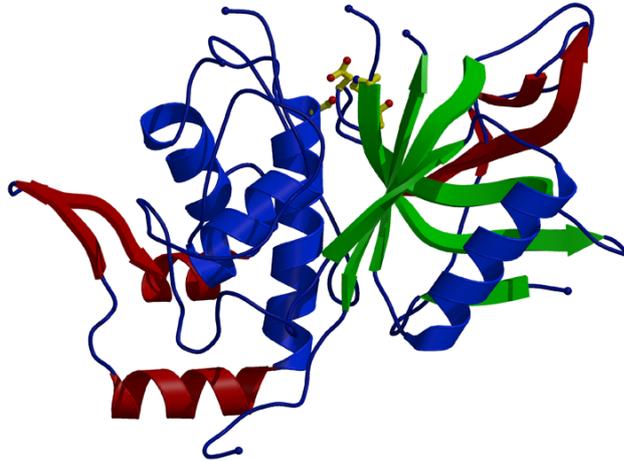
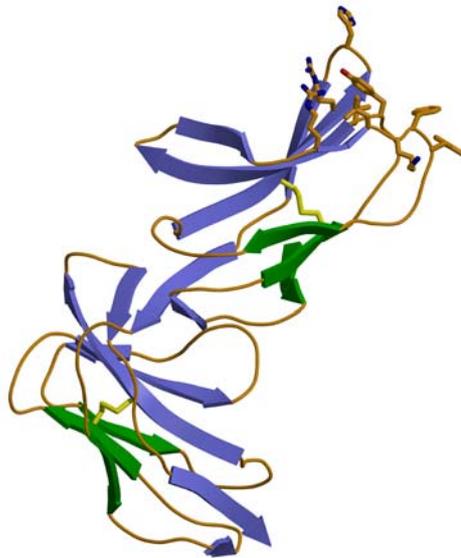


**Röntgenstrukturanalyse
der Cysteinendoprotease
IdeS (Mac-1)**



**und
des humanen Immunglobulin A Rezeptors
Fc α RI (CD89)**



Katja Wenig
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Röntgenstrukturanalyse
der Cysteinendoprotease IdeS (Mac-1)
und
des humanen Immunglobulin A Rezeptors
Fc α RI (CD89)**

Katja Wenig

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des Akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Die Dissertation wurde am 22.02.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05.04.2005 angenommen.

Meinen Eltern

und Alfred

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2001 bis Februar 2005 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich mich für die Überlassung der sehr interessanten Themen und die sehr gute Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die große Freiheit bei der Arbeit hat zu einer angenehmen und kreativen Arbeitsatmosphäre beigetragen, die es erlaubte dem eigenen Forscherdrang zu folgen und die Projekte selbstständig weiterzuentwickeln.

Prof. Dr. Wolfram Bode danke ich für die vielen wertvollen Anregungen und die stete Unterstützung.

Bei Dr. Peter Sondermann möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung, die große Hilfe bei der Lösung aller methodischen Herausforderungen, die vielen fruchtbaren Diskussionen, aber auch für die stetige Motivation bedanken.

Bei Dr. Manuel Than möchte ich mich für die vielen ausführlichen Diskussionen und die praktische Hilfe bei der Einarbeitung in die Feinheiten der Strukturlösung bedanken. Auch möchte ich ihm für die immer lustige Atmosphäre im Büro, die moralische Unterstützung in Krisenzeiten und für die vielen schönen Wander und Klettertouren danken.

Bei Lorenz Chatwell möchte ich mich für die große Unterstützung bei der Lösung der IdeS Struktur und für die stets gute Zusammenarbeit an vielen gemeinsamen Projekten und Aufgaben bedanken.

Im Zusammenhang mit der Kristallstruktur der IdeS Protease möchte ich mich bei Dr. Ulrich von Pawel-Rammingen für die Überlassung der DNA und die Hilfe bei der Publikation bedanken.

Dr. Gleb Bourenkov und Dr. Hans Bartunik danke ich für die Messzeit und die Betreuung an der BW6-Beamline am DESY.

Bei Till Rehm und Loyola D'Silva möchte ich mich für die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren bedanken. Dr. Karlheinz Mann danke ich für die Durchführung der Proteinsequenzierungen, und Frau Elisabeth Weyher-Stingl für die massenspektrometrischen Untersuchungen. Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Rechenzentrums, insbesondere Dr. B. Busch, Dr. Harald Lehnert, Horst Worsch und Herbert Höfner.

Herrn Reiner Kiefersauer danke ich für die Einführung in das Free-Mounting System, der Hilfe bei der Kristalltransformation und der Kristallbetropfung.

Einen besonderen Dank verdienen auch Werner Dersch, Ottmar Paul, Snezan Marinkovic, Renate Rüller, Monika Schneider, Monika Bumann und Marion Heinze, ohne die ein geordnetes und effektives Arbeiten in der Abteilung für Strukturforschung nicht möglich gewesen wäre.

Meinen lieben derzeitigen und ehemaligen Labor und Bürokollegen Kerstin Rohr, Cora Keil, Dr. Martin Augustin, Dr. Michael Koch, Dr. Stefan Henrich, Dr. Stephan Krapp, Constanze Breithaupt, Dr. Ulf Marquardt und Milko Velarde danke ich für die angenehme und freundliche Atmosphäre sowie für die vielen Freizeitaktivitäten und schönen Stunden. Den vielen anderen Kollegen der Abteilung Huber, die hier nicht aufgeführt sind, möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit danken.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern und Großeltern, die mich in all den Jahren meines Studiums und während der Promotionszeit tatkräftig und liebevoll unterstützt haben.

Meinem Freund Alfred danke ich für die sehr schöne gemeinsame Zeit, die vielen unvergesslichen Bergtouren und die Geduld während dieser manchmal etwas anstrengenden Zeit.

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bzw. werden veröffentlicht in:

Katja Wenig, Lorenz Chatwell, Ulrich von Pawel-Rammingen, Lars Björck, Robert Huber & Peter Sondermann (2004) „Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17371-17376.

Katja Wenig & Peter Sondermann (2003) “Purification, crystallization and X-ray diffraction analysis of the extracellular part of the human Fc receptor for IgA, Fc α RI (CD89).” *Acta Cryst.* **D59**, 2247-50.

Katja Wenig, Robert Huber & Peter Sondermann (Manuskript in Vorbereitung) “Structural diversity of the human Fc α receptor I. A novel crystal form reveals multiple conformations of the IgA binding site.”

Katja Wenig, Lorenz Chatwell, Ulrich von Pawel-Rammingen, Robert Huber, P. Sondermann (2004) “Crystal Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS.” HASYLAB (DESY) Jahresbericht 2004, Hamburg.

Protein Data Bank:

Katja Wenig, Lorenz Chatwell, Ulrich von Pawel-Rammingen, Lars Björck, Robert Huber & Peter Sondermann (2004) “Structure Of The Streptococcal Endopeptidase Ides, A Novel Cysteine Proteinase With Strict Specificity For IgG.” PDB Eintrag: 1Y08.

Posterpräsentationen:

EMBO Conference on Structures in Biology, EMBL Heidelberg, 2004

British Crystallographic Association Spring Meeting, Manchester, England, 2004

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis	x
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Die Kristallstruktur des extrazellulären Fragmentes des humanen IgA Rezeptors Fc α RI	1
1.2 Die Kristallstruktur der katalytisch inaktiven C94S Mutante der Cysteinprotease IdeS aus <i>Streptococcus pyogenes</i>	2
2 Einleitung	4
2.1 Das Immunsystem.....	4
2.1.1 Die humorale Immunantwort.....	4
2.1.2 Immunglobulin A	6
2.1.3 Fc-Rezeptoren bei der humoralen Immunantwort.....	8
2.1.4 Der humane Immunglobulin A Rezeptor Fc α RI.....	9
2.2 Das Versagen der Immunabwehr.....	12
2.2.1 Streptokokken Infektion	13
2.2.2 Die Cysteinendoprotease IdeS.....	16
2.2.3 Mechanismus von Cysteinproteasen	19
3 Zielsetzung	22
4 Material	23
4.1 Geräte.....	23
4.2 Chemikalien	24
4.3 Chromatographiematerialien.....	24
4.4 Enzyme.....	25
4.5 Puffer, Medien und Antibiotika	25
4.6 Oligonukleotide.....	29
4.7 Bakterienstämme.....	29
4.8 Plasmide	30

4.9 Standards und Kits	30
4.10 Sonstige Materialien	31
5 Methoden	32
5.1 Molekularbiologische Methoden	32
5.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	32
5.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
5.1.4 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	34
5.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
5.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	34
5.1.7 Dephosphorylierung von linearisierter <i>dsDNA</i>	35
5.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
5.2 Mikrobiologische Methoden.....	36
5.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	36
5.2.2 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen.....	36
5.2.3 Proteinexpressionstest	37
5.2.4 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	37
5.2.4.1 Expression von Fc α RI in <i>inclusion bodies</i>	37
5.2.4.2 Expression von IdeS.....	38
5.2.4.3 Selenomethionin-Expression von IdeS C94S.....	38
5.2.5 Aufschluss von <i>E. coli</i> Zellen.....	39
5.2.5.1 Zellaufschluss bei Expression von unlöslichen Proteinen	39
5.2.5.2 Zellaufschluss bei Expression löslicher Protein.....	39
5.3 Proteinbiochemische Methoden.....	39
5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
5.3.2 Proteinfällung	40
5.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	41
5.3.4 Massenspektrometrie.....	41

5.3.5	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran	41
5.3.6	Proteinkristallisation	42
5.3.7	Reinigung von Immunglobulin G aus humanen Serum	42
5.3.8	Reinigung von Immunglobulin A aus humanem Serum	42
5.3.9	Herstellung von IgA-Sepharose.....	43
5.3.10	NMR.....	43
5.3.10.1	2D- ¹ H/ ¹⁵ N-NMR-Spektren.....	43
5.3.10.2	Bindungsstudien mittels NMR-Spektroskopie	45
5.4	Präparation des Fcα Rezeptors I (CD89).....	46
5.4.1	Isolierung der <i>inclusion bodies</i>	46
5.4.2	Solubilisierung der <i>inclusion bodies</i>	46
5.4.3	<i>In vitro</i> Proteinfaltung	46
5.4.4	Proteinreinigung	47
5.4.5	Aktivitätstest.....	47
5.5	Präparation der Cysteinendoprotease IdeS	48
5.5.1	Reinigung des aktiven Enzyms.....	48
5.5.2	Reinigung des inaktiven Enzyms	48
5.5.3	Aktivitätstest.....	48
5.6	Röntgenkristallographische Methode	49
5.6.1	Allgemeine Einführung zur Kristallographie	49
5.6.2	Verzwilligung von Kristallen	49
5.6.3	Datensammlung und Datenauswertung.....	51
5.6.4	MAD-Phasierung.....	52
5.6.5	Molekularer Ersatz	54
5.6.6	Modellbau und Verfeinerung.....	55
5.6.7	Suche nach Sequenz und Strukturhomologen	55
5.6.8	Graphische Darstellung	55
6	Ergebnisse	56

6.1 Die Kristallstruktur des humanen Fc α Rezeptors I.....	56
6.1.1 Expression und <i>inclusion body</i> Reinigung	56
6.1.2 Renaturierung und Reinigung.....	57
6.1.3 Aktivitätstest.....	58
6.1.4 Kristallisation und Datenaufnahme	59
6.1.5 Strukturlösung	62
6.1.6 Modellbau und Verfeinerung.....	64
6.1.7 Strukturbeschreibung.....	65
6.1.8 Vergleich der Fc α RI Strukturen verschiedener Kristallformen	68
6.1.9 Untersuchung des Interdomänenwinkels.....	70
6.1.10 Vergleich zu strukturell verwandten Proteinen.....	71
6.2 Die Kristallstruktur der Cysteinendoprotease IdeS.....	73
6.2.1 Expression und Reinigung IdeS und IdeS C94S	73
6.2.2 NMR-Bindungsstudien.....	78
6.2.3 Kristallisation und Datenaufnahme	80
6.2.4 Phasierung, Modellbau und Verfeinerung.....	81
6.2.5 Strukturbeschreibung.....	83
6.2.6 Das aktive Zentrum	85
6.2.7 Die Architektur der Substratbindungstaschen.....	86
7 Diskussion.....	89
7.1 Die extrazelluläre Domäne des humanen Fc α Rezeptors I.....	89
7.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung.....	89
7.1.2 Strukturlösung	90
7.1.3 Strukturanalyse	91
7.1.4 Bedeutung der Flexibilität für die Entwicklung von Therapeutika	93
7.2 Die Kristallstruktur der Cysteinendoprotease IdeS.....	95
7.2.1 Kristallisation und Strukturlösung.....	95
7.2.2 Strukturanalyse	96

7.2.3 Das aktive Zentrum	97
7.2.4 Die Substratspezifität.....	97
7.2.5 Bedeutung der Kristallstruktur für die Entwicklung von Inhibitoren.....	99
Anhang.....	101
Literaturverzeichnis	104
Abkürzungen.....	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Schematisch Darstellung des Antikörperaufbaus.....	5
Abbildung 2.2 Die IgA Subklassen.....	6
Abbildung 2.3 Theoretische Modelle von IgA1 und IgA2.....	7
Abbildung 2.4 Struktur des IgA-Fc Fc α RI Komplexes.....	10
Abbildung 2.5 Signaltransduktion des Fc α RI (CD89).....	11
Abbildung 2.6 Einsatz bispezifischer Antikörper.....	12
Abbildung 2.7 Streptococcus pyogenes.....	13
Abbildung 2.8 <i>flesh-eating</i> Syndrom.....	14
Abbildung 2.9 Einfluss von IdeS auf die Phagozytose der Streptokokkenzellen durch PMNs.....	16
Abbildung 2.10 Auswirkung von IdeS auf die Überlebensrate von <i>S.pyogenes</i>	17
Abbildung 2.11 <i>Hinge</i> -Region verschiedener IgG Isotypen.....	19
Abbildung 2.12 Katalysemechanismus der Cysteinproteasen.....	20
Abbildung 5.1: Pulssequenz 2D COSY.....	44
Abbildung 5.2: Pulssequenz $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC.....	44
Abbildung 5.3 Beugungsbilder bei meroedrischer Verzwilligung.....	49
Abbildung 5.4 Zusammensetzung des anomalen Struktur factors.....	52
Abbildung 6.1 Expression und <i>inclusion body</i> Präparation.....	56
Abbildung 6.2 Reinigung von Fc α RI mittels Gelfiltration.....	57
Abbildung 6.3 Dekonvolution des ESI Massenspektrums des Fc α RI.....	58
Abbildung 6.4 Mikrokristalle des Fc α Rezeptors.....	58
Abbildung 6.5 Aktivitätstest Fc α RI.....	59
Abbildung 6.6 rhomboidförmiger Fc α RI Kristall.....	60
Abbildung 6.7 Vergleich der Intensitätsstatistiken.....	60
Abbildung 6.8 Graphische Darstellung der pseudomeroedrischen Verzwilligung P2 zu C222.....	62

Abbildung 6.9	Diffractionsbild des primitiv monoklinen Kristalls.....	63
Abbildung 6.10	Topologiediagramm der Fc α RI Ektodomäne.....	66
Abbildung 6.11	Stereoabbildung des Fc α RI Strukturmodells	67
Abbildung 6.12	Vergleich der Strukturoberflächen.	67
Abbildung 6.13	Elektronendichtekarte DE-loop.	68
Abbildung 6.14	Überlagerung der Fc α RI Strukturen	69
Abbildung 6.15	Stereoabbildung des Interdomänen -Bereichs.	70
Abbildung 6.16	Bestimmung der Unterschiede des Interdomänenwinkels.....	71
Abbildung 6.17	Überlagerung strukturverwandter Proteine.....	73
Abbildung 6.18	Expressionsgel IdeS _{His}	74
Abbildung 6.19	Reinigungsgel Nickel NTA Chromatographie.	74
Abbildung 6.20	Reinigungsgel Gelfiltrations-Chromatographie IdeS _{His}	75
Abbildung 6.21	Aktivitätstest IdeS _{His}	75
Abbildung 6.22	Massenspektrum von IdeS _{His}	76
Abbildung 6.23	HPLC-Elutionsdiagramm des mit Z-LVG-CHN ₂ inhibierten IdeS.....	77
Abbildung 6.24	Dekonvolution des ESI Massenspektrums von Peak 1 des HPLC-Laufs.77	
Abbildung 6.25	Dekonvolution des ESI Massenspektrums von Peak 2 des HPLC-Laufs.77	
Abbildung 6.26	Expressionsgel IdeS C94S.....	78
Abbildung 6.27	Dekonvolution des ESI Massenspektrums von IdeS C94S.....	78
Abbildung 6.28	2D ¹ H/ ¹⁵ N –HSQC Spektren von IdeS C94.....	79
Abbildung 6.29	Kristalle des IdeS C94S	80
Abbildung 6.30	Stereoabbildung der IdeS C94S Struktur.....	83
Abbildung 6.31	Strukturbasiertes Aminosäure-Sequenzvergleich.	84
Abbildung 6.32	Stereoabbildung der Überlagerung des aktiven Zentrums.....	85
Abbildung 6.33	Katalytisches Zentrum des IdeS C94S.	86
Abbildung 6.34	Aktives Zentrum mit Tetrapeptid (LGGP).	87
Abbildung 6.35	Vergleich der Substratbindungstaschen von IdeS C94S und Papain....	88
Abbildung 7.1	Stereoabbildung der Fc α RI/Fc-IgA-Komplexstruktur.	92

Abbildung 7.2 Stereoabbildung der Überlagerung verschiedener EC1 Domänen 93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1 Oligonukleotide	29
Tabelle 4.2 <i>E.coli</i> Bakterienstämme	29
Tabelle 4.3 Plasmide	30
Tabelle 5.1 Reaktionsansatz PCR	33
Tabelle 5.2 Temperaturprogramm PCR	33
Tabelle 5.3 Temperaturprogramm Kopplungs-PCR	33
Tabelle 5.4 Beispielansatz Restriktionsverdau	34
Tabelle 5.5 Beispielansatz Ligation	35
Tabelle 5.6 SDS-PAGE Zusammensetzung	40
Tabelle 6.1 Statistik der Datenaufnahme	61
Tabelle 6.2 Statistik der zur Strukturlösung verwendeten Datenaufnahmen	63
Tabelle 6.3 Verfeinerungsstatistik des Strukturmodells	65
Tabelle 6.4 Unterschiede zwischen den Fc α RI Strukturen.	69
Tabelle 6.5 Vergleich der <i>r.m.s.</i> Abweichung	72
Tabelle 6.6 Auswertung der 2D 1H/15N HSQY Spektren	79
Tabelle 6.7 Statistik der Daten aufnahme	81
Tabelle 6.8 MAD-Phasierungsstatistik	82
Tabelle 6.9 Verfeinerungsstatistik des Strukturmodells	82

1 Zusammenfassung

1.1 Die Kristallstruktur des extrazellulären Fragmentes des humanen IgA Rezeptors Fc α RI

Immunglobulin A ist die häufigste Antikörperklasse in den Schleimhäuten sowie den Schleimhautsekreten des Menschen und wirkt dort als eine erste immunologische Verteidigungslinie gegen angreifende Mikroorganismen. Im humanen Serum ist IgA die zweithäufigste Antikörperklasse und bildet eine zweite Verteidigungsbarriere gegen Pathogene, die bereits die mukösen Oberflächen durchdrungen haben. Die IgA spezifische Immunantwort wie Phagozytose, ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*), Präsentation von Antigenen, Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen wird dabei über die Wechselwirkung der IgA Antigen-Antikörper-Komplexe mit verschiedenen Effektorzellen ausgelöst. Diese Wechselwirkung wird durch die Bindung des Fc-Fragments des Antikörpers an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche dieser Effektorzellen vermittelt. Der Fc α -Rezeptor I ist der vorherrschende Fc-Rezeptor für alle Isotypen des Immunglobulin A im humanen Serum. In letzter Zeit ist das wissenschaftliche Interesse an IgA und dem zugehörigen Rezeptor Fc α RI, aufgrund der effektiven Behandlungsmöglichkeiten von Krebs durch IgA Antikörper außerordentlich gestiegen. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass therapeutische Antikörper, durch die Bindung an Fc α RI auf polymorphkernigen Neutrophilen, eine effiziente Lyse der Tumorzellen bewirken können (Huls *et al.*, 1999).

Innerhalb dieser Arbeit gelang es, das extrazelluläre Fragment des humanen Fc α -Rezeptors I rekombinant in *E.coli*, in Form von *inclusion bodies* zu exprimieren, rückzufalten und zu reinigen. Das so erhaltene Protein besitzt, trotz der fehlenden Glykosylierung, die Fähigkeit humanes Immunglobulin A zu binden. Die Lagerung des Proteins bei 4°C führte zur Ausbildung von Mikrokristallen. Mittels Umkristallisation konnten diese in für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle umgewandelt werden. Die Auswertung der aufgenommenen Diffraktionsbilder ergab eine nahezu perfekte, pseudomeroedrische Verzwilligung dieser Kristalle. Bei der Datenaufnahme weiterer Kristalle der gleichen Kristallisationsbedingung konnte jedoch ein Datensatz eines nicht-verzwilligten Kristalls bis zu einer Auflösung von 2,6 Å gemessen werden. Initiale Phasen wurden mittels der Methode des Molekularen Ersatzes, unter Verwendung der Koordinaten der kurz zuvor veröffentlichten IgA-Fc/Fc α RI Komplexstruktur erhalten.

Das extrazelluläre Fragment des Fc α RI besteht aus zwei Immunglobulindomänen EC1 und EC2. Trotz der funktionellen Ähnlichkeit zu Fc-Rezeptoren, entspricht die

Faltungstopologie der Domänen sowie die Orientierung der Domänen zueinander im Wesentlichen dem der *Killer cell inhibitory* (KIR) und *Leukocyte Immunoglobulin-like* (LIR) Rezeptoren. Der Vergleich der vier voneinander unabhängigen Moleküle innerhalb der kristallographischen, asymmetrischen Einheit zeigt eine erhebliche konformationelle Variabilität der Rezeptorstruktur, vor allem in dem Fc-IgA bindenden Bereich der EC1 Domäne. Die Überlagerung der bisher bekannten Strukturen des freien Fc α RI und des mit Fc-IgA komplexierten Fc α RI erlaubte eine ausführliche Analyse der Rezeptorstruktur in unterschiedlichen chemischen Umgebungen. Dabei ließ sich zeigen, dass der IgA bindende Bereich des freien Rezeptors die Konformation des Rezeptors in IgA gebundener Form annehmen kann, was die Theorie eines *induced-fit* Mechanismus dieser Interaktion nicht unterstützen kann. Diese Studien konnten weiterhin belegen, dass der Winkel zwischen den beiden Immunglobulindomänen sehr flexibel ist.

1.2 Die Kristallstruktur der katalytisch inaktiven C94S Mutante der Cysteinprotease IdeS aus *Streptococcus pyogenes*

Das humane Pathogen *Streptococcus pyogenes* hat verschiedene und komplexe Virulenzmechanismen entwickelt, um das Immunsystem des Menschen zu umgehen. Das erst kürzlich entdeckte Protein IdeS (*Immunoglobulin G degrading enzyme of S. pyogenes*) ist eine extrazelluläre Cysteinendoprotease dieses Pathogens, welche in der Lage ist, sehr spezifisch, Immunglobulin G zwischen dem Fab₂ und Fc-Fragment proteolytisch zu spalten. Dies führt zur Inhibierung der Opsonophagozytose und verhindert die Zerstörung des Bakteriums durch humane polymorphkernige Neutrophile (PMN). Der Nachweis von Antikörpern gegen dieses Protein im Serum von Patienten mit Streptokokken-Infektionen sowie die ständige Expression der Protease während der Infektionen zeigt, dass IdeS ein wichtiger Virulenzfaktor ist. Da *Streptococcus pyogenes* eine Reihe von Krankheiten wie zum Beispiel Scharlach, Sepsis, Pharyngotonsillitis, Toxisches-Schock-Syndrom und das *flesh-eating* Syndrom verursacht, ist IdeS ein vielversprechendes Angriffsziel für die Entwicklung neuer und spezifischer Medikamente.

Die Expression und Reinigung des IdeS Proteins und der katalytisch inaktiven C94S Mutante dieser Cysteinprotease wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Trotz der Mutation des für die Katalyse essentiellen Cysteinrestes C94 zu Serin behielt die Protease die Fähigkeit humanes Immunglobulin G zu binden, was mittels NMR Bindungsstudien bewiesen werden konnte. Das aktive Protein wurde noch während der Expression proteolytisch degradiert und war demzufolge nicht zur Kristallisation geeignet. Hingegen konnte die inaktive Mutante in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2 kristallisiert werden. Unter Verwendung von Synchrotron-Röntgenstrahlung konnten an diesen Kristallen native Daten bis zu einer Auflösung von 1,9 Å aufgenommen werden. Das Phasenproblem konnte mit Hilfe eines *Multiwavelength Anomalous Dispersion* (MAD) Experiments an Kristallen des mit Selenomethionin markierten Proteins gelöst werden. In

der Elektronendichte der Kristallstruktur sind die Reste 49 – 339 des IdeS Proteins gut definiert. Obwohl die IdeS Protease keine Aminosäuresequenzhomologie zu anderen Proteasen aufweist, zeigt die Kristallstruktur die typische Faltungstopologie des Klans Papain-ähnlicher Cysteinproteasen. Die Polypeptidkette faltet sich in zwei getrennte Domänen L und R auf, die über eine ausgedehnte polare Interaktionsfläche miteinander verbunden sind. Neben dem für Cysteinproteasen dieser Familie konservierten Bereich aus vier α -Helixen und sieben β -Strängen, besitzt IdeS einige umfangreiche Insertionen vor allem im Bereich der L-Domäne. Die Überlagerung der strukturell ähnlichen Proteine Cathepsin B und Papain mit der IdeS Struktur zeigt, dass auch der Bereich des aktiven Zentrums große Unterschiede aufweist. Die Kristallstruktur der IdeS C94S Mutante konnte belegen, dass IdeS zu einer neuen Familie des CA Klans der Cysteinproteasen gehört und außerdem eine Grundlage für die Entwicklung antibakterieller Medikamente darstellt.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein sehr komplexes Zusammenspiel verschiedenster Zellen und Moleküle, das die wichtige Aufgabe hat, Vertebraten vor Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Parasiten zu schützen. Dabei muss das Immunsystem ständig unzählige Moleküle überprüfen um fremde von eigenen zu unterscheiden und gegebenenfalls die Zerstörung des antigenen Pathogens einzuleiten. Um seiner Aufgabe gerecht zu werden, benötigt das Immunsystem einerseits Erkennungsmechanismen, um „eigen“ von „fremd“ unterscheiden zu können, andererseits Abwehrmechanismen um die eingedrungenen Pathogene zu neutralisieren oder eliminieren zu können. Die Immunität wird bei Wirbeltieren durch die Lymphozyten vermittelt. Das sind weiße Blutzellen, die von Stammzellen im Knochenmark abstammen und das Blutgefäßsystem verlassen können, um in den Interzellulärräumen nach Fremdkörpern zu suchen. Grundlegend kann man die angeborene und adaptive Immunantwort unterscheiden. Die angeborene Immunantwort ist bei der Bekämpfung der Krankheitserreger jedoch auf Organismen beschränkt, die häufig vorkommende Oberflächenmoleküle besitzen und sich im Laufe der Evolution nicht verändert haben. Dieses Problem wird durch die adaptive Immunantwort überwunden, die sich durch eine in Anpassung an einen Krankheitserreger spezifische Immunantwort auszeichnet. Auch hinsichtlich ihrer Funktionsweise kann man zwei Arten der Immunität unterscheiden. Die zelluläre Immunität richtet sich gegen virusinfizierte Zellen, Pilze, Parasiten und fremdes Gewebe und wird durch die T-Lymphozyten vermittelt. Die humorale Immunität wird von den B-Lymphozyten getragen und im Folgenden näher beschrieben.

2.1.1 Die humorale Immunantwort

Die Hauptfunktion der humoralen Immunantwort besteht darin, extrazellulär vorliegende Mikroorganismen zu zerstören und die Verbreitung von intrazellulären Infektionen über extrazelluläre Flüssigkeiten zu verhindern. Die wichtigsten Vermittler der humoralen Immunantwort sind Antikörper. Diese sehr spezifischen Proteine werden durch B-Zellen sezerniert, nachdem diese durch das spezifische Antigen stimuliert worden sind. Diese Anregung zur Differenzierung der B-Zelle in eine antikörpersezernierende Plasmazelle erfolgt über die Erkennung des Antigens mittels membrangebundener Immunglobulinmoleküle und erfordert zusätzlich den Einsatz von T-Helferzellen.

Das Antikörpermolekül selbst hat zwei verschiedene, strukturell voneinander getrennte Funktionen. Zum einen bindet es spezifisch das Pathogen-Molekül, welches die

Immunantwort ausgelöst hat und zum anderen mobilisiert es Zellen und Moleküle die zur Zerstörung dieses Pathogens führen. Der Antigen erkennende Teil ist von Antikörper zu Antikörper verschieden und wird deshalb als variable Region (V-Region) bezeichnet (Abb. 2.1). Auf genetischer Basis ist die Vielfalt der Antikörper auf die zufällige Rekombination der separaten V-, D- und J-Gensegmente bei der Ausbildung der vollständigen Gene für die variable Region sowie verschiedene Genumlagerungen zurückzuführen. Zu einer weiteren Modifizierung der variablen Region kommt es durch die somatische Hypermutation in Folge der Stimulierung einer B-Zelle durch ein spezifisches Antigen. Die Kombination dieser Mechanismen zur Erzeugung von Vielfalt, schafft aus einer relativ begrenzten Anzahl von Genen ein riesiges Repertoire von Antikörpern verschiedener Spezifität. Der für die Effektorfunktion verantwortliche Bereich der Antikörper unterliegt nicht dieser starken Variation und wird daher als konstante Region (C-Region) bezeichnet. Weiterhin besteht jedes Immunglobulin aus zwei Arten von Polypeptidketten, der leichten (25 kD) und der schweren Kette (50kD). Ein vollständiges Antikörpermolekül setzt sich dabei jeweils aus zwei leichten und zwei schweren (L_2H_2) Ketten zusammen, die miteinander über Disulfidbrücken verbunden sind. Die N-terminalen 108 Aminosäuren beider Ketten stellen dabei die variable Regionen dar. Die Struktur der Immunglobuline besteht aus homologen Domänen von denen zusätzlich jede eine konservierte Disulfidbrücke besitzt. Durch Spaltung mit Papain lassen sich Antikörpermoleküle in zwei globuläre Fragmente teilen, in das Fab_2 und das Fc -Fragment. Diese Einzelfragmente sind in einem vollständigen Immunglobulin über eine flexible Polypeptidkette, dem sogenannten *Hinge*-Peptid, so miteinander verknüpft, dass in etwa die Form eines Y entsteht (Abb. 2.1).

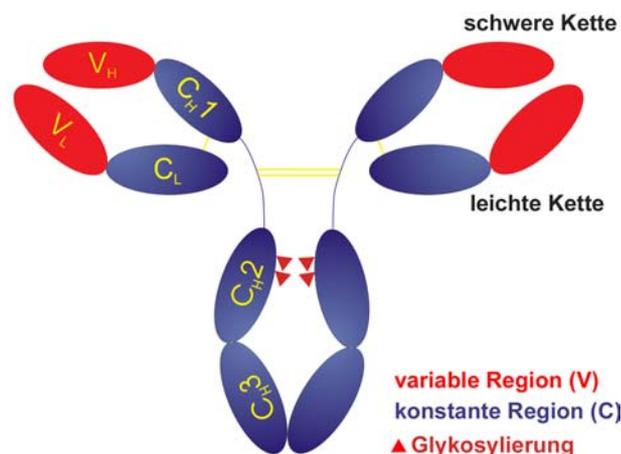


Abbildung 2.1 Schematisch Darstellung des Antikörperaufbaus.

Die Bezeichnungen bedeuten C für konstante Region, V für variable Region, L für *light chain* und H für *heavy chain*.

Anhand des Aufbaus der konstanten Region innerhalb der schweren Kette kann man die Immunglobuline (Ig) in fünf verschiedene Klassen einteilen: IgG, IgA, IgE, IgM und IgD. Durch den sogenannten Klassenwechsel kann jedoch jede variable Region mit einer beliebigen konstanten Region exprimiert werden. Weiterhin lassen sich die IgG Antikörper des Menschen noch in die vier Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 und bei der Maus in

IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 unterteilen. Alle Immunglobulinklassen bestehen zwar aus den beiden leichten und schweren Ketten, allerdings treten IgM und IgA Antikörper auch in Form von Multimeren auf. Im Kapitel 2.1.2 wird näher auf den Aufbau und die spezielle Funktion der IgA Antikörper eingegangen.

Antikörper können prinzipiell auf drei verschiedenen Wegen zur Immunantwort beitragen, zum einen verhindern sie die Adhäsion von Bakterien bzw. Viren an Zielzellen, sie unterstützen die Phagozytose mittels Opsonisierung und aktivieren das Komplementsystem. Viren und intrazelluläre Bakterien müssen, um sich vermehren zu können in die Zielzelle eindringen, indem sie mit Oberflächenmolekülen dieser Zielzelle interagieren. Durch die Bindung von Antikörpern an diese Pathogene wird die Interaktion mit der Zielzelle verhindert und das Pathogen dadurch neutralisiert. Ebenso werden extrazelluläre Toxine durch die Antikörperbindung neutralisiert. Im Falle sich ausserhalb der Zelle vermehrender Erreger, erleichtern die an der Pathogenoberfläche gebundenen Antikörper die Aufnahme der Bakterienzelle in phagozytierende Zellen. Diese sogenannten Phagozyten sind darauf spezialisiert, die aufgenommenen Bakterien zu zerstören. Die Bedeckung der Pathogenoberfläche mit Antikörpern wird hierbei als Opsonisierung bezeichnet. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten der Phagozytose-Aktivierung, zum einen werden die an die Erreger gebundenen Antikörper von Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von phagozytierenden Zellen erkannt und zum anderen werden Proteine des Komplementsystems gebunden. Die Fc-Rezeptor vermittelte Immunantwort wird ausführlich in Kapitel 2.1.3 beschrieben.

2.1.2 Immunglobulin A

Immunglobulin A ist die vorwiegende Antikörperklasse der Atemwegs-, Augen- und Magen-Darm-Trakt Schleimhäute und Schleimhautsekrete, sowie die zweithäufigste Antikörperklasse im menschlichen Serum (Kerr, 1990, van Egmond *et al.*, 2001). Beim Menschen gibt es zwei Subklassen von IgA Antikörpern, IgA1 und IgA2, die beide als Monomer und Polymer vorkommen können. Das hauptsächlich als Monomer vorliegende Serum IgA gehört zu 90% der IgA1 Subklasse an (Furtado *et al.*, 2004). Hingegen liegt das IgA der Schleimhäute überwiegend in dimerer Form vor und beide Subklassen sind zu gleichen Teilen vertreten.

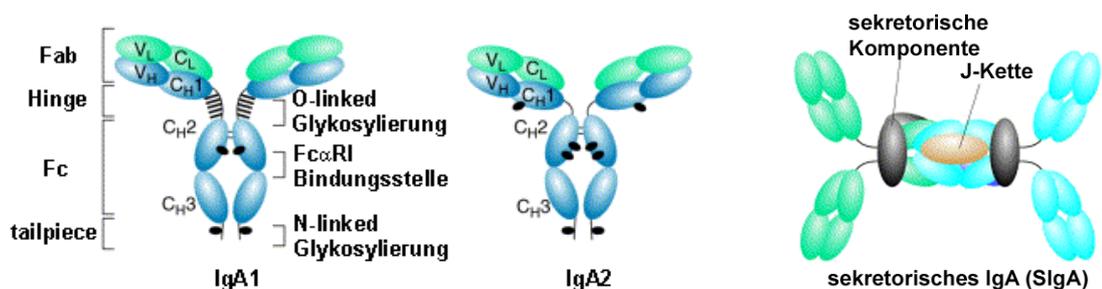


Abbildung 2.2 Die IgA Subklassen.

**Schematische Darstellung der beiden IgA Subklassen sowie der dimeren Form der Schleimhäute
(nach van Egmond *et al.*, 2001).**

Beide IgA Subklassen bestehen aus 12 Immunglobulindomänen die zwei leichte und zwei schwere Ketten ausbilden (Abb. 2.2). Zusätzlich zu anderen Antikörperklassen besitzt IgA C-terminal zur C_{H3} Domäne ein sogenanntes *tailpiece* Peptid aus 18 Aminosäuren, welches eine Glykosylierungsstelle (N-verknüpft) beinhaltet (Boehm *et al.*, 1999). Der größte Unterschied zwischen den beiden Subklassen besteht in der Länge und dem Glykosylierungsgrad des *Hinge*-Peptids. In der IgA1 Subklasse setzt sich dieses Peptid aus 23 Resten zusammen, die insgesamt fünf Glykosylierungsstellen (O-verknüpft) beinhalten. Im Gegensatz dazu umfasst das IgA2 *Hinge*-Peptid nur 10 Aminosäuren ohne Glykosylierungsstelle. Um die Auswirkung dieser *Hinge*-Variabilität auf die Gesamtstruktur aufzuklären, wurden Ultrazentrifugationsläufe, Röntgenkleinwinkel und Neutronen-Streuungsexperimente mit IgA1 und IgA2 Antikörpern durchgeführt und untereinander verglichen (Furtado *et al.*, 2004, Boehm *et al.*, 1999, Abb. 2.3). Dabei konnte festgestellt werden, dass beide Subklassen mehr eine T-Form anstatt die für Antikörper typische Y-Form ausbilden. Allerdings erscheint die IgA2 Struktur in Lösung wesentlich kompakter und beinhaltet neben den T auch Y-förmige Strukturen. Die Anordnung der Fab-Fragmente gegenüber dem Fc-Fragment ist dabei in beiden Subklassen generell sehr flexibel. Die Kombination aus der kompakten IgA2 und der ausgestreckten IgA1 Struktur erlaubt die Bindung eines breiteren Antigenspektrums sowie eine bivalente Bindung von Antigenen die räumlich relativ weit voneinander entfernt auf der Pathogenoberfläche liegen (Furtado *et al.*, 2004).

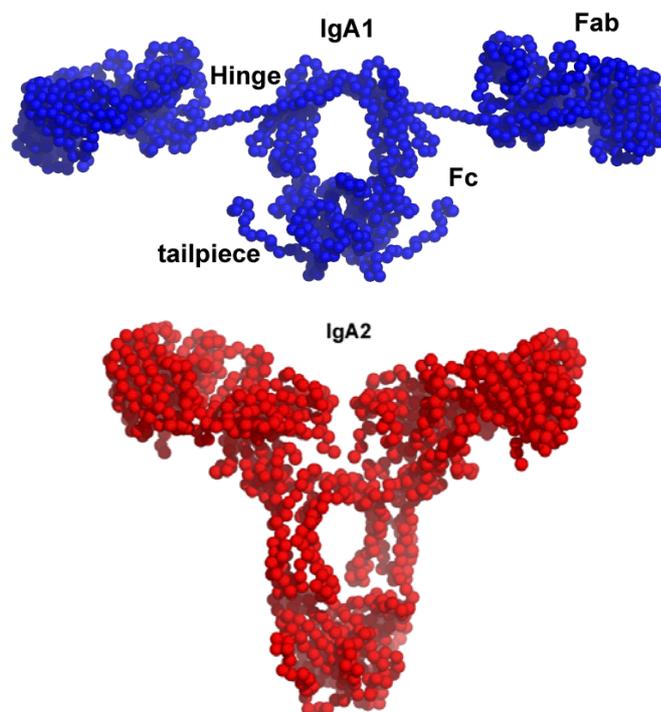


Abbildung 2.3 Theoretische Modelle von IgA1 und IgA2.
Die IgA1 und IgA2 Strukturen wurden mittels Molekulardynamik und Energieminimierungs-Rechnungen erzeugt (PDB Eintrag 1IGA und 1R70, Furtado *et al.*, 2004).

Die Dimerisierung der IgA Antikörper resultiert aus der Ausbildung jeweils einer Disulfidbrücke zwischen dem Cystein im C-terminalen *tailpiece*-Bereich und der J-Kette, einem 15 kDa Peptid, das in den Zellen der Schleimhaut koexprimiert wird (Kerr, 1990). Der Transport dieses IgA Dimer-Komplexes erfolgt aktiv durch Transzytosis durch die Epithelzellen. Dazu bindet das dimerisierte IgA an die extrazelluläre Domäne des polymeren Immunglobulin-Rezeptors (pIgR), der auf der basolateralen Seite der Epithelzellen exprimiert wird (Mostov, 1994). Nach der Transzytose wird auf der apikalen Seite der Epithelzellen die extrazelluläre Domäne des pIg Rezeptors proteolytisch abgespalten und der Komplex aus pIg Rezeptor-Domäne und IgA Dimer in die Schleimhautsekrete entlassen. Die ebenfalls über eine Disulfidbrücke kovalent gebundene pIgR Domäne wird als sekretorische Komponente und der Gesamtkomplex als sekretorisches IgA (SIgA) bezeichnet (Abb.2.2).

Da die Schleimhäute eine erste Abgrenzung gegen die Umwelt darstellen, sind sie die potentielle Angriffsfläche für pathogene Erreger. Bereits in den externen Sekreten verhindert sekretorisches IgA (SIgA) die Anlagerung und das Eindringen der Mikroorganismen in die Epithelzellen der Schleimhäute und wird daher als erste immunologische Verteidigungsbarriere bezeichnet (Macpherson *et al.*, 2000, van Egmond *et al.*, 2001). Die Adhäsion der Bakterien an Schleimhautzellen wird dabei durch die Bedeckung der Oberfläche mit dem stark glykosylierten und hydrophilen SIgA inhibiert, da diese hydrophile Hülle zu einer Abstoßung der Antikörper-Pathogen-Komplexe durch die mucinen Sekrete führt. Dieser Vorgang wird auch als Immunexklusion bezeichnet (Stokes *et al.*, 1975, Kaetzel *et al.*, 1991). Das im Serum zirkulierende monomere IgA hingegen dient als zweite Verteidigungslinie um Pathogene abzuwehren die bereits die mukösen Oberflächen durchdrungen haben (van Egmond *et al.*, 2000). Um Pathogene und neutralisierte Mikroorganismen aus dem Extrazellulärraum zu entfernen, müssen die IgA Antikörper sogenannte Effektorzellen aktivieren. Dabei löst die Wechselwirkung der IgA Antigen-Antikörper-Komplexe, mit einer großen Auswahl verschiedener Zellen des Immunsystems, eine Reihe wichtiger Effektorfunktionen aus, die für die Aktivierung der Entzündungsreaktion von essentieller Bedeutung sind.

2.1.3 Fc-Rezeptoren bei der humoralen Immunantwort

Die Wechselwirkung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt über die Bindung an Fc-Rezeptoren (FcR) auf der Oberfläche akzessorischer Effektorzellen. Zu diesen Effektorzellen gehören die phagozytischen Zellen, wie Makrophagen und polymorphkernige neutrophile Leukozyten, die natürlichen Killerzellen, Eosinophile und Mastzellen. Da die verschiedenen akzessorischen Zellen, Fc-Rezeptoren für Antikörper verschiedener Klassen besitzen, bestimmt der Antikörperisotyp welche Effektorzellen an der Immunantwort beteiligt sind. An der spezifischen Erkennung der Antikörper ist nur der extrazelluläre Anteil der Fc-Rezeptoren, die so genannte α -Kette beteiligt. Da die über die Fc-Rezeptoren ausgelöste Immunantwort, entzündliche Reaktionen und Gewebeschäden

hervorrufen kann, ist es essentiell, dass die Fc-Rezeptoren zwischen Antigen gebundenen und der großen Anzahl an freien Antikörpermolekülen unterscheiden können. Diese Voraussetzung wird durch die Aggregation oder Multimerisierung der Antikörper in Folge der Interaktion mit multimeren Antigenpartikeln wie Viren und Bakterien erreicht. Die multimerisierten Antikörper werden mit einer wesentlich höheren Avidität als die freien Antikörper von den Fc-Rezeptoren gebunden. Erst die Vernetzung der an die multimerisierten Antikörper gebundenen Fc-Rezeptoren in der Zellmembran führt zur Signaltransduktion und somit zur Immunantwort. Zusammenfassend sorgen die spezifischen Antikörper und Fc-Rezeptoren dafür, dass die Effektorzellen die selbst keine Spezifität besitzen, Pathogene identifizieren und aus dem Extrazellulärraum des Körpers entfernen können.

