

Untersuchungen zur Rolle der  
Spätzle-Prodomäne in der dorsal-ventral-Entwicklung  
von *Drosophila melanogaster*

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 Christian Ursel

geboren am 21. August 1983 in Wippra

Gutachter:

1. Prof. Dr. Milton T. Stubbs
2. PD Dr. Hauke Lilie
3. Prof. Dr. Yves Muller

Promotionsgesuch eingereicht am: 30.07.2014

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.01.2015

*„I am still confused, but on a higher level“*

Enrico Fermi

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1 Der Spätzle-Toll-Signalweg .....	6
1.1.1 Dorsal-ventral-Entwicklung in <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
1.1.2 Der Signalweg der angeborenen Immunantwort .....	9
1.2 Easter – Eine Clip-Protease aus <i>Drosophila melanogaster</i> .....	10
1.2.1 Clip-Domänen-Proteasen.....	10
1.2.2 Zymogenaktivierung und Katalysemechanismus von Serinproteasen.....	12
1.2.3 Spezifität von Serinproteasen .....	14
1.3 Das NGF-homologe Cytokin Spätzle.....	15
1.3.1 Spätzle als Ligand des Toll-Rezeptors .....	15
1.3.2 Allgemeine Struktur von Cystin-Knoten-Proteinen .....	17
1.3.3 Funktion der Pro-Wachstumsfaktoren und Prodomänen .....	19
1.4 Der Toll-Rezeptor - Embryonalentwicklung und angeborene Immunantwort.....	21
1.4.1 Funktion von Toll- und <i>toll-like</i> -Rezeptoren .....	21
1.4.2 Struktur von <i>toll-like</i> -Rezeptoren .....	24
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>27</b>
<b>3 Materialien und Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.1 Materialien .....	28
3.1.1 Chemikalien.....	28
3.1.2 Nährmedien .....	30
3.1.3 Bakterien- und Zellkulturstämme .....	30
3.1.4 Plasmide .....	31
3.1.5 Oligonukleotide.....	31
3.1.6 Standards und <i>Kits</i> .....	32

3.1.7	Antikörper, Enzyme und Substrate .....	32
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.1	Zielgerichtete Mutagenese.....	33
3.2.2	Agarosegelelektrophorese .....	34
3.2.3	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	34
3.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA .....	34
3.3	Zellbiologische Methoden .....	35
3.3.1	Genexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	35
3.3.2	Genexpression rekombinanter Proteine in Schneider2-Zellen .....	36
3.4	Proteinchemische Methoden .....	36
3.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.4.2	<i>Western Blot</i> .....	37
3.4.3	Isoelektrische Fokussierung .....	38
3.4.4	<i>Inclusion Body</i> -Präparation .....	38
3.4.5	<i>In vitro</i> -Renaturierung .....	39
3.4.6	Reinigung von Easter <sup>Xa</sup> .....	40
3.4.7	Reinigung von hcProSpätzle11.7 .....	40
3.4.8	Aktivitätsbestimmung von Easter <sup>Xa</sup> .....	41
3.4.9	Proteolytische Reifung von ProSpätzle-Varianten .....	43
3.4.10	Reinigung isolierter Domänen von Spätzle11.7 .....	44
3.5	Biophysikalische Methoden.....	44
3.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	44
3.5.2	Circulardichroismus-Spektroskopie.....	45
3.5.3	Fluoreszenzspektroskopie .....	46
3.5.4	Analyse chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge .....	46
3.5.5	Isothermale Titrationskalorimetrie .....	50
3.5.6	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	54
3.5.7	Analytische Ultrazentrifugation.....	55
3.5.8	Massenspektrometrie .....	58

<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
4.1	Charakterisierung von Easter <sup>Xa</sup> .....	60
4.1.1	Rekombinante Expression von Easter <sup>Xa</sup> .....	60
4.1.2	Renaturierung und Reinigung von Easter <sup>Xa</sup> .....	61
4.1.3	Aktivierung von Easter <sup>Xa</sup> .....	63
4.1.4	Aktivität von Easter <sup>Xa</sup> gegenüber von ProSpätzle-Varianten.....	66
4.1.5	Analyse der sekundären Easter <sup>Xa</sup> -Spaltsequenz in den Spätzle-Prodomänen ..	69
4.1.6	Kinetik der <i>in-vitro</i> proteolytischen Spätzle-Reifung.....	70
4.2	Charakterisierung von gereiftem Spätzle11.7.....	73
4.2.1	Biochemische Charakterisierung von matSpz11.7 .....	73
4.2.2	Entfaltungsübergänge von matSpz11.7.....	76
4.3	Charakterisierung der isolierten 11.7Prodomäne.....	79
4.3.1	Reinigung und spektroskopische Charakterisierung der 11.7PD.....	79
4.3.2	Interaktionsanalyse von 11.7Prodomäne und Cystin-Knoten-Domäne mittels zweidimensionaler Kernspinresonanz .....	83
4.3.3	Interaktionsanalyse der 11.7PD und CK mittels ITC .....	84
4.4	Interaktion von Spätzle11.7 und der Toll-Rezeptor-Ektodomäne .....	87
4.4.1	Dimerisierung der Toll-Rezeptor-Ektodomäne.....	87
4.4.2	Interaktionsanalyse von Toll ECD und Spz11.7 mittels ITC.....	88
4.4.3	Säulenchromatographische Interaktionsanalyse von Toll und Spz11.7 .....	92
4.4.4	Der halbseitig gereifte Ligand hcSpz11.7.....	94
4.4.5	Interaktionsanalyse von Toll und hcSpz11.7 mittels ITC .....	97
4.4.6	Interaktionsanalyse mittels analytischer Ultrazentrifugation .....	99
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>104</b>
5.1	Faltung der Proprotein-Konvertase Easter <sup>Xa</sup> und Cytokin-Reifung.....	104
5.2	Kontextabhängige Faltung und Interaktionsanalytik des Cytokins Spätzle ..	108
5.3	Interaktionsanalyse des gereiften Spätzle-Liganden mit dem Toll-Rezeptor.....	115

