



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Chemie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

Charakterisierung der Modifikation von
 β_2 -Mikroglobulin durch Transglutaminasen und
Untersuchungen zur Modulation von Fc-Rezeptoren

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Anna Tomhardt
aus Nußloch

Lübeck 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Karsten Seeger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian G. Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.07.2015

Für Luca und Lias

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abstract	X
Zusammenfassung.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Immunglobuline und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen	1
1.2 Die Funktion der Fc-Rezeptoren	3
1.3 Die Fc γ -Rezeptoren.....	5
1.3.1 Strukturelle Aspekte des Fc γ RIIIB.....	7
1.3.2 Strukturellen Aspekte des neonatalen Fc-Rezeptors und seine Aufgaben	11
1.4 β_2 -Mikroglobulin als Substrat der Transglutaminasen	16
1.5 Zielsetzung	17
2 Material	19
2.1 Geräte	19
2.2 Chemikalien	19
2.3 Antibiotika.....	20
2.4 Enzyme.....	21
2.5 Fluoreszenzmarkierte Substanzen	21
2.6 Standards zur Bestimmung von DNA-Fragmentgrößen oder Proteinmolekülmassen	22
2.7 Oligonukleotide.....	22
2.8 Plasmide	22
2.9 Mikroorganismen	23
3 Methoden.....	26
3.1 Modifikationen von DNA	26
3.1.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	26
3.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten	26
3.1.3 Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	27

3.2	Analyse durch Agarosegelelektrophorese.....	27
3.3	Isolation von DNA	28
3.3.1	DNA-Extraktion aus dem Agarosegel mittels QIAquick® Gel Extraction Kits.	28
3.3.2	Plasmidisolation mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit 50.....	29
3.4	Herstellung chemisch-kompetenter Zellen.....	29
3.5	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	29
3.6	Lagerung und Erhaltung transformierter Stämme.....	30
3.7	Proteinsynthese	30
3.7.1	Rekombinante Synthese von unmarkiertem Protein	31
3.7.2	Rekombinante Synthese von isotoopenmarkiertem Protein.....	31
3.7.3	Zellfreie Proteinsynthese mit Rapid Translation System (RTS).....	32
3.8	Diskontinuierliche Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektrophorese (SDS-PAGE).....	33
3.9	Zellaufschluss von <i>E.coli</i>	34
3.9.2	Zellyse durch French Press	35
3.10	Chromatographische Proteinreinigung.....	35
3.10.1	Affinitätschromatographie mittels einer Ni-Sepharose-Säule.....	36
3.10.2	Größenausschlußchromatographie mittels Superdex 200 10/300 GL Säule..	37
3.10.3	Größenausschlußchromatographie mittels Sephacryl High Resolution Mediums.....	37
3.11	Renaturierung und Reinigung von Proteinen.....	38
3.11.2	Präparation von FcRn.....	39
3.11.3	Präparation von FcγRIII.....	40
3.12	Protein-Glutamin-γ-Glutamyltransferase-Reaktion	41
3.13	NMR-Spektroskopie	42
3.13.1	¹ H-NMR-Spektroskopie.....	42
3.13.2	2D Heteronuclear Single-Quantum Correlation (HSQC) Experimente	43
3.13.3	Tripleresonanzexperimente	45
3.13.4	Sättigungstransfer Differenz (STD)-NMR-Spektroskopie.....	46

3.14	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS).....	47
3.14.1	Probenvorbereitung für massenspektrometrische Experimente	48
3.14.2	Durchführung der massenspektrometrische Experimente.....	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Etablierung von Expressionssystemen zur Präparation der Proteine β Mg, hFcRn und mFcRn	49
4.1.1	Klonierung unter Verwendung verschiedener Vektoren.....	49
4.1.2	Testexpressionen unter Verwendung verschiedener <i>E. coli</i> Stämme.....	53
4.2	Etablierung eines Expressionssystem zur Präparation des Fc γ RIII.....	56
4.2.1	Klonierung der extrazellulären Domänen des Fc γ RIII unter Verwendung verschiedener Vektoren.....	56
4.2.2	Untersuchung der Expressionstämme <i>E. coli</i> ER2566 und <i>E. coli</i> BL21 (DE3) unter Verwendung verschiedener Bedingungen für den Fc γ RIII.....	57
4.2.3	Klonierung der Bindedomäne des Fc γ RIII in den pET28a(+)-Vektor.....	58
4.2.4	Untersuchung des Expressionstamms <i>E. coli</i> BL21 (DE3) unter Verwendung verschiedener Bedingungen für die Fc γ RIII-BD.....	60
4.3	NMR-Spektroskopische Untersuchungen an β_2 -Mikroglobulin	61
4.3.1	Herstellung und Reinigung von β Mg	61
4.3.2	Protein-NMR-Spektroskopie zur Überprüfung der Faltung von β Mg und Aufnahme von Tripleresonanzexperimenten zur Resonanzzuordnung.....	63
4.3.3	Identifizierung des an der Tgasereaktion beteiligten Lysinrestes	64
4.3.4	Identifizierung des an der Tgasereaktion beteiligten Glutaminrestes	66
4.3.5	Massenspektrometrische Analysen zur Identifizierung von modifizierten Aminosäureresten.....	69
4.3.6	Inhibition der Tgasereaktion durch Methylamin.....	71
4.4	Herstellung und Reinigung von hFcRn	72
4.5	NMR-Spektroskopische Untersuchungen an Fc γ RIII.....	74
4.5.1	Herstellung und Reinigung von Fc γ RIII	75
4.5.2	Protein-NMR-Spektroskopie von Fc γ RIII zur Überprüfung der Proteinfaltung	78

Inhalt

4.5.3	NMR-spektroskopische Untersuchungen des Fc γ RIII/IgG-Komplexes	79
4.5.4	Identifizierung von Liganden des Fc γ RIII durch STD-NMR-Spektroskopie	80
5	Diskussion.....	83
5.1	Etablierung von Expressionssystemen	83
5.2	Präparation des β Mg und der Fc-Rezeptoren.....	85
5.3	NMR-Spektroskopische Untersuchungen an β_2 -Mikroglobulin	89
5.4	NMR-spektroskopische Untersuchungen an Fc γ RIII	96
5.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	97
6	Literatur.....	XIII
	Abbildungsverzeichnis	XXIII
	Tabellenverzeichnis	XXV
	Anhang	XXVI

Abkürzungsverzeichnis

Ahx	Aminohexanoyl
Aminosäuren	
A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin
Ap	Ampicilin
Ap ^R	Ampicilin-Resistenz
bp	Basenpaare
βMg	β ₂ -Mikroglobulin
CV	<i>colum volume</i> ; Säulenvolumen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
Fab	antigenbindendes Fragment
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fc	kristallisierbares Fragment
FcR	Fc-Rezeptor
FcγR	Fc-gamma-Rezeptor
FcγRIII	Fc-gamma-Rezeptor III
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
gpTgase	<i>engl. guinea pig</i> ; Tgase des Meerschweinchens
hFcRn	humaner FcRn
<i>inclusion bodies</i>	Einschlusskörperchen/Proteinaggregate
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-1-thiogalactopyranosid
ITAM	Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
ITIM	Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Inhibierungsmotiv
Kb	Kilobase

Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
Kn	Kanamycin
Kn ^R	Kanamycin-Resistenz
LB	<i>lysogeny broth</i> ; Luria-Bertani
mFcRn	muriner FcRn
MHC	<i>engl.</i> major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
mTgase	murine Transglutaminase
NMR	<i>engl.</i> nuclear magnetic resonance; Kernmagnetische Resonanz
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PIPES	2,2'-(Piperazin-1,4-diyl)bis(ethansulfonsäure)
ppm	<i>engl.</i> parts per million; Teile pro Million
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
STD	Sättigungstransfer Differenz
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tgase	Transglutaminase
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
u-	uniform markiert

Abstract

The binding of immunoglobulins to Fc-receptors is a key event in the regulation of the immune system. They interact with immunoglobulins acting as a bridge between the cellular and the humoral immune response. They are important for the regulation of the immune system, but, in case of autoimmunity, they contribute to pathogenicity. Thus, Fc receptors are prominent targets in the development of new immunotherapies against autoimmune diseases or allergies. Fc-receptors are membrane-bound proteins localized on immune cells, especially on effector cells of the innate immune system. Evidence suggests an important role of the neonatal Fc-receptor in the autoimmune disease epidermolysis bullosa acquisita, a skin blistering disease. The receptor and its small soluble subunit β Mg are widely spread in the body. Interestingly, β Mg is a substrate of transglutaminases, which di- and polymerizes β Mg. Since transglutaminases are ubiquitous proteins, they are also localized in the skin. The modulation of the FcRn function by transglutaminases can be of great interest in the treatment of autoimmune diseases. Interestingly in mouse models blocking of the Fc γ RIII homolog Fc γ RIV-receptor prevents the onset of the autoimmune disease epidermolysis bullosa acquisita. Based on that, the present study deals with characterization of modifications of β_2 -microglobulin by transglutaminases and examinations of modulations of Fc-receptors.

It is noteworthy that previously published protocols for the purification of such proteins were based on their isolation from inclusion bodies. Such methodology involves a renaturation step, plummeting the final protein yield. Therefore, the first goal of this project was the development of straightforward protocols to obtain the neonatal Fc-receptor (FcRn) and the Fc γ RIII-receptor as a soluble protein, as well the small subunit β_2 -microglobulin (β Mg).

In the present work, lysine 6 from β Mg has been identified as the one involved in the transglutaminase reaction, whereas the involved glutamine residue remains to be identified. The analysis of the crystal structure of β Mg in complex with FcRn showed that the dimerization of β Mg in complex with FcRn by transglutaminases is a rather unlikely event. Similar observations were made for other major histocompatibility complex class I-like molecules. Such improvable dimerization would inhibit the FcRn-IgG binding, whereas the binding of the albumin would remain unaffected.

The present data shows that investigation of the Fc γ RIII-IgG complex by NMR spectroscopy is not possible. However, Fc γ RIII alone is a suitable system for affinity studies by Saturation Transfer Difference (STD) NMR spectroscopy. In fact, a library of small fragments was screened, identifying some targets as potential inhibitors for the antibody-Fc γ RIII binding.

Zusammenfassung

Fc-Rezeptoren haben eine herausragende Bedeutung für das Immunsystem, da sie eine Brücke zwischen dessen humoralen und zellulären Komponenten bilden. Sie vermitteln als transmembranöse Rezeptoren Signale an das Zellinnere von Effektorzellen des Immunsystems, nachdem Sie Antikörper an ihrem Fc-Anteil gebunden haben. Da Fc-Rezeptoren auch Vermittler von Immunfehlregulationen sein können, sind diese als Ziel für Immuntherapien bei Autoimmunerkrankungen oder Allergien von Interesse. Im Falle der experimentellen Epidermolysis bullosa acquisita, einer antikörpervermittelten, blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut, wurde gezeigt, dass Mäuse mit einem Defekt des neonatalen Fc-Rezeptor weniger krank werden. Der Rezeptor und seine kleine Untereinheit β Mg sind im Körper weitverbreitet. β Mg ist interessanterweise ein Substrat der Transglutaminasen und wird durch diese dimerisiert, beziehungsweise polymerisiert. Dadurch könnte eine Modulation der FcRn-Funktion durch Transglutaminasen bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen von Interesse sein, denn dieses ubiquitär vorkommene Enzym ist auch in der Haut lokalisiert. Interessanterweise konnte der Ausbruch der Autoimmunkrankheit Epidermolysis bullosa acquisita im Mausmodell auch durch Blockierung des zum Fc γ RIII homologen Fc γ RIV-Rezeptors verhindert werden. In dieser Arbeit liegen daher die Schwerpunkte auf der Charakterisierung von Modifikationen von β 2-Mikroglobulin durch Transglutaminasen und Untersuchungen zur Modulation von Fc-Rezeptoren.

Die bisher veröffentlichten Präparationsprotokolle der in dieser Arbeit verwendeten Proteine ermöglichen eine Reinigung der Proteine aus *inclusion bodies*. Im Fokus dieser Arbeit war aufgrund dessen zunächst die Etablierung von Präparationsprotokollen, die es ermöglichen lösliche Proteine zu erhalten.

Mittels Magnetresonanzspektroskopie wurde Lysinrest 6 des β 2-Mikroglobulins als der an der Transglutaminasereaktion beteiligte Lysinrest identifiziert. Der an der Multimerisierung beteiligte Glutaminrest konnte nicht bestimmt werden. Durch die Lokalisation des K6 des β Mg in der Kristallstruktur des FcRn kann eine Dimerisierung des β Mgs durch Transglutaminasen und somit auch in Klasse I Haupthistokompatibilitäts (MHC I)-Komplexen als eher fraglich angesehen werden. Eine solche unwahrscheinliche Dimerisierung würde die Bindung des FcRn-Liganden IgG vermutlich unmöglich machen, während die Bindung des Liganden Albumin nicht beeinflusst werden würde.

Bei Analysen an dem Fc γ RIII-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass der Fc γ RIII-IgG-Komplexe nicht durch NMR-Spektroskopie untersucht werden kann. Des Weiteren wurde

gezeigt, dass der Fc γ RIII für STD-NMR-Spektroskopie geeignet ist. Es konnten kleine Moleküle einer Fragmentbibliothek als Liganden identifiziert werden, die als potentielle Inhibitoren der Antikörper-Fc γ RIII-Bindung in Betracht kommen.

1 Einleitung

Pathogene, die in den Organismus eingedrungen sind, werden durch Antikörper erkannt. Eine Bindung dieser Antikörper durch Fc-Rezeptoren führt zu einer Eliminierung des Pathogens und der Körper wird so vor schweren Infektionen geschützt. Es kann jedoch auch zu Fehlregulierungen des Immunsystems kommen, sodass Antikörper gegen körpereigene Strukturen gebildet werden, sogenannte Autoantikörper. Dies führt teils zu schwerwiegenden Erkrankungen. Bei der Epidermolysis bullosa acquisita handelt es sich um ein Beispiel einer Autoimmunerkrankung. Hier ist Kollagen VII das Autoantigen, welches die Basallamina der Haut mit dem darunterliegenden Gewebe verbindet. In den meisten Fällen handelt es sich bei den Autoantikörpern um IgG.¹⁻³ Die Bindung der Autoantikörper an Kollagen VII und anschließende komplexe Mechanismen führen zum Ablösen der verschiedenen Hautschichten.^{4,5} Die Behandlung solcher Autoimmunerkrankungen durch intravenöse Gabe von Immunglobulinen führt zu einer Linderung der Symptome. Diese Immunglobuline werden aus Blutplasma gewonnen und müssen in regelmäßigen Abständen immer wieder injiziert werden. Es besteht grundsätzlich die Gefahr der Übertragung von Krankheiten. Dies macht die Behandlungsmethode sehr kosten- und zeitintensiv. Daher werden alternative Behandlungsmethoden von Autoimmunerkrankungen gesucht. So ist die Modulation der Rezeptor/Antikörper-Bindung durch kleiner Moleküle oder Enzyme von vielversprechender Bedeutung.

1.1 Immunglobuline und ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen

Das Immunsystem dient der Erhaltung der körperlichen Gesundheit eines jeden Lebewesens durch Eliminierung von infektiösem Material. Immunglobuline sind Proteine, die der Erkennung von Antigenen dienen. Im Menschen gibt es fünf Isotypen von Immunglobulinen – IgG, IgA, IgE, IgD und IgM – die in verschiedenen Zellen des Körpers vorkommen. IgG ist der am häufigsten vorkommende Isotyp und dient der Eliminierung von Pathogenen. IgA hingegen kommt in äußeren Sekreten wie Speichel, Tränen und Schleim von Bronchien und Darm vor und ist dort der wichtigste Antikörper. Dem Schutz vor Parasiten dient IgE. Dieser Antikörper ist jedoch auch für Allergien verantwortlich. IgM taucht nach Kontakt mit einem Antigen als erster im Serum. Die Funktionen des IgD sind bisher noch nicht bekannt.

Immunglobuline bestehen aus zwei antigenbindende Fragmenten (Fab), welche durch eine Hingeregion mit dem kristallisierbaren Fragment (Fc) verbunden sind (Abbildung 1). Die Aufgabe der Fab-Fragmente ist es Antigene zu erkennen und zu binden (opsonieren). Dieser Teil des IgG variiert abhängig von dem zu erkennenden Antigen. Das Fc-Fragment hingegen ist hoch konserviert und stellt einen Liganden für eine Vielzahl anderer Proteine dar. Es wird zum Beispiel durch Effektormoleküle der Immunzellen gebunden und koppelt so die Erkennung der Antigene mit der Immunantwort.

Pathogene oder Antigene, die in den Körper eingedrungen sind, werden durch Immunglobuline erkannt und gebunden. Dadurch entstehen Immunkomplexe. Diese werden wiederum durch Rezeptoren auf Immunzellen gebunden und eine Immunantwort wird ausgelöst. Hierbei erkennen und binden die membrangebundenen Rezeptoren den Fc-Teil der Immunglobuline, weshalb sie Fc-Rezeptoren (FcR) genannt werden. FcR spielen eine wichtige Rolle in der Immunregulation, da sie die humorale mit der zellulären Immunantwort verbinden.⁶ Die humorale Immunantwort basiert auf Plasmaproteinen, wie Antikörper und Interleukine. Die zelluläre Immunantwort erfolgt durch spezialisierte Immunzellen, wie Granulozyten, natürliche Killerzellen und T-Zellen.

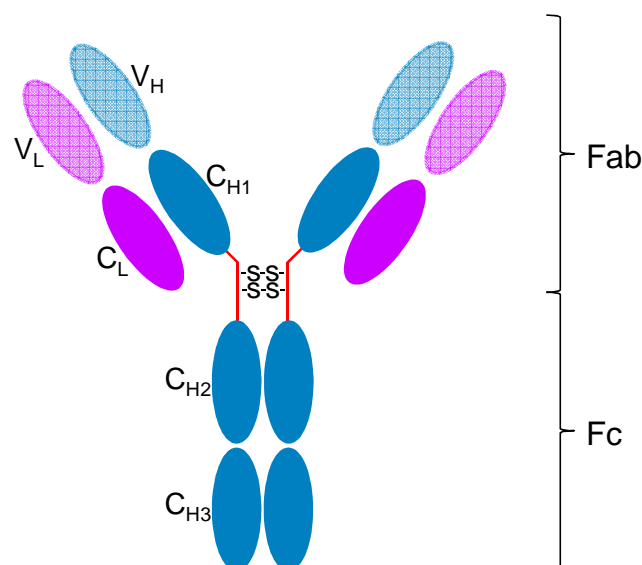


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Immunglobulin G (IgG). IgG besteht aus zwei identischen leichten Ketten (lila) und zwei identischen schweren Ketten (blau). Diese sind innerhalb der Hingeregion (rot) durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. IgG-Moleküle können in das Fab- und Fc-Fragment unterteilt werden, wobei das Fc-Fragment aus konservierten Domänen (C) der schweren Kette besteht. Die Fab-Fragmente bestehen hingegen jeweils aus einer konservierten Domäne und einer variablen Domäne (V; schraffiert) der leichten und der schweren Kette. Die variablen Domänen bilden die Antigenerkennungsstelle.

Die Entdeckung, dass einige pathogene Bakterien das Wirts-Fc-Fragment binden,^{7,8} vermutlich um sich vor einer Immunantwort zu verbergen, unterstreicht die Bedeutung des Fc-Fragments für das Immunsystem.

Eine Immunantwort resultiert aus dem ausbalancierten Zusammenspiel von positiven und negativen Signalen, welche die Stärke der resultierenden Immunantwort bestimmen und welche einen Einfluss auf das angeborene und das adaptive Immunsystem haben.⁹ Die Immunantwort muss stark und lang genug sein um Pathogene zu eliminieren, gleichzeitig muss sie aber spezifisch genug sein, um nichtinfizierte oder gesunde Gewebe zu verschonen. Wenn positive Signale überwiegen, folgen Zellaktivierung und pro-entzündliche Prozesse, die zu einer Eliminierung der Pathogene bzw. Antigene führen. In Abwesenheit solcher positiver Signale ist die Zellaktivierung blockiert und anti-entzündliche Prozesse können stattfinden.

Eine Störung dieses sensiblen Systems kann zu anormalen Antworten führen. Dies kann zu einer Immunantwort gegen nicht Pathogene – einer Allergie – führen, oder das Immunsystem richtet Antikörper spezifisch gegen körpereigene Stoffe, sogenannte Autoantigene, und es kommt zu einer Autoimmunerkrankung. In diesem Fall spricht man von Autoantikörpern. Es gibt viele Möglichkeiten, wie eine ausbalancierte Signalgebung durch aktivierende und inhibierende FcR gestört werden kann: von anormaler Rezeptorexpression bis zu allelischen Varianten der Rezeptoren, die dann unterschiedliche Affinitäten für bestimmte Antikörperisotypen aufweisen.¹⁰⁻¹²

1.2 Die Funktion der Fc-Rezeptoren

Fc-Rezeptoren (FcR) sind Proteine, die auf den Oberflächen verschiedener Zellen des Immunsystems zu finden sind, wie Makrophagen, Neutrophilen und natürliche Killerzellen. Sie binden die Fc-Region von Antikörpern und verbinden so die zelluläre mit der humoralen Immunantwort. Wurde ein Antigen oder Pathogen durch einen Antikörper erkannt (Opsonisierung) so werden die opsonisierten Antigene durch membranständige Fc-Rezeptoren gebunden, was zu einer Ansammlung dieser führt.^{13,14} Durch diesen Prozess wird eine Verlagerung in Cholesterin-reiche Mikrodomänen der Zellmembran induziert. Diese Mikrodomänen sind im Cytoplasma mit Signalmolekülen wie die SRC-Tyrosinkinasen angereichert. Tyrosinreste im cytoplasmatischen Teil der Rezeptoren werden durch diese Kinasen phosphoryliert, was zur Bildung einer SH2-Domäne führt. Diese Domäne stellt eine Bindungsstelle für weitere Kinasen dar und eine Signalkaskade wird ausgelöst. Dadurch

kommt es zu einer Aktivierung oder Inhibierung der Immunantwort.^{13,15} Die Art der beteiligten SRC-Kinase, des induzierten Signals und die daraus resultierende Effektorantwort ist abhängig von dem beteiligten Zell- und Rezeptortyp und der Antikörper-Unterklasse. Die durch die Signalkaskade ausgelösten Effektorfunktionen der FcR sind unter anderem die Endozytose von Immunkomplexen, die Regulation der Antikörperproduktion, Verbesserung der Antigenpräsentation, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder die Freigabe von inflammatorischen Mediatoren, die andere immunkompetente Zellen aktivieren.⁶

Obwohl die humane Familie der FcR durch Genduplikationen und Divergenz zahlreich ist,¹⁶ sind die Familien in verschiedenen Spezies gut konserviert.¹¹ Fc-Rezeptoren werden anhand der Antikörper, die sie erkennen, klassifiziert (Tabelle 1). Alle Fc-Rezeptoren gehören zu der immunoglobulinähnlichen Superfamilie, mit Ausnahme des Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten FcγRIIB und des neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn) welcher zu den Klasse I Haupthistokompatibilitäts-Komplex ähnlichen Rezeptoren gehört.

In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Fcγ-Rezeptoren gelegt, die im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

Tabelle 1: Übersicht der häufigsten Fc-Rezeptor Typen mit Angabe der zubindenden Antikörper

Antikörper	Rezeptor	Mitglieder
IgA	FcαR	FcαRI (CD89)
IgD	FcδR	
IgE	FcεR	FcεRI FcεRII (CD23)
IgG	FcγR	FcγRI (CD64) FcγRIIA (CD32) FcγRIIB1 (CD32) FcγRIIB2 (CD32) FcγRIIA (CD16a) FcγRIIB (CD16b) FcRn (neonatal)
IgM	FcμR	

1.3 Die Fc γ -Rezeptoren

Die Familie der Fc-Rezeptoren für IgG, die Fc γ -Rezeptoren (Fc γ Rs), umfasst mehrere Mitglieder, welche sich auf Grund ihrer unterschiedlichen molekularen Struktur, ihrer Antikörperbindungsaffinität und ihrer IgG-Unterklassenspezifität unterscheiden.^{17,18} Die Fc γ -Rezeptoren umfassen die aktivierenden und einen inhibierenden Rezeptor(en). Aktivierende Rezeptoren sind charakterisiert durch die Anwesenheit eines cytoplasmatischen Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM), das entweder im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors liegt, oder aber als Untereinheit assoziiert ist. Vom Zelltyp abhängig variieren die assoziierten Signaladaptormoleküle, wobei die γ -Kette, das am häufigsten vorkommende Adaptormolekül ist. Bei den meisten aktivierenden FcR reicht die Affinität für monomere Immunglobuline nicht für eine stabile Bindung und der Induktion des Signalweges aus, sodass eine unspezifische Aktivierung der Signalkaskaden verhindert wird. Zur Auslösung von Aktivierungssignalen ist daher die Coaggregation der Rezeptoren durch Bindung von Immunkomplexen notwendig.

Der inhibierende Rezeptor ist ein Einkettenmolekül und besitzt ein cytoplasmatisches Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Inhibierungsmotiv (ITIM).^{17,19,20} Durch Coaggregation mit dem ITAM im Cytoplasma wird das ITIM phosphoryliert und die aktivierende Signalkaskade inhibiert.²¹ Diese zwei Arten der Rezeptoren agieren zusammen und werden in der Regel auf der Zelloberfläche coexprimiert und weisen eine vergleichbare Affinität und Spezifität auf.¹⁷ Dies ist für ein ausgeglichenes Immunsystem wichtig, um die Effektorzellantwort durch simultan ausgelöste aktivierende und inhibierende Signalwege zu regulieren. Die relative Affinität der Antikörperisotypen zu den spezifischen FcR und das Expressionslevel der aktivierenden und inhibierenden FcR sind Faktoren, die bei der Coaktivierung bestimmen, ob eine Immunantwort in einer Zellaktivierung oder -inhibierung resultiert.¹¹

Unterteilung humaner Fc γ -Rezeptoren

Humane Fc γ -Rezeptoren können in 3 Typen – Fc γ RI, Fc γ RII und Fc γ RIII – unterteilt werden (Abbildung 2). Der Fc γ RI weist, im Vergleich zu den anderen Fc γ Rs, die höchste Affinität ($K_D=10^{-8}$ M) für IgG auf. Dies ist vermutlich auf seine 3 Ektodomänen (je 10 kDa) zurückzuführen.²² Er wird konstitutiv auf Monozyten und Makrophagen exprimiert und kann auf Neutrophilen und Eosinophilen induziert werden. Es gibt vier verschiedene Isoformen – Fc γ RIA, Fc γ RIB1, Fc γ RIB2 und Fc γ RIC.

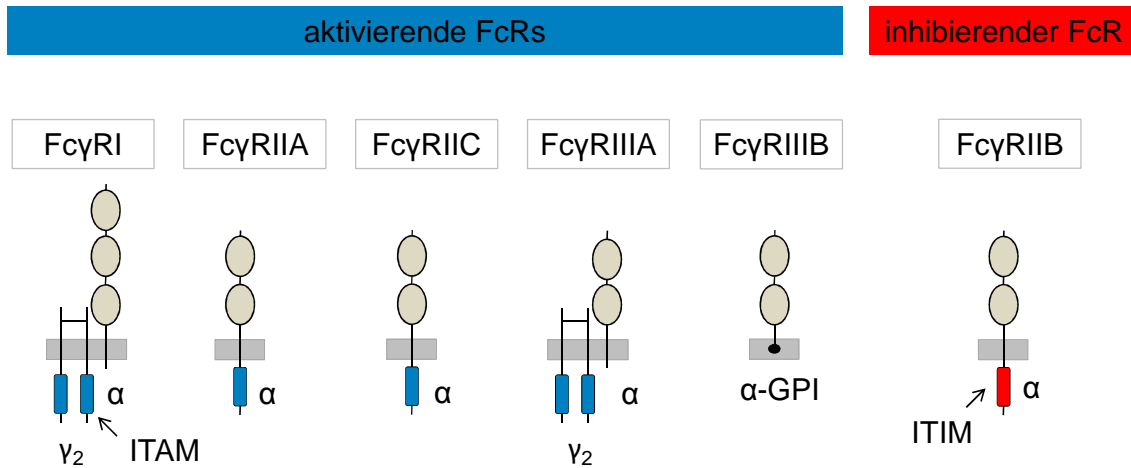


Abbildung 2: Schematische Darstellung der humanen IgG Fc-Rezeptor Familie. Die Fc-Rezeptoren können anhand ihrer induzierten Signalwege unterschieden werden. Die aktivierenden Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIIIA bestehen aus einer ligandenbindenden α -Kette und ein signalweiterleitenden γ -Kette, welche das cytoplasmatische Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM; blau) trägt. Die Fc γ RIIA und Fc γ RIIC Rezeptoren tragen dieses ITAM in ihrer cytoplasmatischen Domäne, der ligandenbindenden α -Kette. Der inhibierende Rezeptor, der Fc γ RIIB, besitzt ein Immunorezeptor Tyrosin-basiertes Inhibierungsmotiv (ITIM; rot) innerhalb seiner cytoplasmatischen Domäne. Außerdem gibt es einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten Rezeptor, den Fc γ RIIIB. Dieser Rezeptor besitzt kein ITAM und kann keine Signalkaskade selber auslösen.

Fc γ RII Rezeptoren werden auf unterschiedlichen immunkompetenten Zellen exprimiert. Dort ist ihre Hauptfunktion die Endozytose von Immunkomplexen. Es gibt mindestens sechs Isoformen – Fc γ RIIA1, Fc γ RIIA2, Fc γ RIIB1, Fc γ RIIB2, Fc γ RIIB3 und Fc γ RIIC. Die Fc γ RII Rezeptoren besitzen nur zwei Ektodomänen, wobei Fc γ RIIA und Fc γ RIIB hier eine 93%ige Übereinstimmung ihrer Aminosäuren aufweisen. Dennoch unterscheiden sie sich in ihren Bindungscharakteristiken für humane und murine IgG-Unterklassen¹⁸ und ihrer Affinität für humanes IgG.²³ Ein weiterer wichtiger Unterschied dieser zwei Formen ist im cytoplasmatischen Teil lokalisiert. Der Fc γ RIIA enthält hier ein ITAM, wobei der Fc γ RIIB ein ITIM enthält.¹⁴

Der Fc γ RIII lässt sich in zwei Formen unterteilen, der transmembrane Fc γ RIIIA Rezeptor ist assoziiert mit der ITAM enthaltenen γ -Kette. Hingegen ist der Fc γ RIIIB durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert. Dieser Rezeptor kann eine Signalkaskade nicht selber hervorrufen, da ihm die direkte Verbindung zum Cytoplasma fehlt. Er braucht vermutlich assoziierte Proteine um Signale in die Zelle weiterzugeben. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Formen in ihrem Vorkommen. Der Fc γ RIIIA wird auf T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert, der Fc γ RIIIB hingegen auf Neutrophilen.

Fc γ RII und Fc γ RIII Rezeptoren binden IgG mit geringer Affinität ($K_D=10^{-6}$ - 10^{-7} M), im Vergleich zum Fc γ RI.²⁴ Die geringere Affinität wird durch das Vorhandensein von nur zwei Ektodomänen erklärt, im Vergleich zu den drei Ektodomänen des Fc γ RI.²²

Bemerkenswerterweise kommen alle drei Fc γ Rs-Typen im Serum und anderen Körperflüssigkeiten auch als lösliche Formen (sFc γ Rs) vor.²⁵ Sie werden durch Proteolyse,²⁶ alternatives Splicing der Prä-RNA²⁷ oder Expression unterschiedlicher Gene¹⁸ generiert. Sie übernehmen vermutlich eine physiologische Rolle in der Immunregulation, da die Antikörperproduktion in Zellkulturen durch sie unterdrückt wird.

FcR als Ziel von Immuntherapien

FcR können auch Vermittler von Immunfehlregulationen sein und spielen eine entscheidende Rolle im Immunsystem, dies macht sie zu interessanten Zielen für Immuntherapien und potentiellen Inhibitoren bei Autoimmunerkrankungen, bei der Tumortherapie und Allergien. Abhängig von der Funktion der FcR wird entweder eine Steigerung oder Herabsetzung der Affinität der FcR/Immunoglobulin-Interaktion angestrebt. So wurde in den letzten Jahren unter Verwendung verschiedener Techniken, wie Peptidlibrary-Screening, kombinatorischer Chemie²⁸ und die Verwendung der sFc γ RIII/hFc1-Komplexstruktur²⁹ zur Extraktion von Peptiden,³⁰ die Entwicklung neuer Inhibitoren der FcR/IgG-Interaktion angestrebt. Im Vergleich zu IgG weisen jedoch all diese Inhibitoren eine sehr viel geringere Affinität zum Rezeptor auf.

Es konnte gezeigt werden, dass der Fc γ RIIIB und der neonatale Rezeptor Schlüsselmoleküle bei Autoantikörper vermittelter Erkrankungen sind. Weshalb auf diese im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.3.1 Strukturelle Aspekte des Fc γ RIIIB

Humane Fc γ RIII Rezeptoren haben ein apparentes Molekulargewicht von 50-80 kDa und sind umfangreich glykolysierte Proteine. Fc γ RIII Rezeptoren binden IgG in Form von Immunkomplexen mit einer Spezifität für IgG1 und IgG3.^{17,18,31} Trotz ihrer unterschiedlichen Membranverankerung kodieren Fc γ RIIIA und Fc γ RIIIB in ihren Ektodomänen strukturell fast identische Proteine, deren Aminosäuresequenzen sich jedoch unterscheiden. So ist das Vorhandensein eines Serins an Position 185 beim Fc γ RIIIB verantwortlich für das Signal zur

Anlagerung eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers.^{17,18} Weitere Unterschiede in den Aminosäuresequenzen sind für unterschiedliche posttranslationale Modifikation wie *N*-Glykosylierungen und die Lokalisierung in der Membran verantwortlich.³² FcγRIIB besitzt keine transmembran- und cytoplasmatische Region. Somit kann eine Immunantwort nicht direkt durch den Rezeptor hervorgerufen werden. Es ist bis jetzt noch nicht verstanden, wie FcγRIIB das Signal in die Zelle überträgt. Verschiedene Proteine stehen im Verdacht, zur Signaltransduktion mit dem FcγRIIB zu assoziieren, so zum Beispiel der Typ 3-Rezeptor,³³ der Formylpeptide-Rezeptor³⁴ oder FcγRIIA.

Bindungsstöchiometrie und Struktur des FcγRIIB

Das Fc-Fragment der Immunglobuline ist ein Homodimer. Dessen Kristallstruktur zeigt eine Symmetrieachse zwischen den Monomeren,³⁵ deshalb wäre eine 2:1 Stöchiometrie bei der Bindung von FcγR an ein IgG wahrscheinlicher als eine 1:1 Stöchiometrie. Tatsächlich ist bei allen bislang kristallisierten Proteinen/Fc-Fragment-Komplexen eine 2:1 Stöchiometrie nachgewiesen worden.^{7,8,36-39} Es liegt also nahe, dass FcγRs Fc-Fragmente ebenso in einer 2:1 Stöchiometrie binden. Jedoch scheint eine Bindung eines Immunglobulins durch zwei FcR auf der Membran für das Immunsystem weniger sinnvoll, da zur Initialisierung der Signalkaskade eine Aggregation der FcR von Nöten ist. Die Bindung mit einer 2:1 Stöchiometrie könnte bereits zu einer Auslösung der Signalkaskade führen, ohne dass die FcR aggregiert sind. Der Durchbruch zum Verständnis der FcγR-Bindung zum Fc-Fragment vom IgG gelang durch die Bestimmung der Kristallstruktur des sFcγRIIB-Komplexes mit dem Fc-Fragment des IgG1.^{29,40} Die Kristallstruktur zeigt eine 1:1 Stöchiometrie für die IgG1-FcγR Interaktion.

In der Struktur des FcγRIII sind die zwei extrazellulären immunoglobulinähnlichen Domänen um 50-55° abgewinkelt und zeigen eine charakteristische herzförmige Domänenanordnung, wie sie bereits für andere FcR beschrieben wurde.^{39,41,42} In der Komplexstruktur ist der Rezeptor zwischen zwei C_{H2}-Domänen des Fc-Fragmentes gebunden, wobei ausschließlich zwei Reste des Linkers und die C-terminale Domäne 2 des FcγRIII an die beiden N-terminalen Spitzen der C_{H2}-Domänen und der Hingeregion des Fc-Fragmentes binden (Abbildung 3).²⁹

Die 1:1 Stöchiometrie kann damit erklärt werden, dass der FcR nahe der Symmetrieachse des Fc-Fragments bindet. Dort interagiert der Rezeptor mit einem oder mehreren Resten des Fc-Fragments, welche in beiden schweren Ketten gefunden werden. So ist die Bindung eines zweiten FcR blockiert. Zweitens induziert die Bindung des FcγR eine Öffnung des hufeisenförmigen Fc-Moleküls. Die Orientierung der C_{H3}-Domänen bleibt zwar nahezu

unverändert, aber die C_{H2} -Domänen werden verlagert und die Distanz zwischen den beiden Prolin 329-Resten an den Spitzen der C_{H2} -Domänen vergrößert sich um 7 Å, wobei die C_{H2B} -Domäne eine deutlichere lokale Veränderung erfährt als die C_{H2A} -Domäne. Diese allosterische Veränderung innerhalb des Fc-Fragments, welches die Symmetrie des Fc-Fragments zerstört, führt ebenfalls dazu, dass ein zweiter FcR nicht mehr binden kann.^{29,43} Beide Prozesse sichern eine 1:1 Stöchiometrie des Komplexes. Durch die Bindung des Rezeptors an das Fc-Fragment erfährt aber auch der Rezeptor eine strukturelle Veränderung und öffnet sich ebenfalls.

Der sFcγRIII bindet das Fc-Fragment mit der Schleife seiner C-terminalen zweiten Domäne (B/C: W 110 – A 114; F/G: V 155 – K 158), dem C-Strang (H 116 – T 119) und den C'-Strang (D 126 – H 132). Auch sind Aminosäurereste der Hingeregion zwischen den beiden Domänen an der Bindung beteiligt. Diese Regionen interagieren mit Schleifen der C_{H2B} -Domäne (B/C: D 265 – E 269; C'/E: N 297 – T 299) und mit der F/G-Schleife (A 327 – I 332) der C_{H2A} -Domäne des IgG, sowie einigen Aminosäureresten der Hingeregion (L 234 – S 239) beider schwerer Ketten.

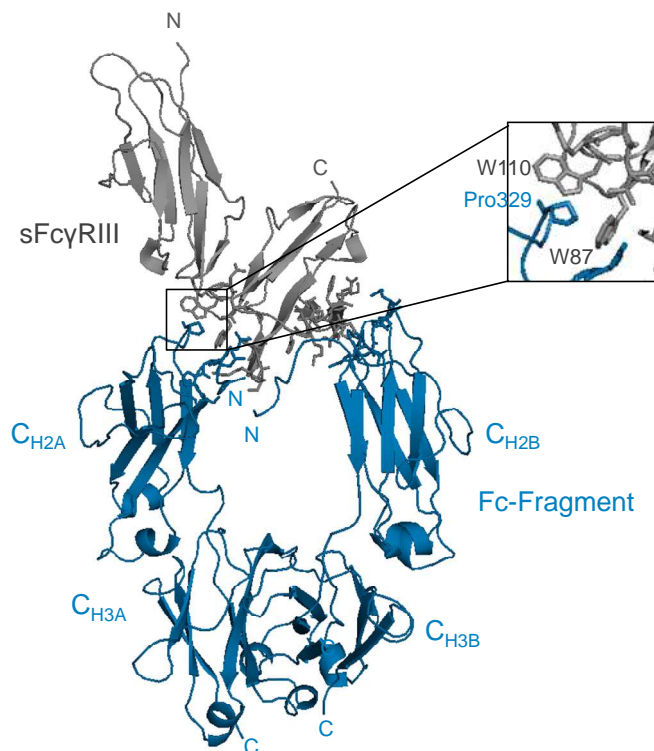


Abbildung 3: Kristallstruktur des sFcγRIII/Fc-Komplexes. In grau dargestellt sind die löslichen Domänen des FcγRIII (sFcγRIII), die im Komplex mit dem Fc-Fragment (blau) von humanem IgG sind. Die Seitenketten der Aminosäurereste, die an der Bindung beider Partner beteiligt sind, sind zur Verdeutlichung der Binderegion im Stäbchenmodell dargestellt. Das „Prolinsandwich“, bestehend aus Pro 329 der C_{H2A} -Domäne und den Trp 87 und Trp 110 des sFcγRIII, ist zur besseren Übersicht vergrößert dargestellt. Zur besseren Orientierung im Komplex wurden die verschiedenen N- und C-Termini markiert. Die Struktur wurde mittels des PDB-Eintrages: 1E4K und dem Programm PyMOL dargestellt.

Die Interaktionsfläche zwischen dem Fc γ RIII und dem Fc-Fragment ist, wie auch für andere Fc γ R/IgG-Komplexe vorausgesagt, mit 895 Å sehr groß.⁴⁴ Jedoch konnten innerhalb der einzelnen Reste keine starken Wechselwirkungen gefunden werden. Als primäre Bindungsstelle wurde ein „Prolinsandwich“ identifiziert. Hier liegt der Prolinrest 329 der C_{H2A}-Domäne des Fc-Fragments zwischen zwei Tryptophanresten – Trp 87 und Trp 110 – (Abbildung 3). Dieses Motiv wird in allen murinen und humanen Fc γ Rs und auch im Homologen sFc ϵ RIA und deren jeweiligen Immunoglobulin-Liganden wiedergefunden.^{29,45}

Rekombinante Herstellung von Fc-Rezeptoren

Eine Herausforderung bei Untersuchungen von Fc-Rezeptoren stellt deren rekombinante Herstellung in eukaryotischen Expressionssystemen dar, da die Rezeptoren ohne ihre Transmembranregionen nur unlöslich exprimiert werden können. Alternativ wurde die Expression in *Escherichia coli* in *inclusion bodies* und anschließender Renaturierung des Proteins durchgeführt.²³ Trotz der fehlenden Glykolysierungen gelang es aktive Rezeptoren herzustellen, die IgG binden konnten.

Durch die fehlenden Glykolysierungen des prokaryotisch exprimierten sFc γ RIII, zur Verwendung für die Kristallstruktur, ist der molekulare Mechanismus der Komplexbildung jedoch weiterhin nicht vollständig verstanden. So liegt nahe der Binderegion am Asparagin 159 eine potentielle N-Glykosylierungsstelle und große Kohlehydratmotive könnten die Affinität für IgG beeinflussen. Jedoch liegt die Affinität des kristallisierten, nicht glykolysierten sFc γ RIII für das Fc-Fragment im Rahmen für glykolysierte sFc γ RIII.^{23,29}

Modulation der Fc-Rezeptor-Antikörper-Bindung

Die Blockierung der Wechselwirkung des Rezeptors mit den Antikörpern ist für Immuntherapien von großem Interesse. Hierbei sind Peptide, die spezifisch an die Fc-Binderegion binden und so die Wechselwirkung mit dem Rezeptor verhindern, von besonderer Bedeutung. So wurde ein zyklisches Peptid entdeckt, das spezifisch an Fc γ RI bindet.⁴⁶ Ebenfalls ist ein Tripeptid bekannt, das durch Bindung an Fc γ RIII inflammatorische Eigenschaften hervorruft.^{47,48} Der Ausbruch der Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita konnte im Mausmodell durch Blockierung des zum Fc γ RIII homologen Fc γ RIV-Rezeptors verhindert werden.⁴⁹ Dies macht den Fc γ RIII zu einem interessanten Ziel bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Durch die Lösung der IgG/Fc γ RIII-Kristallstruktur ergeben sich neue Möglichkeiten spezifische Ziele der Immuntherapien zu identifizieren.

Entgegen des Fc γ RIII kann der FcRn keine Immunantwort auslösen, dennoch ist dieser Fc-Rezeptor von großem Interesse, da er für den Transport von IgG über die Zellmembranen an die gegenüberliegende Zelloberfläche entscheidend ist. Außerdem ist er für das Recycling seiner Liganden IgG und Albumin verantwortlich und trägt so, im Vergleich zu anderen Serumproteinen, zu einer längeren Halbwertszeit dieser bei. Da der Schutz vor Degradation bei Autoantikörpern unerwünscht ist, ist der FcRn zur Entwicklung von Therapien bei Autoimmunerkrankungen in den Fokus gerückt. Dieser Rezeptor soll deshalb im Folgenden näher betrachtet werden.

1.3.2 Strukturellen Aspekte des neonatalen Fc-Rezeptors und seine Aufgaben

Der Brambell-Rezeptor, besser bekannt als der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn), ist beim Transport von mütterlichem IgG zu ihrem Fötus durch die Plazenta^{50,51} oder über die Muttermilch zu ihrem Kind involviert.⁵²⁻⁵⁴ Er wird auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert, wie APCs (Antigen presenting cells),⁵⁵ vaskuläre Endothelzellen,⁵⁶ und einer Reihe von epidermalen Zellen wie Keratinozyten,⁵⁷ Melanozyten, Histozyten und Dendritische Zellen,⁵⁸ sowie in Darm, Niere und Lunge. Dieser Rezeptor bindet genau wie die Fc γ Rs IgG und schützt diese sowie das Serumprotein Albumin vor dem Katabolismus. Ebenfalls vermittelt der FcRn die bidirektionale Transzytose von IgG durch Epithelzellen und IgG-Recycling an die Membran.^{59,60} Diese Verschiebung findet möglicherweise im Darmgewebe statt, wo IgG ins Darmlumen transzytosiert wird, dort Antigene bindet und der entstandene Immunkomplex durch reverse Transzytose über die Zellbarriere zu Dendritischen Zellen transportiert wird.⁶¹ So findet der durch den FcRn vermittelte Transport nicht ausschließlich für monomere Liganden, sondern auch für Immunkomplexe statt. Dies ermöglicht eine effiziente Initiation der Immunantwort. Auch ein Passieren der Blut-Hirn-Schranke ist auf diesem Wege für Plaque gebundene Antikörper möglich.⁵²

Der FcRn, ist strukturell ähnlich dem Klasse I Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) und ist assoziiert mit β_2 -Mikroglobulin (β Mg).^{36,54,62} Ähnlich zu MHC Klasse I besitzt der FcRn drei extrazelluläre alpha (α) Domänen, eine *singlepass*-Transmembrandomäne und einen kurzen cytoplasmatischen Teil, bestehend aus 44 Aminosäuren. Alle drei extrazellulären Domänen sind über nicht kovalente Wechselwirkungen mit β Mg assoziiert, wobei die α 1- und α 2-Domänen auf der α 3-Domäne und dem β Mg sitzen (Abbildung 4).⁶³ Im Unterschied zu klassischen MHC-I Molekülen ist in der FcRn-Struktur die Peptidbindungsfurche kollabiert, so dass eine durch den FcRn vermittelte

Antigenpräsentation unwahrscheinlich ist.³⁶ Die Assoziierung mit dem β Mg findet im endoplasmatischen Retikulum statt und ist essentiell für die Faltung, den Weitertransport und die Funktion des Rezeptors.^{64,65} Fehlt diese Assoziation so kommt es zu Disulfidbrückengebundener FcRn-Oligomere, die im endoplasmatischen Retikulum verbleiben und vermutlich degeneriert werden.^{64,66}

Bindung des IgG

Im Gegensatz zu den konventionellen Fc γ Rs findet die IgG Bindung an den FcRn in pH-Abhängigkeit statt. Der Fc-Part des IgG bindet mit hoher Affinität bei einem sauren pH von 6,0-6,5 an den FcRn, aber nicht bei einem neutralen oder höheren pH.^{67,68} Die Bindung an das Fc-Fragment erfolgt entfernt der Bindestelle der klassischen Fc γ R³⁶ an einer Region, an die auch andere Proteine wie Protein A⁷ und Protein G⁶⁹ sowie ein rheumatischer Faktor (Autoantikörper des Isotyp IgM)³⁷ binden. Der FcRn erfährt im Gegensatz zu den klassischen Fc γ Rs keine großen Konformationsänderung durch die Bindung von IgG.⁷⁰ Stattdessen beruht die starke pH-Abhängigkeit der FcRn-Fc-Bindung auf der Titration von Histidinresten der C_{H2}-C_{H3}-Hingeregion des IgG und deren Interaktion mit sauren Resten des FcRn. Bei saurem pH formen die protonierten Histidinreste H310 und H435 des IgG Salzbrücken mit Resten des FcRn. Hierbei sind die Reste E115, E130, W131, E133 und I135 des humanen FcRn Teil dieser Bindung. Aber auch das I1 des β Mg interagiert mit dem hydrophoben Rest 309 des IgG (Abbildung 4).⁶³

Bei physiologischem pH werden die Histidinreste hingegen deprotoniert und so wird die Dissoziation des Liganden vom Rezeptor ermöglicht. Wobei die exakte Anzahl der titrierbaren Reste im IgG und der an der Bindung beteiligten Reste des FcRn von der Spezies und dem Antikörper-Isotypen abhängig ist.⁷¹ So agiert das hydrophobe I253 des IgG mit dem W133 des FcRn in Ratten,⁵² wobei dieser Rest in humanem FcRn fehlt.

