

**"Biophysikalische Charakterisierung der Isoformen von
Drosophila melanogaster Spätzle,
einem NGF-ähnlichen Protein der Familie der Cystinknoten"**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Anita Hoffmann

geboren am 24. November 1980 in Zittau

Gutachter /in

1. Prof. Dr. M. T. Stubbs

2. Prof. Dr. Y. Muller

3. PD Dr. E. Schwarz

Halle (Saale), 07. Oktober 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Signalkaskaden der Embryogenese und der angeborenen Immunantwort	1
1.2	Das Protein Spätzle.....	8
1.3	Spätzle als Ligand des Toll Rezeptors.....	15
1.4	Die Serinproteasen Easter und Spätzle Prozessierendes Enzym.....	17
1.5	Proteinstrukturmodelle der Toll Signalwege.....	18
1.6	Problematik des Themas und Ziel der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Geräte und Chemikalien	23
2.2	<i>E. coli</i> Stämme.....	24
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.3.1	Expressionsvektoren.....	25
2.3.2	cDNA der Spätzle Isoformen sowie Easter und SPE	25
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion	25
2.3.4	Restriktionsverdau und Ligation	27
2.3.5	Transformation	27
2.3.6	Plasmidpräparation von Vorkulturen	28
2.4	Mikrobiologische Methoden	28
2.4.1	Herstellung chemokompetenter Bakterien	28
2.4.2	Proteinexpression	29
2.4.3	Zellaufschluss	30
2.5	Biochemische Methoden	30
2.5.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	32
2.5.3	Konzentrierung von Proteinlösungen	33
2.5.4	Western Blot.....	34
2.5.5	<i>inclusion-bodies</i> -Aufreinigung und Solubilisation.....	35
2.5.6	<i>in vitro</i> Faltung von solubilisierten <i>inclusion bodies</i>	35
2.5.7	Limitierte Proteolyse	37
2.5.8	Proteinreinigung mittels FPLC.....	37
2.5.9	Modifikation von Aminosäuren	38

2.6	Biophysikalische Methoden	39
2.6.1	Massenspektrometrie.....	39
2.6.2	N-terminales Sequenzieren	40
2.6.3	Circular Dichroism.....	40
2.6.4	Fluoreszenz-Spektroskopie	42
2.6.5	NMR-Spektroskopie.....	42
2.6.6	Kristallisation	42
2.6.7	Datenmessung und Strukturbildung.....	43
2.7	<i>in vivo</i> Aktivitätstest in <i>D. melanogaster</i> Embryonen	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Klonierung der Expressionsvektoren	46
3.2	Propeptid Isoform Spätzle 8.24.....	47
3.2.1	Expression der Spätzle 8.24 Isoform.....	47
3.2.2	Chromatographische Reinigung von Spätzle 8.24	48
3.2.3	Cysteine der Spätzle 8.24 Isoform	49
3.3	Isoform Spätzle 11.7	52
3.3.1	Expression von Spätzle 11.7 in <i>inclusion bodies</i>	52
3.3.2	<i>in vitro</i> Faltung von Spätzle 11.7	53
3.3.3	Die Stabilität von Spätzle 11.7.....	58
3.3.4	Limitierte Proteolyse	60
3.3.5	Mikroinjektion des Spätzle 11.7 in <i>spz</i> defiziente <i>Drosophila</i> Embryonen.....	66
3.4	Isoform Spätzle 8.19	69
3.5	Spätzle 11.27	70
3.6	Easter und Spätzle Prozessierendes Enzym	71
3.7	Kristallisation der Spätzle Isoformen.....	73
3.7.1	Kristallisationsbedingungen	73
3.7.2	Analyse des kristallisierten Fragmentes.....	76
3.8	Datensammlung und Strukturlösung.....	80
3.9	Röntgenkristallstruktur.....	83

4	Diskussion	88
4.1	<i>in vitro</i> Faltung von Spätzle	88
4.2	Spätzle als Mitglied der Cystinknoten-Proteinfamilie	89
4.3	Die Rezeptoraktivierung.....	93
4.4	Funktion des Propeptides in der Cystinknoten-Proteinfamilie.....	95
4.5	Weiterführende Arbeiten	97
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	102
A	Anhang	112
B	Abkürzungsverzeichnis	121
C	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	123
D	Eidesstattliche Erklärung	125
E	Lebenslauf	126
F	Danksagung	127

1 Einleitung

1.1 Die Signalkaskaden der Embryogenese und der angeborenen Immunantwort

Das Spätzle Protein ist ein Nervenwachstumsfaktor ähnlicher Ligand in *Drosophila melanogaster*. Er zählt zur Superfamilie der Cystinknoten und beeinflusst sowohl die angeborene Immunantwort (Lemaitre *et al.*, 1996) als auch die Embryogenese (Morisato & Anderson, 1994).

Spätzle definiert in der Embryogenese von *D. melanogaster* die ventrale, dem Bauch zugewandete Seite während der Ausbildung der Dorsal-Ventral-Achse. Bei Störungen in der Ausbildung dieser Achse kommt es zur Bildung von missgebildeten, nicht überlebensfähigen Embryonen. Insgesamt wurden zwölf verschiedene Gene identifiziert, die für die Ausbildung der Dorsal-Ventral-Achse in *Drosophila* Embryonen verantwortlich sind. Zu ihnen zählen neben dem ventralisierenden (die Bauchseite betreffenden) Gen *cactus* auch die dorsalisierende (die Rückenseite betreffenden) Gene *dorsal*, *easter*, *gastrulation defective*, *nudel*, *pipe*, *pelle*, *snake*, *spätzle*, *toll*, *tube* und *windbeutel*, die zur Dorsalgruppe zusammengefasst werden. Eine Mutation in einem dieser Gene löst eine gestörte Achsenbildung mit dem Ergebnis einer dorsalisierten bzw. ventralisierten Gestalt aus. Die verdrehte Gestalt *spz* defizienter Embryonen vermag an eine deutsche Nudelsorte zu erinnern.

Zunächst wurde das Protein Spätzle als polarisierende Aktivität (*polarizing activity*) in der Dorsal-Ventral-Achsenbildung während der Embryogenese in *D. melanogaster* beschrieben. In Transplantationsexperimenten von perivitelliner Flüssigkeit aus dem die Oozyte umgebenden Kompartiment konnte die polarisierende Eigenschaft der Wildtyp Embryonen an Embryonen von *nudel*, *pipe* oder *windbeutel* defizienten Weibchen weitergegeben werden. Die Position der Injektion in den perivitellinen Raum, das Kompartiment zwischen der Membran der Eihülle und der zytoplasmatischen Membran des Embryos, bestimmte die Polarität der Dorsal-Ventral-Achse. Normalerweise liegt die polarisierende Aktivität an der ventralen Seite und initiiert den Gradienten des Transkriptionsfaktors Dorsal im Zellkern (Stein *et al.*, 1991). Weitere Transplantationsexperimente mit perivitelliner Flüssigkeit aus Wildtyp Embryonen in Embryonen von *easter*, *snake* oder *spätzle* defizienten Weibchen führten ebenfalls zur Rettung der Achsenbildung (Abbildung 1.1).

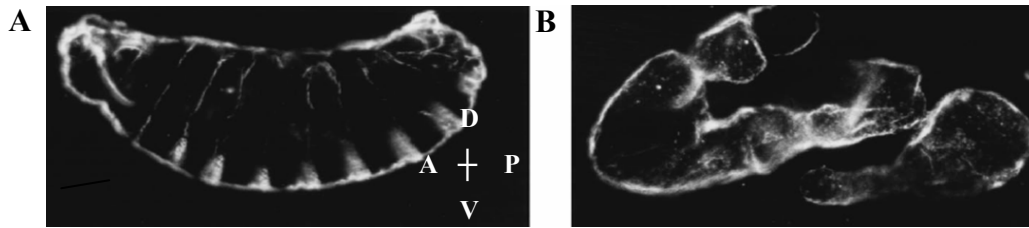


Abbildung 1.1: *Spz* defiziente *Drosophila* Embryonen

Die Abbildung zeigt die Entwicklung der *Drosophila melanogaster* Embryonen mit und ohne exprimierten Spätzle Protein (DeLotto & DeLotto, 1998). **A** Der Embryo repräsentiert den normalen Phänotyp. Die Ausrichtung des Embryos ist mit D (dorsal), V (ventral), A (anterior) und P (posterior) markiert. **B** Die Ausbildung der Dorsal-Ventral-Achse wurde in dem *spz* defizienten Embryo durch das Fehlen des Spätzle Proteins gestört, so dass die Entwicklung stoppte und zu dieser dorsalisierten Gestalt führte.

Aus der Beobachtung, dass die polarisierende Aktivität durch Serinprotease Inhibitoren gestört werden kann, wurde geschlossen, dass Serinproteasen durch proteolytische Prozessierung bei der Ausbildung der Dorsal-Ventral-Achse mitwirken (Stein & Nüsslein-Volhard, 1992).

Durch Spätzle *knockout* Experimente konnte gezeigt werden, dass das Produkt des *spz* Genes der direkte Ligand für den Toll Rezeptor ist und direkt oberhalb des Membranrezeptors Toll wirkt. Das Spätzle Protein wird als Proform exprimiert und ist erst nach einer proteolytischen Prozessierung aktiv. Da der Toll Rezeptor über die gesamte Perivitellinmembran verteilt vorliegt und die Spätzle Proform frei diffundieren kann, definiert die proteolytische Aktivierung von Spätzle die ventrale Seite im Embryo (Morisato & Anderson, 1994). Eine erste biochemische Charakterisierung des Spätzle Proteins zeigte eine hohe thermische und azide Stabilität, die verwendet wurde, um Spätzle aus *Drosophila* Embryonen Extrakt zu isolieren (Schneider *et al.*, 1994).

Die erste veröffentlichte Sequenz der 2,1 kb und 1,9 kb cDNAs zeigt zwei Isoformen von Spätzle, die sich durch eine 0,2 kb Insertion unterscheiden (DeLotto & DeLotto, 1998). Die ersten 22 N-terminalen Aminosäuren wurden wegen ihrer Hydrophobizität als Signalsequenz zum Transport in den extrazellulären, perivitellinen Raum postuliert. Spätzle zeigte keine Sequenzhomologie zu damals bekannten Proteinen. Durch einen Vergleich des Proteinextraktes aus 0 - 4 h alten Embryonen mit und ohne *spz* Defizienz konnten vier Isoformen (60 kD, 52 kD, 47 kD und 23 kD) identifiziert werden. Mittels N-terminalen Deletionen im Protein konnte gezeigt werden, dass die 106 C-terminalen Aminosäuren für die Aktivität verantwortlich sind (Morisato & Anderson, 1994).

Ein komplexes Zusammenspiel der Faktoren der Dorsalgruppe ermöglicht die Aktivierung von Spätzle. In einer Signalkaskade aus Trypsin ähnlichen Serinproteasen werden Windbeutel, Slalom und Pipe im Epithel exprimiert. Das sekretierte Pipe aktiviert zusammen mit der Protease Nudel das im perivitellinen Raum exprimierte Gastrulation-Defective. Dieses wiederum aktiviert über die Serinproteasen Snake und Easter auch Spätzle. Aktiviertes Spätzle bindet an den Toll Rezeptor in der zytoplasmatischen Membran, wodurch das Signal ins Zytoplasma weitergeleitet wird. So kommt es zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors Dorsal in den Zellkern und zur Expression der Proteine zur Ausbildung der Dorsal-Ventral-Achse (Abbildung 1.2; Smith & DeLotto, 1994; Moussian & Roth, 2005).

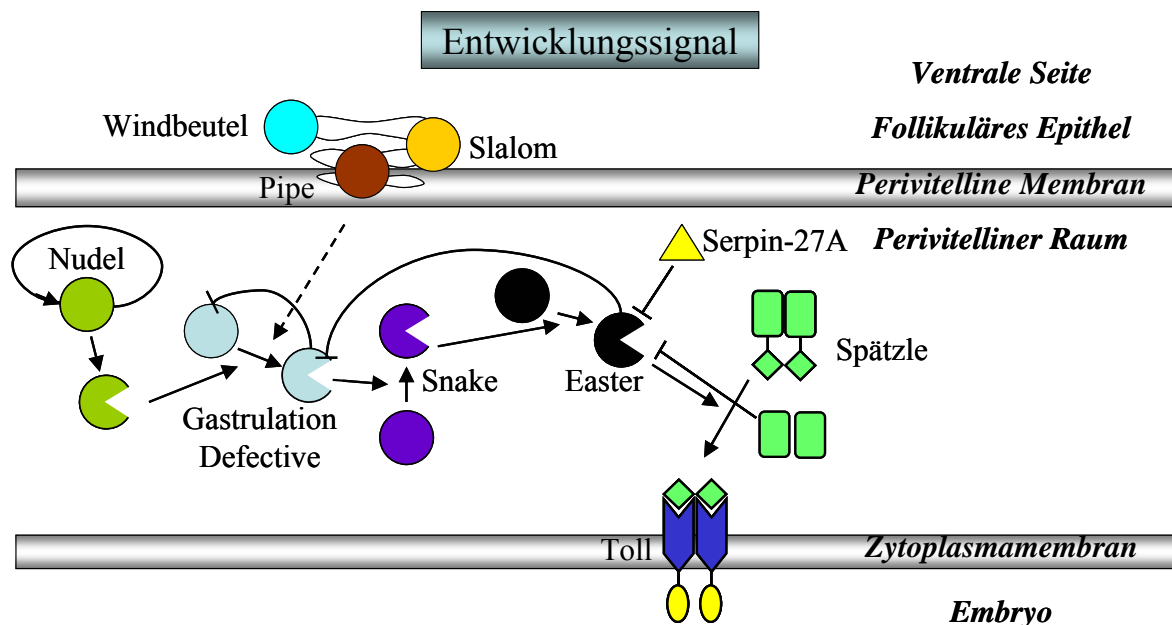


Abbildung 1.2: Initiierung der Dorsal-Ventral-Achsenentwicklung

Die Abbildung zeigt schematisch die extrazelluläre Signalkaskade des Toll Signalweges (nach Moussian & Roth, 2005). Mehrere Proteasen, die verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegen, müssen aktiviert werden, bevor Spätzle prozessiert wird und an den Toll Rezeptor binden kann. Direkte Aktivierungen sind durch Pfeile, inhibitorische Effekte sind durch Querstriche und vermutete Interaktionen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Nach der Aktivierung des Toll Rezeptors durch die Bindung des Spätzle Liganden wird die Signalübertragung im Zytoplasma fortgesetzt, so dass Dorsal schließlich in den Zellkern transportiert wird. Dazu binden ein Heterodimer, gebildet aus den Adaptoren Tube und dMyD88, sowie die Kinase Pelle (Sun *et al.*, 2004) an den Toll Rezeptor. Die Homodimere von Dorsal werden im Zytoplasma durch Cactus inhibiert. Nach der Dissoziation der aktivierten Kinase Pelle aus dem Toll-Komplex wird der Inhibitor Cactus durch aktiviertes Pelle degradiert. So wird Dorsal aus dem inhibitorischen Komplex entlassen und kann nun in den Zellkern transportiert werden. Dort wirkt es als NF- κ B ähnlicher Transkriptionsfaktor, indem es ventralspezifische Genloci aktiviert und dorsalspezifische Genloci inhibiert, so dass die ventrale Seite ausgebildet wird (Abbildung 1.3; Moussian & Roth, 2005).

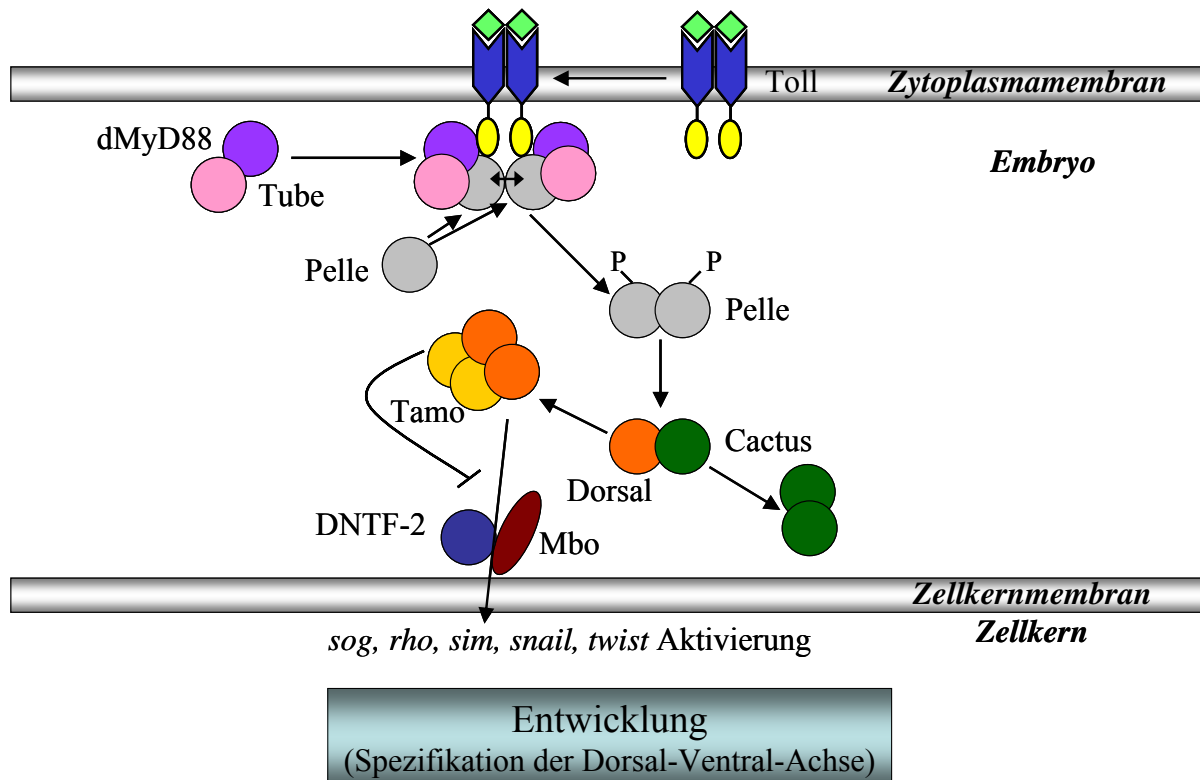


Abbildung 1.3: Signalweiterleitung der Dorsal-Ventral-Achsenentwicklung

Die Abbildung zeigt schematisch die intrazelluläre Signalkaskade des Toll Signalweges in der *Drosophila* Embryogenese (nach Moussian & Roth, 2005). Die Ligandenbindung induziert die Dimerisierung des Toll Rezeptors. Die interzelluläre Rezeptorregion bindet das dMyD88/Tube Heterodimer sowie Pelle, welches durch die Kinaseaktivität phosphoryliert und damit aktiviert wird. Pelle entlässt Dorsal aus einem inhibitorischen Komplex mit Cactus. Dorsal wird in den Zellkern transportiert und wirkt als Transkriptionsfaktor. Direkte Aktivierungen sind durch Pfeile, inhibitorische Effekte sind durch Querstriche und Phosphatgruppen durch „-P“ symbolisiert.

Aufgrund der guten Analysierbarkeit der *Drosophila* Mutanten ist die Ausbildung der Dorsal-Ventral-Achse die am besten charakterisierte Funktion des Toll Signalweges. In den späteren Entwicklungsstufen der Fruchtfliege hat der Toll Signalweg in abgewandelter Form ebenfalls eine Funktion in der angeborenen Immunantwort (Hoffmann, 2003), der Muskelentwicklung und der morphogenetischen Bewegung (Belvin & Anderson, 1996).

Vor allem bei der Erforschung der Immunantwort in *D. melanogaster* wurde die Ähnlichkeit zu der angeborenen Immunantwort in Säugetieren entdeckt und darin eine Möglichkeit gesehen, die komplexe Immunantwort in Säugetieren an einem einfacheren Modellorganismus zu erforschen. Die Immunantwort in *Drosophila* besteht nicht nur aus dem Toll Signalweg, sondern zum Beispiel auch aus den IMD (*immune deficiency genes*) Signalweg, der Bildung von antimikrobiellen Peptiden oder der Erstantwort durch Makrophagen mit der Bildung von Zytokinen zur Lyse von Pathogenen (Hoffmann, 2003). Auf eine detaillierte Darstellung dieser Immunantworten soll hier verzichtet werden.

Das Spätzle Protein wirkt somit in zwei verschiedenen Signalkaskaden mit, die über die Aktivierung von Spätzle und der Bindung an den Toll Rezeptor zusammenlaufen (Abbildung 1.4). Der in der Embryogenese wirkende Transkriptionsfaktor Dorsal besitzt in der angeborenen Immunantwort einen homologen Immunitätsfaktor Dif (*Dorsal related immunity factor*) (Imler & Hoffmann, 2001). Dieser wird sowohl in Larven, in Puppen und in erwachsenen Fliegen im *Fat Body* (entspricht der Leber in Säugetieren) exprimiert, nicht aber während der Oogenese oder in der frühen Embryonalentwicklung. Dif und Dorsal aktivieren nach dem Transport aus dem Zytoplasma in den Zellkern die Transkription des antimikrobiellen Peptidgenes *drosomycin* (Lemaitre *et al.*, 1996).

Die Faktoren der regulatorischen Genkassette um *spätzle/toll/cactus* wurden als weitere potentielle Mitglieder in der angeborenen Immunantwort gesehen (Lemaitre *et al.*, 1996). Dass auch hier Spätzle der Ligand des Toll Rezeptors ist, wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt (Weber *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004). Weiterhin wurden mehrere Serinproteasen identifiziert, die bei der Aktivierung von Spätzle in einer extrazellulären Kaskade mitwirken, aber nicht identisch mit den Serinproteasen der Embryogenese sind. Diese Proteasen sind Persephone (Ligoxygakis *et al.*, 2002), Grass, Sphinx, Spirit, Spheroide und Spätzle Prozessierendes Enzym (SPE) (Kambris *et al.*, 2006). Grass wirkt ausschließlich in der durch gram-positive Bakterien ausgelösten Immunantwort mit und besitzt wie Spirit und SPE eine Clip-Domäne. Dieses N-terminale, vor der katalytischen Domäne liegende Strukturmotiv kommt nur in Insekten vor und besitzt eine regulatorische

Funktion in der sequenziellen Aktivierung der Serinproteasen. Den Proteasen Sphinx 1/2 sowie Spheroid fehlt das katalytische Serin einer Serinprotease, so dass ihre Funktion möglicherweise in der Adaption von Regulatoren liegt (Kambris *et al.*, 2006). In der Signalkaskade des Käfers *Tenebrio molitor* konnte gezeigt werden, dass SPE direkt von der Serinprotease SPE aktivierendes Enzym (SAE) prozessiert wird (Kim *et al.*, 2008). Welche Protease diese Funktion in *Drosophila* übernimmt, ist noch unbekannt. Nach der Aktivierung SPEs und Spätzle bindet Letzteres an den Toll Rezeptor. Dies führt über den Transport des Dif Proteins in den Zellkern zur Ausbildung des antimikrobiellen Peptides Drosomycin. Die Spätzle aktivierende Protease in der Immunantwort ist das Spätzle Prozessierende Enzym (SPE) (Jang *et al.*, 2006; Kambris *et al.*, 2006).

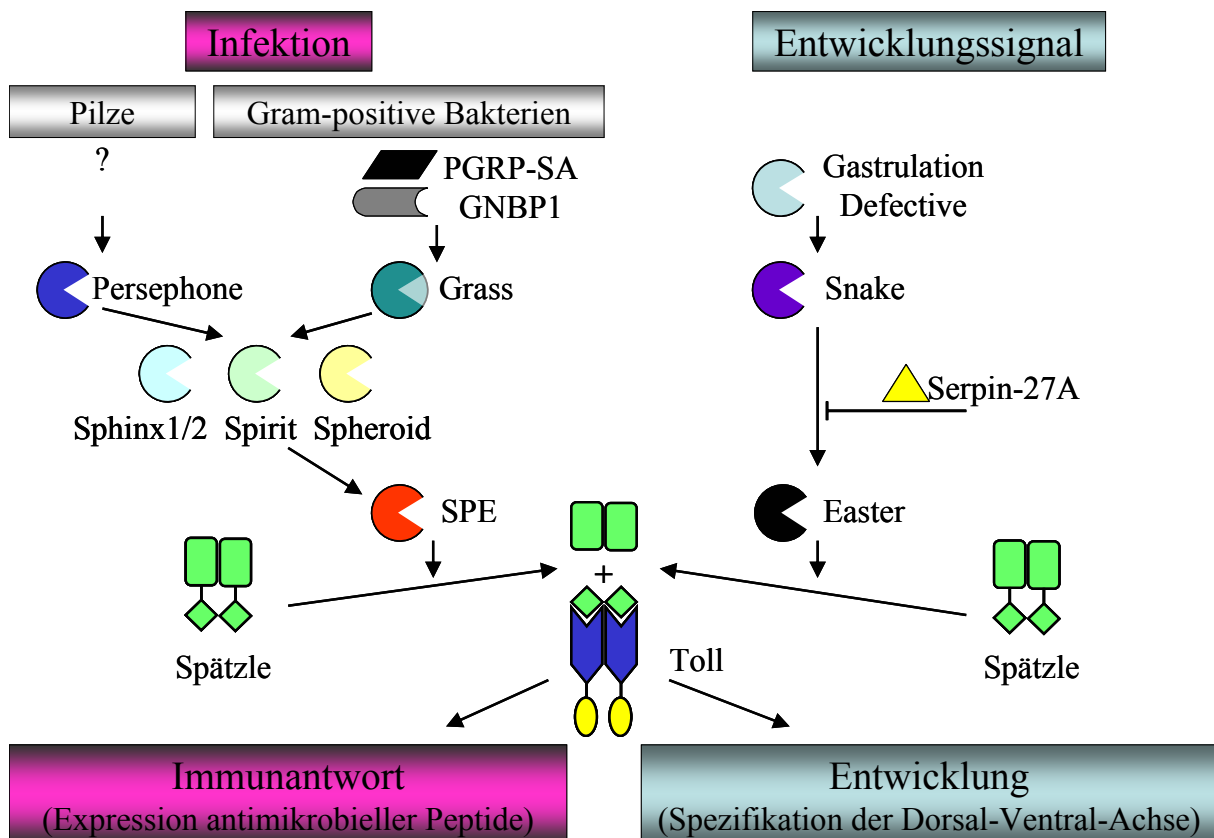


Abbildung 1.4: Die Signalkaskaden um Spätzle

Es sind die Kaskaden der Immunantwort und der Entwicklung zusammenlaufend in der Aktivierung des Spätzle Proteins dargestellt. (geändert, nach Jang *et al.*, 2006 und Kambris *et al.*, 2006)

Der Toll Rezeptor und die Proteine seiner Signalkaskade besitzen Homologe in anderen Organismen. Der Toll Signalweg ist evolutionär konserviert und sowohl in Insekten als auch in der Immunantwort der Säugetiere vorhanden (Lemaitre *et al.*, 1996; Imler & Hoffmann, 2001). In Säugetieren wurden mehrere Toll ähnliche Rezeptoren (TLRs) identifiziert (Rock *et al.*, 1998; Tauszig *et al.*, 2000; Imler & Hoffmann, 2001). Dabei wurde nachgewiesen, dass TLR 2 und TLR 4 wie Toll in *Drosophila* in der angeborenen Immunantwort in Säugetieren integriert sind. Der *Drosophila* Toll Rezeptor sowie die humanen Toll ähnlichen Rezeptoren übertragen das Signal über die Kinase Pelle in *Drosophila* beziehungsweise über die orthologen Interleukin1-Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAKs) in Säugetieren (Abbildung 1.5; Gay & Gangloff, 2007).

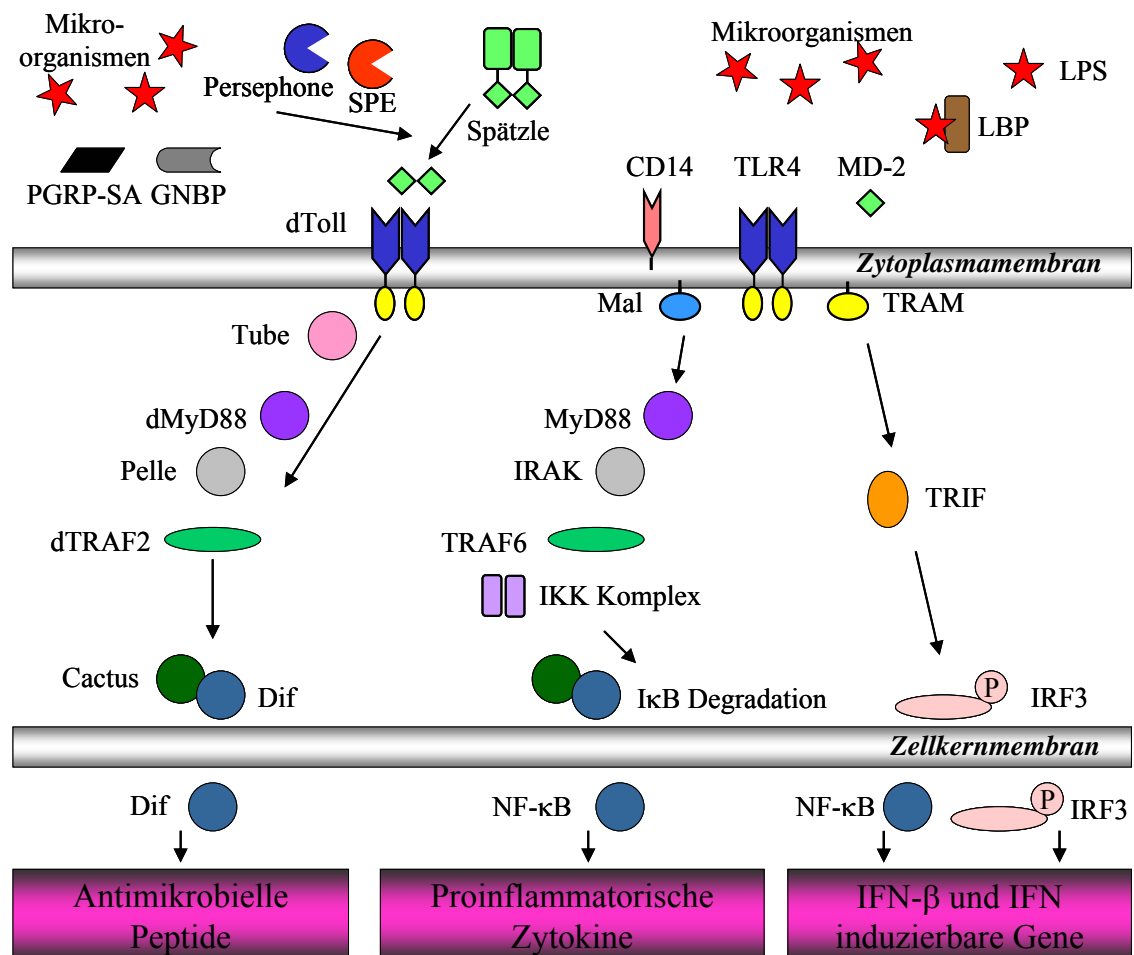


Abbildung 1.5: Die Homologie zwischen Toll-Dorsal und IL-1R-NF-κB Signalweg

Es sind schematisch die konservierten und divergenten Entwicklungen im Toll Signalweg dargestellt. Die Komponenten des Toll Signalweges in *Drosophila* sind links, der humane TLR-Signalweg rechts abgebildet. Evolutionär und funktionell ähnliche Elemente in den beiden Signalwegen sind in derselben Form und Farbe dargestellt. (nach Gay & Gangloff, 2007)

1.2 Das Protein Spätzle

Vom Spätzle Protein in *D. melanogaster* gibt es verschiedene Isoformen, die durch alternatives Spleißen der pre-mRNA gebildet werden (DeLotto *et al.*, 2001). Sie bestehen aus einem Signalpeptid, einem variablen Propeptid, einer Prozessierungsstelle für die Proteasen Easter und Spätzle Prozessierendes Enzym (SPE) sowie dem Cystinknoten ähnlichem C-Terminus (Abbildung 1.6).

Der C-Terminus der Spätzle Isoformen besitzt sieben Cysteine, deren konservierter Abstand das Protein als Mitglied der Familie der Cystinknoten einordnet und den C-Terminus auch als Cystinknoten-Domäne bezeichnen lässt. Die Cystinknoten-Domäne besteht aus den 106 C-terminalen Aminosäuren, so dass sie auch mit C-106 Protein bezeichnet wird.

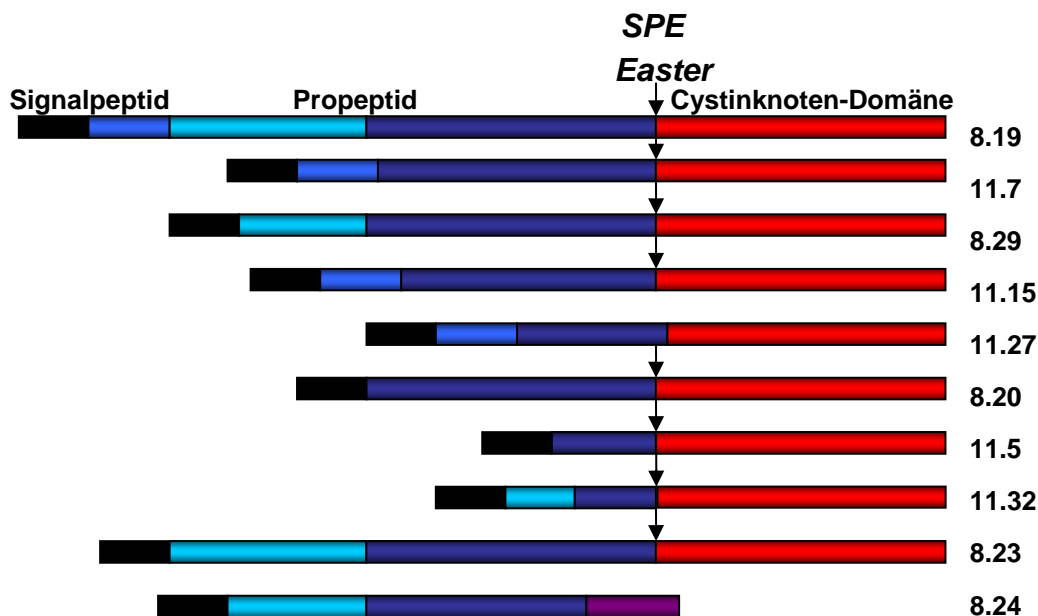


Abbildung 1.6: Die Spätzle Isoformen

Es sind zehn verschiedene Isoformen mit ihren numerischen Bezeichnungen und ihrer Domänenstruktur dargestellt. In Schwarz ist das Signalpeptid, in Blautönen sind die Exons des Propeptides und in Rot die Cystinknoten-Domäne dargestellt. Die Schnittstelle der Proteasen Easter und SPE ist mit einem Pfeil angedeutet. In Violett ist das letzte Exon der Isoform 8.24 dargestellt, welches auf Grund einer Verschiebung im Leseraster der mRNA einzigartig ist. (nach DeLotto *et al.*, 2001)

Von den zehn hier beschriebenen Isoformen sind in cDNA Injektionsexperimenten in *Drosophila* nur drei Isoformen (Spätzle 8.19, Spätzle 11.7 und Spätzle 11.15) bei der Dorsal-Ventral-Differenzierung funktionell. Viele andere Isoformen sind nur partiell funktionell (Spätzle 8.29, Spätzle 11.7, Spätzle 8.20, Spätzle 11.5, Spätzle 11.32, Spätzle 11.6, Spätzle 8.24 und Spätzle 8.23). Nicht aktiv ist nur die Isoform Spätzle 11.27, der das Exon mit der SPE und Easter Spaltstelle fehlt. Selbst Spätzle 8.24, dem die Cystinknoten-Domäne fehlt, ist schwach aktiv. Wegen einer Verschiebung im Leseraster kurz vor dem Beginn der Cystinknoten-Domäne stoppt die Translation von Spätzle 8.24 ohne Ausbildung der vollständigen Cystinknoten-Domäne (DeLotto *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen werden die Spätzle Isoformen zu unterschiedlichen Zeiten und in verschiedenen Körperregionen gebildet und demnach in Gruppen zusammengefasst. Eine Übersicht der Isoformen ist im Anhang gegeben (Abbildung A.1). Die in dieser Arbeit betrachteten Spätzle Isoformen gehören in die Embryonalentwicklungsbibliothek. Sie werden in der Datenbank UniProtKB / Swiss-Prot mit der Zugangsnummer P48607 geführt. Für jede Isoform gibt es ein eigenes Suffix. Die in dieser Arbeit verwendeten Isoformen werden als P48607-1 (Isoform 8.19), P48607-4 (Isoform 8.24), P48607-6 (Isoform 11.27) und als P48607-9 (Isoform 11.7) geführt. Eine Überlagerung (*alignment*) der Aminosäuresequenz verdeutlicht den Aufbau aus Exonen und zeigt die Gemeinsamkeiten und Unterschiede (Abbildung 1.7).

Die Isoform Spätzle 11.7 besteht aus einem Signalpeptid der Aminosäuren 1 - 25¹, dem Propeptid und der Cystinknoten-Domäne der Aminosäuren 221 - 326. Diese Isoform kann durch Easter oder SPE zwischen den Aminosäuren 220 und 221 aktiviert werden und ist glykosiliert (DeLotto *et al.*, 2001) höchst wahrscheinlich an den Positionen N48 sowie N164. Diese Isoform ist für die Verwendung in der Arbeit ausgewählt worden, weil sie ebenfalls neben Spätzle 11.15 und Spätzle 8.19 eine aktive Isoform aus der Embryonalentwicklungsbibliothek mit verkürztem Propeptid ist. Spätzle 11.7 gleicht Spätzle 8.19 sehr, nur das Spätzle 8.19 Exon im Propeptid der Aminosäuren 49 - 121 fehlt. Zu Spätzle 11.15 unterscheidet es sich aber nur in der Anwesenheit eines neun Aminosäure langen Exons. Die Isoform Spätzle 8.19 ist ausgewählt worden, weil es eine aktive Isoformen der Embryonalentwicklungsbibliothek mit dem längsten Propeptid der Isoformen ist. Die Isoform 8.19 besteht ebenfalls aus einem Signalpeptid, einem Propeptid der Aminosäuren 26 - 220 und der durch die Proteasen Easter oder SPE aktivierbaren Cystinknoten-Domäne. Spätzle 8.19 wurde wie Spätzle 11.7 als glykosilierte Isoform

¹ Aminosäurenummerierung nach Isoform 8.19, siehe Abbildung 1.7

identifiziert (DeLotto *et al.*, 2001), die sich wahrscheinlich an den Positionen N48, N114 sowie N164 befinden. Die limitierte Proteolyse des rekombinanten Spätzle 8.19, exprimiert mit dem Baculovirus Expressionssystem, zeigte, dass die Cysteine 1 & 4, 2 & 6 und 3 & 7 durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Das Cystein 5 (Cys318) bildet eine intermolekulare Disulfidbindung aus und ist damit für die Dimerisierung verantwortlich (DeLotto & DeLotto, 1998).



Abbildung 1.7: Sequenzüberlagerung der verwendeten Spätzle Isoformen

Die Überlagerung der Aminosäuresequenzen wurde mit Hilfe des Programmes ClustalW (Chenna *et al.*, 2003) erstellt und zeigt den Aufbau der Spätzle Isoformen aus Exons. Das Signalpeptid ist in Schwarz, das Propeptid in Blau, die Cysteine in Gelb und die Cystinknoten-Domäne in Rot dargestellt. In Magenta ist das im Leseraster verschobene Exon von Spätzle 8.24 markiert. Die potentiellen N-Glykosilierungsstellen sind mit „*“ gekennzeichnet. Die Aminosäurenummerierung erfolgte nach der Isoform Spätzle 8.19. (geändert nach DeLotto *et al.*, 2001)

Neben den zwei in der Entwicklung funktionellen Isoformen wurden auch zwei nicht funktionelle Isoformen ausgewählt. Spätzle 8.24 besitzt keine vollständige Cystinknoten-Domäne, ähnelt aber Spätzle 8.19 vor allem im Propeptid. Neben den Aminosäuren 23 - 48 von Spätzle 8.19, fehlen die Aminosäuren 101 - 121. Vor den Aminosäuren des C-Terminus 197 - 226 kommt es während des Spleißens zu einer Leserasterverschiebung und die Aminosäuren 227 - 326 fehlen durch ein vorzeitiges Stopp-Codon ganz. Somit hat Spätzle 8.24 nur drei der neun Cysteine und die C-terminale Cystinknoten-Domäne fehlt fast vollständig. Da nur ein geringer Teil der Sequenz im Leseraster verschoben ist bevor das Protein endet, wird es trotz der atypischen C-terminalen Sequenz als Modell des Propeptides verwendet. Die zweite in dieser Arbeit verwendete, aber nicht in der Entwicklung funktionelle Isoform ist Spätzle 11.27. Das Protein ist Spätzle 11.7 am ähnlichsten. Neben dem Exon der Aminosäuren 49 - 121 von Spätzle 8.19 fehlen auch die Aminosäuren 189 - 225 und damit die Easter-SPE-Prozessierungsstelle. Ob das Fehlen der Prozessierungsstelle weitere Einflüsse auf die Faltung oder Stabilität und damit der Aktivität der Isoform nimmt, ist unbekannt.

Die Isoformen der Embryonalentwicklungsbibliothek konnten durch ihre mRNA in 0 - 3 h alten Embryonen identifiziert werden. Ihre mRNA degradiert sehr schnell und ist bereits in 3 - 6 h alten Embryonen nicht mehr detektierbar. Eine Ausnahme bildet die Isoform 8.20, sie ist auch in 3 - 6 h alten Embryonen noch zu finden. Die Ursache der Stabilität dieser mRNA sowie die Funktion dieser Isoform ist noch unbekannt (DeLotto *et al.*, 2001).

Zu den beschriebenen Isoformen (Abbildung 1.3) wird noch von fünf zusätzlichen Spätzle Homologe Spz 2 – Spz 6 im *Drosophila* Genom berichtet (Parker *et al.*, 2001). Die Homologen sind eventuell Liganden für einen anderen Rezeptoren (Tauszig *et al.*, 2000). Spätzle und die Homologen besitzen weniger als 30 % Sequenzidentität in der Cystinknoten-Domäne (Anhang A.2). Die Homologen bestehen aus einer Intron-Exon-Struktur und besitzen die meisten Schlüsselaminosäuren für die Ausbildung eines Cystinknotens. Die Zahl der Cysteine in der C-terminalen Domäne variiert von sieben bis neuen Cysteinen, deren Abstand meist kürzer als in der originalen Cystinknoten-Domäne ist. Ob sich diese Cysteine zu einem Cystinknoten-Motiv verbinden können, ist nicht bekannt. Wie im Prototyp werden die Spätzle Homologen als Proformen gebildet und es ist sehr wahrscheinlich, dass sie regulatorisch prozessiert werden müssen, um einen aktiven Liganden zu bilden. Das Spz 4 scheint Einfluss auf die Immunantwort zu nehmen und die Anderen auf die Entwicklung. Es wird angenommen, dass sich die Signalkassette während

der Evolution durch Genverdopplung erweiterte. Die Spätzle Homologen und die Rezeptoren sind zufällig im Genom verteilt (Parker *et al.*, 2001).

Die Immunantwort auf eine mikrobiologische Infektion wurde auch in Schmetterlingen untersucht. Die Proform und die Cystinknoten-Domäne des Spätzle vom Seidenspinner *Bombyx mori* wurden in *E. coli* exprimiert und in Injektionsexperimenten in *Bombyx mori* oder dem Tabakschwärmer *Manduca sexta* auf Funktionen in der Immunantwort untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Cystinknoten-Domäne nicht aber die Proform die Transkription der antimikrobiellen Peptide induzieren kann. Somit muss auch im Seidenspinner die Proform proteolytisch aktiviert werden, um in der Immunantwort wirken zu können (Wang *et al.*, 2007). Die Zahl der Cysteine in der Cystinknoten-Domäne ist wie erwartet konserviert, so dass *B. mori* Spätzle ein Cystinknoten ausbilden kann.

Wie bereits erläutert, besitzt Spätzle neun Cysteine, von denen sieben in der aktiven C-terminalen Domäne angeordnet sind. Während Spätzle keine signifikante Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen zeigt, ist der Abstand der Cysteine in der C-terminalen Domäne ähnlich den Proteinen, die zu der Superfamilie der Cystinknoten gehören. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass Spätzle ein Mitglied dieser Familie ist (Morisato & Anderson, 1994; Morisato & Anderson, 1995). Die Cystinknoten Familie beinhaltet verschiedene Wachstumsfaktoren bzw. Hormone, unter anderem den Nervenwachstumsfaktor (NGF, *nerve growth factor*), den Transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β , *transforming growth factor- β*), den *Platelet-derived* Wachstumsfaktor (PDGF, *platelet-derived growth factor*) (McDonald & Hendrickson, 1993; Murray-Rust *et al.*, 1993), den Knochenwachstumsfaktor (BMP, *bone morphogenetic protein*) und das humane Choriongonadotropin (hCG, *human chorionic gonadotropin*) (Wu *et al.*, 1994). Die Wachstumsfaktoren teilen das gemeinsame Strukturmotiv des Cystinknotens, unterscheiden sich aber in der Art der Dimerisierung (siehe Abbildung 4.2). Der Knochenwachstumsfaktor NGF bildet das Dimer in paralleler Kopf-Kopf-Orientierung durch hydrophobe Wechselwirkungen aus. Das TGF- β und PDGF dimerisieren in antiparalleler Kopf-Schwanz-Orientierung stabilisiert durch eine bzw. zwei intermolekulare Disulfidbrücken (McDonald & Hendrickson, 1993). Der Abstand der Cysteine ist hoch konserviert und ermöglicht durch die Bildung von drei intramolekularen Disulfidbindungen das Falten in der Cystinknoten typischen Form in eine lang gestreckte β -Faltblatt Struktur mit gedrehten, antiparallelen β -Faltblättern. Eine Disulfidbrücke durchdringt einen makrozyklischen Ring, der aus der Polypeptidkette und den beiden anderen Disulfidbrücken gebildet wird. Je nachdem welche Disulfidbrücke den

makrozyklischen Ring durchdringt, werden die Cystinknoten in zwei Klassen unterteilt. In der Klasse Cystinknoten Inhibitoren durchdringt die CysIII-CysIV Disulfidbrücke den makrozyklischen Ring, bei den Wachstumsfaktoren ist es die CysI-CysIV Disulfidbrücke.

Bevor Spätzle in die Familie der Cystinknoten klassifiziert werden konnte, zeigte die Struktur des Coagulogens eine große Ähnlichkeit zu der Struktur des NGFs. Das wasserlösliche Coagulogen aus dem Pfeilschwanzkrebs wird im finalen Schritt der Blutgerinnungskaskade zum unlöslichen Coagulingel gespalten. Wenn auch seine dreidimensionale Struktur der des NGFs sehr ähnlich ist, bildet es keine Dimere (Bergner *et al.*, 1996). Nicht nur der Abstand der Cysteine zeigt Ähnlichkeiten zwischen Spätzle und Coagulogen, auch verbindet beide Proteine die Eigenschaft, dass sie in einer Proteinkaskade mit Trypsin ähnlichen Serinproteasen integriert sind und von diesen gespalten werden müssen.

Die Proformen der Wachstumsfaktoren sind von wissenschaftlichem Interesse, da in einigen Fällen unterschiedliche biologische Aktivitäten im Vergleich zu den reifen Wachstumsfaktoren beschrieben wurden. Das Propeptid des Nervenwachstumsfaktors weist isoliert von der Cystinknoten-Domäne eine undefinierte Struktur auf, im Kontext des proNGFs besitzt es eine strukturierte Anordnung für die spezifische und affine Wechselwirkung mit dem Rezeptor Sortilin/p75^{NTR} (Nykjaer *et al.*, 2004; He & Garcia, 2004). Im Gegensatz zur Bindung des reifen NGFs an den TrkA Rezeptor, welches Neuronenwachstum und Differenzierung induziert (Wiesmann *et al.*, 1999), bewirkt die Bindung an den p75^{NTR} Rezeptor den programmierten Zelltod. Das Propeptid des proNGFs hat ebenfalls einen Einfluss auf die Reifung des Wachstumsfaktors sowie auf die Faltung (Rattenholl *et al.*, 2001a,b). Das Propeptid besitzt somit eine bedeutende Aufgabe in der Steuerung des Zellwachstums. Die ungeordnete Struktur des Propeptides des proNGFs konnte für rekombinantes Maus-NGF mit zwei Strukturen belegt werden. Einerseits können die flexiblen Arme des Propeptides zu einer hufeisenförmigen Struktur angeordnet sein oder eine stäbchenförmige Gesamtstruktur bilden. Diese verschiedenen Konformationen führen zu unterschiedlichen Bindungsaffinitäten des proNGFs zu den Rezeptoren p75^{NTR} und TrkA (Paoletti *et al.*, 2006). Ein weiteres Beispiel in der Gruppe der Wachstumsfaktoren für den stabilisierenden Effekt des reifen Teils auf das Propeptid ist BMP-2 (Hillger *et al.*, 2005). Für TGF- β 1 konnte gezeigt werden, dass das Propeptid β 1-LAP (*latency associated peptide*) die Funktion des reifen Wachstumsfaktors durch extensive Umstrukturierung während der Komplexbildung zwischen TGF- β 1 und β 1-LAP verzögert (McMahon *et al.*, 1996). Spätzle und die Wachstumsfaktoren sind strukturell

verwandt und das Propeptid des nicht aktivierten Spätzle ist ebenfalls unstrukturiert (Weber *et al.*, 2003). Ein Kontext abhängiges Falten des Spätzle Propeptides ist aber bisher nicht bekannt.