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>141</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>154</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>156</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>157</b>
<b>12</b>	<b>Tagungsbeiträge .....</b>	<b>158</b>
<b>13</b>	<b>Eigene Publikationen.....</b>	<b>158</b>
<b>14</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>159</b>
<b>15</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>160</b>
<b>16</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>161</b>

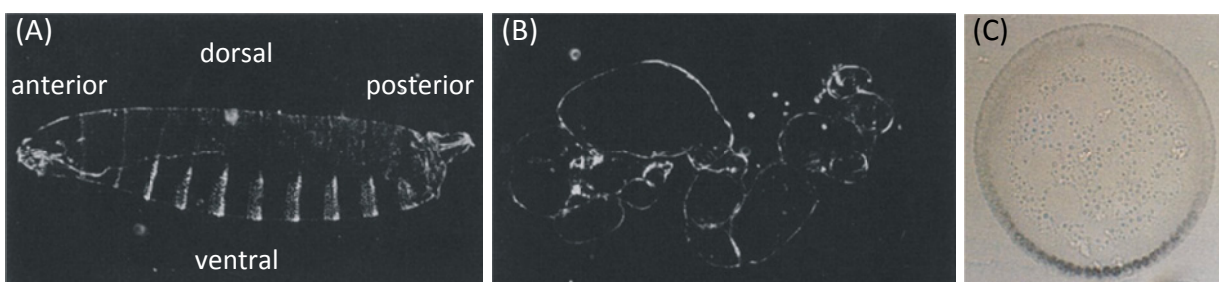
# 1 Einleitung

## 1.1 Der Spätzle-Toll-Signalweg

### 1.1.1 Dorsal-ventral-Entwicklung in *Drosophila melanogaster*

In dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* wurden in den 1980er Jahren durch einen Mutagenese-screen Allele identifiziert, welche in der Embryonalentwicklung die dorsal-ventral-Polarität determinieren (Anderson und Nüsslein-Volhard, 1984). Dabei wurden unter anderen die Allele *easter* (*ea*), *spätzle* (*spz*), *toll* und *dorsal* gefunden. *Loss-of-function* Mutationen eines dieser Gene führt zu dorsalisierten Embryonen (Abbildung 1-1), welche keinerlei Merkmale für eine ventrale oder laterale Zelldifferenzierung aufweisen (Morisato und Anderson, 1995).

Es zeigte sich, dass in einem extrazellulären Kompartiment, dem Perivitellinraum, in einem Signalweg unter Beteiligung von *easter*, *spätzle* und *toll* ein Morphogengradient aufgebaut wird (Stein und Nüsslein-Volhard, 1992). Morphogene sind dadurch definiert, dass sie in Abhängigkeit ihrer Konzentration unterschiedliche Zelldifferenzierungen auslösen (Moussian und Roth, 2005). Die Signaltransduktion führt schließlich zu einer graduellen Translokation des Genproduktes von *dorsal*, entlang der dorsal-ventral-Achse, in die Zellkerne des synzytialen Embryos, wodurch die dorsal-ventral-Polarität determiniert wird (Steward *et al.*, 1988).



