

Kristallstruktur des aktiven Gerinnungsfaktors XIIIa, induziert durch Calciumbindung: Grundlage für die Entwicklung neuartiger Antikoagulantien**

Martin Stieler, Johannes Weber, Martin Hils, Peter Kolb, Andreas Heine, Christian Büchold, Ralf Pasternack und Gerhard Klebe*

In der Vergangenheit wurden große Fortschritte in der Entwicklung von Wirkstoffen gemacht, die an Gerinnungsfaktoren oder der Thrombozytenaktivierung ansetzen. Entsprechende Medikamente werden zur Behandlung von Thrombosen, Lungenembolien und akuten Koronarsyndromen eingesetzt, oder zur Verringerung des Risikos von Schlaganfällen bei Patienten mit Vorhofflimmern. Jahrzehntlang waren Vitamin-K-Antagonisten die einzigen oral verfügbaren Antikoagulantien, und erst seit kurzem ist eine neue Generation von direkt wirkenden oralen Antikoagulantien verfügbar, die Thrombin direkt oder indirekt über den in der Gerinnungskaskade voranstehenden Faktor Xa blockieren.^[1] Allerdings kann Thrombin, je nach Aktivierungszustand, die Blutgerinnung fördern oder verhindern. Die Beeinträchtigung der Thrombinaktivität durch die neu zugelassenen direkten Antikoagulantien hat ein erhöhtes Blutungsrisiko zur Folge, weshalb vielen Patienten eine antikoagulative Therapie vorbehalten werden muss.^[2]

Die gegenwärtig adressierten Enzyme der Blutgerinnungskaskade (Faktor Xa und Thrombin) gehören zur Familie der Serinproteasen. Bemerkenswerterweise besitzt Faktor XIII (FXIII), bei dem es sich um das letzte Enzym der Blutgerinnungskaskade handelt, einen völlig anderen Wirkmechanismus (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). FXIII ist ein Mitglied der Transglutaminasefamilie, die die kovalente Quervernetzung zwischen Proteinketten durch Bildung einer Isopeptidbindung katalysieren. Dazu benötigen sie eine zugängliche Glutamin- und Lysinseitenkette.^[3–6] Während der Blutgerinnung erkennt FXIII aggregierendes Fibrin als Substrat und steuert die Reifung und das Wachstum des Blutgerinnsels. Bei einem angeborenen FXIII-Mangel kommt es zu einer verzögerten Blutung. Demnach stellt FXIII ein interessantes Zielprotein dar, um

eine sichere und effizientere Thrombolyse bei geringerer Dosierung des Gerinnsel-lösenden Medikaments zu erreichen.^[7] Ein FXIII-Inhibitor könnte sogar in der Lage sein, die Thrombusbildung vollständig zu verhindern.^[8]

FXIII agiert innerhalb der Gerinnungskaskade nach Thrombin und reguliert die mechanische Stabilität, Halbwertszeit sowie Lyse-Rate von Blutgerinnseln. Obwohl FXIII als ideales Zielprotein diskutiert wird, sind bis jetzt keine geeigneten Wirkstoffkandidaten verfügbar, um das pharmakologische Potential von FXIII-Inhibitoren näher zu untersuchen. Dies liegt nicht zuletzt darin begründet, dass bis jetzt keine Proteinstruktur von FXIII in der aktiven Konformation zur Verfügung stand, auf deren Grundlage die gezielte Entwicklung eines Inhibitors möglich gewesen wäre. Hier präsentieren wir die erste hochaufgelöste Kristallstruktur (1.98 Å) von FXIII im aktiven Zustand (nachfolgend als FXIIIa° bezeichnet, wie von Muszbek et al.^[9] für die Aktivierung mit Ca²⁺ ohne Protolyse vorgeschlagen wurde) mit einem irreversibel gebundenen Inhibitor. Bisher wurde nur über Strukturen berichtet, in denen FXIII in der inaktiven homodimeren Form vorliegt, in denen das aktive Zentrum vollständig vergraben ist und somit nicht dem katalytisch aktiven Zustand entspricht. Solche Strukturen sind unbrauchbar für ein Wirkstoffdesign. In der hier beschriebenen Struktur koordinieren drei Ca²⁺-Ionen an polare funktionelle Gruppen des Proteins, wodurch eine Umlagerung, einhergehend mit einer lokalen Strukturänderung der katalytischen Domäne, induziert wird. Der daraus resultierende aktive Zustand weist jeweils eine Bindungsstelle für Substrat und Cosubstrat auf, zwischen denen die Isopeptidbindung gebildet wird. Zudem sind die katalytische Triade und eine neu entdeckte katalytische Diade, die beide in den Katalyzyklus des Enzyms eingreifen, vollständig ausgebildet. Die hier aufgedeckten strukturellen Erkenntnisse lassen sich wahrscheinlich auch auf andere Transglutaminasen übertragen.

