

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

**Röntgenkristallographische Charakterisierung der sezernierten  
Aspartatproteinasen von *Candida albicans* als Grundlage einer  
gezielten Arzneistoffentwicklung**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Elisabeth Ruge  
aus  
Uffenheim  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.C. Korting

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. F. Ebel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Fichtl

Prof. Dr. S. Werner

Priv. Doz. Dr. A. Eberharter

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. C. Borelli

Dekan:

Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 02. 2008

***Für Matthias***

**S. D. G.**

# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | <i>Candida albicans</i> .....  | 1         |
| 1.1.1    | Klinische Bedeutung und Pathogenese von <i>Candida albicans</i> .....                      | 1         |
| 1.1.2    | Vom Kommensalen zum pathogenen Erreger: Virulenzfaktoren von <i>Candida albicans</i> ..... | 3         |
| 1.2      | Die Familie der sezernierten Aspartatproteinasen (Saps) von <i>Candida albicans</i> .....  | 4         |
| 1.2.1    | Die Sap-Isoenzyme: extrazelluläre Aspartatproteinasen .....                                | 4         |
| 1.2.2    | Die Sap-Isoenzym Familie: Synthese, Prozessierung und Sekretion der Saps .....             | 5         |
| 1.2.3    | Expression und Funktion der Saps .....   | 7         |
| 1.3      | Antimykotische Pharmakotherapie und Entwicklung neuer Antimykotika .....                   | 9         |
| 1.3.1    | Konventionelle und neuere Antimykotika .....   | 10        |
| 1.3.2    | Wirkstoffentwicklung und dreidimensionale Charakterisierung antifungaler Targets .....     | 16        |
| 1.3.3    | Struktur-basierte gezielte Arzneistoffentwicklung .....                                    | 17        |
| 1.3.4    | Gezielte Entwicklung von Aspartatproteinasen-Inhibitoren .....                             | 18        |
| 1.4      | Ziel der Arbeit .....  | 19        |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>   | <b>21</b> |
| 2.1      | Materialien .....  | 21        |
| 2.1.1    | Allgemein .....  | 21        |
| 2.1.2    | Chemikalien .....  | 21        |
| 2.1.3    | Geräte .....   | 21        |
| 2.1.4    | Chromatographiematerialien .....   | 22        |
| 2.1.5    | Puffer und Medien .....  | 22        |
| 2.1.6    | Sonstige Materialien .....   | 24        |
| 2.2      | Mikrobiologische Methoden .....  | 25        |
| 2.2.1    | Steriles Arbeiten .....  | 25        |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.2.2 | Transformation von <i>Pichia pastoris</i> .....   | 25 |
| 2.2.3 | Anzucht und Aufbewahrung der transformierten <i>Pichia pastoris</i> Stämme ..                                 | 25 |
| 2.2.4 | Expression von Sap1, Sap3, Sap5 und Sap6 .....  | 25 |
| 2.3   | <b>Proteinbiochemische Methoden - Proteinpräparation</b> .....  | 26 |
| 2.3.1 | Dialyse .....   | 26 |
| 2.3.2 | Konzentrierung von Proteinen .....  | 26 |
| 2.3.3 | Reinigung von Proteinen .....   | 27 |
| 2.4   | <b>Proteincharakterisierung</b> .....   | 30 |
| 2.4.1 | Peptidmassen-Fingerprinting – Bestimmung der Identität exprimierter<br>Proteine .....                         | 30 |
| 2.4.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption .....   | 30 |
| 2.4.3 | Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese .....  | 31 |
| 2.4.4 | Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Sap1, Sap3, Sap5 und Sap6<br>.....                               | 31 |
| 2.4.5 | Ermittlung der inhibitorischen Aktivität von Pepstatin A gegen Sap5.....                                      | 32 |
| 2.5   | <b>Kristallisation und Datensammlung</b> .....  | 33 |
| 2.5.1 | Kristallisationsmethode .....   | 33 |
| 2.5.2 | Kristallisationsbedingungen .....   | 34 |
| 2.5.3 | Montieren der Kristalle, Sammlung und Auswertung der Diffraktionsdaten  | 35 |
| 2.5.4 | Sap3 – Soaking-Versuche mit Ritonavir .....   | 36 |
| 2.6   | <b>Strukturlösung und –analyse</b> .....  | 36 |
| 2.6.1 | Theoretischer Hintergrund .....   | 36 |
| 2.6.2 | Röntgenstrukturanalyse – allgemeiner Überblick .....  | 36 |
| 2.6.3 | Beugung von Röntgenstrahlen am Kristall - Braggsche Gleichung.....  | 38 |
| 2.6.4 | Strukturfaktoren: mathematische Wellenbeschreibungen der<br>Beugungsmaxima (Reflexe) von Röntgenstrahlen..... | 39 |
| 2.6.5 | Berechnung der Elektronendichte .....   | 40 |
| 2.6.6 | Lösung des Phasenproblems der Röntgenstrukturanalyse.....   | 41 |
| 2.6.7 | Die Methode des molekularen Ersatzes - <i>molecular replacement</i> .....                                     | 41 |
| 2.6.8 | Modellbau und Verfeinerung .....  | 43 |
| 2.6.9 | Strukturanalyse und graphische Darstellung .....  | 44 |
| 3     | <b>ERGEBNISSE</b> .....   | 45 |
| 3.1   | <b>Proteinherstellung, Kristallisation und Strukturlösung</b> .....   | 45 |
| 3.1.1 | Proteinexpression .....   | 45 |

|       |  |            |
|-------|--|------------|
| 3.1.2 | Proteinaufreinigung.....   | 45         |
| 3.1.3 | Kristallisation und Strukturlösung.....  | 49         |
| 3.2   | <b>Strukturbeschreibung .....</b>  | <b>55</b>  |
| 3.2.1 | Gemeinsamkeiten der Strukturen der Sap-Isoenzyme .....                               | 55         |
| 3.2.2 | Signifikante Unterschiede der Strukturen von Sap1-3 und Sap5 .....                   | 60         |
| 3.2.3 | Das aktive Zentrum und der Substratbindungsbereich.....                              | 62         |
| 3.2.4 | Enzymbindung von Inhibitoren – die besondere Rolle des <i>active site flap</i> ..... | 68         |
| 3.2.5 | Der Sap-Pepstatin A-Komplex – ein wiederkehrendes Bindungsschema ....                | 70         |
| 3.2.6 | Inhibitorische Aktivität von Pepstatin A gegen Sap5.....                             | 72         |
| 4     | <b>DISKUSSION.....</b>   | <b>73</b>  |
| 4.1   | Die Sap-Familie – eine Untergruppe der großen Familie der Aspartatproteinasen.....   | 73         |
| 4.2   | Differenzierung der Sap-Familie in Subgruppen .....                                  | 75         |
| 4.3   | Substratspezifität von Sap1-3 und Sap5 .....   | 77         |
| 4.4   | Inhibitorbindungsstudien an Sap1-3 sowie Sap5.....                                   | 78         |
| 4.5   | Schlußfolgerung und Ausblick.....  | 82         |
| 5     | <b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>  | <b>84</b>  |
| 6     | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>  | <b>87</b>  |
| 7     | <b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>  | <b>91</b>  |
| 8     | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>92</b>  |
| 9     | <b>ABKÜRZUNGEN .....</b>   | <b>112</b> |
| 10    | <b>DANKSAGUNG .....</b>  | <b>114</b> |
| 11    | <b>LEBENS LAUF .....</b>   | <b>116</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 *Candida albicans*

### 1.1.1 Klinische Bedeutung und Pathogenese von *Candida albicans*

Ein dramatischer Anstieg an *Candida*-assoziierten Infektionen ließ die Bedeutung des Genus *Candida* während der letzten Jahre immens wachsen. *Candida*-Spezies gehören mittlerweile - einer Erhebung in den USA zufolge - zu den vierthäufigsten Erregern, die für nosokomiale septische Infektionen verantwortlich sind [143, 144]. Die Gattung *Candida* umfasst etwa 150 Arten, von denen etwa 20 *Candida* Arten als Infektionserreger beschrieben wurden. Dabei stellt *Candida albicans* (*C. albicans*) mit einem Vorkommen von etwa 60-80% innerhalb der *Candida*-Spezies den Erreger mit häufigster Inzidenz dar [177]. *C. albicans* kann als die am besten untersuchte Spezies der Gattung bezeichnet werden [94, 132, 135, 151], was sich vermutlich auf die herausragende Stellung in Häufigkeit und klinischer Relevanz zurückführen lässt.

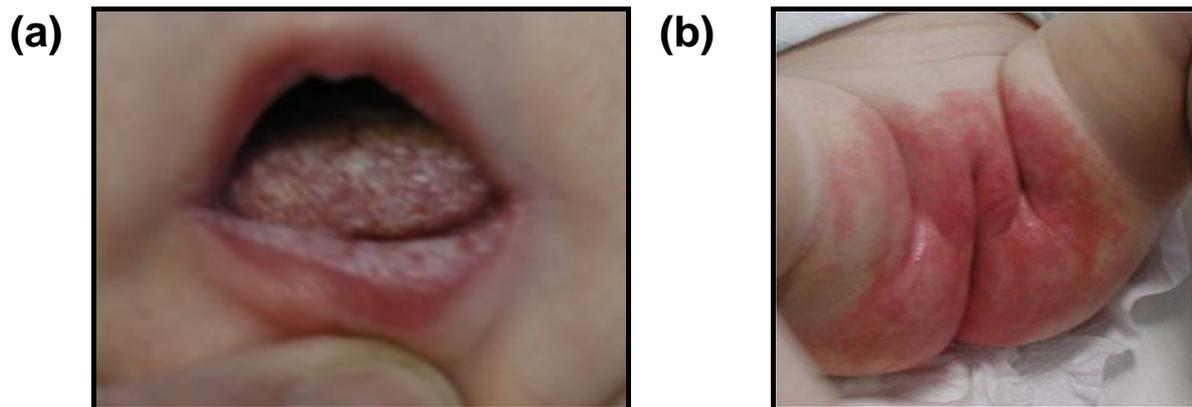
*Candida*-Arten sind eukaryontische Mikroorganismen und werden aufgrund ihrer ungeschlechtlichen Fortpflanzungsweise innerhalb des Reichs der Pilze der Abteilung der Deuteromycetes, auch Fungi imperfecti genannt, zugeordnet. Dermatologisch betrachtet gehören *Candida*-Spezies zu der Gruppe der Hefen, die sich als Sprosspilze von den Dermatophyten (Fadenpilze) und Schimmelpilzen abgrenzen.

Diagnostischer Nachweis und Differenzierung der *Candida* spp. gelingt einerseits mittels Anzucht auf unterschiedlichsten Nährböden (Sabouraud-Glucose-Agar, Albicans ID-Agar, Reis-Tween-Agar u.a.) mit anschließender makroskopischer sowie mikroskopischer Betrachtung. Andererseits wird zur Bestimmung von *Candida* die biochemische Beurteilung der Assimilation und Fermentation von Kohlenhydraten und Stickstoff-Quellen („bunte Reihen“) zu Hilfe genommen. Mit neuen Techniken wie der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann heutzutage in relativer kurzer Zeit ein direkter genetischer Nachweis einzelner *Candida*-Arten durchgeführt werden [65, 175].

*C. albicans* gehört als fakultativ pathogener Keim zur Normalflora des Menschen und wird bei bis zu 71% der gesunden Population im Gastro-Intestinal-Trakt, auf der Rachenschleimhaut sowie im Genitalbereich nachgewiesen [157]. Ein intaktes Immunsystem und eine normale mikrobielle Flora schützen den Organismus vor einer *Candida*-Infektion. Nur geringfügige Änderungen des physiologischen Gleichgewichts jedoch können die harmlosen kommensalen Hefen in aggressive pathogene Keime verwandeln. Oberflächliche

Candidosen (oral, vaginal, intertriginös) aber auch schwere systemische Erkrankungen (Organmykosen, *Candida*-Sepsis) sind Folge einer Infektion mit *Candida spp.*

Feucht-warme Areale wie beispielsweise die Mundschleimhaut (Mundsoor, **Abb. 1 a**) oder der Windelbereich (Windeldermatitis, **Abb. 1 b**), aber auch intertriginöse Bereiche, in denen Hautpartien aufeinanderliegen (Achseln, Leisten, Finger- und Zehenzwischenräume, Gesäßfalten, submammärer Bereich), sind ideale Nährböden für *C. albicans* [47].



**Abbildung 1:** Durch *Candida albicans* verursachte weitverbreitete Krankheitsbilder. (a) Mundsoor, gekennzeichnet durch herdförmige, leicht abstreifbare weißliche Auflagerungen auf gerötetem Grund; (b) Windelsoor, eine Sonderform der *Candida*-Intertrigo mit typischerweise scharf begrenzten, nässenden Erythemen (<http://www.paediatric-in-bildern.de>).

Nicht lebensbedrohlich zwar, doch klinisch von großer Bedeutung sind die durch *Candida spp.* ausgelösten vaginalen Schleimhautinfektionen, die bei dreiviertel aller gesunden Frauen auftreten. Etwa 5% der Frauen leiden dabei unter immer wiederkehrenden Infektionen, der rezidivierenden vulvo-vaginalen Candidose [164, 165].

Bei immunsupprimierten Patienten, wie beispielsweise Patienten mit HIV-Infektion, Leukämie oder Neutropenie, Intensivpatienten oder Organtransplantantierten unter medikamentöser Immunsuppression, treten Schleimhaut-Candidosen in stetig wachsender Zahl auf.

Liegen begünstigende Faktoren vor, können sich Sprosszellen aus den mit *Candida* besiedelten Schleimhäuten in verschiedene Organe bis hin zum zentralen Nervensystem absiedeln, im Sinne einer Fungämie mit eventuell nachfolgender Organmykose und/oder *Candida*-Sepsis [177]. In den letzten Jahren musste eine steigende Morbidität und Mortalität systemischer Candidosen verzeichnet werden [64].

### 1.1.2 Vom Kommensalen zum pathogenen Erreger: Virulenzfaktoren von *Candida albicans*

Der Übergang von *C. albicans* vom harmlosen Kommensalen zum ungehemmt wachsenden Parasiten bedarf eines breiten Repertoires an Virulenzfaktoren, die unter spezifischen Bedingungen gebildet werden [84, 171]. Im Gegensatz zu hochspezialisierten rein pathogenen Keimen, die nur einen Virulenzfaktor exprimieren, ermöglicht das gesamte Repertoire dem Erreger *C. albicans*, sich an viele unterschiedliche Nischen des Wirts zu adaptieren und somit das breite Spektrum klinisch manifestierter Infektionen auszulösen [106]. Die Expression spezifischer Virulenzfaktoren hängt stark von der Infektionsart (oberflächlich oder systemisch), von Ort und Grad der Infektion sowie von der Natur der Wirtsabwehr ab [36, 136]. Nach Eindringen von *C. albicans* in die Blutbahn wird dem Pilz der Eintritt in fast alle Körperregionen und Organe des Wirtssystems eröffnet, was jedoch eine Anpassung des Erregers an die unterschiedlichsten Umgebungen erfordert. Tatsächlich besitzt *C. albicans* die Fähigkeit, in etlichen Körperregionen, die sich massiv in Sauerstoff- und Kohlendioxid-Versorgung, pH, Osmolarität, Nährstoffversorgung und Temperatur unterscheiden, nicht nur zu überleben sondern sich sogar zu vermehren [84].

Zur Virulenz von *C. albicans* scheinen folgende Faktoren beizutragen [23]:

- Adhäsine (Biomoleküle zur Erkennung des Wirtssystems)
- Morphogenese (reversibler Übergang von unizellulären Hefezellen zu filamentösen Hyphen)
- „phenotypic switching“, begleitet von Veränderungen der Antigen Expression, der Morphologie der Kolonien („white“- oder „opaque“-Form) und Änderungen von Zelloberflächeneigenschaften und Gewebeaffinitäten
- Produktion extrazellulärer Hydrolasen wie die sezernierten Aspartatproteinasen, Phospholipasen und Lipasen.

Da die sezernierten Aspartatproteinasen bei der Virulenzentwicklung von *C. albicans* eine Schlüsselrolle einnehmen, gelten sie als die am besten untersuchten Virulenzfaktoren [128]. Eine gesteigerte proteolytische Aktivität wurde schon bald als Virulenzfaktor pathogener *Candida*-Arten erkannt. Bei Untersuchungen zur Aktivität der sezernierten Aspartatproteinasen wurde ihre direkte Proportionalität zur Virulenz der *Candida* Spezies gezeigt [156]. Weitere Hinweise auf die bedeutende Rolle der sezernierten Aspartatproteinasen als Virulenzfaktoren lieferten Vergleiche von Proteolyse-defizienten Mutanten von *C. albicans* mit deren proteolytischen parentalen Stämmen [39, 108, 114, 154]. Die Proteolyse-defizienten Mutanten wurden bei mit *Candida* infizierten Mäusen als weit weniger pathogen beurteilt als ihre nicht-mutierten Verwandten. Der klassische Aspartatproteinase-Inhibitor Pepstatin A konnte *in vitro* das Wachstum von *C. albicans* verhindern [179]. Ebenso blockierte Pepstatin A *in vitro* die Bildung von Kavitationen im

Stratum corneum durch *Candida*-Hefezellen [148] sowie die Adhäsion der Hefezellen an humanen mukosalen [16] und epidermalen Keratinozyten [139]. Klinische Isolate aus oralen oder vaginalen Candidosen, deren proteolytische Aktivität *in vitro* aber auch *in vivo* (in Mäusen oder Ratten) mit ihrer Virulenz in Korrelation gesetzt wurde, wiesen in zahlreichen Studien eine gesteigerte proteolytische Aktivität auf [2, 3, 28, 39, 41, 43, 44, 140, 192].

Zwischen der Produktion der sezernierten Aspartatproteinasen und dem Auftreten anderer Virulenzfaktoren wie Adhäsion, Morphogenese und „phenotypic switching“ wurde interessanterweise ein enger Zusammenhang beobachtet, was die komplexe Rolle dieser Enzyme im Prozess der Pathogenese von *C. albicans*-Infektionen unterstreicht [127].

## 1.2 Die Familie der sezernierten Aspartatproteinasen (Saps) von *Candida albicans*

### 1.2.1 Die Sap-Isoenzyme: extrazelluläre Aspartatproteinasen

Extrazelluläre Proteinase von parasitären Mikroorganismen dienen in erster Linie dazu, komplexes Material in kleinere, für den Parasiten verwertbare Komponenten, zu spalten. Sie verhelfen den Mikroorganismen zudem, mit anderen Bakterien, Parasiten oder Pilzen in Wettbewerb treten zu können [34]. Obligat pathogene Mikroorganismen wie bestimmte Bakterien oder Pilze scheinen die zum Lebenserhalt dienende Funktion in der Weise verändert zu haben, daß sie während des Infektionsprozesses im Menschen, im Tier oder in Pflanzen bestimmte spezialisierte Funktionen ausüben können. In fakultativ pathogenen Erregern wiederum scheinen die extrazellulären Proteinase beidem zu dienen – dem saprophytären Wachstum der Erreger und dem Infektionsprozess [127].

Proteinase werden generell nach ihrem katalytischen Mechanismus klassifiziert. Man unterscheidet folgende vier Klassen [12]:

- Serinproteinase,
- Cysteinproteinase,
- Metalloproteinase,
- Aspartatproteinase.

Interessanterweise gehören alle sezernierten Proteinase von *C. albicans* der Klasse der Aspartatproteinase an. Weder Serin-, Cystein- noch Metalloproteinase wurden bei pathogenen *Candida*-Spezies identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ausschließlich die Gruppe der Aspartatproteinase näher betrachtet.

Aspartatproteinasen sind weitläufig verbreitet. So wurden diese Proteine in Vertebraten, Pilzen und Pflanzen, später auch in Retroviren beschrieben [38]. Verschiedenste Proteingruppierungen wie beispielsweise die Pepsine, Chymosine, Cathepsine, Renine, retroviralen Proteinase sowie die fungalen Aspartatproteinasen gehören dieser Klasse an [80, 173]. Aspartatproteinasen haben charakteristischerweise ein pH-Optimum im sauren Bereich. Sie werden durch Pepstatin A – ein Hexapeptid aus *Streptomyces* [180] – inhibiert, verfügen über zwei katalytische Aspartat-Reste im aktiven Zentrum [67, 100] und schneiden bevorzugt Substrate mit voluminösen hydrophoben Aminosäuren an den Positionen P1 und P1' [67]. Die meisten der Enzyme bestehen aus einer einzigen Aminosäurekette und weisen ein Molekulargewicht von etwa 35 kDa auf.

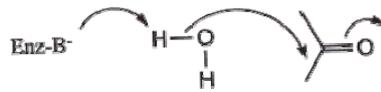
Der enzymatische Katalyseprozess der Aspartatproteinasen beruht auf dem sogenannten „generelle Base“-Reaktionsmechanismus. „Generelle Base“-Katalyse tritt dann auf, wenn zu Beginn der Katalyse entweder ein Substrat oder Wasser deprotoniert wird, bevor das eigentliche Substrat angegriffen wird. Voraussetzung ist, daß einer der aktiven Reste in der Enzymtasche deprotoniert vorliegt (**Abb. 2 a**). Am Beispiel der Struktur von Endothiapepsin in Komplex mit einem Difluoroketon (*gem*-diol)-Inhibitor [184] soll der Katalyseprozess kurz skizziert werden: Ein Wassermolekül - an beide katalytische Aspartate im nativen Enzym gebunden – greift die zu spaltende Peptidbindung nukleophil an. Es bildet sich ein tetrahedraler Übergangszustand aus, der über Wasserstoffbrückenbindungen zum negativ geladenen Aspartat-Rest stabilisiert wird. Während der endgültigen Spaltung der Peptidbindung erfolgt der Transfer eines Protons durch das zweite katalytische Aspartat oder durch ein Lösungsmittelmolekül (**Abb. 2 b**).

### 1.2.2 Die Sap-Isoenzym Familie: Synthese, Prozessierung und Sekretion der Saps

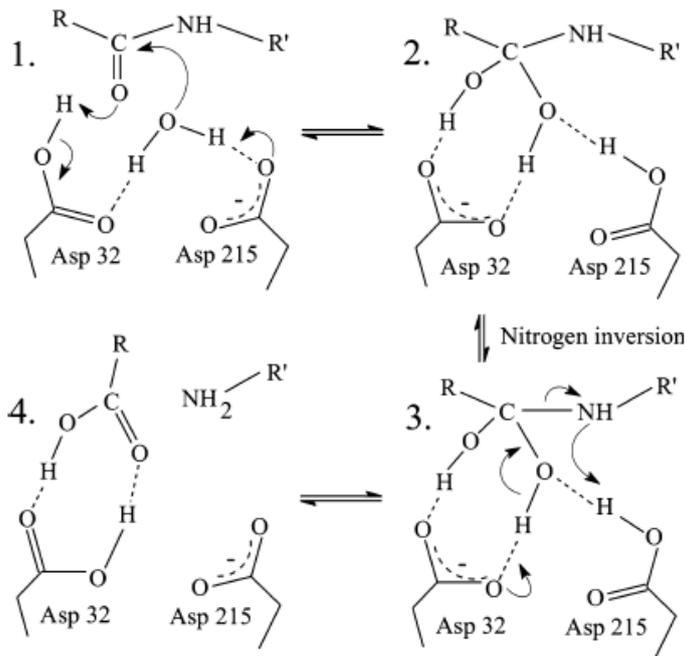
Erst im Laufe der Jahre wurde die Familie der Saps in ihrer Gesamtheit beschrieben. Sie besteht aus zehn Isoenzymen mit einem Molekulargewicht zwischen 35 und 50 kDa, die von zehn verschiedenen Genen SAP1-10 kodiert werden [63, 123, 124]. Im Gegensatz zu den sezernierten Isoenzymen Sap1-8 weisen Sap9 und Sap10 C-terminale Sequenzen auf, die typischerweise bei Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Proteinen zu finden sind.

Die Aminosäuresequenzen von Sap1-3 zeigen bis zu 67% Sequenzidentität, während Sap4-6 bis zu 89% identisch ist. Sap7 unterscheidet sich mit einer Identität von 20 bis 27% am meisten von allen Sap-Isoenzymen [86]. Das in **Abb. 3** dargestellte Dendrogramm illustriert sequentielle Gruppierungen innerhalb der Sap-Isoenzym-Familie.

(a)



(b)



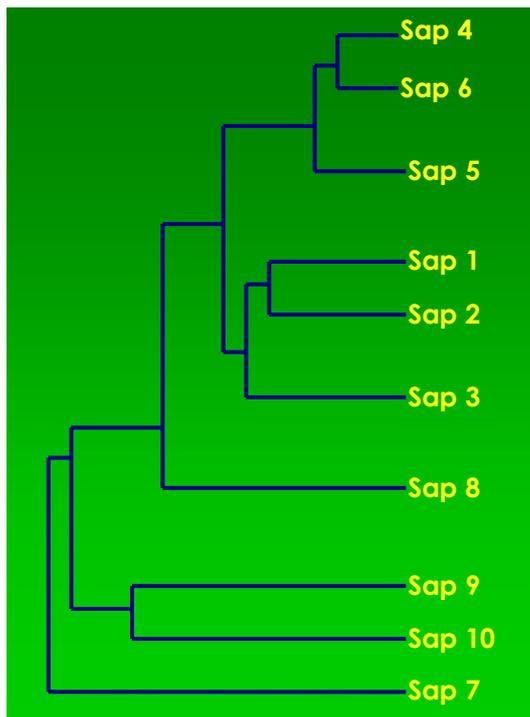
**Abbildung 2:**

Die katalytische enzymatische Spaltung der Aspartatproteinasen erfolgt durch „generelle Base“-Reaktion.

(a) Vereinfachte Darstellung der „generellen Base“-Katalyse. Der aktive Rest liegt im deprotonierten Zustand vor, um wiederum ein Wassermolekül deprotonieren zu können, bevor das Substrat angegriffen wird.

(b) Der katalytische Prozess nach Veerapandian et al. (1992). Der Mechanismus basiert auf der Röntgenkristallstruktur eines Difluoroketon (*gem*-diol)-Inhibitors gebunden an Endothiapepsin. Ein Wassermolekül, das an beide katalytischen Aspartate im nativen Enzym gebunden ist, soll die zu spaltende Peptidbindung nukleophil angreifen (1.). Der tetrahedrale Übergangszustand (2.) wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zum negativ geladenen Asp32 stabilisiert (3.). Die endgültige Spaltung der Peptidbindung wird durch den Transfer eines Protons von Asp215 oder von einem Lösungsmittelmolekül begleitet (4.). Gestrichelte Linien indizieren Wasserstoffbrückenbindungen.

[Asp215 des Endothiapepsins entspricht dem Asp218 der Saps].



**Abbildung 3:** Dendrogramm der Sap-Isoenzyme von *C. albicans*.

Drei unterschiedliche Gruppierungen werden innerhalb der Familie beobachtet. Sap1-3 zeigen dabei bis zu 67% Aminosäuresequenz-Identität, Sap4-6 bis zu 89%. Sap7 besitzt eine Identität von nur 20 bis 27% gemessen zu den anderen Isoenzymen der Sap-Familie.

Die Saps von *C. albicans* werden in ihrer ursprünglichen Form als Prä-Pro-Enzyme gebildet. Diese sind etwa um 60-200 Aminosäuren länger als das eigentliche Enzym und werden während des sekretorischen Transportweges zum reifen Enzym prozessiert (**Abb. 4**).

Noch im rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) der Hefezelle, wo die Synthese der Sap-Isoenzyme stattgefunden hat, wird das N-terminale Signalpeptid (Präpeptid) durch einen Signalpeptidase-Komplex abgespalten [186]. Im Golgi-Apparat erfolgt die Prozessierung des Proenzym zum aktiven Enzym durch Abspaltung des Propeptids nach einer konservierten Spaltstelle Lys-Arg mit Hilfe der Subtilisin-artigen Endoproteinase Kex2 [92]. Das Propeptid dient vermutlich als intramolekulares Chaperon der richtigen Faltung des Proteins [127].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung von Synthese und Prozessierung der Sap-Isoenzyme

Zwar scheint Kex2 eine wichtige Position während der Aktivierung der Sap-Isoenzyme einzunehmen, doch wurde auch extrazelluläre Autoaktivierung ohne Beteiligung von Kex2 unter bestimmten pH Bedingungen beobachtet [101]. Während des Austritts aus dem Golgi-Apparat werden die aktiven Enzyme in sekretorische Vesikel gepackt, zur Plasmamembran transportiert und dort entweder in den extrazellulären Raum sezerniert (Sap1-8) [159] oder an die Zellmembran bzw. Zellwand angeheftet (Sap9 und Sap10) [5, 63, 123].

### 1.2.3 Expression und Funktion der Saps

Die Tatsache, daß die Familie der Saps aus zehn verschiedenen Isoenzymen besteht, könnte darauf hinweisen, daß Infektionen durch *C. albicans* auf unterschiedlichen Expressionsmustern sowie Regulationsmechanismen beruhen.

Unter *in vitro* Bedingungen, bei denen Stickstoff die einzige Nahrungsquelle darstellt, wird in erster Linie das Isoenzym Sap2 produziert [24, 85, 190]. Sap2 gilt deshalb als das am besten charakterisierte Sap-Isoenzym. Untersuchungen zeigten, daß die Bildung von Sap2 durch eine Akkumulation von Peptidspaltstücken nach Proteolyse hochmolekularer Proteine

induziert wird [85]. Sap2 ist in der Lage, ein immenses Spektrum an Proteinen zu spalten. Zu den wichtigsten gehören humane Proteine wie Mucin [33, 46] und sekretorisches Immunglobulin A (IgA), die unter anderem dem Schutz mukosaler Oberflächen dienen [73, 125]. Desweiteren degradiert Sap2 Moleküle der extrazellulären Matrix wie Keratin, Kollagen und Vimentin [83, 137, 149]. *In vivo* erfüllt Sap2 damit nicht nur die Aufgabe, den Erreger mit lebenserhaltenden Nährstoffen zu versorgen, sondern auch potentielle Bindungsstellen zur Anheftung, Kolonisation und Penetration des Wirtsgewebes zu schaffen sowie durch Manipulation der mukosalen und systemischen Immunantwort der Erregerabwehr des Wirtssystems zu entkommen.

Die Expression der Gene SAP1 und SAP3 *in vitro* erfolgt nach „phenotypic switching“ von *C. albicans*-Hefezellen von der „white“- zur „opaque“-Form [126, 191].

Schaller et al. und Korting et al. [103, 158, 161] entdeckten eine mögliche Bedeutung der Isoenzyme Sap1-3 während der Etablierung von Candidosen auf humanen Schleimhautoberflächen. Auf mit *C. albicans* infizierten oralen und vaginalen Schleimhautmodellen (Rekonstituiertes humanes Epithel – RHE) wurde die Expression der Isoenzym-Untergruppe Sap1-3 im initialen Infektionsstadium von epithelialer Kolonisation mit nachfolgender Gewebeschädigung nachgewiesen. Daß die Untergruppe der Sap-Isoenzyme Sap1-3 aller Wahrscheinlichkeit nach die Gruppe derjenigen Proteinasen repräsentiert, die *in vivo* im Wesentlichen zu Schleimhautinfektionen beitragen, wurde durch weitere Studien erhärtet: Sap1-3 spielten für die initiale Penetration von *C. albicans* in Schleimhautoberflächen [27], für die Infektion in einem Vaginitis-Modell in der Ratte [29, 40] und für die Adhäsion an bukkalen Epithelzellen [13, 18, 187] eine wichtige Rolle.

Expression der Gene SAP4-6 steht in klarem Zusammenhang mit dem Übergang der *Candida*-Zellen von der Hefen- zur Hyphenform im fast neutralen pH-Bereich [85, 190]. SAP-defiziente Mutanten gaben erste eindeutige Hinweise auf die Beteiligung der Isoenzym-Untergruppe Sap4-6 an systemischen Infektionen mit *C. albicans* [87, 190]. Studien zur Untersuchung muriner Peritonitis demonstrierten ebenfalls eine mögliche Rolle von Sap4-6, aber nicht von Sap1-3 bei systemischen Candidosen [62, 105]. Sap4-6 scheint für *Candida* zum Schutz vor der Phagozytose von Makrophagen wichtig zu sein. In einer Studie wurde eine um etwa 50% gesteigerte Elimination einer *sap4-6* Dreifachmutante im Gegensatz zum Wildtyp ermittelt [17].

Trotz allem ist die Expression der Isoenzyme Sap4-6 nicht nur an systemische Infektionsprozesse gebunden, da diese Proteine in nahezu allen Infektionsmodellen (humanen und murinen, mukosalen und systemischen) zu detektieren waren. Obwohl Sap4-6 wohl nicht direkt zur Pathogenese mukokutaner Candidosen beizutragen scheinen, könnten sie möglicherweise zum Überleben und zur Proliferation von *C. albicans in vivo* beisteuern [127].

Insgesamt gilt die Einteilung der Sap-Isoenzym Familie in die Untergruppen Sap1-3 und Sap4-6 aufgrund ihrer unterschiedlichen Expressionsmuster, Funktionen und Targets in oberflächlichen und systemischen Infektionsprozessen mittlerweile als überaus relevant.

Untersuchungen zu Sap7, das sich am meisten von den anderen Isoenzymen der Sap-Familie unterscheidet, lieferten bisher zweideutige Ergebnisse [174].

Expression von Sap8 wurde im Zusammenhang mit „phenotypic switching“ beobachtet. Die Genexpression von Sap8 unterliegt jedoch *in vitro* einer Temperatur-abhängigen Regulation und wird vor allem bei 30°C anstatt der üblichen 37°C induziert [88]. Zwar könnte dies auf eine bevorzugte Bildung von Sap8 während Oberflächen-Infektionen hindeuten, doch bleibt die Rolle von Sap8 während des Infektionsprozesses durch *C. albicans* weiterhin unklar [127].

Die Funktionen der membranständigen Proteinasen Sap9 und Sap10 für Integrität an der Zelloberfläche, für Adhäsion und Zellseparation wurde erst kürzlich beschrieben [4].

### **1.3 Antimykotische Pharmakotherapie und Entwicklung neuer Antimykotika**

Pilzinfektionen sind heutzutage in nahezu allen Bereichen der Medizin von großer Bedeutung. Das Spektrum der Erkrankungen reicht vom Therapieproblem Nagelpilzerkrankung und anderen Dermatomykosen über die vaginalen Candidosen bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen bei reduzierter Abwehrlage. Noch bis in die 1970er Jahre hinein galten fungale Infektionen gemeinhin als heilbar, weshalb die Nachfrage nach neuen antimykotischen Arzneistoffen zu dieser Zeit als eher gering eingestuft werden muß. Inzwischen stellen jedoch invasive Pilzinfektionen eine wachsende Gefahr für die Menschheit dar [185]. Dem Mykologen steht derzeit zur Behandlung von Pilzerkrankungen zwar eine Reihe von Antimykotika (AM) zur Verfügung, doch limitiert sich deren Einsatz zunehmend durch Auftreten von Toxizitätsproblematiken und resistenten Pilzstämmen. Deshalb gilt die Entwicklung neuer AM sowie die Weiterentwicklung der bereits verwendeten AM als unerlässlich.

Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über Entdeckung, Entwicklung und Wirkweise der aktuell eingesetzten antimykotischen Wirkstoffe geben.

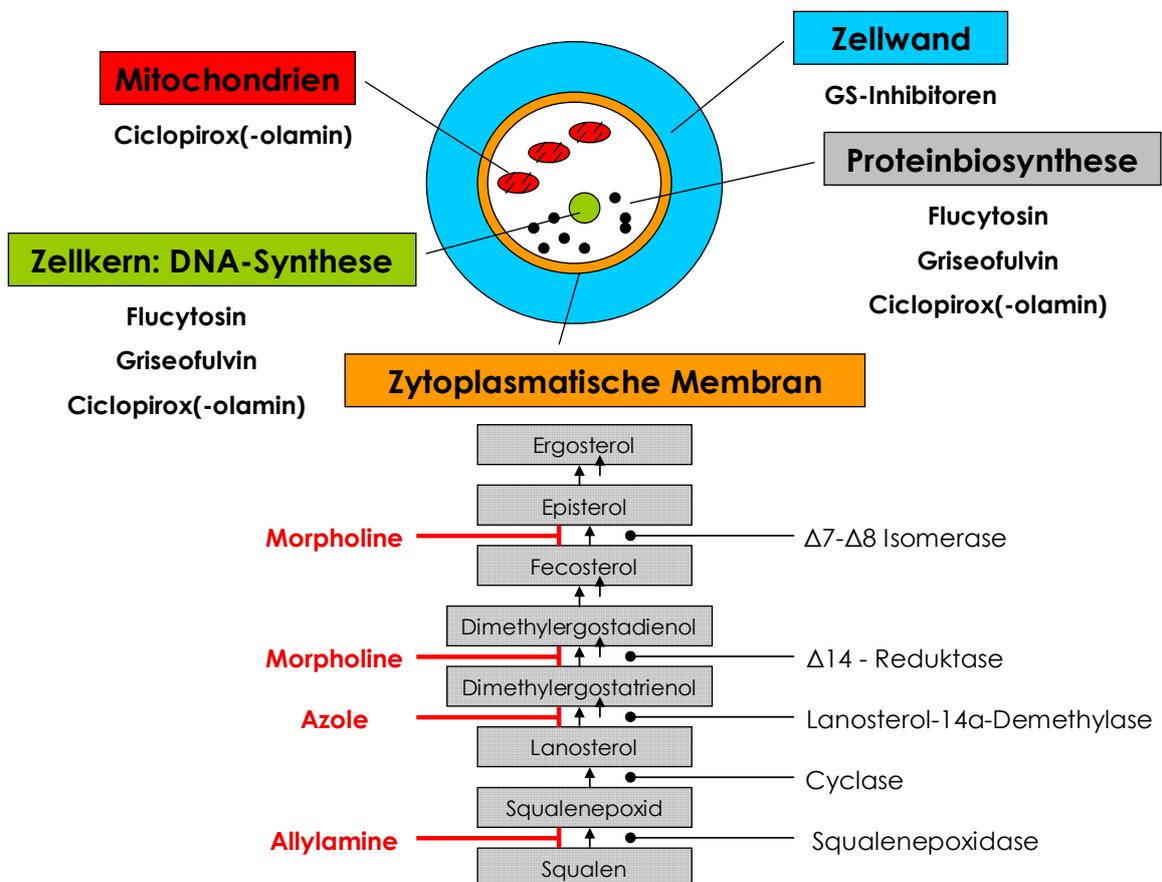
### 1.3.1 Konventionelle und neuere Antimykotika

Eine ganze Reihe der bekannten AM greifen in Aufbau und Synthese der Zellmembran der Pilzzellen ein. Im Gegensatz zu der mit Cholesterol besetzten menschlichen Zellmembran enthalten die Pilze Ergosterol. Beeinträchtigung der Ergosterol-Biosynthese und der physiologischen Funktionen des Ergosterols führen letztlich zu Wachstumshemmung (fungistatischer Effekt von AM) oder zum Absterben der Pilze (fungizider Effekt von AM).

Einen weiteren pilzspezifischen Angriffspunkt für AM bieten die Pilzzellen mit ihrer Zellwand, die die menschlichen Zellen nicht aufweisen. Die Zellwand der Pilze dient unter anderem dem Formerhalt der Zellen [135] und besteht zu 80-90% aus Kohlenhydraten ( $\beta$ -Glukan, Mannan, Chitin). Weitere Bestandteile stellen Proteine (Mannoproteine, 6-25%) und Fette (Glykolipide, 1-7%) dar [32].

Nicht zuletzt existieren AM, die in molekulare Zellvorgänge der Pilze wie beispielsweise RNA- und DNA-Synthese oder mikrotubuläre Prozesse eingreifen.

**Abb. 5** gibt einen Gesamtüberblick über unterschiedliche Angriffspunkte der in der heutigen Therapie eingesetzten antimykotischen Wirkstoffe.



**Abbildung 5:** Angriffspunkte gebräuchlicher Antimykotika in der Pilzzelle

### **Wirkstoffe mit Angriffspunkt an der Zellmembran: Polyene**

Das Wirkprinzip der Polyene beruht auf einer direkten Komplexbildung des Wirkstoffs mit Ergosterol-Molekülen in der Zellmembran. Acht Polyen-Moleküle bilden nach dem Modell von de Krujff et al. [45] einen Kanal mit acht Ergosterol-Molekülen, der aufgrund der amphiphilen Struktur der Polyene eine hydrophile Innenseite und eine hydrophobe Außenseite besitzt. Die Polyen/Ergosterol-Kanäle bilden Poren in der Zellmembran, durch die Protonen und monovalente Kationen aus dem Zellinneren austreten, was letztlich zur Zerstörung der Pilzzellen führt. Vergleichbare, wenn auch schwächere Wechselwirkungen zeigen die Polyene mit dem Cholesterol der menschlichen Zellmembran. Daraus resultieren die zum Teil schweren toxischen Nebenwirkungen, welche allerdings lediglich bei parenteraler, nicht bei lokaler Gabe, auftreten. Als erster Polyen-Wirkstoff wurde im Jahre 1950 das lokal eingesetzte Nystatin (**Abb. 6**) entdeckt. Erst sechs Jahre danach konnte das systemisch wie topisch einsetzbare Amphotericin B (**Abb. 6**) aus *Streptomyces nodosus* isoliert werden [56]. Um die toxischen Nebenwirkungen dieses Wirkstoffs zu verringern, wurden später liposomale Darreichungsformen des Amphotericin B entwickelt.

### **Wirkstoffe mit Angriffspunkt an der Zellmembran: Azole, Allylamine, Morpholine**

Wirkstoffe der Substanzklassen der Azole, Allylamine und der Morpholine greifen insbesondere in die Ergosterol-Biosynthese ein (**Abb. 5**). Ergosterol ist eine essenzielle Komponente der Zellmembran von Pilzen, das für die Membranfluidität und –integrität und für die Funktion membranständiger Proteine wichtig ist. Hemmung der Biosynthese von Ergosterol führt zu einer veränderten Zusammensetzung der Zellmembran der Pilze und somit zum Austritt essentieller Zellbestandteile aufgrund erhöhter Membranpermeabilität sowie zu Beeinträchtigungen der Funktion membranständiger Enzyme [20].