2.1.4 Der humane Immunglobulin A Rezeptor Fc α RI

Der vorherrschende Fc-Rezeptor für beide Subklassen des humanen IgA sowie für alle polymeren Formen ist der niederaffine Fc α RI (CD89) ($K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$) (Wines *et al.*, 1999). Die Expression des Fc α RI ist auf myeloide Zellen beschränkt, dazu gehören Neutrophile, Eosinophile, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und Kupfferzellen (Monteiro *et al.*, 1992). Der Rezeptor wird auf diesen Zellen konstitutiv und unabhängig vom Vorkommen an IgA in gleichbleibenden Mengen exprimiert. Die Interaktion des Fc-Rezeptors mit dem IgA Antigen/Antikörper-Komplex führt zu wichtigen Immunabwehrreaktionen wie Phagozytose, Präsentation von Antigenen, Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite (*respiratory burst*), ADCC (*Antibody-dependent cellular cytotoxicity*) und zur Freisetzung von Zytokinen und Entzündungsmediatoren (Morton *et al.*, 1996). Der Fc α RI ist ein Typ I Transmembranprotein und setzt sich aus drei Abschnitten zusammen, dem extrazellulären Teil aus zwei Immunglobulin-domänen EC1 und EC2 (206 Aminosäuren), der Transmembranhelix (19 Aminosäuren) und einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt (41 Aminosäuren). Aufgrund der unterschiedlichen Glykosylierungszustände je nach Zellart, variiert das apparente Molekulargewicht des Rezeptors zwischen 55-75 kDa auf Monozyten und Neutrophilen bzw. 70-100 kDa auf Eosinophilen (Morton *et al.*, 1996). Trotz der Funktion als Fc-Rezeptor ähnelt die Faltungstopologie und die Orientierung der Fc α Rezeptor Domänen zueinander, der Domänenfaltung des *Killer cell inhibitory* Rezeptors (KIR) und der *Leukocyte Immunglobulin-like* (LIR) Rezeptor Familie (Wende *et al.*, 1999). Auch liegt das für den Fc α Rezeptor kodierende Gen auf Chromosom 19 im Leukozyten Rezeptor Cluster. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die membrandistale Immunglobulin-domäne EC1 des Fc α Rezeptors für die Interaktion mit dem Fc-Fragment verantwortlich ist (Wines *et al.*, 1999). Diese für Fc-Rezeptoren ungewöhnliche Bindungsstelle, konnte durch die kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur des Fc-IgA/Fc α RI Komplexes bestätigt werden (Herr *et al.*, 2003).

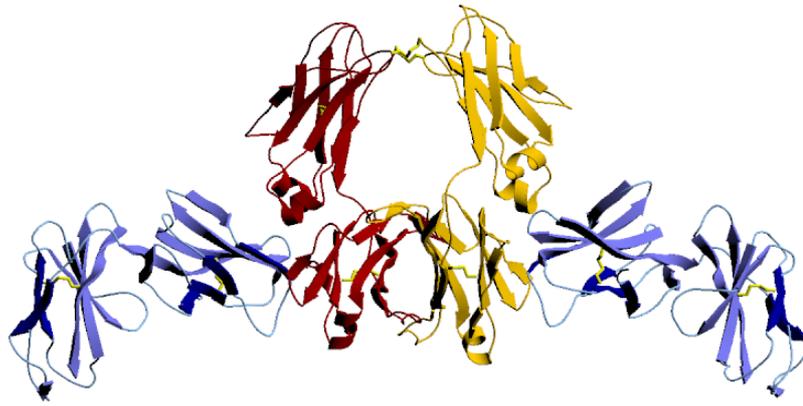


Abbildung 2.4 Struktur des IgA-Fc/Fc α RI Komplexes.

Darstellung der Komplexstruktur aus dem IgA Fc-Fragment (gelb und rot) und dem Fc α RI (blau) im Verhältnis von 1:2 (PDB Eintrag 1OW0, Herr *et al.*, 2003).

Die Komplexstruktur konnte weiterhin belegen, dass zwei Fc α Rezeptor Moleküle gleichzeitig an ein IgA Fc-Fragment binden können (Abb.2.4). Auch diese Eigenschaft ist einzigartig in der Fc-Rezeptor/Antikörper Interaktion, da Fc ϵ RI und alle Fc γ -Rezeptoren in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 das IgE bzw. das IgG Fc-Fragment binden (Garman *et al.*, 2001, Sondermann *et al.*, 2002). Überdies liegt die Bindungsstelle des Rezeptors am IgA Fc-Fragment im Übergangsbereich zwischen der C_{H2} und C_{H3} Domäne, hingegen binden die Fc γ und Fc ϵ Rezeptoren in der Nähe des *Hinge*-Bereichs zwischen den beiden C_{H2} Domänen des IgG Antikörpers (Sondermann *et al.*, 2000).

Der zyttoplasmatische Abschnitt des Fc α RI beinhaltet kein Signalmotiv, daher ist die Interaktion mit der Fc-Rezeptor γ -Kette für die Signaltransduktion notwendig (Pfefferkorn *et al.*, 1994). Die FcR γ -Kette beinhaltet ein Immunrezeptor Tyrosinkinase Aktivierungsmotiv (ITAM) (Reth *et al.*, 1989) und interagiert mit dem Rezeptor über eine positiv geladene Aminosäure in der Fc α RI Transmembranhelix unter Ausbildung einer Salzbrücke (Morton *et al.*, 1995). Die Vernetzung des Fc α Rezeptors in der Zellmembran durch die Bindung der Antigen-Antikörper-Komplexe, führt zur Auslösung der Signaltransduktionskette (Abb.2.5). Dabei wird zunächst das FcR γ -ITAM durch die Src-Kinase *Lyn* phosphoryliert, was wiederum zur Rekrutierung verschiedener weiterer Tyrosinkinasen wie *Syk*, *Blk*, *Btk*, *PI-3* und *PLC- γ 2* führt (Monteiro *et al.*, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IgA auch eine Aktivierung des *ERK1/2* MAP Kinase Signaltransduktionsweg hervorruft (Oudrhiri *et al.*, 2002), verschiedene Serin/Threonin Kinasen wie z.B. Proteinkinase C α , ϵ und Proteinkinase B α anregt (Lang *et al.*, 2001) und Kalzium freisetzt (Lang *et al.*, 1997). Letztendlich führt die Zusammenlagerung der Rezeptoren zu einer Vielzahl immunologischer Abwehrreaktionen wie Endozytose, die Präsentation von Antigenen (Shen *et al.*, 2001), Phagozytose der IgA opsonisierten Bakterien (Burnett *et al.*, 1993), ADCC und Lysis von Bakterien- und Tumorzellen (Lowell *et al.*, 1980, van Egmond *et al.*, 2001).

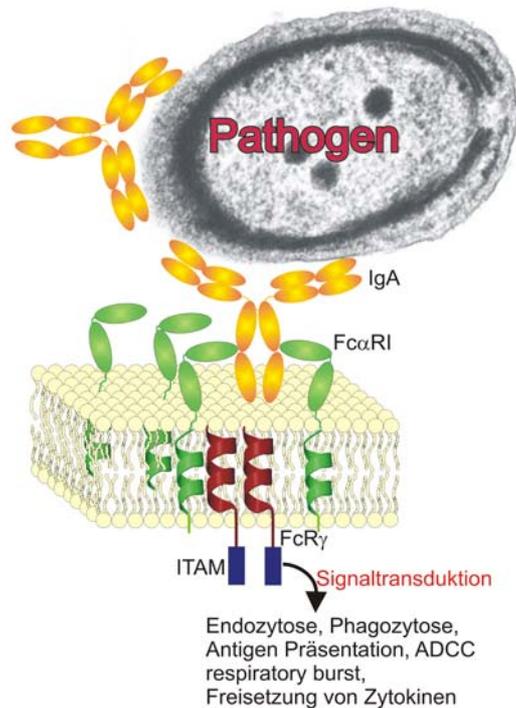


Abbildung 2.5 Signaltransduktion des FcαRI (CD89).

Schematische Darstellung der IgA (orange) vermittelten Aktivierung der Immunantwort in Abhängigkeit des FcαRI-(grün) γ-Ketten (rot) - Komplexes.

Auf Monozyten und Neutrophilen liegt der Fcα Rezeptor auch ohne assoziierte FcR γ-Kette als sogenannter γ-loser Rezeptor vor. Die Funktionsweise dieses γ-losen FcαRI ist bisher ungeklärt, jedoch konnte festgestellt werden, dass er bei der Endozytose und bei der Regenerierung der IgA Antikörper eine wesentliche Rolle spielt (Monteiro *et al.*, 2003).

Neben der wichtigen Funktion des FcαRI, die humorale Immunantwort mit den zellulären Effektorfunktionen zu verknüpfen, ist der Rezeptor auch bei der Pathogenese einer Reihe von Krankheiten involviert. Zum Beispiel ist die Ablagerung von IgA und IgA FcαRI Komplexen in der Niere die Ursache für IgA Nephropathie, der weltweit häufigsten Form der Glomerulonephritis (Monteiro *et al.*, 2003). Weitere Krankheiten, die mit einer Dysfunktion des FcαRI und somit mit einem erhöhten IgA Spiegel im Serum und einer Ablagerung von IgA in Geweben einhergehen sind, die alkoholische Leberzirrhose, Dermatitis herpetiformis, Morbus Bechterew, Systemischer Lupus Erythematosus und HIV Infektionen (Monteiro *et al.*, 1995).

Der erfolgreiche Einsatz verschiedener chimärer, monoklonaler IgG Antikörper in der Tumorthherapie hat ein großes wissenschaftliches Interesse an dieser Behandlungsmöglichkeit geweckt (Vaughan *et al.*, 1998, Holliger *et al.*, 1998). Der Nachteil dieser IgG Antikörper liegt jedoch in der gleichzeitigen Interaktion mit Fc-Rezeptoren welche die zellulären Effektorfunktionen inhibieren (FcγRIIb) sowie mit Fc-Rezeptoren (FcγRIIIb), die auf nicht-zytotoxischen Zellen exprimiert werden (Daeron, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass diese Eigenschaften die Effizienz der therapeutischen Antikörper verringern und auch zu erheblichen Nebenwirkungen im Patienten führen können (Marx, 1983). Im

Gegensatz dazu wird der Fc Rezeptor für IgA, Fc α RI nur auf zytotoxischen Zellen exprimiert und führt folglich ausschließlich zu einer Aktivierung der Immuneffektorzellen. Studien konnten belegen, dass humane IgA Antikörper mittels Fc α RI polymorphkernige Neutrophile (PMN) aktivieren und damit effektiv eine ADCC Immunabwehrreaktion auslösen (Huls *et al.*, 1999). Da diese neutrophilen Zellen die Fähigkeit haben, ein breites Spektrum verschiedener Tumorzellen spezifisch zu lysieren und die größte Population an zytotoxischen Zellen darstellen, ist ein Einsatz monoklonaler IgA Antikörper in der Tumorthherapie denkbar (Lichtenstein, 1990, Huls *et al.*, 1999). Das der Immunabwehrmechanismus des IgA primär auf Effektorzellen basiert, und nicht auf einer Aktivierung des schwer regulierbaren Komplementsystems, wie im Falle der IgG Antikörper, ist ein zusätzlicher Vorteil dieser Antikörperklasse (Valerius *et al.*, 1997).

Weiterhin wird die Anwendung bispezifischer Antikörper in der Immuntherapie diskutiert. Bispezifische Antikörper besitzen einerseits eine Spezifität gegen Fc Rezeptoren auf Immuneffektorzellen und andererseits eine Spezifität gegen ein Zielantigen auf Tumorzellen (Abb. 2.6). Dadurch könnten sie eine Möglichkeit bieten, die therapeutische Effizienz von Antikörpern weiter zu steigern (Repp *et al.*, 2001). Bispezifische Antikörper mit einer Spezifität gegen die Fc α RI Ektodomäne und den Tumorzellmarker CD20 bzw. das Protoonkogen HER-2/neu sind in der Lage eine Lyse der Tumorzellen hervorzurufen, was bereits in *ex vivo* Studien gezeigt werden konnte (Valerius *et al.*, 1997, Stockmeyer *et al.*, 2000).

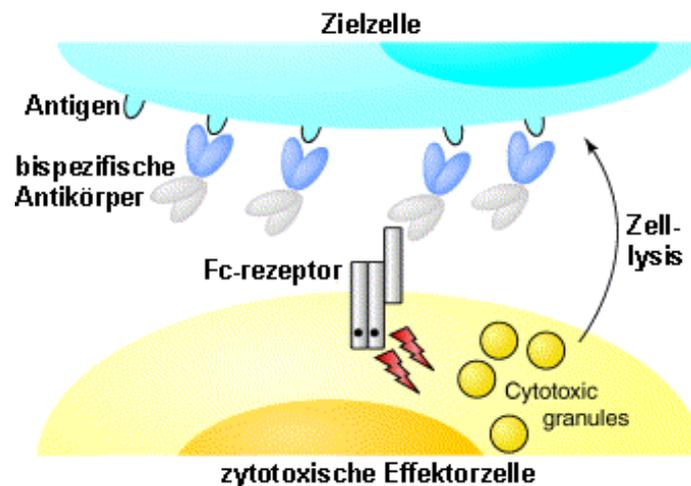


Abbildung 2.6 Einsatz bispezifischer Antikörper.

Durch bispezifische Antikörper vermittelte Lyse der Zielzelle mit Hilfe zytotoxischer Effektorzellen wie z.B polymorphkernige Neutrophile (nach Kufer *et al.*, 2004).

2.2 Das Versagen der Immunabwehr

Die Ausbreitung eines pathogenen Organismus hängt von seiner Fähigkeit ab, sich in einem Wirt zu vermehren und sich auf andere Wirte zu übertragen. Die Erreger müssen also eine Möglichkeit finden, die Immunantwort des Wirtsorganismus zu umgehen, gar nicht erst

auszulösen oder zumindest zu schwächen. Im Laufe der Evolution haben Krankheitserreger in Anpassung an ihren Wirt diverse Strategien entwickelt, um der Vernichtung durch das Immunsystem zu entgehen. Dabei können sich die Erreger in verschiedenen Kompartimenten des Körpers ausbreiten. Intrazelluläre infektiöse Organismen vermehren sich innerhalb der Wirtszelle und können sich dort entweder frei im Zytosol (Viren, Listerien und Chlamydien) oder in zellulären Vesikeln (Mycobakterien) replizieren. Extrazelluläre Erreger hingegen vermehren sich im interstitiellen Bereich, in Blut und Lymphe oder auf der Oberfläche von Epithelien. Eine Gewebeschädigung und entsprechende Krankheitssymptome entstehen dabei entweder direkt durch die Pathogene oder indirekt durch die ausgelöste Immunantwort. Viele extrazelluläre Erreger verursachen direkt Krankheiten indem sie Exotoxine sezernieren, die an der Oberfläche der Wirtszellen wirken. Normalerweise sind extrazelluläre Mikroorganismen Phagozytose anfällig und haben deshalb spezielle Mechanismen entwickelt, wie z.B. die Ausbildung der dicken Peptidoglykanschicht bei grampositiven Bakterien, um dieser Vernichtung zu entgehen. Anhand des humanen Pathogens *Streptococcus pyogenes* wird im nächsten Kapitel ein weiterer Beispielmechanismus zur Umgehung der Abwehrreaktion gegeben.

2.2.1 Streptokokken Infektion

Die serologische Klassifizierung (Lancefield Klassifizierung) der verschiedenen β -hämolytischen Streptokokken Stämme basiert auf der Zusammensetzung ihrer Peptidoglykanschicht. Streptokokken der serologischen Gruppe A deren Polysaccharidschicht aus an Rhamnose gebundenem N-Acetylglukosamin besteht, gehören der Spezies *Streptococcus pyogenes* an.

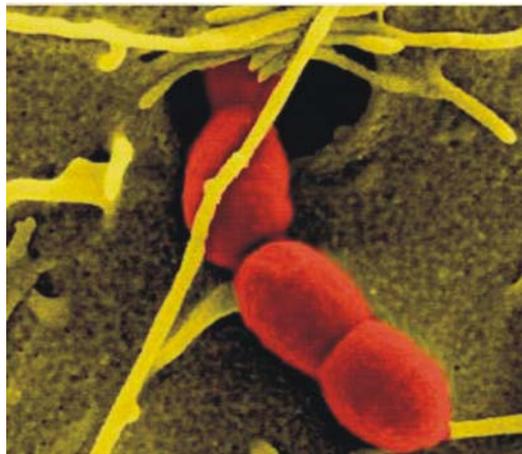


Abbildung 2.7 *Streptococcus pyogenes*.

Abbildung von M. Rohde, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig.

Diese extrazellulären pathogenen Bakterien zählen zu den grampositiven Kokken, die sich in Ketten oder in Paaren zusammenlagern (Abb. 2.7).

Die Streptokokken der Gruppe A besiedeln insbesondere den humanen Rachenraum und die Haut und sind Verursacher einer Reihe eitriger Entzündungen sowie deren

Folgekrankheiten (Cunningham, 2000). Vor allem sind sie die häufigste Ursache für bakterielle Pharyngitis und die Erreger von Scharlach und Eiterflechte. Während dieses Pathogen in der Vergangenheit für das weit verbreitete Kindbettfieber verantwortlich war, spielen gegenwärtig vor allem das Toxische-Schock-Syndrom, Sepsis, Meningitis und die nekrotisierende Fasciitis, eine sehr schwere Erkrankung die unter dem Namen *flesh-eating* Syndrom bekannt wurde, eine große Rolle (Abb. 2.8). Zu den Folgekrankheiten gehören das akute rheumatische Fieber, akute Glomerulonephritis, rheumatische Herzerkrankungen und Arthritis. *Streptococcus pyogenes* Infektionen gehören weltweit zu den häufigsten Infektionskrankheiten, wobei sehr häufig Kinder im Alter von 4 bis 14 Jahren betroffen sind (Bisno, 1995).



Abbildung 2.8 *Flesh-eating* Syndrom.

Abbildung von U. von Pawel-Rammingen.

Das vermehrte Auftreten auch schwerwiegender Streptokokken Infektionen (Weichteil und Haut Infektionen, *flesh-eating* Syndrom), mit hohen Sterblichkeitsraten in den 80er und 90er Jahren in Europa und den USA, zeigt die Notwendigkeit eines umfassenden Verständnisses der Virulenz dieses Pathogens. Zur Entwicklung neuer Medikamenten ist es vor allem von Bedeutung zu verstehen, mit welchen Mechanismen diese Bakterien in der Lage sind das humane Immunsystem zu umgehen.

Neben der oben aufgeführten Einteilung der Streptokokken nach der Lancefield Klassifizierung, ist eine weitere Unterscheidung in M-Protein Serotypen möglich, die anhand der Expression verschiedener M-Oberflächenproteine vorgenommen wird. Bisher konnten über 80 dieser Serotypen beschrieben werden, die jeweils mit verschiedenen Ausprägungen der Streptokokken Infektionen in Verbindung gebracht werden können. Diese M-Proteine wirken als Antigene und ihre Hypervariabilität führt dazu, dass nach der Infektion mit einem Serotyp nur eine typspezifische Immunität im Wirt hervorgerufen wird und demnach eine erneute Infektion durch einen anderen Serotyp erfolgen kann. Dadurch können im Wesentlichen gleichartige Erreger mehrfach dasselbe Individuum infizieren und eine Krankheit auslösen. Außerdem sind diese in der Zellwand verankerten M-Proteine in der Lage das Fc-Fragment von Immunglobulin G zu binden. Dadurch unterbinden sie die Interaktion zwischen dem IgG Fc-Fragment und dem Komplement Faktor C1q, was zu einer verminderten Komplementaktivierung führt (Berge *et al.*, 1997).

Weiterhin sekretiert *Streptococcus pyogenes* eine Reihe verschiedener Virulenzfaktoren in das umgebende Gewebe. Zu diesen Virulenzfaktoren gehören die extrazellulären Toxine A, B, C und H sowie Hämolysine (Slo, Sls), Streptokinase (Ska), Endoglykosidase S (EndoS), C5a Peptidase (ScpA) und Kollagenasen (Spy0590, Spy0591). Diese auch als Superantigene bezeichneten Exotoxine werden in variabler Zusammensetzung sekretiert. Unter den verschiedenen molekularen Mechanismen die zur Schwächung des humanen Abwehrsystems durch diese Exotoxine führen, spielt die Proteolyse von Proteinen die an der Immunantwort beteiligt sind, eine bedeutende Rolle.

Die direkte Beeinflussung der adaptiven Immunantwort durch die proteolytische Spaltung von Immunglobulinen ist ein weit verbreiteter Mechanismus, der auch von vielen anderen pathogenen Mikroorganismen wie z.B.: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoea* und *Neisseria meningitidis* genutzt wird (Travis & Potempa, 2000). Die Spaltung der Immunglobuline in der *Hinge*-Region erfolgt dabei zwischen dem Fab₂ und Fc-Fragment des Antikörpers. Da das Fc-Fragment wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben für die Vermittlung der zellulären Effektorfunktionen wie z. B. Phagozytose verantwortlich ist sowie die Aktivierung des Komplementsystems vermittelt, führt die proteolytische Spaltung dieses zentralen Proteins der adaptiven Immunantwort zur Beeinträchtigung des humanen Immunsystems.

In verschiedenen Studien an Mausmodellen konnte belegt werden, dass die Cysteinprotease SpeB (*Streptococcus pyogenes* erythrogenes Exotoxin B) aus *Streptococcus pyogenes* eine essentielle Rolle als Virulenzfaktor spielt (Lukomski *et al.*, 1997). SpeB war die erste Cysteinprotease, die aus Prokaryonten isoliert werden konnte (Elliott, 1945) und zeigt proteolytische Aktivität gegen ein breites Spektrum humaner Proteine wie Immunglobuline, Fibronectin, Vitronectin (Kapur *et al.*, 1993), Interleukin-1 β , sie aktiviert die Matrix-Metalloprotease MMP-2 (Burns *et al.*, 1996) und sie setzt aktive Kinine aus Kininogenen frei (Herwald *et al.*, 1996). Bei *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein SpeB *knock-out* Stamm eine geringere Virulenz entwickelt als Wildtyp *S.pyogenes* (Lukomski *et al.*, 1997). Allerdings sind auch widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung dieser Cysteinprotease für die Virulenz von *S. pyogenes* veröffentlicht worden (Ashbaugh & Wessels, 2001). Zum einen zeigten Patienten mit schwerwiegenden Streptokokken Infektionen nur einen sehr geringen Antikörper-Titer gegen SpeB (Holm *et al.*, 1992), zum anderen wurde festgestellt, dass SpeB nur während der stationären Wachstumsphase exprimiert wird (Chaussee *et al.*, 1997). Dies lässt es fraglich erscheinen, dass SpeB der Hauptvirulenzfaktor während einer *S. pyogenes* Infektion ist. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Funktion des SpeB das humane Immunglobulin G zu spalten, um so die Opsonisierung der Bakterien zu verhindern, auch in Abwesenheit dieser Protease erfolgen kann. Die für diese Aktivität verantwortliche, bisher unbekannt Protease wurde als IdeS bezeichnet, die Abkürzung für *Immunglobulin G-degrading enzyme of S. pyogenes* (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2002).

2.2.2 Die Cysteinendoprotease IdeS

Die Expression der Protease IdeS konnte zuerst in dem Streptokokken Stamm AP1 nachgewiesen werden (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2002). Dieser Stamm gehört zu dem Serotyp M1 Streptokokken der Gruppe A, die am häufigsten an schwerwiegenden *S. pyogenes* Infektionen beteiligt sind (Holm *et al.*, 1992). Auch die klinisch relevanten Stämme der Serotypen M12 und M55 produzieren proteolytisch aktives IdeS (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2002). Ein weiterer Hinweis für die wichtige Funktion dieser Protease als Virulenzfaktor ist der Nachweis von Antikörpern gegen IdeS im Serum von Patienten mit Pharyngitis, akutem rheumatischem Fieber und anderen akuten *S. pyogenes* Infektionen (Lei *et al.*, 2000).

Um zu bestätigen, dass die proteolytische Spaltung des IgGs durch IdeS direkt die humane Immunantwort beeinträchtigt und somit das Überleben von *Streptococcus pyogenes* im Serum beeinflusst, wurde das Protein rekombinant hergestellt und in verschiedenen bakteriziden Untersuchungen eingesetzt. Die Bakterien des AP1 Stammes wurden für diese Experimente mit Blutplasma von immunisierten und nicht-immunisierten Patienten inkubiert, um eine Opsonisierung der bakteriellen Oberfläche mit Immunglobulin G zu erreichen. Die opsonisierten Bakterien wurden anschließend gewaschen und mit IdeS inkubiert bzw. als Negativkontrolle mit einem Kontrollpuffer behandelt. Nach einem zweiten Waschschrift wurden humane polymorphkernige Neutrophile (PMN) mit diesen Bakterien in einem Verhältnis von 0,1-5 Bakterien/PMN-Zelle infiziert. Sofort nach der Zusammenführung der Zellen und nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die Zahl an c.f.u (*colony forming units*) bestimmt. Das Verhältnis der c.f.u. nach 30 min, geteilt durch die Anzahl der c.f.u. zum Zeitpunkt Null ergibt den zu bestimmenden *survival* (Überlebens)-Faktor (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2002).

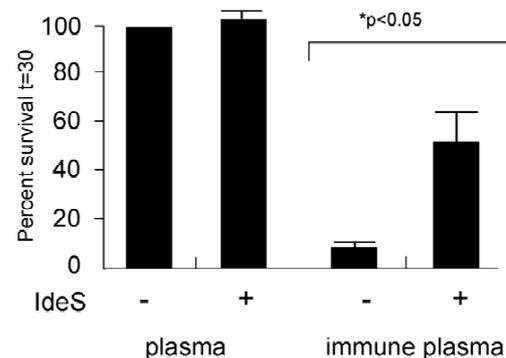


Abbildung 2.9 Einfluss von IdeS auf die Phagozytose der Streptokokkenzellen durch PMNs. Mit IgG opsonisierte Streptokokkenzellen (AP1) wurden mit und ohne IdeS Behandlung der Phagozytose durch PMN-Zellen ausgesetzt. Nach 30 min Inkubationszeit wurde die Anzahl an c.f.u. bestimmt und daraus der *survival*-Faktor berechnet. Ein *survival*-Faktor von 100% wurde für AP1 Zellen in nicht-immunen Plasma festgelegt. Die ausführliche Beschreibung des Versuchs ist dem Text zu entnehmen. (Abbildung aus: U. von Pawel-Rammingen *et al.*, 2002)

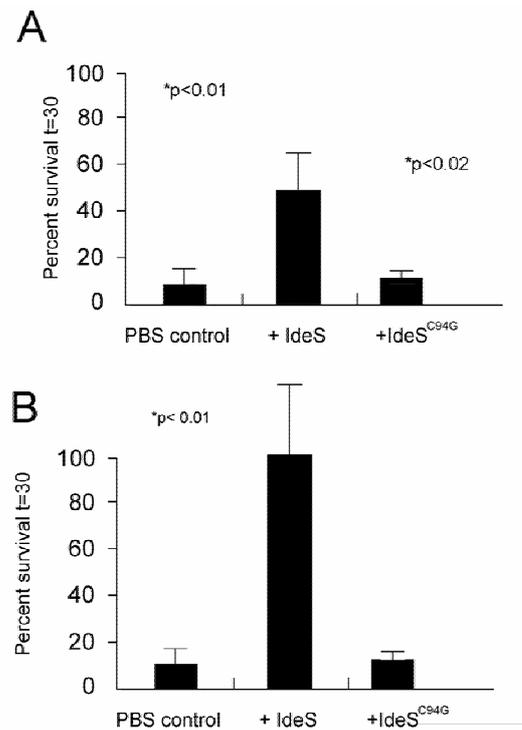


Abbildung 2.10 Auswirkung von IdeS auf die Überlebensrate von *S.pyogenes*.
Analyse des Einflusses von IdeS und der proteolytisch inaktiven IdeS C94G Mutante auf das Überleben von *Streptococcus pyogenes*, anhand der Bestimmung des *survival*-Faktors nach Behandlung mit PMNs (A) und Gesamtblut (B). (Abbildung aus: U. von Pawel-Rammingen, 2002)

Der gleiche Versuch wurde auch mit der inaktiven C94G Mutante der IdeS Protease durchgeführt (Abb. 2.10 A). Ebenso wurde der *survival*-Faktor der mit IdeS bzw. IdeS C94G behandelten Bakterien im Gesamtblut analysiert (Abb. 2.10 B). Wie aus den Abbildungen 2.9 und 2.10 ersichtlich, führt die Inkubation mit IdeS zu einer verringerten Phagozytose der Zellen durch PMNs und auch die Lyse der Bakterien im humanen Gesamtblut wird inhibiert. Die Analyse der Proteine im Überstand nach Inkubation mit IdeS ergab weiterhin, dass IgG proteolytisch in das Fc und das Fab₂-Fragment gespalten wurde. Diese Ergebnisse belegen, dass über die variablen Domänen des Fab₂ Fragmentes an die Bakterienoberfläche gebundenes Immunglobulin G von IdeS proteolytisch verdaut wird und dass diese IgG Spaltung die Resistenz von *S.pyogenes* gegenüber phagozytierenden Zellen erhöht (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2002).

IdeS besteht insgesamt aus 339 Aminosäuren wobei die N-terminalen 29 Reste das Signalpeptid bilden, was durch Aminosäuresequenzanalysen festgestellt werden konnte (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2002). Nach Abspaltung des vorhergesagten Signalpeptids hat die Protease ein Molekulargewicht von 34,9 kDa. Bei einer Sequenzhomologie-Suche mit dem BLASTp Algorithmus gegen die DDBJ/EMBL/GenBank Datenbanken konnte keine Sequenzähnlichkeit zu anderen prokaryontischen Proteinen und nur eine geringe Sequenzhomologie zu dem humanen MAC-1 Integrin (24% in 204 der 339 Reste) festgestellt werden. Aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie zu anderen Proteasen,

konnte im Vorfeld dieser Arbeit keine Aussage über den Katalysemechanismus oder die Tertiärstruktur des Proteins gemacht werden. Eine weitere Besonderheit der IdeS Protease ist, dass die Aminosäuresequenz ein RGD Motiv beinhaltet (Aminosäure 214-216). Dieses Motiv dient als Erkennungssequenz für Integrine, welche auf der Zelloberfläche der Wirtszellen für verschiedene Zell-Zell-Adhensions Funktionen und Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Bei einer Reihe von pathogenen Bakterien und Viren konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese Interaktion zu den Wirtszell-Integrinen wesentlich zum Pathomechanismus beiträgt, da sie zum Beispiel die Anheftung der Bakterien an die Wirtszelle ermöglichen (Isberg & Van Nhieu, 1994).

Biochemische Untersuchungen sowie Mutationanalysen konnten zeigen, dass der einzelne Cystein-Rest C94 in der IdeS-Aminosäuresequenz für die enzymatische Aktivität essentiell ist und IdeS folglich zur Familie der Cysteinproteasen gehört (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2002). Auch Inhibitor-Studien mit typischen Cysteinprotease-Inhibitoren wie Iodessigsäure und dem Peptidderivat N-Benzylloxycarbonyl-leucyl-valyl-glycyl-diazomethan (Z-LVG-CHN₂), die kovalent an die Thiolgruppe des Cysteins binden, konnten dies bestätigen. Hingegen konnte die Aktivität der Protease nicht durch das für Cysteinproteasen häufig verwendete Peptidanalogen E64 inhibiert werden. Im Gegensatz zu anderen extrazellulären, bakteriellen Cysteinproteasen aus *Clostridium histolyticum*, *Staphylokokkus aureus* und *Porphyromonas gingivalis* wird IdeS als reifes Enzym exprimiert und besitzt kein Prosegment. Durch zielgerichtete Mutagenese aller Histidin Reste des Proteins konnte die an der katalytischen Triade der Cysteinprotease beteiligte Aminosäure Histidin 262 identifiziert werden (Lei *et al.*, 2003). Durch die Mutagenese aller Aspartatreste konnte jedoch nicht eindeutig festgestellt werden, ob das Aspartat 284 oder 286 die dritte Aminosäure der katalytischen Triade darstellt.

Die herausragendste Eigenschaft der Endoprotease IdeS ist die stringente Spezifität für humanes Immunglobulin G. Bisher konnte kein weiteres Substrat für IdeS nachgewiesen werden und auch strukturell sehr ähnliche Proteine wie Immunglobuline anderer Klassen werden nicht geschnitten. Die Spaltung des humanen Immunglobulins G durch die Cysteinendoprotease IdeS erfolgt zwischen den Aminosäuren Glycin 236 und Glycin 237 in der unteren *Hinge*-Region (siehe Kap. 2.1.1) des Antikörpers. Die Erkennungssequenz LLGGP besetzt die in Kap. 2.2.3 beschriebenen Substratspezifitätstaschen P3–P2'. Im humanen IgG2 wird jedoch auch ein PVAGP Motiv erkannt. Wie aus Abbildung 2.11 ersichtlich, liegen die Substratreste C-terminal zur Spaltstelle (Pro 238, Ser 239) direkt vor dem ersten β -Strang der C_H2 Immunglobulin Domäne.

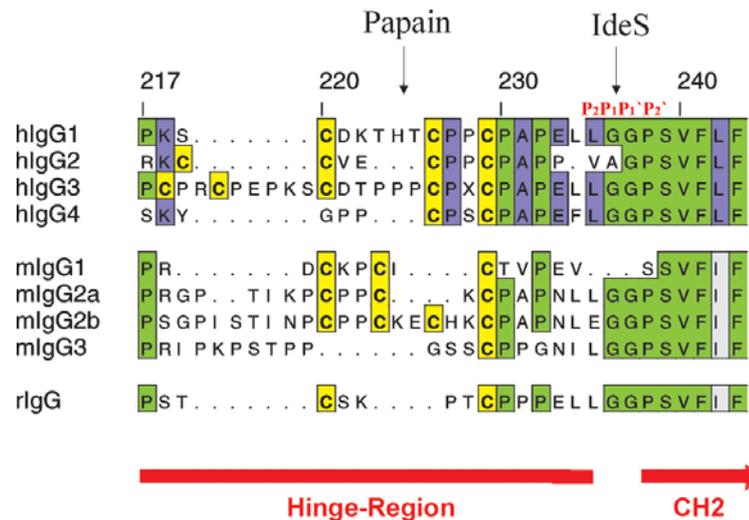


Abbildung 2.11 Hinge-Region verschiedener IgG Isotypen.
Aminosäuresequenzvergleich der Hinge-Regionen verschiedener IgG Isotypen aus Mensch, Maus und Kaninchen.

Hingegen schneidet die ausführlich untersuchte Cysteinprotease Papain oberhalb der Disulfidbrücken im mittleren, sehr flexiblen Bereich der Hinge-Region. Neben den humanen IgG Isotypen ist IdeS auch in der Lage, die Maus Antikörper IgG2a und IgG3 proteolytisch zu verdauen. Dagegen werden synthetisierte Peptide, die der Aminosäuresequenz des Hinge-Peptids des humanen IgG entsprechen sowie andere Proteine wie Rinder Aprotinin, welche die Spaltsequenz LLGG enthalten, nicht als Substrat erkannt (Vincent *et al.*, 2004).

2.2.3 Mechanismus von Cysteinproteasen

Die katalytische Aktivität von Cysteinproteasen beruht auf der, im Allgemeinen nicht beobachteten Nukleophilie der Thiolgruppe eines Cysteinrestes. Diese Reaktivität wird durch die in Cysteinproteasen vorhandene katalytische Triade hervorgerufen. In der Cysteinprotease IdeS setzt sich diese katalytische Triade aus den Aminosäuren Cystein 94, Histidin 262 und Aspartat 284/286 zusammen. Dabei ist das dem Cystein benachbarte Histidin in der Lage, dass Proton der Thiolgruppe des Cysteins zu übernehmen (Abb. 2.12), wenn das Schwefelatom einen nukleophilen Angriff auf das Substrat durchführt.

Der katalytische Mechanismus der Cysteinproteasen konnte bereits anhand zahlreicher röntgenkristallographischer Untersuchungen am Beispiel des Papains hergeleitet werden (Drenth *et al.*, 1976).

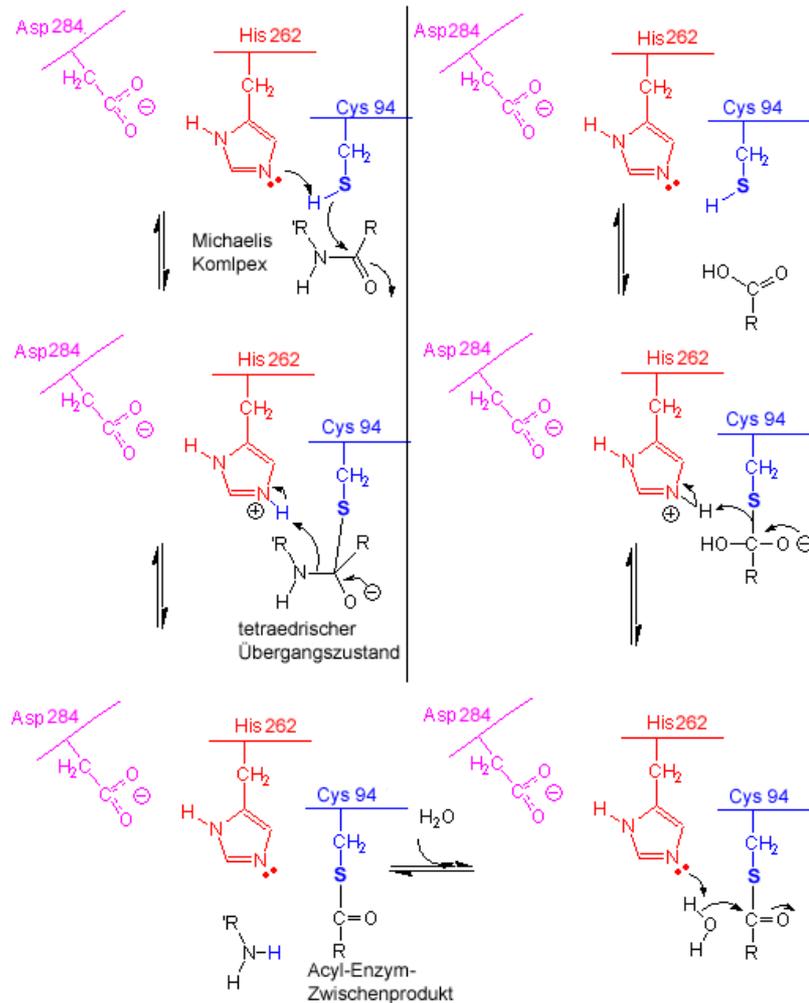


Abbildung 2.12 Katalysemechanismus der Cysteinproteasen.

Das zu spaltende Substrat ist in schwarz und die Reste der katalytischen Triade in blau (Cystein), rot (Histidin) und violett (Aspartat) eingezeichnet. Die angegebenen Restnummern beziehen sich auf die Nummerierung der Cysteinendoprotease IdeS.

Die Hydrolyse beginnt mit einem nukleophilen Angriff des Schwefelatoms des katalytischen Cysteins auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung des Substrats. Die Kohlenstoff-Sauerstoffbindung wird daraufhin zur Einfachbindung und das Sauerstoffatom trägt eine negative Nettoladung. Die vier an den Kohlenstoff gebundenen Atome liegen in einer tetraedrischen Anordnung vor. Dieser sogenannte tetraedrische Übergangszustand wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert, die sich zwischen dem Oxyanion und zwei NH-Gruppen des Proteins ausbilden. Diese Bindungsstelle wird als Oxyanionentasche bezeichnet. Während der Ausbildung des tetraedrischen Zwischenprodukts wird das Proton der Cysteinthiolgruppe auf das Histidin übertragen. Durch die Anwesenheit eines Aspartat in direkter Nachbarschaft des Histidins wird dieser Protonentransfer erheblich erleichtert. Das Aspartat positioniert den Imidazolring des Histidins optimal und neutralisiert partiell die im Übergangszustand erhaltene positive Ladung. Das Proton des protonierten Histidins wird dann auf das Stickstoffatom der Peptidbindung übertragen und führt zur deren Spaltung. Die Aminkomponente des Substrats ist in diesem Stadium über eine

Wasserstoffbrücke an das Histidin gebunden und die Carbonylkomponente ist mit dem Cystein verestert und bildet ein Acyl-Enzym Zwischenprodukt. Damit ist der Acylierungsschritt der hydrolytischen Reaktion beendet. Bei der anschließenden Deacylierung wird die Aminkomponente des Substrates durch ein Wasser ersetzt. Zuerst wird ein Proton des Wassermoleküls durch das Histidin abgezogen und das verbleibende OH⁻-Ion greift das Carbonylkohlenstoffatom der Acylgruppe an. Dadurch entsteht ebenso wie im Acylierungsschritt ein tetraedrischer Übergangszustand. Die Übertragung des Protons auf das Schwefelatom des Cysteins führt letztendlich zur Freisetzung der Carboxylkomponente des Substrats und das Enzym ist für eine neue Katalyserunde bereit.

Die für eine Proteolyse optimale Orientierung der zu spaltenden Peptidbindung im aktiven Zentrum wird durch die für das jeweilige Substrat spezifischen Substratbindungstaschen gewährleistet. Die N-terminal zu der zu spaltenden Peptidbindung gelegenen Substratreste werden dabei mit P1, P2, P3 und die C-terminalen Aminosäuren mit P1', P2' bezeichnet. Die zu diesen Substratresten zugehörigen Enzym-Bindungstaschen werden dementsprechend als S1, S2, S3 und S1', S2' benannt (Schechter & Berger, 1967). Die Spezifität der IdeS Protease für das Substrat IgG legte schon vor Beginn dieser Arbeit die Vermutung nahe, dass die Substratbindetaschen sehr selektiv ausgeprägt sind.

3 Zielsetzung

Das humane Immunsystem ist ein komplexes und sehr wirkungsvolles Verbundsystem aus Zellen und Molekülen, dessen Aufgabe es ist, den Körper gegenüber pathogenen Organismen wie Bakterien und Viren zu schützen. Um einerseits die Funktionsweise der Immunreaktion und andererseits die Umgehung dieses Abwehrmechanismus durch Pathogene auf molekularer Ebene zu verstehen, ist die Röntgenstrukturaufklärung der an diesen Prozessen beteiligten Moleküle eine geeignete Methode. Zur Entwicklung von neuen Therapeutika die in die Abläufe der Immunreaktion modulierend eingreifen oder die spezifisch Virulenzfaktoren von Pathogenen inhibieren sollen, ist ein Verständnis der Wirkmechanismen auf molekularer Grundlage essentiell. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, zum einen die Kristallstruktur des humanen Immunglobulin A Rezeptors Fc α RI und zum anderen die Struktur des, für *Streptococcus pyogenes* wichtigen Virulenzfaktors IdeS aufzuklären.

Um für die Kristallisation geeignete Mengen an Fc α RI herstellen zu können, sollte das extrazelluläre Fragment des humanen Fc α -Rezeptor I rekombinant in *E.coli* exprimiert werden. Anschließend sollte das in *E.coli* in Form von *inclusion bodies* vorliegende Protein rückgefaltet, gereinigt und kristallisiert werden. Aus der Kristallstruktur und dem Vergleich mit Strukturhomologen sollten vor allem Informationen über die Struktur der Immunglobulin A Bindungsstelle sowie über die Faltungstopologie der einzelnen Immunglobulindomänen gewonnen werden.