Die FcRn Interaktionen mit IgG beruhen somit auf hydrophoben Wechselwirkungen, die pH-abhängig durch Salzbrücken stabilisiert werden. Die pH-abhängige Bindung des IgGs ermöglicht den Transport entgegen eines IgG-Konzentrationsgradienten.

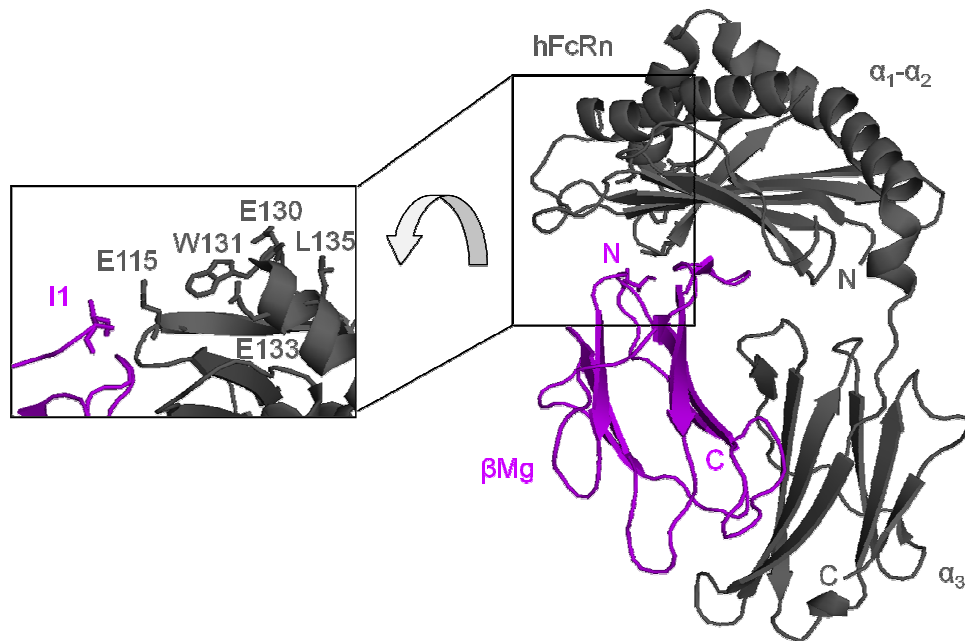


Abbildung 4: Kristallstruktur der extrazellulären Domänen des humanen neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn). In grau dargestellt sind die drei extrazellulären Domänen des FcRn, die mit dem β_2 -Mikroglobulin (β Mg, lila) assoziiert sind. Die Seitenketten der Aminosäurereste, die an der Bindung des Immunoglobulin beteiligt sind, sind zur Verdeutlichung der Binderegion vergrößert, im Stäbchenmodell und von einem anderen Blickwinkel aus dargestellt. Des Weiteren wurden die N- und C-Termini der verschiedenen Ketten markiert. Die Struktur wurde mittels des PDB-Eintrages: 1EXU und dem Programm PyMOL dargestellt.

IgG- und Albumin-Homöostase

Eine wichtige Rolle des FcRn liegt in der IgG- und Albumin-Homöostase. Diese beiden Proteine machen 80% der Proteinmasse im Plasma aus und haben die längste Halbwertszeit aller Serumproteine. Da diese Proteine in großen Mengen im Körper benötigt werden, ist es sinnvoll diese vor dem Abbau zu schützen. So recycelt der FcRn die Menge Albumin am Tag, die produziert wird.⁷² Hingegen ist die Menge des durch den FcRn recycelten IgGs viermal so hoch wie die täglich produzierte Menge.⁷³ Nach der Aufnahme des IgGs oder des Albumins in die Zelle durch Pinozytose kann der Rezeptor im sauren Endosom seinen Liganden binden. Hierdurch können IgG und Albumin von den anderen Komponenten abgesondert werden. Der FcRn transportiert sie dann an dieselbe oder an die gegenüberliegende Zelloberfläche und setzt sie im basischen Milieu des Blutes wieder frei (Abbildung 5). So schützt der FcRn seine Liganden vor dem lysomalen Abbau. Dies ist eine Erklärung für die höhere Halbwertszeit von IgG im Blut, verglichen mit anderen Serumproteinen. Der genaue Mechanismus dieses Transports ist jedoch weiterhin unbekannt.

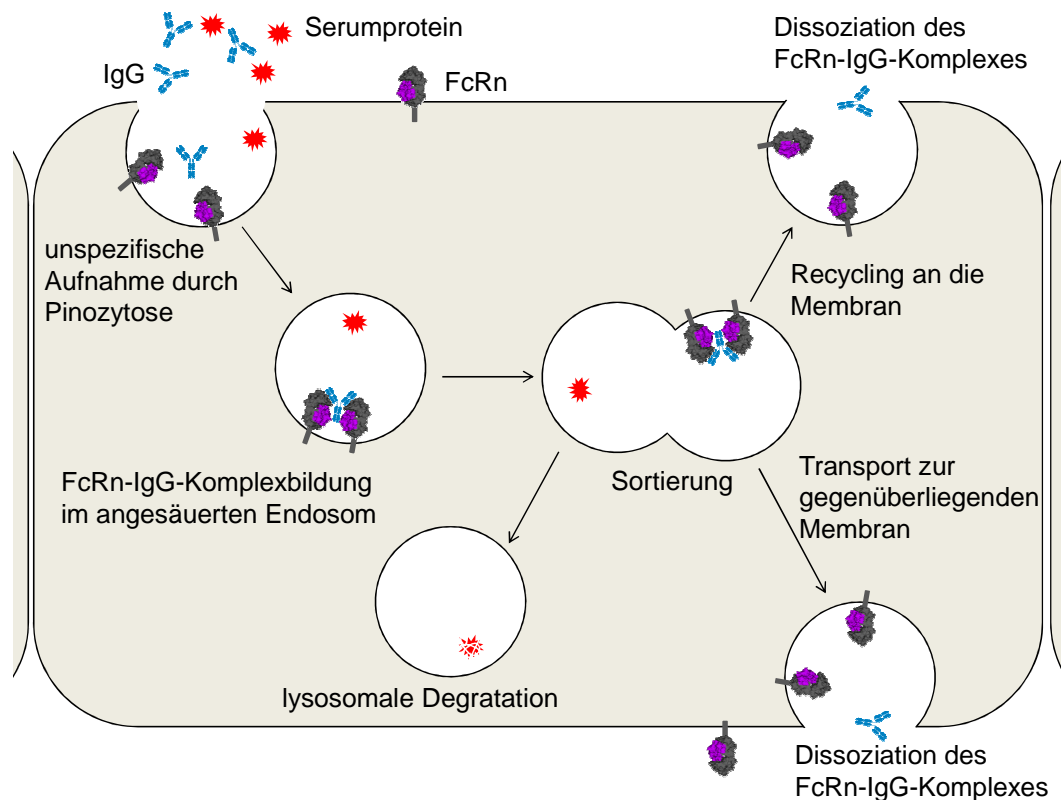


Abbildung 5: FcRn vermittelter bidirektionaler Transport und Membranrecycling von IgG in Epithelzellen. IgGs (blau) sowie andere Serumproteine (rot) werden bei physiologischem pH passiv durch Pinozytose aus dem extrazellulären Raum in die Zelle aufgenommen. Durch die Ansäuerung des Endosoms entstehen Konditionen, die die Bindung des FcRn (assoziiert mit β Mg; grau/lila) an das Fc-Fragment des IgG ermöglichen, wobei zwei FcRn-Moleküle ein IgG binden. Anschließend wird das IgG entweder an die gleiche Zellmembran recycelt oder es wird an die gegenüberliegende Zellmembran transzytosiert. Bei physiologischem pH an der Zellmembran dissoziiert IgG vom FcRn. Serumproteine, die nicht durch einen Rezeptor an die Zellmembran recycelt werden, werden im Lysosomen degradiert. (in Anlehnung an Roopenian 2007)

Autoimmunerkrankungen und der FcRn

Eine Blockierung der Antikörper-Rezeptor-Interaktion resultiert in einer erhöhten Abbaurrate und folglich einer geringeren Halbwertszeit der IgGs.⁷⁴ In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Behandlungen von Autoimmunerkrankheiten mit hohen intravenösen Dosen von IgG zu einer Linderung der Symptome führt.⁷⁵ Eine eindeutige Erklärung für diese Wirkungsweise gibt es bisher nicht. Es werden viele immunologische Effekte erwägt, die je nach Erkrankung variieren können.⁷⁶ So wird vermutet, dass eine Hemmung der B-Zellenaktivität und eine daraus resultierende verminderte Produktion von Autoantikörpern sowie die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen durch die hohe intravenösen Dosen von IgG eine Erklärung für die Linderung sein könnten. Eine weitere bedeutende Begründung für die Wirkungsweise wäre, dass der Überschuss an IgG möglicherweise zu einer Übersättigung des FcRn führt, sodass die Autoantikörper nicht mehr mit dem Rezeptor interagieren und schneller abgebaut werden können.

Ein ähnlicher Erfolg konnte durch das dimere Peptid SYN1436 erreicht werden. Das Peptid bindet ähnlich zum Fc-Fragment und blockiert so die IgG-Bindestelle.^{77,78} Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass FcRn-defiziente Mäuse vor der Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita geschützt sind.⁷⁹ Der FcRn ist deshalb für generelle Therapieansätze für Antikörper vermittelte Krankheiten in den Fokus gerückt.

Kristallstruktur des humanen FcRn

Erst kürzlich gelang es der Gruppe um Dall'Acqua, die Kristallstruktur des humanen FcRn aufzulösen, während er mit humanen Serumalbumin und einem Fc-YTE in Bindung ist (Abbildung 6).⁸⁰ Bei dem Fc-YTE handelt es sich um ein humanes Fc mit den Mutationen M252Y/S254T/T256E für eine verbesserte Bindung an den FcRn.⁸¹⁻⁸³ In dieser Kristallstruktur ist zu erkennen, dass, wie bereits vermutet, der FcRn IgG in einer 2:1 (Rezeptor:Ligand) Stöchiometrie bindet, wobei jedes FcRn-Molekül an das C_{H2}-C_{H3}-Interface einer schweren Kette des IgG bindet.^{63,80,84} Die Bindestelle des Albumin an den FcRn liegt weit entfernt von der IgG-Bindestelle, sodass die Bindungen der beiden Liganden an den Rezeptor sich nicht gegenseitig beeinflussen. Eine FcRn/Albumin-Bindung findet in einer 1:1 Stöchiometrie statt,^{80,85} ist ebenfalls stark pH-abhängig und wird durch die Titration von Histidinresten im Rezeptor und Liganden vermittelt.

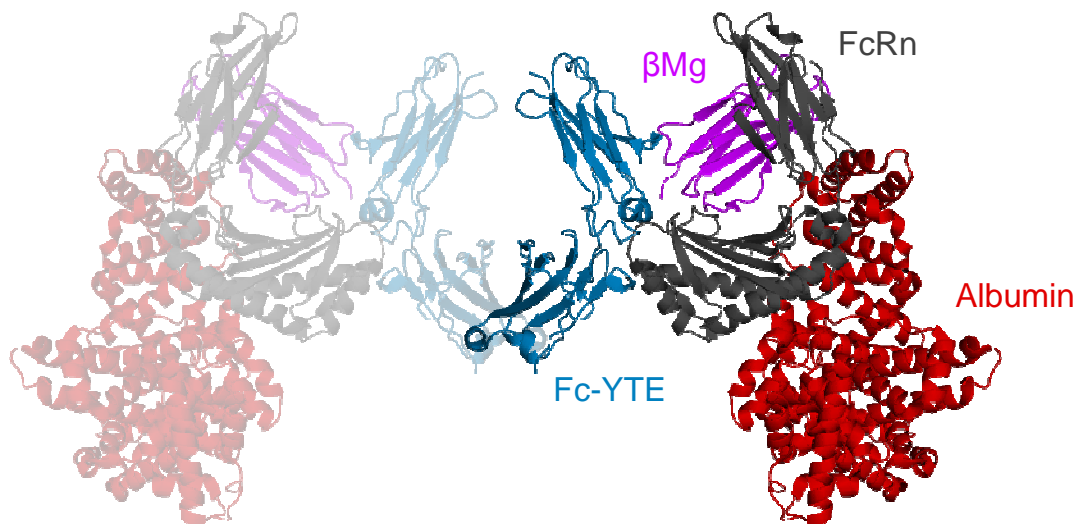


Abbildung 6: Kristallstruktur des FcRn-Albumin-Fc-YTE-Komplexes. In grau dargestellt ist die α -Kette des FcRn, die mit β_2 -Mikroglobulin (β Mg, lila) assoziiert ist. Der Ligand Albumin ist in rot und das Fc-YTE in blau dargestellt. Die farblich kräftig gezeigte Struktur wurde mittels des PDB-Eintrages: 4N0U und dem Programm PyMOL dargestellt. Zur Verdeutlichung des homodimeren Fc-Fragmentes und der damit verbundenen Bindungsstöchiometrie wurde die Kristallstruktur gespiegelt und deutlich schwächer angefärbt. Es wird deutlich darauf hingewiesen, dass es sich hier nur um ein grobes Modell handelt und keinesfalls um eine aufgelöste Kristallstruktur.

Durch das für die Faltung und Funktion des FcRn essentielle βMg ^{64,65} könnten sich weitere mögliche Modulierungsansätze der FcRn-Funktion ergeben. Im Folgenden soll daher näher auf das βMg eingegangen werden.

1.4 β_2 -Mikroglobulin als Substrat der Transglutaminasen

β_2 -Mikroglobulin (βMg) existiert auf der Zelloberfläche als leichte Kette des Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) Klasse I. Es besteht aus einer Kette von 99 Aminosäuren, die in sieben β -Strängen in zwei β -Faltblättern organisiert sind. Die Cysteinreste 25 und 80 sind durch eine Disulfidbrücke verbunden. Hierbei formt das βMg eine typische Immunoglobulinfalte. βMg ist nicht glykosyliert, hat eine molekulare Masse von 11,8 kDa.⁸⁶⁻⁸⁹ und liegt normalerweise löslich vor. Jedoch kann es zu pathogenen Fibrillen aggregieren und so Amyloidablagerungen bilden.⁹⁰ Die βMg -Amyloidose ist eine bekannte und weitverbreitete Komplikation bei langjährigen Dialysepatienten, welche zu einem Kapaltunnelsyndrom und schmerzenden Gelenken führen kann. Der molekulare Mechanismus der Amyloidfibrillenformation ist jedoch bisweilen unbekannt.^{90,91}

Das βMg besteht aus drei Glutaminresten und acht Lysinresten und ist ein Substrat der Transglutaminase (Tgase),⁹² ein Enzym, das mit der Amyloidformationen in Verbindung gebracht wird.^{93,94} Transglutaminasen (Protein-Glutamin- γ -Glutamyltransferasen) katalysieren einen calciumabhängigen Acyltransfer, welcher zwischen einer γ -Carboxyamin-Gruppe (Acylonor) eines peptidgebundenen Glutaminrestes und einem primären Amin stattfindet.⁹⁵ Handelt es sich bei dem Amin um einen proteingebundenen Lysinrest, so kommt es zu einer inter- oder intramolekularen Vernetzung (Abbildung 7).

Die meisten Transglutaminase haben gut definierte Funktionen, wie die Blutgerinnung oder Kreatininformation. Die epidermale Transglutaminase sind bei der Vernetzung von epidermalen Proteinen, bei der Hornhautbildung, sowie bei der Stabilisierung der dermo-epidermalen Verbindung während der Wundheilung beteiligt.^{96,97} Tgasen sind jedoch auch in vielen pathologischen Prozessen involviert, wie der Zöliakie, Autoimmunerkrankungen, Entzündungen und neurodegenerative Erkrankungen wie die Huntigtonkrankheit.^{98,99}

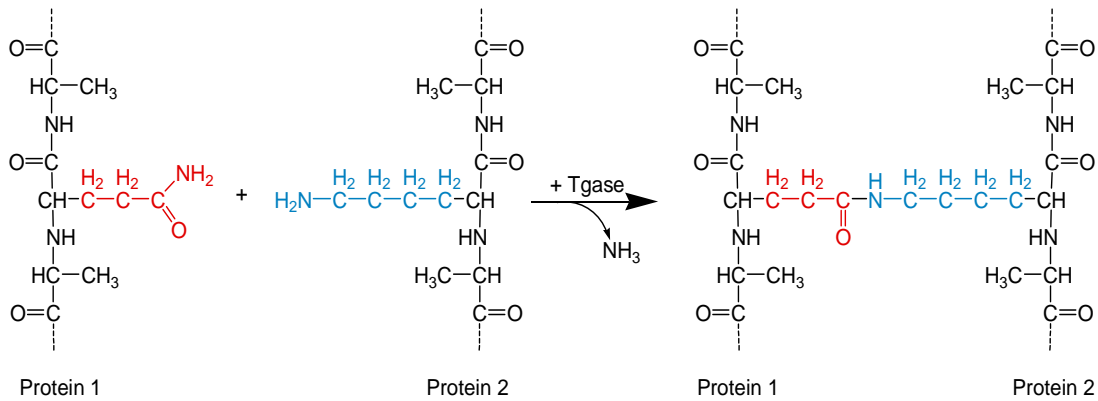


Abbildung 7: Vernetzung von zwei Proteinen durch eine Transglutaminase (Tgase). Transglutaminasen katalysieren einen Acyltransfer. Ist neben dem Glutaminrest eines Proteins (rot) ein Lysinrest eines weiteren Proteins (blau) an der Reaktion beteiligt, so kommt es unter Freigabe von Ammoniak zu einer intermolekularen Vernetzung beider Proteine.

Sowohl der FcRn, das β Mg als auch Tgasen sind im Körper weitverbreitet und spielen eine große Rolle in der Immunregulation, als auch Fehlregulation. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob eine Modifikation des FcRn, in dem β Mg als kleine Untereinheit fungiert, durch Transglutaminasen möglich ist und wie dies seine Funktion beeinflusst.

1.5 Zielsetzung

Die Wechselwirkung von Immunglobulinen und Fc-Rezeptoren ist von herausragender Bedeutung für das Immunsystem, da sie die humorale mit der zellulären Immunantwort verbindet. Bei Fehlregulationen dieses Systems kann es zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen kommen. Eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit ist die Modulation der Rezeptor/Antikörper-Bindung.

Der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) spielt eine große Rolle bei der Immunregulation, da er Immunglobuline vor der Degradation im sauren Endosom bewahrt und so zu ihrer langen Halbwertszeit beiträgt. Der FcRn, aber auch der Fc γ RIII, spielt eine entscheidende Rolle bei der Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita, einer blasenbildenden Hauterkrankung. Interessanterweise konnte der Ausbruch der Epidermolysis bullosa acquisita im Mausmodell durch Blockierung des zum Fc γ RIII homologen Fc γ RIV-Rezeptors verhindert werden. Auch FcRn-defiziente Mäuse sind vor dieser Erkrankung geschützt. Diese Rezeptoren sind daher bei der Entwicklung von Immuntherapien in den Fokus gerückt.

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Interaktion dieser beiden Fc-Rezeptoren mit IgG Autoantikörpern zu inhibieren.

In den bisher veröffentlichten Präparationsprotokollen werden die Proteine aus *inclusion bodies* gereinigt, deshalb sollen in dieser Arbeit zunächst Präparationsprotokolle etabliert werden, die es ermöglichen lösliche Proteine zu erhalten. Hierzu wurden verschiedene Expressionsbedingungen verwendet und die Reinigungsprotokolle für die Versuche dieser Arbeit angepasst.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es nicht gelungen ausreichend FcRn für weiterführende Untersuchungen zu reinigen, sodass eine neue Möglichkeit zur Modulation des FcRn diskutiert wurde. So ist der FcRn wie auch seine kleine Untereinheit, das β_2 -Microglobulin (β Mg), im Organismus weitverbreitet. In der Haut sind auch die ubiquitär vorkommenden Transglutaminasen lokalisiert. Interessanterweise ist das β Mg ein Substrat der Transglutaminasen und kann durch diese polymerisiert werden. Eine Modulation der FcRn-Funktion durch eine Dimerisierung des β Mg durch Transglutaminasen könnte daher ein interessanter Ansatz zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen sein. Ziel dieses Projektes war daher Modifikationen von β_2 -Microglobulin durch Transglutaminasen zu charakterisieren und daraus folgende Modulationen des FcRn zu untersuchen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Identifizierung der Aminosäurereste des β Mg, die an der Transglutaminasereaktion beteiligt sind. Mittels publizierter Kristallstruktur des FcRn soll dann untersucht werden, ob das β Mg, als kleine Untereinheit des Rezeptors, durch Transglutaminase modifiziert werden kann und ob diese Modifikation die Bindung des IgG durch den FcRn beeinflusst.

Außerdem soll geprüft werden, ob NMR-spektroskopische Untersuchungen des Fc γ RIII/IgG-Komplexes möglich sind. Ebenfalls sollen durch STD-NMR-Spektroskopie kleine Moleküle einer Fragmentbibliothek identifiziert werden, die als potentielle Inhibitoren der Antikörper-Fc γ RIII-Bindung in Betracht kommen und so möglicherweise eine Modulation der Immunantwort ermöglichen.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Äkta purifier 10: CU-905, Frac-950, Mixer M-925, Monitor UV-900, Monitor pH/C-900, Pump P-903, Valve INV-907, Valve PV-908	GE Healthcare
Autoklav 3850 ELV	Tuttnauer Systec
Autoklav Laboklav MSV 55	SHP Steriltechnik AG
French Press Cell Disrupter: French-Pressure Cell Press, French Pressure Cell 40K	Thermo IEC
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD plus	Christ
Gefriertrocknungsanlage BETA A	Christ
New Brunswick Innova 4330 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
NMR-Spektrometer Bruker Avance DRX- 500/AVIII-500 mit TCI-Kryoprobenkopf	Bruker
Mikrowaage MC 210 S	Sartorius
pH-Meter pH 330	WTW
Reinstwassersystem RS90-4/UF Ultra Clear	SG Wasserbereitung und Regenerierstation GmbH
Säulen XK 16/20 + Adapter	Pharmacia Biotech
SDS-PAGE-Zubehör Mini-Protean® 3	Bio-Rad
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	peqlab
Spektralphotometer V550 UV/VIS	Jasco
Thermomixer 5436; comfort; Thermostat 5320	Eppendorf
TFX 20. M UV-Belichter Fluolink	Vilber Lourmat
Waage Adventurer™	Ohaus
Waage KERN GJ 610-2M	Kern
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific
Zentrifuge Sorvall RC 5B Plus, Rotor GS3; Rotor SA 600	Du Pont
Zentrifuge Hettich Universal 320R	Hettich

2.2 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck
Ammoniumsulfat ((¹⁵ NH ₄) ₂ SO ₄); 99% ¹⁵ N	Cambridge Isotope Laboratories
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin Natriumsalz	Gerbu
β - Mercaptoethanol	Sigma
Borsäure (H ₃ BO ₄)	Merck

Material

Bromcyan	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat ($\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Deoxycholsäure	Sigma
Deuteriumoxid (D_2O); 99,9%	euriso-top
D - (+) Glucose	Roth
D - Glucose (^{13}C); 99% uniform ^{13}C	euriso-top
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Eisen(III)-chlorid	Fluka
Ethanol, vergällt	Büfa Chemikalien
Glycerin	Roth
Glycin	biomol
Guanidin Hydrochlorid	Roth
Harnstoff	Gerbu
Imidazol	Fluka
IPTG	Roth
Isopropylalkohol	Merck, Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth
Kanamycinsulfat	Sigma
LB-Medium	Roth
L-Lysin	Sigma
α - ^{15}N - L - Lysin; 95-99% ^{15}N	Cambridge Isotope Laboratories
Methylamin Hydrochlorid	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat - Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
PIPES	Sigma
Rotiphorese [®] Gel 30 (Acrylamid:Bis-Acrylamid 37,5:1)	Roth
Salzsäure (HCl) 37%ig	Roth
SDS	Serva
Stickstoff, flüssig	Air Liquide
TEMED	Sigma
Thiamin-Hydrochlorid	Sigma
Tris	Roth
Tris- D_{11}	euriso-top
Triton - X100	Gerbu

2.3 Antibiotika

In der vorliegenden Arbeit wurden resistente *Escherichia coli* Stämme mit Hilfe der Antibiotika Ampicillin (Ap) oder Kanamycin (Kn) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml selektiert. Alle Antibiotikallösungen wurden in entionisiertem Wasser angesetzt und anschließend steriltfiltriert.

2.4 Enzyme

Für die vorliegende Arbeit wurden zum Spalten von DNA die folgenden Restriktionsendonukleasen verwendet: NcoI, NotI, EcoRI, PstI, XhoI, SmaI, NdeI, BamHI und EcoRV von NEB als auch von Thermo Scientific Fermentas.

Des Weiteren wurde T4 DNA Ligase von NEB zum Verknüpfen von DNA-Strängen verwendet.

Zum Aufschluss von Bakterienzellen diente Lysozym von Merck.

Für Protein-Glutamin- γ -Glutamyltransferase-Reaktionen wurden die *Mouse tissue* Transglutaminase (mTgase; T040) und die und die *guinea pig liver* Transglutaminase (gpTgase; T006) von Zedira verwendet.

2.5 Fluoreszenzmarkierte Substanzen

Zur Identifizierung modifizierter Proteine im SDS-Gel wurden verschiedene fluoreszierende Substanzen verwendet. Zur Modifizierung von Lysinresten wurde das Peptid FITC-Ahx-TVQQEL verwendet. Bei der Aminosäuresequenz handelt es sich um einen Glutamindonor.¹⁰⁰ Die Aminosäuresequenz wurde durch einen N-terminalen Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Fluoreszenztag ergänzt. Durch diesen Tag kann modifiziertes Protein in einem SDS-Gel unter UV-Belichtung identifiziert werden. Das FITC-Ahx-TVQQEL wurde durch peptides&elephants synthetisiert.

Zur Modifizierung eines Glutaminrestes wurde das N-(Tetramethylrhodaminy)cadaverin/N-(TAMRA)cadaverine¹⁰¹ (R001; Abbildung 8) von Zedira verwendet. Es handelt sich hierbei um ein fluoreszierendes Amindonorsubstrat für Transglutaminasen

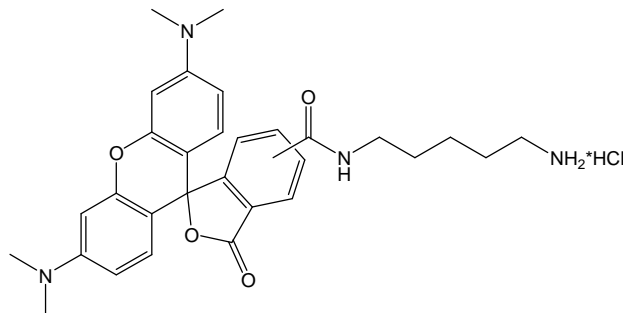


Abbildung 8: N-(Tetramethylrhodaminy)cadaverin/N-(TAMRA)cadaverine. Gezeigt ist die Struktur des fluoreszierenden Amindonorsubstrats R001 für Transglutaminasen von Zedira.

2.6 Standards zur Bestimmung von DNA-Fragmentgrößen oder Proteinmolekülmassen

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung von durch ein Agarosegel aufgetrennte DNA Fragmentgrößen, sowohl der Größenstandard BioRad EZ Load™ Molecular Rulers 100 bp als auch der Größenstandard BioRad EZ Load™ Molecular Rulers 1 Kb eingesetzt.

Zur Bestimmung der Proteinmasse in SDS-Polyacrylamidgelen wurde der BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range, als auch der PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific verwendet.

2.7 Oligonukleotide

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Tabelle 4) wurden mit Hilfe des Programms Primer3 Output (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entworfen und von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

Tabelle 4: Überblick der hier verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Länge [bp]	T _M [°C]	GC [%]
βMg-rev1	CGGATGACGGCTATACACCT	20	59,98	55
hFcRn-rev1	ATACGCAGATCGGTGGTTTC	20	59,96	50
FcgRIII_5'	GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTG ACATATGG	41	>75	63,4
FcgRIII_3'	GATCCCATATGTCAGTGGTGGTGGTGGTGC TCGAGTGC	41	>75	58,5

2.8 Plasmide

Um Versuchsorganismen genetisch zu verändern, wurden verschiedene Vektoren verwendet, beziehungsweise hergestellt (Tabelle 5). Schematische Karten der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren pTWIN1, pIVEX2.3d und pET28a(+) mit den hier verwendeten Restriktionsschnittstellen wurden mit Hilfe des Programms GENTle erstellt und sind in

Abbildung 9 aufgezeigt. Die Sequenzen der klonierten Fragmente sind im Anhang A1 dargestellt.

2.9 Mikroorganismen

Zur Klonierung von Plasmiden und zur Proteinexpression wurden *E. coli* Bakterienstämme verwendet (Tabelle 6), welche von dem Sicherheitsstamm K12 oder B-Stämmen stammen.

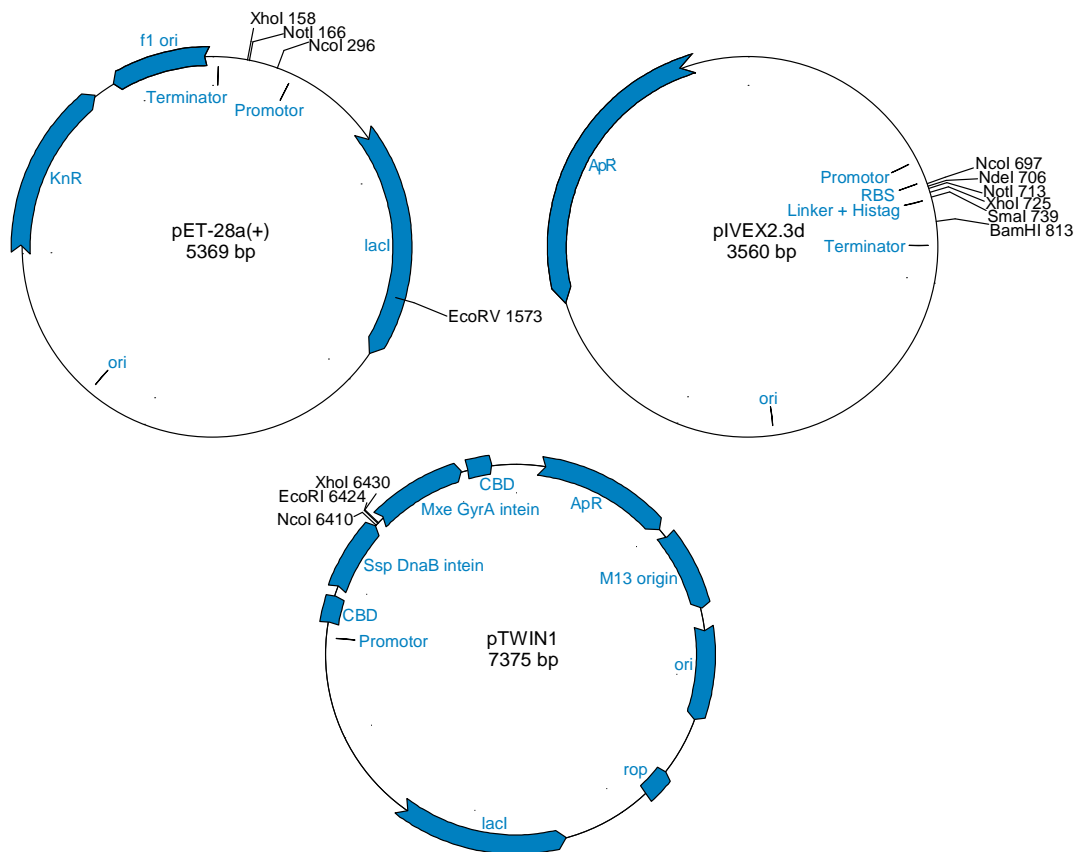


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Plasmide pET28a(+), pIVEX2.3d und pTWIN1 mit den hier verwendeten Restriktionsschnittstellen. Gene sind in blau dargestellt. Der Vektor pET28a(+) enthält eine Kanamycin-(KnR) und die Vektoren pIVEX2.3d und pTWIN eine Ampicillinresistenz (ApR). *LacI* kodiert für das Transkriptionsrepressorprotein LacI, welches durch IPTG gebunden werden kann. So die Wechselwirkungen mit dem Lac-Operator inhibiert. Der Vektor pTWIN enthält außerdem zwei Chitin-Bindedomänen (CBD) und die Tags Ssp DnaB Intein und Mxe GyrA Intein. Das Replikations-repressorprotein Rop wird durch *rop* kodiert. Des Weiteren sind Replikationsursprünge und für diese Arbeit entscheidende Restriktionsschnittstellen angegeben.

Tabelle 5: Übersicht, der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit Angaben über Eigenschaften und Insertgrößen.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pTWIN1	Ap ^R ; M13 origin; pMB1 origin; <i>rop</i> ; <i>lacI</i> ; T7 Promotor; CBD; <i>Ssp</i> DnaB intein; <i>Mxe</i> GyrA Intein	NEB
pET28a(+)	Kn ^R ; T7 Promotor; His-Tag; T7-Tag; T7 Terminator; pBR322 origin; f1 origin; <i>lacI</i>	Merck
pIVEX2.3d	Ap ^R ; T7-Promotor; T7-terminator, Ori	Roche Diagnostic
βMg		
pMA-βMg	Ap ^R ; Col E1 Origin; βMg-Insert (434 bp)	life technologies
pET-βMg	Kn ^R ; pET28a(+) mit Fragment aus pMA-βMg herausgeschnitten mit NcoI und XhoI (424bp)	Diese Arbeit
pIVEX-βMg	Ap ^R ; pIVEX2.3d mit Fragment aus pMA-βMg herausgeschnitten mit NcoI und XhoI (424bp)	Diese Arbeit
FcRn		
pMA-mFcRn	Ap ^R ; Col E1 Origin; mFcRn-Insert (938 bp)	life technologies
pMA-hFcRn	Ap ^R ; Col E1 Origin; hFcRn-Insert (938 bp)	life technologies
pMA-hFcRn ohne HAT	Ap ^R ; Fragment (96 bp) mit NdeI aus hFcRn-Insert herausgeschnitten	Diese Arbeit
pET-hFcRn	Kn ^R ; pET28a(+) mit Fragment aus pMA-hFcRn herausgeschnitten mit NcoI und XhoI (928bp)	Diese Arbeit
pET-mFcRn	Kn ^R ; pET28a(+) mit Fragment aus pMA-mFcRn herausgeschnitten mit NcoI und XhoI (928bp)	Diese Arbeit
pIVEX-hFcRn	Ap ^R ; pIVEX2.3d mit Fragment aus pMA-hFcRn herausgeschnitten mit NcoI und XhoI (928bp)	Diese Arbeit
pIVEX-mFcRn	Ap ^R ; pIVEX2.3d mit Fragment aus pMA-mFcRn herausgeschnitten mit NcoI und XhoI (928bp)	Diese Arbeit
FcγRIII		
pMA-FcγRIII	Ap ^R ; Col E1 Origin; FcγRIII-Insert (569 bp)	Mr. Gene
pEX-A-FcγRIII_domaine2/(pEX-FcγRIII-Bindedomäne (BD))	Ap ^R ; FΦ80 <i>lacZΔM15Δ (lacZYA-argF) U169 deo R rec A1 end A1 hsd R178 (r_k⁻ m_k⁻) pho A sup E44 thi-1 gyr A96 rel A1 λ</i>	europins
pTWIN1-FcγRIII	Ap ^R ; pTWIN1 mit Fragment aus pMA-FcγRIII herausgeschnitten mit NcoI und EcoRI (547bp)	Diese Arbeit
pET28a(+)-FcγRIII	Kn ^R ; pET28a(+) mit Fragment aus pMA-FcγRIII herausgeschnitten mit NcoI und NotI (534bp)	Diese Arbeit
pIVEX2.3d-FcγRIII	Ap ^R ; pIVEX2.3d mit Fragment aus pMA-FcγRIII herausgeschnitten mit NcoI und NotI (534bp); zur Verwendung bei der Klonierung des pIVEX-FcγRIII-His	Diese Arbeit
pET28a(+)-FcγRIII-BD	Kn ^R ; pET28a(+) mit Fragment aus pEX-A-FcγRIII_domaine2 herausgeschnitten mit NcoI und NotI (276bp)	Diese Arbeit
pIVEX-FcγRIII-His	Ap ^R ; pIVEX2.3d-FcγRIII geschnitten mit NotI und BamHI anschließend ligiert mit den hybridisierten Oligonukleotiden FcγRIII_5' und FcγRIII_3'; Histag	Diese Arbeit

Tabelle 6: Beschreibung der verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Life Technologies
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Novagen
ER2566	F ⁻ λ - <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>)114:: <i>IS10</i> <i>R(mcr-73::miniTn10-TetS)2</i> <i>R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i>	NEB
Origami2 (DE3) pLysS	Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F' <i>[lac⁺ lacI^q pro]</i> (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> pLysS (Cam ^R , Str ^R , Tet ^R)	Novagen
SoluBL21	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) (DE3)	Genlantis

3 Methoden

3.1 Modifikationen von DNA

3.1.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die zu analysierende DNA wird in Reaktionsansätzen mit Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Diese erkennen und trennen sequenzspezifisch doppelsträngige DNA, wobei verschiedene Überhänge entstehen können. Die erhaltenen DNA-Fragmente können dann zur Ligation mit anderen DNA-Fragmenten (3.1.2) oder zur Analyse durch eine Agarosegelelektrophorese (3.2) genutzt werden.

Durchführung

Es wurden 1 - 5 µl Plasmid-DNA, je nach der zu erwarteten Plasmidmenge, ohne vorherige Konzentrationsbestimmung in einem Reaktionsansatz von 30 - 50 µl eingesetzt. Die Restriktionsreaktionen wurden mit den empfohlenen Puffern in den vorgegebenen Konzentrationen durchgeführt und enthielt mindestens 1 U der unter 2.4 aufgeführten Endonukleasen. Das Reaktionsvolumen wurde durch Auffüllen mit entionisiertem Wasser erreicht. Die Restriktionsreaktionen wurden bei der empfohlenen Temperatur für ein bis drei Stunden inkubiert.

3.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit glatten Enden oder zueinander passenden Überhängen wird Ligation genannt. Hierzu wird die T4 DNA Ligase verwendet, die unter ATP Verbrauch das 3'-Hydroxylende des einen mit dem 5'-Phosphatende eines anderen Stranges unter Ausbildung einer Phosphordiesterbindung verknüpft.

Durchführung

Die jeweilige DNA wurde mittels Restriktionsendonukleasen gespalten (3.1.1) und anschließend die entstandenen Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (3.2) getrennt. Die Fragmente von Interesse wurden mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* von Qiagen

aus dem Gel extrahiert (3.3.1) und zur Ligation verwendet. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 20 µl, die aus 1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl), 2 µl 10 x Ligationspuffer, sowie Vektor und Insert in den Mengenverhältnissen 1:3 oder 1:5 bestanden. Das Reaktionsvolumen wurde gegebenenfalls mit entionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei RT für 10 min bis zu 3 h. Anschließend folgte eine Lagerung bei - 20 °C.

3.1.3 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Bei Oligonukleotiden handelt es sich um einzelsträngige DNA, die durch Hybridisierung, das heißt Anlagerung von komplementären DNA-Fragmenten, zu doppelsträngigen DNA-Fragmenten zusammengefügt werden können.

Durchführung

Die Oligonukleotide wurden in Hybridisierungspuffer (Tabelle 7) aufgenommen, sodass eine finale Konzentration von 100 pmol/µl erreicht wurde. Von diesen Lösungen wurden jeweils 100 µl gemischt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und im ausgeschalteten Heizblock über Nacht abgekühlt. Nach der Abkühlung wurden die hybridisierten Oligonukleotide bis zur Weiterverwendung bei - 20 °C gelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffer für Oligonukleotide

	<u>Zusammensetzung</u>	
Hybridisierungspuffer	10 mM	Tris HCl pH 7,5-8,0
	50 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

3.2 Analyse durch Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine schnelle Methode zur größenabhängigen Trennung von linearen doppelsträngigen DNA-Fragmenten im elektrischen Feld. Um die DNA nach der Trennung sichtbar zu machen, wird das Gel mit Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, welche dann unter UV-Bestrahlung sichtbar ist.

Durchführung

Die Gelmatrices hatten eine Agarosekonzentration von 1% in 1 x TAE beziehungsweise 1 x TPE mit einer finalen Ethidiumbromidkonzentration von $1,25 \times 10^{-3}$ %. Nach der gelelektrophoretischen Trennung in 1 x TAE oder 1 x TPE erfolgte zur Visualisierung der DNA eine Belichtung mit Hilfe des TFX 20. M UV-Belichter Fluolink und eine Dokumentation durch eine Digitalkamera. In dieser Arbeit sind alle dokumentierten Bilder als Negativ abgebildet.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer für Agarosegele

		Zusammensetzung
1 x TPE	90 mM	Tris HCl pH 7,5-8,0
	28 mM	H ₃ PO ₄
	2 mM	EDTA
	pH mit H ₃ PO ₄ eingestellt auf 8,2	
1x TAE	40 mM	Tris HCl pH 7,5-8,0
	2 mM	EDTA
	pH mit Essigsäure eingestellt auf 8,2	

3.3 Isolation von DNA

3.3.1 DNA-Extraktion aus dem Agarosegel mittels QIAquick® Gel Extraction Kits

Für eine Weiterverarbeitung von DNA-Fragmenten nach einer Trennung durch eine Agarosegelelektrophorese wurden diese mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits von Qiagen aus dem Gel extrahiert. Zunächst wird das Agarosestück in Puffer mit hoher Salzkonzentration gelöst und auf eine Matrix gegeben. Durch eine Zentrifugation erfolgt die Trennung von Agarosematrix und DNA über eine DNA-Bindung an einer Silica Matrix. Die DNA wird schließlich unter Konditionen niedriger Ionenstärke mit schwach alkalischem Puffer eluiert.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.3.2 Plasmid isolation mittels QIAprep[®] Spin Miniprep Kit 50

In dieser Arbeit wird die Plasmid isolation mit Hilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kit 50 von Qiagen durchgeführt. Die Isolation basiert auf der alkalischen Lyse der bakteriellen Zelle gefolgt von einer Adsorption der Plasmid DNA an einer Silica Matrix in Gegenwart von hoher Salzkonzentration und Elution bei geringer Salzkonzentration.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Mikroorganismen, die in der Lage sind DNA in ihre Zellen aufzunehmen, werden als kompetent bezeichnet. Bei Bakterien, die nicht natürlicherweise kompetent sind, kann durch Behandlung mit Calciumchlorid eine Kompetenz erzeugt werden.

Durchführung

Eine 10 ml LB-Kultur wurde über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 4 ml dieser Kultur wurden zum Inokulieren von 500 ml LB-Medium verwendet und ebenfalls bei 37 °C, schüttelnd inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,34 bis 0,39 erreicht hatte. Nach Lagerung auf Eis für 10 min erfolgte eine zehnmütige Zentrifugation bei 1600 x g und 4 °C. Das Zellpellet wurde zweimal in 80 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (60 mM CaCl₂; 15% Glycerin; 10 mM PIPES; pH 7,0 eingestellt mit NaOH) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend pelletiert. Nach Resuspension in 16 ml eiskalter CaCl₂-Lösung wurden jeweils 230 µL in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.5 Transformation von *Escherichia coli*

Mit Transformation wird die Aufnahme von extrachromosomaler DNA durch kompetente Mikroorganismen bezeichnet. In dieser Arbeit wurde die Aufnahme der DNA in chemisch kompetente *E. coli* Zellen mit Hilfe eines Hitzeschocks durchgeführt, welcher die

Zellmembran für DNA permeabel macht. Durch Inkubation bei 37 °C können die Transformanten ihre Antibiotikaresistenz aufbauen, um dann auf einem geeigneten Nährboden mit entsprechenden Antibiotika selektiert zu werden.

Durchführung

100 µl chemisch kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut und dann mit 10 – 100 ng zu transformierender Plasmid-Lösung oder maximal 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Anschließend folgte eine Inkubation für 10 min auf Eis und gefolgt von einem zweiminütigem Hitzeschock bei 42 °C und einer Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde das Ganze einer einstündigen Inkubation bei 37 °C auf einem Rundschtüttler unterzogen. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Schließlich wurden die Kolonien zur weiteren Verwendung genutzt oder bei 4 °C gelagert.

3.6 Lagerung und Erhaltung transformierter Stämme

Um transformierte Stämme langfristig zu konservieren wurden diese mit Glycerin versetzt gelagert.

Durchführung

Eine 5 ml LB-Kultur wurde über Nacht bei 37 °C angezogen, anschließend zentrifugiert, mit 100 µl 15%igem Glycerin (v/v) (steril, ohne Antibiotikum) versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um anschließend bei - 80 °C gelagert zu werden.

3.7 Proteinsynthese

Die Herstellung von Proteinen mit dem *lac*-Operon Genregulationssystem bietet die Möglichkeit, Proteine in großen Mengen in *E. coli* synthetisieren zu lassen. Eine Überexpression der proteinkodierenden Gene sollte reguliert werden, da eine hohe Proteinsyntheserate mit dem Wachstum der Mikroorganismen negativ korreliert. Zur

Kontrolle der Expression der proteinkodierenden Gene dient daher der stark regulierte *lac*-Promotor, der durch den *lac*-Repressor blockiert werden kann. Die Expression der Gene wird durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. IPTG bindet an den Lac-Repressor, sodass dieser nicht mehr mit dem Lac-Operator wechselwirken kann. Dadurch wird der T7-Promotor frei, die Expression der jeweiligen proteinkodierenden Gene wird induziert und das Protein kann nachfolgend synthetisiert werden.

3.7.1 Rekombinante Synthese von unmarkiertem Protein

Durchführung

Mit einer über Nacht Kultur wurden jeweils 500 ml LB-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum, auf eine Zelldichte von OD₆₀₀ 0,1 inokuliert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde durch Zugabe von IPTG (0,5 mM final) induziert. Die Induktion erfolgte für 3 h bei 37 °C oder über Nacht bei 20 °C. Zur Überprüfung der Induktion wurde vor der Zugabe von IPTG und nach der Induktion ein 1 ml Aliquot entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Nach einer Zentrifugation bei 16000 x g für 15 min und 4 °C wurde das Zellpellet bei -20 °C gelagert.

3.7.2 Rekombinante Synthese von isotoopenmarkiertem Protein

Zur Synthese von isotoopenmarkiertem Protein wurde das Protokoll von Marley *et al.*¹⁰² adaptiert. Hier werden zunächst die Zellen im Vollmedium angezogen, um eine ausreichende Zellmasse zu erhalten und hinterher in einer Salzlösung gewaschen, um alle Stickstoff- und Kohlenstoffquellen zu entfernen. Anschließend werden die Zellen in isotoopenmarkierten Minimalmedium überführt und zum Abbau noch unmarkierter Metabolite inkubiert, bevor mit IPTG die Proteinsynthese induziert wird.