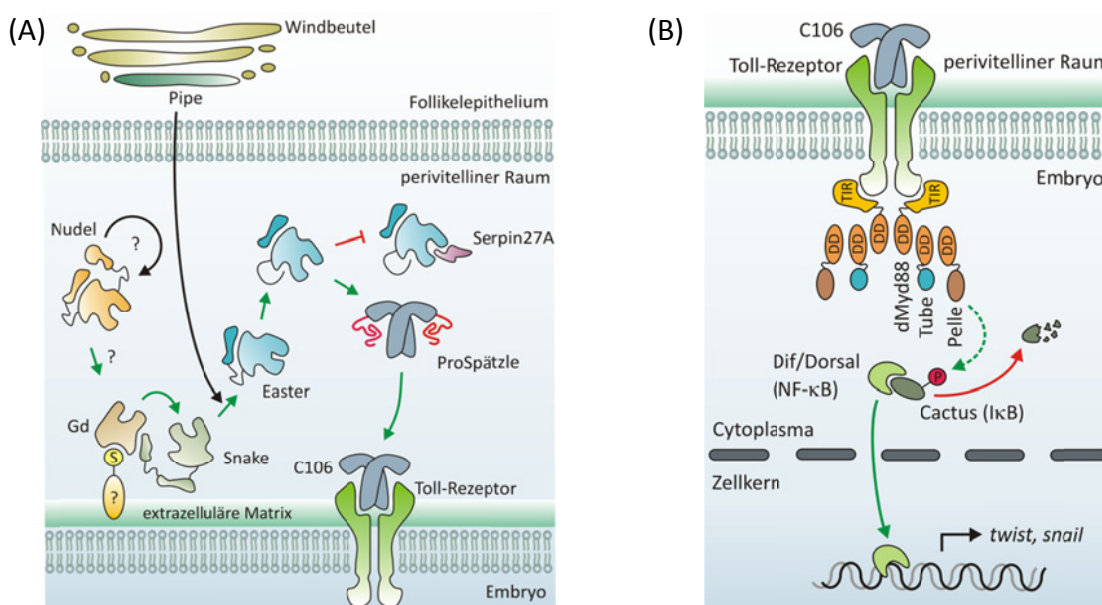
**Abbildung 1-1: Phänotyp der „dorsal-Gene“.**

(A) In *wt*-Larven von *D. melanogaster* ist bei der Embryonalentwicklung eine Asymmetrie mit ventraler Segmentierung erkennbar. (B) Hingegen weisen die Embryonen von *ea/ea*-Weibchen einen typischen Phänotyp, ohne erkennbare dorsal-ventral-Polarität, auf. Zellen differenzieren sich ausschließlich wie die dorsal-gelegenen eines *wt*-Embryos (Schneider *et al.*, 1991). (C) In einem Querschnitt eines synzytialen Embryonalstadiums ist erkennbar, dass das Dorsal-Protein auf der ventralen Seite im Zellkern lokalisiert ist (Steward, 1989).



*Easter* kodiert für die finale Serinprotease (Chasan und Anderson, 1989; Smith und DeLotto, 1994) einer Proteasekaskade bestehend aus den Genprodukten von *nudel*, *gastrulation defective* (Gd) und *snake* (LeMosy *et al.*, 1999). In dem gegenwärtig akzeptierten Modell der Signalkaskade (Abbildung 1-2) wird davon ausgegangen, dass die Serinproteasen als inaktive Vorläuferenzyme, sogenannte Zymogene, in den Perivitellinraum sezerniert werden (Stein und Nüsslein-Volhard, 1992; Chasan *et al.*, 1992).

Das Genprodukt von *spätzle*, welches Homologien zu dem *nerve growth factor* (NGF) aufweist, agiert als extrazelluläres Morphogen (Stein *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1994). Durch eine ventral lokalisierte Aktivierung der Proteasekaskade wird die latente Pro-Form von Spätzle durch *Easter* proteolytisch in seine biologisch aktive Form überführt (DeLotto und DeLotto, 1998). Die Freisetzung der funktionellen Domäne von Spätzle, bestehend aus einem kovalenten Dimer der C-terminalen 106 Aminosäuren (C106), führt zu der Aktivierung des Toll-Rezeptors (Morisato und Anderson, 1994).



**Abbildung 1-2: Der Spätzle-Toll-Signalweg in der Embryonalentwicklung.**

Der Signalweg zur Etablierung der dorsal-ventral-Polarität in *D. melanogaster* kann in eine (A) extrazelluläre Proteasekaskade und einen (B) intrazellulären post-Rezeptor-Signalweg eingeteilt werden. Die ventral lokalisierte Aktivierung der Proteasekaskade führt zur Prozessierung von ProSpätzle. Die Regulation der Kaskade erfolgt unter anderem über den Proteaseinhibitor Serpin27A (Misra *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2003). Die Bindung des gereiften Toll-Liganden C106 induziert eine Rezeptordimerisierung und Assoziation des Adapterproteins dMyd88 über die intrazellulären Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domänen. Rekrutierung des Adapterproteins Tube und der Ser/Thr-Proteinkinase Pelle über *Death*-Domänen-Interaktion führt zur Phosphorylierung und Degradation des IκB-Homologes Cactus (Sun *et al.*, 2004). Anschließende Translokation des NF-κB-Transkriptionsfaktors Dorsal (oder von *Dorsal-related immunity factor* (Dif)) in den Zellkern löst die Expression zygotischer Gene zur Zelldifferenzierung aus. (modifiziert nach Valanne *et al.* (2011) und Moussian und Roth (2005))

*Toll* kodiert dabei für ein Typ-I Transmembranprotein mit einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne (Toll ECD), bestehend aus *leucine-rich repeats* (LRRs), einer Transmembranhelix und einer C-terminalen cytoplasmatischen Domäne (Hashimoto *et al.*, 1988).

