

Expression und Charakterisierung von humanem Plasminogen und verschiedener Domänen in *E. coli* und *P. pastoris*

Inauguraldissertation
der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von
Cédric Invernizzi
von Stein AG

Leiter der Arbeit:
PD Dr. J. Schaller
Departement für Chemie und Biochemie

Expression und Charakterisierung von humanem Plasminogen und verschiedener Domänen in *E. coli* und *P. pastoris*

Inauguraldissertation
der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von
Cédric Invernizzi
von Stein AG

Leiter der Arbeit:
PD Dr. J. Schaller
Departement für Chemie und Biochemie

Von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät angenommen.

Bern, den 5. Dezember 2003

Der Dekan:

Prof. Dr. G. Jäger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Plasminogen: Vorkommen und Funktionen	1
1.1.1 Eigenschaften der Immunabwehr	1
1.1.2 Die Hämostase	1
1.1.3 Die Blutkoagulation	2
1.1.4 Das Plasminogensystem	5
1.1.5 Zellinvasion, Metastasierung und Angiogenese	7
1.1.6 Übertragbare spongiforme Encephalopathien (TSE)	8
1.2 Plasminogen: Struktur	10
1.2.1 Allgemeine Merkmale	10
1.2.2 Das N-terminale Peptid	13
1.2.3 Die Kringel	14
1.2.4 Die Serinprotease	16
1.2.5 Der α_2 -Plasmininhibitor	18
1.3 Expressionssysteme: <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i>	19
1.3.1 <i>E. coli</i> : Expression in BL21(DE3)	20
1.3.2 <i>E. coli</i> : Expression in M15[pREP4] und SG13009[pREP4]	20
1.3.3 <i>P. pastoris</i> : Expression in GS115 und KM71	21
1.4 Zielsetzung	23
2 <i>E. coli</i>: Material und Methoden	24
2.1 Molekularbiologie	24
2.1.1 Material	24
2.1.1.1 Bakterienstämme	24
2.1.1.2 Nährmedien	24
2.1.1.3 Antibiotika	25
2.1.1.4 Plasmide	25
2.1.1.5 Enzyme	26
2.1.1.6 Marker	26
2.1.1.7 Primer	26
2.1.1.8 Kits	26
2.1.1.9 Reagenzien, Lösungen und Puffer	27
2.1.1.10 Geräte	27
2.1.2 Methoden	27
2.1.2.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> und deren Sequenzierung	27
2.1.2.2 DNA mit Restriktionsenzymen verdauen	28
2.1.2.3 DNA-Isolation aus Agarosegelen	28
2.1.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.1.2.5 Dephosphorylieren von DNA mit „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP)	29
2.1.2.6 DNA ligieren mit T4 DNA Ligase	29

2.1.2.7	<i>Transformation kompetenter E. coli Zellen</i>	29
2.1.2.7.1	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	29
2.1.2.7.2	Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen	30
2.1.2.8	<i>Expression in E. coli Zellen</i>	30
2.1.2.8.1	Expression in 100 ml LB Medium	30
2.1.2.8.2	Expression in 2 l LB Medium	31
2.1.2.8.3	Expression in 6 l ¹⁵ N-M9 Medium	31
2.2	Proteinchemie	31
2.2.1	Material	31
2.2.1.1	<i>Antikörper</i>	31
2.2.1.2	<i>Marker</i>	31
2.2.1.3	<i>Kits</i>	31
2.2.1.4	<i>Reagenzien, Lösungen und Puffer</i>	32
2.2.1.5	<i>Geräte</i>	33
2.2.2	Methoden	34
2.2.2.1	<i>Aufschluss der Zellen</i>	34
2.2.2.1.1	Denaturierender Zellaufschluss von 10 ml Proben aus Kleinansätzen	34
2.2.2.1.2	Denaturierender Zellaufschluss von Grossansätzen	34
2.2.2.1.3	Nativer Zellaufschluss	34
2.2.2.2	<i>Metallchelataffinitätschromatographie</i>	34
2.2.2.2.1	Binden von Ni ²⁺ -Ionen an chelatbildende Matrizen	34
2.2.2.2.2	pH-abhängige Proteinreinigung mittels Ni-Affinität	35
2.2.2.2.3	Rückfaltende Proteinreinigung mittels Ni-Affinität	36
2.2.2.2.4	Native Proteinreinigung mittels Ni-Affinität	36
2.2.2.3	<i>Affinitätschromatographie auf Lysin-Bio-Gel</i>	36
2.2.2.3.1	Herstellung von Lysin-Bio-Gel	36
2.2.2.3.2	Proteinreinigung mittels Lysinaffinität	37
2.2.2.4	<i>In vitro Transkription / Translation</i>	37
2.2.2.5	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	38
2.2.2.6	<i>Blotten der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen</i>	38
2.2.2.7	<i>Immunnachweis auf PVDF-Membranen mit ECL Plus</i>	38
2.2.2.8	<i>Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)</i>	39
2.2.2.9	<i>Aminosäureanalyse von Proteinen</i>	39
2.2.2.10	<i>Sequenzierung von Proteinen nach Edman</i>	40
2.2.2.11	<i>Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)</i>	41
2.2.2.12	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	41
3	<i>P. pastoris</i>: Material und Methoden	42
3.1	Molekularbiologie	42
3.1.1	Material	42
3.1.1.1	<i>Bakterien- und Hefestämme</i>	42
3.1.1.2	<i>Nährmedien</i>	42
3.1.1.3	<i>Antibiotika</i>	44
3.1.1.4	<i>Plasmide</i>	44
3.1.1.5	<i>Enzyme</i>	44
3.1.1.6	<i>Primer</i>	44
3.1.1.7	<i>Kits</i>	45
3.1.1.8	<i>Reagenzien, Lösungen und Puffer</i>	45
3.1.1.9	<i>Geräte</i>	46
3.1.2	Methoden	46
3.1.2.1	<i>DNA mit Restriktionsenzymen verdauen</i>	46
3.1.2.2	<i>DNA-Isolation aus Agarosegelen</i>	46

3.1.2.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	47
3.1.2.3.1	PCR für die Inserts InNK15 und ExNK15.....	47
3.1.2.3.2	PCR für die Inserts InhPg und ExhPg.....	48
3.1.2.4	<i>DNA phosphorylieren, dephosphorylieren und ligieren</i>	48
3.1.2.5	<i>Transformation von One Shot® TOP10F' Competent Cells</i>	49
3.1.2.6	<i>Transformation von P. pastoris Zellen mit dem Pichia Spheroplast Module</i>	49
3.1.2.6.1	„Spheroplasting“ von P. pastoris Zellen.....	49
3.1.2.6.2	Transformation der Spheroplasten.....	50
3.1.2.7	<i>Selektion der transformierten P. pastoris Zellen</i>	50
3.1.2.8	<i>Isolation genomischer DNA aus P. pastoris Zellen</i>	51
3.1.2.9	<i>Expression in P. pastoris Zellen</i>	51
3.1.2.9.1	Expression von Mut ⁺ -Stämmen im Kleinansatz.....	51
3.1.2.9.2	Expression von Mut ^S -Stämmen im Kleinansatz.....	51
3.1.2.9.3	Expression von Mut ⁺ -Stämmen im Grossansatz.....	51
3.1.2.9.4	Expression von Mut ^S -Stämmen im Grossansatz.....	52
3.2	Proteinchemie	52
3.2.1	Material	52
3.2.1.1	<i>Marker</i>	52
3.2.1.2	<i>Reagenzien, Lösungen und Puffer</i>	52
3.2.2	Methoden	52
3.2.2.1	<i>Probenvorbereitung für SDS-PAGE</i>	52
3.2.2.1.1	Probenvorbereitung der Pellets aus 1 ml Kultur.....	52
3.2.2.1.2	Probenvorbereitung der Überstände aus 1 ml Kultur.....	53
3.2.2.2	<i>Vorbereitung für Lysin-Bio-Gel-Säule</i>	53
3.2.2.2.1	Vorbereitung der Pellets aus Grosskulturen.....	53
3.2.2.2.2	Vorbereitung der Überstände aus Grosskulturen.....	53
3.2.2.3	<i>Immunnachweis auf PVDF-Membranen mit ECL Plus</i>	53
4	E. coli: Resultate	54
4.1	NK15 und K15 in pQE-8 und pET-9a	54
4.1.1	Molekularbiologie	55
4.1.1.1	<i>PCR</i>	55
4.1.1.2	<i>Ligation und Transformation</i>	55
4.1.2	Proteinchemie	56
4.1.2.1	<i>Expression im Kleinansatz</i>	56
4.1.2.2	<i>Expression im Grossansatz</i>	57
4.1.2.3	<i>Versuche zur Optimierung der Isolationsmethoden</i>	60
4.1.2.4	<i>Analyse von HXNK15 aus dem besten Grossansatz</i>	61
4.1.2.5	<i>Expression mit in vitro Transkriptions- / Translationssystemen</i>	64
4.2	NK1 in pQE-8	65
4.2.1	Expression von ¹⁵ N-markiertem NK1.....	65
4.1.2	Bestimmung der Bindungskonstanten.....	67
5	P. pastoris: Resultate	70
5.1	NK15 in pPIC3.5K und pPIC9K	70
5.1.1	Molekularbiologie	71
5.1.1.1	<i>PCR</i>	71
5.1.1.2	<i>Ligation und Transformation in E. coli</i>	72
5.1.1.3	<i>Transformation und Selektion in P. pastoris</i>	73
5.1.2	Proteinchemie	75
5.1.2.1	<i>Expression im Kleinansatz</i>	75

5.2	hPg in pPIC3.5K und pPIC9K.....	77
5.2.1	Molekularbiologie	78
5.2.1.1	PCR	78
5.2.1.2	Ligation und Transformation in <i>E. coli</i>	80
5.2.1.3	Transformation und Selektion in <i>P. pastoris</i>	81
5.2.2	Proteinchemie	82
5.2.2.1	Expression im Kleinansatz	82
5.2.2.2	Expression im Grossansatz	85
5.3	Expression von NK1, NK13 und K45	86
6	Diskussion	90
6.1	<i>E. coli</i>	90
6.2	<i>P. pastoris</i>	93
6.3	Vergleich zwischen <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i>	95
6.4	Ausblick	97
7	Zusammenfassung	98
8	Referenzen	100
9	Curriculum Vitae	107

1 Einleitung

1.1 Plasminogen: Vorkommen und Funktionen

1.1.1 Eigenschaften der Immunabwehr

Das Immunsystem besteht aus Zellen und Molekülen, die kollektiv und koordiniert auf körperfremde Substanzen reagieren und damit die Immunabwehr bilden. Immunität ist somit eine Reaktion auf Mikroben und fremde Moleküle, ohne weitere nachteilige physiologische oder pathologische Folgen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen angeborener („innate“) und spezifischer („specific“) Immunität. Die angeborene Immunität wird auch als natürliche, die spezifische als adaptive Immunität bezeichnet. Die drei Komponenten der angeborenen Immunität sind physikalische und chemische Schranken, Blutproteine, sowie phagocytische Zellen und andere Leukocyten wie die natürlichen Killerzellen. Zur angeborenen Immunität, welche nur begrenzt Mikroben zu unterscheiden vermag und eher stereotypischer Natur ist, gehören die Hämostase, das Komplementsystem und die phagocytierten Zellen. Sie ist wichtig bei Verletzungen sowie in der ersten Phase einer Infektion und kann die spezifische Immunabwehr auslösen. Die spezifische Immunität setzt sich aus Lymphocyten und deren Produkten, den sogenannten Antikörpern, zusammen. Sie zeichnet sich durch eine ausserordentliche Spezifität für genau bestimmte Moleküle aus, kann auf mehrere Arten auf verschiedene Mikroben reagieren und hat die Fähigkeit sich zu „erinnern“, die sogenannte immunologische Erinnerung, was eine schnellere und intensivere Immunantwort auf sich wiederholende Infektionen mit den selben Mikroben zur Folge hat. Die Eigenschaften der angeborenen und spezifischen Immunität sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst [Abbas *et al.* (1997)].

Tabelle 1.1: Eigenschaften der angeborenen und spezifischen Immunität

	<u>Angeborene Immunität</u>	<u>Spezifische Immunität</u>
Spezifität gegen Mikroben:	Relativ schwach	Hoch
Mannigfaltigkeit:	Limitiert	Gross
Spezialisierung:	Relativ stereotypisch	Hoch spezialisiert
Erinnerung:	Nein	Ja
Physikalische & chemische Schranken:	Haut Antimikrobielle Stoffe	Cutanes Immunsystem Sekretierte Antikörper
Blutproteine:	Komplement	Antikörper
Zellen:	Phagocyten Natürliche Killerzellen	B Lymphocyten (humoral) T Lymphocyten (zell-vermittelt)

1.1.2 Die Hämostase

Eine Verletzung ist gleichbedeutend mit der Zerstörung einer physikalischen Schranke, womit die angeborene Immunabwehr in Gang gesetzt wird. Die Blutstillung, die sogenannte Hämostase, ist dabei für das Gleichgewicht zwischen dem Gefässsystem und allen Blutzellen, sowie den Plasmaproteinen und den niedermolekularen Stoffen verantwortlich. Demnach muss sie schnell und dennoch streng kontrolliert ablaufen, um weder Thrombosen noch Blutungen auszulösen. Zur Hämostase gehören die Blutplättchenaktivierung, die Blutgerinnung (Blutkoagulation), sowie die Fibrinolyse. Durch das Zerreißen der Endothelschicht der Gefässwand wird subendotheliales Kollagen freigelegt, woran sich die Blutplättchen, auch Thrombocyten genannt, mittels integralen Membranglykoproteinen oder über Verbindungsproteine wie Fibrinectin oder den von Willebrand Faktor anheften können. Die Blutplättchen und die Gefässwand sezernieren im ersten Moment gefässverengende Substanzen, sogenannte Vasokonstriktoren wie Serotonin, ADP und Adrenalin, die damit den Blutfluss verlangsamen und die Thrombusbildung unterstützen. Nach etwa einer Minute werden aber bereits gefässweiternde Substanzen, sogenannte Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid und Bradykinin, ausgeschüttet, die die anfänglichen Reaktionen eindämmen. Durch die Bindung von ausgeschüttetem ADP

an die Thrombocyten werden Ca^{2+} -Ionen aus den dichten Granula in das Cytosol der Blutplättchen ausgeschüttet, die über Calmodulin und Myosin eine Umwandlung der Thrombocyten von der Scheibenform zur globulären Form zur Folge haben. Die Blutplättchen aggregieren schliesslich durch die Bildung von Thrombospondin- und Fibrinogenbrücken, die mittels Thrombin aus der Blutgerinnungskaskade in ein stabiles Fibrin-Thrombocyten-Netzwerk umgewandelt und mittels aktiviertem Faktor XIIIa kovalent quervernetzt werden. An der gerinnungsfördernden Oberfläche binden, mit Hilfe von negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin, verschiedene Faktoren, die ein Fortschreiten der Gerinnung sichern. Inhibitoren, wie Prostacyclin I_2 / D_2 und ADP-abbauende Nucleotidase, die einer übermässigen Blutplättchenaktivierung entgegenzutreten, werden von intakten Endothelzellen ausgeschüttet und führen zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dies bewirkt eine Verlagerung der Ca^{2+} -Ionen in intrazelluläre Speicher, womit die Calcium-abhängigen Vorgänge blockiert werden und sich somit ein Gleichgewicht wieder einstellen kann [Michal (1999)].

1.1.3 Die Blutkoagulation

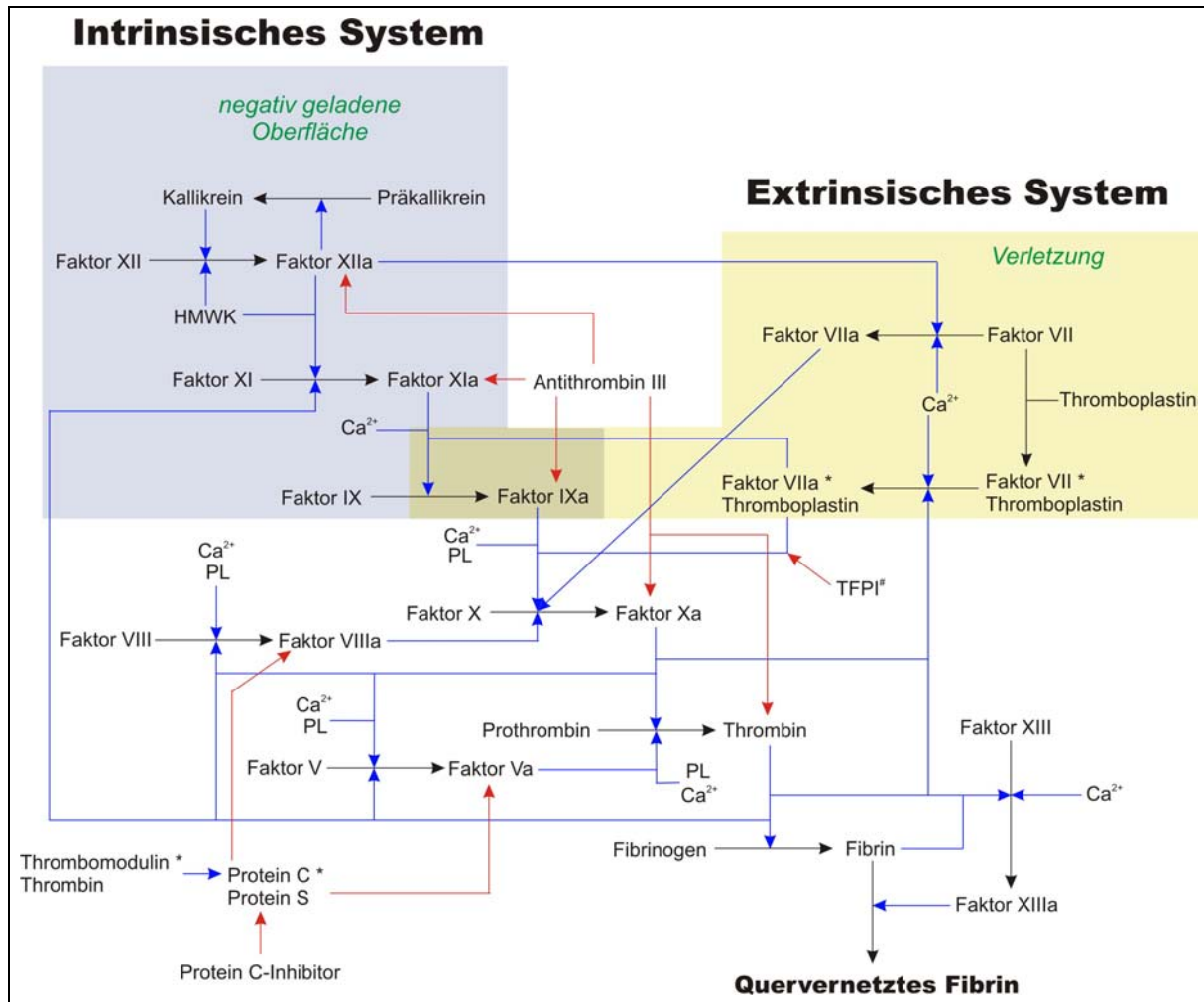
Grundsätzlich gibt es zwei Ereignisse, die die Blutgerinnung, auch als Blutkoagulation bekannt, auslösen können: durch Zugabe von Thromboplastin („tissue factor“) zu Blut wird der sogenannte extrinsische Reaktionsweg eingeschlagen, während durch Kontaktaktivierung der sogenannte intrinsische Reaktionsweg ausgelöst wird. *In vitro* lassen sich die beiden Aktivierungswege unterscheiden, *in vivo* hingegen sind die beiden Systeme eng miteinander verknüpft und laufen praktisch gleichzeitig ab. Dabei ist der extrinsische Reaktionsweg von grosser Bedeutung im Auslösen der Blutgerinnung, während der intrinsische Reaktionsweg wichtig für die weitere Bildung von Fibrin ist. Weil Defekte des ersten intrinsischen Faktors XII im Menschen nicht zu Blutungen führen, wird die Fibrinbildung allerdings kaum über diesen Faktor eingeleitet, sondern vielmehr über eine rückgekoppelte Aktivierung des Faktors XI durch bereits gebildetes Thrombin aus dem extrinsischen Reaktionsweg. Die ursprüngliche Vorstellung zweier unabhängiger Aktivierungskaskaden von Serinproteasen muss heute wohl revidiert werden. Insofern als die beiden Systeme stark vernetzt sind und gegenseitige Rückkopplungsmechanismen aktivierend oder inhibierend auf die Blutkoagulation wirken, funktionieren sie *in vivo* als ein einziges System [Davie *et al.* (1991)].