Erste topische Vertreter der Substanzklasse der Azole wurden in den späten 1960er Jahren eingeführt: die Imidazole Clotrimazol (**Abb. 6**), Miconazol und Econazol. Sehr viel später wurde Ketoconazol (**Abb. 6**) als erster oraler Azol-Wirkstoff zur systemischen antimykotischen Therapie eingesetzt [79]. Toxizität und verminderte Wirksamkeit des Ketoconazols bei schwerwiegenden Pilzinfektionen führten zur Entwicklung einer weiteren Wirkstoffgruppe der Azole – den Triazolen. Fluconazol und Itraconazol (**Abb. 6**) – beides wichtige Vertreter dieser Substanzklasse – zeichneten sich durch ein breiteres antifungales Wirkspektrum aus. Die orale Therapie mit Itraconazol wird jedoch durch sein variables Absorptionsspektrum eingeschränkt, während die Wirkung von Fluconazol immer mehr durch resistente Pilzstämme in Frage gestellt wird. Als ein wichtiger Fortschritt in der AM-Therapie gilt daher die Entwicklung der Triazole der sogenannten „zweiten Generation“ wie beispielsweise das bereits am Markt verfügbare Voriconazol (**Abb. 6**).

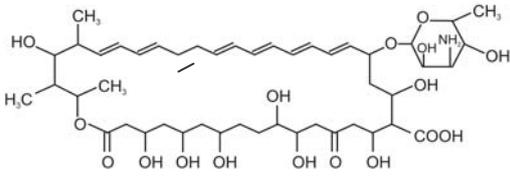
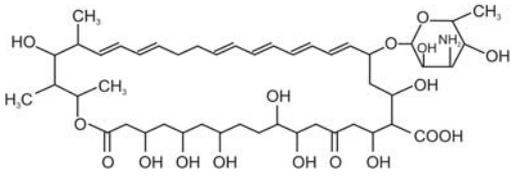
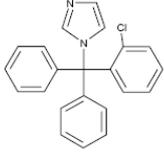
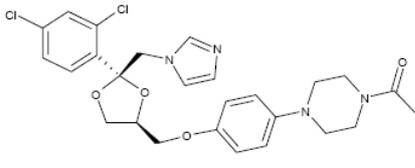
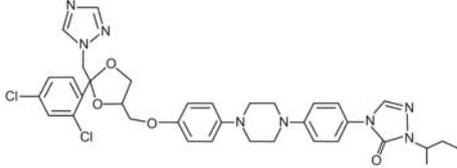
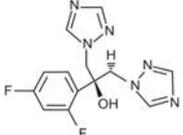
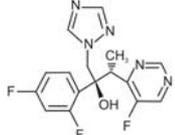
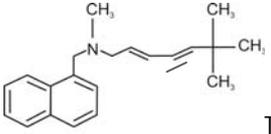
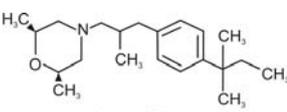
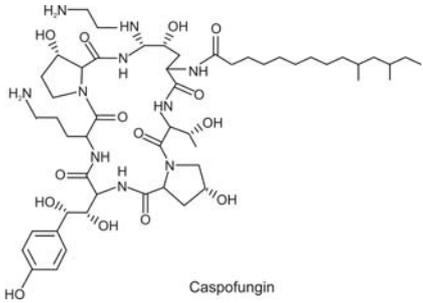
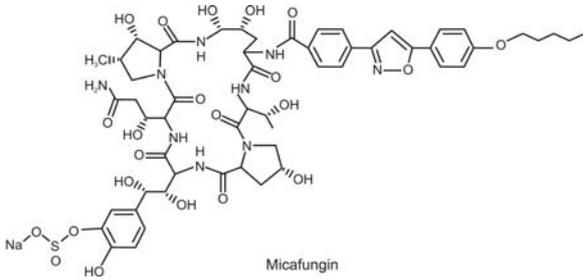
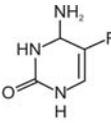
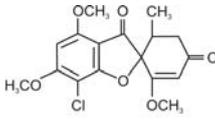
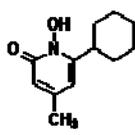
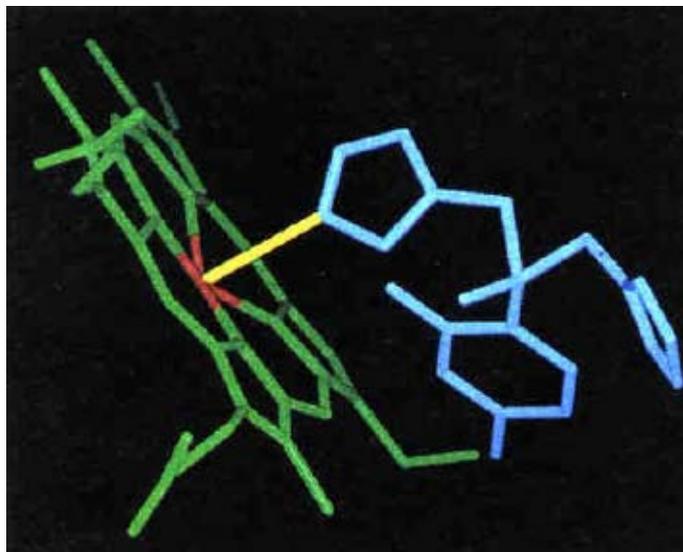
| Polyene   |  |   |
|---|--|---|
|  <p>Amphotericin B</p> |  <p>Nystatin</p>     |   |
| Imidazole   |  |   |
|  <p>Clotrimazol</p>    |  <p>Ketoconazol</p>  |   |
| Triazole  |  |   |
|  <p>Itraconazol</p>   |  <p>Fluconazol</p>   |  <p>Voriconazol</p> |
| Allylamine  |  | Morpholine  |
|  <p>Terbinafin</p>   |  |  <p>Amorolfin</p>   |
| Glucan-Synthase Inhibitoren   |  |   |
|  <p>Caspofungin</p>  |  <p>Micafungin</p> |   |
| Flucytosin  | Griseofulvin   | Ciclopirox (-olamin)  |
|                      |                     |                    |

Abbildung 6: Chemische Strukturen derzeit therapeutisch angewandeter Antimykotika

Essentiell für die Wirkung der Azole ist ihr Imidazol- bzw. Triazolring. Ein Stickstoff dieser Heterozyklen bindet mit hoher Affinität zum Häm-Eisenatom der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase [15] (**Abb. 7**) – ein Enzym der Ergosterol-Biosynthese.



**Abbildung 7:** Wechselwirkung von Azolen (blau) mit dem an das Häm (grün) gebundene Eisenatom (rot). (aus [66])

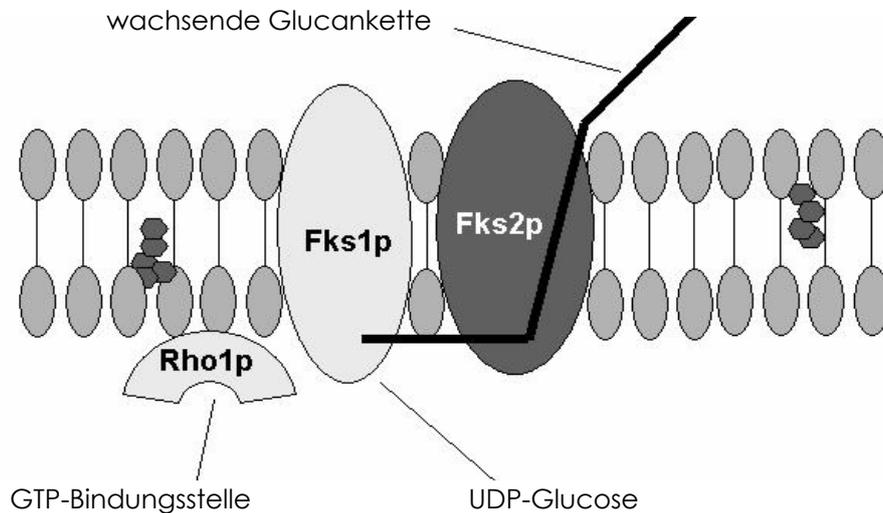
Die fungizide Wirkung der Allylamine beruht auf der selektiven Hemmung der fungalen Squalenepoxidase, eines weiteren Enzyms der Ergosterol-Biosynthese, und der daraus resultierenden Anhäufung von Squalen in der Pilzzelle [72]. Das erste AM der Klasse der Allylamine wurde per Zufall während des Screenings nach zentral aktiven Wirkstoffen gefunden [111]. Gezielte Struktur-Aktivitäts-Studien auf Basis des Naftifins führten zur Entdeckung des Terbinafins (**Abb. 6**) [133].

Amorolfin (**Abb. 6**) findet als einziger Vertreter der Morpholine Einsatz bei der topischen Behandlung von Nagelpilzkrankungen des Menschen [70]. Andere Wirkstoffe dieser Klasse sind vor allem im Agrikultur-Bereich in Gebrauch. Die Morpholine greifen gleich an zwei Stellen in die Ergosterol-Biosynthese ein. Sie inhibieren die  $\Delta^7$ - $\Delta^8$  Isomerase sowie die  $\Delta^{14}$  Reduktase. Die Anwendung von Amorolfin hat veränderte Eigenschaften der Membranpermeabilität zur Folge und induziert zudem abnorme Chitinablagerungen in der Pilzmembran mit Folge eines anormalen Zellwachstums.

### ***Inhibitoren der fungalen Zellwand-Synthese: $\beta(1,3)$ -D-Glucan Synthase Inhibitoren***

Die  $\beta(1,3)$ -D-Glucane sind polymere Struktureinheiten der Pilzzellwand, die für den Erhalt der Zellform und –integrität in einer hypo-osmotischen Umgebung Bedeutung haben.  $\beta(1,3)$ -D-Glucan-Synthase (GS), ein membranständiges Enzym, das die Polymerisation von

Glucose in das  $\beta(1,3)$ -Polymer katalysiert, ist für die Synthese des Zellwand-Polymers verantwortlich [73]. Die GS als Multiunit-Enzym besteht aus den Untereinheiten Fks1p und Fks2p sowie der regulatorischen Einheit Rho1p (**Abb. 8**). Insgesamt ist allerdings noch sehr wenig über das Zusammenspiel von Rho1p und den Fks Proteinen bekannt [52].



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des transmembranären Komplexes der  $\beta(1,3)$ -D-Glucan-Synthase (GS). Die GS wurde sowohl bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sowie bei pathogenen Pilzarten wie *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* und *Pneumocystis spp.* gefunden [113]. Die Aktivität des Komplexes wird über die GTP bindende Untereinheit Rho1p reguliert. Fks1p und Fks2p sind möglicherweise die Zielenzyme der GS-Inhibitoren.

Natürlich entstandene [54, 107, 138] oder künstlich verursachte Mutationen [53] der FKS1- oder FKS2-Gene führten zur Resistenz der Pilze gegenüber GS-Inhibitoren, was erste Beweise für Fks1p und Fks2p als mögliche Zielenzyme der GS-Inhibitoren lieferte. Bereits 1974 konnte Echinocandin B (ECB) als erster GS-Inhibitor isoliert werden [134]. Die Klasse der GS-Inhibitoren beinhaltet als frühe Vertreter die aus der Natur gewonnenen Echinocandine (Lipopeptide) sowie Papulacandine (Glycolipide). Intensive Bemühungen wurden auf die Weiterentwicklung der frühen Vertreter der GS-Inhibitoren verwendet, sodaß heute mit Caspofungin und Micafungin (**Abb. 6**) zwei AM einer neuen Substanzklasse für die antifungale Therapie zur Verfügung stehen.

### **AM mit Eingriff in molekulare Zellvorgänge der Pilze: Flucytosin**

Die Wirkweise von Flucytosin (5-FC) (**Abb. 6**) beruht auf einem Eingriff sowohl in die RNA- als auch in die DNA-Synthese. 5-FC wird mit Hilfe der Cytosinpermease in die fungale Zelle aufgenommen. Dort erfolgt die Desaminierung des 5-FC zum 5-Fluorouracil (5-FU), und weiter die Umwandlung ins Nucleosidtriphosphat. Dieses führt bei Einbau als „falsche Base“ in die RNA zu Fehlkodierung und folglich zu fehlerhafter Proteinsynthese. Zusätzlich noch

wird das 5-FU zum Desoxynucleosid konvertiert, welches die Thymidylatsynthetase und damit die DNA-Synthese inhibiert [70].

An der Desaminierung von 5-FC zum 5-FU ist die Cytosindeaminase beteiligt, die nur in Bakterien und Pilzen zu finden ist; dies macht 5-FC für den Menschen relativ untoxisch [146]. Allerdings führt die Anwendung von 5-FC zu einer raschen Resistenzentwicklung, weshalb der Wirkstoff zur Therapie schwerer systemischer Mykosen normalerweise nur in Kombination mit Amphotericin B gegeben wird [20].

### ***AM mit Eingriff in molekulare Zellvorgänge der Pilze: Griseofulvin***

Die antifungale Aktivität von Griseofulvin (**Abb. 6**) zeigt sich durch den sogenannten curling effect. Dabei handelt es sich um ein mechanisches Eindrehen von Hyphen bei Dermatophyten, die auf diese Weise die Fähigkeit verlieren, auf kürzestem Weg die Epidermis zu durchqueren. Der Pilz wird auf engem Raum arretiert und von der Haut abgeschilfert. Die genaue Wirkweise von Griseofulvin ist zwar noch immer nicht bekannt, doch konnte in mehreren Studien eine Inhibition der Zusammenlagerung von Mikrotubuli durch Griseofulvin nachgewiesen werden [95, 153, 163, 189]. Mikrotubuli bilden das zelluläre Skellet eukaryontischer Zellen; ihre Aggregation bzw. Disaggregation spielen eine Schlüsselrolle in Zellwachstum und Zellmorphologie.

### ***AM mit Eingriff in molekulare Zellvorgänge der Pilze: Ciclopiroxolamin***

Die Pyridone mit ihrem bekanntesten Vertreter Ciclopiroxolamin (**Abb. 6**) binden irreversibel an Zellwand, zytoplasmatische Membran und Mitochondrien und verhindern so die Aufnahme lebenswichtiger Aminosäuren, von Glukose, Kalium und Phosphat. Der Mangel dieser essentiellen Substanzen führt zur Hemmung der Protein-, DNA- und RNA- Synthese sowie der Synthese von Adhäsionsmolekülen. Weitere fungizide Wirkungen der Pyridone beinhalten den Entzug von Eisen- und Aluminiumionen durch Bildung von Chelatkomplexen sowie die Inhibition der Katalase, die dem Abbau des zelltoxischen Wasserstoffperoxids in der Pilzzelle dient [178].

### 1.3.2 Wirkstoffentwicklung und dreidimensionale Charakterisierung antifungaler Targets

Historisch betrachtet gründete sich die Arzneistoffentwicklung darauf, möglichst viele Verbindungen direkt auszutesten und deren pharmakologische Effekte zu beobachten [152]. Im Jahre 1903 beispielsweise entdeckte Paul Ehrlich durch Austesten hundert verschiedener Farbstoffe die Trypan-Farben als mögliche Wirkstoffe zur Behandlung trypanosomaler Infekte. Der Mikrobiologe René Dubos initiierte 1927 erste Screening-Versuche von Erdproben, um wirksame Stoffe zur Bekämpfung von Krankheiten zu finden. Viele Chemikalien und Naturprodukte wurden in den darauffolgenden Jahren identifiziert, isoliert und auf ihre biologische Wirksamkeit gescreent. Später wurde eine systematische Modifikation von Molekülen in die Wirkstoffsuche miteingebunden. Die Kombination aus Screening und chemischer Synthese war zur Standardmethode bei der Suche nach neuen Wirkstoffen geworden [89]. Pharmazeutische Unternehmen bauten riesige Screening-Datenbanken und Bibliotheken aus Peptiden, Nukleotiden, Phage-display-Systemen und kleinen organischen Molekülen auf [121, 131]. Mit dem enormen Wachstum an biochemischem und biologischem Wissen in den 1970er Jahren begann nicht nur die biophysikalische Charakterisierung von Molekülen sondern auch die Suche nach geeigneten zellulären Targets. Seitdem leisteten die Fortschritte in Zell- und Molekularbiologie, in der Mikrobiologie, Biochemie und rekombinanter DNA-Technologie einen großen Beitrag zur Charakterisierung molekularer Targets. Die moderne Wirkstoffsuche findet ihren Ansatz in der Ermittlung und Beschreibung biochemischer Targets und der Entwicklung an sie angepasster inhibitorischer Moleküle – das sogenannte strukturbasierte Inhibitor-Design.

Neue experimentelle Methoden sowie Fortschritte in der Computertechnik ermöglichten die strukturelle Erforschung molekularer Targets. Etliche antifungale Zielstrukturen wurden dreidimensional charakterisiert (**Tab. 1**), was nicht nur zum besseren Verständnis von Interaktionen zwischen Target und Substraten und/oder Inhibitoren beitrug sondern auch essentielle Informationen betreffend Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und für das Wirkstoff-Design lieferte.

Die dreidimensionale Charakterisierung spielt bei der Untersuchung vor allem neuer antifungaler Targets eine immer größere Rolle. Sie stellt im Rahmen der modernen Arzneistoffentwicklung ein wichtiges Werkzeug dar. So basierte beispielsweise die Entwicklung neuer Benzofurane auf den Kristallstrukturen der N-Myristoyltransferase [57, 93]. Auch das dreidimensionale Modell des Elongationsfaktors 2 (EF2) von *Saccharomyces cerevisiae*, eines Inhibitor-Targets der Sordarine, diente zur Untersuchung dieser Zielstruktur mit Hilfe von *molecular docking* Experimenten [25].

| Substanzklasse   | Antifungales Target   | 3D-Charakterisierung der Zielstruktur; Methode  |
|--|---|---|
| Polyene  | Interaktion mit Ergosterol (Bildung hydrophiler Membranporen)                     | Modell des Amphotericin B/Sterol Kanals<br><b>molecular dynamics simulation</b>   |
| Azole  | Ergosterolbiosynthese: Lanosterol14 $\alpha$ -demethylase (P45014DM / CYP 51)     | Modell des CYP51<br><b>sequence alignment und homology modelling</b><br>Templates: Kristallstruktur der bakteriellen CYPs P450cam, P450terp, P450eryF, P450BM3<br>Kristallstruktur von MTCYP51( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ) |
| Allylamine   | Ergosterolbiosynthese: Squalenepoxidase   | Kein Modell vorhanden   |
| Morpholine   | Ergosterolbiosynthese: $\Delta 7 - \Delta 8$ -Isomerase<br>$\Delta 14$ -Reductase | Kein Modell vorhanden   |
| Flucytosin   | RNA-Synthese Aktivierung mittels Cytosindeaminase                                 | Modell der Cytosindeaminase von Hefe<br><b>Röntgenkristallographie</b>  |
| Griseofulvin   | Tubulin Zusammenlagerung der Mikrotubuli  | Modell der Tubulinbindungsregion von Hefe<br><b>homology modelling</b><br>Templates: Kristallstruktur des alpha beta-Tubulins   |
| Syntheseinhibitoren der Pilzzellwand (Glucansynthaseinhibitoren) | $\beta(1,3)$ -D-Glucan-Synthase (Fks1p, Fks2p)                                    | Membrantopologie von Fks1p<br><b>hydropathy analysis</b>  |
| Proteinsyntheseinhibitoren (Sordarine)                           | ribosomale Proteinsynthese: Elongationfaktor (EF) 2/3                             | Modell des EF2<br><b>homology modelling</b><br>Template: Kristallstruktur des bakteriellen EF-G   |
| N-Myristoyltransferase Inhibitoren                               | N-Myristoyltransferase  | Modell der N-Myristoyltransferase von Hefe<br><b>Röntgenkristallographie</b>  |

**Tabelle 1:** Dreidimensionale Charakterisierung antifungaler Zielstrukturen

### 1.3.3 Struktur-basierte gezielte Arzneistoffentwicklung

Genauere Kenntnis der dreidimensionalen Struktur und intensive Analyse der strukturellen Eigenschaften eines Targets sind essentielle Voraussetzungen für die struktur-basierte gezielte Arzneistoffentwicklung. Starke selektive Wechselwirkungen zwischen Target und Wirkstoff erfordern strukturelle wie auch chemische Komplementarität beider Komponenten. Aus diesem Grund müssen die Strukturen beider Komponenten hinreichend bekannt sein.

Proteinstrukturen werden entweder mittels Röntgenkristallographie – auch Röntgenstrukturanalyse genannt - oder Nuclearmagnetresonanz (NMR) Spektroskopie dreidimensional bestimmt [14]. Im Kristallgitter angeordnete Proteine dienen als Grundlage für die Röntgenkristallographie, während bei der NMR Spektroskopie Proteine in Lösung vermessen werden.

Eine gelungene Strukturanalyse gibt ein genaues dreidimensionales Bild des Zielproteins, was einerseits zum tieferen Verständnis seiner chemischen Reaktivität beiträgt und andererseits konkrete Anhaltspunkte für den Entwurf neuer Wirkstoffe auf Basis des Zielproteins liefert. Erfolgreiches strukturbasiertes Inhibitor-Design erfordert einen iterativen Prozess. Die Struktur eines Proteins bildet die Grundlage für das Design eines neuen Liganden, der anschließend synthetisiert und am Zielprotein ausgetestet werden muss. Die neugewonnenen biologischen Daten und die strukturelle Bestimmung der Protein-Liganden-Komplexe verhelfen zu einer Verfeinerung der Struktur-Inhibitor-Komplementarität. Mehrmaliges Wiederholen dieses Verfeinerungszyklus führt letztlich zu einer starken Verbesserung der initialen Leitstruktur [77].

Inzwischen ist die Computertechnik bei der Suche solcher Leitstrukturen nicht mehr wegzudenken. Nur mit Hilfe der Computertechnik werden zwei aktuell angewandte strukturbasierte Design-Techniken möglich. Beim „*database searching*“ [74, 116] werden in einer Datenbank gespeicherte Liganden bekannter Struktur anhand ihrer Komplementarität zum Zielprotein gesucht (*molecular docking*) während mit der Technik der „*structure generation*“ versucht wird, einen Liganden, der optimal zur Target-Struktur passt, neu zu kreieren (Molecular Modelling oder ‚*de novo*‘-Design) [112].

#### 1.3.4 Gezielte Entwicklung von Aspartatproteinase-Inhibitoren

Antimykotische Wirkstoffentwicklung hat die Erforschung neuer, aufgrund des häufigen Auftretens resistenter *Candida* Stämme insbesondere gegen *Candida* wirksamer, AM zum Ziel. Die Saps von *C. albicans* tragen als Virulenzfaktoren wesentlich zur Pathogenese der *Candida*-Hefen bei. Virulenzfaktoren gelten allgemein als wichtige Zielmoleküle antimikrobieller Wirkstoffe (Übersicht: <http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/pages/Chap13.html>). Tatsächlich beobachtet man derzeit einen Paradigmenwechsel in der Mykologie von solchen AM, die mit Zellstrukturen interferieren zu Substanzen, die Virulenzfaktoren inhibieren und so einen Erreger unschädlich machen können [102]. Daher zählt die Entwicklung Sap-spezifischer Aspartatproteinase-Inhibitoren zu einem besonders vielversprechenden Ansatz auf der Suche nach neuen Wirkstoffen gegen *Candida*.

Der klassische Aspartatproteinase-Inhibitor Pepstatin A konnte *C. albicans* zwar daran hindern, in Schleimhautgewebe einzudringen und zu kolonisieren [128], allerdings ist eine

Anwendung des Pepstatin A aufgrund seiner geringen Selektivität und seiner Toxizität bei Menschen nicht möglich [155].

Interessanterweise konnte bei HIV-positiven Patienten, die mit HIV-Proteinase-Inhibitoren behandelt wurden, ein dramatisches Absinken von oropharyngealer Candidosen beobachtet werden [50, 82, 183]. Da die Proteinase von *Candida* und des HI-Virus zur gleichen Aspartatproteinase-Familie gehören, lag der Schluss nahe, daß die HIV-Proteinase-Inhibitoren auch gegen die Saps von *Candida* wirken und somit einen direkten therapeutischen Effekt gegen *Candida*-Infektionen haben [31, 76, 81]. Tatsächlich konnte in einer Reihe von *in vitro* und *in vivo* Studien eine Inhibition der Sap Aktivität sowie der Adhärenz und Gewebsschädigung von *C. albicans* durch HIV Proteinase Inhibitoren gezeigt werden; das Wachstum der Hefen wurde freilich nur in geringem Maße inhibiert [13, 18, 29, 30, 50, 51, 75, 76, 103, 145].

Sap2 von *C. albicans* wurde 1995 als das erste Isoenzym der gesamten Sap-Familie strukturell in Verbindung mit dem Inhibitor A-70450 von Cutfield et al. bestimmt [35]. Kurz darauf beschrieb eine zweite Forschergruppe die Struktur des nahezu identischen klinischen Isolats Sap2X in Komplex mit A-70450 [1]. Ein weiteres Sap von *C. tropicalis* (SapT) wurde von Symersky et al. röntgenkristallographisch gelöst [172]. Das Strukturmodell von Sap2 erlaubte eine retrospektive Interpretation einiger Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von chemischen Verbindungen analog zu A-70450. Besonders die Struktur A-79912 ( $IC_{50} = 3.8$  nM [166]) war *in vitro* ähnlich gegen Sap2 aktiv wie das A-70450 ( $IC_{50} = 1.4$  nM;  $K_i = 0.17$  nM [26]). Allerdings zeigten beide Verbindungen im Mausmodell disseminierter Candidose keine Effektivität unter Bedingungen, bei denen das Fluconazol starke antifungale Wirkung aufwies [1, 167]. Auf Basis der Struktur von Sap2 erzeugte Pichova et al. [145] mittels strukturbasiertem Wirkstoffdesign eine Serie Pepstatin A-analoger peptidomimetischer Inhibitoren. Die neu entwickelten Wirkstoffe inhibierten Sap2 von *C. albicans* im nanomolaren Bereich. Leider wurden diese Inhibitoren nicht *in vivo* getestet, doch lässt die strukturelle Ähnlichkeit zu Pepstatin A einen vergleichbaren Mangel an Protektion bei systemischen Candidosen vermuten [58, 61, 155, 193].

## 1.4 Ziel der Arbeit

Die Saps spielen in der Pathogenese von *C. albicans* eine entscheidende und sehr komplexe Rolle [128]. Zahlreiche Studien zielten auf eine biochemische und genetische Untersuchung der insgesamt zehn Sap-Isoenzyme von *C. albicans* ab.

Strukturelle Charakterisierung von Proteinen bietet insbesondere die Möglichkeit, wichtige Einblicke in ihre räumliche Gestalt und die Funktionsweise von Substrat- und/oder Inhibitorbindung zu gewinnen. Desweiteren stellt die dreidimensionale Darstellung von Proteinen die eigentliche Grundlage für strukturbasiertes Inhibitor-Design dar.

Sap2 gilt als das insgesamt am besten untersuchte Isoenzym der gesamten Sap-Familie und ist bislang auch das einzige Enzym, das röntgenkristallographisch untersucht wurde. Struktur-basiertes Wirkstoffdesign Sap-spezifischer Inhibitoren konnte bisher auf Basis von nur einer einzigen Struktur nur in limitiertem Maße stattfinden.

Anliegen dieser Arbeit war, weitere Sap-Isoenzyme mit Hilfe der Röntgenkristallographie strukturell zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk lag dabei auf Vertretern der Subklassen Sap1-3 sowie Sap4-6. Detaillierte Strukturanalysen und Vergleiche ermöglichen eine strukturelle Gruppierung der Sap-Isoenzyme und helfen, Unterschiede und Gemeinsamkeiten einzelner Sap-Isoenzyme zu ermitteln. Dies wiederum wird die Entwicklung selektiver sowie gruppenspezifischer Inhibitoren vereinfachen.

Insgesamt sollte die Kenntnis weiterer Strukturen aus der Familie der Saps eine äußerst wichtige Grundlage für eine umfassende, gezielte strukturbasierte Entwicklung neuer Aspartatproteinase-Inhibitoren bieten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Allgemein

Der Begriff „ddH<sub>2</sub>O“ wird im Folgenden für deionisiertes Wasser verwendet, welches zusätzlich über eine Milli-Q-Plus Filtrieranlage (Millipore, Bedford, USA) gereinigt wurde. Als „steril“ oder „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien wurden für 20 min bei 121°C und 2 bar Druck autoklaviert. Als „sterilfiltriert“ bezeichnete Lösungen wurden durch einen 0,22 µm-Filter gegeben.

#### 2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien in analytischem Reinheitsgrad von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Hampton Research (Laguna Hills, USA), Millipore (Eschborn), Qiagen (Hilden), Stratagene (Heidelberg), BioRad (München) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

#### 2.1.3 Geräte

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Autoklav                    | Tuttnauer Systec (Wettenberg), 5075 ELV, 2540 EL   |
| Brutschrank                 | Heraeus (Hanau), B5042   |
| Elektrophoresekammern       | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) Elpho 80/92  |
| Feinwaage                   | Sartorius (Göttingen), BP 211D   |
| Fluoreszenz Messgerät       | Millipore (Bedford, MA, USA), CytoFluor 2350   |
| Mikrotiterplatten           | Nunc (Wiesbaden), 96 MicroWell™ Nunclon™ Surface   |
| FPLC Chromatographie Säulen | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)  |
| FPLC Chromatographie System | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)<br>Äkta™ Explorer, Fraktionssammler Frac-100,<br>Flachbrettschreiber REC 102, Pump P-500, Liquid<br>Chromatography Controller LCC-500, Dual Path<br>Monitor UV-2 |
| Heizblock                   | PMC, Digital Dry Block Heater  |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Kristallisationsplatten | Charles Supper Company (Natick, MA, USA),<br>CrysChem Platten                            |
| Kristallisationsroboter | Beckmann (München), Biomek 1000  |
| Magnetrührer            | IKA®-Werke (Staufen), Heidolph, MR 1   |
| Messpipetten            | Eppendorf AG (Hamburg)   |
| pH-Meter                | Mettler Toledo GmbH (Giessen), MP220 mit Elektrode<br>In Lab 410                         |
| Amicon Ultrafiltrator   | Millipore (Billerica, MA, USA), stirred cell series 8000                                 |
| Schüttelinkubator       | Edmund Bühler (Hechingen), KS-15   |
| Tischzentrifugen        | Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH<br>(Hamburg), 5804 R, 5415 R                 |
| UV-Spektrophotometer    | Beckmann (München), DU™ 7500<br>Perkin Elmer (Wellesley, MA, USA), Lambda 17 UV/VIS      |
| Waage                   | Mettler Toledo GmbH (Giessen), PE 3600   |
| Zentrifugen             | Beckmann (München), Kühlzentrifuge Avanti™ J-301<br>und Avanti™ J-25, Zentrifuge J-6 M/E |

#### 2.1.4 Chromatographiematerialien

|                     |  |
|---------------------|--|
| Superdex 75         | Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) |
| DEAE Cellulose DE52 | Whatman® (Middlesex, UK)                       |
| CM-Sepharose        | Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) |

#### 2.1.5 Puffer und Medien

##### *Medien zur Anzucht von Pichia pastoris*

- YPD-Medium

*Yeast-Extract-Peptone-Dextrose*, Hefeextrakt-Pepton-Glukose

1% (m/V) Hefeextrakt (Difco, Detroit, MI, USA)

2% (m/V) Pepton (Difco, Detroit, MI, USA)

2% (m/V) Dextrose (Difco, Detroit, MI, USA)

Für YPD-Agarplatten wurde dem YPD-Medium zusätzlich 15 g/l Agar-Agar zugesetzt.

- BMGY-Medium (Glycerolhaltiges *Pichia*-Wachstumsmedium)

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0

1% (m/V) Hefeextrakt (Difco, Detroit, MI, USA)

2% (m/V) Pepton (Difco, Detroit, MI, USA)

1,34% (m/V) Yeast Nitrogen Base (YNB) ohne Aminosäuren (Difco, Detroit, MI, USA)

1% (V/V) Glycerol

$4 \times 10^{-5}$ % (m/V) Biotin

Zusatz einer 1000-fach konzentrierten Tetracyclin-HCl Stammlösung (10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O + Ethanol abs., 4T + 1T) im Verhältnis 1:1000.

#### *Medien zur Expression der Sap-Isoenzyme*

- BMMY-Medium (Methanolhaltiges *Pichia*-Expressionsmedium)

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0

1% (m/V) Hefeextrakt (Difco, Detroit, USA)

2% (m/V) Pepton (Difco, Detroit, USA)

1,34% (m/V) YNB ohne Aminosäuren (Difco, Detroit, USA)

0,5% (V/V) Methanol

$4 \times 10^{-5}$ % (m/V) Biotin

Zusatz einer 1000-fach konzentrierten Tetracyclin-HCl Stammlösung (10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O + Ethanol abs., 4T + 1T) im Verhältnis 1:1000.

#### *Puffer und Lösungen zur Proteincharakterisierung mittels SDS-PAGE*

- Trenngellösung 12% (80 ml, 8 Gele)

24,4 ml ddH<sub>2</sub>O

32 ml Protogel

(30% Acrylamid+ 0,8% Methylenbisacrylamid) (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA)

20 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

0,8 ml 10% (m/V) SDS (Natriumdodecylsulfat)

0,8 ml 10% (m/V) APS (Ammoniumperoxodisulfat)

32 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

- Sammelgellösung 5%

20 ml ddH<sub>2</sub>O

0,4 ml 2% (m/V) Pyronin G

5,1 ml Protogel

(30% Acrylamid+ 0,8% Methylenbisacrylamid) (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA)

3,75 ml 1,0 M Tris/HCl pH 6,8

0,3 ml 10% (m/V) SDS (Natriumdodecylsulfat)

0,3 ml 10% (m/V) APS (Ammoniumperoxodisulfat)

30 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

- 3-fach konzentrierter SDS-Auftragspuffer
  - 1,75 ml 1,0 M Tris/HCl pH 6,8
  - 1,5 ml 87% (V/V) Glycerin
  - 5,0 ml 10% (m/V) SDS (Natriumdodecylsulfat)
  - 1,25 ml 2,88% (m/V) Bromphenolblau
  - 0,5 ml Mercaptoethanol (jeweils frisch zugeben)

- SDS-Lämmli-Laufpuffer (1l)
  - 1 g SDS (Natriumdodecylsulfat)
  - 3 g Tris
  - 14,4 g Glycin

- Coomassie-Blue-Färbelösung (1l)
  - 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250
  - 450 ml Ethanol
  - 100 ml Essigsäure
  - 450 ml ddH<sub>2</sub>O

- Coomassie-Blue-Entfärbelösung (1l)
  - 250 ml Ethanol
  - 80 ml Essigsäure
  - 670 ml ddH<sub>2</sub>O

- Gel-Fixierlösung (1l)
  - 700 ml Ethanol
  - 50 ml Glycerin
  - 250 ml ddH<sub>2</sub>O

### 2.1.6 Sonstige Materialien

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Mikrokonzentratoren           | Millipore (Billerica, MA, USA), Centricon, Centriprep<br>Molecular Weight Cut-off (MWCO) 10 kDa |
| Dialyseschläuche Spectra/Pore | Spectrum Laboratories, Inc. (Gardena, CA, USA)<br>MWCO 6-8 kDa bzw. 12-14 kDa                   |
| Eppendorf Reaktionsgefäße     | Eppendorf, Netheler und Hinz GmbH (Hamburg)   |
| 1,5 ml und 2 ml               |   |
| Quarzglasküvette              | Hellma (Müllheim), d = 1cm  |
| Sterilfilter                  | membraPure (Bodenheim)  |

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Steriles Arbeiten

Für sämtliche mikrobiologische Arbeiten wurden autoklavierte (120°C, 2 bar, 20 min) bzw. steril filtrierte (Porendurchmesser der Membran: 0,22 µm) Medien und Lösungen sowie autoklavierte Pipettenspitzen verwendet. Die Sterilität der Proben wurde durch Arbeiten unter Laminar-Air-Flow gewährleistet.

### 2.2.2 Transformation von *Pichia pastoris*

Zur Expression der Sap-Isoenzyme wurde die Hefe *Pichia pastoris* als Wirtssystem genutzt. *Pichia pastoris* GS115 waren, wie bei Borg-von Zepelin et al. [17] beschrieben, mittels Plasmid pKJ 113 transformiert worden.

Die transformierten Stämme wurden freundlicherweise von Dr. Michel Monod (Service de Dermatologie, Laboratoire de Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.3 Anzucht und Aufbewahrung der transformierten *Pichia pastoris* Stämme

Die transformierten *Pichia pastoris*-Stämme zur Produktion der jeweiligen Sap-Isoenzyme wurden mit Hilfe einer sterilen Impföse auf YPD-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 30°C im Brutschrank angezüchtet. Etwa 10 ml YPD-Medium wurde mit einer koloniebildenden Einheit (KBE) angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (30°C, 200 U/min) wachsen gelassen. Aliquots der Übernacht-Kultur (ÜNK) wurde im Verhältnis 4:1 mit sterilem Glycerol (86%) gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.4 Expression von Sap1, Sap3, Sap5 und Sap6

Für jedes zu exprimierende Protein (Sap1, Sap3, Sap5 und Sap6) wurde jeweils ein Ansatz à 10 ml BMGY-Medium mit je einer Kolonie der Sap1-, Sap3-, Sap5- bzw. Sap6-exprimierenden *Pichia pastoris*-Stämme von Übernacht-Plattenkulturen (YPD-Agar) angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (30°C, 200 U/min) wachsen gelassen. Sodann wurden 4 x 1000 ml BMGY-Medium mit je einer 10 ml-Vorkultur versetzt und über 48 h bei 30°C und 200 U/min im Schüttelinkubator aufgezogen. Die optische Dichte der Kultur wurde mittels Messung der Absorption von ultravioletem (UV) Licht bei einer

Wellenlänge von 600 nm (=OD<sub>600</sub>) nach Verdünnung der Probe im Verhältnis 1:40 mit ddH<sub>2</sub>O bestimmt. Im Anschluß wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 4050 g bzw. 4000 U/min) (Beckman J-6M/E, Rotor JS-4.0, Fullerton, CA, USA) geerntet. Sie wurden entsprechend ihrer optischen Dichte (OD<sub>600</sub> = 10 - 40) in je 100 – 400 ml BMMY-Medium resuspendiert und für weitere 48 h geschüttelt (30°C, 200 U/min). Nach zwei Tagen wurde der Überstand, der sezerniertes Protein enthielt, abzentrifugiert (30 min, 4°C, 17700 g bzw. 10.000 U/min) (Beckman J2-21M, Rotor JA-10, Fullerton, CA, USA). Der von den Zellen bereinigte Überstand wurde bei –20°C gelagert.

## **2.3 Proteinbiochemische Methoden - Proteinpräparation**

### **2.3.1 Dialyse**

Um die Salzkonzentration im Überstand zu reduzieren wurde die Proteinlösung unter Verwendung eines Dialyseschlauchs (MWCO 6000 – 8000 bzw. MWCO 12000 – 14000, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) gegen das 100-fache Volumen eines 10 mM Natriumcitratpuffers pH 5,5 (Sap1) respektive pH 7,0 (Sap3, Sap5 und Sap6) bei 4°C für mindestens 8 h dialysiert. Dieser Vorgang wurde mit frischem Dialysepuffers erneut durchgeführt.

### **2.3.2 Konzentrierung von Proteinen**

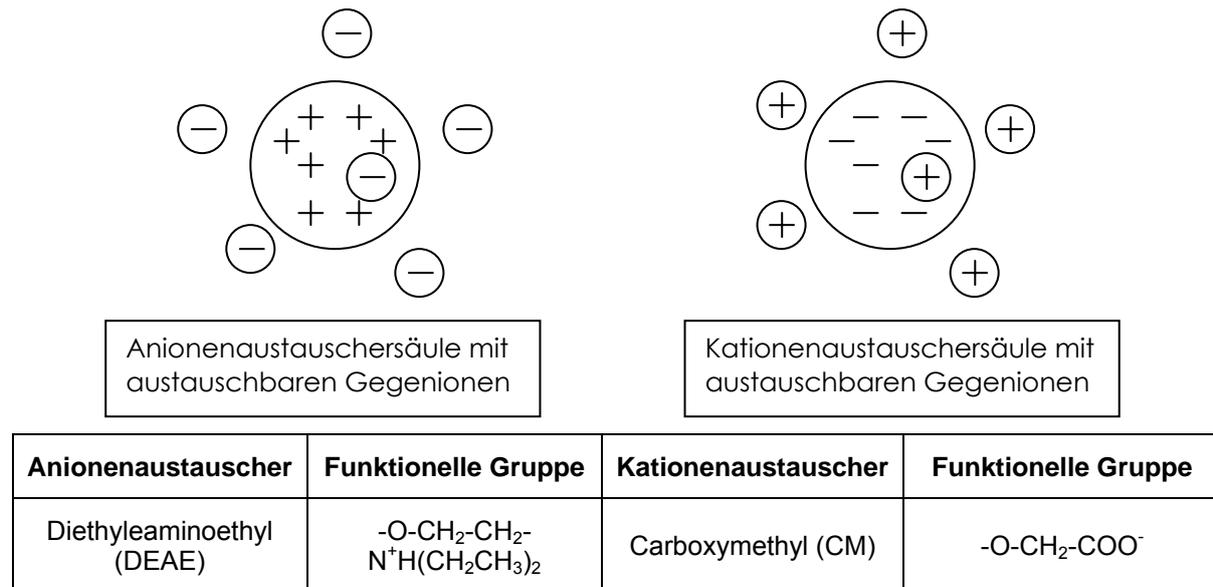
Zur Aufkonzentrierung der Proteinlösungen wurde die Methode der Ultrafiltration angewandt. Größere Volumina ( $V > 15$  ml) konnten mit Hilfe von Ultrafiltrationskammern (Amicon, Witten) auf bis zu 10 ml eingeeengt werden. Durch Anlegen von etwa 3 bar Überdruck wurde Lösung durch eine Membran (MWCO 10 kDa) gepresst, wobei Moleküle mit einer Größe oberhalb 10 kDa zurückgehalten wurden. Kleinere Volumina ( $V < 15$  ml) wurden unter Verwendung von Zentrifugationskonzentratoren mit integrierter Ultrafiltrationsmembran (MWCO 10 kDa) des Typs Centriprep ( $V = 15$  ml) und Centricon ( $V = 2$  ml) (Millipore, Eschborn) aufkonzentriert.