Innerhalb des Perivitellinraums können Easter und Spätzle frei diffundieren (Stein und Nüsslein-Volhard, 1992) und der Toll-Rezeptor ist uniform auf der Plasmamembran des Embryos verteilt (Hashimoto *et al.*, 1991). Eine initiale Asymmetrie wird durch eine Sulfatierung des *vitelline membrane-like* (VML)-Proteins oder weiterer Faktoren der extrazellulären Matrix durch die Sulfotransferase Pipe auf der ventralen Seite festgelegt (Zhang *et al.*, 2009). Die Proteasen Gd und Snake sind in der Lage an Heparin zu binden und werden daher *in vivo* vermutlich an der modifizierten extrazellulären Matrix immobilisiert (Dissing *et al.*, 2001). Eine anschließende räumlich fixierte Zymogenaktivierung geht in einem putativen ternären „Aktivierungskomplex“ aus Gd, Snake und Easter von statten (Chasan und Anderson, 1989; Cho *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2012).

Die funktionelle Bedeutung von Easter für die Regulation der gesamten Proteasekaskade wird dadurch hervorgehoben, dass für *easter* zahlreiche dominante *gain-of-function* Mutationen gefunden wurden (Chasan und Anderson, 1989). Weiterhin wurde aufgezeigt, dass Easter in der Lage ist Gd in einer *feedback*-Reaktion zu prozessieren (Dissing *et al.*, 2001) sowie selbst durch die Überführung in einen kovalenten Komplex mit dem Serinproteaseinhibitor Serpin27A irreversibel gehemmt wird (Misra *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2003).

Der intrazelluläre post-Rezeptor-Signalweg (Abbildung 1-2 (B)) wird durch Rekrutierung des Adaptorproteins dMyd88 über TIR-Domänen-Interaktion induziert. In einem heterotrimeren Komplex aus dMyd88, dem Adapterprotein Tube und der Ser/Thr-Kinase Pelle, vermittelt über *Death*-Domänen-Interaktion, kommt es zur Auto-Phosphorylierung und Aktivierung von Pelle (Sun *et al.*, 2004). Das putative Substrat dieser Kinase, das I $\kappa$ B-homologe Protein Cactus, wird anschließend phosphoryliert und durch das Proteasom degradiert. Durch weitere Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-homologen Transkriptionsfaktors Dorsal wird dieser in den Zellkern transloziert. Dort kommt es in Abhängigkeit der Konzentration an nukleären Dorsal, und damit räumlich abhängig, zu einer Repression oder Induktion diverser zygotischer Gene, welche zu einer spezifischen Zelldifferenzierung führen (Moussian und Roth, 2005).

### 1.1.2 Der Signalweg der angeborenen Immunantwort

Die cytoplasmatische Domäne des Toll-Rezeptors weist eine hohe Sequenzhomologie zu der des Interleukin-1-Rezeptors aus Vertebraten auf (Gay und Keith, 1991), und wird daher als Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet. Der intrazelluläre Teil des Spätzle-Toll-Signalweges und die Cytokin-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch den mammalischen Interleukin-1-Rezeptor zeigen ebenfalls Parallelen (Belvin und Anderson, 1996). Es wurde daher vermutet, dass der Toll-Rezeptor in einem Signalweg der angeborenen Immunantwort beteiligt sein könnte. In *D. melanogaster* konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Spätzle als auch Toll essentiell sind für die Expression antimikrobieller Peptide wie Drosomycin, einem allgemeinen Abwehrmechanismus in Arthropoden (Lemaitre *et al.*, 1996). In Analogie dazu wurden die humanen *toll-like*-Rezeptoren (TLR) identifiziert, welche die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression inflammatorischer Cytokine wie Interleukin-1 induzieren (Medzhitov *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998). Inzwischen konnten auf genomischer Ebene 10 humane TLRs sowie 9 Toll-Rezeptoren in *D. melanogaster* identifiziert werden (Imler und Hoffmann, 2001; Leulier und Lemaitre, 2008). Die Toll- und *toll-like*-Rezeptoren sind dabei neben post-Rezeptorelementen wie Myd88 und NF- $\kappa$ B in einem phylogenetisch konservierten Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität beteiligt (Medzhitov und Janeway, Jr., 1998).

Es sind jedoch zwischen den Toll-Rezeptoren und TLRs substantielle Unterschiede in den Aktivierungsmechanismen als auch der Funktion erkennbar (Gangloff *et al.*, 2003). Charles A. Janeway postulierte, dass die Erkennung pathogen-spezifischer, konservierter molekularer Strukturen, sogenannter PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*) durch nicht-klonale Rezeptoren, den *pattern recognition receptors* (PRRs), des angeborenen Immunsystems geschieht (Janeway, Jr., 1989). Die TLRs aus Vertebraten fungieren als solche PRRs und binden eine Vielzahl von Liganden pathogener Herkunft (Gay und Gangloff, 2007), was unter anderem zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führt (Pasare und Medzhitov, 2004).