Auch wenn Spätzle nur 15 % Sequenzhomologie mit NGF und 18 % mit Coagulogen vorweisen kann, konnte durch *homology modelling* ein Strukturmodell, basierend auf den drei-dimensionalen Strukturen des Coagulogens und NGFs, für die Cystinknoten-Domäne von Spätzle erstellt werden (Mizuguchi *et al.*, 1998). Die Abbildung 1.8 zeigt das monomere und dimere Strukturmodell des Spätzle Cystinknotens.

Das monomere Strukturmodell des Cystinknotens Spätzle zeigt eine gestreckte, nicht globuläre β -Faltblattstruktur. Eine große, neutrale Oberfläche auf einer Seite könnte als Wechselwirkungsfläche in einem Proteinkomplex, zum Beispiel in einem Homodimer dienen. Für eine Dimerisierung spricht auch, dass nach der Modellierung der drei Disulfidbrücken zur Formung des Cystinknotens noch ein Cystein ungepaart verbleibt. Der Abstand und die Geometrie der $C\alpha$ -Atome der ungepaarten Cysteine im modellierten Dimer lässt eine intermolekulare Disulfidbrücke zu.

Es sei angemerkt, dass ein Strukturmodell nicht ersetzend für eine experimentell bestimmte Struktur oder weiterführende biochemische und kristallographische Studien ist.

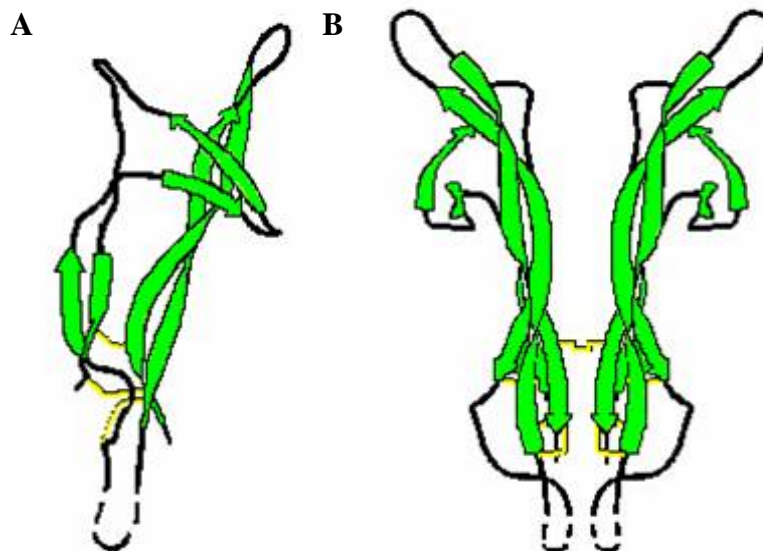


Abbildung 1.8: Strukturmodell des Spätzle Cystinknotens

Die Abbildung zeigt das Strukturmodell der Spätzle Cystinknoten-Domäne in der Sekundärstruktur basierend auf der Ähnlichkeit zu Coagulogen und NGF. Die Cystine wurden in der atomaren Darstellung in Gelb abgebildet. **A** Monomer, **B** Dimer (nach Mizuguchi *et al.*, 1998).

1.3 Spätzle als Ligand des Toll Rezeptors

Mittels *in vitro* Bindung des rekombinanten Spätzle an die rekombinante Ektodomäne des Toll Rezeptors konnte die direkte Interaktion zwischen dem Liganden Spätzle und seinem Rezeptor Toll beschrieben werden. So bindet aktiviertes, dimeres Spätzle zwei Toll Ektodomänen, während inaktives Spätzle den Rezeptor nicht binden kann (Weber *et al.*, 2003). Die Bindung des Liganden an den Toll Rezeptor führt zur Rezeptordimerisierung und zur intrazellulären Weiterführung der Signalkaskade (Underhill, 2003; Hu *et al.*, 2004). An der Zelloberfläche liegt der Toll Rezeptor in einem Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren vor. Die Bindung der Spätzle Cystinknoten-Domäne an die N-terminale Domäne eines Toll Rezeptors überführt den Rezeptor in eine aktive Konformation. Die Affinität der Spätzle Bindung zum zweiten Rezeptor ist durch das erste Bindungsereignis herabgesetzt. Die Bindung des zweiten Rezeptors führt zu einer stabilisierenden Interaktion der C-terminalen Ektodomänen und bringt sie in räumliche Nähe, um das Signal intrazellulär weiterzuleiten. Weiterhin können die Toll Rezeptoren in Lösung Dimere mit schwacher Affinität ausbilden, die vor der Bindung mit dem Liganden dissoziieren (Abbildung 1.9; Weber *et al.*, 2005). Proteolytisch aktiviertes Spätzle bleibt mit dem N-terminalen Propeptid assoziiert und erst nach der Bindung an die Toll Ektodomäne dissoziiert das Propeptid (Weber *et al.*, 2007).

Im Genom von *Drosophila* sind mehrere *toll* verwandte Gene enthalten, die Toll Rezeptoren mit unterschiedlichen Ektodomänen und intrazellulären Region kodieren (Abbildung 1.10).

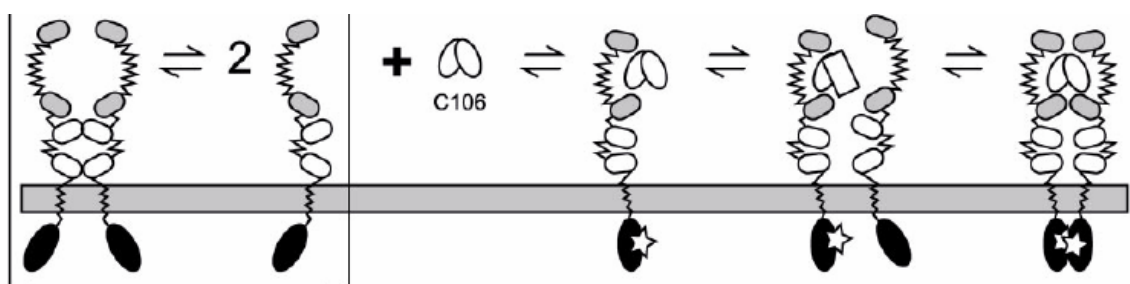


Abbildung 1.9: Das Modell der Signalweiterführung durch den Toll Rezeptor

Die Abbildung zeigt schematisch die Bindung des Liganden Spätzle an den Toll Rezeptor, die zur Rezeptordimerisierung und Signalweiterleitung führen (Weber *et al.*, 2005).

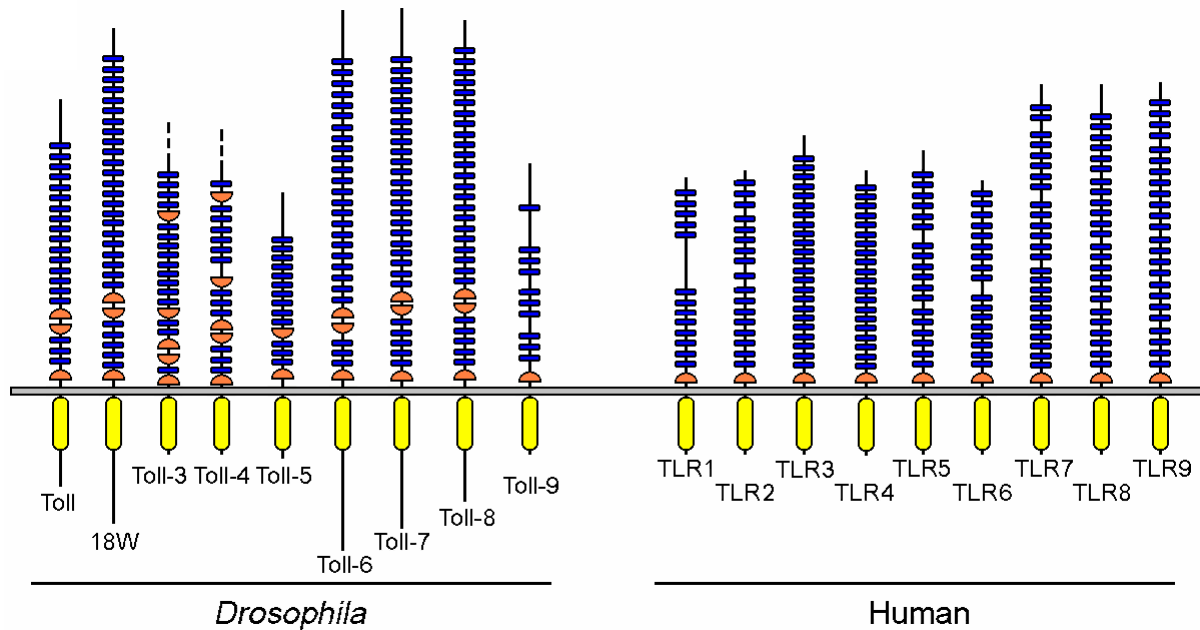


Abbildung 1.10: Die *Drosophila* und humane Toll Familie

Die schematische Darstellung der Rezeptorstrukturen zeigt die Leucin-reichen Wiederholungen (Rechtecke) mit den flankierenden Cystein-reichen Motiven (Halbkreise) der Ektodomänen. In der intrazellulären Region ist die Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR) Domäne (Oval) gekennzeichnet (nach Imler & Hoffmann, 2001).

Die verschiedenen Toll Rezeptoren werden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Fliege exprimiert (Tauszig *et al.*, 2000, Imler & Hoffmann, 2001). So zeigen Experimente, dass Toll, Toll 5 und 18 Wheeler (18 W) in der Entwicklung fungieren (Tauszig *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2003). Die Leucin-reichen Wiederholungssequenzen in der Ektodomäne des Toll Rezeptors wurden auch in Membranproteinen von Menschen und Hefen identifiziert (Hashimoto *et al.*, 1988) und diese Proteine zu der Klasse der Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs, *toll-like receptors*) zusammengeschlossen. Diese TLRs sind aktiv an der interzellulären Signalweitergabe zu Transkriptionsfaktoren mit anschließender Induktion von Effektorgenen beteiligt. Sie sind eine Familie homologer Proteine, die durch Leucin-reiche Wiederholungen und kleinere Cystein-reiche Domänen in der extrazellulären Domäne gekennzeichnet sind. Die zytoplasmatischen Domänen der TLRs sind homolog zu den humanen Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1) und werden als Toll/IL-1-Rezeptor homologe Domänen (TIR) bezeichnet (Kopp & Medzhitov, 1999). Die Rezeptoren der Wirbeltiere und Wirbellosen entstammen einer evolutionären Basis, haben aber dennoch auch funktionelle Unterschiede in der angeborenen Immunantwort, zum Beispiel in der Pathogenenerkennung (Gangloff *et al.*, 2003; siehe 1.1 Signalkaskaden der Embryogenese und der angeborenen Immunantwort).

1.4 Die Serinproteasen Easter und Spätzle Prozessierendes Enzym

Die Serinprotease Easter ist schon lange als extrazytoplasmatische Serinprotease in der Entwicklung der Dorsal-Ventral-Achse in der *Drosophila* Embryogenese bekannt (Chasan & Anderson, 1989). In Injektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Easter sowohl ventral als auch dorsal aktiv sein kann. In *Drosophila* wird Easter als Zymogen exprimiert und ist nach der Prozessierung nur ventral aktiv (Chasan *et al.*, 1992). Die Aktivierung Easters unterliegt mehreren Regulierungen. Während aktives Easter nur in geringen Mengen im Embryo gefunden wurde, weil es zu einem stabilen, hochmolekularen Protease-Inhibitor-Komplex assoziiert, wird Easter durch die Kaskade der drei oberhalb wirkenden Proteasen aktiviert (Misra *et al.*, 1998). Durch aktiviertes Easter kommt es zu einer *feedback* Inhibierung der Protease Gastrulation-Defective, welche die Proteasekaskade initiiert (Dissing *et al.*, 2001). Zudem wird die Aktivität von Easter räumlich durch den Inhibitor Serpin 27A begrenzt (LeMosy, 2006). Als Basis für ein Strukturmodell der katalytischen Domäne von Easter dienten diverse Kristallstrukturen aus der Protein Daten Bank von Trypsin und Trypsin verwandten Domänen (zum Beispiel Trypsin, Chymotrypsin, tPA, Plasmin, Thrombin, Faktor Xa). So konnten eine Ca^{2+} -Bindestelle und die Prozessierungsstellen identifiziert werden (Rose *et al.*, 2003). Easter besteht aus einem Signalpeptid, einem Propeptid und dem reifen Teil. Das aktive Zentrum der Aminosäuren His173, Asp240 und Ser338 befindet sich im reifen Teil und wird durch die drei-dimensionale Struktur in räumliche Nähe gebracht. Bemerkenswert ist der hohe Anteil an 16 Cysteinen im Protein, wovon sich sieben Cysteine im Propart befinden. Aus Strukturvergleichen mit dem Prophenoloxidase aktivierendem Faktor II (PPAFII) aus dem Wimpertierchen *Holotrichia diomphalia* (Piao *et al.*, 2005) nimmt man an, dass drei Disulfidbindungen innerhalb der Clipdomäne gebildet werden und dass das siebte Cystein zur katalytischen Domäne verbunden ist. Durch diese Disulfidbindung bleibt die Clipdomäne nach der Spaltung an die katalytische Domäne gebunden (Rose *et al.*, 2003; Piao *et al.*, 2005; siehe Abbildung 1.11: Modellstrukturen der Initiierung des Toll Signalweges). PPAFII ist keine Serinprotease, besitzt aber eine Trypsin ähnliche Struktur und ist in der Immunantwort des Wimperntierchens integriert.

Das Spätzle Prozessierende Enzym (SPE) ist erst kürzlich als Spätzle Protease identifiziert worden (Jang *et al.*, 2006; Mulinari *et al.*, 2006; Kambris *et al.*, 2006). SPE ist als Protease in der Toll abhängigen Immunantwort integriert. Mittels Injektionsexperimenten mit aktivem SPE in Easter defiziente Embryonen konnte gezeigt werden, dass SPE das funktionelle Homologe zu Easter ist. Wie Easter lässt es die Dorsal-Ventral-Achse in

defizienten Embryonen entwickeln (Jang *et al.*, 2006). Die duale Aktivierung von Spätzle wird durch eine zeitliche und räumliche begrenzte Expression der Serinproteasen SPE im *fat body* und Easter im perivitellinen Raum ermöglicht (Mulinari *et al.*, 2006). SPE spaltet Spätzle an derselben Stelle VSSR↓VGGS wie Easter. Ein Sequenzvergleich zeigt, dass sich Easter und SPE in der Aminosäuresequenz sehr ähnlich sind. Die Positionierung der 16 Cysteine und des aktiven Zentrums sind in Easter und SPE konserviert. Es kann ebenfalls angenommen werden, dass SPE eine Clipdomäne als Propeptid ausbildet.

1.5 Proteinstrukturmodelle der Toll Signalwege

Die Signalkaskade um Spätzle ist strukturell bisher nur wenig charakterisiert. Zu einigen Proteinen oder orthologen Proteine der Signalkaskade um Toll sind Strukturen bekannt und dienen meist als Modell zu den *Drosophila* Proteinen (Abbildung 1.11).

So dient für Spätzle zum Beispiel das bereits erwähnte NGF als Modellstruktur. Für den Toll Rezeptor gibt es orthologe Strukturen der Toll-ähnlichen Rezeptor Ektodomänen sowie der TIR-Domänen. Die extrazelluläre Ektodomäne bindet den Liganden, die Transmembran-Domäne durchdringt die Membran und die intrazelluläre Domäne, auch Toll/Interleukin-Rezeptor Domäne genannt (TIR), ist für die Dimerisierung und Signalweitergabe ins Zytoplasma verantwortlich. Durch Dimerisierung der Ektodomänen zweier Rezeptoren bildet sich die Bindetasche für die Liganden. Die TLR Liganden sind vielfältigste Moleküle (RNA, Lipide, Proteine) und genauso vielfältig sind die Bindemechanismen. Die Strukturen der humanen TLR 3 Ektodomäne (PDB Code: 1ZIW4, Choe *et al.*, 2005), Hybride der humanen TLR 4 Ektodomäne und VLRB (*variable lymphocyte receptor B*) mit und ohne gebundenem Endotoxin Antagonist Eritoran (PDB Code: 2Z66, 2Z65, 2Z64, 2Z63, 2Z62, Kim *et al.*, 2007), der Maus TLR 3 Ektodomäne mit und ohne gebundener dsRNA (PDB Code: 3CIY bzw. 3CIG, Liu *et al.*, 2008) sowie die Struktur des Heterodimers der humanen TLR 1/TLR 2 Ektodomäne mit gebundener Triacetyl-Lipopeptid (PDB Code: 2Z80, 2Z81, 2Z82, 2Z7X, Jin *et al.*, 2007) sind Ergebnisse der Strukturbestimmung von TLR Ektodomänen. Die TIR Domänen der TLR enthalten eine typische Rossmann Faltung bestehend aus zwei Schichten α -Helices, welche eine Schicht an β -Faltblättern umschließen. Die Strukturen der humanen TIR Domänen des TLR 10 (PDB Code: 2J67, Nyman *et al.*, 2008), des TLR 2 (PDB Code: 1FYW, Xu *et al.*, 2000) und des TLR 1 (PDB Code: 1FYV, Xu *et al.*, 2000) sind bekannt.

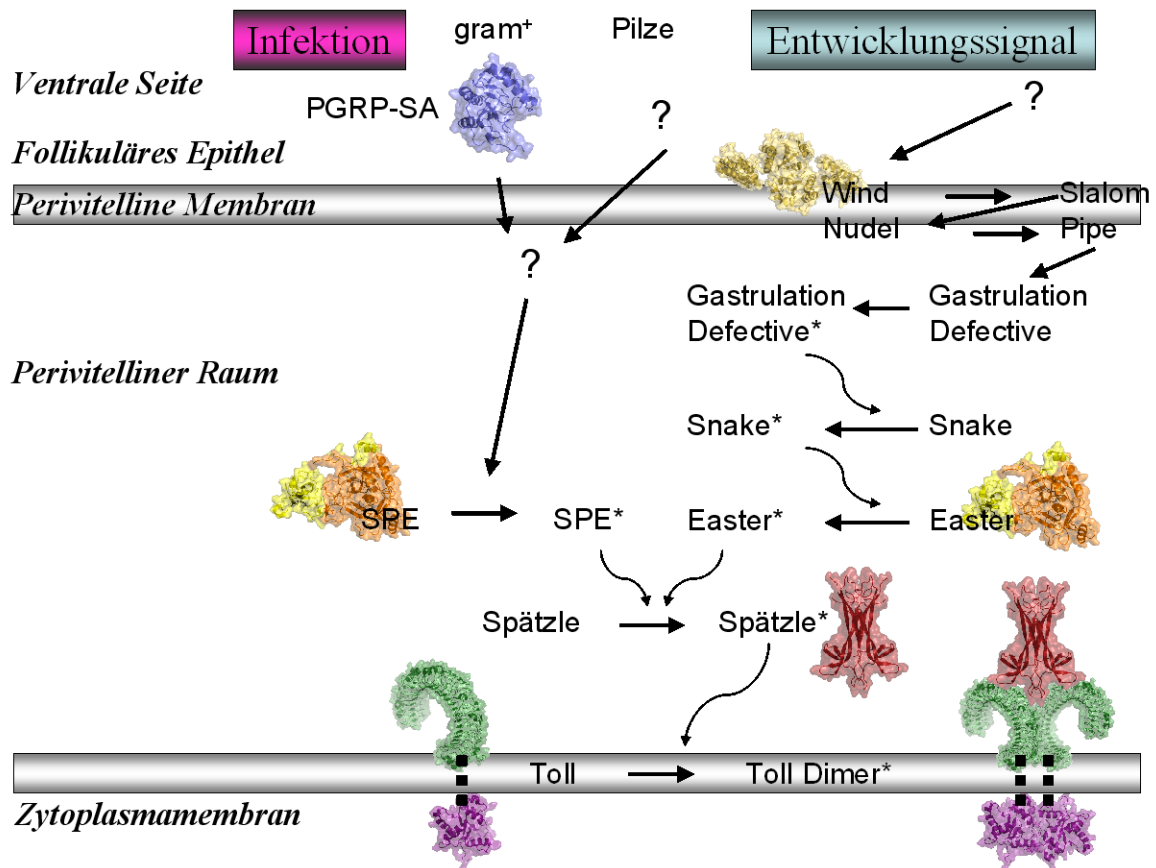


Abbildung 1.11: Modellstrukturen der Initiierung des Toll Signalweges

Es sind die Original- oder Modellstrukturen für die Proteine der Initiierung des Toll Signalweges ohne Berücksichtigung des Maßstabes dargestellt. Das *Drosophila* Peptidoglycan erkennende Protein PGRP-SA ist in Blau (Reiser *et al.*, 2004; PDB Code: 1SXR), das *Drosophila* Wind Dimer ist in Gelb (Ma *et al.*, 2004; PDB Code: 1OVN), das Easter/SPE orthologe Protein Prophenoloxidase aktivierender Faktor II PPAFII aus *Holotrichia diomphalia* ist die Clip-Domäne in Gelb und die katalytische Domäne in Orange (Piao *et al.*, 2005; PDB Code: 2B9L), das Spätzle orthologe Protein NGF aus *Mus musculus* ist als Dimer in Rot (McDonald *et al.*, 1994, PDB Code: 1BET) und Toll ist durch die orthologe Ektodomäne des TLR 3 aus *Homo sapiens* in Grün (Choe *et al.*, 2005; PDB Code: 1ZIW) sowie durch die orthologe TIR Domäne des humanen TLR 2 in Violett (Xu *et al.*, 2000; PDB Code: 1FYW) abgebildet. Aktivierte Proteine sind mit „*“ gekennzeichnet.

Die extrazelluläre Domäne des *Drosophila* Toll Rezeptors enthält mindestens 15 Wiederholungen einer 24 Aminosäuren langen Sequenz, die reich an Leucinen ist. Die konkave Seite der hufeisenförmige Ektodomäne besteht aus parallelen β -Faltblättern, die konvexe Seite aus kurzen Helices und Schleifen (Gay & Keith, 1991). Erst vor kurzem wurde eine durch Elektronenmikroskopie ermittelte, niedrig aufgelöste Struktur der *Drosophila* Toll Ektodomäne mit und ohne Spätzle veröffentlicht. Die Bindung des aktivierten, dimeren Spätzle erwirkt eine konformationelle Änderung der Krümmung des

Toll Rezeptors (Gangloff *et al.*, 2008). Die verschiedenen Spätzle Isoformen könnten verschiedene Signalkomplexe bilden.

Die Spätzle aktivierenden Proteasen SPE und Easter besitzen ähnliche Sequenzen zu dem Clip-Domäne enthaltendem PPAF (aus *Holotrichia diomphalia*, PDB Code: 2B9L, Piao *et al.*, 2005). Die Clip-Domäne und katalytische Domäne sind über eine Disulfidbrücke verbunden und bleiben auch nach der Aktivierung durch Spaltung der Clip-Domäne assoziiert.

Zudem ist die Kristallstruktur von Wind bekannt (PDB Code: 1OVN, Ma *et al.*, 2004). Wind ist das Protein des Gens *windbeutel* aus *Drosophila* und gehört zu den Disulfidisomerasen, welche die Bildung, Reduktion und Isomerisierung von Disulfidbindungen in Abhängigkeit eines CXXC Motivs katalysieren. Es ist ein antiparalleles Homodimer mit einer katalytischen und α -helikalen Domäne. Die Dimerisierung erfolgt durch die katalytische Domäne. Das CXXC Motiv der katalytischen Domäne ist partiell oberflächenexponiert, die Cysteine sind aber nicht redoxaktiv. Beide Domänen werden für den Transport von Pipe in den Golgi Apparat benötigt (Ma *et al.*, 2004). Weiterhin sei die Kristallstrukturen des Peptidoglycan erkennendem Proteins SA (PGRP-SA, PDB Code: 1SXR, Reiser *et al.*, 2004) aus *Drosophila* erwähnt. PGRP-SA ist eines von mehreren Peptidoglycan erkennenden Proteinen mit eigener Spezifität für N-Acetylglucosamin (GluNAC) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) von gram-positiven Bakterien.

Der Komplex aus den *death* Domänen der Serin-Threoninkinase Pelle und dem Adaptorprotein Tube wurde ebenfalls kristallisiert (PDB Code: 1D2Z, Xiao *et al.*, 1999). Der Komplex ist für den Import des Transkriptionsfaktors Dorsal in den Zellkern zuständig. Die Proteine bilden ein Heterodimer bestehend aus jeweils einem Sechshelixbündel (Xiao *et al.*, 1999). Die Struktur der C-terminalen Domäne des humanen MyD88 wurde durch NMR bestimmt und gehört zu den TIR Domänen (PDB Code: 2JS7, Rossi *et al.*, *to be published*). Weiterhin ist die Struktur des Dorsal orthologen Proteins Gambif1 gebunden an DNA aus *Anopheles gambia* bekannt. Drei Argininseitenketten der N-terminalen Domäne binden in ein GGG Motiv der DNA (PDB Code: 1BVO, Cramer *et al.*, 1999; Abbildung 1.12).

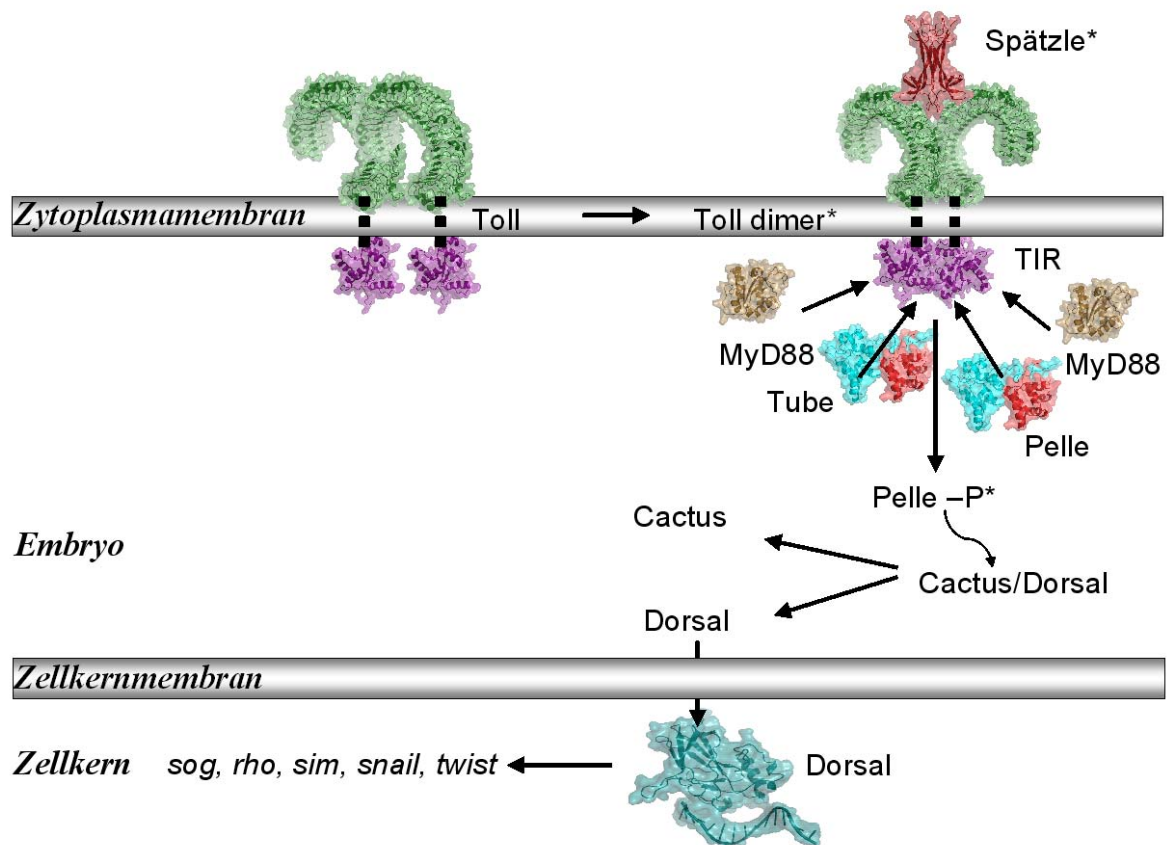


Abbildung 1.12: Modellstrukturen der Signalweiterleitung des Toll Signalweges

Es sind die Original- oder Modellstrukturen für die Proteine der Signalweiterleitung des Toll Signalweges ohne Berücksichtigung des Maßstabes dargestellt. Das Spätzle orthologe Protein NGF ist als Dimer aus *Mus musculus* in Rot (McDonald *et al.*, 1994, PDB Code: 1BET), Toll ist durch die orthologe Ektodomäne des TLR 3 aus *Homo sapiens* in Grün (Choe *et al.*, 2005; PDB Code: 1ZIW) sowie durch die orthologe TIR Domäne des humanen TLR 2 in Violett (Xu *et al.*, 2000; PDB Code: 1FYW) dargestellt. Ebenso sind das dMyD88 orthologe Protein MyD88 als C-terminale Domäne aus *Homo sapiens* in Braun (Rossi *et al.*, *to be published*; PDB Code: 2JS7), das *Drosophila* Pelle und Tube Dimer der *death* Domänen ist in Rot und Blau (Xiao *et al.*, 1999; PDB Code: 1D2Z) sowie das Dorsal orthologe Protein Gambif1 als N-terminale Domäne gebunden an DNA aus *Anopheles gambia* in Blau (Cramer *et al.*, 1999; PDB Code: 1BVO) abgebildet. Aktivierte Proteine sind mit „*“ markiert.

1.6 Problematik des Themas und Ziel der Arbeit

Bisherige Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass Spätzle, aber nicht die Proform, direkt an den Toll Rezeptor bindet. Erst nach der proteolytischen Spaltung des unstrukturierten Propeptides erfolgt eine Bindung an den Rezeptor. Die Diversität in den Isoformen deutet darauf hin, dass das Propeptid eine eigene Funktion hat. Während die Funktion des Signalpeptides und der Cystinknoten-Domäne als Ligand des Toll Rezeptors bekannt ist, ist die Struktur und Funktion der unterschiedlichen Propeptide unklar. Neben der Funktion als Chaperon kommen inhibitorische Einflüsse auf die prozessierenden Proteasen (Misra *et al.*, 1998) oder inhibitorische Einflüsse auf die Rezeptorbindung in Betracht. Ebenso wird ein stabilisierender Effekt des assoziierten Propeptides nach der proteolytischen Aktivierung beschrieben (Weber *et al.*, 2007). Einen solchen entscheidenden Einfluss des Propeptides konnte für den humanen Nervenwachstumsfaktor (NGF), der strukturell mit Spätzle verwandt ist, bereits gezeigt werden. Das isolierte NGF Propeptid besitzt eine undefinierte Struktur, die im Kontext des proNGFs eine strukturierte Anordnung für eine spezifische und affine Wechselwirkung mit dem Rezeptor annimmt. Während proNGF durch die Bindung an den Sortilin/p75^{NTR} Rezeptor zur Apoptose führt (Nykjaer *et al.*, 2004; He & Garcia, 2004), bewirkt eine proteolytische Aktivierung des proNGFs zu reifem NGF die Bindung an den TrkA-Rezeptor und damit das Zellwachstum und eine Zelldifferenzierung (Wiesmann *et al.*, 1999).

Es ist bislang nicht erforscht, welche der Spätzle Isoformen in welchen Signalweg integriert ist und ob es strukturelle Unterschiede in den Isoformen gibt. Ebenso bleibt die Frage nach der Funktion der verschiedenen Isoformen offen. Durch die biophysikalische Charakterisierung verschiedener Isoformen wird erhofft, Informationen über die Funktionalität und eventuelles Kontext-abhängiges Faltungsverhalten des Propeptides zu erfahren. Dazu sind die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der Isoformen zu ermitteln und zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

Für die Durchführung der Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2.1 angeführten Geräte verwendet.

Tabelle 2.1: Hersteller und Typ der verwendeten Geräte

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
Bioreaktor	C-DCU	B. Braun Biotech International
Blot Apparatur	Semi-Phor	Hoefer Scientific Instruments
CD Spektropolarimeter	J-810	Jasco
Fluorimeter	Fluoromax-3	Jobin Yvon Horiba
FPLC	Äkta FPLC	GE Healthcare
French Press	Gaulin Homogenisator LAB 60/60 bzw. Micro LAB 40/60	APV Schröder
HPLC	Probengeber Gina50 Pumpe Model480 Detektor UVD 170S oder 340S	Gynkotec
Imager	Oasis LS3 Protein Crystal Imaging System	Veeco
Massenspektrometer	ESI-Q-TOF 2 Ultraflex-II TOF/TOF	Waters Bruker Daltonics
Mikroskop	KL1500 LCD 10447158	Leica
NMR Spektrometer	Avance II 600 MHz Avance 900 MHz	Bruker
PCR Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Pipettierroboter	Cartesian Dispensing System	Genomic Solutions
Röntgeneratore mit Detektor und Kryostrom	RA Micro007 R-AXIS IV++ XSTREAM2000	RigakuMSC
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultra-Turrax	T25	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik
UV/VIS Spektrophotometer	Ultrospec 3300 pro Ultrospec 4000	Amersham Biosciences Pharmacia Biotech
Waagen	TE3102S bzw. BP4100S Analytical plus	Sartorius Ohaus
Zentrifugen	Biofuge pico Universal 32R Avanti J-20 bzw. J-25	Heraeus Hettich Zentrifugen Beckman Coulter Inc.

Die Chemikalien wurden soweit nicht anders erwähnt von den Firmen Roth, Sigma, Merck, AppliChem oder Fluka in der Reinheitsstufe p. A. bezogen.

2.2 *E. coli* Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *E. coli* Stämme verwendet.

XL1 blue (Stratagen): *rec A1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1* [F' *proAB lacI_qΔM15 Tn 10* (Tet^R)]

BL21 (DE3) (Novagen): F' *ompT hsdS_B (r_B-m_B-)* *gal dcm* (DE3)

BL21 (DE3) pUBS (Novagen): F' *ompT hsdS_B (r_B-m_B-)* *gal dcm* (DE3) pUBS (Kan^R)

Rosetta 2 (DE3) (Novagen): F' *ompT hsdS_B (r_B-m_B-)* *gal dcm* (DE3) pRARE2 (Cam^R)

Für die Plasmidpräparation wurde der Stamm XL1 blue mit einer Tetracyclinresistenz verwendet. Um die Expression von Proteinen zu optimieren, wurden verschiedene Expressionsstämme verwendet. Der Stamm BL21 (DE3) ist *lon* und *ompT* Protease defizient und enthält eine Kopie des Gens für die T7 Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors. Dieser Promotor ist mit IPTG induzierbar. Die nach Induktion synthetisierte T7 Polymerase transkribiert die in den pET-Vektoren inserierten Zielgene.

Die Rosetta Zellen sind für die verbesserte Expression von eukaryotischen Proteinen entwickelt worden. Sieben tRNAs für Isoleucin, Arginin, Lysin, Prolin und Glycin Codone (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, CGG und GGA), die oft in eukaryotischen Organismen aber selten in *E. coli* benutzt werden, sind auf einem Chloramphenicol resistenten Plasmid kodiert. Die BL21 (DE3) pUBS Zellen enthalten ähnlich wie die Rosettas auf einem Kanamycin resistenten Plasmid zwei zusätzliche tRNAs für Arginin Codone (AGG und AGA). Die Medien für die *E. coli* Kultivierung wurden unter Berücksichtigung der Resistenzen mit 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin, 15 µg/mL Tetracyclin oder 50 µg/mL Chloramphenicol aus Antibiotika-Stammlösungen versehen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Expressionsvektoren

Als Expressionsvektoren wurden die Plasmide pET15b und pET21a von Novagen ausgewählt, um die Proteine in *E. coli* als Fusionsproteine mit N- oder C-terminalem His₆-tag herzustellen. Der N-terminale His₆-tag (MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM) kann durch Thrombin gespalten werden. Der C-terminale His₆-tag (LEHHHHHH) ohne Restriktionsstelle hat neben der Kürze an hinzugefügten Aminosäuren den Vorteil, dass er nur vollständig exprimiertes Protein durch Affinitätschromatographie selektiert.

Die pET-Vektoren besitzen einen IPTG induzierbaren T7 Promotor und kodieren eine Ampicillin Resistenz. Als Insertionspunkt in die *Multiple Cloning Site* (MCS) wurden die Schnittstellen der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI für pET15b sowie NdeI und XhoI für pET21a ausgewählt.

2.3.2 cDNA der Spätzle Isoformen sowie Easter und SPE

Die in dieser Arbeit verwendeten Isoformen von Spätzle tragen folgende Genbank Bezeichnung: AF237964 Spätzle 11.27, AF237968 Spätzle 11.7, AF237969 Spätzle 8.19, AF237972 Spätzle 8.24. Vektoren mit den cDNAs dieser Isoformen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Robert DeLotto, Institut for Molekylær Biologi, Københavns Universitet, Dänemark zur Verfügung gestellt.

Die DNA von Easter und SPE wurden nach der Aminosäuresequenz P13582 und Q9VCJ8 aus der Datenbank ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003) ohne Signalpeptid von GeneArt, Deutschland für die Expression in *E. coli* optimiert synthetisiert.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Primer für die PCR wurden mit einer komplementären Region zur cDNA, mit Restriktionsschnittstellen und dem benötigten Überhang an Nukleotiden von Metabion synthetisiert (Anhang Tabelle A.1).

Für die cDNA der Isoformen Spätzle 11.7, Spätzle 11.27 und Spätzle 8.19 konnten dieselben Primer benutzt werden, da diese Isoformen aus denselben N- und C-terminalen Exons bestehen. Für die Isoformen Spätzle 8.24 wurden eigene Primer generiert. Als Template für die PCR wurden die Vektoren mit den cDNAs der Isoformen verwendet.

Ein typischer PCR-Ansatz bestand aus 1 μL Template, 1 μL Primer „up“ 10 pmol/ μL , 1 μL Primer „down“ 10 pmol/ μL , 1 μL dNTP-Mix 10 mM (100 mM dNTP Set PCR Grade, Invitrogen), 5 μL 10 x *pfu*-Polymerasepuffer, 0,3 μL *pfu*-Polymerase (Stratagen) und dd H₂O, mit dem auf ein Endvolumen von 50 μL aufgefüllt wurde.

Die PCR bestand aus 28 Zyklen, in denen DNA und Primer bei 94 °C für 30 sec denaturiert wurden, bei 52 °C für 30 sec die Primer an die DNA hybridisierten und bei 72 °C für 65 sec die *pfu*-Polymerase die neuen Stränge synthetisierte. Nach der PCR wurde ein Teil des synthetisierten PCR-Produktes zur Größenüberprüfung auf ein 1 % (w/v) Agarosegel mit Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer aufgetragen. Die Proben wurden 1 : 1 in Ladepuffer aufgetragen. Als Marker diente eine DNA Leiter (100 bp oder 1 kb DNA Ladder, Fermentas) und das Gel wurde bei 100 V für 20 min laufen gelassen.

Zur weiteren Verwendung des PCR Produktes wurde dieses mit dem PCR-Reinigungskit (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) gereinigt. Statt mit EB-Lösung wurde das PCR-Produkt mit Wasser eluiert, um es direkt im anschließenden Restriktionsverdau verwenden zu können. Zur Überprüfung der Konzentration des PCR Produktes wurde im Anschluss wieder ein 1 % (w/v) Agarosegel angefertigt.

Eine Abwandlung der PCR ist die Kolonie-PCR, die verwendet wurde, um Transformanden einer Ligation auf Integration des Inserts zu überprüfen. Hierzu wurde eine vereinzelt Kolonie von einer Agarplatte in 50 μL Wasser überführt und bei 95 °C 5 min aufgeköcht, um die DNA zu isolieren. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 10 min bei 12500 g sedimentiert. Der Überstand enthielt das Plasmid und wurde anstatt des dd H₂O und des Templates in der anschließenden PCR eingesetzt. Statt *pfu*-Polymerase wurde die *taq*-Polymerase (New England Biolabs) verwendet, da das Insert nur für eine visuelle Bestätigung in einem 1 % (w/v) Agarosegel benötigt wurde.

50 x TAE:	2 M Tris/HCl, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,0
Ladepuffer Agarosegele:	50 % (w/v) Glycerin (KMF Laborchemie), 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in 1 x TAE

2.3.4 Restriktionsverdau und Ligation

Das gereinigte PCR-Produkt und die Plasmide wurden durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen NdeI / BamHI oder NdeI / XhoI (New England Biolabs oder Fermentas) entsprechend ihrer *Multiple Cloning Site* gespalten.

Für einen 20 µL Ansatz wurden 10 µL DNA, 2 µL 10 x Restriktionspuffer, 2 µL 10 x BSA, 0,5 µL NdeI auf 19,5 µL mit dd H₂O aufgefüllt und 1 h bei 37 °C verdaut. Erst dann wurde 0,5 µL BamHI oder XhoI hinzugegeben und 3 h bei 37 °C weiter inkubiert. Vor der Ligation wurden der Puffer und die Enzyme von der DNA durch die Verwendung des PCR-Reinigungskits (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) abgetrennt. Zur Überprüfung wurden die Restriktionsproben auf einem 1 % (w/v) Agarosegel analysiert.

Das Plasmid und das Insert wurden mit der T4 DNA Ligase (New England Biolabs) für 48 h bei 8 °C ligiert, dabei war das Insert im Überschuss vorhanden. Zu 1,5 µL Plasmid wurden 4 µL Insert sowie 2,5 µL dd H₂O gegeben und bei 45 °C für 5 min zum Trennen der DNA-Stränge erhitzt. Erst dann wurde nach Abkühlen des Ansatzes auf Eis 1 µL 10 x T4 DNA Ligasepuffer und 1 µL T4 DNA Ligase hinzugefügt.

2.3.5 Transformation

Aliquots von kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 µL Ligationsansatz oder 0,5 µL Plasmid einer Plasmidpräparation (siehe 2.3.6 Plasmidpräparation von Vorkulturen) versetzt. Nach 30 min auf Eis wurde ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt. Nachdem die Zellen wieder auf Eis abgekühlt waren, folgte die Zugabe von 800 µL LB Medium ohne Antibiotikum sowie ein Inkubationsschritt von 45 bis 60 min bei 37 °C und 500 rpm im Thermoblock. Auf eine LB-Agarplatte mit dem der Resistenz entsprechendem Antibiotikum wurden 200 µL des Transformationsansatzes unter sterilen Bedingungen ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Agar: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/w) Agar

2.3.6 Plasmidpräparation von Vorkulturen

Für die Vorkultur der Plasmidpräparation wurden 4 mL LB-Medium mit Antibiotikum versetzt, unter sterilen Bedingungen angeimpft und für 15 - 16 h bei 125 rpm und 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 8000 g für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet wurde für die Plasmidpräparation (Plasmid Mini Kit, Qiagen) verwendet. Die Präparation erfolgte gemäß Protokoll mit der Ausnahme, dass das Plasmid mit Wasser statt mit Puffer EB eluiert wurde. Die Präparation des Plasmides wurde auf einem 1 % (w/v) Agarosegel in 1 x TAE-Puffer überprüft.

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl

50 x TAE: 2 M Tris/HCl, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,0

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Die *E. coli* Bakterien können durch Behandlung mit Calciumchlorid in die Lage versetzt werden, DNA aus dem Medium aufzunehmen.

100 mL LB-Medium wurden mit 1 mL einer 4 mL Vorkultur angeimpft, die 15 - 16 h bei 37 °C inkubiert worden war. Diese Hauptkultur wurde ca. 2 h bei 37 °C und 125 rpm inkubiert, bis die Absorption $A_{600\text{nm}} \sim 0,3 - 0,5$ AU erreicht hatte. Danach wurden jeweils 50 mL Kultur in ein steriles Zentrifugenröhrchen gefüllt, auf Eis gekühlt und bei 4 °C, 5000 g für 15 min zentrifugiert. Zum Pellet wurden je Zentrifugenröhrchen 30 mL sterile, gekühlte, 0,1 M CaCl₂-Lösung hinzugeben und das Zellpellet suspendiert. Nach diesem Waschschrift wurde die Suspension für 5 min auf Eis inkubiert und erneut bei 4 °C, 5000 g für 15 min zentrifugiert. Zum Pellet wurde jeweils 1,5 mL gekühlte 0,1 M CaCl₂-Lösung gegeben und das Zellpellet suspendiert. Nach 2 h Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension mit einem einfachen Volumen an 50 % sterilem Glycerin (KMF Laborchemie) gemischt. Je 200 µL Zellen wurden in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl

2.4.2 Proteinexpression

Eine Testexpression von neuen Proteinkonstrukten wurde im *batch* Verfahren in 250 mL Schüttelkolben mit 50 mL LB- oder TB-Medium bei 37 °C und 125 rpm durchgeführt. Die Kulturen wurden mit dem benötigten Antibiotikum versehen und 1 %ig angeimpft. Bei einer Absorption $A_{600\text{nm}} \sim 0,5$ AU wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG induziert und 4 h bei 37 °C weiter inkubiert. Nach der Induktion wurde stündlich eine Probe entnommen, um die Absorption $A_{600\text{nm}}$ zu bestimmen und die Produktion an Protein auf einem SDS-Gel analysieren zu können. Die Kultivierung wurde beendet, indem die Zellen bei 5000 g für 10 min zentrifugiert worden. Die Zellen wurden bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

Größere Proteinmengen wurden unter denselben Bedingungen in 5 L Schüttelkolben mit 1,5 L LB-Medium oder im 15 L Bioreaktor hergestellt. Der Bioreaktor verfügte über eine Regelung der Temperatur, des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdrucks. Die Rührgeschwindigkeit und die Begasungsrate wurden dem Sauerstoffbedarf der Kultur automatisch angepasst. Als Kultivierungsmedium wurden 5 L Hefeextrakt und 1 L Glucose-Salz-Lösung mit dem benötigten Antibiotikum verwendet. Die Hauptkultur wurde mit 2 x 200 mL LB-Medium angeimpft. Stündlich wurden Proben entnommen, um die $A_{600\text{nm}}$ und den Glucosegehalt überprüfen zu können. Nachdem die Glucose aufgebraucht war, startete die Zugabe der *feeding*-Lösung. Ab einer Absorption $A_{600\text{nm}} \sim 50$ AU wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4 h Expression wurde die Kultur bei 5000 g, 10 °C für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei -80 °C gelagert.

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl

LB-Agar: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 1 % Agar

TB-Medium: 1,2 % (w/v) Trypton, 2,4 % (w/v) Hefeextrakt, 0,4 % (v/v) Glycerin (KMF Laborchemie), 50 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,0

Hefeextrakt-Medium: 6 % (w/v) Hefeextrakt (Deutsches Hefewerk, Hamburg),
0,06 % (w/v) NH_4Cl , 0,02 % (v/v) Antischaummittel

Glucose-Salz-Lösung: 3 % (w/v) Glucose, 0,4 % (w/v) MgSO_4 , 6,6 % (w/v) K_2HPO_4
jeweils getrennt autoklavieren

feeding-Lösung: 30 % (w/v) Hefeextrakt (Deutsches Hefewerk, Hamburg), 25 %
(v/v) Glycerin (KMF Laborchemie)

2.4.3 Zellaufschluss

Die Zellen wurden entweder in 5 mL IB I pro g Zellen bei anschließender *inclusion-bodies*-Aufreinigung (siehe 2.5.5 *inclusion-bodies*-Aufreinigung und Solubilisation) oder in 5 mL NiNTA Bindepuffer pro g Zellen bei anschließender Affinitätschromatographie (siehe 2.5.8 Proteinreinigung mittels FPLC) mit dem Ultraturrax suspendiert. Es wurden 1,5 mg Lysozym (SIGMA) pro g Zellen hinzugefügt und für 30 min bei 4 °C gerührt. Der Zellaufschluss erfolgte in drei Passagen an der kleinen oder großen Gaulin mit 40 mL bzw. 800 mL Nutzvolumen und einem Druck von 800 bis zu 1200 bar. Im Anschluss wurde die DNA durch einen enzymatischen Verdau mit 0,05 - 0,1 µL Benzonase (SIGMA) pro mL Zellaufschlussvolumen bei pH 8,0 mit 3 mM MgCl₂ für 30 min bei 20 °C abgebaut, bei löslichem Protein bei 4 °C.