Eine vereinfachte Darstellung der Blutgerinnung ist in Figur 1.1 zu finden, nähere Angaben zu den einzelnen Faktoren sind in Tabelle 1.2 dargestellt, von denen 6 Vitamin K-abhängig sind: Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Protein C und Protein S. Durch Vitamin K werden bestimmte Glutamate am C_γ carboxyliert, womit γ -Carboxyglutamat (Gla) entsteht, welches Ca^{2+} -Ionen komplexieren kann, die für die einzelnen Reaktionen sehr wichtig sind. Eine K-Avitaminose oder die Verwendung von Vitamin K-Antagonisten verhindern die Reaktionen und können zu gefährlichen Blutungen führen [Michal (1999); Rodak (1995)].

Tabelle 1.2: Faktoren der Blutgerinnung

Faktor	Name ¹	Wirkung auf	Plasmakonzentration	Grösse ²
I	Fibrinogen	XI, XIII, PK	2000 - 4000 mg/l	340 kDa
II	Prothrombin	I, V, VIII, XIII, XIV	100 mg/l	72 kDa
III	Thromboplastin	VII	0 mg/l	45 kDa
IV	Ca^{2+}	diverse	80 ng/l	40 Da
V	Proaccelerin	X	5 mg/l	330 kDa
VII	Prokonvertin	IX, X	0.5 mg/l	50 kDa
VIII	Antihämophiler Faktor	IX	0.2 mg/l	285 kDa
IX	Christmas Faktor	X, VII	5 mg/l	57 kDa
X	Stuart Faktor	II, V, VII, VIII	10 mg/l	59 kDa
XI	Thromboplastin Antezedent	IX	5 mg/l	160 kDa
XII	Hageman Faktor	PK, XI, VII	30 mg/l	80 kDa
XIII	Transglutaminase	I	30 mg/l	320 kDa
XIV	Protein C	V, VIII	5 mg/l	62 kDa
PS	Protein S	XIV	20 mg/l	75 kDa
PK	Plasma Kallikrein	XII, HK	50 mg/l	86 kDa
HK	Hochmolekulares Kininogen	PK, XI	80 mg/l	110 kDa
PL	Phospholipid	diverse	0 mg/l	x100 Da

1: Eines der vielen Synonyme wurde verwendet. 2: Abschätzung aus SDS-PAGE Analyse ausser IV und PL.



Figur 1.1: Vereinfachte schematische Darstellung der Blutkoagulation. Gräulicher Hintergrund: Intrinsisches System mit dem Kontakt zu einer negativ geladenen Oberfläche als Auslöser der Blutgerinnung (Kontaktaktivierung). Gelblicher Hintergrund: Extrinsisches System mit Thromboplastin als Auslöser der Blutgerinnung (Thromboplastinaktivierung). Die untere Hälfte entspricht dem üblichen Reaktionsweg der Blutkoagulation, der von beiden Systemen benutzt wird. Schwarze Pfeile: X reagiert und wird zu Y. Blaue Pfeile: Aktivierung / Katalyse der entsprechenden Reaktion. Rote Pfeile: Inhibition oder Degradation des jeweiligen Proteins. *: X im Komplex mit Y. HMWK: Hochmolekulares Kininogen. PL: Phospholipide. TFPI: "tissue factor pathway inhibitor" auch bekannt als Lipoprotein-assoziiierter Koagulationsinhibitor (LACI). #: TFPI inhibiert nur den Faktor VIIa-Thromboplastin-Faktor X-Komplex nicht jedoch jenen Komplex mit Faktor IX.

Im extrinsischen System wird Thromboplastin als Auslöser der Blutkoagulation benötigt, welches als integrales Membranprotein an der Gefäßwand-abgewandten Oberfläche der Endothelzellen mit Phospholipid assoziiert vorkommt und eine hohe Affinität für Faktor VII des Blutplasmas besitzt. Demnach bilden Thromboplastin und das in den Hepatocyten synthetisierte Zymogen Faktor VII einen Komplex in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen, woraus in einem autokatalytischen Prozess die aktive Serinprotease Faktor VIIa gebildet wird. Die Autokatalyse wird mit Hilfe von Spuren an vorhandenem Faktor VIIa initiiert, womit die rasche Produktion an grossen Mengen Faktor VIIa gewährleistet ist [Yamamoto *et al.* (1992); Nakagaki *et al.* (1991)]. Im weiteren Verlauf wirken Faktor Xa, Thrombin (Faktor IIa) und Faktor IXa fördernd auf die Konvertierung zu aktivem Faktor VIIa-Thromboplastin-Komplex, welcher seinerseits auf der Membranoberfläche Faktor X zur aktiven Serinprotease Faktor Xa prozessiert. In Plasma zirkulierender Faktor V wird durch Faktor Xa und später auch durch Thrombin zum aktiven Faktor Va geschnitten und assoziiert unter mithilfe von Ca²⁺-Ionen und Phospholipiden auf der Membranoberfläche mit Faktor Xa und Prothrombin zum sogenannten Prothrombinase-Komplex [Tracy *et al.* (1981)]. Dabei bleibt der N-terminale Teil des Prothrombins am Phospholipid hängen und die C-terminale Serinprotease Thrombin wird freigesetzt, welche Fibrinogen zu Fibrin verdaut.

Fibrinogen ist aus 3 verschiedenen Kettenarten aufgebaut, die als α -, β - und γ -Ketten bezeichnet werden (Figur 1.3). Die drei Ketten sind miteinander verdreht und bilden mit einer zweiten identischen

Kettenstruktur des Fibrinogen, welches mit 29 Disulfidbrücken zusammengehalten wird. Thrombin spaltet je 2 N-terminale Peptide der α - und β -Ketten ab, die sogenannten Fibrinopeptide A und B. Die Fibrinmoleküle sind nun polymerisationsfähig, wobei die neuen α - und β -Ketten-Termini an die sogenannte D-Domäne der verschiedenen nächstgelegenen Fibrinmonomere binden und somit ein unlöslicher Fibrinpfropf entsteht [Laudano und Doolittle (1980); Blomback und Blomback (1972)]. Die Generierung von Fibrin stimuliert die Aktivierung von Faktor XIII durch Thrombin zur Transglutaminase, die zwischen α - und γ -Ketten zweier benachbarter Fibrinmonomeren Isopeptidbindungen (ϵ -(γ -Glutamyl)lysyl-Bindungen) produziert und damit den ganzen Fibrinpfropf kovalent quervernetzt [Folk und Finlayson (1977)]. Zusätzlich werden Fibronectin und α_2 -Plasmininhibitor miteingebaut, letzteres um den Abbau des Fibrins durch Plasmin zu verhindern, wie später noch beschrieben.

Wenn wenig Thromboplastin vorhanden ist, wird vom Faktor VIIa-Thromboplastin-Komplex vermehrt Faktor IX statt Faktor X aktiviert, da die K_m - und v_{max} -Werte beider Aktivierungsreaktionen mit der Konzentration an Thromboplastin variieren [Komiya *et al.* (1990)]. Faktor VIII zirkuliert im Plasma als Komplex mit dem von Willebrand Faktor und wird nach Aktivierung durch Faktor Xa oder Thrombin zu Faktor VIIIa, der Ca^{2+} -Ionen- und Phospholipid-abhängig an Membranen bindet [Eaton *et al.* (1986)]. Die auf der Zelloberfläche generierte Serinprotease Faktor IXa bindet an Faktor VIIIa und vermag dort Faktor X, im sogenannten Tenase-Komplex, in die aktive Form zu spalten. Dieser mögliche Weg über Faktor IX trägt zur Wichtigkeit des extrinsischen Systems wesentlich bei, da aus früheren Studien die Faktor IX-Aktivierung nur dem intrinsischen System zuerkannt wurde.

Aufgrund des im Plasma vorkommenden Lipoprotein-assoziierten Koagulationsinhibitors (LACI, auch TFPI „tissue factor pathway inhibitor“ genannt) scheint das extrinsische System aber nur kurzlebig zu sein, weil er den Faktor VIIa-Thromboplastin-Faktor Xa-Komplex bindet und hemmt [Broze, Jr. *et al.* (1990)]. Dennoch ist es möglich über das extrinsische System den Weg über die Faktor IX-Aktivierung einzuschlagen, um die Blutkoagulation voranzutreiben. Aber das intrinsische System scheint hier zunehmend wichtiger zu werden, weil Faktor XI durch entstehendes Thrombin aktiviert wird [Naito und Fujikawa (1991)]. Die Prozessierung läuft Ca^{2+} -Ionen- und Phospholipid-abhängig ab, indem hochmolekulares Kininogen den Faktor XI an die Membran bindet, und führt zur Bildung der Serinprotease Faktor XIa als Homodimer. Die Prozessierung von Faktor IX durch Faktor XIa unter Mitwirkung von Ca^{2+} -Ionen, sowie die Reaktion von Thrombin mit Fibrinogen, sind die einzigen Reaktionen der Blutkoagulationskaskade, die frei im Plasma ablaufen [Di Scipio *et al.* (1978)]. Faktor IXa kann anschließend wie oben beschrieben im Tenase-Komplex seine Wirkung entfalten.

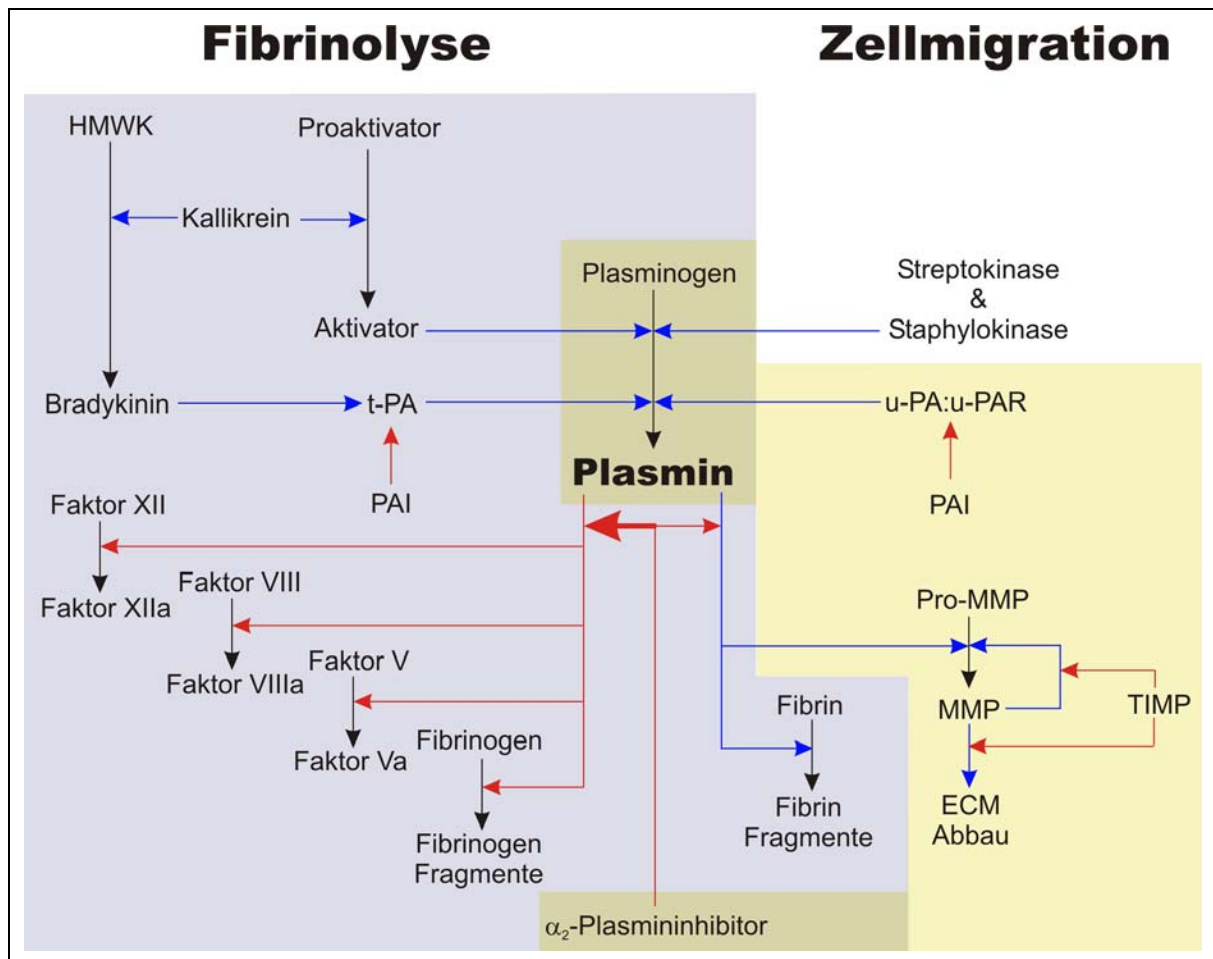
Die Aktivierung von Faktor XI durch Faktor XIIa scheint nur *in vitro* von grösserer Bedeutung zu sein, denn im Menschen führen Defekte an Faktor XII zu keinen nennenswerten Problemen, hingegen wirken sich Faktor XI Defekte schwerwiegend auf die Blutgerinnung aus. Trotzdem kann der intrinsische Reaktionsweg über Faktor XII, welcher im Zusammenwirken mit hochmolekularem Kininogen und Präkallikrein aktiviert werden kann, im Falle einer Kontaktaktivierung durch beispielsweise eine künstliche Herzklappe wichtig sein [Davie *et al.* (1991)]. Zudem aktiviert Faktor XIIa direkt den Faktor VII zu Faktor VIIa, ohne dass sich dieser im Komplex mit Thromboplastin befindet und demnach auch nicht von TFPI gehemmt wird. Der entstandene Faktor VIIa kann wie oben beschrieben Faktor X aktivieren und somit das intrinsische System weiter unterstützen [Rodak (1995)].

Nebst dem TFPI sind weitere Inhibitoren der Blutgerinnung im Plasma vorhanden, wie beispielsweise das Serpin Antithrombin III, welches Thrombin, Faktor IXa, Faktor Xa, Faktor XIa und Faktor XIIa hemmt [Kurachi und Davie (1977); Kurachi *et al.* (1976); Rosenberg und Damus (1973)]. Die Wirkung dieses Serinproteaseinhibitors ist nicht besonders schnell, jedoch in Gebieten intakter Endothelzellen, die heparinoide Moleküle auf der Oberfläche präsentieren, ist die Reaktion sehr heftig und verhindert damit eine Ausbreitung der Blutkoagulation. Weitere Inhibitoren sind α_2 -Macroglobulin, sowie die Serpine Heparin-Cofaktor II, C1-Inhibitor, α_1 -Antitrypsin und aktivierter Protein C-Inhibitor. Letzterer inaktiviert Protein C, welches mit Protein S als Cofaktor, die beiden Faktoren Va und VIIIa proteolytisch inaktiviert. Protein C wird nämlich von an Thrombomodulin-komplexiertem Thrombin aktiviert, welches damit vom Prokoagulant zum Antikoagulant umfunktioniert wird. Protein C scheint zudem auch ein Bindeglied zwischen der Blutgerinnung und dem Entzündungssystem (u.a. auch dem Komplementsystem) zu sein [Esmon (1987)].

Das Inhibitionssystem sowie die Limitierung der meisten Reaktionen der Blutkoagulationskaskaden auf die Membranoberflächen des verletzten Gewebes und der aktivierten Blutplättchen verhindert eine Ausbreitung der proteolytischen Aktivitäten über das ganze Blutzirkulationssystem und begrenzt damit die Blutgerinnung genau auf den Ort der ursprünglichen Verletzung. Die verschiedenen Wechselwirkungen (Figur 1.1) zeigen wie komplex und vernetzt die ganze Blutkoagulation ist und dass die einzelnen Abläufe noch besser erforscht werden müssen [Michal (1999); Rodak (1995); Voet und Voet (1995); Loscalzo und Schafer (1994); Tuddenham und Cooper (1994); Davie *et al.* (1991); Davie *et al.* (1979)].

1.1.4 Das Plasminogensystem

Die zum Plasminogensystem gehörende Fibrinolyse, welche in dynamischem Gleichgewicht mit der Blutkoagulation ist, besteht primär aus einer Reaktion zwischen dem quervernetzten Fibrin und der Serinprotease Plasmin (Figur 1.2). Das Zymogen Plasminogen kann dabei von verschiedenen Aktivatoren zu Plasmin prozessiert werden. Grundsätzlich unterscheidet man die Aktivierung durch den gewebsspezifischen Plasminogenaktivator (t-PA) vom Urokinase Plasminogenaktivator (u-PA), doch zusätzlich kann Plasminogen durch Streptokinase oder Staphylokinase über eine pathogene Invasion zu aktivem Plasmin umgewandelt werden. Zudem wurde ein noch nicht weiter charakterisierter Aktivator beschrieben.