### 2.3.3 Reinigung von Proteinen

#### Reinigungstechniken der Säulenchromatographie

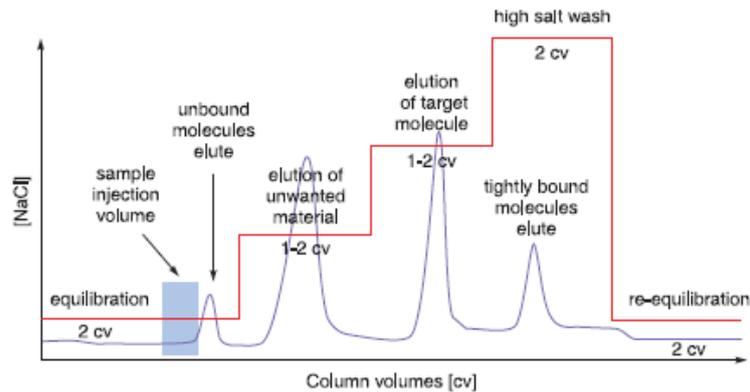
- Anionenaustausch am Beispiel der Diethylaminoethyl (DEAE)-Cellulose

Negativ geladene Proteine lagern sich unter definierten Bedingungen aufgrund elektrostatischer bzw. ionischer Wechselwirkungen an die mit positiv geladenen funktionellen Gruppen bestückte Matrix einer Anionenaustauschersäule an (**Abb. 9**).



**Abbildung 9:** Säulenmaterialien verschiedener Ionenaustauscher

Diese Eigenschaft wird während des Waschvorgangs, der üblicherweise dem Auftrag des Proteins auf die Säule folgt, ausgenutzt. Schwächer gebundene Stoffe werden während des Waschschrittes von der Säule entfernt. Im darauffolgenden Elutionsschritt wird durch die Zugabe eines Eluenten, der sich aufgrund seiner hohen Affinität an die positiv geladenen Gruppen der Säulenmatrix anlagert, das Protein von der Säulenmatrix verdrängt und eluiert. Durch graduelle stufenweise oder kontinuierliche Erhöhung der Ionenkonzentration im Elutionspuffer kann eine bessere Proteintrennung und damit eine effizientere Proteinreinigung erzielt werden. Der gesamte Reinigungsvorgang wird anhand der UV-Absorption der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Das Absorptionsspektrum gibt Auskunft über den Verlauf der Elution des Proteins (**Abb. 10**).



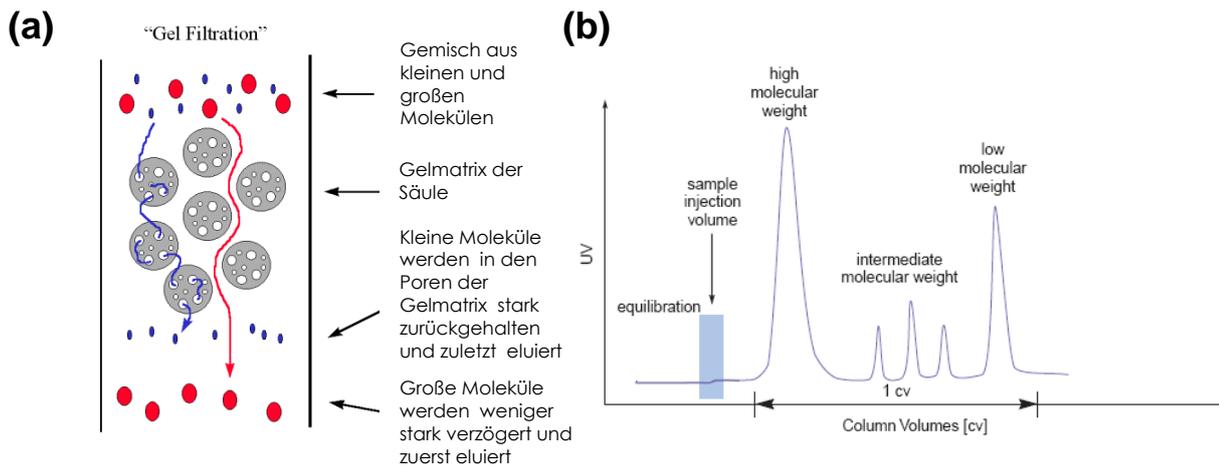
**Abbildung 10:** Elution am Beispiel eines Stufengradienten. Dem Äquilibrieren der Säule mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration folgt das Auftragen der Probenlösung (*sample injection*). Ungebundene Moleküle werden bereits während des Waschvorgangs von der Säule entfernt, stärker gebundene Proteine erst während der anschließenden Elution. Zur Reinigung des Säulenmaterials wird am Ende der gesamten Elution eine hochkonzentrierte Salzlösung über die Säule gegeben, worauf ein Reäquilibrieren mit niedriger Salzkonzentration folgt.

- Prinzip des Kationenaustauschs am Beispiel der Carboxymethyl-Sepharose

Bei der Carboxymethyl-Sepharose (CM) handelt es sich um ein Säulenmaterial mit negativ geladenen Ionengruppen (**Abb. 9**), das zur Anhaftung von Proteinen einer positiven Gesamtladung dient. Das Reinigungsprinzip des soeben beschriebenen Anionenaustauschs kann in direkter Weise auf das Verfahren des Kationenaustauschs übertragen werden, wobei anstelle des anionischen Elutionsmittel ein Eluent kationischer Eigenschaft eingesetzt werden muss.

- Größenausschlusschromatographie an Superdex-Gelfiltrationssäulen

Proteine werden mit Hilfe dieses Verfahrens aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe getrennt. Gelartige Materialien, wie beispielsweise die Superdex-Säulenmaterialien, weisen eine inhärente Struktur auf, bei der Dextrose-Ketten durch intermolekulare Quervernetzung flüssigkeitsgefüllte Poren unterschiedlicher Größe bilden. Während der Reinigung auf einer Gelfiltrationssäule lagern sich die Proteine ihrer Größe entsprechend in die Poren ein und werden somit unterschiedlich lange zurückgehalten (**Abb. 11 a**). Während eines Gelfiltrationslaufes sind große Proteine als erstes zu erwarten, da sie aufgrund der geringen Verzögerung die Trennsäule am schnellsten durchwandern (**Abb. 11 b**).



**Abbildung 11:** Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration). (a) Trennprinzip der Gelfiltration, (b) UV-Absorptionsspektrum eines typischen Elutionsverlaufs einer Gelfiltration. Große Proteine (*high molecular weight*) durchwandern die Trennsäule am schnellsten. Moleküle geringer Größe (*low molecular weight*) werden während eines Gelfiltrationsdurchlaufs stärker zurückgehalten und damit zu einem späteren Zeitpunkt eluiert.

### **Reinigung der Saps durch Anwendung der Ionenaustauschchromatographie**

- Reinigung von Sap1

Aufgrund der negativen Gesamtladung des Proteins erfolgte der erste Reinigungsschritt an einer Diethylaminoethyl (DEAE)-Anionenaustauschersäule (DE 52, Whatman®, Maidstone, England). Nach Auftragen der Probe wurden Verunreinigungen mittels eines 10 mM Natriumcitratpuffers pH 5,5 entfernt. Gereinigtes Protein wurde durch Anlegen eines stufenlosen Gradienten eines Natriumcitratpuffers pH 5,5 von 10 mM bis 100 mM gewonnen.

- Reinigung von Sap3

Die Reinigung wurde auf gleiche Art und Weise wie für Sap1 beschrieben durchgeführt, wobei Wasch- und Elutionspuffer durch Puffer der gleichen Zusammensetzung jedoch mit einem pH-Wert von 7,0 ersetzt wurden.

- Reinigung von Sap5 und Sap6

Die jeweiligen Proteine wurden unter Anwendung des Kationenaustausch-Verfahrens aufgereinigt. Dazu wurden die zu reinigenden Proteinlösungen auf eine CM-Sepharosesäule (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) aufgezogen. Es folgte ein Waschschrift mittels eines 10 mM Natriumcitratpuffers pH 7,0 und ein Elutionsschritt durch Anlegen eines stufenlosen Gradienten von 10 mM bis 300 mM eines Natriumcitratpuffers pH 7,0.

### **Reinigung der Saps mittels Größenausschlusschromatographie/Gelfiltration**

Die einkonzentrierten Proteine (1,0 – 2,0 ml) Sap1, Sap3, Sap5 oder Sap6 wurden zur weiteren Reinigung mittels Gelfiltrationschromatographie nach Größe getrennt. Die Trennung erfolgte an einer High Load Superdex<sup>TM</sup>75 26/60 (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) unter Verwendung eines 10 mM Natriumcitratpuffers pH 7,0, der gleichzeitig 150 mM NaCl enthielt.

Die Proteinreinigung der Sap-Isoenzyme wurde durch Aufzeichnen des Proteinabsorptionsspektrums bei 280 nm und mittels SDS-PAGE während des gesamten Aufreinigungsvorgangs kontrolliert.

## **2.4 Proteincharakterisierung**

### **2.4.1 Peptidmassen-Fingerprinting – Bestimmung der Identität exprimierter Proteine**

Die mittels SDS-PAGE getrennte Proteinprobe wurde aus dem Gel eluiert und durch tryptischen Verdau spezifisch gespalten. Die Massen der einzelnen Proteinfragmente wurden anschliessend im MALDI-TOF Verfahren massenspektrometrisch gemessen. Die Identität der Proteine konnte anhand des ermittelten Peptidmassen-Fingerprints durch Vergleich mit elektronisch gewonnenen Fingerprints (Mascot Research) eindeutig bestimmt werden.

### **2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption**

Proteine absorbieren bei Anwesenheit der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan UV-Licht der Wellenlänge von 280 nm [115]. Die Absorption (A) der Probe, welche im Bereich von 0,1 bis 1,0 liegen sollte, wurde bei 280 nm bestimmt und die Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet:

$$A = A_{280nm} \cdot c \cdot d$$

$A_{280nm}$  = Extinktionskoeffizient (Abs 0,1%) bei 280 nm [71] aus der Anzahl von Tyrosin-, Tryptophan- und Cystein-Molekülen berechenbar.

Zu finden unter: <http://ca.expasy.org> , ProtParam tool

**c** = gesuchte Konzentration (g/l)

**d** = Schichtdicke der Küvette (cm)

### 2.4.3 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts wurde durch eine diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erreicht [109]. Die durch das Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) aus dem Probenpuffer stark negativ geladenen Proteine werden unter den denaturierenden Bedingungen in einem vernetzten Polyacrylamidgel durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer molekularen Masse getrennt. Dabei ist die Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion ihres Molekulargewichts. Dieser Zusammenhang kann zur Bestimmung der relativen Molekülmasse der Proteine genutzt werden.

Die SDS-PAGE wurde mit einem 12%-igen Trenngel durchgeführt. Ein vorgelagertes weitmaschiges Sammelgel diente der Fokussierung der Proteinbanden. Es wurden jeweils acht Gele (8,5 x 8 cm<sup>2</sup>) in einer Gelgießkammer (Eigenbau, MPI Martinsried) gegossen.

Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 800 µl (0,1 g/ml) Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Polymerisationsstarter in die vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und mit wenig Isopropanol blasenfrei überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, das Sammelgel mit 300 µl (0,1 g/ml) APS versetzt und in den Gießstand eingefüllt. Die Kämme für zehn bis zwölf Geltaschen wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Die ausgehärteten Gele wurden in feuchte Zellstofftücher gepackt und bei 4°C gelagert.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 3-fach konzentriertem SDS-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 100°C inkubiert. Nach Auftragen der Proben in die Geltaschen erfolgte die Trennung der Proteine bei konstanter Spannung von 100 bzw. 150 mA im SDS-Laufpuffer. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der getrennten Proteine wurde ein SDS-PAGE-Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Hanover, PA, USA) zusätzlich aufgetragen.

Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt. Dazu wurden die Gele bis zu 2 h in der Coomassie Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden sie in Coomassie Blue Entfärbelösung geschwenkt, bis der Hintergrund entfärbt war.

Gefärbte Gele wurden in Fixierlösung inkubiert und anschließend zwischen zwei Cellophanblättern getrocknet.

### 2.4.4 Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Sap1, Sap3, Sap5 und Sap6

Die proteolytische Aktivität der Sap-Isoenzyme wurde durch Verdau von 0,02%-igem Resorufin-markiertem Casein bei deren jeweiligen pH-Optima (**Tab. 2**) ermittelt. Nach enzymatischer Abspaltung des Farbstoffs Resorufin durch die Sap-Isoenzyme gelangt der

Farbstoff in Lösung und kann dann durch Messung der Absorption von UV-Licht detektiert werden. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurde das ungeschnittene Substrat mittels Trichloressigsäure in einer Endkonzentration von 5% gefällt, 5 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugieren (3 min, RT, 2410 g bzw. 6000 U/min) (Eppendorf Zentrifuge 5415 D, Rotor F 45-24-11, Hamburg) vom Überstand abgetrennt. 100 µl des Überstandes wurden mit 100 µl 1 M Tris-HCl pH 10,0 vermischt und die Absorption im alkalischen Milieu bei 574 nm gemessen.

| Sap-Isoenzym | pH-Optimum |
|--------------|------------|
| Sap1         | pH 4,5     |
| Sap3         | pH 3,5     |
| Sap5/Sap6    | pH 5,0     |

**Tabelle 2:** pH-Optima der proteolytischen Aktivität von Sap1, Sap3, Sap5 und Sap6 mit Resorufin-markiertem Casein in 50 mM Natriumcitratpuffer [17]

#### 2.4.5 Ermittlung der inhibitorischen Aktivität von Pepstatin A gegen Sap5

Der  $IC_{50}$ -Wert gibt die Konzentration eines Inhibitors an, die nötig ist, um die Aktivität eines Enzyms um 50% zu reduzieren. *In vitro* wird diejenige Inhibitorkonzentration bestimmt, bei der die proteolytische Aktivität des Enzyms bzw. dessen Umsetzungsgeschwindigkeit eines Substrats um die Hälfte (= 50%) abgenommen hat.

Die proteolytische Aktivität von Sap5 wurde wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben bei dessen pH-Optimum (pH 5,0) bestimmt. Anstelle der Absorption wurde aufgrund der höheren Sensitivität die Fluoreszenz von Resorufin gemessen. 100 µl des Überstandes wurden abgehoben und in einer 96-Näpchen-Mikrotiterplatte (96 MicroWell™ Nunclon™ Surface Plate, Nunc, Wiesbaden) mit 100 µl 1 M Tris-HCl pH 10,0 gemischt. Die Fluoreszenz des Gemischs wurde am Fluoreszenz-Messgerät (CytoFluor 2350, Millipore, Bedford, MA, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen (Einstellungen am Gerät: Sensitivität 2, Bandweite 7).

Im ersten Teil des Versuchs wurde die Fluoreszenzintensität des ungehemmten Sap5 (5 nM Endkonzentration) nach einer Inkubationszeit von 15 min, 30 min, 45 min, 60 min und 75 min bestimmt. Eine Dauer von 60 min Inkubationszeit erwies sich als geeignet für die Weiterführung des Versuchs. Im zweiten Teil des Versuchs wurde Sap5 mit jeweils verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors Pepstatin A (in DMSO, 10% Endkonzentration) für 60 min inkubiert. Die Endkonzentration von Sap5 betrug 5 nM in einem

Puffer aus 10 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) pH 6,5, die Endkonzentrationen von Pepstatin A variierten zwischen 0-50 nM (50 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM und 0 nM). Die jeweiligen Lösungen wurden wie im vorherigen Absatz beschrieben weiterbehandelt (Inkubationszeit 60 min) und anschließend die Fluoreszenz gemessen (CytoFluor 2350, Millipore, Bedford, MA, USA).

Der Versuch wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt und die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten errechnet. Die Aktivität von Sap5 wurde in einem Diagramm gegen die Konzentration von Pepstatin A aufgetragen und daraus die Inhibitorkonzentration bei 50% ( $IC_{50}$ ) bestimmt.

## 2.5 Kristallisation und Datensammlung

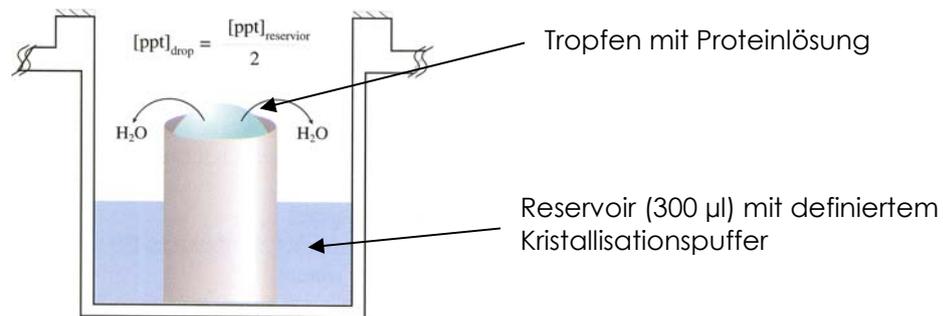
### 2.5.1 Kristallisationsmethode

Alle Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode durchgeführt, bei der zeitabhängig eine Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei über einen Gasraum verbundenen Lösungen erfolgt. Der Gasaustausch zwischen einer in großem Überschuss vorgelegten definierten Pufferlösung (Reservoirlösung) führt zu langsamer Änderung der Präzipitans- und Proteinkonzentration in der Proteinelösung. Durch die langsame Änderung der Salzbedingungen im Proteintropfen bildet sich ein metastabiler Zustand aus, bei dem sich das Protein zwischen gelöstem Zustand und Präzipitation befindet. In der geeigneten Pufferlösung bilden sich Kristallisationskeime, die anschließend zu größeren – im Lichtmikroskop sichtbaren – Kristallen heranwachsen (Übersicht: [117]).

Vor dem Aufkonzentrieren des Proteins auf etwa 10 mg/ml unter Verwendung von Centricon 10-Filtrationseinheiten (Amicon, Witten) wurden die Proben einem Pufferaustausch an Nap<sup>TM</sup>10- oder Nap<sup>TM</sup>25-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) unterzogen. 1,0 ml bzw. 2,5 ml Probe wurden auf die Säulen aufgetragen und mit 1,5 ml respektive 3,5 ml 10 mM MES-Puffer pH 6,5 (Sap1/ Sap3) und pH 6,7 (Sap5/ Sap6) eluiert. Pepstatin A (Sigma-Aldrich, München) gelöst in DMSO wurde in 1,5-fachem Überschuss, ATBI (Calbiochem, Merck Chemicals Lmt., Nottingham, UK) gelöst in 10 mM MES-Puffer pH 6,5 in 4-fachem und Ritonavir (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) gelöst in Methanol in 10-fachem Überschuss zugegeben.

Die Kristallisationsansätze erfolgten in Kristallisationsplatten (CrysChem<sup>TM</sup>, Charles Supper Company) mit sitzenden Tropfen (*sitting drop vapor diffusion method*) (**Abb. 12**). Dabei wurden verschiedene Mengen an Proteinelösung (zwischen 0,4 und 1,0  $\mu$ l) auf den erhöhten Kristallisationsbereich der Kristallisationsplatten pipettiert und mit Reservoirlösung (definierte

Pufferlösung) im Verhältnis 1:1 vorsichtig vermischt. Die Reservoirolösung im unteren Reservoirbereich betrug 300  $\mu\text{l}$ . Die CrysChem-Platten wurden anschließend mit durchsichtiger Folie (CrystalClear, Hampton, Laguna Hills, CA, USA) luftdicht versiegelt und bei 20°C erschütterungsfrei gelagert. Um ein möglichst großes Spektrum an Fällungsmitteln (PEG,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , usw.) und pH-Werten (4,0 – 10,0) abzudecken, wurde anfangs mit einer Vielzahl von Kristallisationspuffern gearbeitet



**Abbildung 12:** Kristallisationsmethode des sitzenden Tropfens (*sitting drop vapor diffusion method*)

## 2.5.2 Kristallisationsbedingungen

- Sap1

Kristalle von Sap1 in Komplex mit ATBI wuchsen in einem Puffer, der entweder 14% oder 16% PEG 20000 und 0,1 M MES pH 6,1, 6,3, 6,5 oder pH 6,7 enthielt. Kristalle erschienen nach einigen Tagen und erreichten ihre volle Größe nach wenigen Wochen.

- Sap3

Sap3 ohne Inhibitor kristallisierte in Gegenwart von 0,2 M Kaliumbromid, 8% PEG 20000, 8% PEG 550MME und 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5. Sap3 in Komplex mit Pepstatin A bildete Kristalle in 0,2 M Kaliumbromid, 15% PEG 4000 und 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5. Der Sap3-ATBI-Komplex bildete Kristalle in Gegenwart von 0,15 M Kaliumthiocyanat and 18% PEG 3350 mit 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5. Kristalle von Sap3 inhibiert mit Ritonavir wurden in 0,2 M Kaliumbromid, 8% PEG 20000, 8% PEG 550MME und 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 gezüchtet.

Kristalle von Sap3 bildeten sich nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  5 M NaCl (Tag 3) innerhalb weniger Tage in Gegenwart von  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen (10 mM Zinkacetat). Die Kristalle erreichten ihre volle Größe nach etwa 2 bis 3 Wochen.

- Sap5

Sap5 konnte als Kokristall mit Pepstatin A bei Kristallisationsbedingungen von 0,1 M 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) pH 7,5 und 10% PEG sowie 8% Ethylenglycol erhalten werden. Erste Kristalle bildeten sich bereits über Nacht und erreichten ihre volle Größe innerhalb weniger Tage.

- Sap6

Sap6 in Komplex mit ATBI bildete trotz Screenings von einer Vielzahl an Kristallisationspuffern keine Kristalle aus.

### 2.5.3 Montieren der Kristalle, Sammlung und Auswertung der Diffraktionsdaten

Kristalle, die groß genug waren (mind. 0,1  $\mu\text{m}$ ), wurden mit Hilfe eines Cryo-Loops (Hampton Research, Laguna Hills, USA) aus dem sitzenden Tropfen gefischt. Im Falle von Sap1 wurden die Kristalle für etwa 10 s in einer Mischung aus 9 Teilen Kristallisationspuffer und 1 Teil Ethylenglycol als Cryoprotektans gebadet. Das Cryoprotektans verhindert die Bildung von Eiskristallen während der Messung unter dem Stickstoffstrom, die die Datenauswertung der gesammelten Daten erheblich stören würden. Die Kristalle wurden anschließend auf dem Goniometerkopf montiert und im Strahlengang justiert. Um Zerstörung der Kristalle während der Messung im Röntgenstrahl zu vermeiden, wurden die Messungen bei 100°K an einer Cryostat-Anlage (Oxford Cryosystems, Oxford, UK) durchgeführt.

Testaufnahmen an Diffraktionsdaten wurden mit Hilfe eines *image plate*-Detektors (MAR Research, Hamburg) unter Verwendung monochromatischer CuK $\alpha$ -Strahlung (Graphit-Monochromator,  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) an einem rotierenden Drehanoden-Röntgenstrahlgenerator RU 200 (Rigaku, Tokio, Japan) durchgeführt.

Hochaufgelöste Datensätze geeigneter Proteinkristalle wurden an der *wiggler beamline* BW6 der Max-Planck-Gesellschaft ( $\lambda = 1,05 \text{ \AA}$ ; HASYLAB, Deutsches Elektronensynchrotron, Hamburg) mit Hilfe eines CCD Detektors (MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Für die Ermittlung des optimalen Drehbereichs und Messwinkels anhand initialer Testbilder wurde das Programm BEST [147] eingesetzt. Für die Indizierung der Diffraktionsdaten wurde DENZO [141], für die Datenreduktion und Skalierung SCALEPACK [141] verwendet. Für die Rechnungen zur Datenauswertung sowie zur Strukturlösung und -analyse wurden Computer der Firmen Silicon Graphics (Sunnyvale, CA, USA) und Digital (Bellevue, WA, USA) sowie IBM-kompatible Personal Computer mit Linux- und Windows-basierten Betriebssystemen eingesetzt.

### **2.5.4 Sap3 – Soaking-Versuche mit Ritonavir**

Über wasserhaltige Kanäle, die einen Proteinkristall normalerweise durchziehen, kann ein gelöster Inhibitor in den Kristall eingesogen werden, um sich dann in das aktive Zentrum der Proteinmoleküle einzulagern.

Zu einem Proteintropfen (1  $\mu\text{l}$ ), in dem Kristalle des freien Enzyms gewachsen waren, wurden direkt 0,2  $\mu\text{l}$  einer 10 mM methanolischen Ritonavir-Lösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min, 30 min, 45 min und 60 min wurden Kristalle aus den sitzenden Tropfen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben gefischt und Testaufnahmen durchgeführt. Weitere Kristalle aus dem Tropfen wurden nach etwa zehn Tagen Inkubationszeit getestet. Ein nativer Datensatz wurde an der Wiggler Beamline BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg) bis zu einer Auflösung von  $< 2,0 \text{ \AA}$  aufgenommen.

## **2.6 Strukturlösung und –analyse**

### **2.6.1 Theoretischer Hintergrund**

Eine molekulare Struktur wird im wissenschaftlichen Sinne durch die Gesamtheit der Lage jedes einzelnen seiner Atome im dreidimensionalen Raum beschrieben. Die Lage eines Atoms  $j$  wird dabei durch seine Koordinaten  $(x_j, y_j, z_j)$  in einem definierten Koordinatensystem in Bezug zum Ursprungspunkt des Systems bestimmt. Eine molekulare Struktur definiert sich über den kompletten Koordinatensatz  $(x_n, y_n, z_n)$  seiner Atome. Das Lösen der Struktur eines Moleküls bedeutet damit, die Koordinaten  $(x_j, y_j, z_j)$  eines jeden Atoms  $j$  zu identifizieren und seine daraus resultierende Position zu spezifizieren.

Im Folgenden soll kurz die theoretische Grundlage der Röntgenstrukturanalyse unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden erörtert werden. Eine ausführlichere Darstellung ist in einer Reihe von Lehrbüchern [55, 118, 150] zu finden.

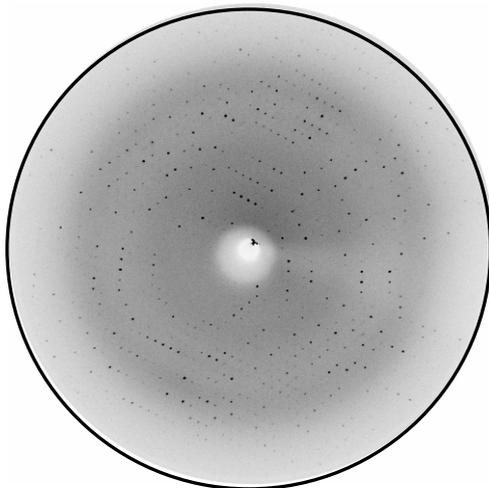
### **2.6.2 Röntgenstrukturanalyse – allgemeiner Überblick**

Das Prinzip der Röntgenstrukturanalyse basiert auf der Streuung von Röntgenstrahlen an den Elektronenhüllen von Atomen und der Verstärkung der gestreuten Strahlen durch das Kristallgitter. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse kann die Struktur eines Kristalls im atomaren Bereich bestimmt werden. Im Gegensatz zum Licht- oder Elektronenmikroskop wird das dreidimensionale Bild atomarer Strukturen nicht direkt erzeugt. Vielmehr werden die

aufgezeichneten Streudaten einer Fouriertransformation unterzogen, woraus dann die dreidimensionale atomare Struktur aus den gesammelten Daten errechnet wird.

Röntgenstrahlen sind aufgrund ihrer Wellenlänge für die strukturelle Aufklärung biologischer Makromoleküle auf atomarer Ebene besonders geeignet, da die Wellenlänge dieser elektromagnetischen Strahlung in der Größenordnung der Atomabstände biologischer Makromoleküle (1-2 Å) liegt. Sie reicht zudem aus, um in diese Materie bis zu 1 mm tief einzudringen.

Kristalle bestehen aus periodisch in Kristallgittern angeordneten Einheitszellen, die wiederum sogenannte asymmetrische Einheiten (z.B. Makromoleküle) in wiederkehrender symmetrischer räumlicher Anordnung beinhalten. Bei Bestrahlung eines Kristalls mit Röntgenstrahlung führt die gitterartige Anordnung der Einheitszellen unter bestimmten Bedingungen zur konstruktiven Interferenz der an den Elektronenhüllen gestreuten Wellen. Durch Abbildung der konstruktiv interferierenden Streuwellen (Reflexe) erhält man das eigentliche Streubild oder Beugungsmuster (**Abb. 13**), das zur Berechnung der Kristallstruktur dient.

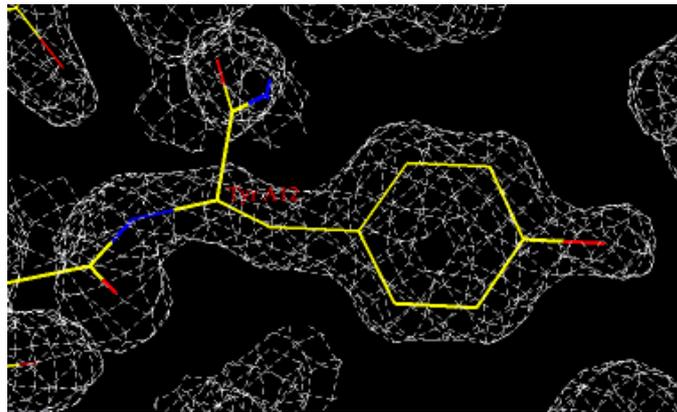


**Abbildung 13:** Streubild eines Kristalls, durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen erzeugt. Schwarze Punkte stellen Reflexe unterschiedlicher Intensität dar.

Reflexe treten, wie in **Abb. 13** zu erkennen, nur an diskreten Orten auf und bilden abhängig vom Kristallgitter des Proteinkristalls (reales Gitter) ein diskretes ebenfalls gitterartig aufgebautes Beugungsmuster (reziprokes Gitter). Reflexe, auch Beugungsmaxima genannt, liegen *per definitionem* im reziproken Raum, wobei ihre Lage ebenso wie im realen Raum in einem Koordinatensystem durch Bezug zu einem Ursprungspunkt mittels Koordinaten oder Indizes ( $h_j$ ,  $k_j$ ,  $l_j$ ) bestimmt wird. Die Gitterabstände der Beugungsmaxima im Beugungsmuster stehen mit den Gitterabständen des realen Kristallgitters invers proportional in Beziehung. Dies ermöglicht eine direkte Ableitung der Geometrie der Einheitszelle des Kristallgitters aus dem Beugungsmuster. Die Intensität der Reflexe stellt eine wichtige Information dar, die für die Berechnung der Atompositionen innerhalb der

Einheitszelle benötigt wird. Bei der Röntgenstrukturanalyse werden streng genommen allerdings nicht die exakten Positionen der Atome, sondern die Verteilung der atomaren Elektronen in der Elementarzelle bestimmt, da nur diese mit der Röntgenstrahlung in Wechselwirkung treten.

Letztlich erhält man aus der Gesamtinformation einer ausreichenden Anzahl an Streubildern eines Kristalls eine Elektronendichtekarte (**Abb. 14**). Indem geeignete Aminosäuren in die Elektronendichtekarte möglichst genau eingepasst werden, wird im Anschluß die gesuchte Struktur des Moleküls ermittelt.



**Abbildung 14:** Elektronendichtekarte (weißes Gitter). In die Elektronendichtekarte wird die Aminosäuresequenz möglichst optimal eingepasst.

Zur Berechnung einer Elektronendichtekarte benötigt man neben der Information der Reflexintensitäten noch die sogenannte Phaseninformation, die sich jedoch nicht direkt aus den Streubildern eines Kristalls ermitteln lässt. Dies stellt ein grundlegendes Problem in der Röntgenstrukturanalyse dar. Methoden, die zur Lösung des sogenannten „Phasenproblems“ beitragen, sollen in den Kapiteln 2.6.6 und 2.6.7. näher erläutert werden.

### 2.6.3 Beugung von Röntgenstrahlen am Kristall - Braggsche Gleichung

Die Beugung der Röntgenstrahlen am Kristallgitter kann nach W. L. Bragg modellhaft auch als partielle Reflexion der Strahlen an einer Schar äquivalenter, paralleler Gitterebenen - den Netzebenenscharen - des Kristallgitters, beschrieben werden. W. L. Bragg zeigte zudem, daß eine Netzebenenschare mit Index  $hkl$  und interplanarem Abstand  $d_{hkl}$  nur dann ein Beugungsmaximum (Reflex) erzeugt, wenn Röntgenstrahlen der Wellenlänge  $\lambda$  im gleichen Winkel  $\theta$  auf die Netzebenenschare einfallen, wie sie von dieser reflektiert werden.

Es gilt also:

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$$

$d$  = Netzebenenabstand

$\sin \theta$  = Einfallswinkel

$\lambda$  = Wellenlänge

wobei  $n$  eine ganze Zahl (Integer) sein muss.

Sind die Bedingungen des Bragg'schen Gesetzes erfüllt, so werden Röntgenstrahlen in gleicher Phase von der Netzebenenchar reflektiert und erzeugen damit eine konstruktive Interferenz, die ein Beugungsmaximum bzw. einen Reflex auslöst. Stellt  $n$  keine ganze Zahl dar, so werden die Röntgenstrahlen nicht in gleicher Phase reflektiert. Daraus resultiert eine destruktive Interferenz; ein Beugungssignal kann in diesem Fall nicht erzeugt werden.

Reflexe treten also, wie bereits erwähnt, nur an diskreten Orten auf und bilden abhängig vom Kristallgitter des Proteinkristalls (reales Gitter) ein diskretes ebenfalls gitterartig aufgebautes Beugungsmuster (reziprokes Gitter).

#### 2.6.4 Strukturfaktoren: mathematische Wellenbeschreibungen der Beugungsmaxima (Reflexe) von Röntgenstrahlen

Wellenbeschreibungen stellen periodische Funktionen dar, die durch Sinus- oder Kosinusgleichungen der folgenden Form beschrieben werden können:

$$f(x) = F \sin 2\pi(hx + \alpha)$$

$F$  = Amplitude der Wellenfunktion

$H$  = Frequenz der Wellenfunktion

$\alpha$  = Phase der Wellenfunktion

oder

$$f(x) = F \cos 2\pi(hx + \alpha).$$

Jede noch so komplizierte Wellenfunktion kann als Summe einfacher Sinus- und Kosinusfunktionen dargestellt werden. Diese mathematische Operation wird als Fouriersumme bezeichnet.

Jedes Atom in der Einheitszelle steuert abhängig von seiner Elektronenanzahl und seiner Position in der Einheitszelle einen bestimmten Beitrag zur Welle des Beugungsmaximums bei. Aus der Summe dieser Beiträge ergibt sich der Strukturfaktor  $F_{hkl}$  für eine Einheitszelle mit  $n$  Atomen, also aus der Summe aller  $n$  atomaren Werte  $f_{hkl}$  wie folgt:

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)}$$

$f_j$  = Atomformfaktor des Atoms  $j$  mit den Koordinaten  $x_j, y_j, z_j$  in der Einheitszelle

### 2.6.5 Berechnung der Elektronendichte

Die Elektronendichte  $\rho(x, y, z)$  stellt eine dreidimensionale periodische Funktion dar, die sich in jeder Einheitszelle wiederholt und deren Graph ein Abbild der Elektronenwolken um die Moleküle der Einheitszelle ergibt.

Betrachtet man einen Strukturfaktor  $F_{hkl}$  nun nicht anhand der Anzahl der Atome einer Einheitszelle, sondern anhand ihrer kontinuierlichen Elektronendichte in der Einheitszelle, so ergibt sich folgende mathematische Beschreibung:

$$F_{hkl} = V \int_x \int_y \int_z \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dx dy dz$$

oder äquivalent

$$F_{hkl} = \int_V \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV,$$

wobei das Integral von  $V$ , dem Volumen der Einheitszelle, nur eine Verkürzung der Integrale der Werte  $x$ ,  $y$  und  $z$  ist.

$F_{hkl}$  stellt eine Fouriertransformation der Elektronendichte  $\rho(x, y, z)$  der Moleküle in der Einheitszelle dar. Eine Fouriertransformation beschreibt im Allgemeinen eine mathematische Operation, bei der eine Funktion mit bestimmten Variablen (z.B.  $t$  = Zeit) in eine Funktion mit reziproken Variablen (z.B.  $1/t$  = Frequenz) transformiert wird. Sie beschreibt also im Falle der Beugung von Röntgenstrahlen exakt die mathematische Beziehung eines Objekts (Variable  $x, y, z$ ) und seines Beugungsmusters (reziproke Variable  $h, k, l$ ). Diese mathematische Operation ist reversibel und kann in beide Richtungen erfolgen. Die Umkehrung der Fouriertransformation für  $\rho(x, y, z)$  ergibt demnach:

$$\begin{aligned} \rho(x, y, z) &= \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} & \mathbf{v} &= \text{Volumen der} \\ & & & \text{Einheitszelle} \\ &= \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha_{hkl}} \end{aligned}$$

Während sich die Amplituden  $|F_{hkl}|$  direkt aus den gemessenen Intensitäten  $I_{hkl}$  der Beugungsmaxima mit

$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2$$

ermitteln lassen, sind die Phasen  $\alpha_{hkl}$  experimentell nicht unmittelbar messbar - in der Kristallographie allgemein als das „Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse“ bekannt.

## 2.6.6 Lösung des Phasenproblems der Röntgenstrukturanalyse

Prinzipiell genügt es, ein Set an Phasen  $\alpha_{hkl}$  zu bestimmen, das den eigentlichen Phasen ausreichend nahe kommt, um mit deren Hilfe näherungsweise die Elektronendichte des Moleküls zu berechnen. Die Molekülkoordinaten werden darauffolgend solange iterativ verändert, bis die Differenz der durch Rücktransformation erhaltenen Strukturfaktoramplituden  $|F_{\text{calc}}(hkl)|$  zu den gemessenen  $|F_{\text{obs}}(hkl)|$  minimal ist.

Neben der Methode des isomorphen Ersatzes (*multiple isomorphous replacement*; MIR) und der Methode der Multiplen Anomalen Dispersion (*multiple anomalous dispersion*; MAD) steht der makromolekularen Proteinkristallographie die Methode des molekularen Ersatzes (Pattersonsuchmethode, *molecular replacement*; MR) zur Lösung des Phasenproblems zur Verfügung.

Bei ersteren Methoden (MIR, MAD) werden angenäherte Phasen  $\alpha_{hkl}$  durch Zugabe von Schwermetall-Ionen zum Proteinkristall ermittelt. Bei diesen Lösungsansätzen werden - sehr vereinfacht dargestellt - mit Hilfe des Schwermetall-Zusatzes auf unterschiedliche Weise detektierbare Zusatzinformationen erhalten, die als Phaseninformationen dienen und damit zu einer angenäherten Berechnung einer ersten Elektronendichte verwendet werden können.

## 2.6.7 Die Methode des molekularen Ersatzes - *molecular replacement*

Zur Lösung des Phasenproblems wurde bei den Strukturmolekülen Sap1, Sap3 und Sap5 die Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement*) angewandt.

Bei dieser Methode werden die Phasen eines bereits bekannten Strukturmodells (Suchmodell), das hinreichend Ähnlichkeit zur gesuchten Struktur aufweist, für die Ermittlung der initialen Elektronendichte des unbekanntes Proteinmoleküls genutzt. Erfahrungsgemäß kann eine Strukturlösung durch *molecular replacement* gelingen, wenn Suchmodell und gesuchte Struktur eine Aminosäuresequenzhomologie von mindestens 25 - 30% aufweisen.

Die Methode des *molecular replacement* umfasst die korrekte Platzierung des Suchmodells in der Einheitszelle, wodurch die Phasenwinkel bestimmt und die Elektronendichte der gesuchten Struktur berechnet werden können. Die Platzierung des Suchmodells erfolgt durch Trennung der Suche nach bester Orientierung (Rotationssuche) und bester Position (Translationssuche) des Suchmodells in der Einheitszelle, wodurch die riesige zu verarbeitende Datenmenge erheblich reduziert werden kann und die Dauer der Suche immens beschleunigt wird.

Prinzipiell werden Strukturfaktoren ( $F_{\text{calc}}$  genannt) aller möglichen Orientierungen und Positionen des gesuchten Modells in der Einheitszelle berechnet und deren Amplituden  $|F_{\text{calc}}|$  mit den gemessenen Amplituden  $|F_{\text{obs}}|$ , die über die Intensitäten der Beugungsmaxima

errechnet werden, verglichen. Die kalkulierten Phasen ( $\alpha_{\text{calc}}$ ) des Modells mit der besten Orientierung und Position dienen als initiale Phasen für die Berechnung des ersten Elektronendichtemodells, das im Anschluss durch kontinuierliche Verfeinerung weiter verbessert werden muss.

Die Anwendung der Pattersonfunktion und der zugehörigen *Patterson map* ermöglicht eine von der Position unabhängige Rotationssuche. Diese Funktion stellt eine Fourier-Summe ohne Phasen dar und birgt somit den Vorteil, direkt aus den gemessenen Daten unter Verwendung der Intensitäten ermittelt werden zu können, da

$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2.$$

Die Patterson-Funktion stellt sich allgemein wie folgt dar:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F_{hkl}|^2 e^{-2\pi i(hu+kv+lw)}.$$

Sie entspricht einer Karte aus Abstandsvektoren zwischen Punkten der Einheitszelle im realen Raum. Während der Rotationssuche werden die Ursprungspunkte der *Patterson maps* des Suchmodells und der gesuchten Struktur überlagert, und durch Drehen des Suchmodells um die Achsen  $\Phi$ ,  $\varphi$  und  $\chi$  wird die beste Orientierung ermittelt. Ein Vergleich verschiedener Orientierungen wird anhand der Rotationsfunktion  $R(\Phi, \varphi, \chi)$  rechnerisch durchgeführt:

$$R(\phi, \varphi, \chi) = \int_{u,v,w} P^{\text{target}}(u, v, w) P^{\text{model}}\{(u, v, w) \times [\phi, \varphi, \chi]\} dudvdw.$$

Die Funktion zeigt ein Maximum als Anzeichen der besten Orientierung, wenn sich die Patterson-Funktionen des Zielmoleküls mit den Patterson-Funktionen des Modells optimal überlagern.