Bis jetzt wurden nur wenige FXIII-Inhibitoren in der Literatur erwähnt. Finney et al.^[10] berichteten über das 66 Aminosäuren lange Peptid Tridegin, das aus der Speicheldrüse des Amazonas-Blutegels *Haementeria ghilianii* gewonnen wird und ein potenter FXIII-Inhibitor ist. In den späten 80er Jahren wurde eine Serie kleiner, irreversibel FXIII-inhibierender Moleküle auf ihre Thrombosewirkung in Tiermodellen untersucht. Aufgrund fehlender Selektivität sowie der kurzen Plasmahalbwertszeit von nur wenigen Minuten wurden diese Inhibitoren nur als pharmakologisches Werkzeug zur Bestimmung der physiologischen Funktion von FXIII und nicht als zukünftige Wirkstoffkandidaten be-

[*] M. Stieler, Dr. P. Kolb, Prof. Dr. A. Heine, Prof. Dr. G. Klebe
Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: klebe@mail.uni-marburg.de

Dipl.-Ing. J. Weber, Dr. M. Hils, Dr. C. Büchold, Dr. R. Pasternack
Zedira GmbH
Roesslerstraße 83, 64293 Darmstadt (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch das BMBF unter der Projektnummer FKZ0316030 finanziell unterstützt. Wir danken den Wissenschaftlern der Beamline BESSY II für ihre Hilfe und dem Helmholtz-Zentrum für Materialien und Energie in Berlin für ein Reisestipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201305133> zu finden.

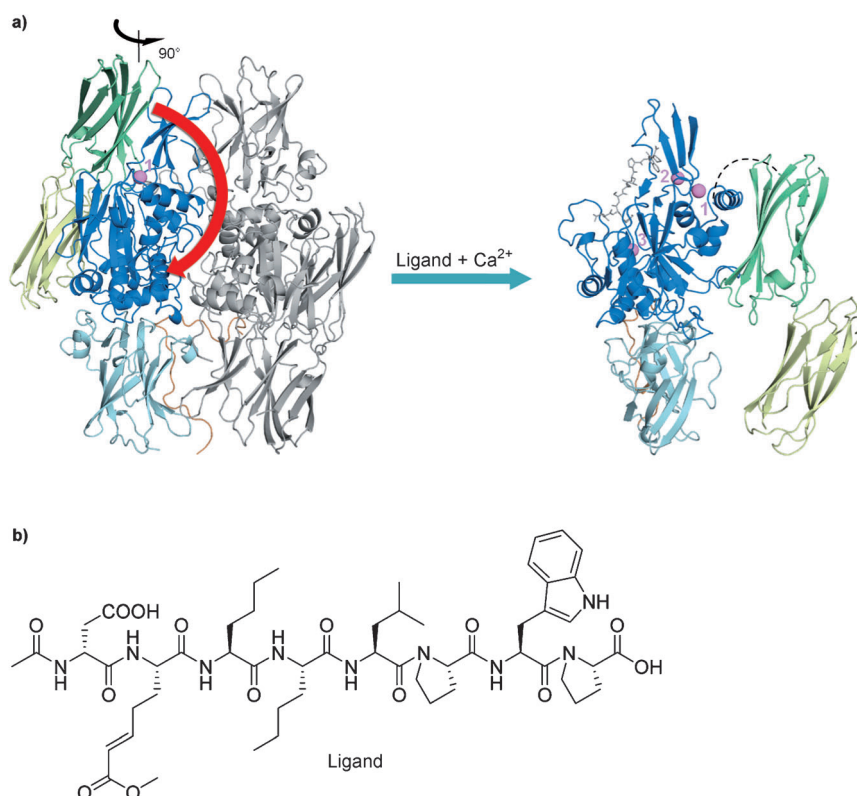


Abbildung 1. a) FXIII liegt im inaktiven Zustand (PDB-Code: 1GGU) als Dimer vor (bei einem Monomer sind die unterschiedlichen Domänen mit verschiedenen Farben wiedergegeben, das andere ist grau dargestellt). Während der Substratbindung dissoziiert FXIII in die beiden Monomere, wobei es innerhalb des jeweiligen Monomers zu einer signifikanten Konformationsänderung kommt. β -Barrel 1 (grün) und β -Barrel 2 (gelb) klappen zur Seite weg, wohingegen die β -Sandwich-Domäne (türkis) sowie die katalytische Domäne (blau) ihre Position beibehalten. Das Aktivierungspeptid (orange) stabilisiert den Dimerkontakt der inaktiven Form und ist auch in der aktiven Form noch am Protein gebunden, wobei es zum Teil in den Lösungsmittellraum ragt. Das aktive Zentrum befindet sich im oberen linken Teil der katalytischen Domäne, wo der Inhibitor ZED1301 (grau, b) kovalent an das Cys 314-Schwefelatom gebunden ist. Die katalytische Domäne der aktiven Form (PDB-Code: 4KTY) enthält drei Calciumionen (rosa) anstelle von einem Calciumion in der inaktiven Form. Die Schleife (502–515), die die β -Sandwich-Domäne und das β -Barrel 1 (gestrichelte Linie) verbindet, ist nicht durch Elektronendichte definiert.^[15]

trachtet.^[11] Für die präklinische Entwicklung von direkten FXIII-Blockern ist es wichtig, auf potente und selektive Verbindungen zurückgreifen zu können, um das Nutzen-Risiko-Verhältnis im Vergleich zu aktuellen Antikoagulantien abschätzen zu können.