Über die Funktionsweise der Cysteinendoprotease IdeS als Virulenzfaktor von *Streptococcus pyogenes* war nur wenig bekannt. Daher erwartete man mit Hilfe der Kristallstruktur den Katalysemechanismus dieser Cysteinprotease beschreiben zu können und die ungewöhnliche Substratspezifität für Immunglobulin G aufzuklären. Da die aktive Protease bislang nicht kristallisierte, sollte die katalytisch inaktive C94S Mutante rekombinant in *E.coli* hergestellt, gereinigt und kristallisiert werden. Für mögliche medizinische Anwendungen, bestand zusätzlich die Aufgabe die Substratbindung genau zu untersuchen, um die Entwicklung von niedermolekularen Inhibitoren zu ermöglichen.

4 Material

4.1 Geräte

Autoklav	Tuttnauer Systec (Wettenberg), 5075 ELV, 2540 EL
Brutschrank	Heraeus (Hanau), B5042
Elektroporationsgerät	Stratagene (La Jolla, CA USA), Electroporator 1000
Elektrophoresekammern	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) Elpho 80/92
Feinwaage	Sartorius (Göttingen), BP 211D
FPLC Chromatographie-Säulen	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
FPLC-Chromatographie-System	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) Äkta™ Explorer, SMART, Fraktionssammler Frac-100, Flachbrettschreiber REC 102, Pump P-500, Liquid Chromatography Controller LCC-500, Dual Path Monitor UV-2
Heizblock	PMC, Digital Dry Block Heater
Homogenisator	IKA®-Werke (Staufen), Ultra-Turrax T25 basic
Kristallisationplatten	Charles Supper Company (Natick, MA USA), CrysChem Platten
Kristallisationsroboter	Beckmann (München), Biomek 1000
Magnetrührer	Heidolph, MR 1, IKA®-Werke (Staufen) RET
PCR-Thermocycler	Stratagene (La Jolla, CA USA) Robocycler Gradient 96 Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH (Hamburg), Mastercycler® ep gradient
pH-Meter	Mettler Toledo GmbH (Giessen), MP220 mit Elektrode In Lab 410

Amicon Ultrafiltrator	Millipore (Billerica, MA USA), stirred cell series 8000
Schüttelinkubator	Braun (Melsungen), HAT
<i>Semi dry blot</i> Apparatur	BioRad (München)
Sonifier	Fa. G. Heinmann (Schwäbisch-Gmünd), Branson Sonifier Modell 250
Spektrophotometer	Beckmann (München), DU TM 7500 Perkin Elmer (Wellesley, MA USA), Lambda 17 UV/VIS
Thermomixer	Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH (Hamburg), 5436
Tischzentrifugen	Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH (Hamburg), 5804 R, 5415 R
UV-Transilluminator	Stratagene (La Jolla, CA USA), Eagle eye II
Waage	Mettler Toledo GmbH (Giessen), PE 3600
Zentrifugen	Beckmann (München), Kühlzentrifuge Avanti TM J-301 und Avanti J-25 TM , Zentrifuge J-6 M/E

4.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Serva oder Sigma bezogen und besaßen den Reinheitsgrad „zur Analyse“.

4.3 Chromatographiematerialien

Superdex 75 und 200	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Ni-NTA	Qiagen GmbH (Hilden)
Q-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
DEAE Cellulose DE52	Whatman [®] (Middlesex, England)
CNBr-Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)

4.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs (Beverly, MA USA)
DNase	Sigma (Taufkirchen)
Lysozym	Sigma (Taufkirchen)
Papain (immobilized)	Pierce (Rockford, IL USA)
Igase	MoBiTec (Göttingen)
Platinum [®] Pfx-DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Beverly, MA USA)

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs bezogen. Alle Enzyme wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

4.5 Puffer, Medien und Antibiotika

Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung

Das Autoklavieren der Medien und Lösungen erfolgte für 20 Minuten bei 120°C.

LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium 15 g/l Bakto-Agar
Minimal Medium für N ₁₅ Markierung	
Minimal Medium (für 1l Medium)	100 ml M9 Medium ¹ (10x)* 10 ml Spurenelemente ² (100x sterilfiltriert) 20 ml 10% (w/v) Glukose* 1 ml 1 M MgSO ₄ * 0,3 ml 1 M CaCl ₂ * 1 ml 1 mg/ml Biotin (sterilfiltriert) 1 ml 1 mg/ml Thiamin (sterilfiltriert) 870 ml Wasser im 2l Schüttelkolben*

*Die angegebenen Lösungen wurden vor der Herstellung des Mediums separat autoklaviert.

¹ M9 Medium (10x)	60 g/l Na ₂ HPO ₄ 30 g/l KH ₂ PO ₄ 5 g/l NaCl 5 g/l N ¹⁵ H ₄ Cl
² Spurenelemente (100x)	5 g/l EDTA 0,83 g/l FeCl ₃ x 6 H ₂ O 84 mg/l ZnCl ₂ 13 mg/l CuCl ₂ x 2 H ₂ O 10 mg/l CoCl ₂ x 6 H ₂ O 10 mg/l H ₃ BO ₃ 1,6 mg/l MnCl ₂ x 6 H ₂ O 10 mg/l (Mo3O10) ₄ x H ₂ O

Um die Spurenelementlösung herzustellen, wurden zunächst 5 g/l EDTA in 800 ml Wasser gelöst, der pH Wert auf 7,5 eingestellt und anschließend die restlichen Spurenelemente zugesetzt.

New Minimal Medium (NMM) für die Selenomethionin Expression

NMM (für 1 l Medium)	740 ml Wasser im 2 l Schüttelkolben (autoklaviert) 60 ml 1 mg/ml Seleno-DL-Methionine (steril- filtriert) 100 ml Aminosäuren-Lösung (10x) 100 ml Salz- Lösung (10x)
Aminosäuren (10x) für NMM	27,4 ml H ₂ O 47,6 ml 1 M K ₂ HPO ₄ 22 ml 1 M KH ₂ PO ₄ je 50 mg Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Prolin, Serin, Threonin, Valin 3 ml Aminosäurelösung II

Mit Wasser auf ein Volumen von 100 ml auffüllen und vor der Zugabe zum NMM sterilfiltrieren.

Aminosäurelösung II	50 mg Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin 2,85 ml H ₂ O 150 µl 32%ige HCl
---------------------	--

Salzlösung (10x) für NMM	7,5 ml 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,7 ml 5 M NaCl 20 ml 1 M Glukose 1 ml 1 mg/ml $\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 1 ml 1M MgSO_4 1 ml Spurenelementelösung 1 ml 10 mg/ml Thiamin 1 ml 10mg/ml Biotin 1 ml $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
--------------------------	---

Mit Wasser auf ein Volumen von 100 ml auffüllen und vor der Zugabe zum NMM sterilfiltrieren.

Spurenelemente für NMM	5 μl 10 mg/ml MnCl_2 5 μl 10 mg/ml $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 5 μl 10 mg/ml Na_2MoO_4 5 μl 10 mg/ml ZnSO_4 auf 50 ml mit H_2O auffüllen
------------------------	--

IPTG und Antibiotika-Stammlösungen

IPTG	238 mg/ml in Wasser
Ampicillin (Na-Salz)	100 mg/ml in Wasser
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol
Kanamycin	50 mg/ml in Wasser

Alle angegebenen Stammlösungen wurden sterilfiltriert und in einem Verhältnis von (v/v) 1:1000 dem Medium zugegeben.

Sonstige Lösungen

Coomassie-Färbelösung	40% Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva)
DNA Probenpuffer	10 mM Tris,/HCl pH 7,2 1 mM EDTA 50% (w/v) Glycerin 0,005% (w/v) Bromphenolblau
Entfärber	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure

Geltrocknungslösung	20% (v/v) Ethanol 1% (v/v) Methanol 1% (v/v) Isopropanol 1,5% (v/v) Glycerin
4xLämmli-Puffer n. red.	250 mM Tris-HCl pH 6,8 8% SDS 40% (v/v) Glycerin 0,004% (w/v) Bromphenolblau
4xLämmli-Puffer red.	250 mM Tris-HCl pH 6,8 8% SDS 40% (v/v) Glycerin 0,004% (w/v) Bromphenolblau 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol
Lysispuffer 1	300 mM NaCl 100 mM Tris/HCl pH 8,0 0,02% (w/v) Natriumazid
Lysispuffer 2	300 mM NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O pH 7,5 5 mM Imidazol
PBS	0,8% NaCl 0,02% KCl 0,114% Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,02% KH ₂ PO ₄ alle Angaben (w/v)
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
TAE	40 mM Tris/HCl pH 7,8 10 mM Na-Acetat 1 mM EDTA
Transfer Puffer (Westernblot)	50 mM Borat/NaOH pH 9,0 20% Methanol
Waschpuffer P1	100 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,5% (v/v) N,N-dimethyldodecylamine N-oxid (LDAO) 1 mM EDTA

<i>hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>supE44 relA1 deoR</i> $\Delta(lacZYA-argF)$ U169	Laboratories, Palo Alto, CA USA
--	---------------------------------

*DE3 ist ein λ Phage, der lysogen in *E. coli* vorliegt. Er tragt das T7 Polymerase-Gen unter lacUV5 Kontrolle.

4.8 Plasmide

Tabelle 4.3 Plasmide

Name	Verwendung	Eigenschaften	Hersteller
pET-22b+	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	Expression von Sequenzen mit Start-Methionin unter Kontrolle eines T7 Promotors, Ampicillin Resistenz	Novagen Inc. Madison, WI USA
pET-28b	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	Expression von Sequenzen mit Start-Methionin unter Kontrolle eines T7 Promotors, Kanamycin Resistenz, optionaler N-terminaler His ₆ -Tag mit Thrombin Spaltstelle	

4.9 Standards und Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIA quick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
<i>High-Range-Molekulargewichtsmarker</i>	Sigma (St.Louis, MO USA)
<i>Low-Range-Molekulargewichtsmarker</i>	Sigma (St.Louis, MO USA)
<i>Broad-Range-Molekulargewichtsmarker</i>	Sigma (St.Louis, MO USA)
1kB DNA Langlenstandard	New England Biolabs (Beverly, MA USA)
1kB DNA Langlenstandard	MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)

4.10 Sonstige Materialien

Centricon Mikrokonzentratoren	Millipore (Billerica, MA USA) MWCO 5 und 10 kDa
Dialyseschläuche Spectra/Pore	Spectrum Laboratories, Inc. (Gardena, CA USA), MWCO 6-8 kDa
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Netheler und Hinz GmbH (Hamburg), 1,5ml und 2ml
Filterpapier	Wattman (Maidstone, England)
Gene Pulser [®] Cuvette	BioRad (Hercules, CA USA), 0,1cm Elektrodenabstand
PVDF-Membran	Pall (New York, NY USA)
Petrischalen	Greiner (Nürtingen)
Quarzglasküvette	Hellma (Müllheim), d=1cm
Sterilfilter	membraPure (Bodenheim)
Ultrafree-MC	Millipore (Billerica, MA USA) GV 0,22µm

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Separation, Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese in 1-1,5% igen Agrosegelelen. Die Proben wurden vor dem Auftragen 1:1 in DNA-Probenpuffer verdünnt und mit „SYBR Green“ nach Angaben des Herstellers versetzt. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer als Laufmittelsystem, bei einer Spannung von 5-10 V/cm durchgeführt.

Nachdem die Proben in dem Gel eine, zur Auftrennung ausreichende Strecke zurückgelegt hatten, wurde das Gel unter UV-Licht ($\lambda=254\text{nm}$) analysiert. Das in die DNA interkalierte „SYBR Green“ fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht und macht somit die DNA-Banden sichtbar (Jin, X. *et al.*, 1994).

5.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1,0 in etwa einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA und 30 $\mu\text{g/ml}$ im Falle von Oligonukleotiden. Um ein möglichst exaktes Messergebnis zu erhalten, wurden die Nukleinsäurelösungen so verdünnt, dass der Extinktionswert zwischen 0,1 und 1 lag.

5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion lässt sich ein DNA-Abschnitt amplifizieren, der von bekannten DNA-Sequenzen begrenzt wird (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988).

Alle PCR-Reaktionen wurden mit der thermostabilen Platinum[®] Pfx DNA Polymerase durchgeführt, welche eine korrekturlesende 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt. Dabei wurde die Polymerase in einem sogenannten *hot start* Verfahren vor dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben.

Ein Reaktionsansatz von 100 μl setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 5.1 Reaktionsansatz PCR

Zugabe	Volumen	Konzentration (Stocklösung)
<i>Pfx</i> -Puffer	10 μ l	10 x
H ₂ O (steril)	79 μ l	
MgSO ₄	2 μ l	50 mM
dNTP Mix	3 μ l	10 mM
Template DNA	1 μ l ($m_{\text{End}}= 10\text{-}100$ ng)	
Primer 1	2 μ l	100 pmol/ μ l
Primer 2	2 μ l	100 pmol/ μ l
<i>Pfx</i> DNA Polymerase	1 μ l	2,5 Einheiten

Das Temperaturprogramm der PCR-Reaktion zur Amplifikation der Template DNA ist in nachstehender Tabelle dargestellt.

Tabelle 5.2 Temperaturprogramm PCR

	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung	120 s	94°C	1
Denaturierung	30 s	94°C	30
<i>Annealing</i> der Primer	30 s	55-65°C	
Extension	60 s	68°C	
Auffüllreaktion	600 s	68°C	1
Abkühlung		4°C	

Diente die PCR zusätzlich der Kopplung verschiedener Amplifikations-Produkte, wurde das in folgender Tabelle dargestellte Reaktionsschema durchgeführt.

Tabelle 5.3 Temperaturprogramm Kopplungs-PCR

	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Denaturierung	120 s	94°C	1
Denaturierung	30 s	94°C	5
<i>Annealing</i> der Amplifikations-Produkte	30 s	55-65°C	
Extension	60 s	68°C	
Zugabe der Primer			
Denaturierung	30 s	94°C	25
<i>Annealing</i> der Primer	30 s	55-65°C	
Extension	60 s	68°C	
Auffüllreaktion	600 s	68°C	1
Abkühlung		4°C	

Nach Abschluß dieser Reaktion wurde die amplifizierte DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und unter Verwendung des „QIAquick PCR Purification Kits“ gereinigt und in 30 µl sterilem Wasser aufgenommen.

5.1.4 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde abhängig von der gewünschten Menge des zu gewinnenden Plasmids, das „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ (100 ml Übernachtskultur) oder das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (5 ml Übernachtskultur) verwendet. Dazu wurden zunächst Zellen aus der entsprechenden Menge einer Übernachtskultur bei 16.000 x g abzentrifugiert und mit Hilfe einer alkalischen Lyse aufgeschlossen. Nach Fällung der Proteine wurde die zu isolierende DNA an einem Silica-Säulenmaterial gebunden und mit 50 µl sterilem Wasser eluiert. Die isolierte Plasmid DNA wurde bei -20°C gelagert.

5.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um die DNA von Verunreinigungen wie z.B. Nukleotiden, ungeschnittenen DNA Fragmenten, Enzymen und Puffer zu trennen wurden die DNA Probe in mehreren Spuren auf einem Agarosegel aufgetragen. Nach der Größenauftrennung wurde eine Referenzspur vom Gel mittels Skalpell abgetrennt und die gewünschte DNA-Bande unter UV Licht markiert. Anschließend wurde das Agarosegel wieder zusammengefügt und die zu isolierende DNA aus dem, nicht mit UV-Licht bestrahltem Gelteil ausgeschnitten.

Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mittels des „QIAquick Gel Extraction Kits“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 50 µl sterilem Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

5.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage einen DNA-Doppelstrang unter Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zu spalten (Mc Clarin *et al.*, 1986), dabei verbleiben an den DNA-Fragmenten entweder Enden ohne Überhang (*blunt end*) oder Enden mit Überhängen einzelsträngiger DNA (*sticky ends*).

Zur Charakterisierung und zur Herstellung gewünschter Plasmid Konstrukte müssen die Plasmid-DNA sowie das PCR-Produkt mit identischen Restriktionsendonukleasen verdaut werden.

Die Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 50 µl setzten sich wie folgt zusammen.

Tabelle 5.4 Beispielansatz Restriktionsverdau

	Volumen
--	---------

DNA-Lösung	43 μ l
10x enzyspezifischer Puffer	5 μ l
Restriktionsendonuklease 1	1 μ l (2-5 Einheiten)
Restriktionsendonuklease 2	1 μ l (2-5 Einheiten)

Der Restriktionsverdau erfolgte in dem vom Hersteller der Enzyme empfohlenem Puffer bei 37°C über Nacht. Um unspezifischen Abbau zu vermeiden, wurde der Ansatz bei Verwendung von Enzymen mit unspezifischer Aktivität nur für 2 Stunden inkubiert.

5.1.7 Dephosphorylierung von linearisierter dsDNA

Um eine Selbstligation der Vektor-DNA zu vermeiden wurden die mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Plasmide mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, CIP) dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte im vom Hersteller empfohlenen Puffer für 30 min bei 37°C unter Verwendung von 1 U Phosphatase pro 20 μ l Plasmid-DNA.

5.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase wurde die linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA kovalent mit dem entsprechenden PCR-Produkt verbunden. Unter ATP-Verbrauch werden dabei Phosphodiesterbindungen geknüpft und es entsteht, nach der Replikation wieder ein vollständiges doppelsträngiges Plasmid.

Ein Ligationsansatz wurde in der Regel wie folgt pipettiert:

Tabelle 5.5 Beispiellansatz Ligation

	Volumen
10x Ligasepuffer	5 μ l
Vektor DNA	100 ng
Insert DNA	x ng (molares Verhältnis Insert:Vektor = 7:1)
T4Ligase (400 U/ μ l)	1 μ l
H ₂ O (steril)	ad 50 μ l

Zudem wurde stets ein Kontrollansatz ohne Insert durchgeführt, um später die Religationsrate des Plasmids abschätzen zu können.

Der Ligationsansatz wurde 2 bis 12 h bei 16°C inkubiert und direkt zur Transformation elektrokompenter *E.coli* verwendet (siehe Kap. 5.2.2).

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E.coli*-Stämmen

Alle verwendeten *E.coli* Stämme wurden zur Anzucht bei 37°C in LB-Medium mit den jeweils stammspezifischen Antibiotika unter Schütteln inkubiert. Das Animpfen dieser Suspensionskulturen erfolgte mittels Einzelkolonien, die zuvor auf Selektions-LB-Agar-Platten gewachsen waren.

Zur Lagerung der Bakterienstämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde eine Übernachtskultur im Verhältnis 4/5:1/5 mit autoklavierter 40%iger (v/v) Glycerin-Lösung in einem sterilen Eppendorfgefäß gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.2.2 Transformation elektrokompetenter *E.coli* Zellen

Da eine natürliche Aufnahme von Plasmid-Fremd-DNA bei *E.coli* Zellen nicht möglich ist, müssen die Zellen für diese Aufgabe kompetent gemacht werden. Für die hier verwendete Methode der Transformation durch Elektroporation wurden die Zellen nach einer Methode von Ausubel und Mitarbeitern (Ausubel *et al.*, 1987) modifiziert. Dabei wurde der für die Expression geeignete *E.coli* Stamm bis zu einer optischen Dichte von 0,4 ($\lambda=580$ nm) kultiviert. Die Zellsuspension wurde dann zunächst 30 min auf Eis inkubiert und anschließend die Zellen 10 min bei 3500 x g und 4°C abzentrifugiert. Das so gewonnene Zellmaterial wurde 3 mal mit eiskaltem, sterilem 10% (v/v) Glycerin gewaschen (1; 1/2, 1/10 Volumen des Zellanzuchtmediums). Zur Verwendung wurden die Zellen mit 10% igem Glycerin in einem Volumen von 1/1000 der Kulturlösung aufgenommen, zu 40 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation der so erzeugten elektrokompetenten *E.coli* Zellen wurde ein 40 µl Aliquot auf Eis aufgetaut, mit der entsprechenden Menge an DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Dabei variierte das Volumen der eingesetzten DNA-Lösung je nach Quelle zwischen 0,5 µl bei Plasmidpräparationen und 5 µl bei Ligationsansätzen. Die Transformation erfolgte mittels eines Elektroporationsgerät (Stratagene, Electroporator 1000) bei einer Spannung von 1,8 kV. Nach der Elektroporation wurden die Zellen rasch in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 10 – 60 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde kurz abzentrifugiert und das entstandene Pellet in einem geringeren Volumen resuspendiert, um die Transformanten in erhöhter Zelldichte auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika ausplattieren zu können. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und die gewachsenen Klone auf Plasmide mit Insert überprüft. Dazu wurden die aus einer Transformation hervorgegangenen Klone in 6 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus dieser Kultur wurde wie unter 5.1.4 beschrieben

die Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau charakterisiert. Zur Überprüfung der Basenabfolge der im Plasmid ligierten Insert-DNA wurden 10 µl dieser Plasmid-DNA zur Sequenzierung an die Firma Medigenomix (Martinsried) geschickt.

5.2.3 Proteinexpressionstest

Nach Überprüfung der Sequenz des Inserts wurde die Plasmid-DNA der positiven Klone in einen entsprechenden Expressionsstamm transformiert. Mit den gewachsenen Kolonien wurde jeweils 10 ml LB-Medium mit stamm- und plasmidspezifischen Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit 1 ml dieser Zellsuspension wurden für die Testexpression 100 ml Schüttelkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600nm} = 0,8$ kultiviert. Anschließend wurden 5 ml der Bakterienkultur als Negativkontrolle separat inkubiert und 95 ml der Kultur mit 1 mM IPTG induziert. Während der Testexpression wurde zu definierten Zeitpunkten (jeweil eine, zwei, drei, vier und zwölf Stunden nach der Induktion) 1 ml Proben entnommen und bei 16.000 x g abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 100 µl 0,1 M Tris/HCl, 6 M Harnstoff, pH 8,0 resuspendiert, die Suspension 10 min bei 37°C geschüttelt und nach Zugabe von 100 µl SDS Probenpuffer 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

Um zu überprüfen, ob das exprimierte Protein in löslicher oder unlöslicher Form in den Zellen vorliegt, wurden vier Stunden nach der Induktion 50 ml Expressionskultur entnommen und abzentrifugiert (4000 x g, 20 min, 4 °C). Die Zellen wurden in Lysispuffer resuspendiert und wie unter 5.2.5.1. beschrieben aufgeschlossen. Anschließend wurde durch Zentrifugation (32.000 g, 15 min, 4°C) die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen getrennt und anschließend beide mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

5.2.4 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in *E.coli*

5.2.4.1 Expression von FcαRI in *inclusion bodies*

Die codierende DNA-Sequenz für die extrazelluläre Domäne des humanen Fcα Rezeptors I wurde in den pET22b+ Vektor mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* kloniert. Zur Expression wurde mit diesem Plasmid der *E.coli*-Stamm Rosetta [DE3] transformiert und eine Plattenkultur auf einer LB-Agar Platte mit Ampicillin und Chloramphenicol (Amp/Cam) angelegt. Von einer Einzelkolonie wurde eine 100 ml LB Schüttelkultur (Amp/Cam) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur diente als Inokulum für 12 l LB Medium (Amp/Cam) welche im Verhältnis 10 ml Vorkultur auf 1 l Medium angeimpft wurden. Die Inkubation erfolgte in 2 l Schikanekolben bei 37°C unter schütteln bis zu einer $OD_{600 nm}$ von 0,8. Anschließend wurde die

Proteinexpression durch die Zugabe von 1 ml 1 M IPTG-Lösung pro 1 l Schüttelkultur induziert und die Kultur für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch 20 min Zentrifugation bei 3500 x g bei 4°C geerntet.

5.2.4.2 Expression von IdeS

Zur Herstellung der aktiven Protease IdeS wurde die kodierende DNA-Sequenz in den Vektor pET28b unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NdeI* und *NotI* kloniert. Durch diese Klonierungsstrategie entsteht am N-terminus des Proteins ein mit Thrombin abspaltbarer His-Tag, welcher für die Reinigung des Enzyms genutzt werden kann.

Der *E.coli*-Stamm Rosetta [DE3] wurde mit dem entstandenen Plasmid transformiert und auf Kanamycin und Chloramphenicol (Kan/Cam) enthaltenden LB-Agarplatten ausgestrichen. Mit einer Einzelkolonie wurde eine 100 ml LB-Vorkultur (Kan/Cam) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Expression wurden mit dieser Vorkultur 6 l LB-Medium (Kan/Cam) im Verhältnis 1:100 inokuliert und bei 37°C in 2 l Schikanekolben angezogen. Nachdem eine OD_{600nm} von 1,0 erreicht war, wurde die Kultur mit 1 mM Endkonzentration IPTG induziert und für 1 h weiter inkubiert. Die Zellen wurden sofort auf ca. 4°C abgekühlt und durch Zentrifugation (20 min, 3500 x g, 4°C) abgeerntet.

Die codierende DNA-Sequenz der inaktiven C94S Mutante der IdeS Protease wurde ebenfalls in den Vektor pET28b kloniert und damit Rosetta [DE3] Zellen transformiert. Die Expression und Zellernte erfolgte wie oben aufgeführt mit dem Unterschied, dass die Zellen nach der Induktion für 4 h bei 37°C inkubiert wurden.

Unter Verwendung der, mit dem entsprechenden Plasmid transformierten Rosetta [DE3] Zellen wurde ¹⁵N markiertes C94S IdeS für die Aufnahme von zwei dimensionalen NMR-Spektren exprimiert. Dazu wurden diese in M9 Minimal Medium, welches 0,5 g/l ¹⁵NH₄Cl enthält, nach vorgenannter Methode angezogen und geerntet.

5.2.4.3 Selenomethionin-Expression von IdeS C94S

Zur Markierung der inaktiven C94S IdeS Mutante mit Selenomethionin wurde der entsprechende Expressionsvektor in den Methionin-auxotrophen *E.coli*-Stamm B834 [DE3] transformiert und eine Plattenkultur auf LB-Agar Platten mit Kanamycin angelegt. Mit einer Einzelkolonie wurden 100 ml LB-Medium (Kan) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Expression des Proteins wurde in Minimalmedium (*New Minimal Medium*, Budisa *et al.*, 1995) mit Kanamycin, wie unter 5.2.4.2. für IdeS C94S beschrieben durchgeführt. Vor der Überimpfung auf Minimalmedium wurden die LB-Vorkulturen abzentrifugiert (10 min, 3500x g, 4°C) und das Zellpellet in Minimalmedium resuspendiert.

5.2.5 Aufschluss von *E.coli* Zellen

5.2.5.1 Zellaufschluss bei Expression von unlöslichen Proteinen

Die abzentrifugierten Zellen wurden in 5 ml Lysispuffer 1 pro 1 l Kulturmedium resuspendiert, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die partiell aufgeschlossenen Zellen mit Waschpuffer P1 mittels eines Ultraturrax gemischt und die Zellen vollständig durch 2 x 3 min Sonifizierung im Eisbad aufgeschlossen. Der Zusatz von LDAO bewirkt dabei eine verbesserte Solubilisierung der Zellmembranbestandteile und erhöht somit den Reinheitsgrad der zu isolierenden *inclusion bodies*. Durch 20 min Zentrifugation bei 32.000 x g und 4°C können die unlöslichen Proteine isoliert werden.

5.2.5.2 Zellaufschluss bei Expression löslicher Protein

Nach dem Ernten der Zellen durch Abzentrifugation wurden sie in 5 ml Lysispuffer 2 pro 1 l Kulturmedium resuspendiert. Die Proteine IdeS und IdeS C94S besitzen an ihrem N-Terminus einen His-tag zur Aufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Für dieses Säulenmaterial wird Phosphat als Puffersystem vorgeschlagen. Weiterhin enthält dieser Puffer, 5 mM Imidazol, um unspezifische Interaktion mit dem Affinitäts-säulenmaterial zu vermindern.

Nach Resuspension der Zellen wurden diese entweder bei -20°C eingefroren oder direkt aufgeschlossen. Durch Zugabe einer Spatelspitze Lysozym, vorsichtigem mischen und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur (1 h bei 4°C im Falle von aktiver IdeS) wurden die Zellwände aufgebrochen. Um die Zellen vollständig aufzuschließen, wurden sie in einem Rosettengefäß unter Eiswasserkühlung für 3 x 2 min sonifiziert. Im Anschluss wurde das Zelllysate 20 min bei 32.000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit den löslichen Proteinen isoliert. Nach Bedarf wurde der Zellsuspension vor dem Aufschluss eine Protease-Inhibitor-Mischung (PefablocTM Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugesetzt.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Page ist eine Methode zur analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht unter Anlegung eines elektrischen Feldes. Durch die vollständige Denaturierung und den Zusatz des anionischen Detergenz SDS der die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt, ist die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine ausschließlich vom Molekulargewicht abhängig (Lämmli *et al.*, 1970).

Zur Erhöhung der Bandenschärfe wird bei der diskontinuierliche SDS-PAGE das Trenngel zusätzlich mit einem Sammelgel überschichtet, in dem durch Isotachophorese die Probe focussiert wird.

Je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine wurden Gele bestehend aus 8-15%igen Trenngelen und 5%igen Sammelgelen in einer Apparatur zu je acht Gelen hergestellt. Die Zusammensetzung für acht 12%ige Gele ist in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 5.6 SDS-PAGE Zusammensetzung

	Sammelgel (5%)	Trenngel (12%)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%)	8,5 ml	50 ml
H ₂ O	30,4 ml	23 ml
1 M Tris/HCl pH 6,6	6,25 ml	-
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	25 ml
10% (w/v) SDS	500 µl	1 ml
10% (w/v) APS	500 µl	1 ml
TEMED	50 µl	40 µl

Die Proteinproben wurden vor dem Gellauf in einem Volumenäquivalent 2 x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA unter Verwendung von SDS-Laufpuffer.

Die Färbung der Gele erfolgte durch Inkubation in Coomassie-Färbelösung für mindestens 2 h. Die Entfärbung des Gelhintergrundes erfolgte im selben Lösungsmittelgemisch ohne Zugabe des Farbstoffes Coomassie G-250.

5.3.2 Proteinfällung

Um stark verdünnte Proteinlösungen mittels SDS-PAGE analysieren zu können, wurden die Proben nach der Methode von Wessel und Flügge ausgefällt (Wessel, D. & Flügge, U.I. 1984). Dabei wurden 100 µl Proteinlösung mit 400 µl Methanol versetzt und 10 s abzentrifugiert (16.000 x g). Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform und kurzem vortexen wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Anschließend wurde die Lösung mit 300 µl H₂O gemischt und für eine Minute bei 9000 x g abzentrifugiert. Dabei entstehen 3 Phasen wobei die obere vorsichtig entfernt und verworfen werden muss. Die Unter- und Interphase werden mit weiteren 300 µl Methanol gemischt und wiederum eine Minute bei 16.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet getrocknet und nach dem resuspendieren in 10 µl Lämmli-Probenpuffer und dem Aufkochen 5 min bei 95°C auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

5.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels UV-Absorption an einem Beckmann (München), DUTM 7500 Spektrophotometer, in 1 cm Quarzglasküvetten bestimmt. Anhand der Absorption bei 280 nm lässt sich über das Lambert-Beersche-Gesetz (Gleichung 4-1) die Konzentration der Proteinlösung bestimmen, wobei der entsprechende Puffer als Referenzlösung diente und ein Absorptionsspektrum von 240 nm bis 300 nm aufgenommen wurde.

$$A = \varepsilon * c * d$$

Formel 5-1 Lambert-Beersches-Gesetz

Dabei entspricht ε dem spezifischen Extinktionskoeffiziente des zu bestimmenden Proteins bei 280 nm in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, c der Konzentration in M und d der Schichtdicke der Küvette. Der Extinktionskoeffizient bei 280 nm ist dabei aus der Anzahl von Tyrosinen, Tryptophanen und Cysteinen berechenbar (Gill & von Hippel, 1989)

5.3.4 Massenspektrometrie

Das Molekulargewicht der isolierten Proteine, deren Degradationsprodukte und Inhibitor Komplexe wurde mit einem Single-Quadrupol Ionenspray-Massenspektrometer API165 (Fa. SciEx, Thornhill, Kanada) bestimmt. Die Messungen wurden freundlicherweise von Frau Elisabeth Weyher-Stingl am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, Abteilung für Bioorganische Chemie durchgeführt und ausgewertet.

5.3.5 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Für die N-terminale Ansequenzierung müssen die durch eine SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Dazu wurden folgende Schichten auf die Anode der Blotkammer gelegt: drei Lagen 3MM-Whatmanpapier in Transferpuffer getränkt, 1 PVDF Membran die zuvor 5 min in 100% Methanol aktiviert und anschließend 5 min in Transferpuffer äquilibriert wurde, das ebenso mit Transferpuffer behandelte Polyacrylamidgel und weitere drei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatmanpapier. Nachdem alle Lagen blasenfrei übereinander geschichtet wurden, wird die Kathode der Blotkammer vorsichtig aufgelegt und beschwert. Der Transfer erfolgte durch ein elektrisches Feld das für 1,5 h mit 100 mA angelegt wird. Die Proteine auf dem Blot wurden anschließend durch 2 min Inkubation in Coomassie-Färbelösung und darauf folgendes Waschen mit Entfärber sichtbar gemacht.

5.3.6 Proteinkristallisation

Alle Kristallisationsexperimente wurden im Dampfdiffusionsverfahren nach der Methode des *sitting drop* in CrysChem-Platten durchgeführt. Dazu wurden 0,4 ml der Reservoirlösung in den äußeren Ring der Kristallisationsplatten pipettiert und 1,5 µl der Proteinlösung mit 1,5 µl der Reservoirlösung in dem erhöht liegenden Kristallisationsbereich der Platte gemischt. Die CrysChem Platten wurden anschließend mit CrystalClear-Band (Hampton, Laguna Hills, CA USA) luftdicht versiegelt und bei 20°C inkubiert. Eine für die Kristallisation geeignete Startbedingung wurde mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Kristallisationsscreens von Hampton und Emerald BioSystems (Bainbridge Island, WA USA) und dem abteilungseigenen *Factorial Screen* (Jancarik & Kim, 1991) ermittelt. Die Startbedingung wurde durch Variation verschiedener Bedingungen wie Präzipitanskonzentration, pH-Wert, Tropfenverhältnis, Proteinkonzentration, Temperatur oder durch Zugabe verschiedenster Additive optimiert. Die Reservoirösungen der optimierten Bedingungen wurden mit einem Biomek 1000 Roboter vorpipettiert. Eine mögliche Kristallisation wurde über mehrere Monate mittels Stereomikroskop verfolgt.

5.3.7 Reinigung von Immunglobulin G aus humanen Serum

Humanes Immunglobulin G (IgG) wurde durch fraktionierte Natriumsulfat-Fällung aus Serum von Patienten mit IgG1 Myelom gereinigt. Dazu wurden 45 ml humanes Serum mit 5 ml PBS versetzt und für 30 min bei 3000 x g und 25°C abzentrifugiert. Dem Überstand wurde 18% (w/v) wasserfreies Na₂SO₄ langsam unter Rühren zugegeben. Die Lösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet (ca. 12 ml) in 25 ml Wasser aufgelöst und Na₂SO₄ bis zu einer Endkonzentration von 14% (w/v) zugesetzt. Das ausgefällte Protein wurde in 15 ml Wasser aufgenommen und Serumalbumin sowie IgG-Fragmente wurden über eine SuperdexTM 75 HiLoad 26/60 Säule mit 2 mM MOPS pH 7,0, 150 mM NaCl als Laufpuffer entfernt. IgG eluierte im Ausschlussvolumen und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.3.8 Reinigung von Immunglobulin A aus humanem Serum

Zur Isolierung von humanem Immunglobulin A (IgA) wurde 50 ml Serum eines Patienten mit multiplem IgA Myelom verwendet. Das Serum wurde drei Mal gegen 2 l, 2 mM Phosphatpuffer pH 6,0 dialysiert und 10 min bei 4°C und 2000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,7 Volumen an gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (30 min, 2500 x g, 20°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Wasser gelöst und 1 ml 0,2 M EDTA-Lösung zugegeben. Diese Lösung wurde drei Mal gegen 1 l 20 mM Phosphatpuffer pH 8,0 dialysiert und im gleichen Puffer auf eine DEAE-Cellulose Säule (DE52)

aufgetragen. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumina 20 mM Phosphat pH 8,0 gewaschen und in einem linearen Gradienten von 0 -100% Puffer B (300 mM Phosphat pH 8,0) eluierte IgA bei ca. 100 mM Phosphat von der Säule. Die IgA enthaltenden Elutionsfraktionen wurden vereinigt, in PBS umgepuffert, auf 100 mg/ml aufkonzentriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

5.3.9 Herstellung von IgA-Sepharose

Zur Herstellung von IgA-Sepharose wurden 3 ml IgA (40 mg/ml in PBS) auf 45 ml mit einem Puffer aus 0,1 M NaHCO₃ und 0,5 M NaCl verdünnt. Als Säulenmaterial wurde 1 g CNBr-Sepharose 4 Fast Flow eingesetzt, welches vor der Anwendung in 1 mM HCl aufgeschlämmt und nacheinander mit 500 ml 1 mM HCl und 250 ml 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl auf einer Glasfritte gewaschen wurde. Für die Kopplungsreaktion wurde das aktivierte Säulenmaterial bei Raumtemperatur mit der IgA-Lösung inkubiert. Der Grad der Bindung konnte mittels UV-Absorptionsmessung des Überstandes bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt werden. Nach Abschluss der Kopplung wurden die freien Bindungsstellen durch 1 h Inkubation mit 1 M Ethanolamin pH 8,0 bei Raumtemperatur blockiert. Um ungebundenes Protein von der Säule zu entfernen, wurde nacheinander mit 0,1 M Natriumacetat pH 4,0 und PBS gewaschen.

5.3.10 NMR

Die Methode der Kernmagnetischen Resonanz (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments μ eines Atomkerns mit einem äußeren magnetischen Feld. Die Kernresonanz-Spektroskopie gibt dabei neben Aussagen über die chemische Struktur von unbekanntem Substanzen, auch Informationen über die räumliche Anordnung von Atomen und deren Bewegung in Molekülen und Molekülkomplexen und kann so zur Aufklärung von Enzymmechanismen und biochemischen Reaktionswegen wesentlich beitragen (Hausser, K.H. & Kalbitzer, H.R. 1989). Vor allem durch die Einführung der gepulsten Fourier-Transform-NMR und der mehrdimensionalen NMR Ende der 60er Jahre gewann die Kernmagnetische Resonanz stark an Bedeutung. Die Theorie dieser Methode ist in einer Reihe von Lehrbüchern ausführlich beschrieben, so dass hier nur auf einige spezielle Anwendungen dieser Methode eingegangen wird.

5.3.10.1 2D-¹H/¹⁵N-NMR-Spektren

Bei homonuklearen ¹H-NMR-Spektren von Proteinen des hier vorliegenden Molekulargewichts (20-40 kDa) ergibt sich eine starke Überlagerung der Amidprotonenresonanzen, was eine Interpretation der Spektren unmöglich macht. Mit Hilfe zweidimensionaler (2D) NMR-Spektren lässt sich diese Überlagerung auflösen. Dabei

kommen zusätzlich zur Präparation und Datenakquisition des 1 D Experiments noch eine indirekte Evolutionszeit t_1 sowie eine Mischsequenz, die aus Pulsen und Wartezeiten bestehen kann hinzu.

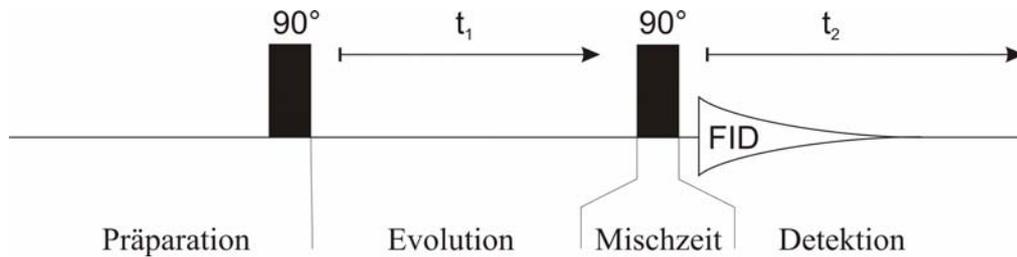


Abbildung 5.1 Pulssequenz 2D COSY.

Schematische Darstellung eines zweidimensionalen NMR-Experiments am Beispiel der Pulssequenz des COSY-Experiments.

Die Kernspins können nach der Präparation während einer festen Zeit t_1 frei präzedieren und die chemische Verschiebung des ersten Kernes wird markiert. Durch die zusätzliche Mischzeit wird die Magnetisierung vom ersten Kern auf einen anderen übertragen, wobei im Wesentlichen die dipolare Wechselwirkung sowie die skalare Kopplung zum Transfer der Magnetisierung beitragen. Während der Zeit t_2 wird abschließend die Magnetisierung mit der chemischen Verschiebung des zweiten Kernes markiert (Holak *et al.*, 1998). Um ein zweidimensionales Spektrum zu erhalten, wird die Evolutionszeit t_1 um einen festen Betrag Δt_1 erhöht. Nach Fourier Transformation in t_2 und t_1 Richtung entsteht das endgültige 2D-Spektrum.

Im Falle der heteronuklearen 2D NMR werden in beiden Frequenzrichtungen die Signale verschiedener Kernsorten detektiert. Das wichtigste Experiment, welche die Übertragung von Magnetisierung auf einen Heterokern und wieder zurück verwendet, ist das HSQC (Hetero Single Quantum Correlation) Experiment.

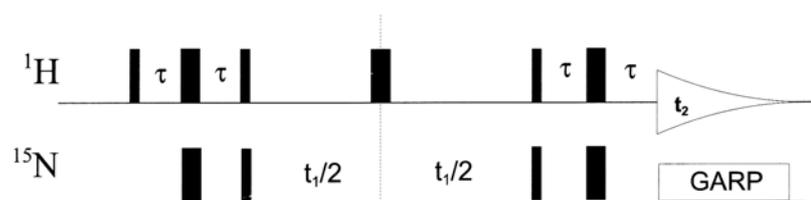


Abbildung 5.2 Pulssequenz $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC.

**Pulssequenz des HSQC-Experimentes auf dem ^1H -Kanal (oben) und dem ^{15}N -Kanal (unten).
Schmale schwarze Balken kennzeichnen 90° -Pulse, breite Rechtecke 180° -Pulse.**

Um detaillierte Aussagen über Struktur und Ligandenbindung der IdeS Protease treffen zu können, wurden zweidimensionale $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren unter Verwendung der HSQC-Standardpulssequenzen aufgenommen (Croasmun & Carlson, 1994, Abbildung 5.2). Dieses Experiment ermöglicht, die im 1D-Spektrum überlappenden Amidprotonenresonanzen durch die Entzerrung des Spektrums in die Stickstoffdimension deutlich getrennt darzustellen.

Für diese Experimente wurde ^{15}N markiertes IdeS C94S eingesetzt, das wie unter 5.2.4.2. beschrieben in M9 Minimalmedium exprimiert wurde. Die Messungen wurden bei einer Proteinkonzentration von 1 mM und PBS als Puffersystem durchgeführt. Direkt vor der Messung wurden 400 μl der Proteinlösung bei 13000 x g für 10 min abzentrifugiert, mit 40 μl D_2O (10%) gemischt und in ein NMR-Probenröhrchen überführt. Da alle NMR-spektroskopischen Untersuchungen in wässriger Lösung durchgeführt wurden, entstand ein starkes Störsignal im Spektrum welches wichtige Signale überlagern kann. Dieses Wassersignal wurde durch die „jump and return“ Methode unterdrückt, um ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis des Proteinspektrums erreichen zu können (Plateau *et al.* 1982).

Alle Spektren wurden bei 290 K an einem Bruker DRX 600 Spektrometer aufgenommen, das mit einem Tripelresonanz-Probenkopf ausgestattet ist. Die aufgenommenen Spektren wurden mit dem Bruker Software-Paket XWin NMR prozessiert und mit dem Programm Sparky analysiert (Goddard *et al.*, 2000).