Bei der Translationssuche wird das orientierte Suchmodell in der Einheitszelle positioniert. Für eine zu untersuchende Position ( $x, y, z$ ) entscheidet während der Translationssuche die Übereinstimmung von  $|F_{\text{calc}}|$  mit  $|F_{\text{obs}}|$  über deren Richtigkeit. Sowohl R-Faktor  $R$  als auch Korrelationsfaktor  $C$  beschreiben die Übereinstimmung der Amplituden zweier Strukturfaktorgruppen wie folgt:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

$|F_{\text{obs}}|$  = beobachtete Strukturfaktoren  
 $|F_{\text{calc}}|$  = berechnete Strukturfaktoren

und

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2}) \times (|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2})}{\sqrt{\sum_{hkl} (|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2})^2 \sum_{hkl} (|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2})^2}}$$

R-Faktoren, die in einer Größenordnung von etwa 0,3 bis 0,4 (bzw. 30–40%) liegen, erzeugen erfahrungsgemäß ein gutes Startmodell zur Verfeinerung der Struktur. Die Grenze der Richtigkeit eines durch *molecular replacements* ermittelten Phasenmodells liegt bei einem R-Faktor von etwa 0,5 oder 50%.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein geeignetes Phasenmodell sowohl der Apostruktur von Sap3 als auch der an Pepstatin A gebundenen Sap3-Struktur mit Hilfe des Programms Molrep [181] gefunden. Zur Ermittlung eines Initialmodells für Sap1 und Sap5 wurde das Programm Phaser [168] eingesetzt. Phaser grenzt sich von vorhergehenden *molecular replacement*-Programmen durch eine stark verbesserte Rotations- und Translationssuche ab.

Als Suchmodell dienten die Koordinaten der bereits bekannten Struktur von Sap2X (PDB Code: 1ZAP; [1]).

### 2.6.8 Modellbau und Verfeinerung

Die Strukturmodelle von Sap1 und Sap3 wurden mit Hilfe des Programms O [98], das Strukturmodell von Sap5 wurde mit dem Programm Coot [22, 59] in die mit CNS [22] berechneten Elektronendichtekarten gebaut. In der Regel wurden teilweise gemittelte  $2F_o-F_c$  und  $F_o-F_c$  Elektronendichtekarten verwendet, wobei zur Verringerung des *model bias* zusätzlich *composite omit maps* für die Einpassung des Strukturmodells verwendet wurden. In Bereichen schlecht definierter Elektronendichte wurden zusätzlich mit Hilfe von CNS  $2F_o-F_c$ -*composite omit maps* verwendet. Die Ligandenstruktur von Pepstatin A wurde aus der Datenbank des *Hetero-compound Information Centre*, Uppsala, entnommen [99]. Topologie- und Parameter-Dateien wurden mit Hilfe von XPLO2D [99] erstellt.

Einem initialen *rigid-body-refinement* folgte die Verfeinerung der Strukturmodelle mit CNS [22] unter Berücksichtigung der Parameter von Engh und Huber [60].

Die Kontrolle der Verfeinerung wurde mit Hilfe des freien R-Faktors ( $R_{free}$ ) als Indiz einer Überverfeinerung gewährleistet. Dabei wurden zur Berechnung des freien R-Faktors 5% der Daten von der Verfeinerung ausgeschlossen [21].

In den ersten Verfeinerungszyklen wurden die Modelle durch *simulated annealing* und Geometrieverfeinerung verbessert. Sobald das *simulated annealing* nicht mehr zur Verbesserung der Strukturmodelle beitrug, erfolgte in weiteren Schritten lediglich die

Verfeinerung der Geometrie und des B-Faktors. Nach Einbau aller identifizierbaren Atome wurden Wassermoleküle mit CNS automatisch in der Elektronendichtekarte positioniert und mit dem Programm O manuell überprüft.

### **2.6.9 Strukturanalyse und graphische Darstellung**

Die Strukturen wurden mit den Programmen PROCHECK [110] und SFCHECK [182] validiert und mit den Programmen O [98], dem SPDB-Viewer [78] und Programmen der CCP4-Programmsammlung (Collaborative Computational Project 1994, [7]) analysiert.

Für Überlagerungen mit anderen Strukturen wurden die Programme LSQMAN [97] und Coot [59] verwendet. Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW [176] erstellt und mittels Excel (MS Office 2000, Microsoft) graphisch dargestellt.

Oberflächenabbildungen wurden mit GRASP [130] erstellt, sonstige Strukturabbildungen wurden in erster Linie mit den Programmen PYMOL [48] und Molscrip [104] angefertigt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Proteinherstellung, Kristallisation und Strukturlösung

#### 3.1.1 Proteinexpression

Voraussetzung zur Kristallisation eines Moleküls sind große Mengen an sehr reinem konzentriertem Protein (ca. 10 mg/ml). Mit Hilfe des rekombinanten Expressionssystems *Pichia pastoris* gelang die getrennte Herstellung der Sap-Isoenzyme in einer für die Kristallisation ausreichenden Menge. Als eukaryontischer Organismus ermöglicht die Hefe *Pichia pastoris* eine Expression korrekt gefalteter Proteine, was sowohl für die Aktivität als auch für die Strukturanalyse des Proteins eine entscheidende Rolle spielt. Zudem birgt dieses Expressionssystem den besonderen Vorteil, die exprimierten Proteine in den Zellüberstand zu sezernieren. Dies erübrigt zum einen ein aufwendiges Zellaufschlussverfahren, zum anderen weist das Protein im Zellüberstand bereits direkt nach der Expression einen relativ hohen Reinheitsgrad auf.

*Pichia pastoris* erwies sich als stabiles und robustes Expressionssystem. Durch Zugabe ausreichender Mengen eines geeigneten Antibiotikums (Tetracyclin-HCl oder Kanamycinsulfat) konnte ein Überwuchern mit schneller heranwachsenden Bakterien erfolgreich verhindert werden. Ausbeuten an Sap-Isoenzymen von etwa 20 – 80 µg/ml, wie bei Borg-von Zepelin et al. [17] beschrieben, konnten in ähnlicher Größenordnung erzielt werden.

Stämme der Hefe *Pichia pastoris* GS 115, in die bereits die jeweiligen Isoenzyme Sap1, Sap3, Sap5 und Sap6 kloniert waren, wurden freundlicherweise von Dr. Michel Monod (Service de Dermatologie (DHURDV), Laboratoire de Mycologie, BT422, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, 1011 Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

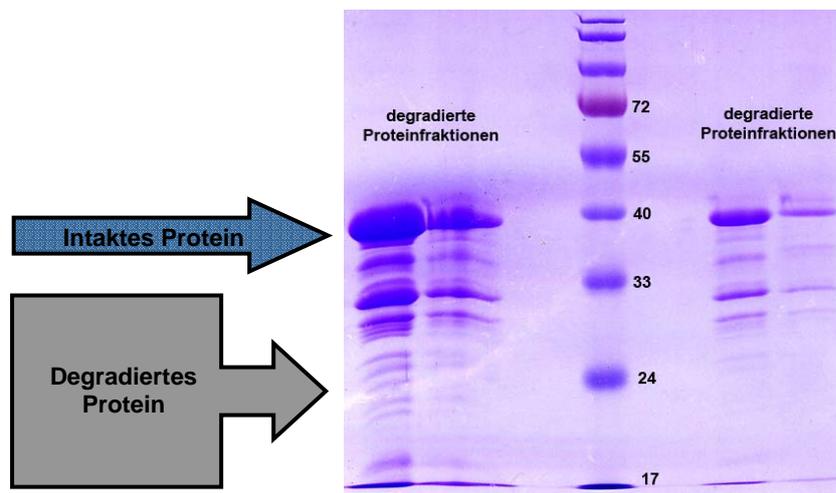
#### 3.1.2 Proteinaufreinigung

Im ersten Reinigungsschritt mittels Ionenaustauschchromatographie wurde die Gesamtladung der jeweiligen Isoenzyme ausgenutzt. Während Sap1 und Sap3 eine negative Gesamtladung von -8 respektive -21 aufweisen, besitzen Sap5 und Sap6 eine insgesamt positive Ladung von +2 bzw. +3 [167].

- Reinigung von Sap1 und Sap3

Aufgrund ihrer negativen Gesamtladung wurden sowohl Sap1 als auch Sap3 an einer DEAE-Anionenaustauschersäule gereinigt.

Im pH-Bereich des Aktivitätsoptimums der Enzyme wurde eine Selbstdegradation beobachtet (**Abb. 15**).



**Abbildung 15:** Selbstdegradation von Sap3 bei pH 3,3 (Aktivitätsoptimum von Sap3: pH 3,5).

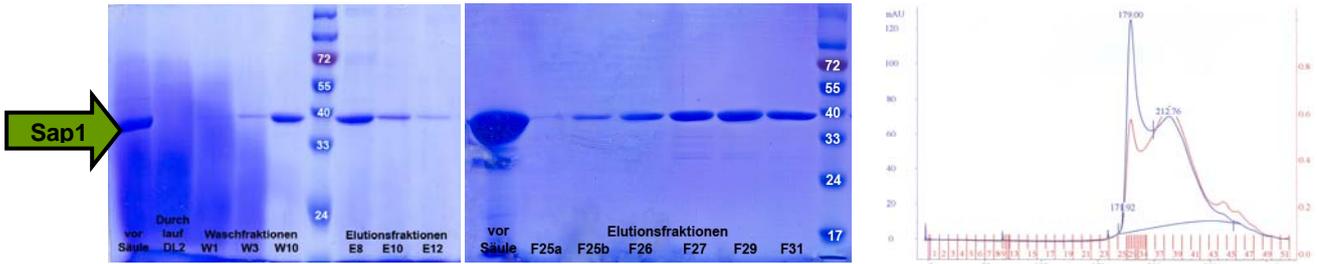
Um dies zu vermeiden wurde im schwach sauren (pH 5,5, Sap1) bis neutralen (pH 7,0, Sap3) pH-Bereich gearbeitet.

Bereits nach dem ersten Reinigungsschritt konnte in beiden Fällen nahezu reines Protein erhalten werden (**Abb. 16**).<sup>1</sup>

Letzte Verunreinigungen wurden jeweils mit Hilfe der Gelfiltration beseitigt, einem finalen Reinigungsschritt, der in der Kristallographie gemeinhin als „Polierschliff des Proteins“ bezeichnet wird. Sap1 und Sap3 konnten mit einem Reinheitsgrad von etwa 95% gewonnen werden.

<sup>1</sup> Anmerkung: Bei wiederholten Reinigungsversuchen von Sap1 erwies es sich als durchaus sinnvoll, der Elution von Sap1 von der Anionenaustauschersäule einen Waschschrift mittels 100 mM HEPES pH 7.5 vorzuschalten.

### Reinigung Sap1



(a) Anionenaustausch

DEAE

Elutionsgradient:  
10 mM → 100 mM  
Natriumcitratpuffer  
pH 5,5

(b) Gelfiltration

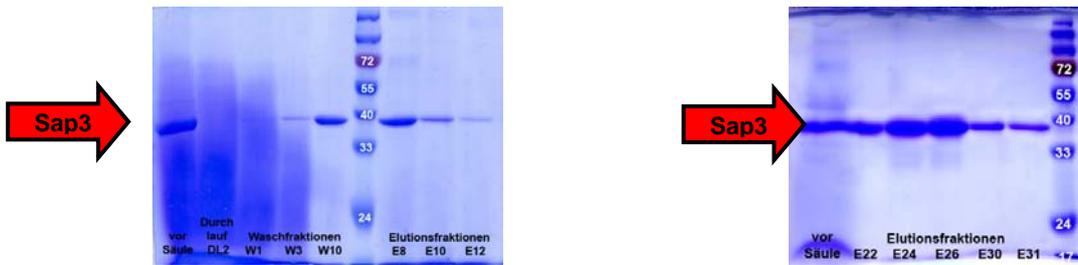
Superdex 75

Elutionspuffer:  
10 mM Natriumcitratpuffer  
pH 7,0 + 150 mM NaCl

(c) UV-Elutionsprofil

(rot:  $\lambda = 280$  nm, blau:  $\lambda = 260$  nm)

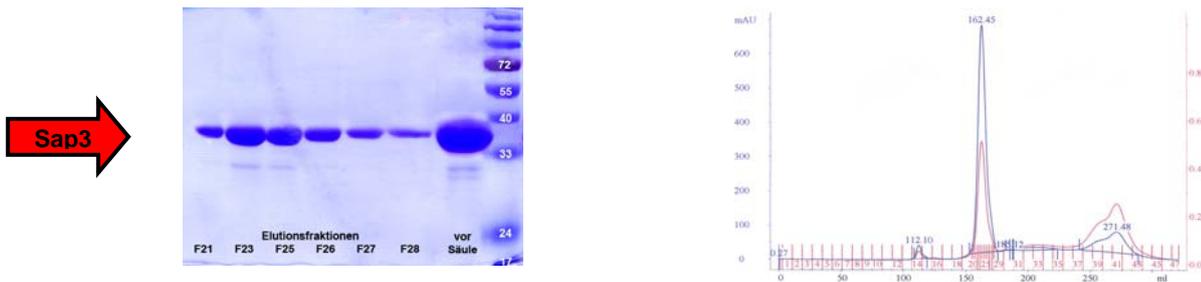
### Reinigung Sap3



(a) Anionenaustausch

DEAE

Elutionsgradient: 10 mM → 100 mM Natriumcitratpuffer pH 7,0



(b) Gelfiltration

Superdex 75

Elutionspuffer: 10 mM Natriumcitratpuffer  
pH 7,0 + 150 mM NaCl

(c) UV-Elutionsprofil

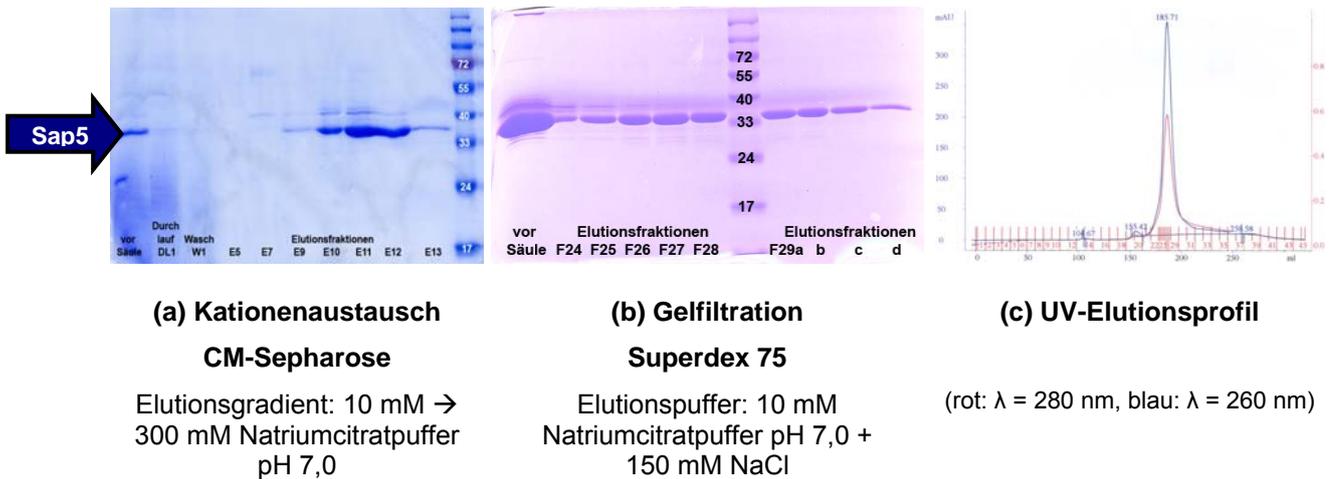
(rot:  $\lambda = 280$  nm, blau:  $\lambda = 260$  nm)

**Abbildung 16:** Reinigung von Sap1 und Sap3. Nachweis von Identität und Reinheit mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese und Absorptionsprofil von ultraviolettem Licht ( $\lambda = 280$  nm).

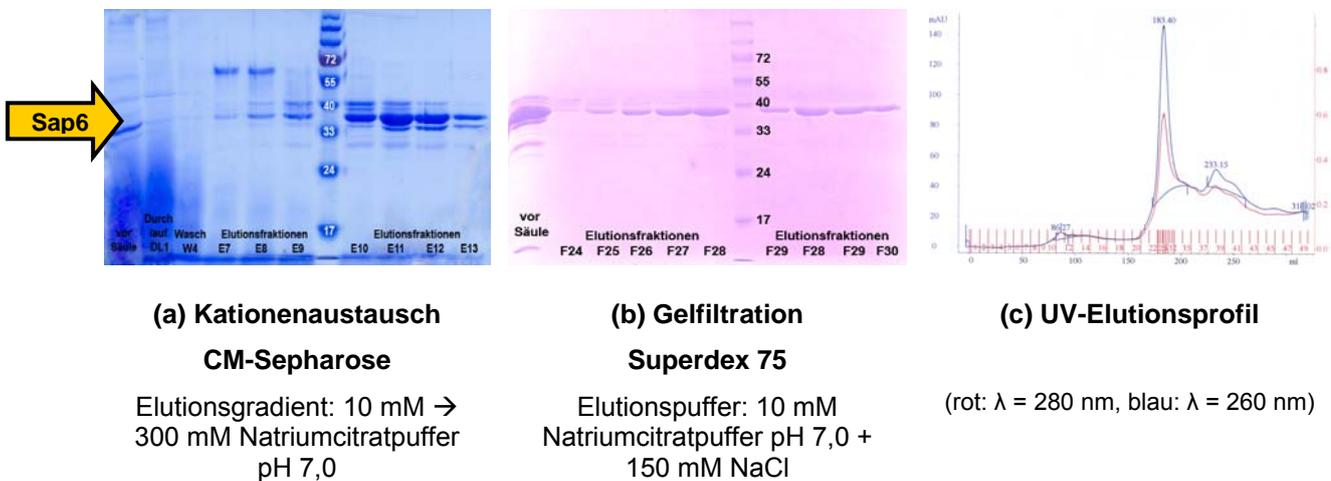
- Reinigung von Sap5 und Sap6

Nach der jeweils ersten Reinigung an einer Kationenaustauschersäule wurden beide Isoenzyme einer zweiten Reinigung mittels Gelfiltration unterzogen (**Abb. 17**). Die für eine Kristallisation nötige Reinheit wurde durch dieses Verfahren erreicht.

## Reinigung Sap5



## Reinigung Sap6



**Abbildung 17:** Reinigung von Sap5 und Sap6. Nachweis von Identität und Reinheit mittels SDS-PAGE und Absorptionsprofil von ultraviolettem Licht ( $\lambda = 280$  nm).

Für alle Isoenzyme wurde ein eindeutiger Identitätsnachweis neben der Analyse mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese mit Hilfe des MALDI-TOF Peptidmassen-Fingerprintings erbracht. Ich danke I. Mathes and F. Lottspeich für die Durchführung der Versuche.

Spaltung von Resorufin-markiertem Casein bei dem Aktivitäts-pH-Optimum der jeweiligen Isoenzyme erbrachte den Nachweis, daß die einzelnen Proteine in ihrer aktiven Form und somit richtig gefaltet vorlagen.

Die Proteine wurden zur Kristallisation in einer Konzentration von etwa 10 mg/ml gewonnen (**Tab. 3**).

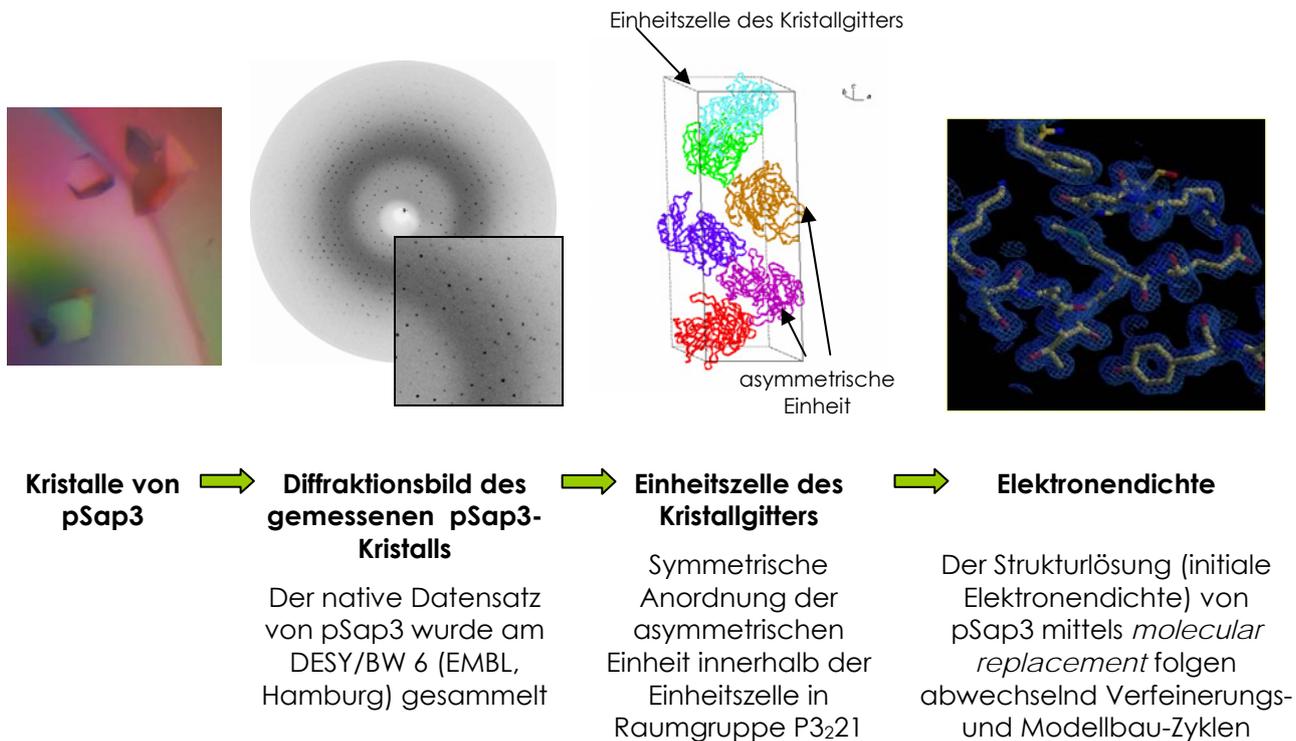
| Sap Isoenzym | Proteinlösung [mg/ml] | Puffer           |
|--------------|-----------------------|------------------|
| Sap1         | 12,98                 | 10 mM MES ph 6,5 |
| Sap3         | 9,95                  | 10 mM MES ph 6,5 |
| Sap5         | 10,4                  | 10 mM MES ph 6,5 |
| Sap6         | 9,6                   | 10 mM MES ph 6,5 |

**Tabelle 3:** Endkonzentration der Proteinlösungen für Kristallisationsansätze

### 3.1.3 Kristallisation und Strukturlösung

Das Verfahren der Kristallisation beruht auf einer empirischen Ermittlung der besten Pufferbedingung, bei der sich Proteinmoleküle im gelösten Zustand zu einem regelmäßigen Kristallgitter anordnen können. Ein Kristallgitter setzt sich aus aneinander gereihten Einheitszellen gleicher Form und gleichen Inhalts zusammen. In der Einheitszelle befindet sich die asymmetrische Einheit, die aus einem oder mehreren Proteinmolekülen besteht. Die asymmetrische Einheit ordnet sich innerhalb der Einheitszelle einer bestimmten Symmetrie folgend an. Die mathematische Operation, die diese Symmetrie beschreibt, wird als Raumgruppe bezeichnet.

Die zeitliche Abfolge vom Kristall bis zum Strukturmodell eines Proteins ist in **Abb. 18** skizziert und soll im Folgenden kurz dargestellt werden. Kristalle besitzen die Eigenschaft, Röntgenstrahlen zu beugen. Durch Beugung der Röntgenstrahlen erzeugte Diffraktionsbilder enthalten Informationen sowohl über Aufbau des Kristallgitters sowie über Lage und Struktur der Moleküle, die das Kristallgitter bilden. Haben sich Kristalle geeigneter Größe gebildet, die Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von mindestens 3 Å streuen, wird aus den Daten eines kompletten Diffraktionsdatensatzes eine initiale Elektronendichtekarte rechnerisch erzeugt. Aufeinanderfolgendes Bauen und Verfeinern am Modell führt letztlich zum eigentlichen Strukturmodell eines Proteins.



**Abbildung 18:** Vereinfachte schematische Darstellung der Abfolge der Röntgenstrukturanalyse und Modellverfeinerung am Beispiel von Sap3 in Komplex mit Pepstatin A.

### Sap1

Initiale Kristalle monoklinischer Form bildeten sich bereits nach etwa zwei Tagen in Gegenwart von 14% oder 16% PEG 20000 und 0,1 M MES in einem pH-Bereich zwischen pH 6,1 und pH 6,7; sie erreichten ihre volle Größe innerhalb von 1 bis 2 Wochen (**Abb. 19 a**). Die Kristalle gehörten der Raumgruppe C2 an. Sie enthielten zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit und wiesen einen Proteingehalt von 49,82% auf.

Daten eines nativen Datensatzes wurden bis zu einer Auflösung von 2,05 Å an der Wiggler Beamline BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg) mit Hilfe eines MAR Research 165 mm charge-coupled device detector (MAR Research, Norderstedt) aufgenommen. Die Struktur von Sap1 wurde mit DENZO/SCALEPACK prozessiert [141] und durch *molecular replacement* (Patterson-Suchmethoden) mit Hilfe des Programms Phaser [168] gelöst. Die Struktur von Sap2X (PDB Code: 1ZAP; [1]) diente dabei als Suchmodell.

Einem initialen *rigid body refinement* folgten abwechselnd Verfeinerungs- und Modellbau-Zyklen mit den Programmen CNSv1.1 [22] und O [98] bis zu einem R-Faktor von  $R_{factor} = 18,98\%$ /  $R_{free} = 22,17\%$ . Schlecht definierte Bereiche insbesondere die Aminosäuren 243 bis 249 beider Moleküle konnten nicht gebaut werden; ihre Besetzung wurde auf Null gesetzt.

Während der Verfeinerung des Strukturmodells von Sap1 zeigte sich keine zusätzliche Elektronendichte im aktiven Zentrum – ein Hinweis darauf, daß der zum Protein zugesetzte Inhibitor ATBI nicht an Sap1 gebunden hat.

### **Sap3–Apoenzym (aSap3) und Sap3 im Komplex mit Pepstatin A (pSap3)**

Die Anwesenheit von Zinkionen ( $Zn^{2+}$ ) erwies sich als unerlässlich für die Ausbildung wohlgeformter Kristalle von Sap3. Ohne Zusatz von  $Zn^{2+}$  bildeten sich nadelförmige dünne Kristalle, die sich unter nachträglichem Zusatz einer 10 mM Zinkacetatlösung zum Proteintropfen zu kompakteren Kristallen umformierten. Genügend große trigonale Kristalle konnten jedoch nur bei Anwesenheit von  $Zn^{2+}$  bereits zu Beginn des Kristallisationsvorgangs erzeugt werden.

Sap3 ohne Inhibitor kristallisierte in Gegenwart von 0,2 M Kaliumbromid, 8% PEG 20000, 8% PEG 550MME und 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5.

Sap3 komplexiert mit Pepstatin A bildete Kristalle unter folgenden Pufferbedingungen: 0,2 M Kaliumbromid, 15% PEG 4000 und 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l 5 M NaCl an Tag 3 zum Pufferreservoir (300  $\mu$ l) erschienen die ersten Kristalle nach etwa 3 bis 4 Tagen und erreichten ihre volle Größe innerhalb weniger Wochen (**Abb. 19 b, c**).

Die trigonalen Kristalle gehörten jeweils der Raumgruppe  $P3_221$  an und enthielten ein Molekül pro asymmetrischer Einheit.

Zwei vollständige Datensätze wurden an der Wiggler Beamline BW6 am DESY, Hamburg, bis zu einer Auflösung von 2,2 Å für aSap3 und 1,8 Å für pSap3 gesammelt.

Die Daten wurden in ähnlicher Weise wie für Sap1 beschrieben prozessiert, die Strukturmodelle entsprechend gebaut und verfeinert. Die Struktur von Sap3 in Komplex mit Pepstatin A wurde anhand des Programms Molrep [181] gelöst. Als Suchmodell konnte erneut die Struktur von Sap2X (PDB Code: 1ZAP; [1]) verwendet werden. Zur Grundlage des *molecular replacement* für aSap3 mittels Molrep diente die finale Struktur des Sap3-Pepstatin A Komplexes.

Der Elektronendichte im aktiven Zentrum von pSap3 konnte eindeutig das Pepstatin A zugewiesen und das Molekül in die Dichtemappe eingebaut werden. Der Substratbindungsbereich von aSap3 wies wie erwartet nur Wassermoleküle auf. Während der letzten Verfeinerungsschritte wurde in die Elektronendichte zwischen den Aminosäuren His131Sap3 und Asp191Sap3 des einen Moleküls und zwischen His197Sap3 und Asp214Sap3 des Nachbarmoleküls ein Zinkatom eingebaut. Im Falle der Struktur von Sap3 in Komplex mit Pepstatin A wurden die Daten bis zu einer Auflösung von 1,9 Å gebaut und verfeinert. ASap3 wurde bis zu einer Auflösung von 2,2 Å verfeinert. Die finalen R-Faktoren betragen  $R_{factor} = 23,5\%$  /  $R_{free} = 26,1\%$  für aSap3 und  $R_{factor} = 23,9\%$  /  $R_{free} = 25,2\%$  für pSap3 (**Tab. 4**).

### **Sap3 – Kokristalle mit ATBI und Ritonavir**

Sowohl ATBI als auch Ritonavir sind als Inhibitoren der Aspartatproteinase des humanen Immundefizienz Virus (HIV) beschrieben [37, 96]. Im Gegensatz zu ATBI steht Ritonavir

neben weiteren HIV-Protease-Inhibitoren wie beispielsweise Indinavir, Saquinavir und Amprenavir als Medikament zur Behandlung der Immundefizienzkrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrom*) zur Verfügung. Im Zusammenhang mit den Saps von *C. albicans* wurde Ritonavir als derjenige HIV-Protease Inhibitor charakterisiert, welcher Sap1-3 *in vitro* am stärksten inhibiert [122, 145]. Die inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$  von Ritonavir gegen Sap3 liegt dabei bei etwa  $20\mu\text{M}$  [166].

Um ermitteln zu können, wie sich die Bindungsschemata verschiedener Inhibitoren im Bindungszentrum von Sap3 unterscheiden, wurde das Enzym sowohl mit ATBI als auch mit Ritonavir kokristallisiert. Sap3 im Komplex mit ATBI bildete Kristalle in Gegenwart von 0,15 M Kaliumthiocyanat und 18% PEG 3350 mit 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5. Kristalle von Sap3 mit Ritonavir wurden in 0,2 M Kaliumbromid, 8% PEG 20000, 8% PEG 550MME mit 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 gezogen.

Native Datensätze wurden für beide Kristalle ausgewertet. Im Rahmen der Auswertung wies in beiden Fällen die fehlende Elektronendichte im aktiven Zentrum von Sap3 darauf hin, daß weder das ATBI noch das Ritonavir an das Enzym gebunden hatten.

### **Sap3 – Soaking-Versuche mit Ritonavir**

Da es mit dem Verfahren der Kokristallisation nicht gelang, das Ritonavir an Sap3 zu binden wurde versucht, Ritonavir mittels Soaking in das aktive Zentrum des Isoenzym einzulagern. Zu einem Proteintropfen (1  $\mu\text{l}$ ), in dem Kristalle des ungebundenen Enzyms ausreichender Größe gewachsen waren, wurde 0,2  $\mu\text{l}$  einer 10 mM methanolischen Inhibitorlösung gegeben. Kristalle, die bereits nach etwa 60 min nach Inhibitorzugabe am Röntgenstrahl getestet wurden, hatten ihre Streukraft verloren. Wurde den Kristallen allerdings etwa zehn Tage Zeit gelassen, ihr Kristallgitter neu zu bilden, so konnte ihre Fähigkeit, Röntgenstrahlen zu beugen, zurückgewonnen werden. Ein nativer Datensatz wurde an der Wiggler Beamline BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg) bis zu einer Auflösung von weniger als 2,0 Å aufgenommen.

Die Auswertung dieses Datensatzes erbrachte den Nachweis, daß eine Bindung von Ritonavir an Sap3 nicht stattgefunden hatte. In der Kristallographie gilt die Affinität eines Inhibitors mit einer  $IC_{50}$  im mikromolaren Bereich als ausreichend, um sich während des Soaking-Prozesses ins aktive Zentrum einzulagern. Grund für die nicht erfolgte Einlagerung könnte die extrem schlechte Löslichkeit des Ritonavirs in der wässrigen Mutterlösung der Proteinkristalle sein. Nach Zugabe der methanolischen Ritonavirlösung zur wässrigen Proteinkristall-Lösung wurde beobachtet, daß der Inhibitor teilweise aus der Lösung ausfiel. Die Menge des noch gelösten Anteils an Ritonavir schien für eine Bindung an Sap3 nicht ausreichend gewesen zu sein.

### **Sap5 – gebunden an Pepstatin A**

Ein leichtes Präzipitieren in der aufkonzentrierten Proteinlösung von Sap5 ließ darauf schließen, daß das gereinigte und aufkonzentrierte Protein bereits nahe seiner Löslichkeitsgrenze lag. Interessanterweise schien dies die Kristallisation weniger zu behindern als vielmehr zu fördern.

Sap5 wurde zusammen mit Pepstatin A im 1,5-fachen Überschuss kokristallisiert. Proteinkristalle bildeten sich über Nacht vorwiegend in Gegenwart von zahlreichen PEG-haltigen Puffern. Während sich bei vielen Kristallisationspuffern eine große Menge kleinerer Kristalle bildete, konnten größere tetragonale Anordnungen in Gegenwart von 10% PEG 8000, 8% Ethylenglycol und 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5 erzeugt werden. Innerhalb weniger Tage hatten die Kristalle ihre volle Größe erreicht (**Abb. 19 d**).

Ein kompletter nativer Datensatz wurde von einem tetragonalen Kristall der Raumgruppe  $P4_12_12$  mit zwei Molekülen pro asymmetrischer Einheit aufgenommen. Datenreduktion, Strukturlösung und Verfeinerung erfolgten prinzipiell analog zu Sap1. Das *molecular replacement* wurde mit Hilfe des Programms Phaser [168] mit Sap2X (PDB Code: 1ZAP; [1]) als Suchmodell durchgeführt. Das Strukturmodell von Sap5 wurde mit Coot [59] in die mit CNS [22] berechneten Elektronendichtekarten gebaut. Schlecht definierte Bereiche konnten mittels Berechnung von *composite omit maps* verbessert werden. Pepstatin A war durch die Elektronendichte im aktiven Zentrum sehr gut definiert. Das etwas flexiblere Ende konnte unter Anwendung einer *simulated annealing omit map* sehr gut herausgearbeitet werden. Bei einer Auflösung von 2,5 Å wurde bis zu R-Faktoren von  $R_{factor} = 22,4 \%$  /  $R_{free} = 27,5 \%$  verfeinert (**Tab. 4**).



(a) Sap1 Apoenzym

(b) Sap3 Apoenzym

(c) Sap3-Pepstatin A

(d) Sap5-Pepstatin A

**Abbildung 19:** Kristalle der Sap-Isoenzyme

### **Sap6 – in Komplex mit ATBI**

Trotz Screenings einer Vielzahl von Kristallisationspuffern mit einem weiten Spektrum an Fällungsmitteln (PEG,  $(NH_4)_2SO_4$  u. a.) und pH-Werten (4,0 – 10,0) wurden keine Kristalle von Sap6 erhalten.

**Tab. 4** gibt einen Überblick zur statistischen Bewertung der Daten bei Datensammlung und nach Strukturverfeinerung aller im Rahmen dieser Arbeit gelösten Strukturen.

| Kristall  | Sap1<br>Apoenzym | Sap3<br>Apoenzym   | Sap3-<br>PepstatinA | Sap5-<br>Pepstatin A             |
|---|------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------|
| Raumgruppe  | C2               | P3 <sub>2</sub> 21 | P3 <sub>2</sub> 21  | P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 |
| Moleküle pro<br>asymmetrischer Einheit                      | 2                | 1                  | 1                   | 2                                |
| <b>A. Datensammlung</b>                                     |                  |                    |                     |                                  |
| Zellkonstante a (Å)   | 60,77            | 61,35              | 61,10               | 92,20                            |
| Zellkonstante b (Å)   | 135,67           | 61,35              | 61,10               | 92,20                            |
| Zellkonstante c (Å)   | 96,49            | 171,98             | 170,74              | 182,01                           |
| $\alpha, \beta, \gamma$ (°)                                 | 90, 96,74, 90    | 90, 90, 120        | 90, 90, 120         | 90, 90, 90                       |
| Auflösung (Å)   | 30,0 - 2,05      | 30,0 - 2,2         | 30,0 - 1,8          | 30,0 - 2,5                       |
| Anzahl der beobachteten<br>Reflexe                          | 147887           | 71472              | 133783              | 329235                           |
| Anzahl der unabhängigen<br>Reflexe                          | 47773            | 19792              | 35196               | 27970                            |
| Completeness (%) <sup>a</sup>                               | 98,4 (99,3)      | 99,8 (99,7)        | 99,3 (100,0)        | 100,0 (100,0)                    |
| $R_{merge}$ (%) <sup>a,b</sup>                              | 5,1 (10,0)       | 6,0 (16,8)         | 5,0 (34,8)          | 10,8 (45,8)                      |
| $I/\sigma$  | 27,3             | 18,4               | 13,7                | 7,1                              |
| <b>B. Strukturverfeinerung</b>                              |                  |                    |                     |                                  |
| Auflösung (Å)   | 19,94 - 2,05     | 19,95 - 2,2        | 19,86 - 1,9         | 29,2 - 2,5                       |
| Anzahl der verwendeten<br>Reflexe                           | 47580            | 18789              | 28626               | 26393                            |
| (working set / test set)                                    | (45198 / 2382)   | (17883 / 906)      | (27207 / 1419)      | (25130 / 1263)                   |
| Anzahl Proteinatome pro<br>asymmetrischer Einheit           | 682              | 340                | 340                 | 684                              |
| Anzahl Wasser<br>pro asymmetrischer<br>Einheit              | 655              | 250                | 318                 | 370                              |
| Anzahl Zinkmoleküle pro<br>asymmetrischer Einheit           | 0                | 1                  | 1                   | 0                                |
| $R_{factor}$ (%) <sup>c</sup> / $R_{free}$ (%) <sup>d</sup> | 18,9 / 22,4      | 23,4 / 26,0        | 23,9 / 25,2         | 22,4 / 27,5                      |
| rmsd <sup>e</sup> Bindungslängen (Å)                        | 0,005            | 0,008              | 0,009               | 0,007                            |
| rmsd <sup>e</sup> Bindungswinkel (°)                        | 1,4              | 1,7                | 1,7                 | 1,4                              |
| Gemittelter B-Faktor (Å) <sup>2</sup>                       | 24,762           | 33,303             | 28,949              | 26,696                           |

**Tabelle 4:** Statistische Bewertung der Datensammlung und Strukturverfeinerung von Sap1, aSap3, pSap3 und Sap5.

<sup>a</sup>Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale (2,12-2,05 Å bei Sap1 Apoenzym, 2,28-2,20 Å bei Sap3 Apoenzym, 1,86-1,80 Å bei Sap3-Pepstatin A und 2,59-2,50 Å bei Sap5-Pepstatin A)

<sup>b</sup> $R_{merge} = \sum hkl |I| - I / \sum hkl |I|$

<sup>c</sup> $R_{factor} = \sum hkl ||F_{obs} - F_{calc}|| / \sum hkl |F_{obs}|$

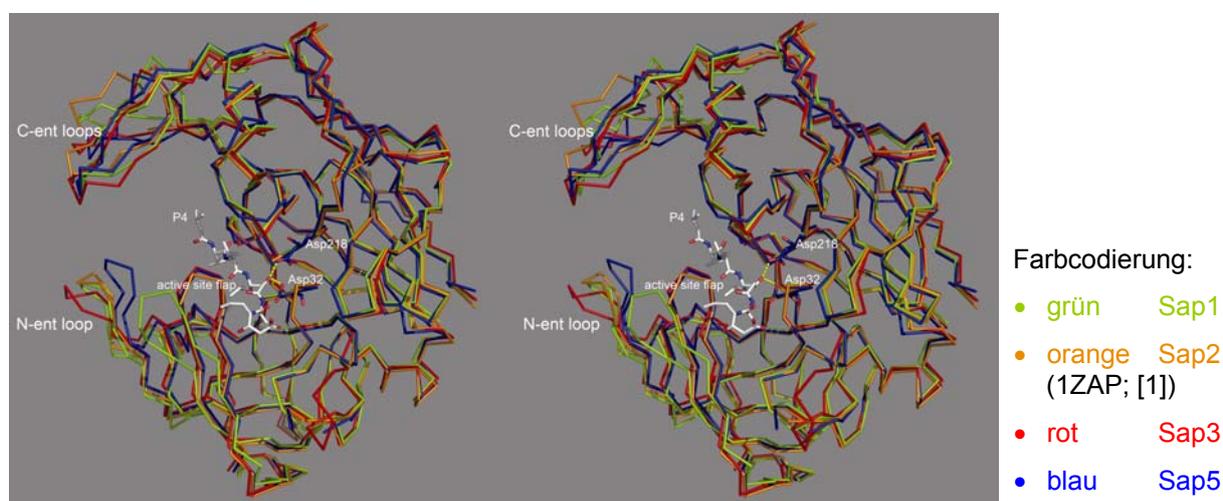
<sup>d</sup>Der  $R_{free}$  wurde von 5,0% der Reflexe berechnet, die nicht für die Verfeinerung berücksichtigt wurden.

<sup>e</sup>rmsd = *root mean square deviation*, rms-Abweichung: Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung

## 3.2 Strukturbeschreibung

### 3.2.1 Gemeinsamkeiten der Strukturen der Sap-Isoenzyme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Kristallstrukturen der Apoenzyme Sap1 und Sap3 sowie die Strukturen von Sap3 und Sap5 jeweils in Komplex mit Pepstatin A gelöst. Strukturelle Überlagerung von Sap1-3 und Sap5 (**Abb. 20, Tab. 5**) wies auf eine sehr hohe Übereinstimmung aller gelösten Proteinstrukturen hin. Deshalb kann die im Anschluß durchgeführte Beschreibung der Struktur von Sap3 ebenso für Sap1 und Sap5 sowie für die bereits bekannte Struktur von Sap2 gelten.



