

Humanes α_2 -Makroglobulin – eine Variation der Venusfliegenfalle

Cindy Meyer, Winfried Hinrichs* und Ulrich Hahn*

Proteinase-Inhibitoren · Proteinkristallstrukturen · α_2 -Makroglobulin

Proteasen sind allgegenwärtige Enzyme, welche die Spaltung anderer Proteine katalysieren und dabei essentielle Prozesse im Leben eines Individuums steuern. Auf diese Weise üben Proteasen wichtige regulatorische Funktionen auf den Stoffwechsel sowie das Wachstum und die Entwicklung einschließlich Alterung und Tod aller Zellen und Organismen aus.^[1] Proteasen überwachen sowohl die Synthese als auch den Umsatz von Proteinen und sind damit lebenswichtige Regulatoren physiologischer Prozesse.

Wie man schon älteren Lehrbüchern entnehmen kann, werden Proteasen und deren Enzymmechanismen bereits sehr lange in allen biochemischen Facetten untersucht. Wer erinnert sich nicht an die katalytische Triade der Serin-Proteasen aus der Biochemie-Grundvorlesung? Ein Charakteristikum der hydrolytischen Spaltung der Serin-Proteasen ist die Bildung des Acyl-Enzym-Intermediats im ersten Reaktionsschritt, wobei eines der beiden Spaltprodukte temporär kovalent am Enzym bindet. Die Hydrolyse im zweiten Reaktionsschritt bewirkt dann die Freisetzung des anderen Spaltprodukts, wodurch der Ausgangszustand des Enzyms wieder hergestellt wird.

Vom medizinisch-therapeutischen Standpunkt her sind Proteasen aufgrund ihrer wichtigen regulatorischen Funktionen vielversprechende Zielobjekte. Endogene sowie exogene Faktoren können zu einer unausgeglichenen Aktivität von Proteasen führen und so Entzündungs- oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen begünstigen.^[2] Eine ungeheuer fein abgestufte Regulation von Proteinsynthese und -abbau ist daher von elementarer Bedeutung und muss mit höchster Präzision kontrolliert werden. Bei dieser Regulation nehmen Protease-Inhibitoren eine Schlüsselfunktion ein.

Proteasen werden in zwei Gruppen eingeteilt: in Exopeptidasen, die Proteine vom N- und C-Terminus her Aminosäure für Aminosäure abbauen, und in Endopeptidasen, auch Proteininasen genannt, die ein Protein innerhalb der Polypeptidkette spalten.^[3] Proteininasen wiederum werden entsprechend ihrer katalytisch aktiven Zentren in vier Klassen unterteilt: Serin-, Aspartat-, Cystein- und Metalloproteininasen. Üblicherweise sind Proteininasen als erste in den Proteinabbau involviert.

Bei den Proteinase-Inhibitoren unterscheidet man klassenspezifische und unspezifische Proteinase-Inhibitoren.^[3] Klassenspezifische Inhibitoren können jeweils nur eine der oben genannten Proteininasen blockieren^[3] und sind kleiner als die unspezifischen Proteinase-Inhibitoren. Ihre hohe Spezifität limitiert zwar das Spektrum der Zielmoleküle, vermindert aber nicht ihre Bedeutung für physiologische Prozesse in einem Organismus und damit auch nicht ihre medizinische Relevanz.

Der bovine pankreatische Trypsin-Inhibitor (BPTI) war der erste spezifische Serin-Proteinase-Inhibitor, dessen Röntgenstrukturanalyse bei atomarer Auflösung von Huber und Mitarbeitern im Jahr 1970 publiziert wurde.^[4] BPTI – auch als Aprotinin oder Trasylol bekannt – ist ein kleines Polypeptid aus 58 Aminosäuren, das neben Trypsin auch andere Serin-Proteininasen inhibiert. Vier Jahre später konnten Huber und Bode in Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern die Struktur des Komplexes aus BPTI und Trypsin veröffentlichen.^[5] BPTI blockiert die Zielproteininasen, indem es mit diesen stabile, in einer Sackgasse endende Komplexe bildet (Abbildung 1). Trasylol wurde viele Jahre als blutungsstillendes Medikament in der Herzchirurgie eingesetzt.^[6] Als sich jedoch herausstellte, dass die Anwendung von Trasylol – beispielsweise während Bypass-Operationen – bei Erwachsenen mit einer erhöhten Mortalität einherging, wurde dessen Anwendung seit 2008 stark eingeschränkt.^[7]