Durchführung

Mit einer Vorkultur wurden jeweils 500 ml LB-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum, auf eine Zelldichte von OD₆₀₀ 0,3 inokuliert. Nach einem Wachstum auf eine OD₆₀₀ von 1 wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g und 4 °C für 15 min

pelletiert, das Pellet mit M9-Salz (6 g/l Na₂HPO₄; 3 g/l KH₂PO₄; 0,5 g/l NaCl) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Die pelletierte Zellmasse wurde zur Inokulierung von 500 ml Minimalmedium verwendet, welches als einzige Stickstoffquelle ¹⁵N-Ammoniumsulfat oder die selektiv ¹⁵N-markierte Aminosäuren enthielt (Tabelle 9). Nach einem einstündigen Wachstum wurde die Genexpression durch Zugabe von IPTG (0,5 mM final) induziert und bei 25 °C für 18-24 h inkubiert. Nach einer Zentrifugation (30 min, 5000 x g, 4 °C) wurde das Pellet bei - 20 °C gelagert.

Tabelle 9: Verwendete M9-Minimalmedien. Angegeben ist die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Minimalmedien für die unterschiedlichen Markierungsmuster. Ein M9-Medium besteht immer aus der generellen Zusammensetzung und der Zugabe markierter Substanzen. Die Angaben dienen zur Herstellung von 500 ml M9-Medium.

Generelle Zusammensetzung		Markierungsmuster			
Individuelle Zugabe	u- ¹⁵ N	u- ¹⁵ N/ ¹³ C	sel.- ¹⁵ N	u- ¹⁵ N/sel.- ¹⁴ N	
Na ₂ HPO ₄	3 g				
KH ₂ PO ₄	0,75 g				
NaCl	0,125 g				
H ₃ BO ₄	50 µg				
CoCl ₂ x 6H ₂ O	50 µg				
FeCl ₃	4,15 mg				
EDTA	4,15 mg				
CaCl ₂	2,775 mg				
Thiamin	2,5 mg				
(¹⁵ NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 g	0,25 g	-	0,25 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	0,25 g	-	
Glucose	1g	-	1g	1g	
¹³ C-Glucose	-	1g	-	-	
L-Lysin	-	-	-	250 mg	
α- ¹⁵ N-L-Lysin	-	-	250 mg	-	

3.7.3 Zellfreie Proteinsynthese mit Rapid Translation System (RTS)

In dieser Arbeit wird die zellfreie Proteinsynthese mit Hilfe des Rapid Translation Systems (RTS) von Roche durchgeführt.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.8 Diskontinuierliche Natrium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli¹⁰³ ist eine Technik zur Separation von Proteinen, basierend auf deren spezifischer elektrophoretischer Beweglichkeit. Insgesamt erfolgt die Trennung nach der Molekülmasse. Die Gelmatrix besteht aus einem engporigen Trenngel, welches durch ein weitmaschiges Sammelgel überlagert ist. Die im Polyacrylamidgel getrennten Proteine können mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt werden. Coomassie-Brilliant-Blau lagert sich an die Seitenketten basischer Aminosäuren und färbt so die Proteine unspezifisch an.

Durchführung

Es wurden 6 %ige Sammel- und 12 %ige bzw. 15%ige Trenngele verwendet (Tabelle 10). Die Proteinproben wurden mit 2 x Probenpuffer für Proteine (Tabelle 11) versetzt und zur Denaturierung 10 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurde dieses Gemisch in die Geltaschen pipettiert. Als Massenstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder von Pierce (Thermo Scientific) oder der SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (BioRad). Als Elektrodenpuffer diente 6g/l Tris; 28,8 g/l Glycin; 1g/l SDS.

An die Gele wurde eine konstante Spannung von 100 V bis 200 V angelegt. Die anschließende Anfärbung der Gele mit GelCode Blue Stain Reagent von Pierce erfolgte nach Herstellerangaben.

Tabelle 10: SDS-Polyacrylamid-Gele. Zusammensetzung in µl zur Herstellung von 2 SDS-Gelen.

	Trenngel (12%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (6%)
Rotiphorese Gel 30	4000	5000	1000
1,5 M Tris; pH 6,8	-	-	1250
1,5 M Tris; pH 8,8		2500	-
H ₂ O	3200	2200	2580
10% SDS (m/v)		100	50
87% Glycerin (v/v)		200	100
20% Ammoniumpersulfat (m/v)		50	25
TEMED		10	10

Tabelle 11: 2x Probenpuffer für SDS-Gele. Zusammensetzung zur Herstellung von 2x Probenpuffer für SDS-Gele

	reduzierend
1,2 ml	Glycerin
1,2 ml	1,5M Tris, pH 6,8
3 ml	10% SDS (m/v)
0,5 ml	β -Mercaptoethanol *
10 mg	Bromphenolblau
ad 10 ml	H ₂ O

*zur Herstellung von nicht reduzierenden Probenpuffer wurde auf die Zugabe von β -Mercaptoethanol verzichtet

3.9 Zellaufschluss von *E.coli*

Zur Zellyse können verschiedenen Methoden verwendet werden. In dieser Arbeit wurde zur Analyse von Testexpressionen eine Zellyse durch Ultraschall angewendet. Sollten die Proteine zur Reinigung verwendet werden, so diente die Methode der French Press zur Zellyse. Auf die Zugabe von Proteaseinhibitoren wurde bei beiden Methoden verzichtet.

3.9.1 Zellyse durch Ultraschall

Ein Zellaufschluss ohne den Einsatz von Detergenzien kann durch Ultraschall erfolgen. Bakterienzellen lysieren unter schnellen Druckveränderungen auf, die in dieser Arbeit durch einen im Ultraschallbereich schwingenden Metallstab hervorgerufen wurden.

Durchführung

Das Bakterienpellet wurde in 1 ml Extraktionspuffer (50 mM Natriumhydrogenphosphat; 5 mM EDTA) je 150 mg Feuchtwicht aufgenommen und nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym unter ständiger Kühlung (Eis) 2 min mit 50%igen Ultraschallpulsen lysiert. Die Suspension wurde dann mit 16000 x g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Fraktionen wurden bei - 20 °C gelagert.

3.9.2 Zellyse durch French Press

Bei der French Press Methode wird die Zellsuspension von einer unter sehr hohem Druck stehenden Kammer durch eine schmale Öffnung in eine Kammer mit sehr viel niedrigerem Druck überführt. Der hohe Druckunterschied und die Verengung des Durchmessers führen zu einer Lyse der Bakterienzelle.

Durchführung

Das Zellpellet wurde in der proteinspezifischen Detergenz (siehe 3.11) aufgenommen. Die Zellen wurden 3x mittels French Press bei einem Druck von 1200 psi aufgeschlossen und anschließend die Zelltrümmer bei 10000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet zur Reinigung der *inclusion bodies* weiter verwendet.

3.10 Chromatographische Proteinreinigung

Unter Chromatographie versteht man Trennmethode, bei denen Substanzgemische durch eine Verteilung in verschiedenen Phasen in ihre Komponenten getrennt werden. Bei allen chromatographischen Trennmethode ist das zu untersuchende Substanzgemisch in einer flüssigen oder gasförmigen mobilen Phase gelöst. Die mobile Phase wandert dann durch die stationäre Phase, wobei es hier zu Wechselwirkungen der gelösten Substanzen mit der stationären Phase kommt. Aufgrund von unterschiedlichen Affinitäten wandert jede einzelne Komponente des Substanzgemisches unterschiedlich schnell und die Komponenten werden getrennt.

Die Reinigung der Proteine erfolgte unter Verwendung eines ÄKTAPurifiers mit Fraktionssammler und wurde mit Hilfe der Software UNICORN überwacht. Die Reinigung fand bei konstanten 4 °C und unter Detektion der Leitfähigkeit statt. Puffer, zur Verwendung während der Reinigung, wurden vor Gebrauch filtriert (0,45 µm) und entgast. Die proteinhaltigen Fraktionen konnten durch Absorptionsmessung bei 280 nm anhand des Chromatogramms identifiziert werden.

3.10.1 Affinitätschromatographie mittels einer Ni-Sepharose-Säule

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen zwei zueinander gehörigen Partnern, wie zum Beispiel zwischen Protein und Ligand. Die Säulenmatrix enthält einen kovalent gebundenen Liganden, der die zu reinigenden Proteine spezifisch bindet und von dem das Protein spezifisch eluiert werden kann.

Zur Chromatographie wurde eine XK16-Säule mit einer Affinitätsmatrix aus Ni-Sepharose 6 Fast-Flow-Beads (Ni-NTA) verwendet. Dies ermöglicht die Reinigung von Proteinen, die mit einem poly-Histidin-Tag fusioniert sind. Dieser Tag besitzt eine Affinität zu Substanzen, die Metallionen gebunden haben (hier Ni-NTA), sodass eine spezifische Bindung des gewünschten Proteins an die Säule erfolgt. Alle Schritte der Affinitätschromatographie erfolgten bei 4 °C und einer Flussrate von 1 ml/min. Während der Reinigung wurde von allen Schritten Proben genommen und anschließend mittels SDS-Gel analysiert.

Durchführung

Das mit Bindepuffer für Ni-NTA-Säulen (Tabelle 12) verdünnte Proteinkonzentrat wurde unter Verwendung eines Superloops auf die mit Bindepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule gegeben. Das Säulenvolumen betrug 15 ml. Der Durchfluss wurde aufgefangen und es folgte das Waschen der Säule mit 2 Säulenvolumen (CV) Bindepuffer. Die Elution erfolgte proteinspezifisch (3.11), wobei das Volumen der jeweiligen Eluatfraktionen 3 ml betrug. Die Lagerung der Säule erfolgte in 20% Ethanol (v/v) bei 4 °C.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Puffer zur Verwendung bei der Ni-Sepharose-Affinitätschromatographie

<u>Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>	
Bindepuffer für Ni-NTA-Säulen	20 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	500 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
	pH 7,3 bei RT eingestellt mit HCl	
Elutionspuffer für Ni-NTA-Säulen	20 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	500 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
	pH 7,3 bei RT eingestellt mit HCl	

3.10.2 **Größenausschlußchromatographie mittels Superdex 200 10/300 GL Säule**

Bei der Größenausschlußchromatographie, auch Gelfiltration genannt, handelt es sich um eine Flüssigchromatographie. Die Trennung findet aufgrund der Größe der Moleküle in Lösung statt und große Moleküle eluieren zuerst, gefolgt von immer kleineren.

In dieser Arbeit wurde zur Gelfiltration eine Superdex 200 10/300 GL Säule von GE Healthcare verwendet, die eine Matrix aus einem Gemisch vernetzter Agarose und Dextran enthält. Das Säulenvolumen beträgt 24 ml mit einem Trennungsbereich von globulären Proteinen mit einem relativen Molekulargewicht von 10000 bis 600000 Da. Alle Schritte der Gelfiltration erfolgten bei 4 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min.

Durchführung

Die proteinhaltige Probe mit einem Volumen von 200-500 µl wurde unter Verwendung der 1 mL Probenschleife mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in eine mit Superdex-Puffer (50 mM Tris; 50 mM NaCl; pH 8,0 bei RT eingestellt mit HCl) äquilibrierte Gelfiltrationssäule eingesetzt. Der Durchfluss wurde verworfen und es folgte eine Elution mit 2 CV Superdexpuffer, wobei das Volumen der jeweiligen Eluatfraktionen 2 ml betrug. Die Lagerung der Säule erfolgte in 20% Ethanol (v/v) bei 4 °C.

3.10.3 **Größenausschlußchromatographie mittels Sephacryl High Resolution Mediums**

Sephacryl High Resolution Media ermöglichen schnelle Reinigung von Proteinen, Polysacchariden und anderen Makromolekülen durch Gelfiltration (Fraktionierungsrahmen: 5000 – 250000 Da). Die Matrix des Sephacryl High Resolution Mediums besteht aus vernetzten Kopolymeren von Allyldextran und *N, N'*-Methylenbisacrylamid. Die hydrophile Eigenschaft des Mediums minimiert unspezifische Adsorptionen und maximiert die Ausbeute.

Durchführung

Die proteinhaltige Probe (max. 13 ml) wurde nach Äquilibration der HiPrep 26/60 Sephacryl S 200 HR Säule (CV: 318,5 ml) mit Sephacryl-Puffer (8 M Harnstoff; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 bei RT) und einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Es folgte die Elution mit 2 CV Sephacryl-Puffer.

3.11 Renaturierung und Reinigung von Proteinen

3.11.1 Präparation von β Mg

Die Reinigung des β Mgs erfolgt nach dem Protokoll von Esposito *et al.*,¹⁰⁴ wobei Abweichungen bei der Zellyse und Chromatographie gemacht wurden. Das β Mg befindet sich nach der Überexpression in *E. coli* in *inclusion bodies*. Nach der Zellyse durch French Press müssen die *inclusion bodies* zunächst gereinigt und unter denaturierenden Bedingungen gelöst werden. Durch eine Affinitätschromatographie erfolgt dann die Reinigung des β Mg. Anschließend wird der Affinitätstag durch eine Bromcyanspaltung entfernt. Bromcyan spaltet Proteine spezifisch nach einem Methionin. Bei der Spaltung entsteht am C-Terminus aus dem Methionin ein Homoserin.

Durchführung

Das Zellpellet wurde in 20 ml 10 mM Tris HCl pH 8,0; 100 μ g/ml Lysozym pro 1 L Kultur aufgenommen und mittels French Press (3.9.2) aufgeschlossen und zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde anschließend in 20 ml 10 mM Tris HCl pH 8,0 resuspendiert, mittels Dounce-Glashomogenisator homogenisiert und erneut zentrifugiert. Nach einer Resuspension in 10 ml 100 mM Tris HCl pH 8,0; 6 M Guanidin Hydrochlorid (GdnHCl) erfolgte eine weitere Homogenisierung. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand mit den Porengrößen 5 μ m, 1,2 μ m, 0,8 μ m und 0,45 μ m filtriert und mit Ni-NTA-Bindepuffer (Tabelle 12) aufgefüllt. Das Filtrat wurde anschließend für eine Affinitätschromatographie anhand einer Ni-Sepharose-Säule (3.10.1) verwendet, wobei die Elution mittels 5 CV Elutionspuffer (100%; Stufengradient) für Ni-NTA-Säulen erfolgte. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gegen H₂O filtriert und zur Entfernung des HAT-Tags in eine Bromcyanspaltung eingesetzt in dem konzentrierte Salzsäure bis zu einer finalen Konzentration von 0,1 M hinzugegeben wurde. Nach einer Zugabe von einigen Milligramm Bromcyan (ca. 100 facher molarer Überschuss; aufgrund der Toxizität nicht abgewogen!)

wurde das Gefäß mit Aluminiumfolie eingewickelt und bei RT über Nacht unter einem Abzug inkubiert. Durch Zugabe eines 10 fachen Volumenüberschusses von Wasser wurde die Reaktion gestoppt und zweimal lyophilisiert. Anschließend erfolgte eine Resuspension in 100 mM Tris HCl pH 8,0; 6 M GdnHCl und zur Renaturierung gegen 10 mM Tris HCl pH 8,0 dialysiert (4 °C über Nacht).

3.11.2 Präparation von FcRn

Die Reinigung des FcRn erfolgt nach dem Protokoll von Andersen *et al.*¹⁰⁵ Der FcRn liegt nach der Überexpression in *E. coli* in *inclusion bodies* vor, deshalb müssen diese nach der Zellyse zunächst gereinigt und gelöst werden. Da es hierdurch zu einer Denaturierung kommt, erfolgte nach mehreren chromatographischen Reinigungsschritten unter denaturierenden Bedingungen eine Renaturierung des Rezeptors und eine erneute chromatographische Reinigung.

Durchführung

Das Zellpellet aus 1 L Kultur wurde in 20 ml 10 mM Tris HCl pH8,0; 100 µg/ml Lysozym aufgenommen und mittels French Press (3.9.2) lysiert. Anschließend wurden die *inclusion bodies* zur Reinigung in IB1-Puffer (Tabelle 13) gelöst und bei 17000 x g, 4 °C für 10 min zentrifugiert, um anschließend in IB2-Puffer aufgenommen und erneut zentrifugiert zu werden. Zum Lösen der *inclusion bodies* wurden diese in 20 mM Tris HCl pH 8,0; 8 M Harnstoff (200 ml/100g Feuchtwicht) aufgenommen und anschließend bei 17000 x g, 4 °C für 15 min zentrifugiert. Nach Filtration des Überstands mit den Porengrößen 5 µm, 1,2 µm, 0,8 µm und 0,45 µm wurde das Filtrat auf eine mit 8 M Harnstoff, 25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl (pH 8,0) äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen (3.10.1), welche anschließend mit 2 Säulenvolumen (CV) gewaschen wurde. Zur Elution wurde ein Gradient von 0 – 25% Elutionspuffer FcRn verwendet. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und durch eine Größenausschlußchromatographie (3.10.3) getrennt. Der gereinigte Rezeptor wurde mit Renaturierungspuffer-FcRn, der einen 4-fach molaren Überschuss an βMg enthielt, auf eine Endkonzentration von 30µg/ml verdünnt und anschließend für eine Stunde rührend bei RT inkubiert, gefolgt von 72 h bei 4 °C. Nun wurde das Gemisch mittels Ultrafiltration konzentriert, um dann mittels einer Superdex-Gelfiltration (3.10.2) getrennt zu werden, um mögliche Multimere zu entfernen.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Puffer zur Reinigung von FcRn

Puffer	Zusammensetzung	
<i>Inclusion body</i> -Waschpuffer 1 (IB1)		PBS
	0,5%	Triton-X100 (v/v)
	0,1%	Deoxycholsäure (w/v)
<i>Inclusion body</i> -Waschpuffer 2 (IB2)	50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	1 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
Renaturierungspuffer FcRn	50 mM	Tris-Glycin (pH 8,5)
	4-fach M	Überschuss an β Mg
FcRn - Elutionspuffer Ni-NTA	8 M	Harnstoff
	50 mM	Tris-HCl
	0,2 M	NaCl
	0,25 M	Imidazol
		pH eingestellt auf 8,0

3.11.3 Präparation von Fc γ RIII

Die Reinigung des Fc γ RIII erfolgt nach dem Protokoll von Zhang *et al.*⁴⁰ Der Rezeptor Fc γ RIII befindet sich nach Zelllyse in *inclusion bodies*. Die *inclusion bodies* werden unter denaturierenden Bedingungen gelöst und das Gemisch direkt in einer Renaturierung eingesetzt. Anschließend erfolgt eine Reinigung durch Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie.

Für die Reinigung von Fc γ RIII ist hier lediglich ein genereller Ablauf beschrieben, da zunächst das Volumen und die Inkubationszeit des Renaturierungspuffers optimiert werden muss.

Durchführung

Zur Lyse durch French Press (3.9.2) wurde das Zellpellet zunächst in 2 M Harnstoff aufgenommen. Nach dem Zellaufschluss wurden die *inclusion bodies* in 1 ml 8 M Harnstoff resuspendiert und unter ständigem Rühren über ~15 h mit einer Flussrate von 1 μ l/min bei 4 °C in 400 ml Renaturierungspuffer Fc γ RIII (Tabelle 14) getropft. Das Gemisch wurde über 4 Tage bei 4 °C gerührt. Nun erfolgte eine Konzentrierung durch Ultrafiltration (MWCO 3 kDa), gefolgt von einer Dialyse (MWCO 3,5 kDa) gegen 5 L entionisiertes Wasser für 24 h bei 4 °C mit einem einmaligen Wechsel des Wassers. Nach einer Zentrifugation (15 min,

8000 x g, 4 °C) wurde die Proteinprobe mit Bindepuffer für Ni-NTA-Säulen (Tabelle 12) aufgefüllt (40 ml Puffer auf 10 ml Probe) und auf eine Ni-NTA-Säule (3.10.1) aufgetragen. Die Elution erfolgte mittels 5 CV Elutionspuffer (100%; Stufengradient). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gegen Superdex-Puffer (50 mM Tris; 50 mM NaCl; pH 8,0 bei RT eingestellt mit HCl) über Nacht bei 4 °C dialysiert. Nach einer Zentrifugation und Konzentrierung auf ein Volumen von ungefähr 150µl mittels Amicon Ultra 10 K wurde das Proteingemisch in einer Gelfiltration (3.10.2) eingesetzt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Puffer zur Reinigung von FcγRIII

<u>Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Renaturierungspuffer FcγRIII	0,5 M Arginin
	5 mM CaCl ₂
	5 mM Cysteamine
	5 mM Cystamin
	50 mM Tris
	pH 8,0 bei RT eingestellt mit HCl

3.12 Protein-Glutamin-γ-Glutamyltransferase-Reaktion

Protein-Glutamin-γ-Glutamyltransferasen (Transglutaminasen, Tgase) katalysieren einen Acyltransfer von einem peptidgebundenen Glutaminrest und einem primären Amin. Ist zusätzlich zu dem Glutaminrest ein Lysinrest an der Reaktion beteiligt, kommt es zur Ausbildung intra- oder intermolekularer Verknüpfung von Proteinen.

Durchführung

Das βMg wurde umgepuffert in Tgasepuffer (Tabelle 15), mit 12,5 µg Tgase (0,1 U T006; 9,4 U T040) versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Wenn die Modifizierung des Proteins durch verschiedenen Substanzen untersucht werden sollten, wurden diese dem Tgasepuffer zugesetzt und der pH-Wert gegebenenfalls korrigiert.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Tgasepuffers (* Bei NMR-Messungen wurde Tris-D₁₁ verwendet.)

Puffer	Zusammensetzung	
Tgasepuffer ⁹²	30 mM	Tris*
	100 mM	NaCl
	10 mM	CaCl ₂
	pH 7,5 bei RT eingestellt mit HCl	
Optionale Zugabe	30 mM	Methylamin ⁹²
	Überschuss	Amindonor: <i>N</i> -(Tetramethylrhodaminyl)-cadaverine/ <i>N</i> -(TAMRA)cadaverine von Zedira
	Überschuss	Glutamindonor: FITC-Ahx-TVQQEL

3.13 NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie findet Anwendung bei Untersuchungen von Proteinwechselwirkungen mit Liganden¹⁰⁶ als auch Proteinen,¹⁰⁷ sowie Moleküldynamiken. Sie dient ebenso zur Strukturaufklärung von Molekülen auf atomarer Ebene.

In dieser Arbeit wurde die NMR-Spektroskopie unter anderem zur Identifizierung durch Transglutaminasen modifizierten Aminosäuren eines Proteins verwendet. Des Weiteren sollten Protein-Liganden Wechselwirkungen untersucht werden.

Alle Experimente wurden an einem Bruker Avance AVIII 500MHz Spektrometer mit TCI-Kryoprobenkopf mit Z-Gradienten durchgeführt. Die Auswertung der Tripleresonanzspektren erfolgte mit Sparky, bei allen anderen Spektren mit TopSpin 3.1.

3.13.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Bei eindimensionalen ¹H-NMR-Experimenten erhält man ein Spektrum, das nur aus Signalen einer Kernsorte besteht, in diesem Fall von Protonen. Mit Hilfe dieser Art von Spektrum lassen sich erste Angaben über Reinheit, Konzentration und Qualität der Probe machen.

¹H-NMR-Experimente

Alle Experimente wurden mit dem Pulsprogramm zgpg30 durchgeführt. Die Aufnahmeparameter waren: Datenpunkte (¹H) 32768; Spektrale Breite in ppm (¹H) 16. Die Anzahl der Scans variierte zwischen 32 und 128. Die Probe wurde mit final 10% D₂O (v/v) gemessen, wobei sich die genaue Probenzusammensetzung, Temperatur und NMR-Röhrchen nach dem jeweiligen Versuchsaufbau der nachfolgenden NMR-Messungen richtete.

3.13.2 2D Heteronuclear Single-Quantum Correlation (HSQC) Experimente

Die Verwendung eines 1D-Spektrums für komplexe Moleküle, wie Proteine, ist aufgrund der vielen Überlagerung der Signale im Spektrum nicht möglich. Die Nutzung einer zusätzlichen spektralen Dimension führt zu einer weiteren Aufspaltung der Signale. Ein Beispiel für ein zweidimensionales NMR-Spektrum ist das Heteronuclear Single-Quantum Correlation (HSQC) Experiment.¹⁰⁸ Hier wird die Magnetisierung von Protonen, die durch eine Bindung mit einem Heterokern gekoppelt sind, auf den Heterokern und wieder zurück transferieren. Zur Untersuchung an Proteinen wird häufig, wie auch in dieser Arbeit, das ¹H, ¹⁵N HSQC-Experiment gewählt. Jedes im Spektrum auftretende Signal repräsentiert ein Proton, das an ein ¹⁵N-Atom gebunden ist. Bei einem Protein bedeutet das, dass im Spektrum die NH-Gruppen des Proteinrückgrats (Abbildung 10) und der Aminosäuren Tryptophan und Histidin, sowie die NH₂-Gruppen der Seitenketten der Aminosäuren Asparagin und Glutamin als Signale dargestellt werden. Die Aminosäure Prolin stellt hier eine Ausnahme dar, da sie durch ihre cyclische Struktur kein NH hat und daher kein Signal zeigt.

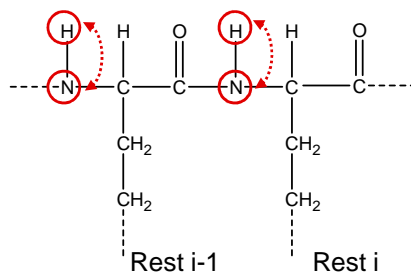


Abbildung 10: Darstellung des Magnetisierungstransfers innerhalb des Proteinrückgrates in einem ¹H, ¹⁵N HSQC-Experiment. Die Kerne der Aminosäurereste i und i-1 eines Proteins, deren Frequenzen detektiert werden können, sind rot hervorgehoben und der Weg des Magnetisierungstransfers ist durch einen Pfeil dargestellt.

Die natürliche Häufigkeit von ^{15}N liegt bei 0,4 %, daher müssen Proteine, die für eine ^1H , ^{15}N HSQC-Messung verwendet werden sollen, zuvor mit diesem Isotop angereichert (markiert) werden (3.7.2). Je nach Fragestellung können hierbei einzelne Aminosäuren selektiv oder das Protein wird uniform markiert.

^1H , ^{15}N HSQC-Experimente zur Identifizierung des an der Tgaseaktion beteiligten Lysinrestes des βMg .

Zur Identifizierung des, an der Tgaseaktion beteiligten, Lysinrestes des βMg wurden ^1H , ^{15}N HSQC-Spektren aufgenommen. Hier wurden 0,15 - 0,3 mM u- ^{15}N -, u- $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ - als auch selektiv ^{15}N Lys-markierte βMg -Proben verwendet, Um die beteiligten Aminosäurereste identifizieren zu können, wurde dem Tgasepuffer das FITC-Ahx-TVQQEL und entweder die murine oder die guinea pig Tgase hinzugefügt. Uniform markierte Proteinproben wurden in 3 mm NMR-Röhrchen mit 32 Scans und selektiv markierte Proteinproben in 3 mm Shigemi-Röhrchen mit 16 Scans gemessen. Alle Experimente enthielten die Datenpunkte ($^1\text{H}\times^{15}\text{N}$) 2048x128, die Spektrale Breite in ppm ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) 16/40 und wurden bei 298 K durchgeführt. Die Probe wurde in den aufgezeigten Experimenten in Tgasepuffer versetzt mit final 10% D_2O (v/v) gemessen.

^1H , ^{15}N HSQC-Experimente zur Identifizierung des an der Tgaseaktion beteiligten Glutaminrestes des βMg .

Um den an der Tgaseaktion beteiligten Glutamirest des βMg identifizieren zu können, wurde dem Tgasepuffer Methylamin bzw. der Amindonor N-(Tetramethylrhodaminyl)-cadaverine von Zedira und entweder die murine oder die guinea pig Tgase hinzugefügt. Alle Experimente enthielten die Datenpunkte ($^1\text{H}\times^{15}\text{N}$) 2048x128, die Spektrale Breite in ppm ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) 16/40, 32 Scans und wurden bei 298 K in einem 3 mm NMR-Röhrchen durchgeführt. Die 0,3 – 0,6 mM u- ^{15}N bzw. u- $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ markierten Proteinproben wurde in den aufgezeigten Experimenten in Tgasepuffer versetzt mit final 10% D_2O (v/v) gemessen.

^1H , ^{15}N HSQC-Experimente zur Untersuchung der $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ -IgG-Komplexbildung .

Um Aminosäuren identifizieren zu können, die an der Bindung des $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ mit dem IgG stehen ($K_A = 5 * 10^5 \frac{1}{\text{M}}$), wurden ^1H , ^{15}N HSQC-Experimente mit und ohne IgG durchgeführt Alle Experimente wurden mit einer 0,026 mM u- ^{15}N markierten $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ -Proteinprobe in einem 3mm Shigemi-Röhrchen gemessen. Die Aufnahmeparameter waren: Datenpunkte ($^1\text{H}\times^{15}\text{N}$) 2048x512; Spektrale Breite in ppm ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) 16/36. Die Probe wurde

in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 mit final 10% D₂O (v/v) gemessen. Die Probe ohne IgG wurde bei 298 K und 60 Scans gemessen. Nach Zugabe von 0,95 mg IgG erfolgte die Messung mit 64 Scans und bei 310 K.

3.13.3 Tripleresonanzexperimente

Zur Identifizierung von an Bindungen beteiligten Aminosäuren eines Proteins müssen die Signale eines ¹H, ¹⁵N HSQC-Spektrums den einzelnen Aminosäuren zugeordnet werden. Hierzu werden Tripelresonanzexperimente verwendet, bei denen die Kerne ¹H, ¹⁵N, und ¹³C miteinander korrelieren.¹⁰⁹ In dieser Arbeit wurden die Tripelresonanzexperimente HNCO, HNCA und HN(CO)CA durchgeführt. Hier zeigt der Name der Experimente, wie der Transfer der Magnetisierung verläuft, wobei in Klammern stehende Kerne zwar am Transfer der Magnetisierung beteiligt sind, jedoch nicht detektiert werden.

Die Magnetisierung beim HNCO-Experiment geht vom Amidproton des Restes i über den dazugehörigen Stickstoffkern zum CO des Aminosäurerestes i-1. Beim HNCA geht die Magnetisierung auf die C_α-Kerne der Reste i und i-1 und bei einem HN(CO)CA-Experiment korreliert das Amidproton und der Stickstoffkern der Aminosäure i nur mit dem C_α der Aminosäure i-1 (Abbildung 11).

Durch die Kombination dieser drei Experimente lassen sich die Signale in einem ¹H, ¹⁵N HSQC-Spektrum den Aminosäuren des Proteinrückgrates zuordnen.

Eine bereits publizierte Zuordnung (BMRB Eintrag 17165¹¹⁰) der βMg-Peaks eines ¹H, ¹⁵N HSQC-Spektrums dienen der eindeutigen Identifizierung der, durch Verwendung andere Puffer- und Messbedingungen, abweichenden βMg-Signale des ¹H, ¹⁵N HSQC-Spektrum dieser Arbeit.

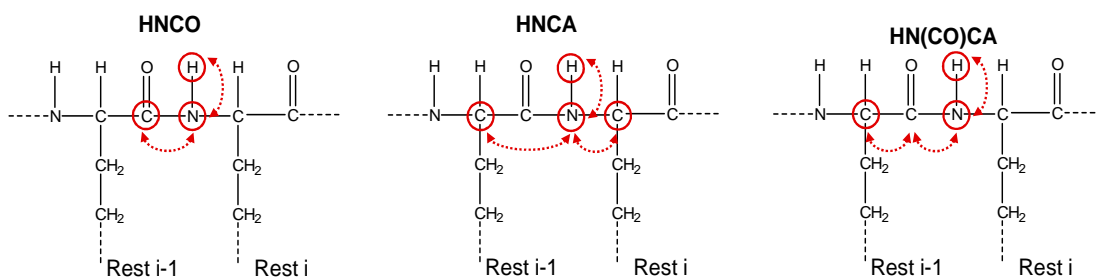


Abbildung 11. Darstellung des Magnetisierungstransfers innerhalb des Proteinrückgrates in Tripelresonanzexperimenten. Die Kerne der Aminosäurereste i und i-1 eines Proteins, deren Frequenzen detektiert werden können, sind rot hervorgehoben und der Weg des Magnetisierungstransfers ist durch einen Pfeil dargestellt.

Zuordnungsexperimente

Eine 0,6 mM u-¹⁵N/¹³C markierte βMg-Probe (in Tgasepuffer) wurde in den Zuordnungsexperimenten in Tgasepuffer versetzt mit final 10% D₂O (v/v) unter Verwendung eines 3 mm NMR-Röhrchens bei 298 K gemessen. Die Aufnahmeparameter der verschiedenen Experimente sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Aufgenommene Zuordnungsexperimente.

	HSQC	HNCO	HNCA	HN(CO)CA
Scans	2	16	8	8
Datenpunkte (¹ Hx ¹⁵ Nx ¹³ C)	2048x256	2048x36x96	2048x56x128	2048x40x128
Spektrale Breite in ppm (¹ H/ ¹⁵ N/ ¹³ C)	16/40	16/34/22	16/34/32	16/34/32

3.13.4 Sättigungstransfer Differenz (STD)-NMR-Spektroskopie

Sättigungstransfer Differenz (STD)-NMR-Spektroskopie erlaubt es, Wechselwirkungen zwischen makromolekulare Moleküle (Proteine) und kleinen Molekülen (Liganden) zu messen.

Die Methode beruht auf der Möglichkeit, selektiv Protonen von Proteinen zu sättigen. Dies ist möglich durch die Anregung eines spektralen Bereichs des Makromoleküls, der frei von jeglichen Signalen des Liganden ist. Durch Spindiffusion breitet sich die Sättigung über den gesamten Rezeptor aus. Wenn das kleinere Molekül (Ligand) an den Rezeptor bindet, wird die Sättigung auch auf den Liganden übertragen. Dadurch wird die Intensität des Signals des Liganden reduziert. Durch Subtraktion des resultierenden Spektrums von dem Referenzspektrum (ohne Sättigung) ergibt das STD-Spektrum, welches nur Signale von bindenden Liganden aufzeigt.^{106,111} Um viele Substanzen gleichzeitig auf Interaktion mit einem Protein zu untersuchen werden Fragmentbibliotheken verwendet.

Maybridge library

Die Fragmentbibliothek wurde erworben bei Thermo Scientific (*Maybridge Ro5 fragment library* welche der Vorgänger der *Ro3 library* ist). Sie wurde speziell für Untersuchungen durch NMR-Spektroskopie entwickelt. Sie enthält 500 Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 500 Da und einer Wasserlöslichkeit von mindestens 2 mM je

Substanz. Die Substanzen wurden so in Gruppen (sogenannter BINs) aufgeteilt, dass jede Substanz wenigstens einen charakteristischen, individuellen Peak im Referenzspektrum aufweisen kann.¹¹²

Die hier verwendeten Komponenten wurden den Stammlösungen von Rademacher¹¹³ entnommen.

Durchführung

Für STD-Experimente wurde der FcRn in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 umgepuffert. Die Endkonzentration des Proteins betrug ungefähr 12 μM , versetzt mit dem jeweiligen BIN mit einer Konzentration von 64 μM je Komponente. Zusätzlich wurde die Probe mit 0,05 mM TSP- d_4 und D_2O (final 10% v/v) versetzt. Die NMR-Messungen erfolgten mit 2048 Scans, 24576 Datenpunkten (^1H) und einer spektralen Breite (^1H) von 14 ppm bei 298 K in einem 3 mm Shigemi-Röhrchen. Zur Messung des Referenzspektrums des BIN 25 wurden die Parameter blieben die Parameter unverändert, lediglich die Anzahl der Scans wurde auf 64 herabgesetzt.

3.14 Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Mit Massenspektrometrie werden Molekülmassen von Molekülen und Atomen bestimmt. Die Substanz, die untersucht werden soll, wird in die Gasphase überführt und ionisiert. Eine Ionisierung wird durch die Aufnahme oder Abgabe eines Elektrons erreicht. In einem elektrischen Feld werden die Ionen beschleunigt und gelangen zum Massenanalysator. Dort werden die erzeugten Ionen entsprechend ihres Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) getrennt und in einem Detektor detektiert.

Ist bei der Analyse eines Proteins die Aminosäuresequenz bekannt, können aus der Differenz der theoretischen und tatsächlichen Masse Modifikationen des Proteins abgeleitet werden.

3.14.1 Probenvorbereitung für massenspektrometrische Experimente

Proteinproben, die auf Modifikationen durch Massenspektrometrie untersucht werden sollen, wurden wie in Tabelle 17 beschrieben hergestellt, 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend viermal mit Wasser gewaschen um störende Salze aus den Versuchsansätzen zu entfernen. Die Ansätze wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

Tabelle 17: Probenzusammenstellung für massenspektrometrische Experimente. Mit unmarkiertem β Mg wurden verschiedene Probe hergestellt.

Proben	β Mg (mM)	FITC-Ahx-TVQQEL (Überschuss)	Methylamin (final 30 mM)	TAMRA (Überschuss)	Tgase (1,25 μ g)
Referenz	0,9	-	-	-	-
1	0,9	+	-	-	murin
2	0,9	+	-	-	guinea pig
3	0,2	-	+	-	murin
4	0,2	-	+	-	guinea pig
5	0,9	-	-	+	murin
6	0,9	-	-	+	guinea pig

3.14.2 Durchführung der massenspektrometrische Experimente

Die Durchführung der Experimente erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Dominik Schwudke; Bioanalytische Chemie; Forschungszentrum Borstel.

Durchführung

Jeweils 5 μ l Probe wurden mit 40 μ l Ammoniumhydrogencarbonat (50 mM) und 1 μ l Dithiothreitol (45 mM) versetzt, bei 50 °C inkubiert, anschließend abgekühlt, um dann mit 1 μ l 100 mM 2-Jodacetamid versetzt und im Dunklen bei 15 min bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 μ l Trypsin (Promega Gold; Stammlösung 5 μ g/ μ l in 0,001 n HCl 1:10 mit 50 mM Ammoniumcarbonat verdünnt). Nach einer Inkubation über Nacht wurden der Probe 5 μ l 10 % Trifluoressigsäure hinzugesetzt und zur Trockne eingedampft. Um dann in 3 μ l 0,1% Trifluoressigsäure aufgenommen und mit α -Cyano-4-hydroxymethylsäure, Sinapinsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure präpariert zu werden.

4 Ergebnisse

Im Ergebnisteil werden zunächst die Resultate zur Optimierung der Proteinpräparationen des β Mg und der Rezeptoren FcRn und Fc γ RIII dargestellt. Anschließend wird gezeigt welche Ergebnisse bei der Identifikation der an der Tgaseaktion beteiligten Aminosäuren des β Mg erzielt werden konnten. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf Auswirkungen der Tgase auf β Mg im Komplex mit FcRn, und somit auch Klasse I Haupthistokompatibilitäts-Komplexen und welchen Effekt dies auf das Immunsystem hat. Zuletzt zeigten Untersuchungen, ob NMR-spektroskopische Strukturuntersuchungen an dem Fc γ RIII-IgG-Komplex durchgeführt werden können und das der Fc γ RIII für Untersuchungen durch STD-NMR-Spektroskopie geeignet ist.

4.1 Etablierung von Expressionssystemen zur Präparation der Proteine β Mg, hFcRn und mFcRn

In den bisher veröffentlichten Präparationsprotokollen des β Mg¹⁰⁴ wird das Protein aus *inclusion bodies* gereinigt. In dieser Arbeit sollte zunächst versucht werden Bedingungen zu finden, die es ermöglichen lösliches Protein zu erhalten. Des Weiteren sollten die Expressionsbedingungen des FcRn optimiert werden, mit dem Aspekt die höchst mögliche Proteinausbeute zu erzielen. Hierzu wurden verschiedene Klonierungsvektoren, *E. coli*-Expressionsstämme sowie unterschiedliche Induktionsbedingungen untersucht. Anschließend sollen die Reinigungsprotokolle für die Versuche dieser Arbeit angepasst werden.

4.1.1 Klonierung unter Verwendung verschiedener Vektoren

Zur Etablierung von neuen Expressionssystemen für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden unterschiedliche Vektoren zur Klonierung verwendet. Der pIVEX2.3d-Vektor dient zur zellfreien Proteinexpression und ermöglicht so eine selektive Markierung der Proteine für die NMR-Spektroskopie. Außerdem wurde der Vektor pTWIN1 verwendet, dieser ermöglicht eine Reinigung über einen Intein-Tag, welcher durch eine Autokatalyse

abgespalten werden kann. Außerdem wurde, wie in den Publikationen,^{40,104,105} der pET28a(+)-Vektor verwendet.

Entwicklung eines Genkonstruktes

Zur Klonierung der proteinkodierenden DNA-Sequenz für das β Mg als auch für den FcRn, wurde zunächst ein generelles Genkonstrukt (Abbildung 12) entwickelt.

Zur Reinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie wurde eine HAT-Tag kodierende Sequenz im Genkonstrukt verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Polyhistidin-Affinitätstag, wobei sich verschiedene Aminosäuren zwischen den Histidinen befinden. Dies ermöglicht, im Vergleich zu einem konventionellen His-Tag, eine Elution des Proteins mit niedrigeren Imidazolkonzentrationen. Dies ist schonender für das Protein. Um den Tag nach der Reinigung des FcRn entfernen zu können, wurde C-terminal vom Tag eine TEV-Protease-Erkennungssequenz kodiert. Beim β Mg sollte hierzu die Bromcyanspaltung verwendet werden, weshalb darauf geachtet wurde, dass vor der Proteinsequenz des β Mgs ein Methionin kodiert wird. Außerdem enthält das Konstrukt verschiedene Restriktionsschnittstellen, die es ermöglicht Tags nutzen zu können, die bereits durch einen Vektor bereitgestellt sind. Die proteinkodierenden DNA-Sequenzen für das humane β Mg, den murinen FcRn (mFcRn) und den humanen FcRn (hFcRn) wurden als Plasmide pMA-hFcRn, pMA-mFcRn und pMA-Mg geliefert.



Abbildung 12: Generelles Schema der Genkonstrukte. N-terminal zur proteinkodierenden Sequenz befinden sich Sequenzen, die den HAT-Tag und eine Schnittstelle der TEV-Protease kodieren. Die Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen ermöglichen eine Klonierung in verschiedene Expressionsvektoren, sowie das Entfernen einzelner Fragmente. Das für die Bromcyanspaltung wichtige Methionin ist durch ein M dargestellt.

Klonierung von β Mg und FcRn

Nach dem veröffentlichten Präparationsprotokoll unter Verwendung des pET28a(+)-Vektors liegt das β Mg in inclusion bodies vor.¹⁰⁴ Zunächst sollte deshalb versucht werden ein Expressionssystem zu etablieren, mit dem es möglich ist, das Protein löslich und rein in großer Menge herzustellen. Bei der Etablierung eines Expressionssystems für den humanen

FcRn (hFcRn) als auch den murinen FcRn (mFcRn) sollte die Proteinausbeute optimiert werden.

Die Plasmide pMA- β Mg, pMA-hFcRn und pMA-mFcRn wurden zur Klonierung in die Vektoren pET28a(+) und pIVEX2.3d zunächst mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und XhoI gespalten, entstandene Fragmente durch eine Agarosegelelektrophorese getrennt und die Banden von Interesse aus dem Gel extrahiert. Nun konnten diese in eine Ligation eingesetzt werden. Nach einer Hitzeschocktransformation in *E. coli* DH5 α wurden die Plasmide isoliert und zur Überprüfung einer Restriktionsanalyse mit anschließender Agarosegelelektrophorese unterzogen (erwartete Fragmentgrößen siehe Tabelle 18). Bei der Analyse der Agarosegele zeigte es sich als unmöglich die Banden der Inserts zu erkennen. Anhand der Größenunterschiede der linearisierten Vektoren und der Vektoren aus denen das Insert heraus gespalten wurde, konnten alle Transformanten als positiv analysiert werden (Abbildung 13). Das Ergebnis konnte anschließend durch Sequenzierungen der Firma Eurofins MWG Operon bestätigt werden. Im Folgenden werden die Plasmide als pIVEX-mFcRn, pIVEX-hFcRn, pIVEX- β Mg, pET-mFcRn, pET-hFcRn und pET- β Mg bezeichnet.

Eine Klonierung in den pTWIN1-Vektor konnte an dieser Stelle nicht erzielt werden.

Da pIVEX-Konstrukte ausschließlich zur zellfreien Expression dienen, wurden im Folgenden die pET-Konstrukte für Testexpressionen mit verschiedene *E. coli* Stämme verwendet um Bedingungen zu finden, die es ermöglichen die Proteinexpression zu optimieren.

Tabelle 18: Erwartete Fragmentgrößen einer Restriktionsanalyse mit verschiedenen Endonukleasen.

Plasmidname	Restriktionsenzym(e)	Erwartete Fragmente [bp]
pIVEX-mFcRn	NcoI/XhoI	3532; 932
	SmaI	4464
pIVEX-hFcRn	NcoI/XhoI	3532; 932
	NdeI	4368; 96
pIVEX- β Mg	NcoI/XhoI	3532; 428
	SmaI	3960
pET-mFcRn	NcoI/XhoI	5231; 932
	EcoRV	6163
pET-hFcRn	NcoI/XhoI	5231; 932
	EcoRV	6163
pET- β Mg	NcoI/XhoI	5231; 428
	EcoRV	4175; 1484
pET28a(+)	EcoRV	5369

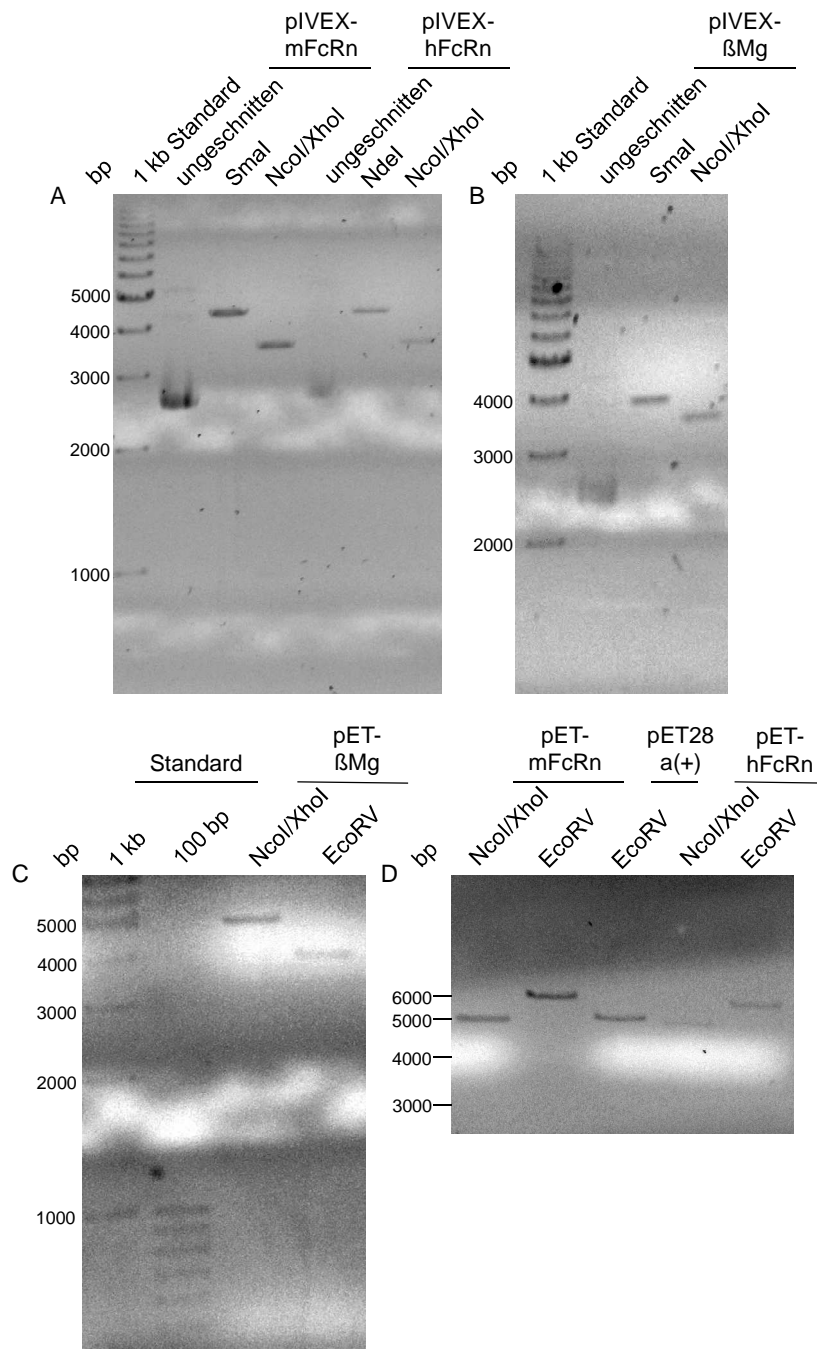


Abbildung 13: Analyse der mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespaltenen Plasmide pIVEX-mFcRn (A), pIVEX-hFcRn (A), pIVEX-βMg (B), pET-βMg (C), pET-mFcRn (D) und pET-hFcRn (D) zur Überprüfung der Konstrukte durch gelelektrophoretische Trennung. Die Restriktionsansätze wurden auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Inserts der gespaltenen Vektoren konnten nicht visualisiert werden. So das ein Erfolg der Restriktionsanalysen ausschließlich anhand der Größenunterschiede der Vektoren festgestellt wurden. Als Standard diente der BioRad EZ Load™ Molecular Rulers 1 kb und der BioRad EZ Load™ Molecular Rulers 100 bp.