Der Toll-Rezeptor wird hingegen nur durch die Bindung des endogenen Liganden Spätzle aktiviert, wodurch Toll eher als Cytokin-Rezeptor klassifiziert wird (Tauszig *et al.*, 2000). Die Erkennung pathogener Strukturen erfolgt in Arthropoden über in der Hämolymphe zirkulierende Rezeptoren wie GNBPs oder PGRPs (Michel *et al.*, 2001; Gobert *et al.*, 2003; Gottar *et al.*, 2006), welche im Anschluss eine Serinproteasekaskade aktivieren (Jang *et al.*, 2008).

An diesem Signalweg sind jedoch von der Embryonalentwicklung unabhängige Proteasen wie die *Gram-positive specific serine protease* (Grass) oder *Spätzle Processing Enzyme* (SPE) beteiligt (Kambris *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2006). Anhand der konstitutiven Expression von Drosomycin in Serpin43Ac-defizienten Mutanten zeigte sich, dass in der angeborenen Immunantwort Spätzle ebenfalls proteolytisch aktiviert werden muss um die Toll-abhängigen Abwehrmechanismen zu induzieren (Levashina *et al.*, 1999).

## 1.2 Easter – Eine Clip-Protease aus *Drosophila melanogaster*

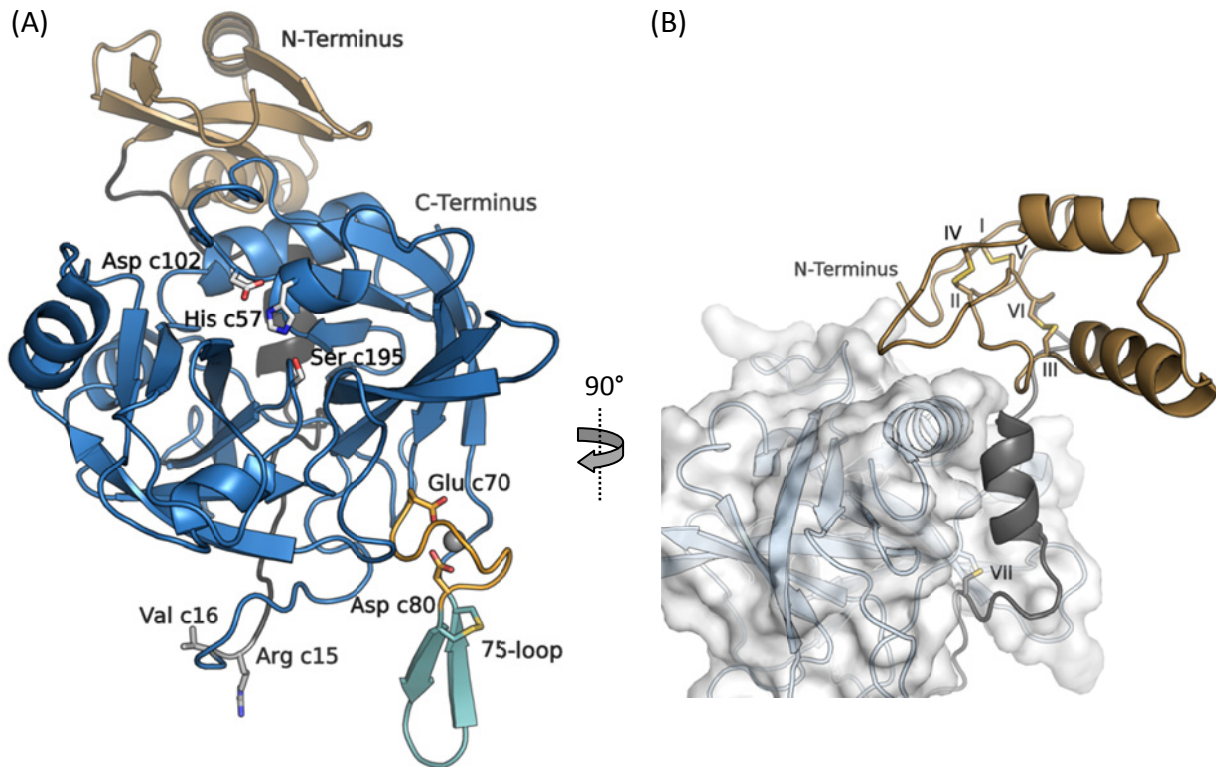
### 1.2.1 Clip-Domänen-Proteasen

Durch Identifizierung des Genes wurde nachgewiesen, dass das Genprodukt von *easter* in zwei distinkte Domänen unterteilt werden kann (Chasan und Anderson, 1989). Die C-terminale Domäne weist Homologien zu extrazellulären Serinproteasen auf. Homologe für die N-terminale Domäne wurden in *DmSnake* sowie dem *Proclotting Enzyme*, einem Prothrombin-Analog der Hämolymp-koagulation aus *Tachypleus tridentatus*, gefunden (Smith und DeLotto, 1992). Damit definierte diese N-terminale Domäne eine neue Subfamilie von Serinproteasen, welche ausschließlich in Invertebraten vorkommen, und als Clip-Domänen-Proteasen bezeichnet werden (Jiang und Kanost, 2000).