IB I: 0,1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0

NiNTA Bindepuffer: 0,1 M Tris/HCl, 20 mM Imidazol, pH 7,4

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnten Proteinproben auf ihre Zusammensetzung untersucht werden. Es wurden 12 % oder 15 % SDS-Gele mit einem Proteinmarker (BenchMark Protein Ladder, Invitrogen) verwendet, um Proteine in 1 x Lämmli Laufpuffer bei 100 V etwa 20 min und anschließend bei 200 V 1 h elektrophoretisch zu trennen. Je nachdem welche Proben zu untersuchen waren, unterschieden sich die Probenvorbereitungen sowie der SDS-Probenpuffer.

In Expressionsproben mussten zunächst die Zellen aufgeschlossen werden. Dafür wurden 200 µL 8 M Harnstoff, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4 auf das Zellpellet gegeben und suspendiert. Um nur die löslich exprimierten Protein zu erhalten, wurde 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4 verwendet. Die Zellen wurden 10 sec mit Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 12500 g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde 1 : 1 mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert.

In Guanidin denaturierte oder zu verdünnte Proben wurden mittels NaDoc-Fällung umgepuffert bzw. konzentriert. Hierzu wurden 100 µL bis zu 1 mL der gewünschten Probe mit dd H₂O auf 1 mL aufgefüllt, mit 100 µL 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat (NaDoc) gemischt und mit 200 µL 10 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt. Die präzipitierten Proteine wurden bei 12500 g für 15 min zentrifugiert, der Überstand komplett entfernt und das Pellet mit 1,5 M Tris/HCl, pH 7,4 gelöst. Das gelöste Pellet wurde ebenfalls 1 : 1 mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese jeweils 10 - 20 min in Fairbanks A, B, C und D gefärbt bzw. entfärbt.

Sollte gefaltetes Protein auf seinen oligomeren Zustand überprüft werden, wurde die Proteinprobe mit SDS-Probenpuffer ohne Reduktionsmittel gemischt. Die SDS-Gele, deren Proben eine geringe Proteinkonzentration enthielten, wurden mit Silberionen gefärbt (PageSilver Silver Staining Kit, Fermentas).

10 x Lämmli: 25 mM Tris/HCl, 0,2 M Glycin, 0,3 mM SDS, pH 8,9

reduzierender 3 x SDS-Probenpuffer: 175 mM Tris/HCl, 6 % (w/v) Glycerin (KMF Laborchemie), 5 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) β-Mercaptoethanol, 0,0125 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

nicht reduzierender 3 x SDS-Probenpuffer: 175 mM Tris/HCl, 6 % (w/v) Glycerin (KMF Laborchemie), 5 % (w/v) SDS, 0,0125 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

Fairbanks A: 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250

Fairbanks B: 10 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250

Fairbanks C: 10 % (v/v) Essigsäure, 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250

Fairbanks D: 10 % (v/v) Essigsäure

2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm am UV Spektrophotometer nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet (Gleichung 1).

$$A = c * l * \varepsilon$$

Gleichung 1

A ... Absorption (AU)

ε ... Extinktionskoeffizient ($M^{-1} * cm^{-1}$)

l ... Schichtdicke (cm)

c ... Konzentration (M)

Die Extinktionskoeffizienten der Fusionsproteine wurde mit ProtParam des ExPASy Proteomics Server (Gasteiger *et al.*, 2003) unter der Annahme berechnet, dass die molaren Extinktionskoeffizienten aus der Proteinsequenz ermittelt werden können (Gleichung 2). Dabei wurden die molaren Extinktionskoeffizienten von Tyrosin, Tryptophan und Cystin zu dem Extinktionskoeffizient des Proteins in Wasser zusammengefasst (Edelhoch *et al.*, 1967; Gill & von Hippel., 1989).

$$\varepsilon(denat) = \#(Tyr) * \varepsilon(Trp) + \#(Trp) * \varepsilon(Trp) + \#(Cystine) * \varepsilon(Cystine)$$

Gleichung 2

mit (Pace *et al.*, 1995) $\varepsilon(Trp) = 1490 (M^{-1} * cm^{-1})$

$\varepsilon(Trp) = 5500 (M^{-1} * cm^{-1})$

$\varepsilon(Cystine) = 125 (M^{-1} * cm^{-1})$

ε ... Extinktionskoeffizient ($M^{-1} * cm^{-1}$)

... Anzahl (1)

denat ... denaturiertes Protein

Tyr ... Tyrosin

Trp ... Tryptophan

Für die Spätzle Isoformen wurden die Extinktionskoeffizienten nach ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003) für das denaturierte Protein ohne disulfidverbrückte Cysteine verwendet. Der native Extinktionskoeffizient mit Berücksichtigung der Disulfidverbrückung wurde manuell bestimmt, indem die Absorption bei 280 nm von nativen Protein gemessen, das Protein in reduzierenden, denaturierenden Puffer verdünnt und erneut die Absorption gemessen wurde. Aus der Absorption des nativen und denaturierten Proteins nach Gleichung 1 ergibt sich der native Extinktionskoeffizient zu (Gleichung 3):

$$\varepsilon(\text{nat}) = \frac{A(\text{nat})}{A(\text{denat})} * \varepsilon(\text{denat}) * VF \quad \text{Gleichung 3}$$

ε ... Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)

A ... Absorption bei 280 nm (AU)

VF ... Verdünnungsfaktor (1)

denat ... denaturiertes Protein

nat ... natives Protein

Die Proteinkonzentration wurde von (M) auf (g/L) unter Berücksichtigung der molaren Masse des Monomers umgerechnet (Gleichung 4). Somit beziehen sich die angegebenen Proteinkonzentrationen immer auf die Konzentration des Monomers. Die molare Masse wurde ebenfalls aus der Proteinsequenz mit ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003) berechnet und mittels Massenspektrometrie überprüft.

$$c(\text{protein}) = \frac{A * MW}{\varepsilon * l} \quad \text{Gleichung 4}$$

c(Protein) ... Konzentration ($\text{g} * \text{L}^{-1}$)

A ... Absorption (AU)

ε ... Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)

MW ... molare Masse ($\text{g} * \text{mol}^{-1}$)

2.5.3 Konzentrierung von Proteinlösungen

Für die Proben der SDS-PAGE wurde die NaDoc-Fällung verwendet, um Volumina bis 1 mL zu konzentrieren oder aus Guanidin umzupuffern (siehe 2.5.1 Denaturierende Polyacrylamid-gelelektrophorese).

Mit Filtrationseinheiten (Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices, Millipore) in den Größen 10 k und 30 k NMWL (*nominal molecular weight limit*) wurden Volumina bis zu 100 mL Proteinlösung konzentriert, zum Beispiel die Proben für die Kristallisation oder die Größenausschlusschromatographie. Dazu wurden die Filtrationseinheiten in der Tischzentrifuge bei 10 °C und 5000 g zentrifugiert. Größere Volumina wurden mit dem Filtrationssystem von VivaScience mit der VivaFlow 200 Membran 10 k NMWL konzentriert. Ein Endvolumen von ca. 100 mL konnte aus technischen Gründen nicht unterschritten werden. Das VivaFlow System eignete sich für die Konzentrierung der

Faltungsansätze vor der Dialyse (siehe 2.5.6 *In vitro* Faltung von solubilisierten *inclusion bodies*).

2.5.4 Western Blot

Die Proteinkonstrukte der Isoformen mit einem His₆-tag konnten mit dem Western Blot detektiert werden. Zunächst wurde ein SDS-Gel (siehe 2.5.1 Denaturierende Polyacryamid-Gelelektrophorese) mit His-tag-Proteinmarker (BenchMark His-tagged Protein Standard, Invitrogen) angefertigt, es jedoch nicht gefärbt. Das Gel wurde in einer Blot Apparatur mit Whatman Papier (Gel-Blotting-Papier, Schleicher & Schüll) und einer Nitrocellulosemembran (Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane, BioRad) bei 60 mA für 2 h geblottet.

Die Membran wurde anschließend in Blotpuffer für 1,5 h bei 20 °C inkubiert. Es folgte die 1° Antikörper-Bindung (Anti-His₆ von der Maus, Roche) in Blotpuffer mit 0,05 % (v/v) des 1° Antikörpers über Nacht bei 4 °C. Nach drei Waschschritten für 10 min in Blotpuffer wurde die Membran mit 0,05 % (v/v) des 2° Antikörper (Anti-Maus Antikörper von der Ziege gekoppelt mit Peroxidase, Chemicon International) in Blotpuffer für 4 h inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten für je 10 min in Blotpuffer ohne Magermilchpulver erfolgte die Entwicklung des Detektionsfilms (Chemiluminescent Detektionsfilm, Roche). Nach Zugabe von 1 mL 1 : 1 gemischter ECL I- und ECL II-Lösung (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Bioscience) auf die Membran, wurde diese in einer Filmkassette belichtet. Nach dem Waschen in Entwickler (Kodak Processing Chemicals Developer, Sigma), Wasser und Fixier (Kodak Processing Chemicals Fixer, Sigma) wurden His₆-tag-Proteine auf dem Film sichtbar.

10 x PBS: 0,1 M Natrium-Phosphat, 1,5 M NaCl, pH 7,2

Blotpuffer: 4 % (w/w) Magermilchpulver, 0,2 % (v/v) Tween in 1 x PBS

2.5.5 *inclusion-bodies*-Aufreinigung und Solubilisation

Die unlöslich exprimierten Proteine reichert sich in *E. coli* in so genannten Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) an. Diese wurden nach dem Zellaufschluss durch die *inclusion-bodies*-Aufreinigung von der löslichen Proteinfraction getrennt. Zu den aufgeschlossenen Zellen in IB I Puffer wurde die Hälfte des Volumens an IB II hinzugefügt und bei 4 °C für 30 min gerührt, um die Zellmembranen abzubauen. Die Suspension wurde bei 30000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in IB III mit dem Ultraturrax suspendiert. Es folgten drei weitere Zentrifugations- und Waschschrte. Das dann erhaltene Pellet konnte bei -20 °C gelagert werden (Rudolph & Lilie, 1996).

Die *inclusion bodies* wurden mit 5 mL IB IV pro mg IB für 2 h bei 20 °C gelöst und reduziert. Anschließend wurde der pH-Wert auf pH 3 - 4 erniedrigt und nicht gelöstes Protein durch Zentrifugation bei 10000 g für 15 min abgetrennt. Die solubilierten *inclusion bodies* wurden dann zweimal für 2 h und einmal für 16 h gegen IB V dialysiert und bei -20 °C gelagert (Rudolph & Lilie, 1996). Die Proteinkonzentration wurde durch die Absorption $A_{280\text{nm}}$ einer verdünnten Probe bestimmt.

IB I:	0,1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0
IB II:	60 mM EDTA, 1,5 M NaCl, 6 % Triton X 100, pH 7,0
IB III:	0,1 M Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 7,0
IB IV:	6 M GdnHCl (Nigu Chemie), 0,1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5 zusätzlich 0,1 M DTT frisch hinzugeben
IB V:	4 M GdnHCl (Nigu Chemie), 10 mM EDTA, pH 4,0

2.5.6 *in vitro* Faltung von solubilierten *inclusion bodies*

Die Faltung der Spätzle Isoformen beruhte auf der Anwendung des Prinzips der schnellen Verdünnung (*rapid dilution*) in einem Faltungspuffer mit Redox-System, um Cysteine zu Cystinen zu oxidieren. Als Redox-System wurden reduziertes und oxidiertes Glutathion (GSH, GSSG) verwendet (Abbildung 2.1; Rudolph & Lilie, 1996).

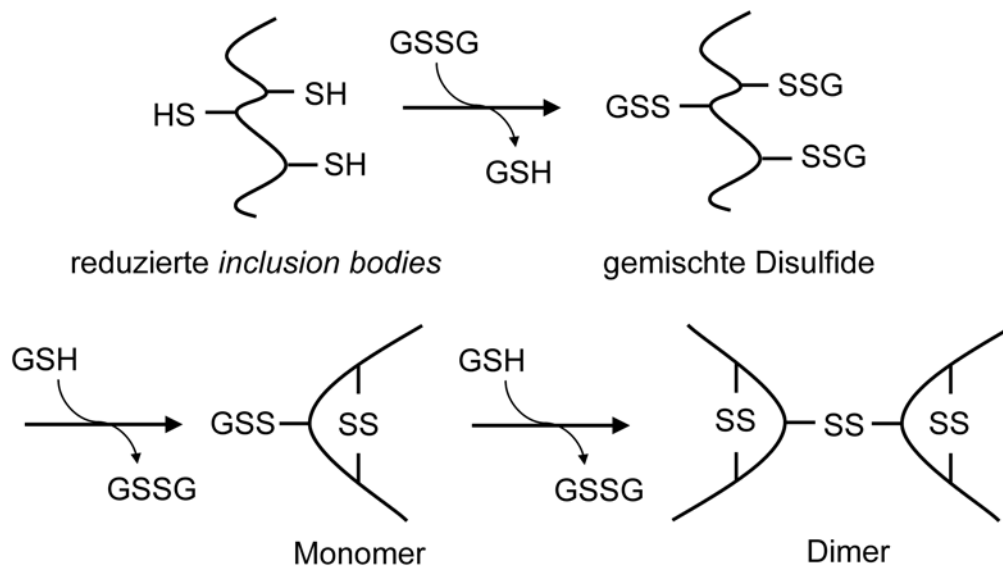


Abbildung 2.1: Die Bildung von Cystinen während der *in vitro* Faltung

Es ist schematisch die Oxidation der Cysteine durch oxidiertes Glutathion (GSSG) zu gemischten Disulfiden und die anschließende Reduktion durch reduziertes Glutathion (GSH) zu disulfidverbrückten Cystinen in leicht alkalischem Milieu gezeigt (nach Rudolph & Lilie, 1996; Tsumoto *et al.*, 2003).

In IB V dialysierte *inclusion bodies* wurden zu 150 mg/L in entgasten, auf 8 °C gekühlten Faltungspuffer verdünnt, in der Regel im Verhältnis 1 : 200 bis 1 : 300, so dass die restliche GdnHCl Konzentration vernachlässigt war (Rattenholl *et al.*, 2001). Als Faltungspuffer wurde entweder der auf Arginin basierende Faltungspuffer oder der auf Tris/HCl basierende Faltungspuffer (Funkner, 2007) verwendet. Die Proteinfaltung wurde bei 8 °C für 48 - 72 h gerührt und anschließend auf ein zehntel des Volumens mit Hilfe des VivaFlow Systems eingengt (siehe 2.5.3 Konzentrierung von Proteinlösungen).

Es folgten drei Dialysen der Proteinlösung in einer Dialysemembran (Dialyseschläuche mit Größenbegrenzung 3,5 kDa oder 12 - 14 kDa; SpectroPor) gegen das zehnfache Volumen an Phosphatpuffer. Ein SDS-Gel ohne Reduktionsmittel im SDS-Ladepuffer gab Aufschluss über den oligomeren Zustand der Isoformen.

IB V:	4 M GdnHCl (Nigu Chemie), 10 mM EDTA, pH 4,0
Arginin Faltungspuffer:	1 M Arginin, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 5 mM GSH und 2 mM GSSG, pH 8,5 - 9,5
Tris/HCl Faltungspuffer:	1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 5 mM GSH und 2 mM GSSG, pH 8,5 - 9,5 (Funkner, 2007)
Phosphatpuffer:	20 mM Natrium-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 7,4

2.5.7 Limitierte Proteolyse

Die Spätzle Isoformen wurden in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4 mit Trypsin (Trypsin from bovine pancreas, SIGMA) einer 1 g/L Stammlösung in Trypsin-Lagerlösung bei 20 °C oder 4 °C im Verhältnis 100 : 1 (w/w) inkubiert (Weber *et al.*, 2003). Für analytische Proben wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung in SDS-Ladepuffer bei 95 °C für 5 min gestoppt. Die präparativen Proben mit C-terminalen His₆-tag wurden in einem weiteren Aufreinigungsschritt durch eine Affinitätschromatographie gereinigt.

Trypsin-Lagerlösung: 10 mM CaCl₂, 1 mM HCl

2.5.8 Proteinreinigung mittels FPLC

Spätzle Isoformen wurden durch eine Kombination von verschiedenen Chromatographieschritten gereinigt, die an einer FPLC (Äkta, GE Healthcare mit der Software Unicorn 4.11 bzw 5.10) durchgeführt wurden. Sämtliche Puffer waren filtriert und entgast, die Proben wurden entweder zentrifugiert oder auf 0,22 µm steril filtriert.

Die Isoform Spätzle 8.24 wurde zunächst mit einer Affinitätschromatographie vorgereinigt, dann wurden mit einer Ionenaustauschchromatographie verbliebene Verunreinigungen minimiert und final eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Für die Affinitätschromatographie diente 0,1 M Tris/HCl, 20 mM Imidazol, pH 7,4 als Bindepuffer und 0,1 M Tris/HCl, 0,5 M Imidazol, pH 7,4 als Elutionspuffer. Als Säulen wurden 1 mL bzw. 5 mL HisTrap FF Säulen (GE Healthcare) verwendet. Mit einem Stufengradienten oder einem kontinuierlichen Gradienten von 0 % auf 100 % Elutionspuffer über 20 Säulenvolumen wurden gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Mit einer SDS-PAGE wurden die Elutionspeaks auf ihre Proteinzusammensetzung analysiert und die Fraktionen entsprechend vereinigt. Die vereinigten Elutionsfraktionen wurden gegen den Bindepuffer der Ionenaustauschchromatographie (25 mM Natrium-Citrat, 50 mM Natrium-Phosphat, pH 5,5) dialysiert und auf eine HiTrap SP FF 1 mL oder 5 mL Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Mit einem kontinuierlichen Gradienten von 0 % auf 100 % Elutionspuffer (25 mM Natrium-Citrat, 50 mM Natrium-Phosphatpuffer, 1 M NaCl, pH 5,5) über 20 Säulenvolumen wurden gebundene Proteine eluiert. Auch hier wurden die Fraktionen per SDS-PAGE analysiert und vereinigt. Für die folgende Größenausschlusschromatographie in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4 mit einer Superdex 16/60 75 prep grade Säule mit 120 mL Säulenvolumen (GE Healthcare)

wurde die Proteinlösung auf ca. 5 g/L konzentriert und maximal 2 % des Säulenvolumens als Probenvolumen aufgetragen.

Als *inclusion bodies* exprimierte Isoformen wurden durch die *inclusion-bodies*-Aufreinigung vorgereinigt. Das dann *in vitro* gefaltete Protein wurde nur noch über eine Größenausschlusschromatographie gesäubert. Für die Größenausschlusschromatographie wurde ebenfalls eine Superdex 16/60 oder 26/60 75 prep grade Säule mit 120 mL Säulenvolumen bzw. 320 mL Säulenvolumen (GE Healthcare) verwendet. Als Puffer wurde neben 20 mM Tris/HCl, pH 7,4 auch Phosphatpuffer (20 mM Natrium-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 7,4) verwendet. Erfolgte eine partielle Proteolyse, wurde das Proteolyseprodukt mit einer Affinitätschromatographie analog zur Isoform 8.24 von den Proteolysefragmenten und dem Trypsin getrennt.

2.5.9 Modifikation von Aminosäuren

Freie Cysteine wurden durch Iodacetamid blockiert, um den Cystingehalt der Isoformen untersuchen zu können (Chapman, 1996). Es wurde eine 1 M Iodacetamid-Lösung in 0,1 M Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 8,5 frisch angesetzt. Zu 45 µL Protein wurden 5 µL 1 M Iodacetamid-Lösung gegeben, gemischt und für 15 min bei 20 °C belassen. Der Gehalt an freien Cysteinen wurde durch Massenspektrometrie bestimmt, nachdem die Probe durch RP-HPLC gereinigt wurde. Je erfolgter Modifikation erhöht sich das Molekulargewicht um 57 Da.

Lysine wurden durch Methylierung modifiziert, um die Oberflächencharakteristik des Proteins und damit das Kristallisationsverhalten zu ändern (Walter *et al.*, 2006; Rayment, 1997). Durch abwechselnde Alkylierung und Reduktion wurden zwei Methylgruppen pro Lysin sowie am N-Terminus angefügt. Dies erhöht das Molekulargewicht um 28 Da pro modifizierter Seitenkette.

Zunächst wurde das Protein auf 1 g/L in Phosphatpuffer (20 mM Natrium-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 7,4) verdünnt. Es wurden 20 µL 1 M Borandimethylaminkomplex und 40 µL 1 M Formaldehyd je 1 mL Proteinlösung hinzugefügt, gemischt und auf Eis inkubiert. Diese Zugabe wurde nach 2 h wiederholt und wieder 2 h auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden 10 µL 1 M Borandimethylaminkomplex je 1 mL Proteinlösung hinzugefügt und über Nacht bei 8 °C inkubiert. Die Methylierungsreaktion wurde durch eine Größenausschlusschromatographie (siehe 2.5.8 Proteinreinigung mittels FPLC) mit Phosphatpuffer beendet und eine erfolgreiche Methylierung durch Massenspektrometrie überprüft.

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 Massenspektrometrie

Die Proben zur Bestimmung der molekularen Gesamtmasse wurden durch RP-HPLC (*reversed phase - high performance liquid chromatography*) entsalzt. Das HPLC-System bestehend aus Probengeber, Pumpe und UV-/VIS Detektor stammte von Gynkotek. Als Säule wurde eine C4 Säule (Jupiter 5u C4 300A 250 x 4,6 mm, Phenomenex), als Fließmittel wurde dd H₂O mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure und Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure gewählt, so dass in einem 10 min Gradienten von 40 - 80 % Acetonitril die Proben entsalzt wurden. Die Proteinproben wurden in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch abgegeben. Die Gesamtmasse wurde am ESI-Q-TOF 2 Massenspektrometer ausgerüstet mit einer Nanospray Ionenquelle bestimmt.

Proteinproben zur Messung der Peptidmasse durch MALDI-MS wurden auf einem SDS-Gel aufgetragen und das Gel in frisch angesetzter Fairbanks A Lösung gefärbt. Die ausgeschnittenen Proteinbanden wurden zur Bestimmung der Fingerprints verwendet. Die Gelproben wurden dreimal in Wasser, zweimal in 10 mM (NH₄)₂CO₃ und schließlich einmal in 10 mM (NH₄)₂CO₃, 50 % (v/v) Acetonitril gewaschen und getrocknet. Nach einer Hydratisierung in 20 µL 10 mM (NH₄)₂CO₃, pH 8,0 wurde Trypsin für einen über Nacht Verdau bei 37 °C hinzugegeben. Nach dem Auftragen von 0,5 µL einer gesättigten α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure in Aceton auf der MALDI-MS-Matrix wurde 1 µL des Proteinverdau auf die Matrix gegeben. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde die Probe in 1 µL Ethanol / Aceton / 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure-Gemisch (6 : 3 : 1) kristallisiert. Die Peptidmassen-Fingerprint Spektren wurden an einem Ultraflex-II TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonic) aufgezeichnet.

Die Messungen an den Massenspektrometern wurden von Frau Dr. A. Schierhorn, Max-Planck-Institut für Proteinfaltung, Halle, durchgeführt.

Fairbanks A: 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250

2.6.2 N-terminales Sequenzieren

Der N-Terminus einer Proteinprobe wurde mittels Edman Abbau bestimmt werden. Die Proteinprobe wurde in reduzierendem SDS Ladepuffer gelöst und elektrophoretisch auf einem SDS-Gel gereinigt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel nicht gefärbt sondern auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, PALL, Gelman Laboratory) in 50 mM Na₃BO₃, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,0 bei 60 mA für 2 h geblottet (siehe 2.5.4 Western Blot). Die PVDF-Membran wurde in 0,006 % (v/v) Coomassie G250, 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol gefärbt und an der Luft getrocknet. Die Proteinbande wurde ausgeschnitten und zum N-terminalen Sequenzieren zu Alphalyse Europe, Dänemark geschickt. Der N-Terminus wurde durch sechs Zyklen des Edman Abbaus bestimmt.

2.6.3 Circular Dichroism

Die fern-UV CD-Spektren wurden am Spektropolarimeter mit Pelthierelement im Bereich von 260 - 190 nm in 0,2 bis 1 nm Schritten mit mindestens 8 Akkumulationen aufgezeichnet. Die verwendeten Quarzküvetten hatten eine Schichtdicke von 0,1 mm oder 0,5 mm (Hellman). Die Proteinproben wurden in einer Konzentration von ca. 0,5 g/L in Phosphatpuffer (20 mM Natrium-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 7,4) bei 4 °C vermessen. In GdnHCl (MP Biomedicals, Ohio) denaturierte Proben wurden nach 16 h Inkubation in entsprechender GdnHCl Konzentration bei 20 °C vermessen. Die gemessenen CD-Signale wurden gegen den Pufferwert korrigiert und in molare Elliptizitäten pro Aminosäurerest Θ_{MRW} umgerechnet (Gleichung 5; Kelly *et al.*, 2005).

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta * 100 * MRW}{c * l} \quad \text{mit} \quad MRW = \frac{MW}{\#(AS) - 1} \quad \text{Gleichung 5}$$

Θ_{MRW} ... molare Elliptizität (deg * cm² * dmol⁻¹)

Θ ... Elliptizität (deg)

c ... Proteinkonzentration (g * L⁻¹)

l ... Schichtdicke der Küvette (cm)

MW ... Molekulargewicht (g * mol⁻¹)

#(AS) ... Anzahl Aminosäuren (1)

Der Temperatureinfluss auf die fern-UV CD-Spektren wurden bei 4 °C, 20 °C, 40 °C, 60 °C und 80 °C im Bereich von 260 - 190 nm in 1 nm Schritten mit 16 Akkumulationen aufgezeichnet. Die verwendeten Quarzküvetten mit Stopfen hatten eine Schichtdicke von 1 mm (Hellman). Die Proteinproben wurden in einer Konzentration von ca. 0,1 g/L in Phosphatpuffer (20 mM Natrium-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 7,4) vermessen. Der Anteil an Sekundärstrukturelementen wurde mit dem Programm CDPro abgeschätzt (CONTINLL, CDSSTR und SELCON3; Sreerama & Woody, 2000).

Aus Denaturierungsexperimenten mit GdnHCl (MP Biomedicals, Ohio) wurde der native Anteil (Gleichung 6) des Proteins im Denaturierungsübergang berechnet. Die freie Entfaltungenergie ΔG und die Kooperativität m wurden mit einem sechs Parameter Fit (Gleichung 7) nach Korrektur der Anfangssteigung berechnet (Bolen & Santoro, 1988; Pace & Shaw, 2000; Eftink, 1994).

$$F_n = \frac{y - y_u}{y_f - y_u} \quad \text{und} \quad F_u = 1 - \frac{y - y_u}{y_f - y_u} \quad \text{Gleichung 6}$$

F_n ... Anteil natives Protein

F_u ... Anteil denaturiertes Protein

y ... Messwert

y_u ... Messwert entfaltetes Protein

y_f ... Messwert gefaltetes Protein

$$y = \frac{(F_n + m_n * x) + (F_u + m_u * x) * \exp[(m * x - \Delta G)/(R * T)]}{1 + \exp[(m * x - \Delta G)/(R * T)]} \quad \text{Gleichung 7}$$

y ... Messwert

F_n ... Anteil natives Protein

F_u ... Anteil denaturiertes Protein

m_n ... Messwert gefaltetes Protein

m_u ... Messwert entfaltetes Protein

R ... universelle Gaskonstante ($8,31451 \text{ J} * \text{mol}^{-1} * \text{K}^{-1}$)

T ... Temperatur (293 K)

ΔG ... freie Entfaltungenergie ($\text{kJ} * \text{mol}^{-1}$)

m ... Kooperativität ($\text{kJ} * \text{mol}^{-1} * M_{\text{GdnHCl}}^{-1}$)

2.6.4 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Spektren der Tryptophan Fluoreszenz wurden am Fluorimeter Fluoromax-3 (Jobin Yvon Horiba) mit Pelthierelement gemessen. Die Proteinproben wurden bei einer Konzentration von 50 mg/L in Phosphatpuffer (20 mM Natrium-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 7,4) und 20 °C in Fluoreszenz-Quarzküvetten (Hellman) auf ihre Fluoreszenzintensitäten untersucht. Die Anregungswellenlänge betrug für die Tryptophan Fluoreszenz 295 nm, und die Intensitäten der Emission wurden für 310 bis 400 nm aufgezeichnet. Die um die Intensität der Fluoreszenz des Puffers korrigierten Intensitäten wurden auf die Proteinkonzentration bezogen. Die Wellenlänge mit der höchsten Fluoreszenzintensität wurde λ_{\max} genannt.

Aus Denaturierungsexperimenten mit GdnHCl (MP Biomedicals, Ohio) wurde der native Anteil (siehe Gleichung 6) des Proteins im Denaturierungsübergang berechnet. Die freie Entfaltungenergie ΔG und die Kooperativität m wurden mit einem sechs Parameter Fit (siehe Gleichung 7) nach Korrektur der Anfangssteigung berechnet (Santoro & Bolen, 1988; Pace & Shaw, 2000; Eftink, 1994).

2.6.5 NMR-Spektroskopie

Die Protonenspektren wurden an einem 600 MHz (Spätzle 11.7 und Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne) oder einem 900 MHz (Spätzle 8.24) NMR Spektrometer von Herrn U. Weininger, Abteilung Biophysik, MLU Halle-Wittenberg, aufgenommen und ausgewertet. Das Protein wurde in 90 % Phosphatpuffer (20 mM Natrium-Phosphat, 20 mM NaCl, pH 7,4) und 10 % (v/v) D₂O vermessen.

2.6.6 Kristallisation

Die zu kristallisierenden Proteine wurden nach der Größenausschlusschromatographie auf möglichst >10 g/L konzentriert, so dass ca. 500 μ L Proteinlösung für die ersten Kristallisationsversuche sowie einige Wiederholungen zur Verfügung standen. Die Proteine verblieben in den Puffern, wie sie im letzten Chromatographieschritt verwendet wurden: 50 mM Tris/HCl pH 7,4 oder 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,2. Nach der Konzentrierung in den Filtrationseinheiten wurde das Protein bei 8 °C bis zur Verwendung gelagert. Nach Bedarf wurde die Lösung für 30 min bei 16000 g und 10 °C vor dem Pipettieren der Kristallisationstropfen zentrifugiert. Nicht verbrauchtes Protein wurde als Rückstellprobe bei -20 °C gelagert.

Die Isoformen wurden mit verschiedenen Kristallisationspuffern auf das Kristallisationsverhalten überprüft. Es wurden die Kristallisationspuffer aus *JBScreen 1-10 Crystal Screening Kit* (Jena Bioscience), *Crystal Screen 1 und 2* (Hampton Research), *Crystallization basic, extension, low ionic* und *cryo kit* (Sigma-Aldrich) sowie *Factorial Solutions* der AG Stubbs verwendet. Die *Factorial Solutions* der AG Stubbs sind optimierte Puffer aus anderen Kits, die von der Arbeitsgruppe hergestellt wurden. Es wurden 96-well Platten (CrystalQuick, Greiner) nach der Methode des sitzenden Tropfens (*sitting drop*) mit verschiedenen Proteinkonzentrationen der unterschiedlichen Isoformen von einem Pipettierroboter angesetzt. 200 nL der Proteinlösung wurden mit 200 nL der Reservoirlösung versetzt und gegen 110 μ L Reservoir mittels Dampfdiffusion bei 14 °C oder 20 °C äquilibriert. Ein Überblick über die Bedingungen der angesetzten 96-well Platten ist im Anhang angefügt (Anhang Tabelle A.2).

Der Verlauf der Kristallisationsansätze wurde mit dem OASIS LS31 *Imaging System* (Veeco, USA) oder mit dem Mikroskop verfolgt. Potentielle Proteinkristalle wurden mit Schlaufen (Cryoloops, Hampton Research) aus dem Kristallisationstropfen gehoben und unter Stickstoffstrom bei -180 °C mit dem Röntngenerator auf ihre Streukraft getestet.

Viel versprechende Bedingungen wurden mit den Rückstellproben und neu gereinigten Protein in 24-well Cryschem Kristallisationsplatten (Cryschem Plates, Hampton Research) mit sitzendem Proteintropfen (*sitting drop*) oder in 24-well Nextal Kristallisationsplatten (NeXtal Crystallization Tool, Qiagen) mit hängendem Proteintropfen (*hanging drop*) durch leichte Variationen, zum Beispiel der Temperatur, der Proteinkonzentration oder der Pufferzusammensetzung optimiert (Anhang Tabelle A.4). Es wurden 1 μ L der Proteinlösung mit 1 μ L der Reservoirlösung versetzt und gegen 500 μ L Reservoirlösung mittels Dampfdiffusion äquilibriert. Die Kristalle wurden aus ihren Kristallisationstropfen gehoben, in Reservoirlösung gewachsen und sofort (*macroseeding*) oder nach mechanischer Zerkleinerung (*microseeding*) in frische Kristallisationstropfen gebracht, um die Kristallisation zu verbessern.

2.6.7 Datenmessung und Strukturbildung

Erste Kristalle wurden auf ihre Streukraft unter des dem Institut für Biochemie/Biotechnologie zur Verfügung stehenden Röntngenerators (Cu-Drehanode, Wellenlänge 1,5418 Å) getestet. Ein kompletter Datensatz eines optimierten Kristalls wurde am Synchrotron BESSY, Berlin, Beamline BL 14.1 ohne Kryopuffer von Herrn Dr. P.

Neumann, Abteilung Physikalische Biotechnologie, gemessen. Diese Beamline (Wellenlänge 0,91840 Å) war mit einem 225 mm CCD-Mosaikdetektor (MarResearch) ausgestattet.

Die Röntgenbeugungsbilder wurden indiziert, integriert und skaliert mit Hilfe der Software XDS (Kabsch, 1993). Die Struktur wurde von Herrn Dr. P. Neumann mit der Methode des Molekularen Ersatzes (*molecular replacement*) berechnet. Eine Überlagerung von fünf verkürzten NGF Monomeren (PDB Codes: 1BTG (Holland *et al.*, 1994), 1SG1 (He & Garcia, 2004), 1BET (McDonald *et al.*, 1991), 1SGF (Bax *et al.*, 1997)) diente als Strukturmodell im Programm Phaser (McCoy *et al.*, 2005).

Mit O und Coot (Jones *et al.*, 1991; Emsley & Cowtan, 2004) wurde die Struktur manuell gebaut und konnte durch eine *omit map* sowie durch gewichtete Differenzelektronendichtekarten (2Fo-Fc, 3Fo-2Fc, Fo-Fc) bestätigt werden. Die Struktur wurde in CNS basierend auf der Methode des *slow cooling simulated annealing* kombiniert mit einer standardisierten Geometrieverfeinerung und einer eingeschränkten Temperaturfaktor-Optimierung (*restrained B-factor refinement*) verfeinert.

Die erlaubten Abweichungen zwischen äquivalenten Aminosäureseitenketten der zwei Monomeren in der asymmetrischen Einheit, die durch nicht kristallographische Symmetrien aufeinander abbildbar waren, wurden in den ersten Runden der Verfeinerung limitiert (*NCS restraints*). In späteren Runden wurde diese Einschränkung gelockert und schließlich aufgehoben. Die anisotropen Verschiebungen (*anisotropic displacements*) der Spätzle Monomere wurden in den finalen Verfeinerungsschritten abwechselnd in Phenix und CNS (Adams *et al.*, 2002; Brunger *et al.*, 1998) mit denselben, im R-Wert nicht berücksichtigten Daten (*R-free set*) berechnet. Phenix verwendete für die Strukturverfeinerung mittels *ridge body movement* sechs TLS-Gruppen (Translation, Libration und Drehachse; *translation, libration, screw axis*), drei Gruppen pro Monomer. Die Stereochemie des Strukturmodells wurde in Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft und gegebenenfalls verbessert. Die atomaren Koordinaten wurden in der Protein Datenbank PDB (Berman *et al.*, 2000) mit dem PDB Code: 3E07 (Hoffmann *et al.*, 2008b) hinterlegt.

Die Datenmessung und der Bau des Strukturmodells erfolgten von Herrn Dr. P. Neumann, Abteilung Physikalische Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg. Der eigene Anteil ist auf die Datenmessung am Institut für Biochemie/Biotechnologie sowie den Bau des Strukturmodells in gut definierte Elektronendichte durch Mutation des Polyalaninmodells in die entsprechenden Aminosäuren zu begrenzen.

2.7 *in vivo* Aktivitätstest in *D. melanogaster* Embryonen

Aus dem Bloomington *Drosophila* Stock Center wurden aus dem Stock *spz[2]ca[1]/TM1* und dem Deletionsstock *Df(3R)ED6255* eine transheterozygote Elterngeneration erzeugt. *Df(3R)ED6255* (96D2-F1) fehlt das *spz* Gen (Ryder *et al.*, 2007) und *spz[2]* ist ein Nullallel (DeLotto *et al.*, 2001). Der Balancer *TM1*, *Me* (*moiré*, Musterung auf dem Auge) musste zu *TM6c*, *Sb* (*stubble*, kurze, dicke Borsten) geändert werden, um einen besser selektierbaren Marker zu erhalten. Weibliche Fliegen mit der Defizienz in einem *spz* Allel *Df(3R)ED6255/TM6c* wurden mit Männchen mit einer Punktmutation in *spz* *spz[2]ca[1]/TM6c* gekreuzt. Transheterozygote Weibchen *Df(3R)ED6255/spz[2]ca[1]* wurden selektiert, um sie mit Wildtyp Männchen zu befruchten. Den Embryonen dieser Kreuzung fehlte ein funktionelles *spz* Gen, weil nur die mütterliche *spz* Kopie in der Embryogenese aktiv ist. So stoppt die Entwicklung der Embryonen ohne die Ausbildung einer Dorsal-Ventral-Achse.

Für die Injektionsexperimente wurden transheterozygote Weibchen zum Eierablegen auf Agarblöcken mit Hefe als Futter gehalten. Nach 30 min wurden die Eier abgesammelt, in 1 x PBS gewaschen, mit 12 % Hypochlorid dechorionisiert, erneut in 1 x PBS gewaschen und bei 30 °C für 7 min getrocknet. Die vorbereiteten Embryonen, die sich im Entwicklungsstadium zwei (Stein *et al.*, 1991) befanden, wurden auf einem Objektträger ausgerichtet und mit Karbonöl überschichtet. So vorbereitete Embryonen konnten mit einer selbstgezogenen Nadel aus einer Glaskapillare mit 5 g/L Spätzle Protein in 0,1 mM Natrium-Phosphat, 5 mM KCl, pH 7,4 injiziert werden. Unter dem Mikroskop konnte die Injektion in die zentrale, dorsale Seite bis in den perivitellinen Raum der Embryonen beobachtet werden. Nach erfolgter Injektion wurden die Objektträger mit den Embryonen in feuchter Umgebung bei 25 °C für 22 h belassen, damit sich die Embryonen weiterentwickeln konnten. Das Karbonöl wurde dann von den Embryonen durch Waschen in Heptan entfernt und der Objektträger mit Hoyers Medium (van de Meer, 1977) bedeckt. Über Nacht klärten sich die Strukturen der Embryonen bei 65 °C und konnten dann in Dunkelfeldmikroskopie auf Dorsal-Ventral-Elemente analysiert werden.

Die Arbeiten mit *D. melanogaster* wurden von Herrn M. Walther, Abteilung Entwicklungsgenetik, MLU Halle-Wittenberg durchgeführt. Der eigene Anteil der Arbeit ist auf die Vorbereitung der Embryonen zur Injektion sowie die Injektion des Proteins in einige Embryonen zu begrenzen.

10 x PBS: 0,1 M Natrium-Phosphat, 1,5 M NaCl, pH 7,2

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der Expressionsvektoren

Die *spz* cDNA wurde aus den Klonierungsvektoren von der Arbeitsgruppe DeLotto, Dänemark, durch PCR amplifiziert (Anhang Tabelle A.1 Primersequenzen). Die PCR-Produkte und die Expressionsvektoren wurden mit Restriktionsenzymen geschnitten und das Insert wurde anschließend in den Vektor ligiert. Nach der Transformation des Ligationsansatzes in Ca²⁺-kompetente XL1 blue Zellen wurden Ampicillin resistente Klone mittels Kolonie-PCR und Plasmidverdau nach einer Plasmidpräparation analysiert. Die Plasmide mit schneidbarem Insert wurden bei MWG Biotech AG sequenziert und auf ihre Aminosäuresequenz überprüft. Die folgenden Konstrukte gingen aus dieser Arbeit hervor (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Expressionskonstrukte von Spätzle, Easter und SPE

Es wird die Zusammensetzung der einzelnen Expressionsvektoren bestehend aus dem Insert, dem Affinitätstag sowie die Identität der Plasmide gezeigt.

Insert	Plasmid	STOP im Primer	Eigenschaften
<i>spz8.19</i>	pET21a	nein	C-terminaler His ₆ -tag
<i>spz8.19</i>	pET15b	ja	N-terminaler His ₆ -tag
<i>spz11.7</i>	pET21a	nein	C-terminaler His ₆ -tag
<i>spz11.7</i>	pET15b	ja	N-terminaler His ₆ -tag
<i>spz11.7</i>	pET21a	ja	kein His ₆ -tag
<i>spz8.24</i>	pET21a	nein	C-terminaler His ₆ -tag
<i>spz8.24</i>	pET15b	ja	N-terminaler His ₆ -tag
<i>spz11.27</i>	pET21a	nein	C-terminaler His ₆ -tag
<i>spz11.27</i>	pET15b	ja	N-terminaler His ₆ -tag
<i>easter</i>	pET15b	ja	N-terminaler His ₆ -tag
<i>easter</i>	pET21a	nein	C-terminaler His ₆ -tag
<i>SPE</i>	pET15b	ja	N-terminaler His ₆ -tag
<i>SPE</i>	pET21a	nein	C-terminaler His ₆ -tag
<i>easter</i>	MBP-Fusion	ja	N-terminales MBP
<i>easter</i>	GST-Fusion	ja	N-terminales GST
<i>SPE</i>	MBP-Fusion	ja	N-terminales MBP
<i>SPE</i>	GST-Fusion	ja	N-terminales GST

Für jede Spätzle Isoform wurden mindestens zwei Expressionsvektoren kloniert, jeweils in den Vektoren pET21a und pET15b, um zwischen Proteinen mit N-terminalem oder C-terminalem His₆-tag wählen zu können. Durch die Integration eines Stop-Codons im reversen Primer für die pET21a Konstrukte konnte das Protein ohne His₆-tag exprimiert werden. Für die auf dem pET15b Vektor basierenden Konstrukten wurde immer ein Primer mit Stop-Codon verwendet, weil das Stop-Codon im Vektor erst nach einer GSGC Aminosäuresequenz kodiert ist und sonst ein zusätzliches Cystein im C-Terminus direkt neben den Cysteinen der Cystinknoten-Domäne integriert werden würde.

Für das Spätzle Prozessierende Enzym und Easter wurden neben den His₆-tag Konstrukten auch Vektoren für die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem Maltose bindenden Protein oder N-terminaler Glutathion-S-transferase kloniert. Mit diesen Konstrukten soll auf veränderte Expressionseigenschaften der prozessierenden Enzyme getestet werden.

Die Aminosäuren 1 - 25 von Spätzle 8.19 in *D. melanogaster* werden von einer Signalpeptidase gespalten und gelten damit als Signalpeptid (DeLotto & DeLotto, 1998). Für Spätzle 11.7 und Spätzle 11.27 wurden ebenfalls die ersten 25 Aminosäuren als Signalsequenz entfernt, da sie dasselbe Exon am N-Terminus besitzen wie Spätzle 8.19. Für die Isoform Spätzle 8.24 wurden nur das erste, dem Signalpeptid homologe Exon mit den Aminosäuren 1 - 22 entfernt. Daraufhin wurden mit den in der Tabelle 3.1 genannten Expressionsvektoren Testexpressionen in verschiedenen *E. coli* Stämmen im 50 mL Maßstab durchgeführt. Alle Konstrukte konnten in mehreren *E. coli* Stämmen erfolgreich exprimiert werden (siehe Kapitel 3.2 Spätzle 8.24; 3.3 Spätzle 11.7; 3.4 Spätzle 8.19 und 3.6 Easter und SPE).

3.2 Propeptid Isoform Spätzle 8.24

3.2.1 Expression der Spätzle 8.24 Isoform

Die Isoform Spätzle 8.24 konnte ohne Signalpeptid in BL21 (DE3) *E. coli* Zellen und deren Derivaten exprimiert werden. Die Expressionsbanden auf den SDS-Gelen zeigten für die Expression nach 4 h bei 37 °C in Rosetta (DE3) Zellen die beste Expression, in BL21 (DE3) Zellen eine moderate und in BL21 (DE3) pUBS Zellen eine geringe Expression an (Abbildung 3.1). In weiteren Expressionen wurde diese Isoform in Rosetta (DE3) Zellen exprimiert.

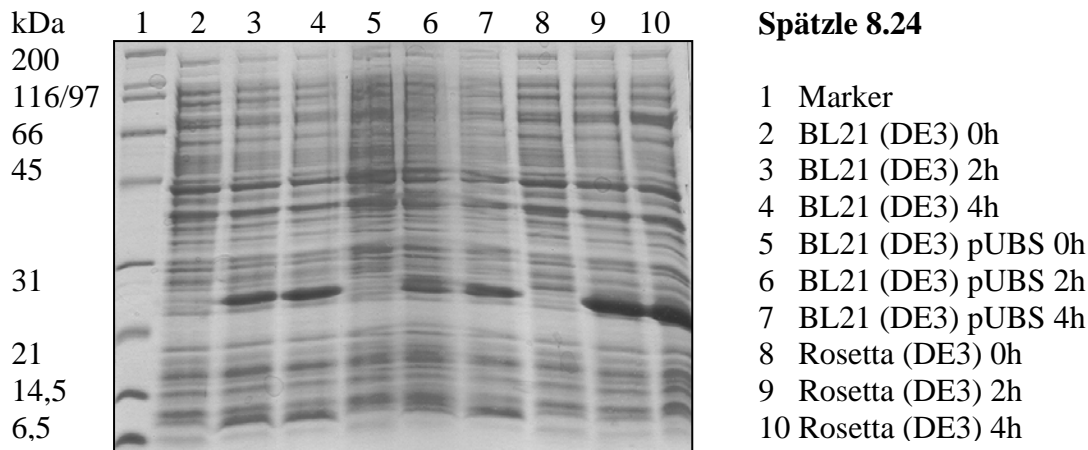


Abbildung 3.1: Expression von Spätzle 8.24 in verschiedenen *E. coli* Stämmen

Die Expression von Spätzle 8.24 (~19 kDa) wurde in BL21 (DE3), BL21 (DE3) pUBS und Rosetta (DE3) getestet. Die Expressionsproben 0 h, 2 h und 4 h nach der Induktion wurden reduziert auf ein 15 % SDS-Gel aufgetragen.

Trotz der drei Cysteine in der Aminosäuresequenz, von denen die Disulfidverknüpfung unbekannt ist, wurde diese Isoform in der löslichen Zellfraktion exprimiert. Eine Maßstabsvergrößerung von 50 mL LB Medium im 250 mL Schüttelkolben auf 1,5 L im 5 L Schüttelkolben bis zu 8 L im 15 L Bioreaktor gelang mit großem Erfolg, so dass bis zu 88 g Biofeuchtmasse pro L Medium in einer Expression hergestellt werden konnten.

3.2.2 Chromatographische Reinigung von Spätzle 8.24

Das für die Reinigung von Spätzle 8.24 entwickelte Protokoll (siehe 2.5.8 Proteinreinigung mittels FPLC) sieht die chromatographischen Schritte der Affinitäts-, Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie vor. In der Abbildung 3.2 kann die Homogenität einer Proteinlösung während der chromatographischen Reinigung nachvollzogen werden.