4.1.2 Testexpressionen unter Verwendung verschiedener *E. coli* Stämme

Das β Mg ist essentiell für die Renaturierung des FcRn. Mit den hier hergestellten Vektorkonstrukten ist es nicht möglich löslichen Rezeptor in *E. coli* zu exprimieren. Verschiedene *E. coli* Stämme sollten nun auf ihre Proteinausbeute überprüft werden um die Proteinexpression optimieren zu können. Des Weiteren soll ein Expressionssystem gefunden werden, das es ermöglicht lösliches β Mg zu erhalten.

E. coli BL21 (DE3)

Hierzu wurden zunächst die Vektoren pET-mFcRn, pET-hFcRn und pET- β Mg durch Hitzeschock in den *E. coli* BL21 (DE3) transformiert, welcher in den publizierten Präparationsprotokollen verwendet wurde. Mit den Transformanten wurden LB-Kulturen inokuliert, bei 37 °C angezogen und bei einer OD₆₀₀ 0,2 eine Probe entnommen. Die Induktion der Proteinbiosynthese der verbleibenden Kulturen erfolgte mittels IPTG-Zugabe. Nach einer über Nacht Inkubation bei 26 °C wurde erneut eine Probe abgenommen. Eine Analyse der genommenen Proben erfolgt mittels SDS-Gelelektrophorese (Abbildung 14). Hier zeigte sich, dass die Proteinsynthese für die Proteine β Mg und hFcRn induzierbar war. Jedoch ist es aus nicht bekannten Gründen auch nach weiteren Versuchen nicht gelungen die Proteinsynthese für den murinen neonatalen Fc Rezeptor zu induzieren.

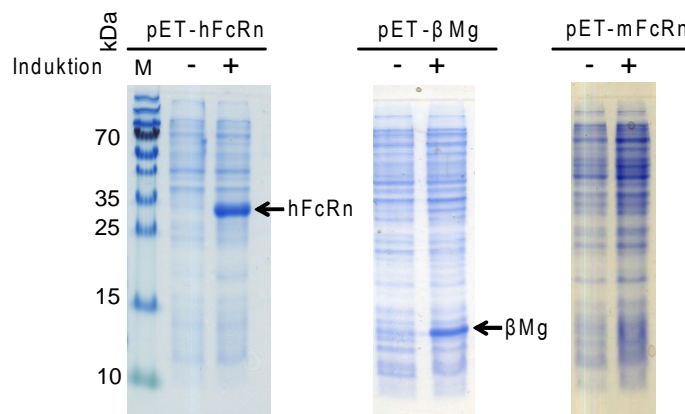


Abbildung 14: Nachweis der induzierten Proteinsynthese der Proteine β Mg, hFcRn und mFcRn exprimiert vom Vektor pET28a(+) in *E. coli* BL21 (DE3) bei einer Induktionstemperatur von 26 °C. Gezeigt sind 15%ige SDS-Polyacrylamidgels (Coomassie gefärbt) bei denen jeweils Fraktionen induzierter (+) und nicht induzierter (-) LB-Kulturen aufgetragen waren. Beim mFcRn konnte keine Induktion der Proteinsynthese festgestellt werden. M: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific.

E. coli Origami2 (DE3) pLysS

E. coli Origami2 (DE3) pLysS wurde ebenfalls mit den Konstrukten pET-mFcRn, pET-hFcRn und pET- β Mg transformiert. Wie bereits für den *E. coli* BL21 (DE3) beschrieben, wurden transformierte *E. coli* Origami2 (DE3) pLysS einer Testexpression in LB-Medium unterzogen. Nach der Entnahme der induzierten Proben wurden die verbleibenden Kulturen einem Zellaufschluss durch Ultraschall unterzogen, um durch Zentrifugation die lösliche von der nicht löslichen Fraktion trennen zu können. Die Analyse des *E. coli* Origami 2 (DE3) pLysS durch SDS-Gelelektrophorese zeigte entgegen den Erwartungen für das Plasmid pET-mFcRn eine Proteinbande in der induzierten Probe bei den zu erwartenden 33,6 kDa (Abbildung 15). Dies ist erstaunlich, da zuvor in *E. coli* BL21 (DE3) keine Induktion der Proteinsynthese möglich war. Es ist ebenfalls deutlich eine Bande in der nicht löslichen Fraktion nach Zellaufschluss mittels Ultraschall erkennbar. Dies bedeutet, dass auch in diesem Bakterienstamm der murine FcRn in *inclusion bodies* vorliegt. Bei *E. coli* Origami2 (DE3) pLysS pET-hFcRn ist keine eindeutige Induktionsbande zu erkennen, jedoch scheint der Rezeptor in der nicht löslichen Fraktion vorzuliegen (Abbildung 15). Bei dem *E. coli*, der das Plasmid pET- β Mg trägt, kann vermutet werden, dass die Proteinsynthese induziert worden ist, da eine sehr schwache Proteinbande in der induzierten Probe zu erkennen ist. Außerdem scheint eine ebenfalls sehr schwache Proteinbande bei den zu erwarteten 15,6 kDa in der löslichen Fraktion detektierbar (Abbildung 15). Diese schwache Bande lässt vermuten, dass das β Mg in geringen Mengen löslich synthetisiert wird. Jedoch scheint die Menge nicht ausreichend zu sein um das Protein reinigen und für weitere Versuche verwenden zu können.

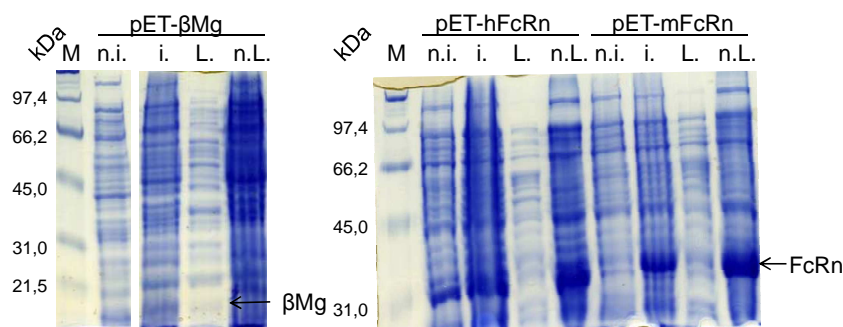


Abbildung 15: Nachweis der induzierten Proteinsynthese und Lokalisation des Proteins in Fraktionen des *E. coli* Origami 2 (DE3) pLysS, die die Plasmide pET-hFcRn, pET-mFcRn oder pET- β Mg trugen, bei einer Induktionstemperatur von 37 °C. Gezeigt sind 12%ige SDS-Polyacrylamidgele (Coomassie gefärbt) bei denen jeweils Fraktionen induzierter (i.) und nicht induzierter (n.i.) Kulturen aufgetragen waren. Ebenfalls wurden auf dem Gel die, nach einem Zellaufschluss erhaltenen, löslichen (L.) und nicht löslichen (n.L.) Fraktionen analysiert. M: BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range.

E. coli soluBL21

Ein weiterer *E. coli* Stamm, der auf die Proteinausbeute untersucht werden sollte, war der *E. coli* soluBL21. Dieser *E. coli* Stamm ist optimiert für die Expression von nicht-löslichen Proteinen in löslicher Form. Dieser sollte ebenfalls mit den Konstrukten pET-mFcRn, pET-hFcRn und pET-βMg transformiert werden. Jedoch gestaltet sich die Transformation in *E. coli* soluBL21 als schwierig und war ausschließlich für das Konstrukt pET-hFcRn erfolgreich. Nach Herstellerangaben war empfohlen *E. coli* soluBL21 in M9-Medium anzuziehen, deshalb wurde in diesem Medium, sowie in LB-Medium, wie beschrieben eine Testexpression durchgeführt. Es war zu beobachten, dass *E. coli* soluBL21 in M9-Medium deutlich langsamer anwächst als in LB-Medium. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall und die lösliche Fraktion wurde von der nicht löslichen durch Zentrifugation getrennt.

Die Analyse der Testexpression des *E. coli* soluBL21, der das Plasmid pET-hFcRn trug, durch SDS-Gelelektrophorese zeigte in M9-Minimalmedium, als auch im LB-Medium, keine Proteinbanden bei den zu erwartenden 33,6 kDa, die auf eine induzierte Überexpression des hFcRn schließen lässt (Abbildung 16).

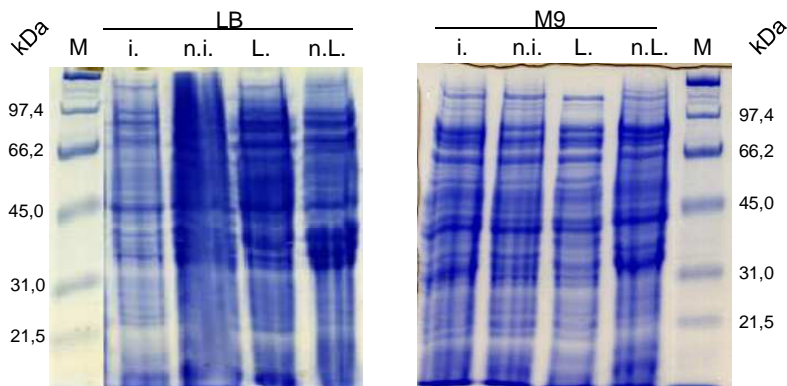


Abbildung 16: Nachweis der induzierten Proteinsynthese und Lokalisation des Proteins in Fraktionen des *E. coli* Stamms soluBL21 pET-hFcRn bei einer Induktionstemperatur von 21 °C. Gezeigt sind 12%ige SDS-Polyacrylamidgele (Coomassie gefärbt) bei denen jeweils Fraktionen induzierter (i.) und nicht induzierter (n.i.) Kulturen aufgetragen waren, die einem M9-Minimalmedium oder LB-Medium entstammten. Ebenfalls wurden auf dem Gel die, nach einem Zellaufschluss erhaltenen, löslichen (L.) und nicht löslichen (n.L.) Fraktionen analysiert. Es konnte keine Induktion der Proteinsynthese festgestellt werden. M: BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range.

Es ist in dieser Arbeit nicht gelungen Expressionssysteme zu finden, die es erlauben lösliches β Mg herzustellen oder die Proteinausbeute der neonatalen Fc-Rezeptoren zu optimieren. Im Folgenden wird mit dem Expressionsstamm *E.coli* BL21 (DE3) und den Plasmiden pET-hFcRn und pET- β Mg weitergearbeitet. Dies sind die Expressionsbedingungen, die bereits publiziert wurden.^{104,105}

4.2 Etablierung eines Expressionssystem zur Präparation des Fc γ RIII

Der FcRn wird in den veröffentlichten Präparationsprotokollen^{23,40} aus *inclusion bodies* gereinigt. Um es zu ermöglichen lösliches Protein zu erhalten, sollen in dieser Arbeit zunächst verschiedene Expressionsbedingungen untersucht werden.

4.2.1 Klonierung der extrazellulären Domänen des Fc γ RIII unter Verwendung verschiedener Vektoren

Um die NMR-spektroskopische Untersuchungen an dem Fc γ RIII Rezeptor vornehmen zu können, wurde das dafür kodierende Gen durch Mr. Gene synthetisch hergestellt (Sequenz siehe Anhang A1) und als Plasmid pMA-Fc γ RIII geliefert. Das genkodierende Fragment des Plasmids wurde in die Vektoren pTWIN1, pET28a(+) und pIVEX2.3d kloniert, um ein Expressionssystem zu etablieren mit dem es möglich ist, den Rezeptor in großer Menge rein herzustellen. Hierzu wurden zunächst die Plasmide pET28a(+), pIVEX2.3d und pMA-Fc γ RIII mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und NotI und die Plasmide pTWIN1 und pMA-Fc γ RIII mit den Restriktionsenzymen NcoI und EcoRI gespalten. Eine Trennung der entstandenen Fragmente erfolgte durch eine Agarosegelelektrophorese. Die Banden von Interesse wurden aus dem Gel extrahiert und in eine Ligation eingesetzt. Die Plasmide werden im Nachfolgenden als pIVEX-Fc γ RIII, pTWIN-Fc γ RIII und pET-Fc γ RIII bezeichnet. Nach einer Hitzeschocktransformation in *E. coli* DH5 α wurden die Plasmide isoliert und einer Restriktionsanalyse mit einer anschließenden Agarosegelelektrophorese unterzogen, wobei alle untersuchten Transformanten als positiv analysiert wurden. Anschließend konnten die Ergebnisse durch Sequenzierungen der Firma Eurofins MWG Operon bestätigt werden. Das Konstrukt pIVEX-Fc γ RIII besaß jedoch keinen His-Tag, sondern anstelle der Histidine befanden sich dort Serine. Hier wurde mit Hilfe von

Oligonukleotiden nachträglich ein Histag in den Vektor pIVEX-Fc γ RIII kloniert. Dieser Vektor, hier pIVEX-Fc γ RIII-His genannt, kann zur zellfreien Proteinexpression verwendet werden.

Der Expressionsstamm *E.coli* ER2566 wurde mittels Hitzeschocks mit dem Plasmid pTWIN-Fc γ RIII und der Expressionsstamm *E. coli* (DE3) BL21 mit dem Plasmid pET-Fc γ RIII transformiert. Anschließend wurde eine Testexpression durchgeführt.

4.2.2 Untersuchung der Expressionstämme *E. coli* ER2566 und *E. coli* BL21 (DE3) unter Verwendung verschiedener Bedingungen für den Fc γ RIII

Die Proteinsynthese des Fc γ RIII sollte in den Expressionstämmen *E. coli* ER2566 und *E. coli* BL21 (DE3) überprüft werden. Hierzu dienten die Plasmide pTWIN-Fc γ RIII und pET-Fc γ RIII. Es sollte analysiert werden, ob sich das Protein nach Zellyse in der löslichen oder nicht löslichen Fraktion befindet und ob eine Veränderung der Induktionstemperatur zu einer Optimierung der Proteinsynthese führt. Hierzu wurde eine Proteinexpression sowohl bei 20 °C über Nacht als auch bei 37 °C für drei Stunden durchgeführt. Nach einem Zellaufschluss durch Ultraschall erfolgte die Trennung der löslichen von der nicht löslichen Fraktion durch Zentrifugation. Eine kleine Menge der löslichen Fraktionen wurden zur Inkubation mit Ni-Sepharose- bzw. Chitinkügelchen verwendet, anschließend pelletiert, um dann mittels SDS-PAGE analysiert zu werden (Abbildung 17). Bei beiden Induktionsbedingungen liegt das Pellet in der nicht löslichen Fraktion und somit in *inclusion bodies* vor.

Mit den Vektoren pET-Fc γ RIII und pTWIN-Fc γ RIII wurden ebenfalls erfolgreich die Bakterienstämme *E. coli* soluBL21 und Origami 2 (DE3) pLysS transformiert. Mit diesen Klonen wurde eine Testexpression in LB-Medium bei 30 °C über Nacht durchgeführt. Die Analyse des *E. coli* Origami 2 (DE3) pLysS pET-Fc γ RIII durch SDS-Gelelektrophorese zeigt, dass die Induktion der Proteinsynthese erfolgreich war. Jedoch liegt hier der Rezeptor ebenfalls in der nicht löslichen Fraktion vor. Bei dem *E. coli* Origami 2 (DE3) pLysS mit dem Plasmid pTWIN-Fc γ RIII und *E. coli* soluBL21 mit den Plasmiden pTWIN-Fc γ RIII oder pET-Fc γ RIII konnte keine Induktion der Proteinsynthese festgestellt werden (nicht gezeigt). Auch mittels zellfreier Expression des Vektors pIVEX-Fc γ RIII mit Hilfe des RTS ProteoMaster von Roche war es nicht möglich lösliches Protein zu erhalten.

Es war in dieser Arbeit nicht möglich löslichen Fc γ RIII zu exprimiert. Eine weitere Möglichkeit lösliches Protein zu erhalten sollte mit Hilfe der für die Bindung des IgGs verantwortlichen extrazellulären Domäne untersucht werden.

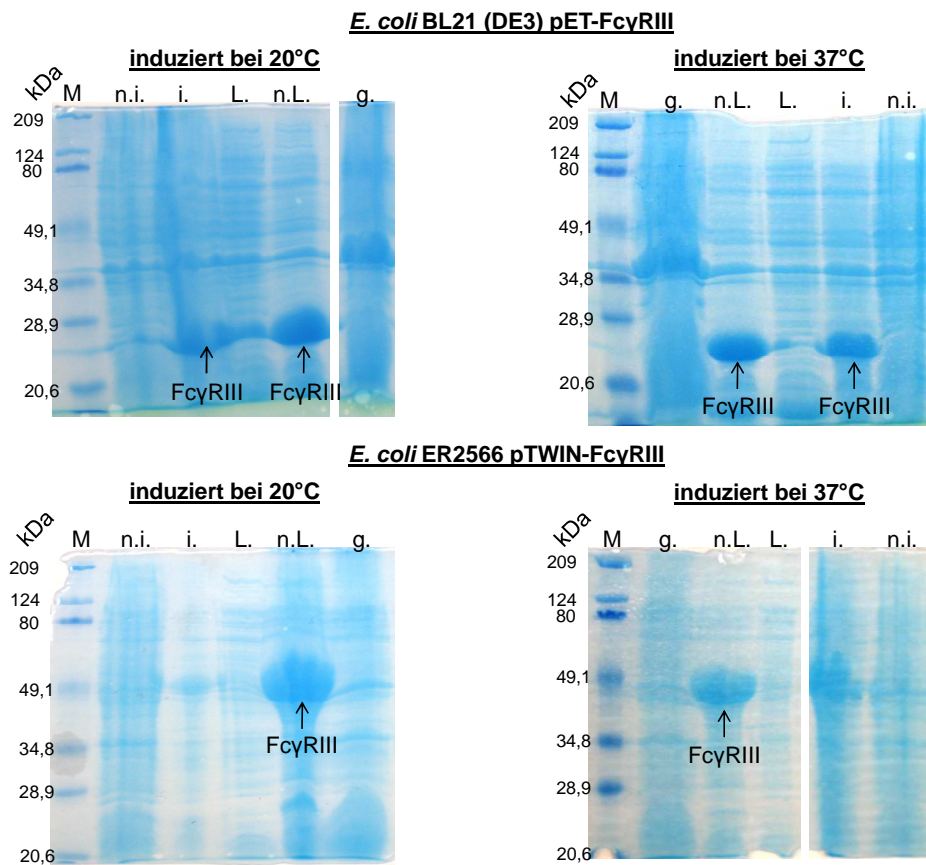


Abbildung 17: Nachweis des überexprimierten Proteins Fc γ RIII in *E. coli* bei einer Induktionstemperatur von 37 C beziehungsweise 20 °C. Gezeigt sind 12%ige SDS-Polyacrylamid-gele (Coomassie gefärbt), bei denen jeweils Fraktionen induzierter (i.) und nicht induzierter (n.i.) Kulturen aufgetragen waren. Ebenfalls waren die nach einem Zellaufschluss erhalten lösliche (L.) und nicht lösliche (n.L.) Fraktionen aufgetragen, sowie das durch Ni-Sepharose- bzw. Chitinkügelchen gereinigte (g.) Protein. M: BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range.

4.2.3 Klonierung der Bindedomäne des Fc γ RIII in den pET28a(+)-Vektor

Die zweite extrazelluläre Domäne mit der Hingereion (im Folgenden Fc γ RIII-Bindedomäne, kurz Fc γ RIII-BD, genannt) ist für die Bindung des Fc-Parts des IgG verantwortlich. So sollte diese Domäne des Fc γ RIII kloniert und untersucht werden, ob diese löslich exprimiert werden kann. Außerdem könnte dann bei anschließenden STD-Messungen unterschieden werden, ob Substanzen an die erste oder zweite extrazelluläre Domäne des Rezeptors binden.

Hierzu wurde ein Genkonstrukt (Sequenz siehe Anhang A1) entwickelt, das es ermöglicht das Gen in verschiedenen Vektoren zu klonieren. Durch Verwendung unterschiedlicher Restriktionsendonukleasen können unterschiedliche Tags verwendet werden, die durch Vektoren bereitgestellt sind. Das Insert kann aber auch so verändert werden, dass das zu synthetisierende Protein zur Proteinligation geeignet ist. Die möglichen Klonierungsstrategien mit den zu verwendenden Vektoren sind in Abbildung 18 dargestellt. Das Genkonstrukt wurde durch Eurofins synthetisiert und als pEX-A-FcγRIII_domain2 Vektor geliefert.

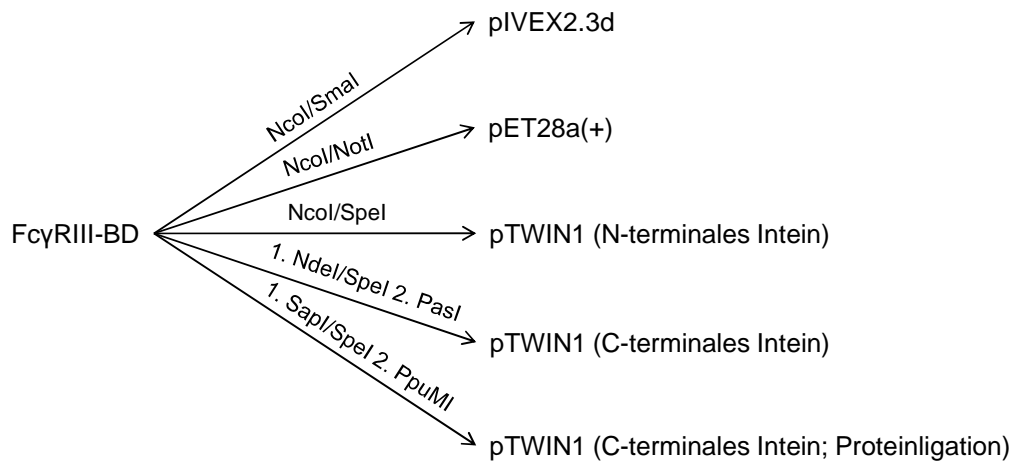


Abbildung 18: Klonierungsstrategien der FcγRIII-Bindedomäne in die Vektoren pET28a(+), pIVEX2.3d und pTWIN1. Gezeigt sind die Restriktionsenzyme, die zur jeweiligen Klonierung des Konstrukts nötig sind. Bei den Konstrukten des pTWIN1 ist aufgezeigt, welches Intein verwendet wird und ob das Konstrukt zur Proteinligation verwendet werden kann.

In dieser Arbeit wurde das Insert zunächst in den pET28a(+)-Vektor kloniert. Hierzu wurde das Plasmid pEX-A-FcγRIII_domain2 und der Vektor pET28a(+) mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und NotI gespalten. Die Trennung der entstandenen Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Banden von Interesse wurden aus dem Gel extrahiert und in eine Ligation eingesetzt. Das erhaltene Plasmid wird im Nachfolgenden als pET-FcγRIII-BD bezeichnet.

Nach einer Hitzeschocktransformation in *E. coli* DH5α wurden die Plasmide isoliert und einer Restriktionsanalyse mit einer anschließenden Agarosegelelektrophorese unterzogen, wobei alle analysierten Transformanten positiv waren (Abbildung 19). Eine anschließende Sequenzierung bestätigte, dass die Transformanten das Plasmid pET-FcγRIII-BD enthielten.

Mit dem klonierten Konstrukt pET-FcγRIII-BD sollten nun Expressionsbedingungen gefunden werden, die es ermöglichten lösliches Protein in großer Menge rein herzustellen.

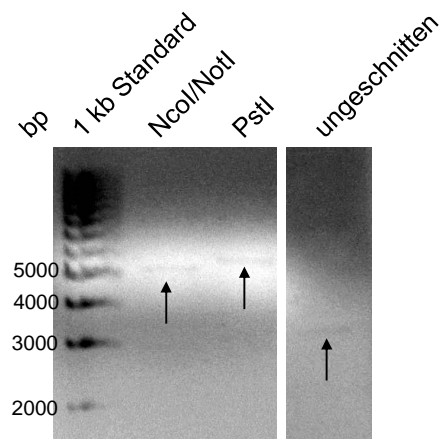


Abbildung 19: Analyse des mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespaltenen Plasmids pET-FcγRIII-BD zur Überprüfung des Konstrukts durch gelelektrophoretische Trennung. Es wurden die jeweiligen Restriktionsansätze auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Kontrolle wurde das Plasmid ungeschnitten auf das Gel aufgetragen. Mit Pfeilen sind die sehr schwachen DNA-Banden hervorgehoben. Als Standard diente der BioRad EZ Load™ Molecular Rulers 1 kb.

4.2.4 Untersuchung des Expressionstamms *E. coli* BL21 (DE3) unter Verwendung verschiedener Bedingungen für die FcγRIII-BD

Um lösliches Protein exprimieren zu können, wurde der Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) durch Hitzeschock mit dem Vektor pET-FcγRIII-BD transformiert. Mit diesen Klonen wurde eine Testexpression in 50 ml LB-Medium bei 37 °C für 3 h und bei 30 °C über Nacht durchgeführt. Nach einem Zellaufschluss durch Ultraschall erfolgte die Trennung der löslichen von der nicht löslichen Fraktion mittels Zentrifugation. Die Analyse der induzierten, löslichen und nicht löslichen Fraktionen durch SDS-Gelelektrophorese (Abbildung 20) zeigte für die 30 °C und die 37 °C Kultur eine Proteinbande in der induzierten Probe bei den zu erwartenden 11,8 kDa. In den löslichen Fraktionen sind geringe Mengen der FcγRIII-BD erkennbar. Jedoch ist deutlich mehr Protein in der nicht löslichen Fraktion vorhanden, was bedeutet, dass die FcγRIII-BD ebenfalls überwiegend in *inclusion bodies* vorliegt.

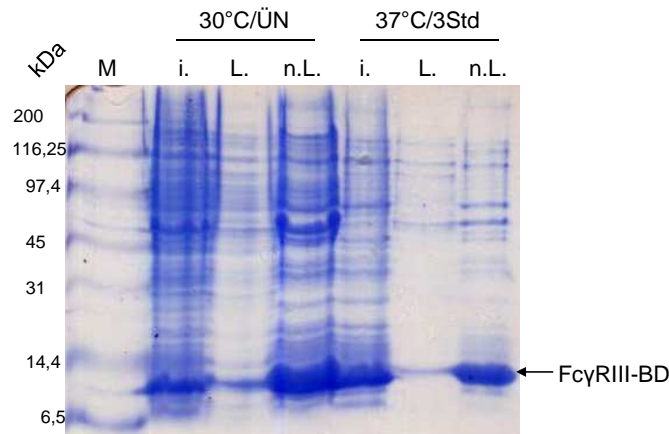


Abbildung 20: Nachweis der induzierten Proteinsynthese und Lokalisation des Proteins Fc γ RIII-BD in verschiedenen Fraktionen von *E. coli* BL21 (DE3) pET-Fc γ RIII-BD. Gezeigt ist ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt) bei dem jeweils Fraktionen induzierter (i.) Kulturen aufgetragen waren, nach einer Induktion bei 30 °C über Nacht (ÜN) oder bei 37 °C für 3 h. Ebenfalls waren die nach einem Zellaufschluss erhaltenen löslichen (L.) und nicht löslichen (n.L.) Fraktionen aufgetragen. M: BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range.

4.3 NMR-Spektroskopische Untersuchungen an β_2 -Mikroglobulin

4.3.1 Herstellung und Reinigung von β Mg

Eine Voraussetzung für Untersuchungen an β Mg als auch an FcRn ist es, dass β Mg in ausreichender Menge unmarkiert oder isotope markiert löslich vorliegt. Zuvor ist es nicht gelungen Expressionsbedingungen zu finden, die es erlauben lösliches β Mg herzustellen (4.1). In dieser Arbeit wird daher das Protein unter Verwendung des Expressionsstammes *E.coli* BL21 (DE3) und des zuvor klonierten Plasmids pET- β Mg nach Esposito *et al.*¹⁰⁴ hergestellt und aus *inclusion bodies* gereinigt.

Das Zellpellet einer über Nacht Proteinexpression wurde zur Zellyse mittels French Press verwendet. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurden die pelletierten *inclusion bodies* aufgeschlossen. Die Reinigung des β Mg erfolgte anschließend durch eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit Hilfe eines ÄKTA-purifier Systems (Abbildung 21). Die anschließende Analyse der verschiedenen Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigt, dass die Reinigung erfolgreich war. Der Proteinverlust im Durchfluss und in der Waschfraktion konnte auch durch Erhöhung des Säulenvolumens oder einer erneuten Ni-NTA-Affinitätschromatographie nicht verhindert werden. Vermutlich handelt es sich hier um β Mg, bei dem die Aminosäuresequenz des HAT-Tags nach Abspaltung einzelner Aminosäuren durch Proteasen unvollständig vorliegt und deshalb keine Bindung an die Affinitätsäule

stattfindet. Bei der anschließenden Renaturierung des gereinigten Proteins konnte ein Niederschlag beobachtet werden, bei dem es sich nach Analyse auf einem SDS-Gel um β Mg handelt (nicht gezeigt).

Der N-terminale HAT-Tag wurde nach der erfolgreichen Reinigung durch eine Bromcyanspaltung von dem Protein abgespalten. SDS-Gelanalysen zeigen, dass der HAT-Tag unvollständig abgespalten wurde, sodass anschließend das native β Mg und β Mg+HAT-Tag im Gemisch vorlagen (Abbildung 21).

Die Proteinausbeute nach einer Bromcyanspaltung variierte unabhängig von einer Markierung stark zwischen 0,3 mg/g Feuchtpellet und 4,2 mg/g Feuchtpellet.

Mit den so gewonnenen Proteinproben sollte zunächst durch NMR-Spektroskopie die Faltung des Proteins überprüft werden. Anschließend wurden Tripleresonanzspektren und bereits publizierte Peaklisten¹¹⁰ als Hilfe bei der Zuordnung der einzelnen Peaks des ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrums verwendet.

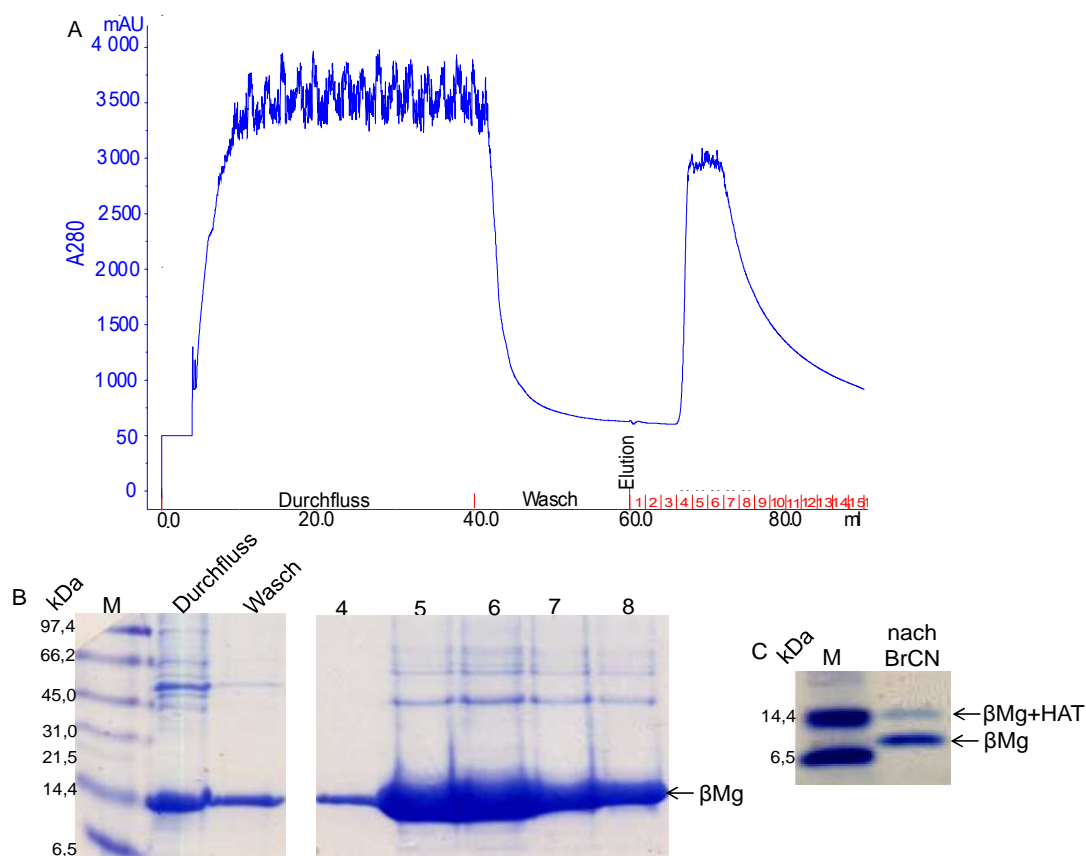


Abbildung 21: Reinigung von β Mg mittels Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Säule und anschließender Bromcyanspaltung. (A) Gezeigt ist ein Chromatogramm, das den Verlauf der Reinigung von unmarkiertem β Mg zeigt. (B) Proben verschiedener Fraktionen wurden auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt) analysiert. (C) Analyse der Effizienz der Bromcyanspaltung auf einem Gradienten-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt). M: BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range. Die Abbildung des Chromatogramms wurde mit dem Programm UNICORN erstellt.

4.3.2 Protein-NMR-Spektroskopie zur Überprüfung der Faltung von β Mg und Aufnahme von Tripleresonanzexperimenten zur Resonanzzuordnung

Mittels NMR-Spektroskopie können Proteine in Lösung auf atomarer Ebene strukturell untersucht werden. Hier sollte zunächst überprüft werden, ob das β Mg nach der Reinigung und Renaturierung gefaltet vorliegt.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung erfolgte mit $u\text{-}^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten β Mg mit einer Konzentration von 0,6 mM. Zur Überprüfung der korrekten Proteinfaltung diente ein ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum. Ein Vergleich des ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrums mit bereits publizierten Zuordnungen des β Mgs^{91,114} zeigt, dass β Mg nach der Reinigung und Renaturierung richtig gefaltet vorlag. Durch andere Puffer- und Messbedingungen kommt es jedoch zu geringfügigen Peakverschiebungen. Um die Signale im ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum eindeutig einer Aminosäure zuordnen zu können, wurden Tripleresonanzspektren aufgenommen und durch die Software Sparky ausgewertet. Eine bereits publizierte Zuordnung von Eichner *et al.*¹¹⁰ (BMRB 17166) wurde zusätzlich zu den Tripleresonanzspektren zur Identifizierung der Signale verwendet (Abbildung 22).

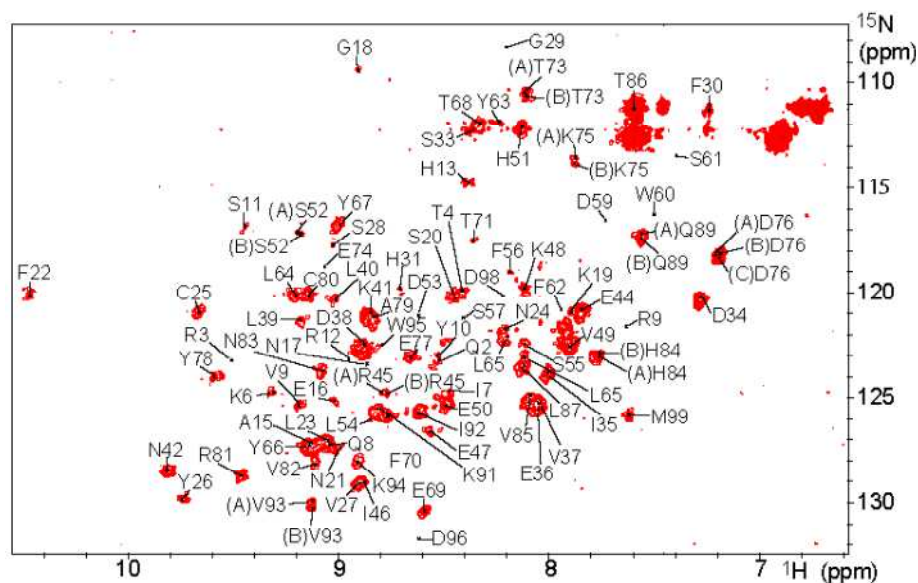


Abbildung 22: 500 MHz ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum von $u\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ β Mg in Tgasepuffer mit den zugeordneten Resonanzen der Amidprotonen. Die Messung der 0,6 mM $u\text{-}^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ markierte β Mg-Probe erfolgte in Tgasepuffer (30 mM Tris; 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , pH 7,5) mit final 10% D_2O (v/v) unter Verwendung eines 3 mm NMR-Röhrchens bei 298 K. Durch unterschiedliche β Mg-Spezies kann es für eine Aminosäure mehrere Peaks geben, diese sind dann mit (A), (B) oder (C) gekennzeichnet. Ist für eine Aminosäure kein Signal vorhanden, so wurde sich an die Zuordnung von Eichner *et al.*¹¹⁰ (BMRB 17166) gehalten.

4.3.3 Identifizierung des an der Tgasereaktion beteiligten Lysinrestes

Das β Mg ist ein Substrat der Tgase, daher sollen im Folgenden die Aminosäurereste des β Mgs identifiziert werden, die an der Reaktion beteiligt sind. Hierzu werden die beteiligten Aminosäurereste modifiziert. Durch die Modifikation verschwinden oder entstehen Peaks in einem ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum. Hierdurch kann die an der Reaktion beteiligte Aminosäure identifiziert werden.

Um den Lysinrest des β Mgs zu identifizieren, der an der Tgasereaktion beteiligt ist, wurde β Mg mit einem Peptid versetzt, welches als Glutamindonor dient.¹⁰⁰ Dieser wird in einer Tgasereaktion an den beteiligten Lysinrest angelagert und führt so zur Modifikation. Die Aminosäuresequenz TVQQEL des Glutamindonors wurde adaptiert, indem N-terminal ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Fluoreszenztag angefügt wurde. Dieser ermöglicht es modifiziertes β Mg in einem SDS-Gel unter UV-Belichtung zu identifizieren. Im Folgenden wird der Glutamindonor als FITC-Ahx-TVQQEL bezeichnet.

Durch Tgase modifiziertes β Mg wurde mittels einer Superdex 200 10/300 GL Größenausschlußchromatographie untersucht. Damit konnte die Modifikation des β Mg am Lysinrest nachgewiesen werden. Als Referenz dienten die Chromatogramme von nicht modifiziertem β Mg sowie von dem Peptid FITC-Ahx-TVQQEL. Ein Vergleich der Chromatogramme (Abbildung 23) zeigt, dass β Mg nach Inkubation mit FITC-Ahx-TVQQEL und *mouse tissue* (mTgase) oder aber *guinea pig liver* (gpTgase) Transglutaminase deutlich später eluiert. Dies ist ein erster Hinweis, dass β Mg modifiziert vorliegt.

Entgegen den Erwartungen eluiert β Mg früher als durch FITC-Ahx-TVQQEL modifiziertes β Mg. Nach der Modifikation weist das Protein eine um 1,2 kDa höhere Masse auf. Daher sollte dies vor nicht modifizierten β Mg eluieren und der Elutionspeak sich somit nach links verschieben. Dass es zu einer Verzögerung der Elution des modifizierten β Mgs kommt, kann damit erklärt werden, dass es zu Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix nach der Modifikation kommt. Durch den Überschuss des FITC-Ahx-TVQQEL in der Tgasereaktion wurde nicht gebundener Glutamindonor in den Fraktionen 12 und 13 eluiert. Die Färbungen der Elutionsfraktionen resultierten aus dem Fluoreszenztag und lassen dadurch auf die Existenz von modifiziertem β Mg schließen.

Eine Analyse der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE zeigt unter UV-Belichtung fluoreszierende Banden bei ~ 13 kDa und ~ 17 kDa. Die erwartete Masse von modifiziertem β Mg bei liegt 12,9 kDa. Durch das SDS-Gel konnte gezeigt werden, dass es gelungen ist mit FITC-Ahx-TVQQEL modifiziertes Protein und in der Fraktion 9 zu eluieren. Die

fluoreszierende Bande bei ~ 17 kDa ist ein Hinweis darauf, dass auch β Mg+HAT vorlag, welches nach Modifizierung eine theoretische Masse von 16,8 kDa hat. Betrachtet man das Coomassie-gefärbte SDS-Gel im Vergleich, so sind im Gegensatz zur UV-Belichtung Doppelbanden vorhanden, wobei die Fluoreszenzbande der Bande mit der höheren Masse im Coomassie-gefärbten Gel entspricht. Dies lässt darauf schließen, dass auch unmodifiziertes β Mg mit und ohne HAT-Tag in der Fraktion 9 vorlag.

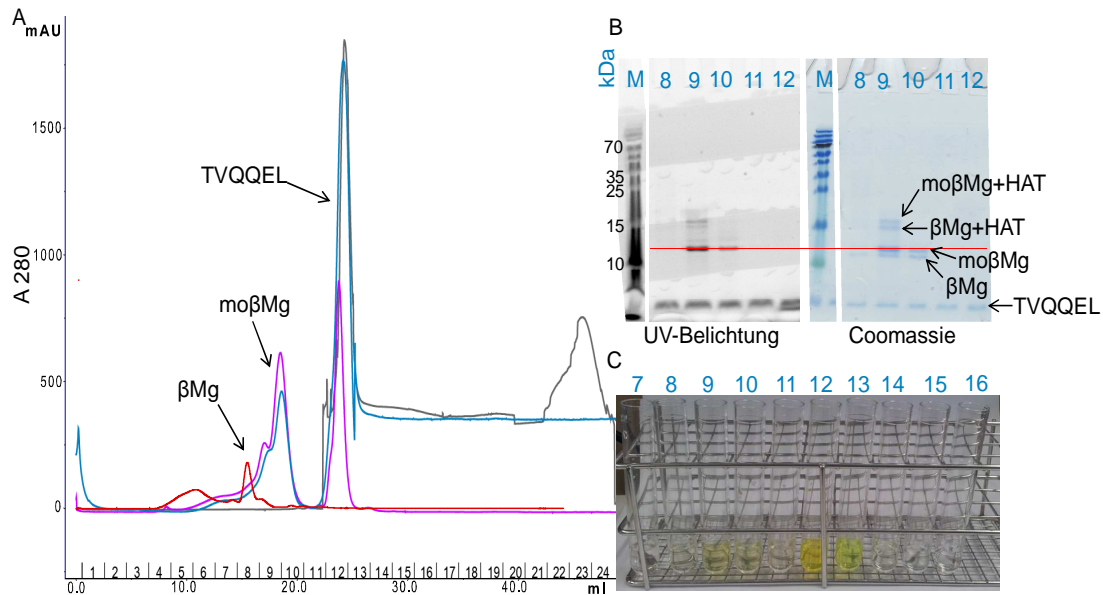


Abbildung 23: Chromatogramm einer Gelfiltration der Tgasereaktion zur Modifizierung des β Mgs mit FITC-Ahx-TVQCEL durch eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit anschließender Analyse via SDS-Gel. (A) Gezeigt sind Chromatogramme der Reinigung von, durch eine gpTgase (blau) oder mTgase (lila), mit TVQCEL modifiziertem β Mg (mo β Mg). Als Referenzen dienen Chromatogramme von nicht modifiziertem β Mg (β Mg; rot) und dem FITC-Ahx-TVQCEL (grau). (B) Proben verschiedener Fraktionen wurden unter reduzierenden Bedingungen auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend unter UV-Belichtung und durch Coomassie-Färbung analysiert. (C) Die Färbung einzelner Fraktionen des gpTgase Chromatogramms ist durch ein Foto dokumentiert. M: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific. Die Abbildung der Chromatogramme wurde mit dem Programm UNICORN erstellt.

Es wurde gezeigt, dass das β Mg mit Hilfe des FITC-Ahx-TVQCEL in einer Tgasereaktion modifiziert werden kann. Daher soll durch NMR-spektroskopische Untersuchung der an der Tgasereaktion beteiligte Lysinrest identifiziert werden. Hierzu wurde zunächst selektiv ^{15}N Lys-markiertes β Mg hergestellt. Im ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum der selektiv markierten Probe werden ausschließlich Peaks der acht Lysine des β Mg erwartet. Das Spektrum (Abbildung 24; rot) zeigt nur sieben Peaks, die eindeutig zugeordnet werden können. Für Lysin 58 ist kein Signal im Spektrum zu erkennen. Nach Zugabe des Peptids FITC-Ahx-TVQCEL wurde die Probe halbiert und jeweils mit gpTgase beziehungsweise mTgase inkubiert. An der Tgasereaktion beteiligte Lysinreste zeigen aufgrund der Modifikation durch das FITC-Ahx-

TVQQL eine Veränderung des dazugehörigen Peaks. NMR-Messungen zeigen, dass das zum Lysin 6 gehörige Signal nach Inkubation mit beiden Tgasen verschwindet, wobei alle anderen Peaks unverändert bleiben (Abbildung 24). Das Verschwinden des Peaks von K6 kann ebenso in Messungen mit uniform ^{15}N -markierten Proben beobachtet werden (nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass Lysin 6 an der Tgasereaktion beteiligt ist. Eine Analyse der NMR-Proben durch ein SDS-Gel zeigt unter UV-Belichtung fluoreszierende Banden, die von dem mit Peptid modifizierten Protein stammen.

Im Folgenden soll der Glutaminrest identifiziert werden, der bei der Tgasereaktion eine Bindung zum Lysin 6 eingeht. Hierzu wird der Tgasereaktion Methylamin hinzugefügt. Durch die Tgase wird dann eine Methylgruppe an den beteiligten Glutaminrest angefügt.⁹²

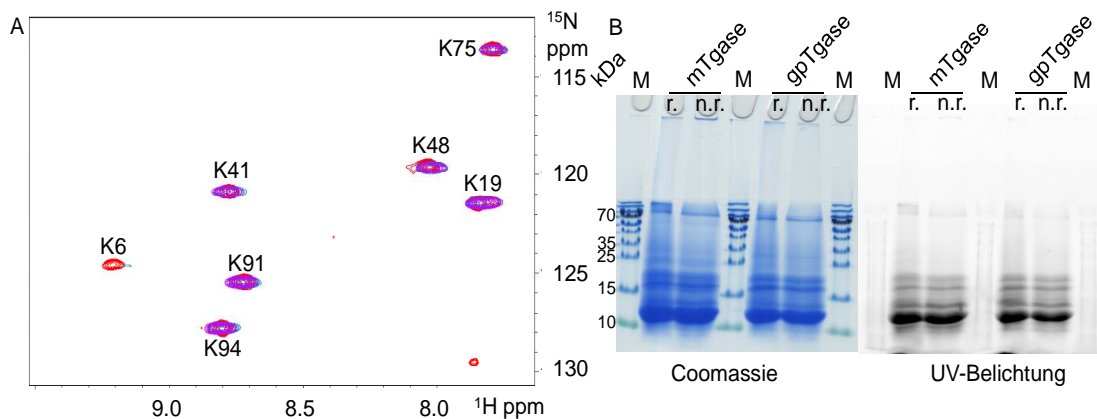


Abbildung 24: Analyse mit NMR-Spektroskopie und SDS-PAGE des selektiv ^{15}N Lysin markierten βMg vor und nach Modifizierung mit einem Glutaminendonator. Gezeigt sind ^1H , ^{15}N HSQC-Spektren des selektiv ^{15}N Lysin markierten βMg s ohne Modifikation (rot) und durch gpTgase (blau) beziehungsweise mTgase (lila) modifiziert. Die durch Tgasen modifizierten NMR-Proben wurden auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und durch UV-Belichtung beziehungsweise durch Coomassie-Färbung analysiert. M: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific.