Beim 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC –Spektrum repräsentiert jedes im Spektrum auftretende Signal ein ^1H -Proton, das an ein ^{15}N -Atom gebunden ist ($^1\text{H}_\text{N}$). Deshalb besteht das Spektrum überwiegend aus den Signalen der $^1\text{H}_\text{N}$ -Protonen des Proteinrückgrates (außer Prolin) und zusätzlich, je nach pH und Lösungsmittelexposition, aus den Signalen der NH_2 –Gruppen der Asn und Gln Seitenketten sowie der $^1\text{H}_\text{N}$ –Protonen von Trp und His. Dabei ergeben Proteine mit einer definierten Tertiärstruktur Spektren mit einer großen Dispersion der Frequenzen, wohingegen die Frequenzen ungefalteter Proteine sehr ähnlich zueinander sind und sich deshalb stark überlagern.

5.3.10.2 Bindungsstudien mittels NMR-Spektroskopie

Die NMR Spektroskopie hat sich auch als eine leistungsfähige Methode bei der Untersuchung von Protein-Protein und Protein-Ligand Wechselwirkungen erwiesen. Dazu wird eine ^{15}N markierte Proteinprobe mit unmarkiertem Ligand titriert und nach jeder Zugabe ein 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektrum aufgenommen. Die Interaktion zwischen Protein und Ligand kann dabei über die Änderungen der chemischen Verschiebung in den 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren verfolgt werden, da die Signallage und Intensität eng mit der Konformation und chemischen Umgebung des jeweiligen Kerns verbunden ist. Die beobachteten Veränderungen können dabei durch strukturelle Unterschiede, chemischen Austausch, Relaxationseffekte oder auch nur durch die Nähe des Liganden verursacht werden. Bei Zuordnung der 2D Signale zur Aminosäuresequenz des Proteins ist zusätzlich eine Lokalisierung der Bindungsstelle möglich.

Interaktionsstudien der C94S IdeS Mutante mit entsprechenden Liganden wurden grundsätzlich in PBS unter Verwendung von 1 mM ^{15}N markiertem Protein durchgeführt. Die potentiellen Substrate und Inhibitoren der IdeS Protease wurden dabei in einem molaren Enzym:Liganden Verhältnis von 2:1 bis 1:2 schrittweise zugegeben. Nach jeder weiteren Titration wurde ein 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektrum der Probe aufgenommen. Die

Messungen erfolgten wie unter 5.3.10.1. aufgeführt und die verschiedenen Spektren wurden mit dem Programm Sparky überlagert und analysiert. Während der gesamten Titrationen wurde darauf geachtet, dass der pH Wert und die Temperatur konstant blieben. Da keine Sequenzzuordnung der Signale im 2D Spektrum vorgenommen wurde, konnte mit diesen Daten ausschließlich eine Aussage über die prinzipiellen Bindeeigenschaften der Liganden getroffen werden.

5.4 Präparation des Fc α Rezeptors I (CD89)

5.4.1 Isolierung der *inclusion bodies*

Nach dem Abzentrifugieren des Zellysats wie unter 5.2.5.1. beschrieben, befinden sich die unlöslichen Proteine im Pellet. Zur weiteren Reinigung der sogenannten *inclusion bodies* wurden diese in Waschpuffer P1 mit Hilfe eines Ultraturax resuspendiert und bei 32.000 x g, 20 min, 4°C abzentrifugiert. Um möglichst vollständig alle Reste der Zellmembran und Zellorganellen zu entfernen, wurde dieser Waschschrift mindestens 2-mal wiederholt. Um das Detergenz LDAO, was bei der Renaturierung des Proteins hinderlich sein kann, zu entfernen wurden die *inclusion bodies* abschließend mehrmals in Puffer P2 resuspendiert und abzentrifugiert. Dieses Verfahren wurde nach der *inclusion body* Reinigungsmethode von Rudolph *et al.* entwickelt (Rudolph *et al.*, 1997).

5.4.2 Solubilisierung der *inclusion bodies*

Um die *inclusion bodies* in Lösung zu bringen, wurden diese in 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 mit einer Konzentration von 35 mg/ml solubilisiert. Zusätzlich wurde 100 mM DTT oder 5 mM Mercaptoethanol zugegeben um bestehende Disulfidbrücken aufzubrechen. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren, wurde das verbleibende unlösliche Material durch Zentrifugation bei 32.000 x g abgetrennt.

Durch Dialyse gegen 4 M Guanidiniumhydrochlorid pH 3-4 wurde das bei der Renaturierung störende DTT entfernt und die Konzentration des Denaturierungsmittels abgesenkt. Die Lösung konnte anschließend bei -20°C gelagert und direkt zur *in vitro* Renaturierung eingesetzt werden.

5.4.3 *In vitro* Proteinfaltung

Hier wurde die *in vitro* Renaturierungsmethode durch schnelle Verdünnung des denaturierten Agens in Rückfaltungspuffer angewandt. Dieser Puffer sollte die korrekte Proteinfaltung stabilisieren und die Aggregation von Faltungintermediaten verhindern. Um

die optimale Bedingung zur Rückfaltung des Zielproteins etablieren zu können, müssen ähnlich viele Variablen wie bei der Kristallisation von Proteinen getestet werden: pH, Ionenstärke, Temperatur und Additive wie Arginin, PEG, Detergenzien oder Chaotrope. Enthält das Protein wie im Falle des Fc α Rezeptors I Disulfidbrücken, wird zusätzlich ein *Redoxshuffling*-System aus dem reduzierten und oxidierten Zustandes von Thiolreagenzien, wie Glutathion, Cystein oder Cysteamin eingesetzt (Lilie *et al.*, 1998).

Zur Renaturierung des Fc α R I wurden 10 ml der solubilisierten *inclusion bodies* in fünf Pulsen (je 2 ml) im Abstand von 6 h tropfenweise in 1 l Rückfaltungspuffer, bei 10 °C und unter kontinuierlichem Rühren zugegeben. Der Rückfaltungspuffer setzte sich dabei aus 1 M Arginin, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 5 mM GSH und 0,02% Natriumazid zusammen. Der Rückfaltungsansatz wurde dann für 4-5 Tage bei 10°C weiter gerührt bis die Konzentration der freien Thiolgruppen, laut Ellmans Test unter 1 mM lag. Anschließend wurden die während der Rückfaltung entstandenen Aggregate mittels Zentrifugation (32.000 x g, 20 min, 4°C) entfernt. Die so erhaltene Lösung wurde in einer Amicon-Rührzelle, unter Verwendung einer Membran mit einer nominellen Ausschlussgröße von 5 kDa, auf 1/20 des Volumens aufkonzentriert und in 2 mM Tris/HCl pH 8,0 umgepuffert.

5.4.4 Proteinreinigung

Proteinverunreinigungen sowie nur partiell gefaltetes Protein wurde durch eine abschließende Gelfiltrations-Chromatographie mit einer SuperdexTM75 (26/60) HiLoad Säule, bei einer Flussrate von 1 ml/min und einem Laufpuffer aus 20 mM NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 entfernt.

Das Absorptionsmaximum der Proteinlösung war von 280 nm zu 260 nm verschoben, was ein eindeutiges Indiz für eine Kontamination mit DNA ist. Zur Entfernung dieser Verunreinigung wurde die Eigenschaft des Proteins bei 4°C Lagerung nach 2 Tagen zu kristallisieren ausgenutzt. Dabei wurde der kristalline Niederschlag in Form von sehr kleinen Nadeln mehrmals mit Wasser gewaschen und anschließend in 100 mM Citrat pH 6,0 gelöst. Nach dieser Prozedur zeigte das Absorptionsspektrum ein Maximum bei 280 nm wie für Proteine erwartet.

5.4.5 Aktivitätstest

Die Aktivität des *in vitro* rückgefalteten Fc α R I wurde mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von IgA – Sepharose überprüft. Das Säulenmaterial wurde dazu mit PBS äquilibriert und das gereinigte Protein im gleichen Puffer auf die Säule aufgetragen. Nach zwei Waschschrinen mit PBS, wurde das gebundene Material mit 100 mM Glycin pH 3,0 eluiert. Um unspezifische Interaktion mit dem Säulenmaterial auszuschliessen, wurde unter gleichen Bedingungen eine Affinitäts-Chromatographie mit IgG-Sepharose durchgeführt.

5.5 Präparation der Cysteinendoprotease IdeS

5.5.1 Reinigung des aktiven Enzyms

Das wie unter 5.2.5.2 beschrieben abzentrifugierte Zellysate wurde bei Raumtemperatur auf eine mit Lysispuffer 2 äquilibrierte Nickel-NTA Affinitätssäule aufgetragen. An einer FPLC-Anlage (Äkta Explorer) wurde die Säule mit Auftragspuffer gespült, bis kein Protein mehr von der Säule gewaschen werden konnte. Mittels eines Puffers bestehend aus 300 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 5 mM Tris pH 7,5 wurde IdeS nahezu ohne weitere Verunreinigungen von der Säule eluiert. Da der N-terminale His-Tag des Proteins proteolytisch abgebaut wird, erfolgte nach mehrtägiger Inkubation bei Raumtemperatur eine so genannte negative Nickel-NTA Reinigung um ausschließlich His-Tag freies IdeS zu erhalten. Dazu wurde das gereinigte und verdaut Protein aufkonzentriert und unter den oben aufgeführten Bedingungen auf eine Nickel-NTA aufgetragen. Imidazol wurde zuvor durch Dialyse mit einem Puffer aus 300 mM NaCl, 5 mM Tris pH 7,5 entfernt. Für die weitere Aufreinigung wurde der Durchlauf dieser Säule gesammelt, mit einem Ultrafree-Konzentrator (nominelle Ausschlussgröße 10 kDa) bis auf 50 mg/ml ankonzentriert und auf eine mit 100 mM NaCl, 2 mM MOPS pH 8,0 äquilibrierte Superdex 75 HiLoad 26/60 Säule aufgetragen. Bei einer Flussrate von 2 ml/min eluierte das Protein nach 160 ml, wurde fraktioniert gesammelt, mittels 12%iger SDS-PAGE analysiert und für Aktivitätstests eingesetzt. Für Kristallisationsansätze wurde das proteolytisch aktive IdeS unmittelbar nach der Reinigung mit einem achtfachen molaren Überschuss des in DMSO gelösten, kovalent bindenden Inhibitors Z-Leu-Val-Gly-diazomethan (Bachem, Weil am Rhein) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

5.5.2 Reinigung des inaktiven Enzyms

Die Reinigung der inaktiven C94S IdeS Mutante erfolgte in gleicher Weise wie die des aktiven Enzyms, allerdings konnte auf eine negative Nickel-NTA Reinigung verzichtet werden, da kein proteolytischer Verdau der Mutante beobachtet wurde.

5.5.3 Aktivitätstest

Um die Aktivität der Cysteinendoprotease IdeS zu überprüfen, wurde das natürliche Substrat des Enzyms, humanes Immunglobulin G verwendet. Dazu wurde 1 mg aus humanem Myeloma Serum isoliertes IgG (siehe Kapitel 5.3.7) in PBS pH 6,5 umgepuffert und mit 10 µg aktivem IdeS versetzt. Der proteolytische Verdau wurde jeweils nach 0, 1, 2, 3 und 30 h auf einer Superdex75 PC3.2/30 Säule mit PBS als Laufpuffer am SMART FPLC-System verfolgt und zusätzlich mittels SDS-PAGE analysiert.

5.6 Röntgenkristallographische Methode

5.6.1 Allgemeine Einführung zur Kristallographie

Die Methode der Röntgenkristallographie ist in einer Reihe hervorragender Lehrbücher (Drenth, 1992, Massa, 1996) ausführlich beschrieben, so dass hier nur auf einige grundlegende Prinzipien, auf die zur Strukturlösung eingesetzten Methoden sowie auf den aufgetretenen speziellen Fall der Kristallverzwillingung eingegangen wird.

5.6.2 Verzwillingung von Kristallen

Verzwilligte Kristalle bestehen aus zwei oder mehreren Zwillingsdomänen derselben chemischen Zusammensetzung. Dabei beschreibt das Zwillingsgesetz in Form einer 3×3 Matrix die genaue Art und Weise, wie sich die Domänen geometrisch ineinander überführen lassen. Weiterhin ist für die vollständige Beschreibung der Verzwillingung, der relative Anteil der einzelnen Domänen am Kristallaufbau anzugeben.

Das beobachtete Beugungsbild verzwilligter Kristalle setzt sich aus den überlagerten Beugungsbildern der einzelnen Domänen im Kristall zusammen, da jede Domäne unabhängig ihr eigenes Bild beiträgt. Eine Klassifizierung der verschiedenen Zwillingstypen kann man nach der Auswirkung der Verzwillingung auf das Beugungsbild vornehmen. Dabei kann man bei Proteinkristallen drei Arten unterscheiden: die meroedrische, die pseudo-meroedrische und die nicht-meroedrische Verzwillingung. Im Falle der meroedrischen und der pseudo-meroedrischen Verzwillingung von Kristallen kommt es zu einer vollständigen Überlappung der einzelnen Domänen in allen drei Raumrichtungen, was zu einer exakten Überlagerung der Beugungsbilder führt.

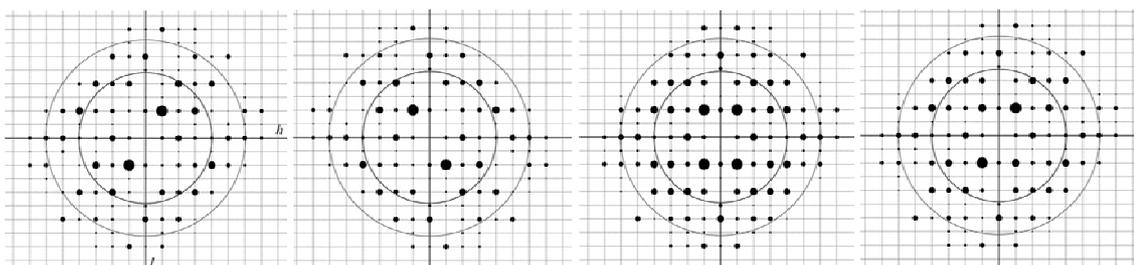


Abbildung 5.3 Beugungsbilder bei meroedrischer Verzwillingung.

Von links nach rechts sind zuerst die Beugungsbilder ($h0l$ Ebene) der Zwillingsdomänen einzeln und anschließend bei perfekter Verzwillingung (Zwillingsfraktion = 0,5) und mit einer Zwillingsfraktion von 0,2 dargestellt.

Bei diesen Arten von Verzwillingung kann dem Beugungsbild die Fehlordnung nicht unmittelbar angesehen werden. Dennoch gibt es einige Warnsignale, die auf eine derartige Verzwillingung hinweisen. Aufgrund der Überlagerung der Beugungsbilder verringern sich die Intensitätsunterschiede der Röntgenreflexe im beobachteten Diffraktionsmuster, da es unwahrscheinlich ist, dass starke Reflexe nur von starken und schwache nur von schwachen

Reflexen überlagert werden. Daher sind die beobachteten Reflexintensitäten einander wesentlich ähnlicher als bei einem unverzwilligten Datensatz. Betrachtet man die verschiedenen Intensitätsstatistiken des ausgewerteten Datensatzes lässt sich feststellen, ob eine meroedrische Verzwilligung vorliegt und auch der relative Anteil der einzelnen Domänen am Kristallaufbau (Zwillingsfraktion) kann daraus berechnet werden. Der Plot der kumulativen Intensitätsverteilung der nicht-zentrischen Reflexe ist eine in der Proteinkristallographie übliche Methode zur Darstellung der Intensitätsverteilung. Bei verzwilligten Kristallen zeigt diese Verteilung einen sigmoidalen Verlauf, da die Überlagerung der Intensitäten der einzelnen Zwillingsdomänen dazu führt, dass sich die Anzahl der schwachen Reflexe verringert.

Ein weiterer sensibler und zuverlässiger Indikator für eine Verzwilligung der Daten ist der Mittelwert von $|E^2 - 1|$ (zweites Moment der Intensitäten). Dieser Wert ist desto größer, je größer die Unterschiede zwischen den Reflexintensitäten sind und deshalb zeigen die Beugungsbilder von Zwillingskristallen eine Abweichung vom Erwartungswert (2.0) nach unten.

Im Unterschied zur meroedrischen Verzwilligung, bei der eine Verzwilligung innerhalb eines Kristallsystems stattfindet, ist die pseudo-meroedrischer Verzwilligung kristallsystemübergreifend. Eine meroedrisch Verzwilligung kann nur bei Kristallsystemen mit zwei möglichen Lauegruppen vorliegen. In diesen Kristallsystemen (tetragonal, trigonal, hexagonal und kubisch) besteht die Möglichkeit ein Gitter niedrigerer Lauesymmetrie durch das Zwillingsgesetz so auf sich abzubilden, dass dadurch die höhere Symmetrie erzeugt werden kann. Eine höhere Symmetrie wird allerdings nur dann erzeugt wenn es sich um eine perfekte Verzwilligung handelt, d.h. wenn beide Zwillingsdomänen in gleicher relativer Populierung im Kristall vorhanden sind. Je größer der Unterschied der Populierung der Domänen ist, desto stärker werden die Abweichungen von der höheren Symmetrie.

Im Falle der kristallsystemübergreifenden pseudo-meroedrischen Verzwilligung erscheint ein Kristallsystem niedriger Symmetrie durch das Zwillingsgesetz als höhersymmetrisch. Dies ist nur möglich, wenn die metrische Symmetrie der Elementarzelle höher ist als vom Kristallsystem gefordert. Zum Beispiel kann eine primitive monokline Zelle mit $a = b$ unmittelbar in eine größere orthorhombische C-zentrierte umgestellt werden. Auch kann eine monokline Elementarzelle mit der geometrischen Beziehung $c \cdot \cos\beta = -a/2$ in eine C-zentrierte orthorhombische überführt werden. Dieser Spezialfall wird näher im Ergebnisteil am Beispiel der $Fc\alpha RI$ Kristalle erläutert.

Bei der nicht-meroedrischen (epitaxialen) Verzwilligung handelt es sich um eine mehr oder weniger willkürliche Verwachsung der Kristalle, d.h. die Domänen überlappen nicht in allen drei Dimensionen und das Zwillingsgesetz ist ein nicht-kristallographisches. Aus diesem Grund überlagern auch die Beugungsbilder nicht mehr exakt und man bekommt eine zum Teil chaotisch wirkende Anordnung von Reflexen. Gelingt es nicht eine

Elementarzelle im Diffraktionsbild ausfindig zu machen, ist es nicht möglich den Datensatz auszuwerten.

Bei der Auswertung der meroedrisch und pseudo-meroedrisch verzwilligten Kristalle liegt das Problem nicht bei der Elementarzellbestimmung, sondern die Lösung des Phasenproblems ist häufig stark erschwert oder sogar unmöglich. Auch nach einer gelungenen Phasierung kann die Verfeinerung der Struktur schwierig verlaufen. In den meisten Fällen ist eine Strukturlösung mit verzwilligten Datensätzen nicht möglich, so dass eine mathematische Entzwilligung der Daten notwendig wird. Dies wird möglich, da das gemessene Beugungsbild als Überlagerung zweier korrekter Beugungsbilder angesehen werden kann. Zu jedem Reflex gibt es daher einen zwillingsverwandten Reflex, wobei dieser aus dem ersten durch Anwendung des reziproken Zwillingsoperators erzeugt wird. Problematisch ist aber die genaue Zwillingsfraktion festzustellen, da diese normalerweise unbekannt ist und abgeschätzt werden muss. In der Praxis entzwilligt man die Daten daher mit verschiedenen Werten der Zwillingsfraktion und analysiert anschließend die $|E^2-1|$ - Statistik. Mit dieser Methode entfernt man zwar die Verzwilligung der Daten aber man rechnet neue systematische Fehler hinein, und zwar desto stärker je näher der Wert der Zwillingsfraktion bei 0,5 liegt. Bei perfekter Verzwilligung ist das Problem aus mathematischen Gründen (Teilung durch Null) nicht lösbar. Durch die neu entstandenen systematischen Fehler ist auch eine Verfeinerung der entzwilligten Daten nie unproblematisch.

Unerkannte und nicht entsprechend behandelte Verzwilligungen stellen eine große Fehlerquelle in der Röntgenstrukturanalyse dar. Daher ist diese Problematik ein wichtiger und nicht zu unterschätzender Faktor in der Kristallographie.

5.6.3 Datensammlung und Datenauswertung

Für die Aufnahme von Beugungsbildern müssen Kristalle aus der Mutterlauge auf die Messapparatur überführt werden. Um Röntgenaufnahmen bei Raumtemperatur aufzunehmen wurden die Kristalle zusammen mit einer kleinen Menge Reservoirlösung in eine Glaskapillare (GLAS, W.Müller, Berlin) mit 0,5 -1,0 mm Durchmesser gesaugt, der Kristall mittels *Paper Wicks* (Hampton Research, Laguna Hills USA) trocken gelegt und die Kapillare mit Dentalwachs verschlossen. Durch die hochenergetische, ionisierende Röntgenstrahlung vor allem bei Messungen am Synchrotron werden im Kristall radikalische Kettenreaktionen ausgelöst, die irreversible Schäden am Kristall hervorrufen. Diese Strahlenschäden vermindern die Qualität der aufgenommenen Daten eines Kristalls zum Teil extrem. Aus diesem Grund wurden die meisten Kristalle, bei Messungen mit der intensiveren Synchrotronstrahlung ausschließlich, mittels Kryoloop (Hampton Research, Laguna Hills USA) in einem Stickstoffstrom bei 100 K oder direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um eine Eisbildung des im Kristall vorhandenen Wassers zu verhindern wurden die Kristalle vorher kurzzeitig (3-10 s) in einen Kryopuffer überführt, welcher sich aus der Reservoirlösung und Kryoprotektantien wie z.B. D(-)-2,3 Butandiol, Glycerin,

Ethylenglycol oder niedermolekularen Polyethylenglykolen in geeigneter Konzentration zusammensetzt. Alternativ kann der Kristall in einem glasartig erstarrenden Öl eingefroren werden.

Die Datenaufnahme erfolgte entweder mit CuK α -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) an einem RIGAKU-Drehanodengenerator mit Kupferanode (Rigaku, Tokio) und MAR-*Image plate* Detektor (MAR, Norderstedt) oder an der *beamline* BW6 des deutschen Elektronensynchrotrons (DESY, HASYLAB, Hamburg) mit einem MAR-CCD (*charge-coupled device*) –Detektor. Die Bestimmung der Kristallorientierung, Raumgruppe und Gitterkonstanten sowie die Integration der Beugungsbilder erfolgte mit den Programmen DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) und MOSFLM Version 6.11 (Leslie, 1999). Zur Datenreduktion wurden die Programme SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997), SCALA und TRUNCATE (Collaborative Computational Project No. 4, 1994) verwendet. Mit dem Programm POLARRFN (CCP4, 1994) wurde eine Selbstrotations-Pattersonsuche durchgeführt.

5.6.4 MAD-Phasierung

Zur Strukturlösung der Protease IdeS wurde die Methode der *Multiwavelength Anomalous Dispersion* (MAD) angewandt. Diese Methode zur Lösung des Phasenproblems in der Kristallographie wurde erst durch die Verwendung von Synchrotronstrahlung möglich, da hier Röntgenstrahlung mit einem breiten Wellenlängenspektrum erzeugt und exakt eingestellt werden kann. Das Prinzip der MAD Methode beruht auf der anomalen Streuung von Röntgenstrahlung. Zur anomalen Streuung kommt es in einem elementspezifischen Wellenlängenbereich (Absorptionskante) des Röntgenspektrums, bei dem die Energie des eingesetzten Röntgenstrahls etwas größer als die Anregungsenergie der Elektronen in der äußeren Schale einer beteiligten Atomsorte ist. Dabei wird ein Elektron von der K-Schale auf ein höheres Energieniveau gehoben und es kommt beim Zurückfall von der L auf die K-Schale zu einer ungerichteten Emission von K α -Strahlung des angeregten Elements. Das führt zu einer stärkeren Wechselwirkung der Röntgenstrahlung mit dieser Atomsorte und infolge dessen zu einer kleinen Änderung der Amplitude und Phase. Dieser Vorgang wird als anomale Dispersion bezeichnet. Durch diesen zusätzlichen Streubeitrag kann man die Strukturformfaktoren nicht mehr alleinig unter der Annahme klassischer elastischer Streuung (einer Wechselwirkung bei der die Strahlung am Ort des Atoms weder Energie noch ihre Phase ändert) berechnen (Abb. 5.4).

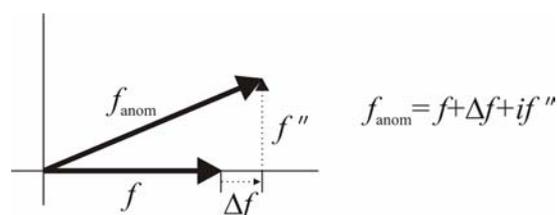


Abbildung 5.4 Zusammensetzung des anomalen Atomformfaktors.

Der zusätzliche anomale Streubeitrag setzt sich aus einem Realteil Δf (dispersiver Beitrag) und einem Imaginärteil $i f''$.

Des Weiteren ist bei einer anomalen Streuung das Friedelsche Gesetz $|F_{hkl}| = |F_{-h-k-l}|$ nicht mehr gültig. Dieser Unterschied in den Friedel-Paaren, jetzt Bijvoet-Paare, wird als Bijvoet-Differenz ($\Delta|F|_{\text{ano}}$) bezeichnet und kann genutzt werden, um die Position der anomal streuenden Atome anhand einer anomalen Differenz-Patterson-Map oder mit direkten Methoden zu bestimmen.

$$\Delta|F|_{\text{ano}} = \{|F_{\text{PH}}^{(+)}| - |F_{\text{PH}}^{(-)}|\} \frac{f'}{2f''}$$

Formel 5-2 Berechnung der Bijvoet-Differenzen.

Die Bijvoet-Differenzen können aus den Strukturfaktoramplituden der Friedelpartner nach oben stehender Gleichung berechnet werden. $F_{\text{PH}}^{(+)}$ ist dabei die Amplitude des Strukturfaktors vom Reflex (h, k, l) und $F_{\text{PH}}^{(-)}$ die Amplitude des Reflexes (-h, -k, -l).

Die anomale Patterson-Map lässt sich dabei durch Fouriertransformation mit $\Delta|F|_{\text{ano}}^2$ als Koeffizienten berechnen.

Da der anomale Streubeitrag zum Strukturfaktor sehr gering ist, setzt diese Methode eine gute Isomorphie der Datensätze voraus. Der Vorteil beim MAD ist, dass eine perfekte Isomorphie erreicht werden kann, indem der gleiche Kristall bei verschiedenen Wellenlängen gemessen wird. Um die optimalen Wellenlängen festzustellen wird der Kristall einer Absorptionmessung unterzogen. Wird der Absorptionskoeffizient für Röntgenstrahlung des Schweratoms gegenüber der Wellenlänge aufgetragen, ergibt sich eine Kurve mit sehr scharfen Peaks die der oben genannten Absorptionskante entsprechen. Die verwendeten unterschiedlichen Wellenlängen entsprechen dabei dem Maximum der Absorptionskurve (λ_{peak} , f'' Maximum) und dem Wendepunkt der Kurve (λ_{edge} , Δf Minimum). Als Vergleichsreflexe wurde ein Datensatz bei einer Wellenlänge (λ_{remote} , kein Einfluss anomaler Dispersion), die weit von der Absorptionskante entfernt war, aufgenommen.

Zur Strukturlösung der IdeS wurde Selen als anomaler Streuer mittels Selenomethionin-Expression (sh. Kap. 5.2.4.3.) in das Protein eingebracht. Die Lagen von vier der fünf möglichen Selenomethionin Positionen in der Differenz-Patterson-Map wurden mit dem Programm SHELXD (Schneider & Sheldrick, 2002) mittels direkter Methoden bestimmt und mit dem Programm SHARP (Fortelle & Bricogne, 1997) durch *solvent flattening* verfeinert. Die initialen Phasen wurden dazu verwendet das atomare Strukturmodell mit dem Programm ARP-WARP (Morris *et al.*, 2002) automatisch in die resultierende Elektronendichte-Verteilung einzupassen. Das Strukturmodell wurde wie unter Modellbau und Verfeinerung beschrieben vervollständigt.

5.6.5 Molekularer Ersatz

Die Struktur des Fc α -Rezeptors, sowie der hier nicht ausführlich behandelten Struktur des IdeS verdauten Fc-Fragmentes von IgG wurden mittels *Molecular Replacement* (Faltmolekülmethode) (Huber, 1965, Growther & Blow, 1967) gelöst. Bei dieser Methode wird die Orientierung und Position des Moleküls in der Einheitszelle unter Verwendung eines strukturell ähnlichen Suchmodelles bestimmt. Voraussetzung für diese Technik ist, dass das Suchmodell und das Zielmolekül eine ausreichende Ähnlichkeit zueinander haben, wobei ein Erfahrungswert besagt, dass die Standardabweichung der C $^{\alpha}$ -Atome nicht mehr als 1 Å betragen sollte. Diese strukturelle Ähnlichkeit wird in der Regel bei Proteinen mit einer Sequenzidentität von über 25% erreicht. Mit der Zunahme an bekannten und in der RCSB- Proteindatenbank (Bermann *et al.*, 2000) veröffentlichten Strukturen steigt die Chance, eine ausreichend ähnliche Struktur für die Strukturlösung zu finden. Nachdem ein ausreichend gutes Suchmodell vorliegt, muss dieses durch eine sechsdimensionale Suche, welche drei Rotations- und drei Translationsparameter beinhaltet, korrekt in der Einheitszelle positioniert werden. Da der Rechenaufwand einer sechsdimensionalen Suche nicht realisierbar ist, wird die Suche in Rotation und anschließende Translation unterteilt, was zu 2 dreidimensionalen Einzelschritten führt. Um dies zu ermöglichen, wird die Pattersonfunktion herangezogen (Patterson, 1934). Die Pattersonfunktion $P(u, v, w)$ ist eine Fouriersynthese der gemessenen Intensitäten (Strukturfaktoramplituden) ohne Einbeziehung des Phasenwinkels ($\alpha = 0$) (Formel 5-3). Dabei bezeichnen u , v , w die Achsen der Patterson-Zelle. Sie enthält die Information über sämtliche interatomaren Abstandsvektoren.

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_{h, k, l} |F(h, k, l)|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw)$$

Formel 5-3 Pattersonfunktion

Das Prinzip der Suche im Patterson Raum beruht darauf, dass das Suchmodell in einer dreidimensionalen Suche jeweils um definierte Inkremente rotiert wird und von jeder der resultierenden Orientierungen eine Patterson-Dichte-Verteilung berechnet wird. Diese wird mit der Patterson-Dichte des gemessenen Datensatzes verglichen und Übereinstimmungen werden mit Hilfe eines Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Man erhält ein Maximum dieses Korrelationskoeffizienten bei gleicher Orientierung des Suchmodells und des zu suchenden Proteinmoleküls in der Einheitszelle. Anschließend wird das so orientierte Suchmodell durch eine weitere inkrementierte dreidimensionale Translationssuche durch die Einheitszelle geschoben. Die korrekte Lage des Modells kann sowohl anhand des kristallographischen R-Faktors als auch über den Korrelationskoeffizienten überprüft werden.

Initiale Phasen zur Strukturlösung des Fc α -Rezeptors wurden mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) unter Verwendung der Koordinaten der bereits von Herr *et al.* gelösten Struktur des Rezeptors als Suchmodell (PDB Eintrag: 1OVZ, Herr *et al.*, 2003) erhalten.

5.6.6 Modellbau und Verfeinerung

Die Elektronendichten wurden mit dem Programm CNSv1.1 (Brünger *et al.*, 1998) berechnet. Der manuelle Einbau der Modelle in die 2 FoF- und die FoFc- Elektronendichte erfolgte auf einer SILICON GRAPHICS *work station* mit den Programmen O (Jones *et al.*, 1991) und MAIN (Turk, 1992). Bei der Verfeinerung des Strukturmodells mit dem Programm CNSv1.1 wurden 5 bzw. 8% der Reflexe zufällig ausgewählt und nicht zur Verfeinerung berücksichtigt. Diese so genannten Test-Set Reflexe wurden zur Bestimmung des freien R-Faktors herangezogen. Die Verfeinerung der Parameter wie Atomposition und B-Faktoren in CNS erfolgte unter der Berücksichtigung der Parameter von Engh & Huber (Engh & Huber, 1991). Mittelungen der Elektronendichten im direkten Raum mittels der NCS-Symmetrie sowie die dafür benötigten Masken wurden mit dem Programm MAIN durchgeführt.

Die Analyse der geometrischen Parameter wie Bindungslängen, Bindungswinkel und dihedrale Winkel erfolgte mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1996). Überlagerungen und *least-square-fits* wurden mit den Programmen LSQMAN (Jones *et al.*, 1991) und MAIN durchgeführt. Die Sekundärstrukturelemente wurden mit den Programmen STRIDE (Frishman & Argos, 1995) und MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) automatisch zugeordnet und visuell überprüft.

5.6.7 Suche nach Sequenz und Strukturhomologen

Der Vergleich der Strukturen mit den bekannten Strukturen der RCSB-Proteindatenbank (Bermann *et al.*, 2000) wurde mit dem DALI-Server (Holm & Sander, 1993) des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/dali>) vorgenommen. Die Suche nach sequenzhomologen Proteinen erfolgte mit dem BLAST-Server des National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

5.6.8 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung von Proteinen wurden die Programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (Esnouf, 1999), RASTER3D (Merrit & Murphy, 1994) und PYMOL (www.pymol.org) verwendet. Die Oberfläche der Proteine sowie das elektrostatische Potential der Oberflächen wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls, 1991) berechnet. Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) vorgenommen und mit ALSRIPT (Barton, 1993) graphisch dargestellt.

6 Ergebnisse

6.1 Die Kristallstruktur des humanen Fc α Rezeptors I

6.1.1 Expression und *inclusion body* Reinigung

Um ein für die Kristallisation geeignetes stabiles Protein zu erhalten, wurde die für die extrazelluläre Domäne des Fc α Rezeptors kodierende DNA in den Vektor pET22b+ kloniert. Das Protein mit einem Molekulargewicht von 23,6 kD wurde wie unter 5.2.4.1. beschrieben in dem *E.coli* Stamm Rosetta [DE3] überexprimiert. Die Expression des Proteins konnte anhand einer zusätzlichen starken Proteinbande im SDS-Polyacrylamidgel im Molekulargewichtsbereich zwischen 21 und 24 kD verfolgt werden (Abb. 6.1). Bei der Expression von disulfidverbrückten Proteinen im Cytoplasma von *E.coli* liegen die Proteine häufig, aufgrund falsch verknüpfter Disulfidbrücken, unlöslich in Form von *inclusion bodies* vor (Marston, 1986). Da die N-terminale, extrazelluläre Rezeptordomäne im nativen Zustand zwei Disulfidbrücken ausbildet, wurde das Protein vollständig in Form von *inclusion bodies* akkumuliert. Die unlösliche Proteinfraction wurde gemäß dem unter 5.4.1. aufgeführten Protokoll isoliert, dabei wurden mittels mehrerer Waschstschritte und unter Verwendung von LDAO die ebenfalls unlöslichen Membranbestandteile sowie verunreinigende lösliche Proteine entfernt. Bei diesem Verfahren konnten aus 8 l Kulturmedium ca. 5 g *inclusion bodies* präpariert werden. Der Reinheitsgrad der isolierten *inclusion bodies* wurde mittels 12%iger SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen bestimmt (Abb. 6.1). Durch N-terminale Proteinsequenzierung wurde die Proteinbande bei ca. 23 kD als Fc α RI verifiziert.

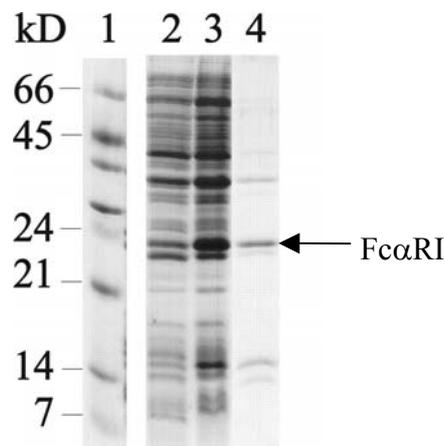


Abbildung 6.1 Expression und *inclusion body* Präparation.

Reduzierendes 12% iges SDS-Polyacrylamid-Gel nach Coomassie Färbung 1) Molekulargewichts-marker, 2) Zellysat vor der Induktion, 3) Zellysat 4h nach Induktion mit 1 mM IPTG, 4) gereinigte *inclusion bodies*.

6.1.2 Renaturierung und Reinigung

Die gereinigten *inclusion bodies* wurden unter denaturierenden Bedingungen und bei vollständiger Reduktion der Disulfidbrücken, wie unter 5.4.2. beschrieben solubilisiert. Nach Entfernung des DTT durch Dialyse gegen 4 M Guanidiniumhydrochlorid pH 4.0 konnte das Protein nach dem optimierten Verfahren renaturiert werden (Wenig & Sondermann, 2003).

Aufgrund der geringen Verunreinigungen des Proteins nach der Renaturierung, genügte eine abschließende Gelfiltration, um den gewünschten Reinheitsgrad von mindestens 95% für die Kristallisation zu erreichen. Die optimale Pufferbedingung (2 mM Tris/HCl pH 8,0) des renaturierten Fc α -Rezeptors wurde durch Löslichkeitstests ermittelt. Da sich bei diesen Experimenten herausstellte, dass NaCl oder andere Salze das rückgefaltete Protein destabilisieren und aggregieren, wurde auch die Gelfiltrations-Chromatographie in einem Niedrigsalzpuffer (20 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0) durchgeführt.

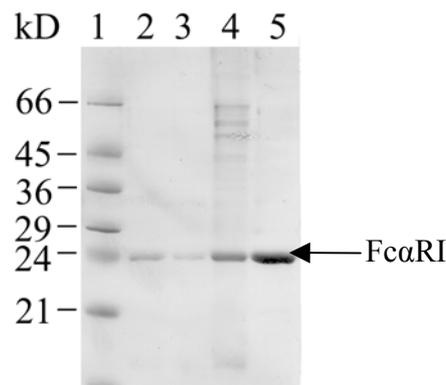


Abbildung 6.2 Reinigung von Fc α RI mittels Gelfiltration.

Die Fraktionen der Gelfiltrationssäule wurden auf einem reduzierenden 12% SDS-Polyacrylamid-gel aufgetragen, was mittels Coomassie gefärbt wurde. 1) Molekulargewichtsmarker, 2 bis 4) Elutionsfraktionen der Gelfiltrationen, 5) vereinte und aufkonzentrierte Fraktionen

Zur Molekularmassenbestimmung wurde eine Elektronenspray-Ionisations Massenspektrometrie des HPLC gereinigten, renaturierten Proteins durchgeführt. Die Dekonvolution des ESI Massenspektrums ergab ein Molekulargewicht von 23003 D und 23611 D (Abb. 6.3). Dabei entspricht 23611 D dem Molekulargewicht des unmodifizierten Proteins. Da durch N-terminale Sequenzierung gezeigt werden konnte, dass der N-terminus des Proteins intakt ist, weist die massenspektrometrische Analyse auf einen C-terminalen proteolytischen Abbau von 5 Aminosäuren hin.

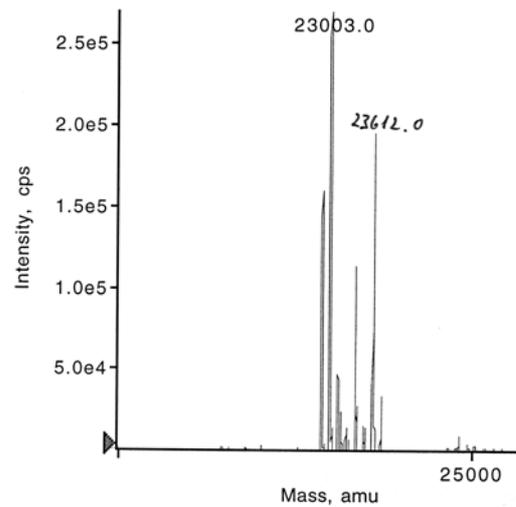


Abbildung 6.3 Dekonvolution des ESI Massenspektrums des Fc α RI.

Während der Lagerung der vereinigten und auf 5 mg/ml aufkonzentrierten Gelfiltrationsfraktionen bei 4°C bildete das Protein einen mikrokristallinen Niederschlag. Da die Kristalle nur eine Ausdehnung von maximal 10 μ m erreichten (Abb. 6.4) konnten sie jedoch nicht für röntgenkristallographische Untersuchungen verwendet werden. Deshalb diente die Kristallisation ausschließlich der weiteren Reinigung des Proteins. Nach mehreren Waschschrritten wurde der kristalline Niederschlag in 100 mM Citrat-Puffer solubilisiert. Das so erhaltene Protein wurde mit einer Konzentration von 5 mg/ml direkt für weitere Kristallisationsversuche eingesetzt.

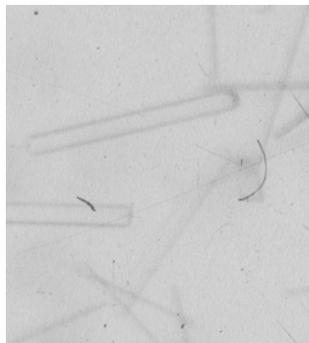


Abbildung 6.4 Mikrokristalle des Fc α RezeptorsI.

6.1.3 Aktivitätstest

Um zu überprüfen, ob das in *E.coli* exprimierte und *in vitro* renaturierte extrazelluläre Fragment des Fc α Rezeptor in der Lage ist, mit dem IgA Fc-Fragment zu interagieren, wurde eine Affinitätschromatographie mit IgA Sepharose durchgeführt. IgG Sepharose diente bei diesem Aktivitätstest als Negativkontrolle. Die Herstellung des IgA Säulenmaterials sowie die Durchführung des Aktivitätstests wurde ausführlich im Methodenteil Kapitel 5.3.9 und 5.4.5 abgehandelt.

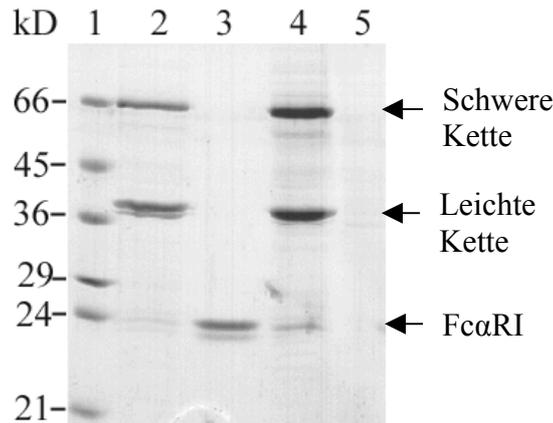


Abbildung 6.5 Aktivitätstest FcαRI.

Eine Lösung des renaturierten und gereinigten FcαRI wurde mit IgA und IgG Sepharose in PBS inkubiert, gewaschen und anschließend mit Glycin Puffer pH 3,0 eluiert. Die Proben wurden auf einem reduzierendem 12%igem, Coomassie gefärbten SDS Polyacrylamidgel analysiert. 1) Molekulargewichtsmarker, 2) Durchlauf IgA Säule, 3) Elution IgA-Säule, 4) Durchlauf IgG-Säule, 4) Elution IgG-Säule

Das in *E.coli* exprimierte und somit nicht glykosylierte Protein zeigte unter diesen Bedingungen eine spezifische und quantitative Interaktion mit der IgA Sepharose. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass der nach oben stehendem Protokoll rückgefaltete und gereinigte IgA Rezeptor in homogener und aktiver Form vorliegt.