Spätzle 8.24 hat eine molekulare Masse von 19 kDa, läuft auf einem 15 % SDS-Gel aber etwas oberhalb der 21 kDa Markerbande. Die Massenspektrometrie bestätigt die molekulare Masse des Proteins Spätzle 8.24, es fehlen allerdings 131 Da (Tabelle 3.2). Wahrscheinlich wurde das N-terminale Methionin durch eine Methionin Aminopeptidase von *E. coli* (Frottin *et al.*, 2006; Ben-Bassat *et al.*, 1987) abgespalten. Somit liegt die leichte Größendifferenz zur Markerbande am Laufverhalten des Spätzles bzw. des Referenzproteins. Nach den drei Chromatographien ist das Protein quasi frei von *E. coli* Protein und kann für biophysikalische Untersuchungen verwendet werden.

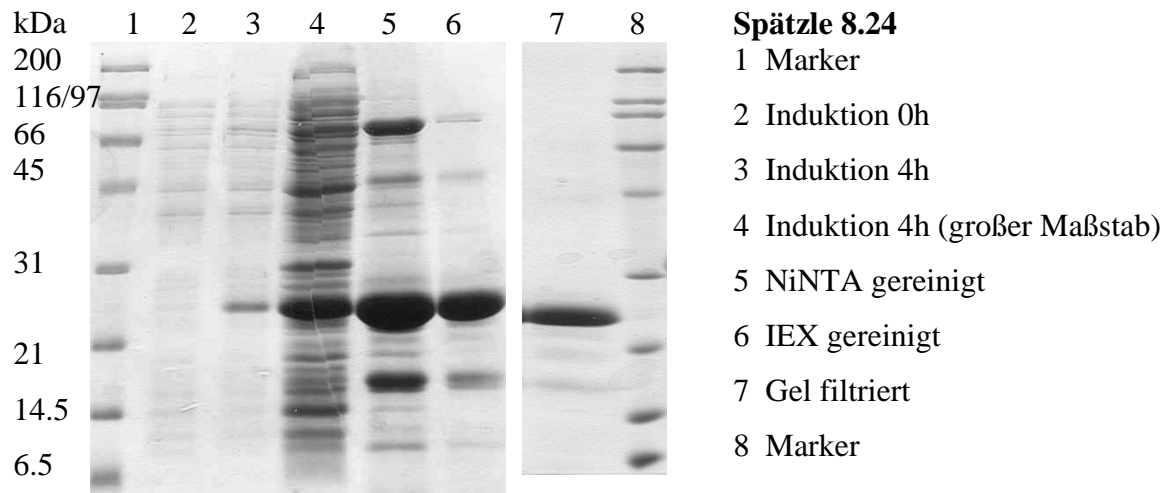


Abbildung 3.2: Chromatographische Reinigung von Spätzle 8.24.

Auf dem 15 % SDS-Gel sind von Spätzle 8.24 (~19 kDa) die Proben der Expression, der Affinitätschromatographie (NiNTA), der Ionenaustauschchromatographie (IEX) und der Größenausschlusschromatographie (Gel filtriert) dargestellt.

Aus einem Großansatz im Bioreaktor konnten ~660 g Biofeuchtmasse in 7,4 L Medium erzeugt werden. Nach dem Zellaufschluss und dem ersten Reinigungsschritt betrug die Ausbeute an Gesamtprotein mit verbleibenden Verunreinigungen $\sim 2,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Medium, die während der weiteren Aufreinigung nach einer Dialyse und Ionenaustauschchromatographie auf $0,75 \text{ g Spätzle 8.24} \cdot \text{L}^{-1}$ Medium abnahm. Nach dem finalen Reinigungsschritt der Größenausschlusschromatographie wurden $0,5 \text{ g Spätzle 8.24} \cdot \text{L}^{-1}$ Medium für die biophysikalische Charakterisierung gewonnen.

3.2.3 Cysteine der Spätzle 8.24 Isoform

Das Spätzle 8.24 besitzt keine vollständige Cystinknoten-Domäne, aber dennoch zwei Cysteine im Propart und ein Cystein aus der Cystinknoten-Domäne. Eine mögliche Konnektivität der Cystine wurde durch eine Modifikation der freien Cysteine mit Iodacetamid untersucht. Das Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung zeigt, dass alle drei Cysteine modifiziert worden und somit nicht disulfidverbrückt sind oder Dimere bildeten (Tabelle 3.2). Während der Langzeitlagerung von Spätzle 8.24 in nicht reduzierenden Puffern konnte eine leichte Dimerisierung beobachtet werden. Dies verdeutlicht die hohe Reaktivität der Cysteine. Ob die Cysteine des Propeptides prinzipiell nicht disulfidverbrückt sind, bleibt bei jeder Isoform individuell zu überprüfen.

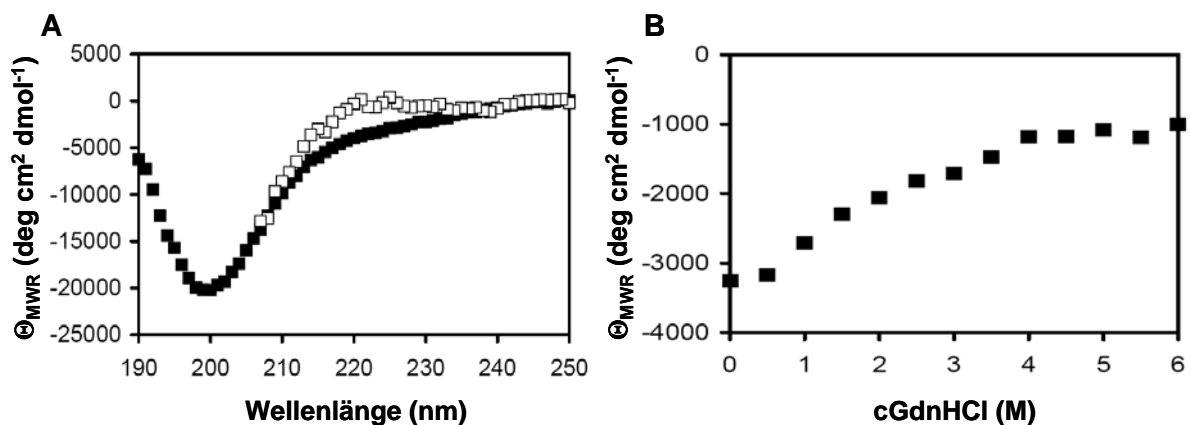
Tabelle 3.2: Bestimmung der molekularen Masse von Spätzle 8.24

Freie Cysteine wurden nach Bedarf mit Iodacetamid zu methylierten Cysteinen (CAM) modifiziert. Durch diese Modifikation änderte sich die molekulare Masse um +57 Da je freies Cystein. Teilweise konnte das Abspalten des N-terminalen Methionins (Met) beobachtet werden (-131 Da).

Isoform	Spezies	Gemessene Masse (Da)	Theoretische Werte			Differenz zu gemessener Masse (Da)
			Masse (Da)	Erwartete Cystine (-)	Modifikationen (-)	
Spz8.24	Monomer	19026	19028	0	minus 1 Met	-2
	modifiziertes Monomer	20428	20428	0	3 CAM	0

Der sekundäre Strukturanteil der Propeptid Isoform wurde mit einer fern-UV CD-Messung untersucht. Das fern-UV CD-Spektrum zeigt ein Minimum bei einer Wellenlänge von 197 nm und ist vergleichbar mit dem CD-Signal eines unstrukturierten Proteins (Abbildung 3.3A).

In 6 M GdnHCl denaturiertes Protein zeigt einen Signalunterschied im Bereich 215 - 225 nm. Die Messung eines GdnHCl Denaturierungsübergangs zeigt eine reversible Entfaltung mit einem breiten Übergang (Abbildung 3.3B). Bereits bei 0,5 M GdnHCl beginnt eine Entfaltung, die erst bei 4 M GdnHCl abgeschlossen ist. Die enorme Breite des Übergangs verdeutlicht die fehlende Kooperativität bei der Entfaltung des unstrukturierten Spätzle 8.24 Proteins. Da aber trotz der geringen Sekundärstrukturanteile eine Entfaltung in GdnHCl gemessen werden konnte, scheint das Protein gefaltet zu sein.

**Abbildung 3.3: Fern-UV CD-Spektren und Denaturierungsübergänge von Spätzle 8.24**

A Die fern-UV CD-Spektren von Spätzle 8.24 wurden bei 4 °C in Phosphatpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4) mit und ohne 6 M GdnHCl vermessen. Die native Probe ist in schwarzen Vierecken und die denaturierte Probe in weißen Vierecken dargestellt. **B** Aus den fern-UV CD-Spektren ist die Elliptizität Θ_{MWR} in einem GdnHCl Denaturierungsexperiment bei 220 nm abgebildet.

Um das Ergebnis der fern-UV CD-Messung zu überprüfen, wurde ein 1D- ^1H -NMR Spektrum der Propeptid Isoform aufgezeichnet, welches ebenfalls eine Aussage über die Faltung des Proteins erlaubt. Das Spektrum zeigt weder Peaks oberhalb von 0 ppm noch unterhalb von 9 ppm (Abbildung 3.4), die für die Anwesenheit von Sekundärstrukturelementen sprechen würden (Rehm *et al.*, 2002). Das Ergebnis bestätigt somit das Fehlen von Tertiärstrukturelementen in Spätzle 8.24.

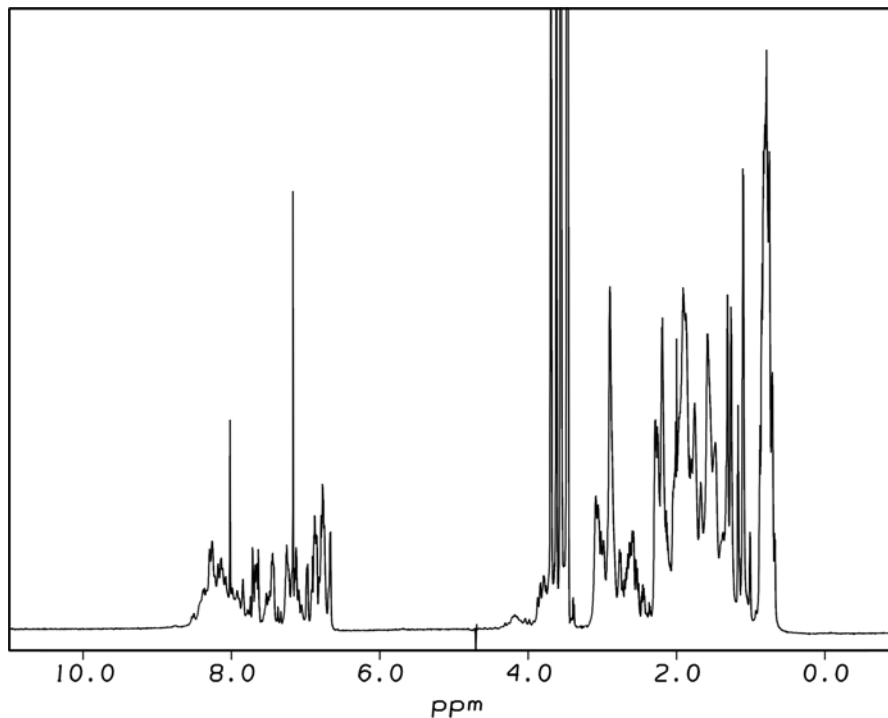


Abbildung 3.4: 1D- ^1H -NMR Spektrum der Propeptid Isoform Spätzle 8.24

Die Abbildung zeigt das 1D- ^1H -NMR Spektrum der Spätzle Isoform Spätzle 8.24, gemessen bei einer Konzentration von 3 g/L in 10 % D_2O / 90 % Phosphatpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4). Weder oberhalb von 0 ppm noch unterhalb von 9 ppm sind charakteristische Peaks zu erkennen, die auf die Anwesenheit von Tertiärstrukturelementen hinweisen würden.

3.3 Isoform Spätzle 11.7

3.3.1 Expression von Spätzle 11.7 in *inclusion bodies*

Die Konstrukte dieser Isoform wurden sowohl in BL21 (DE3), BL21 (DE3) pUBS als auch Rosetta (DE3) erfolgreich exprimiert. Dabei erreichten die Rosetta (DE3) Zellen im Testmaßstab von 50 mL nach 4 h sowohl die höchste Absorption $A_{600\text{nm}}$ als auch die stärkste Expressionsbande im SDS-Gel, weshalb sie für weitere Expressionen genutzt wurden. Die verbesserte Expression in den Rosetta (DE3) Zellen wird auf die extra exprimierten tRNAs für eukaryontisch oft benutzte Codons zurückzuführen sein. In allen getesteten Zellen wurde das Protein unlöslich, in so genannten *inclusion bodies* (Einschlusskörper) exprimiert. Diese Isoform besitzt die für Spätzle typische Cystinknoten-Domäne und damit neun Cysteine pro Molekül. Nicht korrekt verbrückte Cysteine während der Expression in *E. coli* können eine Ursache der unlöslichen Expression sein.

Auch mit dieser Isoform konnte eine Maßstabsvergrößerung bis zum 8 L Maßstab durchgeführt werden, so dass mit einer Fermentation bis zu 75 g Biofeuchtmasse pro L Medium erzeugt wurden. In Abbildung 3.5 und 3.6 sind als Beispiele die Wachstumskurve von Rosetta (DE3) Zellen im 8 L Maßstab bei der Expression von Spätzle 11.7 sowie das Expressionsmuster im SDS-Gel dargestellt.

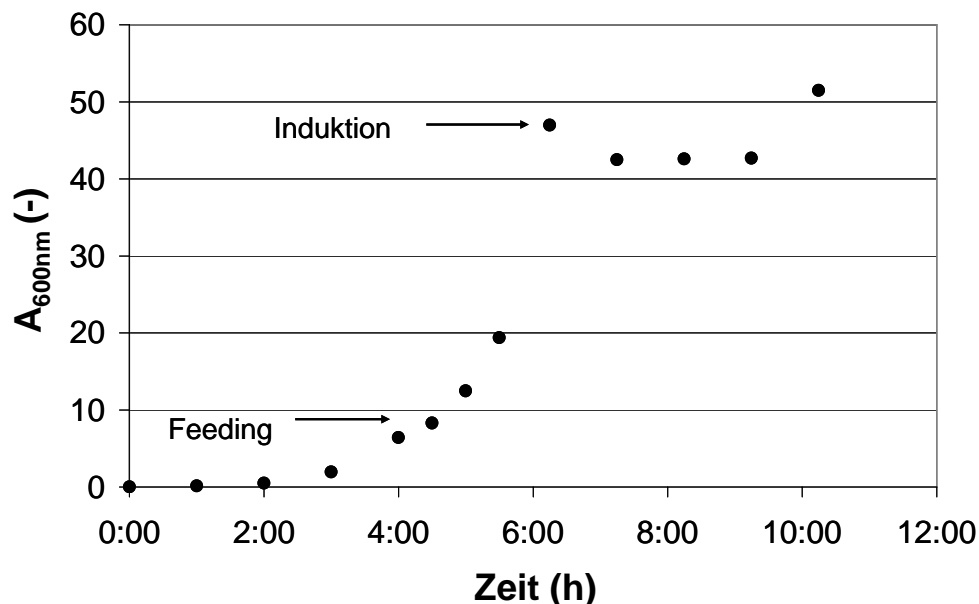


Abbildung 3.5: Wachstumskurve der Expression von Spätzle 11.7 im Bioreaktor

Es ist die Absorption $A_{600\text{nm}}$ gegen die Expressionszeit aufgetragen. Mit einem Pfeil markiert sind die Induktion mit IPTG und der Start des Feedings mit Glycerinlösung.

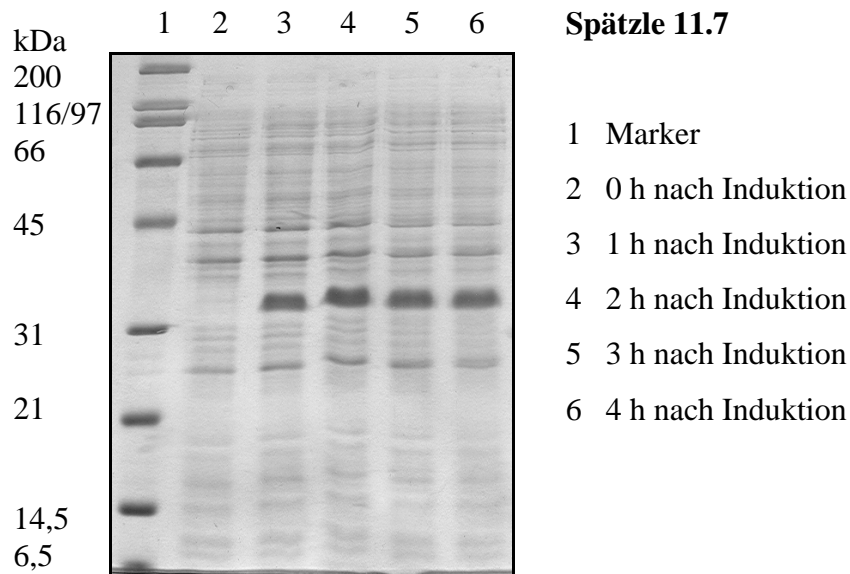


Abbildung 3.6: Expressionsproben von Spätzle 11.7 im Bioreaktor

Es ist die Expression des Zielproteins Spätzle 11.7 auf einem reduzierten 15 % SDS-Gel während des Expressionsverlaufes dargestellt. Das 27 kDa große Protein ist als deutliche Bande oberhalb des 31 kDa Markerproteins zu erkennen.

Die Wachstumskurve zeigt die typischen Phasen einer Kultivierung. Innerhalb der ersten drei Stunden passt sich die Startkultur an die neue Umgebung an und die Absorption steigt kaum. Nach 4 h ist die Glucose verbraucht, so dass mit der Zugabe der Kohlenstoffquelle (*Feeding*) begonnen werden musste. Die Kultur hat sich den Bedingungen angepasst und beginnt exponentiell zu wachsen. Bei einer Absorption von $A_{600nm} \sim 50$ AU wurde die Expression des Zielproteins mit IPTG induziert. Im Allgemeinen endet das exponentielle Wachstum mit der Induktion und die Kultur geht in die stationäre Phase über, in der die Kultivierung auch beendet wird. Die Expressionsproben der 8 L Kultivierung zeigen deutlich, dass vor der Induktion kein oder nur geringe Mengen des Zielproteins gebildet wurden und dass mit der Induktion das Zielprotein exprimiert wird.

3.3.2 *in vitro* Faltung von Spätzle 11.7

Die aus der Expression gewonnenen Zellen wurden mit einem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen (siehe 2.4.3 Zellaufschluss), die *inclusion bodies* isoliert und solubilisiert (siehe 2.5.5 *inclusion-bodies*-Aufreinigung und Solubilisation). Die isolierten *inclusion bodies* waren von ~90 % Reinheit, so dass für die *in vitro* Faltung ohne einen weiteren Reinigungsschritt verwendet werden konnten.

Die Faltungsexperimente von anderen unlöslich exprimierten Proteinen sowie von humanen NGF gaben erste Hinweise auf die zu verwendenden Puffer und Bedingungen. Nach Rudolph & Lilie (1996) wurde das unter 2.5.6 *in vitro* Faltung von solubilisierten *inclusion bodies* beschriebene Protokoll zur Faltung verwendet. Mit der Methode der schnellen Verdünnung (*rapid dilution*) wurde Spätzle in einem Arginin-Faltungspuffer (1 M L- Arginin, 0,1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 1 mM GSSG, 5 mM GSH, pH 9,5) zu seiner nativen Form gefaltet. Anschließend wurde der Faltungspuffer durch Querstromfiltration auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens konzentriert und gegen 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) oder Phosphatpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4) dialysiert. In der folgenden Größenausschlusschromatographie und in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE zeigte sich, dass Spätzle 11.7 *in vitro* als Dimer (54 kDa) und Monomer (27 kDa) vorliegt (Abbildung 3.7). Da eine reduzierte Proteinprobe des Dimers auf der SDS-PAGE sich wie das Monomer zeigte, ist das Dimer kovalent verbunden.

In der Diplomarbeit Funker (2007) wurde die Ausbeute der Faltung der Isoform 8.19 verbessert, indem statt Arginin ein Tris/HCl basierter Faltungspuffer (1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 1 mM GSSG, 5 mM GSH, pH 9,5) verwendet wurde. Dieser Faltungspuffer ließ sich auch auf Spätzle 11.7 übertragen.

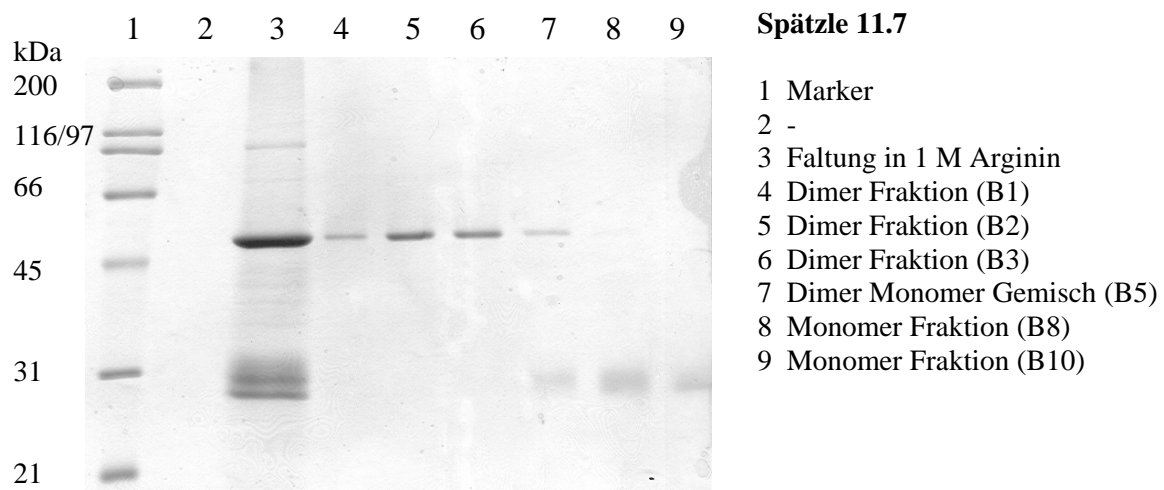


Abbildung 3.7: *in vitro* Faltung und Reinigung von Spätzle 11.7

Die Abbildung zeigt eine 15 % SDS-PAGE mit den nicht reduzierten Proben der Faltung von Spätzle 11.7 (Dimer 54 kDa, Monomer 27 kDa) in 1 M Tris/HCl Faltungspuffer sowie den Fraktionen des Dimer- und Monomerpeaks der anschließenden Größenausschlusschromatographie (siehe Abbildung 3.8).

In den Kapiteln 3.4 Spätzle 8.19 und 3.5 Spätzle 11.27 wird die Ausbeute an Dimere nach der Faltung mit Tris/HCl- und Arginin-Faltungspuffer verglichen sowie der Einfluss der Faltungstemperatur diskutiert (siehe Abbildungen 3.17 und 3.18: *in vitro* Faltungen von Spätzle 8.19, Spätzle 11.7 und Spätzle 11.27).

Anhand des Chromatogramms der Größenausschlusschromatographie zeigte sich für die Rückfaltung des Spätzle 11.7 im Arginin-Faltungspuffer ein Monomer-Dimer-Verhältnis von $1,7 (\pm 0,7) : 1,0$ als Mittelwert aus acht Rückfaltungen. Das Verhältnis verschob sich zugunsten der Dimere auf $0,31 (\pm 0,06) : 1,00$ im Tris/HCl-Faltungspuffer, ebenfalls ein Mittelwert aus acht Rückfaltungen (Abbildung 3.8). Über den Anteil der Aggregate lässt sich mittels der Chromatogramme keine Aussage treffen, weil die Aggregation stark mit der Behandlung der Probe vor dem Chromatographieschritt zusammenhängt, zum Beispiel das Sterilfiltrieren durch einen $0,40 \mu\text{m}$ Sterilfilter, die Zentrifugation bei 10°C oder die Lagerzeit sowie -temperatur. Der Anteil der Aggregate einer Faltung und der Verlust in der anschließenden Aufreinigung lässt sich nur grob auf zwei Drittel der eingesetzten *inclusion bodies* abschätzen. Insgesamt konnten aus einem Großansatz im Bioreaktor $\sim 530 \text{ g}$ Biofeuchtmasse aus 7 L Medium erzeugt werden. Nach dem Zellaufschluss konnten 4 g feuchte *inclusion bodies* $\cdot \text{L}^{-1}$ Medium isoliert und 1 g *inclusion bodies* $\cdot \text{L}^{-1}$ Medium solubilisiert werden. Aus einem 2 L Faltungsansatz mit $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Proteinkonzentration wurden 65 mg Dimer nach der Reinigung mit der Größenausschlusschromatographie erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von ca. $0,2 \text{ g}$ Spätzle 11.7 $\cdot \text{L}^{-1}$ Medium.

Eine Dimerisierung der Spätzle Cystinknoten-Domäne wurde in den perivitellinen Extrakten und durch das drei dimensionale Spätzlemodell beschrieben (Morisato & Anderson, 1994; Mizuguchi *et al.*, 1998), eine Dimerisierung der Spätzle Proform wurde für Spätzle 8.19 und Spätzle 11.7 exprimiert in Insektenzellen durch SDS-PAGE gezeigt (DeLotto & DeLotto, 1998). Nicht nur die Cystinknoten-Domäne, sondern bereits die Proform ist auch nach den Ergebnissen dieser *in vitro* Faltungen ein Dimer.

Die massenspektrometrische Analyse der Faltungsprodukte konnte die Monomer und Dimere bestätigen. Bis zu $\sim 10 \%$ der Monomere wurden mit einer Glutathion-Modifikation detektiert (Tabelle 3.3). Diese Modifikation ist ein Artefakt aus der *in vitro* Faltung und bescheinigt das Vorhandensein eines freien Cysteins. Die Blockierung des Cysteins durch Glutathion kann zur Ausbildung der Monomere statt der Dimere führen. Weiterhin wurde das Vorhandensein von freien Cysteinen durch eine Modifikation mit Iodacetamid untersucht (Tabelle 3.3). Die

Monomere wurden mit bis zu drei Carbamidomethylierungen gemessen. Dies spricht für bis zu drei freie Cysteine im Monomer. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die Cysteine des Propeptides und jenes Cystein, welches für die Dimerisierung verantwortlich ist.

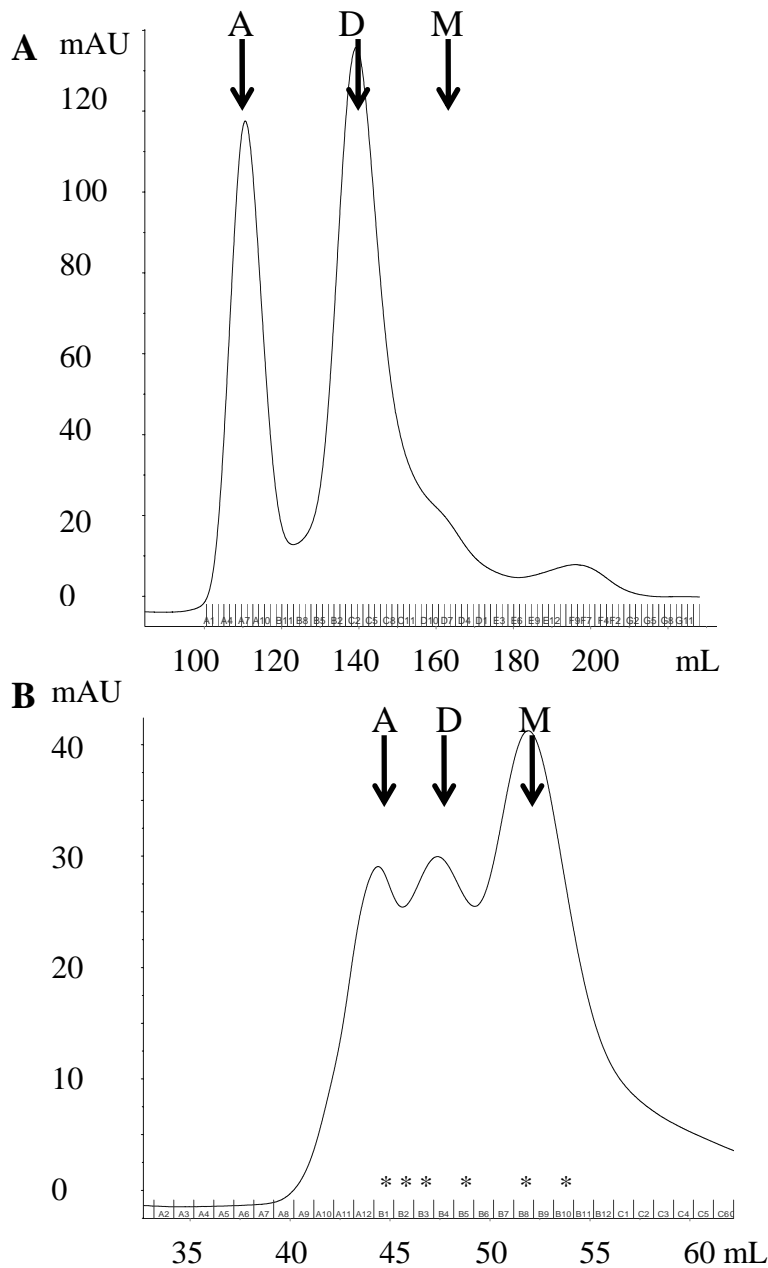


Abbildung 3.8: Monomer-Dimer-Verhältnis nach der Faltung von Spätzle 11.7 in verschiedenen Faltungspuffern

Die Abbildung zeigt die Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie der *in vitro* Faltung von Spätzle 11.7 in verschiedenen Faltungspuffern. Die Pfeile kennzeichnen die Peaks der Aggregate (A), der Dimere (D) und der Monomere (M). **A** Das Chromatogramm zeigt das Monomer-Dimer-Verhältnis einer Tris/HCl basierten Faltung getrennt auf einer 26/60 Säule und in **B** ist das Chromatogramm einer Arginin basierter Faltung getrennt auf einer 16/60 Säule zu sehen. Die mit „*“ gekennzeichneten Fraktionen sind in Abbildung 3.7 auf einem SDS-Gel aufgetragen.

Die Dimere wurden mit bis zu vier freien Cysteinen gemessen. Dabei kann es sich um die Cysteine in den beiden Propeptiden handeln. Eine ungerade Anzahl an Modifikationen gibt wenig Aufschluss über die Anzahl der freien Cysteine, weil immer zwei Cysteine sich zu einer Disulfidbrücke verbinden und jeweils ein Cystein pro Molekül durch die Dimerisierung verbrückt ist. Dass die Modifikation vollständig verläuft, zeigt das Auffinden von neun Modifikationen von neun Cysteinen pro Molekül der solubilisierten *inclusion bodies* (Tabelle 3.3). Somit muss angenommen werden, dass sowohl eine Mischpopulation der Disulfid verbrückten Cysteine des Propeptides vorliegen kann oder ein nicht vollständiger Reaktionsumsatz wegen schlechter Zugänglichkeit zu einer ungeraden Anzahl von modifizierten Cysteinen erfolgte.

Die weiteren biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit der Dimerfraktion der Größenausschlusschromatographie durchgeführt.

Tabelle 3.3: Bestimmung der molekularen Masse von Spätzle 11.7

Nach Bedarf wurden die freien Cysteine mit Iodacetamid zu methylierten Cysteinen (CAM) modifiziert mit gleichzeitiger Änderung der molekularen Masse um +57 Da je freies Cystein. Noch gebundenes Glutathion (GSH) aus dem Faltungspuffer erhöht die Masse des Proteins um 305 Da. Ungefaltetes Protein der *inclusion bodies* wird mit IB bezeichnet.

Isoform	Spezies	Gemessene Masse (Da)	Erwartete Werte			Differenz zu gemessener Masse (Da)
			Masse (Da)	Erwartete Cystine (-)	Modifikationen (-)	
Spz11.7	IB	27201	27201	0	-	-0,4
	modifizierte IB	27713	27714	0	9 CAM	-1
	Monomer	27501	27500	3	GSH	1
		27195	27195	3	-	0
	modifiziertes Monomer	27668	27671	3	3 CAM +GSH	-3
		27363	27366	3	3 CAM	-3
		27307	27309	3	2 CAM	-2
		27249	27250	4	1 CAM	-1
		27203	27193	4	0 CAM	10
	Dimer	54386	54388	7	-	-2
	modifiziertes Dimer	54610	54616	7	4 CAM	-6
		54555	54559	7	3 CAM	-4
		54500	54500	8	2 CAM	0
		54445	54443	8	1 CAM	2
		54395	54386	9	0 CAM	9
	Cystin-knoten	25122	25959	7	-	-837
25968		25959	7	-	9	

3.3.3 Die Stabilität von Spätzle 11.7

Eine hohe thermische Stabilität ist ein gemeinsames Merkmal der Proteine der Cystinknoten Familie. Um Spätzle aus *Drosophila* Perivitellin-Extrakten zu isolieren, wurde die Stabilität bei niedrigem pH-Wert und bei hoher Temperatur für die Reinigung ausgenutzt (Morisato & Anderson, 1994; Schneider *et al.*, 1994). Auch das dimere Spätzle 11.7 zeigt in Acetatpuffer (pH 4,5) beim Erhitzen auf 100 °C für 5 min keine Präzipitation. Einen genaueren Aufschluss gibt die Sekundärstrukturbestimmung mittels fern-UV CD-Spektroskopie bei verschiedenen Temperaturen. Die Spektren weisen bei unterschiedlichen Temperaturen von 4 - 70 °C keine signifikanten Unterschiede auf, was für eine thermische Stabilität des Dimers spricht. Weiterhin zeigen die Spektren bei 4 °C für Monomer und Dimer denselben Kurvenverlauf und ein Minimum bei 203 nm. Das Spektrum für das Dimer ist in Abbildung 3.9A unter nativen und denaturierenden Bedingungen gezeigt.

Das Spektrum des dimeren Spätzle 11.7 zeigt nach der CDPro Datenbank (Sreerama & Woody, 2000) ~30 % strukturierte Bereiche für ein β -Faltblatt enthaltendes Protein mit unstrukturierten Bereichen (~60 %). Daneben stimmt das Spektrum der fern-UV CD-Messung von rekombinantem, in *E. coli* exprimierten Spätzle 11.7 mit dem veröffentlichten fern-UV CD-Spektrum der Spätzle 8.19 ähnlichen Isoform HL01462 aus Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) Insektenzellen überein (Weber *et al.*, 2005). Dies weist darauf hin, dass das *in vitro* gefaltete Protein die native Struktur besitzt.

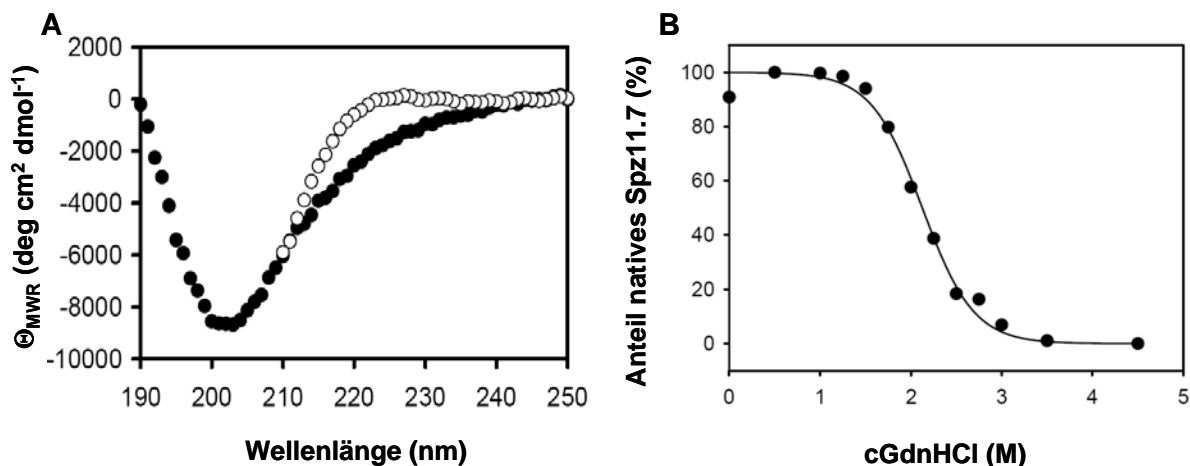


Abbildung 3.9: Fern-UV CD-Spektren und der Denaturierungsübergang von Spätzle 11.7

A Die fern-UV CD-Spektren von dimerem Spätzle 11.7 wurden bei 4 °C in Phosphatpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4) mit und ohne 6 M GdnHCl vermessen. Die native Probe ist in weißen Kreisen und die denaturierte Probe in schwarzen Kreisen dargestellt. **B** Aus den fern-UV CD-Spektren ist der native Proteinanteil in einem GdnHCl Denaturierungsexperiment bei 220 nm abgebildet.

In 6 M GdnHCl denaturiertes Dimer von Spätzle 11.7 zeigt im Bereich des fern-UV CD-Spektrum von 215 bis 225 nm eine abweichende Elliptizität von der nativen Probe. Dies bestätigt die Anwesenheit von gefalteten Regionen im Protein. Die Übergangsmessungen in GdnHCl zeigen ein kooperatives Entfaltungsverhalten eines idealen Zwei-Zustandsmodells (Abbildung 3.9B). Der Übergangsmittelpunkt liegt bei $\sim 2,1$ M GdnHCl für dimeres Spätzle 11.7. Dies zeigt, dass Spätzle 11.7 in GdnHCl eine moderate Stabilität (freie Entfaltungsenthalpie $\Delta G = 19,1 \pm 1,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und Kooperativität $m = 9,1 \pm 0,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}_{\text{GdnHCl}}^{-1}$) besitzt und dass sich Propeptid und Cystinknoten-Domäne gemeinsam entfalten.

Das konzentrationsabhängige Entfalten in GdnHCl kann auch mit Hilfe von Tryptophan-Fluoreszenz-Messungen analysiert werden (Abbildung 3.10A). Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm für die Fluoreszenz von ausschließlich Tryptophan wurde ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} \sim 345$ nm für natives Spätzle gemessen. Ein Emissionsmaximum bei dieser Wellenlänge spricht für ein nicht vollständig im Lösungsmittel exponiertes Tryptophan, da Spätzle 11.7 nur ein Tryptophan in der Cystinknoten-Domäne enthält. In 6 M GdnHCl denaturiertes Spätzle 11.7 zeigt ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} \sim 360$ nm eines Lösungsmittel exponierten Tryptophans mit viel höherer Fluoreszenzintensität im denaturierten Zustand. Somit wird die Tryptophan Fluoreszenz im nativen Zustand durch den Propeptid unterdrückt (*quenching* Effekt). Der Denaturierungsübergang ist reversibel und zeigt einen Übergangspunkt bei 2,0 M GdnHCl mit einer freien Entfaltungsenthalpie von $\Delta G = 23,9 \pm 1,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und Kooperativität von $m = 12,2 \pm 0,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}_{\text{GdnHCl}}^{-1}$ (Abbildung 3.10B). Somit stimmen die mit fern-UV CD-Spektren ermittelten Werte gut mit denen der Fluoreszenz überein.

Spätzle 11.7 zeigt in den Denaturierungsexperimenten der fern-UV CD- und Fluoreszenz-Messungen nur einen Übergangspunkt, so dass geschlossen werden kann, dass die Entfaltung in einem Schritt für Propeptid und Cystinknoten gemeinsam erfolgt.

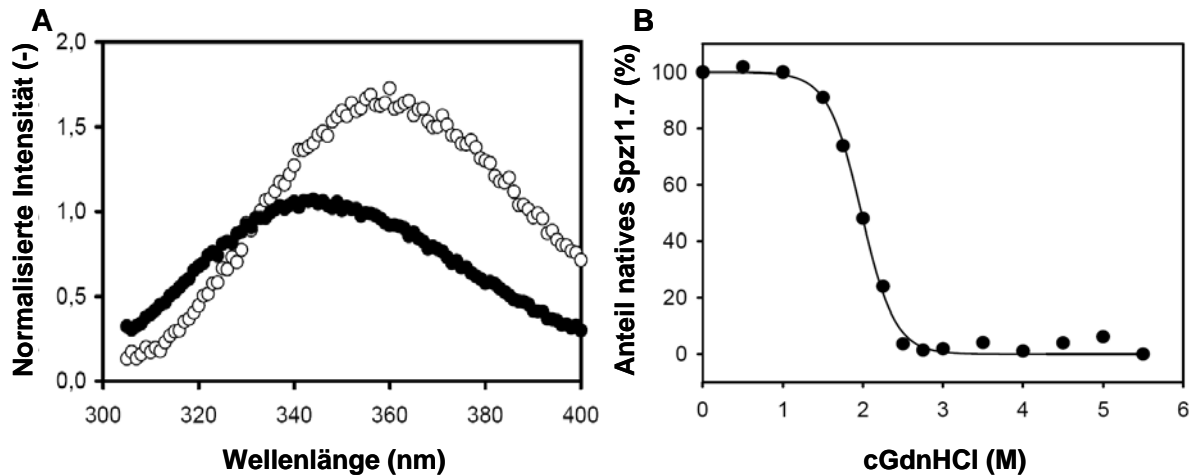


Abbildung 3.10: Tryptophan-Fluoreszenz-Spektren und Denaturierungsübergang von Spätzle 11.7

A Die Fluoreszenz-Spektren von Spätzle 11.7 wurde bei 20 °C in Phosphatpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4) mit und ohne 6 M GdnHCl vermessen. Die Spektren der nativen Probe (schwarze Kreise) und der denaturierten Probe (weiße Kreise) sind dargestellt. **B** Aus den Fluoreszenz-Spektren ist der native Proteinanteil des GdnHCl Denaturierungsexperiments bei 340 nm abgebildet.

3.3.4 Limitierte Proteolyse

Die Serinprotease Trypsin spaltet Proteine hinter jeder zugänglichen basischen Aminosäure (Arginin, Lysin). Bei neutralem pH-Wert und bei 20 °C spaltet sich Trypsin selbst, während Spätzle 11.7 Dimere an sich stabil sind. Ein proteolytischer Abbau der Spätzle 11.7 Dimere mit Trypsin resultierte in einem schnellen Abbau des Proteins zu einem stabilen ~24 kDa Fragment in einer nicht reduzierten SDS-PAGE und einem ~12 kDa Fragment in einer reduzierten SDS-PAGE (Abbildung 3.11).

Das unterschiedliche Laufverhalten des proteolytischen Fragmentes in reduzierter und nicht reduzierter Umgebung zeigt, dass das proteolytische Fragment ein kovalentes Dimer ist. Außer der Monomer- beziehungsweise Dimerbande und der Bande des 13 kDa Fragments ist auch eine Bande eines zeitweise stabilen Intermediates zu sehen.

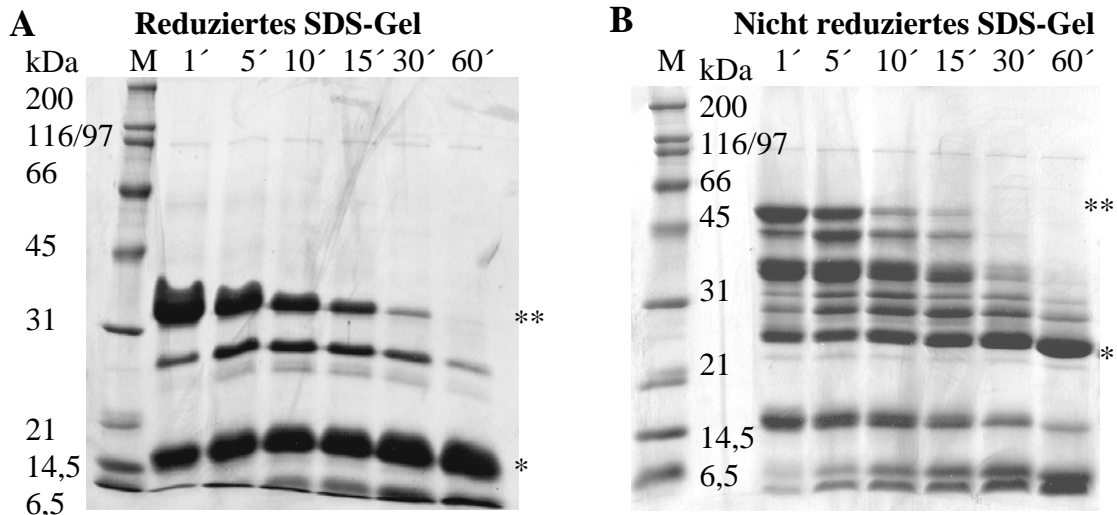


Abbildung 3.11: Limitierte Proteolyse von Spätzle 11.7 durch Trypsin

Der proteolytische Verdau der Spätzle 11.7 Dimere durch Trypsin wurde bei 4 °C durchgeführt, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu verlangsamen und um Intermediate zu sehen. Nach 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min und 60 min wurde eine Probe der limitierten Proteolyse entnommen und inaktiviert. **A** Auf einem reduzierten 12 % SDS-Gel sind das 27 kDa Monomer (***) und das 12 kDa proteolytische Fragment (*) markiert. **B** Auf einem nicht reduzierten 12 % SDS-Gel sind das 54 kDa Dimer (***) und das 24 kDa proteolytische Fragment (*) markiert.

Spätzle 11.7 besitzt einen C-terminalen His₆-tag, der vor und nach der Proteolyse durch Western Blot detektiert werden kann, womit es sich bei dem 13 kDa Fragment um ein C-terminales Fragment handeln muss. Die massenspektrometrische Analyse zeigt, dass es sich um die Cystinknoten-Domäne ohne das Propeptid handelt. Wird das Arginin in der Easter-Aktivierungssequenz VSSR↓VGGS als Spaltungsstelle angenommen, weicht das Fragment der partiellen Proteolyse um 9 Da bei einem Verdau bei 4 °C und ~840 Da bei einem Verdau bei 20 °C ab (Tabelle 3.3). Somit hat die Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Prozessierung des Dimers. Das Trypsin scheint bei höheren Temperaturen unspezifischer zu schneiden. Eine exakte Bestimmung der Sequenz der fehlenden ~840 Da durch Massenspektrometrie war durch den hohen Cystingehalt nicht möglich.

Das proteolytische Fragment ist etwas größer als das erwartete C-106 Fragment mit 12 kDa unter reduzierten und 24 kDa unter nicht reduzierten Bedingungen (DeLotto & DeLotto, 1998), weil Spätzle 11.7 einen C-terminalen His₆-tag enthält. Die Aminosäuresequenz des proteolytischen Fragmentes ist bis auf den rekombinanten C-terminalen His₆-tag identisch zu dem *in vivo* aktivierten Spätzle.

Das Trypsin baut nur das unstrukturierte Propeptid ab, weil die basischen Reste der strukturierten Cystinknoten-Domäne für die Proteolyse nicht zugänglich sind. Das gleiche Ergebnis wurde mit der Spätzle 8.19 ähnlichen Isoform HL01462 aus Sf9 Zellen erzielt (Weber *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis der partiellen Proteolyse liefert einen zusätzlichen Hinweis, dass die *in vitro* Faltung eine native Struktur gebildet hat.

Auch Monomere von Spätzle 11.7 wurden auf das Vorhandensein einer Trypsin resistenten Domäne unter denselben Bedingungen untersucht. Das Trypsin baut das Monomer vollständig ab, so dass selbst nach kürzester Zeit keine Fragmente auf einem SDS-Gel sichtbar waren. Damit kann dem Monomer keine Stabilität zugeschrieben werden und es ist anzunehmen, dass es ein Artefakt der *in vitro* Faltung ist.

Eine fern-UV CD-Messung des Cystinknotens zeigt ebenfalls ein Minimum, welches von 203 nm für Spätzle 11.7 zu 197 nm bei 4 °C mit einer negativeren Elliptizität verschoben ist. Dieses Spektrum weist im Vergleich zu einem Standard Datenset auf eine unstrukturierte Spezies hin (Abbildung 3.12). Aus Strukturvorhersagen für die Cystinknoten-Domäne wurde ein β -Faltblatt reiches Protein erwartet. Dieses sollte ein Spektrum mit einem Minimum bei 210 nm und einer positiven Elliptizität unter 200 nm zeigen. Der Vergleich der fern-UV CD-Spektren der Propeptid Isoform Spätzle 8.24 und dem Spätzle 11.7 zeigt einen Signalunterschied, welcher zur Cystinknoten-Domäne gehören sollte. Aber die Cystinknoten-Domäne ohne Propeptid zeigt ein unerwartetes fern-UV CD-Spektrum für ein β -Faltblatt reiches Protein. Eine mögliche Interpretation dieses Ergebnisses ist, dass die Cystinknoten-Domäne Struktur verliert, wenn die Stabilisierung durch das Propeptid fehlt.