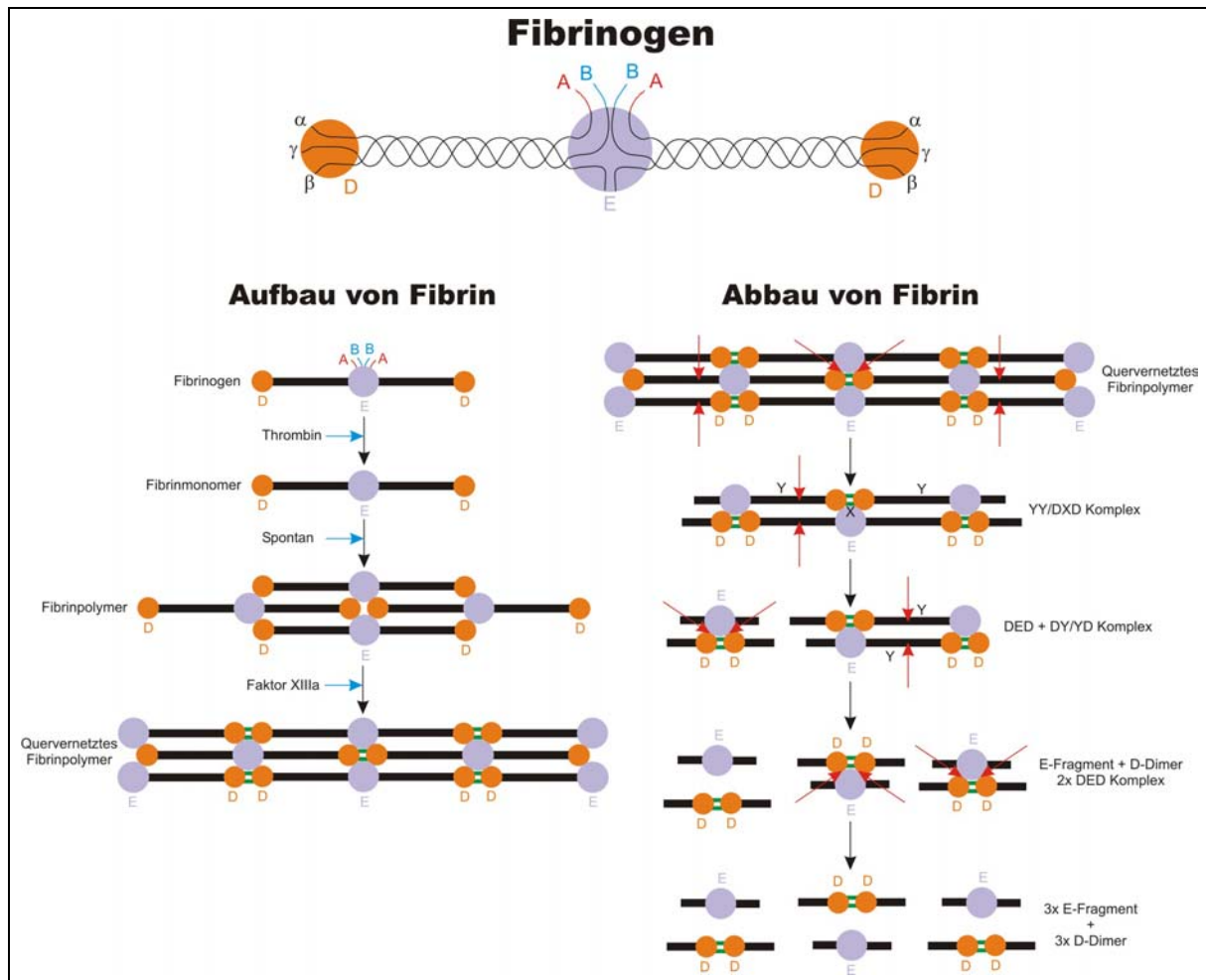
Figur 1.2 Vereinfachte schematische Darstellung des Plasminogensystems. Gräulicher Hintergrund: Fibrinolyse. Gelblicher Hintergrund: Zellmigrationssystem. Schwarze Pfeile: X reagiert und wird zu Y. Blaue Pfeile: Aktivierung / Katalyse der entsprechenden Reaktion. Rote Pfeile: Inhibition oder Degradation des jeweiligen Proteins. Roter dicker Pfeil von α_2 -Plasmininhibitor: Schnelle Inhibition (0.1 Sekunden). Roter dünner Pfeil von α_2 -Plasmininhibitor: Langsame Inhibition (5 Sekunden). HMWK: Hochmolekulares Kininogen. t-PA: Gewebsspezifischer Plasminogenaktivator. u-PA: Urokinase Plasminogenaktivator. u-PAR: u-PA-Rezeptor. PAI: Plasminogenaktivatorinhibitor (mehrere Typen). Pro-MMP: Latente Matrixmetalloproteinasen. MMP: Matrixmetalloproteinasen. TIMP: Gewebeinhibitor von MMP. ECM: Extrazelluläre Matrix.

t-PA und u-PA werden als einkettige Proteine synthetisiert (sc-t-PA und scu-PA) und zu zweikettigen Proteinen prozessiert (tct-PA und tcu-PA). Beide Aktivatoren haben unterschiedliche Rollen in der Plasminogenaktivierung, indem durch t-PA primär Plasmin für den Abbau von Fibrin bereitgestellt wird, während der u-PA für zellmigratorische und gewebsumstrukturierende Prozesse verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang wird u-PA an membrangebundene, zelluläre u-PA Rezeptoren (u-PAR) gebunden, wodurch dort lokal Plasminogen zu Plasmin prozessiert wird, welches seinerseits Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in Gang setzt, die die extrazelluläre Matrix abbauen und damit eine Zellwanderung oder eine Neuordnung des Gewebes ermöglichen. Damit scheint die Plasminogenakti-

vierung eine nicht zu unterschätzende Rolle in den Prozessen der Angiogenese und der Metastasebildung von Tumoren (siehe auch Kapitel 1.1.5) zu spielen [Collen (2001)].

Streptokinase bildet einen Komplex mit Plasminogen, welcher andere Plasminogenmoleküle zu Plasmin aktiviert und nicht durch die natürlichen Inhibitoren gehemmt werden kann. Der Komplex unterscheidet nicht zwischen freiem und an Fibrin-gebundenem Plasminogen, womit ein sogenannter „system-lytischer Zustand“ erreicht wird. Staphylokinase bildet ebenfalls einen Komplex mit Plasminogen, der aktivierend auf andere Plasminogenmoleküle wirkt, reagiert aber spezifisch mit Fibrin-gebundenem und kaum mit freiem Plasminogen [Collen (2001)].

Viele dieser Plasminogenaktivatoren werden therapeutisch im Falle von Herzinfarkt oder ähnlichen Krankheiten benutzt. Zur Anwendung kommen Alteplase (rekombinanter t-PA), Reteplase (rekombinanter t-PA mit Deletion), Tenecteplase (rekombinanter t-PA mit mehreren Substitutionen), sowie Streptokinase und Staphylokinase (zum Teil noch in der klinischen Testphase).



Figur 1.3: **Struktur von Fibrinogen - Aufbau und Abbau von Fibrin.** Fibrinogen: Je 2 α -, β -, und γ -Ketten mit D-Domänen (orange) und E-Domäne (lila), sowie den Fibrinopeptiden A (rot) und B (blau). Aufbau von Fibrin: Die blauen Pfeile bezeichnen eine proteolytische Spaltung oder Vernetzung. Abbau von Fibrin: Die roten Pfeile bezeichnen die Stellen proteolytischer Spaltung durch Plasmin.

In der Fibrinolyse, d.h. dem Abbau von quervernetztem Fibrin durch die Serinprotease Plasmin, werden auch Fibrinogen, Faktor Va, Faktor VIIIa und Faktor XIIa, sowie Proteine des Komplementsystems proteolytisch angegriffen und abgebaut. Gestartet wird die Fibrinolyse durch t-PA, der laufend von den Endothelzellen sekretiert wird und über Lysin-bindende Kringelstrukturen an verschiedene Lysinreste von Fibrin bindet [Ritchie *et al.* (2000)]. Damit wird Plasminogen nur in der Nähe von Fibrin durch den t-PA zur aktiven Serinprotease Plasmin umgewandelt und kann seine proteolytische Aktivität auf den Fibrinpfropf entfalten. Überdies wird durch Plasmin der einkettige scu-PA zur zweikettigen, jedoch nicht aktiveren Form tct-PA geschnitten [Michal (1999)].

Ein zweiter Auslöser der Fibrinolyse ist Kallikrein, bekannt aus der Blutkoagulation. Dabei wandelt es einen Proaktivator zu einem aktiven Plasminogenaktivator um, aktiviert den einkettigen scu-PA zum

zweikettigen t-PA und spaltet zudem hochmolekulares Kininogen (HMWK) zu Bradykinin, welches die Freisetzung von weiterem t-PA fördert [Michal (1999)].

Die Zerstörung des quervernetzten Fibrins durch Plasmin (Figur 1.3) setzt als erstes drei sogenannte E-Domänen sowie drei vernetzte D-Domänen frei. Dieses sogenannte YY/DXD-Fragment wird weiter in ein DED- und ein vernetztes DY/YD-Fragment prozessiert. Letzteres wird ebenfalls in zwei DED-Fragmente zerschnitten, die schliesslich von Plasmin zu E-Fragmenten und D-Dimeren abgebaut werden [Rodak (1995)].

Zu Beginn der proteolytischen Reaktion von Plasmin wird die grösste Aktivität auf der Oberfläche des quervernetzten Fibrins beobachtet, die anschliessend immer heftiger wird und nach innen gerichtet ist. Dies wird verständlich durch die Beobachtung, dass Plasmin vorzugsweise nach Lysin schneidet und somit neue C-terminale Lysinreste im Fibrin freisetzt, die, aufgrund der hohen Lysinaffinität von mehreren Kringeln, zusätzliche Bindungsstellen für Plasmin darstellen [Rijken und Sakharov (2001)]. Durch das Binden des Plasmins an die C-terminalen Lysinreste des Fibrins wird die Inhibition durch den α_2 -Plasmininhibitor um das fünfzigfache verlangsamt, nämlich auf etwa 5 Sekunden im Vergleich zu 0.1 Sekunden im Falle von freiem Plasmin im Plasma [Favier *et al.* (2001)]. Demnach wird durch diese Bindung möglicherweise eine Konformation des Plasmins eingenommen, die die katalytische Domäne vor der Inaktivierung durch den α_2 -Plasmininhibitor schützt, womit dem Plasmin eine kurze Zeit bleibt, um Fibrin zu spalten [Collen (2001)].

Das inhibitorische System der Fibrinolyse besteht hauptsächlich aus 4 Proteinen: α_2 -Plasmininhibitor (auch als α_2 -Antiplasmin bekannt), α_2 -Makroglobulin, sowie Plasminogenaktivatorinhibitoren 1 und 2 (PAI-1 und PAI-2) [Rijken und Sakharov (2001)]. Der α_2 -Plasmininhibitor sowie in geringerem Ausmass α_2 -Makroglobulin hemmen Plasmin, während PAI-1 die beiden Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA inhibiert. PAI-1 befindet sich in einer inaktiv-latenten Form im Plasma und wird durch Phospholipide sowie durch Wechselwirkung mit Vitronectin reaktiviert [Montuori *et al.* (2002)]. Eine erhöhte Konzentration an PAI-1 konnte in mehreren Krankheitsbildern nachgewiesen werden, wie beispielsweise in venösen Thromboembolien, Fettleibigkeit und koronar-arteriellen Krankheiten. Zudem zeigte sich, dass die Herzinfarktwahrscheinlichkeit, die um 8 Uhr morgens am höchsten ist, mit der höchsten sich im Tagesverlauf ändernden Konzentration an PAI-1 korreliert [Collen (2001)]. Die Aufgabe von PAI-2 scheint nicht primär die Inhibition der Plasminogenaktivatoren zu sein, denn die Bindungseffizienz an u-PA ist etwa fünfzehnmal geringer als jene von PAI-1. Zudem wird nur ein kleiner Anteil in glykosylierter Form sekretiert und Dickinson *et al.* (1995) konnten einen Schutz von PAI-2 gegen Tumornecrosefaktor- α -induzierte (TNF- α) Apoptose beobachten.

Der Begriff Plasminogensystem wird den oben erläuterten Mechanismen gerechter als der Ausdruck Fibrinolyse, weil damit auch die Zusammenhänge, an welchen Plasminogen sonst noch beteiligt ist, zum Tragen kommen. Die Aufgaben von Plasmin beschränken sich nicht nur auf den Verdau von Fibrin und von Faktoren der Blutkoagulationskaskade sowie der Förderung der Zellmigration, sondern reichen auch hin bis zur Aktivierung verschiedener Proteine des Komplementsystems wie C1, C3 und C5 sowie zur Inaktivierung des C1-Inhibitors. Aus all diesen Beobachtungen wird klar, dass noch viel Forschungstätigkeit nötig ist, um das Plasminogensystem zu verstehen und die Verbindungen zu anderen Systemen deutlicher aufzuzeigen [Collen (2001); Rijken und Sakharov (2001); Michal (1999); Rodak (1995); Voet und Voet (1995); Tuddenham und Cooper (1994); Castellino und Powell (1981)].

1.1.5 Zellinvasion, Metastasierung und Angiogenese

Indem Plasmin Matrixmetalloproteinasen aktiviert, die ihrerseits die extrazelluläre Matrix abbauen, ist das Plasminogensystem auch wichtig für die Zellmigration. Die Matrix besteht aus verschiedensten Proteinen und Polysacchariden, die von den umliegenden Zellen wie Fibroblasten, Mastzellen und Makrophagen sekretiert und in einem grösseren Netzwerk angeordnet werden. Die Hauptbestandteile sind Kollagen, Elastin, Laminin und Fibronectin, sowie Glykosaminoglycane, Proteoglycane und Glykoproteine [Alberts *et al.* (1994)]. Diese Proteine und Polysaccharide werden degradiert, um die Zellmigration zu ermöglichen.

Tumorzellen machen sich bei einer Gewebsinvasion diesen Mechanismus zu Nutzen, der ihnen schliesslich zur Metastasierung verhilft [Moscatelli und Rifkin (1988)]. Damit die Tumorzellen weiter wachsen können, müssen sie mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Durch den Vorgang der Angiogenese werden neue Blutgefässe ausgebildet, indem die Endothelzellen, unter Mitwirkung des u-PA:u-PAR-aktivierten Plasminogens, vom bestehenden Gefässsystem aus in die extrazelluläre Matrix vordringen.

Ein endogener Inhibitor der Angiogenese ist Angiostatin, welches das Wachstum der Endothelzellen hemmt [Folkman (1995); O'Reilly *et al.* (1994)]. Angiostatin entspricht dem Plasminogenfragment Kringel 1 - 4. Es kann auch *in vitro* aus humanem Plasminogen durch limitierte Proteolyse mit Elastase gewonnen werden und hemmt *in vivo* die Angiogenese. Im Gegensatz dazu kann keine angiostatische Wirkung von humanem Plasminogen nachgewiesen werden. Einzelne und kombinierte Kringeldomänen wurden auf ihre angiostatische Wirkung getestet, wobei die beiden Kringel K2 und K3 zusammen die höchste Wirkung zeigten. Da diese beiden Kringel eine viel geringere Affinität zu Lysin haben als dies von Kringel 1 und Kringel 4 der Fall ist, muss angenommen werden, dass die angiostatische Wirkung nichts mit den Lysinbindungsstellen (LBS) zu tun hat [Cao *et al.* (1996)]. Nach Erkenntnissen von Ji *et al.* (1998b) ist das Kringel 1 - 3 Fragment für die Hemmung der Zellproliferation und Kringel 4 für die Inhibition der Zellmigration verantwortlich. Zudem haben Kassam *et al.* (2001) zeigen können, dass Plasmin in einer autoproteolytischen Reaktion inaktiviert wird, wobei ein 61 kDa grosses Fragment entsteht, bestehend aus K1 - 4 von Lysin⁷⁸ bis Lysin⁴⁶⁸. Dieses Plasminfragment zeigt anti-angiogenetische Wirkung wie Angiostatin. Dies würde heissen, dass der normale „Plasmin-durchsatz“ in nicht-pathologischer Umgebung angiostatisch-wirkende Fragmente erzeugt.

Interessanterweise zeigt auch Kringel 5 von humanem Plasminogen angiostatische Aktivität. Von Cao *et al.* (1997) wurde K5 als spezifischer Inhibitor der endothelien Zellproliferation identifiziert, der wirksamer als Angiostatin ist. Zudem konnten Ji *et al.* (1998a) eine Hemmung der endothelien Zellmigration durch K5 nachweisen, die vergleichbar mit Angiostatin und anscheinend von der LBS unabhängig ist.

1.1.6 Übertragbare spongiforme Encephalopathien (TSE)

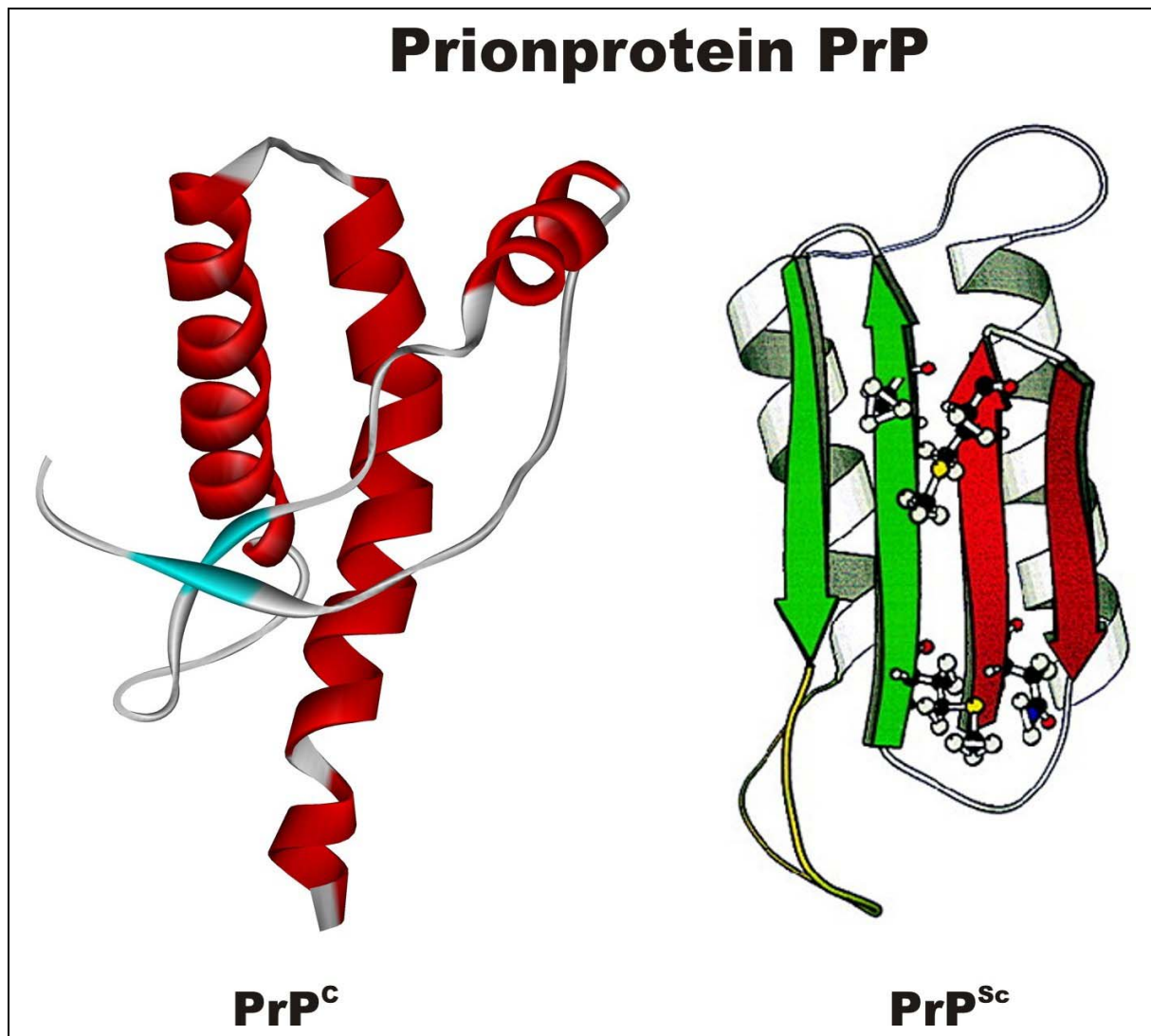
Prionen scheinen verantwortlich für das Krankheitsbild von übertragbaren spongiformen Encephalopathien („transmissible spongiform encephalopathies“ TSE) zu sein. Dabei wird das Hirn von diesem Nukleinsäure-freien Erreger innert kurzer Zeit total degeneriert und führt nach 3 bis 12 Monaten zum Tod, ohne jegliche Immunreaktion. Die Krankheit ist bei mehreren Tierarten, wie beispielsweise beim Rind unter dem Namen BSE oder „Rinderwahnsinn“, sowie auch beim Menschen bekannt. Die humanen TSE-Varianten unterteilt man in vererbte („fatale familiäre Insomnie“ FFI, „Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom“ GSS und „familiäre Creutzfeldt-Jakob Krankheit“ fCJD), sporadisch auftretende („sporadische Creutzfeldt-Jakob Krankheit“ sCJD) und infektiöse Formen (Kuru und „neue Variante der Creutzfeldt-Jakob Krankheit“ vCJD) [Prusiner (1998)]. Die infektiöse Form vCJD ist erst seit einigen Jahren bekannt und unterscheidet sich zur herkömmlichen CJD, indem die Krankheit viel früher und nicht erst mit über 60 Jahren auftritt. Ob diese Krankheit vom Rind auf den Menschen übertragen wurde, ist weiterhin umstritten.