6.1.4 Kristallisation und Datenaufnahme

Zur Rekristallisation des Fcα Rezeptors, wurden unter Beibehaltung des Citrat-Puffersystems verschiedene Präzipitanzlösungen getestet. Dazu wurden nach dem *sitting drop* Verfahren 1,5 µl Proteinlösung (5 mg/ml) mit dem gleichen Volumen an Reservoirlösung in Crys-Chem-Platten gemischt und bei 20°C über einem Reservoirvolumen von 400 µl inkubiert. Die Optimierung der Kristallisationsbedingung ergab, dass ein Zusatz von 4% Ethylenglykol und 100 mM Citrat Puffer bei pH 6,0 die besten Proteinkristalle erzielte. Die rhomboidförmigen Kristalle bildeten sich nach ein bis zwei Tagen und erreichten ihre maximale Größe von 0,2 × 0,1 × 0,04 mm nach ca. zwei Wochen (Abb. 6.6).

Da die Kristalle bei Diffraktionsmessungen unter Verwendung der Röntgenstrahlung des RIGAKU-Drehanodengenerators eine nur geringe Auflösung von maximal 8 Å erreichten, musste die Datenaufnahme am Synchrotron vorgenommen werden. Zur Vermeidung von Strahlenschäden durch die hochenergetische Synchrotronstrahlung wurden die Kristalle bei 100 K im Stickstoffstrom eingefroren. Um dabei die Ausbildung von kristallinen Eisstrukturen zu verhindern, mussten die Kristalle für 5-10 Sekunden in Kryopuffer bestehend aus 12% D(-)2,3 Butandiol in Reservoirlösung eingelegt werden. Die so

behandelten Kristalle konnten direkt in flüssigem Stickstoff oder im Stickstoffgasstrom eingefroren werden (Wenig & Sondermann 2003).



Abbildung 6.6 Rhomboidförmiger $Fc\alpha RI$ Kristall.

Alle Diffraktionsmessungen der $Fc\alpha RI$ Kristalle wurden an der Wiggler *beamline* BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron gemessen. Dabei konnten Daten bis zu einer Auflösung von $2,5 \text{ \AA}$ aufgenommen werden. Die Auswertung und Skalierung der Daten mit den Programmen DENZO und SCALEPACK ergab ein flächenzentriertes orthorhombisches Kristallgitter mit den Einheitszellparametern $a = 53,1$ $b = 144,9$ $c = 140 \text{ \AA}$ und einem annehmbaren R_{sym} -Faktor von $6,1\%$.

Jedoch zeigten die Intensitätsstatistiken der Daten eine auffällige Abweichung von den Erwartungswerten, die auf eine Verzwilligung der Kristalle hinwies. Zum einen zeigte der Plot der kumulativen Intensitätsverteilung einen sigmoidalen Verlauf, was eine charakteristische Eigenschaft verzwilligter Daten ist, und zum anderen lag der durchschnittliche Wert des zweiten Moments (Standardabweichung einer gleichverteilten Zufallsvariable) der Intensitäten bei $1,67$ (Abb. 6.7). Im Falle von Daten ohne Fehlordnung liegt dieser Wert bei 2 , wohingegen ein Wert von $1,5$ bei perfekter Verzwilligung erreicht wird (Declercq & Evrard, 2001). Der beobachtete Mittelwert von $1,67$ deutet demzufolge auf eine partielle Verzwilligung hin.

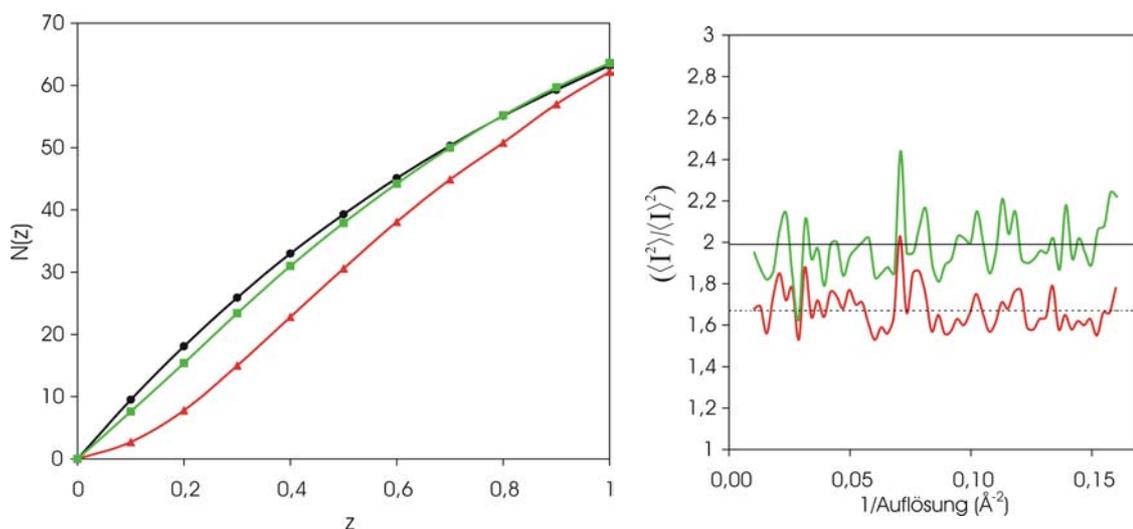


Abbildung 6.7 Vergleich der Intensitätsstatistiken.

Das linke Diagramm zeigt die kumulative Intensitätsverteilung der azentrischen Daten wobei $N(z)$ dem Prozentsatz an Reflexen mit $I \geq z \cdot I_{\text{max}}$ entspricht. Dabei sind theoretische Werte für

unverzwillingte Daten in schwarz, die Werte des verzwillingten Kristalls in rot und die des unverzwillingten Kristalls in grün dargestellt. Im rechten Diagramm ist das zweite Moment der Intensitäten ($\langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$) als eine Funktion der Auflösung für die verzwillingten (rot) und unverzwillingten Daten (grün) aufgetragen

Bei weiteren Messungen mit Kristallen aus der gleichen Kristallisationsbedingung wurde ein Datensatz aufgenommen, der nicht in der C-zentrierten orthorhombischen Raumgruppe ausgewertet werden konnte ($R_{\text{sym}} = 19,8\%$). Stattdessen zeigte das Diffraktionsmuster Eigenschaften eines primitiv monoklinen Kristallsystems mit den Einheitszellparametern $a = 53,1$ $b = 140,6$ $c = 77,2$ Å und $\beta = 110^\circ$. Der durchschnittliche Wert des zweiten Moments der Intensitäten (1,99) sowie die Auftragung der kumulativen Intensitätsverteilung dieser Daten (Abb. 6.7) belegen, dass dieser Kristall keine Verzwillingung aufweist. Die vollständigen Datenstatistiken beider Kristalle sind der Tabelle 6.1 zu entnehmen.

Tabelle 6.1 Statistik der Datenaufnahme.

Zusammenfassung der kristallographischen Datenaufnahme und Prozessierung. Die in Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale (2,96–2,8 Å für P2₁ und 2,59–2,5 Å für C222₁ Daten).

Kristallform	Monoklin, nicht verzwillingt	Pseudo-orthorhombisch, verzwillingt
Raumgruppe	P2 ₁	C222 ₁ (für Auswertung)
Einheitszellparameter (Å, °)	$a = 53,1$ $b = 140,6$ $c = 77,2$ $\alpha = \gamma = 90$, $\beta = 110$	$a = 53,1$ $b = 144,9$ $c = 140,2$ $\alpha = \gamma = \beta = 90$
Mosaizität (°)	2,1	1,1
Wellenlänge (Å)	1,05	1,05
Auflösung (Å)	20,0–2,8	20,0–2,5
Anzahl der Reflexe:		
gemessen	41514	44080
unabhängig	22945	17600
Vollständigkeit (%)	88,4 (83)	91,5 (76,3)
mittleres $I/\sigma(I)$	11,6 (5,0)	19,6 (5,6)
R_{sym} (%) ¹	5,1 (11,0)	6,0 (19,8)
zweites Moment der Intensitäten	1,99	1,67

$$^1R_{\text{sym}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(\mathbf{h}) - \langle I(\mathbf{h}) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(\mathbf{h})}$$

Die genaue Untersuchung der Einheitszellparameter des monoklinen Kristalls ergab, dass sie in der geometrischen Beziehung $c \cdot \cos\beta = -a/2$ zueinander stehen. Diese spezielle Geometrie der Zelle ermöglicht die Simulation der orthorhombischen Lauegruppe *mmm* im Falle von perfekter Verzwillingung (Abb. 6.8). Es handelt sich dabei um eine pseudomeroedrische Verzwillingung (Kap. 5.6.2), da ein monoklines Kristallgitter durch das Zwillingsgesetz in das höhersymmetrische C-zentrierte orthorhombische Kristallsystem

überführt wird. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die ursprünglich angenommene orthorhombische Symmetrie nur eine durch die Verzwillingung entstandene Pseudosymmetrie ist und die korrekte Raumgruppe primitiv monoklin ist ($P2_1$). Diese These konnte zusätzlich durch die in den unverzwillingten Daten nachgewiesene nichtkristallographische Symmetrie (NCS) unterstützt werden, da gezeigt werden konnte, dass nichtkristallographische Symmetrie das Auftreten von Verzwillingung fördern kann (Larsen *et al.*, 2002, Royant *et al.*, 2002). Dabei sind die zwei nichtkristallographischen Achsen sowohl orthogonal zueinander als auch zu der kristallographischen zweifachen Achse angeordnet, was bedeutet, dass sie parallel zu den kristallographischen Achsen des durch Verzwillingung entstandenen orthorhombischen Kristallsystems verlaufen. Die NCS wurde durch Selbstrotations-Pattersonsuche mit dem Programm POLARRFN (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) bestimmt (Abb 6.8).

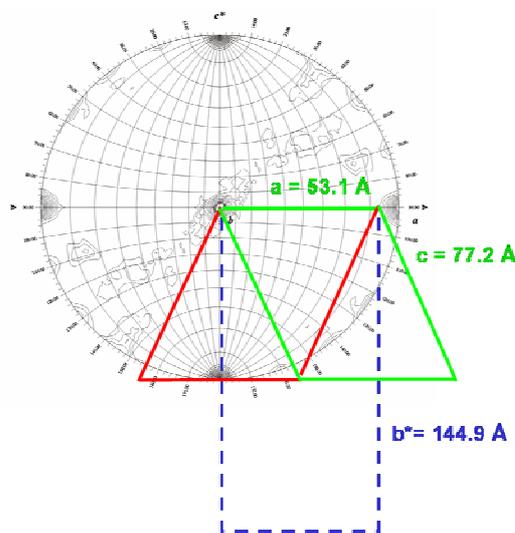


Abbildung 6.8 Graphische Darstellung der pseudomeroedrigen Verzwillingung $P2$ zu $C222$. In grün und rot sind zwei sich überlappende B Ebenen der monoklinen Einheitszelle abgebildet. Bei perfekter Überlagerung dieser Einheitszellen entsteht ein größeres C-zentriertes orthorhombisches Gitter ($\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$). Im Hintergrund ist die Selbstrotations Pattersonkarte bei $\kappa = 180^\circ$ abgebildet.

Um eine Überlappung der Reflexe aufgrund der hohen Mosaizität des monoklinen Kristalls zu verhindern, wurden die Daten nur bis zu einer Auflösung von $2,8 \text{ \AA}$ ausgewertet (Abb. 6.9). Unter Annahme von vier Molekülen pro asymmetrische Einheit betrug das Verhältnis von Zellvolumen zu Molekulargewicht $2,96 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, woraus ein Solvensgehalt von 58% im Proteinkristall resultiert (Matthews, 1968).

6.1.5 Strukturlösung

Da die Verzwillingung der Kristalle eine Strukturlösung stark erschwert oder gar unmöglich macht (sh Kap. 5.6.2), wurde vorerst versucht die qualitativ schlechteren, aber nicht verzwillingten, monoklinen Daten zur Strukturlösung einzusetzen. Trotz der vorhandenen

Suchmodelle mit geeigneter Sequenzhomologie, wie der Struktur des *Killer cell inhibitory* – Rezeptor (32% Identität) und der *Leukocyte-inhibitory* Rezeptor Struktur (35% Identität) schlugen alle Versuche der Phasierung mit den zur Verfügung stehenden Programmen (BEAST, AMoRe, Molrep) fehl. Da die Qualität der verzwilligten Daten hinsichtlich Vollständigkeit, Auflösung und Mosaizität deutlich besser war, wurde versucht, die genaue Zwillingsfraktion zu bestimmen, um anschließend unter Anwendung des Zwillingsgesetzes eine mathematische Entzwilligung dieser Daten vorzunehmen. An diesen so entzwilligten Daten wurde die Methode des Molekularen Ersatzes zur Phasierung angewandt. Unter Verwendung der oben aufgeführten Suchmodelle konnten dennoch keine korrekten Phasen erhalten werden.

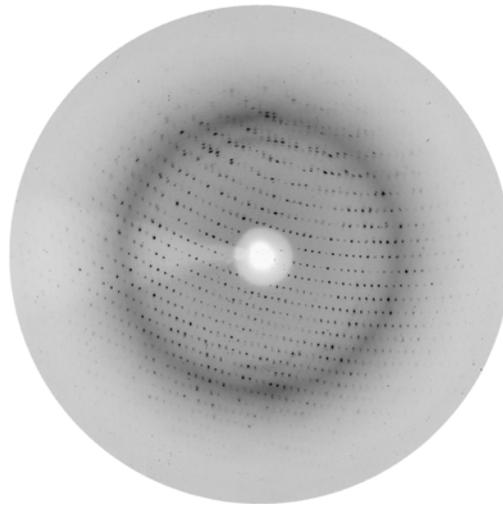


Abbildung 6.9 Diffraktionsbild des primitiv monoklinen Kristalls.

Aufgrund der hohen Mosaizität wurden die Daten nur bis zu einer Auflösung von 2,8 Å ausgewertet.

Nach weiteren Messungen am Deutschen Elektronen Synchrotron konnte schließlich ein unverzwilligter Datensatz aufgenommen werden, der mit einer Auflösung von 2,6 Å und einer Mosaizität von nur 0,5° eine deutlich bessere Qualität besaß.

Tabelle 6.2 Statistik der zur Strukturlösung verwendeten Datenaufnahmen.

Zusammenfassung der kristallographischen Datenaufnahme und Prozessierung, wobei die in Klammern angegebenen Werte sich auf die höchste Auflösungsschale (2,69 -2,6 Å) beziehen.

Raumgruppe	P2 ₁
Einheitszellparameter (Å, °)	a = 53,14 b = 140,52 c = 77,03 α = γ = 90 β = 110,
Mosaizität (°)	0,5
Wellenlänge (Å)	1,05
Auflösung (Å)	14,94 – 2,6
Anzahl der Reflexe :	
gemessen	38355
unabhängig	27189

Datenredundanz	1,5
Vollständigkeit (%)	82,8 (80,0)
mittleres I/σ(I)	13,2 (5,3)
R _{sym} (%) ¹	6,4 (13,1)

$$^1R_{\text{sym}} = \sum h \sum i |I(\mathbf{h}) - \langle I(\mathbf{h}) \rangle| / \sum h \sum i I(\mathbf{h})$$

Nach Veröffentlichung der FcIgA/FcαRI Komplexstruktur wurden mittels dieser Koordinaten (PDB Code: 1OVZ, Herr, *et al.*, 2003) die initialen Phasen dieses Datensatzes mit dem Program AMoRe (Navaza, 1994) bestimmt. Die Rotations- und Translationsuche im Pattersonraum mit Daten von 15-4 Å Auflösung ergaben eine eindeutige sich deutlich abhebende Lösung mit vier Molekülen in der asymmetrischen Einheit (Korrelationsfaktor 40,9%, R-Faktor 42,9%). Diese vier Moleküle stehen zueinander über eine zweifache nichtkristallographische Symmetrie (NCS) in Beziehung und wurden mit A, B, C und D bezeichnet.

6.1.6 Modellbau und Verfeinerung

Für jedes der vier Moleküle des Fcα Rezeptor-Modells wurde eine *rigid body* Verfeinerung unter der Annahme durchgeführt, dass jeweils die beiden separaten Immunglobulindomänen (Aminosäuren 6-97 und 98-198) als starre Körper betrachtet werden können. Diese erste Verfeinerung erzielte einen freien R-Faktor von 44,3%. Anschließend folgten mehrere Zyklen von manuellem Modellbau mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) und Verfeinerung mit CNS V.1.1 (Brünger *et al.* 1998) Zusätzlich wurde nach den initialen Modellbauzyklen eine zweifache zyklische Mittelung des Dichtebereiches von Molekül A mit B und von Molekül C mit D unter Verwendung des Programms MAIN durchgeführt. Die dazu benötigte Maske zur Festlegung der zu mittelnden Dichtebereiche wurde ebenfalls in MAIN erstellt. Die Mittelung erfolgte unter Anwendung der NCS-Operatoren. Für nachfolgende Zyklen wurden die Phasen der gemittelten Elektronendichteverteilung verwendet und mit den experimentellen Strukturfaktoramplituden kombiniert. Weitere Verfeinerungsalgorithmen beinhalteten die Atompositionen, individuelle B-Faktoren und ein *simulated annealing*. Bis auf die abschließenden Zyklen wurden während der Verfeinerung strenge NCS-Restriktionen (Kraftkonstante = 300 kcal mol⁻¹ Å²) zwischen den Molekülen A/B und C/D angewandt. In den letzten Verfeinerungszyklen wurden eine *bulk* Solvenz Korrektur und eine anisotrope Korrektur der B-Faktoren eingeführt, sowie Wassermoleküle automatisch eingebaut und manuell überprüft.

Das finale Modell beinhaltet die Aminosäurereste 7 – 195 des Fcα Rezeptors und konnte bis zu einem R-Faktor von 23,6% (R_{free}=28,3%) verfeinert werden. Der freie R-Faktor wurde dabei aus 5% der Reflexe berechnet, welche in dünnen Schalen zufällig ermittelt und von der Verfeinerung ausgeschlossen wurden.

Detaillierte Angaben zur Verfeinerung und Qualitätsprüfung des erhaltenen Strukturmodells sind in der Tabelle 6.3 zusammengefasst. Die Geometrie der Struktur wurde mit dem Program PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1996) anhand eines Ramachandran-Plots analysiert.

Tabelle 6.3 Verfeinerungsstatistik des Strukturmodells.

Verfeinerung	
Maximale Auflösung (Å)	2,6
Anzahl der Proteinatome	6052
Anzahl der Wassermoleküle	172
Anzahl der Reflexe	27128
R-Faktor (%) ¹	23,6
R _{free} -Faktor (%) ²	28,3
Geometrie	
r.m.s.d. von Idealwerten:	
Bindungslängen	0,007
(Å)Bindungswinkel (°)	1,43
B-Faktoren gebundener Atome (Å ²)	1,49
Mittlerer B-Faktor (Å ²)	30,9
Ramachandran Plot Auswertung (%)	
energetisch bevorzugter Bereich	87,9
energetisch erlaubter Bereich	11,8
energetisch möglicher Bereich	0,3
energetisch verbotener Bereich	0

¹ $R = \frac{\sum |F_{oh} - F_{ch}|}{\sum F_{oh}}$, wobei F_{oh} den gemessenen und F_{ch} den berechneten Strukturfaktoramplituden der Reflexe h entspricht.

² Wert des R-Faktors für 5% der Reflexe, die nicht zur Verfeinerung herangezogen wurden. Die Testset Selektion wurde dabei in dünnen Schalen vorgenommen, um eine Aufspaltung der durch NCS verbundenen Reflexe zu verhindern und somit einen korrekten R_{free}-Faktor berechnen zu können.

6.1.7 Strukturbeschreibung

Von den 207 Aminosäureresten der Ektodomäne des humanen Fcα Rezeptors I (ohne Berücksichtigung des Signalpeptides) sind die Reste 7 - 195 in der Kristallstruktur enthalten. Fünf der fehlenden C-terminalen Aminosäuren wurden proteolytisch während der Reinigung des Proteins abgebaut und die übrigen Reste sind aufgrund ihrer hohen Flexibilität nicht in der Elektronendichte sichtbar.

Die Struktur des extrazellulären löslichen FcαRI Fragments besteht aus zwei Immunglobulindomänen EC1 (Aminosäurerest 1-99) und EC2 (Rest 105-207), deren zentrales Element eine β- Sandwich Struktur ist. Dabei bezeichnet EC1 die membranferne

und EC2 die C-terminale Membran benachbarte Domäne, welche über einen kurzen Linker aus vier Aminosäuren miteinander verbunden sind. Die Faltungstopologie der Domäne EC1 entspricht dem I-Typ der Immunglobulindomänen und die Topologie der EC2 Domäne setzt sich, ebenso wie die Domänen des Fc γ RIIb und des KI Rezeptors, aus einer Mischung aus I- und C2-Typ zusammen. Das β -Sandwich setzt sich in Domäne EC1 aus einem viersträngigen (Strand A, B, E, D) und einem gegenüberstehenden fünfsträngigen (A', C, C', F, G) und in Domäne EC2 aus einem dreisträngigen (A, B, E) und einem fünfsträngigen (A', C, C', F, G) antiparallelem β -Faltblatt zusammen (Abb. 6.10). Dabei ist die Aufteilung des A-Stranges zwischen den gegenüberliegenden β -Faltblättern in einen A und A'-Strang eine charakteristische Eigenschaft des I-Typs. Außerdem ist der G-Strang in beiden Domänen aufgrund einer Störung (β -bulg, S91 – T93) in zwei kleinere Stränge unterteilt. Die im β -Sandwich sich gegenüberstehenden Stränge B und F sind in beiden Domänen über eine Disulfidbrücke verbunden.

Eine strukturell ähnliche Anordnung der Faltblattstränge ist auch in anderen Fc-Rezeptoren und in den Domänen des LIR-1 und KI-Rezeptors zu finden (Sondermann *et al.*, 1999, Chapman *et al.*, 2000). Gleichmaßen entspricht die Orientierung der Domänen EC1 und EC2 zueinander der LIR und KIR Domänenorientierung und ist entgegengesetzt der Anordnung in anderen Fc-Rezeptoren (Fc ϵ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIII).

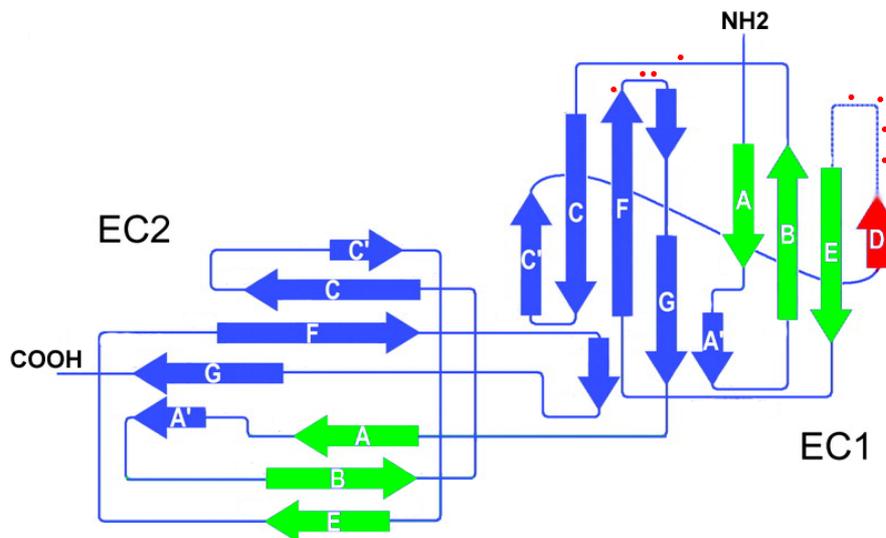


Abbildung 6.10 Topologiediagramm der Fc α RI Ektodomäne.

Die β -Faltblattstränge sind als Pfeile dargestellt und nach Zugehörigkeit zu vorderem oder hinterem Blatt in grün bzw. blau eingefärbt. Die Konformation des D β -Strangs (rot) ist in den vier Molekülen der asymmetrischen Einheit verschieden. Aminosäurereste die an der Interaktion mit IgA beteiligt sind, wurden als rote Punkte in das Diagramm eingetragen.

In der asymmetrischen Einheit der monoklinen Kristalle liegen vier unabhängige Moleküle vor, die sich in unerwarteter Weise in der Anordnung der β -Stränge und der Konformation einiger *loop*-Regionen voneinander unterscheiden. Als Beispiel ist die Kristallstruktur von Molekül C der asymmetrischen Einheit in Abbildung 6.11 dargestellt.

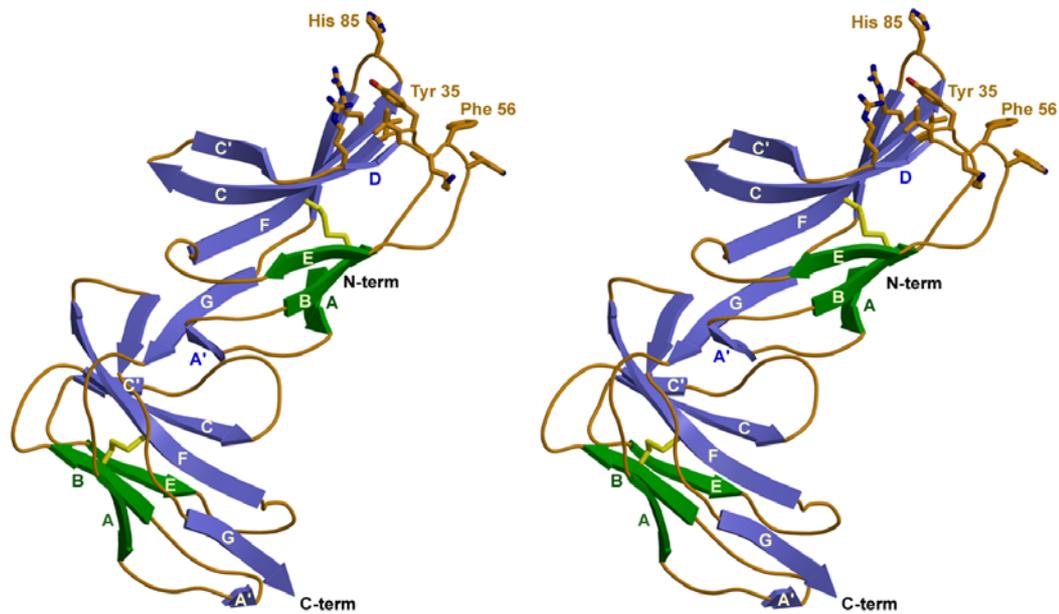


Abbildung 6.11 Stereoabbildung des Fc α RI Strukturmodells.

Die Abbildung zeigt Molekül C der asymmetrischen Einheit mit einer Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente. Aminosäuren die direkt im Kontakt zum IgA Fc-Fragment stehen, sind in *ball & stick* Darstellung gezeigt.

Molekül C zeigt dabei die größte strukturelle Variabilität gegenüber den übrigen Molekülen A, B und D. Insgesamt sind der β -Strang D und der folgenden DE *loop*-Bereich in Domäne EC1 (Aminosäuren 50-61) der umfangreichsten Umordnung unterworfen (Abb. 6.12). Die Position des C $^{\alpha}$ -Atoms des Restes W57 verändert sich dabei bis zu einem Abstand von 14,7 Å.

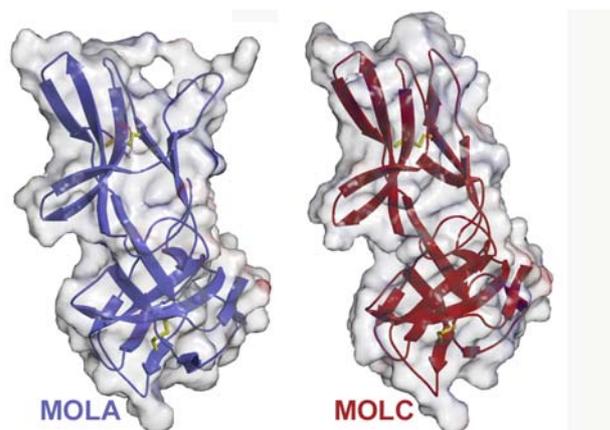


Abbildung 6.12 Vergleich der Strukturflächen.

Der Vergleich der Oberflächen von Molekül A und C zeigt die großen konformationellen Änderungen innerhalb der Domäne EC1.

Diese Umlagerung bewirkt eine Änderung im Aufbau des β -Faltblatt-Sandwichs der Domäne EC1 in Molekül C, so dass nunmehr den drei Strängen A, B und E sechs β -Stränge gegenüberstehen. Das bedeutet, dass Strang D in einen so genannten C'' Strang überführt worden ist, was von der Standard I-Typ Konformation der Immunglobulindomänen

abweicht. Die Elektronendichte beider Konformationen ist gut definiert (Abb. 6.13) und das Auftreten dieser Variabilität kann nicht durch Unterschiede in den Kristallkontakten oder in der chemischen Umgebung der Moleküle der asymmetrischen Einheit erklärt werden.

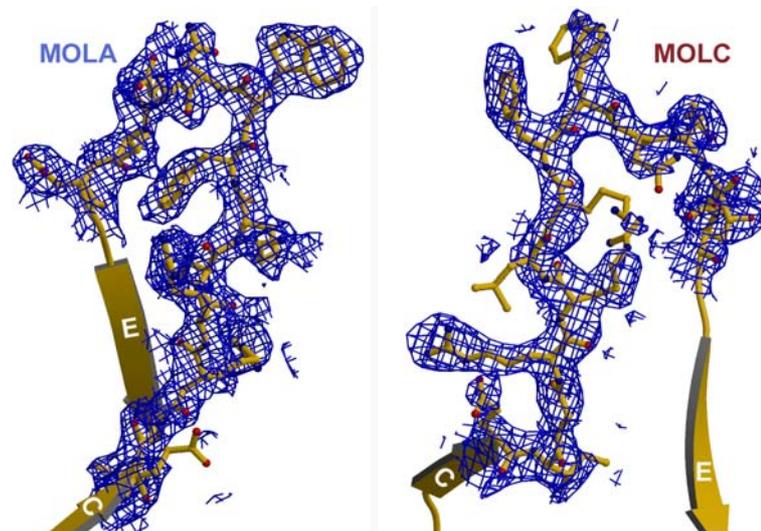


Abbildung 6.13 Elektronendichtekarte DE-loop.

Vergleich der unterschiedlichen Konformationen des DE-loops bzw. DE Stranges in den Molekülen A und C der asymmetrischen Einheit. Die Abbildung zeigt ein Stick-Modell des Bereiches zusammen mit der bei 1σ konturierten 2FoFc Elektronendichte.

Eine weitere strukturelle Variabilität geringeren Ausmasses konnte in der FG-loop Region beobachtet werden.

6.1.8 Vergleich der Fc α RI Strukturen verschiedener Kristallformen

Die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des humanen Fc α RI wurde bislang in drei unterschiedlichen Kristallformen sowie im Komplex mit Fc α gelöst. Da es zusätzlich bei den Kristallen der Raumgruppen $P2_1$ und $I4_1$ (PDB Eintrag 1OVZ, Herr *et al.*, 2003) zwischen den unterschiedlichen Molekülen der asymmetrischen Einheit zu erheblichen strukturellen Abweichungen kommt, kann man die Struktur des Rezeptors in insgesamt sechs verschiedenen chemischen Umgebungen untersuchen. Zum direkten Vergleich der bekannten Strukturen wurde eine Überlagerung (Abb. 6.14) und eine *r.m.s.* (*root mean square*) Abweichung (*r.m.s.d.*) der voneinander verschiedenen Moleküle mit dem Programm LSQMAN (Jones *et al.*, 1991) berechnet.

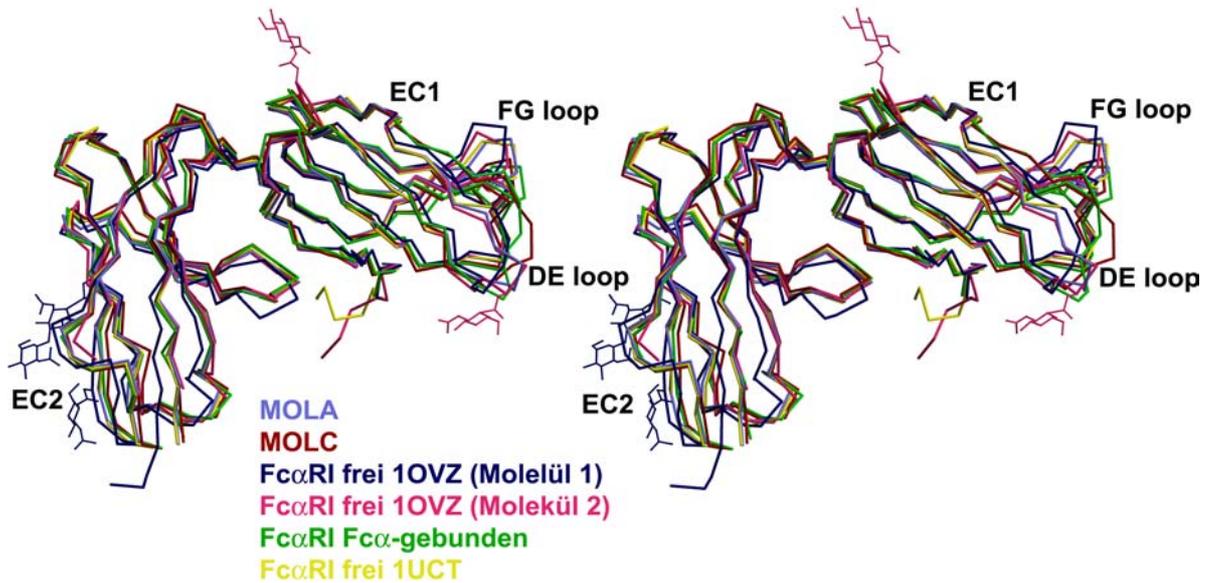


Abbildung 6.14 Überlagerung der FcαRI Strukturen .

Tabelle 6.4 Unterschiede zwischen den FcαRI Strukturen.

Abweichung der bisher gelösten FcαRI Strukturen in Bezug auf die Struktur von Molekül A der primitiv monoklinen Kristallform.

Struktur und Molekül	Gesamt - r.m.s. Abweichung versus MOLA		DE-loop/D-Faltblattstrang Konformation	Abstand Aminosäure 57 versus MOLA	Raumgruppe
	Å	C ^α Atome			
MOLA	0	188	C''-Strang	0	P2 ₁
MOLC	1.06	179	D –Strang	14.67	P2 ₁
FcαRI 1OVZ Molekül 1	1.15	186	C''-Strang	3.53	I4 ₁
FcαRI 1OVZ Molekül 2	0.83	174	C''-Strang	2.46	I4 ₁
FcαRI 1UCT	0.52	185	Ungeordnet	-	C222 ₁
Fcα-gebundener FcαRI	1.22	180	D –Strang	11.05	P3

Wie man der Tabelle 6.4 entnehmen kann, ergibt die Überlagerung der Strukturen eine relativ hohe *r.m.s.* Abweichung aller C^α-Atome von maximal 1.22 Å. Dabei sind die größten Unterschiede in der EC1 Domäne im DE-loop und FG-loop Bereich zu finden (Abb. 6.14), was auch schon innerhalb der vier Moleküle der P2₁ Kristallform beobachtet werden konnte. Die Aminosäuren 50-61 bilden in gebundener Form einen D β-Strang und in der freien Rezeptorform meist einen C''- Faltblattstrang, außer in Molekül C der

monoklinen Kristallform. Um die Abweichung in diesem Bereich zu quantifizieren, wurde nach Überlagerung aller Moleküle der Abstand der Aminosäure W57 in Bezug auf W57 in Molekül A gemessen (Tab. 6.4)

6.1.9 Untersuchung des Interdomänenwinkels

Die beiden Immunglobulindomänen EC1 und EC2 des humanen Fc α Rezeptors (Herr *et al.*, 2003, Ding *et al.*, 2003) sind etwa herzförmig zueinander angeordnet, und spannen einen Interdomänenwinkel von ca. 85-95° auf. Diese stark gewinkelte Ausrichtung der Domänen führt zu einer großen Interaktionsfläche zwischen EC1 und EC2. Innerhalb dieses Bereiches kommt es hauptsächlich zu hydrophoben Wechselwirkungen, die von den Aminosäuren V17(A'-Strang), A74, A75 (E-F-loop), V97, V98, T99, G100 (G-Strang) der EC1 Domäne, den Resten L101, Y102 im Linkerbereich und Y173, Y181, W183 (F-Strang und F-G-loop) in der EC2 Domäne ausgebildet werden. Zusätzlich stabilisieren vier Wasserstoffbrücken (G100-W183, E95-Y181, V98-Y181, V98-W183) die Konformation der Domänen zueinander (Abb. 6.15).

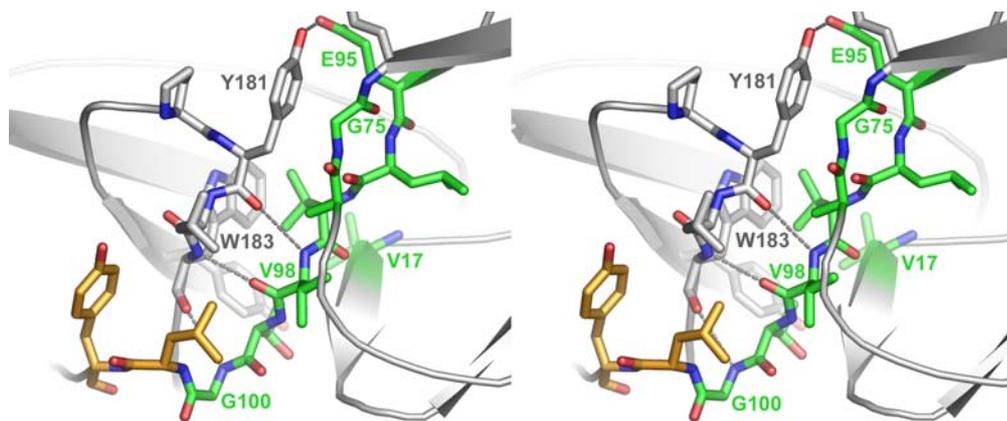


Abbildung 6.15 Stereoabbildung des Interdomänen -Bereichs.

Die an der Stabilisierung des Interdomänenwinkels beteiligten Reste sind in *ball & stick* Darstellung gezeichnet. Dabei sind die Kohlenstoffatome der EC1 Domäne grün, des Linkerbereiches gold und der EC2 Domäne grau eingefärbt. Wasserstoffbrücken sind als graue gestrichelte Linien eingetragen.

Anhand der unter 6.1.8 erwähnten Fc α RI Strukturen unterschiedlicher Kristallformen und Expressionssysteme, konnte die Flexibilität des Interdomänenwinkels ausführlich analysiert werden.

Da in mehreren Bereichen der EC1 Domäne (DE, FG) weitreichende strukturelle Veränderungen zwischen den Strukturen beobachtet wurden, ist eine standardmäßige Bestimmung des Interdomänenwinkels durch die Berechnung des Winkels zwischen den Schwerpunkts-Achsen der einzelnen Domänen nicht aussagekräftig. Andererseits ist die Faltungstopologie der EC2 Domäne zwischen den in Kapitel 6.1.8 verglichenen Kristallstrukturen weitgehend konstant (maximale *r.m.s.* Abweichung = 0.76 Å). Deshalb

wurden alle Gesamtstrukturen nur unter Berücksichtigung der Domäne EC2 überlagert und die Veränderung der Domäne EC1 relativ zu EC2 betrachtet (Abb. 6.16).

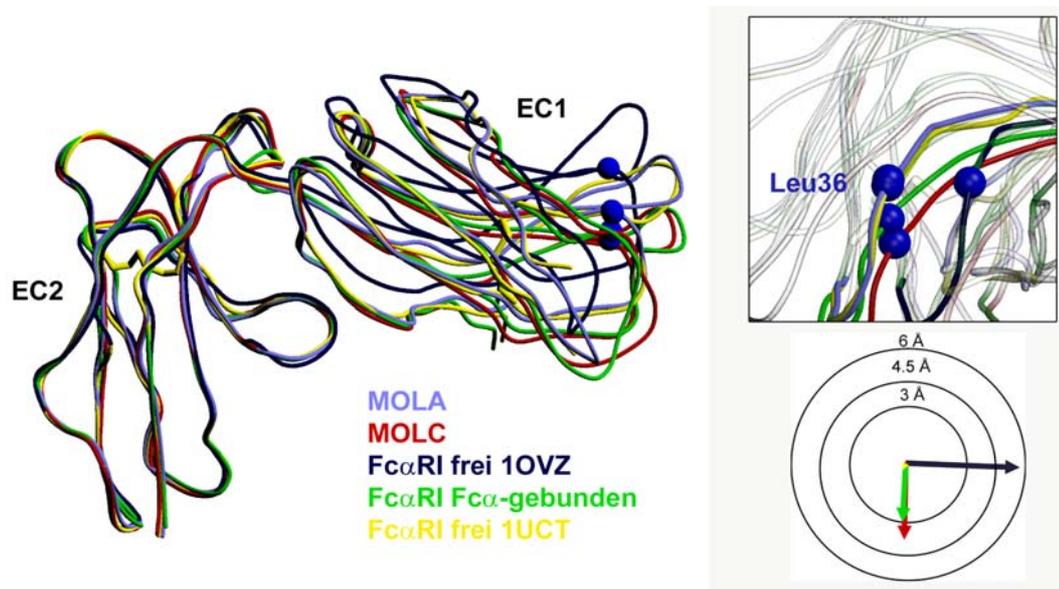


Abbildung 6.16 Bestimmung der Unterschiede des Interdomänenwinkels. Überlagerung der FcαRI Gesamtstruktur unter alleiniger Berücksichtigung der Domäne EC2, Berechnung des Leu36 C^α-Abstandes und Darstellung der Abweichung im Kreisdiagramm.

Zur Bestimmung eines definierten, vergleichbaren Wertes wurde der Abstand der C^α-Atome der Aminosäuren L36 in Bezug auf L36 in Molekül A der monoklinen Kristallform bestimmt. Dieser Wert sollte eine sinnvolle Aussage zulassen, da Leu36 in einem gut definierten invarianten β-Strang der EC1 Domäne liegt. Im Kreisdiagramm in Abbildung 6.16 sind die Abstände der C^α-Atome unter Beachtung der Richtungsänderung eingetragen. Der maximale Abstand der Leu36 C^α-Atome beträgt beinahe 6 Å und belegt somit, dass die Domänen trotz der großen Interaktionsfläche zwischen Domäne EC1 und EC2 gegeneinander beweglich sind. Weiterhin ist aus Abbildung 6.16 ersichtlich, dass die Änderung des Interdomänenwinkels unabhängig davon ist, ob der Rezeptor im Komplex mit Fcα oder in ungebundenem Zustand vorliegt. Selbst die Moleküle A und C innerhalb der asymmetrischen Einheit der monoklinen Kristalle unterscheiden sich in ihrer Domänenorientierung beträchtlich (Leu36 C^α-Abstand = 3,6 Å.).

6.1.10 Vergleich zu strukturell verwandten Proteinen

Die Struktur des humanen Fcα Rezeptors zeigt eine relativ hohe Homologie zu den D1 und D2 Domänen des humanen *Killer cell inhibitory* Rezeptors (KIR) und des *Leukocyte Immunoglobulin-like* Rezeptors (LIR). Wie die Berechnung der *r.m.s.* Abweichung zeigt, (Tabelle 6.5) ist speziell die EC2 Domäne der D2 Domäne des KI Rezeptors, aber auch des LI Rezeptors sehr ähnlich.

Tabelle 6.5 Vergleich der *r.m.s.* Abweichung.

Berechnung der *r.m.s.* Abweichung in Bezug auf Molekül A der asymmetrischen Einheit der monoklinen Kristallform unter Angabe der berücksichtigten Anzahl an C^α-Atomen.