Wie alle humanen Transglutaminasen besteht FXIII aus einer β -Sandwich-Domäne, einer katalytischen Domäne und zwei β -Barrel-Domänen. In einigen Eigenschaften weicht FXIII jedoch beträchtlich von allen anderen Mitgliedern dieser Enzymfamilie ab. Die enzymatisch inaktive Protransglutaminase trägt ein einzigartiges, 37 Aminosäuren langes Aktivierungspeptid, das von Thrombin in der letzten Phase der Gerinnungskaskade abgespalten wird. Zudem ist FXIII die einzige dimere Transglutaminase, die aus zwei Zymogen-A-Untereinheiten besteht (zellulärer FXIII-A₂, der in Thrombozyten und Megakaryozyten vorkommt), oder im Plasma mit zwei B-Untereinheiten assoziiert ist und so als Heterotetramer vorliegt (Plasma FXIII-A₂B₂).

Rekombinanter humaner zellulärer Faktor XIII (FXIII-A₂) wurde nicht proteolytisch mit Thrombin, sondern durch Verwendung einer hohen Calcium-Konzentration aktiviert.^[11] Anschließend wurde aktivierter FXIIIa° mit dem irreversibel bindenden peptidischen Liganden ZED1301 inhibiert, dessen Michael-Akzeptor den Glutaminrest des Substrats nachahmt (Abbildung 1). Der Komplex kristallisiert in der Raumgruppe *P1* mit zwei unabhängigen FXIIIa°-ZED1301-Molekülen in der asymmetrischen Einheit.

In der bereits publizierten inaktiven Struktur ist das katalytische Zentrum durch die β -Barrel-1-Domäne verdeckt, wobei Tyr 560OH eine H-Brücke zu S γ des katalytischen Cys 314 bildet. Hier zeigen wir, dass die Bindung von ZED1301 in Anwesenheit von Calciumionen eine große konformative Änderung zum aktiven Zustand induziert, wobei die beiden β -Barrel-Domänen zur Seite wegdrhen und das katalytische Zentrum offenlegen (Abbildung 1). FXIII kristallisiert in der aktiven Form als Monomer, was mit den Daten der hier durchgeführten Größenausschlusschromatographie übereinstimmt. Wir nehmen an, dass die in der Kristallstruktur vorliegende Konformation die aktive und physiologisch relevante Form von FXIIIa° repräsentiert, da das aktive Zentrum für ein Substrat zugänglich ist. Diese Erkenntnisse stimmen mit massenspektrometrischen Daten überein, die durch Wasserstoff-Deuterium-Austausch in Lösung erhalten wurden.^[13,14] Strukturänderungen treten hiernach ebenfalls nur innerhalb

der katalytischen Domäne auf, wohingegen β -Barrel 1 und 2 ihre Gesamtfaltung beibehalten.^[15] Die Elektronendichte der Schleife, die die katalytische und β -Barrel-1-Domäne verbindet, ist in unserer Struktur höchstwahrscheinlich aufgrund einer deutlich höheren Flexibilität dieses Bereichs nicht sichtbar. Diese Beobachtung ist im Einklang mit biochemischen Untersuchungen, nach denen sich die Lys 513-Ser 514-Peptidbindung in einer flexiblen, leicht zugänglichen Schleife befindet und durch Thrombin gespalten werden kann. Zudem verbleibt das nicht abgespaltene Propeptid am N-Terminus der β -Sandwich-Domäne. Wir können einen Einfluss des flexiblen und entfernt liegenden Propeptids auf die Konformation der katalytischen Untereinheit nicht vollständig ausschließen. Wir nehmen jedoch an, dass dieser Sachverhalt in Bezug auf das strukturbasierte Wirkstoffdesign eine unwesentliche Rolle spielt. Die meisten Kontakte, die im inaktiven Zustand gebildet werden, gehen bei der Umlagerung während der Aktivierung und der Dissoziation vom Dimer in die

beiden Monomere verloren. 23 Aminosäuren des N-terminalen Peptids sind in der Elektronendichtekarte sichtbar.

Es wurde viel über die treibende Kraft spekuliert, die die starke konformative Änderung während der Aktivierung bewirkt. Seit der Entdeckung von FXIII durch Laki und Lorand in den 1940er Jahren stand die Wichtigkeit von Calciumionen für die Aktivierung von FXIII, sowie auch aller anderen Transglutaminasen, außer Frage.^[16] Daher war es überraschend, dass Kristalle von inaktivem FXIII, die in Gegenwart einer hohen Calcium-Konzentration gezüchtet wurden, oder bereits gebildete Kristalle, die einer hohen Calcium-Konzentration ausgesetzt wurden, nur eine Calcium-Bindungsstelle pro Monomer aufweisen (Abbildung 1 a).^[17,18] In unserer FXIIIa^o-Struktur können wir drei Calcium-Bindungsstellen beobachten, die essentiell für den Übergang in den aktive Zustand sind. Dieser kann vermutlich nur eingefroren werden, wenn ein peptidischer Inhibitor zusammen mit den drei Calciumionen bindet und so das Protein stabilisiert wird.