Aufgrund der Sequenzhomologie kann die katalytische Domäne von Easter der Familie S1, den Chymotrypsin-ähnlichen Serin-Endopeptidasen, zugeordnet werden (Chasan und Anderson, 1989). Charakteristisch für diese ist das Auftreten einer evolutiv konservierten katalytischen Triade aus His<sup>c57</sup>, Asp<sup>c102</sup> und Ser<sup>c195</sup> (Dodson und Wlodawer, 1998).

Die konservierte Tertiärstruktur Chymotrypsin-ähnlicher Serinproteasen ist durch eine Zwei-Domänen antiparallele  $\beta$ -barrel-Struktur beschrieben (Abbildung 1-3). Dabei liegen die katalytischen Aminosäurereste His<sup>c57</sup> und Asp<sup>c102</sup> auf dem N-terminalen 6-strängigen  $\beta$ -barrel und Ser<sup>c195</sup> auf dem C-terminalen  $\beta$ -barrel.

Über die  $\delta$ -Carboxylgruppen der konservierten Reste Glu<sup>c70</sup> und Glu<sup>c80</sup> sowie Rückgrat-Carbonylsauerstoffe und Wassermoleküle wird in bovinem Trypsin ein Ca<sup>2+</sup>-Ion oktahedral komplexiert was die Tertiärstruktur des Proteins stabilisiert (Bode und Schwager, 1975a; Bode und Schwager, 1975b). Die Bindung eines Ca<sup>2+</sup>-Ions über diese konservierten Reste wird auch für Easter angenommen (Rose *et al.*, 2003).



**Abbildung 1-3: Allgemeine Struktur von Clip-Domänen-Proteasen.**

(A) Die Tertiärstruktur des Zymogens von *DmGrass* (PDB-Code: 2XXL (Kellenberger *et al.*, 2011)) ist als *cartoon*-Darstellung mit wichtigen Seitenketten als Stabdarstellung gezeigt. Die Clip-Domäne ist in bronze, der *linker* in schwarz, die Proteasedomäne in blau, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-loop in orange, der 75-loop in cyan, die katalytische Triade in weiß und die Zymogenaktivierungsstelle in grau dargestellt. Ein gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion ist als graue Sphäre gezeigt. (B) Die Clip-Domäne in bronze und der *linker* in schwarz mit den konservierten Cysteinen (entsprechend ihrer Reihenfolge nummeriert) als Stabdarstellung sind im Detail gezeigt. Die Proteasedomäne ist als *cartoon*-Darstellung mit weißer, transparenter Oberfläche abgebildet. Das  $\beta$ -Faltblatt der Clip-Domäne ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. C-Atome sind analog der Beschreibung gefärbt, O-Atome rot, N-Atome blau und S-Atome gelb. Die Nummerierung der Aminosäurereste von Serinproteasen erfolgt allgemein nach der Nomenklatur von Shotton und Hartley (1970), welche auf der Sequenz von bovinem Chymotrypsin basiert und durch ein „c“ gekennzeichnet wird.

Die Kristallstrukturen der zu Easter homologen Clip-Domänen-Proteasen *DmGrass* (Kellenberger *et al.*, 2011) und *HdPPAF-I* (Piao *et al.*, 2007) zeigten, dass die Proteasedomänen zu bovinem Trypsinogen (Fehlhammer *et al.*, 1977) strukturell sehr ähnlich sind. Abweichend davon liegen der Aktivierungs-loop, mit der für die Zymogenaktivierung zu spaltenden Peptidbindung  $\text{Arg}^{\text{c15}}\text{-Val}^{\text{c16}}$ , und der sogenannte 75-loop in den Clip-Domänen-Proteasen exponiert vor (Abbildung 1-3 (A)). Der 75-loop schließt sich direkt an den  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-loop an und bildet eine  $\beta$ -hairpin-Struktur, welche durch eine zusätzliche Disulfidbrücke stabilisiert wird (siehe Anhang 8.1). Die räumliche Nähe des 75-loops zu dem Aktivierungs-loop ließ vermuten, dass dieser die Zugänglichkeit für aktivierende Proteasen einschränkt (Piao *et al.*, 2007; Kellenberger *et al.*, 2011).

Die N-terminale Clip-Domäne umfasst im Allgemeinen 30 - 60 Aminosäurereste und ist über einen variablen *linker* mit der C-terminalen Proteasedomäne verbunden (Jiang und Kanost, 2000). Die strukturelle Gemeinsamkeit aller bekannten Clip-Domänen ist das Vorhandensein von drei konservierten Disulfidbrücken sowie eines weiteren Cysteins, welche eine kovalente Bindung an die Proteasedomäne vermittelt (Abbildung 1-3 (B), siehe Anhang 8.6). Die Clip-Domäne besteht aus einem zentralen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, welches durch die drei Disulfidbrücken stabilisiert wird, flankiert von zwei  $\alpha$ -Helices (Piao *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007; Kellenberger *et al.*, 2011). Eine definierte Funktion der Clip-Domäne, abgesehen von der Latenzvermittlung, konnte biochemisch noch nicht nachgewiesen werden. Im Falle von Easter hat die Clip-Domäne keine essentielle Funktion für dessen proteolytische Aktivität da durch Deletion der N-terminalen Clip-Domäne die Zymogenaktivierung umgangen und eine konstitutiv aktive Variante Easter $\Delta$ N erstellt werden kann (Chasan *et al.*, 1992). Diese Variante unterliegt daher keiner räumlich fixierten Aktivierung und führt zu lateralisierten Embryonen ohne dorsal-ventral-Asymmetrie.