4.3.4 Identifizierung des an der Tgasereaktion beteiligten Glutaminrestes

Um den an der Tgasereaktion beteiligten Glutaminrest des βMg s identifizieren zu können, wurde βMg mit Methylamin versetzt.⁹² Durch eine Transglutaminase wird βMg durch eine Methylgruppe an einem Glutaminrest modifiziert. Dies inhibiert die Polymerbildung des βMg s durch die Transglutaminase und die Modifikation kann mittels NMR-Spektroskopie überprüft werden.

Mehrere NMR-spektroskopische Analysen von Reaktionsansätzen mit 30 mM Methylamin zeigten in den ^1H , ^{15}N HSQC-Spektren keine Veränderungen der einzelner Peaks, die es ermöglichten einen modifizierten Glutaminrest zu identifizieren (Abbildung 25). Da die NMR-Spektren vor und nach der Tgasereaktion mit Methylamin annähernd identisch sind, war es auch nicht möglich bestimmte Glutamine auszuschließen, oder die möglichen Glutaminreste auf eine Region des Proteins einzugrenzen. Dies galt sowohl für die gpTgase, als auch für die mTgase. Deutlich zu erkennen ist in den Spektren jedoch, dass in der Region 7,6 ppm/129 ppm ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) das rot und lila Spektrum Peaks zeigen, die im Zuordnungsspektrum (Abbildung 22) und publizierten Spektren^{91,114} nicht erscheinen. Diese könnten denaturiertem βMg entstammen.

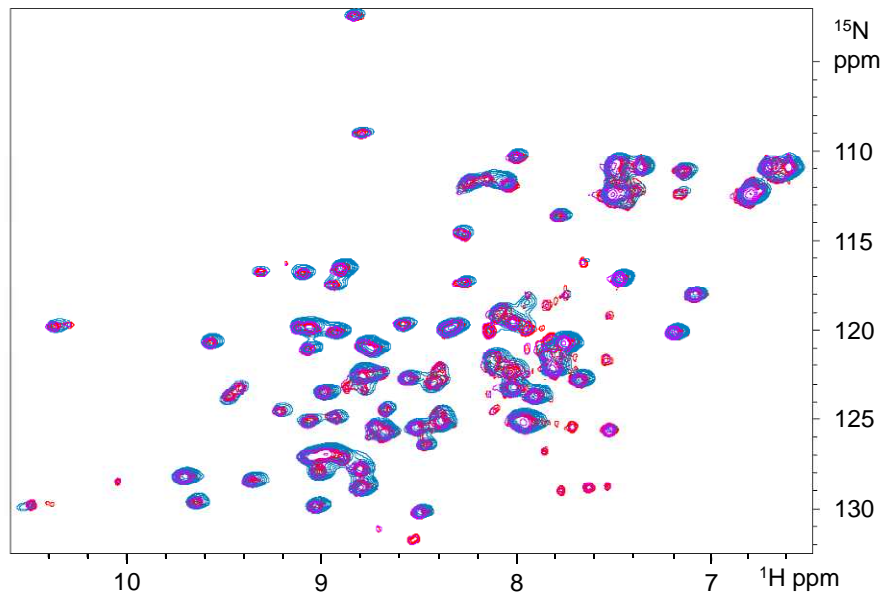


Abbildung 25: ^1H , ^{15}N HSQC von $u\text{-}^{15}\text{N}$ markierten βMg vor und nach Modifizierung mit Methylamin. Gezeigt sind Spektren des $u\text{-}^{15}\text{N}$ markierten βMg s ohne Modifikation (rot) und nach Reaktion mit gpTgase (blau) beziehungsweise mTgase (lila).

Eine Analyse der NMR-Proben durch ein SDS-Gel, zeigte, dass trotz der Zugabe von Methylamin Polymere gebildet worden sind und somit eine Inhibition der Polymerbildung durch Zugabe von Methylamin nicht erreicht werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Identifizierung von modifiziertem βMg wurde zuvor durch einen Fluoreszenztag am Glutaminendonor ermöglicht. Mit Hilfe des N-(Tetramethylrhodaminy)cadaverin/N-(TAMRA)cadaverine (R001) von Zedira¹⁰¹ sollte daher versucht werden den beteiligten Glutaminrest zu identifizieren. Der Einfachheit halber wird im Folgenden N-

(TAMRA)cadaverine mit TAMRA abgekürzt. Es wird analog dem FITC-Ahx-TVQQEL zur Identifizierung des Lysinrestes dem Tgasereaktionsansatz hinzugesetzt und inkubiert.

Verschiedene NMR-spektroskopische Analysen von Reaktionsansätzen mit TAMRA zeigten in ^1H , ^{15}N HSQC-Spektren sowohl für die gpTgase, als auch für die mTgase, keine deutlichen Veränderungen einzelner Peaks (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Versuche eignen sich daher nicht zur Identifizierung eines modifizierten Glutaminrestes, bestimmte Glutamine auszuschließen, oder die möglichen Glutaminreste auf eine Region des Proteins einzugrenzen.

Die Modifizierung des Lysinrestes durch FITC-Ahx-TVQQEL konnte gut mittels Größenausschlußchromatographie gezeigt werden (Abbildung 23). So sollen die Reaktionsansätze mit dem TAMRA, die zuvor bei NMR-spektroskopischen Messungen keine Hinweise auf Modifikationen am Glutamin zuließen, durch eine Größenausschlußchromatographie gereinigt und mit Referenzspektren des βMg s und des TAMRA verglichen werden (Abbildung 26).

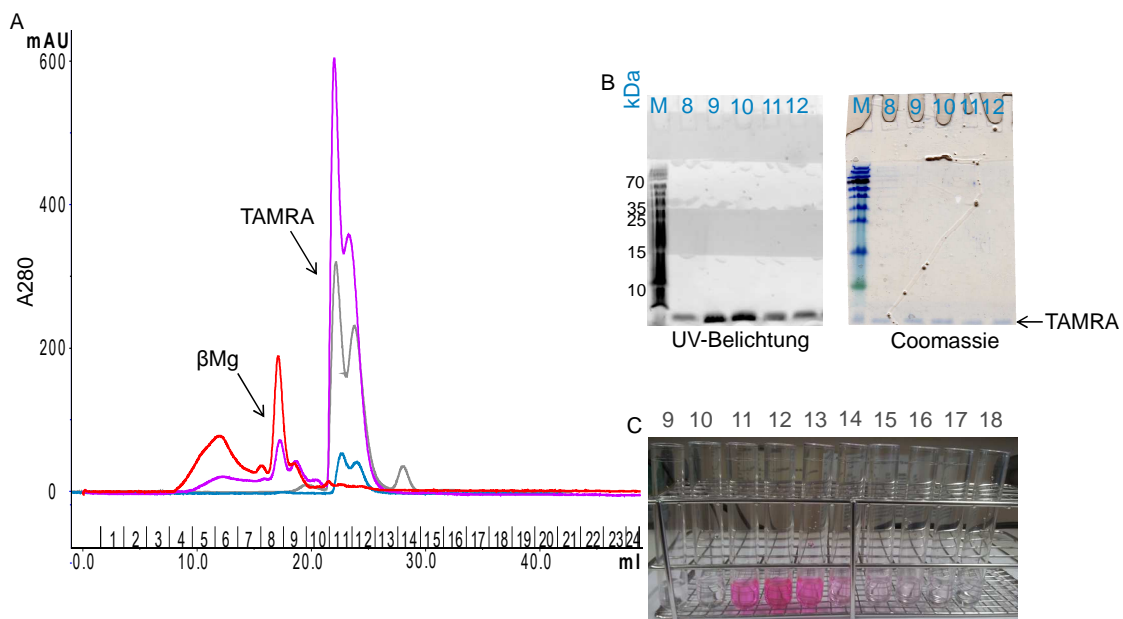


Abbildung 26: Chromatogramm einer Gelfiltration der Tgasereaktion zur Modifizierung des βMg s mit TAMRA durch eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit anschließender Analyse via SDS-Gel. Gezeigt sind Chromatogramme (A), der Verläufe der Reinigung des βMg , zur Modifizierung inkubiert mit TAMRA und gpTgase (blau) oder mTgase (lila). Als Referenzen dienen Chromatogramme von nicht modifiziertem βMg (βMg ; rot) und dem TAMRA (grau). (B) Proben verschiedener Fraktionen einer Reinigung, nach Modifikation mit gpTgase, wurden unter reduzierenden Bedingungen auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend unter UV-Belichtung und durch Coomassie-Färbung analysiert. (C) Die Färbung einzelner Fraktionen einer TAMRA-Reinigung ist durch ein Foto dokumentiert. M: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific. Die Abbildung der Chromatogramme wurde mit dem Programm UNICORN erstellt.

Das Ergebnis der NMR-Spektroskopie konnte bestätigt werden, dass es zu keiner Modifikation von β Mg durch TAMRA gekommen ist. Die Analyse der Fraktionen via SDS-Gel zeigt keine fluoreszierende Bande, die von einem modifizierten Protein stammt. Hier sind ausschließlich Banden von freiem TAMRA in der Laufmittelfront zu erkennen.

Durch Massenspektrometrie sollten alle durch NMR und Gelfiltration analysierten Probenansätze auf eventuelle Modifikationen untersucht werden, um so die an der Reaktion beteiligten Aminosäurereste zu identifizieren.

4.3.5 Massenspektrometrische Analysen zur Identifizierung von modifizierten Aminosäureresten

Durch Massenspektrometrie sollte die Beteiligung des Lysin 6 an der Tgaseaktion bestätigt und der beteiligte Glutaminrest identifiziert werden. Hierzu wurden die zuvor durch NMR-Spektroskopie, Gelfiltration und SDS-PAGE analysierten Proben mittels Massenspektrometrie auf eventuelle Modifikationen untersucht. Wie aus vorherigen SDS-Gelanalysen bekannt, zeigt die Auswertung der Masselisten auch, dass sich in allen Proben Verunreinigungen befanden. Weiterhin weisen einige Signale eine sehr geringe Intensität auf, so dass sie in den Masselisten identifiziert werden können, im Massenspektrum (Anhang A3) können diese Signale aufgrund der Verunreinigungen jedoch nicht lokalisiert werden. Vergleicht man die Aminosäuresequenz von β Mg mit den Massesignalen, so wird deutlich, dass nicht alle zu erwartenden Peptidmassen nach der tryptischen Spaltung in den Masselisten wiedergefunden werden (Tabelle 19). Das Signal bei m/z 1532,69 bestätigt, dass die Bromcyanspaltung nicht zur vollständigen Abspaltung des HAT-Tags geführt hat und in den Proben ebenfalls β Mg+HAT vorliegt. Dies muss bei der Betrachtung möglicher Modifikationen berücksichtigt werden.

Durch NMR-Spektroskopie wurde eine Modifikation des K6 durch Tgase festgestellt. Das Fragment ${}^4\text{TPK}^6$ war daher hier von besonderem Interesse. Es konnte jedoch in den Masselisten nicht identifiziert werden. Falls eine Modifikation des K6 eine tryptische Spaltung verhindert, müsste das Fragment entsprechend des N-terminal oder C-terminal liegenden Peptides größer sein. Hierbei ist auch zu beachten, dass die Entfernung des HAT-Tags nicht vollständig gelungen ist und so in den Proben auch β Mg+HAT vorliegt. Das N-terminal liegende Peptid der Sequenz ${}^4\text{TPK}^6$ wäre dann deutlich größer, als bei dem β Mg ohne HAT-Tag.

Tabelle 19: Übersicht der Ergebnisse der Massenspektrometrie von β Mg. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von β Mg (schwarz) mit der N-terminalen HAT-Tag-Sequenz (grau). Glutaminreste innerhalb der Sequenz sind Rot, Lysinreste Blau dargestellt. Die Position der Lysine und Glutamine innerhalb des β Mg wurden durch hochgestellte Zahlen in den Peptiden hervorgehoben. Schnittstellen des Enzyms Trypsin sind durch \sim gekennzeichnet. Peptide, die in der Masseliste der Referenz zu finden sind, sind mit ihren Peptidmassen dargestellt und in der Aminosäuresequenz unterstrichen. Mögliche Modifikationen der Peptide mit deren veränderten Massen sind ebenfalls dargestellt. Diese konnten jedoch nicht wiedergefunden werden.

MK⁻³²~DHLIHNVHK⁻²³~EEHAHAHNK⁻¹⁴~GR~AEEAYA^{Q-5}GSHMI^{Q2}R~TPK⁶~IQ⁸VYSR~HPAENGK¹⁹~SNFLNCYVSGFHPDIEVDLLK⁴¹~NGER~IEK⁴⁸~VEHSDLSFSK⁵⁸~DWAIFYLLYYTEFTPTPEK⁷⁵~DEYACR~VNHVTL^{SQ89}PK⁹¹~IVK⁹⁸~WDR~DM

		Peptid						
		IQ ⁸ VYSR	VNHVTL SQ ⁸⁹ P K ⁹¹	VEHSDL SFSK ⁵⁸	AEEAYA Q ⁻⁵ GSH MIQ ² R	DWAIFY LLYYT EFTPT EK ⁷⁵	SNFLNC YVSGFH PSDIEV DLLK ⁴¹	DWAIFYL LLYYTEF TPTE K ⁷⁵ ~DE YACR
βMg	m/z	765,54	1122,74	1148,64	1532,93	2203,32	2554,56	2997,67
	+TVQQEL	-	2336,74	2362,64	-	3417,32	3768,56	4211,67
Theoretische (m/z)	+1	779,54	1136,74	-	1546,93	-	-	-
	+2	-	-	-	1560,93	-	-	-
+TAMRA	+1	1302,62	1659,82	-	2070,01	-	-	-
	+2	-	-	-	2607,09	-	-	-

In den Masselisten der mit FITC-Ahx-TVQQEL modifizierten Proben konnte jedoch keine der β Mg+HAT entsprechende Masse wiedergefunden werden. Ebenso konnte keine Modifikation durch FITC-Ahx-TVQQEL festgestellt werden.

Eine Modifikation mit Methylamin sowie eine Modifikation mit TAMRA konnte ebenfalls an keinem der Peptidfragmente nachgewiesen werden. Hierbei spielte es keine Rolle, ob das β Mg mit oder ohne HAT-Tag vorlag. Auch eine mögliche zweifache Modifikation des Peptids ⁻¹¹AEEAYAQGS^{HMIQ}R³ an den zwei Glutaminresten wurde berücksichtigt, konnte jedoch nicht in den Masselisten identifiziert werden.

Es war nicht möglich mit der Massenspektrometrie die in 4.3.3 identifizierte Modifikation am K6 zu bestätigen, noch den an der Tgasereaktion beteiligten Glutaminrest zu identifizieren. Da es zuvor nicht gelang, wie durch Fésüs *et al.* beschrieben die Polymerbildung des β Mgs durch Zugabe von Methylamin zu verhindern, sollte im Folgenden überprüft werden, ob der Versuch von Fésüs *et al.* reproduzierbar ist.

4.3.6 Inhibition der Tgasereaktion durch Methylamin

Durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie ist es zuvor nicht gelungen einen mit Methylamin modifizierten Aminosäurerest zu identifizieren. Deshalb sollte überprüft werden, ob der Versuch von Fésüs *et al.* mit der mTgase als auch mit der gpTgase reproduzierbar ist. Hierzu wurden verschiedene Ansätze einer Tgasereaktion von β Mg und Methylamin durch ein SDS-Gel analysiert (Abbildung 27). Um sicher zu gehen, dass Methylamin in ausreichender Menge vorlag, wurde dessen Konzentration innerhalb des Reaktionsgemisches auf 100 mM erhöht. Anhand des SDS-Gels war deutlich zu erkennen, dass das β Mg Substrat der mTgase als auch der gpTgase ist und wie in Fésüs beschrieben, eine Polymerbildung durch eine Zugabe von Methylamin inhibiert werden kann.

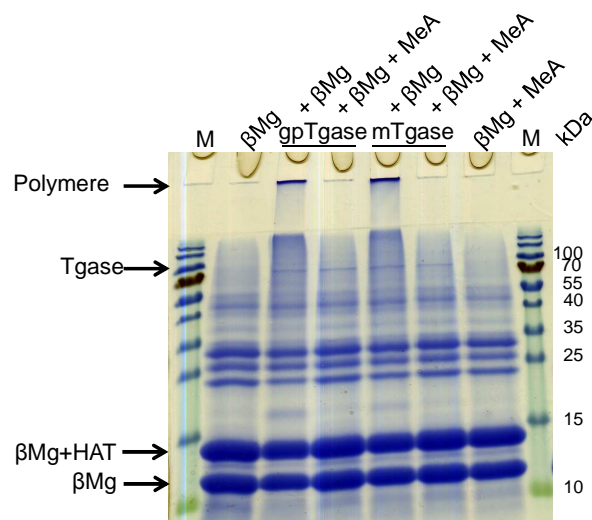


Abbildung 27: Einfluss von Methylamin auf die Polymerbildung von β Mg durch eine Tgasereaktion. Gezeigt ist ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt), auf dem Ansätze von Tgasereaktionen mit und ohne Methylamin (MeA) aufgetragen wurden. Die Ansätze wurden zuvor entweder mit gpTgase oder mTgase für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz der ausschließlich β Mg und einer der zusätzlich Methylamin enthielt. M: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific.

Es ist nicht gelungen den an der Tgasereaktion beteiligten Glutaminrest zu identifizieren. Daher kann nur anhand der Kristallstruktur abgeleitet werden, ob eine Dimerisierung des β Mg als kleine Untereinheit des FcRn durch eine Tgase die Bindung zu Antikörpern moduliert. Im folgenden Abschnitt sollte der humane neonatale Fc-Rezeptor zunächst in ausreichender Menge gereinigt werden, um anschließend diese Fragestellung praktisch untersuchen zu können.

4.4 Herstellung und Reinigung von hFcRn

Mit dem zuvor gereinigten β Mg war es nun möglich FcRn nach Andersen *et al.*¹⁰⁵ herzustellen und aus *inclusion bodies* zu reinigen. Hierzu wurde der Expressionsstamm *E.coli* BL21 (DE3) und das zuvor klonierten Plasmids pET-hFcRn verwendet. Die *inclusion bodies* einer über Nacht Proteinsynthese wurden wie unter 3.11.2 beschrieben gereinigt, die gelösten *inclusion bodies* auf eine Ni-NTA-Säule gegeben und der FcRn mit Hilfe von Imidazol eluiert. Das Chromatogramm und die anschließende SDS-PAGE einzelner Fraktionen zeigt, dass es gelungen ist, den FcRn zu eluieren (Abbildung 28).

Der Proteinverlust im Durchfluss und in der Waschfraktion konnte auch durch Erhöhung des Säulenvolumens oder einer erneute Ni-NTA-Affinitätschromatographie nicht verhindert werden. Die Analyse der Fraktionen durch ein SDS-Gel zeigte, dass es gelungen ist FcRn zu eluieren. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden zur weiteren Reinigung mittels Größenausschlußchromatographie eingesetzt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Fraktionen, in denen der Rezeptor eluierte, wurden durch ein SDS-Gel identifiziert, vereinigt und anschließend mit unmarkiertem β Mg zur Renaturierung verwendet. Die Konzentration des Rezeptors im Renaturierungsansatz betrug 30 μ g/ml (0,89 μ M), daher wurde das β Mg in einer Endkonzentration von 3,57 μ M (4 fach molarer Überschuss) hinzugegeben.

Nach der Inkubation des Renaturierungsansatzes wurde das Volumen durch eine Amicon-Ultrafiltrationszelle eingeeengt und mittels Größenausschlußchromatographie (3.10.2) gereinigt. Ohne Referenzchromatogramm ist es schwierig einen Peak eindeutig dem renaturierten FcRn zuzuordnen. Deshalb wurde β Mg ebenfalls durch die Superdex-Säule gereinigt. Dieses Chromatogramm diente nun als Referenz und die Kurven beider Chromatogramme konnten mit einander verglichen werden (Abbildung 29). Die Verläufe ähneln sich sehr stark und es kann kein Peak eindeutig dem FcRn zugeordnet werden. Eine Analyse der einzelnen Fraktionen der Reinigung des Renaturierungsansatzes durch ein SDS-Gel zeigt, dass es zwar gelungen ist den Rezeptor zu eluieren. Zusätzlich zur FcRn-

Proteinbande sind aber auch Proteinbanden des β Mg und des β Mg+HAT zu erkennen. Dies könnte damit zu erklären sein, dass die SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen stattgefunden hat. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es nicht gelungen ist den Rezeptor rein zu eluieren und dass die β Mg und β Mg+HAT Proteinbanden aus Verunreinigungen mit freiem β Mg resultieren. Es ist anzunehmen, dass es nicht möglich ist den Rezeptor in reiner Form zu isolieren.

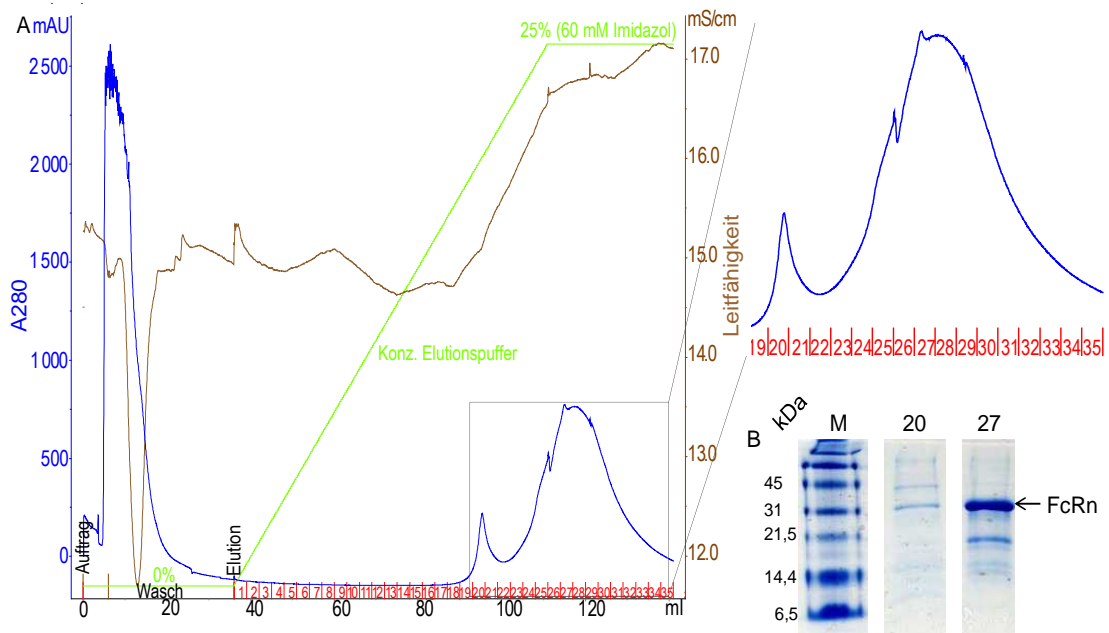


Abbildung 28: Chromatogramm einer Reinigung von hFcRn mittels Ni-NTA-Sepharose mit anschließender Analyse via SDS-Gel. (A) Gezeigt ist ein Chromatogramm, das den Verlauf der Reinigung von $u\text{-}^{15}\text{N}$ markiertem hFcRn zeigt. (B) Proben verschiedener Fraktionen wurden auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt) analysiert. M: BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range. Die Abbildung des Chromatogramms wurde mit dem Programm UNICORN erstellt.

Nach der Reinigung des Renaturierungsansatzes zeigte eine Proteinkonzentrationsmessung, dass es nicht gelang FcRn für NMR-Experimente in ausreichender Menge herzustellen. Weitere Reinigungsversuche des FcRn in der Bachelorarbeit von Jannis Lawatscheck¹¹⁵ zeigten ebenfalls eine geringe Proteinausbeute. So gelang es eine 50 μ M Probe mit dem FcRn- β Mg-Komplex herzustellen. Hiermit war es möglich ein ^1H NMR-Spektrum aufzunehmen, welches deutlich proteinspezifische Signale zeigt. In einem ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum konnten jedoch lediglich vereinzelt sehr schwache Signale detektiert werden. Dies reichte aber nicht aus um eine korrekte Faltung nachzuweisen.¹¹⁵

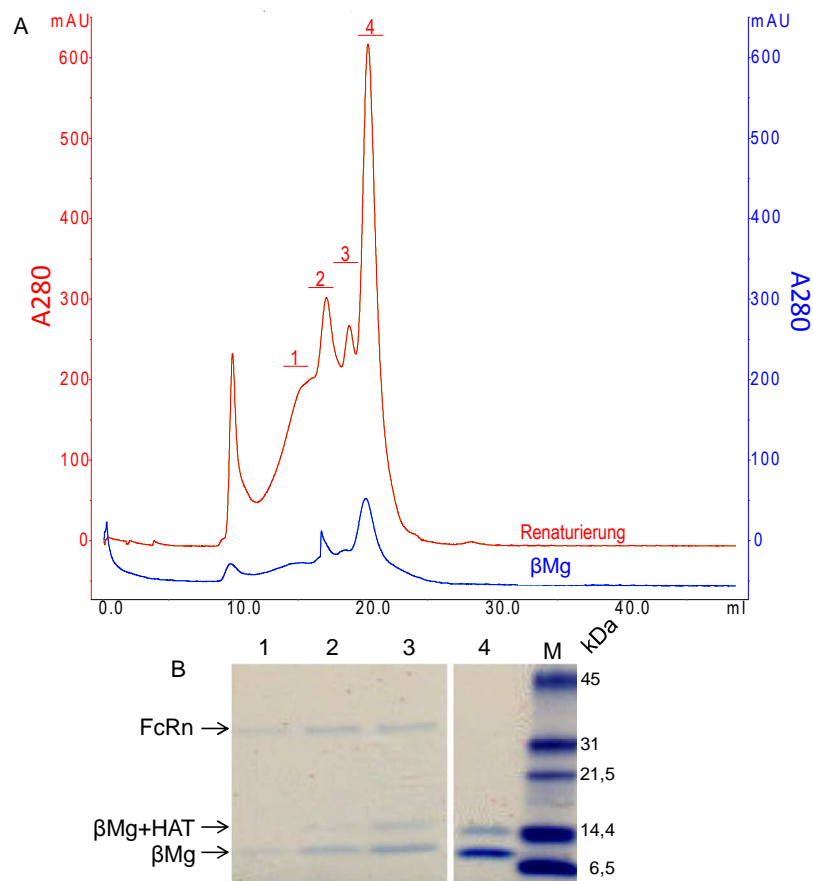


Abbildung 29: Vergleich der Chromatogramme der Größenausschlußchromatographie über eine Superdex 200 10/300 GL Säule des FcRn-Renaturierungsansatzes (rot) und das als Referenz dienende Chromatogramm des β Mgs (blau). Proben verschiedener Fraktionen der Reinigung des Renaturierungsansatzes wurden auf einem Gradienten-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt) analysiert. M: BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range. Die Abbildung des Chromatogramms wurde mit dem Programm UNICORN erstellt.

Um den FcRn NMR-spektroskopisch untersuchen zu können ist eine höhere Proteinausbeute nötig. Hier zeigten sich vor allem die Renaturierung und die anschließende Größenausschlußchromatographie als problematisch und bieten einen guten Ansatz zur Optimierung der Proteinausbeute. Ist es gelungen den FcRn in ausreichender Menge zu reinigen, so wäre es möglich das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit die Inhibition der Interaktion des FcRn mit IgG Autoantikörpern weiterzuverfolgen.

4.5 NMR-Spektroskopische Untersuchungen an Fc γ RIII

Es konnten zuvor keine Expressionsbedingungen gefunden werden, die es ermöglichen löslichen Fc γ RIII-Rezeptor herzustellen. Das Protein wird daher unter Verwendung des *E.*

coli BL21 (DE3) pET-Fc γ RIII hergestellt und aus nach Zhang *et al.*⁴⁰ aus *inclusion bodies* gereinigt.

4.5.1 Herstellung und Reinigung von Fc γ RIII

Mit dem *E. coli* BL21 (DE3) pET-Fc γ RIII soll eine Reinigungsstrategie etabliert werden, die es ermöglicht den Fc γ RIII in großer Menge rein zu präparieren. Hierzu wurde das Reinigungsprotokoll nach Zhang *et al.*⁴⁰ adaptiert.

Die *inclusion bodies* einer über Nacht Proteinsynthese wurden isoliert, und anschließend zur Reinigung eine Ni-NTA-Sepharose Affinitätschromatographie durchgeführt (Abbildung 30). Die anschließende SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen zeigt, dass es gelungen ist, den Rezeptor zu eluieren.

Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und in eine Gelfiltration eingesetzt. Bei der Gelfiltration tritt nach ca. 8 ml ein erster Elutionspeak auf (Abbildung 31). Hierbei handelt es sich um Multimere und Aggregate des Fc γ RIII. Nach ungefähr 18 ml, in Fraktion 9, eluierte monomeres Fc γ RIII. Bei der Analyse einzelner Fraktionen durch eine SDS-PAGE ist auffällig, dass der Rezeptor unter nicht reduzierenden Bedingungen Doppelbanden aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass das Protein sowohl mit korrekt ausgebildeten Disulfidbrücken vorlag, als auch in einer Konformation, in der nicht alle Disulfidbrücken ausgebildet sind. Anhand des Chromatogramms wurde die Fraktion 9 für NMR-spektroskopische Untersuchungen vorbereitet, wobei es gelang eine 0,03 mM u-¹⁵N markierte Probe herzustellen.

Die Reinigung des Fc γ RIII erwies sich generell als schwierig, da vor allem die Renaturierung aber auch Schritte wie Konzentrierung oder Dialyse zu sehr hohem Proteinverlust geführt haben. Hierdurch blieb nach allen Reinigungsschritten meist nicht genug Protein für Versuche übrig. Eine Übersicht mehrerer Reinigungsversuche mit eventuellen Abweichungen vom generellen Protokoll sind in Abbildung 32 dargestellt.

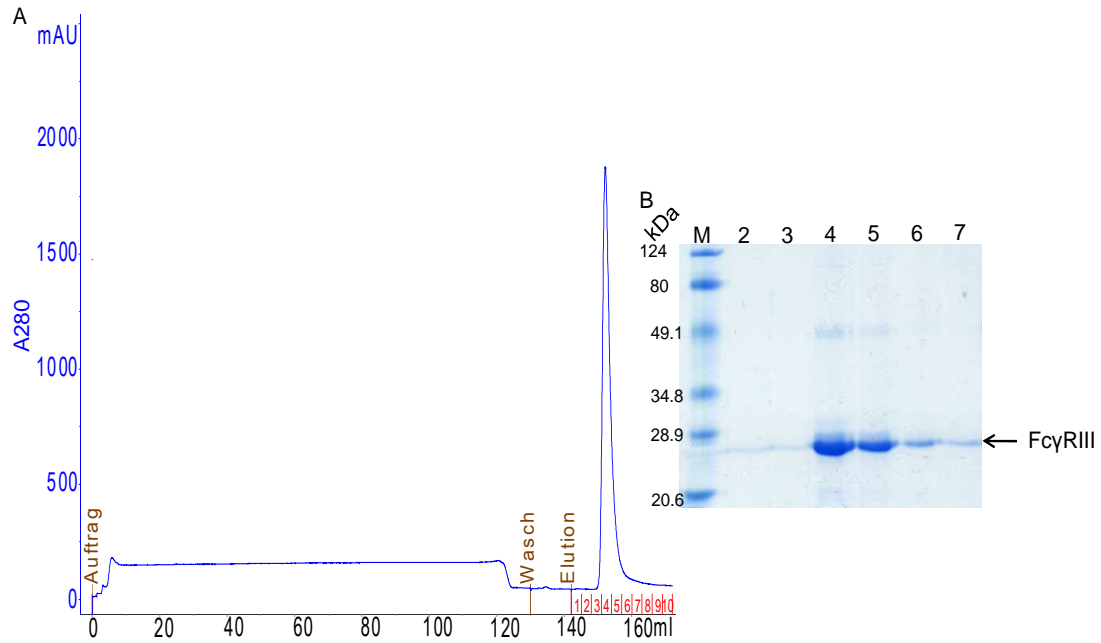


Abbildung 30: Chromatogramm einer Reinigung von FcγRIII über eine Ni-NTA-Säule mit anschließender Analyse via SDS-Gel. (A) Gezeigt ist ein Chromatogramm, das den Verlauf der Reinigung von u-¹⁵N markiertem FcγRIII zeigt. (B) Proben verschiedener Fraktionen wurden auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt) analysiert. M: BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range. Die Abbildung des Chromatogramms wurde mit dem Programm UNICORN erstellt.

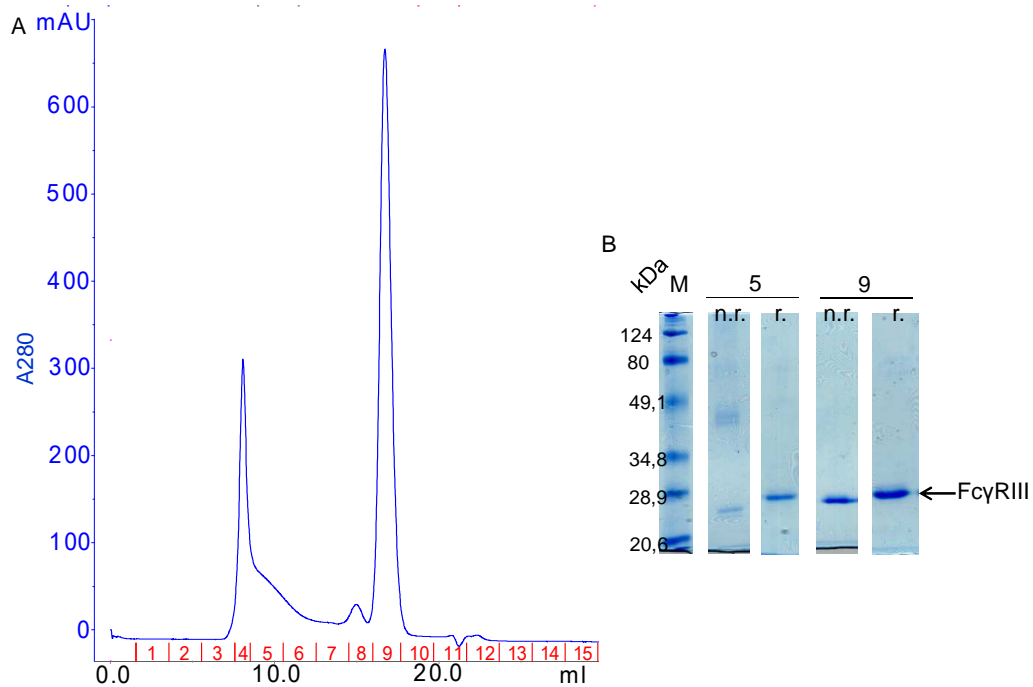


Abbildung 31: Chromatogramm der Gelfiltration von u-¹⁵N FcγRIII über eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit anschließender Analyse via SDS-Gel. Gezeigt ist ein Chromatogramm, das den Verlauf der Reinigung von u-¹⁵N markiertem FcγRIII zeigt. Proben verschiedener Fraktionen wurden unter reduzierenden (r.) und nicht reduzierenden (n.r.) Bedingungen auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt) analysiert. M: BioRad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range. Die Abbildung des Chromatogramms wurde mit dem Programm UNICORN erstellt.

Ergebnisse

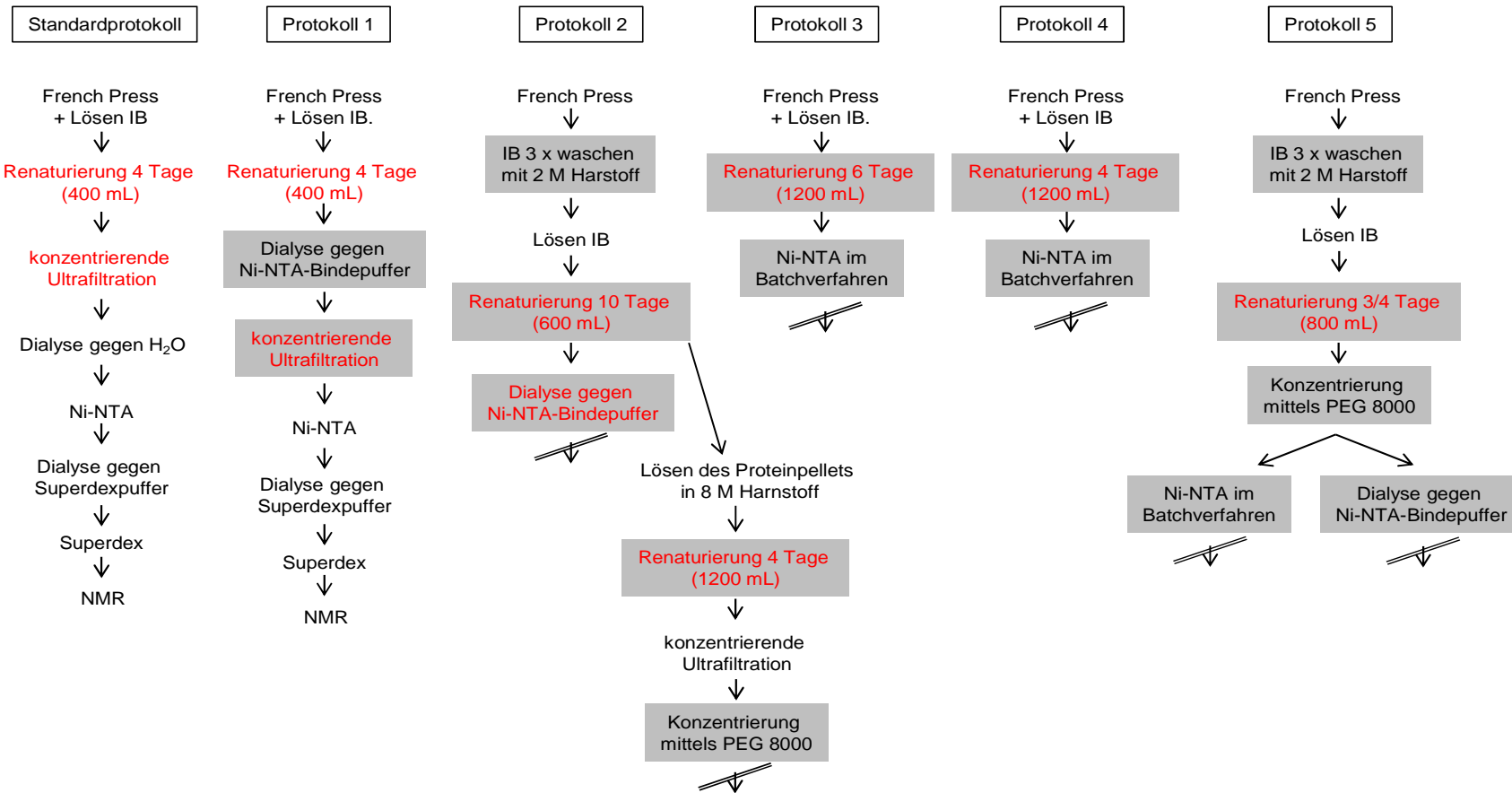


Abbildung 32: Übersicht einzelner Reinigungsprotokolle des Fc γ RIII. Dargestellt sind verschiedene Protokolle zur Reinigung des Fc γ RIII aus *inclusion bodies* (IB). Aufgeführt sind Abweichungen zum Standardprotokoll (grau unterlegt) und Schritte, die zu einem hohen Proteinverlust geführt haben (rot). Doppelt durchgestrichene Pfeile zeigen, dass die Reinigung an dieser Stelle abgebrochen wurde, da der Proteinverlust bereits so hoch war, dass eine weitere Reinigung nicht sinnvoll erschien.

4.5.2 Protein-NMR-Spektroskopie von Fc γ RIII zur Überprüfung der Proteinfaltung

Proteine in Lösung können auf atomarer Ebene mittels NMR-Spektroskopie strukturell untersucht werden. Hier soll zunächst überprüft werden, ob der Rezeptor Fc γ RIII nach der Renaturierung und Reinigung gefaltet vorliegt und ob NMR-spektroskopische Strukturuntersuchungen an dem Protein durchgeführt werden können.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung erfolgte mit der zuvor präparierten u- ^{15}N -markierten Fc γ RIII-Probe (4.5.1).

Das ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum des Fc γ RIII zeigt von 203 zu erwartenden lediglich 165 Peaks (Abbildung 33). Dies ist bei einem Protein mit 188 Aminosäuren nicht unüblich, da es aufgrund der Proteingröße zu Peaküberlagerungen kommt. Anhand der Peakverteilung im Spektrum zwischen 6 und 11 ppm erkannt werden, dass das Protein gefaltet vorlag.

Es konnte gezeigt werden, dass die Renaturierung und Reinigung des Fc γ RIII erfolgreich war. Im Folgenden sollen der Fc γ RIII/IgG-Komplex durch NMR-Spektroskopie untersucht werden.

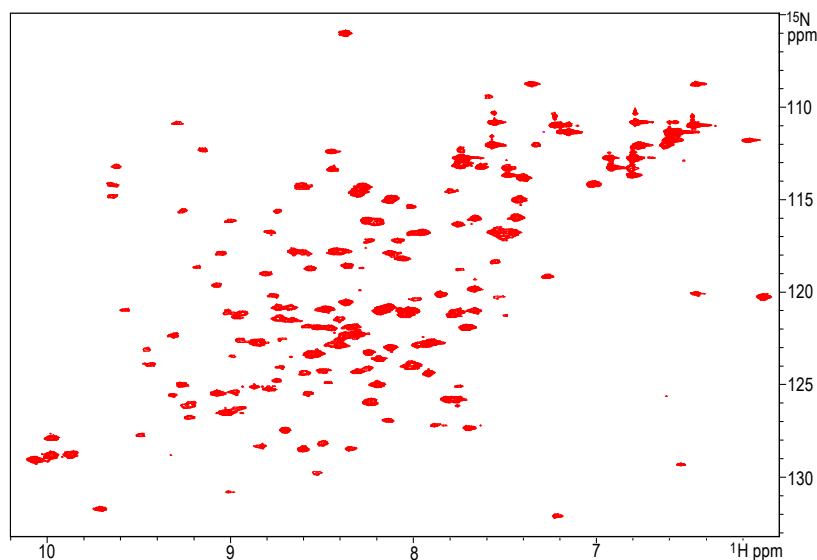


Abbildung 33: 500 MHz ^1H , ^{15}N -HSQC-Proteinspektrum von u- ^{15}N -markierten Fc γ RIII. Das Protein liegt in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH*7,4 versetzt mit 10% D_2O (v/v) vor. Die Proteinkonzentration betrug ungefähr 0,03 mM. Die Messung erfolgte bei 303,8 K.

4.5.3 NMR-spektroskopische Untersuchungen des Fc γ RIII/IgG-Komplexes

Die Kristallstruktur des löslichen Fc γ RIII in Komplex mit einem humanen IgG1 Fc-Fragments ist bekannt und es konnte gezeigt werden, dass Aminosäurereste der C γ 2-Domäne und der Hingeregion des Rezeptors in Kontakt mit dem Fc-Fragment stehen.²⁹ Bei einer Kristallstruktur befinden sich die Proteine nicht in Lösung, deshalb soll hier der Komplex aus Fc γ RIII und humanem IgG mittels NMR-Spektroskopie in Lösung untersucht werden. Die Signale der Aminosäuren des Rezeptors, die in Kontakt mit dem IgG stehen, zeigen in einem ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum eine andere chemische Verschiebung im Vergleich zu freiem Fc γ RIII. Dies wird durch eine Signalverschiebung deutlich. Nach einer Resonanzzuordnung des Proteinrückgrates könnten dann die Aminosäuren identifiziert werden, die durch die Komplexbildung mit dem humanen IgG beeinflusst werden.

Zur NMR-spektroskopischen Untersuchung des Fc γ RIII im Komplex mit humanem IgG wurde zu $u\text{-}^{15}\text{N}$ markiertem Fc γ RIII-Rezeptor humanes IgG (hIgG) zugegeben. Dies führte dazu, dass >99% des Rezeptors im Komplex mit dem hIgG vorliegt. Nach der Zugabe war sofort eine Trübung der Probe zu beobachten, was darauf schließen ließ, dass der Rezeptor unter Zugabe von hIgG ausfällt.

Vergleicht man die Spektren vor und nach der IgG-Zugabe, so ist eine deutliche Veränderung der Peakverteilung erkennbar (Abbildung 34).

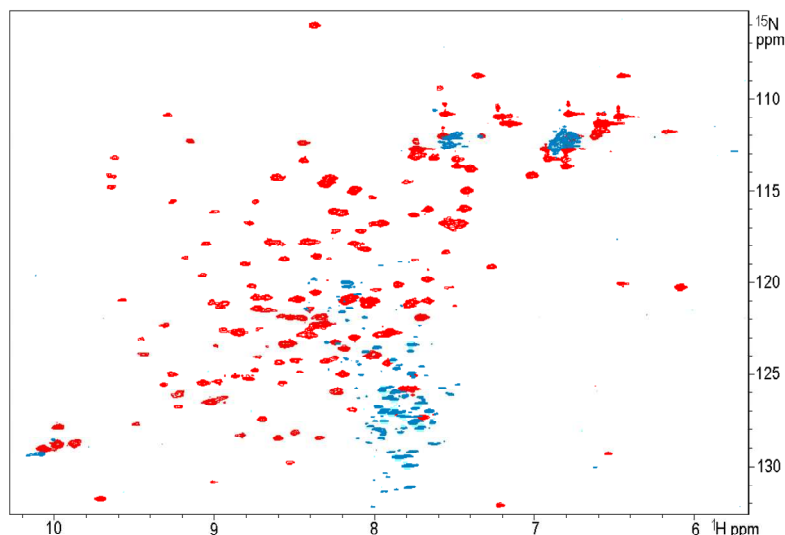


Abbildung 34: Bildung des Fc γ RIII-IgG-Komplexes. Überlagerung der aufgenommenen 500 MHz ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren des gereinigten, $u\text{-}^{15}\text{N}$ -markierten Fc γ RIII mit einer Proteinkonzentration von ungefähr 0,03 mM (rot) und des Spektrums nach der Zugabe von 0,95 mg humanem IgG (blau). Das Protein liegt in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH* 7,4 versetzt mit final 10% D $_2$ O (v/v) vor. Die Messung erfolgte bei 300 K.

Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturbedingungen der NMR-Messung ohne und mit hIgG, können geringe Peakverschiebungen von bis zu 1 ppm hiervon herrühren. Die NH-Peaks des Rückgrates sind aber nur über einen sehr kleinen Bereich von 7,5 - 8,5 ppm verteilt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass der Fc γ RIII durch die Zugabe von hIgG denaturiert. Daher konnten keine Verschiebungen einzelner Peaks im ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum beobachtet werden. Eine Untersuchung des Fc γ RIII/IgG-Komplexes durch NMR-Spektroskopie war hier somit nicht möglich.

4.5.4 Identifizierung von Liganden des Fc γ RIII durch STD-NMR-Spektroskopie

Der Fc γ RIII/IgG-Komplex konnte nicht durch NMR-Spektroskopie untersucht werden. In diesem Teil der Arbeit sollte analysiert werden, ob es möglich ist durch STD-NMR-Spektroskopie Liganden zu identifizieren, die an den Fc γ RIII binden. Hierzu wurden Substanzen, die speziell für ein NMR Screening entwickelten Fragmentbibliothek „Maybridge library“ (3.13.4), verwendet. Während der Dissertation von Christoph Rademacher wurden die Substanzen so in Gruppen (sogenannte BINs) aufgeteilt, dass jede Substanz in ihrem BIN mindestens einen charakteristischen, individuellen Peak im STD-Spektrum aufweist.¹¹² Da die Intensität des Signals bindender Moleküle (Liganden) gedämpft wird und durch Subtraktion des resultierenden Spektrums von dem Referenzspektrum (ohne Sättigung) das STD-Spektrum ergibt, zeigt dieses nur Signale von bindenden Liganden.^{106,111}

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden zunächst mit BIN 12 (Zusammenstellung und Strukturen der Substanzen siehe Anhang A3 und A4) verschiedene Pulsprogramme mit Hilfe einer 90%igen H $_2$ O- und einer reinen D $_2$ O-Probe verglichen (Abbildung 35). Mit dem Pulsprogramm stddiffesgp.3 (mit Wasserunterdrückung) und der D $_2$ O-Probe sind am meisten Signale zu erkennen, deshalb sollte bei weiteren STD-Messungen diese Bedingungen gewählt werden.