Durch den Vergleich der Strukturen der aktiven und inaktiven Form von FXIII lässt sich folgender Mechanismus postulieren: Die Calcium-Bindungsstelle 1 ist bereits im inaktiven Zustand besetzt. Allerdings wechselwirkt nur Ala 457CO direkt mit dem Ca²⁺-Ion, und die restlichen Koordinationsstellen sind mit Wassermolekülen abgesättigt. Während der Aktivierung koordiniert dieses Calciumion, neben Ala 457CO, nun auch noch an die Seitenketten von Asn 436, Glu 485 und Glu 490, sodass das Koordinationspolyeder vervollständigt wird. Dies induziert die Bewegung einer Schleife und angrenzenden α -Helix, wodurch eine kompaktere Calciumumgebung entsteht (Abbildung 2 a). Die Bildung der zweiten Calcium-Bindungsstelle induziert eine Strukturänderung in der Nähe der katalytischen Domäne, sodass die

Bildung einer hydrophoben Tasche nahe am katalytischen Zentrum ermöglicht wird (Abbildung 2 b). Diese Bewegung wird durch die Koordination von Asp 367 an Ca²⁺ ausgelöst, und der benachbarte β -Strang wird in Richtung des zentralen Ions gezogen. Die dadurch gebildete hydrophobe Tasche wird durch das C-terminale Tryptophan unseres Inhibitors besetzt und stabilisiert. Zudem enthält der β -Strang die Aminosäure Trp 390, dessen Indolring um annähernd 90° gedreht wird und so in der Nähe des katalytischen Zentrums, zusammen mit der Seitenkette von Trp 279, einen hydrophoben Tunnel bildet. Dieser Tunnel ermöglicht nun die Aufnahme der Seitenkette des vermeintlichen K-Substrats, sodass in Folge die entsprechende Isopeptidbindung gebildet werden kann. Ein derartiger Tunnel wurde ebenfalls in der Kristallstruktur der TG2 beobachtet, die einem aktiven Zustand zugeschrieben wird.^[19–21]

Zudem beeinflusst die Besetzung der zweiten Ca²⁺-Bindungsstelle die Orientierung eines dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatts, das sich im oberen Teil der katalytischen Domäne befindet und ebenfalls an der Bildung der oben erwähnten hydrophoben Tasche beteiligt ist. Hierbei kommt es zur Koordination von Asp 351 an Ca²⁺, wodurch der entsprechende β -Strang nach unten gezogen wird. Die Koordinationssphäre des Calciumions an der zweiten Bindungsstelle wird neben Asp 351 durch Sauerstoffatome der Seitenketten bzw. des Peptidrückgrats der Aminosäuren Asn 347, Asp 345 und Asp 343 abgesättigt. Die Calcium-Bindungsstelle 2 nimmt zudem Einfluss auf die Ausbildung einer katalytischen Diade, die für die Aktivierung des K-Substrats benötigt wird (Abbildung 2 b). In der inaktiven Konformation sind der N_ε-Imidazol-Stickstoff von His 342 und der Carboxylat-Sauerstoff von Glu 401 für eine erfolgreiche Wechselwirkung zu weit voneinander entfernt (ungefähr 10 Å, Abbildung 2 b).