In co-Expressionsstudien konnte biochemisch bestätigt werden, dass Snake in der Lage ist, Easter von seiner zymogenen in eine aktive Form zu überführen (Dissing *et al.*, 2001). *In vivo* liegt Easter jedoch hauptsächlich in zymogener Form oder als hochmolekularer, kovalenter Komplex mit dem Serinproteaseinhibitor Serpin27A vor (Misra *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2003). Diese Regulation der Aktivität von Easter ist essentiell um die Form des Morphogengradienten zu determinieren (Chang und Morisato, 2002).

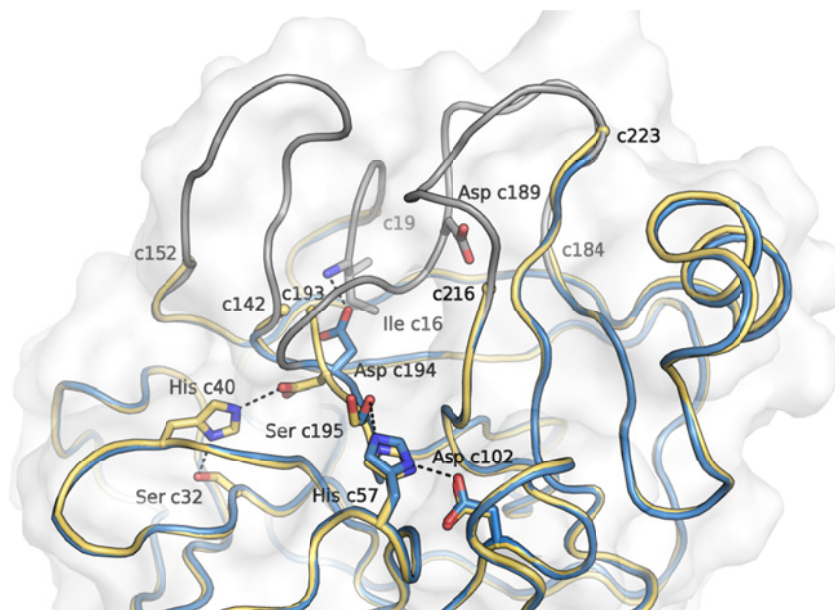
### **1.2.2 Zymogenaktivierung und Katalysemechanismus von Serinproteasen**

Bakterielle und eukaryotische Proteasen werden in der Regel als inaktive Vorläuferenzyme (Zymogene) sekretiert um eine zeitliche und räumliche Regulation der Proteaseaktivierung zu gewährleisten. Der generelle Mechanismus zur Überführung eines Zymogens in die reife, katalytisch aktive Protease verläuft über die proteolytische Entfernung einer N-terminalen gelegenen Prosequenz oder Prodomäne (Khan und James, 1998). Zusätzlich zur Latenzvermittlung können diese Prodomänen auch als Faltungshelfer für das Vollängenprotein fungieren wie es am Beispiel von Subtilisin und Carboxypeptidase Y gezeigt wurde (Baker *et al.*, 1993; Bryan, 2002).



Der molekulare Mechanismus der Zymogenaktivierung ist insbesondere anhand von bovinem Trypsinogen hervorragend untersucht (Stroud *et al.*, 1977; Huber und Bode, 1978). Die Aminosäurereste der katalytischen Triade, His<sup>c57</sup>, Asp<sup>c102</sup> und Ser<sup>c195</sup>, unterliegen nur geringfügigen konformationellen Änderungen (Fehlhammer *et al.*, 1977). Die Seitenkette von Asp<sup>c194</sup> ist in Trypsinogen über Wasserstoffbrückenbindung in der Zymogentriade mit His<sup>c40</sup> und Ser<sup>c32</sup> involviert (Abbildung 1-4).