	Gesamtstruktur		Domäne EC1		Domäne EC2	
	<i>r.m.s.d.</i> (Å)	C ^α - Atome	<i>r.m.s.d.</i> (Å)	C ^α - Atome	<i>r.m.s.d.</i> (Å)	C ^α - Atome
<i>Killer cell inhibitory</i> Rezeptor (KIR)	1,66	134	1,85	71	1,22	95
Leukocyte Ig-like Rezeptor (LIR)	1,53	146	1,73	57	1,52	83
Fcγ Rezeptor IIb	1,52	75	1,75	64	1,47	73

Die *r.m.s.* Abweichungen liegen für diese Domänen im gleichen Bereich wie zwischen den verschiedenen Kristallstrukturen des FcαRI. Weiterhin ist die hydrophobe Interaktionsfläche zwischen den Domänen in beiden strukturell verwandten Rezeptoren in ähnlicher Form vorhanden. Ein Struktur basierter Sequenzvergleich zeigt, dass die 12 für die Ausprägung des Interdomänenwinkels verantwortlichen Reste weitgehend konserviert sind (Ding *et al.*, 2003).

Innerhalb der EC1 Domäne konnten jedoch größere strukturelle Unterschiede festgestellt werden, die vor allem im C-, C' und D-β-Strang zu finden sind (Abb. 6.17). Während im KI-Rezeptor der C' Strang wesentlich länger als im FcαRI ausgebildet ist, wird der entsprechende Bereich im LIR durch zwei 3¹⁰-Helices ersetzt. Trotz dieser grundlegenden Unterschiede führt die Überlagerung der Gesamtstruktur des LI Rezeptors und des Fcα-Rezeptors zu einem vergleichsweise niedrigen *r.m.s.d.*-Wert von 1,53 Å (berechnet über 146 C^α-Atome).

Die Faltungstopologie der einzelnen Immunglobulindomänen des Fcα Rezeptors ist auch zu anderen Fc-Rezeptoren verwandt. Als Beispiel wurde der Fcγ-Rezeptor IIb ausgewählt und ebenfalls der FcαRI-Struktur überlagert. Obwohl die Einzeldomänen weitgehende strukturelle Übereinstimmung zeigen, ist die Orientierung der beiden Domänen zueinander in diesem Fall entgegengesetzt (Abb. 6.17).

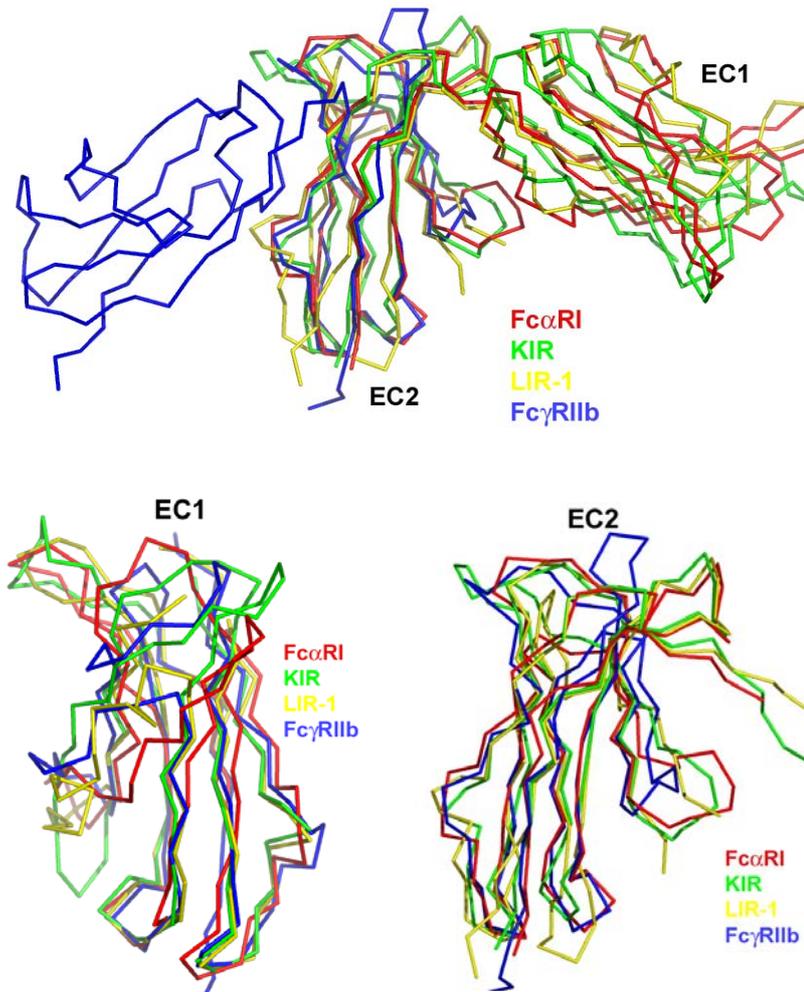


Abbildung 6.17 Überlagerung strukturverwandter Proteine.

Die obere Darstellung zeigt die Überlagerung der Gesamtstrukturen verschiedener FcαRI strukturverwandter Proteine. Im unteren Bildabschnitt wurde die Überlagerung auf die einzelnen Domänen beschränkt und so optimiert.

6.2 Die Kristallstruktur der Cysteinendoprotease IdeS

6.2.1 Expression und Reinigung IdeS und IdeS C94S

Die kodierende DNA für die Aminosäuren 38-339 (Nummerierung vom Anfang der Signalsequenz) der Cysteinendoprotease IdeS wurde mit einem N-terminalen His-Tag kloniert und in Rosetta [DE3] Zellen exprimiert. Im Folgenden wird dieses Konstrukt als IdeS_{His+} bezeichnet. Nach Induktion der Zellen mit 1 mM IPTG wurde die Expression auf einem 12%igem reduzierendem SDS-Polyacrylamidgel nach jeweils 1, 2, und 4 h analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass das ursprüngliche Gesamtfragment IdeS_{His+} mit einem Molekulargewicht von 36,35 kDa (Abb. 6.18, A) noch während der Expression proteolytisch verdaut wird. Die N-terminale Sequenzierung zeigte, dass das

Protein spezifisch an der Thrombin-Schnittstelle gespalten wurde. Da der His-Tag für die Aufreinigung des Proteins erforderlich war, wurden die Zellen bereits nach 1 h Expression abzentrifugiert und auf Eis aufgeschlossen.

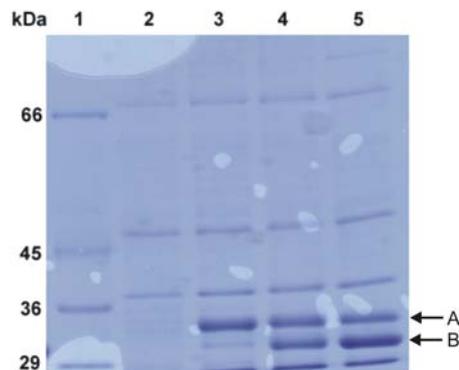


Abbildung 6.18 Expressionsgel IdeS_{His+}.

Die Expression von IdeS_{His+} wurde auf einem reduzierendem, Coomassie gefärbten 12% igesm SDS-Polyacrylamidgel analysiert. 1) Molekulargewichtsmarker, 2) Probe vor Induktion, 3) nach 1 h Induktion mit 1mM IPTG, 4) nach 2 h Induktion, 5) nach 4 h Induktion. A entspricht dem Protein mit intaktem His-Tag und B dem geschnittenen IdeS ohne His-Tag (IdeS_{His-}).

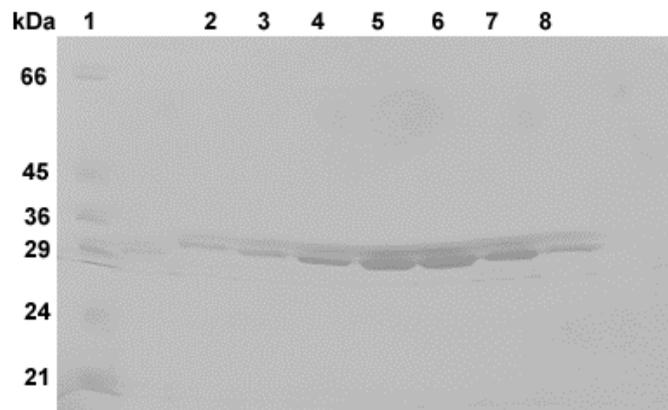


Abbildung 6.19 Reinigungsgel Nickel NTA Chromatographie.

Die Elutionsfraktionen wurden auf einem reduzierendem, Coomassie gefärbten 12% igen SDS-Polyacrylamidgel (Spur 2-8) aufgetragen und entsprechend vereinigt.

Da auch der Einsatz von Serinproteaseinhibitoren den proteolytischen Verdau nicht verhindern konnte, wurde nach der initialen Ni-NTA Reinigung (Abb. 6.19) mit dem geschnittenen Protein (IdeS_{His-}) weitergearbeitet. Dieses Fragment wurde mittels negativer Ni-NTA sowie einer abschließenden Gelfiltrations-Chromatographie aufgereinigt (Abb. 6.20).

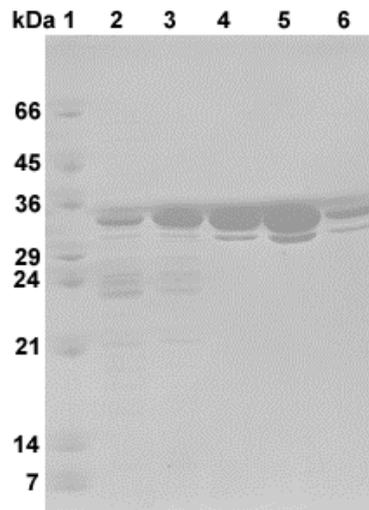


Abbildung 6.20 Reinigungsgel Gelfiltrations-Chromatographie IdeS_{His-}.

Auftragung der Elutionsfraktion der Gelfiltration auf einem reduzierendem, Coomassie gefärbten 12% igen SDS-Polyacrylamidgel: 1) Molekulargewichtsmarker 2–6) Elutionsfraktionen.

Die Aktivität des rekombinanten IdeS_{His-} konnte mittels Verdau des physiologischen Substrates Immunglobulin G nachgewiesen werden. Bereits nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das eingesetzte humane IgG vollständig in Fc und Fab₂ Fragment aufgespalten. Die entstandenen Fragmente wurden unter reduzierenden Bedingungen auf einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb 6.21).

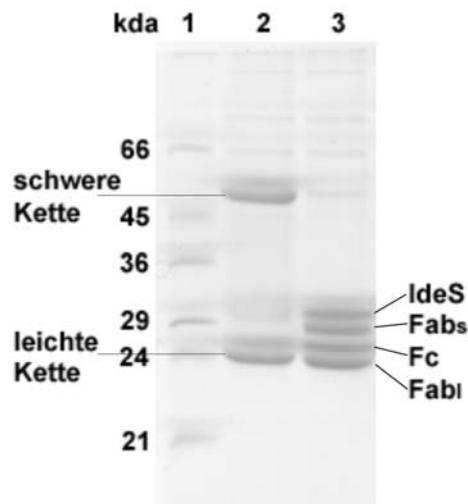


Abbildung 6.21 Aktivitätstest IdeS_{His-}.

Der proteolytische Verdau von humanem Immunglobulin G wurde mittels reduzierendem, Coomassie gefärbtem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel analysiert: 1) Molekulargewichtsmarker, 2) humanes IgG, 3) humanes IgG mit Ides_{His-} proteolytisch verdaut. Dabei steht Fabs für Fab der schweren Kette, Fabl für Fab Fragment der leichten Kette.

Bereits im SDS-Polyacrylamidgel der Gelfiltrations-Fractionen (Abb. 6.20) ist erkennbar, dass der proteolytische Verdau des IdeS_{His-} auch während der Aufreinigung weiter

fortschreitet. Zur Analyse der Abbauprodukte wurde ein ESI Massenspektrum des gereinigten Proteins aufgenommen.

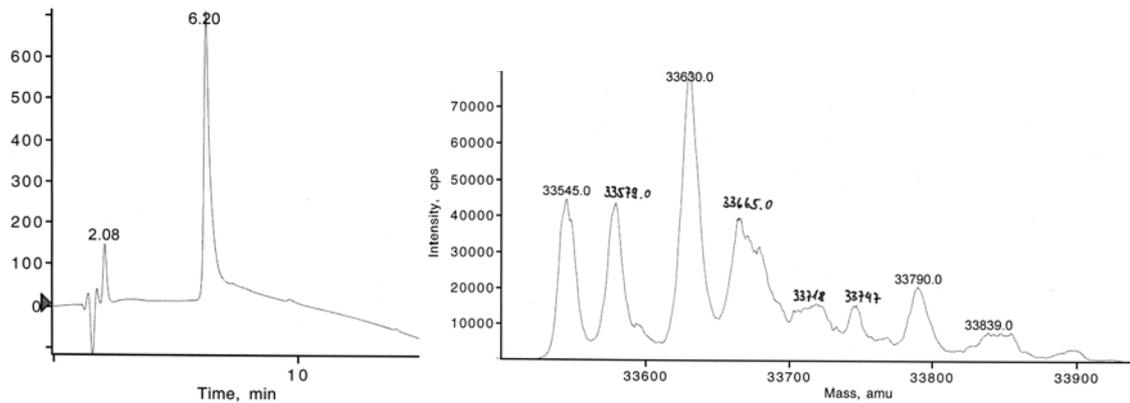


Abbildung 6.22 Massenspektrum von IdeS_{His-}.
HPLC-Elutionsdiagramm (links) und Dekonvolution des ESI-Massenspektrums (rechts) des gereinigten proteolytisch verdauten IdeS_{His-}.

Die Auswertung dieses Spektrums ergab, dass kein definiertes endgültiges Abbauprodukt entstanden war und somit kein für die Kristallisation sinnvoll verwendbares Protein erhalten wurde.

Des Weiteren wurde versucht das aktive Enzym mit dem spezifischen Peptidinhibitor Z-Leu-Val-Gly-CHN₂ zu inaktivieren und somit zu stabilisieren. Dazu wurde der in wasserfreiem DMSO gelöste Inhibitor in mehreren Schritten bis zu einem achtfachen Molaren Überschuss dem gereinigten und aufkonzentrierten (7 mg/ml) Protein zugegeben. Die Inhibierungsversuche wurden bei einem pH-Wert von 6,5 (2 mM Tris, 100 mM NaCl) im Dunkeln und bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss wurde die Aktivität des inhibierten Proteins mittels Verdau von humanem Immunglobulin G getestet. Dabei wurde festgestellt, dass keine vollständige Inhibierung erreicht werden konnte. Wie das HPLC-Elutionsdiagramm zeigt, lag nur etwa 50% des Proteins im Komplex mit dem Inhibitor vor (Abb. 6.22). Die beiden Peaks der HPLC-Reinigung wurden separat massenspektrometrisch bestimmt.

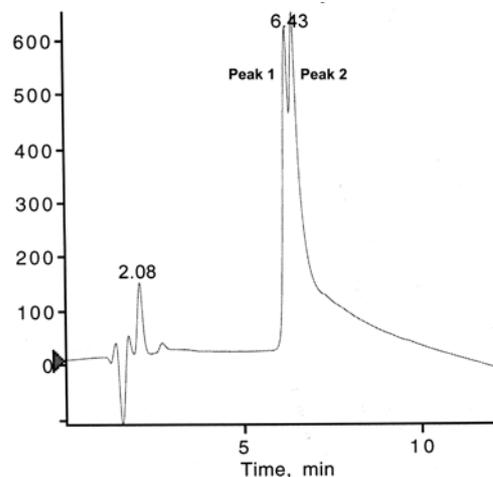


Abbildung 6.23 HPLC-Elutionsdiagramm des mit Z-LVG-CHN₂ inhibierten IdeS. Da keine vollständige Inhibierung erreicht werden konnte, erscheinen zwei Elutionspeaks im Elutionsdiagramm der HPLC.

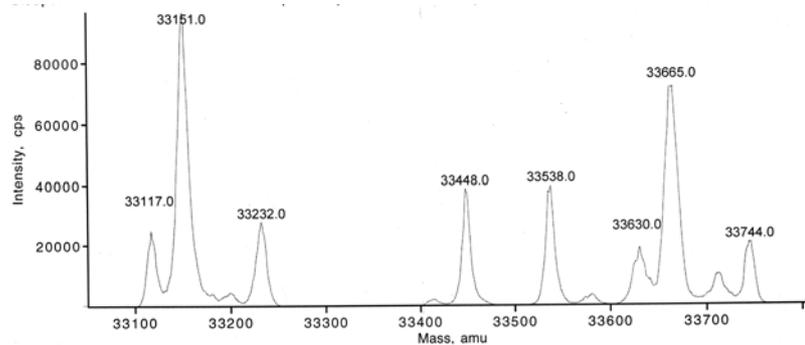


Abbildung 6.24 Dekonvolution des ESI Massenspektrums von Peak 1 des HPLC-Laufs.

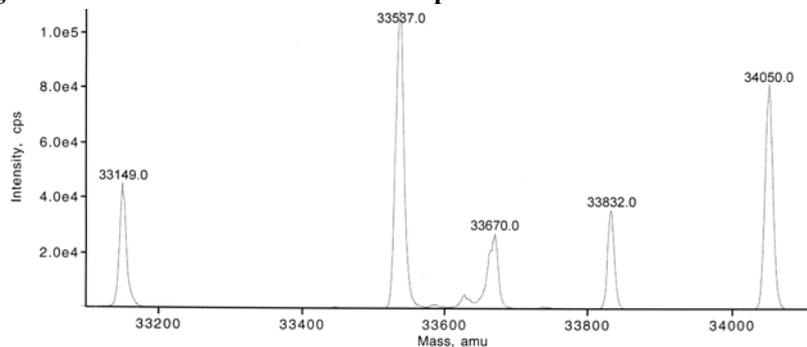


Abbildung 6.25 Dekonvolution des ESI Massenspektrums von Peak 2 des HPLC-Laufs.

Die Vielzahl an auftretenden Peaks im ESI Massenspektrum zeigt, dass auch die partielle Inhibierung der Protease mit dem spezifischen Inhibitor Z-LVG-CHN₂ zu keinem stabilen Protein führte. Eine Zuordnung der einzelnen Peaks des Massenspektrums konnte durch die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten, aufgrund des N und C-terminal erfolgenden Abbaus nicht vorgenommen werden. Trotz der Instabilität der Termini wurden mit dem partiell inhibierten Protein Kristallisationsexperimente durchgeführt, die jedoch keine messbaren Proteinkristalle lieferten.

Deshalb wurde das vermeintlich für die Aktivität verantwortliche Cystein 94 des aktiven Zentrums zu Serin mutiert und somit die Cysteinendoprotease IdeS inaktiviert. Die Mutante IdeS C94S wurde ebenfalls in pET28b kloniert und in Rosetta [DE3] Zellen überexprimiert (Abb. 6.26). Das Proteinkonstrukt wurde während der Expression nicht proteolytisch verdaut und blieb auch bei den folgenden Reinigungsschritten, Ni-NTA und Gelfiltrations-Chromatographie stabil. Die finale Ausbeute an für die Kristallisation ausreichend gereinigtem Protein betrug etwa 40 mg je Liter Expressionskultur. Für Kristallisationsversuche wurde das Protein in einen Puffer aus 5 mM MOPS, 100 mM NaCl pH 8,0 und 0,02% Natriumazid überführt.

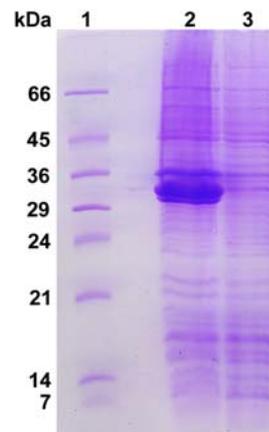


Abbildung 6.26 Expressionsgel IdeS C94S. Reduzierendes, mit Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der IdeS C94S Expression 1) Molekulargewichtsmarker, 2) Expression nach 4 h Induktion mit 1 mM IPTG, 3) Probe vor Induktion.

Selenomethionin enthaltendes IdeS C94S für die experimentelle Phasenbestimmung mittels MAD, wurde analog zum nicht-substituierten Protein in *E. coli* B834 Zellen in Minimal-Medium exprimiert und gereinigt. Der quantitative Einbau des Selens wurde mittels ESI Massenspektrometrie überprüft (Abb 6.27).

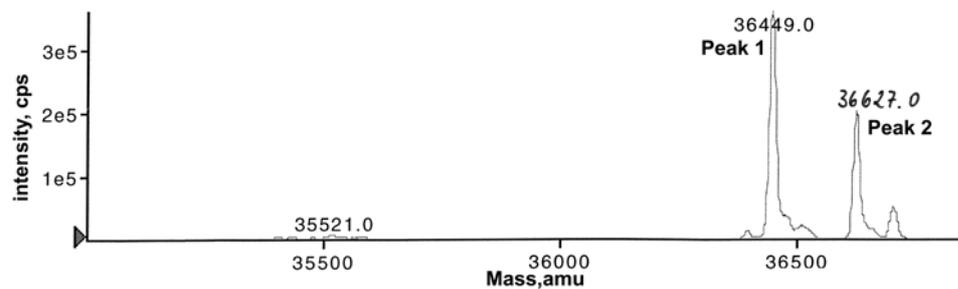


Abbildung 6.27 Dekonvolution des ESI Massenspektrums von IdeS C94S.

Aus der erhaltenen Masse konnte berechnet werden, dass alle Methionine durch Selenomethionin ausgetauscht wurden (Peak 1) jedoch bei einem Teil des Proteins das Startmethionin fehlt (Peak 2).

6.2.2 NMR-Bindungsstudien

Um festzustellen, ob IdeS C94S trotz der Mutation im aktiven Zentrum noch in der Lage ist mit dem Fc-Fragment des humanen Immunglobulin G zu interagieren, wurden NMR-Bindungsstudien durchgeführt. Dazu wurde das ^{15}N markierte Protein mit einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Nach der Aufnahme eines 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC Referenzspektrums wurde im Molaren Verhältnis von 2:1, 1:1 und 1:2 das mittels Papainverdau hergestellte Fc-Fragment zugegeben und unter exakt gleichen Bedingungen nach jeder weiteren Zugabe ein Spektrum gemessen. Nach der Überlagerung der 2D Spektren wurde die Position und Stärke der Peaks verglichen. Bei einem äquimolarem

Verhältnis von IdeS C94S zu Fc IgG konnten insgesamt 23 Veränderungen im Spektrum beobachtet werden (Abb. 6.28). Das gleiche Experiment wurde unter Zugabe von BSA (*bovine serum albumin*) als Negativkontrolle durchgeführt (Abb. siehe Anhang).

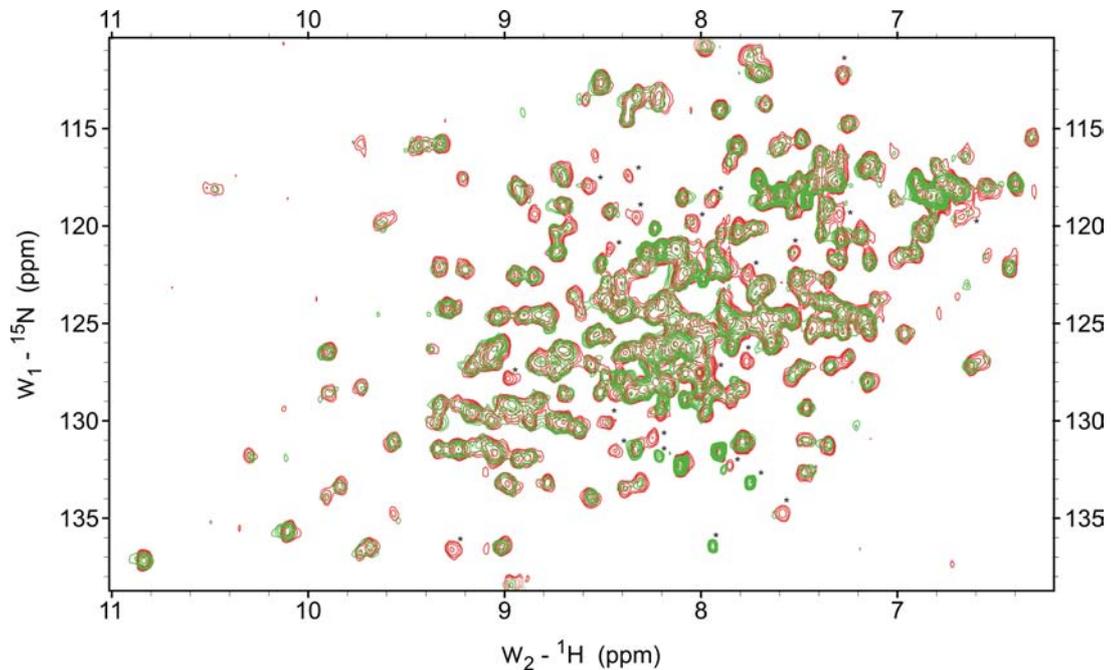


Abbildung 6.28 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von IdeS C94.

In rot ist das 2D $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ Referenzspektrum des 15 N markierten IdeS C94S (0,5 mM) dargestellt. Ein weiteres Spektrum wurde nach der Zugabe von Fc IgG (Papain verdaut) im Molaren Verhältnis von 1:1 aufgenommen und dem Referenzspektrum überlagert (grün). Die beobachteten chemischen Verschiebungen sind mit Sternen gekennzeichnet.

Weitere Titrations erfolgten analog mit dem IdeS verdauten Fc IgG sowie mit dem, aus dem *Hinge*-Bereich abgeleiteten Heptapeptid γ -short (Aminosäuresequenz: ELLGGPS). Nach Überlagerung der entsprechenden 2 D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren wurde die Art und Anzahl der beobachteten Veränderungen bei Zugabe der verschiedenen Substrate im Molaren Verhältnis von 1:1 verglichen (Tabelle 6.6).

Tabelle 6.6 Auswertung der 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC Spektren.

Vergleich der Anzahl der chemischen Verschiebungen (chem. V.) nach Substratzugabe in äquimolarem Verhältnis bzw. im vierfachen Überschuss im Falle des γ -short Peptides.

IdeS C94S +	Anzahl Gesamt- Verschiebungen	γ -short		FcIgG Papain verdaut	
		Gemeinsame chem. V.	Zusätzliche chem. V.	Gemeinsam chem. V.	Zusätzlich chem. V.
FcIgG (Papain)	23	9	14	-	-
FcIgG (IdeS)	22	9	13	19	3
γ -short	16	-	-	9	7
BSA	9	6	3	7	2

Da bei einem vierfachen Molaren Überschuss des γ -short Peptides noch zusätzliche Änderungen auftraten, wurde dieses Spektrum zur Auswertung herangezogen. Sämtliche für die Auswertung benötigten 2D -Spektrenüberlagerungen sind im Anhang zu finden.

6.2.3 Kristallisation und Datenaufnahme

Die C94S Mutante der IdeS Protease konnte mittels Dampfdiffusionsverfahren nach der Methode des *sitting drop* kristallisiert werden. Dazu wurden 1,5 μ l Proteinlösung mit einer Konzentration von 7 mg/ml mit 1,5 μ l Präzipitanzlösung (23% Polyethylenglykol 2000 Monomethylether, 100 mM Natriumazetat pH 4,5, 250 mM Ammoniumsulfat) gemischt und bei 20°C gegen 400 μ l Reservoirlösung äquilibriert. Über Nacht bildeten sich Kristalle in Form von sehr dünnen Platten aus die innerhalb von 2 Tagen ihre maximale Größe von $1,0 \times 0,3 \times 0,02$ mm erreichten. Unter den gleichen Bedingungen wie das nicht substituierte Protein kristallisierte auch das Selenomethionin enthaltende Protein in vergleichbarer Größe.

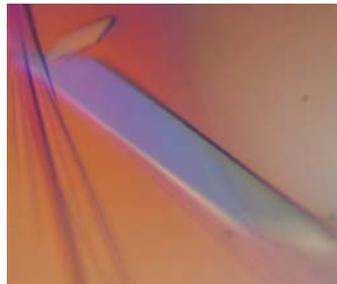


Abbildung 6.29 Kristalle des IdeS C94S.

Die Kristalle konnten nach kurzzeitigem Einlegen in Kryoprotektans (Reservoirlösung mit 5% D (-)-2,3 Butandiol) in flüssigem Stickstoff bzw. im Stickstoffgasstrom schockgefroren werden. Um die Raumgruppe sowie die Zellkonstanten zu bestimmen wurde ein Datensatz eines bei 100 K eingefrorenen Kristalls an der hausinternen Röntgenquelle aufgenommen. Die Auswertung der Daten ergab ein orthorhombisches Kristallgitter der Raumgruppe $P2_12_12$ mit den Zellkonstanten $a = 63,37$, $b = 86,83$, $c = 57,66$ Å ($\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$). Mit einem Molekül IdeS (36,2 kDa) pro asymmetrischer Einheit betrug das Verhältnis von Zellvolumen zum Molekulargewicht $2,27$ Å³/Da woraus sich ein Solvensgehalt von 45,5% ergibt (Matthews, 1968).

Zur Strukturlösung wurde die Methode der *Multiwavelength Anomalous Dispersion* mit Selen als anomalen Streuer angewandt. Die Datenaufnahme eines kompletten MAD Experiments erfolgte bei 100 K an der Wiggler *Beamline* BW6 am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY, HASYLAB, Hamburg). Die entsprechenden Wellenlängen (Maximum f'' : $\lambda_1 = 0,9791$ Å, *Remote point*: $\lambda_2 = 0,95$ Å, Minimum f' : $\lambda_3 = 0,97935$ Å) wurden mittels Röntgenfluoreszenzspektrum in der Nähe der Se-K Absorptionskante bestimmt.

Die drei MAD Datensätze wurden an einem einzigen mit Selenomethionin substituierten Kristall aufgenommen. Zusätzlich wurde ein nativer Datensatz eines nichtsubstituierten Kristalls bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1,05 \text{ \AA}$ gemessen. Alle aufgenommenen Datensätze wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK ausgewertet. Eine ausführliche Zusammenstellung der kristallographischen Statistiken gibt Tabelle 6.7.

Tabelle 6.7 Statistik der Datenaufnahme.

Die Angaben in Klammern entsprechen den Werten in der letzten Auflösungsschale 2-1,93 Å.

	IdeS-C94S, Se-Met markiert			IdeS-C94S
Wellenlänge (Å)	$\lambda_1 = 0.97910$	$\lambda_2 = 0.95$	$\lambda_3 = 0.97935$	1.05
Auflösung(Å)	20 - 1.9	20 - 1.9	20 - 1.9	20 - 1.9
Anzahl an Reflexen :				
gesamt	210,883	146,498	139,042	186,153
unabhängig	46,131	44,826	44,731	24,440
<i>Vollständigkeit</i> (%)	99.7 (98.6)	96.6 (84.7)	96.7 (82.9)	99.3 (99.4)
Mosaizität (°)	0,94	1,06	1,09	0,5
R_{sym}^1	6.0 (28.8)	5.6 (31.6)	5.8 (30.7)	6.3 (26.6)
$I/\sigma(I)$	24.5 (4.1)	19.2 (2.7)	17.7 (2.6)	28.4 (6.3)
Wilson B (Å ²)	21.67	22.08	21.59	18.58

$$^1R_{\text{sym}} = \sum h \sum i |I(\mathbf{h}) - \langle I(\mathbf{h}) \rangle| / \sum h \sum i I(\mathbf{h})$$

6.2.4 Phasierung, Modellbau und Verfeinerung

Von den fünf theoretisch vorhandenen Selen-Lagen (ohne Startmethionin) der asymmetrischen Einheit konnten vier mit dem Programmen SHELXD und SHARP lokalisiert und verfeinert werden. Nach Optimierung der experimentellen Phasen mittels *solvent flattening* wurde eine *figure of merit* von 0,951 erreicht. Eine umfassende Phasierungsstatistik ist in Tabelle 6.8 gegeben.

Die aus der Phasierung mit diesen vier Selenpositionen resultierende Elektronendichte war sehr gut definiert, so dass 280 der 323 Aminosäuren automatisch in vier einzelnen Ketten und partiell mit Seitenketten eingebaut werden konnten. Dieses initiale Modell wurde in mehreren Zyklen von Verfeinerung und manuellem Überbauen mit dem Programm O (Jones, *et al.*, 1991) erweitert und verbessert. Die kristallographische Verfeinerung sowie die Berechnung der 2 Fo-Fc und Fo-Fc -Elektronendichten erfolgte dabei unter Verwendung des qualitativ besten, nativen Datensatzes mit dem Programm CNS. Version 1.1 (Brünger *et al.*, 1998) und beinhaltete ein *annealing* sowie eine Verfeinerung der Atompositionen und B-Faktoren. Nach dem Einbau der 206 Wassermoleküle und einer Sulfation betrug der endgültige R-Faktor 19,56% (freier R-Faktor = 23,47%). Trotz der guten Datenqualität sind 31 N-terminale Reste, darunter der His-Tag des Proteinkonstrukts nicht in der Elektronendichte sichtbar.

Tabelle 6.8 MAD-Phasierungsstatistik.

Die angegebenen Werte wurden mit dem Programm SHARP berechnet.

Wellenlänge (Å)	f'' -Maximum (λ_1)	Remote Point (λ_2)	f'' -Minimum (λ_3)
<i>Phasing Power</i> ¹			
isomorph	0.861	-	1.019
anomal	2.185	0.851	1.190
FOM (<i>Figure of merit</i>)	0.599		
nach <i>solvent flattening</i>	0.915		
R_{cullis}			
isomorph	0.738	-	0.645
anomal	0.587	0.851	0.854

¹ Phasing Power = ($|F_H|/E$), F_H ist die Strukturfaktoramplitude der Schweratomstruktur und E ist der *residual lack of closure*.

Um die Geometrie der 291 Reste des endgültigen Strukturmodells zu überprüfen, wurde mit dem Programm PROCHECK ein Ramachandran-Plot erstellt.

Tabelle 6.9 Verfeinerungsstatistik des Strukturmodells.

Verfeinerung	
Auflösung (Å)	19.86 – 1.93
Anzahl Reflexe	24,409
Overall B	24,3
$R_{\text{cryst}}^1 / R_{\text{free}}^2$ (%)	19.56 / 23.47
<i>r.m.s.d.</i> von Idealwerten:	
Bindungslängen (Å)	0.0086
Bindungswinkel (°)	1.37
Anzahl an:	
Proteinatomen	2280
Wasser	206
Sulfat	1
Ramachandran Plot Auswertung (%):	
energetisch bevorzugter Bereich	88,84
energetisch erlaubter Bereich	9,96
energetisch möglicher Bereich	1,2
energetisch verbotener Bereich	0

¹ $R = \sum |F_{oh} - F_{ch}| / \sum F_{oh}$, wobei F_{oh} den gemessenen und F_{ch} den berechneten Strukturfaktoramplituden der Reflexe h entspricht.

² der R_{free} wurde für 8% der Reflexe bestimmt

Die Struktur des IdeS C94S wurde unter der Bezeichnung 1Y08 in der RCSB Protein-Strukturdatenbank hinterlegt.

6.2.5 Strukturbeschreibung

Die Kristallstruktur der proteolytisch inaktiven Mutante C94S der Cysteinendoprotease IdeS aus *Streptococcus pyogenes* beinhaltet die Reste 49 – 339 (Nummerierung vom Anfang des Signalpeptides). Dabei sind die Reste 1-38 des N-Terminus bereits nicht im Proteinkonstrukt enthalten, da diese das Signalpeptid darstellen. Die übrigen 11 Aminosäuren sowie der zusätzliche N-terminale His-tag sind nicht in der Elektronendichte sichtbar, was auf eine hohe Flexibilität in dieser Region schliessen lässt.

Die Struktur des IdeS C94S besitzt eine gemischte α/β Faltung mit insgesamt 12 β -Faltblattsträngen und sechs α -Helices (Abb. 6.30). Dabei faltet sich die Polypeptidkette in zwei verschiedene Domänen, die miteinander über eine weitreichende polare Interaktionsfläche in Wechselwirkung stehen. Die markante Spalte zwischen den beiden Domänen kennzeichnet das aktive Zentrum und wird als *active site cleft* bezeichnet (im oberen Teil des Moleküls in Abb. 6.30). Diese Faltungstopologie ist für die Familie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen charakteristisch und die beiden Domänen werden deshalb in Anlehnung an die Papain-Nomenklatur als L bzw. R Domäne bezeichnet. Die linksseitige L-Domäne besteht dabei im wesentlichen aus der aminoterminalen Hälfte des Proteins bis zu Aminosäure Leucin 220. Eine Ausnahme stellen die Anfangsreste 49-85 dar, die in der R-Domäne liegen und zwei im Vergleich zur Papainstruktur zusätzliche β -Stränge (β_2 und β_3) sowie einen großen *loop* ausbilden. Weiterhin überqueren die 10 C-terminalen Reste nochmals die Domänengrenze und gehören somit wiederum zur L-Domäne. Alle übrigen Aminosäuren der C-terminalen Proteinhälfte gehören der R-Domäne an.

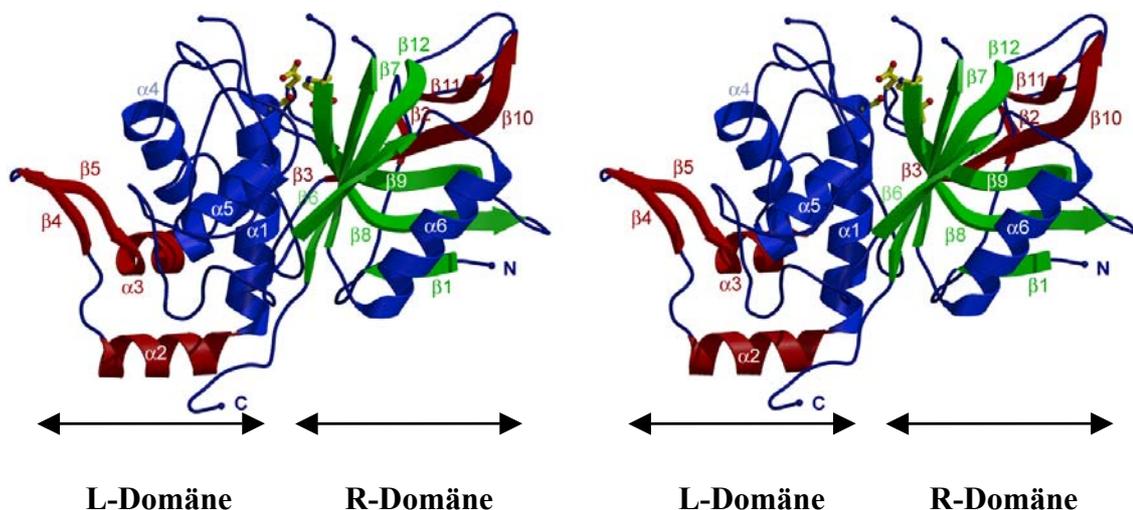


Abbildung 6.30 Stereoabbildung der IdeS C94S Struktur.

In Bezug auf Papain zusätzliche Sekundärstrukturelemente sind rot, übereinstimmende α -Helices blau und β -Stränge grün gezeichnet. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind in *ball & stick* Form dargestellt.

Trotz der fehlenden Sequenzidentität zu strukturell bekannten Proteinen (Abb. 6.31), zeigt auch die Anordnung der Sekundärstrukturelemente innerhalb der beiden Domänen Ähnlichkeiten zu Proteasen des CA Stammes. Das zentrale Element der R-Domäne ist das typische, in sich stark verdrehte, antiparallele β -Faltblatt, welches sich aus 5 β -Strängen ($\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 8$, $\beta 9$ und $\beta 12$) zusammensetzt und von Helix $\alpha 6$ begrenzt wird. Hingegen wird die L-Domäne hauptsächlich aus den drei für Cysteinproteasen der Papainfamilie markanten Helices $\alpha 1$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ aufgebaut. Im Vergleich zu Papain zusätzliche Sekundärstrukturelemente der IdeS Struktur sind, neben den oben erwähnten $\beta 2$ und $\beta 3$, die β -Stränge 10 und 11 innerhalb der R-Domäne, sowie die Helices $\alpha 2$ und $\alpha 3$ und die Faltblattstränge $\beta 4$ und $\beta 5$ der L-Domäne.

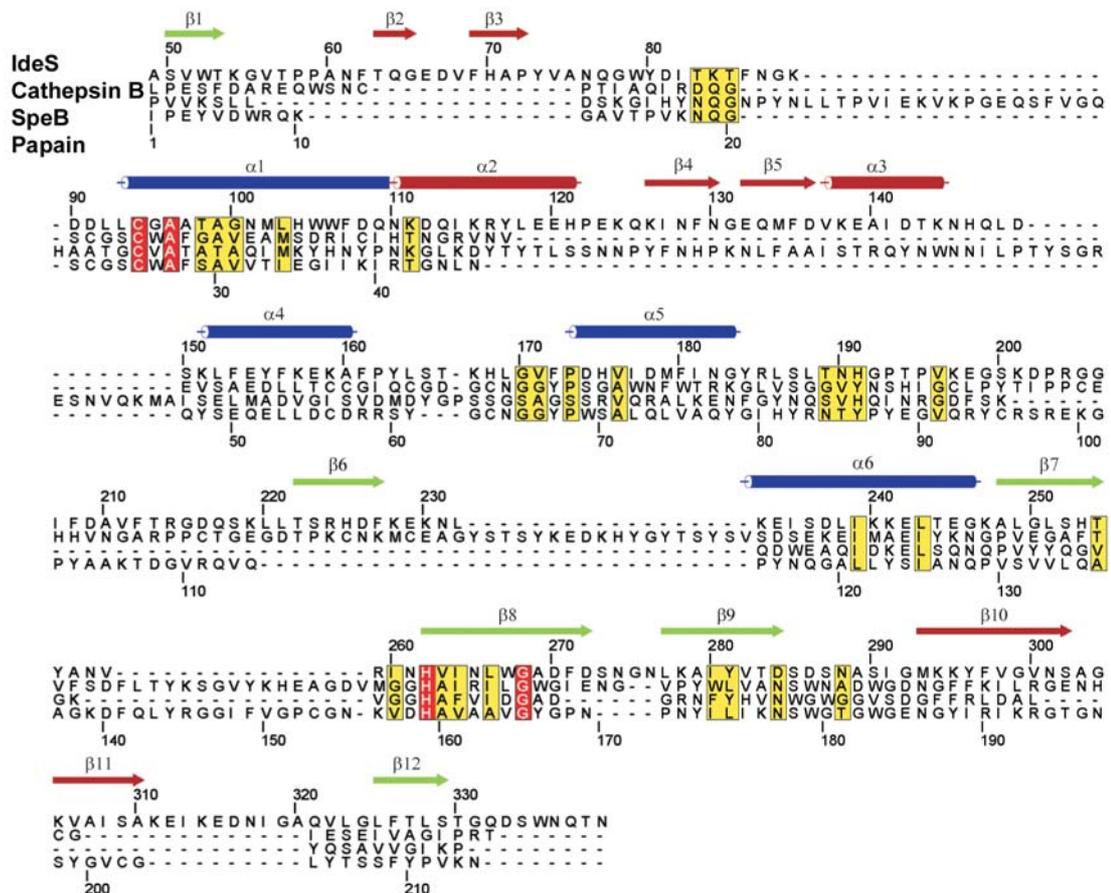


Abbildung 6.31 Strukturbasierter Aminosäure-Sequenzvergleich.

Sequenzvergleich von IdeS C94S mit den strukturell homologen Proteinen Cathepsin B, SpeB und Papain. Die Nummerierung sowie die eingezeichneten Sekundärstrukturelemente beziehen sich auf die IdeS Aminosäuresequenz und sind entsprechend Abb. 6.30 gefärbt. Rot hinterlegte Reste sind in allen vier Strukturen identisch und gelb hinterlegte chemisch ähnlich.