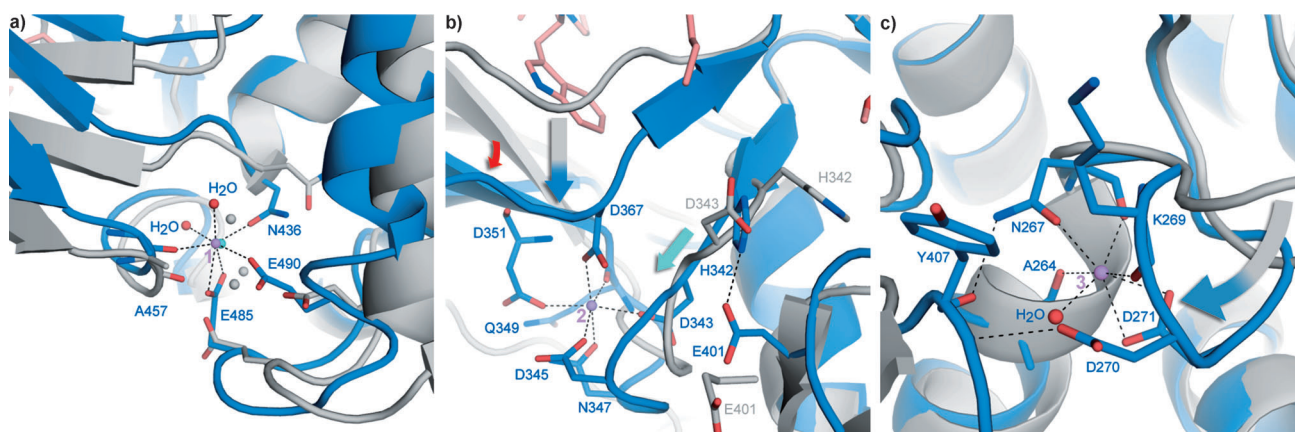


Abbildung 2. Im aktiven Zustand binden drei Calciumionen (rosa) innerhalb der katalytischen Domäne (blau) und induzieren eine Strukturänderung von der inaktiven zur aktiven Form (grau, Bindungsstelle 1: 1GGU; Bindungsstelle 2 und 3: 1F13). Gestrichelte Linien stellen koordinative Bindungen, H-Brücken und ionische Wechselwirkungen dar. ZED1301 ist orange eingefärbt. a) Durch die Bindung von Ca²⁺ an Bindungsstelle 1 kommt es im aktiven Zustand zu einer leichten Verschiebung einer α -Helix. In der inaktiven Form (türkise Kugel) bindet an dieser Position ebenfalls ein Ca²⁺-Ion, jedoch kommt es nur zu einer direkten Wechselwirkung mit Ala 457CO. Die verbleibende Koordinationssphäre wird mit Wasser (graue Kugeln) vervollständigt. b) Bei Bindungsstelle 2 zieht die Ca²⁺-Bindung die Asp 367-enthaltende Schleife und bewirkt zusammen mit der Koordination von Asp 351 eine Rotationsbewegung des dreisträngigen β -Faltblatts (roter Pfeil). Beide Wechselwirkungen führen zur Bildung der hydrophoben Tasche (grau-blauer Pfeil), die eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung spielt. Zudem ist Bindungsstelle 2 an der Ausbildung der katalytischen Diade beteiligt. Die Koordination von Asp 343 zu Ca²⁺ zieht eine Schleife nach unten (türkiser Pfeil) und ermöglicht eine direkte Wechselwirkung von His 342 und Glu 401, die wichtig für die Aktivität des Enzyms ist. c) Die Besetzung von Bindungsstelle 3 hat eine Umorientierung einer Schleife zur Folge, die Bestandteil der K-Substrat-Bindungsregion (z. B. Lys 269 und Tyr 407) ist.

Die Koordination von Asp 343 an Ca^{2+} zieht die Schleife in Richtung des Calciumions, wobei die dabei resultierende Verschiebung von His 342 die Bildung einer H-Brücke mit Glu 401 ermöglicht. Die letztere Aminosäure befindet sich in einer flexiblen Schleife und kann daher in Richtung von His 342 verschoben werden.

Die dritte Calcium-Bindungsstelle hat Auswirkungen auf die Bindung des Lysin-haltigen Substrats, welches das Thioester-Intermediat von der gegenüberliegenden Seite des oben erwähnten hydrophoben Tunnels angreift (Abbildung 2c). Die Wechselwirkung von Asp 271 mit Ca^{2+} hat die Verschiebung einer Schleife im Bereich der Proteinoberfläche zur Folge. Zudem sind Asn 267 und Asp 270 Bestandteile dieser Schleife und wechselwirken mit Tyr 407. Die eingebauten Calciumionen, insbesondere Bindungsstelle 2 und 3, wirken als Schablone (Templat) und induzieren durch die Einbeziehung polarer Seitenketten strukturelle Änderungen, die wichtig sind, um das Enzym von dem Substrat-unzugänglichen inaktiven in den funktionellen aktiven Zustand zu überführen.

Der vorgeschlagene Mechanismus wird durch strukturelle Daten von verwandten humanen Transglutaminasen gestützt.^[17,18,20,21] Zum Beispiel sind in der aktivierten und zwischen der katalytischen Domäne und dem β -Barrel 1 gespaltenen TG3 drei Calcium-Bindungsstellen besetzt.^[18,20] Der Vergleich der aktiven FXIII-Struktur mit anderen aktiven humanen Transglutaminasen zeigt, dass sich alle Enzyme dieser Klasse im aktiven Zustand sehr ähnlich sind. Allerdings gibt es insbesondere bei der Calcium-Bindungsstelle 2 einen entscheidenden Unterschied: Im Fall von FXIII wechselwirkt die Seitenkette von Asp 351 mit dem Calciumion an dieser Stelle, wohingegen sich bei der TG3 an dieser Position ein Wassermolekül befindet. Dies hat zur Folge, dass das angrenzende dreisträngige β -Faltblatt keine räumliche Drehung erfährt, sondern nur verschoben ist. Bei FXIII ist diese Rotation jedoch entscheidend für die vollständige Ausbildung der Substratbindungstasche. Wir gehen daher davon aus, dass die TG3-Struktur noch nicht dem vollständig aktiven Zustand entspricht. Bemerkenswerterweise ist das Asp an dieser wichtigen Position innerhalb aller Transglutaminasen mit Ausnahme der TG2 hoch konserviert, letztere besitzt an dieser Stelle ein Glu (siehe Hintergrundinformationen).