**Abbildung 20:** Stereoabbildung der überlagerten Strukturmodelle von Sap1-3 und Sap5. Pepstatin A (weiß), das der Struktur von Sap5 angehört, wurde modellhaft mit eingefügt. *C-ent loops* und *N-ent loop* bezeichnen die C-terminalen bzw. N-terminalen Eingangs-loops der Isoenzyme (siehe Text).

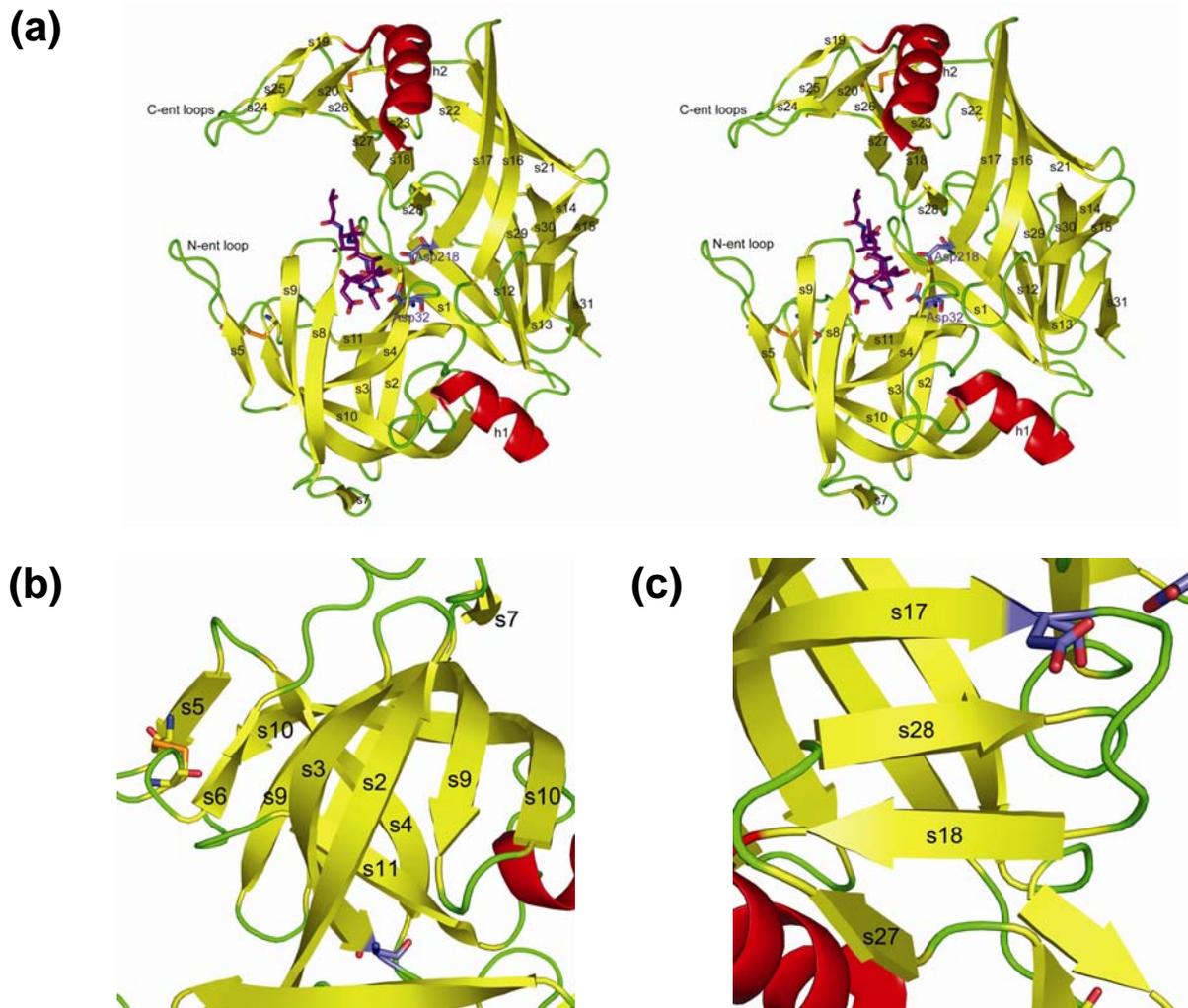
|      | Sap2                             | Sap3                             | Sap5                             |
|------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Sap1 | 327 C $\alpha$ -Atome<br>1,238 Å | 328 C $\alpha$ -Atome<br>1,253 Å | 329 C $\alpha$ -Atome<br>1,182 Å |
| Sap2 |                                  | 327 C $\alpha$ -Atome<br>1,598 Å | 327 C $\alpha$ -Atome<br>1,587 Å |
| Sap3 |                                  |                                  | 327 C $\alpha$ -Atome<br>1,401 Å |

**Tabelle 5:** rms-Abweichung<sup>1</sup> aller C $\alpha$ -Atome von Sap1-3 und Sap5. Die Aminosäuren des *active site flap* wurden von der Überlagerung ausgeschlossen.

<sup>1</sup>rms-Abweichung = rmsd, root mean square deviation, Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung; entspricht der Standardabweichung  $\sigma$ , wenn statt des Mittelwertes die Koordinaten einer der Strukturen verwendet werden. Die rms-Abweichung gilt als Maß für die Unterschiedlichkeit zweier Strukturmodelle.

Sap3 ist ein dicht gepacktes globuläres Protein mit einer nierenförmigen Gesamtstruktur, die sich deutlich in eine N-terminale und eine C-terminale Domäne teilt (**Abb. 21 a**). Jede Domäne wiederum stellt jeweils eines der katalytischen Aspartate bereit, die - im aktiven Zentrum direkt nebeneinander lokalisiert - während des katalytischen Prozesses im Zusammenspiel agieren. Ausnehmend viele  $\beta$ -Stränge sind in der Sekundärstruktur von Sap3 zu finden. Das Rückgrat der Sap3-Struktur wird von einem sechssträngigen Domänenübergreifenden antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (s1,13,12,29,30,15) gebildet, wobei die  $\beta$ -Stränge s1,13,12 und s29,30,15 der N-terminalen bzw. der C-terminalen Domäne zuzuordnen sind. An das sechssträngige  $\beta$ -Faltblatt lagert sich ein kurzes Segment von elf Aminosäuren (Aminosäuren 172 bis 182) an, welches die N-terminale Domäne mit der C-terminalen Domäne verbindet. Aminosäuren 172 bis 176 (s13) wiederum bilden ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt mit den Aminosäuren 337 bis 341 (s31) des nahegelegenen C-terminalen Kettenendes.

An der Rückseite des Proteins beginnend windet sich die Aminosäurenkette nach vorne, wo sie sich nach einer Kehrtwendung im aktiven Zentrum zur dicht gepackten aminoterminalen Domäne arrangiert. Der N-terminale Lappen schichtet sich aus drei  $\beta$ -Faltblatt-Lagen auf, die beinahe im rechten Winkel zueinander liegen („*orthogonal  $\beta$ -sheet layers*“, **Abb. 21 b**). Bei dem stark ineinander verdrehten sechssträngigen  $\beta$ -Faltblatt s7,9,10,4,11,3 sind die vier  $\beta$ -Stränge s10,4,11,3 in zwei antiparallele Paare paralleler  $\beta$ -Stränge angeordnet. Dieses Motiv wurde bereits in der Struktur des Pepsins gefunden [162] und wurde damals als das „Ehering“ Motiv oder als ein Paar interpenetrierender  $\Psi$ -Lettern bezeichnet. Das  $\beta$ -Faltblatt s7,9,10,4,11,3 wird ober- und unterhalb von zwei weiteren viersträngigen  $\beta$ -Faltblättern (s3,2,9,10 bzw. s5,10,9,8) eingeschlossen. Während s3,2,9,10 aus einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt besteht, weist s5,10,9,8 eine Mischung aus einem zweisträngigen antiparallelen (s9,8) und einem zweisträngigen parallelen (s5,10)  $\beta$ -Faltblatt auf. Das antiparallele  *$\beta$ -hairpin*, bestehend aus Aminosäuren 81 bis 91, wird in der Familie der Aspartatproteinasen üblicherweise als „*active site flap*“ oder nur als „*flap*“ bezeichnet [38]. Der *active site flap* bedeckt das aktive Zentrum und spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung eines Inhibitors oder Substrats. In der Nähe ist ein weiterer breiter *flap* angeordnet, der seinen Ursprung in dem  $\beta$ -Faltblatt s5 findet und durch eine Disulfidbrücke zwischen Aminosäure 47 und Aminosäure 59 zusammengebunden ist. Dieser *flap* kann als N-terminaler *Eingangsl-loop* (N-ent *loop*, **Abb. 21 a**) zum aktiven Zentrum bezeichnet werden. Die Aminosäurekette passiert, bevor sie das Domänenübergreifende  $\beta$ -Faltblatt und danach die C-terminale Domäne erreicht, die einzige N-terminale  $\alpha$ -Helix (h1). H1, an der Oberfläche des Proteins liegend, wird auf der einen Seite von den „*orthogonalen  $\beta$ -sheet layers*“ und auf der anderen Seite von dem sechssträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (s1,13,12,29,30,15) flankiert.



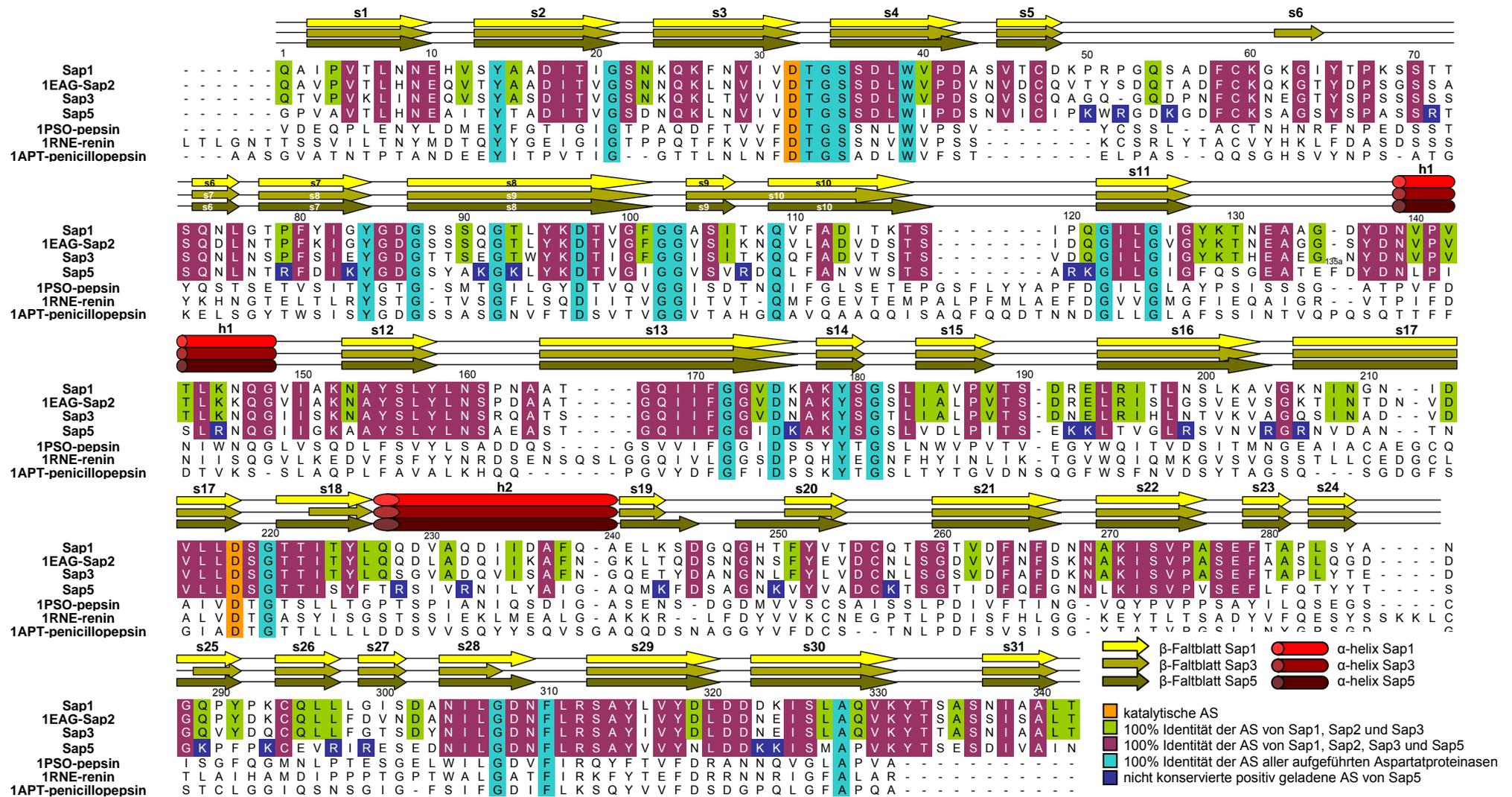
**Abbildung 21:** Struktur des Pepstatin-Sap3-Komplexes. (a) Stereoansicht des Gesamtmoleküls in *ribbon* Darstellung. Das dicht gepackte globuläre Protein besteht zumeist aus  $\beta$ -Faltblättern (gelb).  $\alpha$ -Helices – in rot dargestellt – sind an der Oberfläche der Struktur zu finden. Die katalytischen Aspartate sind in blau, das Pepstatin A in lila dargestellt. (b) Orthogonal geschichtete  $\beta$ -Faltblätter der N-terminalen Domäne von Sap3. (c)  $\beta$ -Stränge s27,18,28,17 arrangiert zum „Ehring“ Motiv oder als Paar interpenetrierender  $\Psi$ -Lettern. Der  $\beta$ -Strang s17 endet dabei mit dem katalytischen Aspartat Asp218.

Der C-terminale Lappen des Proteins erscheint weniger dicht gepackt als der N-terminale Teil. Er kann in drei Teilbereiche aufgeteilt werden: der relativ gutgeordnete hintere Teil mit seinen vielen  $\beta$ -Faltblättern, der mittlere Teil, der aus einer 14 Aminosäuren langen  $\alpha$ -Helix (h2, Aminosäure 227 bis Aminosäure 240) besteht, und der vor allem aus *loops* bestehende weit weniger geordnete C-terminale Vorderteil. Der oberste Teil der Domäne, geformt durch ein antiparalleles viersträngiges  $\beta$ -Faltblatt (s17,16,21,22), wird von einer zweiten  $\beta$ -Faltblatt Schicht fast orthogonal überdeckt, die aus fünf  $\beta$ -Strängen (s27,18,28,17,16) besteht. Die vier  $\beta$ -Stränge s27,18,28,17 zeigen erneut das „Ehring“ Motiv bzw. das Paar interpenetrierender  $\Psi$ -Lettern (**Abb. 21 c**). Interessanterweise endet ein  $\beta$ -Strang der jeweiligen „Ehring“ Motive (s3 und s17) mit einem der katalytischen Aspartate Asp32 bzw. Asp218. Zwei einzelne *loops* (C-ent *loops* - s19-s20 *loop* und s24-s25 *loop*), die den

Vorderteil der C-terminalen Domäne bilden, finden ihren Ursprung in der Nähe des Mittelteils der C-terminalen Domäne, wo sie über eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 256 und 294 verbunden sind. Die Enden der C-ent *loops* werden im weiteren Verlauf zwar in einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (s 23,26,20,19) zusammengehalten, driften jedoch nach vorne hin auseinander. Die C-ent *loops* bilden in Verbindung mit dem N-ent *loop* einen höhlenartigen tunnelförmigen Substratbindungsbereich.

Unterschiede in der Aminosäuresequenz von Sap1-3 und Sap5 zeigen bis auf eine Ausnahme nur geringe Auswirkung auf die hochkonservierte Faltung der Isoenzyme. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Saps (**Abb. 22**) weist die Insertion einer Aminosäure in der Sequenz von Sap5 bzw. Sap2 sowie die Deletion einer Aminosäure innerhalb der Aminosäuresequenz von Sap3 auf. Die zusätzliche Aminosäure 212 in Sap2 (Aminosäure-Nummerierung auf Basis der Aminosäuresequenz von Sap2) resultiert in einem kleinen Extra-*loop* innerhalb des analogen  $\beta$ -Strangs s17 in Sap1, 3 und 5, wobei sich die Sekundärstruktur insgesamt nicht verändert. Die Insertion einer Aminosäure nach Aminosäure 135 in Sap5 erweitert zwar die Gesamtlänge des *loops* in diesem Bereich, verursacht aber keine Veränderung der Gesamtstruktur.

Bei genauer Betrachtung der in **Abb. 20** dargestellten Überlagerung der Strukturen der Sap-Isoenzyme beobachtet man die am höchsten konservierten Bereiche der Proteinfaltung im mittleren sowie im hinteren Teil der Proteinstrukturen. Strukturelle Unterschiede sind vor allem im Bereich der Eingangs-*loops* und des *active site flap* zu finden. So verkleinert beispielsweise die Deletion einer Aminosäure im N-terminalen Eingangs-*loop* (N-ent *loop*) von Sap3 diesen signifikant und führt somit zu einem weniger restriktiven Eingang zum aktiven Zentrum von Sap3. Diese Deletion wäre im Aminosäuresequenzvergleich gemäß Stewart et al. [167] an Position 51 der Sap3-Sequenz zu finden, während an Position 52 ein Glutamat (Glu52Sap3) beschrieben ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein struktureller Aminosäuresequenzvergleich mit Hilfe des Programms ClustalW [176] neu durchgeführt. Wie in **Abb. 22** zu erkennen, verschiebt sich die Deletion in Sap3 auf Platz 52 und dem Glutamat Glu52Sap3 wird die Position 51 zugeordnet. Vergleicht man die Lage der betroffenen Aminosäuren nach Überlagerung der Sap-Strukturen, so zeigt das Glu52Sap3 in der Struktur von Sap3 in gleicher Weise in die Kluft des aktiven Zentrums wie die Seitenketten der Aminosäuren Tyr51Sap2, Arg51Sap1 und Trp51Sap5. Glu52Sap3 ist somit eher zu den Aminosäuren an Position 51 äquivalent. Deshalb erscheint der Aminosäuresequenzvergleich dieser Arbeit im Vergleich zu dem von Stewart et al. diskutierten richtiger.

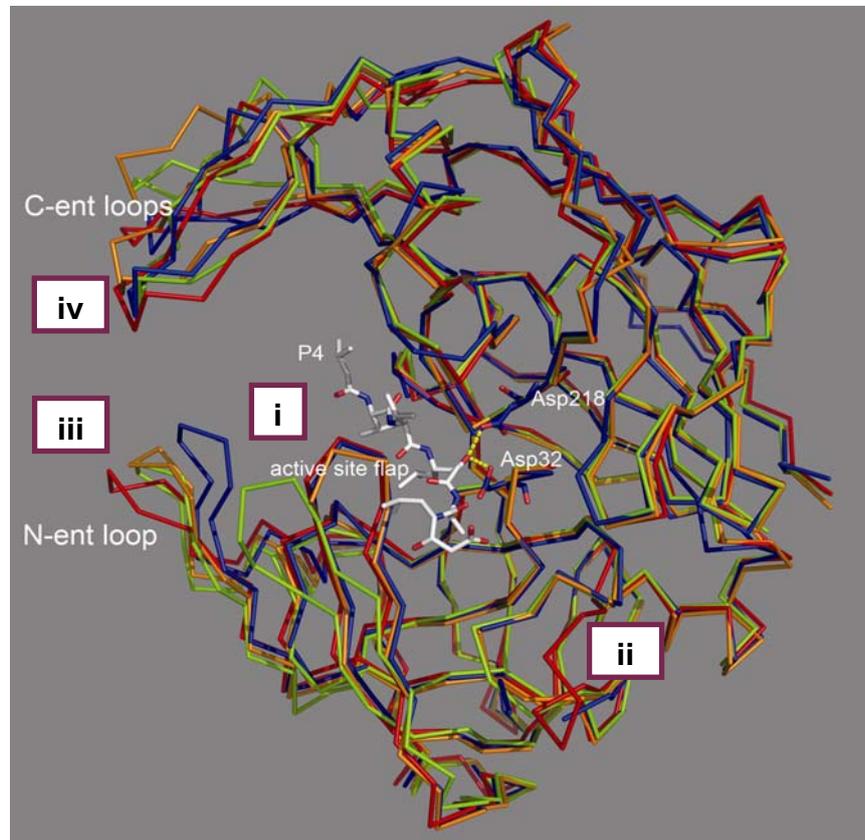


**Abbildung 22:** Aminosäuresequenzvergleich von Sap1-3 und Sap5 mit typischen humanen und fungalen Aspartatproteinasen (Pepsin/Renin respektive Penicillopepsin). Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms ClustalW durchgeführt. Die Nummerierung der Aminosäuresequenz basiert auf der Aminosäure-Nummerierung von Sap2.

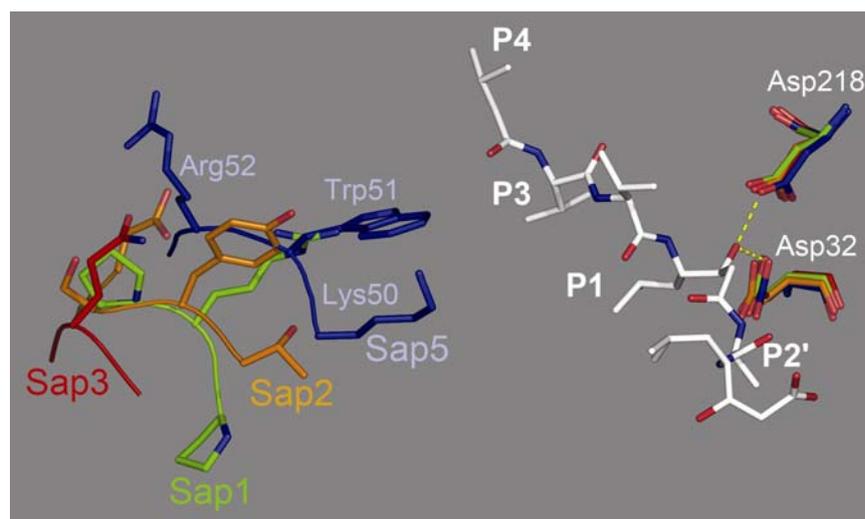
### 3.2.2 Signifikante Unterschiede der Strukturen von Sap1-3 und Sap5

Strukturell unterscheiden sich die Sap-Isoenzyme vor allem in vier Bereichen: i) in der Lage des *active site flap*, ii) in der *loop*-Konformation der Aminosäuren 129 bis 135, iii) im Bereich des N-ent *loops* und iv) im Bereich der C-ent *loops* (**Abb. 23**).

(a)



(b)



Farbcodierung: grün Sap1, orange Sap2 (1ZAP; [1]), rot Sap3, blau Sap5

**Abbildung 23:** Überlagerung von Sap1-3 und Sap5. (a) Signifikante Unterschiede der überlagerten Strukturmodelle von Sap1-3 sowie Sap5. Pepstatin A beispielhaft an Sap5 gebunden ist in weiß dargestellt. (b) Nahansicht des Bereichs des N-ent *loop*. Der *loop* von Sap5 ist wesentlich voluminöser aufgebaut und zeigt weiter in das aktive Zentrum des Enzyms hinein als die entsprechenden *loops* bei Sap1-3.

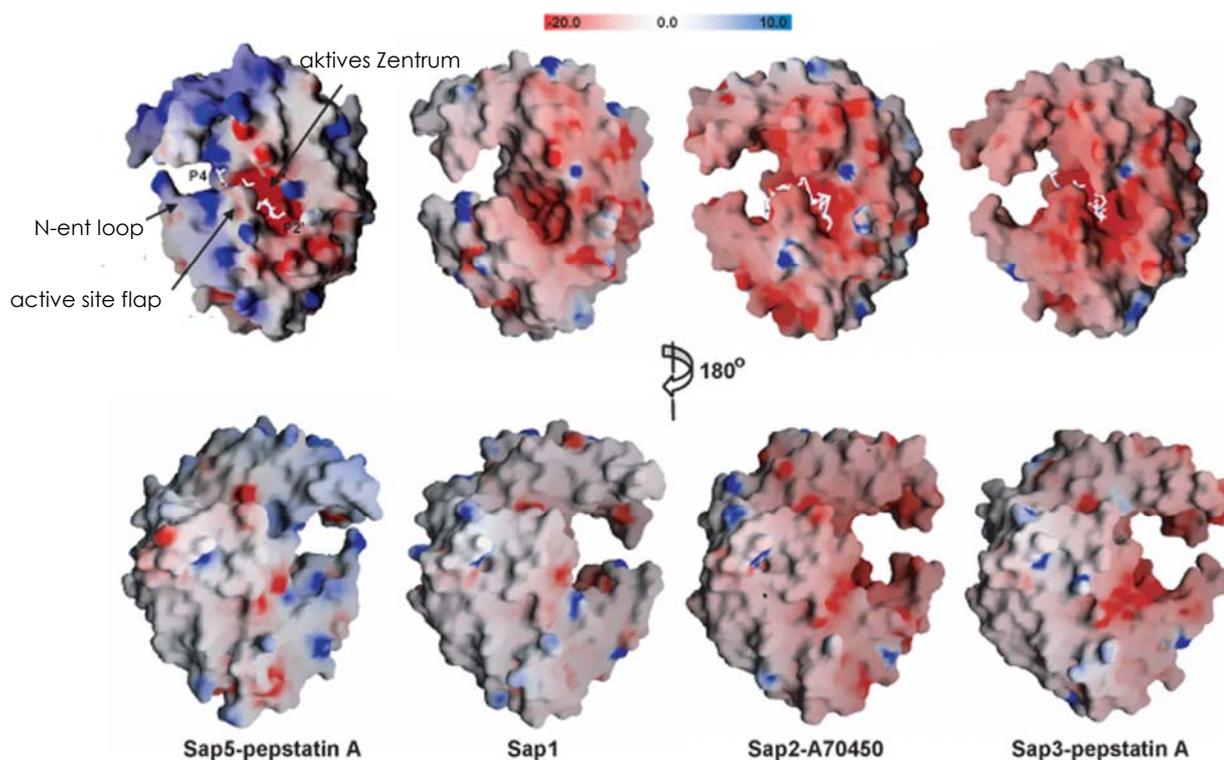
Wie bereits erwähnt, spielt die Konformation des *active site flap* bei der Substrat- und Inhibitorbindung der Saps eine große Rolle. Strukturelle Veränderungen infolge der Anlagerung eines Inhibitors an die Enzyme sollen in Kapitel 3.2.4 näher betrachtet werden. Besonders sticht bei Sap3 im Vergleich zu den Strukturen der anderen Sap-Isoenzyme die Konformationsänderung des *loops* der Aminosäuren 129 bis 135 von Sap3 hervor (**Abb. 23; ii**). Diese *loop*-Änderung ist Folge eines Aminosäureaustauschs an den Positionen 131 und 134. Anstelle von Asn131Sap1, Asn131Sap2 oder Gly131Sap5 ist bei Sap3 das His131Sap3 und anstatt Ala134Sap1, Gly134Sap2 oder Thr134Sap5 ist das Glu134Sap3 positioniert. Die stark polaren und langen Seitenketten sowohl des Histidins als auch des Glutamats in Sap3 bevorzugen Bindungen mit polaren Lösungsmittelmolekülen, was vermutlich zu der Auswärtsdrehung des *loops* führt. Die neue Konformation wird durch die Bildung einer Salzbrücke zwischen Lys129Sap3 und Asp37Sap3 stabilisiert. His131Sap3, dessen Seitenkette von der Oberfläche des Proteins zur Lösungsmittel exponierten Seite gedreht liegt, nimmt an der Bindung eines Zinkmoleküls teil. Dies trägt vermutlich zusätzlich zur Konformationsänderung des *loops* in der Sap3-Struktur bei. Bei den Strukturen von Sap1, 2 und 5 liegt der analoge *loop* zum aktiven Zentrum der Isoenzyme hin ausgerichtet vor.

Die größte konformelle Varianz lässt sich sicherlich innerhalb der Eingangs-*loops* (N-ent und C-ent *loops*) der jeweiligen Strukturen finden. Schlecht definierte Elektronendichte sowie hohe B-Faktoren speziell im Gebiet der Eingangs-*loops* sind ein Indiz für ihre hohe Flexibilität. Während die C-ent *loops* weiter entfernt vom aktiven Zentrum der Enzyme liegen, bietet der N-ent *loop* jeweils die Möglichkeit einer neuen potentiellen Bindungsstelle für das aktive Zentrum und den Substratbindungsbereich. Der große N-ent *loop* gilt als charakteristisch für die Familie der Sap-Isoenzyme. Er wurde von Stewart et al. [166] sogar als zweiter *active site flap* der Saps bezeichnet. Die Struktur von Sap5 weist im Vergleich zu den anderen Strukturen den engsten Eintritt zur Kluft des aktiven Zentrums auf. Verantwortung dafür trägt der N-ent *loop* von Sap5, der am stärksten in die Substratbindungshöhle ragt und dadurch die Möglichkeit eines Zutritts von Substrat- und/oder Inhibitormolekülen erheblich verringert; ein Effekt, der durch die Anwesenheit hochvoluminöser Aminosäureseitenketten von Lys50Sap5, Trp51Sap5 und Arg52Sap5 noch verstärkt wird (**Abb. 23 b**). Die positive Ladung dieser Aminosäuren verleiht dem *loop* zusätzlich einen stark positiven Charakter. Die Konformation des N-ent *loop* wird in der Struktur von Sap5 durch ein weites Netzwerk hydrogener Wechselwirkungen stabilisiert. Trp51Sap5 interagiert dabei mit Arg120Sap5 (Kation- $\pi$  Interaktion), das Lys50Sap5 steht in Kontakt mit Asp86Sap5 und Ser88Sap5 (Wasserstoffbrückenbindung bzw. hydrophobe Wechselwirkung der Seitenketten). Der N-ent *loop* von Sap3 stellt dem Eintritt von Substratmolekülen in das aktive Zentrum das geringste Hindernis entgegen, wobei

Aminosäuren mit kleinen Seitenketten wie Ala49Sap3, Gly50Sap3 sowie Gly53Sap3 ebenso dazu beitragen wie die Deletion einer Aminosäure an Position 52.

Werden die Sap-Isoenzyme nicht anhand ihrer Struktur analysiert sondern bezüglich ihrer Oberflächenladung untersucht, so zeigt sich hier ein deutlicher Unterschied im Gegensatz zur strukturellen Übereinstimmung.

Wie in **Abb. 24** zu erkennen, spaltet sich Sap5 aufgrund seiner Oberflächenladung ganz eindeutig von Sap1-3 ab. Während das aktive Zentrum bei allen Isoenzymen eine stark negative Ladung aufweist, ist die Struktur von Sap5 außerhalb des aktiven Zentrums vorwiegend positiv geladen im Gegensatz zu den negativ geladenen Strukturen von Sap1-3. Interessanterweise akkumulieren die negativen bzw. positiven Oberflächenladungen auf einer Seite der jeweiligen Proteine, was eine Aufteilung der Strukturoberflächen in eine eher hydrophile (geladene) und eine eher hydrophobe (ungeladene) Seite zur Folge hat.



**Abbildung 24:** Molekulare Oberflächen von Sap5 und Sap1-3, die gemäß dem berechneten lokalen elektrostatischen Potential eingefärbt sind (rot: negativ, blau: positiv). Das aktive Zentrum ist in allen Isoenzymen stark negativ geladen. Sap5 weist in seiner restlichen Oberfläche eine vorwiegend positive Ladung auf, Sap1-3 hingegen sind in erster Linie negativ geladen. Die Oberflächen aller vier Proteine teilen sich in eine eher hydrophile (geladene) und eine hydrophobe (ungeladene) Seite.

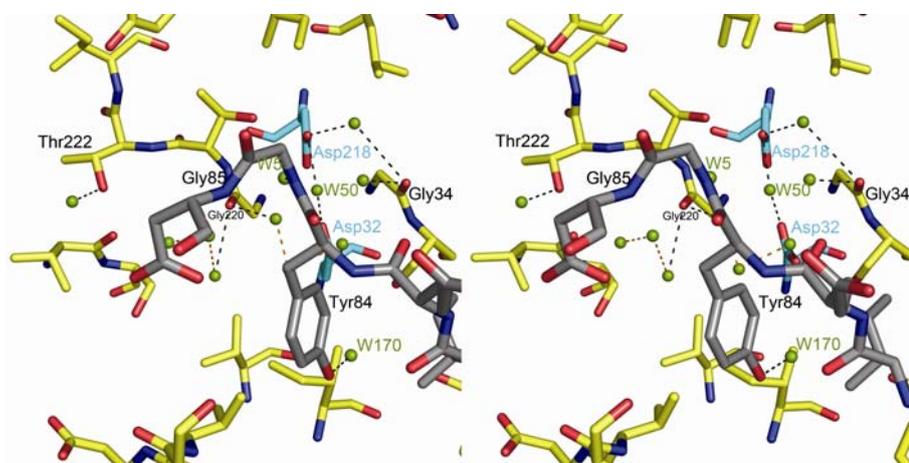
### 3.2.3 Das aktive Zentrum und der Substratbindungsbereich

Tief im Inneren der Proteinstruktur liegen die katalytischen Aspartate Asp32 und Asp218, die gemeinsam mit ihren benachbarten Aminosäuren das aktive Zentrum bilden. Ein Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen zu den umliegenden Aminosäuren (Gly34, Gly220) sorgt

für eine relativ rigide Struktur im Bereich des aktiven Zentrums. Während Asp32 der N-terminalen Domäne angehört, stammt das Asp218 aus dem C-terminalen Teil des jeweiligen Enzyms. Beide Aminosäuren sind so zueinander positioniert, daß sie während des katalytischen Prozesses optimal interagieren können.

In Standardorientierung ordnen sich sechs bzw. sieben Substratbindungstaschen, der Reihe nach als S4 bis S2' bezeichnet (Nomenklatur nach Schechter und Berger<sup>1</sup>), von links oben nach rechts unten an. Diese bieten Raum für Peptide einer Größe von etwa sieben bis neun Aminosäureeinheiten. Lassen sich relativ große Bindungstaschen (S4, S3, S2') am Rand der Proteine finden, so positionieren sich die kleineren Taschen mehr im Inneren der Substratbindungskluft. Die N-terminale Vorderseite der Kluft, die das aktive Zentrum beherbergt, wird durch den *active site flap* überdeckt, der damit zusätzliche Aminosäuren zur Substratbindung zur Verfügung stellen kann.

Im Falle der Apoenzyme Sap1 und Sap3, die an keinen Inhibitor gebunden haben, lagern sich Wassermoleküle, vor allem im Bereich der katalytischen Aspartate Asp32 und Asp218, an die Aminosäuren der aktiven Zentren an (**Abb. 25**). Wie in **Abb. 25** am Beispiel des Sap3 Apoenzym dargestellt, bildet ein Wassermolekül (W50) eine hydrogene Bindung äquivalenter Länge (1,45 Å) mit beiden katalytischen Aminosäuren.



**Abbildung 25:** Stereo Plot des mit Wassermolekülen gefüllten Substratbindungsbereichs des Sap3 Apoenzym. Grüne Bälle stellen Wassermoleküle dar. Die katalytischen Aspartate sind in cyan gezeichnet, während weitere Aminosäuren des katalytischen Zentrums gelb eingefärbt wurden. Gestrichelte Linien in schwarz repräsentieren intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäuren und Wassermolekülen, in orange weisen sie auf intramolekulare Bindungen nur zwischen Wassermolekülen hin. Graue Aminosäuren gehören zum *active site flap*. W50 bindet als katalytisches Wasser sowohl an Asp32 als auch an Asp218. Nur zwei Wassermoleküle, W5 und W10, bilden eine Verbindung zu Aminosäuren des *active site flap*, nämlich Gly85 und Tyr84.

<sup>1</sup> In dem 1967 von Schechter & Berger vorgeschlagenen Modell binden die Aminosäurereste des Polypeptid-Substrats an sogenannte *subsites* im aktiven Zentrum der Protease. Diese *subsites* werden entsprechend mit S bezeichnet, die Aminosäurereste des Substrats mit P (*peptide*). Die Reste auf der N-terminalen Seite der Schnittstelle werden mit P1, P2, P3 (*non-primed site*), die auf der C-terminalen Seite mit P1', P2', P3' bis P8' (*primed site*) bezeichnet.

Essentieller Bestandteil des katalytischen Zentrums pepsinartiger Enzyme sind nicht nur die zwei katalytischen Aspartat-Aminosäuren, sondern auch ein Wassermolekül (W50), das - wie in **Abb. 25** zu erkennen – an beide Aspartate bindet und während des Substratbindungsprozesses deprotoniert wird, um den Katalyseprozess initiieren zu können [8, 9].

Weitere Wassermoleküle binden im aktiven Zentrum an Gly34 (O), Gly220 (O) und Thr222 (OG1). Interessanterweise lagern sich nur wenige Wassermoleküle an Aminosäuren des *active site flap* an; nur Tyr85 (OH) und Gly85 (N) – Aminosäuren, die wichtige Bindungspartner für Inhibitoren oder Substrate darstellen – bilden eine Wasserstoffbrückenbindung zu Wassermolekülen aus.

**Tab. 6** zeigt eine vergleichende Aufstellung derjenigen Aminosäuren von Sap1-3 und Sap5, die den jeweiligen Substratbindungsbereich bilden. Sap1-3 und Sap5 weisen insgesamt eine Sequenzidentität von 52% auf (**Abb. 22, Tab. 6**). Bezieht man in den Sequenzvergleich jedoch nur die Aminosäuresequenzen der Isoenzyme Sap1-3 mit ein, so erhöht sich die Sequenzidentität auf einen Wert von bis zu 68%.

Auf Basis der unterschiedlichen Charaktere sowie Form und Größe der einzelnen Substratbindungstaschen, lassen sich die Strukturen von Sap1-3 und Sap5 in zwei Gruppen unterteilen. Wieder separiert sich Sap5 aufgrund der divergierenden Eigenschaften seiner Substratbindungstaschen von den Enzymen Sap1-3. Im Folgenden sollen Unterschiede und Gemeinsamkeiten der einzelnen Substratbindungstaschen – bei S4 beginnend – der Reihe nach beschrieben werden. Zur visuellen Unterstützung dienen die in **Abb. 26** im Detail dargestellten überlagerten Bindungstaschen der Strukturen Sap1, Sap2, Sap3 und Sap5.