Die Suche nach strukturell homologen Proteinen mit dem DALI -Suchalgorithmus (Holm & Sanders, 1993) ergab, dass die IdeS Struktur der Cysteinprotease Cathepsin B am ähnlichsten ist. Eine optimale Überlagerung der beiden Proteine mit dem Programm LSQMAN zeigt, dass die C^α -Atome der 127 topologisch äquivalenten Aminosäuren einen niedrigen *r.m.s.d.*-Wert von 1,88 Å aufweisen. Dabei haben die wesentlichen

Sekundärstrukturelemente, welche bereits anhand der Papainstruktur beschrieben wurden, die gleiche Position und Orientierung. Trotz dieser insgesamt betrachtet homologen Faltungstopologie variieren die verbindenden Elemente zwischen den Sekundärstrukturen erheblich. Hierbei ist die IdeS Struktur gegenüber anderen Papain-ähnlichen Cysteinproteasen und auch gegenüber Cathepsin B bedeutend größer (339 Aminosäuren verglichen mit 254 in Cathepsin B und 212 in Papain). Dieser Größenunterschied wird hauptsächlich durch Insertionen zwischen den konservierten Strukturelementen erreicht. Anders als Papain und Cathepsin B wird IdeS ohne Propeptid synthetisiert und bildet keine Disulfidbrücken aus. Weiterhin besitzt die Cysteinendoprotease IdeS das für die Interaktion mit Integrinen wichtige RGD-Strukturmotiv, welches sich in dem $\beta 4/\beta 5$ verknüpfenden *loop* (Rest 214-216) befindet.

6.2.6 Das aktive Zentrum

Die für Cysteinproteasen typische katalytische Triade besteht beim IdeS aus den Resten Histidin 262, Aspartat 284 und dem in der Kristallstruktur zu Serin mutiertem Cystein 94. Die Überlagerung der Gesamtstrukturen von Papain, Cathepsin B und IdeS zeigt, dass die Reste C94S und H262 genau auf den Cystein (C25 Papain, C29 Cathepsin) und Histidin Resten (H159 Papain, H199 Cathepsin B) der katalytischen Triaden zu liegen kommen. Das aktive Zentrum der IdeS Endopeptidase ähnelt somit dem der Papainfamilie (C1A) der Cysteinproteasen. Demnach befindet sich, wie auch in Papain und Cathepsin B das katalytisch aktive Cystein C94S am N-terminalen Ende der Helix $\alpha 1$ in der Interaktionsfläche zwischen der L und R-Domäne (Abb. 6.30).

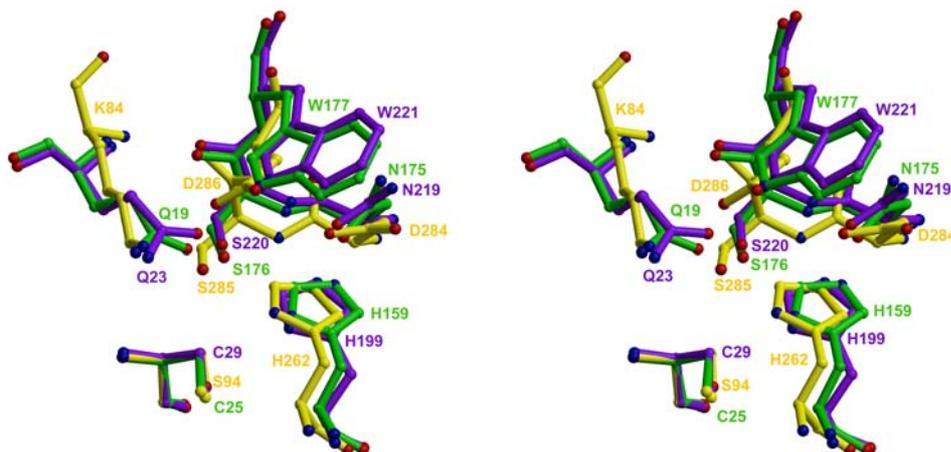


Abbildung 6.32 Stereoabbildung der Überlagerung des aktiven Zentrums.

Gezeigt ist die Überlagerung der aktiven Zentren von IdeS C94S (gelb), Papain (grün, PDB Eintrag 1POP) und Cathepsin B (violett, PDB Eintrag 1CSB). Diese Überlagerung wurde basierend auf dem Cystein Rest des aktiven Zentrums C94S der IdeS Struktur erstellt.

Zum besseren Vergleich der aktiven Zentren wurden die drei Strukturen unter optimaler Anpassung der Reste C94S, C25 (Papain) und C29 (Cathepsin B) überlagert (Abb. 6.32). Daraus geht hervor, dass die für die korrekte Orientierung des Histidin Imidazoliumrings

verantwortliche Aminosäure das Aspartat 284 ist und nicht wie in Papain (N175) und Cathepsin B (N219) ein Asparagin. Weiterhin zeigt die Überlagerung, dass der Rest Lysin 84 auf den Resten Q19 in Papain und Q23 in Cathepsin B zu liegen kommt. Diese Glutamine bilden zusammen mit dem Amid-Stickstoff des katalytischen Cysteins die so genannte Oxyaniontasche aus (Drenth *et al.*, 1976; Menard *et al.*, 1991, Schroder *et al.*, 1993), welche typischer Weise die Peptidhauptketten-Carbonylgruppe des Substratrestes P1 bindet. Die Konformation des in IdeS an dieser Position vorliegenden Lysins (K84) wird durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücken-Bindung zum Aspartat 286 stabilisiert. Ein weiteres Merkmal der Papain-Proteasfamilie C1A ist die Abschirmung des katalytischen Asparagin-Restes durch ein direkt benachbartes Tryptophan (W177 Papain, W221 Cathepsin B). Aus Abbildung 6.32 geht hervor, dass bei der IdeS Struktur dieses Tryptophan durch einen weiteren Aspartat-Rest (D286) ausgetauscht ist, was zu einer stark ausgeprägten negativen Ladung in der direkten Umgebung des aktiven Zentrums führt.

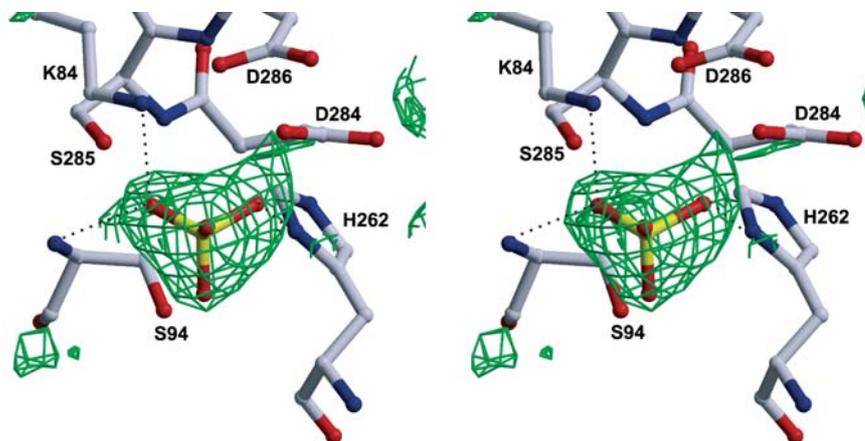


Abbildung 6.33 Katalytisches Zentrum des IdeS C94S.

Ball & stick Stereomodell der katalytischen Triade der C94S IdeS Mutante mit der initialen, bei 2,5 σ konturierten Fo-Fc Elektronendichtekarte und eingebautem Sulfation.

In der Kristallstruktur der IdeS C94S Mutante ist im Bereich des aktiven Zentrums zusätzliche Elektronendichte erkennbar (Abb. 6.33), die als Sulfation aus dem Kristallisationsmedium interpretiert wurde. Dieses über drei Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren S94, H262, K84 koordinierte Sulfation maskiert die Oxyaniontasche.

6.2.7 Die Architektur der Substratbindungstaschen

Das einzige bisher nachgewiesene Substrat der IdeS Protease ist Immunglobulin G (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2003). Die Spaltung erfolgt in der Scharnier- oder *Hinge*-Region des Antikörpers zwischen den Aminosäuren Glycin 236 und Glycin 237. Aus den Aminosäuresequenzen der *Hinge*-Region verschiedener Immunglobulin G Subklassen läßt sich, anhand des Ergebnisses des Proteaseverdaus, das Spaltmotiv ableiten. Demnach ist bei humanem IgG1, IgG3 und IgG4 das für Cysteinproteasen der Papainfamilie ungewöhnliche Motiv Leu-Leu-Gly in den P3, P2 und P1 Positionen zu finden. Zusätzlich

wird das Pro-Val-Ala Motiv des humanen IgG2 als Spaltsequenz akzeptiert (Vincent *et al.*, 2004).

Zur Analyse der Substratspezifitätstaschen S3 bis S2' wurden Strukturen der homologen Proteine im Komplex mit Peptidinhibitoren der IdeS Struktur überlagert. Dazu wurden die Kristallstrukturen von Cathepsin B in Komplex mit CA030 (PDB Eintrag: 1CSB) und Papain mit E64 (PDB Eintrag: 1PE6) herangezogen. Um die Bindung detailliert beschreiben zu können, wurde basierend auf diesen Überlagerungen das aus dem IgG1 Spaltmotiv abgeleitete Tetrapeptid Leu-Gly-Gly-Pro in die *active site cleft* der IdeS C94S Struktur eingepasst. Das vorgeschlagene Modell nach Energieminimierung der Geometrie des Tetrapeptids ist in Abbildung 6.34 dargestellt.

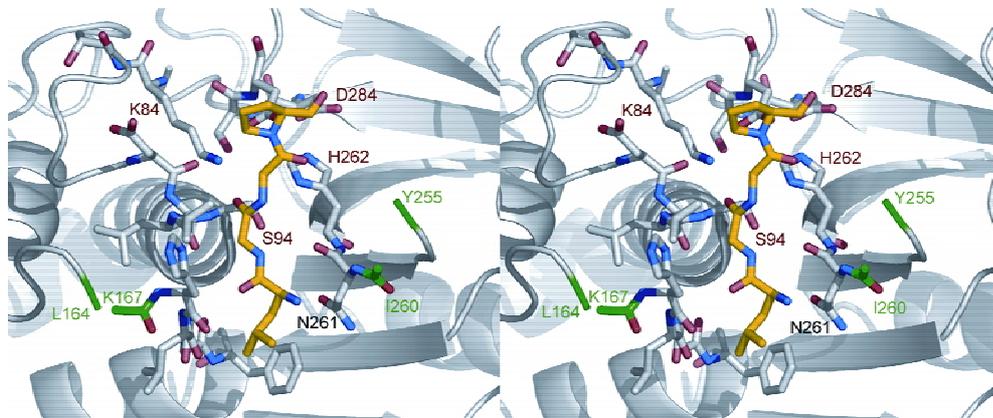


Abbildung 6.34 Aktives Zentrum mit Tetrapeptid (LGGP).

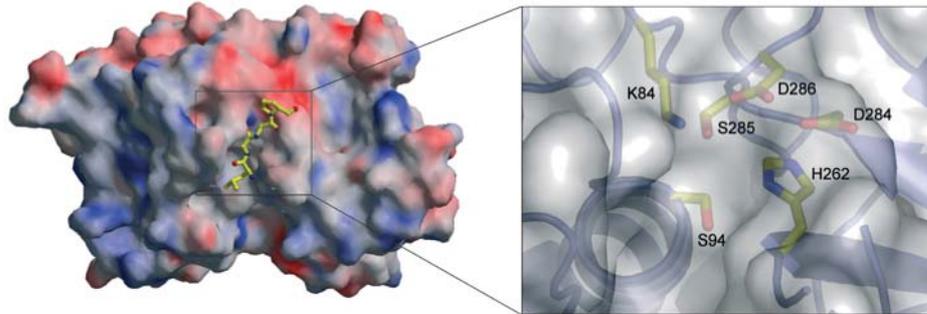
Stereoabbildung der *active site cleft* (grau) zusammen mit dem von der Spaltsequenz abgeleiteten Tetrapeptid (Kohlenstoff: gelb, Stickstoff: blau, Sauerstoff: rot). Die ersten und letzten in der Elektronendichte sichtbaren Aminosäuren der flexiblen *loops* des IdeS (L164, K167, Y255 und I260) sind grün gekennzeichnet.

Wie aus dem Modell ersichtlich, liegt die spaltbare Peptidbindung in direkter Nähe zur Thiolgruppe des katalytischen Cysteins 94. Daraus lässt sich folgern, dass das *Hinge*-Peptid des IgG in gleicher Art und Weise prozessiert wird, wie die Substrate des Papains. Der Carbonyl-Sauerstoff des P1-Restes Glycin 236, ist in der Oxyanionentasche gebunden, in dem es mit dem Stickstoff der Lys 84 Seitenkette sowie mit dem Amid der Peptidbindung Wasserstoffbrücken ausbildet. Dadurch zeigt das Amid-Stickstoff des P1' Restes in Richtung des ND1 der Imidazolgruppe des Histidin 262. Im Weiteren kann Glycin 236 durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit dem Rest Asn 261 stabilisiert werden. Eine mögliche Seitenkette dieses P1-Restes würde in die S1-Enzymspezifitätstasche reichen, die jedoch durch die Seitenketten der Reste Leu 92 und His168 blockiert ist. Dadurch ist diese Tasche sehr eng und nur für kleine Reste wie z.B. Alanin oder Glycin geeignet. Im Gegensatz dazu ist die S1-Bindungstasche in Papain wesentlich weiter (Abb. 6.35) und damit unspezifischer.

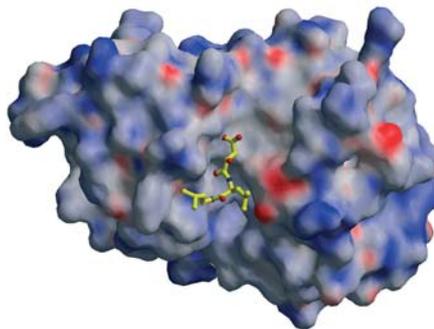
Ebenso wie die meisten Proteasen der Papainfamilie bevorzugt IdeS als P2 Substratrest hydrophobe Aminosäuren, aber durch die Seitenketten der Reste Asn 261 und Phe172 ist auch diese Substratspezifitätstasche kleiner ausgebildet und lässt somit im Gegensatz zu

Papain keine Bindung von aromatischen Aminosäuren zu. Eine exakte Beschreibung der S3 Substratbindetasche ist aufgrund der in der Elektronendichte nicht sichtbaren flexiblen *loops* zwischen Helix $\alpha 4$ und $\alpha 5$ nicht möglich. Zur Veranschaulichung der weitreichenden Unterschiede hinsichtlich Ausprägung und Ladung der Substratbindungstaschen zeigt Abbildung 6.35 einen Vergleich der *active site cleft* von Papain und IdeS.

A



B



C

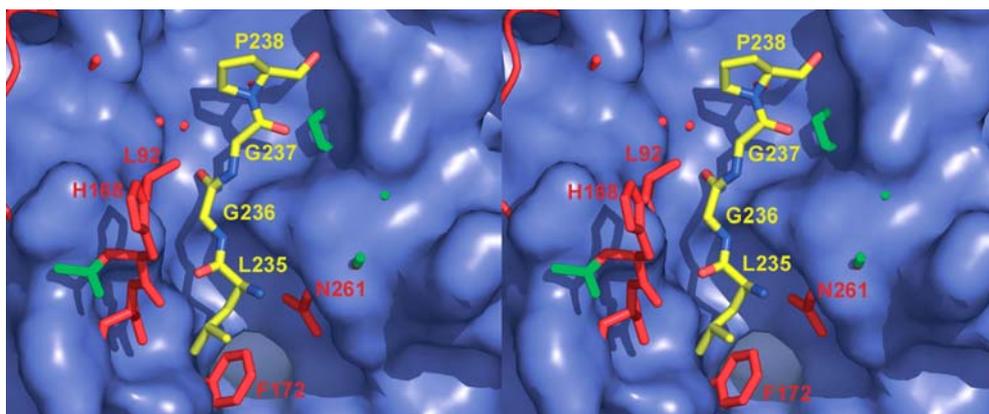


Abbildung 6.35 Vergleich der Substratbindungstaschen von IdeS C94S und Papain.

A) Darstellung der IdeS C94S Oberfläche eingefärbt nach dem elektrostatischen Potential (rot: negative, blau: positive Ladung) zusammen mit dem modellierten Tetrapeptid LGGP. B) Ebenso eingefärbte Oberfläche des Papains mit dem Inhibitor E64. C) Überlagerung der Papain Oberfläche (blau) mit einem *ball & stick* Modell von IdeS C94S (rot und grün) und dem modellierten Tetrapeptid (gelb). Speziell die S1' und S2' Spezifitätstaschen der *active site cleft* sind bei der IdeS Protease wesentlich enger als bei Papain gestaltet.

7 Diskussion

7.1 Die extrazelluläre Domäne des humanen Fc α Rezeptors I

Durch die Schlüsselfunktion der humanen Fc-Rezeptoren, die humorale Immunantwort mit den zellulären Effektorfunktionen zu verknüpfen, gibt es ein starkes medizinisches Interesse an diesen Proteinen. Während für Immunglobulin G eine Reihe unterschiedlicher Fc-Rezeptoren existiert, die zum Teil auch eine inhibierende Effektorfunktion hervorrufen, ist Immunglobulin A in der Lage, sehr effektiv ausschließlich zytotoxische Effektorzellen über die Interaktion mit dem Fc α Rezeptors I (CD89) zu aktivieren. Aufgrund dieser Eigenschaft kommt dem Fc α RI eine besondere pharmazeutische Relevanz zu. Die Anwendung von monoklonalen Immunglobulin A und bispezifischen Antikörpern in der Tumorthherapie, sowie der Einsatz des löslichen Fc α Rezeptors I bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der IgA Nephropathie, Systemus lupus erythematosus und dem SjögrenSyndrom ist dabei denkbar und wird bereits im Ansatz realisiert. Aus diesen Gründen ist ein umfassendes Verständnis der Fc α RI Struktur und der Interaktion mit Immunglobulin A unerlässlich.

7.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung

Zu Beginn dieser Arbeit war durch Mutationsanalysen bereits bekannt, dass die IgA Bindung in der membrandistalen Immunglobulindomäne EC1 erfolgt. Da die Expression und Reinigung eines Membranproteins in ausreichenden Mengen nur in seltenen Fällen problemlos verläuft und der IgA bindende Bereich in der EC1 Domäne des Rezeptors liegt, wurde für die Strukturlösung des Fc α RI nur das extrazelluläre Fragment in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert und rekombinant in *E.coli* exprimiert. Bei der Expression von Membranproteinen in eukaryontischen Zellen, wird der extrazelluläre Bereich des Proteins im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums posttranslational modifiziert, disulfidverbrückt und korrekt gefaltet. Die Expression der disulfidverbrückten, extrazellulären Fragmente von Membranproteinen in *E.coli* führt hingegen häufig zu einer Akkumulation des denaturierten Proteins im Cytosol in Form von *inclusion bodies* (Lilie *et al.*, 1998). Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass aufgrund des reduzierenden Milieus im Cytoplasma der Bakterienzelle keine korrekten Disulfidbrücken ausgebildet werden können. Auch das extrazelluläre Fragment des humanen Fc α Rezeptors I, welches je Immunglobulindomäne eine Disulfidbrücke ausbildet, wurde in *E.coli* in *inclusion bodies* abgelagert. Die Isolierung dieser Proteinaggregate aus den aufgeschlossenen Bakterienzellen ist aufgrund der hohen Dichte des Materials leicht durch Zentrifugation möglich (Rudolph *et al.*, 1997). Durch mehrere Waschschriffe und unter Verwendung von

Detergenzien können Membranbestandteile und andere Verunreinigungen aus den *inclusion bodies* entfernt werden. Zur Reinigung des Fc α RI *inclusion body* Materials wurde das Detergenz LDAO eingesetzt. Für zahlreiche Proteine konnte in den letzten Jahren ein Standardverfahren zur *in vitro* Rückfaltung aus *inclusion bodies* entwickelt werden, da die Information für die Ausbildung der nativen Tertiärstruktur in der Aminosäuresequenz des Proteins enthalten ist (Rudolph & Lilie 1996). Die native Struktur kann sich jedoch nur unter geeigneten physikalisch chemischen Bedingungen ausbilden, die in Abhängigkeit der Proteinspezies angepasst werden müssen. Das extrazelluläre Fragment des Fc α RI konnte mittels *in vitro* Renaturierung in eine lösliche Form überführt werden. Dazu wurde ein Puffer verwendet der Arginin als Faltungshelfer und ein Disulfid-*Redoxshuffling* System aus 5 mM GSH enthielt. Trotz der fehlenden Glykosylierung des Proteins, aufgrund der Expression in *E.coli*, konnte mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von IgA Sepharose eine Interaktion des rückgefalteten Fc α RI mit humanem Immunglobulin A nachgewiesen werden. Nach Abtrennung der Proteinaggregate mittels Gelfiltration kristallisierte der gereinigte Fc α Rezeptor I in Form von Mikrokristallen aus. Für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle konnten durch Umkristallisation erhalten werden.

7.1.2 Strukturlösung

Die Auswertungen der ersten am Synchrotron gemessenen Daten ergab eine pseudomeroedrische Verzwilligung der monoklinen Kristalle (P2₁ zu C222₁). Da diese spezielle Fehlordnung der Kristalle eine Strukturlösung stark erschwert oder verhindert (siehe Kap. 5.6.2) und keine andere Kristallform erhalten werden konnte, wurden weitere Messungen an Kristallen der gleichen Kristallisationsbedingung durchgeführt. Dabei konnten Daten eines nicht-verzwilligten Kristalls bis zu einer Auflösung von 2,8 Å aufgenommen werden. Mit diesem Datensatz wurde versucht, die Struktur mittels der Methode des molekularen Ersatzes (*Molecular Replacement*) zu lösen. Als Suchmodelle wurden bei diesen Versuchen die Kristallstrukturen des *Killer cell inhibitory*-Rezeptors (KIR) (Sequenzidentität von 32%) und des *Leukocyte Immunoglobulin-like* Rezeptors (LIR) (Sequenzidentität 35%) sowie die separaten Immunglobulindomänen dieser Rezeptoren und auf diesen Strukturen basierende Poly- Alanin Modelle eingesetzt. Auch unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden *Replacement*-Programme wie AMoRe, BEAST und Molrep konnten keine korrekten Phasen erhalten werden. Dies kann zum einen Folge der schlechten Qualität des nicht-verzwilligten Datensatzes hinsichtlich der Auflösung, Mosaizität und Vollständigkeit sein oder zum anderen an der zu geringen Strukturhomologie der Suchmodelle liegen. Zusätzlich erschwert wird das Auffinden der Moleküle im Pattersonraum durch das Vorliegen von vier Fc α RI Molekülen in der asymmetrischen Einheit. Um dennoch mit den vorhandenen Daten die Struktur des Fc α Rezeptors lösen zu können, wurde auf den verzwilligten Datensatz zurückgegriffen und eine mathematische Entzwilligung der Daten durchgeführt, um anschließend die Struktur

mittels Molekularem Ersatz mit den oben aufgeführten Suchmodellen und Programmen zu lösen. Jedoch schlugen alle Versuche der Phasierung wiederum fehl. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die Entzwilligung der Daten, aufgrund einer zu hohen Zwillingsfraktion nicht erfolgreich war und wahrscheinlich ein systematischer Fehler entstand, der eine Strukturlösung verhinderte. Eine Strukturlösung mittels der Methode des *Multiple isomorphous Replacement* (MIR) war nicht möglich, da die Kristalle hinsichtlich der Zwillingsfraktion nicht isomorph waren. Während der Auswertung eines weiteren nicht-verzwilligten Datensatzes besserer Qualität, wurde die Kristallstruktur des Fc IgA / Fc α RI Komplexes und die Fc α RI Einzelstruktur veröffentlicht (Herr *et al.*, 2003). Die Einzelstruktur wurde dabei durch eine Kombination aus MIRAS (*multiple isomorphous replacement with anomalous scattering*) und MAD gelöst. Mit dem nun vorliegenden 100%igen Suchmodell und den qualitativ besseren Daten, konnte die Struktur des Fc α RI in der monoklinen Kristallform gelöst werden. Während der Verfeinerung des Modells, wurde eine bis 2,1 Å aufgelöste Struktur des Fc α RI in einer weiteren Kristallform (C222₁) veröffentlicht (Ding *et al.*, 2003).

7.1.3 Strukturanalyse

Die Struktur der extrazellulären Domäne des Fc α RI besteht aus zwei Immunglobulin(Ig) - domänen EC1 und EC2, deren Faltungstopologie im Wesentlichen dem I-Typ bzw. einer Mischung aus I- und C2-Typ der Ig-Domänen entspricht (Abb. 6.11). Die Aufklärung der extrazellulären Domäne des Fc α RI in nunmehr drei verschiedenen Kristallformen, mit und ohne Glykosylierung und in Komplex mit dem IgA Fc-Fragment, ermöglicht eine ausführliche Analyse der konformationellen Flexibilität des Rezeptors in unterschiedlichen chemischen Umgebungen. Ein Vergleich der Strukturen durch die Überlagerung und anschließende Berechnung der *r.m.s.* Abweichung zeigte, dass es innerhalb der EC1 Domäne zu erheblichen konformationellen Unterschieden kommt. Vor allem im Bereich des FG und DE-loops sowie des D-Stranges (Rest 50-61) dieser Domäne sind Abstände zwischen den C $^{\alpha}$ -Atomen von bis zu 14 Å zu beobachten. Der Vergleich der vier kristallographisch voneinander unabhängigen Moleküle der asymmetrischen Einheit der monoklinen Raumgruppe (P2₁) zeigt, dass allein innerhalb dieser Kristallform eine unvermutet hohe Variabilität in dieser Region vorliegt. Man kann davon ausgehen, dass die beobachtete strukturelle Variabilität nicht auf direkte Kristallkontakte in den unterschiedlichen Kristallformen zurückzuführen ist, sondern der Fc α Rezeptor I auch in Lösung in diesen multiplen Konformationen vorliegt. Weiterhin wird durch die Überlagerung der bisher bekannten Strukturen, unter ausschließlicher Berücksichtigung der EC2 Domäne deutlich, dass trotz der ausgedehnten hydrophoben Interaktionsfläche zwischen den Domänen, der Interdomänenwinkel flexibel ist.

Durch die Strukturlösung des Komplexes, bestehend aus dem IgA Fc-Fragment und dem extrazellulären Teil des Fc α RI konnte gezeigt werden, dass neben den durch Mutationsstudien bereits festgestellten Resten Y35, R82, Y81 H85 I83 G84 auch weitere

Aminosäuren des Fc α RI im D-Strang/DE-*loop* Bereich (L54, K55, F56 W57 und der N58 verknüpfte Zucker) an der Interaktion beteiligt sind (Herr *et al.*, 2003). Trotz der nachgewiesenen Beteiligung des, an die Aminosäure N58 des Fc α RI gebundenen N-Acetylglukosamins an der IgA Bindung, interagiert das rekombinant in *E.coli* hergestellte Protein auch ohne diese Glykosylierung mit dem IgA Fc-Fragment. Insgesamt setzt sich die Interaktionsfläche aus einem zentralen hydrophoben Kernbeich zusammen, der von mehreren intermolekularen Wasserstoffbrücken (zwischen Fc α RI R52, R53, K55, R82 und den IgA Fc Resten R382, E389, E437) umgrenzt wird (Abb. 7.1).

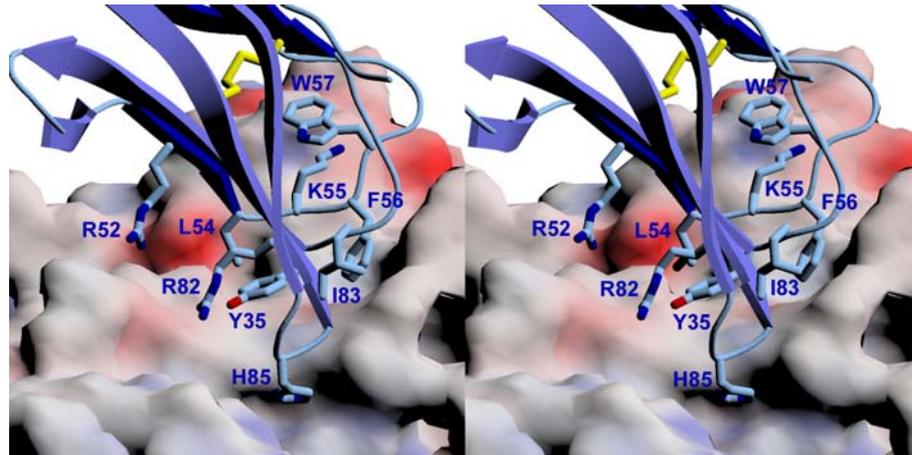


Abbildung 7.1 Stereoabbildung der Fc α RI/Fc-IgA Komplexstruktur.

Das IgA Fc-Fragment ist als Oberfläche mit Einfärbung nach elektrostatischem Potential (rot: negative Ladung, blau: positive Ladung), der Fc α Rezeptor I als Sekundärstrukturmodell und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren des Rezeptors als *Stick*-Modell dargestellt.

Speziell die Reste L54, K55 und F56 des Rezeptors sind erheblich an der Bindung beteiligt, da jede dieser Aminosäuren drei bis fünf Kontakte zum IgA Fc-Fragment ausbildet und insgesamt bis zu 35% zur Interaktionsfläche beitragen. Wie unter dem Kapitel 6.1.8 aufgeführt, zeigt gerade dieser Bereich des Fc α Rezeptors eine außergewöhnlich hohe konformationelle Flexibilität. Daher kann der genaue strukturelle Vergleich der Konformationen, speziell des D-Stranges und DE-*loop* Bereiches, wichtige Informationen für ein umfassendes Verständnis der Antikörper-Rezeptor Wechselwirkung liefern. Anhand der von ihnen gelösten Strukturen des freien und IgA gebundenen Fc α RI haben Herr *et al.* festgestellt, dass in der EC1 Domäne des freien Rezeptors ein D-Strang ausgebildet wird, während dieser β -Strang in der gebundenen Form Wasserstoffbrücken mit dem hinteren β -Faltblatt ausbildet und somit einen C'' Stranges darstellt. Aus diesen Beobachtungen postulieren Herr *et al.*, dass die Ausbildung eines C'' erst durch die Bindung des IgA Fc-Fragmentes hervorgerufen wird und somit ein *induced-fit* Mechanismus für die Bindung des IgA vorliegt. Die Überlagerung der Fc α RI aus der Komplexstruktur mit den vier Molekülen der monoklinen Kristallform zeigt jedoch, dass Molekül C der monoklinen Kristallform eine dem gebundenen Zustand sehr ähnliche Konformation annimmt und entsprechend einen C''-Strang ausbildet (Abb. 7.2). Weiterhin zeigt die Überlagerung der bisher bekannten Fc α Rezeptor I Strukturen, dass der ganze Bereich von Aminosäure 50

bis 60 mehrere verschiedene Konformationen annehmen kann bzw. so flexibel ist das teilweise keine Elektronendichte für diesen Bereich definiert ist (Abb. 6.14).

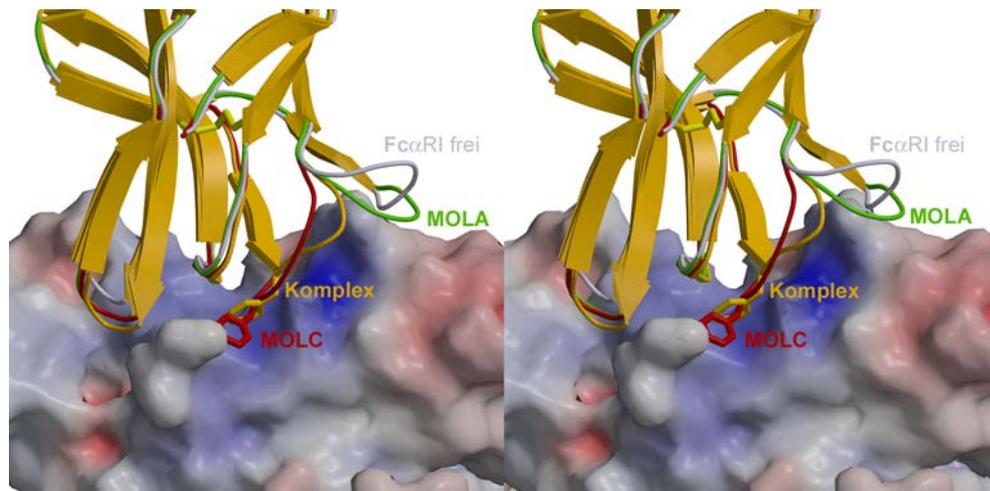


Abbildung 7.2 Stereoabbildung der Überlagerung verschiedener EC1 Domänen.
Gezeigt ist die Oberfläche des Fc-Fragmentes von IgA eingefärbt nach dem elektrostatischen Potential (rot: negative Ladung, blau: positive Ladung) zusammen mit einer Überlagerung der FcαRI Strukturen verschiedener Kristalle und in komplexierter und freier Form.

Die Bindungsregion nimmt die in der Komplexstruktur vorliegende Konformation also nicht erst bei Interaktion mit dem Fc-Fragment des IgA an, sondern liegt in Lösung, in mehreren energetisch gleichwertigen Zuständen vor, die leicht ineinander überführbar sind. Demnach verläuft die Fc-Rezeptor-Antikörper-Interaktionen nicht nach einem *induced fit* Mechanismus und das Fc-Fragment induziert keine neue Konformation des FcαRI. Vielmehr bindet es nur eines der Konformere des Rezeptors und selektioniert somit die bevorzugte Rezeptorpopulation.

Auch weitere an der IgA Interaktion beteiligte Aminosäuren, innerhalb des FG-*loops* des Rezeptors (Reste R82, G84, H85) weisen eine erhebliche Flexibilität auf, jedoch nicht in dem für die DE Region beobachteten Ausmaß.

7.1.4 Bedeutung der Flexibilität für die Entwicklung von Therapeutika

Eine Autoimmunerkrankung entsteht, wenn eine spezifische adaptive Immunantwort gegen ein körpereigenes Antigen (Autoantigen) ausgelöst wird. Das Autoantigen kann in der Regel nicht vollständig vom Immunsystem beseitigt werden, was zu einer lang anhaltenden Immunreaktion führt. Diese ruft eine chronische Entzündung und eine damit einhergehende Gewebeschädigung hervor, die in einigen Fällen tödlich endet. Bei einigen Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) kommt es im Verlauf der Krankheit zu einer Ablagerung von großen Mengen an Antikörper/Autoantigen-Komplexen in unterschiedlichen Geweben, wie zum Beispiel in den Nierenglomeruli und den Blutgefäßen. Zu dieser Gewebedeposition kommt es in Folge der Interaktion der Immunkomplexe mit Fc-Rezeptoren die auf der Oberfläche der

Gewebezellen, wie zum Beispiel der Mesangialzellen der Niere exprimiert werden. Die Wechselwirkung dieser so immobilisierten Immunkomplexe mit Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen, führt zur Aktivierung immunkompetenter Effektorzellen in diesen Geweben, die zu einer gesteigerten Sekretion von Entzündungsmediatoren und zur weiteren Autoantikörper-Produktion führt. Dieser Rückkopplungsmechanismus hat eine massive Gewebeschädigung und letztendlich den Ausfall des betroffenen Organs zur Folge. Die Inhibierung der Immunkomplex-Fc-Rezeptor-Wechselwirkung könnte regulatorisch in diese Entwicklung einer chronischen Entzündung eingreifen, in dem sie die Immobilisation der Immunkomplexe im Gewebe verhindert und zusätzlich die Aktivierung der Effektorzellen hemmt. Daher stellt die Inhibierung dieser Wechselwirkung eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit bei Immunkomplex-vermittelten Autoimmunerkrankungen dar (Clarkson *et al.*, 1986a, Soubrane *et al.*, 1993). Die Blockierung der Fc-Rezeptoren könnte dabei durch den Einsatz von Fc-Rezeptor gerichteten, monoklonalen Antikörpern (Clarkson *et al.*, 1986b), oder durch die Verabreichung von löslichen Fc-Rezeptoren, die einerseits in der Lage sind Immunkomplexe zu binden, aber andererseits keine Immunreaktion auslösen, erreicht werden. Letzteres wurde bereits in Mausexperimenten untersucht, in denen der lösliche Fc γ Rezeptor III (CD16) zur Behandlung von Mäusen mit einer Lupus Nephritis Erkrankung erfolgreich eingesetzt wurde (Watanabe *et al.*, 1998).

Die IgA Nephropathie (Berger's Erkrankung) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch die Ablagerung von Immunglobulin A/Fc α RI Immunkomplexen im Mesangium der Niere gekennzeichnet ist (D'Amico *et al.*, 2000). Die Erkrankung tritt entweder allein, als primäre Glomerulonephritis oder als Folgekrankheit bei systemischen Autoimmunerkrankungen, in Form der sekundären Glomerulonephritis z.B. beim Systemischen Lupus Erythematosus oder HIV auf und stellt somit die häufigste Form der Glomerulonephritis weltweit dar (D'Amico *et al.*, 2000). Im Verlauf der Krankheit kommt es zu einer Immobilisierung der Immunkomplexe aus Autoantigen/IgA und Fc α RI durch die Wechselwirkung mit dem Transferrin-Fc-Rezeptor CD71 der auf der Oberfläche der Mesangialzellen exprimiert wird. Infolgedessen kommt es zur oben beschriebenen chronischen Entzündung des Nierengewebes durch die Aktivierung zytotoxischer Effektorzellen. Um die Auslösung dieser Entzündungsreaktion zu verhindern, wäre in diesem Fall der Einsatz von löslichem Fc α RI denkbar. Einerseits könnte die Gewebedeposition der Immunkomplexe durch die Blockierung der Transferrin-Rezeptor Bindungsstellen mit löslichem Fc α RI verhindert werden und andererseits würde die Bindung der Immunkomplexe an den Effektorzell-gebundenen Fc α -Rezeptor kompetitiv gehemmt werden. Aufgrund der niedrigen Affinität ($K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$) des Rezeptors müssten jedoch, um eine effektive Hemmung der Immunantwort zu erreichen, sehr hohe lokale Konzentration an löslichen Fc α RI eingesetzt werden. Ein Grund für die niedrige Affinität sind die flexiblen Konformationen der Immunglobulin A Bindungsstelle des Fc α Rezeptors. Anhand der strukturellen Vergleiche und Flexibilitätsanalysen der Fc α RI/IgA-Komplexstruktur mit den Fc α RI Strukturen verschiedener Kristallformen konnte

festgestellt werden, dass die gebundene Konformation des Rezeptors auch frei in Lösung vorliegen kann und nicht durch die Interaktion mit dem IgA Fc-Fragment induziert wird. Die bedeutendste konformationelle Änderung erfährt dabei der D-Strang und DE-loop-Bereich, welcher in der gebundenen Konformation einen C''-Strang ausbildet. Eine Möglichkeit die Affinität des Fc α RI zu erhöhen, könnte die gezielte Stabilisierung dieses flexiblen Bereiches, in der zur Bindung bevorzugten Konformation sein. Dazu könnte, auf Grundlage der Kristallstruktur des Fc α Rezeptors, mittels strukturbasierter Proteindesign eine gezielte Mutation in dem β -Strang D/C'' eingeführt werden. Zum Beispiel könnte man jeweils einen Rest im C-Strang und im D/C''-Strang zu einem Cystein mutieren, um eine zusätzliche Disulfidbrücke einzufügen, um so die C'' Konformation zu stabilisieren. Falls die Affinität des Fc α RI durch diese gerichtete Mutagenese ausreichend verbessert werden kann, könnte ein derartiger löslicher Rezeptor bei der Behandlung der IgA-Nephropathie sinnvoll eingesetzt werden.

7.2 Die Kristallstruktur der Cysteinendoprotease IdeS

Der humanpathogene Bakterienstamm *Streptococcus pyogenes* hat vielseitige und komplexe Virulenzmechanismen entwickelt, um das humane Immunsystem zu umgehen. Das erst kürzlich identifizierte Protein IdeS (Mac-1) ist eine extrazelluläre Cysteinendoprotease dieses Pathogens. Die Protease besitzt die Fähigkeit humanes Immunglobulin G proteolytisch in der *Hinge*-Region zu spalten, um somit der Opsonophagozytose und der Vernichtung durch die polymorphkernigen neutrophilen Effektorzellen zu entgehen. Insbesondere das Vorkommen von IdeS-spezifischen Antikörpern im Serum von Patienten mit unterschiedlichen Streptokokken-Erkrankungen, sowie die stetige Expression dieser Protease während der Infektion weisen daraufhin, dass IdeS ein wichtiger Virulenzfaktor ist und eine Zielstruktur für die Entwicklung neuer Therapeutika darstellt.

7.2.1 Kristallisation und Strukturlösung

Um für die Kristallisation geeignetes Protein in ausreichenden Mengen herstellen zu können, wurde die für die IdeS Protease kodierende DNA in einen *E.coli* Expressionsvektor kloniert. Bei der Expression des aktiven Enzyms in *E.coli*, wurde ein N- und C-terminal erfolgreicher proteolytischer Abbau des Proteins festgestellt. Dieser Abbau ist wahrscheinlich auf eine unspezifische Autoproteolyse aufgrund der hohen lokalen Konzentration der Protease oder auf eine verunreinigende *E.coli* Protease zurückzuführen. Weiterhin konnte keine vollständige Inaktivierung der Protease mit dem kovalent bindenden Z-Leu-Val-Gly-CHN₂ (Z-LVG-CHN₂) Inhibitor erreicht werden, was wahrscheinlich in der geringen Löslichkeit des Inhibitors in wässrigen Lösungen begründet liegt. Aufgrund des proteolytischen Abbaus der Termini sowie der unvollständigen Inhibierung erwies sich das aktive Enzym als ungeeignet für Kristallisationsexperimente.

Die katalytisch inaktive C94S Mutante der IdeS Protease konnte rekombinant als His-tag Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert werden, ohne dass eine proteolytische Spaltung des Proteins beobachtet wurde. Über zwei chromatographische Reinigungsschritte konnte die Protease in für die Kristallisation ausreichender Menge und Reinheit hergestellt werden. Das so erhaltene, proteolyseresistente Protein wurde mit Ammoniumsulfat als Additiv in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2 kristallisiert. Trotz der geringen Dicke der Kristalle konnten, unter Verwendung von Synchrotron-Röntgenstrahlung, Daten bis zu einer Auflösung von 1,9 Å aufgenommen werden. Da keine Sequenzhomologie zu strukturell bekannten Proteinen bestand, wurde die Struktur mittels der MAD Methode unter Verwendung von Selenomethionin markiertem Protein gelöst.

7.2.2 Strukturanalyse

Die Kristallstruktur der IdeS C94S Mutante zeigt eine hohe strukturelle Homologie zu Cysteinproteasen der Papainfamilie C1A, sie weist aber auch einige auffallende Unterschiede auf. Die Überlagerung der Struktur mit Papain und dem strukturell ähnlichsten Protein Cathepsin B belegt die Zugehörigkeit von IdeS zum CA Klan der Cysteinproteasen. Dabei zeigt die Struktur der IdeS Protease auch den typischen Aufbau aus zwei Domänen, die als L bzw. R-Domäne bezeichnet werden (Abb. 6.30), was ein charakteristisches Merkmal dieses Proteaseklans ist. Neben den für Proteasen der Papainfamilie konservierten Bereich aus drei α -Helices in der L-Domäne sowie sieben β -Strängen und einer α -Helix innerhalb der R-Domäne besitzt die IdeS Struktur insbesondere in der L-Domäne umfangreiche strukturelle Insertionen (Abb. 6.30). Eine auch funktionell bedeutende Insertion ist das RGD-Motiv, welches an der Oberfläche der Proteasestruktur lokalisiert ist und somit die Fähigkeit besitzt mit Wirtszell-Integrinen zu interagieren. Dieses auch in der SpeB Protease aus *Streptococcus pyogenes* enthaltene Integrin-Bindemotiv vermittelt die Interaktion zu Vitronectin ($\alpha_v\beta_3$) und Thrombozyten Rezeptoren (Lei *et al.*, 2002), worüber ein Kontakt zur Wirtszelle hergestellt werden kann. Es wurde postuliert, dass diese Interaktion zur Virulenz des Bakteriums beiträgt (Lei *et al.*, 2002). Weitere auffallende Merkmale der IdeS Protease sind die fehlenden Disulfidbrücken und die Expression als reifes Enzym ohne Prosegment. IdeS ist eine Endoprotease, daher ist die *active site cleft* C-terminal zu der zu spaltenden Peptidbindung des Substrates nicht durch einen sogenannten *occluding-loop* verdeckt, wie es bei der Exopeptidase Cathepsin B der Fall ist. Neben den aufgeführten strukturellen Unterschieden, ist die fehlende Sequenzhomologie zu anderen Cysteinproteasen (Abb. 6.31) ein weiterer Beweis für die Annahme, dass IdeS ein Mitglied einer neuen Proteasefamilie innerhalb des CA Klans der Cysteinproteasen darstellt. Die Kombination aus gleicher Faltungstopologie bei geringer Homologie der Aminosäuresequenz, ist ein Hinweis auf eine divergente Evolution dieser Proteasen.