Der Inhibitor ZED1301 bindet an die Oberfläche der katalytischen Domäne von FXIIIa°. Diese Region lässt sich in drei Hauptinteraktionsbereiche aufteilen: das katalytische Zentrum, den angrenzenden „A-Raum“ und die etwas weiter entfernte hydrophobe Tasche (Abbildung 3a). Im Inhibitor-gebundenen Zustand unterscheidet sich die Form der Oberfläche signifikant von der Geometrie, die im inaktiven Zustand eingenommen wird, insbesondere hinsichtlich der hydrophoben Tasche, deren Bildung durch Ca^{2+} -Bindung ausgelöst wird (Abbildung 3b).

Die Aminosäuren der katalytischen Triade liegen bei FXIIIa° wahrscheinlich in einer geometrischen Anordnung vor, in der die Substratbindung und ein anschließender Übergang in die entsprechende Thioesterform möglich sind. Das β -C-Atom des Michael-Akzeptors von ZED1301 bildet eine kovalente Bindung mit Cys 314 (Abbildung 3c). Des Weiteren kommt es zur Bildung von H-Brücken zwischen

dem Carbonylsauerstoff des terminalen Methylesters und dem Indolstickstoff von Trp 279 sowie dem Rückgrat-NH von Cys 314, die beide zusammen das Oxyanionen-Loch bilden. Der dazu angrenzende hydrophobe Tunnel wird von Trp 279 und Trp 370 gebildet, dessen Funktion in der Verhinderung der Hydrolyse des intermediär gebildeten Thioesters liegt. Auch in der aktiven TG2-Struktur ist ein Tunnel ausgebildet, jedoch lässt die aktive FXIIIa°-Struktur die Bindung der Lysinseitenkette des Cosubstrats sterisch zu. Das K-Substrat wird somit optimal zum Thioester-Intermediat ausgerichtet, um die anschließende Bildung des Thioesters zu ermöglichen. Diese Annahme wird durch das Docking eines künstlichen Ala-Lys-Ala Tripeptid-Mimetikums bekräftigt, das eine entsprechende Orientierung im aktiven Zentrum einnimmt (Abbildung 3d). Die Lysinseitenkette passt perfekt in den hydrophoben Tunnel, wobei sich das freie Elektronenpaar der terminalen ϵ -Aminogruppe in einer geeigneten Entfernung zum Thioester-C-Atom befindet, sodass das Thioester-Enzym-Intermediat nukleophil durch Lys angegriffen werden kann. Zudem kommt es zur Bildung von H-Brücken zwischen dem Tripeptid und dem Protein, die das Substrat in seiner Position fixieren (Abbildung 3d).

Unsere Kristallstruktur weist zudem darauf hin, dass Faktor XIIIa° neben der bereits bekannten katalytischen Triade eine katalytische Diade besitzt, die im Bereich des katalytischen Zentrums den nukleophilen Angriff des K-Substrats unterstützt. Die Diade besteht aus His 342 und Glu 401, wobei beide Reste erst während der Ca^{2+} -induzierten Aktivierung in eine Anordnung, die eine direkte Wechselwirkung zulässt, gebracht werden (Abbildung 3e). Sowohl His 342 als auch Glu 401 sind innerhalb der Familie der menschlichen Transglutaminasen hoch konserviert, mit Ausnahme der TG7 (Gln anstatt Glu). Vor etwa 20 Jahren schrieben Yee et al. His 342 eine katalytische Funktion zu. Jedoch vermuteten sie, dass Glu 434 und nicht Glu 401 der Partner von His 342 innerhalb einer möglichen katalytischen Diade ist.^[18] Die Mutation von His 342 zu Ala führt zu einer beträchtlichen Reduktion der Aktivität für die Bildung der Isopeptidbindung. Dagegen wird die Affinität des Enzyms gegenüber dem K-Substrat nur geringfügig beeinträchtigt.^[22] In der kürzlich publizierten TG2-Struktur ist das entsprechende His 305 in Richtung der Glutamin-enhaltenden Substratbindungsregion orientiert.^[19] Daher kann man argumentieren, dass diese Struktur noch nicht dem vollaktivierten Zustand entspricht. Zugegebenermaßen ist auch unsere Struktur nur eine weitere eingefrorene Situation in der kristallinen Phase, die eine mögliche Geometrie des Proteins widerspiegelt. Nichtsdestotrotz, nehmen wir bei aller Vorsicht an, dass diese Struktur dem aktiven Zustand näherkommt, da sich die beiden Substrate zwanglos in die Struktur einpassen lassen, alle drei Calcium-Bindestellen populierte sind, der hydrophobe Tunnel ausgebildet ist und die zusätzliche katalytische Diade bereitgestellt wird.