Das Spektrum der fern-UV CD-Messung der durch Trypsin-Proteolyse generierten Cystinknoten-Domäne zeigt Ähnlichkeiten mit dem veröffentlichten fern-UV CD-Spektrum der Cystinknoten-Domäne der Spätzle 8.19 ähnlichen Isoform HL01462 aus Sf9 Zellen (Weber *et al.*, 2005). Der Kurvenverlauf der Elliptizitäten entspricht einander, nur ist das Minimum der durch Trypsin-Proteolyse generierten Cystinknoten-Domäne Spätzle 11.7 nach kürzeren Wellenlängen im Vergleich zum Spätzle 11.7 mit Propeptid verschoben, während die Cystinknoten-Domäne von Spätzle 8.19 aus Sf9 Zellen eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen erfährt. Aus dem Methodenteil der Veröffentlichung ist nur unvollständig zu erkennen, wie die durch Trypsin-Proteolyse gewonnene Cystinknoten-Domäne gereinigt wurde. Somit ist es nicht nachvollziehbar, wie dieses Ergebnis zu werten ist.

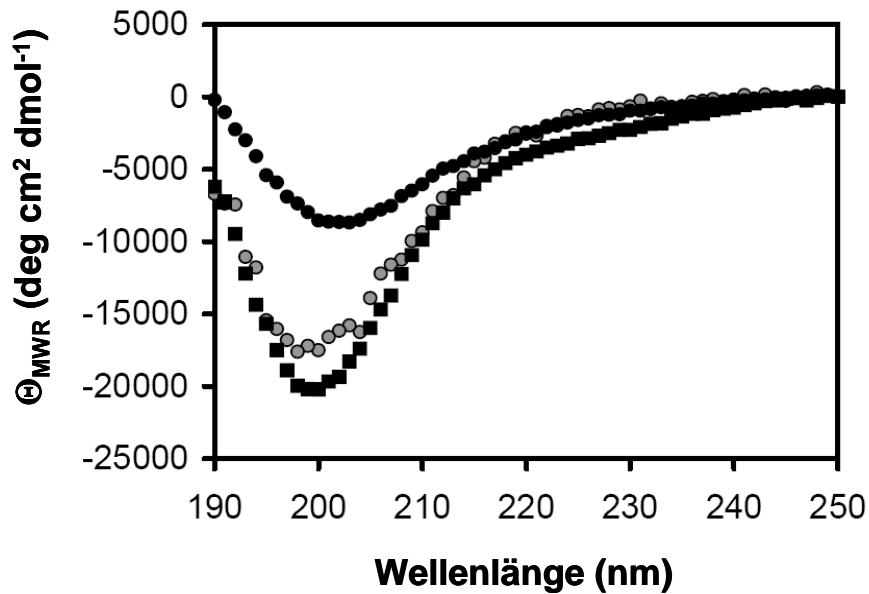


Abbildung 3.12: Fern-UV CD-Spektrum der Cystinknoten-Domäne Spätzle 11.7 im Vergleich der Isoformen

Es sind die fern-UV CD-Spektren der Cystinknoten-Domäne Spätzle 11.7 (graue Kreise), des Spätzle 11.7 (schwarze Kreise) und der Propeptid Isoform Spätzle 8.24 (schwarze Vierecke) dargestellt. Die relativ unstrukturierte Cystinknoten-Domäne und das Propeptid (Isoform Spätzle 8.24) sind als Komplex in der Spätzle 11.7 Isoform wesentlich strukturierter.

Ob die Cystinknoten-Domäne von Spätzle 11.7 entgegen den Erwartungen unstrukturiert ist, wurde mit einer 1D- ^1H NMR-Messung überprüft. Das NMR-Spektrum der Cystinknoten-Domäne hingegen zeigt Peaks, die für eine Sekundärstruktur sprechen. So sind Peaks oberhalb von 0 ppm und unterhalb von 9 ppm nachzuweisen (Abbildung 3.13). Dieses Ergebnis im Zusammenhang mit der Ähnlichkeit der fern-UV CD-Spektren zwischen der Spätzle Cystinknoten-Domäne und reifem NGF (Rattenholl *et al.*, 2001a) spricht für die Existenz einer strukturierten Cystinknoten-Domäne.

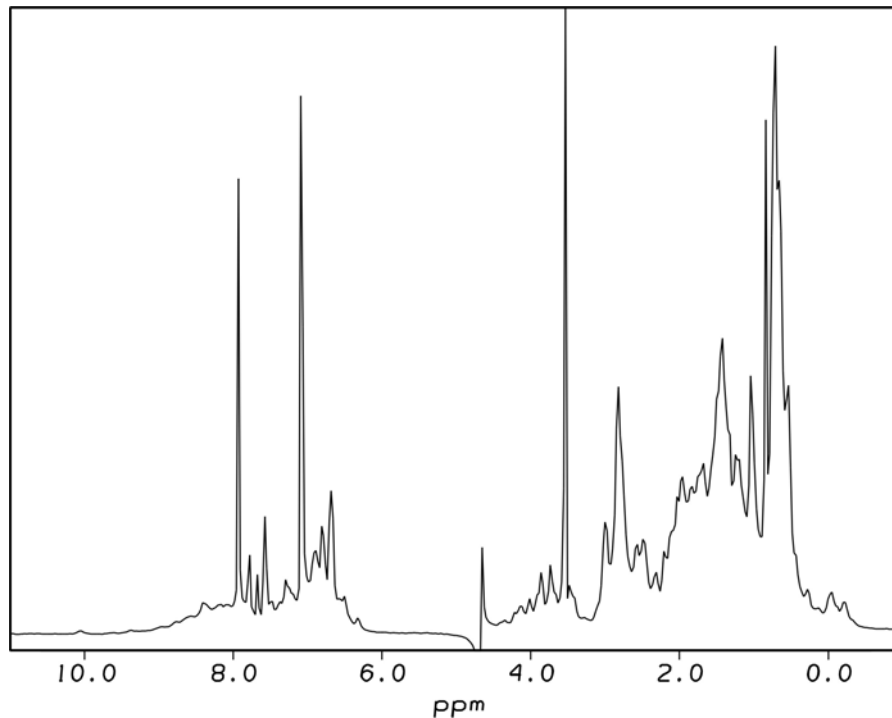


Abbildung 3.13: 1D-¹H NMR-Spektrum der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne

Die Abbildung zeigt das Spektrum einer 1D-¹H NMR-Messung der Cystinknoten-Domäne aus Spätzle 11.7, gemessen bei 5 g/L in 90 % Phosphatpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4) / 10 % D₂O. Die Peaks oberhalb von 0 ppm und unterhalb von 9 ppm zeigen das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen.

Die Tryptophan-Fluoreszenz-Messung der Cystinknoten-Domäne weist eine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu nativem Spätzle 11.7 zusammen mit einer Rotverschiebung des Maximums zu $\lambda_{\max} \sim 350$ nm auf (Abbildung 3.14A). Eine in 6 M GdnHCl denaturierte Proteinprobe hat eine leicht verringerte Fluoreszenzintensität mit einer Verschiebung des Maximums zu $\lambda_{\max} \sim 360$ nm. Die Fluoreszenzintensität nimmt zu, wenn der Propart durch Trypsinverdau oder GdnHCl Denaturierung nicht mehr die Tryptophan-Fluoreszenz quenchen kann. Somit müsste der Propart das Tryptophan abschirmen und es teilweise vom Lösungsmittel abgrenzen.

In Entfaltungsübergängen in verschiedenen GdnHCl Konzentrationen zeigt sich die Cystinknoten-Domäne mit einem breitem Übergang (freie Entfaltungsenergie $\Delta G = 8,9 \pm 0,9$ kJ* mol^{-1} ; Kooperativität $m = 4,2 \pm 0,4$ kJ* mol^{-1} * M_{GdnHCl}^{-1}) und einem Mittelpunkt mit 2,1 M GdnHCl als reversibel aber nicht kooperativ entfaltend und nur etwas stabiler in GdnHCl als Spätzle 11.7 mit einem Übergangspunkt von 2,0 M GdnHCl (Abbildung 3.14B).

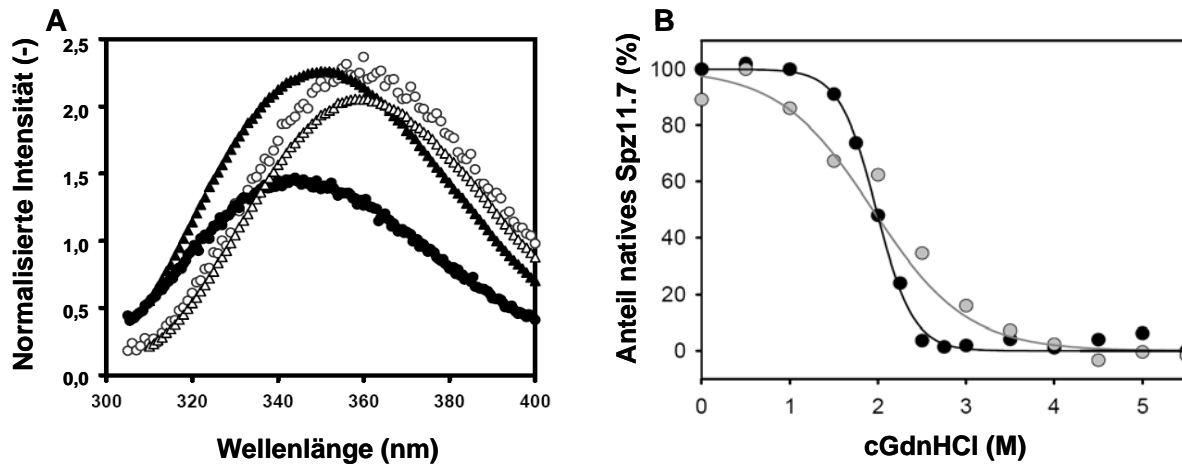


Abbildung 3.14: Tryptophan-Fluoreszenz-Spektren und die Denaturierungsübergänge der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne

A Die Fluoreszenz-Spektren der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne wurde bei 20 °C in Phosphatpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4) mit und ohne 6 M GdnHCl vermessen. Die native Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne (schwarze Dreiecke) ist mit dem denaturierten Protein (weiße Dreiecke), nativem Spätzle 11.7 (schwarze Kreise) sowie denaturiertem Spätzle 11.7 (weiße Kreise) dargestellt. **B** Aus den Fluoreszenz-Spektren ist der denaturierte Proteinanteil des GdnHCl Denaturierungsexperimentes der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne bei 330 nm (graue Kreise) und des Spätzle 11.7 (schwarze Kreise) bei 340 nm abgebildet.

Das Tryptophan-Fluoreszenz-Signal der Cystinknoten-Domäne von Spätzle 8.19 zeigt analog zu der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne keinen Quenching Effekt zwischen nativer und denaturierter Probe (Anhang Abbildung A.3; Funkner, 2007). Die Wellenlänge der maximalen Fluoreszenz verschiebt sich von 350 nm auf 360 nm und bestätigt ein teilweise Lösungsmittel exponiertes Tryptophan in der nativen Probe und ein Lösungsmittel exponiertes Tryptophan in der denaturierten Probe. Die Entfaltung in GdnHCl verläuft ähnlich der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne in einem undefinierten Übergang mit geringer Kooperativität bei 2,4 M GdnHCl (Anhang Abbildung A.4; Funkner, 2007). Dieser Übergangsmittelpunkt ist etwas höher als 2,1 M der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne.

3.3.5 Mikroinjektion des Spätzle 11.7 in *spz* defiziente *Drosophila* Embryonen

Eine erfolgreiche Dorsal-Ventral-Achsenbildung nach der Injektion rekombinanten Spätzle Proteins aus Insektenzellen wurde bereits für die Isoform 8.19 (DeLotto & DeLotto, 1998) und für mRNA Injektion unter anderem auch für Spätzle 11.7 (DeLotto *et al.*, 2001) beschrieben. Die Injektionen von perivitellinen Extrakten aus Wildtyp Embryonen zu *spz* defizienten Embryonen (Stein *et al.*, 1991) waren ebenso erfolgreich wie die Injektion von *spz* RNA (DeLotto & DeLotto, 1998).

In dieser Arbeit wurde als Expressionsquelle *E. coli* gewählt und das Protein musste *in vitro* gefaltet werden. Mit der Injektion in *D. melanogaster* Embryonen sollte die Aktivität des Proteins als Ligand für den Toll Rezeptor und die Weiterleitung des Signals für die Dorsal-Ventral-Achsenbildung überprüft werden. Spätzle 11.7 gehört neben Spätzle 8.19 und Spätzle 11.15 zu den Isoformen, die *spz* defiziente Embryonen vollständig weiterentwickeln lassen (DeLotto *et al.*, 2001). Es wurden 5 g/L Spätzle 11.7 Dimer injiziert, die in den Embryonen durch Easter prozessiert werden mussten, um aktiv an den Toll Rezeptor binden zu können. Unter dem Mikroskop konnte die Injektion in die zentrale, ventrale Seite bis in den perivitellinen Raum der Embryonen im zweiten Entwicklungsstadium beobachtet werden (Abbildung 3.15).

Insgesamt wurden in mehreren Passagen 183 *spz* defiziente Embryonen injiziert und 238 *spz* defiziente Embryonen wurden als Negativkontrolle ohne die Injektion von Protein ähnlich präpariert. Ebenso wurden Wildtyp Embryonen als Positivkontrolle ohne Injektion präpariert, um die natürliche Ausbildung der dorsal-ventralen Elemente zu beobachten.

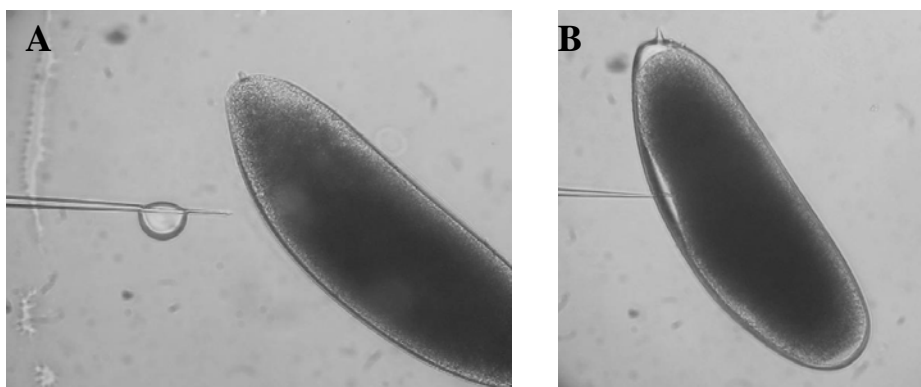


Abbildung 3.15: Mikroinjektion der *Drosophila* Embryonen

Es sind zwei verschiedene Zeitpunkte der Mikroinjektion in *spz* defiziente *Drosophila* Embryonen dargestellt. **A** Unter dem Mikroskop im Phasenkontrast sind die Injektionsnadel mit kontinuierlichem Proteinfluss sowie der zu injizierende Embryo zu sehen. **B** Die Abbildung zeigt die Verteilung der Flüssigkeit im perivitellinen Raum direkt nach der Injektion.

Von der Negativkontrolle entwickelte sich kein Embryo weiter, die Deletion des *spz* Gens war somit 100 %. Aus dem Pool der injizierten Embryos enthielten acht Embryonen partielle oder vollständige dorsal-ventral Elemente anstelle von dorsalisierten Körpern (Abbildung 3.16).

Es wurden jene Embryonen als erfolgreich entwickelt gezählt, die unter dem Mikroskop wenigstens drei sichtbare Bänder der Segmentierung enthielten. Die Erfolgsquote von 4,4 % der Injizierten ist recht gering und ist auf die Komplexität des Versuches zurückzuführen. Neben dem richtigen Zeitpunkt war auf den Injektionspunkt im ventralen Bereich sowie im perivitellinen Raum zu achten. Auch war die benötigte Menge an Protein unbekannt und eine exakte Abgabe an Volumen nicht möglich.

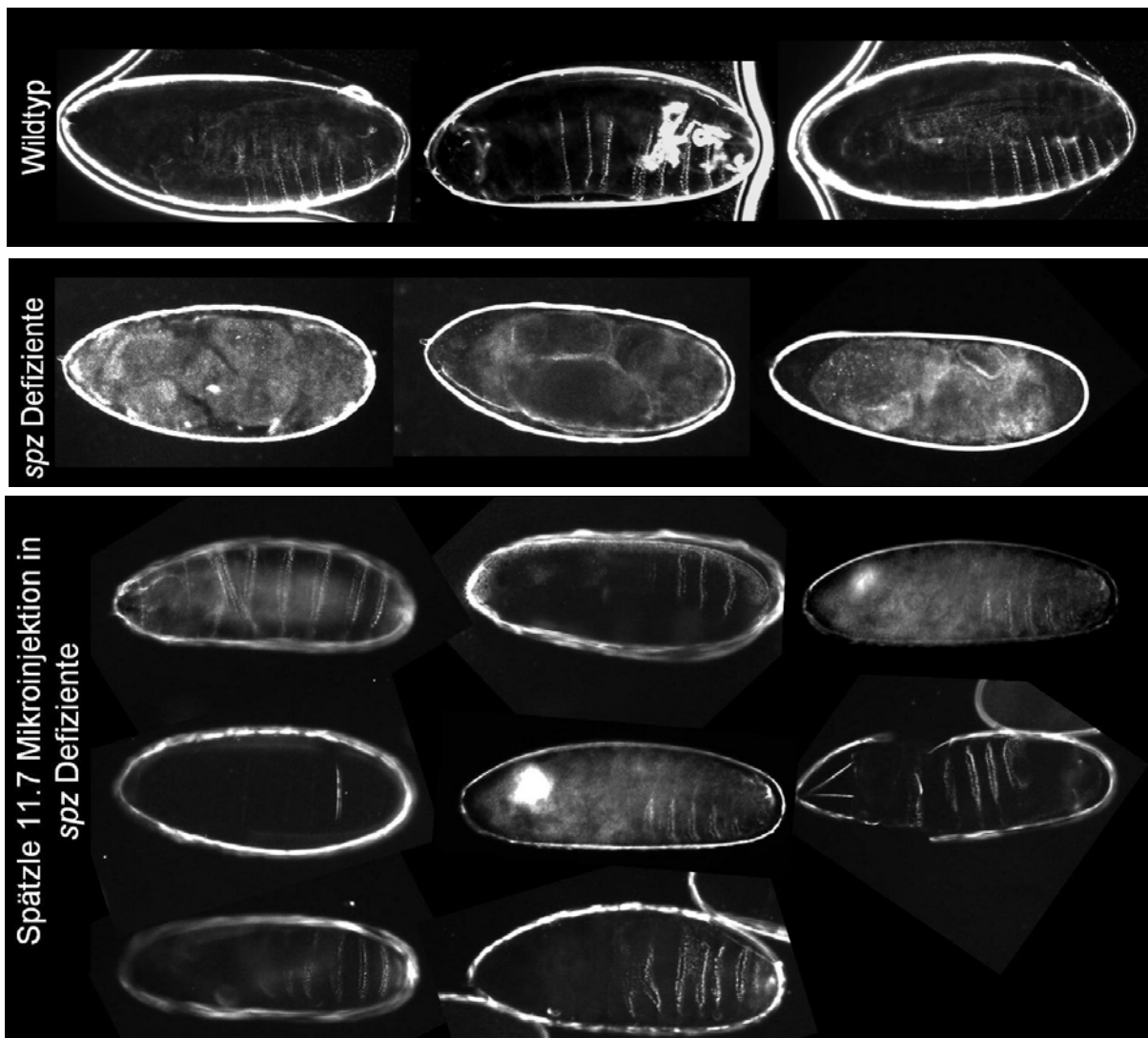


Abbildung 3.16: *Drosophila* Embryonen des Injektionsexperimentes

Die Abbildung zeigt die Positivkontrollen der Dorsal-Ventral-Achsenentwicklung von Wildtyp Embryonen, die Negativkontrollen von *spz* defizienten Embryonen ohne Injektion sowie die geretteten *spz* defizienten Embryonen durch die Mikroinjektion von Spätzle 11.7.

Als Anhaltswerte der Proteinkonzentration dienten die RNA-Konzentrationen, da die Proteinkonzentration bei der Injektion von Spätzle 8.19 nicht veröffentlicht ist. In den RNA-Injektionsexperimenten verschiedenster Proteasen wurde mit unterschiedlichsten Konzentrationen gearbeitet. So injizierte Stein *et al.*, (1991) mit perivitelliner Flüssigkeit und rettete 50 % der Injizierten, DeLotto *et al.*, (2001) injizierte mit 0,5 g/L RNA der verschiedenen Isoformen und rettete 50 % der Embryonen mit den aktiven Isoformen; Smith & DeLotto, (1994) injizierten mit 0,1 - 2 g/L RNA verschiedener Proteasen und retteten 50 - 100 % der Embryonen und Ligoxygakis *et al.*, (2002) injizierte mit 0,5 g/L mit 60 % Erfolg. Damit liegt die verwendete Proteinkonzentration in derselben Zehnerpotenz wie die RNA-Konzentrationen. Da es in der Literatur keine Mengenangaben für Proteinlösungen und nur eine Veröffentlichung überhaupt gab, wurden Vorversuche mit ansteigender Proteinkonzentration durchgeführt, bis eine Konzentration von 5 g/L im großen Maßstab qualitativ erfolgreich war. Weiterhin ist zu beachten, dass durch die Expression des Proteins in *E. coli* posttranslationelle Modifikationen, wie die Glykosylierung, in Spätzle 11.7 fehlen (siehe Abbildung 1.7: Sequenzüberlagerung der verwendeten Spätzle Isoformen). Die Glykosylierungen können einen wichtigen Einfluss auf die Regulation besitzen. Die Vergleichsexperimente der Injektion von rekombinantem Spätzle 8.19 aus Sf9 Zellen enthalten diese Glykosylierungen (DeLotto & DeLotto, 1998).

Die Anzahl der Negativkontrollen ist mit 238 Embryonen groß genug, um ausschließen zu können, dass Embryonen auch ohne erfolgreiche Injektion sich hätten weiter entwickeln können. Als weitere Negativkontrolle wurde reduziertes oder denaturiertes Protein in Betracht gezogen, um eine nachträgliche Faltung im perivitellinen Raum ausschließen zu können. Die Vorversuche mit 4 M GdnHCl (in 0,1 mM Natrium-Phosphatpuffer, 5 mM KCl, pH 7,2) oder 5 mM DTT (in 0,1 mM Natrium-Phosphatpuffer, 5 mM KCl, pH 7,2) zeigten eine hohe Unverträglichkeit in Wildtyp Embryonen. Die denaturierende Wirkung des 4 M GdnHCl wurde zuvor mit CD-Spektroskopie und die reduzierte Wirkung mit SDS-PAGE überprüft. Mit 5 mM DTT konnte zumindest die Reduzierung der intermolekularen Disulfidbrücke sichergestellt werden. Von 66 Embryonen, die mit DTT-Puffer injiziert wurden, entwickelten sich 11 (17 %) von 72 Embryonen weiter. Von den Embryonen, die mit GdnHCl-Puffer injiziert wurden, entwickelte sich kein (0 %) Embryo weiter. Zudem überlebten 77 von 93 (83 %) Wildtyp Embryonen die Injektion mit Injektionspuffer (0,1 mM Natrium-Phosphatpuffer, 5 mM KCl, pH 7,2).

3.4 Isoform Spätzle 8.19

Die Isoform Spätzle 8.19 konnte ohne Signalpeptid in BL21 (DE3) *E. coli* Zellen und deren Derivaten BL21 (DE3) pUBS als auch Rosetta (DE3) exprimiert werden. SDS-Gele zeigten für die Expression im Testmaßstab von 50 mL LB-Medium nach 4 h bei 37 °C in Rosetta (DE3) Zellen die beste Expression. In allen getesteten Zellen wurde das Protein in *inclusion bodies* exprimiert. Diese Isoform besitzt wie die Isoform Spätzle 11.7 die für Spätzle typische Cystinknoten-Domäne und damit neun Cysteine pro Molekül. Nicht korrekt verbrückte Cysteine während der Expression in *E. coli* können eine Ursache der unlöslichen Expression sein.

Der für Spätzle 11.7 entwickelte, auf 1 M Arginin basierende Faltungspuffer mit GSH und GSSG als Redoxsystem konnte auch für die Faltung von Spätzle 8.19 genutzt werden und führte zur Ausbildung von Dimeren. Die Ausbeute an Dimere konnte durch einen auf 1 M Tris/HCl basierenden Faltungspuffer wesentlich erhöht werden (Funkner, 2007). Die Abbildung 3.17 zeigt den erheblichen Einfluss der Temperatur und des Puffersystems auf die Faltung durch Änderung des Dimeranteils. Der höchste Anteil an Dimere konnte mit der Faltung bei 8 °C in 1M Tris/HCl erzielt werden. Die Komponenten des Redoxsystems, die Faltungszeit und die Dialyseschritte blieben unverändert.

Die biophysikalische Charakterisierung der Spätzle Isoform 8.19 erfolgte separat in der Diplomarbeit von A. Funkner (2007) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

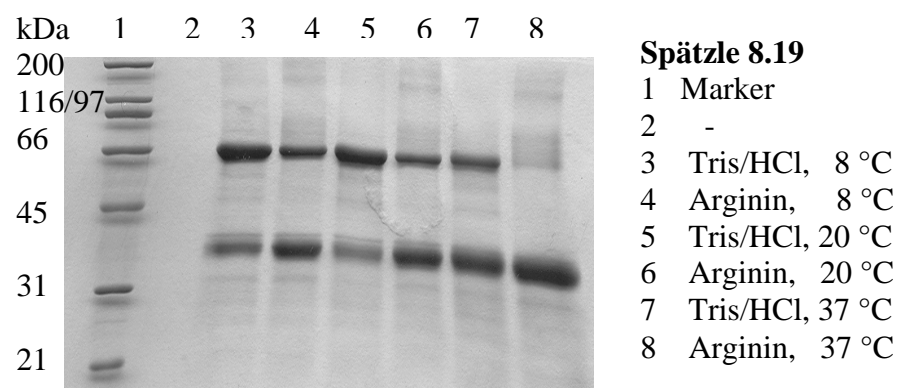


Abbildung 3.17: *in vitro* Faltung von Spätzle 8.19

Auf dem SDS-Gel sind die nicht reduzierten Proben des Proteins Spätzle 8.19 (Monomer 37 kDa, Dimer 74 kDa) nach der Dialyse aus dem Tris/HCl oder Arginin basierten Faltungspuffern abgebildet. Die Faltungen fanden bei 8 °C, 20 °C oder 37 °C statt.

3.5 Spätzle 11.27

Die Expression von Spätzle 11.27 wurde bis zum 1,5 L Maßstab erfolgreich durchgeführt. Auch diese Isoform, die die Cystinknoten-Domäne enthält, exprimiert in *inclusion bodies*, die nach dem erarbeiteten Protokoll von Spätzle 11.7 isoliert, gelöst und für Faltungsanalysen verwendet wurden. Aus den Expressionen im Schüttelkolben wurden 11 g Biofeuchtmasse aus 6 L Medium erhalten. Nach Zellaufschluss und *inclusion-bodies*-Aufreinigung und Solubilisation betrug die Ausbeute an Spätzle 11.27 0,2 g *inclusion bodies* * L⁻¹ Medium.

Anders als für Spätzle 11.7 konnte für Spätzle 11.27 mit dem auf Arginin oder Tris/HCl basierten Faltungspuffer keine Dimerisierung auf einem SDS-Gel beobachtet werden. Spätzle 11.27 bildete auch während einer Variation der Faltungstemperatur nur Monomere (Abbildung 3.18).

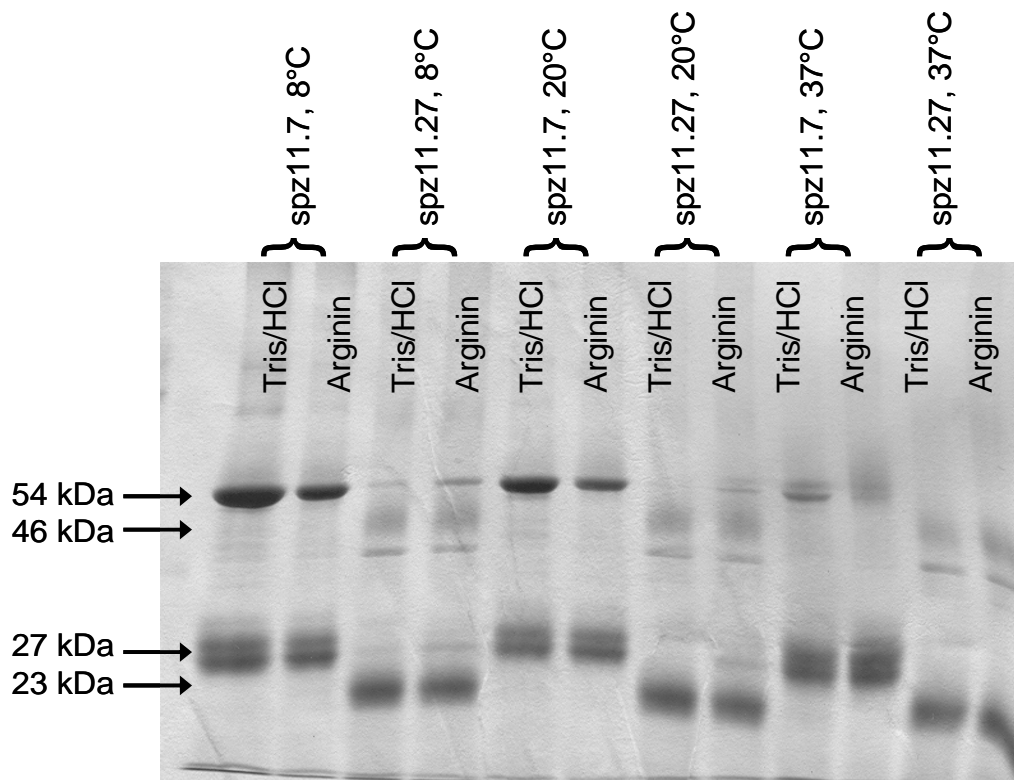


Abbildung 3.18: Vergleich der *in vitro* Faltungen von Spätzle 11.7 und Spätzle 11.27

Auf dem SDS-Gel sind die nicht reduzierten Proben der Proteine Spätzle 11.7 (spz11.7, Monomer 27 kDa, Dimer 54 kDa) und Spätzle 11.27 (spz11.27, Monomer 23 kDa, Dimer 46 kDa) nach der Dialyse aus dem auf Tris/HCl oder Arginin basierten Faltungspuffer abgebildet. Die Faltungen fanden bei 8 °C, 20 °C oder 37 °C statt.

Obwohl bei der Isoform 11.27 die Aktivierungsstelle von SPE und Easter durch Intron-Exon-Spleißen entfernt wurde, besitzt es alle neun Cysteine, so dass eine Dimerisierung theoretisch möglich ist. Durch das Entfernen des Exon wird das zweite Cystein des Proparts in die Nähe des ersten Cysteins der Cystinknoten-Domäne gebracht. Der Abstand beträgt nur noch acht Aminosäuren und führt eventuell zu einer falschen Konnektivität der Cysteine (siehe Abbildung 1.7: Sequenzüberlagerung der verwendeten Spätzle Isoformen).

In der vergleichbaren Faltung der Isoform Spätzle 11.7 kann sehr gut beobachtet werden, dass unter den gewählten Bedingungen eine Dimerisierung möglich ist. Für die anderen Isoformen nimmt der Dimeranteil mit höheren Temperaturen ab und im Tris/HCl-Faltungspuffer wird mehr Dimer gebildet als im Arginin-Faltungspuffer.

Das bei der Faltung gebildete, lösliche Monomer von Spätzle 11.27 ist in Gegenwart von Trypsin nicht stabil und ähnelt in dieser Hinsicht dem Monomer der Isoform Spätzle 11.7. Aus Veröffentlichungen zu dieser Isoform geht nicht hervor, ob es zu einer Dimerisierung kommt. Es ist somit denkbar, das Spätzle 11.27 als einzige Isoform in Funktionalitätsstudien (DeLotto *et al.*, 2001) vollständig inaktiv ist, weil es keine Dimere bildet, die zu einer Rezeptordimerisierung führen könnten. Wie monomeres Spätzle 8.24 *in vivo* partiell aktiv sein kann, ist damit nicht beantwortet.

3.6 Easter und Spätzle Prozessierendes Enzym

Die Protease Easter ließ sich in *E. coli* Rosetta (DE3) und BL21 (DE3) mit N-terminalem (pET15b) oder C-terminalem (pET21a) His₆-tag im 50 mL Maßstab exprimieren. Das SPE konnte hingegen nur in *E. coli* Rosetta (DE3) erfolgreich exprimiert werden (Abbildung 3.19).

Auf Grund des hohen Cysteingehalts von 16 Cysteinen pro Molekül wurden diese Proteine unlöslich in *E. coli* exprimiert. Das Reinigen und Solubilisieren der *inclusion bodies* war nach einem Standardprotokoll möglich (Rudolph & Lilie, 1996). Mit den solubilisierten *inclusion bodies* können nun Faltungsexperimente zur Ausbildung der Disulfidbrücken und der nativen Struktur durchgeführt werden.

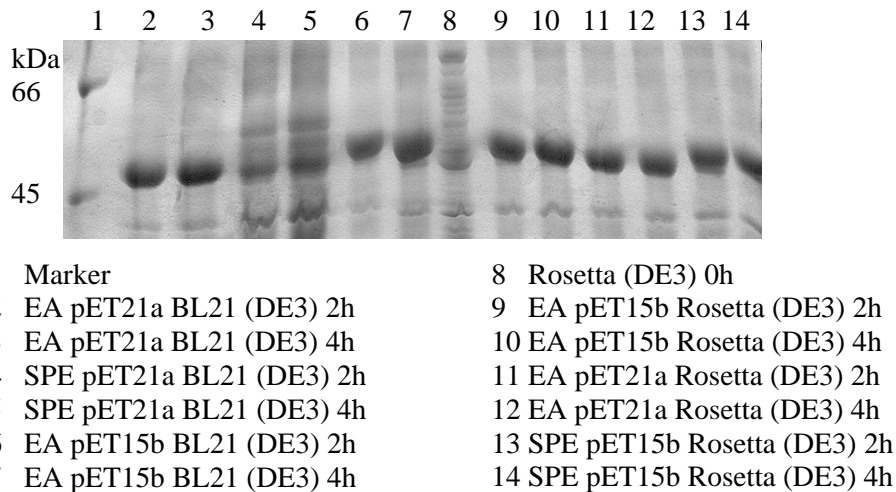


Abbildung 3.19: Expression der Easter und SPE Konstrukte

Der Ausschnitt aus einem reduzierten 12,5 % SDS-Gel zeigt die Expression von Easter (~43 kDa) und SPE (~44 kDa) in verschiedenen *E. coli* Zellen. Die Expressionsproben 2 h und 4 h nach der Induktion wurden mit einem Vergleich vor der Induktion (0 h) aufgetragen.

Die Fusionskonstrukte mit N-terminalem Maltose bindenden Protein und Glutathion-S-transferase wurden in Kooperation mit der OPPF (*Oxford Protein Production Facility*, Oxford/England 2007) im Rahmen des Kurses „*2nd EMBO practical course on high-throughput protein production and crystallization*“ hergestellt. Diese Fusionsproteine können neben den Eigenschaften anderer Affinitätstags, wie der effizienten Translationsinitiation, der Reinigung durch Affinität und dem Schutz vor proteolytischen Abbau, auch die Löslichkeit des Konstrukts durch ihre eigene, gute Löslichkeit verbessern (Kapust & Waugh, 1999). Diese Fusionskonstrukte von Easter und SPE wurden ebenfalls unlöslich exprimiert, so dass eine *in vitro* Faltung der *inclusion bodies* notwendig ist. Dies wurde im Rahmen der Diplomarbeiten von T. Sieg (2008) und C. Ursel (2009) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg separat bearbeitet.

3.7 Kristallisation der Spätzle Isoformen

3.7.1 Kristallisationsbedingungen

Um die atomare Struktur der Spätzle Isoformen zu identifizieren, wurden die verschiedenen Isoformen kristallisiert. Dazu wurden sechs verschiedene, kommerzielle Matrizen an Kristallisationslösungen (*Screening Kits*) und eine Arbeitsgruppen interne Matrix zum Kristallisieren verwendet. Neben Spätzle 8.24, Spätzle 11.7 als Dimer mit Propeptid oder Spätzle 11.7 als dimere Cystinknoten-Domäne wurden die Proteine auch mit N-terminalen, C-terminalen und ohne His₆-tag zum Kristallisieren angesetzt. Die Screening Kits wurden in 96-well Platten vom Pipettierroboter vorgelegt. Dieses Format eignet sich zur Hochdurchsatzsuche nach Kristallisationsbedingungen und kann mit einem *Imaging System* analysiert werden, ohne jeden einzelnen Tropfen am Mikroskop betrachten zu müssen. Neben den verwendeten Isoformen, dem Expressionskonstrukt und der Kristallisationstemperatur wurde vor allem die Proteinkonzentration variiert. Eine Zusammenstellung der Kristallisationsexperimente befindet sich im Anhang (Anhang Tabelle A.2).

In den Platten 428 bis 433 (Anhang Tabelle A.2) (Proteinkonzentration 8,6 g/L) kam es bereits bei ~30 % der Kristallisationspuffer zur Ausbildung von Präzipitat. Im Allgemeinen führten über 5600 Kristallisationsansätze neben klaren Tropfen auch zu leichter bis schwerer Präzipitation des Proteins. In einigen Kristallisationsbedingungen konnten kleine, kristalline Objekte oder Sphärolithe (lokale Konzentrierung des Proteins in runder Gestalt, keine Symmetrie in der Anordnung der Moleküle vorhanden) beobachtet werden. Diese Bedingungen wurden in 24-well Platten wiederholt (Anhang Tabelle A.3) und die Objekte mittels Röntgenstrahlung auf ihre Beschaffenheit aus Protein sowie dem Streuverhalten getestet.

Eine besondere Methode zur Einleitung der Kristallisation ist die Methylierung von Lysinen (White & Rayment, 1993). Durch diese reduktive Methylierung werden die Oberflächeneigenschaften des Proteins verändert, welches zu einer 30 - 60 % verringerten Löslichkeit und zu einem veränderten, aber nicht unbedingt erfolgreichen Kristallisationsverhalten führt. Spätzle 11.7 enthält 17 Lysine und einen ebenso modifizierbaren N-Terminus. Das Dimer wurde nach einem etablierten Protokoll (Walter *et al.*, 2006) über Nacht in geringer Konzentration methyliert. Das Protein war stabil und präzipitierte nicht. In der anschließenden Größenausschlußchromatographie wurde der reduzierende Reaktionspuffer gegen Phosphatpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4) getauscht. Auf

dem Chromatogramm sowie einem nicht reduzierten SDS-Gel konnte die dimere Spezies wieder detektiert werden. Ein fern-UV CD-Spektrum zeigte keine veränderte Sekundärstruktur bei 4 °C und das methylierte Protein lies sich wie gewohnt konzentrieren. Die massenspektrometrische Analyse bestätigte die dimere Form und zeigte die erfolgte Methylierung durch eine Erhöhung der molekularen Masse um 14 Da je Methylierung. Jedes Lysin kann zwei Modifikationen tragen und ist dann um 28 Da schwerer. Die vermessene unmethylierte Referenz und das methylierte Protein wiesen einen Masseunterschied von 960 Da auf (Tabelle 3.4). Das entspricht mit einer Abweichung im Gesamtergebnis von 6 Da 34 Modifikationen von je 14 Da im Dimer. Somit sind entweder 16 Lysine pro Monomer und der N-Terminus oder alle 17 Lysine modifiziert. Mit diesem methylierten Spätzle 11.7 wurde im direkten Vergleich mit nicht methylierten Spätzle 11.7 und Phosphatpuffer ein Satz 96-well Kristallisationsplatten pipettiert. Der Puffer diente zur Identifizierung von Kristallisationsbedingungen, die Salzkristalle bildeten.

Zusätzlich zu den Kristallisationsansätzen mit Spätzle 11.7 und Spätzle 8.24 wurden auch in der Diplomarbeit Funkner (2007) mit 14 x 96-well Kristallisationsplatten von Spätzle 8.19 über 1300 Kristallisationsbedingungen getestet. Hier konnten bislang nur Salzkristalle identifiziert werden (Anhang Tabelle A.5; Funkner, 2007).

Tabelle 3.4: Die Bestimmung der molekularen Masse des methylierten Spätzle 11.7

Eine Methylierungsreaktion (methyl) resultiert in einer Erhöhung der molekularen Masse um 14 Da je modifizierter Aminosäure.

Isoform	Spezies	Gemessene Masse (Da)	Erwartete Werte			Differenz zu gemessener Masse (Da)
			Masse (Da)	Erwartete Cystine (-)	Modifikationen (-)	
Spz11.7	Dimer	54386	54388	7	-	-2
	modifiziertes Dimer	55346	55340	7	34 methyl	6

Der erste Proteinkristall bildete sich nach drei Monaten Kristallisationszeit in einem erneuten Kristallisationsansatz der Isoform 11.7 bei 20 °C in 96-*well* Kristallisationsansätzen. Die zur Kristallisation verwendete Proteinlösung bestand aus 20 g/L Spätzle 11.7 Dimer in 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,4 und der Reservoirlösung 50 mM Tris/HCl, 20 % PEG 3350, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, Low Ionic Crystallization Kit). Der Kristall streute anisotrop bis 7 Å unter Kathodenstrahlung. Die primäre Kristallisationsbedingung lies sich in einem pH/PEG 3350-Screen (pH 7,6 - pH 8,6; 14 - 28 % PEG 3350 in 50 mM Tris/HCl) in 24-*well* Platten mit sitzendem Tropfen unter der Bedingung 50 mM Tris/HCl, 24 % PEG 3350, pH 7,8 mit gleicher Temperatur und gleicher Proteinkonzentration sowie Proteinreinigungscharge wiederholen. Die Kristalle zeigten eine sehr starke Verwachsung. Die Fragmente eines verwachsenen Kristalls streuten anisotrop bis 7 Å unter Kathodenstrahlung.

Eine Optimierung der Kristallisationsbedingung mit Zusatzsubstanzen (Additivscreen, Hampton Research) zeigte drei Bedingungen, welche die Kristallisation in 50 mM Tris/HCl, 20 % PEG 3350, pH 8,0 bei 20 °C und 20 g/L Spätzle 11.7 Dimer beschleunigten. Es wurde dieselbe Proteinreinigungscharge verwendet, wie in den 96-*well* Platten zuvor. Innerhalb von drei Wochen konnten mehrere Kristalle in hängenden Tropfen erhalten werden (Abbildung 3.20). Die Zusätze sind 0,1 M Betain-Monohydrat, 0,1 M Phenol und 0,1 M Glycin (D1, D5 und C3 des Additivscreens II, Hampton Research), die 1:10 in die 2 µL Kristallisationstropfen gemischt wurden. Die Kristalle, die mit Betain-Monohydrat als Zusatzsubstanzen kristallisierten, waren mit einer Größe von ca. 150 µm x 50 µm die größten Kristalle. Mit Phenol als Zusatzsubstanzen betrug die Größe der Kristalle 100 µm x 50 µm und mit Glycin ca. 50 µm x 45 µm. Die meisten Kristalle, die mit einer Zusatzsubstanzen kristallisierten, streuten ebenfalls anisotrop mit einer geringen Auflösung. Ein Kristall aus einem Kristallisationstropfen mit 0,1 M Betain-Monohydrat streute bis 2,8 Å unter Kathodenstrahlung und wurde bis zur Messung am Berliner Synchrotron BESSY (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung) in flüssigen Stickstoff gelagert. Die vorherigen Einfriertests der Reservoirlösung zeigten keine Eisringe, so dass auf einen Kryopuffer verzichtet wurde.

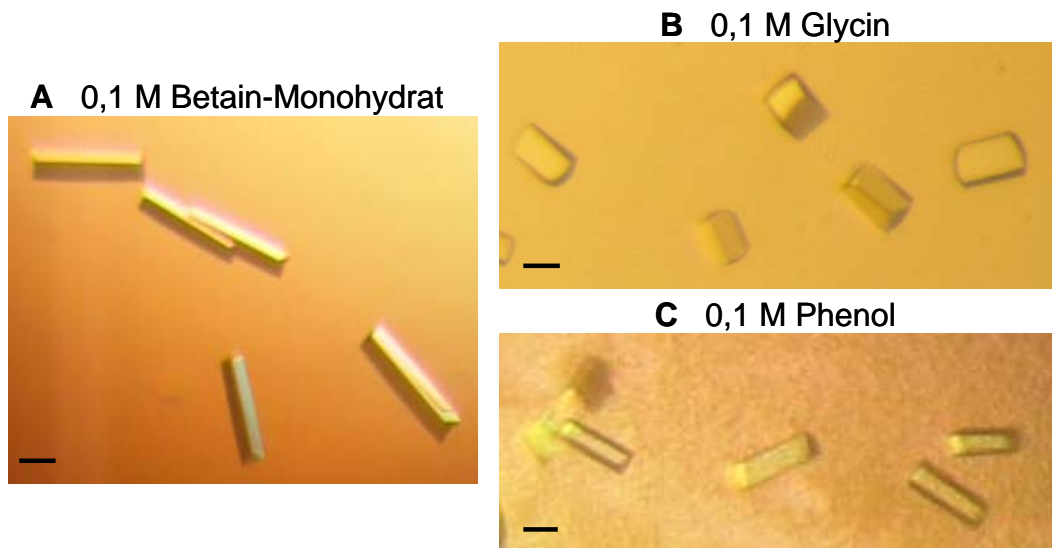


Abbildung 3.20: Kristalle von Spätzle 11.7

Die Abbildung zeigt die Kristalle des Additivscreens in 50 mM Tris/HCl, 20 % PEG 3350, pH 8,0 mit verschiedenen Additiven, die 1:10 in die Kristallisationstropfen gemischt wurden. **A** 0,1 M Betain-Monohydrat, **B** 0,1 M Glycin und **C** 0,1 M Phenol. Der Balken symbolisiert den Maßstab von 50 μm .

Um die Phasen während der Strukturberechnung ermitteln zu können, wurde mit Makro seeding versucht, Atome mit hohem Molekulargewicht in die Kristalle zu integrieren (*soaking*). Die Schweratomionen Ba^{2+} , Ni^{2+} und I^- wurden für das Makro seeding ausgewählt. Mit 10 mM der Salze dieser Schweratomionen als Zusätze zu neu angesetzten Additivkristallisationstropfen gelang es nicht, Kristalle mit guter Auflösung zu erhalten. Ebenfalls gelang es nicht, native Kristalle durch Makro seeding mit guter Auflösung zu erzeugen. Die Ursache zeigte sich in der Analyse des kristallisierten Fragmentes.

3.7.2 Analyse des kristallisierten Fragmentes

Ein in Reservoirlösung gewaschener und in nicht reduzierenden SDS-Probenpuffer gelöster Kristall wurde auf einem SDS-Gel auf seine molekulare Masse analysiert (Abbildung 3.21A). Dabei zeigte sich, dass der Kristall aus einer homogenen Proteinspezies bestand. Diese war auf eine Größe von ca. 21 kDa degradiert. Die Proteinproben der originalen Proteinlösung, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, zeigt neben Abbaubanden auch Dimere mit der ursprünglichen molekularen Masse von 54 kDa. Die SDS-Gelproben aus weiteren, ähnlichen Kristallisationstropfen zeigten neben der Proteinbande des kristallisierten Fragmentes eine niedermolekulare Bande an. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um die Abbauprodukte, die

vom kristallisierten Fragment gespalten wurden. Die Analyse weiterer Kristallisationsbedingungen, die auf derselben 96-well Platte lagen, zeigte eine unterschiedlich starke Degradation der Proteinlösung (Abbildung 3.21B). Es konnte festgestellt werden, dass nicht in allen Kristallisationstropfen ein Abbau geschehen war und somit die Degradation entweder pH-abhängig oder auf eine Kontamination zurückzuführen ist, die nicht in allen Tropfen vorhanden war.