7.2.3 Das aktive Zentrum

Durch verschiedene Mutationsanalysen konnte bereits festgestellt werden, dass die Aminosäuren C94 und H262 für die proteolytische Aktivität der IdeS Protease von essentieller Bedeutung sind. Weiterhin konnte durch Mutation der Aspartat Reste 284 und 286 eine Verringerung der katalytischen Aktivität nachgewiesen werden, was eine Beteiligung dieser Aminosäuren am Katalysemechanismus wahrscheinlich macht (Lei *et al.*, 2003). Die Kristallstruktur von IdeS C94S zeigt, dass das aktive Zentrum dieser Protease ähnlich dem der Papainfamilie der Cysteinproteasen aufgebaut ist. Diese strukturelle Homologie des aktiven Zentrums lässt auf einen analogen Katalysemechanismus schliessen (Abb. 6.32). Demnach ist das, in der Kristallstruktur zu Serin mutierte, Cystein 94 in der Lage ein Thiolat-Imidazol-Ionenpaar mit Histidin 262 auszubilden. Obwohl der Katalysemechanismus prinzipiell dem anderer Cysteinproteasen der Papainfamilie gleicht, gibt es auffallende Unterschiede bei den an der Katalyse beteiligten Aminosäuren. Dabei ersetzt ein Lysin (K84) das charakteristische Glutamin der Oxyanionentasche und anstelle eines Asparagins ist der Aspartatrest 284 für die Orientierung des Imidazolringes des Histidins 262 verantwortlich. Die Konformation des zur Oxyanionentasche beitragenden Lysins 84 wird durch die Ausbildung einer Salzbrücke mit der Seitenkette des Aspartat 286 stabilisiert. Dies könnte eine Erklärung für die beobachtete verminderte Reaktivität der D286A Mutante (Lei *et al.*, 2003) sein, da hier diese stabilisierende Wechselwirkung fehlt.

7.2.4 Die Substratspezifität

Die IdeS Protease spaltet Immunglobulin G in der unteren *Hinge*-Region, in unmittelbarer Nähe zur C_H2 Domäne zwischen den Aminosäuren Gly236/Gly237 bzw. zwischen Gly236/Ala237 im Isotyp IgG2 (Abb. 2.11). Dieser Bereich des IgG Fc-Fragmentes dient auch als Bindungsstelle für humane Fcγ-Rezeptoren, wie die Struktur des Fc-FcγRIII Komplexes zeigt (Sondermann *et al.*, 2000). Daher könnte die nachgewiesene Inhibierung der IgG vermittelten Opsonophagozytose durch die proteolytisch inaktive IdeS C94A Mutante (Lei *et al.*, 2002) darauf zurückzuführen sein, dass IdeS mit dem FcγRIII um Bindungsstellen am IgG Fc-Fragment konkurriert.

Ein besonderes Merkmal der Cysteinendoprotease IdeS ist ihre ausserordentlich hohe Substratspezifität. Im Gegensatz zu den strukturell homologen Proteasen wie Cathepsin B, SpeB und Papain, welche ein breites Substratspektrum aufweisen, konnten bisher neben den vier Isotypen des humanen Immunglobulin G keine weiteren Substrate nachgewiesen werden. Um diese außergewöhnliche Substratspezifität erklären zu können, wurde die Kristallstruktur der IdeS Protease mit der Papain Struktur überlagert und hinsichtlich der Ausprägung und Ladung der Substratspezifitätstaschen verglichen (Abb. 6.35). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Substratbindetaschen N-terminal zu der zu spaltenden Substratpeptidbindung (S1, S2) generell enger ausgebildet sind als in Papain. Diese relativ kleinen Spezifitätstaschen erlauben nur die Bindung von Glycin bzw. Aminosäuren mit

kleinen Seitenketten wie Alanin. Damit kann auch die 10 fach geringere Affinität von IdeS zu humanem IgG2 erklärt werden, da hier im Vergleich zu den übrigen IgG Isotypen etwas größere Reste die P1 und P2 Positionen (Alanin, Valin) besetzen. Ebenso liegt die Inaktivität der IdeS Protease gegenüber IgG1 aus Maus (Abb. 2.11), Schwein und Schaf (Agniswamy *et al.*, 2004) in der engen Ausprägung dieser Substratspezifitätstaschen begründet. Eine ausführliche Beschreibung der S2 und S3 Bindungstaschen ist anhand der Kristallstruktur der IdeS C94S Mutante nicht möglich, da zwei *loop*-Bereiche, die am Aufbau dieser Taschen beteiligt sind, aufgrund ihrer Flexibilität nicht in der Elektronendichte sichtbar sind. Die Flexibilität in dem α -Helix 4 und 5 verknüpfenden *loop* ist auf die, im Gegensatz zu anderen Cysteinproteasen der Papainfamilie, fehlende stabilisierende Disulfidbrücke zurückzuführen. Eine Konformationsänderung in den flexiblen Bereichen, bedingt durch die Bindung des IgG Fc-Fragmentes erscheint möglich. Die Kristallstruktur der IdeS C94S Mutante allein läßt keine Vorhersage über die genaue Position des P2' Substratrestes zu. Höchstwahrscheinlich ist die Ausrichtung dieses Restes in der *active site cleft* von der Orientierung der C_H2 Domäne des Fc-Fragmentes abhängig, die sich C-terminal zum *Hinge*-Peptid befindet. Der Vergleich der Substratspezifitätstaschen von Papain und IdeS macht weiterhin deutlich, dass neben den Unterschieden in der Ausprägung der Bindungstaschen auch die Ladungsverteilung innerhalb der *active site cleft* Besonderheiten aufweist. Speziell die S2' Spezifitätstasche ist in der IdeS Protease durch die Gegenwart der beiden Aspartatreste 284 und 286 hauptsächlich negativ geladen, wohingegen diese Region in Papain keine spezifische Ladung besitzt. Insgesamt können die Unterschiede in der *active site cleft* erklären, warum verschiedene, für Cysteinproteasen typische Inhibitoren wie E64, Kininogen, Cystatin C und verwandte Inhibitoren nicht in der Lage sind, die IdeS Protease zu inaktivieren. Da vor allem Cystatin C in relativ hohen Konzentrationen (ca. 0,9 mg/ml) im humanen Serum vorkommt, ist die Resistenz gegenüber diesen Inhibitoren ein wichtiger Schutzmechanismus der IdeS Protease in ihrer Eigenschaft als Virulenzfaktor von *Streptococcus pyogenes*.

Der spezielle Aufbau der IdeS-*active site cleft* kann jedoch nicht begründen, dass selbst Peptide, welche das Leu-Gly-Gly-Pro Spaltmotiv enthalten, nicht proteolytisch geschnitten werden, was in mehreren biochemischen Experimenten nachgewiesen wurde (Vincent *et al.*, 2004). Vielmehr weist diese Eigenschaft darauf hin, dass zusätzliche Bereiche des Immunglobulin G Moleküls an der Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes beteiligt sind. Die in dieser Arbeit durchgeführten NMR-Bindungsstudien belegen, dass die katalytisch inaktive IdeS C94S Mutante die Fähigkeit besitzt, mit dem IgG Fc-Fragment auch nach der proteolytischen Spaltung mit Papain oder IdeS zu interagieren. Zusätzlich konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass ein Heptapeptid, bestehend aus den Aminosäuren ELLGGPS des IgG *Hinge*-Bereichs, eine geringere Anzahl chemischer Verschiebungen im NMR-Spektrum bewirkt. Zusammen mit biochemischen Experimenten, die eine Bindung der Protease zu Papain verdautem Fc IgG bestätigen (Vincent *et al.*, 2004), stützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass neben den Aminosäuren des

Spaltmotivs auch weiter entfernt liegende Bereiche zur Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes beitragen. Eine größere konformationelle Änderung der Enzymstruktur ist dabei allerdings nicht zu erwarten, da nach der Zugabe des IgG-Fc-Fragmentes nur einige, im Vergleich zur Heptapeptid-Zugabe, zusätzliche Verschiebungen im 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum der IdeS C94S Mutante zu beobachten waren. Die Interaktion der Protease mit der $\text{C}_\text{H}2$ Domäne des Fc-Fragmentes könnte jedoch für die optimale Positionierung des *Hinge*-Bereiches in die *active site cleft* verantwortlich sein, um eine effektive Spaltung zu ermöglichen. Die genaue Region dieser sogenannten *Exosite* kann jedoch nur durch die Kristallstruktur des Komplexes aus IdeS und dem IgG Fc-Fragment exakt lokalisiert werden. Bisher konnten mit Kokristallisationsexperimenten keine Kristalle erhalten werden und eine gemeinsame Aufreinigung des Komplexes mittels Gelfiltration ist aufgrund der zu geringen Affinität nicht möglich. Ebenso konnten erste computergestützte Modellierungsversuche mit den Programmen AutoDock (Goodsell *et al.*, 1996) und SDA (*simulation of diffusional association of proteins*, Gabdoulline *et al.*, 1998) die angenommene *Exosite* nicht eindeutig lokalisieren.

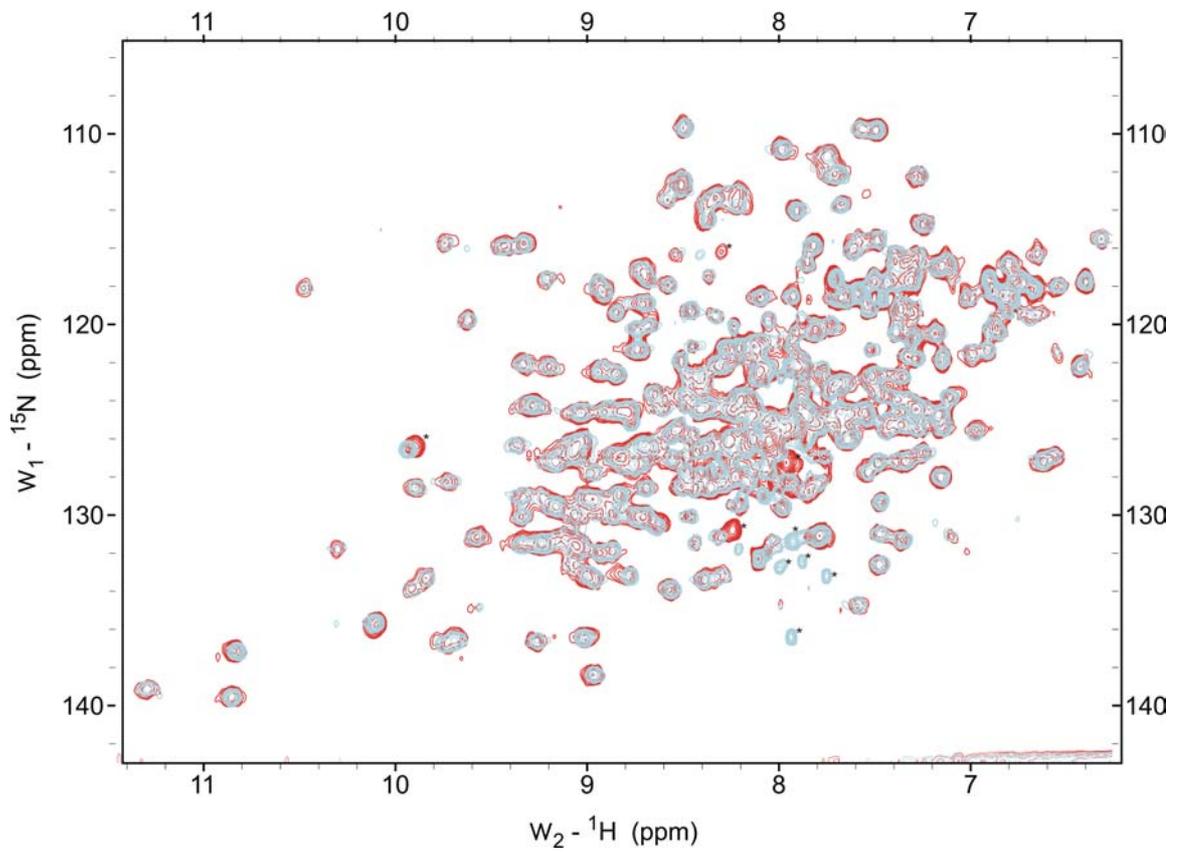
7.2.5 Bedeutung der Kristallstruktur für die Entwicklung von Inhibitoren

Um neue, für die IdeS Cysteinprotease spezifische Inhibitoren zu entwickeln, ist ein umfassendes Verständnis der Substratbindung notwendig. Mit der Kristallstruktur der unkomplexierten IdeS C94S Mutante ist ein erster Schritt in diese Richtung unternommen worden, mit dem wichtige Fragen zum Mechanismus des Enzyms beantwortet werden konnten. Dennoch erfordert eine exakte Analyse der Substratbindung die strukturelle Aufklärung von Komplexen, bestehend aus der Protease und Substraten oder dem spezifischen Peptidinhibitor Z-LVG- CHN_2 . Bisher war es nicht möglich, diese Substanzen in die IdeS C94S Kristalle einzubringen, da ein über drei Wasserstoffbrücken gebundenes Sulfation das aktive Zentrum der Protease blockiert. Dieses Sulfation konnte auch durch mehrere Waschschrte in sulfatfreiem Kristallisationspuffer nicht entfernt werden, was auf eine hohe Affinität zur Bindungsstelle deutet. Auch eine Betropfung der mittels des Free Mounting Systems (Kiefersauer, 2000) transformierten Kristalle mit dem in DMSO gelösten Peptidinhibitor Z-LVG- CHN_2 führte nicht zu dem gewünschten Austausch des Sulfations durch den Inhibitor. In weiterführenden Experimenten könnte man einerseits versuchen die IdeS Protease in einem sulfatfreien Puffer zu kristallisieren oder andererseits das Sulfation aus den vorhandenen Kristallen, unter Verwendung von anderen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten auszuwaschen. Die starke Affinität des Sulfations zur *active site cleft* kann jedoch auch wichtige Hinweise für die Entwicklung neuer, auf den chemischen Eigenschaften des Sulfations basierender Inhibitoren geben.

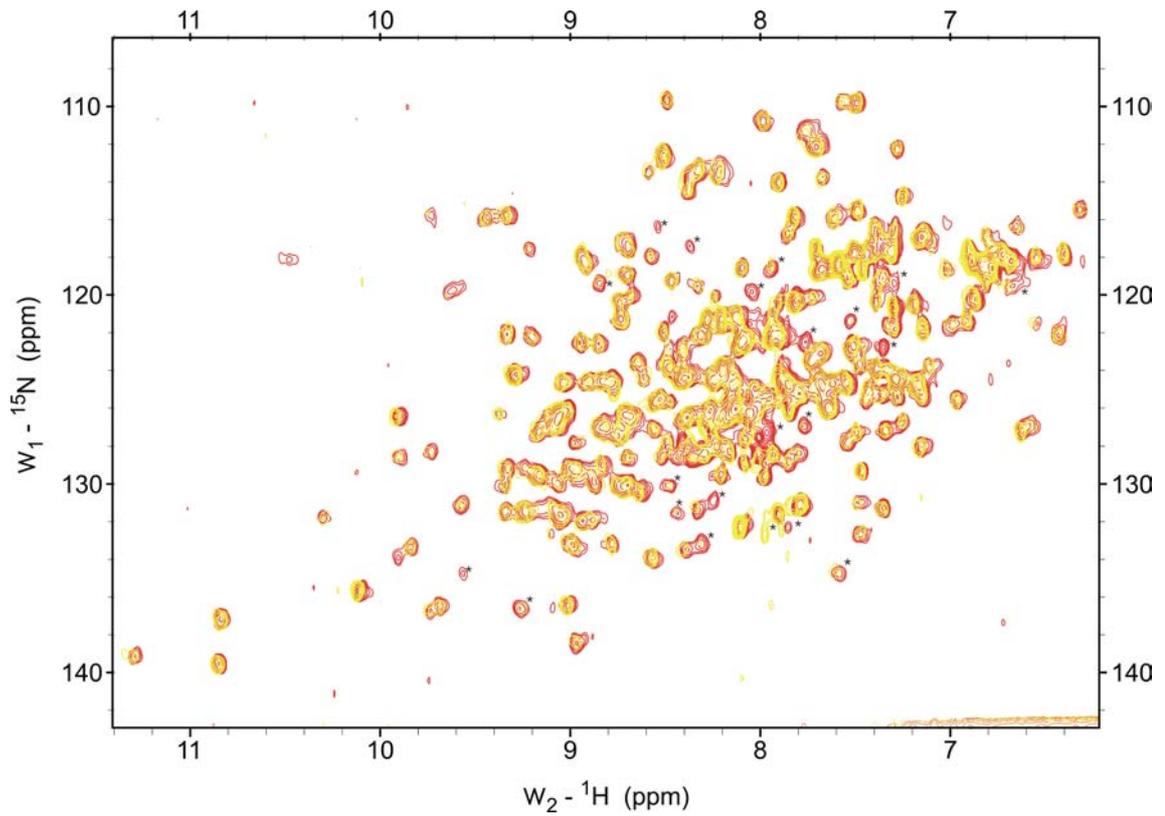
Zusammenfassend betrachtet bietet die Kristallstruktur der IdeS C94S Mutante erste Einblicke in die ungewöhnliche Substratspezifität und den Katalysemechanismus dieses Enzyms. Da diese Cysteinendoprotease ein wichtiger Virulenzfaktor des humanen

Pathogens *Streptococcus pyogenes* ist, stellt die Kristallstruktur einen ersten Ansatzpunkt für ein strukturbasiertes Inhibitor-Design und für die Entwicklung neuer Medikamente dar.

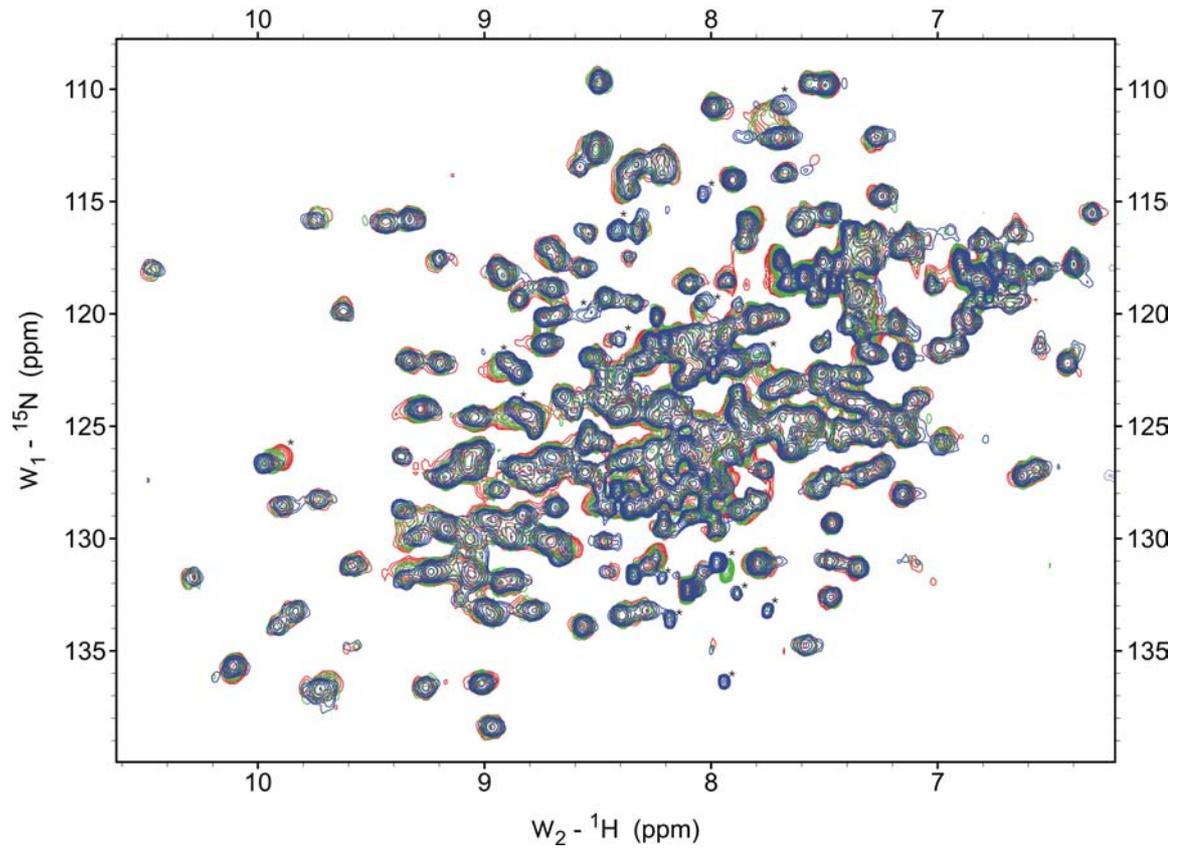
Anhang



2D ${}^1\text{H}/{}^{15}\text{N}$ HSQC -Referenzspektrums des ${}^{15}\text{N}$ markiertem IdeS C94S überlagert mit dem gleichen Spektrum unter Zugabe von BSA (im 1:1 Molaren Verhältnis). Die Sterne markieren die beobachteten chemische Verschiebungen.



Überlagerung des 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Referenzspektrum (rot) Ides (0,5 mM) mit dem Spektrum nach Zugabe von IdeS verdautem Fc-IgG im Molaren Verhältnis von 1:1 (gelb). Die aufgetretenen Verschiebungen sind mit Sternen gekennzeichnet



Überlagerung des 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Referenzspektrum (rot) Ides (0,5 mM) mit dem Spektrum nach Zugabe des Heptapeptides γ -short im Molaren Verhältnis von 1:1 (grün) und 1:4 (blau). Die aufgetretenen Verschiebungen sind mit Sternen gekennzeichnet

Literaturverzeichnis

- Agniswamy, J., Lei, B., Musser, J.M. & Sun, P.D. (2004) Insight of host immune evasion mediated by two variants of group A Streptococcus Mac protein. *J Biol Chem.* **279**, 52789-96.
- Ashbaugh, C.D. & Wessels, M.R. (2001) Absence of a cysteine proteinase effect on bacterial virulence in two murine models of human invasive group A streptococcal infection. *Infect Immun*, **69**, 6683–6686.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Barton, G.J. (1993) Alscript: A tool to format multiple sequence alignments. *Protein Eng.* **6(1)**, 37-40.
- Berge, A., Kihlberg, B.M., Sjöholm, A.G. & Björck, L. (1997) Streptococcal protein H forms soluble complement-activating complexes with IgG, but inhibits complement activation by IgG-coated targets. *J Biol Chem*, **272**, 20774–20781.
- Berman, H.M., Westbrook, J. *et al.* (2000) The protein data bank. *Nucl. Acids Res.* **28(1)**, 235-42.
- Boehm, M.K., Woof, J.M., Kerr, M.A. & Perkins, S.J. (1999). The Fab and Fc fragments of IgA1 exhibit a different arrangement from that in IgG: a study by X-ray and neutron solution scattering and homology modelling. *J. Mol.Biol.* **286**, 1421-1447.
- Bisno, A.L. (1995) Streptococcus pyogenes. In G.L. Mandell, R.G. Bennett and R. Dolin (ed.), Principles and practise of infectious diseases, Vol 2. Churchill Livingstone, New York, N.Y. 1786-1799.
- Budisa, N., Steipe, B. *et al.* (1995) High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in Escherichia coli. *Eur.J.Biol.* **230(2)**, 788-96.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grossekunstleve, R.W., Iang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S. *et al.* (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.* **D54**, 905-921.
- Burnett, D., Chamba, A., Stockley, R.A., Murphy, T.F., Hill, S.L. (1993) Effects of recombinant GM-CSF and IgA opsonisation on neutrophil phagocytosis of

- latex beads coated with p6 outer membrane protein from *Haemophilus influenzae*. *Thorax* **48**, 638-42.
- Burns, E.H., Jr., Marciel, A.M., & Musser, J.M. (1996) Activation of a 66-kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infect. Immun.* **64**, 4744-50.
- Chapman, T.L., Heikema, A.P., West, A.P. & Bjorkman, P.J. (2000) Crystal structure and ligand binding properties of the D1D2 region of the inhibitory receptor LIR-1 (ILT2). *Immunity* **13**, 727-36.
- Chaussee, M.S., Phillips, E.R. & Ferretti, J.J. (1997) Temporal production of streptococcal erythrogenic toxin B (streptococcal cysteine proteinase) in response to nutrient depletion. *Infect Immun*, **65**, 1956–1959.
- Clarkson, S.B., Bussel, J.B., Kimberly, R.P., Valinsky, J.E., Nachman, R.L., Unkeless, J.C. (1986a) Treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura with anti-Fc γ receptor antibody. *New Engl. J. Med.* **314**, 1236-39.
- Clarkson, S.B., Kimberly, R.P., Valinsky, J.E., Witmer, M.D., Bussel, J.B., Nachman, R.L., Unkeless, J.C (1986b) Blockade of clearance of immune complexes by an anti-Fc γ receptor monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **164**, 474-489.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.
- Collin, M., & Olsen, A. (2001) Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infect. Immun.* **69**:7187-7189.
- Collin, M., and Olsen, A. (2001) EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG, *EMBO J.* **20**, 3046-3055.
- Croasmun, W.R. and Carlson, R.M.K. (1994) Two dimensional NMR spectroscopy: Applications for chemists and biochemistry. VHC Publ., New York.
- Cunningham, M.W. (2000) Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clinical Microbiology Reviews* **7**, 470-511.
- Daeron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol.* **15**, 203-34.
- D'Amico, G. (2000) Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors. *Am. J. Kidney Dis.* **36**, 227–237.
- Declercq, J.P. & Evrard, C. (2001). A twinned monoclinic crystal form of human peroxiredoxin 5 with eight molecules in the asymmetric unit. *Acta Crystallogr.* **D57**, 1829-1835.
- Ding, Y., Xu, G., Yang, M., Yao, M., Gao, G.F., Zhang, W. and Rao, Z. (2003) Crystal structure of the ectodomain of human Fc α RI. *J Biol Chem.* **278 (30)**, 27966-70.

- Drenth, J. (1992) Principles of X-ray crystallography. New York, USA, Springer Verlag.
- Drenth, J., Kalk, K.H. & Swen, H.M. (1976) Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain. *Biochemistry* **15**, 3731-3738.
- Elliott, S.D: (1945) A proteolytic enzyme produced by group A streptococci with special reference to its effect on the type-specific M antigen, *J.Exp.Med.* **81**, 573-592.
- Esnouf, R. M. (1999) *Acta Crystallographica*, **D55**, 938-940.
- Engh, R. & Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for x-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr.* **A47**, 392-400.
- Fortelle, E.D.L. & Bricogne, G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for the multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymology*. **276**, 472-294.
- Frishman, D & Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* **23**, 566-579.
- Furtado, P.B., Whitty, P.W., Robertson, A., Eaton, J.T., Almogren, A., Kerr, M.A., Woof, J.M. and Perkins, S.J. (2004) Solution structure determination of monomeric human IgA2 by X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: a comparison with monomeric human IgA1. *J Mol Biol.* **338(5)**, 921-41.
- Garman, S.C., Sechi, S., Kinet, J.P. and Jardetzky, T.S. (2001) The analysis of the human high affinity IgE receptor Fc ϵ RI α from multiple crystal forms. *J Mol Biol.* **311**, 1049-1062.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gabdoulline, R.R., Wade, R.C. (1998). Brownian dynamics simulation of protein-protein diffusional encounter. *Methods*, **14**, 329-341.
- Goddard, T.D. & Kneller D.G. (2000) "SPARKY 3" University of California, San Francisco.
- Goodsell, D.S., Morris, G.M. & Olson, A.J. (1996) Docking of Flexible Ligands: Applications of AutoDock. *J.Mol.Recognition* **9**, 1-5.
- Crowther, R. A. and Blow, D. M. (1967) A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure. *Acta Crystallogr.* **23**, 544-548.
- Hausser, K.H. & Kalbitzer, H.R. (1989) NMR für Mediziner und Biologen. Springer Verlag.
- Herr, A. B., Ballister, E. R., Bjorkman, P. J Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc α RI and its complex with IgA1-Fc. *Nature* **423** pp. 614 (2003)

- Herwald, H., Collin, M., Müller-Esterl, W. & Bjorck, L. (1996) Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a virulence mechanism. *J. Exp. Med.* **184**, 665-73.
- Holak, T., Mühlhahn, P., Schirra, H.J. (1998) Bioanalytik. Hrsg. Lottspeich, F. & Zorbas, H. Spektrum Akademischer Verlag
- Holliger, P. and Hoogenboom, H. (1998) Antibodies come back from the brink. *Nat. Biotechnol.* **16**, 1015-1016.
- Holm, S.E., Norrby, A., Bergholm, A.M. and Norgren, M. (1992) Aspects of pathogenesis of serious group A streptococcal infections in Sweden, 1988–1989. *J Infect Dis*, **166**, 31–37.
- Huber, R. (1965) Die automatisierte Faltmolekülmehode. *Acta Crystallogr.* **19**, 353-56.
- Huls, G., Heijnen, I.A.F.M., Cuomo, E., van der Linden, J., Boel, E., van de Winkel, J.G.J., Logtenberg, T. (1999) Antitumor Immune Effector Mechanisms Recruited by Phage Display-derived Fully Human IgG1 and IgA1 Monoclonal Antibodies. *Cancer Research* **59**, 5778-84.
- Isberg, R.R. & Tran Van Nhieu, G. (1994) Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbiol*, **2**, 10–14.
- Jancarik, J. & Kim, S-H.J. (1991) Sparse Matrix sampling: a screening method for the crystallization of macromolecules. *Appl. Cryst.* **24**, 409-411.
- Jin, X., Yue, S., Wells, K.S., Singer, V.L. (1994) SYBR Green I: A New Fluorescent Dye Optimized for Detection of Picogram Amounts of DNA in Gels. *Biophys J.* **66**, A159.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.* **A47**, 110-119.
- Kaetzel, C.S., Robinson, J.K., Chintalacheruvu, K.R. Vaerman, J.P., Lamm, M.E. (1991) The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **88**, 8796-800.
- Kapur, V., Topouzis, S., Majesk, M.W., Li, L.L., Hamrick, M.R., Hamill, R.J., Patti, J.M. and Musser, J.M. (1993) A conserved Streptococcus pyogenes extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb. Pathog.* **15**, 327-346.
- Kerr, M.A. (1990) The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* **271**, 285-296.
- R. Kiefersauer, R., Than, M.E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J.M. Soulimane, T. & Huber, R. (2000) A novel free-mounting system for protein

- crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *J. Appl. Cryst.* **33**, 1223-1230.
- Kraulis, P.J. (1991) Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-50.
- Kufer, P., Lutterbse, R., Baeuerle, P.A. (2004) A revival of bispecific antibodies. *Trends in Biotechnology* **22**, 238-244.
- Lämmlli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lang, M.L., Glennie, M.J., Kerr, M.A. (1997) Human neutrophil Fc α R and FcRIIa but not FcRIIIb generate intracellular calcium signals which triggers the respiratory burst. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 333.
- Lang, M.L., Shen, L., Gao, H. Cusack, W.F., Lang, G.A., Wade, W.F. (2001) Fc α receptor cross-linking causes translocation of phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1 and proein kinase B alpha to MHC class II peptide-loading-like compartments. *J. Immunol.* **166**, 5585-93.
- Larsen, N.A., Heine, A., de Prada, P., Redwan, E., Yeates, T.O., Landry, D.W. & Wilson, I.A. (2002) Structure determination of a cocaine hydrolytic antibody from a pseudomerohedrally twinned crystal. *Acta Crystallogr.* **D58**, 2055-2059.
- Laskowski, R.A., Rullmann, J.A. *et al.* (1996) Aqua and procheck-nmr: Programs for checking the quality of protein structures solved by nmr. *J. Biomol. NMR* **8(4)**, 477-86.
- Lei, B., DeLeo, F.R., Reid, S.D., Voyich, J.M., Magoun, L., Liu, M., Braughton, K.R., Ricklefs, S., Hoe, N.P., Cole, R.L., Musser, J.M. (2002) ?? *Infect. Immun.* **70**, 6880-90.
- Lei, B., Liu, M., Meyers, E.G., Manning, H.M., Nagiec, M.J. & Musser, J.M. (2003) Histidine and aspartic acid residues important for immunoglobulin G Endopeptidase Activity of the Group A Streptococcus Opsonophagocytosis-Inhibiting Mac Protein. *Infect Immun*, **71**, 2881-84.
- Lei, B., Mackie, S., Lukomski, S. & Musser, J.M. (2000) Identification and immunogenicity of group A *Streptococcus* culture supernatant proteins. *Infect Immun*, **68**, 6807–6818.
- Leslie, A.G. (1999) Integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr.* **D 55**, 1696-702.
- Lichtenstein, A. (1990) Granulozytes as possible effectors of tumor immunity, in Oettgen HF (ed). *Human Cancer Immunology*, 731.

- Lilie, H., Schwarz, E. et al. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E.coli*. *Curr.Opin.Biotechnol.* **9(5)**, 497-501.
- Lowell, G.H., Smith, L.F., Griffiss, J.M., Brandt, B.L. (1980) IgA-dependent, monocyte-mediated, antibacterial activity. *J. Exp. Med.* **152**, 452-57.
- Lukomski, S., Sreevatsan, S., Amberg, C., Reichardt, W., Woischnik, M., Podbielski, A. & Musser, J.M. (1997) Inactivation of *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease significantly decreases mouse lethality of serotype M3 and M49 strains. *J.Clin. Invest.* **99**, 2574-80.
- Macpherson, A.J. et al. (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* **288**, 2222-2226
- Mac Clarin, J.A., Frederick, C.A., Wang, B.C., Greene, P., Boyer, H.W., C., Grable, J. & Rosenberg, J.M.(1986) Structure of the DNA-Eco RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science*, **234**, 1526-1541.
- Marston, F.A. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *E.coli*. *Biochem. J.* **240**, 1-12.
- Marx, J.L., (1983) Suppressing autoimmunity in mice., *Science* **221**, 843-45.
- Massa, W. (1996) Kristallstrukturbestimmung, Stuttgart, B.G. Teubner.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- Menard, R., Carriere, J., Laflamme, P., Plouffe, Khouri, H.E., Vernet, T., Tessier, D.C., Thomas, D.Y. & Storer, A.C. (1991) Contribution of the glutamine 19 side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain. *Biochemistry* **37**, 8924-8928.
- Monteiro, R.C., Cooper, M.D., Kubagawa, H. (1992) Molecular heterogeneity of Fc alpha receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **148**, 1764-70.
- Monteiro, R.C., Grossetete, B., Nguyen, A.T., Jungers, P., Lehuen, A. (1995) Dysfunctions of Fcα Receptors by blood phagocytic cells in IgA nephropathy. *Contrib. Nephrol.* **111**, 116-22.
- Monteiro, R.C. & van de Winkel, J.G.J. (2003) IgA Fc Receptors. *Annu.Rev. Immunol.* **21**, 177-204.
- Morris, R.J., Perrakis, A. & Lamzin, V.S. (2002) ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps. *Acta Crystallogr.* **D58**, 968-75.
- Morton, H.C., van den Herik-Oudijk, I.E., Vossebeld, P., Snijders, A., Verhoeven, A.J., Capel, P.J., van de Winkel, J.G. (1995) Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain.

- Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. *J Biol Chem.* **270**, 29781-7.
- Morton, HC., van Egmond, M., Van de Winkel, JGJ. (1996) Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Crit Rev Immunol.* **16**, 423-40.
- Mostov, K.E. (1994) Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu.Rev. Immunol.* **12**, 63-84.
- Mullis, K.B., Falcoona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. & Ehrlich, H.A. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Navaza, J. (1994), AMoRe – an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr.* **D 50**, 157-163.
- Nicholls, A., R. Bharadwaj and B. Honig (1993) GRASP: Graphical Representation and Analysis of Surface Properties. *Biophys. J.* **64**, A166.
- Ouadrhiri, Y., Pilette, C., Monteiro, R.C., Vaerman, J.P., Sibille, Y. (2002) Effect of IgA on respiratory burst and cytokine releas by human alveolar macrophages: role of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *Am.J. Respir.Cell. Mol.Biol.* **26**, 315-32.
- Otwinowski, Z & Minor, W. (1997) Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Academic Press* part A.
- Patterson, A.L. (1934) A Fourier Series Method for the Detemination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. *Phys. Rev.* **46**, 372-76.
- Pfefferkorn, L.C., Yeaman, G.R. (1994) Association of IgA-Fc receptors (FcαR) with FcεRI γ2 subunits in U937 cells. Aggregation induces the tyrosine phosphorylation of γ2. *J. Immunol.* **153**, 3228-36.
- Plateau, P. & Gueron, M.(1982) Exchangeable proton NMR without base-line distortion, using new strong-pulse sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **104**,7310–7311.
- Repp, R., Valerius, T., Bargou, R. (2001) Bispezifische Antikörper in der Hämatologie und Onkologie. *Der Internist* **42**, 854-59.
- Reth, M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383-84.
- Royant, A. Crizot, S., Kahn, R., Belrhali, H., Fieschi, F., Landau, E.M. & Pebay-Peyroula, E. (2002) Detection and characterization of merohedral twinning in two protein crystals: bacteriorhodopsin and p67(phox). *Acta Crystallogr.* **D58**, 784-791.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., Jaenicke, R. (1997) Folding proteins. In *Protein Function: A Practical Approach*(Tom E. Creighton, ed), pp. 57-99. Irl. Press / Oxford University Press, Oxford.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **27**, 157-62.
- Schneider, T.R. & Sheldrick, G.M. (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr.* **D58**, 1772-1779.
- Schroder, E., Phillips, C., Garman, E., Harlos, K. & Crawford, C. (1993) X-ray crystallographic structure of a papain-leupeptin complex. *FEBS Lett.* **315**, 38-42.
- Shen, L., van Egmond, M., Siemasko, K., Gao, H., Wade, T. *et al.* (2001) Presentation of ovalbumin internalized via the immunoglobulin-A Fc receptor is enhanced through Fc receptor γ -chain signalling. *Blood* **97**, 205-213.
- Sondermann, P., Huber, R. & Jacob, U. (1999) Crystal structure of the soluble form of the human FcRIIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1,7 resolution. *EMBO J.* **18**, 1095-1103.
- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V. & Jacob, U. (2000) The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* **406**, 267-73.
- Sondermann, P. & Oosthuizen, V. (2001) X-ray crystallographic studies of IgG-Fc γ receptor interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 481-486.
- Sondermann, P. & Oosthuizen, V. (2002) The structure of Fc γ receptor/Ig complexes: considerations on stoichiometry and potential inhibitors. *Immunol Lett.* **82**, 51-6.
- Soubrane, C., Tourani, J.M., Andrieu, J.M., Visonneau, S., Beldjord, K., Israel-Biet, D., Mouawad, R., Bussel, J., Weil, M., Khayat, D. (1993) Biologic response to anti-CD16 monoclonal antibody therapy in the human immunodeficiency virus-related immune thrombocytopenic purpura patient. *Blood* **81**, 15-19.
- Stockmeyer B, Dechant M, van Egmond M, Tutt AL, Sundarapandiyan K, Graziano RF, Repp R, Kalden JR, Gramatzki M, Glennie MJ, van de Winkel JG, Valerius, T., (2000), Triggering Fc alpha-receptor I (CD89) recruits neutrophils as effector cells for CD20-directed antibody therapy. *J. Immunol.* **165**, 5954-5961.
- Stokes, C.R., Soothill, J.F., Turner, M.W. (1975) Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* **255**, 745-46.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. *et al.* (1994) Clustal w: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids, Res.* **22**, 4673-80.
- Travis, J. Potempa, J. (2000) Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**, 35-50.
- Turk, D. (1992) Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Technische Universität München.
- Valerius, Th., Stockmeyer, B., van Spriel, A.B., Graziano, R.F., van den Herik-Oudijk, I.E., Repp, R., Deo, Y.M., Lund, J., Kalden, J.R., Gramatzki, M., van de Winkel, J.G.J. (1997) Fc α RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood* **90(11)**, 4485-92.
- van Egmond, M., van Garderen, E., van Spriel, A.B., Damen, C.A., van Amersfoort, E.S., van Zandbergen, G., van Hattum, J., Kuiper, J., van de Winkel, J.G. (2000) Fc α RI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nature Med.* **6**, 680-685.
- van Egmond, M., Damen, C.A., van Spriel, A.B., Vidarsson, G., van Garderen, E., van de Winkel, J.G.J. (2001) IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol.* **22**, 205-11.
- Van Egmond, M., van Spriel, A.B., Vermeulen, H., Huls, G., van Garderen, E., van de Winkel, J.G. (2001) Enhancement of polymorphonuclear cell-mediated tumor cell killing on simultaneous engagement of Fc γ RI (CD64) and Fc α RI (CD89). *Cancer Res.* **61**, 4055-60.
- Vaughan, T.J., Osbourn, J.K., Tempest, P.R., (1998) Human antibodies by design. *Nat. Biotechnol.* **16**, 535-539.
- Vincent, B., von Pawel-Rammingen, U., Björck, L. & Abrahamson, M. (2004) Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding. *Biochemistry* **43 (49)**, 15540-9.
- von Pawel-Rammingen, U. & Björck, L. (2003) IdeS and SpeB: immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Streptococcus pyogenes*. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 50-55.
- von Pawel-Rammingen, U., Johansson, B.P. & Björck, L. (2002) IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. *EMBO* **21**, 1607-15.
- von Pawel-Rammingen, U., Johansson, B.P., Tapper, H. & Björck, L. (2002) *Streptococcus pyogenes* and phagocytic killing. *Nat. Med.* **8**, 1044-45.

- Watanabe, H., Sherris, D. & Gilkeson, G.S. (1998) Soluble CD16 in the treatment of murine lupus nephritis. *Clin Immunol Immunopathol.* **88**, 91-95.
- Wende, H., Colonna, M., Ziegler, A., Volz, A. (1999) Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mamm. Genome* **10**, 154-160.
- Wessel, D. & Flügge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-143.
- Wines, BD., Hulett, MD., Jamieson, GP., Trist, HM., Spratt, JM., Hogarth, PM (1999) Identification of residues in the first domain of human Fc α receptor essential for interaction with IgA. *J. Immunol.* **162**, 2146-53.

Abkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Å	Angström, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	Serumalbumin aus Rind
cDNA	DNA komplementär zu RNA
C-terminal	Carboxyterminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
LB	Luria-Bertani
Ig	Immunglobulin
IdeS	Immunoglobulin G degrading enzyme of Streptococcus pyogenes
His-tag	<i>Tag</i> aus 6 Histidinen
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
MAD	multiwavelength anomalous dispersion
MES	2-Morpholinethansulfonsäure
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
NCS	nichtkristallographische Symmetrie
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernmagnetische Resonanz)
N-terminal	Aminoterminal

NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphate buffered saline
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
PMN	polymorphkernige Neutrophile
ppm	parts per million
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
r.m.s.d.	root mean square deviation
U	units
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Z-LVG-CHN ₂	N-Benzoyloxycarbonyl-leucyl-valyl-glycyl-diazomethan

Zur Benennung von einzelnen Aminosäuren wurde sowohl der Einbuchstabencode als auch der Dreibuchstabencode verwendet.