Über die Änderung des Protonierungszustandes des Cosubstrats während der Bildung der Isopeptidbindung kann nur spekuliert werden. Die Lysinseitenkette des K-Substrats sollte unter physiologischen Bedingungen eine geladene Ammoniumgruppe tragen. Sobald das Cosubstrat in die Proteinbindungstasche eintritt, kommt es zu einer beträcht-

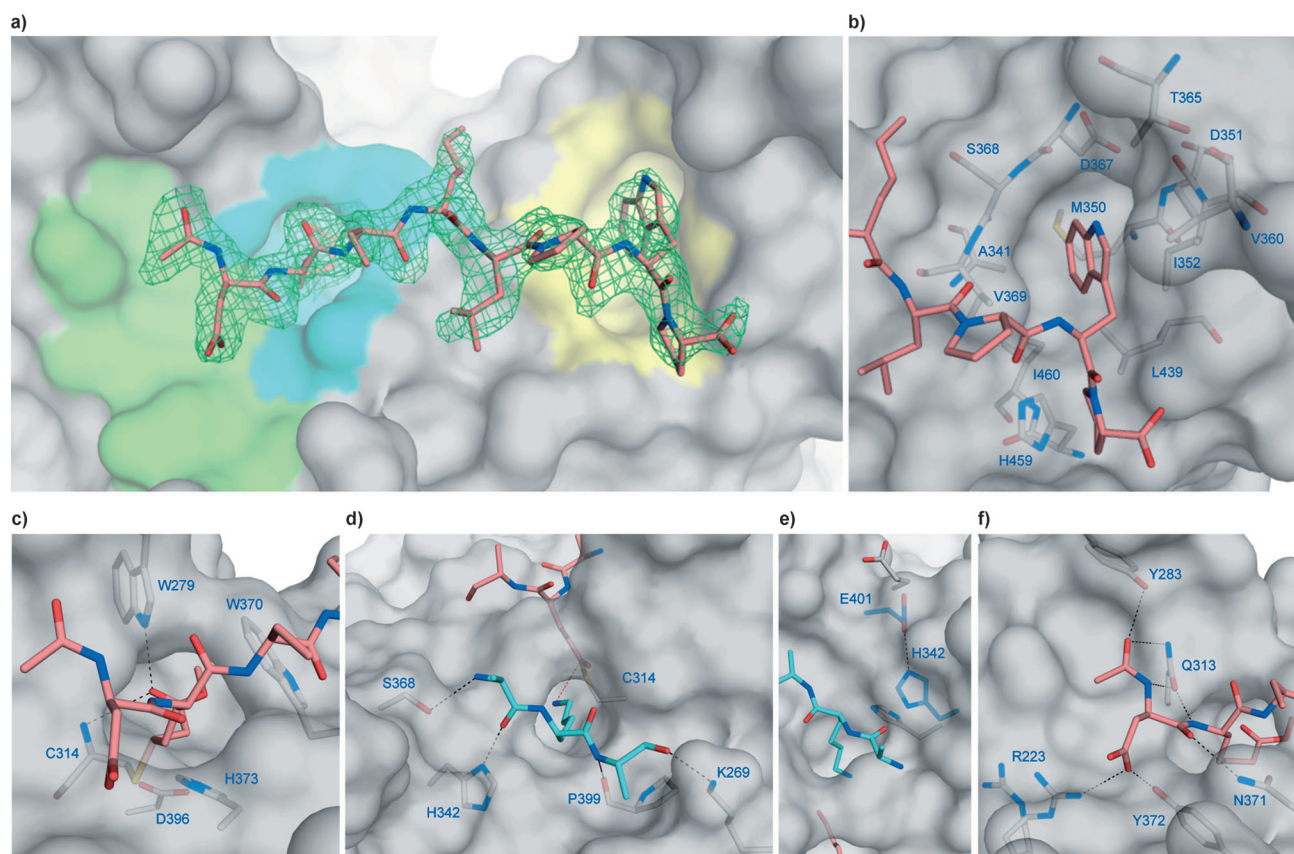


Abbildung 3. a) Der Ligand ZED1301 (orange, Differenzelektronendichte $F_o - F_c$ konturiert bei 3σ) bindet kovalent an Cys 314 innerhalb des katalytischen Zentrums. Links davon befindet sich eine Wechselwirkungsregion, die als A-Raum bezeichnet wird (grün). Mit dem gegenüberliegenden Ende bindet der Ligand mit seinem Indolring in eine hydrophobe Tasche (gelb). Die Oberfläche von FXIII ist grau dargestellt. b) Vergrößerte Darstellung der hydrophoben Tasche, die größtenteils aus hydrophoben Aminosäuren besteht. c) Der Ligand bildet eine kovalente Bindung zu Cys 314 des katalytischen Zentrums und wechselwirkt über den Carbonylsauerstoff des Michael-Akzeptors mit der NH-Gruppe von Trp 279 und Cys 314, die gemeinsam das Oxyanionen-Loch bilden. Zudem wird ein hydrophober Tunnel von Trp 279 und Trp 370 gebildet, der die Hydrolyse des intermediären Thioesters verhindert. d) Das K-Substrat, das als Ala-Lys-Ala-Tripeptid (türkis) modelliert wurde, passt perfekt in den hinteren Teil des hydrophoben Tunnels. H-Brücken zum minimierten Tripeptid sind als gestrichelte Linien dargestellt. Der ursprüngliche Ligand wurde in ein Q-Substrat (Ala-Gln-Ala-Tripeptid, orange) umgewandelt, um die Bindung des Substrates zu simulieren. e) Neben dem hydrophoben Tunnel im Bereich des Eingangs der K-Substrat-Bindungsstelle, befindet sich die neu gefundene katalytische Diade. f) Wasserstoffbrücken, die im A-Raum zwischen Ligand und Protein gebildet werden.

lichen pK_a -Verschiebung in Richtung geringerer Basizität, wodurch Lys im ungeladenen Zustand vorliegt. Dieser Effekt könnte durch das angrenzende His 373 der katalytischen Triade unterstützt werden, das eine positive Ladung trägt. Während der Bildung der Amidbindung könnte die katalytische Diade, vergleichbar zu dem Mechanismus der katalytischen Triade in Serinproteasen, reversibel arbeiten, indem sie das zweite Proton der Aminokopfgruppe des reagierenden Lysins aufnimmt.