Unspezifische Proteinase-Inhibitoren werden einzeln durch die α -Makroglobuline repräsentiert. Diese sind in der Lage, Proteininasen aller vier Klassen zu inhibieren.^[3] Die α -Makroglobuline sind hochmolekulare Glycoproteine, deren Strukturen und Funktionen aktuell in einer Vielzahl verschiedener Organismen untersucht werden. Die α -Makroglobuline machen etwa 10 % der gesamten Serum-Proteine aus.^[3,8] Ihr breites Wirkungsspektrum erlaubt es ihnen, an der Regulation einer Vielzahl von physiologischen Prozessen, wie der Blutgerinnung und Entzündungsreaktionen,

[*] Dr. C. Meyer, Prof. Dr. U. Hahn
Institut für Biochemie & Molekularbiologie
Fachbereich Chemie, MIN-Fakultät, Universität Hamburg
Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg (Deutschland)
E-Mail: uli.hahn@uni-hamburg.de
Homepage: <http://www.chemie.uni-hamburg.de/bc/hahn/index.html>
Prof. Dr. W. Hinrichs
Institut für Biochemie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Str. 4, 17489 Greifswald (Deutschland)
E-Mail: winfried.hinrichs@uni-greifswald.de
Homepage: <http://www.chemie.uni-greifswald.de/~biochem/>

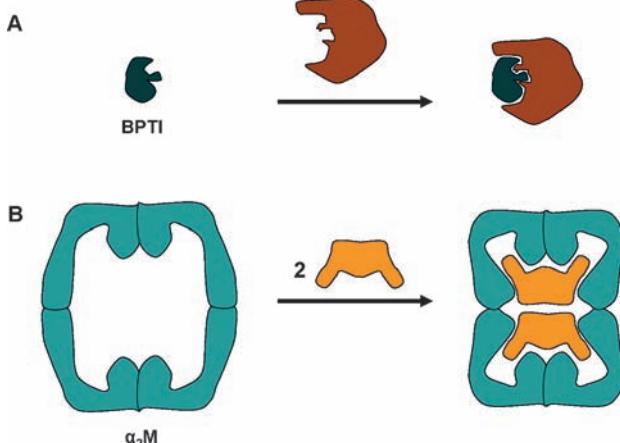


Abbildung 1. Inhibition von Proteinasen durch Proteinase-Inhibitoren. A) Der klassenspezifische bovine pankreatische Trypsininhibitor (BPTI, 58 Aminosäuren) bindet das aktive Zentrum der Proteinase Trypsin und inhibiert dessen proteolytische Aktivität. B) Der deutlich größere unspezifische Proteinase-Inhibitor α_2 -Makroglobulin (α_2 M, Tetramer, ca. 6000 Aminosäuren) bindet verschiedene Zielproteinasen kovalent innerhalb einer Köderregion. Dies führt zu dessen Strukturänderung und zum Einfangen der Proteinase im Inneren des tetrameren α_2 M. Dieser Mechanismus erinnert an eine Venusfliegenfalle.

beteiligt zu sein. Dabei stellt ihre wichtigste Funktion die Inhibition von exzessiv vorhandenen endogenen und exogenen Proteinasen dar.