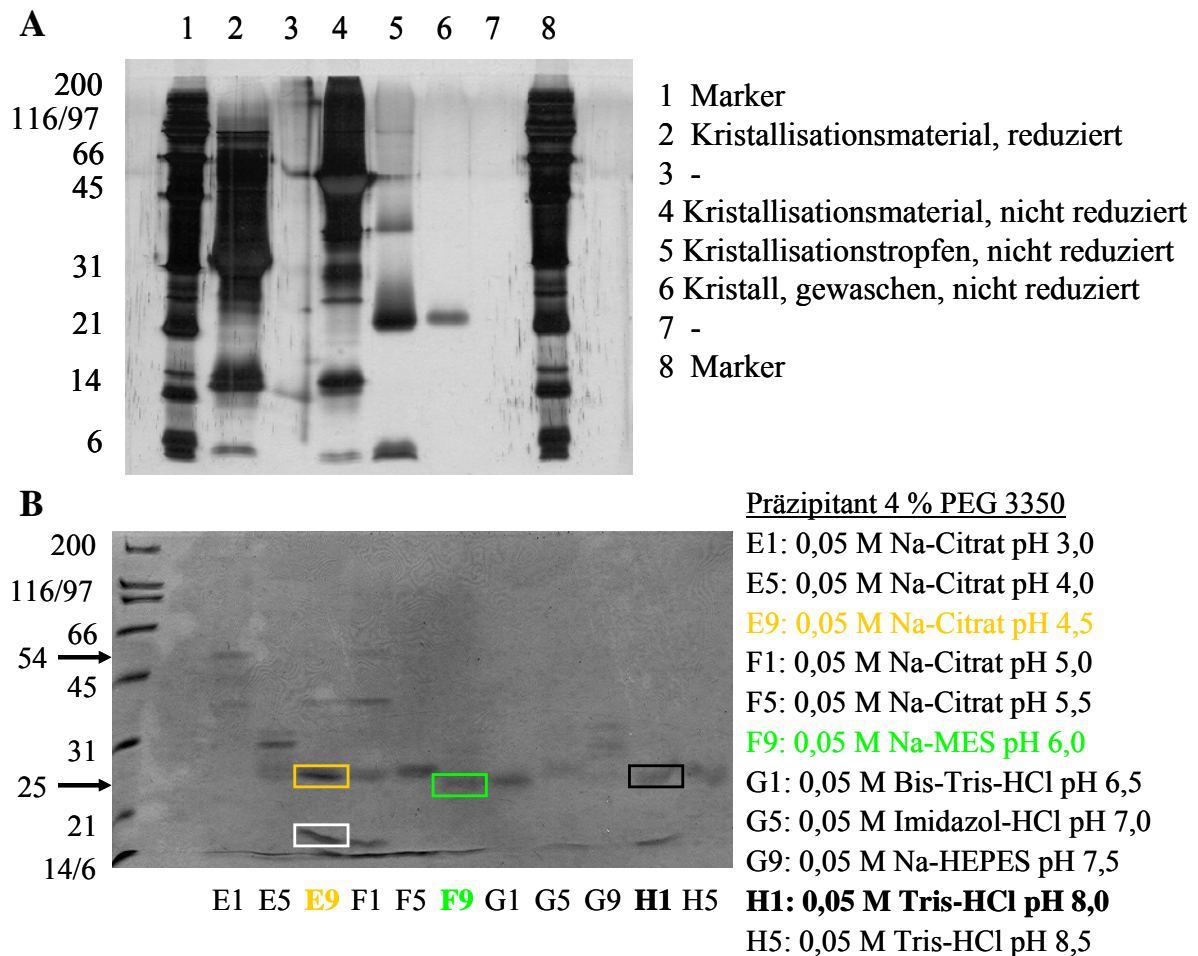


Abbildung 3.21: SDS-Gele der Kristallisation von Spätzle 11.7

Gezeigt werden verschiedene SDS-Gele, die Proteinproben von Kristallisationstropfen enthalten. **A** Das Silber gefärbte SDS-Gel zeigt in Spur 6 das nicht reduzierte, kristallisierte Fragment eines gewaschenen, in Probenpuffer gelösten Kristalls sowie zum Vergleich verschiedene Proteinproben während der Kristallisation. **B** Die Abbildung zeigt die unterschiedliche Proteindegradation der nicht reduzierten Kristallisationsansätze mit jeweils 4 % PEG 3350 als Präzipitant. Die Spuren E9, F9 und H1 enthalten ähnliche Proteinbanden wie diese im Kristall. Die gekennzeichneten Bereiche der Spuren E9, F9 und H1 (primäre Kristallisationsbedingung) wurden mit MALDI-MS weiter analysiert (siehe Abbildung 3.22).

Das kristallisierte Fragment sollte mit MALDI-MS (*matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry*) charakterisiert werden, um die Aminosäuresequenz für die Strukturbildung zu kennen. Als Proben für die Peptidmassenanalyse wurden Kristallisationstropfen mit ähnlichen Kristallisationsbedingungen verwendet, wie jene, die Kristalle hervorbrachten und einen vergleichbaren Proteinabbau auf einem SDS-Gel zeigten. Die Proteinbanden, welche dieselben Molekulargewichte wie das kristallisierte Fragment zeigten, wurden nach Färbung des Gels ausgeschnitten (Abbildung 3.21B).

Mit MALDI-MS wurde eine Dreifachbestimmung der Gelproben durchgeführt. Die Fingerprints enthielten die Massen der Peptide mit den Aminosäuren 139 - 143, 148 - 162, 193 - 204, 205 - 217 und 228 - 237 (Abbildung 3.22).

All diese Peptide sind in der C-terminalen Cystinknoten-Domäne der Spätzle 11.7 Pro-Isoform enthalten. Fehlende Peptide der C-terminalen Domäne sind entweder kleiner als 500 Da oder enthalten Cysteine, die zu Cystinen verbrückt sein sollten. Als Negativkontrolle wurde der Fingerprint des niedermolekularen Abbauproduktes verwendet, das nicht auf dem Gel des kristallisierten Fragments sichtbar war. Das Spektrum zeigte die Massen der Peptide mit den Aminosäuren 10 - 25, 26 - 39, 40 - 54, 55 - 66, 71 - 77, 78 - 84, 110 - 123 und 148 - 162 der Spätzle Isoform 11.7. Mit Ausnahme des Peptides 148 - 162 sind alle anderen Peptide in der N-terminalen Prodomäne der Spätzle 11.7 Pro-Isoform enthalten. Das Peptid 148 - 162, welches sowohl in der Negativkontrolle als auch im kristallisierten Fragment durch MALDI-MS gefunden wurde, zeigte in allen drei Kristall ähnlichen Proben ein deutlich höheres Signal als in der Negativkontrolle und sollte daher als falsch-negativ in der Negativkontrolle angesehen werden. Die Peptide 55 - 66 (1437,807 Da) und 205 - 217 (1437,686 Da) besitzen sehr ähnliche Peptidmassen, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Zur genaueren Analyse hätten diese Peptide nach der Massebestimmung sequenziert werden können. Doch auch ohne die Information dieser beiden Peptide ist eine Zuordnung der Sequenz des kristallisierten Fragments möglich.

Um den N-Terminus des kristallisierten Fragmentes zu identifizieren, der nach MALDI-MS zwischen den Aminosäuren 123 und 139 liegt, wurde eine N-terminale Sequenzierung von gewaschenen, gelösten Kristallen durchgeführt.


```

1 MKEYERIIKE LFTITNDEGV VLFNRTDTEV 30
31 QSEQPIPPRH PSDTFVFPDS PIAKYRPPQS 60
61 PARPLRNDTK EHNPCA KDE S QHLRNFCTNV 90
91 DDYPDL SGLT HKLKNNFAKF FSNDLQPTDV 120
121 SSRVGGSDER FLCRSIRKLV YPKKGLRADD 150
151 TWQLIVNNDE YKQAIQIEEC EGADQPCDFA 180
181 ANFPQSYNPI CKQHYTQOTL ASIKSDGELD 210
211 VVQNSFKIPS CCKCALKTGL EHHHHHH 237

```

Abbildung 3.22: Aminosäuresequenz des kristallisierten Fragmentes

Es sind das N-terminale Propeptid sowie in fett gedruckten Buchstaben die reife Cystinknoten-Domäne gekennzeichnet. Die durch MALDI-MS detektierten Peptide sind schwarz (Probe H1), grün (Probe F9), gold (E9, hochmolekulare Probe) oder grau (E9, niedermolekulare Negativprobe, siehe Abbildung 3.21) unterstrichen. Die gestrichelten Linien stehen für die Peptide mit sehr ähnlichen Peptidmassen: Y55 - R66 (1437,807 Da) und S205 - K217 (1437,686 Da).

Als Probe für das N-terminale Sequenzieren diente die Lösung aus drei ineinander gewachsenen Kristallen eines 2 µL Kristallisationstropfen mit 2 µg Protein. Die Kristalle wurden aus dem Kristallisationstropfen genommen, in Kristallisationspuffer gewaschen und anschließend in SDS-Ladepuffer gelöst. Nach sechs Zyklen Edman Abbau wurde die Sequenz V/A-?-?-Y/S-D-E/Q mit einer relativ geringen Signalstärke und einer Glycin Kontamination erhalten. Dieses Ergebnis lässt sich auf die Sequenz von Spätzle 11.7 eindeutig zu den Aminosäuren 124 - 129 V-G-G-S-D-E zu ordnen. Der ermittelte N-Terminus des kristallisierten Bereiches, welcher ebenso der N-Terminus des reifen Spätzle 11.7 nach proteolytischer Aktivierung ist, ist mit den MALDI-MS Ergebnissen vereinbar. Nach MALDI-MS Daten ist das letzte auszuschließende Peptid der Negativkontrolle 110 - 123 und das erste vom kristallisierten Fragment zu berücksichtigende Peptid 139 - 143.

Der C-Terminus des kristallisierten Fragmentes wurde durch Western Blot Analyse näher bestimmt, da das His₆-tag Peptid 228 - 237 nur in einer von drei Proben mit MALDI-MS identifiziert werden konnte. Von einer reduzierten und einer nicht reduzierten Proteinprobe eines Kristallisationstropfens mit sehr kleinen Kristallen wurde zusammen mit einer als Positivkontrolle genutzten Proteinprobe derselben Charge (bei -20 °C gelagert) ein SDS-Gel

angefertigt. Die Proteinbanden des ungefärbten Gels wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (BioRad) transferiert. Der Western Blot wurde nach Protokoll durchgeführt und His-tag enthaltende Proteine wurden nach der Entwicklung und Fixierung des Films sichtbar. Es wurden Signale sowohl für die reduzierte und nicht reduzierte Probe der Positivkontrolle (Protein derselben Charge wie bei der Kristallisation, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) aber nicht vom Kristallisationstropfen mit gelösten Kristallen erhalten. Daraus wird geschlossen, dass der C-terminale His₆-tag nicht mehr im Kristall vorhanden ist.

Eine Zusammenfassung der MALDI-MS, der N-terminalen Sequenzierung und der Western Blot Ergebnisse lässt die Schlussfolgerung zu, dass Spätzle 11.7 in seiner reifen, proteolytisch aktivierten Form kristallisierte. Das nach CD-, NMR- und Fluoreszenzmessung unstrukturierte Propeptid wurde von einer proteolytischen Aktivität im Kristallisationsansatz während der Kristallisationszeit von Wochen bis Monaten abgebaut. Es ist bekannt, dass das Propeptid der Spätzle Isoformen sehr anfällig für eine Spaltung durch Trypsin ist (Weber *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2005). Somit entspricht das kristallisierte Fragment einer Spaltung nach Arg123, obwohl es keine eindeutigen Beweise für eine solche Kontamination gibt. Dieselbe Charge an Protein, die während des Kristallisationsversuches bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde, sowie einige andere Kristallisationstropfen zeigten keinen Proteinabbau. Die Ursache, dass keine nativen Kristalle durch Makro seeding erhalten werden konnten, kann in dem Vorhandensein des Propeptides in der zu kristallisierenden Proteinlösung liegen.

3.8 Datensammlung und Strukturlösung

Die ersten Kristalle streuten bis zu $7\text{ }^{\circ}\text{Å}$ Auflösung unter Kathodenstrahlung des dem Institut für Biochemie/Biotechnologie zur Verfügung stehenden Röntgengenerators. Optimierung der Kristallisationsbedingungen resultierte in Kristallen, die unter Kathodenstrahlung bis $2,8\text{ }^{\circ}\text{Å}$ und unter Synchrotronstrahlung bis $2,4\text{ }^{\circ}\text{Å}$ streuten. Die Raumgruppe der orthorhombischen Kristalle ist $P2_12_12_1$, die Zellkonstanten betragen $a = 52,80\text{ }^{\circ}\text{Å}$, $b = 58,98\text{ }^{\circ}\text{Å}$ und $c = 62,21\text{ }^{\circ}\text{Å}$ sowie $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$. Die Statistik der Datensammlung, der Strukturlösung und -verfeinerung ist in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Struktur wurde in der Protein Daten Bank unter dem PDB Code 3E07 veröffentlicht.

Tabelle 3.5: Statistik der Datensammlung und Strukturlösung

Es sind die Werte der Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung der Cystinknoten-Domäne zusammengefasst. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale (2,47 - 2,40 Å).

Datensammlung	SPZ
Wellenlänge (Å)	0,91840
Raumgruppe	P2(1)2(1)2(1)
a (Å)	52,80
b (Å)	58,98
c (Å)	62,21
Max. Auflösung (Å)	2,40
R_{merge} (%) ^A	5,5 (63,1)
Vollständigkeit (%)	99,1 (99,9)
Anzahl der Reflexe	37360
Anzahl von einmaligen Reflexen	7919
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	16,49 (2,55)
Verfeinerung	
Auflösungsbereich (Å)	19,83 – 2,40
Vollständigkeit (Arbeitsset + Testset) (%)	99,2 (99,7)
Beugungsanzahl ($F > 0$)	7919
Wilson B-Faktor (Å ²)	59,22
R_{cryst} (%) ^B	22,2 (37,1)
Freier R-Faktor (%) ^C	26,5 (46,0)
Nicht Wasserstoffatome	1462
Protein	1419
Wasser	37
Glycerin	6
Rmsd (<i>root mean square deviation</i>) von Idealwerten	
Bindungslängen (Å)	0,007
Bindungswinkel (°)	1,40
Dihedralwinkel (°)	27,30
<i>gemittelter Temperaturfaktor</i> (Å ²)	59,22
Proteinatome / <i>Monomer A</i> / <i>Monomer B</i>	67,27 / 60,34 / 74,34
Hauptkette / <i>Monomer A</i> / <i>Monomer B</i>	62,87 / 54,44 / 71,39
Wasser	50,62
Glycerin	73,96
Protein Daten Bank Veröffentlichung	3E07

^A $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$; ^B $R_{cryst} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$

^C Freier R-Faktor wurde wie der R_{cryst} berechnet. Der Faktor basiert aber auf dem Test-Set bestehend aus 7,7 % der Daten, die nicht im Refinement verwendet wurden.

Das kleine Volumen der Elementarzelle mit einem Wasseranteil von 45 % (Matthews, 1968) deutete bereits darauf hin, dass die Kristalle nicht das vollständige pro-Spätze Dimer enthielten. Die Strukturlösung zeigte, dass die Elementarzelle aus zwei Monomeren besteht, die ein durch eine Disulfidbrücke kovalent verknüpftes Dimer bilden. Das finale Strukturmodell besteht aus den Aminosäuren 5 - 108¹ (Monomer A) und 4 - 106 (Monomer B), 37 Wassermolekülen und einem Glycerin Molekül mit einer Auflösung von 2,4 Å und mit einem R-Faktor von 0,222 sowie einem freien R-Faktor von 0,265. Die Stereochemie des Strukturmodells wurde in Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) analysiert: 91,7 % der Aminosäuren sind in der bevorzugten (*favoured*) Region des Ramachandran Plots lokalisiert und 8,3 % im zusätzlich erlaubten (*add allowed*) Bereich (Abbildung 3.23).

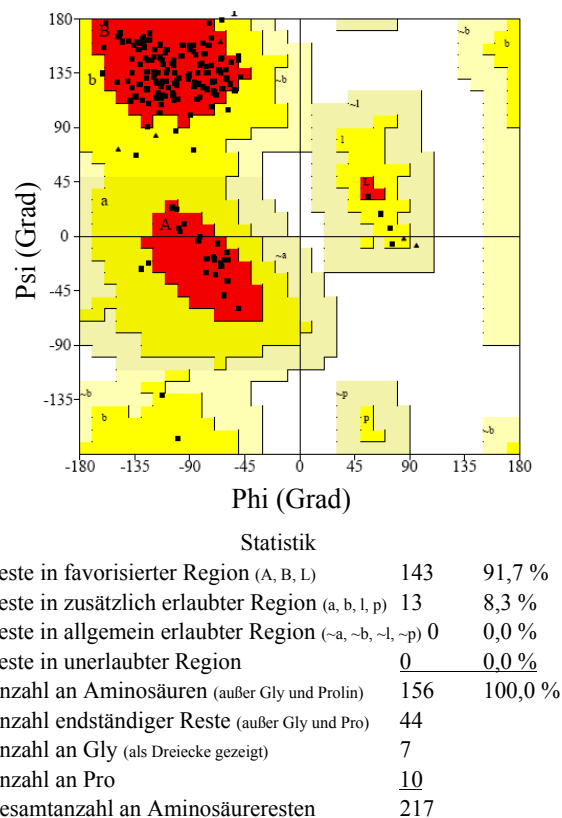


Abbildung 3.23: Ramachandranplot

Die Psi und Phi-Winkel der Peptidbindungen wurden auf favorisierte, erlaubte und nicht erlaubte Winkelkombinationen überprüft und grafisch im Ramachandranplot ausgegeben (Procheck, Laskowski *et al.*, 1993).

¹ Die Nummerierung der Aminosäuren ändert sich. Während die Proisoform die Aminosäuren 1 - 237 enthält, entspricht das Val124 nun Val1 der Cystinknoten-Domäne, welche aus den Aminosäuren 1 - 114 besteht.

3.9 Röntgenkristallstruktur

Die Cystinknoten-Domäne der Isoform Spätzle 11.7 zeigt eine größtenteils aus β -Faltblättern bestehende, längliche Struktur (Abbildung 3.24).

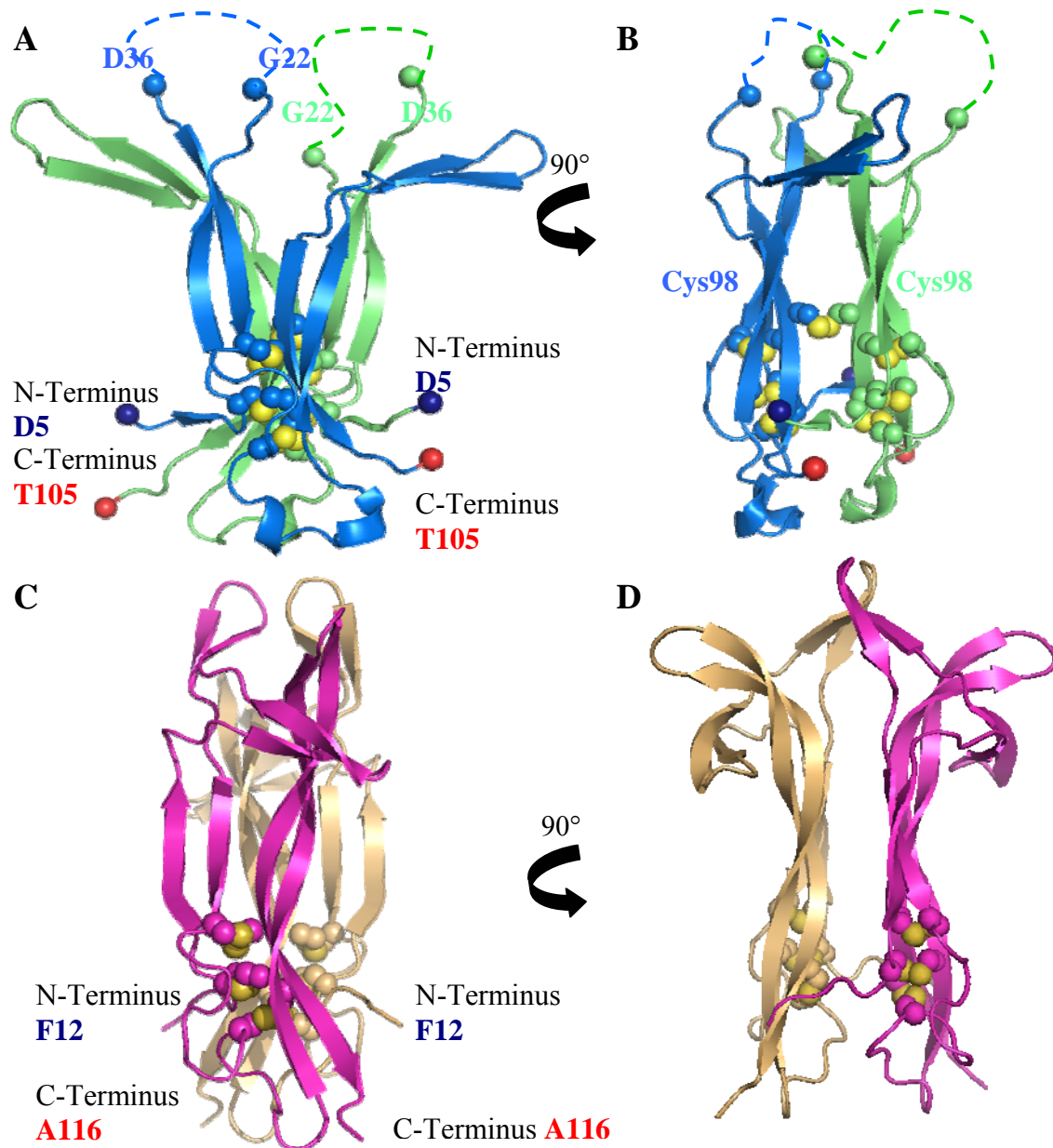


Abbildung 3.24: Kristallstruktur der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne

Die Abbildung zeigt die Sekundärstrukturelemente der Proteine Spätzle im Vergleich zu NGF (Pymol, DeLano, 2002) **A** Seitenansicht der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne sowie in **B** die Frontansicht, um 90° gedreht zur Seitenansicht. Dargestellt sind die Monomere in Grün und in Blau sowie die Cystin-Seitenketten in Kugeln mit gelben Schwefelatomen. Die N-Termini wurden als blaue Kugeln, die C-Termini als rote Kugeln sowie die flexible Schleife in einer gestrichelten Linie abgebildet. **C** Seitenansicht des reifen NGF sowie in **D** die Frontansicht (PDB Code: 1BET, McDonald *et al.*, 1991). Die Monomere des reifen NGF sind in Pink und Beige dargestellt sowie die Cystin-Seitenketten in Kugeln mit gelben Schwefelatomen.

Die N- und C-Termini befinden sich auf der dem Cystinknoten zugewandeten Seite des Moleküls. Das andere Ende des Moleküls wird durch die Schleifen der β -Faltblätter definiert. Für das Monomer A ist die Struktur der Aminosäuren Asp5 bis Glu108 aus der Elektronendichte ersichtlich. Zwei zusätzliche Aminosäuren des C-terminalen His₆-tag, aber nicht die Histidine selber, konnten in die Struktur gebaut werden. Das Monomer B unterscheidet sich leicht in der Kettenlänge zu Monomer A. So konnten die Aminosäuren Ser4 bis Gly106 identifiziert werden. In beiden Strukturen der Monomeren fehlt die Schleife der Aminosäuren Leu23 bis Asp36, da für diese keine Elektronendichte ermittelt werden konnte. Dies deutet auf eine unstrukturierte, flexible Region in der Cystinknoten-Domäne hin. Die zwei Monomere A und B haben sich zu einem Homodimer arrangiert, welches in paralleler Ausrichtung ein so genanntes Kopf-zu-Kopf-Dimer bildet. Eine intermolekulare Disulfidbrücke der Cys98 in Monomer A und B stabilisiert das Dimer. Das Disulfidmuster des Cystinknoten wird durch die Disulfidbrücken der Cysteine Cys10-Cys68, Cys47-Cys99 und Cys54-Cys101 (CysI-CysIV, CysII-CysVI, CysIII-CysVII) gebildet. Der Cystinknoten bildet einen makrozyklischen Ring aus dem Peptidrückgrat zweier β -Stränge und zweier Cysteine (Cys47-Cys99 und Cys54-Cys101), der von einer Disulfidbrücke (Cys10-Cys68) durchdrungen wird.

Die Struktur der Cystinknoten-Domäne besteht pro Monomer aus den Sekundärstrukturelementen dreier β -Faltblätter sowie einer kurzen Helix. Zwei β -Faltblätter sind parallel zur Dimerisierungsfläche angeordnet und zeigen die für die Cystinknoten typische Verdrehung. Das dritte Faltblatt ist senkrecht zu den zentralen Faltblättern ausgerichtet, wird zum Teil aus Strängen Symmetrie verwandter Monomere durch Domänenaustausch gebildet und stabilisiert somit das Dimer. Diese Anordnung der β -Faltblätter gibt der Gesamtstruktur eine T-ähnliche Gestalt. Viele der Lösungsmittel exponierten Aminosäuren des dritten Faltblattes sind hydrophob (Ala78, Ile80, Leu86, Val88, Leu16, Thr18 und Ala41). Durch Kristallkontakte zu den Symmetrie verwandten Molekülen werden diese Aminosäureseitenketten im Kristall vom Wasser abgeschirmt (Abbildung 3.25). In Lösung könnten diese Aminosäuren durch das Propeptid oder der flexiblen Schleife vom Lösungsmittel abgegrenzt werden.

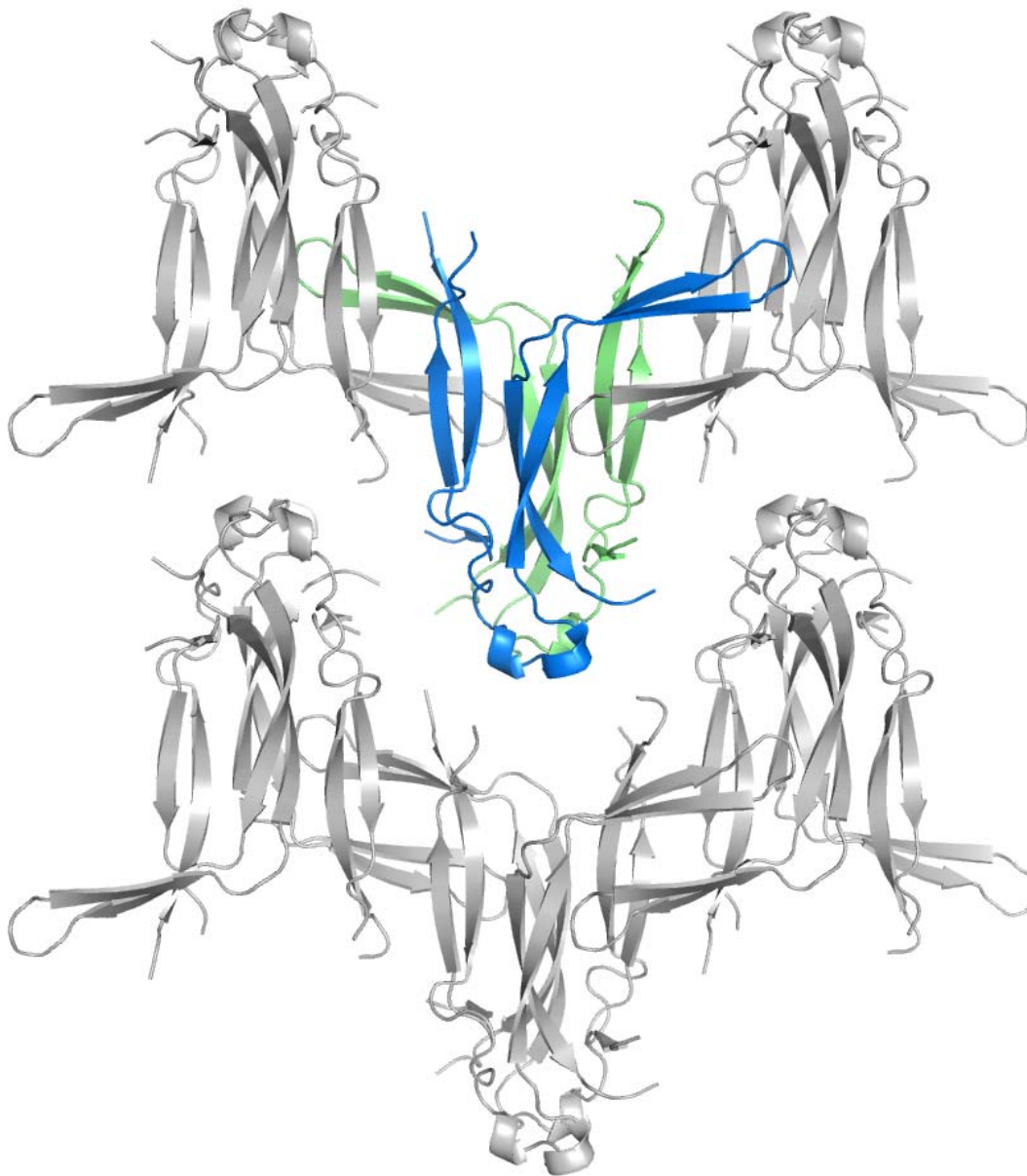


Abbildung 3.25: Symmetrie verwandte Moleküle in der Kristallanordnung

Die Spätzle Monomere der asymmetrischen Einheit sind in Grün und Blau in ihrer Sekundärstruktur dargestellt. Die Symmetrie verwandten Moleküle wurden mit Pymol (DeLano, 2002) berechnet und in Silber dargestellt. Das senkrecht zu den β -Faltblättern des Cystinknotens stehende dritte β -Faltblatt zeigt eine Wechselwirkung über hydrophobe Aminosäuren mit dem dritten β -Faltblatt eines Symmetrie verwandten Moleküls.

An der ca. 2000 \AA^2 großen Dimerisierungsfläche treten weitere stabilisierende Effekte durch Wechselwirkung zwischen einzelnen Aminosäuren auf. Etwa drei Viertel der Dimerisierungsfläche wird durch das β -Faltblatt des Cystinknotens gebildet und ein Viertel durch den Domänen-Austausch des dritten Faltblattes. Die Dimerisierungsfläche zeigt an der Seite der Termini einen hauptsächlich hydrophoben Charakter. Um den Cystinknoten

dominieren hydrophile Aminosäuren die Dimerisierungsfläche und erst an der Seite der Schleifen treten wieder vermehrt hydrophobe Aminosäuren auf, die die Dimerisierungsfläche und eine Einhöhlung umschließen. Diese Einhöhlung durchdringt das gesamte Moleküle beginnend an der den Schleifen zugewandeten Seite und endet noch deutlich vor dem Cystinknoten (Abbildung 3.26). Diese tiefe Einhöhlung könnte durch die hydrophoben Aminosäurereste am Dimerisierungsrand eine Bindestelle für kleine Moleküle darstellen.

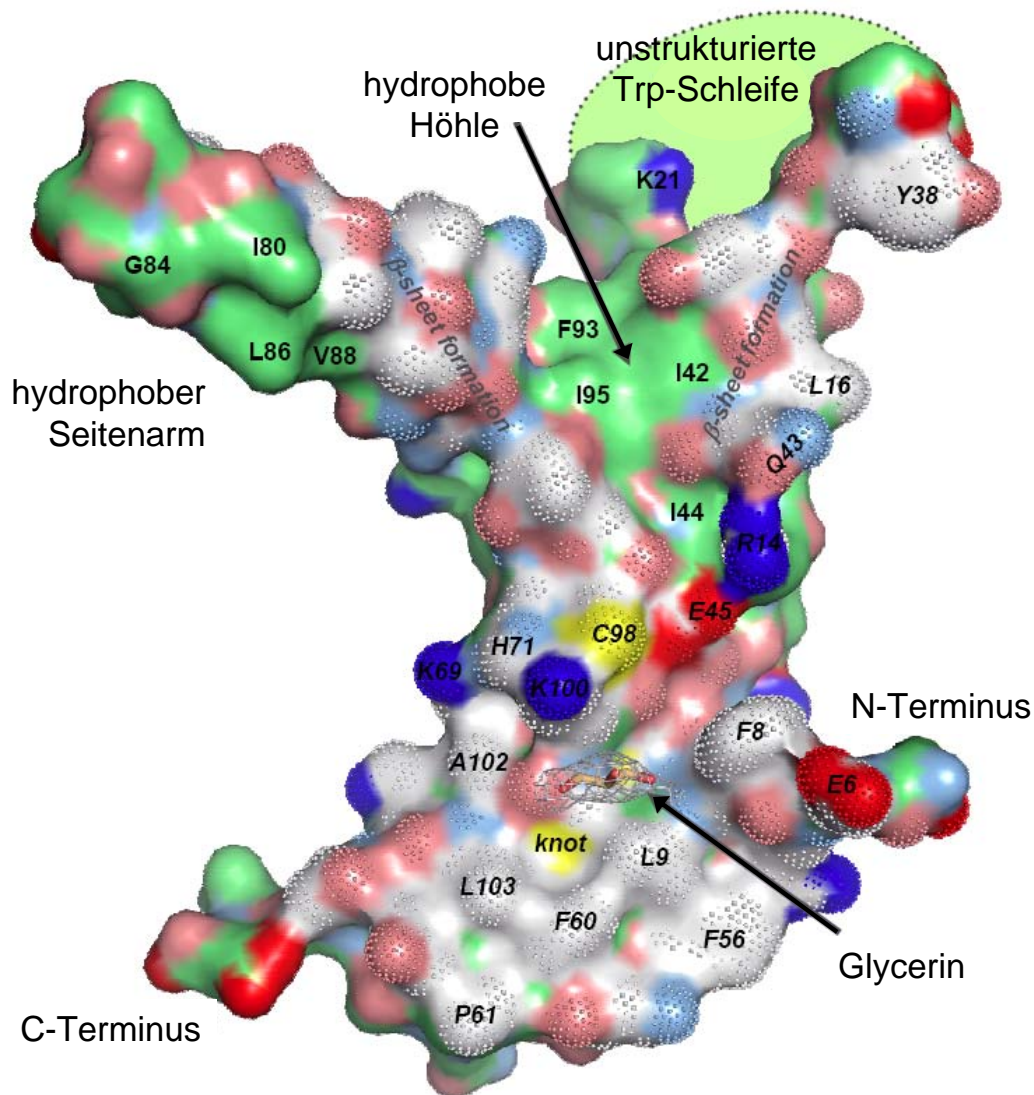


Abbildung 3.26: Dimerisierungsfläche der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne

Die Abbildung zeigt die Dimerisierungsfläche der Cystinknoten-Domäne und enthüllt eine tiefe Einhöhlung an der Molekülseite der Schleifen, hydrophobe Seitenarme sowie eine hydrophobe Umgebung um den Cystinknoten. Oberflächenexponierter Kohlenstoff ist in Grün, verdeckter Kohlenstoff in Weiß, polarer Stickstoff in Hellblau, basischer Stickstoff in Dunkelblau, polarer Sauerstoff in Pink und saurer Sauerstoff in Rot dargestellt. Die angeraute Oberfläche mit der Aminosäurenummer bezeichnet Atome in Kontakt mit dem anderen Monomer. Zusätzliche Elektronendichte konnte mit einem Molekül Glycerin besetzt werden, welches mit orangen Stäbchen dargestellt ist. Die *omit map* Elektronendichte in Grau ist mit 3σ konturiert. (Pymol, DeLano, 2002)

Eine Betrachtung der Oberfläche der gesamten Struktur zeigt außer den hydrophoben Aminosäuren des dritten β -Faltblattes keine offensichtlichen, potentiellen Bindungsstellen des Propeptides oder des Toll Rezeptors. Zusätzliche Elektronendichte in der Dimerisierungsfläche wurde mit einem Glycerin Molekül besetzt, das wahrscheinlich aus den für die Konzentrierung des Proteins verwendeten Filtrationseinheiten stammt.

Wie aus CD-Messungen bekannt ist, zeigt Spätzle 11.7 als Proform ein kooperativeres Entfalten als die Cystinknoten-Domäne allein. Da in der Struktur eine flexible Schleife enthalten ist, kann die Stabilisierung dieser durch das Propeptid die CD-Ergebnisse unterstützen. Ebenso ist das einzige Tryptophan des Proteins in der flexiblen Schleife positioniert, so dass bei Fluoreszenzmessungen der Cystinknoten-Domäne ohne Propeptid ein breiter Entfaltungsübergang gemessen werden konnte. Da das Tryptophan vom Propeptid in seiner Fluoreszenzintensität vermindert wurde, liegt das Propeptid sehr wahrscheinlich über dem Tryptophan und damit über der flexiblen Schleife der Cystinknoten-Domäne. Das Propeptid wird damit die flexible Schleife stabilisieren und zu einem höher kooperativen Übergang verhelfen. Die möglichen Positionen des Propeptides in der Proisoform können soweit eingeschränkt werden, dass der N-Terminus der Cystinknoten-Domäne bekannt ist und eventuell der Höhlenausgang geschlossen oder die flexible Schleife stabilisiert wird.

Eine solche Wechselwirkung des Propeptides mit der Cystinknoten-Domäne wurde bereits an der Spätzle Isoform HL01462 gezeigt. Das Propeptid bleibt nach einer Spaltung von der Cystinknoten-Domäne bis zur Bindung an den Rezeptor assoziiert (Weber *et al.*, 2007).

4 Diskussion

4.1 *in vitro* Faltung von Spätzle

Die Spätzle Isoformen mit der Cystinknoten-Domäne wurden in *E. coli* unlöslich exprimiert, während Spätzle 8.24 wohl auf Grund des geringeren Anteils an Cysteinen löslich exprimiert werden konnte. Bislang wurde Spätzle aus *D. melanogaster* Embryonen gewonnen (Schneider *et al.*, 1994; Morisato & Anderson, 1994) oder in Sf9 Insektenzellen rekombinant exprimiert (DeLotto & DeLotto, 1998; DeLotto *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2003). Die für Spätzle 11.7 entwickelte Reinigungsstrategie und die Arginin-Faltung konnten problemlos auf Spätzle 8.19 übertragen sowie die Dimerbildung mit einem auf Tris/HCl basierenden Faltungspuffer optimiert werden (Funkner, 2007). Beide entwickelten Faltungspuffer führten zur Ausbildung von Dimeren neben der Existenz von Monomeren, wobei sich die Monomere als instabil und nicht nativ erwiesen. Die Tendenz Dimere zu bilden, war in dem Tris/HCl-Faltungspuffer größer als in dem Arginin-Faltungspuffer. Die monomere und dimere Spezies konnten in der Größenausschlusschromatographie, auf nicht reduzierenden SDS-Gelen und massenspektrometrisch bestätigt werden. Die auf das Verfahren der *rapid dilution* basierende *in vitro* Faltung mit einem Redoxsystem zur Verbrückung der Cysteine ähnelt den Faltungen anderer Cystinknoten Proteine, z.B. des humanen NGFs (Rattenholl *et al.*, 2001) oder auch Spätzle aus dem Seidenspinner *B. mori* (Wang *et al.*, 2007). Die Frage nach der Disulfidverbindung der Cysteine im Propeptid konnte sowohl für Spätzle 11.7 als auch für die Isoform Spätzle 8.19 nur soweit gehend beantwortet werden, dass bis zu vier freie Cysteine existieren, die durch Iodacetamidmodifikation in der Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten.

Die säure- und temperaturstabile Eigenschaft des Cystinknotens, die zur Isolierung aus dem Homogenisat der 0 – 3 h alten *Drosophila* Embryonen genutzt wurde, konnte an den in *E. coli* exprimierten und *in vitro* gefalteten Spätzle Isoformen 11.7 und 8.19 nachgewiesen werden. Die thermische Stabilität der Dimere konnte auch durch eine geringe Änderung der Elliptizität in den fern-UV CD-Spektren innerhalb des Temperaturbereiches von 20 - 95 °C bestätigt werden. Obwohl die fern-UV CD-Spektren der Spätzle 11.7 und Spätzle 8.19 Dimere auf den ersten Blick unstrukturiert erscheinen (Anhang Abbildung A.3; Funkner, 2007), zeigen die kooperativen Denaturierungsübergänge der CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie sowie das 1D-¹H-NMR Spektrum

einen moderaten Anteil an Sekundärstrukturelementen. Die CD-Spektren β -Faltblattreicher Proteine zeigen eine niedrige Amplitude und eine charakteristische, negative Elliptizität um 200 nm (Sreerama & Woody, 2003). Der Ursprung des unstrukturierten CD-Spektrums der β_{II} -Proteine ist noch nicht vollkommen verstanden. β_{II} -Proteine weisen auf jeden Fall einen geringeren Gehalt an β -Faltblättern auf als β_I -Proteine. Auch das fern-UV CD-Spektrum des humanen proNGFs (Rattenholl *et al.*, 2001a) sowie der Spätzle Isoform HL01462 (Weber *et al.*, 2003) zeigen eine negative Elliptizität mit einem Minimum bei ~ 205 nm.

Während für die Isoformen Spätzle 11.7 und Spätzle 8.19 eine Sekundärstruktur für die Cystinknoten-Domäne und das ungespaltene Propeptid gezeigt werden konnte, besitzt Spätzle 8.24 nach CD- und NMR-Spektren in Übereinstimmung keine messbare Sekundärstruktur. Für das Propeptid der Spätzle 8.19 homologen Isoform HL01462 konnte aus der Analyse der fern-UV CD-Messungen mit und ohne Propeptid ebenfalls keine Sekundärstruktur vorhergesagt werden (Weber *et al.*, 2003).

4.2 Spätzle als Mitglied der Cystinknoten-Proteinfamilie

Die Kristallstruktur der Cystinknoten-Domäne mit der markanten Disulfidverbrückung, dem hohen Anteil an β -Faltblättern als Sekundärstrukturelemente sowie der Verdrehung der zentralen β -Faltblätter weist Spätzle als ein typisches Mitglied der Cystinknoten-Familie aus. Somit werden die CD- und NMR-Ergebnisse sowie das Strukturmodell von Mizuguchi *et al.*, (1998) bestätigt. Nur die besondere Lage des dritten Falblattes konnte nicht modelliert werden. Ebenso enthält die Röntgenkristallstruktur die intermolekulare Verbindung der Monomer, die wegen der hohen Diversität zwischen NGF und Coagulogen nicht modelliert werden konnte. Die Verbrückung der Cystine zum Cystinknoten entspricht neben diesem Modell auch dem DeLotto & DeLotto, (1998) Modell basierend auf der Grundlage von massenspektrometrischen Ergebnissen nach einer Proteolyse der Cystinknoten-Domäne.

Die Suche nach Spätzle ähnlichen Strukturen mittels des Dali Servers (Holm & Sander, 1996) ergab mehrere positive Ergebnisse. Diese strukturell ähnlichen Proteine hatten einen Übereinstimmungswert der Sekundärstrukturelemente (*z score*) zwischen zwei (wenig strukturell verwandt) bis über sechs (stark strukturell ähnlich). Der *z score* ist abhängig von der Größe der Proteine und wird deshalb zusammen mit dem C α -Abstand der sich

entsprechenden $\text{C}\alpha$ -Atome sowie dem Prozentsatz der identischen Aminosäuren angegeben.

Als bestes Ergebnis wurden der Nervenwachstumsfaktor NGF (PDB Code: 1SGF) mit einem z score von 6,5 (rmsd 3,0 Å und 19 % identische Aminosäuren) und das Neurotrophin-4 (PDB Code: 1HCF) mit einem z score 6,3 (rmsd 2,6 Å und 17 % identische Aminosäuren) angegeben. In der Überlagerung des Spätzle Monomers mit einem NGF Dimer werden die Konservierung der zentralen β -Faltblätter sowie die Abweichung im dritten β -Faltblatt deutlich (Abbildung 4.1).

Neben weiteren NGF-Strukturen (PDB Codes: 1BTG, 1BET, 1WWW) und Coagulogen (PDB Code: 1AOC), die für das vorhergesagte Strukturmodell verwendet wurden (Mizuguchi *et al.*, 1998), wurden auch weitere Mitglieder der Cystinknoten-Proteinfamilie gefunden.

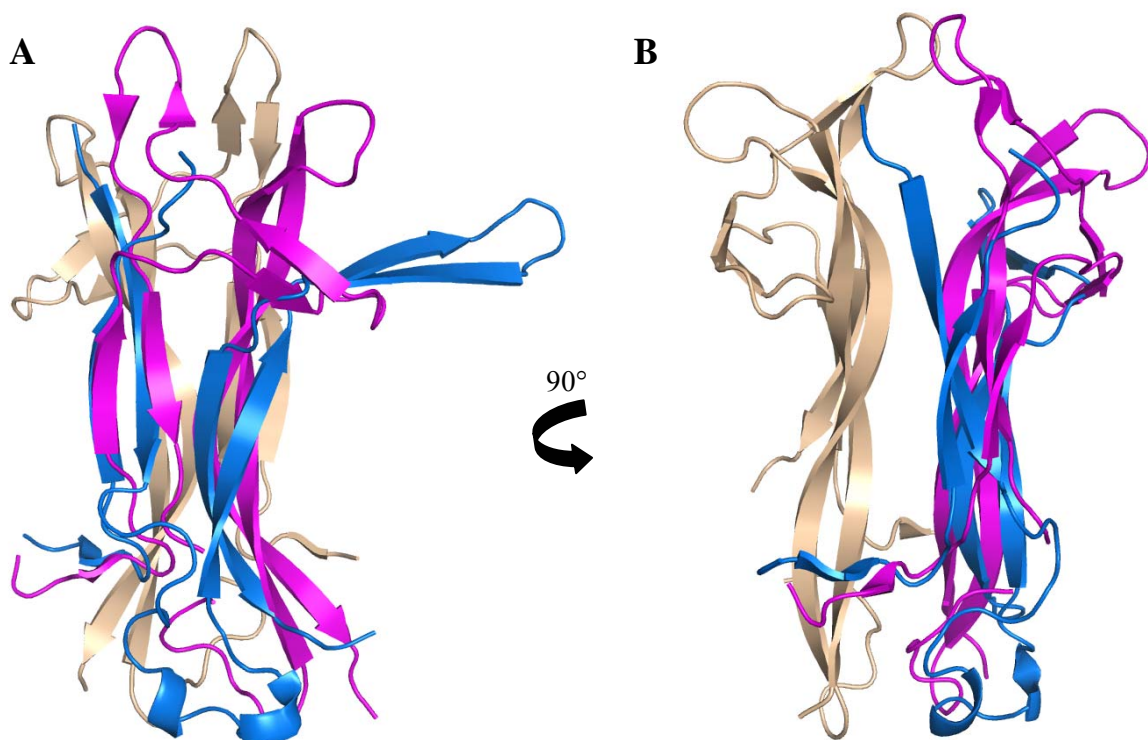


Abbildung 4.1: Überlagerung der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne auf NGF

In der Überlagerung des Spätzle Monomers mit einem NGF Dimer ist die Sekundärstruktur der NGF Monomere in Pink und Beige sowie der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne in Blau abgebildet (Pymol, DeLano, 2002; NGF PDB Code: 1BET, McDonald *et al.*, 1991). **A** Dargestellt ist die Seitenansicht der Überlagerung sowie in **B** die Frontansicht. Die zentralen β -Faltblätter des Cystinknotens sind konserviert, das dritte β -Faltblatt ist anders positioniert.

So ähnelt die Struktur der Spätzle Cystinknoten-Domäne zum Beispiel dem Neurotrophin NT-3 (PDB Code: 1NT3), dem neurotrophischen Faktor BDNF (PDB Code: 1B8M), den Knochenwachstumsfaktoren BMP-2 (PDB Codes: 2QJ9, 2H62), BMP-6 (PDB Code: QCW), BMP-7 (PDB Codes: 1LX5, 1LXI), den transformierenden Wachstumsfaktoren TGF- β 1 (PDB Code: 1KLA), TGF- β 2 (PDB Code: 2TGI), TGF- β 3 (PDB Code: 1TGK), dem Wachstumsfaktor VEGF (PDB Code: 1QTY), dem Choriongonadotropin hCG (PDB Code: 1HRP) sowie dem Interleukin 17F (PDB Code: 1JPY; Abbildung 4.2). Die schematische Darstellung der Spätzle Struktur (Abbildung 4.3) berücksichtigt die Cystine des Cystinknotens, die Wasserstoffbrückenbindungen der β -Faltblätter, die flexible Schleife sowie die zu NGF homologen Aminosäuren.