Das Prionprotein PrP kommt in der sogenannten PrP^C-Form in hohen Konzentrationen an der Zelloberfläche der Synapsen als GPI-verankertes Glykoprotein vor [Stahl *et al.* (1990)]. Der Verdacht hat sich in den letzten Jahren erhärtet, dass die α -Helix-reiche PrP^C-Form in einem posttranslationalen Prozess zu einer konformereren, Proteinase K-resistenten, β -Faltblatt-reichen PrP^{Sc}-Form konvertiert wird (Figur 1.4). PrP^{Sc} ist im Gegensatz zu PrP^C häufig in oligomerisierter Form als stäbchenförmige Aggregate im Hirn von Patienten zu finden [Prusiner (1998)]. Offensichtlich scheint mindestens ein weiteres Protein, als „Protein X“ bezeichnet, an dieser konformationellen Umwandlung beteiligt zu sein [Cohen und Prusiner (1998)]. Mittlerweile wurden auch schon verschiedene Strukturdaten des PrP^C veröffentlicht, von der PrP^{Sc}-Form fehlen hingegen bis heute solche Daten und man stützt sich weiterhin auf berechnete Modelle (Figur 1.4) [Prusiner (1998)].

Fischer *et al.* (2000) veröffentlichten Daten, nach denen offensichtlich ein Protein gefunden worden war, welches zwischen den beiden Konformeren unterscheiden konnte. Dabei handelte es sich um Plasminogen, welches über eine der ersten 3 Kringeldomänen, höchstwahrscheinlich Kringel 1, an die PrP^{Sc}-Form band, wobei diese Wechselwirkung unter Zugabe von Lysin unterbunden wurde. Allerdings konnte diese spezifische Wechselwirkung nur unter Inkubationsbedingungen nachgewiesen werden, in welchen zusätzlich noch nicht-infektiöses Hirnhomogenat beigemischt wurde. Demnach wurde Plasminogen, unter eventueller Mitwirkung von anderen „Faktoren“, als erstes endogenes Protein betrachtet, welches zwischen beiden Konformeren unterscheiden konnte.

Von Ellis *et al.* (2002) wurden diese Befunde genauer untersucht, wobei sie aber ihre Versuche mit sogenanntem rekombinantem holo-PrP und apo-PrP durchführten. Das holo-PrP entspricht in etwa der PrP^C-Form, welche Cu²⁺-Ionen höchstwahrscheinlich an den 4 „Oktarepeats“ der Sequenz (PHGGGWGQ)₄ bindet, während das apo-PrP der PrP^{Sc}-Form gleicht und kein Cu²⁺ koordiniert [Brown *et al.* (2001); Wong *et al.* (2001); Viles *et al.* (1999)]. Getestet wurde die Plasminogenaktivierung durch u-PA und t-PA unter Zugabe von holo-PrP und apo-PrP. Keines der beiden PrP zeigte eine

Wirkung auf die Aktivierung durch u-PA, jedoch konnte eine Stimulation der Aktivierung durch t-PA um fast das 300-fache erzielt werden, wenn mit apo-PrP, jedoch nicht mit holo-PrP, inkubiert wurde. Weitere Bindungsstudien zeigten, dass die erhöhte Aktivierungseigenschaft, nebst der Bindung von Plasminogen über die Lysinbindungsstellen (LBS), abhängig von einer hoch-spezifischen Wechselwirkung zwischen t-PA und apo-PrP war. Kinetische Studien liessen vermuten, dass apo-PrP zwei von einander getrennte Bindungsstellen sowohl für t-PA als auch für Plasminogen besitzt. Demnach ist die Bindung von Plasminogen an PrP nicht unbedingt spezifisch für PrP^{Sc}, sondern von der Absenz von Cu²⁺-Ionen abhängig. *In vivo* konnte nämlich nachgewiesen werden, dass PrP^{Sc} eine Präferenz für Mn²⁺ und Zn²⁺ hat [Wong *et al.* (2001); Brown *et al.* (2000)]. Der mögliche Verlust von Cu²⁺ bei der Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} könnte die t-PA-katalysierte Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin zur Folge haben, was wiederum Auswirkungen auf das Krankheitsbild haben könnte. Dies scheint insofern eine realistische These zu sein, da sowohl t-PA als auch Plasminogen von Neuronen exprimiert werden und demnach im Hirn vorkommen [Basham und Seeds (2001); Tsirka *et al.* (1997); Verrall und Seeds (1988)].



Figur 1.4: **3D-Struktur von humanem Prionprotein.** PrP^C: NMR-Struktur des humanen Prionproteinfragments 90 - 230 in der „normalen“ Form bestehend aus 40% α -Helix und 5% β -Faltblatt. PrP^{Sc}: Berechnete Struktur des humanen Prionproteins in der pathologischen Form bestehend aus 30% α -Helix und 45% β -Faltblatt. Spiralen: α -Helix-Struktur. Pfeile: β -Faltblatt-Struktur.

1.2 Plasminogen: Struktur

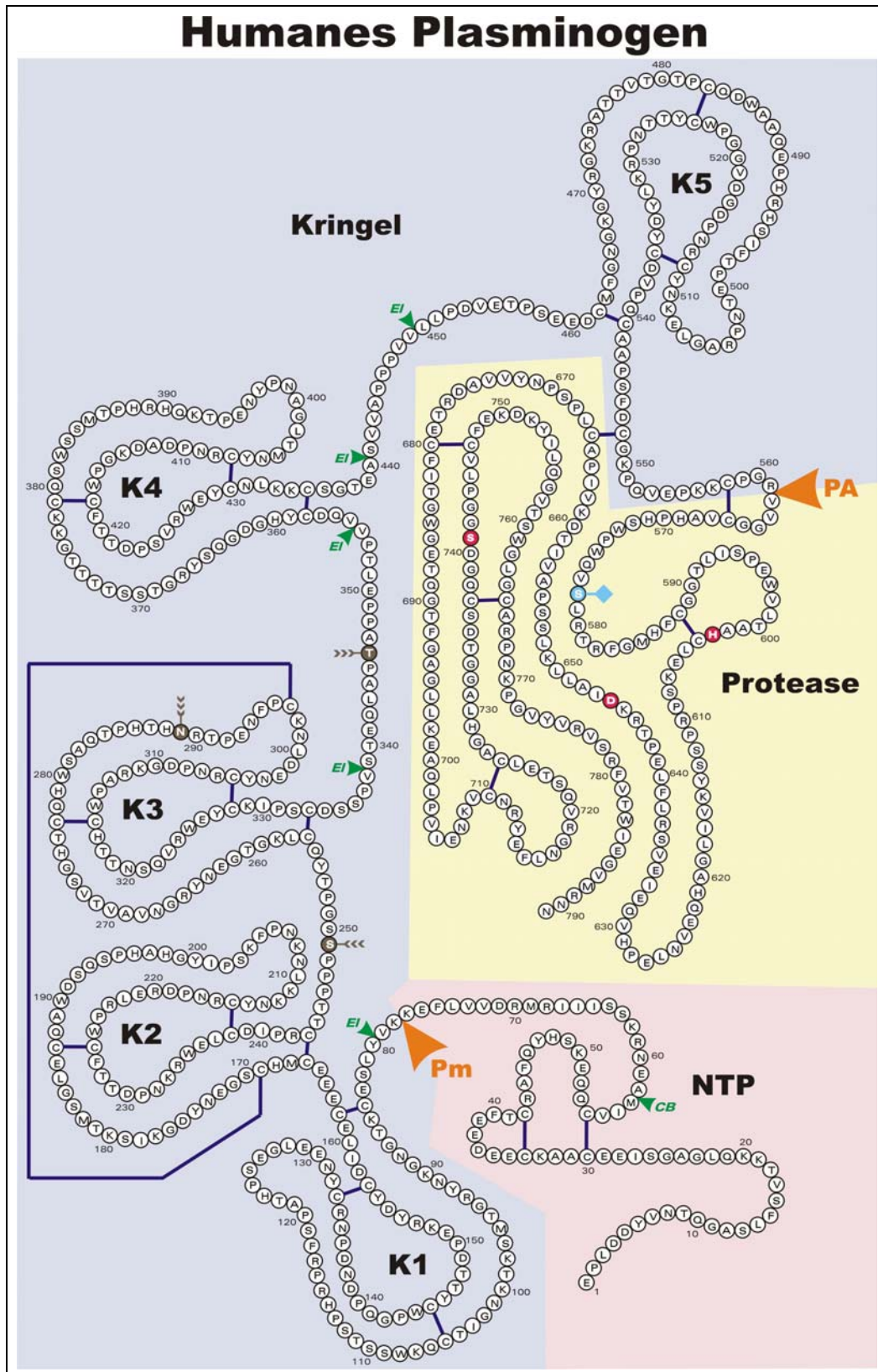
1.2.1 Allgemeine Merkmale

Das ubiquitäre Plasminogen wird im Menschen von vielen Zellarten exprimiert, doch die höchste Syntheserate wird von Hepatocyten der Leber erzielt, die den Serinproteasevorläufer in Mengen von 70 bis zu 200 mg/l Plasma ins Blut sekretieren. Aufgrund der elektrophoretischen Mobilität von Plasminogen gehört es zur Familie der β -Globuline. Wie schon im Kapitel 1.1 zum Ausdruck kam, kann Plasminogen von diversen Aktivatoren zur Serinprotease Plasmin prozessiert werden, welche ihrerseits verschiedenste Substrate durch Hydrolyse nach Lysyl- und Arginyl-Bindungen aktiviert oder degradiert [Castellino und Powell (1981)]. Das Gen des humanen Plasminogens befindet sich auf dem Strang 1 des Chromosoms 6, enthält 19 Exons und erstreckt sich über 51'055 Basen, während die mRNA im Gegensatz dazu nur noch aus 2732 Basen besteht. Eine ähnliche Anordnung der Kringel-codierenden Exons findet man auch in anderen Genen von Proteinen mit Kringelstrukturen, sodass anzunehmen ist, dass „gene shuffling“ zur Verbreitung der Kringelstrukturen beigetragen hat [Patthy (1985)]. Eine N-terminale Exportsignalsequenz von 19 Aminosäuren führt zum Export des Proplasminogens ins Endoplasmatische Reticulum (ER), wo diese prozessiert und das native Plasminogen nach posttranslationalen Modifikationen im Golgi-Apparat sekretiert wird.

Plasminogen ist ein einkettiges, globuläres Glykoprotein mit 791 Aminosäuren. Die Struktur kann in drei Einheiten eingeteilt werden: das N-terminale Peptid (NTP), die 5 Kringel und die Serinproteasedomäne (Figur 1.5). Plasminogen wird in einer limitierten Proteolyse zwischen Arg⁵⁶¹ und Val⁵⁶² durch Aktivatoren zu Plasmin, bestehend aus einer sogenannten leichten (B) und einer schweren (A) Kette, gespalten. Beide Ketten sind über zwei der insgesamt 24 Disulfidbrücken kovalent zusammengehalten. Die schwere Kette umfasst die Aminosäuren Glu¹ bis Arg⁵⁶¹, entsprechend dem N-terminalen Peptid mit den 5 Kringeln, und hat je nach Glykosylierung eine Molmasse von 64.3 bis 66.5 kDa. Die leichte Kette beinhaltet die Aminosäuren Val⁵⁶² bis Asn⁷⁹¹ mit einer Molmasse von 25 kDa und enthält das aktive Zentrum, bestehend aus den drei Aminosäuren Ser⁷⁴¹, Asp⁶⁴⁶ und His⁶⁰³, die die sogenannte katalytische Triade der Serinprotease bilden. Plasmin kann seinerseits in einer autokatalytischen Reaktion das NTP zwischen Lys⁷⁷ und Lys⁷⁸ abspalten, dies sowohl bei Plasmin als auch bei Plasminogen. Daher bezeichnet man das ganze Protein beginnend mit Glu¹ als Glu-Plasminogen und in der aktivierten Form als Glu-Plasmin, während das verkürzte Protein mit Lys⁷⁸ am N-Terminus Lys-Plasminogen oder aktiviert entsprechend Lys-Plasmin genannt wird [Violand und Castellino (1976); Wiman und Wallen (1975)].

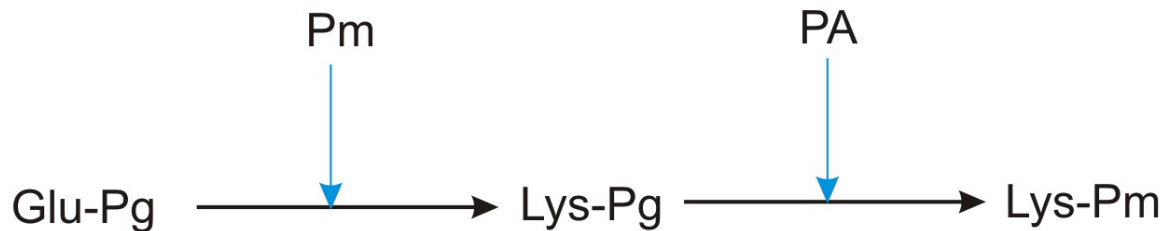
Die beiden Plasminogenformen unterscheiden sich bezüglich der Reaktivität ihrer Aktivierung zu den entsprechenden Plasminformen. Demnach ist die katalytische Effizienz von t-PA auf Lys-Plasminogen 11-mal höher als auf Glu-Plasminogen [Hoylaerts *et al.* (1982)], während mit u-PA ein gleicher Effekt mit 9-mal gesteigerter Effizienz beobachtet werden konnte [Ellis *et al.* (1991)]. Die Bindung von Glu-Plasminogen über Wechselwirkungen der Kringel mit Lysinresten an Zelloberflächen oder Fibrin bewirkt eine konformationelle Änderung, die die N-terminale Peptidspaltstelle zugänglicher für bereits vorhandenes Plasmin macht. Die Prozessierung von Glu-Plasminogen zu Lys-Plasminogen wird dadurch erleichtert (Figur 1.6). Das gebildete Lys-Plasminogen ist ein viel besseres Substrat für die Plasminogenaktivatoren als die Glu-Form. In Lösung wird aber Glu-Plasminogen durch Aktivatoren effizient zu Glu-Plasmin prozessiert, welches erst in einem zweiten Schritt durch Plasmin zur Lys-Form geschnitten wird [Miles *et al.* (2003)].

Wie aus Figur 1.5 hervorgeht, ist Plasminogen glykosyliert, wobei 2 Varianten unterschieden werden (Figur 1.7). Variante 1 ist sowohl an Asn²⁸⁹ (N-glykosidisch) als auch an Thr³⁴⁶ (O-glykosidisch) glykosyliert, während Variante 2 nur an Thr³⁴⁶ ein Oligosaccharid trägt [Marti *et al.* (1988); Castellino und Powell (1981)]. Allgemein sind die Glykosylierungen bezüglich dem Sialinsäuregehalt heterogen. Variante 1 scheint zudem dabei leichter zu Plasmin aktivierbar zu sein [Takada und Takada (1983)]. In Variante 2 konnte noch eine zusätzliche Glykosylierung an Ser²⁴⁹ (O-glykosidisch) mit dem gleichen Trisaccharid wie an Thr³⁴⁶ nachgewiesen werden [Pirie-Shepherd *et al.* (1997)]. Somit scheint Variante 1 an Thr³⁴⁶ / Asn²⁸⁹ und Variante 2 an Thr³⁴⁶ / Ser²⁴⁹ glykosyliert zu sein. Ein weiteres Faktum ist, dass Plasminogen im erwachsenen Menschen leicht anders glykosyliert ist als im Neugeborenen und in letzterer Form durch den α_2 -Plasmininhibitor schlechter hemmbar ist [Ries *et al.* (2002)]. Eine weitere posttranslationale Modifikation konnte von Wang *et al.* (1997) nachgewiesen werden, nämlich eine Phosphorylierung an Ser⁵⁷⁸. Demnach sind die Glykosylierungen ausschliesslich in den Kringeldomänen zu finden, während die Phosphorylierung in der Serinproteasedomäne vorkommt.

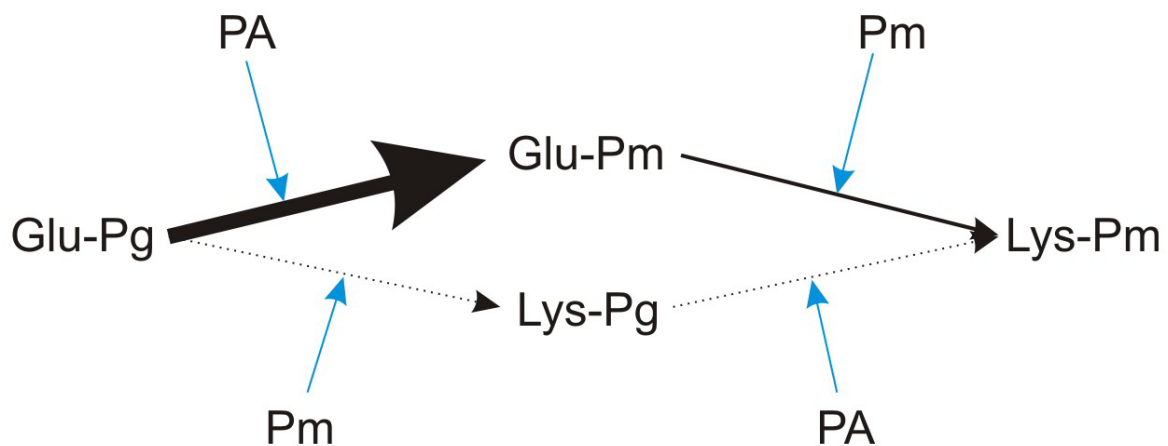


Figur 1.5: **Schematische Darstellung von humanem Plasminogen.** Rötlicher Hintergrund: N-terminale Peptid-domäne. Grünlicher Hintergrund: 5 Kringeldomänen. Gelblicher Hintergrund: Serinproteasedomäne. Dunkelblau: Disulfidbrücken. Rot: Katalytische Triade bestehend aus Serin⁷⁴¹, Asparaginsäure⁶⁴⁶ und Histidin⁶⁰³. Braun: Glykosylierungsstellen Serin²⁴⁹, Asparagin²⁸⁹ und Threonin³⁴⁶. Hellblau: Phosphorylierungsstelle Serin⁵⁷⁸. PA: Spaltung zwischen Arginin⁵⁶¹ und Valin⁵⁶² durch einen Plasminogenaktivator aktiviert Plasminogen zu Plasmin. Pm: Spaltung zwischen Lysin⁷⁷ und Lysin⁷⁸ durch Plasmin erzeugt aus Glu¹-Plasminogen / -Plasmin das kürzere Lys⁷⁸-Plasminogen / -Plasmin. El: Elastasespaltstellen, die bei limitierter Spaltung Angiostatine (K1 - 4) liefert. CB: Erste Cyanbromidspaltstelle, die unter anderem CB-NTP freisetzt.