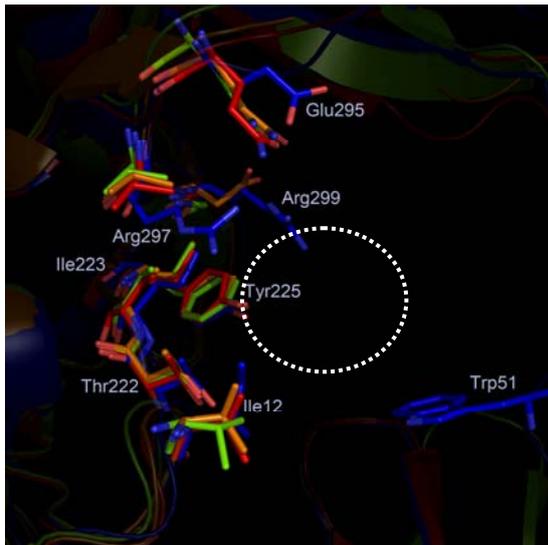
Die Substratbindungstasche S4 ist in der Standardorientierung jeweils im linken oberen Bereich der Proteinstrukturen lokalisiert. Sie erscheint bei Sap1-3 recht geräumig, wobei sich bei Sap3 ihre Größe wegen des Austauschs von Gly299<sub>Sap1/2</sub> durch Asp299<sub>Sap3</sub> etwas reduziert. Bei Sap5 hingegen wird S4 durch den Ersatz von Val12<sub>Sap1/2/3</sub> mit Ile12<sub>Sap5</sub> und - viel wichtiger noch – durch die Substitution von Leu297<sub>Sap1/2/3</sub> durch Arg297<sub>Sap5</sub> sowie Gly299<sub>Sap1/3</sub> und Asp299<sub>Sap2</sub> durch Arg299<sub>Sap5</sub> dramatisch verändert (**Abb. 26**). Die Seitenketten der Arginine an Position 297 und 299 ragen dabei direkt in die S4 Bindungstasche von Sap5 hinein. Sie verringern damit nicht nur signifikant deren Größe, sondern verleihen der S4 Tasche zusätzlich einen polaren Charakter positiver Ladung, der durch den Austausch von Gln295<sub>Sap1/2/3</sub> gegen ein Glutamat (Glu295<sub>Sap5</sub>) noch leicht gesteigert wird. Neben polaren Interaktionen ermöglichen die langen hydrophoben Seitenketten der Arginine und des Glutamats auch hydrophobe van der Waals-Bindungen innerhalb der Sap5-S4 Tasche. Die voluminöse Seitenkette des Trp51<sub>Sap5</sub>, eine Aminosäure des relativ tief in die Substratbindungshöhle reichenden N-ent *loop* von Sap5, trägt ebenfalls zur S4 Tasche bei und erweitert damit dessen Substratbindungsbereich.

| Substrat-<br>bindungstaschen | Aminosäure | Sap1 | Sap2               | Sap3               | Sap5  |
|------------------------------|------------|------|--------------------|--------------------|---|
| <b>S4</b>                    | 12         | Val  | Val*               | Val*               | Ile*  |
|                              | 222        | Thr  | Thr*               | Thr*               | Thr*  |
|                              | 223        | Ile  | Ile                | Ile                | Ile*  |
|                              | 225        | Tyr  | Tyr                | Tyr                | Tyr   |
|                              | 295        | Gln  | Gln                | Gln                | Glu   |
|                              | 297        | Leu  | Leu                | Leu                | Arg   |
|                              | 299        | Gly  | Gly                | Asp                | Gly   |
|                              |            |      |                    |                    | 51 Trp  |
| <b>S3</b>                    | 12         | Val  | Val*               | Val                | Ile*  |
|                              | 13         | Ser  | Thr                | Ser                | Thr   |
|                              | 86         | Asp  | Asp                | Asp                | Asp   |
|                              | 88         | Ser  | Ser                | Thr                | Ser   |
|                              | 118        | Ser  | Ser                | Ser                | Ser   |
|                              | 120        | Pro  | Asp                | Asp                | Arg   |
|                              | 220        | Gly  | Gly*               | Gly                | Gly*  |
|                              |            |      |                    |                    | 50 Lys<br>51 Trp                                  |
| <b>S2</b>                    | 85         | Gly  | Gly*               | Gly*               | Gly*  |
|                              | 86         | Asp  | Asp*               | Asp*               | Asp*  |
|                              | 221        | Thr  | Thr*               | Thr                | Thr   |
|                              | 225        | Tyr  | Tyr*               | Tyr*               | Tyr*  |
|                              | 301        | Ser  | Asn                | Ser                | Ser   |
|                              | 303        | Ala  | Ala                | Tyr                | Asp   |
|                              | 305        | Ile  | Ile                | Ile*               | Ile   |
| <b>S1</b>                    | 30         | Ile  | Ile*               | Val*               | Ile (4.10A)                                       |
|                              | 84         | Tyr  | Tyr*               | Tyr*               | Tyr*  |
|                              | 86         | Asp  | Asp                | Asp                | Asp   |
|                              | 88         | Ser  | Ser                | Thr                | Ser   |
|                              | 119        | Ile  | Ile                | Val                | Ala   |
|                              | 123*       | Ile  | Ile*               | Ile*               | Ile*  |
| <b>S1'</b>                   | 34         | Gly  | Gly*               | Gly*               | Gly*  |
|                              | 193        | Glu  | Glu                | Glu                | Lys   |
|                              | 195        | Arg  | Arg                | Arg                | Thr   |
|                              | 216        | Leu  | Leu                | Leu                | Leu   |
|                              | 303        | Ala  | Ala                | Tyr                | Asp   |
|                              | 305        | Ile  | Ile                | Ile*               | Ile (>4A)   |
| <b>S2'</b>                   | 35         | Ser  | Ser*               | Ser*               | Ser*  |
|                              | 37         | Asp  | Asp                | Asp                | Asp   |
|                              | 82         | Ile  | Ile*               | Ile                | Ile   |
|                              | 83         | Gly  | Gly*               | Glu*               | Lys*  |
|                              | 84         | Tyr  | Tyr                | Tyr                | Tyr   |
|                              |            |      | 131 Asn<br>133 Ala | 131 Asn<br>133 Ala | 129 Lys<br>132 Glu<br>80 Phe<br>94 Trp<br>137 Tyr |
| <b>S3'</b>                   |            |      |                    | 303 Tyr            | 303 Asp<br>83 Lys*                                |

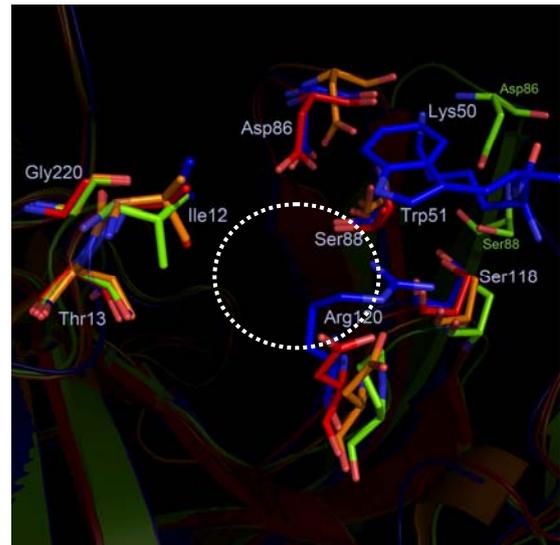
\* an der Bindung von Pepstatin A beteiligte Aminosäuren

Farbcodierung: grün: polare Aminosäuren, rot: saure Aminosäuren, blau: basische Aminosäuren

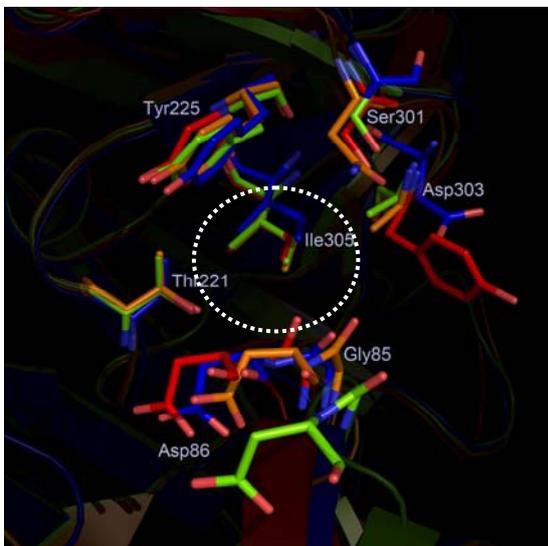
**Tabelle 6:** Aufstellung der Aminosäuren von Sap1-3 und Sap5, die die Substratbindungstaschen bilden (Sap2: (1ZAP; [1])).



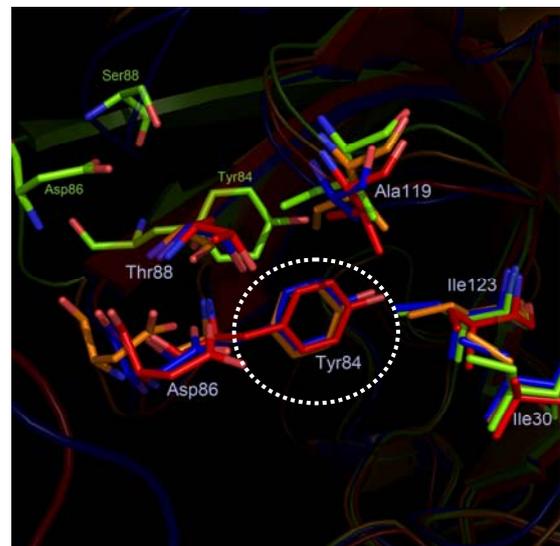
S4



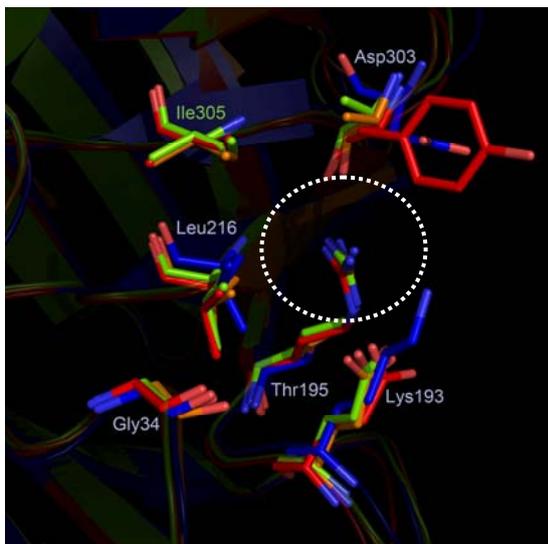
S3



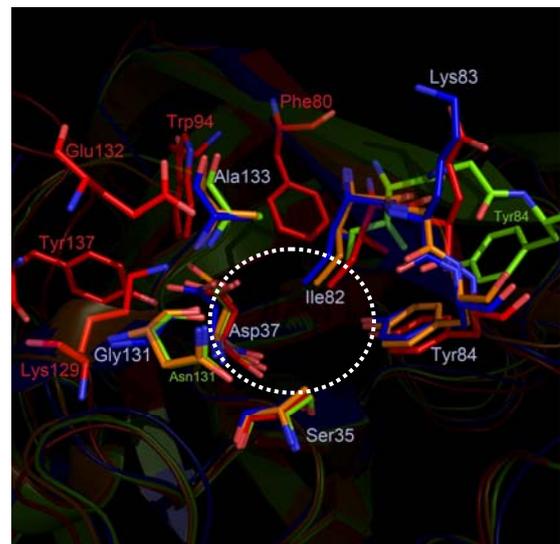
S2



S1



S1'



S2'

**Abbildung 26:** Darstellung der Substratbindungstaschen S4 bis S2'. Überlagerung von Sap1-3 und Sap5. Farbcodierung: grün Sap1, orange Sap2 (1ZAP; [1]), rot Sap3, blau Sap5. Die gestrichelte weiße Linie deutet jeweils die Lage der Substratbindungstaschen an.

Die Enzyme der Sap-Familie besitzen im Vergleich zu den bekannten humanen und fungalen Aspartatproteinasen eine besonders große S3 Substratbindungstasche. Die Größe der Tasche wird in der Struktur von Sap5 durch die Substitution von Asp120Sap2/3 oder Pro120Sap1 durch Arg120Sap5 wiederum verringert. Der polare Gesamtcharakter dieser Tasche bei Sap1-3 bleibt bei Sap5 zwar erhalten, erlangt durch das Arginin jedoch einen eher positiven Gesamtcharakter im Vergleich zu Sap1-3. Ebenso wie bei S4 tragen Aminosäuren des N-ent *loops* von Sap5 - Lys50Sap5 und Trp51Sap5 – zur S3 Bindungstasche bei.

Differenzen zwischen den Substratbindungstaschen des Innenraums von Sap1-3 und Sap5 fallen geringer aus als bei den Taschen des äußeren Bereichs. Anstatt Ala120Sap1/2 ist in der S2 Tasche von Sap3 ein Tyrosin (Tyr303Sap3) sowie bei Sap5 ein Aspartat (Asp303Sap5) zu finden. An Position 301 zeigt die Struktur von Sap2 ein Asparagin (Asn301Sap2) anstelle des Serins (Ser301Sap1/2/5) in Sap1, Sap2 und Sap5. Trotz unterschiedlicher Aminosäuren bleibt der polare Charakter der S2 Bindungstasche bei allen vier Sap-Isoenzymen erhalten. Stewart et al. propagierte aufgrund von Molecular Modelling Studien an Sap1 bis Sap6 [167], daß der Ersatz von Alanin an Position 303 (Sap1/2) durch Tyrosin (Sap3) bzw. Asparaginsäure (Sap5) den Zutritt zu den Substratbindungstaschen S2 und/oder S1' limitieren würde. Die Kristallstrukturen von Sap3 und Sap5 zeigen jedoch deutlich, daß die Seitenketten von Tyr303Sap3 und Asp303Sap5 von der S2 Tasche wegzeigen, anstatt in sie hineinzuragen. Beide Aminosäuren tragen damit eher zur Bildung einer neuen Substratbindungstasche S3' bei.

Die Anwesenheit von Aminosäuren mit kleineren Seitenketten wie die Valine Val30Sap3 und Val119Sap3 und das Alanin Ala119Sap5 im Vergleich zu den Isoleucinen Ile30Sap1/2/5 und Ile119Sap1/2/5 sowie des Isoleucins Ile119Sap1/2 und des Valins Val119Sap3, vergrößern die S1 Substratbindungstasche von Sap3 bzw. Sap5 nur in geringem Maße.

Die S1' Substratbindungstaschen der Isoenzyme Sap1-3 weist eine hohe Konservierung innerhalb ihrer Aminosäuresequenz auf. Bei Sap5 hingegen verursacht der Austausch von Arg195Sap1/2/3 und des benachbarten GluSap1/2/3 mit Thr195Sap5 bzw. Lys193Sap5 die Bildung eines schmalen trichterartigen Tunnels.

Infolge der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Drehung des *loops* (Aminosäuren 129 bis 135) zur lösungsmittlexponierten Oberfläche des Sap3-Proteins, erfährt die S2' Substratbindungstasche von Sap3 wohl die drastischste Veränderung ihrer Form und Größe. Nur die Aminosäuren von Sap1 und Sap2 der S2' Tasche sind identisch. Substitution von Gly131Sap5 durch Asn131Sap1/2 maximiert die Größe dieser Bindungstasche in der Struktur von Sap5 signifikant, der polare Charakter bleibt dennoch erhalten. Die Aminosäuren der Positionen 131 und 133 der Struktur von Sap3 zeigen nach außen im Gegensatz zu den analogen Aminosäuren von Sap1, Sap2 und Sap5, wo diese Teil der S2'

Substratbindungstasche sind. An deren Stelle treten in Sap3 das Lysin Lys129Sap3 und des Glutamats Glu132Sap3, die durch ihre positive bzw. negative Ladung den eher neutralen Charakter der S2' Tasche von Sap1, Sap2 und Sap5 bei Sap3 in einen eher polaren Gesamtcharakter umwandeln. Beachtenswert bleibt, daß sich die S2' Bindungstasche in Folge der *loop*-Verlagerung nicht nur erweitert, sondern dass die Drehung des *loops* sogar einen Zutritt zu den tiefer im Inneren des Proteins liegenden aromatischen Aminosäuren Phe80Sap3, Trp94Sap3 und Tyr137Sap3 ermöglicht. So formt sich aus der Höhle der S2'-Tasche von Sap1, Sap2 und Sap5 bei Sap3 ein Tunnel mit polarem Eingang und aromatischem Ende. Interessanterweise liegt der Veränderung von S2' keine Substitution derjenigen Aminosäuren zugrunde, die die S2' Substratbindungstasche bilden, sondern sie resultiert aus der Alteration benachbarter Aminosäuren.

Innerhalb der Untergruppe der Sap-Isoenzyme Sap1-3 besitzen die Bindungstaschen S4 bis S1 nur hydrophobe und saure Aminosäuren, während sich die einzigen basischen Aminosäuren (Arg195Sap1/2/3 und Lys129Sap3) nur in Bindungstaschen des „*primed*“ Bereichs, d.h. des in Standardorientierung rechts vom aktiven Zentrum liegenden Bereichs befinden.

### 3.2.4 Enzyymbindung von Inhibitoren – die besondere Rolle des *active site flap*

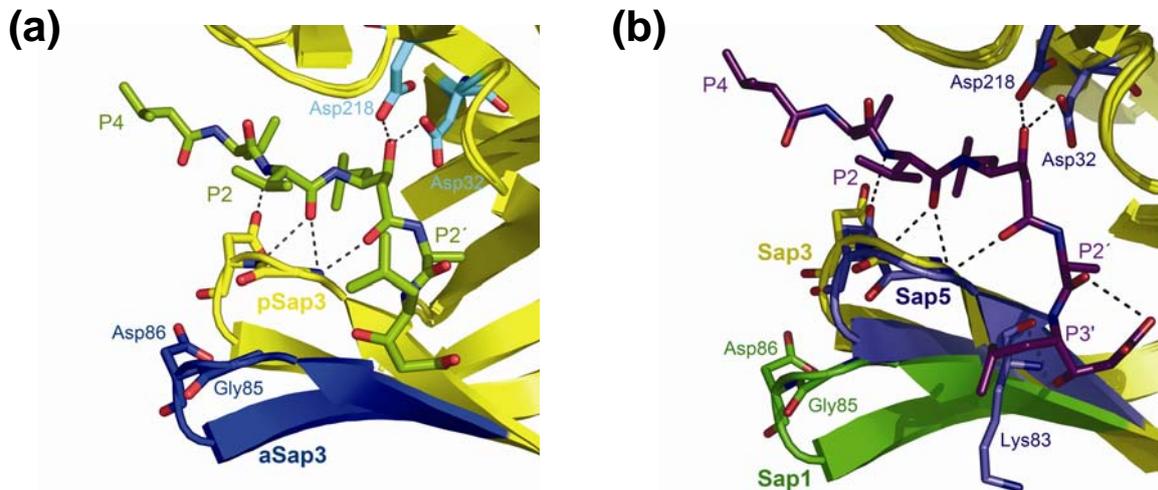
Um eine potentielle konformelle Änderung der Sap-Isoenzyme nach Bindung eines Inhibitors untersuchen zu können, wurde die Struktur von Sap3 sowohl im ungebundenen (aSap3) als auch im an Pepstatin A gebundenen Zustand (pSap3) gelöst.

Tatsächlich zeigt die Überlagerung beider Strukturen (rms-Abweichung aller C $\alpha$ -Atome: 0,70 Å) eine Konformationsänderung des *active site flap* (Aminosäuren 81 bis 91) nach Bindung von Pepstatin A. Der *active site flap* legt sich nach einer Bewegung von bis zu 5,9 Å über den Inhibitor und verengt damit signifikant den Bereich des aktiven Zentrums (**Abb. 27**). Die neue Konformation kann als „geschlossene“ Form des Enzyms bezeichnet werden. Infolge der Bewegung des *active site flap* wird dessen Aminosäuren ermöglicht, sowohl Wasserstoffbrückenbindungen als auch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem gebundenen Inhibitor einzugehen.

Eine konformelle Änderung des *active site flap* nach Bindung eines Inhibitors wurde zwar schon in anderen Aspartatproteinasen beobachtet [19, 68, 90]. Dennoch erscheint die Bewegung des *flap* in Sap3 mit bis zu 5,9 Å im Vergleich zu 1,45 Å bis 2,2 Å bei anderen Enzymen als besonders weit.

Nach Inhibitorbindung in Pepsin und Penicillopepsin wurde zusätzlich eine Gesamtbewegung der C-terminalen Domäne beobachtet [68]. Eine Überlagerung der Strukturen von Sap3 hingegen weist auf eine geringfügig stärkere Bewegung der N-

terminalen Domäne und nicht der C-terminalen Domäne hin. Dies indizieren rms Abweichungen äquivalenter C $\alpha$ -Atome von 0,39 Å (N-terminale Aminosäuren 14 bis 80 und Aminosäuren 92 bis 152) und 0,26 Å (C-terminale Aminosäuren 193 bis 310).



**Abbildung 27:** Bewegung des *active site flap* nach Inhibitorbindung. (a) Überlagerung von aSap3 und pSap3. Der *active site flap* von aSap3 (blau) belässt das aktive Zentrum in geöffnetem Zustand, während der *flap* in pSap3 (gelb) die Kluft des aktiven Zentrums stark überdeckt. Die Bewegung des *active site flap* verengt den Bereich des aktiven Zentrums signifikant und ermöglicht zusätzliche polare Kontakte zwischen Gly85 und Asp86 und Pepstatin A (schwarze gestrichelte Linien). (b) Überlagerung von Sap1-Apoenzym (grün), pSap3 (gelb) und Sap5-Pepsatin A-Komplex (hellblau). Sap5 gebunden an Pepstatin A (violett) zeigt ebenso wie pSap3 die geschlossene Form. Das ungehinderte Molekül von Sap1 liegt dagegen in geöffneter Form vor. Die Isoleucin-Seitenkette des Pepstatin A positioniert sich an P3' in der Weise, daß es mit Lys83Sap5 über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren kann.

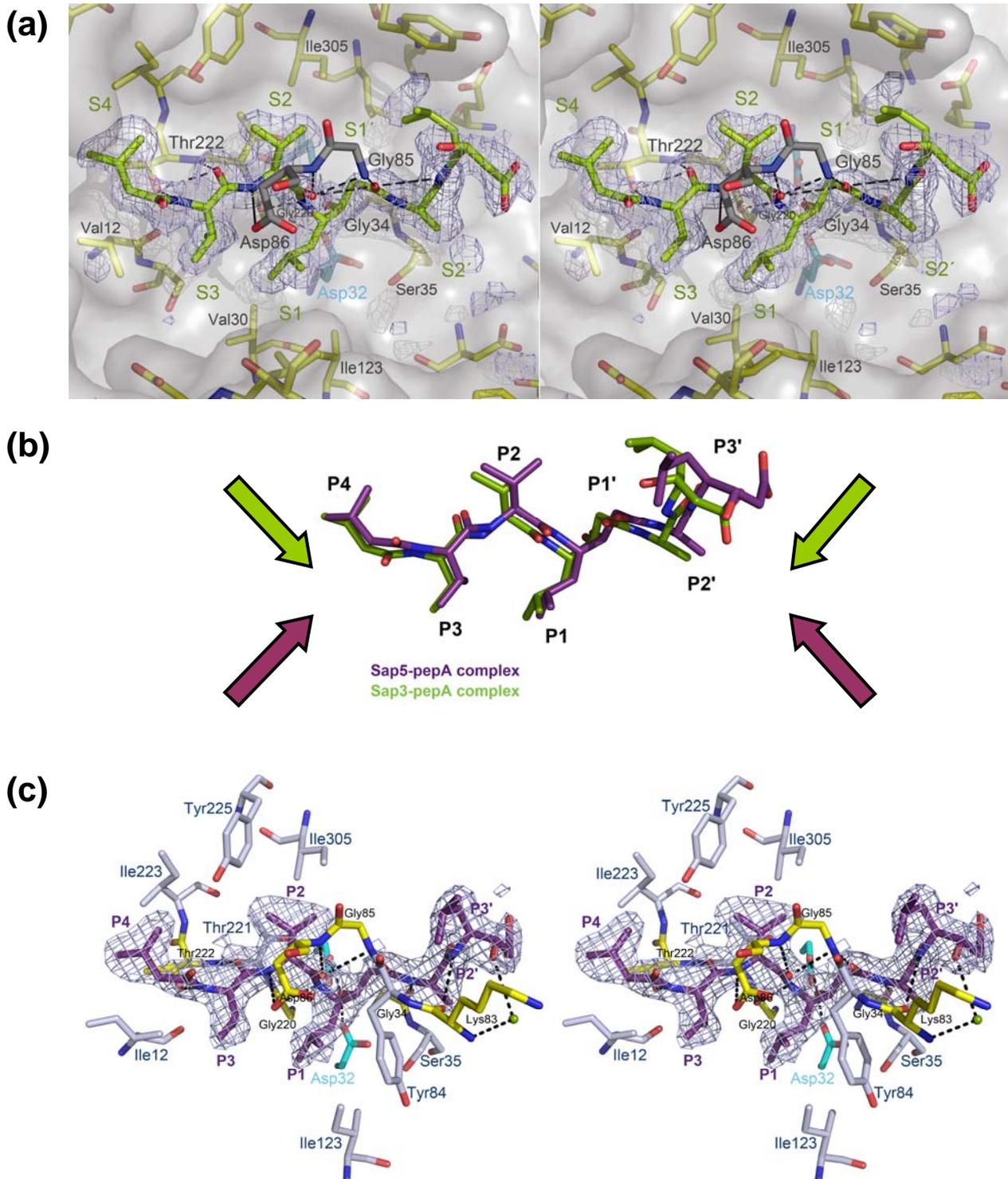
Sap1 wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als Struktur ohne Inhibitor gelöst. Obwohl in keinem der beiden Moleküle der asymmetrischen Einheit ein Inhibitor gebunden hatte, liegt bemerkenswerterweise das eine Molekül in der geschlossenen, das andere Molekül in der offenen Form vor. Der *active site flap* von Sap1 wird vermutlich bei einem der Moleküle in die geschlossene Position gezwungen, da dessen Aminosäuren die Hauptkontaktpartner für Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den zwei Molekülen der asymmetrischen Einheit darstellen. Die geschlossene Form wird deshalb vermutlich auf ein kristallographisches Artefakt zurückzuführen sein. Trotzdem ist die unterschiedliche Lage des *active site flap* ein Indiz für dessen hohe Flexibilität, da die Lage des *active site flap* in starker Abhängigkeit von Bindungskontakten zu seinen jeweiligen Bindungspartnern zu stehen scheint. Im Falle der Bindung eines Inhibitors an das Enzym positioniert sich der *active site flap* in derjenigen Stellung, die eine ideale Interaktion zwischen Inhibitor- und Proteinmolekül ermöglicht.

### 3.2.5 Der Sap-Pepstatin A-Komplex – ein wiederkehrendes Bindungsschema

Sowohl Sap3 als auch Sap5 liegen im Strukturmodell als Komplex mit Pepstatin A vor. Während der Verfeinerung beider Strukturen lies sich das Pepstatin A, der klassische Inhibitor von Aspartatproteinasen, aufgrund seiner gut definierten Elektronendichte leicht ins aktive Zentrum modellieren (**Abb. 28**). Die Elektronendichte des ungebundenen Endes von Pepstatin A, welches sich in Richtung der Eingangs-*loops* hinstreckt, war in der Sap3-Struktur relativ schwach ausgebildet, was auf eine höhere Flexibilität dieses Endes schließen lässt. *Omit map* Berechnungen während der Verfeinerung des Sap5-Modells halfen, alle Atome des Pepstatin A in die sehr gut definierte Elektronendichte zu bauen (**Abb. 28 c**).

Die Hydroxylgruppe des zentralen Statins des Pepstatin A bildet mit beiden katalytischen Aspartaten Asp32 und Asp218 (**Abb. 27, Abb. 28 a, c**) Wasserstoffbrückenbindungen aus. Pepstatin A ahmt mit dieser Bindung, die auch in anderen von Pepstatin A inhibierten Aspartatproteinasen charakterisiert wurde [10, 11, 68, 91, 169], einen tetrahedralen Übergangszustand während des proteolytischen Prozesses nach. Das Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Inhibitor und Sap-Isoenzymen, wie es in der Struktur von Sap3 und Sap5 zu beobachten ist und in der Struktur von Sap2 bereits beschrieben wurde [35], erscheint hochkonserviert. Aminosäuren Gly34 (O), Gly85 (N), Asp86 (N, OD2), Gly220 (O) und Thr222 (N, OG1) bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus, doch tragen auch viele hydrophobe Wechselwirkungen zur Interaktion zwischen den Saps und Pepstatin A bei. Aminosäure 83 und Aminosäure 221 sind über „long distance“ Wasserstoffbrückenbindungen ( $> 3,5 \text{ \AA}$ ) ebenfalls am Enzym-Inhibitor-Bindungsnetzwerk beteiligt. Da die Bindung der Aminosäuren an Position 83 über das Peptid-Sauerstoffatom der Hauptkette erfolgt, verändert sich das hydrogenne Bindungsschema an dieser Stelle trotz unterschiedlicher Seitenketten der Aminosäure 83 Sap1-3 und Sap5 nicht.

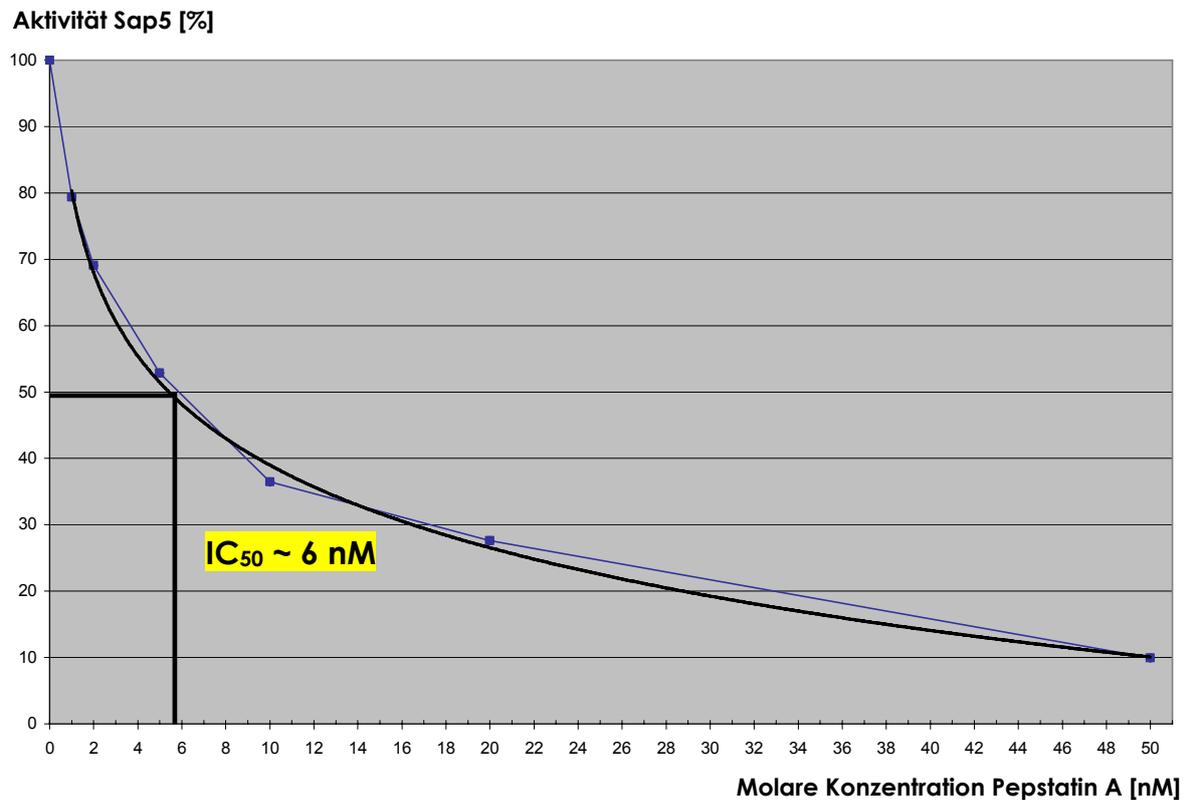
Pepstatin A bindet sowohl an Sap3 als auch an Sap5 in der gleichen offenen Konformation, was anhand der Überlagerung beider Moleküle in **Abb. 28 b** sehr gut demonstriert wird. Im Vergleich zum Pepstatin A der Sap3-Struktur erscheint das „*primed*“ Ende des Inhibitors bei Sap5 gedreht. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist diese Drehung auf eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen der Seitenkette von Lys83Sap5 und der Isoleucin-Seitenkette des Pepstatin A an P3' zurückzuführen (**Abb.27 b**), welche in der Struktur von Sap3 mit der Seitenkette des Glutamats (Glu83Sap3) nicht beobachtet wird. Die zusätzliche Wechselwirkung reduziert vermutlich auch die Flexibilität von P3' des Pepstatin A in Sap5, was wiederum Ausschlag für die besser definierte Elektronendichte in diesem Bereich sein kann.



**Abbildung 28:** Pepstatin A-Bindung an Sap3 und Sap5. (a) Sap3-Pepstatin A-Komplex im Substratbindungsbereich, überlagert mit der  $F_o-F_c$  Elektronendichte von Pepstatin A (blau, konturiert mit  $2.5\sigma$ ). Gestrichelte Linien in schwarz zeigen polare Wechselwirkungen zwischen Pepstatin A (grün) und Aminosäuren des aktiven Zentrums von Sap3 an. Gly85Sap3 und Asp86Sap3 des *active site flap* wurden grau eingefärbt. (b) Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Pepstatin A (lila) und Aminosäuren von Sap5 (gelb). Aminosäuren, die hydrophobe Kontakte mit Pepstatin A ausbilden, sind in magenta gezeigt. Die  $2F_o-F_c$  omit map (blau) wurde mit  $1.0\sigma$  konturiert und mit Hilfe des *simulated annealing* (CNS) berechnet. (c) Überlagerung der Pepstatin A-Moleküle gebunden an Sap3 bzw. Sap5. Die Konformation liegt in beiden Strukturen hochkonserviert vor und unterscheidet sich nur signifikant an der Position P3'.

### 3.2.6 Inhibitorische Aktivität von Pepstatin A gegen Sap5

Der  $IC_{50}$ -Wert gibt die Konzentration eines Inhibitors an, die nötig ist, um ein Enzym in vitro zu 50% zu blockieren. Für Sap5 wird eine Endkonzentration an Pepstatin A von etwa 6 nM benötigt, um eine Inhibition des Enzyms von 50% zu erzielen (**Abb. 29**).



**Abbildung 29:** Diagramm zur Bestimmung der inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von Pepstatin A gegen Sap5. Der  $IC_{50}$ -Wert von Pepstatin A liegt bei etwa 6 nM.

## 4 Diskussion

Die Familie der Saps stellt einen wichtigen Virulenzfaktor während des Infektionsprozesses durch *C. albicans* dar. Therapie oder besser noch Prävention der Candidosen in immunsupprimierten Patienten könnte auf der Entwicklung Sap-spezifisch wirkender Inhibitoren basieren. Die Kenntnis mehrerer Sap-Strukturen schafft ein umfassenderes strukturelles Bild der Sap-Isoenzyme und erleichtert demzufolge strukturbasiertes Inhibitor-Design. Sap2 und das nah verwandte klinische Isolat Sap2X wurden Mitte der 1990er Jahre als die ersten Isoenzyme der Sap-Familie strukturell beschrieben [1, 35]. Die Struktur einer weiteren fungalen sezernierten Aspartatproteinase des Erregers *Candida tropicalis* wurde 1997 von Symersky et al. [172] gelöst.

Die im Rahmen der Dissertation erarbeiteten Strukturmodelle der Sap-Proteine Sap1, Sap3 und Sap5 von *C. albicans* liefern nicht nur eine breite Basis für strukturbasiertes Inhibitor-Design, sondern ermöglichen zudem eine konsolidierende Charakterisierung der Sap-Proteine. Mit Sap1 und Sap3 konnte die Untergruppe der Sap-Isoenzyme Sap1-3 strukturell vervollständigt werden. Mit Sap5 hingegen wurde die erste Struktur einer Proteinase aus der Untergruppe Sap4-6 bestimmt, womit eine strukturelle Grundlage für eine Bestimmung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen den verschiedenen Sap-Untergruppen gelegt wurde.

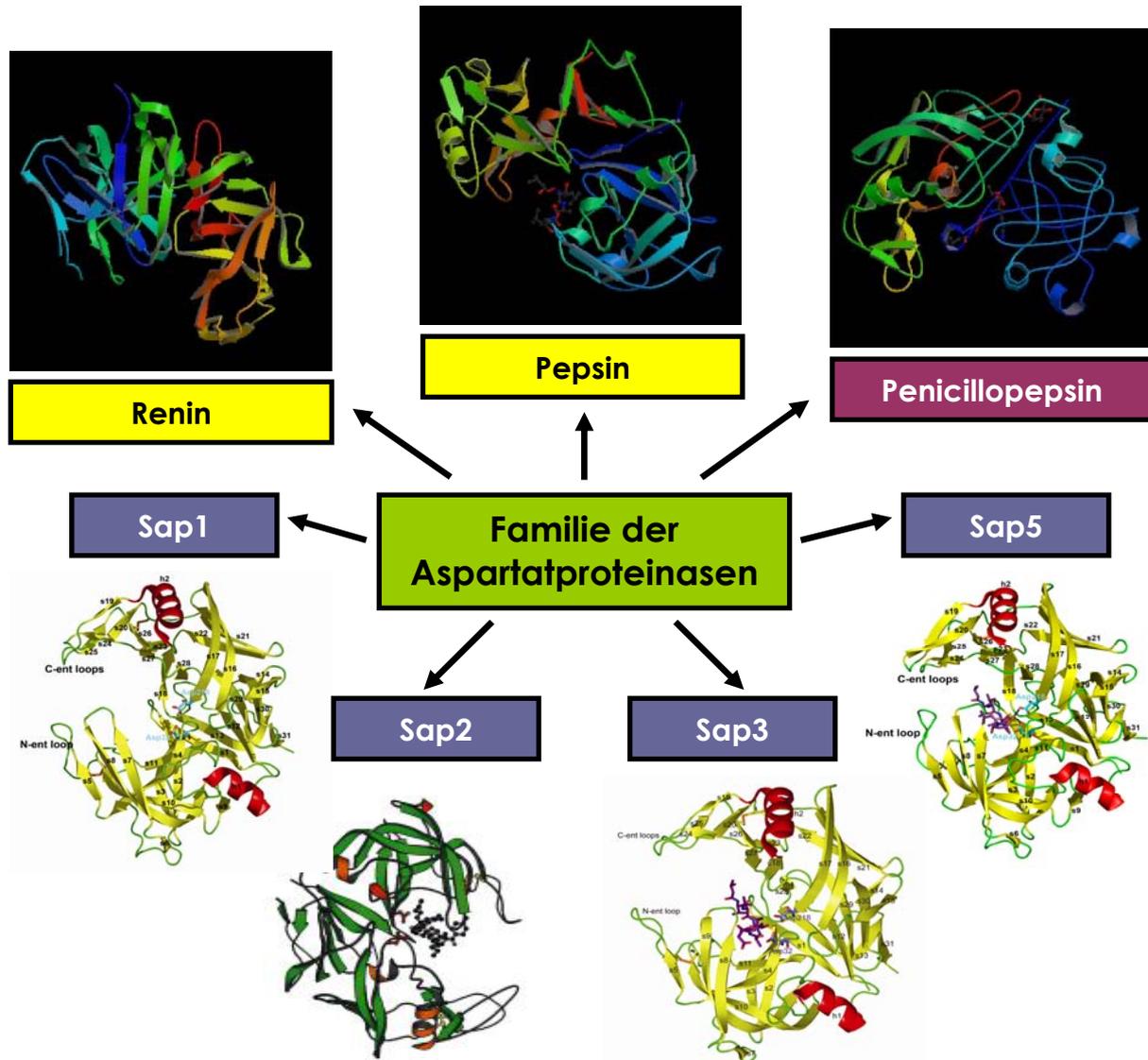
Anhand der gelösten Struktur von Sap3 sowohl im ungebundenen als auch im gebundenen Zustand kann der Modus der Inhibitorbindung an die Sap-Enzyme weiter erforscht werden.

### 4.1 Die Sap-Familie – eine Untergruppe der großen Familie der Aspartatproteinasen

Zunächst erstaunt die hohe strukturelle Übereinstimmung aller bisher gelösten Strukturen der Sap-Isoenzyme. Sap5, dessen Aminosäuresequenz im Sequenzvergleich nur etwa 50% Identität mit den Sequenzen der Enzyme Sap1-3 besitzt, weist dennoch nur geringe Unterschiede in seiner Proteinfaltung auf. Die hohe Konservierung der Tertiärstruktur der untersuchten Saps bestätigt deren Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Sap-Familie.

Die Saps zeigen mit ihren dicht gepackten zumeist aus  $\beta$ -Faltblättern bestehenden zweilappigen Strukturen das klassische Faltungsmuster der Aspartatproteinasen, das in humanen Aspartatproteinasen wie Pepsin [162], Renin [49] und Cathepsin D [119] sowie

fungalen Aspartatproteinasen wie Penicillopepsin [90] und Rhizopuspepsin [169] beobachtet wurde (**Abb. 31**). Trotzdem verweisen einzigartige strukturelle Merkmale die Saps in eine eigene Untergruppe innerhalb der Familie der Aspartatproteinasen.



**Abbildung 31:** Einzelne Vertreter der Aspartatproteinasen. Die Familie der Saps gehört zu der großen Familie der Aspartatproteinasen. Gelbe, violette und graublau Markierungen gruppieren die gezeigten Strukturen zu humanen und fungalen Aspartatproteinasen sowie zu den sezernierten Aspartatproteinasen von *C. albicans* (Saps). Zwar stellen auch die Saps fungale Aspartatproteinasen dar, bilden aber eine eigene Untergruppe.

Den sicherlich auffälligste Unterschied zu anderen Aspartatproteinasen stellt der signifikant längere Disulfid-*loop* der Saps zwischen Cys47 und Cys59 (*N-ent loop*) dar, der sich an Substrat- oder Inhibitorbindungen beteiligen kann. Stewart et al. bezeichnete diesen *loop* sogar als zweiten *active site flap* [166]. Aufgrund des Verlusts eines kleinen helikalen Fragments als Folge einer Deletion von sieben bis acht Aminosäuren vergrößern sich die Substratbindungstaschen S1 und S3 der Saps signifikant. Die *C-ent loops* der Sap-

Isoenzyme werden durch Insertion von Aminosäuren 247 bis 249 bzw. Aminosäuren 286 bis 290 vergrößert. Am Ende des Carboxyterminus der Sap-Strukturen ist die Aminosäuresequenz der Saps um etwa zehn Aminosäuren erweitert. Abad-Zapatero et al. [1] wiesen dem verlängerten Ende der Saps eine mögliche Bedeutung als Anhaftungspunkt zu, das den Enzymen zur Erkennung von Oberflächen und/oder Gewebe dienen könnte. Diese Hypothese wurde allerdings noch durch keine experimentellen Untersuchungen bestätigt.

Insgesamt besitzen die Sap-Isoenzyme aufgrund ihrer strukturellen Veränderungen im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Familie der Aspartatproteinasen einen vergrößerten Substratbindungsbereich.

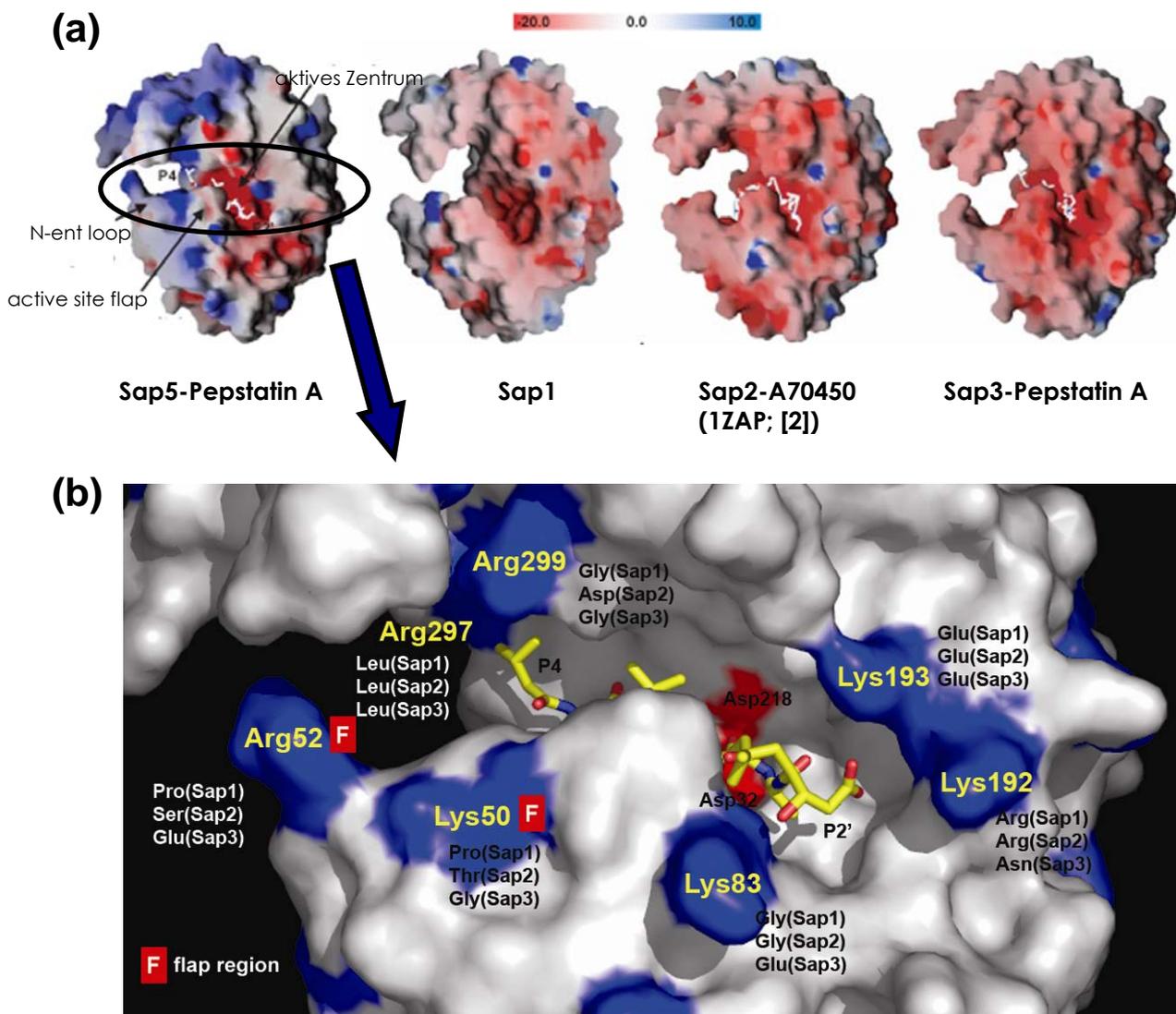
## 4.2 Differenzierung der Sap-Familie in Subgruppen

Trotz der hochkonservierten Tertiärstruktur aller Sap-Isoenzyme, lässt die Darstellung der elektrostatischen Oberfläche eine Unterteilung der Saps in zwei Gruppen deutlich erkennen. Die Untergruppe der Enzyme Sap1-3 mit insgesamt negativ geladener Oberfläche spaltet sich von Sap5 ab, das eine eher positive Oberfläche aufweist (**Abb. 32 a, b**).