Nachdem nun die Messbedingungen gefunden wurden, die die besten Signale liefern, wurde der gereinigte Fc γ RIII Rezeptor in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH*7,4 in D $_2$ O jeweils einmal mit dem BIN 12 und einmal mit dem BIN 25 gemessen.

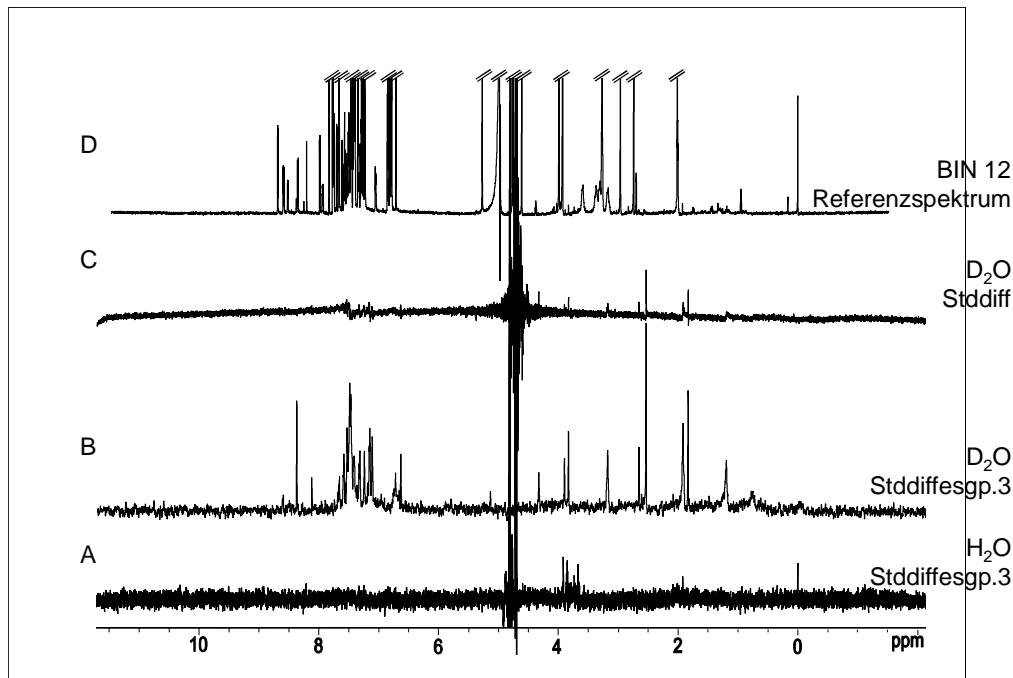


Abbildung 35: 500 MHz STD-Spektren des Fc γ RIII nach Zugabe von BIN 12. Die Proteinkonzentration des Rezeptors betrug nach Zugabe des BIN 12 ungefähr 12 μ M. Die Konzentration des BIN12 betrug je Komponente 64 μ M. Verglichen werden hier eine Probe (D) in der der Rezeptor in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH*7,4 versetzt mit 10% D₂O (v/v) vorliegt (H₂O), gemessen mit dem Programm Stddiffesgp.3 (mit Wasserunterdrückung) und eine Probe, in der der Rezeptor in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH*7,4 in D₂O vorliegt (D₂O). (C) Diese Probe wurde einmal mit (Stddiffesgp.3) und (B) einmal ohne Wasserunterdrückung (Stddiff) gemessen. Desweiteren ist (A) das Referenzspektrum des BIN 12 dargestellt. Die Anzahl der Scans betrug bei jedem Experiment 2048 bei 298 K. Eingestrahlt wurde bei -0,5 ppm, die Sättigungszeit betrug 750 ms.

Vergleicht man nun die Referenzspektren der BINs und der Einzelsubstanzen mit dem STD-Spektrum, so konnten aus BIN 12 die Substanzen 89, 118, 196, 291 und 362 und aus BIN 25 die Substanzen 76, 111, 140, 185, 235, 244 und 309 als bindend identifiziert werden (Abbildung 36).

Es wurde hier somit gezeigt, dass der Fc γ RIII geeignet ist um durch STD-Spektroskopie Fragmente zu identifizieren, die an diesen binden. Jedoch ist unklar wo am Rezeptor die Bindung der einzelnen Fragmente stattfindet. Die Peaks der Aminosäuren des Rezeptors, die an der Komplexbildung mit IgG beteiligt sind, können nicht identifiziert werden, da der Rezeptor durch Zugabe von IgG denaturiert. Bekannt ist durch die Kristallstruktur, dass die Bindung des IgGs ausschließlich durch Aminosäuren der zweiten extrazellulären Domäne und der Hingeregion stattfindet. Deshalb kommen nur solche Substanzen als potentielle Inhibitoren der Antikörperbindung in Frage, die an dieser binden. Hierzu wurde bereits die Fc γ RIII-Bindedomäne kloniert und nach Etablierung eines Reinigungsprotokolls könnten die zuvor als bindend identifizierte Substanzen unterschieden werden, ob diese an die erste oder zweite extrazelluläre Domäne des Rezeptors binden. Dies ließe dann eine weitere Eingrenzung der potentiellen Inhibitoren zu.

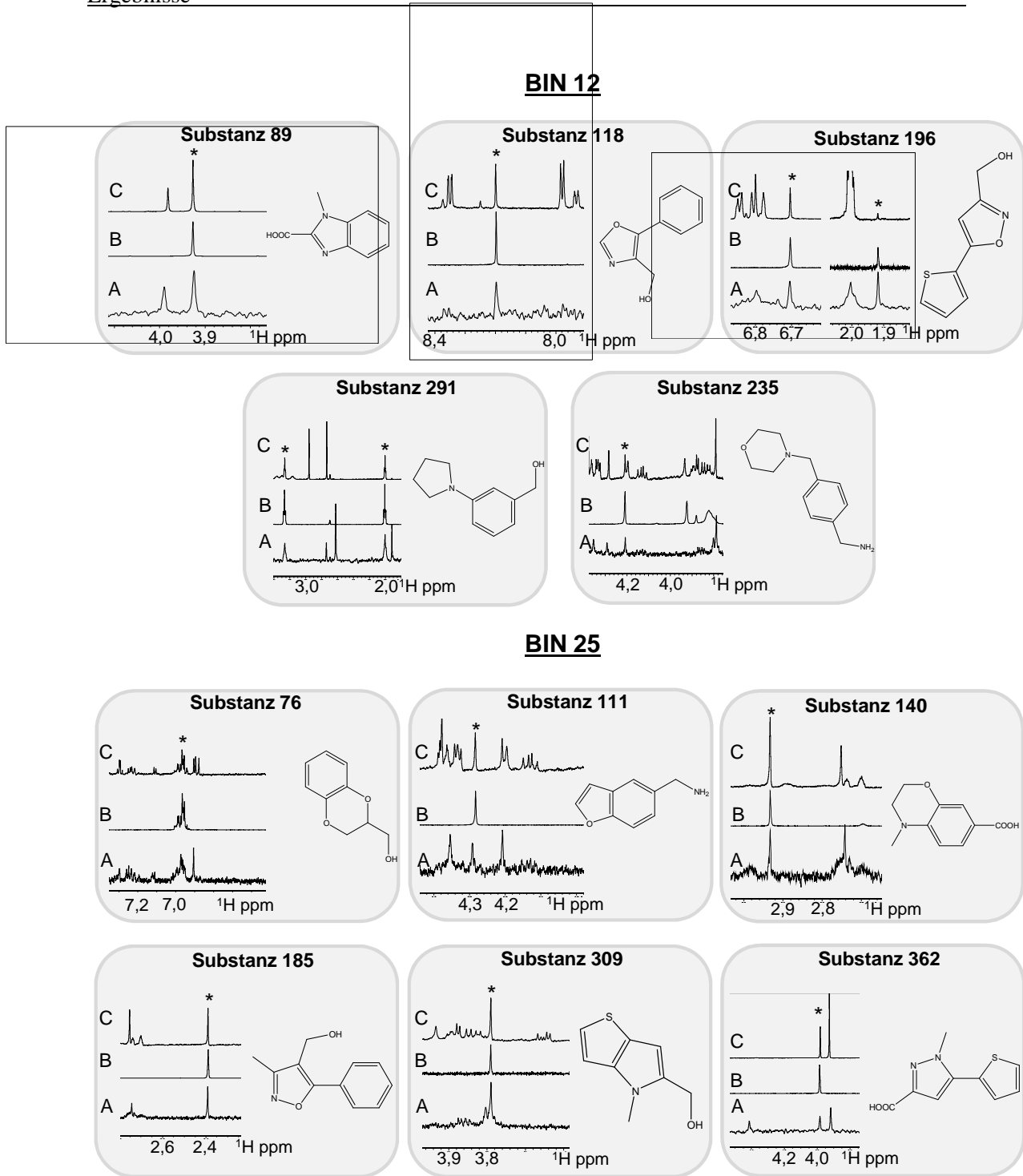


Abbildung 36: Identifizierung von Liganden des Fc γ RIII durch STD-NMR-Spektroskopie. Gezeigt ist das STD-Spektrum (stddiffesgp.3) des Fc γ RIII mit BIN 12 oder BIN 25 (A), der Einzelsubstanz (B) und das jeweilige Referenzspektrum des dazugehörigen BINs (C). Verwendet wurde eine D₂O-Probe des gereinigten Fc γ RIII mit einer Konzentration von ungefähr 12 μ M versetzt mit dem jeweiligen BIN mit einer Konzentration von 64 μ M je Substanz. Mit * markierte Peaks dienen zur Identifizierung der Bindung der Komponente an den Rezeptor, wobei das Signal keinem Proton der jeweiligen Substanz zugeordnet wurde. Neben den Spektren sind die Strukturen der Substanzen dargestellt. Die Anzahl der Scans betrug bei jedem Experiment 2048 bei 298 K. Eingestrahlt wurde bei -0,5 ppm, die Sättigungszeit betrug 750 ms.

5 Diskussion

Fc-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Immunregulation, da sie die humorale mit der zellulären Immunantwort verbinden. Eine Immunantwort resultiert aus dem ausbalancierten Zusammenspiel von positiven und negativen Signalen, welche die Stärke der resultierenden Immunantwort bestimmen. Wenn positive Signale überwiegen, folgen Zellaktivierung und pro-entzündliche Prozesse, die zu einer Eliminierung der Pathogene führen. In Abwesenheit solcher Stimulationen ist die Zellaktivierung blockiert und anti-entzündliche Prozesse können stattfinden. Eine Störung dieses sensiblen Systems kann zu einer Immunantwort gegen Nicht-Pathogene – einer Allergie – führen, oder das Immunsystem richtet Antikörper gegen körpereigene Stoffe (sogenannte Autoantigene) und es kommt zu einer Autoimmunerkrankung.

Fc-Rezeptoren für IgG werden Fc γ -Rezeptoren (Fc γ Rs) genannt, welche sich aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Struktur, ihrer Antikörperbindungsaffinität und ihrer IgG-Unterklassenspezifität unterscheiden.

Hier soll zum besseren Verständnis der Fc-Rezeptor-IgG-Interaktionen und deren Modulation beigetragen werden, was für die Entwicklung neuer therapeutischer Inhibitoren wichtig ist. Hierzu wurden in dieser Arbeit Schwerpunkte auf der Modifizierung der Funktion des neonatalen Fc-Rezeptors gelegt. Auch die Identifizierung von Liganden des Fc γ RIII Rezeptors, potentielle Inhibitoren der Fc γ RIII-IgG-Interaktion, war ein Schwerpunkt. Eine Blockierung der Antikörper-Rezeptor-Interaktion ist sowohl für den Fc γ RIII als auch den FcRn von großem Interesse, da so möglicherweise eine Modulation der Immunantwort erreicht werden kann.

5.1 Etablierung von Expressionssystemen

In den bisher veröffentlichten Präparationsprotokollen müssen die in dieser Arbeit verwendeten Proteine β Mg,¹⁰⁴ FcRn¹⁰⁵ und Fc γ RIII⁴⁰ aus nicht-löslichen *inclusion bodies* gereinigt werden. Dies ist mit einer aufwendigen Renaturierungsprozedur verbunden, daher sollten in dieser Arbeit zunächst Expressionssysteme etabliert werden, die es ermöglichen lösliche Proteine zu exprimieren. Hierzu wurden unterschiedliche Vektoren verwendet, mit denen unterschiedliche Reinigungsprotokolle verbunden sind. Der pET28a(+)-Vektor fand in allen Publikationen Verwendung und wurde deshalb auch in dieser Arbeit benutzt. Der

Vektor pIVEX2.3d wird für zellfreie Expressionssysteme verwendet und bietet somit eine interessante Alternative Proteine zu exprimieren. Neben der Möglichkeit Proteine unter Verwendung der ganzen Zelle selektiv Isotopen zu markieren, können Proteine mit dem zellfreien Expressionssystem ebenfalls einfach selektiv Isotopen markiert werden.¹¹⁶ Wobei hier von Vorteil ist, dass ausschließlich das Protein von Interesse markiert wird und die Markierung effizienter ist. Ein weiterer Vektor, der in dieser Arbeit Verwendung fand, ist der pTWIN1-Vektor, der eine Reinigung über einen Intein-Tag ermöglicht. Dieses kann durch eine Autokatalyse abgespalten werden, sodass sich nach der Reinigung kein Tag mehr am Protein befindet. Des Weiteren war das Reinigungsprotokoll für diesen Vektor in der Arbeitsgruppe gut etabliert. Unter der Verwendung unterschiedlicher Restriktionsschnittstellen wurden die verschiedenen Inserts aus den synthetisierten Plasmiden herausgeschnitten und einer Ligation mit dem jeweiligen Vektor unterzogen (Übersicht siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Übersicht der angestrebten Vektorkonstrukte. Markiert sind erfolgreich durchgeführte Klonierungen durch (+). Klonierungen die angestrebt wurden, aber nicht durchgeführt werden konnten, sind durch (-), Klonierungen die nicht durchgeführt wurden, durch n.d. gekennzeichnet.

	hFcRn	mFcRn	β Mg	Fc γ RIII	Fc γ RIII-BD
pET28a(+)	+	+	+	+	+
pIVEX2.3d	+	+	+	+	n.d.
pTWIN1	-	-	-	+	n.d.

Hierbei stellte sich vor allem die Klonierung in den pTWIN1-Vektor als schwierig dar und es gelang ausschließlich das für den Fc γ RIII kodierende Insert in diesen Vektor zu klonieren. Bei den Proteinen hFcRn, mFcRn und β Mg musste die HAT-Tag kodierende Sequenz aus dem Insert entfernt werden um den Intein-Tag nutzen zu können. Hierbei konnte die Entfernung dieser Sequenz vor oder nach der Klonierung in den pTWIN1 erfolgen. Die Entfernung der HAT-Tag kodierenden Sequenz wurde nur für das Konstrukt pMA-hFcRn erreicht. Eine Klonierung in den pTWIN1 war bei keiner dieser Strategien erfolgreich. Hierbei wurden unterschiedliche Volumina des Ligationsmixes verwendet und eine Hitzeinaktivierung der T4-Ligase zur Optimierung durchgeführt. Beides führte jedoch nicht zu einer erfolgreichen Klonierung.

Mit den Vektoren pET-hFcRn, pET-mFcRn, pET- β Mg, pET-Fc γ RIII, pET-Fc γ RIII-BD und pTWIN-Fc γ RIII sollten nun unter Verwendung unterschiedlicher *E. coli*-Expressionsstämme und unterschiedlicher Induktionsbedingungen Expressionssysteme gefunden werden, mit denen, es möglich wäre die Proteine in großer Menge löslich zu exprimieren. Tabelle 21 gibt einen Überblick über die durchgeführten Testexpressionen und die Induzierbarkeit der Proteinsynthese.

Überraschenderweise konnte eine Induktion der Proteinsynthese für den mFcRn auch nach mehrmaligen Versuchen nicht in dem *E. coli* BL21 (DE3) erreicht werden, sehr wohl aber mit dem *E. coli* Stamm Origami 2 (DE3) pLysS. Für beide *E. coli* Stämme wurde das gleiche Vektorkonstrukt verwendet, sodass es keinen Unterschied in der Induzierbarkeit der Proteinsynthese geben sollte. Die Gründe für das dennoch unterschiedliche Ergebnis bleiben an dieser Stelle unbekannt und müssten weiter untersucht werden.

Des Weiteren zeigte sich die Transformation des *E. coli* soluBL21 als schwierig und gelang ausschließlich mit den Vektoren pET-hFcRn und pET-FcγRIII. Wobei die Proteinsynthese für beide nicht induzierbar war. Zusätzlich gestaltete sich die Anzucht des Stammes nach Herstellerangaben aufgrund eines sehr langsamen Wachstums schwierig, sodass eine Proteinsynthese statt in M9-Minimalmedium ebenso in LB-Medium durchgeführt wurde. Die deutlichen Probleme beim Wachstum dieses Stammes geben einen Hinweis auf grundlegendere Probleme bei diesen Klonen. Deshalb wurden hier keine weiteren Versuche unternommen, die Proteinsynthese zu induzieren.

Die Klone, bei denen eine Proteinsynthese induzierbar war, wurden dann in lösliche und nicht lösliche Bestandteile fraktioniert und eine Analyse ergab, dass es nicht gelungen ist, Bedingungen zu finden, die es ermöglichen lösliches Protein zu exprimieren. Aufgrund dessen wurde im Folgenden mit den Vektoren pET-hFcRn, pET-βMg und pET-FcγRIII weitergearbeitet, die bereits in den Publikationen verwendet wurden.

Tabelle 21: Übersicht der durchgeführten Testexpressionen. Kulturen in denen eine Proteinsynthese induziert werden konnten sind mit (+) markiert. In mit (-) gekennzeichnete Kulturen konnte keine Induktion der Proteinsynthese festgestellt werden. Testexpressionen die nicht durchgeführt wurden, sind durch n.d. gekennzeichnet.

		pET28a(+)					pTWIN1
		hFcRn	mFcRn	βMg	FcγRIII	FcγRIII-BD	FcγRIII
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	+	-	+	+	+	n.d.
	Origami2 (DE3).pLysS	+	+	+	+	n.d.	-
	soluBL21	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
	ER2566	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+

5.2 Präparation des βMg und der Fc-Rezeptoren

Für in dieser Arbeit durchgeführte Experimente war es von essenzieller Bedeutung, dass die Proteine in ausreichender Menge rein präpariert werden konnten. Da alle Proteine bei einer Expression in *E. coli* in *inclusion bodies* vorlagen, war eine Reinigung dieser Proteine zunächst mit Lösen der *inclusion bodies* und einer damit verbundenden Denaturierung der

Proteine verbunden. Bei allen drei Proteinen, dem FcRn, FcγRIII und dem βMg, zeigt sich der Schritt der Renaturierung als verlustreich.

Reinigung des βMg

Die Reinigung des βMg gestaltete sich im Vergleich zu der Präparation der Rezeptoren einfach. Ein Schritt der βMg Reinigung, der zu einem hohen Proteinverlust führte, war die Reinigung über eine Ni-NTA-Säule, bei der SDS-Gelanalysen zeigten, dass eine hohe Proteinmenge nicht an die Säule gebunden hat und sich somit im Durchfluss befand. Es war nicht möglich durch eine weitere Affinitätschromatographie oder eine Erhöhung des Säulenvolumens den Proteinverlust zu verringern. Der HAT-Tag eluiert bereits bei 60 mM Imidazol, so kann es aufgrund des hier verwendeten Ni-NTA-Bindepuffer, der bereits eine Imidazolkonzentration von 20 mM aufweist, während der Affinitätschromatographie zu nicht optimalen Bindungsbedingungen gekommen sein. Eine Reinigung unter Verwendung eines Bindepuffers ohne Imidazol widerlegte aber diese These, da der Proteinverlust im Durchlauf unverändert hoch blieb. Während der Reinigung wurden native Bedingungen verwendet, wodurch der Proteinverlust auch durch einen frühzeitigen Beginn der Faltung des βMgs während des Reinigungsprozesses erklärt werden kann. So konnte gezeigt werden, dass eine Filtration eines denaturierten βMgs mit Wasser zur Renaturierung des Proteins ausreicht. Während der Affinitätschromatographie lagen jedoch nicht die optimalen Renaturierungsbedingungen vor, sodass es zu Fehlfaltungen des Proteins gekommen sein kann, was möglicherweise dazu führte, dass der HAT-Tag nicht mehr mit der Säulenmatrix interagieren konnte. Um dies auszuschließen, wurde eine Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, indem dem Ni-NTA-Bindepuffer als auch dem Elutionspuffer, Guanidinhydrochlorid in einer Konzentration von 6 M hinzugefügt wurde. Es zeigte sich jedoch, dass dies nicht zu einer höheren Proteinausbeute führt und der Proteinverlust im Durchlauf vergleichbar war. Eine weitere Erklärung wäre, dass es sich hier um Protein handelt, bei dem der N-terminale HAT-Tag durch Proteasen hydrolytisch abgebaut wurde und so nicht mehr mit der Säulenmatrix interagieren konnte. Dies könnte durch eine Verwendung von Proteasen während der Zellyse vermieden werden.

Ein weiterer Schritt des Reinigungsprotokolls, der zu Proteinverlust führte, ist die Dialyse gegen 10 mM Tris. Da βMg jedoch in hoher Menge exprimiert werden konnte und die Reinigungsprozedur relativ einfach war, wurden auf eine Optimierung dieser Schritte verzichtet.

Die Ausbeute einiger rekombinanter Proteine in der nativen Form konnte durch Coexpression mit Chaperonen in *E. coli* erhöht werden.¹¹⁷⁻¹²¹ Der Effekt ist jedoch abhängig

von der individuellen Chaperon/rekombinantes Protein-Kombination. So wäre es interessant eine Coexpression des β Mg mit Chaperonen auf Produktion von löslichem Protein zu untersuchen.

Reinigung des FcRn

Deutlich schwieriger gestaltete es sich die Rezeptoren, FcRn und Fc γ RIII zu reinigen. Bei der Reinigung des FcRn zeigte sich bei der Affinitätschromatographie der gleiche Proteinverlust im Durchfluss wie bei der Reinigung des β Mgs. Auch hier führte eine Erhöhung des Säulenvolumens oder das Einsetzen der Durchflussfraktion in eine erneute Affinitätschromatographie zu keiner Abhilfe.

Ein weiterer Schritt, der zu einem hohen Proteinverlust führte, war hier, wie beim β Mg, die Renaturierung des Rezeptors. Eine Schwierigkeit bei der Renaturierung des FcRn gestaltet sich dadurch, dass zur richtigen Faltung des Proteins β Mg als kleine Untereinheit in ausreichender Menge vorliegen muss.^{64,65} So wurde gezeigt, dass eine fehlende Assoziierung des Rezeptors mit β Mg zu Disulfidbrücken-gebundener FcRn-Oligomere führt. *In vivo* akkumulieren diese im endoplasmatischen Retikulum und werden dort wahrscheinlich abgebaut.^{64,66} β Mg liegt zwar im Renaturierungsansatz des FcRn in vierfach molarem Überschuss vor. Jedoch ist es denkbar, dass ein FcRn-Molekül mit einem anderen FcRn-Molekül eine Disulfidbrücke formt und dann als Disulfidbrücken-gebundener FcRn-Oligomere ausfällt. Dies könnte geschehen bevor es dem FcRn-Molekül möglich ist, mit einem β Mg zu assoziieren. Zur Optimierung des Renaturierungsprozesses könnte eine langsamere Zugabe des denaturierten Rezeptors in den Renaturierungsansatz über einen längeren Zeitraum in kleinen Mengen erfolgversprechend sein, wie es auch für den Fc γ RIII praktiziert wurde.^{23,40} Die einzelnen FcRn-Moleküle hätten hierdurch mehr Zeit mit einem β Mg-Molekül zu assoziieren und würden nicht so schnell mit einem weiteren FcRn-Molekül in Kontakt kommen. Eine weitere Möglichkeit wäre es IgG oder Fc-Fragmente dem Renaturierungsansatz hinzuzugeben. Dies könnte bei der korrekten Faltung des Rezeptors behilflich sein, da nun der Ligand des Rezeptors während der Faltung anwesend ist und dies die Faltung unterstützen könnte. Klasse I MHC-Moleküle binden typischerweise Peptide im endoplasmatischen Retikulum und präsentieren so Antigene den T-Zellen.¹²² Ohne die Bindung dieser Peptide löst sich die Struktur der Ligandenbindestelle auf.¹²³ Es konnte gezeigt werden, dass eine zellfreie Renaturierung von MHCI-Heterodimeren exogenen Liganden benötigt, um einen dreiteiligen Komplex mit der MHCI-Kette und β Mg zu bilden. Eine Renaturierung in Abwesenheit von Liganden führt zu einem instabilen Komplexen.^{123–126} Auch die Verwendung von Chaperonen während der Renaturierung könnte zu einer

besseren Proteinausbeute nach der Renaturierung führen. Für MHCI-Moleküle fungieren Calnexin und Calreticulin als Chaperone.¹²⁷

Ein weiterer interessanter Ansatz wäre die Coexpression von FcRn mit β Mg oder Chaperonen¹¹⁷⁻¹²¹ in *E. coli*. β Mg und/oder Chaperone wären nun während der Expression des FcRn anwesend und könnten die Faltung des Rezeptors unterstützen. So könnte es möglicherweise gelingen, dass der Rezeptor bereits in *E. coli* korrekt faltet und dann löslich exprimiert werden kann.

Sollte es durch die hier genannten Optimierungsmöglichkeiten gelingen den FcRn in großer Menge zu reinigen, so wäre es möglich das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit die Inhibition der Interaktion des FcRn mit IgG Autoantikörpern weiterzuverfolgen.

Reinigung des Fc γ RIII

Während der Affinitätschromatographie des Fc γ RIII zeigte sich entgegen der FcRn- und β Mg-Reinigungen kein Proteinverlust. Im Unterschied zu FcRn und β Mg besitzt der Fc γ RIII keinen HAT-Tag, sondern einen C-terminalen Polyhistidin-Tag, der durch den pET28a(+)-Vektor kodiert wurde. Die Verwendung dieses Tags wäre eine weitere erfolgsversprechende Möglichkeit, den Proteinverlust bei der Reinigung der Proteine FcRn und β Mg zu verringern.

Der hohe Proteinverlust bei der Reinigung des Fc γ RIII ereignete sich vor allem bei der Renaturierung. Eine Veränderung der Inkubationszeit und des Volumens des Renaturierungsansatzes führte jedoch nicht zu einer höheren Proteinausbeute. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Reinigungsprotokoll von Zhang *et al.*⁴⁰ konnte keine ausreichende Proteinmenge gereinigt werden. Das Reinigungsprotokoll von Sonderman *et al.*²³ weicht von dem Protokoll von Zhang *et al.*⁴⁰ in den Renaturierungs- und Reinigungsschritten ab. Es wäre daher interessant das Reinigungsprotokoll von Sonderman *et al.*²³ anzuwenden und die Proteinausbeute beider Protokolle miteinander zu vergleichen. Auch eine Kombination beider Reinigungsstrategien könnte die gereinigte Proteinmenge steigern.

Wie auch beim FcRn könnte eine Zugabe des Liganden IgG zum Renaturierungsansatz eine verbesserte Proteinausbeute bewirken. Aber auch eine Coexpression mit Chaperonen in *E. coli* wäre, wie beim FcRn und β Mg, eine interessante Möglichkeit lösliches Protein zu exprimieren.

5.3 NMR-Spektroskopische Untersuchungen an β_2 -Mikroglobulin

Überprüfung der Faltung von β Mg und Resonanzzuordnung eines ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrums

Durch Abweichung der NMR-spektroskopischen Versuchsbedingungen in dieser Arbeit von Publikationen^{91,110} kommt es in ^1H , ^{15}N HSQC-Spektren des β Mg zu Peakverschiebungen. Durch Tripleresonanzspektren und einer publizierten Zuordnung¹¹⁰ war es möglich die Signale eines ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrums des β Mg den einzelnen Aminosäuren zu zuordnen. Anhand des ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrums kann sofort erkannt werden, dass die Renaturierung des β Mgs erfolgreich war und ein Vergleich des Spektrums mit bereits veröffentlichten Spektren^{91,110} zeigt, dass das Protein in der richtigen Konformation vorlag. Wie durch SDS-Gelanalysen und Massenspektrometrie gezeigt werden konnte, liegt nach der Bromcyanspaltung ein Gemisch aus β Mg und β Mg+HAT vor. Der HAT-Tag scheint eine Faltung des Proteins jedoch nicht zu beeinträchtigen. Eine Zuordnung von Signalen des HAT-Tag ist aufgrund des β Mg/ β Mg+HAT-Gemisches jedoch nicht möglich. Für einige Aminosäuren wurde eine Überlagerung der Signale beobachtet. Für andere Aminosäuren konnten bei den verwendeten Probenbedingungen kein Signal detektiert werden. Die theoretische Lage dieser Signale wurde mit der Hilfe der Resonanzliste von Eichner *et al.*¹¹⁰ in dem Spektrum bestimmt. Eine Wiederholung der NMR-Experimente mit einer höher konzentrierten β Mg-Probe könnte Abhilfe schaffen.

Identifizierung des an der Tgasereaktion beteiligten Lysinrestes

β Mg enthält drei Glutamin- und acht Lysinreste. Wie es durch Fésüs *et al.*⁹² gezeigt wurde, ist β Mg ein geeignetes Substrat der Transglutaminase. Transglutaminasen katalysieren einen Acyltransfer, welcher zwischen einer γ -Carboxyamin-Gruppe (Acyldonor) eines peptidgebundenen Glutaminrestes und einem primären Amin stattfindet.⁹⁵ Handelt es sich bei dem Amin um einen proteingebundenen Lysinrest, so kommt es zu einer inter- oder intramolekularen Verknüpfung. Beide, β Mg und Tgase, sind im Körper weitverbreitet und werden mit einer Vielzahl von biologischen Funktionen in Verbindung gebracht.⁹⁶⁻⁹⁹

Hier wurde untersucht, ob Modifikationen von MHCI-ähnlichen Proteinen in denen β Mg als kleine Untereinheit fungiert, wie der FcRn, durch Transglutaminasen möglich sind. Hierzu sollten zunächst die Aminosäurereste identifiziert werden, die an der Ausbildung einer Verknüpfung beteiligt sind. Zur Identifikation des Lysinrestes des β Mgs wurde das Peptid FITC-Ahx-TVQQEL der Tgasereaktion hinzugesetzt. FITC-Ahx-TVQQEL dient als Glutamindonor¹⁰⁰ und trägt einen Fluoreszenztag, der es ermöglicht modifiziertes β Mg unter UV-Belichtung zu identifizieren. Zunächst wurden die modifizierten Proben durch eine

Größenausschlußchromatographie untersucht. Hier konnte eine deutlich spätere Elution von modifiziertem β Mg dokumentiert werden. Dass das modifizierte β Mg deutlich später eluiert wurde überraschte zunächst, da durch die Modifikation eine um 1,2 kDa höhere Masse vorliegt und so die Elution des modifizierten Proteins vor dem nicht-modifizierten β Mg erwartet wurde. Die verzögerte Elution kann durch Wechselwirkungen der Säulenmatrix mit der Modifikation erklärt werden. Die Analyse der Proben durch SDS-PAGE zeigte unter UV-Belichtung fluoreszierende Banden des modifizierten Proteins. Es sind jedoch zwei fluoreszierende Banden in der Fraktion zuerkennen, die darauf hinwiesen, dass das Protein in zwei Varianten vorlag, mit und ohne HAT-Tag. Dies wurde bereits zuvor durch SDS-PAGE beobachtet und konnte später durch eine massenspektrometrische Analyse bestätigt werden. Betrachtet man im Vergleich zu dem UV-belichteten Gel, das mit Coomassie gefärbte Gel, so ist deutlich zu erkennen, dass knapp unterhalb der fluoreszierenden Banden eine weitere nicht fluoreszierende Proteinbande zu detektieren ist. Dies zeigt, dass es trotz Überschuss an TVQQEL, welcher nicht vollständig verbraucht wurde, Protein vorliegt, das nicht durch die Tgase modifiziert wurde. Dies entspricht den Ergebnissen von Fésüs *et al.*,⁹² dass nicht alle β Mg-Monomere durch eine Tgase in Multimere umgewandelt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür zeigt die Tertiärstruktur des β Mgs, die aus zwei β -Faltblättern besteht, die durch hydrophobe Bindungen als Sandwich zusammengehalten werden.^{63,128} Betrachtet man die Seiten des β -Faltblattes, so fallen die Sequenzen ${}^6\text{KIQ}^8$ und ${}^{89}\text{QPK}^{91}$ auf (Abbildung 37). Diese sind so lokalisiert, dass es zu einer Bildung einer internen Isopeptidbindung durch die Tgase kommen kann. So modifizierte Moleküle stehen nicht mehr für eine Polymerisation zur Verfügung.⁹² Durch NMR-Spektroskopie wurde das K6 identifiziert, durch die Tgase modifiziert worden zu sein. Da das K6 auch Bestandteil der Sequenz ${}^6\text{KIQ}^8$ ist, sind die internen Isopeptidbindungen eine Erklärung dafür, dass nicht alle β Mg-Monomere mit TVQQEL modifiziert wurden, obwohl dieses in ausreichender Menge vorlag. In den Ergebnissen der Massenspektrometrie als auch in NMR-Spektren lassen sich jedoch keine Hinweise auf eine solche interne Isopeptidbindung finden. So bleibt das Vorhandensein einer internen Isopeptidbindungen spekulativ.

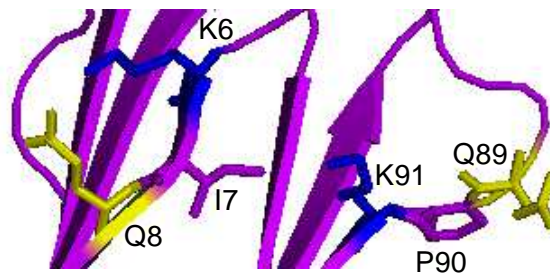


Abbildung 37: Ausschnitt der Kristallstruktur des β Mgs zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sequenzen ${}^6\text{KIQ}^8$ und ${}^{89}\text{QPK}^{91}$. Glutaminreste sind in Gelb, Lysinreste in Blau dargestellt. Die Aminosäuren von Interesse sind im Stäbchenmodell dargestellt und beschriftet.

Das Amidproton von K58 kann in den ^1H , ^{15}N HSQC-Spektren nicht detektiert werden, vermutlich durch schnellen Austausch mit H_2O . Deshalb lässt sich keine Aussage treffen, ob dieser Aminosäurerest möglicherweise ebenso wie das K6 modifiziert wurde. Bei der massenspektrometrischen Analyse kann hingegen das Peptid wiedergefunden werden, dass K58 beinhaltet. Eine Modifikation dieses Peptids durch TVQQEL kann in den jeweiligen Proben nicht festgestellt werden, sodass hier davon ausgegangen werden kann, dass das K6 als einziger Lysinrest des βMg s an der Tgasereaktion beteiligt ist.

Die Modifikation des K6 des humanen βMg kann sowohl mit der *Mouse tissue* Transglutaminase als auch mit der *guinea pig liver* Transglutaminase beobachtet werden. Beide Transglutaminasen stammen von unterschiedlichen Spezies (Maus und Meerschweinchen) und aus der Leber sowohl als auch aus dem Gewebe. Dies zeigt, dass die Transglutaminasereaktion mit βMg ein im Organismus ubiquitär vorkommendes Ereignis ist und die Substratspezifität der Transglutaminasen Spezies übergreifend ist.

Identifizierung des an der Tgasereaktion beteiligten Glutaminrestes

Anschließend sollte der beteiligte Glutaminrest identifiziert werden. Hierzu wurde der Versuch von Fésüs *et al.*⁹² zur Hilfe genommen. Durch die Zugabe von Methylamin zur Tgasereaktion wird eine Methylgruppe an den jeweiligen Glutaminrest angelagert. Diese chemische Veränderung sollte sich dann durch einen zusätzlichen oder verschwindenden Peak im ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum nachvollziehen lassen und der beteiligte Glutaminrest kann identifiziert werden. Jedoch zeigten die NMR-Messungen, dass sich die Spektren vor und nach der Inkubation mit Methylamin kaum unterschieden. Eine anschließende Analyse der Proben durch ein SDS-Gel zeigte weiterhin, dass eine Polymerbildung nicht inhibiert worden war. Auch die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen erlaubten keine Schlüsse auf ein mit einer Methylgruppe modifizierten Glutaminrest. Alternativ sollte der Glutaminrest nun durch N-(Tetramethylrhodaminy)cadaverin/N-(TAMRA)cadaverine¹⁰¹ modifiziert werden. Da dieses fluoresziert, könnte eine Modifikation wie beim TVQQEL visuell überprüft werden. Durch Gelfiltration, SDS-PAGE als auch durch NMR-Spektroskopie konnte jedoch eine Modifikation des βMg s durch TAMRA ausgeschlossen werden. Durch Massenspektrometrie ist eine Modifikation des an der Tgasereaktion beteiligten Glutaminrestes in diesen Versuchsansätzen ebenfalls nicht gelungen.

Inhibierung der Polymerbildung durch Methylamin

In SDS-Gelen wurde zuvor gezeigt, dass es nicht gelungen ist, die Polymerbildung durch Zugabe von Methylamin zu inhibieren. Zur Überprüfung des Versuchsansatzes von Fésüs *et al.*⁹² wurden durch ein SDS-Gel verschiedene Ansätze der Tgasereaktion mit Methylamin analysiert. Hier wurden jedoch statt der 30 mM 100 mM Methylamin verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass durch die höhere Methylaminkonzentration eine Inhibition der Polymerbildung gelungen war. In dem SDS-Gel wurden zur Kontrolle auch Proben ohne Methylamin analysiert. Hier ist eindeutig zu erkennen, dass es im Gegensatz zu den Proben mit Methylamin zu einer deutlichen Polymerbildung kommt. Jedoch verbleibt der überwiegende Teil des β Mgs als Monomer, was auf eine mögliche interne Isopeptidbindung zwischen den β -Faltblättern zurückgeführt werden kann. An dieser Stelle scheint die zu niedrige Methylaminkonzentration ausschlaggebend für das Misslingen der Identifizierung des Glutaminrestes gewesen zu sein.

Kristallstrukturanalysen des FcRn

Betrachtet man die Kristallstruktur des FcRn und hebt K6 und die drei Glutaminreste Q2, Q8 und Q89 hervor, so wird deutlich, dass eine Dimerisierung des β Mgs, wenn es als kleine Untereinheit von MHCI-ähnlichen Molekülen fungiert nur möglich ist, wenn neben K6 das Q2 oder Q89 an der Tgasereaktion beteiligt ist. Q8 wird durch die extrazellulären Domänen des Rezeptors verdeckt, und ist für die Tgase nicht zugänglich. K6 liegt aber räumlich in der Proteinkrümmung des FcRn/ β Mg-Komplexes und es ist fraglich, ob dieses von der Tgase erreicht werden kann. Ist dies möglich, könnte ein zweites FcRn Molekül sich möglicherweise räumlich nicht nahe genug anlagern, so dass das K6 zu weit weg von seinem Gegenstück einem Glutaminrest liegt (Abbildung 38).

Untersuchungen an Fc-Rezeptoren haben ergeben, dass diese ein Substrat der Tgase sind und durch diese polymerisiert werden können, was deren Funktion im Vergleich zu monomeren Rezeptoren beeinflusst.¹²⁹ Betrachtet man nun die 13 Glutamin- und 12 Lysinreste des FcRn in der Kristallstruktur so zeigt sich, dass das Q225 räumlich sehr nahe dem K6 des β Mg liegt. Des Weiteren liegt K86 des FcRn nahe dem Q2 des β Mg. Hier wäre denkbar, dass es durch Transglutaminasen zu einer intramolekularen Isopeptidbindung kommen kann. Eine intramolekulare Isopeptidbindung könnte zwischen dem K86 des FcRn und Q2 des β Mg die Bindung des IgGs durch II des β Mg negativ beeinflussen. Eine Isopeptidbindung zwischen Q225 und K6 dürfte mit Blick auf die Kristallstruktur sich jedoch nicht auf die Bindung des IgG auswirken. Durch die hohe Anzahl von Glutamin- und Lysinresten im FcRn ist es

jedoch ebenfalls denkbar, dass der FcRn selbst ein Substrat der Tgasen ist. Dies sind rein spekulative Annahmen, welche experimentell untersucht werden müssten. Ein weiteres Indiz für den Einfluss von Tgasen auf Fc-Rezeptoren ist die Annahme, dass die Aktivität der Tgase wichtig ist für die Bindung der Immunkomplexe und dass diese Einfluss nehmen könnten auf die Rezeptorsignalweiterleitung.^{130,131} Wobei die genaue Funktion der Tgase in diesen Zusammenhängen noch nicht verstanden ist.

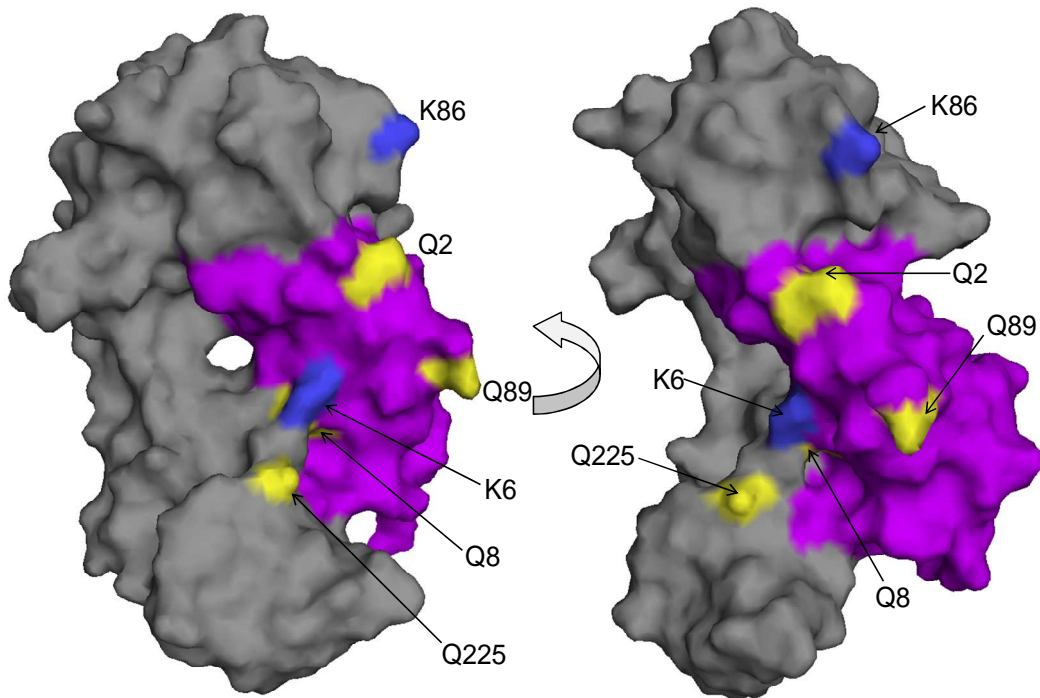


Abbildung 38: Kristallstruktur des β_2 -Microglobulins als kleine Untereinheit des humanen neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn). In Grau dargestellt sind die drei extrazellulären Domänen des FcRn, die mit dem β_2 -Mikroglobulin (β Mg, lila) assoziiert sind. Lysine sind in Blau, Glutaminreste in Gelb dargestellt. Die Struktur wurde mittels des PDB-Eintrages: 1EXU und dem Programm PyMOL dargestellt.

Betrachtet man nun den FcRn in Komplex mit seinen Liganden, dem Serumalbumin und dem Fc-Fragment, so wird deutlich, dass die Glutaminreste Q2 und Q89 an oder nahe der Bindungsregion für das Fc-Fragment liegen (Abbildung 39). Wenn eine Modifizierung durch die Tgase möglich sein sollte, so zeigt die Kristallstruktur, dass durch die Dimerisierung des β Mgs die Bindungsregion für das Fc-Fragment verdeckt werden würde.

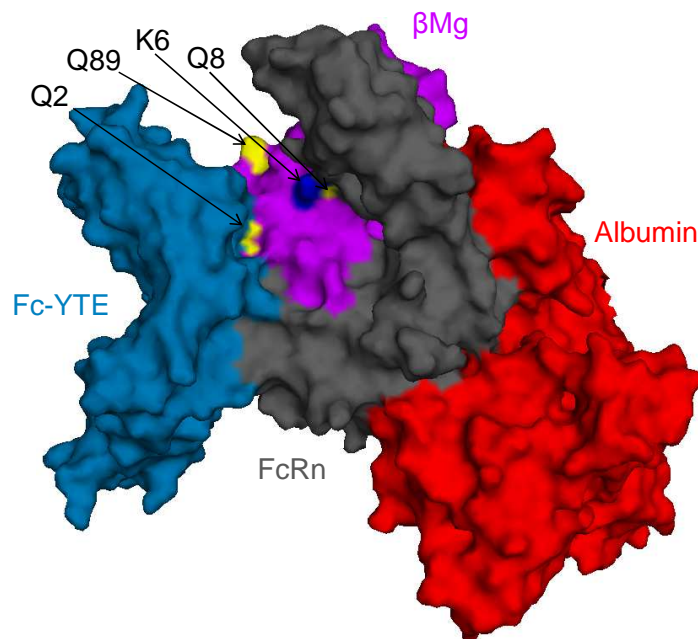


Abbildung 39: Kristallstruktur des β_2 -Microglobulins als kleine Untereinheit im FcRn-Albumin-Fc-YTE-Komplexe. In Grau dargestellt ist die α -Kette des FcRn, die mit β_2 -Mikroglobulin (β Mg, lila) assoziiert ist. Der Ligand Albumin ist in Rot und das Fc-YTE in Blau dargestellt. Der Lysinrest, der an der Tgasereaktion beteiligt ist, ist in Blau, alle möglichen Glutaminreste in Gelb dargestellt. Die gezeigte Struktur wurde mittels des PDB-Eintrages: 4N0U und dem Programm PyMOL dargestellt.

Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Dimerisierung des β Mgs, als kleine Untereinheit, durch eine Tgase zu einem Verlust der Fc-Fragment-Bindungsfähigkeit des FcRn führen würde. Die Albuminbindestelle liegt weit von der Antikörperbindestelle entfernt, so sollte eine Dimerisierung auf diese keine Auswirkungen haben.

Kristallstrukturanalysen von β Mg als kleine Untereinheit von anderen Proteinen

Betrachtet man die Struktur des humanen Klasse I Histokompatibilitäts-Antigen HLA-A2 und des T-Zellenoberflächen-Glykoprotein CD1a, Proteinbeispiele mit β Mg als kleine Untereinheit, so ist auffällig, dass die Strukturen ähnlich der FcRn-Struktur sind (Abbildung 40). Auch die Lokalisation des β Mgs und dessen Aminosäuren ist übereinstimmend. Dies ist nicht verwunderlich, da Proteine mit β Mg als kleine Untereinheit, wie der FcRn, zu den Klasse I Haupthistokompatibilitäts-Komplex-ähnlichen Proteinen gehören. Das bei der Tgasereaktion beteiligte K6 ist somit ebenfalls in der Proteinkrümmung lokalisiert und Q8 wird durch die Domänen der schweren Ketten verdeckt. Eine Dimerisierung des β Mgs in Komplex mit MHC I-ähnlichen Proteinen durch eine Tgase scheint daher generell als eher unwahrscheinlich.