Aktivierung von Plasminogen



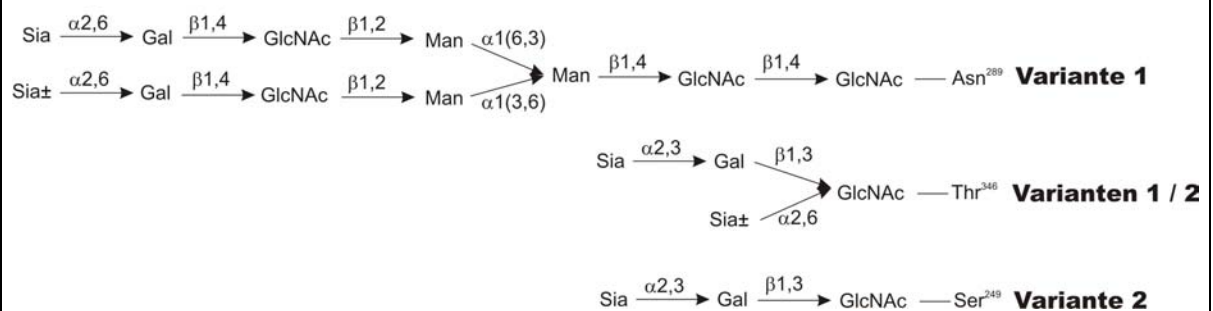
Aktivierung an der Zelloberfläche / am Fibrin



Aktivierung in Lösung

Figur 1.6: **Aktivierung von Plasminogen**. Schwarze Pfeile: X wird zu Y gespalten (die Dicke der Pfeile korreliert mit der Reaktionsrate). Glu-Pg: Glu-Plasminogen. Lys-Pg: Lys-Plasminogen. Glu-Pm: Glu-Plasmin. Lys-Pm: Lys-Plasmin. Pm: Glu- oder Lys-Plasmin. PA: Plasminogenaktivator.

Glykosylierungen am humanen Plasminogen

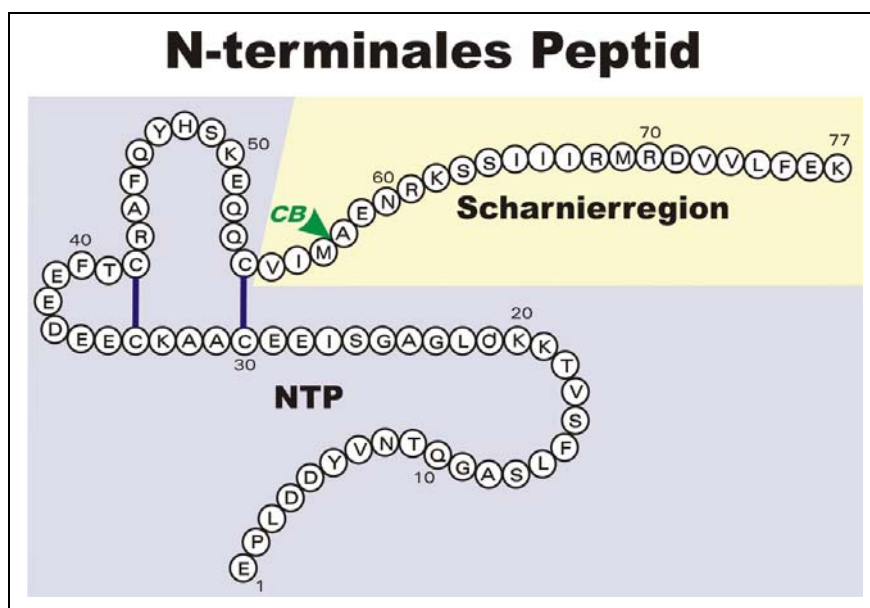


Figur 1.7: **Glykosylierungsmuster von humanem Plasminogen**. GlcNAc: N-Acetylglucosamin. Gal: Galactose. Man: Mannose. Sia: Sialinsäure. ±: variabler Gehalt.

Bis heute gelang es nur kleinere Domänen, wie einige Kringel, sowie die Serinproteasedomäne zu kristallisieren und davon hochaufgelöste Strukturdaten zu gewinnen. Vom ganzen Plasminogen fehlen jedoch weiterhin solche Daten, die Aufschluss über die Konformation der einzelnen Domänen im Kontext des ganzen Proteins geben würden. Tranqui *et al.* (1979) konnten mittels Elektronenmikroskopie der Konformation von Glu-Plasminogen eine rechtshändige Spirale zuordnen. Untersuchungen von Ponting *et al.* (1992) ergaben, dass Glu-Plasminogen mindestens drei Konformationen, als α , β , und γ bezeichnet, annehmen kann, die durch intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert werden. Dabei zeigte sich, dass es sich um Lysinreste handeln muss, die in die Lysinbindungsstellen (LBS) der Kringel binden. Die kompakte α -Konformation (auch „T-state“ für „tense“ genannt) von Glu-Plasminogen scheint einer rechtshändigen Spirale zu gleichen, wenn das NTP aber abgespalten wird, ist das Lys-Plasminogen in einer offenen β -Form (auch „R-state“ für „relaxed“ genannt) vorzufinden. Aufgrund diverser Messungen und Bindungsstudien scheint Kringel 4 an der Konformationsänderung von der β - zur anderen offenen γ -Form beteiligt zu sein und Kringel 1 scheint nicht substantiell zur kompakten Konformation beizusteuern. Mit Mutationsstudien konnte nun von Cockell *et al.* (1998) gezeigt werden, dass die LBS von Kringel 5 eindeutig in der Beibehaltung der α -Konformation involviert ist und dass das NTP mit den Aminosäuren Lys⁵⁰ und / oder Lys⁶² in die LBS bindet. Aufgrund der Beobachtungen von An *et al.* (1998a) scheint sich die Wahl auf Lys⁵⁰ einzunengen.

1.2.2 Das N-terminale Peptid

Das N-terminale Peptid umfasst die Aminosäuren Glu¹ bis Lys⁷⁷ und beinhaltet durch die beiden vorhandenen Disulfidbrücken ein Schlaufe-in-der-Schlaufe-Motiv („loop-in-a-loop“). Das Cystinmuster entspricht einer 1 - 4 und 2 - 3 Verknüpfung, d.h. das erste Cystein in der Aminosäuresequenz bildet mit dem an vierter Position stehenden, sowie das zweite mit dem dritten eine Disulfidbrücke (Figur 1.8). Wie bereits beschrieben konnte von Cockell *et al.* (1998) und An *et al.* (1998a) nun ziemlich sicher der Wechselwirkungspartner ausfindig gemacht werden, der in die LBS des Kringels 5 bindet und damit zur α -Konformation des Glu-Plasminogens führt. Es scheint sich dabei um das Lys⁵⁰ zu handeln, welches sich in einer Schlaufe des NTP befindet. Gerade diese Region ist eine der meistkonservierten des NTP im Sequenzvergleich mit verschiedenen Spezies. Nebst mehreren synthetisierten Peptiden, welche einzelnen Abschnitten des NTP entsprechen, wurde auch CB-NTP, ein NTP-Fragment aus der Cyanbromidspaltung, auf Wechselwirkungen mit den verschiedenen Kringeln untersucht [An *et al.* (1998a); An *et al.* (1998b)]. Die sogenannte Scharnierregion des NTP scheint keine definierte Struktur anzunehmen, denn sie ist eine der sensibelsten Regionen von Plasminogen, was sich *in vitro* durch erhöhte proteolytische Degradation mittels Proteasen wie Plasmin, Elastase, Enterokinase und Faktor Xa äussert. Durch Mutationsstudien von Horrevoets *et al.* (1995) konnte gezeigt werden, dass vor allem die basischen Aminosäuren in der Scharnierregion für die Stabilisierung der kompakten Glu-Plasminogen-Struktur verantwortlich sind.



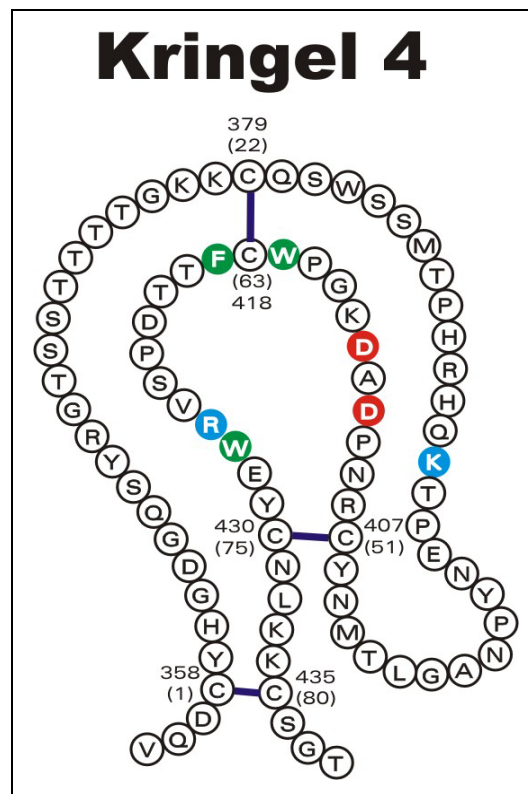
Figur 1.8: Schematische Darstellung des N-terminalen Peptids (NTP) von Plasminogen. NTP: NTP von Glu¹ bis Cys⁵⁴. Scharnierregion: NTP von Val⁵⁵ bis Lys⁷⁷. CB: Cyanbromidspaltstelle. Blau: Disulfidbrücken.

Im Genom des Menschen gibt es zwei Gene, die als „plasminogen related gene“ (PRG) A und B bezeichnet werden [Ichinose (1992)]. Allerdings ist durch die Anwesenheit von Stopcodons im Leseraster eine Expression einer funktionellen Protease ausgeschlossen. Die möglichen Translationsprodukte bestehen aber aus einem Signalpeptid und den ersten 77 Aminosäuren von Plasminogen, welche bis auf lediglich vier Aminosäuresubstitutionen mit dem NTP übereinstimmen. Sowohl PRG A- als auch PRG B-Transkripte konnten in Hepatocyten nachgewiesen werden, bisher jedoch in keiner anderen Zellart. Dieser Befund scheint darauf hinzudeuten, dass auch NTP, wenn es vom Plasminogen oder Plasmin freigesetzt worden ist, eine möglicherweise wichtige regulatorische Funktion haben könnte [Lewis *et al.* (1999)]. Rekombinantes PRG B-Protein konnte zudem das Wachstum von primären Tumoren hemmen, während rekombinantes NTP (Glu¹ bis Val⁷⁹) nur geringfügige Inhibition verursachte [Lewis *et al.* (2001)].

1.2.3 Die Kringel

Die Kringel sind Domänen, die in vielen Fällen das Enzym reversibel an ein Substrat binden. Dieses Strukturelement ist in vielen anderen Proteinen gefunden worden, wie beispielsweise in mehreren Faktoren der Blutgerinnung. Prothrombin enthält deren zwei, wobei der zweite Kringel mit Faktor Va interagiert. Die Kringelstruktur wurde 1988 mittels Röntgendiffraktion gelöst und führte zu einem Nummerierungssystem für Kringel, auch wenn diese zum Teil aus einer unterschiedlichen Anzahl an Aminosäuren aufgebaut sind [Tulinsky *et al.* (1988)]. Weitere Kringel-enthaltende Proteine sind Faktor XII und u-PA die je eine solche Struktur enthalten, während Apolipoprotein a sagenhafte 38 Kringel enthält. t-PA besitzt deren zwei, wobei der zweite eine Lysinbindungsstelle aufweist. Damit kann t-PA an Fibrin binden und auf dessen Oberfläche Plasminogen zu Plasmin aktivieren.

Plasminogen besitzt 5 Kringel, die je aus 78 bis 80 Aminosäuren aufgebaut sind (Figur 1.9). Sie besitzen je drei Disulfidbrücken, die nach dem Muster 1 - 6, 2 - 4, 3 - 5 angeordnet sind und demnach eine sogenannte Kringelstruktur ausbilden, die nach Denaturierung autonom *in vitro* zurückfaltet. Eine Eigenheit von Plasminogen ist die Interkringeldisulfidbrücke zwischen Kringel 2 und 3, die sonst nur noch in ähnlicher Weise im Hepatocytenwachstumsfaktor und dem Hepatocyten-ähnlichen Wachstumsfaktor vorkommt.



Figur 1.9: **Schematische Darstellung von Kringel 4 des Plasminogens.** Die Zahlen in Klammern entsprechen der von Tulinsky *et al.* (1988) eingeführten Kringelnummerierung. Blau: Positiv geladene Aminosäuren der Lysinbindungsstelle (LBS). Rot: Negativ geladene Aminosäuren der LBS. Grün: Hydrophobe Aminosäuren der LBS. Dunkelblau: Disulfidbrücken.

In den letzten Jahren wurden mehrere Kringle rekombinant in grösseren Mengen exprimiert. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf die einzelnen Kringle 1, 2 und 3 gerichtet, weil diese nur mit grösster Mühe durch proteolytischen Verdau von Plasminogen gewonnen werden konnten. Im Gegensatz dazu gehen aus Elastase-verdaulichem Plasminogen Kringle 4 und 5 hervor, wobei letzterer aus dem entstandenen Miniplasminogen (Kringel 5 + Serinproteasedomäne) durch zusätzlichen Verdau mit Pepsin, unter Abspaltung von Microplasminogen (Serinproteasedomäne), gewonnen wird. Alle rekombinant hergestellten Kringle wurden in *E. coli* exprimiert (Tabelle 1.3): Kringel 1 [Menhart *et al.* (1991)], Kringel 2 [Marti *et al.* (1994)], Kringel 3 [Marti *et al.* (1994)], Kringel 4 [McCance *et al.* (1994)] und Kringel 5 [McCance *et al.* (1994)]. Auch weitere Konstrukte wurden exprimiert, wie beispielsweise Kringel 2 + 3 [Söndel *et al.* (1996)], NTP [Lewis *et al.* (1999)], NTP + Kringel 1 [Douglas *et al.* (2002)] und in der LBS mutierter Kringel 3 [Bürgin und Schaller (1999)]. Mit den meisten dieser Proteine wurden Bindungsstudien bezüglich der Lysinbindungsstellen (LBS) gemacht und Bindungskonstanten mit verschiedenen Liganden bestimmt. Zudem wurde versucht die 3D-Struktur mit NMR und Röntgen-diffraktion aufzuklären. Zur Zeit ist die Röntgenstruktur von Kringel 1 [Mathews *et al.* (1996)], Kringel 4 [Wu *et al.* (1991)] und Kringel 5 [Chang *et al.* (1998)], sowie die NMR-Struktur von Kringel 2 [Marti *et al.* (1999)] und Kringel 2 + 3 [Söndel *et al.* (1996)] bekannt.

Aus den Assoziationskonstanten in Tabelle 1.3 wird klar, dass nicht alle LBS die Liganden gleich stark binden. Demnach lässt sich eine Reihenfolge aufstellen:

$$K1 > K4 > K5 > K2 \gg K3$$

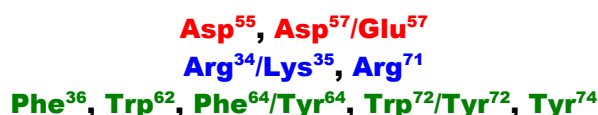
Kringel 3 beherbergt an Stelle 57 (Kringelnummerierung) ein Lysin statt eine Asparaginsäure, d.h. eine positive statt eine negative Ladung, wodurch die LBS nicht mehr im Stande ist einen Liganden wie Lysin zu binden, obwohl sie richtig vorgeformt ist, d.h. die Tasche der LBS in der richtigen Konformation vorliegt. Durch Mutation des Lys zu Asp konnten von diesem mutierten Kringel 3 (rK3mut) Assoziationskonstanten im Bereich zwischen rK2 und K5 für die jeweiligen Liganden gemessen werden, was zeigt, dass die LBS wieder nennenswerte Wechselwirkungen eingehen kann.