Für die Entwicklung eines potentiellen FXIII-Blockers als neuartiges Antikoagulans ist die Selektivität gegenüber anderen menschlichen Transglutaminasen von essentieller Bedeutung. Innerhalb des A-Raums konnten einige interessante Unterschiede von FXIIIa^o im Vergleich zur TG2 aufgedeckt werden (Abbildung 3 f). Bei der Betrachtung der Selektivität wurde sich auf die TG2 konzentriert, da diese die am häufigsten vorkommende Transglutaminase ist. Innerhalb des A-Raums kommt es zu einem ausgeprägten Netzwerk von starken H-Brücken zwischen Inhibitor und folgenden Ami-

nosäuren des Proteins: Tyr 283, Gln 313, Asn 371, Tyr 372, Arg 223 und Val 369. Zusätzlich besitzt FXIIIa^o an Position 223 einen Argininrest. Zudem befindet sich im unteren Bereich des A-Raums eine negative Tasche, die von Glu 216, Asp 219 und Tyr 372 gebildet wird. Diese Unterschiede sollten durch medizinisch-chemische Optimierung des initialen Inhibitors ausgenutzt werden, um ausreichend Affinität und Selektivität gegenüber FXIIIa^o im Vergleich zur TG2 zu gewinnen. Experimentelle Details zur Strukturbestimmung sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 14. Juni 2013,
veränderte Fassung am 15. Juli 2013
Online veröffentlicht am 20. September 2013

Stichwörter: Antikoagulantien · Calcium · Kristallstrukturanalyse · Transglutaminasen · Wirkstoffentwicklung

- [1] D. Garcia, E. Libby, M. A. Crowther, *Blood* **2010**, *115*, 15–20.
- [2] J. H. Griffin, *Nature* **1995**, *378*, 337–338.
- [3] L. Lorand, R. M. Graham, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 140–156.
- [4] L. Muszbek, Z. Berczky, Z. Bagoly, I. Komaromi, E. Katona, *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 931–972.
- [5] I. Komáromi, Z. Bagoly, L. Muszbek, *J. Thromb. Haemostasis* **2011**, *9*, 9–20.
- [6] V. Schroeder, H. P. Kohler, P. T. Velasco, S. N. P. Murthy, P. Lefebvre, D. Green, *J. Thromb. Haemostasis* **2013**, *11*, 234–244.
- [7] L. Lorand, *Blood* **1999**, *93*, 909–917.
- [8] L. Lorand, *J. Thromb. Haemostasis* **2005**, *3*, 1337–1348.
- [9] L. Muszbek, R. A. Ariens, A. Ichinose, *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *5*, 181–183.
- [10] S. Finney, L. Seale, R. T. Sawyer, R. B. Wallis, *Biochem. J.* **1997**, *324*, 797–805.
- [11] R. J. Shebuski, G. R. Sitko, D. A. Claremon, J. J. Baldwin, D. C. Remy, A. M. Stern, *Blood* **1990**, *75*, 1455–1459.
- [12] L. Lorand, R. B. Credo, T. J. Janus, *Methods Enzymol.* **1981**, *80*, 333–341.
- [13] M. Andersen, J. Faber, *Haemophilia* **2010**, *16*, 42.
- [14] R. T. Woof, M. C. Maurer, *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *512*, 87–95.
- [15] A. Mary, K. E. Achyuthan, C. S. Greenberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *261*, 112–121.
- [16] K. Laki, L. Lorand, *Science* **1948**, *108*, 280.
- [17] B. A. Fox, V. C. Yee, L. C. Pedersen, I. Le Trong, P. D. Bishop, R. E. Stenkamp, D. C. Teller, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 4917–4923.
- [18] V. C. Yee, L. C. Pedersen, I. Letrong, P. D. Bishop, R. E. Stenkamp, D. C. Teller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7296–7300.
- [19] D. M. Pinkas, P. Strop, A. T. Brunger, C. Khosla, *Plos Biol.* **2007**, *5*, 2788–2796.
- [20] B. Ahvazi, P. M. Steinert, *Exp. Biol. Med.* **2003**, *35*, 228–242.
- [21] B. Ahvazi, H. C. Kim, S. H. Kee, Z. Nemes, P. M. Steinert, *EMBO J.* **2002**, *21*, 2055–2067.
- [22] J. M. Hettasch, C. S. Greenberg, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 28309–28313.