Der vielleicht wichtigste Vertreter der α -Makroglobuline ist das α_2 -Makroglobulin (α_2 M), ein hoch konserviertes Protein, das seit mehr als sechs Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung ist.^[3] Daher sind für diesen Proteinase-Inhibitor die meisten biochemischen Informationen bekannt. Das humane α_2 M wurde erstmals von Cohn und Mitarbeitern im Jahr 1946 isoliert.^[9] Es ist ein großes und häufig vorkommendes Glycoprotein aus vier identischen Untereinheiten und einem Molekulargewicht von 740 kDa. Jede Untereinheit ist ein Multidomänenmolekül aus jeweils 1451 Aminosäuren.^[10] Das homotetramere α_2 M übt seine hemmende Wirkung auf Proteinasen durch die Verwendung eines einzigartigen „Venusfliegenfallen“-Mechanismus aus (Abbildung 1). Dabei fängt das α_2 M die aktive Zielproteinase irreversibel in einer spezifischen Köderregion.^[8,11] Die Proteinasebindung induziert eine Konformationsänderung des Inhibitors α_2 M.^[10] Als Konsequenz wird eine zunächst verborgene, zwischen einer Cystein- und Glutamin-Seitenkette bestehende Thioesterbindung von außen zugänglich.^[10] Folglich kann die Thioesterbindung mit der Zielproteinase reagieren, wobei α_2 M kovalent mit der gefangenen Proteinase verknüpft wird. Alternativ können kleine nucleophile Moleküle, wie Methylamin (MA), die Thioesterbindung öffnen und somit eine Konformationsänderung des Inhibitors hervorrufen, die vergleichbar mit der Strukturänderung des α_2 M nach Einfangen der Zielproteinase ist.^[10]

Das Einfangen der Proteinase durch α_2 M führt weiterhin zur Präsentation einer rezeptorbindenden Domäne (RBD) auf der Oberfläche des α_2 M.^[8] Dadurch wird der α_2 M-Proteinase-Komplex von spezifischen Rezeptoren auf der Ober-

fläche von Zellen des retikuloendothelialen Systems erkannt. Die Proteinkomplexe werden folglich durch receptorvermittelte Endozytose in die Zellen internalisiert und in den Lysosomen proteolytisch abgebaut. Diese aufeinander abgestimmten Prozesse ermöglichen die rasche Entfernung des α_2 M und der eingeschlossenen Proteinase aus dem Blutkreislauf.^[10,12,13]

Beim Menschen sind keine vollständigen α_2 M-Mängel bekannt. Dies führt zu der Annahme, dass die Abwesenheit von α_2 M möglicherweise letal ist. Zudem ist bekannt, dass Störungen der Aktivität des α_2 M mit verschiedenen Krankheiten, wie AIDS oder Alzheimer, assoziiert sind.^[14,15]

Um einen tieferen Einblick in den α_2 M-Mechanismus zu bekommen, haben Marrero et al. die Kristallstruktur von MA-induziertem humanen α_2 M gelöst und mit Daten aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen an α_2 M-Protease-Komplexen verglichen.^[16] Die erzielte kristallographische Auflösung von 4.3 Å erlaubt praktisch nur eine Interpretation der Elektronendichtheckarten auf Sekundärstrukturerbene,^[16] da die eindeutige Erfassung von Atomtypen und deren Positionen nicht möglich ist. So hat beispielsweise das Polypeptidrückgrat nur die Form eines Schlauches, und Seitenketten sind eher zufällig erkennbar. Die methodischen Details weisen auf ein mühsames Experimentieren hin, haben doch alle kristallographischen Anstrengungen nur zu einem einzigen für eine Datensammlung geeigneten Kristall geführt. Verschiedene kristallographische Computerprogramme mussten zur Interpretation von Quartärstruktur und Kristallpackung bemüht werden.