Tabelle 1.3: Assoziationskonstanten K_a in mM^{-1} der Kringle von Plasminogen

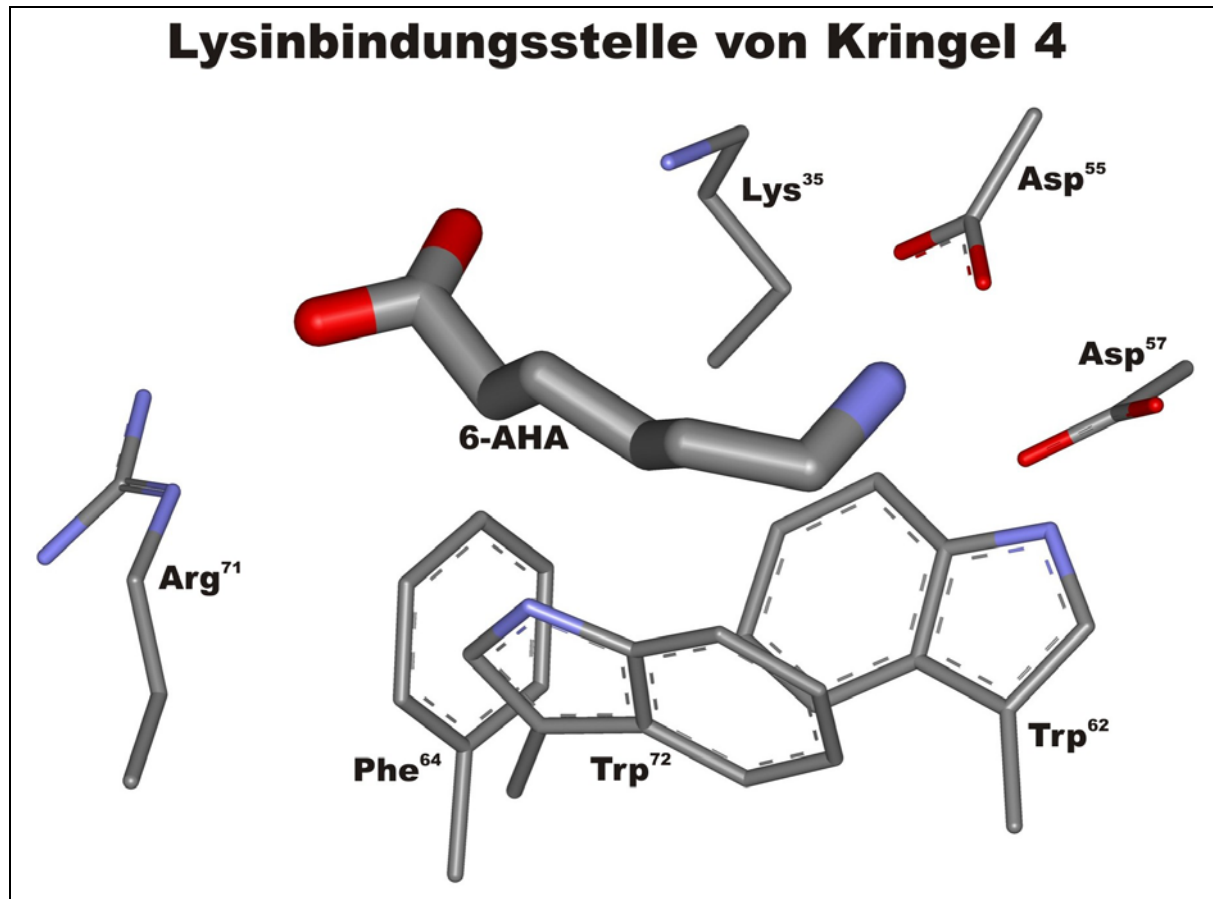
Ligand	rK1	rK2	rK3mut	K4	K5
6-AHA	74.2 ± 8	2.3 ± 0.2	4.2	21 ± 1	10.6 ± 0.2
AMCHA	> 300	7.3 ± 0.6	12.7 ± 0.5	159 ± 2	44.2 ± 4.1
CB-NTP	4.6 ± 0.7	3.3 ± 0.5	-	6.2 ± 0.4	2.3 ± 0.4
A2PIC	70 ± 7	3.2 ± 0.5	~ 4	46	4.3 ± 1.9
A2PIC(K452A)	11.6 ± 0.5	-	-	9.1 ± 0.2	-

6-AHA: 6-Aminohexansäure. AMCHA: *trans*-4-(Aminomethyl)-cyclohexancarbonsäure. CB-NTP: N-terminales Peptid aus Cyanbromidspaltung (Glu¹ bis HSer⁵⁷). A2PIC: C-Terminus des α_2 -Plasmininhibitors (Asn³⁹⁸ bis Lys⁴⁵²). A2PIC(K452A): Mutierter C-Terminus des α_2 -Plasmininhibitors (Asn³⁹⁸ bis Ala⁴⁵² statt Lys⁴⁵²). r: rekombinant. rK3mut: Kringel 3 mit Ser²⁹⁷ statt Cys und Asp³¹¹ statt Lys. -: Nicht gemessen.

Allgemein sieht die Lysinbindungsstelle wie in Figur 1.10 aus. Demnach treten 2 positiv geladene Aminosäuren (Lys oder Arg) und 2 negativ geladene Aminosäuren (Asp oder Glu) in elektrostatische Wechselwirkung mit dem Liganden, typischerweise ein Lysinrest eines anderen Proteins oder des NTP. Der Ligand wird zusätzlich durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der aromatischen Tasche (Phe, Trp oder Tyr) stabilisiert. Im Bezug auf die Kringelnummerierung sind folgende Aminosäuren an der Ausstattung der LBS beteiligt:



Im Zusammenhang mit der Isolation der Kringle ist die Beobachtung, dass die Löslichkeit von Kringle in Anwesenheit von Chloridionen massiv abnimmt, von grosser Wichtigkeit [de Vos *et al.* (1992)]. Bei der Isolation muss deshalb besonders nach der Rückfaltung von kringlehaltigem Protein auf die Pufferzusammensetzung geachtet und nicht mit Salzsäure zum Einstellen des pH gearbeitet werden.



Figur 1.10: 3D-Struktur der Lysinbindungsstelle (LBS) von Kringel 4 des humanen Plasminogens. Röntgenstruktur bei 2.25 Å mit dem Liganden 6-AHA und den 7 Aminosäuren, die für die Bindung / Stabilisierung in der Lysinbindungsstelle verantwortlich sind. Blau: N. Rot: O. Grau: C. H sind weggelassen. 6-AHA: 6-Aminohexansäure.

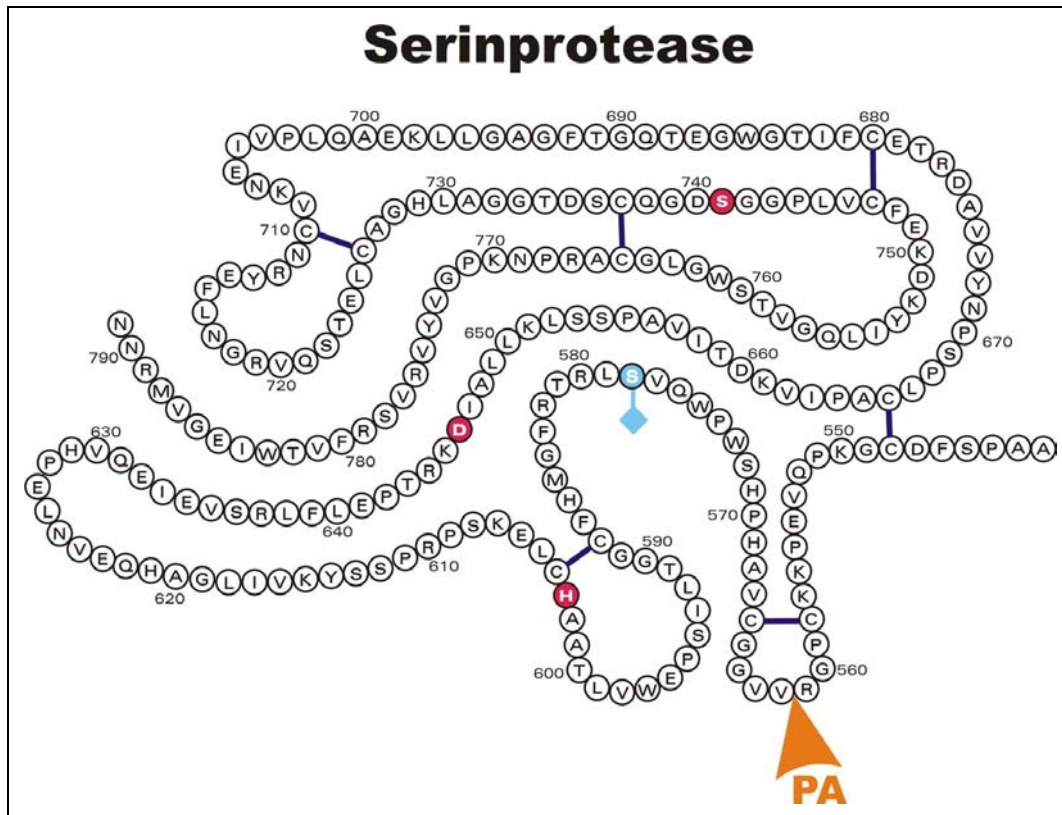
1.2.4 Die Serinprotease

Plasminogen gehört zur Chymotrypsinfamilie der Serinproteasen. Die katalytische Aktivität ist selektiv für die Sequenz Lys - Xaa und in geringerem Ausmass Arg - Xaa. Demnach ist die Substratspezifität nicht sehr hoch, was sich auch in der Anzahl der vielen Substrate niederschlägt, die von Plasmin aktiviert oder degradiert werden können. Die Serinproteasedomäne besitzt eine sogenannte katalytische Triade, die im Falle von Plasminogen aus Ser⁷⁴¹, Asp⁶⁴⁶ und His⁶⁰³ besteht (Figur 1.11). Bei der Aktivierung zu Plasmin wird die Peptidbindung zwischen Arg⁵⁶¹ und Val⁵⁶² hydrolysiert, welche sich in einer Schlaufe befinden, die in dieser Form nur in Plasminogen existiert [Peisach *et al.* (1999)]. Die schwere und die leichte Kette bleiben durch zwei Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden, wobei die leichte Kette noch vier zusätzliche Cystinbrücken beinhaltet. Die eigentliche Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin geschieht dadurch, dass der neu gebildete N-Terminus (Val⁵⁶²) der leichten Kette intramolekular in eine Tasche eindringt, in welcher er mit der Carboxylgruppe des Asp⁷⁴⁰ eine Salzbrücke bildet und eine optimale Anordnung der katalytischen Triade bewirkt [Wang *et al.* (1995)].

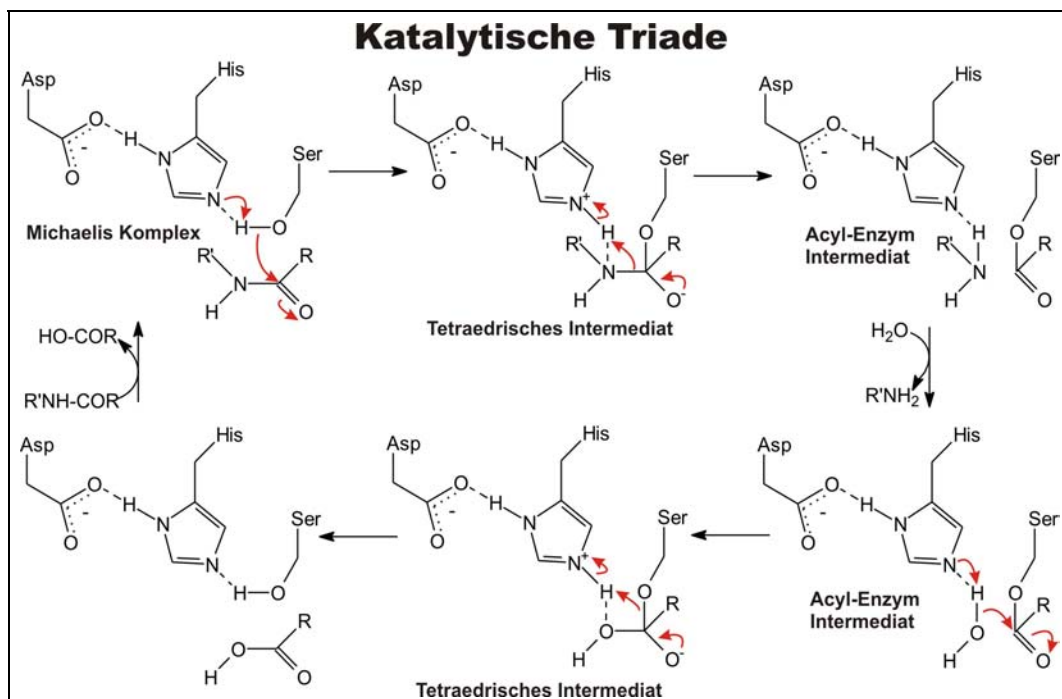
Der katalytische Mechanismus der Triade besteht aus vier Schritten (Figur 1.12). Im ersten Schritt greift das Serin die Carbonylgruppe des Substrats nucleophil an und bildet einen Übergangszustandskomplex der „tetraedrisches Intermediat“ genannt wird. Im zweiten Schritt zerfällt das „tetraedrische Intermediat“ in ein sogenanntes „Acyl-Enzym Intermediat“. Das Aminogruppe-enhaltende Peptid wird freigelassen und an dessen Stelle bindet ein Wassermolekül. Im dritten Schritt deacyliert das „Acyl-Enzym Intermediat“ wieder zurück zum „tetraedrischen Intermediat“. Im letzten Schritt kehrt die katalytische Triade wieder in den ursprünglichen Zustand zurück unter Abgabe des Carboxyl-enhaltenden Peptids [Voet und Voet (1995)].

Im Gegensatz zu den Plasminogenaktivatoren, die eine proteolytische Aktivität besitzen und die Arg-Val-Bindung schneiden, kann Streptokinase ohne Bindungsspaltung an Plasminogen binden (siehe

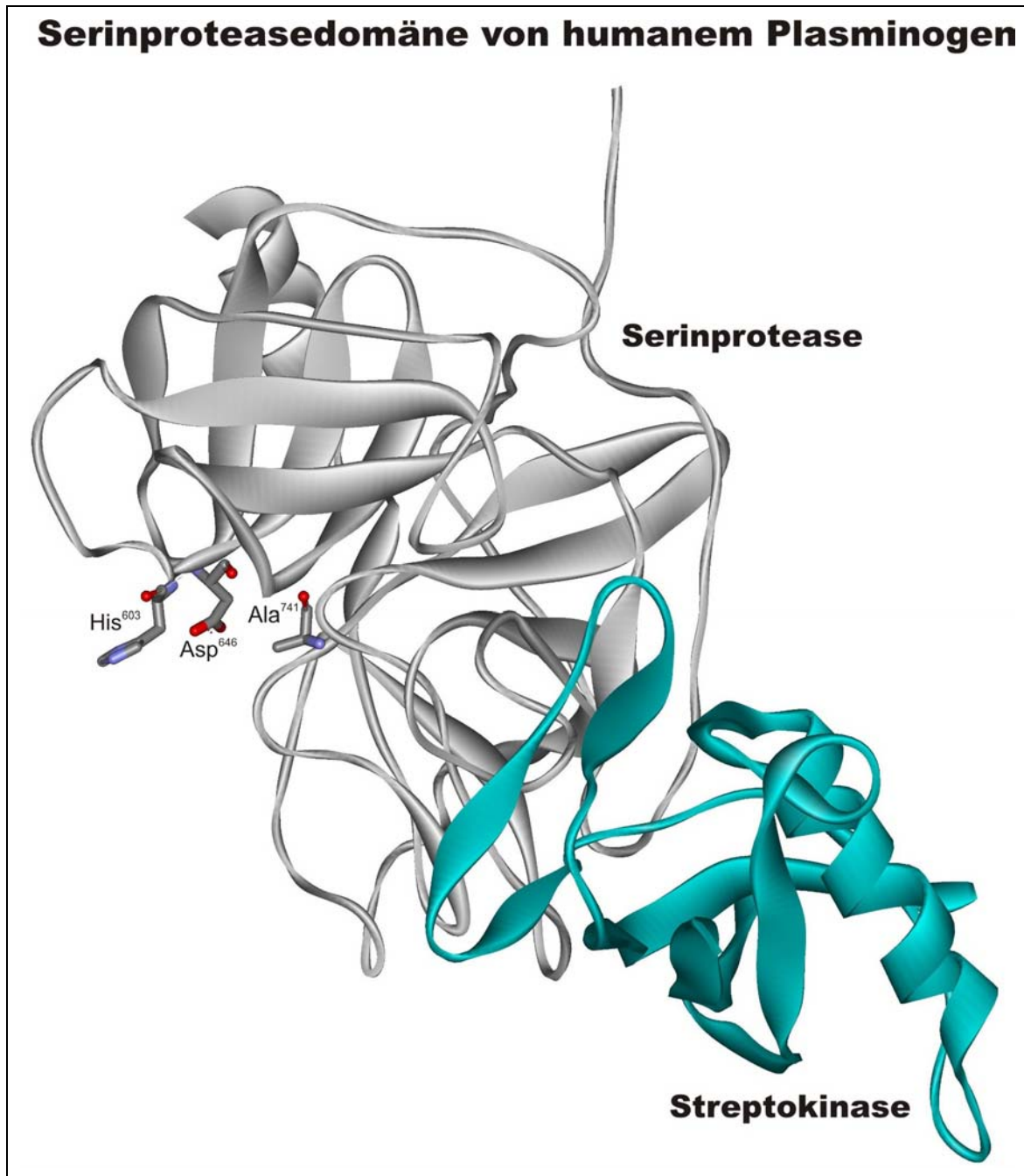
auch Kapitel 1.1.4) und durch eine Kontaktaktivierung die Konformation des Plasminogens derart verändern, dass die katalytische Triade aktiv wird. Von Wang *et al.* (1998) konnte zudem die Röntgenstruktur von Streptokinase im Komplex mit der Serinproteasedomäne des Plasminogens bestimmt werden (Figur 1.13). Dabei scheint die C-terminale Domäne der Streptokinase für die Kontaktaktivierung von Plasminogen verantwortlich zu sein.



Figur 1.11: **Schematische Darstellung der Serinproteasedomäne von Plasminogen.** Rot: Katalytische Triade mit Ser⁷⁴¹, Asp⁶⁴⁶ und His⁶⁰³. Hellblau: Phosphorylierungsstelle Ser⁵⁷⁸. PA: Schnittstelle der Plasminogenaktivatoren zwischen Arg⁵⁶¹ und Val⁵⁶². Dunkelblau: Disulfidbrücken.



Figur 1.12: **Schematische Darstellung des Mechanismus der katalytischen Triade.**



Figur 1.13: **3D-Struktur der Serinproteasedomäne von humanem Plasminogen.** Röntgenstruktur bei 2.30 Å von Microplasminogen von Ala⁵⁴³ bis Asn⁷⁹¹ (grau) im Komplex mit der α -Domäne der Streptokinase (grün-blau). Gezeigt sind die drei Aminosäuren der an Stelle 741 mutierten katalytischen Triade: Ala⁷⁴¹ statt Ser⁷⁴¹, Asp⁶⁴⁶ und His⁶⁰³. Blau: N. Rot: O. Grau: C. H sind weggelassen.

1.2.5 Der α_2 -Plasmininhibitor

Der α_2 -Plasmininhibitor gehört zu den Serpinen, d.h. zu den Serinproteaseinhibitoren. Das Gen besteht aus 10 Exons, die sich über 16 Kilobasen erstrecken. Der α_2 -Plasmininhibitor ist ein einkettiges Glykoprotein mit etwa 13% Kohlenhydratgehalt und ist aus 464 Aminosäuren aufgebaut [Moroi und Aoki (1976)]. Man unterscheidet 2 Formen des α_2 -Plasmininhibitors, nämlich die Met-Form und die Asn-Form, wobei letztere N-terminal um 12 Aminosäuren kürzer ist und im Blutplasma entsteht. Etwa 60 - 70% des im Plasma vorkommenden α_2 -Plasmininhibitors entspricht der Asn-Form [Koyama *et al.* (1994); Bangert *et al.* (1993)]. Das Protein enthält zudem 4 Cysteine, jedoch ist nur eine Disulfidbrücke ausgebildet [Christensen *et al.* (1997)]. Die Konzentration an α_2 -Plasmininhibitor im Plasma beträgt etwa 70 mg/l, was in etwa auch jener von Plasminogen entspricht.

Das Reaktionszentrum, welches mit Plasmin reagiert, besteht aus den Aminosäuren Arg³⁷⁶ und Met³⁷⁷ [Holmes *et al.* (1987)]. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab, wobei im ersten ein nicht-kovalenter Komplex zwischen dem α_2 -Plasmininhibitor und Plasmin gebildet wird und im zweiten das Reaktionszentrum des Serpins durch die katalytische Triade der Serinprotease gespalten wird. Dabei entsteht ein kovalent gebundener 1:1-Komplex von α_2 -Plasmininhibitor und Plasmin, der proteolytisch inaktiv ist [Frank *et al.* (2003)]. Wie bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt beträgt die Halbwertszeit von Plasmin im Plasma 0.1 Sekunden, während es an der Zelloberfläche etwa 5 Sekunden dauert bis Plasmin inhibiert wird [Favier *et al.* (2001)].