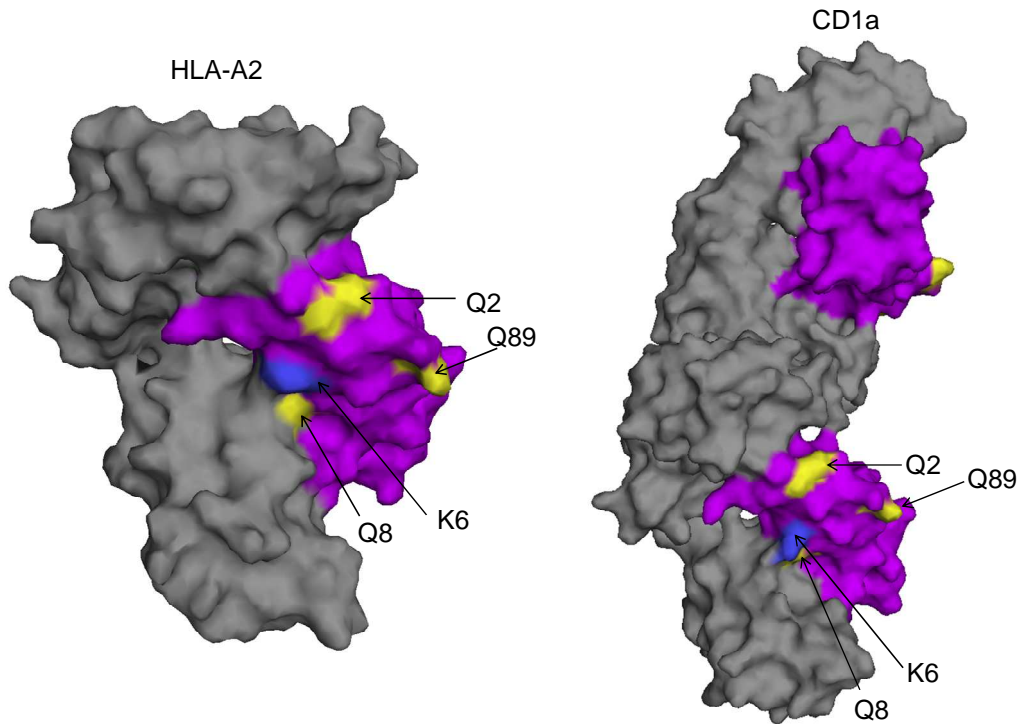


Abbildung 40: Kristallstruktur des β_2 -Microglobulins als kleine Untereinheit des humanen Klasse I Histokompatibilitäts-Antigen HLA-A2 und des T-Zellenoberflächen-Glykoprotein CD1a. In Grau dargestellt sind die extrazellulären Domänen, die mit dem β_2 -Microglobulin (β Mg, lila) assoziiert sind. Lysine sind in Blau, Glutaminreste in Gelb dargestellt. Die Struktur wurde für das HLA-A2 mittels des PDB-Eintrages: 3HLA, für das CD1a mittels des PDB-Eintrages: 1XZ0 und dem Programm PyMOL dargestellt.

Klasse I MHC-Moleküle binden im endoplasmatischen Retikulum kleinere Peptide und präsentieren so Antigene den T-Zellen.¹²² Die peptidbindende Spalte wird durch die α_1 - und α_2 -Domäne gebildet, welche auf der α_3 -Domäne und dem β Mg sitzen.⁸⁶ Eine negative Beeinflussung der Peptidbindung durch eine Modifizierung durch Tgasen scheint eher ausgeschlossen, da die peptidbindende Spalte weit vom β Mg entfernt liegt.

In vivo wäre es denkbar, dass in einer Tgasereaktion neben β Mg andere Reaktionspartner – Proteine oder kleine Moleküle – zur Modifizierung in Betracht kommen. Je nach Größe und Struktur könnten diese zu einer Funktionsmodifikation von Klasse I MHC-Moleküle führen.

5.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen an Fc γ RIII

Es gab bisher noch keine publizierten NMR-Spektren des Fc γ RIII Rezeptor, daher sollte hier zunächst untersucht werden, ob sich das Protein für NMR-spektroskopische Untersuchungen eignet. Das ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum des Fc γ RIII zeigte eine Peakverteilung die typisch für ein gefaltetes Protein ist. Jedoch wurden statt der 203 zu erwartenden Peaks lediglich 165 Peaks im Spektrum identifiziert. Bei einem Protein mit 188 Aminosäuren ist dies üblich, da es durch die Fülle der NMR-Signale zu Peaküberlagerungen kommt. Zur Resonanzzuordnung der einzelnen Peaks wäre es nötig Tripleresonanzspektren zu messen, dies konnte hier aufgrund der geringen Proteinausbeute nach der Reinigung des Rezeptors nicht realisiert werden.

NMR-spektroskopische Untersuchung des Fc γ RIII-IgG-Komplexes

Zur Analyse des Fc γ RIII-IgG-Komplexes wurde humanes IgG der NMR-Proteinprobe hinzugefügt, sodass > 99% des Rezeptors im Komplex mit IgG vorliegen sollte. Bei Zugabe des IgGs konnte eine sofortige Trübung der Probe beobachtet werden, was auf eine Denaturierung des Rezeptors schließen ließ. Dies konnte durch das NMR-Spektrum bestätigt werden. Es war somit nicht möglich den Fc γ RIII-IgG-Komplex NMR-spektroskopisch zu untersuchen. In diesem Versuch wurde zur Komplexbildung eine hoch konzentrierte Probe mit kleinem Volumen gewählt. Hingegen werden bei der Renaturierung von Fc-Rezeptoren Bedingungen gewählt, die eine starke Verdünnung in großen Volumina erfordern.^{23,40,105} Es könnte somit möglich sein, dass zur Komplexbildung ein niedrig konzentriertes Volumen Erfolgs versprechender ist. Anschließend müsste der Ansatz zur Komplexbildung konzentriert werden, damit die Probe NMR-spektroskopisch untersucht werden kann. Des Weiteren wurde in Kristallstrukturen von FcR/Fc-Komplexes nur der Fc-Part des IgGs verwendet.^{29,80,81} Möglicherweise gelingt eine Komplexbildung besser wenn das Fc-Fragment statt des vollständigen IgGs verwendet wird.

Konventionelle NMR-Spektren von großen Molekülen oder Komplexen in Lösung zeigen typischerweise sehr breite Linien, eine schlechte Auflösung und eine geringe Sensitivität. Bei der NMR-spektroskopische Untersuchung des Fc γ RIII/Fc-Komplexes empfiehlt sich daher die Anwendung von TROSY¹³² (*Transverse relaxation-optimized spectroscopy*) und CRINEPT¹³³ (*Cross-correlated relaxation-enhanced polarization transfer*) Techniken. Mit diesen Techniken können Proteine mit einer Größe > 100 kDa NMR-spektroskopisch untersucht werden, da die TROSY-Technik die transversale Spinrelaxation unterdrückt und durch eine Kombination mit der CRINEPT-Technik eine Optimierung der transversalen

Relaxation stattfindet.¹³⁴ Auch die Verwendung von deuterierten Proteinproben könnte hilfreich sein. Deuterierung verbessert das Verhältnis von Signal zu Rauschen durch Unterdrückung der Spindiffusion.¹³⁵

Identifizierung von Liganden des Fc γ RIII

Um Substanzen zu finden, die als mögliche Inhibitoren der Fc γ RIII-IgG-Bindung in Frage kommen, wurde die Fragmentbibliothek *Maybridge Ro5 fragment library* verwendet. In dieser Arbeit wurden zunächst die Versuchsbedingungen optimiert, indem ein Pulsprogramm und eine Probenzusammensetzung ausgewählt wurden, die es ermöglichten möglichst viele Signale im STD-Spektrum zu erhalten. Durch die STD-Messungen mit dem BIN 12 und 25 konnten insgesamt 12 Substanzen als bindend identifiziert werden. Da sich die Reinigung des Fc γ RIII als schwierig erwies und die Ausbeuten sehr gering waren, konnten hier keine weiteren BINs der Fragmentbibliothek untersucht werden. Dies wäre jedoch ein wichtiger Schritt zur Identifizierung potentieller Inhibitoren. Die Bindung des IgGs findet ausschließlich an der zweiten extrazellulären Domäne und der Hingeregion statt.²⁹ Daher müssten die hier als bindend identifizierten Substanzen zunächst noch unterschieden werden, ob sie an die erste oder zweite Domäne binden. Als Inhibitoren würden dann nur die Substanzen in Betracht kommen, die an der zweiten Domäne binden. Hierzu kann das Vektorkonstrukt pET-Fc γ RIII-BD zur Expression der Bindedomäne verwendet werden, wobei zunächst ein Reinigungsprotokoll etabliert werden muss. Hierbei sollte die Optimierungsmöglichkeit der Coexpression mit Chaperonen in *E. coli* zur Expression von löslichem Protein, wie auch für die Proteine β Mg, FcRn und Fc γ RIII, Anwendung finden. Auch eine Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und den einzelnen Substanzen mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie wäre ein weiterer interessanter Aspekt zur Identifizierung geeigneter Inhibitoren für die Fc γ RIII-IgG-Bindung.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnten Grundlagen geschaffen werden zur Modulation von Fc-Rezeptoren und MHCI-ähnlichen Proteinen durch Transglutaminasen und potentielle Inhibitoren.

Modulation durch Transglutaminasen

Die diskutierten Ergebnisse haben erste Anhaltspunkte darauf gegeben, dass eine Dimerisierung des β Mgs durch eine Tgase als unwahrscheinlich gilt, wenn β Mg als kleine Untereinheit des FcRn bzw. von MHCI-ähnlichen Proteinen vorliegt. Dies ist auf die Lokalisation des K6 und der möglicherweise beteiligten Glutaminreste zurückzuführen. Q8 des β Mg wird fast vollständig vom Rezeptor verdeckt, sodass dieses nicht für eine Reaktion mit einer Tgase in Betracht kommt. Da K6 deutlich in der Proteinkrümmung lokalisiert ist, liegt nahe, dass sterische Hinderungen dazu führen, dass das β Mg nicht dimerisieren kann. Falls dies doch möglich sein sollte, so zeigt die Kristallstruktur des FcRn-Albumin-Fc-YTE-Komplexes, dass durch die Dimerisierung die Bindestelle des IgGs durch ein weiteres β Mg verdeckt wäre und so eine Bindung nicht mehr möglich wäre. Dies hätte zur Folge, dass IgG aus dem sauren Endosom nicht mehr durch den Rezeptor gebunden und an die Zelloberfläche recycelt werden könnte. Die Halbwertszeit des IgG wäre dadurch deutlich vermindert. Die Bindung des Albumins wäre durch eine Dimerisierung nicht beeinflusst, da die Bindungsstelle weit entfernt der IgG-Bindestelle liegt.

Des Weiteren wäre es von großer Bedeutung den an der Tgasereaktion beteiligten Glutaminrest des β Mgs zu identifizieren. Hier ist der Einsatz einer höheren Methylaminkonzentration vielversprechend. So sollten unter diesen Bedingungen sowohl die NMR-spektroskopischen als auch die massenspektrometrischen Untersuchungen erneut durchgeführt werden. Wurde dann der Glutaminrest identifiziert, so könnte eine Dimerisierung des β Mgs, als kleine Untereinheit MHCI-ähnlicher Moleküle, möglicherweise ganz ausgeschlossen werden. Trotzdem sollten mit gereinigtem FcRn Dimerisierungsversuch unternommen werden und mögliche Änderungen der Bindungseigenschaften untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich das β Mg im Komplex mit MHCI-Proteinen, speziell der FcRn, betrachtet, im Zusammenhang mit der Fragestellung, ob eine Transglutaminase Einfluss auf seine Funktion haben könnte. Mit den oben diskutierten Ergebnissen scheint dies eher unwahrscheinlich. Des Weiteren wäre es aber auch denkbar, dass der FcRn nicht durch das β Mg als Substrat der Tgase in seiner Funktion modifiziert werden kann, sondern dass der Rezeptor selbst ein Substrat dieses Enzyms ist. Untersuchungen an Fc-Rezeptoren haben ergeben, dass diese ein Substrat der Tgase sind und durch diese polymerisiert werden können, was deren Funktion im Vergleich zu monomeren Rezeptoren beeinflusst.¹²⁹ Außerdem scheint die Aktivität der Tgase wichtig für die Bindung der Immunkomplexe und könnte Einfluss nehmen auf die Rezeptorsignalweiterleitung.^{130,131} Zukünftig wäre es sehr

interessant wie sich eine Inkubation des FcRn bzw. FcγRIII mit der Tgase auf dessen Struktur und Funktion auswirkt. Durch die Strukturunterschiede der beiden Rezeptoren ist es denkbar, dass ein Rezeptor als Substrat der Tgase fungiert, der andere hingegen nicht. Hier könnten durch Gelfiltration, NMR-Spektroskopie und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie mögliche Polymerbildungen und daraus resultierende Modellierungen der Bindungseigenschaften der Rezeptoren FcRn und FcγRIII untersucht werden. Durch die Größe der Rezeptoren könnte sich eine NMR-spektroskopische Untersuchung schwierig gestalten. Hier könnte die Verwendung von TROSY¹³² und CRINEPT¹³³ Techniken und einer deuterierten Probe hilfreich sein.¹³⁵

Optimierung der Reinigungsprotokolle

Um eine mögliche Dimerisierung der Fc-Rezeptoren *in vitro* untersuchen zu können, müsste eine ausreichend große Menge an Rezeptor hergestellt werden. Hier stellt jedoch die Reinigung und Renaturierung das größte Problem dar. Den Proteinverlust bei der Reinigung des FcRn könnte möglicherweise durch Verwendung des poly-Histidin-Tags statt des HAT-Tags erreicht werden. Um den Proteinverlust während der Renaturierungen so gering wie möglich zu halten, könnte der Ligand IgG dem Renaturierungsansatz hinzugefügt werden. Die Anwesenheit des Liganden könnte zu einer verbesserten Faltung und somit gesteigerten Ausbeute führen. Auch die Verwendung von Chaperonen während der Renaturierung oder durch Coexpression mit den Rezeptoren in *E. coli* könnte zu einer besseren Proteinausbeute führen. Die Coexpression des FcRn neben Chaperonen mit βMg in *E. coli* könnte die Faltung des FcRn unterstützen. Dies stellt eine Möglichkeit dar die Rezeptoren bereits in *E. coli* löslich zu exprimieren.

Identifizierung von Inhibitoren der FcγRIII-IgG-Bindung

Ein weiterer sehr interessanter Aspekt ist die Identifizierung von möglicher potentieller Inhibitoren der FcγRIII-IgG-Bindung mit Hilfen der Fragmentbibliothek *Maybridge Ro5 fragment library*. Hierzu muss jedoch, wie auch in den Versuchen zuvor, genügend Protein isoliert werden. Dafür muss eine Optimierung der Reinigungsstrategie angestrebt werden. Um Fragmente unterscheiden zu können, ob sie an die erste oder zweite extrazelluläre Domäne des FcγRIII binden kann zukünftig mit dem in dieser Arbeit bereits hergestellten Vektor pET-FcγRIII-BD eine Reinigungsstrategie entwickelt werden, die es ermöglicht die Bindedomäne in löslicher Form herzustellen.

In dieser Arbeit konnten Grundlagen geschaffen werden im Hinblick auf die Modulation von Fc-Rezeptoren durch Transglutaminasen und potentielle Inhibitoren. Dies ermöglicht weitere interessante Untersuchungen zur Modifizierung der Fc-Rezeptorbindungseigenschaften.

6 Literatur

1. Ludwig RJ. Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *ISRN Dermatol.* 2013;15:1–25.
2. Woodley DT, Burgeson RE, Lunstrum G, Bruckner-Tuderman L, Reese MJ, Briggaman RA. Epidermolysis Bullosa Acquisita Antigen is the globular carboxyl terminus of Type VII Procollagen. *J Clin Invest.* 1988;81(3):683–687.
3. Woodley DT, Briggaman RA, O’Keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR. Identification Of The skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med.* 1984;310(16):1007–1013.
4. Uitto J, Chung-Honet L, Christiano A. Molecular biology and pathology of type VII collagen. *Experimental Dermatology.* 1992;1(1):2–11.
5. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Bro EB. Autoantibodies to Type VII Collagen Mediate Fcγ-Dependent Neutrophil Activation and Induce Dermal-Epidermal Separation in Cryosections of Human Skin. *Am J Pathol.* 2002;161(1):301–311.
6. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol.* 1998;76(6):231–248.
7. Deisenhofer J. Crystallographic Refinement and Atomic Models of a Human Fc Fragment and Its Complex with Fragment B of Protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å Resolution. *Biochemistry.* 1981;20(9):2361–2370.
8. Sauer-Eriksson AE, Kleywegt GJ, Uhlén M, Jones TA. Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG. *Structure.* 1995;3:265–278.
9. Lanier LL. Face off - The interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr Opin Immunol.* 2001;13(3):326–331.
10. Dijkstra HM, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM. Inflammation in autoimmunity: Receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* 2001;22(9):510–516.
11. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors: Old friends and new family members. *Immunity.* 2006;24:19–28.
12. Wijngaarden S, van de Winkel JGJ, Jacobs KMG, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Van Roon JAG. A shift in the balance of inhibitory and activating Fcγ receptors on monocytes toward the inhibitory Fcγ receptor IIb is associated with prevention of monocyte activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3878–3887.
13. Metzger H. Transmembrane Signaling: The Joy Of Aggregation. *J Immunol.* 1992;149(5):1477–1487.
14. Isakov N. ITIMs and ITAMs The Yin and Yang of Antigen and Fc Receptor-Linked Signaling Machinery. *Immunol Res.* 1997;16:85–100.

15. Lang ML, Shen L, Wade WF. Gamma-chain dependent recruitment of tyrosine kinases to membrane rafts by the human IgA receptor Fc α R. *J Immunol.* 1999;163:5391–5398.
16. Qiu WQ, De Bruin D, Brownstein BH, Pearse R, Ravetch, V. J. Organisation of the Human and Mouse Low-Affinity Fc γ R Genes: Duplication and Recombination. *Science.* 1990;248:732–735.
17. Ravetch J V., Kinet J-P. Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:457–492.
18. Van de Winkel JGJ, Capel PIJA. Overview: Fc receptors Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today.* 1993;14(1):215–221.
19. Daeron M. Fc Receptor Biology. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:203–234.
20. Ravetch J V, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science.* 2000;290(October):84–89.
21. Nimmerjahn F. Activating and inhibitory Fc γ Rs in autoimmune disorders. *Springer Semin Immunopathol.* 2006;28(4):305–19.
22. Allen JM, Seed B. Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science.* 1989;243(4):378–381.
23. Sonderrmann P, Jacob U. Human Fc γ receptor IIb expressed in Escherichia coli reveals IgG binding capability. *Biol Chem.* 1999;380(6):717–21.
24. Maenaka K, van der Merwe PA, Stuart DI, Jones EY, Sonderrmann P. The human low affinity Fc γ receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol Chem.* 2001;276(48):44898–904.
25. Fridman WH, Teillaud JL, Bouchard C, et al. Soluble Fc gamma receptors. *J Leukoc Biol.* 1993;54:504–512.
26. Bazil V, Strominger JL. Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16. *J Immunol.* 1994;152(20):1314–1322.
27. Rappaport E, Cassel D, Walterhouse D, et al. A soluble form of the human Fc receptor Fc gamma RIIA: cloning, transcript analysis and detection. *Exp Hematol.* 1993;21(5):689–696.
28. Marino M, Ruvo M, De Falco S, Fassina G. Prevention of systemic lupus erythematosus in MRL/lpr mice by administration of an immunoglobulin-binding peptide. *Nat Biotechnol.* 2000;18(7):735–9.
29. Sonderrmann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γ RIII complex. *Nature.* 2000;406(6793):267–73.
30. Radaev S, Sun PD. Recognition of IgG by Fc γ receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J Biol Chem.* 2001;276(19):16478–16483.

31. Simmons D, Seed B. The Fc γ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature*. 1988;336:568–570.
32. Ravetch J V., Perussia B. Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. *J Exp Med*. 1989;170:481–497.
33. Zhou M, Todd RF, van de Winkel JG, Petty HR. Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc γ receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions. *J Immunol*. 1993;150(7):3030–3041.
34. Kew RR, Grimaldi CM, Furie MB, Fleit HB. Human neutrophil Fc γ RIIIB and formyl peptide receptors are functionally linked during formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced chemotaxis. *J Immunol*. 1992;149:989–997.
35. Huber R, Deisenhofer J, Colman PM, Matsushima M, Palm W. Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature*. 1976;264:415–420.
36. Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature*. 1994;372:379–383.
37. Corper AL, Sohi MK, Bonagura VR, et al. Structure of human IgM rheumatoid factor Fab bound to its autoantigen IgG Fc reveals a novel topology of antibody-antigen interaction. *Nat Struct Biol*. 1997;4:374–381.
38. DeLano WL, Ultsch MH, de Vos AM, Wells JA. Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science*. 2000;287:1279–1283.
39. Sonderrmann P, Huber R, Jacob U. Crystal structure of the soluble form of the human Fc γ -receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO J*. 1999;18(5):1095–1103.
40. Zhang Y, Boesen CC, Radaev S, et al. Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc γ RIII. *Immunity*. 2000;13(3):387–95.
41. Maxwell KF, Powell MS, Hulett MD, et al. Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc γ RIIa. *Nat Struct Biol*. 1999;6:437–442.
42. Garman SC, Kinet JP, Jardetzky TS. Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor. *Cell*. 1998;95:951–961.
43. Sonderrmann P, Oosthuizen V. The structure of Fc receptor/Ig complexes: considerations on stoichiometry and potential inhibitors. *Immunol Lett*. 2002;82(1-2):51–6.
44. Sonderrmann P, Kaiser J, Jacob U. Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol*. 2001;309(3):737–49.
45. Sonderrmann P, Oosthuizen V. Mediation and Modulation of Antibody Function. *Biochem Soc*. 2002;30:481–486.

46. Bonetto S, Spadola L, Buchanan AG, Jermutus L, Lund J. Identification of cyclic peptides able to mimic the functional epitope of IgG1-Fc for human Fc gammaRI. *FASEB J*. 2009;23(2):575–85.
47. Mathison RD, Befus AD, Davison JS, Woodman RC. Modulation of neutrophil function by the tripeptide feG. *BMC Immunol*. 2003;4.
48. Mathison RD, Christie E, Davison JS. The tripeptide feG inhibits leukocyte adhesion. *J Inflamm*. 2008;5.
49. Kasperkiewicz M, Nimmerjahn F, Wende S, et al. Genetic identification and functional validation of Fc gammaRIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J Pathol*. 2012;228(1):8–19.
50. Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol*. 1996;157:3317–3322.
51. Simister NE, Story CM, Chen HL, Hunt JS. An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol*. 1996;26:1527–1531.
52. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(August):715–725.
53. Brambell FW. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet*. 1966;2:1087–1093.
54. Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature*. 1989;337:184–187.
55. Zhu X, Meng G, Dickinson BL, et al. MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG Is Functionally Expressed in Monocytes, Intestinal Macrophages, and Dendritic Cells. *J Immunol*. 2001;166(5):3266–3276.
56. Ward ES, Zhou J, Ghetie V, Ober RJ. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int Immunol*. 2003;15(2):187–195.
57. Cauza K, Hinterhuber G, Dingelmaier-Hovorka R, et al. Expression of FcRn, the MHC class I-related receptor for IgG, in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2005;124(1):132–139.
58. Cianga P, Cianga C, Plamadeala P, Branisteanu D, Carasevici E. The neonatal Fc receptor (FcRn) expression in the human skin. *Virchows Arch*. 2007;451(4):859–860.
59. Kuo TT, de Muinck EJ, Claypool SM, et al. N-glycan moieties in neonatal Fc receptor determine steady-state membrane distribution and directional transport of IgG. *J Biol Chem*. 2009;284(13):8292–8300.
60. Tzaban S, Massol RH, Yen E, et al. The recycling and transcytotic pathways for IgG transport by FcRn are distinct and display an inherent polarity. *J Cell Biol*. 2009;185:673–684.

61. Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, et al. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity*. 2004;20(6):769–783.
62. Burmeister WP, Gastinel LN, Imister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature*. 1994;372:336–343.
63. West AP, Bjorkman PJ. Crystal Structure and Immunoglobulin G Binding Properties of the Human Major Histocompatibility Complex-related Fc Receptor. *Structure*. 2000;39:9698–9708.
64. Zhu X, Peng J, Raychowdhury R, Nakajima A, Lencer WI, Blumberg RS. The heavy chain of neonatal Fc receptor for IgG is sequestered in endoplasmic reticulum by forming oligomers in the absence of beta2-microglobulin association. *Biochem J*. 2002;367:703–714.
65. Kuo TT, Baker K, Yoshida M, et al. Neonatal Fc receptor: From immunity to therapeutics. *J Clin Immunol*. 2010;30(6):777–789. doi:10.1007/s10875-010-9468-4.
66. Claypool SM, Dickinson BL, Yoshida M, Lencer WI, Blumberg RS. Functional reconstitution of human FcRn in Madin-Darby canine kidney cells requires co-expressed human beta 2-microglobulin. *J Biol Chem*. 2002;277(31):28038–28050.
67. Simister NE, Rees AR. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur J Immunol*. 1985;15:733–738.
68. Rodewald R. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. *J Cell Biol*. 1976;71:666–670.
69. Derrick JP, Wigley DB. Crystal structure of a streptococcal protein G domain bound to an Fab fragment. *Nature*. 1992;359:752–754.
70. Vaughn DE, Bjorkman PJ. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure*. 1998;6:63–73.
71. Ghetie V, Ward ES. Multiple Roles For The Major Histocompatibility Complex Class I-Related Receptor FcRn. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:739–766.
72. Kim J, Bronson CL, Hayton WL, et al. Albumin turnover: FcRn-mediated recycling saves as much albumin from degradation as the liver produces. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G352–G360.
73. Anderson CL, Chaudhury C, Kim J, Bronson CL, Wani M a, Mohanty S. Perspective - FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol*. 2006;27(7):343–8.
74. Vaccaro C, Zhou J, Ober RJ, Ward ES. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nat Biotechnol*. 2005;23(10):1283–1288.
75. Kaveri S V, Dietrich G, Hurez V, Kazatchkine MD. Intravenous immunoglobulins (IVIg) in the treatment of autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol*. 1991;86:192–198.

76. Michels H, Burmester GR, Buttgereit F. i.v.-Immunglobuline bei chronischen idiopathischen Myositiden. *Z Rheumatol.* 2005;64(2):102–110.
77. Mezo AR, McDonnell K a, Tan Hehir CA, et al. Reduction of IgG in nonhuman primates by a peptide antagonist of the neonatal Fc receptor FcRn. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(7):2337–42.
78. Mezo AR, Sridhar V, Badger J, Sakorafas P, Nienaber V. X-ray crystal structures of monomeric and dimeric peptide inhibitors in complex with the human neonatal Fc receptor, FcRn. *J Biol Chem.* 2010;285(36):27694–701.
79. Sesarman A, Sitaru AG, Olaru F, Zillikens D, Sitaru C. Neonatal Fc receptor deficiency protects from tissue injury in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Mol Med.* 2008;86(8):951–959.
80. Oganessian V, Damschroder MM, Cook KE, et al. Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *J Biol Chem.* 2014;289:7812–7824.
81. Oganessian V, Damschroder MM, Woods RM, Cook KE, Wu H, Dall'Acqua WF. Structural characterization of a human Fc fragment engineered for extended serum half-life. *Mol Immunol.* 2009;46:1750–1755.
82. Dall'Acqua WF, Kiener P a., Wu H. Properties of Human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc Receptor (FcRn). *J Biol Chem.* 2006;281(33):23514–23524.
83. Robbie GJ, Criste R, Dall'Acqua WF, et al. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):6147–6153.
84. Martin WL, Bjorkman PJ. Characterization of the 2:1 complex between the class I MHC-related Fc receptor and its Fc ligand in solution. *Biochemistry.* 1999;38:12639–12647.
85. Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med.* 2003;197(3):315–322.
86. Bjorkman PJ, Saper MA, Samaraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 1987;329:506–512.
87. Okon M, Bray P, Vucelic D. 1H NMR Assignments and secondary structure of human beta2-microglobulin in solution. *Biochemistry.* 1992;31:8906–8915.
88. Verdone G, Corazza A, Viglino P, et al. The solution structure of human β 2-microglobulin reveals the prodromes of its amyloid transition. *Protein Sci.* 2002;11:487–499.
89. Berggård I, Bearn AG. Isolation and properties of a low molecular weight beta-2-globulin occurring in human biological fluids. *J Biol Chem.* 1968;243:4095–4103.

90. McParland VJ, Kad NM, Kalverda AP, et al. Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation in vitro. *Biochemistry*. 2000;39:8735–8746.
91. McParland VJ, Kalverda AP, Homans SW, Radford SE. Structural properties of an amyloid precursor of beta(2)-microglobulin. *Nat Struct Biol*. 2002;9(5):326–31.
92. Fésüs L, Falus A, Erdei A, Laki K. Human beta(2)-Microglobulin is a Substrate of Tissue Transglutaminase : Polymerization in Solution and on the Cell Surface. *J Cell Biol*. 1981;89(17):706–710.
93. Dudek SM, Johnson GVW. Transglutaminase facilitates the formation of polymers of the beta-amyloid peptide. *Brain Res*. 1994;651:129–133.
94. De Jager M, van der Wildt B, Schul E, et al. Tissue transglutaminase colocalizes with extracellular matrix proteins in cerebral amyloid angiopathy. *Neurobiol Aging*. 2013;34(4):1159–1169.
95. Folk JE. Transglutaminases. *Annu Rev Biochem*. 1980;49:517–531.
96. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev*. 2009;89(3):991–1023.
97. Karashima T, Furumura M, Ishii N, et al. Distinct protein expression and activity of transglutaminases found in different epidermal tumors. *Exp Dermatol*. 2014;23(6):433–435.
98. Cooper AJL, Jeitner TM, Gentile V, Blass JP. Cross linking of polyglutamine domains catalyzed by tissue transglutaminase is greatly favored with pathological-length repeats: Does transglutaminase activity play a role in (CAG)_n/Q_n-expansion diseases? *Neurochem Int*. 2002;40:53–67.
99. Kim SY, Jeitner TM, Steinert PM. Transglutaminases in disease. *Neurochem Int*. 2002;40:85–103.
100. Ruoppolo M, Orrù S, D'Amato A. Analysis of transglutaminase protein substrates by functional proteomics. *Protein Sci*. 2003;12:1290–1297.
101. Kasprzak A, Takashi R, Morales M. Orientation of actin monomer in the F-actin filament: radial coordinate of glutamine-41 and effect of myosin subfragment 1 binding on the monomer orientation. *Biochemistry*. 1988;27(12):4512–22.
102. Marley J, Lu M, Bracken C. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J Biomol NMR*. 2001;20(1):71–5.
103. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–685.
104. Esposito G, Michelutti R, Verdone G, et al. Removal of the N-terminal hexapeptide from human beta(2)-microglobulin facilitates protein aggregation and fibril formation. *Protein Sci*. 2000;9(5):831–45.

105. Andersen JT, Justesen S, Berntzen G, et al. A strategy for bacterial production of a soluble functional human neonatal Fc receptor. *J Immunol Methods*. 2008;331(1-2):39–49.
106. Meyer B, Peters T. NMR Spectroscopy of Proteins NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors *Angewandte*. 2003;(8):864–890.
107. Shimada I. NMR Techniques for Identifying the Interface of a Larger Protein – Protein Complex : Cross-Saturation and Transferred Cross-Saturation Experiments. *Methods Enzymol*. 2005;394:483–506.
108. Bodenhausen, G. and Ruben DJ. Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem Phys Lett*. 1980;69(1):185–189.
109. Ikura M, Kay LE, Bax A. A Novel Approach for Sequential Assignment of ¹H, ¹³C, and ¹⁵N Spectra of Larger Proteins: Heteronuclear Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Spectroscopy. Application to Calmodulin. *Biochemistry*. 1990;(1980):4659–4667.
110. Eichner T, Kalverda AP, Thompson GS, Homans SW, Radford SE. Conformational conversion during amyloid formation at atomic resolution. *Mol Cell*. 2011;41(2):161–72.
111. Mayer M, Meyer B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chemie Int Ed*. 1999;35:1784–1788.
112. Rademacher C, Landström J, Sindhuwinata N, Palcic MM, Widmalm G, Peters T. NMR-based exploration of the acceptor binding site of human blood group B galactosyltransferase with molecular fragments. *Glycoconj J*. 2010;27(3):349–58.
113. Rademacher C. Investigations into Viral Entry Mechanisms and Carbohydrate-Protein Interactions using NMR Experiments. 2008.
114. Katou H, Kanno T, Hoshino M, et al. The role of disulfide bond in the amyloidogenic state of beta(2) -microglobulin studied by heteronuclear NMR. *Protein Sci*. 2002;11:2218–2229.
115. Lawatscheck J. Herstellung und NMR-spektroskopische Untersuchungen von neonatalem Fc-Rezeptor. 2013.
116. Becker GW. Stable isotopic labeling of proteins for quantitative proteomic applications. *Briefings Funct Genomics Proteomics*. 2008;7(5):371–382.
117. Machida S, Yu Y, Singh SP, Kim JD, Hayashi K, Kawata Y. Overproduction of β -glucosidase in active form by an Escherichia coli system coexpressing the chaperonin GroEL/ES. *FEMS Microbiol Lett*. 1998;159(1):41–46.
118. Ashiuchi M, Yoshimura T, Kitamura T, et al. In vivo effect of GroESL on the folding of glutamate racemase of Escherichia coli. *J Biochem*. 1995;117(3):495–498.
119. Xu Z, Yang S, Zhu D. GroE assists refolding of recombinant human pro-urokinase. *J Biochem*. 1997;121(2):331–337.

120. Thomas JG, Baneyx F. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing Heat-shock proteins. *J Biol Chem.* 1996;271(19):11141–11147.
121. Thomson NM, Saika A, Ushimaru K, et al. Efficient production of active polyhydroxyalkanoate synthase in *Escherichia coli* by coexpression of molecular chaperones. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(6):1948–1955.
122. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:369–396.
123. Hansen T. Ligand-free MHC class I conformation. *Nat Struct Biol.* 1998;(5):340–341.
124. Reid SW, Smith KJ, Jakobsen BK, et al. Production and crystallization of MHC class I B allele single peptide complexes. *FEBS Lett.* 1996;383(1-2):119–123.
125. Altamirano MM, Woolfson A, Donda A, et al. Ligand-independent assembly of recombinant human CD1 by using oxidative refolding chromatography. *PNAS.* 2001;98(6):3288–3293.
126. Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *PNAS.* 1992;89(8):3429–3433.
127. Williams DB, Watts TH. Molecular chaperones in antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 1995;7(1):77–84.
128. Cohen FE, Sternberg MJE, Taylor WR. Analysis and prediction of protein beta-sheet structures by a combinatorial approach. *Nature.* 1980;285(5):378–382.
129. Fésüs L, Erdei A, Sándor M, Gergely J. The influence of tissue transglutaminase on the function of Fc receptors. *Mol Immunol.* 1982;19(1971):39–43.
130. Fésüs L, Sándor M, Horváth LI, Bagyinka C, Erdei A, Gergely J. Immune-complex-induced transglutaminase activation: its role in the Fc-receptor-mediated transmembrane effect on peritoneal macrophages. *Mol Immunol.* 1981;18(7):633–638.
131. Fésüs L, Hársfalvi J, Horváth A, Sándor M. Transglutaminase and receptor signaling: concepts and realities. *Mol Immunol.* 1984;21(12):1161–1165.
132. Pervushin K, Riek R, Wider G, Wüthrich K. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(23):12366–71.
133. Riek R, Wider G, Pervushin K, Wüthrich K. Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(9):4918–4923.

134. Riek R, Pervushin K, Würthrich K. TROSY and CRINEPT : NMR with large molecular and supramolecular structures in solution. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(10):462–468.
135. Sattler M, Fesik SW. Use of deuterium labeling in NMR: Overcoming a sizeable problem. *Structure.* 1996;4(11):1245–1249.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Immunglobulin G (IgG).	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der humanen IgG Fc-Rezeptor Familie.	6
Abbildung 3: Kristallstruktur des sFcγRIII/Fc-Komplexes.	9
Abbildung 4: Kristallstruktur der extrazellulären Domänen des humanen neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn).	13
Abbildung 5: FcRn vermittelter bidirektionaler Transport und Membranrecycling von IgG in Epithelzellen.....	14
Abbildung 6: Kristallstruktur des FcRn-Albumin-Fc-YTE-Komplexes.	15
Abbildung 7: Vernetzung von zwei Proteinen durch eine Transglutaminase (Tgase).	17
Abbildung 8: N-(Tetramethylrhodaminy)cadaverin/N-(TAMRA)cadaverine.	21
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Plasmide pET28a(+), pIVEX2.3d und pTWIN1 mit den hier verwendeten Restriktionsschnittstellen.	23
Abbildung 10: Darstellung des Magnetisierungstransfers innerhalb des Proteinrückgrates in einem ¹ H, ¹⁵ N HSQC-Experiment.....	43
Abbildung 11. Darstellung des Magnetisierungstransfers innerhalb des Proteinrückgrates in Tripelresonanzexperimenten..	45
Abbildung 12: Generelles Schema der Genkonstrukte. N-terminal zur proteinkodierenden Sequenz befinden sich Sequenzen, die den HAT-Tag und eine Schnittstelle der TEV-Protease kodieren.50	
Abbildung 13: Analyse der mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespaltenen Plasmide pIVEX-mFcRn (A), pIVEX-hFcRn (A), pIVEX-βMg (B), pET-βMg (C), pET-mFcRn (D) und pET-hFcRn (D) zur Überprüfung der Konstrukte durch gelelektrophoretische Trennung.	52
Abbildung 14: Nachweis der induzierten Proteinsynthese der Proteine βMg, hFcRn und mFcRn exprimiert vom Vektor pET28a(+) in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) bei einer Induktionstemperatur von 26 °C.	53
Abbildung 15: Nachweis der induzierten Proteinsynthese und Lokalisation des Proteins in Fraktionen des <i>E. coli</i> Origami 2 (DE3) pLysS, die die Plasmide pET-hFcRn, pET-mFcRn oder pET-βMg trugen, bei einer Induktionstemperatur von 37 °C.	54
Abbildung 16: Nachweis der induzierten Proteinsynthese und Lokalisation des Proteins in Fraktionen des <i>E. coli</i> Stamms soluBL21 pET-hFcRn bei einer Induktionstemperatur von 21 °C.....	55
Abbildung 17: Nachweis des überexprimierten Proteins FcγRIII in <i>E. coli</i> bei einer Induktionstemperatur von 37 C beziehungsweise 20 °C.....	58
Abbildung 18: Klonierungsstrategien der FcγRIII-Bindedomäne in die Vektoren pET28a(+), pIVEX2.3d und pTWIN1.....	59
Abbildung 19: Analyse des mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespaltenen Plasmids pET-FcγRIII-BD zur Überprüfung des Konstrukts durch gelelektrophoretische Trennung..	60
Abbildung 20: Nachweis der induzierten Proteinsynthese und Lokalisation des Proteins FcγRIII-BD in verschiedenen Fraktionen von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET-FcγRIII-BD..	61

Abbildung 21: Reinigung von β Mg mittels Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Säule und anschließender Bromcyanspaltung..	62
Abbildung 22: 500 MHz ^1H , ^{15}N HSQC-Spektrum von $u\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ β Mg in Tgasepuffer mit den zugeordneten Resonanzen der Amidprotonen.	63
Abbildung 23: Chromatogramm einer Gelfiltration der Tgasereaktion zur Modifizierung des β Mgs mit FITC-Ahx-TVQQL durch eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit anschließender Analyse via SDS-Gel.	65
Abbildung 24: Analyse mit NMR-Spektroskopie und SDS-PAGE des selektiv ^{15}N Lysin markierten β Mg vor und nach Modifizierung mit einem Glutamindonor.	66
Abbildung 25: ^1H , ^{15}N HSQC von $u\text{-}^{15}\text{N}$ markierten β Mg vor und nach Modifizierung mit Methylamin.	67
Abbildung 26: Chromatogramm einer Gelfiltration der Tgasereaktion zur Modifizierung des β Mgs mit TAMRA durch eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit anschließender Analyse via SDS-Gel.	68
Abbildung 27: Einfluss von Methylamin auf die Polymerbildung von β Mg durch eine Tgasereaktion..	71
Abbildung 28: Chromatogramm einer Reinigung von hFcRn mittels Ni-NTA-Sepharose mit anschließender Analyse via SDS-Gel.	73
Abbildung 29: Vergleich der Chromatogramme der Größenausschlußchromatographie über eine Superdex 200 10/300 GL Säule des FcRn-Renaturierungsansatzes (rot) und das als Referenz dienende Chromatogramm des β Mgs (blau).	74
Abbildung 30: Chromatogramm einer Reinigung von Fc γ RIII über eine Ni-NTA-Säule mit anschließender Analyse via SDS-Gel.	76
Abbildung 31: Chromatogramm der Gelfiltration von $u\text{-}^{15}\text{N}$ Fc γ RIII über eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit anschließender Analyse via SDS-Gel.	76
Abbildung 32: Übersicht einzelner Reinigungsprotokolle des Fc γ RIII.	77
Abbildung 33: 500 MHz ^1H , ^{15}N -HSQC-Proteinspektrum von $u\text{-}^{15}\text{N}$ -markierten Fc γ RIII.	78
Abbildung 34: Bildung des Fc γ RIII-IgG-Komplexes..	79
Abbildung 35: 500 MHz STD-Spektren des Fc γ RIII nach Zugabe von BIN 12.	81
Abbildung 36: Identifizierung von Liganden des Fc γ RIIIs durch STD-NMR-Spektroskopie.	82
Abbildung 37: Ausschnitt der Kristallstruktur des β Mgs zur Verdeutlichung der Lokalisation der Sequenzen $^6\text{KIQ}^8$ und $^{89}\text{QPK}^{91}$.	90
Abbildung 38: Kristallstruktur des β_2 -Microglobulins als kleine Untereinheit des humanen neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn).	93
Abbildung 39: Kristallstruktur des β_2 -Microglobulins als kleine Untereinheit im FcRn-Albumin-Fc-YTE-Komplexe.	94
Abbildung 40: Kristallstruktur des β_2 -Microglobulins als kleine Untereinheit des humanen Klasse I Histokompatibilität Antigen HLA-A2 und des T-Zellenoberflächen-Glykoprotein CD1a.	95
Abbildung 41: Massenspektrum des β Mg nach tryptischer Spaltung.	XXXV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der häufigsten Fc-Rezeptor Typen mit Angabe der zubindenden Antikörper	4
Tabelle 2: Verwendete Geräte	19
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	19
Tabelle 4: Überblick der hier verwendeten Oligonukleotide	22
Tabelle 5: Übersicht, der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit Angaben über Eigenschaften und Insertgrößen.	24
Tabelle 6: Beschreibung der verwendeten Bakterienstämme.	25
Tabelle 7: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffer für Oligonukleotide	27
Tabelle 8:Zusammensetzung der Puffer für Agarosegele	28
Tabelle 9: Verwendete M9-Minimalmedien.....	32
Tabelle 10: SDS-Polyacrylamid-Gele.....	33
Tabelle 11: 2x Probenpuffer für SDS-Gele.....	34
Tabelle 12: Zusammensetzung der Puffer zur Verwendung bei der Ni-Sepharose-Affinitätschromatographie.....	36
Tabelle 13: Zusammensetzung der Puffer zur Reinigung von FcRn	40
Tabelle 14:Zusammensetzung der Puffer zur Reinigung von FcγRIII.....	41
Tabelle 15: Zusammensetzung des Tgasepuffers	42
Tabelle 16: Aufgenommene Zuordnungsexperimente.....	46
Tabelle 17: Probenzusammenstellung für massenspektrometrische Experimente.....	48
Tabelle 18: Erwartete Fragmentgrößen einer Restriktionsanalyse mit verschiedenen Endonukleasen.51	
Tabelle 19: Übersicht der Ergebnisse der Massenspektrometrie von βMg.....	70
Tabelle 20: Übersicht der angestrebten Vektorkonstrukte	84
Tabelle 21: Übersicht der durchgeführten Testexpressionen. Kulturen in denen eine Proteinsynthese induziert werden konnten sind mit (+) markiert.....	85

Anhang

A1: DNA-Sequenzen der Inserts

DNA-Sequenzen der Insert zur Klonierung in die Vektoren pET28a(+), pIVEX2.3d und pTWIN1. Neben den Basen ist die Aminosäuresequenz der Proteine in grau dargestellt. Wichtige Elemente des Proteins sind rot, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in blau gekennzeichnet. Die DNA-Sequenzen für Schnittstellen die zur Klonierung verwendet wurden sind zum besseren Verständnis teilweise in grau dargestellt. Diese grau dargestellten DNA-Sequenzen sind nicht Teil der Inserts, da sie bei der Klonierung durch Inkubation mit Restriktionsendonukleasen abgespalten werden.