Das aktive Zentrum aller vier Sap-Isoenzyme zeigt sich als tiefrot eingefärbte Kluft. Die rote Farbe demonstriert die hochkonservierte negative Ladung sowohl der katalytischen Aspartate als auch ihrer benachbarten Aminosäuren. Zu einer katalytischen Reaktion tragen nicht nur die katalytischen Aminosäuren bei; Andreeva et al. wiesen bei Aspartatproteinasen auch den benachbarten Aminosäuren der katalytischen Aspartate eine wichtige Rolle im katalytischen Zentrum zu [6]. Der allgemein anerkannte konservierte katalytische Mechanismus pepsinartiger Enzyme setzt voraus, daß die Carboxylgruppe eines der aktiven Aspartate in protoniertem Zustand, die Säuregruppe des anderen Aspartats dagegen deprotoniert vorliegt [38, 91, 142, 170, 184]. Den benachbarten Aminosäuren fällt die wichtige Aufgabe zu, den protonierten bzw. deprotonierten Zustand der katalytischen Aspartate aufrecht zu erhalten. Ein konservierter katalytischer Mechanismus erfordert daher auch eine Konservierung des gesamten katalytischen Bereichs, wie es bei allen pepsinartigen Enzymen und insbesondere bei den Saps zu erkennen ist. Als hochkonserviertes Motiv lässt sich bei pepsinartigen Enzymen das katalytische Motiv DSG bzw. DTG finden. D stellt dabei jeweils ein katalytische Aspartat dar (**Abb. 22**).

Die negativ geladene Gesamtoberfläche der Isoenzyme Sap1-3 steht im Einklang mit deren Aktivitäts-pH-Optimums von pH 4,5 (Sap1) und pH 3,5 (Sap2, Sap3) [17]. Positiv geladene Aminosäuren, die den katalytischen Bereich von Sap5 umgeben, könnten zum Anstieg des

Aktivitäts-pH-Optimums von Sap5 zu pH 5,0 beitragen. Die Variabilität der Sap-Isoenzyme in ihrer Oberflächenladung und folglich in ihrem optimalen Aktivitäts-pH-Bereich ermöglicht dem Erreger *C. albicans*, sich an seine jeweilige Umgebung durch Expression verschiedenartiger Sap-Isoenzyme zu adaptieren. Sap1-3 wird während superfizieller kutaner wie vaginaler *C. albicans* Infektionen (niedriger Umgebungs-pH) [42, 129, 160] exprimiert, während Sap4-6 nach Übergang von *C. albicans* Hefezellen zu Hyphen während systemischer Erkrankungen produziert werden (schwach saurer bis neutraler Umgebungs-pH) [85, 190].



**Abbildung 32:** Vergleich molekularer Oberflächen von Sap5 und Sap1-3, die gemäß dem berechneten lokalen elektrostatischen Potential eingefärbt sind (rot: negativ, blau: positiv). (a) Sap5 weist in seiner Oberfläche eine vorwiegend positive Ladung auf, Sap1-3 hingegen sind in erster Linie negativ geladen. Das aktive Zentrum ist bei allen Sap-Isoenzymen stark negativ geladen. (b) Die Vergrößerung der Substratbindungsregion von Sap5 verdeutlicht die Vielzahl nicht konservierter positiv geladener Aminosäuren.

### 4.3 Substratspezifität von Sap1-3 und Sap5

Aspartatproteinasen schneiden gewöhnlich bevorzugt Substrate mit voluminösen hydrophoben Aminosäuren an den Positionen P1 und P1' [67]. Fungale Aspartatproteinasen grenzen sich von humanen Aspartatproteinasen insofern ab, daß sie Substrate schneiden, die an Position P1 Aminosäuren mit polaren Seitenketten aufweisen.

Bisher wurde nur eine einzige Studie zu Substratspezifitäten der Isoenzyme Sap1-3 und Sap6 durchgeführt. Bei den von Koelsch et al. durchgeführten Substratbindungsstudien zeigen Sap1 und Sap2 an Position P1 sehr ähnliche Schneidepräferenz nach Aminosäuren wie (Phe>Leu>Tyr(Sap1)/Lys(Sap2)>Lys(Sap1)/Tyr(Sap2)) [101]. Dies steht in Einklang mit einer identischen Aminosäuren-Ausstattung der Substratbindungstasche S1. Sap3 hingegen schneidet an Position P1 weniger spezifisch, nämlich nach mehr als zehn verschiedenen Aminosäuren (Leu>Arg>>Phe>Glu>Asp>Tyr>Lys>Gln>Ala>Asn). Ein Grund für die geringere Spezifität von Sap3 ist sicherlich die etwas größere S1 Tasche.

Koelsch et al. untersuchten in ihrer Studie nur Substratspezifitäten der Sap-Isoenzyme Sap1-3 und Sap6. Da in Sap5 und Sap6 jedoch identische Aminosäuren die S1 Tasche formen, können äquivalente Substratspezifitäten beider Enzyme erwartet werden. Es wurde gezeigt, daß Sap6 an Position P1 im Gegensatz zu Sap1-3 alle Aminosäuren mit Ausnahme von Ile, His und Pro schneidet, jedoch bevorzugt nach (Phe>Leu>Tyr>Ala). Die Substitution von Ile119Sap1/2 oder Val119Sap3 durch Ala119Sap5/Sap6 vergrößert die S1 Tasche von Sap5/ Sap6 etwas, was möglicherweise zu deren geringen Spezifitäten bei P1 beiträgt.

Die hohe Konservierung der Aminosäuren, die die S1' Substratbindungstaschen von Sap1-3 bilden, lässt ein sehr ähnliches unspezifisches Schneidprofil bei P1' erwarten. Tatsächlich werden an Position P1' alle Aminosäuren außer Asn, His, Arg, Lys und Pro akzeptiert. Interessanterweise werden keine Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten in S1' zugelassen [101], was vermutlich auf eine elektrostatische Abstoßungsreaktion mit Arg195 in allen drei Enzymen zurückzuführen ist. Die Veränderung der S1'-Sap5 Tasche zu einer eher schmalen trichterartigen Substratbindungstasche könnte deren Substratspezifität limitieren.

Leider existieren keine Untersuchungen zu Substratspezifitäten von S4 bis S2 und S2'. Ein möglicher Einfluss von Aminosäure 83 auf das Substratbindungsverhalten von S2 wurde jedoch bei verschiedenen Sap-Enzymen von *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* beschrieben [69]. Fusek et al. [69] stellten fest, da Aminosäure 74 (welche Aminosäure 83 der Saps entspricht) genau zwischen den Substratbindungstaschen S2 und S2' liege, könnte sie im Zuge des initialen Fits während der Substratbindung in nächste Nähe zu der an P2 positionierten Aminosäure des Substrats gelangen. Fusek et al. zeigten in ihren Untersuchungen, daß das Sap-Enzym von *C. tropicalis* mit einem Glutamat an der kritischen Position saure Aminosäuren an Substratposition P2 diskriminierte. Sap3, das ebenfalls an

Position 83 ein Glutamat besitzt, könnte eine ähnliche Diskriminierung von sauren Aminosäuren aufweisen. Sap2 von *C. albicans* mit einem Glycin als Aminosäure 83 hingegen tolerierte in S2 Aminosäuren mit unterschiedlichsten Seitenketten. Diese Eigenschaft wird vermutlich von Sap1 geteilt, da auch dieses Enzym ein Glycin an Position 83 aufweist.

Aufgrund der massiven Veränderungen der Substrattaschen S4 und S3 von Sap5 ist von sehr distinkten Substratspezifitäten innerhalb dieser Taschen bei Sap1-3 und Sap5 auszugehen. Sap5, das im Gegensatz zu Sap1-3 zwei Arginine in S4 und ein weiteres Arginin in S3 besitzt, wird vermutlich wegen der langen hydrophoben Seitenketten und der positiv geladenen Guanidinium-Gruppen der Arginine an den entsprechenden Substratpositionen hydrophobe und/oder negativ geladene Aminosäuren bevorzugen.

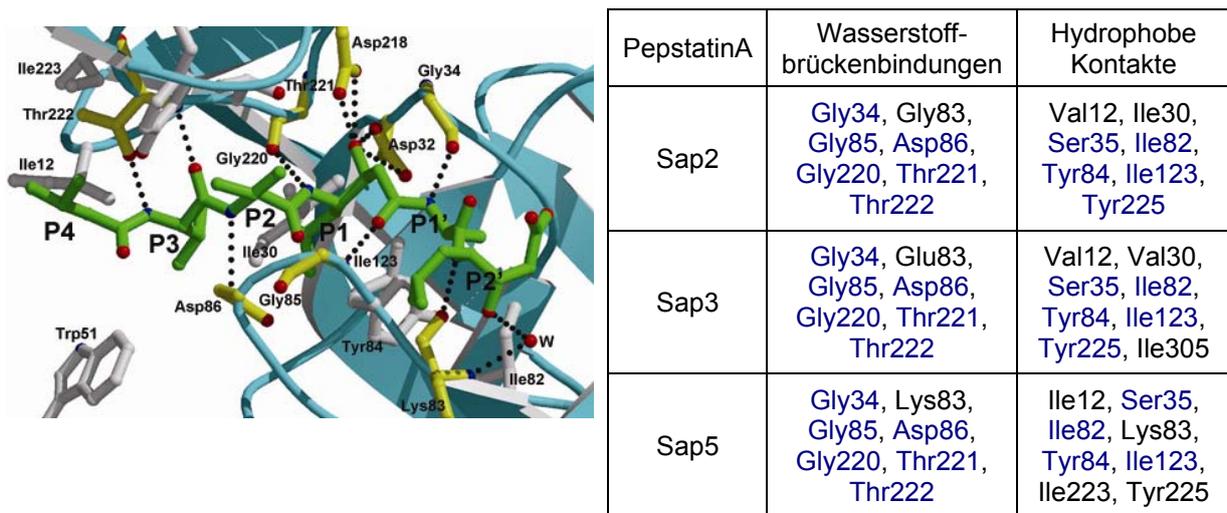
## 4.4 Inhibitorbindungsstudien an Sap1-3 sowie Sap5

### ***Pepstatin A***

Sehr ähnliche Bindungsaffinitäten für Pepstatin A gegenüber Sap2 und Sap3 mit  $K_i$  Werten von 17 nM (bzw. einem  $IC_{50}$  von 27 nM für Sap2 [26]) und 60 nM für Sap3 wurden berichtet [101]. Sap5 wird von Pepstatin A ebenfalls stark inhibiert, reflektiert durch einen  $IC_{50}$  Wert von 6 nM, der im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurde.

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Enzym und Pepstatin A bilden innerhalb der Sap-Isoenzyme ein hochkonserviertes Muster, das bereits auch in anderen Pepstatin A-Protein-Komplexen beobachtet wurde. Hydrophobe Kontakte differieren zwar zwischen Sap2, Sap3 und Sap5, dennoch sorgt eine ähnliche Anzahl dieser Kontakte für ähnliche Bindungseigenschaften des Pepstatin A an die Saps (**Abb. 33**).

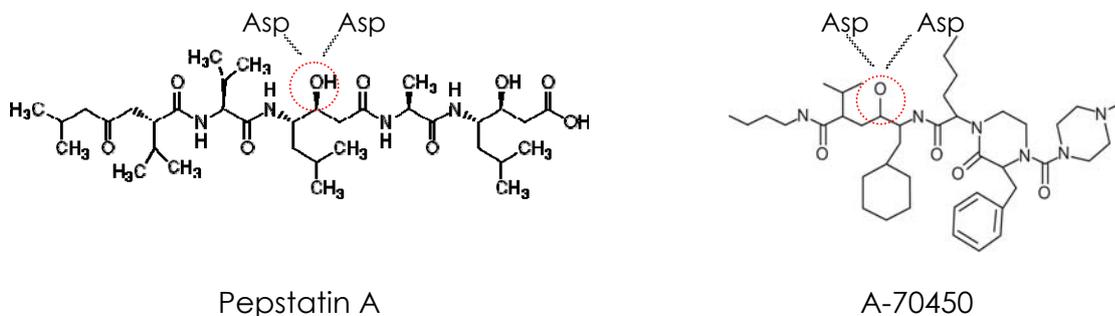
Auf die besondere Rolle des *active site flap* bei der Bindung eines Inhibitors wurde bereits in Kapitel 3.2.4 hingewiesen. Die Anlagerung des *flap* an den Inhibitor liefert einen wichtigen Beitrag zu seiner Bindung, indem weitere Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe Wechselwirkungen ermöglicht werden. Die Bestimmung der Strukturen von Sap3 in An- und Abwesenheit des Inhibitors zeigte deutlich die veränderte Lage des *active site flap* nach Inhibitorbindung. Die Konformation von pSap3, mit über das aktive Zentrum gelegtem *active site flap*, kann als „geschlossene“ Form des Enzyms bezeichnet werden, während die Struktur des ungebundenen Sap3 hingegen die „offene“ Form des Enzyms darstellt. Tatsächlich kann in weiteren ungebundenen Sap3-Apostrukturen jeweils die offene Konformation des Enzyms beobachtet werden, während in der an Pepstatin A gebundenen Struktur von Sap5 die geschlossene Form beobachtet wird.



**Abbildung 33:** Bindung von Pepstatin A im aktiven Zentrum der Sap-Isoenzyme am Beispiel des Sap5-Pepstatin A-Komplexes. Aminosäuren in gelb bilden Wasserstoffbrückenbindungen (schwarz gestrichelte Linie) mit Pepstatin A (grün). Aminosäuren, die hydrophobe Kontakte mit dem Inhibitor ausbilden, sind in grau dargestellt. Die in nebenstehender Aufstellung blau eingefärbten Aminosäuren sind in den Sap3/5-Pepstatin A-Komplexen konserviert.

### A-70450

Sap2 wurde von Stewart et al. und Abad-Zapatero et al. sowohl als Komplex mit Pepstatin A (**Abb. 34**) als auch in Verbindung mit A-70450 (**Abb. 34**), einem hochpotenten Sap-spezifischen Inhibitor ( $IC_{50} = 1.3 \text{ nM}$  [26]), kristallisiert [1, 35].



**Abbildung 34:** Strukturformeln der Aspartatproteinase-Inhibitoren Pepstatin A und A-70450. Die jeweilige Statin-Gruppe ist rot umrandet. Die Lage der katalytischen Aspartate (Asp) der Saps zur jeweiligen Hydroxylgruppe des Statins ist angedeutet.

Stewart et al. fanden in der Struktur von Sap2-A-70450 zwar zwei Wasserstoffbrückenbindungen weniger als in Sap2-Pepstatin A, doch war die Anzahl der hydrophoben Kontakte signifikant erhöht. Dies lässt A-70450 zu einem fast 20-fach stärkeren Inhibitor als Pepstatin A gegenüber Sap2 werden. Die Substratbindungstaschen S4, S3 und S1' werden von Pepstatin A nur suboptimal ausgefüllt. A-70450 hingegen war in der Lage, mit seiner verzweigten und voluminösen Struktur insbesondere die Substratbindungstasche S3 besonders gut zu belegen. Stewart et al. fanden in späteren Untersuchungen für A-70450

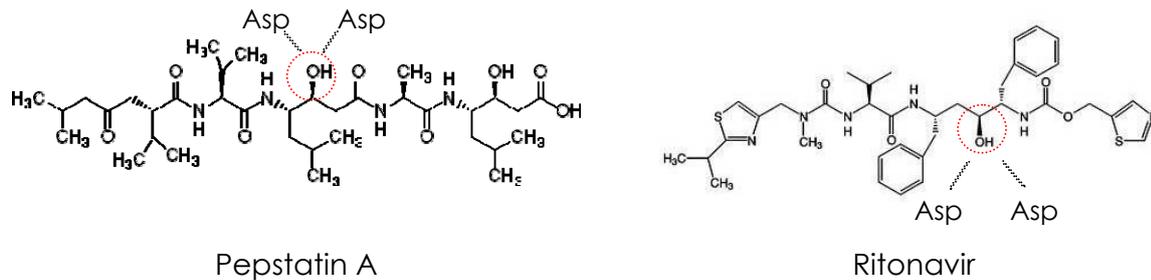
ähnliche inhibitorische Eigenschaften gegen Sap1 und Sap3 wie gegen Sap2 [166].  $IC_{50}$  Werte von A-70450 gegen Sap4-6 wurden leider bislang nicht bestimmt. Untersuchungen des anticandidalen Effekts von A-70450 *in vivo* an zwei Mausmodell-Assays systemischer *Candida*-Infektionen konnten eine antifungale Wirkung des Inhibitors allerdings nicht demonstrieren [73]. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß während systemischer candidaler Infektionen vor allem eine Expression von Sap4-6 beobachtet wird. Die mangelnde antifungale Wirkung von A-70450 unter systemischen Bedingungen könnte auf eine geringe inhibitorische Aktivität des A-70450 gegenüber Sap4-6 hinweisen. A-70450 wurde im Rahmen dieser Arbeit in den Substratbindungsbereich von Sap5 modellhaft eingebaut. Dabei traten Kollisionen zwischen dem terminalen Methylpiperazinring von A-70450 und Trp51Sap5 und/oder Lys50Sap5 auf. Die Lage von Trp51Sap5 und Lys50Sap5 kann aufgrund ihres Bindungsnetzwerks zu den umliegenden Aminosäuren (Arg120Sap5, Asp86Sap5 und Ser88Sap5) als relativ fixiert bezeichnet werden, was ein mögliches Ausweichen des N-ent *loop* nach Bindung von A-70450 an Sap5 reduziert. Die Bindung von A-70450 an Sap5 könnte demzufolge stark behindert sein.

### **Ritonavir - Molecular Modelling**

In verschiedensten Inhibitorstudien mit HIV Proteinase Inhibitoren wie z.B. Ritonavir, Saquinavir und Indinavir [76, 103, 122, 145] wurde die hemmende Aktivität im mikromolaren Bereich dieser Inhibitoren gegenüber den Saps nachgewiesen, wobei sich Ritonavir als der mit Abstand potenteste, bislang untersuchte Inhibitor erwiesen hat. Bemerkenswerterweise wurde eine signifikante Hemmung nur bei Sap1-3 beobachtet, wohingegen Isoenzyme der Untergruppe Sap4-6 nicht inhibiert wurden.

Um mögliche strukturelle Gründe in diesem Zusammenhang herausfinden zu können, wurde ein Ritonavir/HIV-1-Komplex (PDB Code: 1HXW; [96]), mit den Inhibitor-Strukturkomplexen von Sap2, 3 sowie Sap5 überlagert. Die Proteinase des HI-Virus, die auch zur Familie der Aspartatproteinasen zählt, setzt ebenso wie die Saps von *C. albicans* zwei Aspartate im katalytischen Prozess ein. Im Gegensatz zu den Saps, die Monomere darstellen, ist die HIV-Proteinase als Dimer aktiv, wobei jeweils ein Molekül ein katalytisches Aspartat zur Verfügung stellt [120, 188].

In gleicher Weise wie im Sap-Pepstatin A-Komplex beobachtet zeigt die Hydroxylgruppe des zentralen Phenylstatin (Phe-CH-CHOH-) des Ritonavirs in Richtung der katalytischen Asparaginsäuren. Deshalb wurde das Ritonavir in die Substratbindungshöhle von Sap1-3 und Sap5 so modelliert, daß die Hydroxylgruppe des Statins von Pepstatin A (**Abb. 30**) mit derjenigen des Phenylstatins von Ritonavir (**Abb. 30**) annähernd zur Deckung gebracht werden konnte.



**Abbildung 30:** Strukturformeln der Aspartatproteinase-Inhibitoren Pepstatin A und Ritonavir. Die jeweilige Statin-Gruppe ist rot umrandet. Die Lage der katalytischen Aspartate (Asp) der Saps zur jeweiligen Hydroxylgruppe des Statins ist angedeutet.

In der Überlagerung der monomeren Saps mit der dimeren HIV-Proteinase passt ein Molekül des Dimers interessanterweise relativ gut auf die N-terminale Domäne der Saps, während sich die C-terminale Domäne und das zweite Dimer-Molekül der HIV-Proteinase sehr schlecht übereinander legen. Insbesondere im Bereich des *active site flap* überlagern sich die Strukturen der Saps mit der Struktur der HIV-Proteinase, die einen analogen *flap* aufweist, sehr gut. Als Dimer besitzt die HIV-Proteinase allerdings zwei solcher *active site flaps*, wobei sich beide *flaps* über den im aktiven Zentrum gebundenen Inhibitor legen können. Daraus resultiert eine eng geschlossene aktive Bindungshöhle der HIV-Proteinasen. Mögliche Wechselwirkungen, die zu einer Inhibitorbindung des Ritonavirs an die Sap-Isoenzyme beitragen könnten, beziehen bei den jeweiligen Saps Aminosäuren Tyr225, Thr222, Thr221, Gly220 und Asp86 (Wasserstoffbrückenbindungen) sowie Tyr84 und Ser35 (hydrophobe Wechselwirkungen) ein. Jedoch treten gerade im Bereich des *active site flap* gegenseitige Behinderungen der Valin-Seitenkette des Ritonavirs und der Aminosäuren Ile82 und Tyr84 in allen untersuchten Sap-Isoenzymen auf. Die Überlagerung der Saps mit der HIV-1 Protease zeigt zwar bei Bindung von Ritonavir eine äquivalente Konformation des *flap* der HIV-1 Protease analog zum *active site flap* der Saps. Allerdings besteht der *flap* der HIV-1 Protease im Bindungsbereich zumeist aus Glycinen, die aufgrund mangelnder Seitenketten und höherer Flexibilität mit Ritonavir - im Gegensatz zu den Aminosäuren Ile82 und Tyr84 der Saps - nicht kollidieren.

Eine mögliche Ursache für die mangelnde Bindung des Ritonavirs an Sap5 könnte in der langen Seitenkette des Lys193Sap5 liegen, die direkt in die Substratbindungshöhle hineinragt und damit die Isopropylthiazolyl-Gruppe des Ritonavirs stark behindert. Die kürzere Glutaminsäure an Position 193 in Sap2 und Sap3 stellen dagegen kein Hindernis dar. Sap4 und Sap6 jedoch, die ebenso wie Sap5 kaum von Ritonavir inhibiert werden ( $IC_{50} > 300\mu M$ ) [122], besitzen an Position 193 ein Threonin. Diese Aminosäure stellt für Ritonavir nicht das gleiche Hindernis dar wie das Lysin in der Struktur von Sap5. Zudem kann nach Bindung des Ritonavir an Sap5 eine Konformationsänderung der betreffenden Seitenkette des Inhibitors nicht ausgeschlossen werden.

Im Bereich des *active site flap* wird nach Einbau von Ritonavir in das aktive Zentrum bei allen Sap-Isoenzymen eine gravierende Kollision von Aminosäuren 82 und 84 mit Ritonavir beobachtet. Der *active site flap* stellt die flexibelste Region der Sap-Strukturen dar und passt sich an den jeweiligen Bindungspartner des Enzyms an. Die tatsächliche Stellung des *active site flap* im Ritonavir-Sap-Komplex wird sich demzufolge von derjenigen des Sap-Pepstatin A-Komplexes unterscheiden. Vermutlich bedeutet dies auch einen Verlust der potentiellen hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyr84 bzw. Asp86 der Saps und Ritonavir.

Durch Modelling des HIV-Proteinase-Inhibitors Ritonavir in das aktive Zentrum von Sap2, Sap3 und Sap5 sollte versucht werden, Hinweise für den unterschiedlichen inhibitorischen Effekt von Ritonavir gegenüber Sap1-3 ( $IC_{50}$  zwischen 2 und  $20\mu\text{M}$ ) und Sap5 ( $IC_{50} > 300\mu\text{M}$ ) [122] zu finden. Bedauerlicherweise konnte aufgrund der Modelling Versuche keine einfache Erklärung für das Fehlen einer inhibitorischen Aktivität von Ritonavir gegenüber Sap5 gefunden werden. Eine kristallographische Bestimmung zumindest eines Sap-Ritonavir-Komplexes würde das exakte Bindungsschema dieses Komplexes darlegen. Die in dieser Arbeit eher hypothetischen Erklärungen eines möglichen Bindungsschemas von Ritonavir an die Saps können dadurch substantiiert werden.

## 4.5 Schlußfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der bereits bekannten Struktur von Sap2 drei weitere Isoenzyme - Sap1, Sap3 und Sap5 - aus der zehngliedrigen Sap-Familie strukturell bestimmt.

Im Allgemeinen erstaunt die hochkonservierte Tertiärstruktur nicht nur innerhalb der Isoenzyme Sap1-3 mit einer Aminosäuresequenzidentität von etwa 70%, sondern auch bei Sap5, das in seiner Aminosäuresequenz nur etwa 50% Identität zu Sap1-3 zeigt. Deutlich differenziert sich Sap5 von Sap1-3 jedoch durch seine positive elektrostatische Gesamtoberflächenladung. Zudem unterscheidet sich Sap5 in seiner Zusammensetzung vor allem der Substratbindungstaschen S3 und S4 und in Aufbau und Lage des N-terminalen Eingangs-*loops* (N-ent *loop*). Die langkettige Aminosäure Lys83Sap5 trägt durch hydrophobe Interaktion mit Pepstatin A sogar zur Bildung einer „neuen“ Substratbindungstasche S3' in der Struktur von Sap5 bei.

Die Aufklärung weiterer Strukturen aus der Sap-Isoenzym Familie sollte nicht nur einer detaillierten Strukturanalyse dienen, sondern ein breiteres Fundament für ein struktur-basiertes Inhibitor-design von neuen Sap-spezifischen Hemmsubstanzen legen. Mit der

Bestimmung von Sap1 und Sap3 konnte der Wissensstand betreffend der Untergruppe Sap1-3, die bei oberflächlichen Candidosen eine große Rolle spielt, vervollständigt werden. Durch Nutzung struktureller Gemeinsamkeiten von Sap1-3 können in Zukunft gegen alle drei Isoenzyme wirksame Inhibitoren entwickelt werden.

Mit Sap5 wurde ein Enzym aus der zweiten, bei systemischen *Candida*-Infektionen wichtigen Untergruppe strukturell bestimmt. Inhibitor-design für Sap5 bzw. Sap4-6 spezifischer Hemmstoffe sollte sich vor allem auf die großen Unterschiede in den Substratbindungstaschen S4 und S3 konzentrieren.

Modelling-Versuche des Ritonavirs ins aktive Zentrum der verschiedenen Sap-Isoenzyme gaben wenig Aufschluss über die Gründe der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der HIV-Proteinase Inhibitoren gegen Sap1-3 ( $IC_{50}$  zwischen 2 und 20  $\mu$ M) bzw. Sap4-6 ( $IC_{50} > 300\mu$ M). Einen wichtigen Beitrag zu weiteren Modelling-Versuchen könnte die kristallographische Aufklärung des generellen Bindungsschemas der HIV-Proteinase-Inhibitoren im aktiven Zentrum der Saps leisten.

## 5 Zusammenfassung

Ein dramatischer Anstieg an *Candida* assoziierten Infektionen ließ die Bedeutung der *Candida*-Spezies während der letzten Jahre immens wachsen. *Candida albicans* (*C. albicans*) gehört als fakultativ pathogener Keim zur Normalflora des Menschen und wird bei bis zu 71% der gesunden Population im Gastro-Intestinal-Trakt, auf der Rachenschleimhaut respektive im Genitalbereich nachgewiesen. Ein intaktes Immunsystem und eine normale mikrobielle Flora schützen den Organismus ausreichend vor einer candidalen Infektionskrankheit. Nur geringfügige Änderungen des physiologischen Gleichgewichts jedoch können die normalerweise harmlosen kommensalen Hefen in aggressive pathogene Keime verwandeln. Bei immunsupprimierten Patienten, wie beispielsweise Patienten mit HIV Infektion, Leukämie oder Neutropenie, Intensivpatienten oder Organtransplantantierten unter medikamentöser Immunsuppression, treten Schleimhaut-Candidosen in stetig wachsender Zahl auf. Liegen begünstigende Faktoren vor, resultiert daraus nicht selten eine Fungämie mit eventuell nachfolgender Organmykose und lebensbedrohlicher *Candida*-Sepsis.

Der Übergang von *C. albicans* vom harmlosen Kommensalen zum ungehemmt wachsenden Parasiten bedarf eines breiten Repertoires an Virulenzfaktoren, die unter spezifischen Bedingungen gebildet werden. Zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien zufolge spielt die zehngliedrige Familie der sezernierten Aspartatproteinasen (Saps) in der Pathogenese von *C. albicans* eine entscheidende und sehr komplexe Rolle. Daher zählt die Entwicklung von Aspartatproteinase-Inhibitoren zu einem besonders vielversprechenden Ansatz auf der Suche nach neuen Wirkstoffen gegen *Candida*.

Die moderne Wirkstoffsuche findet ihren Ansatz in der Ermittlung und strukturellen Beschreibung biochemischer Targets und der Entwicklung an sie angepasster inhibitorischer Moleküle – das sogenannte strukturbasierte Inhibitor-design.

Eine gelungene Strukturanalyse gibt ein genaues dreidimensionales Bild des Zielproteins. Dies trägt einerseits zum tieferen Verständnis seiner chemischen Reaktivität bei und liefert andererseits konkrete Anhaltspunkte für den Entwurf neuer Wirkstoffe auf Basis der Struktur des Zielproteins.

Proteinstrukturen werden entweder mit Hilfe der Röntgenkristallographie oder der Nuklearmagnetresonanz (NMR) Spektroskopie dreidimensional bestimmt. Im Kristallgitter angeordnete Proteine dienen als Grundlage für die Röntgenkristallographie, während bei der NMR Spektroskopie Proteine in Lösung vermessen werden.

Sap2 von *C. albicans* wurde bereits 1995 als das erste Isoenzym der gesamten Sap-Familie strukturell in Verbindung mit den Inhibitoren A-70450 und Pepstatin A von Cutfield et al.

bestimmt. Kurz darauf beschrieben Abad-Zapatero et al. die Struktur des nahezu identischen klinischen Isolats Sap2X im Komplex mit A-70450.

Anliegen dieser Arbeit war, weitere Sap-Isoenzyme mit Hilfe der Röntgenkristallographie strukturell zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk lag dabei auf Vertretern der Subklasse Sap1-3, die bei oberflächlichen Candidosen eine große Rolle spielen, sowie auf Vertretern der bei systemischen *Candida*-Infektionen wichtigen Untergruppe Sap4-6. Detaillierte Strukturanalysen und -vergleiche ermöglichen eine strukturelle Gruppierung der Sap-Isoenzyme und helfen, Unterschiede und Gemeinsamkeiten einzelner Sap-Isoenzyme zu ermitteln. Die strukturelle Subklassifizierung wird die Entwicklung selektiver sowie gruppenspezifischer Inhibitoren unterstützen.

Mit Hilfe des rekombinanten Expressionssystems *Pichia pastoris* wurden die Sap-Isoenzyme in einer für die Kristallisation ausreichenden Menge hergestellt. Nach Reinigung der Proteine konnten die Isoenzyme Sap1 und Sap3 als Apoenzyme im ungebundenen Zustand sowie Sap3 und Sap5 in Komplex mit Pepstatin A kristallisiert und deren Strukturen röntgenkristallographisch bestimmt werden.

Die Saps zeigen eine hochkonservierte Tertiärstruktur und weisen mit ihren dicht gepackten zumeist aus  $\beta$ -Faltblättern bestehenden zweilappigen Strukturen das klassische Faltungsmuster der Aspartatproteinasen auf. Spezifische strukturelle Merkmale rechtfertigen jedoch die Eingruppierung der Saps in eine eigene Subklasse innerhalb der Aspartatproteinasen.

Die hohe Konservierung der Tertiärstruktur aller bisher strukturell bestimmten Saps bestätigt deren Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Enzym-Familie. Doch zeigt eine umfassende Analyse der Sap-Strukturen eine Aufteilung der Sap-Familie in weitere Subgruppen.

Sap5 unterscheidet sich strukturell von Sap1-3 vor allem in seiner Zusammensetzung der Substratbindungstaschen S3 und S4 und in Aufbau und Lage des N-terminalen Eingangs-loops. Die langkettige Aminosäure Lys83Sap5 trägt durch hydrophobe Interaktion mit Pepstatin A sogar zur Bildung einer „neuen“ Substratbindungstasche S3' in der Struktur von Sap5 bei.

Deutlich differenziert sich Sap5 durch seine positive elektrostatische Gesamtoberflächenladung von den Isoenzymen Sap1-3, die eine eher negativ geladene Gesamtoberfläche aufweisen. Die Variabilität der Sap-Isoenzyme in ihrer Oberflächenladung und folglich in ihrem optimalen Aktivitäts-pH-Bereich bietet dem Erreger *C. albicans* ein breites Wirkungsspektrum. Es ermöglicht ihm, sich durch Expression verschiedenartiger Sap-Isoenzyme an seine jeweilige Umgebung optimal anzupassen.

Die gelösten Strukturen von Sap3 im ungebundenen als auch im gebundenen Zustand trugen wesentlich zur Aufklärung des Inhibitor-Bindungsmodus an die Sap-Enzyme bei. Im

Vergleich der Strukturen von Sap3 in An- und Abwesenheit eines Inhibitors wird die veränderte Lage des als *active site flap* bezeichneten Bereichs (Aminosäuren 81 bis 91) nach Inhibitorbindung deutlich. Andere Enzyme der Klasse der Aspartatproteinasen zeigten eine ähnliche konformelle Änderung des *active site flap* nach Bindung eines Inhibitors. Die Bewegung des *flap* bei Sap3 mit bis zu 5,9 Å im Vergleich mit anderen Aspartatproteinasen, bei denen *flap*-Bewegungen zwischen 1,45 Å bis 2,2 Å beobachtet wurden, erscheint dennoch besonders weit.

Die Anlagerung des *flap* an den Inhibitor liefert einen wichtigen Beitrag zur Inhibitorbindung, indem weitere Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe Kontakte ermöglicht werden. Die Konformation von Sap3 im Komplex mit Pepstatin A, das einen über das aktive Zentrum gelegten *active site flap* aufweist, kann als „geschlossene“ Form des Enzyms bezeichnet werden, während die Struktur des ungebundenen Sap3 die „offene“ Form darstellt. Tatsächlich wird in weiteren Sap3-Apostrukturen jeweils die offene Konformation des Enzyms beobachtet. Die an Pepstatin A gebundene Struktur von Sap5 zeigt die geschlossene Form, das ungehinderte Molekül der Sap1-Apostruktur wiederum liegt in der offenen Konformation vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der bereits bekannten Struktur von Sap2 drei weitere Isoenzyme - Sap1, Sap3 und Sap5 - aus der zehngliedrigen Familie der Sap gelöst. Mit den Strukturen von Sap1 und Sap3 wurde die Untergruppe Sap1-3 strukturell vollständig charakterisiert. Sap5 stellt bisher das erste Enzym aus der Subgruppe Sap4-6 dar, das strukturell bestimmt wurde.

Die Aufklärung weiterer Sap-Strukturen sollte neben einer detaillierten Strukturanalyse der Saps ein breites Fundament für Struktur-basiertes Inhibitor-design von neuen Sap-spezifischen Hemmsubstanzen legen. Strukturelle Gemeinsamkeiten von Sap1-3 bieten sich für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren an, die bei oberflächlichen Candidosen angewendet werden. Die Struktur von Sap5 ermöglicht erstmals die Ermittlung spezifischer Inhibitoren gegen Sap4-6, die bei systemischen *Candida*-Infektionen ihren Einsatz finden.

## 6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Durch *Candida albicans* verursachte weitverbreitete Krankheitsbilder.
- Abbildung 2:** Die katalytische enzymatische Spaltung der Aspartatproteinasen erfolgt durch „generelle Base“-Reaktion.
- Abbildung 3:** Dendrogramm der Sap-Isoenzyme von *C. albicans*.
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung von Synthese und Prozessierung der Sap-Isoenzyme
- Abbildung 5:** Angriffspunkte gebräuchlicher Antimykotika in der Pilzzelle
- Abbildung 6:** Chemische Strukturen derzeit therapeutisch angewendeter Antimykotika
- Abbildung 7:** Wechselwirkung von Azolen (blau) mit dem an das Häm (grün) gebundene Eisenatom (rot).
- Abbildung 8:** Schematische Darstellung des transmembranären Komplexes der  $\beta(1,3)$ -D-Glucan-Synthase (GS). Die GS wurde sowohl bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sowie bei pathogenen Pilzarten wie *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* und *Pneumocystis* spp. gefunden. Die Aktivität des Komplexes wird über die GTP bindende Untereinheit Rho1p reguliert. Fks1p und Fks2p sind möglicherweise die Zielenzyme der GS-Inhibitoren.
- Abbildung 9:** Säulenmaterialien verschiedener Ionenaustauscher
- Abbildung 10:** Elution am Beispiel eines Stufengradienten. Dem Äquilibrieren der Säule mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration folgt das Auftragen der Probenlösung (*sample injection*). Ungebundene Moleküle werden bereits während des Waschvorgangs von der Säule entfernt, stärker gebundene Proteine erst während der anschließenden Elution. Zur Reinigung des Säulenmaterials wird am Ende der gesamten Elution eine hochkonzentrierte

Salzlösung über die Säule gegeben, worauf ein Reäquilibrieren mit niedriger Salzkonzentration folgt.

**Abbildung 11:** Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration).

**Abbildung 12:** Kristallisationsmethode des sitzenden Tropfens (*sitting drop vapor diffusion method*)

**Abbildung 13:** Streubild eines Kristalls, durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen erzeugt. Schwarze Punkte stellen Reflexe unterschiedlicher Intensität dar.

**Abbildung 14:** Elektronendichtekarte (weißes Gitter). In die Elektronendichtekarte wird die Aminosäuresequenz möglichst optimal eingepasst wird.

**Abbildung 15:** Selbstdegradation von Sap3 bei pH 3,3 (Aktivitätsoptimum von Sap3: pH 3,5).

**Abbildung 16:** Reinigung von Sap1 und Sap3. Nachweis von Identität und Reinheit mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese und Absorptionsprofil von ultraviolettem Licht ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

**Abbildung 17:** Reinigung von Sap5 und Sap6. Nachweis von Identität und Reinheit mittels SDS-PAGE und Absorptionsprofil von ultraviolettem Licht ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der Abfolge der Röntgenstrukturanalyse und Modellverfeinerung am Beispiel von Sap3 in Komplex mit Pepstatin A.

**Abbildung 19:** Kristalle der Sap-Isoenzyme

**Abbildung 20:** Stereoabbildung der überlagerten Strukturmodelle von Sap1-3 und Sap5. Pepstatin A, das der Struktur von Sap5 angehört, wurde modellhaft mit eingefügt.

**Abbildung 21:** Struktur des Pepstatin-Sap3-Komplexes.

**Abbildung 22:** Aminosäuresequenzvergleich von Sap1-3 und Sap5 mit typischen humanen und fungalen Aspartatproteinasen (Pepsin/Renin respektive Penicillopepsin). Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms

ClustalW durchgeführt. Die Nummerierung der Aminosäuresequenz basiert auf der Aminosäure-Nummerierung von Sap2.

**Abbildung 23:** Überlagerung von Sap1-3 und Sap5.

**Abbildung 24:** Molekulare Oberflächen von Sap5 und Sap1-3, die gemäß dem berechneten lokalen elektrostatischen Potential eingefärbt sind (rot: negativ, blau: positiv). Das aktive Zentrum ist in allen Isoenzymen stark negativ geladen. Sap5 weist in seiner restlichen Oberfläche eine vorwiegend positive Ladung auf, Sap1-3 hingegen sind in erster Linie negativ geladen. Die Oberflächen aller vier Proteine teilen sich in eine eher hydrophile (geladene) und eine hydrophobe (ungeladene) Seite.

**Abbildung 25:** Stereo Plot des mit Wassermolekülen gefüllten Substratbindungsbereichs des Sap3 Apoenzyms. Grüne Bälle stellen Wassermoleküle dar. Die katalytischen Aspartate sind in cyan gezeigt, während weitere Aminosäuren des katalytischen Zentrums gelb eingefärbt wurden. Gestrichelte Linien in schwarz repräsentieren intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäuren und Wassermolekülen, in orange weisen sie auf intramolekulare Bindungen nur zwischen Wassermolekülen hin. Graue Aminosäuren gehören zum *active site flap*. W50 bindet als katalytisches Wasser sowohl an Asp32 als auch an Asp218. Nur zwei Wassermoleküle, W5 und W10, bilden eine Verbindung zu Aminosäuren des *active site flap*, nämlich Gly85 und Tyr84.