Nebst der Inhibition der proteolytischen Aktivität von Plasmin hat der α_2 -Plasmininhibitor noch zwei weitere Funktionen, nämlich die Inhibition der Bindung von Plasmin(ogen) an Fibrin, sowie die kovalente Bindung („cross-linking“) an Fibrin. Wenn Fibrin den α_2 -Plasmininhibitor gebunden hat, ist es um ein vielfaches resistenter gegen Degradierung durch Plasmin. Für die Bindung treten Lys³⁰³ der α -Kette des Fibrins und Gln¹⁴ des α_2 -Plasmininhibitors in Wechselwirkung [Ritchie *et al.* (2000)]. Dabei ist die Rate des „cross-linkings“ um ein vielfaches höher für die Asn-Form, bei welcher Gln¹⁴ an der N-terminalen Position 2 liegt, als für die Met-Form [Sumi *et al.* (1989); Tamaki und Aoki (1982)].

Der α_2 -Plasmininhibitor besitzt nebst des Reaktionszentrums, wo Plasmin den Inhibitor zwischen Arg³⁷⁶ und Met³⁷⁷ schneidet, sowie der Fibrinbindungsstelle bei Gln¹⁴ noch eine Plasminogenbindungsstelle. Kluft und Los (1981) fanden eine nicht-Plasminogen-bindende Form, die später als α_2 -Plasmininhibitor ohne C-terminale Region identifiziert werden konnte [Sasaki *et al.* (1986)]. Dieser C-Terminus konnte bisher in keinem anderen Serpin gefunden werden. Untersuchungen mit Hilfe von rekombinanten C-Termini, die sich von Asn³⁹⁸ bis Lys⁴⁵² erstreckten, wurden von Frank *et al.* (2003) durchgeführt. Dabei wurde ein Wildtyp und ein an Stelle 452 zu Ala mutiertes C-terminales Fragment exprimiert. Die Assoziationskonstanten für die beiden Kringel rK1 und K4 zeigten eine um das fünf-fache reduzierte Bindungsstärke gegenüber dem mutierten C-Terminus im Vergleich zum Wildtyp. Von Wang *et al.* (2003) konnte ebenfalls eine um das fünffache reduzierte Bindungsstärke von ganzem rekombinantem α_2 -Plasmininhibitor, der allerdings an der Stelle 436 von Lys zu Glu mutiert war, gemessen werden. Jedoch konnte der Effekt, welcher mit dem C-terminalen Fragment mit mutiertem Lys⁴⁵² von Frank *et al.* (2003) beobachtet werden konnte, nicht mit dem ganzen rekombinanten, an der gleichen Stelle mutierten α_2 -Plasmininhibitor von Wang *et al.* (2003) bestätigt werden. Um die Frage zu beantworten, welches Lysin hauptsächlich für die Bindung an die LBS des Plasmins verantwortlich ist, müssen demnach noch weitere Bindungsstudien mit mutierten Proteinen und Peptiden durchgeführt werden.

Somit besteht der α_2 -Plasmininhibitor N-terminal aus einer Fibrinbindungsstelle, C-terminal aus einer Plasminogenbindungsstelle, sowie aus einer in der mittleren Region angesiedelten Serpinaktivität.

1.3 Expressionssysteme: *E. coli* und *P. pastoris*

Seit zwei Jahrzehnten ist eine kaum zu fassende Menge an strukturellen Daten von den verschiedensten Proteinen zusammengetragen worden, mit dem jeweiligen Ziel eine hochaufgelöste Röntgenstruktur aus Proteinkristallen oder eine NMR-Struktur in Lösung zu ermitteln. Dies ist nur Dank ausgeklügelter rekombinanter Expressionssysteme möglich geworden, die es dem Experimentator in einigen Fällen innert weniger Wochen erlauben, mehrere Milligramme an Protein in hochreiner Form darzustellen.

Das bekannteste, bestuntersuchte und am meisten verbreitete System basiert auf dem Darmbakterium *Escherichia coli*, kurz *E. coli*. Durch die einfache Transformation des Bakteriums mit Plasmiden, die mittels PCR Träger des gewünschten Gens geworden sind, kann mit einfachen Mitteln, unter Verwendung starker Promotorregionen, in diesen Vektoren eine gezielte Expression des eingebauten Gens induziert werden. Nach wenigen Stunden können dann schon grössere Mengen im Milligrammbereich aus weniger als einem Liter Kultur isoliert werden. Dies veranschaulicht ganz deutlich, dass es sich bei *E. coli* um ein einfach zu handhabendes, schnelles und vor allem billiges Expressionssystem handelt.

Sobald aber „anspruchsvollere“ Proteine exprimiert werden sollen, wie etwa sehr grosse Proteine oder solche mit viel Sekundärstrukturelementen, die durch komplexe Disulfidbrückenmuster zusammengehalten werden, stösst man schon bald an die Grenzen des *E. coli* Systems. Da es sich um ein prokaryontisches System handelt, führt die ganze Faltungsprozedur von rekombinant exprimierten eukaryontischen Proteinen, die in höheren Eukaryonten sehr komplex unter mithilfe von diversen Chaperonen abläuft, des öfters zu physiologisch inaktiven Formen. Für die Inaktivität von in *E. coli* exprimierten eukaryontischen Proteinen können nebst einer falschen Faltung auch fehlende posttranslationale

Modifikationen, wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen, ausschlaggebend sein. Allerdings kann für strukturelle Untersuchungen mittels NMR und Röntgendiffraktion das Fehlen von Modifikationen von wesentlichem Vorteil sein, tragen doch in *E. coli* exprimierte Proteine keine störenden Glykosylierungen, die insbesondere für Kristallisationsexperimente ein grosses Hindernis darstellen können.

Um diese dem *E. coli* System innewohnenden Probleme zu umgehen, gibt es heute auch verschiedenste eukaryontische Expressionssysteme angefangen mit Hefe, einem niederen Eukaryont, über Insektenzellen bis hin zu Säugerzellen. Sobald man aber den prokaryontischen Systemen den Rücken kehrt, wird die ganze Arbeit schon von Beginn weg viel komplexer. Beispielsweise müssen die Gene in der Regel in das Genom des Wirts rekombiniert werden, um eine stabile Zelllinie zu erhalten. Häufig kann die Rekombination nicht in gerichteter Form durchgeführt werden, d.h. jeder Klon wird das Gen an einer anderen Stelle im Genom einbauen. Je nachdem wo diese Rekombination stattfindet, können wichtige Gene des Wirts ausgeschaltet werden. Demnach ist es ausserordentlich wichtig so viel Klone wie möglich auf Lebensfähigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit sowie Expressionsverhalten zu untersuchen, um eine möglichst hohe Ausbeute an rekombinantem Protein zu erzielen. Aufgrund des Transfektionsverfahrens und der aufwendigeren Selektion der Klone sind eukaryontische Systeme viel zeit- und materialintensiver, und daher auch teurer als das *E. coli* System.

Allerdings konnten aufgrund der Transkriptions- und Translationsmechanismen sowie den posttranslationalen Vorgängen schon mehrere menschliche Proteine, beispielsweise in Insektenzellen, in grösseren Mengen hergestellt werden. Diese rekombinanten Produkte unterscheiden sich strukturell und physiologisch häufig in keiner Weise von direkt aus dem Menschen isoliertem Protein.

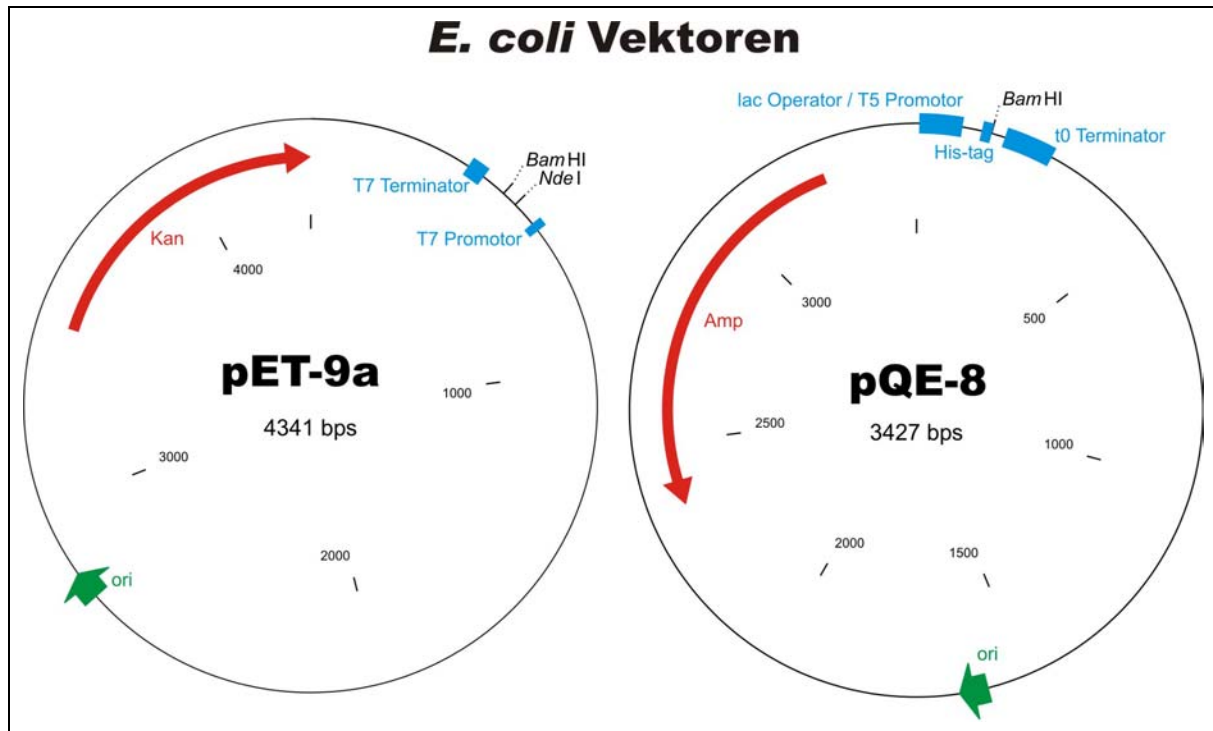
Aufgrund der Zielsetzung (siehe auch Kapitel 1.4) war klar, dass zunächst zwei *E. coli* Expressionssysteme getestet werden sollten und falls diese keine befriedigenden Ergebnisse liefern würden, könnte man Experimente mit der methylotrophen Expressionshefe *Pichia pastoris*, kurz *P. pastoris*, in Betracht ziehen. Viele der oben gemachten Ausführungen über die eukaryontischen Expressionssysteme treffen auch auf *P. pastoris* zu, insbesondere dass es ein zeit- und materialintensiveres System im Vergleich zum *E. coli* System ist. Zudem können unerwünschte Glykosylierungen stattfinden, jedoch nicht in einem Ausmass wie bei *S. cerevisiae*, die häufig hyperglykosyliert. Ein weiteres Problem könnte die primitivere Ausstattung des Faltungs- und posttranslationalen Modifikationsapparats im Vergleich zu höheren eukaryontischen Systemen sein. Allerdings hat die methylotrophe Expressionshefe einen ausserordentlich wichtigen Vorteil gegenüber höheren eukaryontischen Systemen, nämlich die Möglichkeit, auf einfache Weise mit ^{13}C und ^{15}N markierte Proteine zu exprimieren. In den meisten höheren eukaryontischen Systemen sind Expressionen in Minimalmedien mit klar definierter Zusammensetzung gar nicht erst möglich, oder nur unter Zusatz etlicher markierter Metaboliten, die den finanziellen Rahmen des Projekts gesprengt hätten.

1.3.1 *E. coli*: Expression in BL21(DE3)

Der Stamm BL21(DE3) ist lysogen. In seinem Genom hat er den Bacteriophagen λ DE3 integriert, welcher das T7 Bacteriophagen-Gen *I* enthält. Dieses Gen codiert die T7 Polymerase und steht unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors, der durch Zugabe von IPTG dereprimiert wird. Der in die Zellen transformierte pET-9a Vektor (Figur 1.14), in welchem zwischen den *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstellen ein beliebiges „Insert“ eingebaut werden kann, besitzt einen T7 Promotor, der von der T7 Polymerase erkannt wird, so dass das Gen nach Stimulation mit IPTG transkribiert wird [Studier und Moffatt (1986); Davanloo *et al.* (1984)].

1.3.2 *E. coli*: Expression in M15[pREP4] und SG13009[pREP4]

Die beiden Stämme M15[pREP4] und SG13009[pREP4] enthalten das Plasmid pREP4, welches das *lacI^q* Repressor-Gen enthält. Der in die Zellen transformierte pQE-8 Vektor (Figur 1.14) mit einem beliebigen, bei der *BamHI*-Schnittstelle eingebauten „Insert“, besitzt hinter zwei 5'-vorgeswitchten *lac* Operatoren einen T5 Promotor, der von der *E. coli* RNA Polymerase erkannt wird. Jedoch reprimiert der pREP4-codierte *lacI^q* Repressor normalerweise den T5 Promotor durch Bindung an die Operatoren. Erst die Zugabe von IPTG dereprimiert den Promotor, weil dieses den Repressor bindet und inaktiviert, womit das Gen transkribiert wird [Villarejo und Zabin (1974); Stuber *et al.* (1990)]. Die Regulation der Expression ist ein sogenanntes *trans*-System, da der Repressor und das Repressor-kontrollierte Gen auf zwei verschiedenen Vektoren codiert sind.



Figur 1.14: Schematische Darstellung der *E. coli* Vektoren. Kan: Gen für Kanamycinresistenz. Amp: Gen für Ampicillinresistenz. ori: Replikationsursprung des Plasmids.

1.3.3 *P. pastoris*: Expression in GS115 und KM71

Die beiden Vektoren pPIC3.5K und pPIC9K (Figur 1.15) sind sowohl für die Expression in *P. pastoris*, als auch für die Klonierung und Vermehrung in *E. coli* ausgestattet. Hierfür besitzen sie einen pBR322 Replikationsursprung, womit die ganze Klonierungsprozedur des gewünschten Gens in die Plasmide auf der Ebene von *E. coli* durchgeführt werden kann. Die Plasmid-tragenden Transformanten können mit den Ampicillin- und Kanamycinresistenzen selektioniert werden.

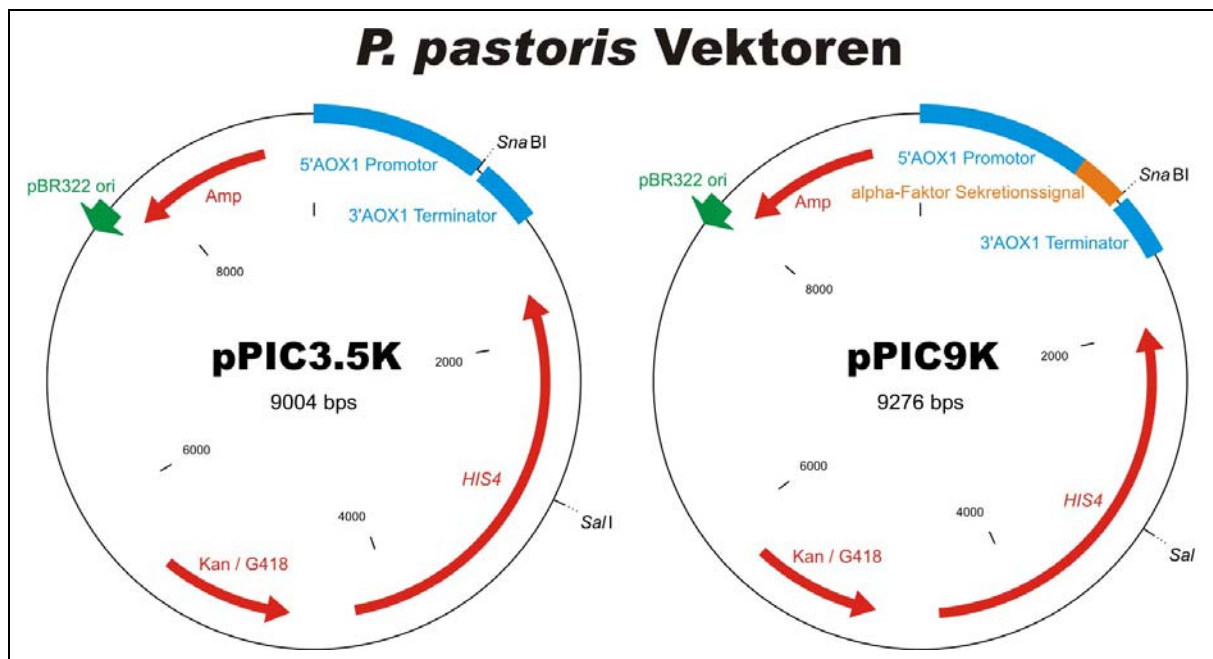
Der Vektor pPIC3.5K, welcher für intrazelluläre Expressionen ausgelegt ist, enthält keine Kozak-Konsensussequenz, die deshalb zusammen mit dem zu klonierenden Gen im richtigen Leseraster eingefügt werden muss. Diese Sequenz entspricht etwa der Basenfolge ACCATGG, worin das ATG zugleich das Startsignal für das Ribosom bedeutet. Im Vektor pPIC9K ist hingegen eine solche Kozak-Sequenz schon vorhanden, da sich 5'-terminal eine α -Faktor Signalsequenz aus *S. cerevisiae* befindet. Falls das zu klonierende Gen im gleichen Leseraster 3'-terminal an die Signalsequenz kloniert wird, kann das exprimierte Protein in das ER exportiert werden, wo die Signalsequenz abgeschnitten und das rekombinante Protein ins Medium sekretiert wird. Die Expression des klonierten Gens untersteht der Kontrolle des 5'AOX1 Promotors, jener des natürlich in *P. pastoris* vorkommenden Alkoholoxidasegens AOX1, was zu einer starken Überexpression des Proteins führt. Dabei unterliegt der Promotor einer zweistufigen Regulation, indem er zum ersten durch die An- oder Abwesenheit von Glucose reprimiert beziehungsweise dereprimiert wird und zum zweiten durch die Zufuhr von Methanol induziert wird. Um eine Überexpression zu induzieren, reicht die Zugabe von Methanol nicht aus, sondern es darf auch keine Glucose anwesend sein. Aus diesem Grund werden die Zellen jeweils in Glycerin-haltigem Medium, welches den 5'AOX1 Promotor nicht reprimiert, als Glucoseersatz angezogen und für die Expression anschliessend mit Methanol induziert.

Nach der Konstruktion in *E. coli* werden die Plasmide typischerweise im *HIS4*-Gen, welches für die Histidinoldehydrogenase codiert, linearisiert und in die beiden *P. pastoris* Stämme GS115 und KM71, die beide bezüglich dieses Enzyms defizient sind, transformiert. Dazu werden die Hefezellen zunächst mit Zymolyase behandelt, um nach erfolgter Zellwandschwächung die lineare DNA aufnehmen zu können. Die Zellen werden anschliessend in Top-Agar gegossen, damit sich die Zellwände wieder regenerieren können. Die aufgenommene DNA wird bevorzugt an die *his4*-Stelle rekombinieren, da man im komplementären *HIS4*-Gen des Vektors die Linearisierung vollzogen hatte. Im Idealfall bleibt es nicht nur bei einem einzigen solchen Ereignis, sondern es sind mehrere Rekombinationen hintereinander im Kassettenprinzip denkbar und auch schon nachgewiesen worden.