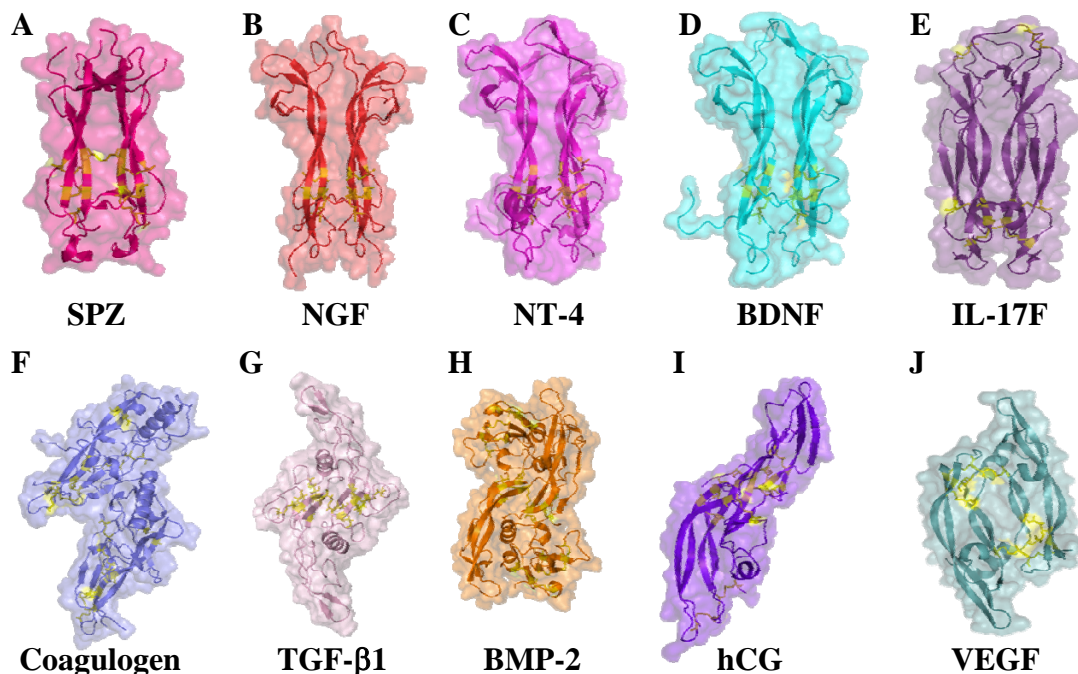


Abbildung 4.2: Strukturen der Cystinknoten-Familie

Die Sekundärstrukturen der Proteine sind mit ihren Oberflächen schematisch und nicht maßstabsgerecht dargestellt. Die Cystine sind durch gelbe Stäbchen symbolisiert (Pymol, DeLano, 2002). **A Spätzle Cystinknoten-Domäne** (PDB Code: 3E07, Hoffmann *et al.*, 2008b), **B NGF** 6,5 z score, 19 % Sequenzidentität, 3,0 Å rmsd zu Spätzle (PDB Code: 1SGF, Bax *et al.*, 1997), **C NT-4** 6,3 z score, 17 % Sequenzidentität, 2,6 Å rmsd zu Spätzle (PDB Code: 1HCF, Banfield *et al.*, 2001), **D BDNF** 5,7 z score, 18 % Sequenzidentität, 4,9 Å rmsd zu Spätzle (PDB Code: 1B8M, Robinson *et al.*, 1999), **E IL-17F** 4,2 z score, 11 % Sequenzidentität, 2,5 Å rmsd zu Spätzle (PDB Code: 1JPY, Hymowitz *et al.*, 2001), **F Monomer Coagulogen** 3,3 z score, 16 % Sequenzidentität, 2,5 Å rmsd zu Spätzle (PDB code: 1AOC, Bergner *et al.*, 1996), **G TGF- β 1** 2,8 z score, 18 % Sequenzidentität, 7,5 Å rmsd zu Spätzle (PDB Code: 1KLA, Hinck *et al.*, 1996), **H BMP-2** 2,6 z score, 17 % Sequenzidentität, 7,5 Å rmsd zu Spätzle (PDB Code: 2QJ9, Kotzsch *et al.*, 2008), **I Heterodimer hCG** 2,2 z score, 22 % Sequenzidentität, 5,5 Å rmsd zu Spätzle (PDB Code: 1HRP, Laphorn *et al.*, 1994) und **J VEGF** 2,1 z score, 21 % Sequenzidentität, 6,2 Å rmsd zu Spätzle (PDB Code: 1QTY, Starovasnik *et al.*, 1999).

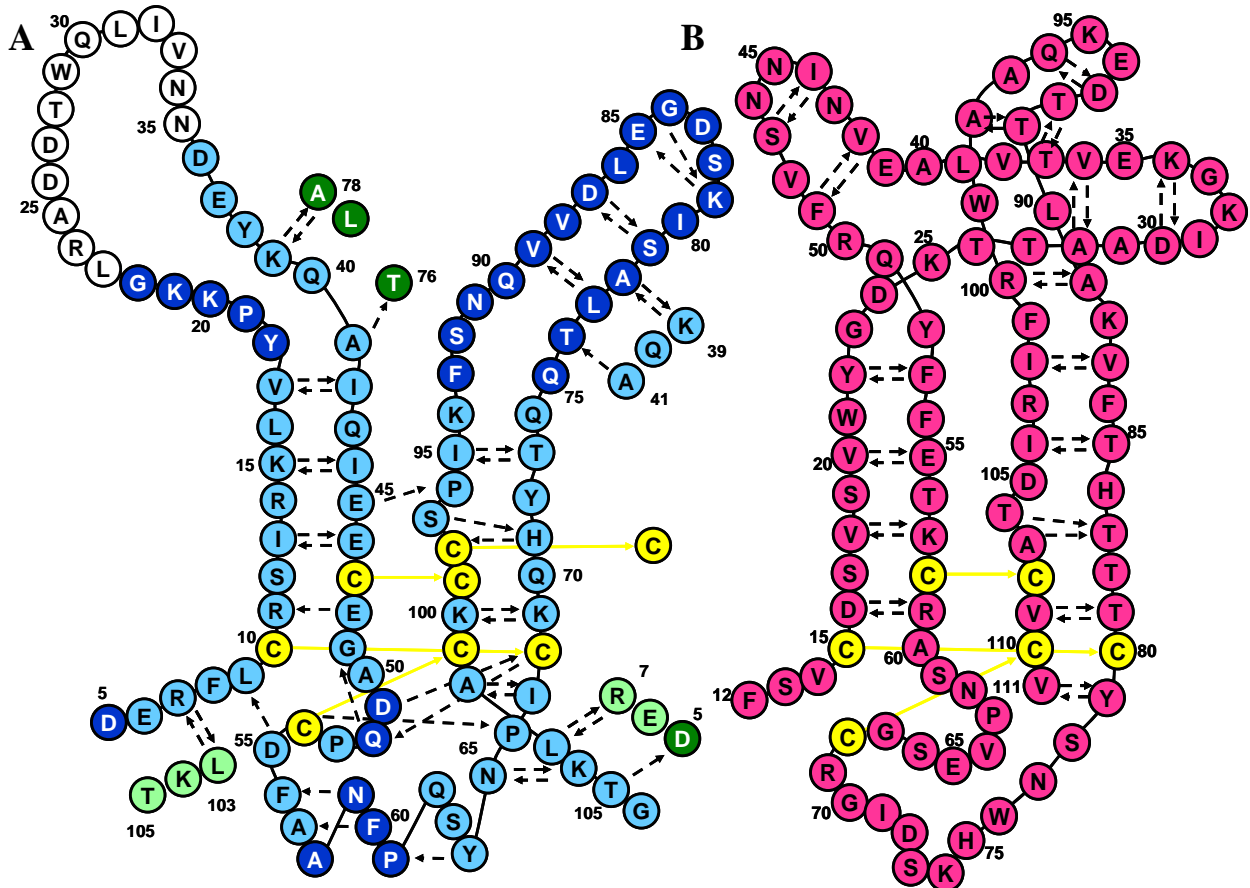


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur

In der Abbildung **A** ist die Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne (PDB Code: 3E07, Hoffmann *et al.*, 2008b) und in **B** das reife NGF (PDB Code: 1BET, nach McDonald, *et al.* 1991) dargestellt. Für die Cysteine wurden gelbe Kreise sowie gelbe Linien für die Disulfidbrücken verwendet. Die Pfeile symbolisieren die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hauptketten. Ein Spätzle Monomer ist in Blautönen, das andere in Grüntönen und NGF in Rot dargestellt. Die hellgrünen und hellblauen Kreise stehen für Aminosäuren in Spätzle, die homolog zu NGF positioniert sind ($\text{rmsd} < 3,5 \text{ \AA}$), die dunkelgrünen und dunkelblauen Kreise sind Aminosäuren, die sich in NGF und Spätzle unterscheiden ($\text{rmsd} > 3,5 \text{ \AA}$). Die durch weiße Kreise symbolisierten Aminosäuren bilden eine flexible Schleife.

Die Größe der Dimerisierungsfläche von Spätzle (1995 \AA^2) ist im Vergleich mit einigen Mitgliedern der Cystinknoten-Familie am ähnlichsten der des hCGs mit $\sim 1950 \text{ \AA}^2$ (1HRP: 1917 \AA^2 , 1HCN: 2023 \AA^2). Beide Proteine stabilisieren ihre Dimere durch einen teilweisen Austausch der Domänen, der zu der großen Dimerisierungsfläche beiträgt. Die Wachstumsfaktoren NGF (1BET: 1420 \AA^2 , 1BTG: 1263 \AA^2) und TGF (1TGF: 1314 \AA^2 , 2TGI: 1293 \AA^2) besitzen eine wesentlich kleinere Dimerisierungsfläche, nur die Fläche des PDGFs (1PDG: 1100 \AA^2) ist noch geringer (berechnet mit AreaMol, CCP4 suite, Collaborative Computational Project number 4, 1994).

4.3 Die Rezeptoraktivierung

Die Modelle der Rezeptoraktivierung (Mizuguchi *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2007; Gangloff *et al.*, 2008) gehen von einem dimeren Spätzle aus, welches eine negativ geladene Bindetasche für die Leucin-reichen Sequenzen des Toll Rezeptors ausbildet. Die erwartete dimere Struktur konnte bestätigt werden, welche bereits vor einem Kontakt mit dem Rezeptor ausgebildet ist. Hinweise auf eine Rezeptor-Bindetasche konnte die Struktur der dimeren Cystinknoten-Domäne nicht geben.

Die bis heute publizierten Strukturen verschiedener TLRs mit ihren Liganden zeigen eine breite Möglichkeit der Ligandenbindung (Abbildung 4.4), die mit erheblichen konformellen Änderungen im Rezeptor verbunden ist. Das Heterodimer TLR 1 / TLR 2 wird durch die Bindung eines tri-acetylierten Lipopeptides Pam₃CSK₄ gebildet. Hingegen ist das di-acetylierte Lipopeptid Pam₂CSK₄ nicht befähigt die Dimerisierung zu bewirken, denn zwei der drei Lipidketten inserieren in die TLR 2 Bindetasche und die Dritte in einen hydrophoben Kanal in dem TLR 1 (Jin *et al.*, 2007). Der TLR 5 bindet hingegen das Flagellin begeißelter Bakterien und der TLR 3 und TLR 8 binden doppelsträngige bzw. einzelsträngige RNA. Der in Säugetieren zuerst entdeckte TLR 4 bindet Lipopolysaccharide aus der Zellwand gram-negativer Bakterien (Belvin & Anderson, 1996). Die Bindung eines Lipopolysaccharids in eine hydrophobe Tasche des Rezeptor-assoziierten MD-2 soll zur Dimerisierung des TLR 4 mit anschließender Änderung der Konformation zur Signalweiterleitung führen (Gangloff & Gay, 2004). Die ersten Kristallstrukturen mit und ohne den tetra-acetylierten Antagonisten Lipid IVA bzw. Eritoran (Ohto *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007) zeigten, dass MD-2 im Komplex mit und ohne den Lipopolysacchariden an die konkave Oberfläche der Ektodomäne bindet, aber keine dimere Rezeptoren entstehen. Der Agonist LPS bindet genau wie Eritoran oder Lipid IVA in einer großen hydrophoben Tasche in MD-2. Das LPS besitzt aber im Gegensatz zu den Antagonisten sechs Lipidketten, von denen fünf in einer tiefen Tasche in MD-2 verdeckt werden. Die verbleibende Lipidkette ist oberflächenexponiert und bildet eine hydrophobe Interaktion mit dem TLR 4 aus. Zusätzlich verdrängen zwei der Lipidketten das phosphorylierte Glucosaminrückgrat um ~5 Å zum Lösungsmittel. Diese konformelle Änderung ermöglicht den Phosphatgruppen des LPS durch ionische Wechselwirkungen an der Rezeptordimerisierung mitzuwirken (Park *et al.*, 2009).

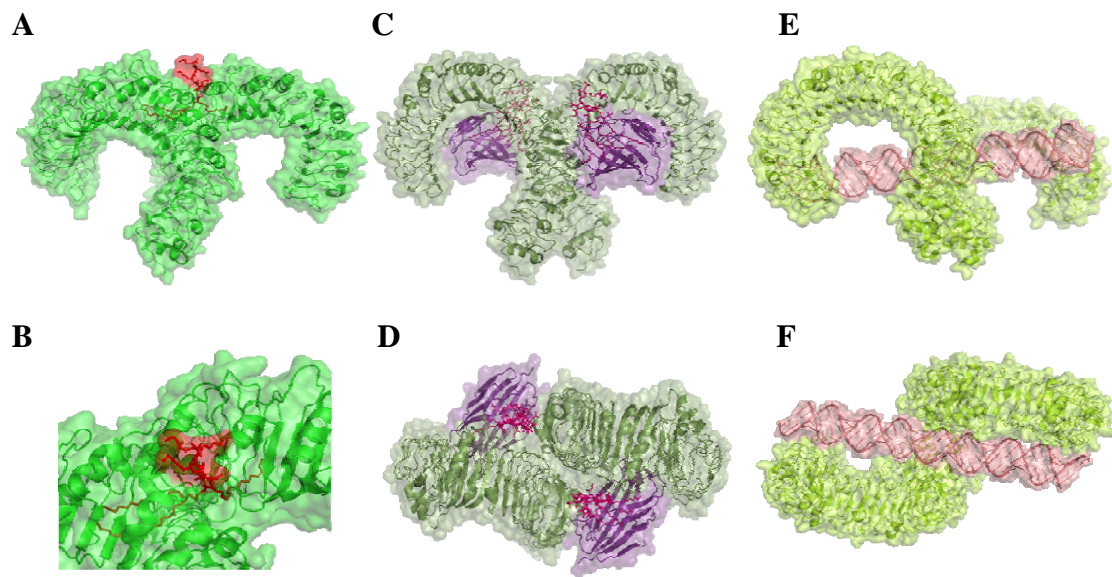


Abbildung 4.4: Bindungsmodi der Rezeptoren der angeborenen Immunantwort

Die Sekundärstrukturen der TLR Ektodomänen mit ihren Liganden sind mit ihren Oberflächen schematisch und nicht maßstabsgerecht dargestellt (Pymol, DeLano, 2002). **A** TLR 1/2 mit Lipopeptid Pam₃CSK₄ als Liganden (PDB Code: 2Z7X, Jin *et al.*, 2007), **B** Vergrößerung der Ligandenbindetasche der Abbildung A, **C** TLR 4-MD-2 Komplex mit LPS als Liganden (PDB Code: 3FXI, Park *et al.*, 2009), **D** Drehung des TLR 4-MD-2 Komplexes mit LPS um 90 ° zur Darstellung der LPS vermittelten Rezeptordimerisierung, **E** Maus-TLR 3 mit doppelsträngiger RNA als Liganden (PDB Code: 3CIY, Liu *et al.*, 2008) und **F** Drehung des Komplexes aus TLR 3 und doppelsträngiger RNA um 90 ° zur Darstellung der RNA-Bindung. Die TLR besitzen eine Vielzahl an verschiedenen Ligendentypen, deren Bindung auf verschiedenartige Bindungsmechanismen und -taschen basieren.

Die Struktur der Cystinknoten-Domäne weist ebenfalls wie das TLR 4 assoziierte MD-2 eine tiefe, hydrophobe Einhöhlung auf. Ein Vergleich mit den Strukturen des TLR 1/2-Komplexes und des TLR 4-MD-2-Komplexes lässt den Schluss zu, dass die tiefe, hydrophobe Einhöhlung eine mögliche Bindetasche für einen unbekanntem Liganden, z.B. aus den Zellwänden gram-positiver Bakterien, sein könnte. So könnten die Spätzle Isoformen strukturell verschiedene Signalkomplexe bilden, indem sie unterschiedliche Liganden binden, und könnten somit einen Einfluss auf die Signalkaskade in der Immunantwort nehmen. Eine gering aufgelöste Struktur des Komplexes aus Toll und Spätzle zeigte, dass Spätzle ebenfalls eine Konformationsänderung in der Toll Ektodomäne und deren Dimerisierung bewirkt (Gangloff *et al.*, 2008). Es ist somit möglich, dass die Diversität der *Drosophila* Toll Rezeptoren in der Bindung verschiedener Lipopolysaccharide, die zur Rezeptoraktivierung führen, begründet ist.

4.4 Funktion des Propeptides in der Cystinknoten-Proteinfamilie

Die Tryptophan-Fluoreszenz-Messungen mit nativem und in GdnHCl denaturierten Spätzle 11.7 und Spätzle 8.19 zeigen ein Quenching der Intensität für das native Protein (Anhang Abbildung A.3; Funkner, 2007). Der Effekt ist in Spätzle 8.19 noch stärker als in Spätzle 11.7. Da sich die Isoformen nur in dem Exon der Aminosäuren 49 - 121 von Spätzle 8.19 unterscheiden, ist der Unterschied in der Länge oder der Sequenz des Propeptides zu suchen. Ein solcher Unterschied zeigt eine strukturelle Diversität innerhalb der Isoformen und repräsentiert die Isoformen als individuelle Proteine.

Ein GdnHCl induzierter, chemischer Denaturierungsübergang zeigt wieder zwischen Spätzle 11.7 und Spätzle 8.19 Gemeinsamkeiten auf. Spätzle 8.19 entfaltet genau wie Spätzle 11.7 (Abbildung 4.5A) in einem definierten Übergang mit hoher Kooperativität bei 2,1 M GdnHCl (Anhang Abbildung A.4; Funkner, 2007). Die Fluoreszenz-Intensität für proNGF nimmt mit der Denaturierung in GdnHCl ab, während die native Fluoreszenz der Spätzle Isoformen 11.7 und 8.19 durch das Propeptid gequentscht wird und mit der Denaturierung in GdnHCl zunimmt. In einem GdnHCl induzierten, chemischen Denaturierungsübergang werden zwei Übergangspunkte der drei proNGF Tryptophane bei 0,8 M und 3,5 M GdnHCl (Abbildung 4.5B) beschrieben (Rattenholl, 2001; Kliemann *et al.*, 2007). Dies steht für ein früheres Entfalten des proNGF Propeptides als des Spätzle 11.7 Propeptides als auch für eine wesentlich größere Entfaltungstabilität des reifen NGFs in GdnHCl. Somit ist die Cystinknoten-Domäne von Spätzle 11.7 weniger stabil in GdnHCl als NGF. In der Kristallstruktur ist ersichtlich, dass das Tryptophan in der flexiblen Schleife vorliegt. Mit dieser Flexibilität lassen sich die verringerte Kooperativität in CD- und Fluoreszenz-Messungen erklären und deutet darauf hin, dass die Prodomäne das Tryptophan beeinflusst.

Die Übergangsmittelpunkte für BMP-2 wurden auf sehr ähnliche 0,8 M GdnHCl für die Propeptid-Domäne und 3,3 M GdnHCl für die BMP-2-Domäne bestimmt (Abbildung 4.5C; Hillger, 2005). Für NGF der Maus (Timm & Neet, 1992) wurden für das reife Protein die freie Entfaltungsentnergie und die Kooperativität einer Entfaltung in GdnHCl mit Fluoreszenz-Spektroskopie ermittelt ($\Delta G \sim 19 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ und $m \sim 5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}_{\text{GdnHCl}}^{-1}$). Die Kooperativität der Entfaltung wird von Spätzle als Proisoform, nicht aber von der Cystinknoten-Domäne übertroffen.

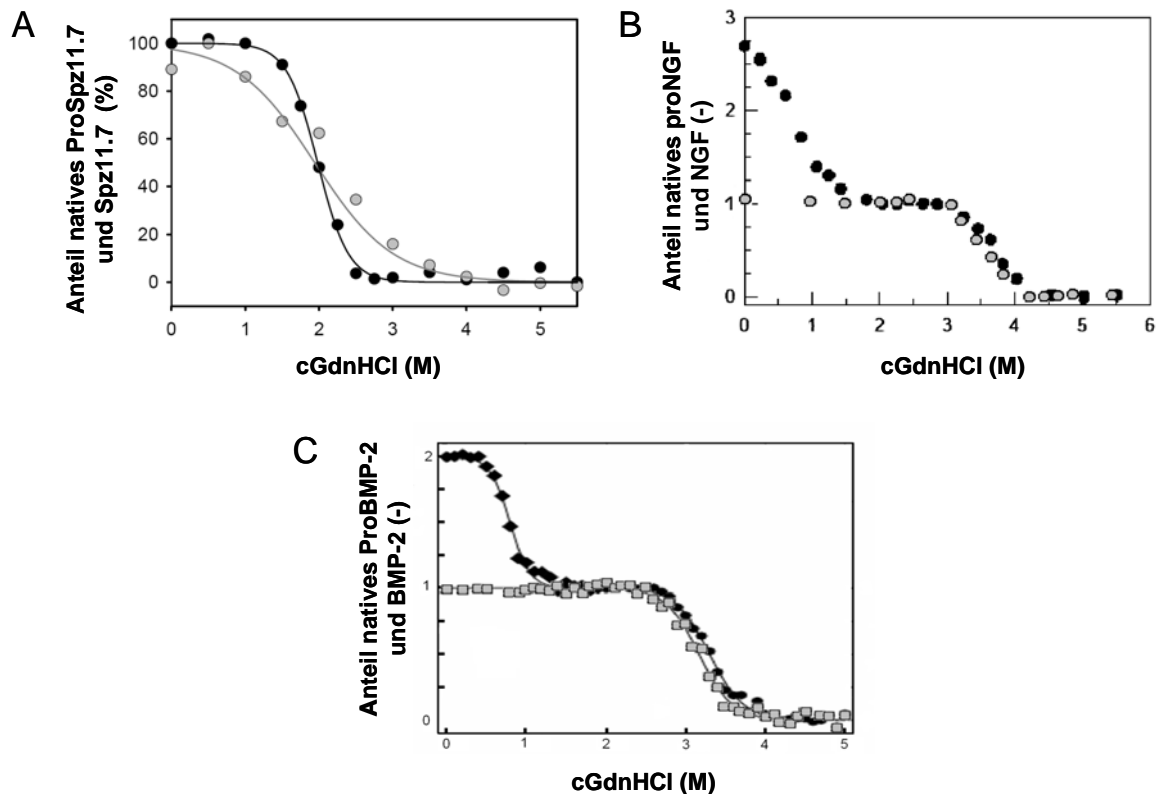


Abbildung 4.5: Denaturierungsübergänge der Cystinknoten-Proteine

Gezeigt sind verschiedene Tryptophan-Fluoreszenz Denaturierungsübergänge in GdnHCl der Proproteine und der reifen Formen der Cystinknoten-Proteine. **A** Denaturierung des Spätzle 11.7 (schwarz) und der Cystinknoten-Domäne Spätzle 11.7 (grau), **B** Denaturierung des proNGFs (schwarz) und NGFs (grau) (nach Rattenholl, 2001), **C** Denaturierung des proBMP-2 (schwarz) und des BMP-2 (grau) (Hilger, 2005). Während das Propeptid in proNGF und proBMP unabhängig und in geringen GdnHCl-Konzentrationen entfaltet, kann für Spätzle nur ein Übergangspunkt bestimmt werden. Dieser Übergangspunkt liegt bei niedrigeren Konzentrationen als der Übergangspunkt für die Cystinknoten-Domänen des NGFs und des BMP-2.

Ein Vergleich der Ergebnisse der biophysikalischen Charakterisierungen weiterer Mitglieder der Cystinknoten-Familie zeigt weitere Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Proteinfamilie auf. Das Propeptid des proTGF- β ist nicht kovalent an TGF- β 1 gebunden und verzögert so die Wirkung des Wachstumsfaktors. Die Bildung des latenten Komplexes bewirkt eine große Änderung der Konformation. So zeigen fern-UV CD-Spektren, dass der Gehalt an β -Faltblättern abnimmt und unstrukturierte Bereiche zunehmen (McMahon *et al.*, 1996). Ähnlich zu NGF und proNGF wird das Propeptid in proBMP-2 durch den reifen Wachstumsfaktor stabilisiert. In proBMP-2 entfaltet das Propeptid in einem kooperativen Übergang, während das isolierte Propeptid weniger kooperativ entfaltet. Das proBMP-2 entfaltet in Denaturierungsexperimenten wie NGF,

nicht aber wie Spätzle, in zwei Faltungsübergänge, so dass das Propeptid und der Cystinknoten in NGF und BMP separat entfalten. Im Gegensatz zu NGF spielt das Propeptid bei der *in vitro* Faltung des proBMP-2 keine entscheidende Rolle (Hillger *et al.*, 2005). Das Propeptid des Wachstumsfaktors VEGF agiert hingegen weder als Faltungshelfer, noch ist es für die hohe Temperaturstabilität von 108 °C verantwortlich (Muller *et al.*, 2002).

Die biophysikalische Charakterisierung der Spätzle Isoformen konnte ebenfalls wie die Kristallstruktur bestätigen, dass Spätzle zur Proteinfamilie der Cystinknoten zu zuordnen ist. Ein Vergleich des unstrukturierten Spätzle 8.24 mit dem Propeptid des humanen NGFs zeigt, dass beide übereinstimmend in 1D-¹H-NMR Messungen und GdnHCl Denaturierungsübergängen wenige Sekundärstrukturelemente enthalten. Trotz der wenigen Strukturelemente wirkt das Propeptid des humanen NGFs als Faltungshelfer (Rattenholl *et al.*, 2001; Kliemann *et al.*, 2004) und ist entscheidend für die Rezeptorbindung. Während NGF an den Tyrosinkinase-Rezeptor TrkA bindet und die Zelldifferentiation aktiviert (Wiesmann *et al.*, 1999), bindet proNGF an den Sortilin/p75^{NTR} Rezeptor und löst Apoptose aus (Nykjaer *et al.*, 2004).

Eine wichtige Funktion des Spätzle Propeptides wurde erst experimentell bestätigt. Durch die Proteasen Easter oder SPE aktiviertes Spätzle bleibt mit seinem Propeptid assoziiert bis es zur Rezeptorbindung kommt (Weber *et al.*, 2007). Hier könnten verschiedene Propeptide regulatorische Effekte auf die Bindung zum Rezeptor nehmen.

4.5 Weiterführende Arbeiten

Nach dem die Struktur der Cystinknoten-Domäne bekannt ist, bleibt als weiteres Ziel die Strukturaufklärung der Spätzle Proisoformen. Um die Proteolyse unbekannter Herkunft in den Kristallisationsansätzen in Zukunft einzuschränken, sind weitere Kristallisationsansätze in Gegenwart von Protease-Inhibitoren anzufertigen.

Vor allem unstrukturierte Bereiche im Propeptid sind anfällig für die Proteolyse und können zudem die Kristallisation durch vielfältige Konformationen stören. Zur Vorhersage der unstrukturierten Bereiche in den Spätzle Isoformen wurden der RONN Server (Regional Order Neural Network; Yang *et al.*, 2005) sowie der PONDR Server (Predictor Of Natural Disordered Regions; Romero *et al.*, 2001) mit den Methoden XL1 und VL-XT verwendet. Es wurden die Aminosäuren als unstrukturiert angesehen, die in mindestens zwei der drei Methoden als unstrukturiert berechnet worden sind. In den Sequenzen der

Spätzle Isoformen werden zwei bis vier unstrukturierte Bereiche vorhergesagt, die sich alle im Propeptid befinden und nahezu das gesamte Propeptid betreffen. Für die Isoformen 11.7, 11.27 und 8.19 kann das Propeptid stückweise bis zur Cystinknoten-Domäne gekürzt werden, um Kristallisationskonstrukte mit möglichst wenig unstrukturierten Bereich zu erhalten. Bei diesen um den N-Terminus gekürzten Konstrukten ist zu beachten, dass die Notwendigkeit des Propeptides als Faltungshelfer in der *in vitro* Faltung unbekannt ist. Für das Spätzle des Seidenspinners *B. mori* konnte gezeigt werden, dass es ohne Propeptid zu aktiven Protein *in vitro* faltet. Die *B. mori* Spätzle Proform führte *in vitro* zu Monomeren, die in Injektionsexperimenten nicht aktiv waren. Eine dimere Spezies der Proform konnte nicht beobachtet werden, eventuell wäre diese die aktive Spezies (Wang *et al.*, 2007). Eine Alternative zu den im N-Terminus gekürzten *Drosophila* Proteinkonstrukten ist die Integration einer spezifischen Protease Schnittstelle, z.B. vor der Cystinknoten-Domäne, so dass die Konstrukte mit dem Propeptid exprimiert, gefaltet und dann vor der Kristallisation mit einem anschließenden Reinigungsschritt gespalten werden können.

Neben der Spätzle Spaltung durch die nativen Proteasen SPE und Easter haben die Enzyme Thrombin, Faktor Xa, Enterokinase und die TEV-Protease eine breite Anwendung zur Spaltung von Fusionsproteine gefunden. Die TEV-Protease (*Tobacco etch virus Nla proteinase*) spaltet Fusionsproteine sehr spezifisch an der Sequenz ENLYFQ↓S, Thrombin spaltet in LVPR↓GS, Faktor Xa spaltet in IEGR↓XX und Enterokinase DDDDK↓SP. Der empfohlene Reaktionspuffer sollte aber keine reduzierende Agenzien enthalten, z.B. 5 mM DTT oder 0,3 mM TCEP wie es für die TEV Protease empfohlen wird (van den Berg *et al.*, 2006; Blommel & Fox, 2007). Dies könnte zur Reduktion der Cystine in SPE oder Easter führen, so wie es eine Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücke in Spätzle bewirkt, und damit eine Destabilisierung der Struktur folgen.

Die Spaltung durch eine Protease ist ein zusätzlicher Schritt in der Reinigung und müsste optimiert werden, dies könnte durch eine Expression der Cystinknoten-Domäne ohne Propeptid umgangen werden. Wie schon bei der Kürzung des Propeptides ist es unbekannt, ob das Propeptid als Faltungshelfer benötigt wird. Zudem könnten gekürzte Spätzle Isoform wie die Cystinknoten-Domäne ohne Propeptid destabilisiert sein, weil die Interaktion mit dem assoziierten Propeptid fehlt. Somit sind die Expression und die Faltung der Konstrukte als Proformen mit einer Proteaseschnittstellen zu favorisieren, vor allem auch in der Hinsicht, dass das assoziierte Propeptid des aktivierten Spätzle bereits regulatorische Funktionen ausüben kann (Weber *et al.*, 2007).

Neue Expressionskonstrukte werden auch für die Proteasen Easter und SPE benötigt. Neben den Proformen der Proteasen, bestehend aus der Clip-Domäne und der katalytischen Domäne mit einer rekombinanten Aktivierungsstelle durch, z.B. Faktor Xa, sollte auch die katalytische Domäne allein exprimiert werden. Somit kann die Selektivität und Spezifität der Proteasen für verschiedene Spätzle Isoformen untersucht werden. Katalytisch aktive Easter und SPE Proteasen können in größeren Mengen aktiviertes Spätzle für weitere Untersuchung der Konformation des assoziierten Propeptides und der Cystinknoten-Domäne herstellen. Zudem sollte der *Drosophila* Rezeptor Toll als Ektodomäne löslich in *E. coli* exprimiert werden können und damit Komplexe aus der Ektodomäne und den Spätzle Proisoformen, dem aktivierten Spätzle und der Spätzle Cystinknoten-Domäne untersucht werden.

Die biophysikalische Charakterisierung der vier Spätzle Isoformen zeigt eine Diversität der Isoformen im Zusammenhang mit der Funktionalität des Propeptides auf. Das erarbeitete Strukturmodell der Cystinknoten-Domäne bestätigt die Zugehörigkeit in die Cystinknoten-Proteinfamilie und bringt weitere Einzelheiten der Regulierung in der Signalkaskade mit sich.

5 Zusammenfassung

Das Spätzle Protein wird als Proform exprimiert und ist an der Entwicklung der Dorsal-Ventral-Achse in der Embryogenese sowie in der angeborenen Immunantwort beteiligt. Die Spätzle mRNA wird nach der Transkription gespleißt, so dass mindestens zehn Splice-Varianten entstehen. Diese Isoformen haben mit einer Ausnahme die C-terminale Cystinknoten-Domäne gemeinsam und unterscheiden sich hauptsächlich in der Zusammensetzung der Exone des unstrukturierten Propeptides, dessen Funktion noch unbekannt ist. Die große Diversität der Prosequenzen ist eventuell für die verschiedenen Funktionen in der angeborenen Immunantwort oder der Embryogenese verantwortlich. Damit es zu diesen Funktionen kommen kann, wird eine proteolytische Kaskade ausgelöst, die in der Aktivierung des Proteins durch die Proteasen Easter oder SPE in die Cystinknoten-Domäne und das Propeptid resultiert. Die 106 Aminosäure lange, C-terminale Cystinknoten-Domäne ist ähnlich zu der reifen Form des humanen Nervenwachstumsfaktors NGF. Die charakteristische Anordnung der Cysteinen zu einem makrozyklischen Ring wird als Cystinknoten-Motiv bezeichnet.

Die Propeptid Isoform Spätzle 8.24 wurde in der löslichen Fraktion als Monomer exprimiert. Die drei Cysteine dieser Isoform sind nicht disulfidverbrückt. Die Sekundärstrukturanalyse mit fern-UV CD- und 1D-NMR-Spektroskopie zeigten ein unstrukturiertes Protein, das in GdnHCl nicht kooperativ entfaltet. Spätzle 8.24 ist vergleichbar mit dem proNGF Propeptid. Es wurde ebenfalls als unstrukturiertes Monomer beschrieben, ist aber dennoch *in vivo* funktionell.

Die *in vivo* aktive Isoform Spätzle 11.7 wurde in unlöslichen Inclusion Bodies exprimiert. Eine *in vitro* Faltung führte zur Bildung der Homodimere der Proform sowie der Trypsin instabilen Monomeren. Die Dimere bestehen wie proNGF aus unstrukturierten und β -Faltblatt reichen Bereichen, sind thermisch und azid stabil und entfalten kooperativ in GdnHCl. Die *in vitro* gefalteten Dimere können die Dorsal-Ventral-Achsenentwicklung in *Drosophila* Embryonen weiterführen. Die partielle Proteolyse mit Trypsin verdaut das unstrukturierte Propeptid und entlässt die durch Struktur geschützte Cystinknoten-Domäne. Diese zeigt ein unstrukturiertes fern-UV CD-Spektrum, welches aber ähnlich zu reifem NGF ist. Ein 1D- ^1H -NMR Spektrum kann die Sekundärstruktur bezeugen. Die Cystinknoten-Domäne zeigt weiterhin eine hohe Temperaturstabilität, eine Temperatur induzierte Sekundärstruktur sowie ein nicht kooperatives Entfalten in GdnHCl bei niedrigen Temperaturen.

Das Spätzle 11.27 wurde ebenfalls in der unlöslichen *E. coli* Fraktion exprimiert. Die *in vitro* Faltungen in den entwickelten Puffer für Spätzle 11.7 und 8.19 bildeten keine Dimere aus. Trotz fehlendem Exon mit der Easter-Spaltungsstelle sind alle neun Cysteine vorhanden und damit eine Dimerisierung theoretisch möglich. Die Monomere sind nicht in der Proteolyse von Trypsin stabil.

Gestützt auf die Ergebnisse der Diplomarbeit von Funkner (2007) ist die Isoform Spätzle 8.19 mit dem längsten Propeptid Spätzle 11.7 sehr ähnlich. Beide werden unlöslich exprimiert, falten zu Temperatur stabilen Homodimeren und zeigen eine Sekundärstruktur mit β -Strängen und unstrukturierten Bereichen. Ein wesentlicher Unterschied konnte nur in der Tryptophan-Fluoreszenz festgestellt werden. Das in Spätzle 8.19 wesentlich größere Propeptid schirmt das Tryptophan der Cystinknoten-Domäne im nativen Zustand wesentlich stärker von der Oberfläche ab. In den Eigenschaften der aus der partiellen Proteolyse entstandenen Cystinknoten-Domäne ähneln sich beide Isoformen wieder sehr.

Mögliche weitere Unterschiede der Isoformen Spätzle 11.7 und Spätzle 8.19 könnten in der Prozessierung mit SPE und Easter liegen. Dazu muss in Zukunft nach dem entwickelten Faltungsprotokoll (Sieg, 2008) größere Mengen dieser Proteasen hergestellt werden und in umfangreicheren *in vitro* Aktivitätstests das Prozessieren von Spätzle 11.7 und Spätzle 8.19 untersucht werden.

Innerhalb dieser Arbeit wurden mit den Isoformen Spätzle 8.24 und Spätzle 11.7 Kristallisationsexperimente angesetzt, deren Variationen in den Konstrukten und Proteinkonzentrationen streuende Proteinkristalle der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne hervorbrachten. Die Struktur zeigt ein Dimer mit den für ein Cystinknoten typischen Disulfidbrücken sowie den verdrehten β -Faltblättern. Die Charakterisierung der Isoformen zeigt, dass sich nicht alle Domänen des Propeptides zum Kristallisieren eignen und neue Expressionskonstrukte mit strukturierten Domänen benötigt werden. Eine Strukturaufklärung der Spätzle Proform ohne und in Gegenwart des Rezeptors könnte eine Kontext abhängige Faltung des Propeptides zeigen oder ausschließen. Aus den Strukturdaten können weiterhin Mutationen der Aminosäuresequenz für die Klärung der Faltungs- und Bindungsmechanismen gewählt werden.

6 Literaturverzeichnis

Adams, P D, Grosse-Kunstleve, R W, Hung, L W, Ioerger, T R, McCoy, A J, Moriarty, N W, Read, R J, Sacchettini, J C, Sauter, N K und Terwilliger, T C (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 58, 1948-1954.

Banfield, M J, Naylor, R L, Robertson, A G S, Allen, S J, Dawbarn und D, Brady, R L (2001). Specificity in Trk-receptor:Neurotrophin interaction: The crystal structure of Trkb-D5 in complex with Neurotrophin-4/5. *Structure* 9, 1191-1199.

Bax, B, Blundell, T L, MurrayRust, J und McDonald, N Q (1997). Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure* 5, 1275-1285.

Belvin, M P und Anderson, K V (1996). A CONSERVED SIGNALING PATHWAY: The Drosophila Toll-Dorsal pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12, 393-416.

Ben-Bassat, A, Bauer, K, Chang, S Y, Myambo, K, Boosman, A und Chang, S (1987). Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the Escherichia coli methionine aminopeptidase and its gene structure. *The Journal of Bacteriology* 169, 751-757.

Bergner, A, Oganessyan, V, Muta, T, Iwanaga, S, Typke, D, Huber, R und Bode, W (1996). Crystal structure of Coagulogen, the clotting protein from horseshoe crab: A structural homologue of nerve growth factor. *The EMBO Journal* 15, 6789-6797.

Berman, H M, Westbrook, J, Feng, Z, Gilliland, G, Bhat, T N, Weissig, H, Shindyalov, I N und Bourne, P E (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28, 235-242.

Blommel, P G und Fox, B G (2007). A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease. *Protein Expression and Purification* 55, 53-68.

Bolen, D W und Santoro, M M (1988). Unfolding free-energy changes determined by the linear extrapolation method .2. Incorporation of delta-G-degrees-N-U values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry* 27, 8069-8074.

Brunger, A T, Adams, P D, Clore, G M, Delano, W L, Gros, P, Grosse-Kunstleve, R W, Jiang, J S, Kuszewski, J, Nilges, M, Pannu, N S, Read, R J, Rice, L M, Simonson, T und Warren, G L (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 54, 905-921.

Chapman, J R (1996). Methods in molecular biology, Vol. 61: Protein and peptide analysis by mass spectrometry. *Humana Press, Totowa, NJ*

Chasan, R und Anderson, K V (1989). The role of Easter, an apparent serine protease, in organizing the dorsal ventral pattern of the Drosophila embryo. *Cell* 56, 391-400.

- Chasan, R, Jin, Y H und Anderson, K V (1992). Activation of the Easter zymogen is regulated by 5 other genes to define dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Development* 115, 607-616.
- Chenna, R, Sugawara, H, Koike, T, Lopez, R, Gibson, T J, Higgins, D G und Thompson, J D (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 31, 3497-3500.
- Choe, J, Kelker, M S und Wilson, I A (2005). Crystal Structure of Human Toll-Like Receptor 3 (TLR3) Ectodomain. *Science* 309, 581-585.
- Collaborative Computational Project, number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 50, 760-763.
- Cramer, P, Varrot, A, Barillas-Mury, C, Kafatos, F C und Muller, C W (1999). Structure of the specificity domain of the Dorsal homologue Gambif1 bound to DNA. *Structure with Folding & Design* 7, 841-852.
- DeLano, W L (2002). The PyMOL molecular graphics system. *DeLano Scientific*, <http://www.pymol.org>.
- DeLotto, Y und DeLotto, R (1998). Proteolytic processing of the *Drosophila* Spatzle protein by Easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. *Mechanisms of Development* 72, 141-148.
- DeLotto, Y, Smith, C und DeLotto, R (2001). Multiple isoforms of the *Drosophila* Spatzle protein are encoded by alternatively spliced maternal mRNAs in the precellular blastoderm embryo. *Molecular & General Genetics* 264, 643-652.
- Dissing, M, Giordano, H und DeLotto, R (2001). Autoproteolysis and feedback in a protease cascade directing *Drosophila* dorsal-ventral cell fate. *The EMBO Journal* 20, 2387-2393.
- Edelhoch, H (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.
- Eftink, M R (1994). The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophysical Journal* 66, 482-501.
- Emsley, P und Cowtan, K (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 60, 2126-2132.
- Frottin, F, Martinez, A, Peynot, P, Mitra, S, Holz, R C, Giglione, C und Meinnel, T (2006). The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Molecular & Cellular Proteomics* 5, 2336-2349.
- Funkner, A (2007). *In vitro* Faltung und biophysikalische Charakterisierung von rekombinantem Spätzle. *Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Gangloff, M, Weber, A N R, Gibbard, R J und Gay, N J (2003). Evolutionary relationships, but functional differences, between the *Drosophila* and human Toll-like receptor families. *Biochemical Society Transactions* 31, 659-663.

Gangloff, M und Gay, N J (2004). MD-2: the Toll 'gatekeeper' in endotoxin signalling. *Trends in Biochemical Sciences* 29, 294-300.

Gangloff, M, Murali, A, Xiong, J, Arnot, C J, Weber, A N, Sandercock, A M, Robinson, C V, Sarisky, R, Holzenburg, A, Kao, C und Gay, N J (2008). Structural insight into the mechanism of activation of the toll receptor by the dimeric ligand spatzle. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 14629-14635.

Gay, N J und Keith, F J (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-356.

Gasteiger, E, Gattiker, A, Hoogland, C, Ivanyi, I, Appel, R D und Bairoch, A (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31, 3784-3788.

Gay, N J und Gangloff, M (2007). Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry* 76, 141-165.

Gill, S C und von Hippel, P H (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino-acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182, 319-326.

Hashimoto, C, Hudson, K L und Anderson, K V (1988). The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

He, X L und Garcia, K C (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304, 870-875.

Hillger, F, Herr, G, Rudolph, R und Schwarz, E (2005). Biophysical comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 14974-14980.

Hillger, F (2005). Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von proBMP-2, BMP-2 und dem BMP-2 Propeptid. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

Hinck, A P, Archer, S J, Qian, S W, Roberts, A B, Sporn, M B, Weatherbee, J A, Tsang, M L, Lucas, R, Zhang, B L, Wenker, J und Torchia, D A (1996). Transforming Growth Factor beta 1: Three-dimensional structure in solution and comparison with the x-ray structure of Transforming Growth Factor beta 2. *Biochemistry* 35, 8517-8534.

Hoffmann, J A (2003). The immune response of Drosophila. *Nature* 426, 33-38.

Holland, D R, Cousens, L S, Meng, W und Matthews, B W (1994). Nerve Growth-Factor in different crystal forms displays structural flexibility and reveals zinc-binding sites. *The Journal of Molecular Biology* 239, 385-400.

Holm, L und Sander, C (1996). Mapping the Protein Universe. *Science* 273, 595-602.

Hu, X D, Yagi, Y, Tanji, T, Zhou, S L und Ip, Y T (2004). Multimerization and interaction of Toll and Spatzle in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9369-9374.

- Hymowitz, S G, Filvaroff, E H, Yin, J P, Lee, J, Cai, L, Risser, P, Maruoka, M, Mao, W, Foster, J, Kelley, R F, Pan, G, Gurney, A L, de Vos, A M und Starovasnik, M A (2001). IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *The EMBO Journal* 20, 5332-5341.
- Imler, J L und Hoffmann, J A (2001). Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology* 11, 304-311.
- Jang, I H, Chosa, N, Kim, S H, Nam, H J, Lemaitre, B, Ochiai, M, Kambris, Z, Brun, S, Hashimoto, C, Ashida, M, Brey, P T und Lee, W J (2006). A Spatzle-Processing Enzyme required for Toll signaling activation in Drosophila innate immunity. *Developmental Cell* 10, 45-55.
- Jin, M S, Kim, S E, Heo, J Y, Lee, M E, Kim, H M, Paik, S G, Lee, H Y und Lee, J O (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130, 1071-1082.
- Jones, T A, Zou, J Y, Cowan, S W und Kjeldgaard, M (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A - Foundations of Crystallography* 47, 110-119.
- Kabsch, W (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* 26, 795-800.
- Kambris, Z, Brun, S, Jang, I H, Nam, H J, Romeo, Y, Takahashi, K, Lee, W J, Ueda, R und Lemaitre, B (2006). Drosophila immunity: A large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Current Biology* 16, 808-813.
- Kapust, R B und Waugh, D S (1999). Escherichia coli Maltose-Binding Protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science* 8, 1668-1674.
- Kelly, S M, Jess, T J und Price, N C (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1751, 119-139.
- Kim, H M, Park, B S, Kim, J I, Kim, S E, Lee, J, Oh, S C, Enkhbayar, P, Matsushima, N, Lee, H, Yoo, O J und Lee, J O (2007). Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist eritoran. *Cell* 130, 906-917.
- Kim, C H, Kim, S J, Kan, H, Kwon, H M, Roh, K B, Jiang, R, Yang, Y, Park, J W, Lee, H H, Ha, N C, Kang, H J, Nonaka, M, Soderhall, K und Lee, B L (2008). A three-step proteolytic cascade mediates the activation of the peptidoglycan-induced Toll pathway in an insect. *Journal of Biological Chemistry* 283, 7599-7607.
- Kliemannel, M, Rattenholl, A, Golbik, R, Balbach, J, Lille, H, Rudolph, R und Schwarz, E (2004). The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *Febs Letters* 566, 207-212.
- Kliemannel, M, Golbik, R, Rudolph, R, Schwarz, E und Lilie, H (2007). The pro-peptide of proNGF: Structure formation and intramolecular association with NGF. *Protein Science* 16, 411-419.

- Kopp, E B und Medzhitov, R (1999). The Toll-receptor family and central of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 11, 13-18.
- Kotzsch, A, Nickel, J, Seher, A, Heinecke, K, van Geersdaele, L, Herrmann, T, Sebald, W und Mueller, T D (2008). Structure analysis of Bone Morphogenetic Protein-2 type I receptor complexes reveals a mechanism of receptor inactivation in juvenile polyposis syndrome. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 5876-5887.
- Lapthorn, A J, Harris, D C, Littlejohn, A, Lustbader, J W, Canfield, R E, Machin, K J, Morgan, F J und Isaacs, N W (1994). Crystal structure of human Chorionic Gonadotropin. *Nature* 369, 455-461.
- Laskowski, R A, Macarthur, M W, Moss, D S und Thornton, J M (1993). Procheck - A program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26, 283-291.
- Lemaitre, B, Nicolas, E, Michaut, L, Reichhart, J M und Hoffmann, J A (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- LeMosy, E K (2006). Spatially dependent activation of the patterning protease, Easter. *Febs Letters* 580, 2269-2272.
- Ligoxygakis, P, Pelte, N, Ji, C Y, Leclerc, V, Duvic, B, Belvin, M, Jiang, H B, Hoffmann, J A und Reichhart, J M (2002). A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *EMBO Journal* 21, 6330-6337.
- Ligoxygakis, P, Pelte, N, Hoffmann, J A und Reichhart, J M (2002). Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease 1. *Science* 297, 114-116.
- Liu, L, Botos, I, Wang, Y, Leonard, J N, Shiloach, J, Segal, D M und Davies, D R (2008). Structural basis of Toll-Like Receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 320, 379-381.
- Ma, Q J, Guo, C S, Barnewitz, K, Sheldrick, G M, Soling, H D, Uson, I und Ferrari, D M (2003). Crystal structure and functional analysis of *Drosophila* Wind, a protein-disulfide isomerase-related protein. *Journal of Biological Chemistry* 278, 44600-44607.
- Matthews, B W (1968). Solvent content of protein crystals. *The Journal of Molecular Biology* 33, 491-497.
- McCoy, A J, Grosse-Kunstleve, R W, Storoni, L C und Read, R J (2005). Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 61, 458-464.
- McDonald, N Q, Lapatto, R, MurrayRust, J, Gunning, J, Wlodawer, A und Blundell, T L (1991). New-protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal-structure of Nerve Growth-Factor. *Nature* 354, 411-414.
- McDonald, N Q und Hendrickson, W A (1993). A structural superfamily of Growth-Factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73, 421-424.