**Abbildung 26:** Darstellung der Substratbindungstaschen S4 bis S2'. Überlagerung von Sap1-3 und Sap5.

**Abbildung 27:** Bewegung des *active site flap* nach Inhibitorbindung.

**Abbildung 28:** Pepstatin A-Bindung an Sap3 und Sap5.

**Abbildung 29:** Diagramm zur Bestimmung der inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von Pepstatin A gegen Sap5. Der  $IC_{50}$ -Wert von Pepstatin A liegt bei etwa 6 nM.

**Abbildung 30:** Strukturformeln der Aspartatproteinase-Inhibitoren Pepstatin A und Ritonavir.

**Abbildung 31:** Einzelne Vertreter der Aspartatproteinasen. Die Familie der Saps gehört zu der großen Familie der Aspartatproteinasen. Gelbe, violette und graublau Markierungen gruppieren die gezeigten Strukturen zu humanen und fungalen Aspartatproteinasen sowie zu den sezernierten Aspartatproteinasen von *C. albicans* (Saps). Zwar stellen auch die Saps fungale Aspartatproteinasen dar, bilden aber eine eigene Untergruppe.

**Abbildung 32:** Vergleich molekularer Oberflächen von Sap5 und Sap1-3, die gemäß dem berechneten lokalen elektrostatischen Potential eingefärbt sind (rot: negativ, blau: positiv).

**Abbildung 33:** Bindung von Pepstatin A im aktiven Zentrum der Sap-Isoenzyme am Beispiel des Sap5-Pepstatin A-Komplexes. Aminosäuren in gelb bilden Wasserstoffbrückenbindungen (schwarz gestrichelte Linie) mit Pepstatin A (grün). Aminosäuren, die hydrophobe Kontakte mit dem Inhibitor ausbilden, sind in grau dargestellt. Die in blau eingefärbten Aminosäuren in nebenstehender Aufstellung sind in den Sap-Pepstatin A-Komplexen konserviert.

**Abbildung 34:** Strukturformeln der Aspartatproteinase-Inhibitoren Pepstatin A und A-70450.

## 7 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Dreidimensionale Charakterisierung antifungaler Zielstrukturen
- Tabelle 2:** pH-Optima der proteolytischen Aktivität von Sap 1, 3, 5 und 6 mit Resorufin-markiertem Casein in 50 mM Natriumcitratpuffer [17]
- Tabelle 3:** Endkonzentration der Proteinlösungen für Kristallisationsansätze
- Tabelle 4:** Statistische Bewertung der Datensammlung und Strukturverfeinerung von Sap1, aSap3, pSap3 und Sap5.
- Tabelle 5:** rms-Abweichung aller C $\alpha$ -Atome von Sap1-3 und Sap5. Die Aminosäuren des *active site flap* wurden von der Überlagerung ausgeschlossen.
- Tabelle 6:** Aufstellung der Aminosäuren von Sap1-3 und Sap5, die die Substratbindungstaschen bilden (Sap2: (1ZAP; [1])).

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 Abad-Zapatero C, Goldman R, Muchmore SW, Hutchins C, Stewart K, Navaza J, Payne CD and Ray TL (1996). Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents. *Protein Sci* 5(4): 640-52.
- 2 Abu-Elteen KH, Elkarmi AZ and Hamad M (2001). Characterization of phenotype-based pathogenic determinants of various *Candida albicans* strains in Jordan. *Jpn J Infect Dis* 54(6): 229-36.
- 3 Agatensi L, Franchi F, Mondello F, Bevilacqua RL, Ceddia T, De Bernardis F and Cassone A (1991). Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynaecology clinic. *J Clin Pathol* 44(10): 826-30.
- 4 Albrecht A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, Maccallum D, Odds FC, Schäfer W, Klis F, Monod M and Hube B (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* 281(2): 688-94.
- 5 Albrecht A, Felk A, Pichova I, Schaller M, Kretschmar M, Nichterlein T, de Groot P, Schäfer W, Klis F, Monod M and Hube B (2004). Sap9 and Sap10 of *Candida albicans*: localization, function and their relevance for virulence. *ASM Conference on Candida and Candidosis*, 18-22 March 2004, Austin, Texas, Abstract No. 217.
- 6 Andreeva NS and Rumsh LD (2001). Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Sci* 10(12): 2439-50.
- 7 Anonymous (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 5): 760-3.
- 8 Antonov VK, Ginodman LM, Kapitannikov YV, Barshevskaya TN, Gurova AG and Rumsh LD (1978). Mechanism of pepsin catalysis: general base catalysis by the active-site carboxylate ion. *FEBS Lett* 88(1): 87-90.

- 9 Antonov VK, Ginodman LM, Rumsh LD, Kapitannikov YV, Barshevskaya TN, Yavashev LP, Gurova AG and Volkova LI (1981). Studies on the mechanisms of action of proteolytic enzymes using heavy oxygen exchange. *Eur J Biochem* 117(1): 195-200.
- 10 Bailey D, Cooper JB, Veerapandian B, Blundell TL, Atrash B, Jones DM and Szelke M (1993). X-ray-crystallographic studies of complexes of pepstatin A and a statine-containing human renin inhibitor with endothiapepsin. *Biochem J* 289 ( Pt 2): 363-71.
- 11 Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur MV, Sowder RC, 2nd, Cachau RE, Collins J, Silva AM and Erickson JW (1993). Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14): 6796-800.
- 12 Barrett AJ (1980). Ciba Foundation, Ed. Introduction: the classification of proteinases. Symposium on Protein Degradation in Health and Disease, Amsterdam, Excerpta Medica: 1-13.
- 13 Bektic J, Lell CP, Fuchs A, Stoiber H, Speth C, Lass-Flörl C, Borg-von Zepelin M, Dierich MP and Würzner R (2001). HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31(1): 65-71.
- 14 Böhm HJ, Klebe, G, Kubinyi, H, Ed. (2002, 2<sup>nd</sup> edition). *Wirkstoffdesign*. Heidelberg Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- 15 Bordas B, Komives T and Lopata A (2003). Ligand-based computer-aided pesticide design. A review of applications of the CoMFA and CoMSIA methodologies. *Pest Manag Sci* 59(4): 393-400.
- 16 Borg M and Röchel R (1988). Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* 56(3): 626-31.
- 17 Borg-von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D and Monod M (1998). The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* 28(3): 543-54.
- 18 Borg-von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A and Monod M (1999). HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans*

- strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol* 113(5): 747-51.
- 19 Bott R, Subramanian E and Davies DR (1982). Three-dimensional structure of the complex of the *Rhizopus chinensis* carboxyl proteinase and pepstatin at 2.5-Å resolution. *Biochemistry* 21(26): 6956-62.
  - 20 Bracher F (2001). Antimykotische Wirkstoffe. In Lokale Pilzinfektionen. Bayerische Landesapothekerkammer (ed.). München, GOVI. Schriftenreihe der Bayerischen Landesapothekerkammer Heft 62: 47-65.
  - 21 Bruenger A (1992). The free r value: A novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355: 472-74.
  - 22 Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T and Warren GL (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 5): 905-21.
  - 23 Calderone RA and Fonzi A (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 327-35.
  - 24 Cannon RD, Timberlake WE, Gow NA, Bailey D, Brown A, Gooday GW, Hube B, Monod M, Nombela C, Navarro F and et al. (1994). Molecular biological and biochemical aspects of fungal dimorphism. *J Med Vet Mycol* 32 Suppl 1: 53-64.
  - 25 Capa L, Mendoza A, Lavandera JL, Gomez de las Heras F and Garcia-Bustos JF (1998). Translation elongation factor 2 is part of the target for a new family of antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* 42(10): 2694-9.
  - 26 Capobianco JO, Lerner CG and Goldman RC (1992). Application of a fluorogenic substrate in the assay of proteolytic activity and in the discovery of a potent inhibitor of *Candida albicans* aspartic proteinase. *Anal Biochem* 204(1): 96-102.
  - 27 Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, Ram AF, van den Ende H and Klis FM (1997). In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13(15): 1477-89.

- 28 Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T and Agatensi L (1987). Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* 156(5): 777-83.
- 29 Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M and Cauda R (1999). In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis* 180(2): 448-53.
- 30 Cassone A, Tacconelli E, De Bernardis F, Tumbarello M, Torosantucci A, Chiani P and Cauda R (2002). Antiretroviral therapy with protease inhibitors has an early, immune reconstitution-independent beneficial effect on *Candida* virulence and oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Infect Dis* 185(2): 188-95.
- 31 Cauda R, Tacconelli E, Tumbarello M, Morace G, De Bernardis F, Torosantucci A and Cassone A (1999). Role of protease inhibitors in preventing recurrent oral candidosis in patients with HIV infection: a prospective case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 21(1): 20-5.
- 32 Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D and Martinez JP (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1): 130-80.
- 33 Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P and de Repentigny L (1996). Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* 64(11): 4514-9.
- 34 Cunningham EL and Agard DA (2004). Disabling the folding catalyst is the last critical step in alpha-lytic protease folding. *Protein Sci* 13(2): 325-31.
- 35 Cutfield SM, Dodson EJ, Anderson BF, Moody PC, Marshall CJ, Sullivan PA and Cutfield JF (1995). The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* in complexes with two inhibitors. *Structure* 3(11): 1261-71.
- 36 Cutler JE (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45: 187-218.

- 37 Dash C and Rao M (2001). Interactions of a novel inhibitor from an extremophilic *Bacillus* sp. with HIV-1 protease: implications for the mechanism of inactivation. *J Biol Chem* 276(4): 2487-93.
- 38 Davies DR (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 19: 189-215.
- 39 De Bernardis F, Agatensi L, Ross IK, Emerson GW, Lorenzini R, Sullivan PA and Cassone A (1990). Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 161(6): 1276-83.
- 40 De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schäfer W and Cassone A (1999). Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* 179(1): 201-8.
- 41 De Bernardis F, Boccanera M, Rainaldi L, Guerra CE, Quinti I and Cassone A (1992). The secretion of aspartyl proteinase, a virulence enzyme, by isolates of *Candida albicans* from the oral cavity of HIV-infected subjects. *Eur J Epidemiol* 8(3): 362-7.
- 42 De Bernardis F, Cassone A, Sturtevant J and Calderone R (1995). Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. *Infect Immun* 63(5): 1887-92.
- 43 De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G, Quinti I, Sullivan PA and Cassone A (1996). Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* 64(2): 466-71.
- 44 de Bernardis F, Mondello F, Scaravelli G, Pachi A, Girolamo A, Agatensi L and Cassone A (1999). High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol* 37(5): 1376-80.
- 45 de Kruijff B and Demel RA (1974). Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochim Biophys Acta* 339(1): 57-70.

- 46 de Repentigny L, Aumont F, Bernard K and Belhumeur P (2000). Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* 68(6): 3172-9.
- 47 Degitz K, Korting, HC (2001). Erkrankungen durch Hefepilze. *In Lokale Pilzinfektionen*. Bayerische Landesapothekerkammer (ed.). München, GOVI. Schriftenreihe der Bayerischen Landesapothekerkammer Heft 62: 33-36.
- 48 DeLano WL (2006). PyMOL Reference Manual. San Carlos, CA, DeLano Scientific LLC.
- 49 Dhanaraj V, Dealwis CG, Frazao C, Badasso M, Sibanda BL, Tickle IJ, Cooper JB, Driessen HP, Newman M, Aguilar C and et al. (1992). X-ray analyses of peptide-inhibitor complexes define the structural basis of specificity for human and mouse renins. *Nature* 357(6378): 466-72.
- 50 Diz Dios P, Ocampo A, Miralles C, Otero I, Iglesias I and Rayo N (1999a). Frequency of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients on protease inhibitor therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 87(4): 437-41.
- 51 Diz Dios P, Otero Varela I, Iglesias Martin I, Ocampo Hermida A and Martinez Vazquez C (1999b). Failure of indinavir to inhibit *Candida albicans* in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18(10): 755-6.
- 52 Douglas CM (2001). Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med Mycol* 39 Suppl 1: 55-66.
- 53 Douglas CM, D'Ippolito JA, Shei GJ, Meinz M, Onishi J, Marrinan JA, Li W, Abruzzo GK, Flattery A, Bartizal K, Mitchell A and Kurtz MB (1997). Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 41(11): 2471-9.
- 54 Douglas CM, Marrinan JA, Li W and Kurtz MB (1994). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3-beta-D-glucan synthase. *J Bacteriol* 176(18): 5686-96.

- 55 Drenth J (1999). Principles of Protein X-Ray Crystallography. New York, Springer Verlag.
- 56 Dutcher JD (1968). The discovery and development of amphotericin B. Dis Chest 54: Suppl 1:296-8.
- 57 Ebiike H, Masubuchi M, Liu P, Kawasaki K, Morikami K, Sogabe S, Hayase M, Fujii T, Sakata K, Shindoh H, Shiratori Y, Aoki Y, Ohtsuka T and Shimma N (2002). Design and synthesis of novel benzofurans as a new class of antifungal agents targeting fungal N-myristoyltransferase. Part 2. Bioorg Med Chem Lett 12(4): 607-10.
- 58 Edison AM and Manning-Zweerink M (1988). Comparison of the extracellular proteinase activity produced by a low-virulence mutant of *Candida albicans* and its wild-type parent. Infect Immun 56(5): 1388-90.
- 59 Emsley P and Cowtan K (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60(Pt 12 Pt 1): 2126-32.
- 60 Engh RA and Huber R (1991). Accurate bond and angle parameters for x-ray protein-structure refinement. Acta Crystallogr Section A 47: 392-400.
- 61 Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E and Tamburini P (1997). Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. Infect Immun 65(2): 551-6.
- 62 Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, Sanglard D, Korting HC, Schäfer W and Hube B (2002). *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. Infect Immun 70(7): 3689-700.
- 63 Felk A, Schäfer W, Hube B (2000). *Candida albicans* secretory aspartic proteinase (SAP10) gene. Accession No. AF146440.
- 64 Fidel PL Jr., Vazquez JA and Sobel JD (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev 12(1): 80-96.

- 65 Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J and Rossier M (1998). Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol* 36(2): 395-401.
- 66 Folkers G (1994). *Pharm Ztg* 139: 267.
- 67 Fruton JS (1976). The mechanism of the catalytic action of pepsin and related acid proteinases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 44: 1-36.
- 68 Fujinaga M, Chernaia MM, Tarasova NI, Mosimann SC and James MN (1995). Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. *Protein Sci* 4(5): 960-72.
- 69 Fusek M, Smith EA, Monod M, Dunn BM and Foundling SI (1994). Extracellular aspartic proteinases from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* yeasts differ substantially in their specificities. *Biochemistry* 33(32): 9791-9.
- 70 Georgopapadakou NH and Walsh TJ (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother* 40(2): 279-91.
- 71 Gill SC and von Hippel PH (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182(2): 319-26.
- 72 Gokhale VM and Kulkarni VM (1999). Comparative molecular field analysis of fungal squalene epoxidase inhibitors. *J Med Chem* 42(26): 5348-58.
- 73 Goldman RC, Frost DJ, Capobianco JO, Kadam S, Rasmussen RR and Abad-Zapatero C (1995). Antifungal drug targets: *Candida* secreted aspartyl protease and fungal wall beta-glucan synthesis. *Infect Agents Dis* 4(4): 228-47.
- 74 Good AC and Mason JS (1995). Three-dimensional structure database searches. *Rev Comp Chem* 7: 67-117.
- 75 Gruber A, Berlit J, Speth C, Lass-Flörl C, Kofler G, Nagl M, Borg-von Zepelin M, Dierich MP and Würzner R (1999a). Dissimilar attenuation of *Candida albicans* virulence properties by human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Immunobiology* 201(1): 133-44.

- 76 Gruber A, Speth C, Lukasser-Vogl E, Zangerle R, Borg-von Zepelin M, Dierich MP and Würzner R (1999b). Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor attenuates *Candida albicans* virulence properties in vitro. *Immunopharmacology* 41(3): 227-34.
- 77 Gschwend DA, Good AC and Kuntz ID (1996). Molecular docking towards drug discovery. *J Mol Recognit* 9(2): 175-86.
- 78 Guex N and Peitsch MC (1997). Swiss-model and the swiss-pdbviewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-23.
- 79 Heeres J, Backx LJ, Mostmans JH and Van Cutsem J (1979). Antimycotic imidazoles. part 4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally active broad-spectrum antifungal agent. *J Med Chem* 22(8): 1003-5.
- 80 Hoegl L, Korting HC and Klebe G (1999). Inhibitors of aspartic proteases in human diseases: molecular modeling comes of age. *Pharmazie* 54(5): 319-29.
- 81 Hoegl L, Thoma-Greber E, Röcken M and Korting HC (1998). HIV protease inhibitors influence the prevalence of oral candidosis in HIV-infected patients: a 2-year study. *Mycoses* 41(7-8): 321-5.
- 82 Hood S, Bonington A, Evans J and Denning D (1998). Reduction in oropharyngeal candidiasis following introduction of protease inhibitors. *Aids* 12(4): 447-8.
- 83 Hube B (1996). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 7(1): 55-69.
- 84 Hube B (2004). From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 7(4): 336-41.
- 85 Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ and Gow NA (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 14(1): 87-99.
- 86 Hube B and Naglik J (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147(Pt 8): 1997-2005.

- 87 Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Monod M, Schäfer W, Brown AJ and Gow NA (1997). Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* 65(9): 3529-38.
- 88 Hube B, Sanglard, D, Monod, M, Brown, AJP, Gow, NAR (1997b). Extracellular proteolytic activity of *Candida species*. In Proceedings of the Fifth Symposium on Topic in Mycology: Host-Fungus Interplay, Stanford, California, USA, June 27-30, 1995. HS Vanden Bossche, D. A.; Odds, F. C. (ed.), Bethesda: National Foundation for Infectious Diseases: 109-122.
- 89 Hunter WN (1997). A structure-based approach to drug discovery; crystallography and implications for the development of antiparasite drugs. *Parasitology* 114 Suppl: S17-29.
- 90 James MN, Sielecki A, Salituro F, Rich DH and Hofmann T (1982). Conformational flexibility in the active sites of aspartyl proteinases revealed by a pepstatin fragment binding to penicillopepsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(20): 6137-41.
- 91 James MN, Sielecki AR, Hayakawa K and Gelb MH (1992). Crystallographic analysis of transition state mimics bound to penicillopepsin: difluorostatine- and difluorostatone-containing peptides. *Biochemistry* 31(15): 3872-86.
- 92 Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R and Thorner J (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* 37(3): 1075-89.
- 93 Kawasaki K, Masubuchi M, Morikami K, Sogabe S, Aoyama T, Ebiike H, Niizuma S, Hayase M, Fujii T, Sakata K, Shindoh H, Shiratori Y, Aoki Y, Ohtsuka T and Shimma N (2003). Design and synthesis of novel benzofurans as a new class of antifungal agents targeting fungal N-myristoyltransferase. Part 3. *Bioorg Med Chem Lett* 13(1): 87-91.
- 94 Kayser FH, Bienz, KA, Eckert, J, Zinkernagel, RM (1998). *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag.
- 95 Keates RA (1981). Griseofulvin at low concentration inhibits the rate of microtubule polymerization in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 102(2): 746-52.

- 96 Kempf DJ, Marsh KC, Denissen JF, McDonald E, Vasavanonda S, Flentge CA, Green BE, Fino L, Park CH, Kong XP and et al. (1995). ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 2484-8.
- 97 Kleywegt G and Jones T (1994). Halloween ... Masks and Bones. Warrington, SERC Daresbury Laboratory.
- 98 Kleywegt GJ and Jones TA (1996). Efficient rebuilding of protein structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52(Pt 4): 829-32.
- 99 Kleywegt GJ and Jones TA (1998). Databases in protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 6 Pt 1): 1119-31.
- 100 Knowles JR (1970). On the mechanism of action of pepsin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 257(813): 135-46.
- 101 Koelsch G, Tang J, Loy JA, Monod M, Jackson K, Foundling SI and Lin X (2000). Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1480(1-2): 117-31.
- 102 Korting HC and Schaller M (2001). Neue Entwicklungen in der medizinischen Mykologie [New developments in medical mycology]. *Hautarzt* 52(2): 91-7.
- 103 Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U and Hube B (1999). Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 43(8): 2038-42.
- 104 Kraulis PJ (1991). Molscript - a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 24: 946-50.
- 105 Kretschmar M, Hube B, Bertsch T, Sanglard D, Merker R, Schroder M, Hof H and Nichterlein T (1999). Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun* 67(12): 6637-42.

- 106 Kumamoto CA and Vinces MD (2005). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 7(11): 1546-54.
- 107 Kurtz MB and Douglas CM (1997). Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J Med Vet Mycol* 35(2): 79-86.
- 108 Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C and Magee PT (1985). Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 49(3): 571-5.
- 109 Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
- 110 Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS and Thornton JM (1993). Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26(283-91).
- 111 Leitner KH, Ed. (2003). Von der Idee zum Markt: Die 50 besten Innovationen Österreichs. Erfolgsgeschichten der österreichischen Industrie zwischen 1975 und 2000. Wien, Böhlau Verlag.
- 112 Lewis RA and Leach AR (1994). Current methods for site-directed structure generation. *J Comput Aided Mol Des* 8(4): 467-75.
- 113 Liu J and Balasubramanian MK (2001). 1,3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. *Curr Drug Targets Infect Disord* 1(2): 159-69.
- 114 Macdonald F and Odds FC (1983). Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 129(2): 431-8.
- 115 Mach H, Middaugh CR and Lewis RV (1992). Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal Biochem* 200(1): 74-80.
- 116 Martin YC (1992). 3D database searching in drug design. *J Med Chem* 35(12): 2145-54.

- 117 McPherson A (1982). Preparation and Analysis of Protein Crystals. New York, Wiley & Sons.
- 118 McPherson A (2002). Introduction to Macromolecular Crystallography. New York, Wiley & Sons.
- 119 Metcalf P and Fusek M (1993). Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. *Embo J* 12(4): 1293-302.
- 120 Miller M, Jaskolski M, Rao JK, Leis J and Wlodawer A (1989). Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* 337(6207): 576-9.
- 121 Mitchison TJ (1994). Towards a pharmacological genetics. *Chem Biol* 1(1): 3-6.
- 122 Monod M, Borg-von Zepelin M, Telenti A and Sanglard D (1999). The inhibition of *Candida albicans*-secreted aspartic proteases by three different HIV protease inhibitors. *Dermatology* 198(4): 412-4.
- 123 Monod M, Hube B, Hess D and Sanglard D (1998). Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 144 ( Pt 10): 2731-7.
- 124 Monod M, Togni G, Hube B and Sanglard D (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 13(2): 357-68.
- 125 Morrison CJ, Hurst SF, Bragg SL, Kuykendall RJ, Diaz H, McLaughlin DW and Reiss E (1993). Purification and characterization of the extracellular aspartyl proteinase of *Candida albicans*: removal of extraneous proteins and cell wall mannoprotein and evidence for lack of glycosylation. *J Gen Microbiol* 139 Pt 6: 1177-86.
- 126 Morrow B, Srikantha T and Soll DR (1992). Transcription of the gene for a pepsinogen, PEP1, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 12(7): 2997-3005.
- 127 Naglik J, Albrecht A, Bader O and Hube B (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6(10): 915-26.

- 128 Naglik JR, Challacombe SJ and Hube B (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(3): 400-28, table of contents.
- 129 Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, Sweet SP, Challacombe SJ and Agabian N (1999). In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun* 67(5): 2482-90.
- 130 Nicholls A, Sharp KA and Honig B (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11(4): 281-96.
- 131 Nielsen J (1994). Combinatorial Chemistry. *Chem Ind* 22: 902-05.
- 132 Nolting S, Fegeler, K (1993). *Medizinische Mykologie*. Heidelberg Berlin New York.
- 133 Nussbaumer P, Dorfstatter G, Leitner I, Mraz K, Vyplél H and Stutz A (1993). Synthesis and structure-activity relationships of naphthalene-substituted derivatives of the allylamine antimycotic terbinafine. *J Med Chem* 36(19): 2810-6.
- 134 Nyfeler R and Keller-Schierlein W (1974). [Metabolites of microorganisms. 143. Echinocandin B, a novel polypeptide-antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: isolation and structural components]. *Helv Chim Acta* 57(8): 2459-77.
- 135 Odds FC (1988). *Candida* and Candidosis. Baillière Tindall, London, 2<sup>nd</sup> edition.
- 136 Odds FC (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* 31(3 Pt 2): S2-5.
- 137 Ogrydziak DM (1993). Yeast extracellular proteases. *Crit Rev Biotechnol* 13(1): 1-55.
- 138 Ohshima T, Miyakoshi S and Isono F (2004). FKS1 mutations responsible for selective resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to the novel 1,3-beta-glucan synthase inhibitor arborcandin C. *Antimicrob Agents Chemother* 48(1): 319-22.
- 139 Ollert MW, Söhnchen R, Korting HC, Ollert U, Bräutigam S and Bräutigam W (1993). Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* 61(11): 4560-8.

- 140 Ollert MW, Wende C, Görlich M, McMullan-Vogel CG, Borg-von Zepelin M, Vogel CW and Korting HC (1995). Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 33(10): 2543-9.
- 141 Otwinowski Z and Minor W (1997). Macromolecular Crystallography. *In* *Methods in Enzymology*. CW Carter and RM Sweet (ed.). London, Academic Press. 276: 307.
- 142 Parris KD, Hoover DJ, Damon DB and Davies DR (1992). Synthesis and crystallographic analysis of two rhizopuspepsin inhibitor complexes. *Biochemistry* 31(35): 8125-41.
- 143 Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S and Hollis RJ (2000). Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 44(3): 747-51.
- 144 Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB and Wenzel RP (1998). National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 31(1): 327-32.
- 145 Pichova I, Pavlickova L, Dostal J, Dolejsi E, Hruskova-Heidingsfeldova O, Weber J, Ruml T and Soucek M (2001). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 268(9): 2669-77.
- 146 Polak A (1999). Ancotil flucytosin: status quo & perspektiven. *In*. WD ICN (ed.). München, Utz.
- 147 Popov AN and Bourenkov GP (2003). Choice of data-collection parameters based on statistic modelling. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59(Pt 7): 1145-53.
- 148 Ray TL and Payne CD (1988). Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infect Immun* 56(8): 1942-9.

- 149 Ray TL and Payne CD (1990). Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 58(2): 508-14.
- 150 Rhodes G (2006). *Crystallography made crystal clear*. San Diego, Academic Press.
- 151 Rieth H (1975). Systematic und Morphologie der pathogenen Pilze. *In Mykosen*. JL Hartung, D. (ed.). Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 5-29.
- 152 Ringe D (1995). Structure-aided drug design: crystallography and computational approaches. *J Nucl Med* 36(6 Suppl): 28S-30S.
- 153 Roobol A, Gull K and Pogson CI (1976). Inhibition by griseofulvin of microtubule assembly in vitro. *FEBS Lett* 67(3): 248-51.
- 154 Ross IK, De Bernardis F, Emerson GW, Cassone A and Sullivan PA (1990). The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 136(4): 687-94.
- 155 Rüchel R, Ritter B and Schaffrinski M (1990). Modulation of experimental systemic murine candidosis by intravenous pepstatin. *Zentralbl Bakteriol* 273(3): 391-403.
- 156 Rüchel R, Uhlemann K and Boning B (1983). Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 255(4): 537-48.
- 157 Ruhnke M (2002). Skin and mucous membrane infections. *In Candida and Candidiasis*. RA Calderone (ed.). Washington DC, American Society for Microbiological Press: 307-325.
- 158 Schaller M, Bein M, Korting HC, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S and Hube B (2003). The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* 71(6): 3227-34.
- 159 Schaller M, Hube B, Ollert MW, Schäfer W, Borg-von Zepelin M, Thoma-Greber E and Korting HC (1999). In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted

- aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol* 112(3): 383-6.
- 160 Schaller M, Januschke E, Schackert C, Woerle B and Korting HC (2001). Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis in vivo. *J Med Microbiol* 50(8): 743-7.
- 161 Schaller M, Schäfer W, Korting HC and Hube B (1998). Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* 29(2): 605-15.
- 162 Sielecki AR, Fedorov AA, Boodhoo A, Andreeva NS and James MN (1990). Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 214(1): 143-70.
- 163 Sloboda RD, Van Blaricom G, Creasey WA, Rosenbaum JL and Malawista SE (1982). Griseofulvin: association with tubulin and inhibition of in vitro microtubule assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 105(3): 882-8.
- 164 Sobel JD (1988). Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann N Y Acad Sci* 544: 547-57.
- 165 Sobel JD (1992). Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis* 14 Suppl 1: S148-53.
- 166 Stewart K and Abad-Zapatero C (2001). *Candida* proteases and their inhibition: prospects for antifungal therapy. *Curr Med Chem* 8(8): 941-8.
- 167 Stewart KW, Goldman RC and Abad-Zapatero C (1999). The secreted proteinases from *Candida*: challenges for structure-aided drug design. In *Proteases of infectious agents*. BM Dunn (ed.). San Diego, Academic Press: 117-138.
- 168 Storoni LC, McCoy AJ and Read RJ (2004). Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 3): 432-8.

- 169 Suguna K, Padlan EA, Bott R, Boger J, Parris KD and Davies DR (1992). Structures of complexes of rhizopuspepsin with pepstatin and other statine-containing inhibitors. *Proteins* 13(3): 195-205.
- 170 Suguna K, Padlan EA, Smith CW, Carlson WD and Davies DR (1987). Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(20): 7009-13.
- 171 Sweet SP (1997). Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. *Oral Dis* 3 Suppl 1: S88-95.
- 172 Symersky J, Monod M and Foundling SI (1997). High-resolution structure of the extracellular aspartic proteinase from *Candida tropicalis* yeast. *Biochemistry* 36(42): 12700-10.
- 173 Szecsi PB (1992). The aspartic proteases. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 210: 5-22.
- 174 Taylor BN, Hannemann H, Sehnal M, Biesecker A, Schweizer A, Rollinghoff M and Schroppel K (2005). Induction of SAP7 correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice. *Infect Immun* 73(10): 7061-3.
- 175 Thanos M, Schonian G, Meyer W, Schweynoch C, Graser Y, Mitchell TG, Presber W and Tietz HJ (1996). Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol* 34(3): 615-21.
- 176 Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-80.
- 177 Tietz HJ, Nenoff, P, Ullmann, AJ (2005). *Organmykosen auf einen Blick: Diagnostik und Therapie lebensbedrohlicher Pilzinfektionen*. Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag.
- 178 Tietz HJ, Sterry W (2006). *Einteilung der Antimykotika und Wirkmechanismen*. Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag.

- 179 Tsuobi R, Kurita Y, Negi M and Ogawa H (1985). A specific inhibitor of keratinolytic proteinase from *Candida albicans* could inhibit the cell growth of *C. albicans*. *J Invest Dermatol* 85(5): 438-40.
- 180 Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M and Hamada M (1970). Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 23(5): 259-62.
- 181 Vagin A and Teplyakov A (2000). An approach to multi-copy search in molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 12): 1622-4.
- 182 Vaguine AA, Richelle J and Wodak SJ (1999). SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(Pt 1): 191-205.
- 183 Valdez H, Gripshover BM, Salata RA and Lederman MM (1998). Resolution of azole-resistant oropharyngeal candidiasis after initiation of potent combination antiretroviral therapy. *Aids* 12(5): 538.
- 184 Veerapandian B, Cooper JB, Sali A, Blundell TL, Rosati RL, Dominy BW, Damon DB and Hoover DJ (1992). Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral "intermediate" of aspartic proteinases. *Protein Sci* 1(3): 322-8.
- 185 Vicente MF, Basilio A, Cabello A and Pelaez F (2003). Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect* 9(1): 15-32.
- 186 von Heijne G (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 184(1): 99-105.
- 187 Watts HJ, Cheah FS, Hube B, Sanglard D and Gow NA (1998). Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol Lett* 159(1): 129-35.
- 188 Weber IT, Miller M, Jaskolski M, Leis J, Skalka AM and Wlodawer A (1989). Molecular modeling of the HIV-1 protease and its substrate binding site. *Science* 243(4893): 928-31.

- 189 Weber K, Wehland J and Herzog W (1976). Griseofulvin interacts with microtubules both in vivo and in vitro. *J Mol Biol* 102(4): 817-29.
- 190 White TC and Agabian N (1995). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol* 177(18): 5215-21.
- 191 White TC, Miyasaki SH and Agabian N (1993). Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 175(19): 6126-33.
- 192 Wu T, Samaranayake LP, Cao BY and Wang J (1996). In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol* 44(4): 311-6.
- 193 Zotter C, Haustein UF, Schonborn C, Grimmecke HD and Wand H (1990). Die Wirkung von Pepstatin A auf die *Candida albicans*-Infektion der Maus [Effect of pepstatin A on *Candida albicans* infection in the mouse]. *Dermatol Monatsschr* 176(2-3): 189-98.

## 9 Abkürzungen

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>AIDS:</b>               | acquired immunodeficiency syndrome                             |
| <b>AM:</b>                 | Antimykotika   |
| <b>APS:</b>                | Ammoniumperoxodisulfat   |
| <b>aSap3:</b>              | Sap3 Apoenzym  |
| <b><i>C. albicans:</i></b> | <i>Candida albicans</i>  |
| <b>C-ent loops:</b>        | C-terminale Eingangs-loops                                     |
| <b>CM:</b>                 | Carboxymethyl  |
| <b>DEAE:</b>               | Diethylaminoethyl  |
| <b>DESY:</b>               | Deutsches Elektronensynchrotron                                |
| <b>DMSO:</b>               | Dimethylsulfoxid   |
| <b>E:</b>                  | Extinktion   |
| <b>ECB:</b>                | Echinocandin B   |
| <b>EF:</b>                 | Elongationfaktor   |
| <b>5-FC:</b>               | Flucytosin   |
| <b>5-FU:</b>               | 5-Fluorouracil   |
| <b>GPI:</b>                | Glycosylphosphatidylinositol                                   |
| <b>GS:</b>                 | D-Glucan-Synthase  |
| <b>HEPES:</b>              | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure                 |
| <b>HIV:</b>                | humanes Immundefizienz Virus                                   |
| <b>IC<sub>50</sub>:</b>    | Konzentration eines Inhibitors bei 50% inhibitorischer Wirkung |
| <b>IgA:</b>                | Immunoglobulin A   |

---

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>KBE:</b>              | koloniebildenden Einheit  |
| <b>MAD:</b>              | <i>multiple anomalous dispersion</i>                              |
| <b>MES:</b>              | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure                                  |
| <b>MIR:</b>              | <i>multiple isomorphous replacement</i>                           |
| <b>MR:</b>               | <i>molecular replacement</i>                                      |
| <b>MWCO:</b>             | <i>molecular weight cut-off</i>                                   |
| <b>N-ent loop:</b>       | N-terminaler Eingangs- <i>loop</i>                                |
| <b>NMR:</b>              | Nuklearmagnetresonanz (Spektroskopie)                             |
| <b>PCR:</b>              | <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion       |
| <b>PEG:</b>              | Polyethylenglycol   |
| <b>pSap3:</b>            | Sap3-Pepstatin A Komplex  |
| <b>OD<sub>600</sub>:</b> | optische Dichte bei Licht der Wellenlänge von 600 nm              |
| <b>RHE:</b>              | Rekonstituiertes humanes Epithel                                  |
| <b>rms:</b>              | <i>root mean square</i>   |
| <b>Sap:</b>              | Sezernierte Aspartatproteinase                                    |
| <b>SDS:</b>              | <i>sodium dodecyl sulphate</i> ; Natriumdodecylsulfat             |
| <b>SDS-PAGE:</b>         | diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| <b>TEMED:</b>            | Tetramethylethyldiamin  |
| <b>ÜNK:</b>              | Übernacht-Kultur  |
| <b>UV Licht:</b>         | ultraviolettes Licht  |
| <b>YNB:</b>              | Yeast Nitrogen Base   |
| <b>YPD:</b>              | Yeast-Extract-Peptide-Dextrose                                    |

## 10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. G. Plewig sowie Herrn Prof. Dr. med T. Ruzicka danke ich für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München promoviert zu werden.

Herrn Prof. Dr. med. H.C. Korting gilt mein Dank für die Stellung des sehr interessanten Themas, für die konstruktive Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie das fortwährende Interesse an meiner Arbeit.

Frau Dr. med. C. Borelli danke ich für die Betreuung, Unterstützung und das stets sehr rege Interesse am Fortschreiten der Promotionsarbeit.

Mein Dank gilt der OPO-Stiftung, Zürich, für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Ich danke dem gesamten Arbeitskreis von Prof. Dr. H.C. Korting, insbesondere Frau A. Kiesslinger, Frau J. Laude, Frau E. Januschke, Barbara Beifuss, Alexander Roeder, Günther Weindl und Georg Schulz für die freundliche Aufnahme und die gemeinsame Zeit. Insbesondere Frau A. Kiesslinger danke ich für die konstruktive Unterstützung im Labor. Ein ganz besonderes Danke gilt dabei nochmals Barbara Beifuss für ihre freundschaftliche und moralische Unterstützung sowie für ihr immer offenes Heim.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. R. Huber, Leiter der Abteilung Strukturforschung des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried, für die Bereitstellung der Laboratorien und in-house Mess-Stationen sowie für das Interesse an meiner Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. W. Bode für die gebotene Möglichkeit, die experimentelle Arbeit zu Ende führen zu können.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Klaus Maskos für die großartige fachliche Betreuung bedanken. Seine Unterstützung sowie seine Geduld in der Beantwortung fachlicher Fragen wusste ich sehr zu schätzen.

Ich danke Herrn Dr. M. Monod für die bereitwillige Gabe der Expressionssysteme der Sap-Isoenzyme.

Mein Dank gilt Alexandra Vogelsang und Jung-Hoon Lee für die Unterstützung der experimentellen Arbeiten bei der Proteinreinigung sowie Lösung der Struktur von Sap5.

Dr. Gleb Bourenkov und Dr. Hans Bartunik danke ich für die Bereitstellung der Infrastruktur an der Max-Planck-Beamline BW6 am Deutschen Elektronen Synchrotron, Hamburg.

Ich danke Frau R. Rüller und Frau M. Schneider für die Hilfe bei der Bewältigung bürokratischer Angelegenheiten. Mein Dank gilt auch Herrn W. Dersch und Herrn O. Paul für die Instandhaltung der technischen Einrichtungen der Abteilung Strukturforschung und für die zuverlässige und schnelle Hilfe bei technischen Problemen.

Allen Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung danke ich für die freundschaftliche Aufnahme als „Gastwissenschaftlerin“ und für die angenehme Atmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Klaus Maskos, Charlotte Ungewickell, Christine Rumpf, Dr. Kerstin Rohr, Dr. Cora Keil, Sandra Lepthien, Mekdes Debela, Dr. Anna Tochowicz, Dr. Peter Göttig, Thomas Steiner und Rasso Willkomm.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie insbesondere meinen Eltern und Schwiegereltern für manche tatkräftige Unterstützung, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt zu allerletzt meinem Mann Matthias, der mich zur Durchführung der Promotion ermuntert hat, und mich während der gesamten Promotionszeit mit großer Geduld, Ermutigung sowie physischer als auch psychischer Unterstützung begleitet hat.

# 11 Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name, Vorname: Ruge, Elisabeth (geb. Merk)  
Geburtsdatum: 16.07.1976  
Geburtsort: Uffenheim  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Ausbildungsdaten

1982 – 1995  
Grundschule Sugenheim  
Herzog-Christian-August-Gymnasium Sulzbach-Rosenberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1995 – 1996  
Freiwilliges Soziales Jahr / Auslandsaufenthalt  
Volunteer bei 'Ashburnham Christian Trust'  
East Sussex, England

1996 – 1997  
Studium Lehramt Sonderschule  
LMU München

1997 – 2002  
Studium Pharmazie  
LMU München

06/2002 – 12/2002  
Praktisches Jahr für Apotheker (1. Teil)  
Mohren-Apotheke München

12/2002 – 06/2003  
Praktisches Jahr für Apotheker (2. Teil)  
Apotheke des Bezirkskrankenhauses Haar

17.10.2003  
Approbation zur Apothekerin

10/2003 – 04/2004  
Praktikum bei Fujisawa Deutschland GmbH, München

05/2004  
Beginn der Promotion zum Doktor der Humanbiologie  
Arbeitskreis Prof. Dr. med. H.C. Korting, Klinikum der  
Universität München – Klinik und Poliklinik für Dermatologie  
und Allergologie;  
wissenschaftliches Arbeitsgebiet: Röntgenkristallographie  
(Arbeitskreis Prof. Dr. R. Huber, Strukturforschung,  
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried)

## Publikationen

Ruge E, Korting HC, Borelli C (2005). Current state of three-dimensional characterisation of antifungal targets and its use for molecular modelling in drug design. *Int J Antimicrob Agents* 26:427-41

Ruge E, Borelli C, Maskos K, Monod M, Bode W, Korting HC, Huber R (2005). Structural analyses and enzymic characteristics of the secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*. In HASYLAB Annual Report 2005. Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB am Deutschen Elektronen-Synchrotron DESY. Part II: 535

Borelli C, Ruge E, Schaller M, Monod M, Korting HC, Huber R, Maskos K (2007). The crystal structure of the secreted aspartic proteinase (Sap) 3 from *Candida albicans* and its complex with pepstatin A. *Proteins* (im Druck)

Borelli C, Ruge E, Lee JH, Reckewell A, Schaller M, Monod M, Korting HC, Huber R, Maskos K. X-ray structures of Sap1 and Sap5 - structural comparison of the secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*. Manuskript in Vorbereitung

## Poster

Borelli C, Ruge E, Maskos K, Bode W, Monod M, Korting HC, Huber R (2005). Structural Analyses of the Secreted Aspartic Proteinases (Sap) 3 of *Candida albicans*. 2<sup>nd</sup> international congress on Trends in Medical Mycology (TIMM-2). Berlin, October 23 – 26, 2005.

## Vorträge

Structural analysis and enzymic characteristics of the secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*. 22<sup>nd</sup> Winter School 2005, Proteinases and their Inhibitors, Recent Developments. Tiers, Italien, 2005.

Vom Protein zur dreidimensionalen Struktur: *Methodik der Röntgenstrukturanalyse*. Wissenschaftstag der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. München, 18. November 2006.