Nachdem sie sich im Top-Agar regeneriert haben, geschieht die Selektion der Transformanten auf Histidin-defizienten Platten. Alle Klone die dort wachsen sollten demnach eine wiederum intakte Histi-dinoldehydrogenase exprimieren, da sie durch die rekombinierte DNA das intakte *HIS4*-Gen wieder im Genom rekonstituiert haben sollten. Zur Sicherheit wird mit den positiven Klonen eine zweite Selektion durchgeführt und zwar mit dem Antibiotikum Geneticin. Auf den Vektoren ist das G418-Resistenzgen codiert, welches in *E. coli* für eine Kanamycinresistenz, in *P. pastoris* hingegen für eine Geneticinresistenz sorgt. Der Vorteil von Geneticin besteht darin, dass Klone, die mehrere Kopien in ihr Genom rekombiniert haben, gegen höhere Dosen an Antibiotikum resistent sind. Deshalb können direkte Rückschlüsse auf die ungefähre Anzahl von eingebauten Kopien gemacht werden. Um ganz sicher zu gehen, dass sie auch das klonierte Gen beherbergen, wird von einigen Klonen die DNA isoliert und eine PCR zum Nachweis des Gens durchgeführt.

Wenn alle diese Selektionstests bewältigt sind, sollte noch der Mut-Phänotyp („methanol utilisation“) kontrolliert werden. Dabei sollten GS115-Klone Mut⁺ und KM71-Klone Mut^s sein, d.h. sie können Methanol entweder gut metabolisieren (Mut⁺) oder wachsen unter diesen Bedingungen nur langsam (Mut^s). Demnach hat der KM71-Stamm eine reduzierte Alkoholoxidaseaktivität zu verzeichnen, da er Träger eines mutierten *aox1*-Gens ist und somit nur noch mit dem schwächer exprimierten AOX2-Gen Methanol metabolisieren kann (deshalb Mut^s für „Methanol utilisation slow“).

Für die Expression der beiden Stämme wird auf den Promotor des AOX1-Gens von *P. pastoris* zurückgegriffen, der dem natürlichen Promotor der Alkoholoxidase entspricht. Wenn die Zellen in Methanol-haltigem Medium als einziger Kohlenstoffquelle induziert werden, beginnt die starke Transkription zu mRNA, die etwa 5% der total vorhandenen mRNA-Menge in der Zelle ausmacht. Die Translation der mRNA erzielt schliesslich bis zu 30% der totalen Proteinmenge in der Zelle. In der Regel kann nach 48 bis 144 Stunden das Protein aus den Zellen oder aus dem Medium isoliert werden. Die Expressionsdauer sowie die Isolationsart sind jeweils vom verwendeten Zellstamm und vom rekombinierten Vektor abhängig. Bei der sekretierten Expression ist die Wahrscheinlichkeit gross N-glykosyliertes Protein zu erhalten, falls Glykosylierungssequenzen vorhanden sind, jedoch wurden kaum je O-glykosylierte Expressionsprodukte beobachtet [Invitrogen (2002); Grinna und Tschopp (1989); Tschopp *et al.* (1987); Ellis *et al.* (1985)].



Figur 1.15: Schematische Darstellung der *P. pastoris* Vektoren. Amp: Gen für Ampicillinresistenz in *E. coli*. Kan / G418: Gen für Kanamycinresistenz in *E. coli* / Geneticinresistenz in *P. pastoris*. *HIS4*: Gen für Histi-dinoldehydrogenase. ori: pBR322 Replikationsursprung des Plasmids in *E. coli*.

1.4 Zielsetzung

Die dreidimensionale Struktur des humanen Plasminogens ist weiterhin unbekannt. Wie aus Kapitel 1.2.3 hervorgeht sind viele Domänen einzeln rekombinant exprimiert worden. Von vier Kringeln wie auch von der Serinproteasedomäne konnten mittels Röntgendiffraktion und NMR die Strukturen bestimmt werden. Aufgrund der vielfachen Wechselwirkungen, die Plasminogen im Körper eingeht, sowie in Anbetracht der Komplexität des ganzen Plasminogensystems, könnte die Auflösung der dreidimensionalen Struktur weitere Erkenntnisse liefern und manche Theorie bestätigen oder widerlegen. Eine ausserordentlich wichtige Rolle fällt dabei den Kringeln zu, denn durch ihre Lysinbindungsstellen nehmen sie an diversen Wechselwirkungen teil. Zudem kommen Kringel in vielen anderen Proteinen vor, die unterschiedlichste Aufgaben wahrnehmen, wie beispielsweise im Angiostatin, dessen Funktion im Vergleich zu Plasminogen ganz verschieden ist. Aus diesem Grund ist es unabdingbar zu erfahren, wie die Kringel untereinander angeordnet sind und wie deren Wechselwirkungen im Protein aussehen.

Deshalb soll die schwere Kette von Plasminogen mit und ohne N-terminales Peptid kloniert und in *E. coli* rekombinant exprimiert werden. Die Isolation und Reinigung sollte dann mittels Metallchelataffinitätschromatographie eines „His-tags“ an Ni^{2+} -Ionen, sowie mittels Affinität der korrekt gefalteten Lysinbindungsstellen an Lysin, höchstwahrscheinlich hauptsächlich durch die Kringel K1 und K4 vermittelt, durchgeführt werden. Aufgrund bisher gemachter Erfahrungen wurde vorerst das einfache prokaryontische System ausgewählt. Mit einzelnen Kringeln sowie dem Kringelsupermodul K2 + K3 hat das System gut funktioniert. Die Frage ist nur, ob sich solch positive Resultate auch mit der Expression von mehr als doppelt so grossen Proteinen mit vielen Sekundärstrukturen erzielen lassen. Falls die Expression möglich ist, lässt sich so auf einfache Art und Weise markiertes Material herstellen, d.h. mit ^{13}C und ^{15}N markiertes Protein, weil *E. coli* in einem klar definierten Minimalmedium ohne weiteres wachsen kann. Durch die Markierung wird nebst Kristallisationsexperimenten für Strukturbestimmung mittels Röntgendiffraktion auch eine zumindest partielle Strukturbestimmung mittels NMR ermöglicht. Allerdings braucht es für beide Methoden genügend Material, d.h. mehrere Milligramme. Zudem sollte das Material nicht glykosyliert sein, da dies die Kristallisation und die NMR-Messung stark erschweren kann, was ein weiteres Argument für die Expression in *E. coli* ist.

Nebst der Strukturbestimmung kann rekombinant hergestelltes Plasminogen auch zu Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie herangezogen werden, wie beispielsweise mit α_2 -Plasmininhibitor und dessen C-terminalen Peptiden mit Wildtypsequenz sowie mutierten Lysinresten. Damit könnten das oder die mit den Kringeln von Plasminogen wechselwirkende/n Lysinrest/e des α_2 -Plasmininhibitors sowie die zuständige Lysinbindungsstelle des Plasminogens genauer ermittelt werden.

Falls das *E. coli* System kein oder zu wenig Material liefern sollte, wäre ein nächster Schritt die Expression der schweren Kette in *P. pastoris*, eine methylotrophe Hefe. Die ganze Klonierung in die geeigneten Vektoren kann in *E. coli* durchgeführt werden, was das Ganze wesentlich erleichtert und vereinfacht. Nach erfolgter Konstruktion der Vektoren können sie in *P. pastoris* transformiert werden und dann gerichtet in das Hefegenom rekombinieren.

Die Expression kann ebenfalls in Minimalmedien durchgeführt werden, was eine Markierung mit ^{13}C durch Zugabe von markiertem Methanol als einzige Kohlenstoffquelle, sowie ^{15}N -markiertem Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle ermöglicht. Zudem besteht durch Wahl des geeigneten Vektors die Möglichkeit, das rekombinante Protein intrazellulär oder, dank einer N-terminalen Exportsignalsequenz, sekretiert zu exprimieren. Wird die Sekretion ins Auge gefasst, sind zumindest die beiden hauptsächlich Glykosylierungsstellen von Plasminogen zu mutieren.

Falls diese Expressionsversuche fehlschlagen, soll die Expression vom ganzen humanen Plasminogen in *P. pastoris* versucht werden, ebenfalls intrazellulär und sekretorisch, damit diese Resultate mit Experimenten mit höheren eukaryontischen Expressionssystemen verglichen werden können.

In weiteren Experimenten sollen auch diverse kleinere Fragmente von Plasminogen, wie beispielsweise rekombinantes NTP mit K1 und rekombinante K4 + K5 in *P. pastoris* exprimiert werden, damit sich diese mit aus *E. coli* isoliertem Protein vergleichen lässt. Zudem soll das Fragment NTP mit K1 mit ^{15}N markiert in *E. coli* in grösseren Mengen exprimiert werden, um strukturelle Studien mittels NMR zu ermöglichen.

7 Zusammenfassung

Plasminogen ist die Hauptkomponente der Fibrinolyse und ist in aktivierter Form für die Auflösung von Fibrin verantwortlich. Damit keine Überreaktion stattfindet, sind die Blutkoagulation und die Fibrinolyse durch ein vernetztes System von Aktivatoren und Inhibitoren reguliert, welche die beiden Reaktionsabläufe im Gleichgewicht halten. Seit der Entdeckung des Plasminogens als fibrinolytische Serinprotease konnte zudem dessen Beteiligung an verschiedenen weiteren Prozessen wie der Zellmigration und der Angiogenese im Körper nachgewiesen werden, sowie eventuell sogar ein Mitwirken am Krankheitsbild der übertragbaren spongiformen Enzephalopathien.

Durch die Bindung von Plasminogen an Fibrin, Zelloberflächen oder Liganden, mit Hilfe der Lysinbindungsstellen, findet eine Konformationsänderung von der kompakten α -Konformation zur offenen β -Konformation statt. Dadurch wird die Plasminogenaktivierungsstelle, die Bindung zwischen Arg⁵⁶¹ und Val⁵⁶², für verschiedene Enzyme zugänglich, welche diese Peptidbindung hydrolytisch spalten und aktives Plasmin freisetzen. Nebst dieser Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin können aus den sogenannten Glu-Formen durch Autoproteolyse zwischen Lys⁷⁷ und Lys⁷⁸ die Lys-Formen entstehen, wobei das sogenannte N-terminale Peptid freigesetzt wird. Bei der Generierung von Plasmin bleiben die leichte und die schwere Kette miteinander über zwei der insgesamt 24 Disulfidbrücken kovalent verbunden. Die schwere Kette umfasst demnach die fünf Kringeldomänen (K1 - K5), die für die Bindung an das Substrat verantwortlich sind. Die Bindung kommt durch eine Wechselwirkung der Lysinbindungsstellen mit Lysinresten des Substrats zustande, wobei nicht alle eine gleich starke Affinität zeigen. Die Reihenfolge ist K1 > K4 > K5 > K2, während bei K3, aufgrund einer nicht funktionellen Lysinbindungsstelle, keine Affinität nachzuweisen ist. Die leichte Kette besteht aus der Serinproteasedomäne, die mit einer katalytischen Triade, in ähnlichem Muster wie bei Chymotrypsin, ausgestattet ist.

Um strukturelle Untersuchungen mit Plasminogen durchführen und dessen Eigenschaften genauer untersuchen zu können, wurden schon mehrere Fragmente hergestellt, entweder rekombinant oder durch limitierte Proteolyse. Zu den rekombinanten Fragmenten gehören unter anderem das N-terminale Peptid sowie die fünf Kringeldomänen, die alle als einzelne Kringel oder als Multikringeldomänen exprimiert werden konnten. Hingegen Miniplasminogen bestehend aus Kringel 5 und der Serinproteasedomäne sowie Mikroplasminogen, welches der Serinproteasedomäne entspricht, konnten proteolytisch generiert werden. Durch Mutationsstudien der Lysinbindungsstellen der Kringel konnten wesentliche Erkenntnisse betreffend der Anordnung der Aminosäuren in der Bindungstasche gewonnen werden.

Die dreidimensionale Struktur vom ganzen humanen Plasminogen ist allerdings weiterhin unbekannt. Bisher konnten nur physiologische Daten von rekombinantem Plasminogen gewonnen werden sowie durch Elektronenmikroskopie und Bindungsstudien eine dreidimensionale Anordnung der α -Konformation postuliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die schwere Kette, sowie das ganze humane Plasminogen rekombinant in unglykosylierter Form zu exprimieren, damit die Struktur mittels NMR und Röntgendiffraktion gelöst werden könnte. Mit beiden Konstrukten könnte zudem durch Bindungsstudien eindeutig ermittelt werden, welche Lysinbindungsstelle mit welchem Lysin interagiert und für die kompakte α -Konformation des Plasminogens verantwortlich ist.

Zunächst wurde versucht die schwere Kette mit und ohne N-terminales Peptid in zwei verschiedenen *E. coli* Expressionssystemen mit den pQE-8 und pET-9a Vektoren zu exprimieren. Mit dem pQE-8 Vektor war eine Isolation mittels Ni²⁺-Affinität eines coexprimierten „His-tags“, sowie mittels Lysinaffinität der Lysinbindungsstellen möglich, während pET-9a Konstrukte nur über Lysinaffinität isoliert werden konnten. Aus einer pQE-8 Expression der schweren Kette mit N-terminalem Peptid konnte schliesslich genügend reines Material hergestellt werden, um zumindest eine analytische Charakterisierung des exprimierten Proteins durchführen zu können. Dabei wurde eine Fragmentierung des Proteins festgestellt, wobei aber alle Fragmente mit dem gleichen N-Terminus begannen. Demnach erschien es am wahrscheinlichsten, dass die Fragmentierung durch eine für *E. coli* inkompatible Sekundärstruktur der mRNA verursacht wurde, die zu einer frühzeitigen Termination der Proteinsynthese führte. Diese Theorie konnte durch in unserer Gruppe bereits gemachte Beobachtungen mit den Konstrukten K13 und K45 eindeutig untermauert werden. Mit den pET-9a Vektoren wurden zudem *in vitro* Expressionen mit *E. coli* Lysat und Reticulocytenlysate entsprechend prokaryontischer und eukaryontischer Transkriptions- / Translationsmaschinerie durchgeführt. Das *E. coli* System führte zwar zu einer Bande auf der richtigen Höhe, jedoch auch zu weiteren intensiven Banden mit tieferem Molekulargewicht, so dass von einer Fragmentierung ausgegangen werden musste. Im eukaryontischen System war

hingegen eine einzige Bande auf der richtigen Höhe vorzufinden. Diese Beobachtungen korrelierten sehr gut mit publizierten Daten von rekombinant exprimiertem humanem Plasminogen.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde versucht, die schwere Kette des humanen Plasminogens mit dem N-terminalen Peptid im *P. pastoris* Expressionssystem herzustellen, da dieser Organismus ein Eukaryont ist und demnach vielleicht besser mit der mRNA-Struktur umgehen kann. Allerdings war aus Kleinansätzen keine Expression des rekombinanten Proteins festzustellen, weder aus schnell und langsam Methanol-metabolisierenden Zellen, noch in intrazellulärer oder sekretierter Form.

Parallel dazu wurde auch das ganze humane Plasminogen in die pPIC3.5K- und pPIC9K-Vektoren für intrazelluläre oder sekretorische Expression kloniert. Die konstruierten Gene wurden schliesslich in GS115 und KM71 *P. pastoris* Zellen rekombiniert, entsprechend schnellem und langsamem Wachstum in Methanol-Minimalmedien. In allen vier Varianten konnte, im Gegensatz zu Versuchen mit der schweren Kette, in Kleinansätzen eine Expression nachgewiesen werden. Bei den intrazellulär exprimierten Proteinen konnte aus den Pellets eine Bande auf der richtigen Höhe immunologisch nachgewiesen werden, während im Überstand der sekretorisch exprimierten Proteine nichts zu finden war. Trotz Exportsequenz hatte keine Sekretion stattgefunden. Diese Zellen hatten die Proteine jedoch intrazellulär akkumuliert und konnten immunologisch als etwa 10 kDa höhere Banden, als dies bei den intrazellulären Expressionen der Fall war, nachgewiesen werden. Der Masseunterschied rührte von der N-terminal immer noch vorhandenen Exportsequenz her. Demnach schien *P. pastoris* zumindest im Fall des ganzen Plasminogens keine Probleme bezüglich frühzeitiger Termination der Translation durch die Sekundärstruktur der mRNA gehabt zu haben, wie dies bei verschiedenen Konstrukten in *E. coli* beobachtet worden war.

Als weiteres Projekt wurde das Konstrukt NK1, entsprechend dem N-terminalen Peptid mit dem ersten Kringel von humanem Plasminogen, in *E. coli* und *P. pastoris* exprimiert, isoliert und charakterisiert. Aus dem prokaryontischen System liess sich reines und intaktes Protein isolieren, während das Hefesystem zwar das Protein exprimierte, jedoch die Reinigung zu einer Fragmentierung durch Spaltung in der Scharnierregion führte. Aufgrund der hohen Ausbeute in *E. coli* wurde eine markierte Expression in diesem Expressionssystem angesetzt. Im Vergleich zu früheren in unserer Gruppe durchgeführten Expressionen in Vollmedien konnte die Ausbeute an markiertem Protein in Minimalmedium durch Optimierungen weiter gesteigert werden. Damit zeigte sich die Überlegenheit von *E. coli* im Vergleich zu *P. pastoris* für die Expression von NK1 sehr deutlich, obwohl das Potential der methylotrophen Hefe sicherlich noch nicht ausgeschöpft ist und die Anwendung weiterer isolationstechnischer Methoden zu reinem sowie intaktem Protein führen könnten.

Die Fluoreszenztitration von NK1 mit dem Ligand 6-AHA wurde mit jener von K1 verglichen. Die berechneten Assoziationskonstanten waren durchaus vergleichbar, jedoch lagen sie etwas tiefer als in vorgängigen Experimenten. Aus den Messungen konnte kein Einfluss des NTP auf die Wechselwirkung des Kringels 1 mit dem Liganden 6-AHA festgestellt werden, womit auch eine wichtige Rolle einer solchen Wechselwirkung in der kompakten α -Konformation des Plasminogens ausgeschlossen werden konnte.

Auch das Konstrukt K45, entsprechend den Kringeln 4 und 5, wurde in *P. pastoris* exprimiert und isoliert, jedoch mit weniger Erfolg als mit NK1. Zwar konnte die Expression von K45 nachgewiesen werden, jedoch war die Ausbeute nach der Reinigung zu gering, um eine detaillierte Analyse des Proteins durchführen zu können. Das erhaltene RP-HPLC-Chromatogramm liess allerdings auf eine Fragmentierung schliessen, wie sie schon für in *E. coli* exprimierten K45 aus früheren Experimenten in unserer Gruppe beobachtet worden war.

Eine Expression von NK13 in *P. pastoris*, entsprechend dem N-terminalen Peptid mit den ersten drei Kringeln, blieb ohne Erfolg.

Demnach scheint *E. coli* ein ideales System für die Expression von kleinen Konstrukten von humanem Plasminogen zu sein, jedoch ist das Potential für die Expression von Multidomänen des Plasminogens aufgrund der Probleme mit der Sekundärstruktur der mRNA offensichtlich ausgeschöpft. Bei *P. pastoris* ist es jedoch nicht sicher, ob in diesem System wirklich keine grösseren Mengen von Plasminogen und verschiedener Domänen hergestellt werden können als hier gezeigt. Da das Hefesystem aber noch längst nicht ausgeschöpft ist, müssten weiterreichende Untersuchungen über das Expressionsverhalten von *P. pastoris* durchgeführt werden.