Sequenz des für das β Mg kodierenden Inserts

HAT-Tag

M K D H L I H N V H K E E

001 CCATGGTTCA TATGAAAGAT CATCTGATTC ATAACGTGCA TAAAGAAGAA
NcoI NdeI

HAT-Tag TEV

H A H A H N K G R A E A A Y A Q G

051 CATGCGCATG CGCATAACAA AGGGCGCGCC GAAGCGGCGT ATGCGCAGGG
AscI

β Mg

S H M I Q R T P K I Q V Y S R H P

101 CAGCCATATG ATTCAGCGTA CCCC~~GAAA~~AAT TCAGGTGTAT AGCCGTCATC
NdeI

β Mg

A E N G K S N F L N C Y V S G F

151 CGGCGGAAAA CGGCAAAGC AACTTTCTGA ACTGCTATGT GAGCGGCTTT

β Mg

H P S D I E V D L L K N G E R I E

201 CATCCGAGCG ATATCGAAGT GGATCTGCTG AAAAACGGCG AACGTATTGA

β Mg

K V E H S D L S F S K D W A F Y L
251 AAAAGTGGAA CATAGCGATC TGAGCTTTAG CAAAGATTGG AGCTTTTATC

βMg

 L Y Y T E F T P T E K D E Y A C
301 TGCTGTATTA TACCGAATTT ACCCCGACCG AAAAAGATGA ATATGCGTGC

βMg

 R V N H V T L S Q P K I V K W D R
351 CGTGTGAACC ATGTGACCCT GAGCCAGCCG AAAATTGTGA AATGGGATCG

βMg

 D M A A A *
401 TGATATGGCG GCCGCTTAGG CGGCCGCCCT CGAG
 NotI NotI XhoI

Sequenz des für den hFcRn kodierenden Inserts

HAT-Tag

 M K D H L I H N V H K E E
001 CCATGGTTCA TATGAAAGAT CATCTGATTC ATAACGTGCA TAAAGAAGAA
 NcoI NdeI

HAT-Tag

TEV

 H A H A H N K G R A E A A Y A Q G
051 CATGCGCATG CGCATAACAA AGGGCGCGCC GAAGCGGCGT ATGCGCAGGG
 AscI

hFcRn

 S H M A E S H L S L L Y H L T A V
101 CAGCCATATG GCGGAAAGCC ATCTGAGCCT GCTGTATCAT CTGACCGCGG
 NdeI

hFcRn

 S S P A P G T P A F W V S G W L
151 TGAGCAGCCC GGC GCCGGGC ACCCCGGCGT TTTGGGTGAG CGGCTGGCTG

hFcRn

 G P Q Q Y L S Y N S L R G E A E P
201 GGCCCGCAGC AGTATCTGAG CTATAACAGC CTGCGTGGCG AAGCGGAACC

hFcRn

C G A W V W E N Q V S W Y W E K E
251 GTGCGGCGCG TGGGTGTGGG AAAACCAGGT GAGCTGGTAT TGGGAAAAAG

hFcRn

T T D L R I K E K L F L E A F K
301 AAACCACCGA TCTGCGTATT AAAGAAAAAC TGTTTCTGGA AGCGTTTAAA

hFcRn

A L G G K G P Y T L Q G L L G C E
351 GCGCTGGGCG GCAAAGGCC GTATACCCTG CAGGGCCTGC TGGGCTGCGA

hFcRn

L G P D N T S V P T A K F A L N G
401 ACTGGGCCCG GATAACACCA GCGTGCCGAC CGCGAAATTT GCGCTGAACG

hFcRn

E E F M N F D L K Q G T W G G D
451 GCGAAGAATT TATGAAC TTT GATCTGAAAC AGGGCACCTG GGGCGGCGAT

hFcRn

W P E A L A I S Q R W Q Q Q D K A
501 TGGCCGGAAG CGCTGGCGAT TAGCCAGCGT TGGCAGCAGC AGGATAAAGC

hFcRn

A N K E L T F L L F S C P H R L R
551 GGCGAACAAA GAACTGACCT TTCTGCTGTT TAGCTGCCCC CATCGTCTGC

hFcRn

E H L E R G R G N L E W K E P P
601 GTGAACATCT GGAACGTGGC CGTGGCAACC TGGAATGGAA AGAACC GCCG

hFcRn

S M R L K A R P S S P G F S V L T
651 AGCATGCGTC TGAAAGCGCG TCCGAGCAGC CCGGGCTTTA GCGTGCTGAC

hFcRn

C S A F S F Y P P E L Q L R F L R
701 CTGCAGCGCG TTTAGCTTTT ATCCGCCGGA ACTGCAGCTG CGTTTTCTGC

hFcRn

N G L A A G T G Q G D F G P N S
751 GTAACGGCCT GCGGGCGGGC ACCGGCCAGG GCGATTTTGG CCCGAACAGC

hFcRn

D G S F H A S S S L T V K S G D E
801 GATGGCAGCT TTCATGCGAG CAGCAGCCTG ACCGTGAAAA GCGGCGATGA

hFcRn

H H Y C C I V Q H A G L A Q P L R
851 ACATCATTAT TGCTGCATTG TGCAGCATGC GGGCCTGGCG CAGCCGCTGC

hFcRn

V E L A A A *
901 GTGTGGAAC T GCGGCCGCT TAGGCGGCCG CCCTCGAG
NotI NotI XhoI

Sequenz des für den mFcRn kodierenden Inserts

HAT-Tag

M K D H L I H N V H K E E
001 CCATGGTTCA TATGAAAGAT CATCTGATTC ATAACGTGCA TAAAGAAGAA
NcoI NdeI

HAT-Tag

TEV

H A H A H N K G R A E A A Y A Q G
051 CATGCGCATG CGCATAACAA AGGGCGCGCC GAAGCGGCGT ATGCGCAGGG
AscI

mFcRn

S H M T R P P L M Y H L T A V S N
101 CAGCCATATG ACCCGTCCGC CGCTGATGTA TCATCTGACC GCGGTGAGCA
NdeI

mFcRn

P S T G L P S F W A T G W L G P
151 ACCCGAGCAC CGGCCTGCCG AGCTTTTGGG CGACCGGCTG GCTGGGCCCCG

mFcRn

Q Q Y L T Y N S L R Q E A D P C G
201 CAGCAGTATC TGACCTATAA CAGCCTGCGT CAGGAAGCGG ATCCGTGCGG

mFcRn

A W M W E N Q V S W Y W E K E T T
251 CGCGTGGATG TGGGAAAACC AGGTGAGCTG GTATTGGGAA AAAGAAACCA

mFcRn

D L K S K E Q L F L E A L K T L
301 CCGATCTGAA AAGCAAAGAA CAGCTGTTTC TGGAAGCGCT GAAAACCCTG

mFcRn

E K I L N G T Y T L Q G L L G C E
351 GAAAAAATTC TGAACGGCAC CTATACCCTG CAGGGCCTGC TGGGCTGCGA

mFcRn

L A S D N S S V P T A V F A L N G
401 ACTGGCGAGC GATAACAGCA GCGTGCCGAC CGCGGTGTTT GCGCTGAACG

mFcRn

E E F M K F N P R I G N W T G E
451 GCGAAGAATT TATGAAATTT AACCCGCGTA TTGGCAACTG GACCGGCGAA

mFcRn

W P E T E I V A N L W M K Q P D A
501 TGGCCGAAA CCGAAATTGT GGCGAACCTG TGGATGAAAC AGCCGGATGC

mFcRn

A R K E S E F L L N S C P E R L L
551 GGCGCGTAAA GAAAGCGAAT TTCTGCTGAA CAGCTGCCCG GAACGTCTGC

mFcRn

G H L E R G R R N L E W K E P P
601 TGGCCATCT GGAACGTGGC CGTCGTAACC TGGAATGGAA AGAACCGCCG

mFcRn

S M R L K A R P G N S G S S V L T
651 AGCATGCGTC TGAAAGCGCG TCCGGGCAAC AGCGGCAGCA GCGTGCTGAC

mFcRn

C A A F S F Y P P E L K F R F L R
701 CTGCGCGGCG TTTAGCTTTT ATCCGCCGGA ACTGAAATTT CGTTTTCTGC

mFcRn

N G L A S G S G N C S T G P N G
751 GTAACGGCCT GGCGAGCGGC AGCGGCAACT GCAGCACCGG CCCGAACGGC

mFcRn

D G S F H A W S L L E V K R G D E
801 GATGGCAGCT TTCATGCGTG GAGCCTGCTG GAAGTGAAAC GTGGCGATGA

mFcRn

H H Y Q C Q V E H E G L A Q P L T
851 ACATCATTAT CAGTGCCAGG TGGAAATGA AGGCCTGGCG CAGCCGCTGA

mFcRn

V D L A A A *
901 CCGTGGATCT GGCGGCCGCT TAGGCGGCCG CCCTCGAG
NotI NotI XhoI

Sequenz des für den FcγRIII kodierenden Inserts

FcγRIII

M A R T E D L P K A V V F L E P
001 CCATGGCCCC CACCGAAGAT CTGCCGAAAG CCGTGGTGTT TCTGGAACCG
NcoI

FcγRIII

Q W Y S V L E K D S V T L K C Q G
051 CAGTGGTATA GCGTGCTGGA AAAAGATAGC GTGACCCTGA AATGCCAGGG

FcγRIII

A Y S P E D N S T Q W F H N E S L
101 CGCGTATAGC CCGGAAGATA ACAGCACCCA GTGGTTTTCAT AACGAAAGCC

FcγRIII

I S S Q A S S Y F I D A A T V N
151 TGATTAGCAG CCAGGCGAGC AGCTATTTTA TTGATGCGGC GACCGTGAAC

FcγRIII

D S G E Y R C Q T N L S T L S D P
201 GATAGCGGCG AATATCGCTG CCAGACCAAC CTGAGCACCC TGAGCGATCC

FcγRIII

V Q L E V H I G W L L L Q A P R W
251 GGTGCAGCTG GAAGTGCATA TTGGCTGGCT GCTGCTGCAG GCGCCGCGCT

FcγRIII

V F K E E D P I H L R C H S W K
301 GGGTGTTTAA AGAAGAAGAT CCGATTCATC TGCGCTGCCA TAGCTGGAAA

FcγRIII

N T A L H K V T Y L Q N G K D R K
351 AACACCGCGC TGCATAAAGT GACCTATCTG CAGAACGGCA AAGATCGCAA

FcγRIII

Y F H H N S D F H I P K A T L K D
401 ATATTTTCAT CATAACAGCG ATTTTCATAT TCCGAAAGCG ACCCTGAAAG

FcγRIII

S G S Y F C R G L V G S K N V S
451 ATAGCGGCAG CTATTTTTGC CGCGCCTGG TGGGCAGCAA AAACGTGAGC

FcγRIII

S E T V N I T I T Q G A A A * E F
501 AGCGAAACCG TGAACATTAC CATTACCCAG GGCGCGGCCG CGTGAGAATT
NotI EcoRI

551 C

Sequenz der hybridisierten Oligonukleotide zur Klonierung des His-Tags in den pIVEX2.3d-FcγRIII

In der hybridisierten Sequenz sind die Überhänge der Restriktionsschnittstellen durch Unterstreichen hervorgehoben. Die grauen Sequenzen gehören nicht zu den Oligonukleotiden und dienen lediglich zur Verdeutlichung der Schnittstellen.

His-Tag

A A A L E H H H H H H * H M G S
001 GCGGCCGCAC TCGAGCACCA CCACCACCAC CACTGACATA TGGGATCC
CGCCGGCGTG AGCTCGTGGT GGTGGTGGTG GTGACTGTAT ACCCTAGG
NotI NdeI / BamHI

Sequenz des für die FcγRIII-BD kodierende Insert

S S N C P R W V F K E E D P H M
001 GCTCTTCAA CTGTCCGCGA TGGGTATTCA AAGAGGAGGA CCCCATATG
SapI PpuMI NdeI

FcγRIII-BD

A M V H I G W L L L Q A P R W V F
051 GCCATGGTAC ATATTGGCTG GCTGCTGCTG CAGGCGCCGC GCTGGGTGTT
NcoI

FcγRIII-BD

K E E D P I H L R C H S W K N T A
101 TAAAGAAGAG GACCCGATTC ATCTGCGCTG CCATAGCTGG AAAAACACCG

FcγRIII-BD

L H K V T Y L Q N G K D R K Y F
151 CGCTGCATAA AGTGACCTAT CTACAGAACG GCAAAGATCG CAAATATTTT

FcγRIII-BD

H H N S D F H I P K A T L K D S G
201 CATCATAACA GCGATTTTCA TATTCGAAA GCGACCCTGA AAGATAGCGG

FcγRIII-BD

S Y F C R G L V G S K N V S S E T
251 CAGCTATTTT TGCCGCGGCC TGGTGGGCAG CAAAAACGTG AGCAGCGAAA

FcγRIII-BD

V N I T I T Q G A A A P G * E F
301 CCGTGAACAT TACCATTACC CAGGGCGCGG CCGCGCCCGG GTGAGAATTC
PasI NotI SmaI

S Q G C I T G D A L V A L
351 TCCCAGGGCT GCATCACGGG AGATGCACTA GTTGCGTTGC
PasI SpeI

A2: Chemische Verschiebungen im ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrums des βMgs

Zuordnung	^{15}N	^1H	S57	N-HN	121.199	8.405	
			D59	N-HN	116.520	7.730	
Q2	N-HN	123.210	8.522	W60	N-HN	116.242	7.498
R3	N-HN	123.232	9.506	S61	N-HN	113.448	7.395
T4	N-HN	119.908	8.411	F62	N-HN	120.806	7.942
K6	N-HN	124.729	9.308	Y63	N-HN	111.859	8.235
I7	N-HN	124.641	8.473	L64	N-HN	120.132	9.203
Q8	N-HN	127.210	9.040	L65	N-HN	122.088	8.200
V9	N-HN	125.325	9.187	Y66	N-HN	127.284	9.135
Y10	N-HN	122.989	8.529	Y67	N-HN	116.743	8.991
S11	N-HN	116.816	9.444	T68	N-HN	111.916	8.328
R12	N-HN	123.134	8.951	E69	N-HN	130.377	8.590
H13	N-HN	114.750	8.382	F70	N-HN	125.868	8.765
A15	N-HN	127.138	9.130	T71	N-HN	117.511	8.359
E16	N-HN	125.116	9.020	(A)T73	N-HN	110.460	8.116
N17	N-HN	123.395	8.863	(B)T73	N-HN	110.611	8.109
G18	N-HN	109.390	8.905	E74	N-HN	118.755	9.065
K19	N-HN	120.939	7.892	(A)K75	N-HN	113.548	7.872
S20	N-HN	120.269	8.445	(B)K75	N-HN	113.825	7.878
N21	N-HN	127.323	8.992	(A)D76	N-HN	118.208	7.208
F22	N-HN	120.150	10.464	(B)D76	N-HN	118.107	7.186
L23	N-HN	127.043	9.049	(C)D76	N-HN	118.336	7.191
N24	N-HN	121.706	8.206	E77	N-HN	123.074	8.656
C25	N-HN	120.944	9.664	Y78	N-HN	124.008	9.590
Y26	N-HN	129.825	9.742	A79	N-HN	121.161	8.829
V27	N-HN	129.079	8.902	C80	N-HN	120.171	9.139
S28	N-HN	117.737	9.027	R81	N-HN	128.704	9.461
G29	N-HN	108.284	8.203	V82	N-HN	128.158	9.109
F30	N-HN	111.264	7.238	N83	N-HN	123.703	9.075
H31	N-HN	119.799	8.707	(A)H84	N-HN	123.044	7.758
S33	N-HN	112.214	8.359	(B)H84	N-HN	122.858	7.759
D34	N-HN	120.219	7.277	V85	N-HN	124.873	8.089
I35	N-HN	123.810	8.005	T86	N-HN	111.206	7.595
E36	N-HN	125.527	8.049	L87	N-HN	123.462	8.120
V37	N-HN	125.212	8.046	(A)Q89	N-HN	117.141	7.559
D38	N-HN	122.468	8.874	(B)Q89	N-HN	117.393	7.559
L39	N-HN	121.292	9.179	K91	N-HN	125.491	8.806
L40	N-HN	120.342	9.016	I92	N-HN	125.725	8.622
K41	N-HN	120.951	8.845	(A)V93	N-HN	129.905	9.124
N42	N-HN	128.458	9.814	(B)V93	N-HN	130.248	9.122
G43	N-HN	102.543	8.943	K94	N-HN	128.059	8.908
E44	N-HN	120.817	7.845	W95	N-HN	122.454	8.792
(A)R45	N-HN	124.706	8.795	D96	N-HN	131.710	8.617
(B)R45	N-HN	124.777	8.768	R97	N-HN	121.594	7.632
I46	N-HN	129.000	8.875	D98	N-HN	120.166	8.218
E47	N-HN	126.603	8.566	M99	N-HN	125.807	7.619
K48	N-HN	119.787	8.115				
V49	N-HN	122.533	7.898				
E50	N-HN	125.345	8.489				
H51	N-HN	112.088	8.129				
(A)S52	N-HN	117.107	9.193				
(B)S52	N-HN	117.193	9.177				
D53	N-HN	121.090	8.620				
L54	N-HN	126.043	8.850				
S55	N-HN	122.444	8.113				
F56	N-HN	119.011	8.185				
Zuordnung	^{15}N	^1H					

A3: Massenspektrum des β Mg

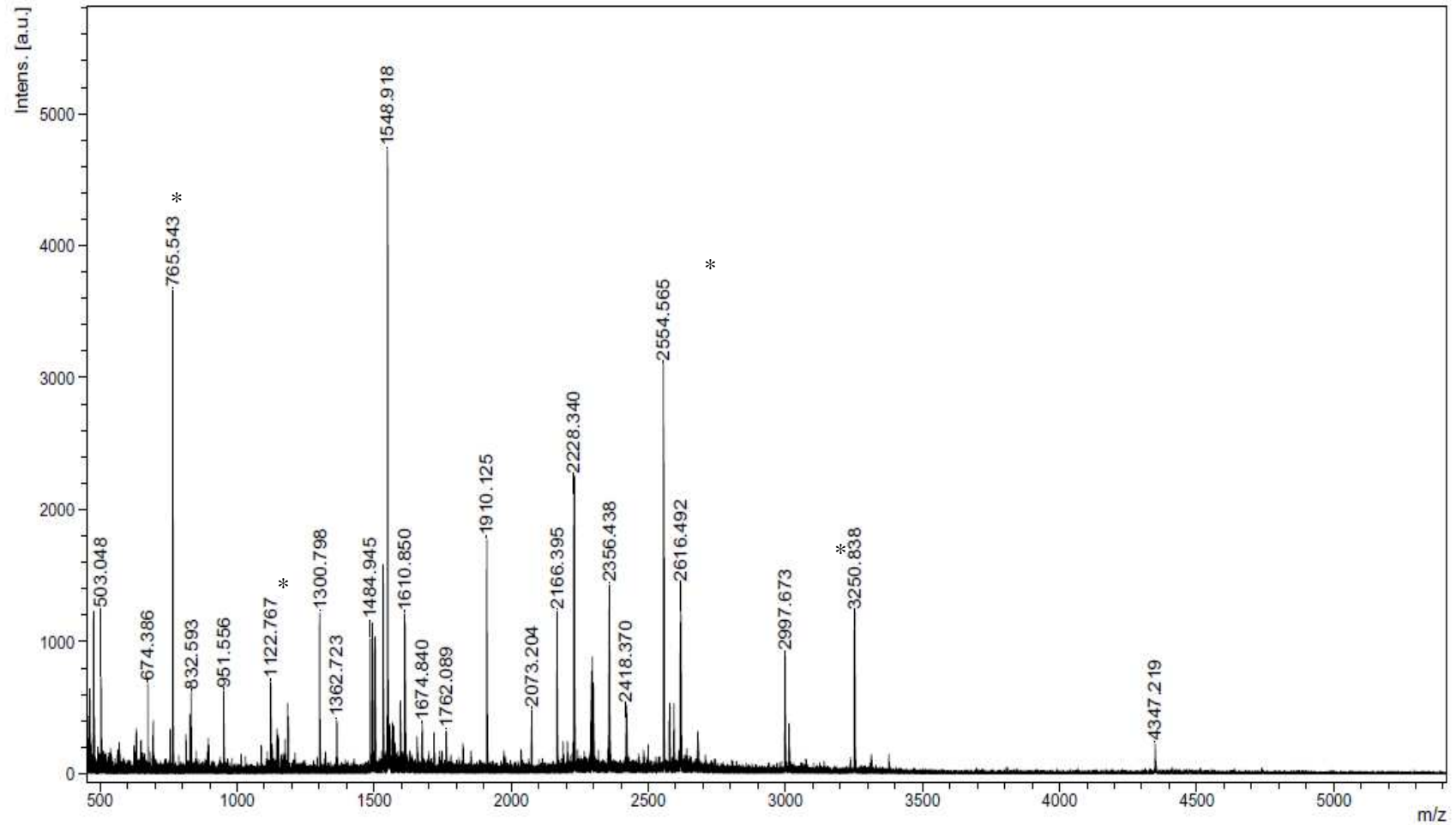


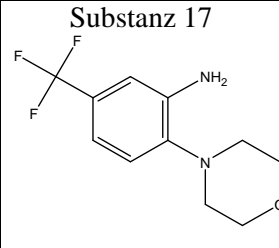
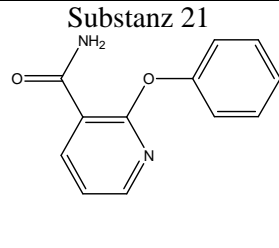
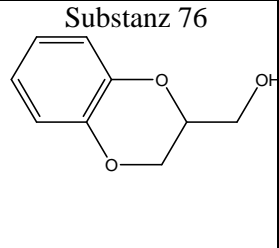
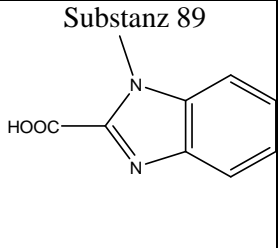
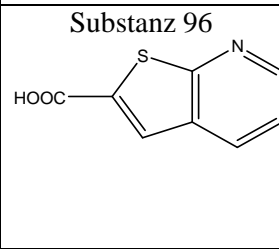
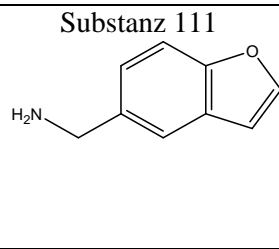
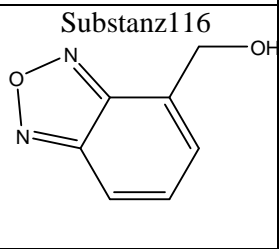
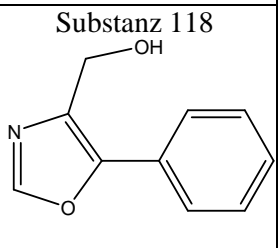
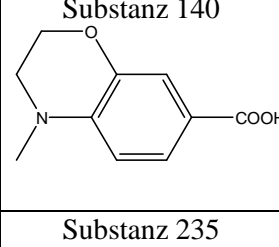
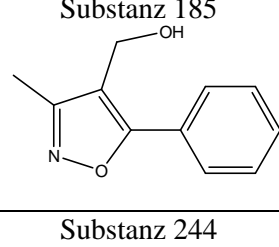
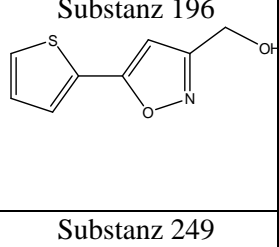
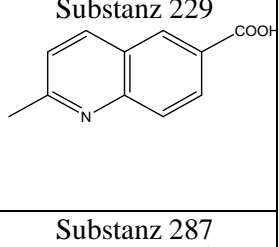
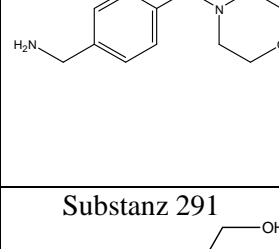
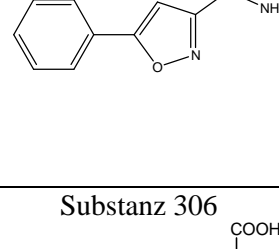
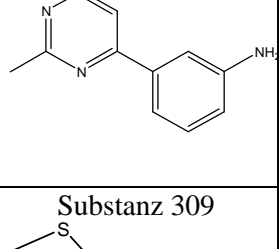
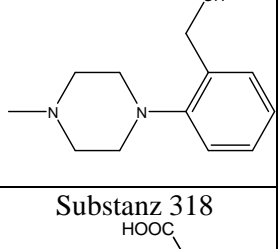
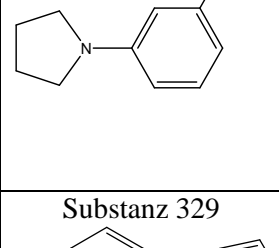
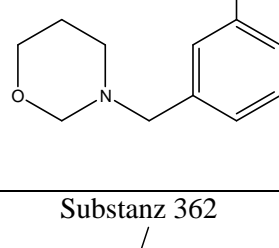
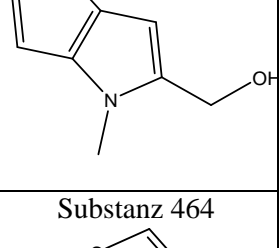
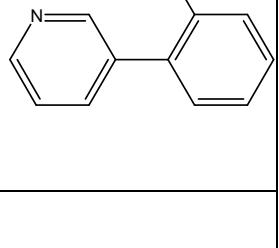
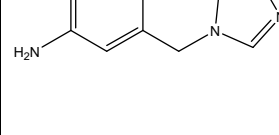
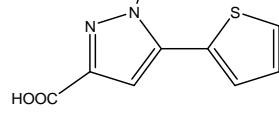
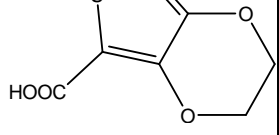
Abbildung 41: Massenspektrum des β Mg nach tryptischer Spaltung.

A4: Zusammenstellung der BINs 12 und 25 der Maybridge library¹¹² (abgewandelt durch Rademacher und Landström)

BIN	Substanzen*	Σ Substanzen
12	464 362 329 318 291 287 249 196 118 96 89	11
25	309 306 244 235 229 185 140 116 111 76 21 17	12

* Gelbe Substanzen haben eine 1 mM Stockkonz./ Weiße Substanzen haben eine 2 mM Stockkonz.

A5: Substanzen der Maybridge Ro5 Fragment Library

<p>Substanz 17</p> 	<p>Substanz 21</p> 	<p>Substanz 76</p> 	<p>Substanz 89</p> 
<p>Substanz 96</p> 	<p>Substanz 111</p> 	<p>Substanz 116</p> 	<p>Substanz 118</p> 
<p>Substanz 140</p> 	<p>Substanz 185</p> 	<p>Substanz 196</p> 	<p>Substanz 229</p> 
<p>Substanz 235</p> 	<p>Substanz 244</p> 	<p>Substanz 249</p> 	<p>Substanz 287</p> 
<p>Substanz 291</p> 	<p>Substanz 306</p> 	<p>Substanz 309</p> 	<p>Substanz 318</p> 
<p>Substanz 329</p> 	<p>Substanz 362</p> 	<p>Substanz 464</p> 	

A6: Pulsprogramme

¹H; ¹⁵N HSQC-NMR-Spektrum (hsqctf3gpsi)

```

;hsqctf3gpsi          3 (p1 ph1)
;avance-version (11/02/24)  d26 pl3:f3
;HSQC                (center (p2 ph1) (p22 ph6):f3 )
;2D H-1/X correlation via double inept  d26 UNBLKGRAD
transfer             p28 ph1
;using sensitivity improvement          4u
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI (p1 ph2)
gradient selection  3u
;with decoupling during acquisition    p16:gp1
;using trim pulses in inept transfer    d16
;using f3 - channel                    (p21 ph3):f3
;                                       d0
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright &
M. Rance, J. Magn.; Reson. 93, 151-170
(1991)                #ifdef LABEL_CN
                       (center (p2 ph7) (p14:sp3 ph1):f2 )
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. #else
Chem. Soc. 114, 10663-5 (1992)          (p2 ph7)
;J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, #endif /*LABEL_CN*/
P. Schmidt, O. Schedletzky,
;S.J. Glaser, O.W. Sorensen & C. Griesinger,
J. Biomol. NMR 4, 301-306 (1994)
;                                       d0
;                                       p16:gp2*EA
;                                       d16
;$CLASS=HighRes        (p22 ph4):f3
;$DIM=2D               DELTA
;$TYPE=                (center (p1 ph1) (p21 ph4):f3 )
;$SUBTYPE=             d24
;$COMMENT=             (center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
                       d24
#include <Avance.incl> (center (p1 ph2) (p21 ph5):f3 )
#include <Grad.incl>   d26
#include <Delay.incl>  (center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
                       d26
"p2=p1*2"              (p1 ph1)
"p22=p21*2"            DELTA1
"d11=30m"              (p2 ph1)
"d26=1s/(cnst4*4)"    4u
                       p16:gp3
" d0=3u"                d16 pl16:f3
                       4u BLKGRAD
" in0=inf1/2"          go=2 ph31 cpd3:f3
                       d1 do:f3 mc #0 to 2
"DELTA1=p16+d16-p1*0.78+de+8u" F1EA(calgrad(EA) & calph(ph5, +180),
caldel(d0, +in0) & calph(ph3, +180) &
calph(ph6, +180) & calph(ph31, +180))
#ifdef LABEL_CN
"DELTA=p16+d16+larger(p2,p14)+d0*2" exit
#else
"DELTA=p16+d16+p2+d0*2"
#endif /*LABEL_CN*/
"acqt0=0"              ph1=0
baseopt_echo           ph2=1
                       ph3=0 2
1 ze                   ph4=0 0 2 2
d11 pl16:f3            ph5=1 1 3 3
2 d1 do:f3             ph6=0
                       ph7=0 0 2 2
                       ph31=0 2 2 0

```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse
(default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse
(default)
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree
(adiabatic)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse for
inversion (adiabatic)
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power
pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d24: 1/(4J)YH for YH
; 1/(8J)YH for all multiplicities
;d26: 1/(4J(YH))
;cnst4: = J(YH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd3: decoupling according to sequence
defined by cpdprg3
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for
decoupling sequence

;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2 : gp 3
;                          50 : 80 : 20.1 for
C-13
;                          50 : 80 : 8.1 for
N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 50%
;gpz2: 80%
;gpz3: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100

;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled
samples start experiment with
; option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end
```

```
;$Id: hsqcctf3gpsi,v 1.5.4.1 2011/02/24
17:26:39 ber Exp
```

hncogp3d

```
;avance-version (10/02/12)
;HNCO
;3D sequence with
; inverse correlation for triple resonance
using multiple
; inept transfer steps
;
; F1(H) -> F3(N) -> F2(C=O,t1) ->
F3(N,t2) -> F1(H,t3)
;
;on/off resonance Ca and C=O pulses using
shaped pulse
;phase sensitive (t1)
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient
selection (t2)
;using constant time in t2
;(use parameterset HNCOGP3D)
;
;S. Grzesiek & A. Bax, J. Magn. Reson. 96,
432 - 440 (1992)
;J. Schleucher, M. Sattler & C. Griesinger,
Angew. Chem. Int. Ed. 32,
; 1489-1491 (1993)
;L.E. Kay, G.Y. Xu & T. Yamazaki, J. Magn.
Reson. A109, 129-133 (1994)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d13=4u"

"d21=5.5m"
"d23=12m"
"d26=2.3m"

"d0=3u"
"d10=d23/2-p14/2"
"d29=d23/2-p14/2-p26-d21-4u"
```

```

"d30=d23/2-p14/2"                (p13:sp8 ph1):f2

"in0=inf1/2"                      4u
"in10=inf2/4"                    p16:gp3
                                   d16
"in29=in10"                      (p26 ph2):f1
"in30=in10"                      20u cpds1:f1 ph1

"DELTA=d0*2+larger(p14,p22)-p14" (p21 ph1):f3
"DELTA1=p16+d16+d13+4u"          d30
"DELTA2=d23-d21-p26"            (p14:sp5 ph1):f2
"DELTA3=d21-p16-d16-4u"        d30
                                   (center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph8):f3 )
                                   d10
"spoff2=0"                      (p14:sp5 ph1):f2
"spoff3=0"                      d29
"spoff5=bf2*(cnst22/1000000)-o2" 4u do:f1
"spoff8=0"                      (p26 ph7):f1
                                   4u
aqseq 321                        p16:gp4*EA
                                   d16
1 d11 ze                          DELTA3 p11:f1
  d11 pl16:f3
2 d11 do:f3                      (center (p1 ph1) (p21 ph5):f3 )
3 d1 p11:f1                      d26
p1 ph1                          (center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
d26 pl3:f3                      d26
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 ) (center (p1 ph2) (p21 ph6):f3 )
d26 UNBLKGRAD                  d26
(p1 ph2):f1                    (center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
                                   d26
4u pl0:f1                      (p1 ph1)
(p11:sp1 ph1:r):f1             DELTA1
4u                              (p2 ph1)
p16:gp1                        d13
d16                            p16:gp5
                                   d16 pl16:f3
                                   4u BLKGRAD
(p21 ph3):f3                  go=2 ph31 cpd3:f3
d21 pl19:f1                   d11 do:f3 mc #0 to 2
(p26 ph2):f1                  F1PH(calph(ph4, +90), caldel(d0, +in0))
DELTA2 cpds1:f1 ph1          F2EA(calgrad(EA) & calph(ph6, +180),
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 ) caldel(d10, +in10) & caldel(d29, +in29) &
d23                            caldel(d30, -in30))
(p21 ph1):f3                  exit

d13 do:f1
(p26 ph7):f1                  ph1=0
4u                              ph2=1
p16:gp2                        ph3=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
d16                            ph4=0 2
                                   ph5=0 0 2 2
                                   ph6=3 3 1 1
                                   ph7=3
                                   ph8=0 0 0 0 2 2 2 2
                                   ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2

(p13:sp2 ph4):f2              ;pl0 : 0W
d0                              ;pl1 : f1 channel - power level for pulse
(center (p14:sp5 ph1):f2 (p22 ph1):f3 ) (default)
d0
4u
(p14:sp3 ph1):f2
DELTA
(p14:sp5 ph1):f2
4u

```

```

;p13 : f3 channel - power level for pulse
(default)
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;p119: f1 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp1: f1 channel - shaped pulse 90 degree
(H2O on resonance)
;sp2: f2 channel - shaped pulse 90 degree
(C=O on resonance)
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree
(C=O on resonance)
;sp5: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca
off resonance)
;sp8: f2 channel - shaped pulse 90 degree
(C=O on resonance)
;for time reversed pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse [2
msec]
;p13: f2 channel - 90 degree shaped pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power
pulse
;p26: f1 channel - 90 degree pulse at p119
;d0 : incremented delay (F1 in 3D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d10: incremented delay (F2 in 3D) = d23/2-
p14/2
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: 1/(2J(NH)) [5.5 msec]
;d23: 1/(4J(NCO)) [12 msec]
;d26: 1/(4J'(NH)) [2.3 msec]
;d29: incremented delay (F2 in 3D) = d23/2-
p14/2-p26-d21-4u
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d23/2-
p14/2
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;cnst22: Calpha chemical shift (offset, in ppm)
;o2p: CO chemical shift (cnst21)
;inf1: 1/SW(CO) = 2 * DW(CO)
;inf2: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(2 * SW(CO)) = DW(CO)
;nd0: 2
;in10: 1/(4 * SW(N)) = (1/2) DW(N)
;nd10: 4
;in29: = in10
;in30: = in10
;NS: 8 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2 td2 max = 2
* d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F2

;cpds1: decoupling according to sequence
defined by cpdprg1
;cpd3: decoupling according to sequence
defined by cpdprg3
;pcpd1: f1 channel - 90 degree pulse for
decoupling sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for
decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4 :
gp 5
;60 : -40 : 10 : 80 : 8.1

;for z-only gradients:
;gpz1: 60%
;gpz2: -40%
;gpz3: 10%
;gpz4: 80%
;gpz5: 8.1%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100
;gpnam5: SMSQ10.100

;$Id: hncogp3d,v 1.17 2010/02/12 15:03:55
ber Exp $

hncocagpwg3d
;avance-version (10/02/12)
;HN(CO)CA
;3D sequence with
;inverse correlation for triple resonance using
multiple
;inept transfer steps
;
;F1(H) -> F3(N) -> F2(C=O) -> F2(Ca,t1)
-> F2(C=O) -> F3(N,t2) -> F1(H,t3)
;
;on/off resonance Ca and C=O pulses using
shaped pulse
;phase sensitive (t1)
;phase sensitive (t2)
;using constant time in t2
;water suppression using watergate sequence
;(use parameterset HNCOCAGPWG3D)
;
;S. Grzesiek & A. Bax, J. Magn. Reson. 96,
432 - 440 (1992)
;(L.E. Kay, G.Y. Xu & T. Yamazaki, J. Magn.
Reson. A109, 129-133 (1994))
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

```

```

prosol relations=<triple>                                (center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
                                                          d23
#include <Avance.incl>                                    (p21 ph1):f3
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>                                     (p13:sp2 ph3):f2
                                                          4u
"p2=p1*2"                                                (p14:sp5 ph1):f2
"p22=p21*2"                                              DELTA2
"d11=30m"                                                 (p14:sp3 ph1):f2
"d13=4u"                                                  4u
                                                          (p14:sp5 ph1):f2
"d21=5.5m"                                                DELTA2
"d22=4m"                                                  (p13:sp8 ph2):f2
"d23=12m"
"d26=2.3m"                                               4u
                                                          30u fq=cnst22(bf ppm):f2
"d0=3u"
"d10=d23/2-p14/2"                                         (p13:sp2 ph4):f2
"d29=d23/2-p14/2-p26-d21-4u"                             d0
"d30=d23/2-p14/2"                                         (center (p14:sp7 ph1):f2 (p22 ph8):f3 )
                                                          d0
"in0=inf1/2"                                              4u
"in10=inf2/4"                                             (p14:sp3 ph1):f2
                                                          DELTA
"in29=in10"                                               (p14:sp7 ph1):f2
"in30=in10"                                               4u
                                                          (p13:sp8 ph1):f2
"DELTA=d0*2+larger(p14,p22)-p14"
"DELTA1=d23-d21-p26"                                       4u
"DELTA2=d22-p14-4u"                                       30u fq=cnst21(bf ppm):f2
"DELTA3=d26-p16-d16-p11-12u"
                                                          (p13:sp2 ph2):f2
"spoff2=0"                                                 DELTA2
"spoff3=0"                                                 (p14:sp5 ph1):f2
"spoff5=bf2*((cnst22-cnst21)/1000000)"                  4u
"spoff7=bf2*((cnst21-cnst22)/1000000)"                  (p14:sp3 ph1):f2
"spoff8=0"                                                 DELTA2
                                                          (p14:sp5 ph1):f2
aqseq 321                                                  4u
                                                          (p13:sp8 ph1):f2
1 d11 ze
d11 pl16:f3                                               4u do:f1
2 d11 do:f3                                               (p26 ph7):f1
3 d1 pl1:f1 fq=cnst21(bf ppm):f2                          4u
p1 ph1                                                     p16:gp2
d26 pl3:f3                                                 d16
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )                            (p26 ph2):f1
d26 UNBLKGRAD                                             20u cpds1:f1 ph1
(p1 ph2):f1
                                                          (p21 ph5):f3
4u pl0:f1                                                  d30
(p11:sp1 ph1:r):f1                                        (p14:sp5 ph1):f2
4u                                                         d30
p16:gp1                                                    (center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph8):f3 )
d16                                                         d10
                                                          (p14:sp5 ph1):f2
(p21 ph1):f3                                              d29
d21 pl19:f1                                               4u do:f1
(p26 ph2):f1                                             (p26 ph7):f1
DELTA1 cpds1:f1 ph1                                       d21

```

```

(p21 ph1):f3
;sp8: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on
resonance)
; for time reversed pulse
p16:gp3
; p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
d16 pl0:f1
; p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
(p11:sp1 ph6):f1
; p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse [1
4u
msec]
4u pl1:f1
; p13: f2 channel - 90 degree shaped pulse
(p1 ph1)
; p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
4u
; p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
p16:gp4
; p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
d16
; p22: f3 channel - 180 degree high power
DELTA3 pl0:f1
pulse
(p11:sp1 ph6):f1
; p26: f1 channel - 90 degree pulse at pl19
4u
; d0 : incremented delay (F1 in 3D) [3 usec]
4u pl1:f1
; d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
; d10: incremented delay (F2 in 3D) = d23/2-
4u pl0:f1
p14/2
(p11:sp1 ph6):f1
; d11: delay for disk I/O [30 msec]
4u
; d13: short delay [4 usec]
DELTA3
; d16: delay for homospoil/gradient recovery
p16:gp4
; d21: 1/(2J(NH)) [5.5 msec]
d16 pl16:f3
; d22: 1/(4J(COCa)) [4 msec]
4u BLKGRAD
; d23: 1/(4J(NCO)) [12 msec]
go=2 ph31 cpd3:f3
; d26: 1/(4J'(NH)) [2.3 msec]
d11 do:f3 mc #0 to 2
; d29: incremented delay (F2 in 3D) = d23/2-
F1PH(calph(ph4, +90), caldel(d0, +in0))
p14/2-p26-d21-4u
F2PH(calph(ph5, +90), caldel(d10, +in10) &
; d30: decremented delay (F2 in 3D) = d23/2-
caldel(d29, +in29) & caldel(d30, -in30))
p14/2
exit
; cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
; cnst22: Calpha chemical shift (offset, in ppm)
; o2p: Calpha chemical shift (cnst22)
ph1=0
; inf1: 1/SW(Ca) = 2 * DW(Ca)
ph2=1
; inf2: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
ph3=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
; in0: 1/(2 * SW(Ca)) = DW(Ca)
ph4=0 2
; nd0: 2
ph5=0 0 2 2
; in10: 1/(4 * SW(N)) = (1/2) DW(N)
ph6=2
; nd10: 4
ph7=3
; in29: = in10
ph8=0 0 0 2 2 2
; in30: = in10
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2
; NS: 8 * n
; DS: >= 16
; td1: number of experiments in F1
; td2: number of experiments in F2 td2 max = 2
; * d30 / in30
; FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
; FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F2
; cpds1: decoupling according to sequence
; defined by cpdprg1
; cpd3: decoupling according to sequence
; defined by cpdprg3
; p10 : 0W
; p11 : f1 channel - power level for pulse
; (default)
; p13 : f3 channel - power level for pulse
; (default)
; p16: f3 channel - power level for CPD/BB
; decoupling
; p19: f1 channel - power level for CPD/BB
; decoupling
; sp1: f1 channel - shaped pulse 90 degree
; (H2O on resonance)
; sp2: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on
; resonance)
; sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on
; resonance)
; sp5: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca
; off resonance)
; sp7: f2 channel - shaped pulse 180 degree
; (C=O off resonance)
; use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 50 : 40 : 60 : 30
; for z-only gradients:

```

```

;gpz1: 50%                "d23=12m"
;gpz2: 40%                "d26=2.3m"
;gpz3: 60%
;gpz4: 30%                "d0=3u"
                            "d10=d23/2-p14/2"
                            "d29=d23/2-p14/2-p26-d21-4u"
                            "d30=d23/2-p14/2"

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100      "in0=inf1/2"
;gpnam2: SMSQ10.100      "in10=inf2/4"
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100

; $Id: hncocagpwg3d,v 1.6 2010/02/12
15:03:55 ber Exp $      "in29=in10"
                            "in30=in10"

hncagpwg3d
;avance-version (10/02/12)
;HNCA
;3D sequence with
;inverse correlation for triple resonance using
multiple
;inept transfer steps
;
;F1(H) -> F3(N) -> F2(Ca,t1) -> F3(N,t2) ->
F1(H,t3)
;
;on/off resonance Ca and C=O pulses using
shaped pulse
;phase sensitive (t1)
;phase sensitive (t2)
;using constant time in t2
;water suppression using wtergate sequence
;(use parameterset HNCAGPWG3D)
;
;S. Grzesiek & A. Bax, J. Magn. Reson. 96,
432 - 440 (1992)
;(J. Schleucher, M. Sattler & C. Griesinger,
Angew. Chem. Int. Ed. 32,
;1489-1491 (1993))
;(L.E. Kay, G.Y. Xu & T. Yamazaki, J. Magn.
Reson. A109, 129-133 (1994))
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d13=4u"

"d21=5.5m"

```

```

4u do:f1
(p26 ph7):f1
4u
p16:gp2
d16
(p26 ph2):f1
20u cpds1:f1 ph1

(p21 ph5):f3
d30
(p14:sp5 ph1):f2
d30
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph8):f3 )
d10
(p14:sp5 ph1):f2
d29
4u do:f1
(p26 ph7):f1
d21
(p21 ph1):f3

p16:gp3
d16 pl0:f1
(p11:sp1 ph6):f1
4u
4u pl1:f1

(p1 ph1)
4u
p16:gp4
d16
DELTA2 pl0:f1
(p11:sp1 ph6):f1
4u
4u pl1:f1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
4u pl0:f1
(p11:sp1 ph6):f1
4u
DELTA2
p16:gp4
d16 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd3:f3
d11 do:f3 mc #0 to 2
F1PH(calph(ph4, +90), caldel(d0, +in0))
F2PH(calph(ph5, +90), caldel(d10, +in10) &
caldel(d29, +in29) & caldel(d30, -in30))
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph4=0 2
ph5=0 0 2 2
ph6=2
ph7=3
ph8=0 0 0 0 2 2 2 2
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2

;p10 : 0W
;p11 : f1 channel - power level for pulse
(default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse
(default)
;p16: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;p19: f1 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp1: f1 channel - shaped pulse 90 degree
(H2O on resonance)
;sp2: f2 channel - shaped pulse 90 degree (Ca
on resonance)
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca
on resonance)
;sp5: f2 channel - shaped pulse 180 degree
(C=O off resonance)
;sp8: f2 channel - shaped pulse 90 degree (Ca
on resonance)
; for time reversed pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse [1
msec]
;p13: f2 channel - 90 degree shaped pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power
pulse
;p26: f1 channel - 90 degree pulse at p119
;d0 : incremented delay (F1 in 3D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d10: incremented delay (F2 in 3D) = d23/2-
p14/2
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: 1/(2J(NH)) [5.5 msec]
;d23: 1/(4J(NCa)) [12 msec]
;d26: 1/(4J'(NH)) [2.3 msec]
;d29: incremented delay (F2 in 3D) = d23/2-
p14/2-p26-d21-4u
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d23/2-
p14/2
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;cnst22: Calpha chemical shift (offset, in ppm)
;o2p: Calpha chemical shift (cnst22)
;inf1: 1/SW(Ca) = 2 * DW(Ca)
;inf2: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(2 * SW(Ca)) = DW(Ca)
;nd0: 2
;in10: 1/(4 * SW(N)) = (1/2) DW(N)
;nd10: 4
;in29: = in10
;in30: = in10
;NS: 8 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments in F1

```

```

;td2: number of experiments in F2      td2 max
= 2 * d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F2
;cpds1: decoupling according to sequence
defined by cpdprg1
;cpd3: decoupling according to sequence
defined by cpdprg3
;pcpd1: f1 channel - 90 degree pulse for
decoupling sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for
decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 50 : 40 : 60 : 30

;for z-only gradients:
;gpz1: 50%
;gpz2: 40%
;gpz3: 60%
;gpz4: 30%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;gpnam3: SMSQ10.100
;gpnam4: SMSQ10.100

;$Id: hncagpwg3d,v 1.5 2010/02/12 15:03:55
ber Exp $

stddiffesgp.3

;stddiffesgp.3
;avance-version (11/01/24)
;pseudo 2D sequence
;for saturation transfer difference
;with shaped pulse train for saturation on f2
channel
;alternating between on and off resonance
;to be defined by fq2list
;with spoil sequence to destroy unwanted
magnetization
;water suppression using excitation sculpting
with gradients
;with spinlock to suppress protein signals
;(use parameterset STDDIFFESGP.3)
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. Int.
Ed. 38, 1784-1788 (1999)
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. 111,
1902-1906 (1999).
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson.,
;Series A 112 275-279 (1995)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>

#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
define list<frequency> stdlist=<${FQ2LIST}>
"p2=p1*2"
"d12=20u"
"d11=30m"
"p29=d29"
"l5=d20/p42"
"d31=p42*15"
"DELTA1=d1-d31"
"TAU=de+p1*2/3.1416+50u"
"nbl=td1"
"acqt0=0"
baseopt_echo
1 ze
3m stdlist:f2 st0
2 6m
3 6m
4 d11
6m
5 50u UNBLKGRAD
4u pl10:f1
(p17 ph2)
(p17*2 ph3)
4u
p30:gp1
10m pl1:f1
4u BLKGRAD
DELTA1
6 (p42:sp9 ph4):f2
4u
lo to 6 times l5
p1 ph1
4u pl29:f1
(p29 ph5)
50u UNBLKGRAD
p16:gp2
d16 pl0:f1
(p40:sp10 ph6:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph7
4u
p16:gp2
d16
TAU
p16:gp3
d16 pl0:f1
(p40:sp10 ph8:r):f1
4u
d12 pl1:f1
p2 ph9
p16:gp3
d16
4u BLKGRAD
goscnp ph31
3m stdlist.inc
lo to 3 times nbl
3m ipp1 ipp5 ipp6 ipp7 ipp8 ipp9 ipp31

```



```
4u
lo to 6 times l5
p1 ph1
goscnp ph31
3m stdlist.inc
3m stdlist:f2 st
lo to 3 times nbl
3m ipp1 ipp31
3m stdlist.res
lo to 4 times ns
d11 wr #0
3m rppall
3m zd
lo to 5 times l4
exit
ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph2=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
;p1 : f1 channel - power level for pulse
(default)
;p2 : f2 channel - power level for pulse
(default) [120 dB]
;sp9 : f2 channel - shaped pulse for saturation
[40 - 60 dB]
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p42: f2 channel - shaped pulse for saturation
[50 msec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d20: saturation time
;d31: saturation time as executed
;l4: l4 = number of averages = (total number
of scans) / NS
;l5: loop for saturation: p42 * 15 = saturation
time
;NS: 8 * n
;DS: 4
;td1: number of experiments
;NBL: NBL = number of irradiation
frequencies
;define FQ2LIST (irradiation frequencies)
;(list has to be stored in
"/u/exp/stan/nmr/lists/f1")
;this pulse program produces a ser-file
(PARMOD = 2D)
;The STD experiment is protected by
international patents owned by:
;Alepharma Licensing, Raamfeld 67, 22397
Hamburg, Germany.
;For commercial use (direct or indirect) please
contact the company for
;licensing information at:
;E-mail: info@alepharma-licensing.com,
;Fax: +49 4060847812,
;Tel: +49 1701685158 or +49 1712788867.
;$Id: stddiff,v 1.6.2.1 2011/01/24 15:49:24 ber
Exp $
```

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Seeger für das spannende Thema, sein großes Engagement, die Anregungen und seine aktive Unterstützung bedanken.

Meinen Mentoren Herrn Prof. Dr. Restle und Herrn Dr. Recke gilt ein großer Dankbarkeit für die vielen Diskussionen und Denkanstöße.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Hübner für die Übernahme der Zweitgutachterschaft.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei dem Graduiertenkolleg 1727 „Modulation of Autoimmunity“.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Dominik Schwudke; Bioanalytische Chemie; Forschungszentrum Borstel danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Ohne die Zusammenarbeit und Unterstützung aller Mitglieder des Institutes für Chemie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Hier möchte ich mich namentlich bei einigen von ihnen ganz besonders bedanken.

Sarah Leineweber, Sarah Schönig, Lena Lisbeth Grimm, Sophie Weißbach, Henrik Wegener und Dr. Alvaro Mallagaray De Benito, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Dr. Thorsten Biet für die Unterstützung am NMR und die tollen Gespräche. Dr. Christoph Rademacher und Dr. Nora Sindhuwina für die Hilfe mit der Maybridge Library. Jens Klingbeil und Jannis Lawaschek, die während ihrer Praktika bzw. Abschlussarbeiten weitere Aspekte dieses Themas beleuchteten und dadurch zum Fortgang beigetragen haben. Des Weiteren möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Mittagspausen versüßt haben.

Jan, Luca und Lias gebührt eine außerordentliche Dankbarkeit für ihre Liebe und die stetigen Ablenkungen.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, für ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und ihre stetige Motivation.