Die von Marrero et al. präsentierten Ergebnisse sind nicht nur in Bezug auf die gewährten Einblicke in einen biologischen Regulationsprozess bemerkenswert.^[16] Sie erinnern auch daran, dass vor einem Jahrhundert von Laue die ersten Röntgenbeugungsexperimente an Einkristallen vorschlug und interpretierte.^[17] Die Kristallstrukturanalyse von so einfach aufgebauten Verbindungen wie NaCl oder KCl öffnete Chemikern den Zugang zum Arbeiten mit exakten 3D-Informationen bei atomarer Auflösung.^[18] Das läutete die Entwicklung detaillierter Konzepte zur Stereochemie von Mechanismen, Reaktionswegen und molekularen Interaktionen ein. Vergleicht man die molaren Massen der ersten Kristallstrukturanalysen mit den Partikelgrößen heutiger Untersuchungsobjekte, wie beispielsweise dem prokaryotischen Ribosom,^[19] so sind diese um sechs Größenordnungen gewachsen. Das gilt gleichermaßen für den finanziellen und technischen Aufwand.

Bezüglich der Kristallisation ist immer noch keine Voraussage der optimalen Bedingungen für ein bestimmtes Protein oder anderes Biopolymer möglich. Zu viele Parameter müssen berücksichtigt werden, und die besonders kritischen sind selten bekannt. Ausreichend gute Kristalle für die Röntgenbeugung sind häufig immer noch ein Zufallsprodukt und üblicherweise nur durch die Variation unzähliger verschiedener Bedingungen zu erhalten. Diese enorme Anzahl von Kristallisationsexperimenten und deren Überwachung wird durch Pipettierroboter und automatische Visualisierung ermöglicht (Hochdurchsatz). Dennoch muss auch mal ein einziger Kristall ausreichen.

Eingegangen am 9. Februar 2012
Online veröffentlicht am 4. April 2012

-
- [1] H. B. Shen, K. C. Chou, *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 153.
[2] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 785.
[3] K. Hibbetts, B. Hines, D. Williams, *J. Vet. Intern. Med.* **1999**, *13*, 302.
[4] R. Huber, D. Kukla, A. Ruhlmann, O. Epp, H. Formanek, *Naturwissenschaften* **1970**, *57*, 389.
[5] R. Huber, D. Kukla, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, J. Deisenhofer, W. Steigemann, *J. Mol. Biol.* **1974**, *89*, 73.
[6] D. Fergusson, A. Blair, D. Henry, A. Hisashige, C. Huet, A. Koopman-van Gemert, E. Katz, B. McClelland, H. Sigmund, A. Laupacis, *Int. J. Technol. Assess. Health Care* **1999**, *15*, 717.
[7] N. S. Wilder, M. N. Kavarana, T. Voepel-Lewis, T. Paugh, T. Lee, R. G. Ohye, *Ann. Thorac. Surg.* **2011**, *92*, 958.
[8] L. Sottrup-Jensen, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11539.
[9] E. J. Cohn, L. E. Strong, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 459.
[10] D. Ganea, S. Dray, M. Teodorescu, *Surv. Immunol. Res.* **1983**, *2*, 367.
[11] A. J. Barrett, P. M. Starkey, *Biochem. J.* **1973**, *133*, 709.
[12] P. Marynen, F. Van Leuven, J. J. Cassiman, H. Van den Berghe, *J. Immunol.* **1981**, *127*, 1782.
[13] P. Marynen, F. van Leuven, J. J. Cassiman, H. Van den Berghe, *FEBS Lett.* **1982**, *137*, 241.
[14] S. B. Athauda, E. Ido, H. Arakawa, M. Nishigai, H. Kyushiki, Y. Yoshinaka, T. Takahashi, A. Ikai, J. Tang, K. Takahashi, *J. Biochem.* **1993**, *113*, 742.
[15] D. M. Kovacs, *Exp. Gerontol.* **2000**, *35*, 473.
[16] A. Marrero, S. Duquerroy, S. Trapani, T. Goulas, T. Guevara, G. R. Andersen, J. Navaza, L. Sottrup-Jensen, F. X. Gomis-Rüth, *Angew. Chem.* **2012**, DOI: 10.1002/ange.201108015; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, DOI: 10.1002/anie.201108015.
[17] W. Friedrich, P. Knipping, M. Laue, Bayerische Akademie der Wissenschaften, Sitzungsberichte, **1913**, 303.
[18] W. L. Bragg, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1913**, *89*, 248.
[19] A. Yonath, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4438; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4340.
-