- McMahon, G A, Dignam, J D und Gentry, L E (1996). Structural characterization of the latent complex between Transforming Growth Factor beta 1 and beta 1-Latency-Associated Peptide. *Biochemical Journal* 313, 343-351.
- Misra, S, Hecht, P, Maeda, R und Anderson, K V (1998). Positive and negative regulation of Easter, a member of the serine protease family that controls dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. *Development* 125, 1261-1267.
- Mizuguchi, K, Parker, J S, Blundell, T L und Gay, N J (1998). Getting knotted: a model for the structure and activation of Spatzle. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 239-242.
- Morisato, D und Anderson, K V (1994). The Spatzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. *Cell* 76, 677-688.
- Morisato, D und Anderson, K V (1995). Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. *Annual Review of Genetics* 29, 371-399.
- Moussian, B und Roth, S (2005). Dorsoventral axis formation in the Drosophila embryo - Shaping and transducing a morphogen gradient. *Current Biology* 15, R887-R899.
- Mulinari, S, Hacker, U und Castillejo-Lopez, C (2006). Expression and regulation of Spatzle-Processing Enzyme in Drosophila. *Febs Letters* 580, 5406-5410.
- Muller, Y A, Heiring, C, Misselwitz, R, Welfle, K und Welfle, H (2002). The cystine knot promotes folding and not thermodynamic stability in Vascular Endothelial Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 43410-43416.
- Murray-Rust, J, McDonald, N Q, Blundell, T L, Hosang, M, Oefner, C, Winkler, F und Bradshaw, R A (1993). Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure* 1, 153-159.
- Nykjaer, A, Lee, R, Teng, K K, Jansen, P, Madsen, P, Nielsen, M S, Jacobsen, C, Kliemann, M, Schwarz, E, Willnow, T E, Hempstead, B L und Petersen, C M (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843-848.
- Nyman, T, Stenmark, P, Flodin, S, Johansson, I, Hammarstrom, M und Nordlund, P (2008). The crystal structure of the human Toll-like Receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer. *Journal of Biological Chemistry* 283, 11861-11865.
- Ohto, U, Fukase, K, Miyake, K und Satow, Y (2007). Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* 316, 1632-1634.
- Pace, C N, Vajdos, F, Fee, L, Grimsley, G und Gray, T (1995). How to measure and predict the molar absorption-coefficient of a protein. *Protein Science* 4, 2411-2423.
- Pace, C N und Shaw, K L (2000). Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 1-7.
- Paoletti, F, Konarev, P V, Covaceuszach, S, Schwarz, E, Cattaneo, A, Lamba, D und Svergun, D I (2006). Structural and functional properties of mouse proNGF. *Biochemical Society Transactions* 34, 605-606.

Park, B S, Song, D H, Kim, H M, Choi, B S, Lee, H und Lee, J O (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, doi:10.1038/nature07830.

Parker, J S, Mizuguchi, K und Gay, N J (2001). A family of proteins related to Spatzle, the toll receptor ligand, are encoded in the Drosophila genome. *Proteins-Structure Function and Genetics* 45, 71-80.

Piao, S, Song, Y L, Kim, J H, Park, S Y, Park, J W, Lee, B L, Oh, B H und Ha, N C (2005). Crystal structure of a clip-domain serine protease and functional roles of the clip domains. *The EMBO Journal* 24, 4404-4414.

Rattenholl, A, Lilie, H, Grossmann, A, Stern, A, Schwarz, E und Rudolph, R (2001a). The pro-sequence facilitates folding of human Nerve Growth Factor from Escherichia coli inclusion bodies. *European Journal of Biochemistry* 268, 3296-3303.

Rattenholl, A, Ruoppolo, M, Flagiello, A, Monti, M, Vinci, F, Marino, G, Lilie, H, Schwarz, E und Rudolph, R (2001b). Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *The Journal of Molecular Biology* 305, 523-533.

Rattenholl, A (2001). Untersuchung zur Pro-Sequenz-vermittelten Faltung von rekombinanten, humanen Nervenwachstumsfaktor. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

Rayment, I (1997). Reductive alkylation of lysine residues to alter crystallization properties of proteins. *Macromolecular Crystallography, Pt A* 276, 171-179.

Rehm, T, Huber, R und Holak, T A (2002). Application of NMR in structural proteomics: Screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure* 10, 1613-1618.

Reiser, J B, Teyton, L und Wilson, I A (2004). Crystal structure of the Drosophila peptidoglycan recognition protein (PGRP)-SA at 1.56 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology* 340, 909-917.

Robinson, R C, Radziejewski, C, Spraggon, G, Greenwald, J, Kostura, M R, Burtnick, L D, Stuart, D I, Choe, S und Jones, E Y (1999). The structures of the Neurotrophin 4 homodimer and the Brain-Derived Neurotrophic Factor/Neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Science* 8, 2589-2597.

Rock, F L, Hardiman, G, Timans, J C, Kastelein, R A und Bazan, J F (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 588-593.

Romero, P, Obradovic, Z, Li, X H, Garner, E C, Brown, C J und Dunker, A K (2001). Sequence complexity of disordered protein. *Proteins-Structure Function and Genetics* 42, 38-48.

Rose, T, LeMosy, E K, Cantwell, A M, Banerjee-Roy, D, Skeath, J B und Di Cera, E (2003). Three-dimensional models of proteases involved in patterning of the Drosophila embryo - Crucial role of predicted cation binding sites. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 11320-11330.

- Rossi, P, Xiao, R, Acton, T B, Tong, L und Montelione, G T. Solution NMR Structure of Human Myeloid Differentiation Primary Response (MyD88). *To be Published*
- Rudolph, R und Lilie, H (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *The FASEB Journal* 10, 49-56.
- Ryder, E, Ashburner, M, Bautista-Llacer, R, Drummond, J, Webster, J, Johnson, G, Morley, T, Chan, Y S, Blows, F, Coulson, D, Reuter, G, Baisch, H, Apelt, C, Kauk, A, Rudolph, T, Kube, M, Klimm, K M, Nickel, C, Szidonya, J, Maroy, P, Pal, M, Rasmuson-Lestander, A, Ekstrom, K, Stocker, H, Hugentobler, C, Hafen, E, Gubb, D, Pflugfelder, G, Dorner, C, Mechler, B, Schenkel, H, Marhold, J, Serras, F, Corominas, M, Punset, A, Roote, J und Russell, S (2007). The DrosDel deletion collection: A Drosophila genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* 177, 615-629.
- Schneider, D S, Jin, Y S, Morisato, D und Anderson, K V (1994). A processed form of the Spatzle protein defines dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo. *Development* 120, 1243-1250.
- Sieg, T (2008). Rückfaltung und Charakterisierung von Easter und Spätzle Processing Enzyme. *Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Smith, C L und DeLotto, R (1994). Ventralizing signal determined by protease activation in Drosophila embryogenesis. *Nature* 368, 548-551.
- Sreerama, N und Woody, R W (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry* 287, 252-260.
- Sreerama, N und Woody, R W (2003). Structural composition of beta(I)- and beta(II)-proteins. *Protein Science* 12, 384-388.
- Starovasnik, M A, Christinger, H W, Wiesmann, C, Champe, M A, de Vos, A M und Skelton, N J (1999). Solution structure of the VEGF-binding domain of Flt-1: comparison of its free and bound states. *The Journal of Molecular Biology* 293, 531-544.
- Stein, D, Roth, S, Vogelsang, E und Nüsslein-Volhard, C (1991). The polarity of the dorsoventral axis in the Drosophila embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 65, 725-735.
- Stein, D und Nüsslein-Volhard, C (1992). Multiple extracellular activities in Drosophila egg perivitelline fluid are required for establishment of embryonic dorsal-ventral polarity. *Cell* 68, 429-440.
- Sun, H Y, Towb, P, Chiem, D N, Foster, B A und Wasserman, S A (2004). Regulated assembly of the Toll signaling complex drives Drosophila dorsoventral patterning. *Embo Journal* 23, 100-110.
- Tauszig, S, Jouanguy, E, Hoffmann, J A und Imler, J L (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10520-10525.
- Timm, D E und Neet, K E (1992). Equilibrium denaturation studies of mouse beta-Nerve Growth-Factor. *Protein Science* 1, 236-244.

Tsumoto, K, Ejima, D, Kumagai, I und Arakawa, T (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 28, 1-8.

Underhill, D (2003). Toll gets tied in a knot. *Nature Immunology* 4, 723-724.

Ursel, C (2009). Optimierung der *in vitro* Renaturierung von *Easter* und *Spätzle Processing Enzyme* zur Biophysikalischen Charakterisierung. *Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*

van den Berg, S, Löfdahl, P, Härd, T und Berglund, H (2006). Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *Journal of Biotechnology* 121, 291-298.

van de Meer, J M (1977). Optical clean and permanent whole mount preparations for phase-contrast microscopy of cuticular structures of insect larvae. *Drosophila Information Service* 52, 160.

Walter, T S, Meier, C, Assenberg, R, Au, K F, Ren, J S, Verma, A, Nettleship, J E, Owens, R J, Stuart, D I und Grimes, J M (2006). Lysine methylation as a routine rescue strategy for protein crystallization. *Structure* 14, 1617-1622.

Wang, Y, Cheng, T C, Rayaprolu, S, Zou, Z, Xia, Q Y, Xiang, Z H und Jiang, H B (2007). Proteolytic activation of pro-spatzle is required for the induced transcription of antimicrobial peptide genes in lepidopteran insects. *Developmental and Comparative Immunology* 31, 1002-1012.

Weber, A N R, Tauszig-Delamasure, S, Hoffmann, J A, Lelievre, E, Gascan, H, Ray, K P, Morse, M A, Imler, J L und Gay, N J (2003). Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature Immunology* 4, 794-800.

Weber, A N R, Moncrieffe, M C, Gangloff, M, Imler, J L und Gay, N J (2005). Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the *Drosophila* toll pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 22793-22799.

Weber, A N R, Gangloff, M, Moncrieffe, M C, Hyvert, Y, Imler, J L und Gay, N J (2007). Role of the Spatzle pro-domain in the generation of an active toll receptor ligand. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 13522-13531.

White, H D und Rayment, I (1993). Kinetic characterization of reductively methylated Myosin Subfragment-1. *Biochemistry* 32, 9859-9865.

Wiesmann, C, Ultsch, M H, Bass, S H und de Vos, A M (1999). Crystal structure of Nerve Growth Factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 401, 184-188.

Wu, H, Lustbader, J W, Liu, Y, Canfield, R E und Hendrickson, W A (1994). Structure of human Chorionic-Gonadotropin at 2.6-angstrom resolution from mad analysis of the selenomethionyl protein. *Structure* 2, 545-558.

Xiao, T, Towb, P, Wasserman, S A und Sprang, S R (1999). Three-dimensional structure of a complex between the death domains of Pelle and Tube. *Cell* 99, 545-555.

Xu, Y W, Tao, X, Shen, B H, Horng, T, Medzhitov, R, Manley, J L und Tong, L (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408, 111-115.

Yang, Z R, Thomson, R, McNeil, P und Esnouf, R M (2005). RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* 21, 3369-3376.

Veröffentlichungen dieser Dissertation:

Hoffmann, A, Funkner, A, Walther, M, Weininger, U, Schierhorn, A, Balbach, J, Reuter, G und Stubbs, M T (2008a). Biophysical characterisation of refolded *Drosophila* Spatzle, a cystine knot protein, reveals distinct properties of three isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 32598-32609.

Hoffmann, A, Neumann, P, Schierhorn, A und Stubbs, M T (2008b). Crystallization of Spatzle, a cystine knot protein involved in embryonic development and innate immunity in *Drosophila melanogaster*. *Acta Crystallography F - Structural Biology and Crystallization Communications* 64, 707-710.

A Anhang

Tabelle A.1: Sequenzen der Primer für die PCR

Die Primer sind nach den Isoformen, der Syntheserichtung forward (up) oder reverse (down) und dem Vorhandensein eines Stoppcodons benannt. Die unterstrichenen Nukleotide kennzeichnen die eingefügten Restriktionsschnittstellen. Die rekombinanten Proteine wurden ohne Signalpeptid kloniert.

Primerbezeichnung	Sequenz 5'-3'
Spz NdeI-up ohne Signal	GGC AAG <u>CATATG</u> AAG GAG TAC GAA CGT ATC ATC
Spz BamHI-down	AAA <u>GGATCC</u> CCC AGT CTT CAA CGC GCA CTT
Spz XhoI-down ohne Stopp	AAA <u>CTCGAG</u> CCC AGT CTT CAA CGC GCA CTT
Spz BamHI-down Stopp	AAA <u>GGATCC</u> TCA CCC AGT CTT CAA CGC GCA CTT
Spz XhoI-down Stopp	AAA <u>CTCGAG</u> TCA CCC AGT CTT CAA CGC GCA CTT
Spz8.24 NdeI-up ohne Signal	GGC AAG <u>CATATG</u> ACG TCC GCG GAC AGT GCA CCC
Spz8.24 BamHI-down Stop	AAT GGATCC TTA TTG ACA ATT AAC TGC CAG GTG TCG
Spz8.24 XhoI-down	AAT <u>CTCGAG</u> CTG ACA ATT AAC TGC CAG GTG TCG
SPE NdeI-up	G GAA TTA <u>CATATG</u> GGC CTG GTG CAT CGT
SPE BamHI-down Stopp	CGC <u>GGATCC</u> TTA TTA CGG TTC CAG TTT CTG
SPE XhoI-down	CGA <u>CTCGAG</u> CGG TTC CAG TTT CTG TTT GAT CC
Easter NdeI-up	G GAA TTA <u>CATATG</u> GGC CAG TTT TAT TTT CCG
Easter BamHI-down Stopp	CGC <u>GGATCC</u> TTA TTA GCT TTC GAT GGT GTT C
Easter XhoI-down	AAT <u>CTCGAG</u> GCT TTC TAT GGT GTT CTG AAT CCA ATC

Spz11.7	P48607-9	C	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	YEAKEY
Spz8.19	P48607-1	A	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	YEAKEY
Spz8.24	P48607-4		MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	
Spz11.27	P48607-6		MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	YEAKEY
HL01462	A1Z0H7	L	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	
Spz8.20	P48607-2	I	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	
Spz11.6	P48607-3	B	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	
Spz8.29	P48607-5	D	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	IVYINIELTKRHEAEVRAEKTVDYKALLATINNGGPGKSASNHLQ	
Spz11.32	P48607-7		MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	
Spz11.5	P48607-8		MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	
Spz11.15	P48607-10		MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	YEAKEY
	Q8IG88	K	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	IVYINIELTKRHEAEVRAEKTVDYKALLATINNGGPGKSASNHLQ	YEAKEY
	Q8IMP7	G	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	YEAKEY
	Q8IMP8	J	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	YEAKEY
	Q8IMP9	H	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	
	Q8IMQ0	E	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	
	Q8IMQ1	F	MMTPMWISLFKVLVLLFAFFAT	-----	

Spz11.7	P48607-9	C	ERIIKELFTITNDEGVVLFN	-----	
Spz8.19	P48607-1	A	ERIIKELFTITNDEGVVLFN	TSADSAPFMPIPTQHDDPTQKQKQNQNSPIPETNRHYHQYHSLIQPDQYFKVQ	
Spz8.24	P48607-4		ERIIKELFTITNDEGVVLFN	TSADSAPFMPIPTQHDDPTQKQKQNQNSPIPETNRHYHQYHSLIQPDQYFKVQ	
Spz11.27	P48607-6		ERIIKELFTITNDEGVVLFN	-----	
HL01462	A1Z0H7	L	-----	TSADSAPFMPIPTQHDDPTQKQKQNQNSPIPETNRHYHQYHSLIQPDQYFKVQ	
Spz8.20	P48607-2	I	-----	-----	
Spz11.6	P48607-3	B	-----	TSADSAPFMPIPTQHDDPTQKQKQNQNSPIPETNRHYHQYHSLIQPDQYFKVQ	
Spz8.29	P48607-5	D	-----	-----	
Spz11.32	P48607-7		-----	TSADSAPFMPIPTQH	
Spz11.5	P48607-8		-----	-----	
Spz11.15	P48607-10		ERIIKELFTITNDEGVVLFN	-----	
	Q8IG88	K	ERIIKELFTITNDEGVVLFN	-----	
	Q8IMP7	G	ERIIKELFTITNDEGVVLFN	-----	
	Q8IMP8	J	ERIIKELFTITNDEGVVLFN	-----	
	Q8IMP9	H	-----	TSADSAPFMPIPTQHDDPTQKQKQNQNSPIPETNRHYHQYHSLIQPDQYFKVQ	
	Q8IMQ0	E	-----	TSADSAPFMPIPTQ	
	Q8IMQ1	F	-----	-----	

Spz11.7	P48607-9	C	-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDTFVFPDSPAIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE		
Spz8.19	P48607-1	A	RSPNGKLNLFVNDTFVSLQ	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDTFVFPDSPAIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE		
Spz8.24	P48607-4		-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDTFVFPDSPAIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE		
Spz11.27	P48607-6		-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDTFVFPDSPAIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE		
HL01462	A1Z0H7	L	-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDT	-----	KYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE
Spz8.20	P48607-2	I	-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDTFVFPDSPAIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE		
Spz11.6	P48607-3	B	RSPNGKLNLFVNDTFVSLQ	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDTFVFPDSPAIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE		
Spz8.29	P48607-5	D	-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDTFVFPDSPAIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE		
Spz11.32	P48607-7		-----	-----			
Spz11.5	P48607-8		-----	-----			
Spz11.15	P48607-10		-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDT	-----	YRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE
	Q8IG88	K	-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDT	-----	KYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE
	Q8IMP7	G	-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDTFVFPDSPAIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE		
	Q8IMP8	J	-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDT	-----	KYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE
	Q8IMP9	H	-----	RTDTEVQSEQIIPPRHPSDTFVFPDSPAIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA	KADE		
	Q8IMQ0	E	-----	-----			
	Q8IMQ1	F	-----	-----		DE	

Spz11.7	P48607-9	C	SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	
Spz8.19	P48607-1	A	SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	
Spz8.24	P48607-4		SQHRLNFCTNVDDYDLSGL	-----	RRAIPLQEHQEAGVPPKGLGGRRHLA
Spz11.27	P48607-6		SQHRLNFCTNV	-----	DERFLCRSIRKLVYPKGLRADDTWQ
HL01462	A1Z0H7	L	SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	
Spz8.20	P48607-2	I	SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	
Spz11.6	P48607-3	B	SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	
Spz8.29	P48607-5	D	SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	
Spz11.32	P48607-7		-----	DYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ
Spz11.5	P48607-8		-----	NVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ
Spz11.15	P48607-10		SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	
	Q8IG88	K	SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	
	Q8IMP7	G	SQHRLNFCTNVDDYDLS	-----	DERFLCRSIRKLVYPKGLRADDTWQ
	Q8IMP8	J	SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	
	Q8IMP9	H	SQHRLNFCTNVDDYDLS	-----	DERFLCRSIRKLVYPKGLRADDTWQ
	Q8IMQ0	E	-----	NFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ
	Q8IMQ1	F	SQHRLNFCTNVDDYDLSGLTHKLKNNFAKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFL	CRSIRKLVYPKGLRADDTWQ	

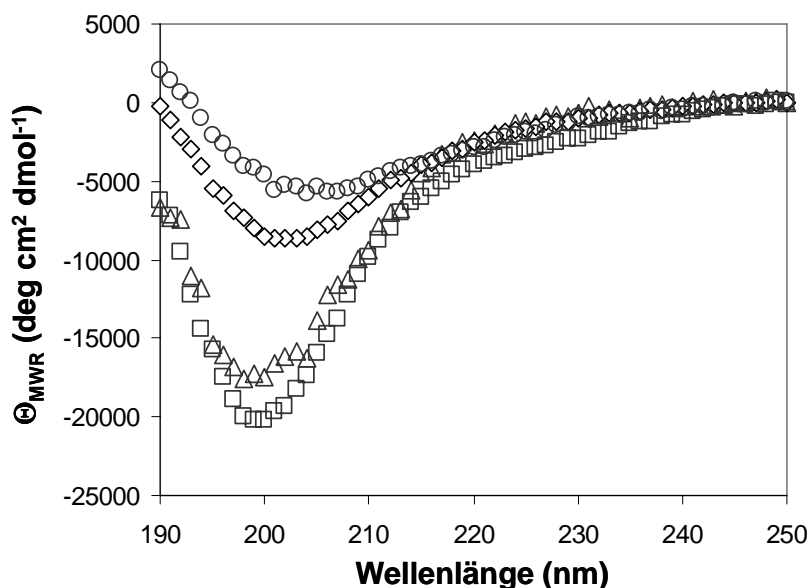


Abbildung A.3: Fern-UV CD-Spektren der Spätzle Isoformen

Es sind die fern-UV CD-Spektren der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne (Dreiecke), Spätzle 11.7 (Kreise), Spätzle 8.19 (Rauten) (Daten aus Funkner, 2007) und der Propeptid Isoform Spätzle 8.24 (Vierecke) dargestellt. Vor allem die Cystinknoten-Domäne und Spätzle 8.24 zeigen ein CD-Spektrum typisch für unstrukturierte Bereiche.

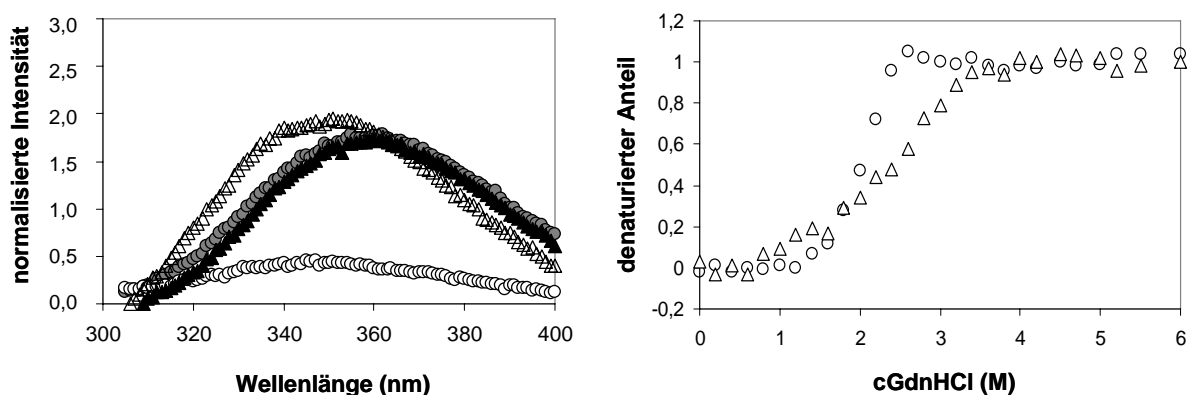


Abbildung A.4: Tryptophan-Fluoreszenz-Spektren und Denaturierungsübergang von Spätzle 8.19

A Es sind das native Spätzle 8.19 (weiße Kreise), die Cystinknoten-Domäne Spätzle 8.19 (weiße Dreiecke) und denaturiertes Spätzle 8.19 (graue Kreise) sowie die denaturierte Cystinknoten-Domäne Spätzle 8.19 (schwarze Dreiecke) dargestellt. Die nativen Spektren unterscheiden sich durch einen Quenchingeffekt des Propeptides auf das Tryptophan in der Cystinknoten-Domäne erheblich. Dieser Effekt ist in den denaturierten Proben aufgehoben. **B** Aus den Fluoreszenz-Spektren sind die denaturierten Proteinanteile des GdnHCl Denaturierungsübergangs bei 350 nm des Spätzle 8.19 (weiße Kreise) und der Cystinknoten-Domäne Spätzle 8.19 (weiße Dreiecke) abgebildet. Spätzle 8.19 entfaltet in vergleichbaren GdnHCl Konzentration wie seine Cystinknoten-Domäne nur wesentlich kooperativer. (Daten aus Funkner, 2007)

Tabelle A.2: Die Kristallisationsansätze im 96-well Format der Kristallisationskits

Nr. Datum	Protein und Puffer	Kristallisationskit	Proteinkonzentration; Temperatur
428 22.02.06	Spz11.7 C-His-Tag proDimer 50 mM Tris pH 7,4	House factorials	8,6 g/L 20 °C
429 22.02.06	Spz11.7 C-His-Tag proDimer 50 mM Tris pH 7,4	Hampton research 2+1	8,6 g/L 20 °C
430 22.02.06	Spz11.7 C-His-Tag proDimer 50 mM Tris pH 7,4	Sigma basic kit + additive	8,6 g/L 20 °C
431 22.02.06	Spz11.7 C-His-Tag proDimer 50 mM Tris pH 7,4	JBS bulk 1-4	8,6 g/L 20 °C
432 22.02.06	Spz11.7 C-His-Tag proDimer 50 mM Tris pH 7,4	JBS bulk 5-8	8,6 g/L 20 °C
433 22.02.06	Spz11.7 C-His-Tag proDimer 50 mM Tris pH 7,4	JBS bulk 9+10	8,6 g/L 20 °C
581 17.08.06	Spz11.7 C-His-Tag Cystinknoten-Domäne 50 mM Tris pH 7,4	House factorials	13 g/L 14 °C
580 17.08.06	Spz11.7 C-His-Tag Cystinknoten-Domäne 50 mM Tris pH 7,4	Hampton 2+1	13 g/L 14 °C
579 17.08.06	Spz11.7 C-His-Tag Cystinknoten-Domäne 50 mM Tris pH 7,4	Sigma basic kit + additive	13 g/L 14 °C
677 18.01.07	Spz11.7 ohne His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,2	Sigma cryo + low ionic	36 g/L, 15 g/L 14 °C
678 18.01.07	Spz11.7 ohne His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,2	Hampton 2+1	36 g/L, 15 g/L 14 °C
679 18.01.07	Spz11.7 ohne His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,2	House factorials	36 g/L, 15 g/L 14 °C
680 18.01.07	Spz11.7 ohne His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,2	Sigma basic + extended	36 g/L, 15 g/L 14 °C
681 18.01.07	Spz11.7 ohne His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,2	JBS 5-8	36 g/L, 15 g/L 14 °C
682 18.01.07	Spz11.7 ohne His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,2	JBS 9+10 49er+ 50er	36 g/L, 15 g/L 14 °C
683 18.01.07	Spz11.7 ohne His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,2	JBS 1-4	36 g/L, 15 g/L 14 °C
712 23.02.07	Spz8.24 C-His-Tag 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,5	Sigma cryo + low ionic	37 g/L, 25,5 g/L, 14 g/L 14 °C
713 23.02.07	Spz8.24 C-His-Tag 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,5	JBS 9+10 49er+ 50er	37 g/L, 25,5 g/L, 14 g/L 14 °C
714 23.02.07	Spz8.24 C-His-Tag 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,5	House factorials	37 g/L, 25,5 g/L, 14 g/L 14 °C
715 23.02.07	Spz8.24 C-His-Tag 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,5	JBS 5-8	37 g/L, 25,5 g/L, 14 g/L 14 °C
716 23.02.07	Spz8.24 C-His-Tag 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,5	Hampton 1+2	37 g/L, 25,5 g/L, 14 g/L 14 °C
717 23.02.07	Spz8.24 C-His-Tag 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,5	JBS 1-4	37 g/L, 25,5 g/L, 14 g/L 14 °C
718 23.02.07	Spz8.24 C-His-Tag 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,5	Sigma basic + extended	37 g/L, 25,5 g/L, 14 g/L 14 °C
762 28.03.07	Spz11.7 ohne His-Tag Cystinknoten-Domäne 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	Sigma basic + additive	30 g/L 14 °C
763 28.03.07	Spz11.7 ohne His-Tag Cystinknoten-Domäne 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	Sigma cryo + low ionic	30 g/L 14 °C

764 28.03.07	Spz11.7 ohne His-Tag Cystinknoten-Domäne 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	House factorials	30 g/L 14 °C
765 28.03.07	Spz11.7 ohne His-Tag Cystinknoten-Domäne 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	Hampton 1+2	30 g/L 14 °C
766 28.03.07	Spz11.7 ohne His-Tag Cystinknoten-Domäne 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	JBS 1-4	30 g/L 14 °C
767 28.03.07	Spz11.7 ohne His-Tag Cystinknoten-Domäne 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	JBS 5-8	30 g/L 14 °C
768 28.03.07	Spz11.7 ohne His-Tag Cystinknoten-Domäne 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	JBS 9+10 49er+ 50er	30 g/L 14 °C
849 16.08.07	Spz11.7 C-His-Tag Dimer methyliert; Spz11.7 C-His-Tag Dimer; 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	Sigma basic + additive	17 g/L, 20 g/L, Puffer 20 °C
850 16.08.07	Spz11.7 C-His-Tag Dimer methyliert; Spz11.7 C-His-Tag Dimer; 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	Sigma cryo + low ionic	17 g/L, 20 g/L, Puffer 20 °C H3 Kristall
851 16.08.07	Spz11.7 C-His-Tag proDimer methyliert; Spz11.7 C-His-Tag proDimer; 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	House factorials	17 g/L, 20 g/L, Puffer 20 °C
852 16.08.07	Spz11.7 C-His-Tag proDimer methyliert; Spz11.7 C-His-Tag proDimer; 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	Hampton 2+1	17 g/L, 20 g/L, Puffer 20 °C
853 16.08.07	Spz11.7 C-His-Tag proDimer methyliert; Spz11.7 C-His-Tag proDimer; 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	JBS 1-4	17 g/L, 20 g/L, Puffer 20 °C
854 16.08.07	Spz11.7 C-His-Tag proDimer methyliert; Spz11.7 C-His-Tag proDimer; 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	JBS 9-10 / 49er+50er	17 g/L, 20 g/L, Puffer 20 °C
855 16.08.07	Spz11.7 C-His-Tag proDimer methyliert; Spz11.7 C-His-Tag proDimer; 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl pH 7,4	JBS 5-8	17 g/L, 20 g/L, Puffer 20 °C

Der Proteinkristall der Kristallisationsplatte 850 kristallisierte aus einer 20 g/L unmethylierten Spätzle 11.7 Proteinlösung bei 20 °C in 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,4. Die Reservoirlösung bestand aus 50 mM Tris/HCl, 20 % PEG 3350, pH 8,0 (Sigma low ionic, Position D3).

Tabelle A.3: Kristallisationsbedingungen der Variationen

Die Tabelle zeigt die Variationen der Kristallisationsansätze des 96-*well* Formates ins 24-*well* Format. Die Zusammensetzungen der Kristallisationspuffer für die Variationen sind in der Tabelle A.4 aufgeführt.

Nr. Datum Plattentyp	Protein und Proteinpuffer	Kristallisations- puffer	Proteinkonzentration im Tropfen; Temperatur
001 16.02.07 Crychem	Spz11.7 ohne His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	Puffer 1 - 21	27 g/L, 13 g/L, 9 g/L, 22,5 g/L 14 °C
002 16.02.07 Crychem	Spz11.7 ohne His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	Puffer 1 - 21	27 g/L, 13 g/L, 9 g/L, 22,5 g/L 14 °C
003 19.04.07 Nextal	Spz11.7 ohne His-Tag Cystinknoten- Domäne 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	Puffer 1, 7, 8, 10, 16, 20, 21	15 g/L 14 °C; + Seeding
003b 19.04.07 Nextal	Spz11.7 ohne His-Tag Cystinknoten- Domäne 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	Puffer 8	15 g/L 14 °C; + Seeding
004 06.09.07 Nextal	Spz11,7 C-His-Tag proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	Puffer 35, 41, B1	8 g/L, 9 g/L, 10 g/L, 11 g/L, 12 g/L, 14 g/L 20 °C
004b 06.09.07 Nextal	Spz11.7 C-His-Tag methyliertes proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	Puffer 35, 41, B1	6,8 g/L, 7,6 g/L, 8,5 g/L, 9,3 g/L, 10,2 g/L, 11,9 g/L; 20 °C
005 05.10.07 Crychem	Spz11.7 C-His-Tag methyliertes / unmethyliertes proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	Puffer 35, 41, B1, 1, 2, 7, 8, 11	17 g/L, 20 g/L 20 °C; ± Pferdehaar
006a,b 7.12.07 Crychem	Spz11.7 C-His-Tag unmethyliertes proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	96- <i>well</i> Platte 0850 H3: pH & PEG 3350 screen	20 g/L 20 °C 1 + 1 µL
007a,b,c 12.12.07 Nextal	Spz11.7 C-His-Tag unmethyliertes proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	96- <i>well</i> Platte 0850 H3: HR Additive Screen	20 g/L, 20 °C 1 + 1 + 0,2 µL D1: BESSY
008 18.01.08 Nextal	Spz11.7 C-His-Tag unmethyliertes proDimer 20 mM Phosphatpuffer, 20 mM NaCl, pH 7,2	96- <i>well</i> Platte 0850 H3: Schweratom soaking	20 g/L 20 °C

Tabelle A.4: Zusammensetzung der Variationskristallisationspuffer

#	Kristallisationskit	well	Puffersubstanz	[M]	Salz	[M]	Präzipitant	[%]	pH	Zusatz
1	Sigma cryo	B4	NaHEPES	0,075	Li2SO4	1,125	Glycerol	25,0	pH 7,5	
2		B5	Tris HCl	0,085	Li2SO4	0,170	PEG 4000	25,5	pH 8,5	Glycerol 15 %
3		B6	NaCacodylat	0,080	MgAcetat	0,160	PEG 8000	16,0	pH 6,5	Glycerol 20 %
4		B9	NaCacodylat	0,100	MgAcetat	0,200	2-methyl-2,4-pentandiol	30,0	pH 6,5	
5		C4	NaCacodylat	0,085	NaAcetate	0,170	PEG 8000	25,5	pH 6,5	Glycerol 15 %
6	Hampton	D3	Tris HCl	0,1	MgCl x 6(H2O)	0,2	Hexandiol [M]	3,4	pH 8,5	
7		D5	Tris HCl	0,1	Li2SO4 x H2O	1,0	Ni(II)Cl x 6(H2O)	0,01	pH 8,5	
8		F4	NaHEPES	0,1	Li2SO4 x H2O	1,5	/	/	pH 7,5	
9	Factorials	D7	NaHEPES	0,1	NaCitrat	1,2	/	/	pH 7,9	
10		H7	/	/	Li2SO4	1,0	PEG 8000	2,0	pH 6,7	
11		H8	/	/	Li2SO4	0,9	PEG 8000	9,0	pH 6,7	
12	Sigma basic	B7	Tris HCl	0,1	NH4Acetate	0,2	2-Propanol	30,0	pH 8,5	
13	JBS 5	A9	Tris HCl	0,1	Li2SO4	0,2	PEG 8000	18,0	pH 8,5	
14	JBS 9	A2	NaAcetat	0,1	CaCl	0,2	2-Propanol	10,0	pH 4,6	
15	JBS 1-4	A6	Tris HCl	0,1	Li2SO4	0,2	PEG 400	25,0	pH 8,5	
16		E1	Tris HCl	0,1	LiCl	0,8	PEG 4000	8,0	pH 8,5	
17		F12	Tris HCl	0,1	LiCl	0,8	PEG 4000	30,0	pH 8,5	
18		G1	Tris HCl	0,1	Li2SO4	0,2	PEG 5000 MME	25,0	pH 8,5	
19		G11	Tris HCl	0,1	LiCl	0,5	PEG 6000	28,0	pH 8,5	
20	Sigma basic	B5	Tris HCl	0,1	Li2SO4	0,2	PEG 4000	20,0	pH 8,5	
21	JBS 2	C11	Tris HCl	0,1	Li2SO4 x H2O	0,2	PEG 4000	30,0	pH 8,5	
34	Sigma low ionic	G11	NaHEPES	0,05	/	/	PEG 3350	20,0	pH 7,5	
45	Sigma low ionic	H11	NaGlycine	0,05	/	/	PEG 3350	20,0	pH 9,0	
B1	JBS 4	G7	KCl	0,05	MgCl x 6(H2O)	0,010	PEG 6000	15,0	/	

Tabelle A.5: Die Kristallisationsansätze mit Spätzle 8.19 aus Funkner, (2007)

Nr. Datum	Protein und Puffer	Kristallisations- kit	Proteinkon- zentration; Temperatur
692 24.01.07	Spz8.19 N-His-Tag proDimer 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	House factorials	5 g/L 14 °C
693 24.01.07	Spz8.19 N-His-Tag proDimer 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	Sigma basic + additive	5 g/L 14 °C
694 24.01.07	Spz8.19 N-His-Tag proDimer 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	JBS 1-4	5 g/L 14 °C
695 24.01.07	Spz8.19 N-His-Tag proDimer 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	Sigma cryo + low ionic strength	5 g/L 14 °C
696 24.01.07	Spz8.19 N-His-Tag proDimer 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	Hampton research 2+1	5 g/L 14 °C
697 24.01.07	Spz8.19 N-His-Tag proDimer 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	JBS 9+10 49+50	5 g/L 14 °C
733 07.03.07	Spz8.19 Cystinknoten-Domäne 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	JBS 5-8	8 g/L 14 °C
734 07.03.07	Spz8.19 Cystinknoten-Domäne 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	House factorials	8 g/L 14 °C
735 07.03.07	Spz8.19 Cystinknoten-Domäne 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	Sigma basic + additive	8 g/L 14 °C
736 07.03.07	Spz8.19 Cystinknoten-Domäne 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	JBS 1-4	8 g/L 14 °C
737 07.03.07	Spz8.19 Cystinknoten-Domäne 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	Sigma cryo + low ionic strength	8 g/L 14 °C
738 07.03.07	Spz8.19 Cystinknoten-Domäne 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	Hampton research 2+1	8 g/L 14 °C
739 07.03.07	Spz8.19 Cystinknoten-Domäne 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5	JBS 9+10 49+50	8 g/L 14 °C

B Abkürzungsverzeichnis

Tabelle B.1: Die verwendeten Abkürzungen

A	Absorption
AU	Absorptionseinheit
BMP	Knochenwachstumsfaktor (<i>bone morphogenetic protein</i>)
CAM	Carbamidomethylierung
CD	Circular Dichroism
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EA	Protein Easter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GdnHCl	Guanidin Hydrochlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
hCG	humanes Choriongonadotropin (<i>human chorionic gonadotropin</i>)
IB	Einschlußkörper (<i>inclusion bodies</i>)
IPTG	Isopropyl- β ,D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Lysogeny broth</i> , auch Luria Bertani Medium
MBP	Maltose bindendes Protein
MCS	Polylinker (<i>multiple cloning site</i>)
NaDoc	Natriumdesoxycholat
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NMWL	Molekulargewichtsgrenze (<i>nominal molecular weight limit</i>)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>Platelet-derived</i> Wachstumsfaktor (<i>platelet-derived growth factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SPE	Spätzle Prozessierendes Protein
SPZ	Spätzle Protein
TB	<i>terrific broth</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin HCl
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/VIS	Ultraviolett/sichtbar (<i>visible</i>)
VEGF	Endothelienwachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

Tabelle B.2: Die Abkürzungen der Aminosäuren

Es sind die Abkürzungen der Aminosäuren mit dem dazugehörigen Namen der Aminosäure angegeben.

One Letter Code	Three Letter Code	Name der Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

C Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: <i>Spz</i> defiziente <i>Drosophila</i> Embryonen	2
Abbildung 1.2: Initiierung der Dorsal-Ventral-Achsenentwicklung.....	3
Abbildung 1.3: Signalweiterleitung der Dorsal-Ventral-Achsenentwicklung	4
Abbildung 1.4: Die Signalkaskaden um Spätzle	6
Abbildung 1.5: Die Homologie zwischen Toll-Dorsal und IL-1R-NF- κ B Signalweg	7
Abbildung 1.6: Die Spätzle Isoformen.....	8
Abbildung 1.7: Sequenzüberlagerung der verwendeten Spätzle Isoformen	10
Abbildung 1.8: Strukturmodell des Spätzle Cystinknotens	14
Abbildung 1.9: Das Modell der Signalweiterführung durch den Toll Rezeptor	15
Abbildung 1.10: Die <i>Drosophila</i> und humane Toll Familie	16
Abbildung 1.11: Modellstrukturen der Initiierung des Toll Signalweges.....	19
Abbildung 1.12: Modellstrukturen der Signalweiterleitung des Toll Signalweges	21
Abbildung 2.1: Die Bildung von Cystinen während der <i>in vitro</i> Faltung.....	36
Abbildung 3.1: Expression von Spätzle 8.24 in verschiedenen <i>E. coli</i> Stämmen.....	48
Abbildung 3.2: Chromatographische Reinigung von Spätzle 8.24.....	49
Abbildung 3.3: Fern-UV CD-Spektren und Denaturierungsübergänge von Spätzle 8.24	50
Abbildung 3.4: 1D- 1 H-NMR Spektrum der Propeptid Isoform Spätzle 8.24	51
Abbildung 3.5: Wachstumskurve der Expression von Spätzle 11.7 im Bioreaktor	52
Abbildung 3.6: Expressionsproben von Spätzle 11.7 im Bioreaktor	53
Abbildung 3.7: <i>in vitro</i> Faltung und Reinigung von Spätzle 11.7	54
Abbildung 3.8: Monomer-Dimer-Verhältnis nach der Faltung von Spätzle 11.7 in verschiedenen Faltungspuffern.....	56
Abbildung 3.9: Fern-UV CD-Spektren und der Denaturierungsübergang von Spätzle 11.7... 58	
Abbildung 3.10: Tryptophan-Fluoreszenz-Spektren und Denaturierungsübergang von Spätzle 11.7	60
Abbildung 3.11: Limitierte Proteolyse von Spätzle 11.7 durch Trypsin	61
Abbildung 3.12: Fern-UV CD-Spektrum der Cystinknoten-Domäne Spätzle 11.7 im Vergleich der Isoformen.....	63
Abbildung 3.13: 1D- 1 H NMR-Spektrum der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne	64
Abbildung 3.14: Tryptophan-Fluoreszenz-Spektren und die Denaturierungsübergänge der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne	65
Abbildung 3.15: Mikroinjektion der <i>Drosophila</i> Embryonen	66
Abbildung 3.16: <i>Drosophila</i> Embryonen des Injektionsexperimentes	67
Abbildung 3.17: <i>in vitro</i> Faltung von Spätzle 8.19	69
Abbildung 3.18: Vergleich der <i>in vitro</i> Faltungen von Spätzle 11.7 und Spätzle 11.27.....	70
Abbildung 3.19: Expression der Easter und SPE Konstrukte	72
Abbildung 3.20: Kristalle von Spätzle 11.7	76
Abbildung 3.21: SDS-Gele der Kristallisation von Spätzle 11.7	77
Abbildung 3.22: Aminosäuresequenz des rekombinanten Spätzle 11.7	79
Abbildung 3.23: Ramachandranplot	82
Abbildung 3.24: Kristallstruktur der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne	83
Abbildung 3.25: Symmetrie verwandte Moleküle in der Kristallanordnung.....	85
Abbildung 3.26: Dimerisierungsfläche der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne	86

Abbildung 4.1: Überlagerung der Spätzle 11.7 Cystinknoten-Domäne auf NGF	90
Abbildung 4.2: Strukturen der Cystinknoten-Familie.....	91
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur	92
Abbildung 4.4: Bindungsmodi der Rezeptoren der angeborenen Immunantwort	94
Abbildung 4.5: Denaturierungsübergänge der Cystinknoten-Proteine	96
Abbildung A.1: Sequenzüberlagerung aller Spätzle Isoformen.....	114
Abbildung A.2: Sequenzüberlagerung der Cystinknoten-Domänen der Spätzle Homologen Spz 2 - Spz 6.....	114
Abbildung A.3: Fern-UV CD-Spektren der Spätzle Isoformen.....	115
Abbildung A.4: Tryptophan-Fluoreszenz-Spektren und Denaturierungsübergang von Spätzle 8.19	115
Tabelle 3.1: Expressionskonstrukte von Spätzle, Easter und SPE.....	46
Tabelle 3.2: Bestimmung der molekularen Masse von Spätzle 8.24	50
Tabelle 3.3: Bestimmung der molekularen Masse von Spätzle 11.7	57
Tabelle 3.4: Die Bestimmung der molekularen Masse des methylierten Spätzle 11.7	74
Tabelle 3.5: Statistik der Datensammlung und Strukturlösung.....	81
Tabelle A.1: Sequenzen der Primer für die PCR	112
Tabelle A.2: Die Kristallisationsansätze im 96- <i>well</i> Format der Kristallisationskits	116
Tabelle A.3: Kristallisationsbedingungen der Variationen	118
Tabelle A.4: Zusammensetzung der Variationskristallisationspuffer	119
Tabelle A.5: Die Kristallisationsansätze mit Spätzle 8.19 aus Funkner, (2007).....	120
Tabelle B.1: Die verwendeten Abkürzungen	121
Tabelle B.2: Die Abkürzungen der Aminosäuren.....	122

D Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet und angegeben.

Ort, Datum: Halle, 28. April 2009

Unterschrift: A. Hoffmann

E Lebenslauf

Anita Hoffmann

Weidenkätzchenweg 4, 06120 Halle/Saale

anita.hoffmann@biochemtech.uni-halle.de

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 24.11.1980

Geburtsort: Zittau

Nationalität: deutsch

Geschlecht: weiblich

Familienstand: ledig

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit Januar 2008: Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie / Biotechnologie,
Abteilung Physikalische Biotechnologie

Unterbrechung wegen Elternzeit: August 2008 – März 2009

Januar 2005 – Dezember 2007: Wissenschaftliche Angestellte und Promotionsstudentin

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie / Biotechnologie,
Abteilung Physikalische Biotechnologie

Oktober 1999 – September 2004: Studentin der Biotechnologie

Technische Universität Braunschweig; **Abschluss: Diplom- Biotechnologin**

SCHULAUSSBILDUNG

August 1997 – Juli 1999

Häßler-Gymnasium, Erfurt; **Abschluss: Abitur**

August 1992 – August 1997

Buchenberg-Gymnasium, Erfurt

Ort, Datum: Halle, 28. April 2009

Unterschrift: A. Hoffmann

F Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den an der Erstellung dieser Doktorarbeit direkt oder indirekt mitwirkenden Personen wenden. Ich bedanke mich bei:

- Prof. Milton T. Stubbs für die Möglichkeit der Anfertigung der Arbeit in seiner Arbeitsgruppe und den hilfreichen Anregungen zur Umsetzung der Aufgabenstellung,
- den Mitarbeitern sowie den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stubbs für das angenehme Arbeitsklima, der hilfsbereiten Einstellung und den entstandenen Freundschaften, insbesondere den an dem Projekt „Spätzle“ mitwirkenden Personen: Susann Juhnke, Silvio Erler, Andreas Funkner, Torsten Sieg, Constanze Than-Breithaupt sowie Piotr Neumann,
- den Mitarbeitern der kooperierenden Arbeitsgruppen: Angelika Schierhorn (Massenspektrometrie), Ulrich Weininger & Prof. Jochen Balbach (Biophysik), Matthias Walther & Prof. Gunther Reuter (Entwicklungsgenetik), Robert DeLotto (Universität Dänemark) sowie
- dem SFB610 „Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz“ für die Finanzierung und GRK1026 „Conformational transitions in macromolecular interactions“ für die Kooperation.

Da im Leben neben der Arbeit auch die Familie von großer Bedeutung ist, möchte ich mich ebenfalls bedanken bei:

- meinem langjährigen Freund Robert Schwartz für den beständigen Rückhalt in der liebevollen Beziehung,
- meinem Papa Werner Hoffmann für die jahrelange Fürsorge,
- und meiner Familie.

Euch allen ein herzliches Dankeschön.

Anita Hoffmann