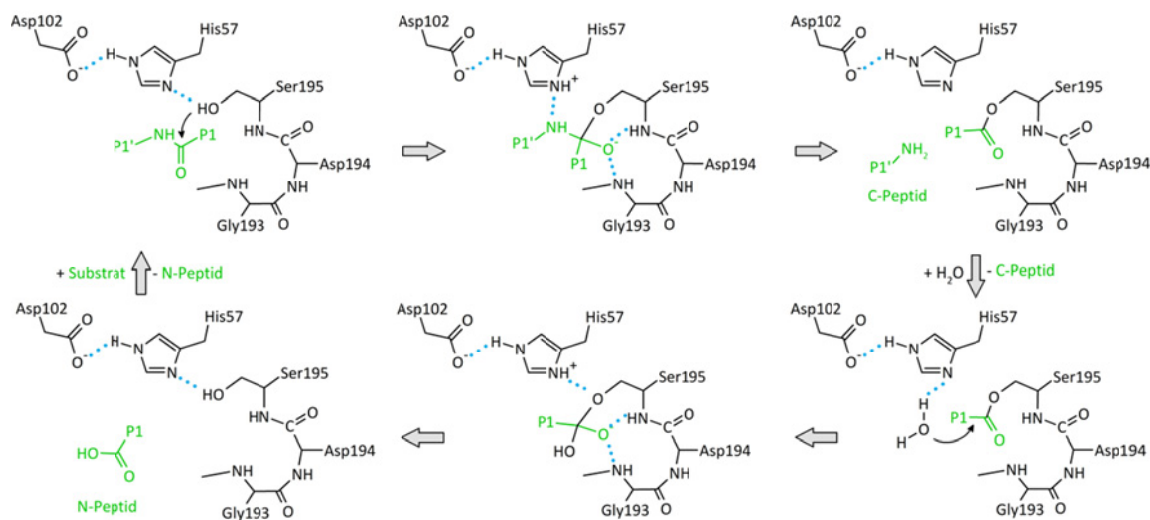
Durch proteolytische Entfernung der Prosequenz bildet die freiwerdende  $\alpha$ -Aminogruppe von Ile<sup>c16</sup> eine lösungsmittelunzugängliche Salzbrücke mit der  $\gamma$ -Carboxylgruppe von Asp<sup>c194</sup> was zu Konformationsänderungen in vier Sequenzelementen führt (Bode *et al.*, 1976; Fehlhammer *et al.*, 1977). Diese Segmente sind in Trypsinogen flexibel, liegen in aktiven Trypsin jedoch strukturiert vor, weshalb sie als Aktivierungsdomäne bezeichnet werden. Sie umfassen den N-Terminus - Gly<sup>c19</sup>, Gly<sup>c142</sup> - Pro<sup>c152</sup>, Gly<sup>c184</sup> - Gly<sup>c193</sup> und Gly<sup>c216</sup> - Asn<sup>c223</sup> (Huber und Bode, 1978). Diese Umorientierung beinhaltet Bereiche der S1-Spezifitätstasche, gebildet von den Resten Gly<sup>c184</sup> - Gly<sup>c193</sup> und Gly<sup>c216</sup> - Asn<sup>c223</sup> (Perona und Craik, 1995) sowie des *oxyanion-hole*, gebildet von den Rückgratamidstickstoffen von Gly<sup>c193</sup> und Ser<sup>c195</sup> was für die Katalyse essentiell ist.



#### Abbildung 1-4: Zymogenaktivierung Chymotrypsin-ähnlicher Serinproteasen.

Ein Strukturvergleich von bovinem Trypsinogen (PDB-Code: 1TGB (Fehlhammer *et al.*, 1977)) und bovinem Trypsin (PDB-Code: 3MFJ, Brzuskiwicz *et al.*, unveröffentlichte Daten) ist gezeigt. Trypsin ist als *cartoon*-Darstellung in blau mit weißer, transparenter Oberfläche dargestellt. Die Segmente der Aktivierungsdomäne sind grau gefärbt. Trypsinogen ist in gelb gezeigt und die flankierende Reste der flexiblen Aktivierungsdomäne sind markiert. Aminosäurereste des aktiven Zentrums sind als Stabdarstellung gezeigt. C-Atome sind analog der Beschreibung gefärbt, O-Atome rot, N-Atome blau. Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken sind als gestrichelte Linien veranschaulicht.

Der allgemein anerkannte Katalysemechanismus (Abbildung 1-5) verläuft in allen Vertretern der Chymotrypsin-ähnlichen Serin-Endopeptidasen über eine evolutiv konservierte Acyltransferreaktion (Dodson und Wlodawer, 1998; Hedstrom, 2002). Die  $\beta$ -Hydroxylgruppe von Ser<sup>c195</sup> greift, in einer durch His<sup>c57</sup> basenkatalysierten Reaktion, das Carbonyl-C-Atom der zu spaltenden Peptidbindung nukleophil an. Das entstehende tetrahedrale Intermediat wird über die Rückgratamide des *oxyanion-hole* stabilisiert. Nach der Protonierung des freizusetzenden Amins durch His<sup>c57</sup> wird das C-Peptid mit einem neuen N-Terminus entlassen und es bildet sich das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat an Ser<sup>c195</sup>. Die Deacylierungsreaktion erfolgt nach einem analogen Mechanismus mit Wasser als angreifendes Nukleophil.



**Abbildung 1-5: Allgemeiner Katalysemechanismus für Serin-Endopeptidasen.**

Die Aminosäurereste des aktiven Zentrum sind entsprechend der Nomenklatur von Shotton und Hartley (1970) beschriftet. Das Substrat, mit der zwischen den Aminosäureresten P1 und P1' zu spaltenden Peptidbindung, ist in grün dargestellt.

### 1.2.3 Spezifität von Serinproteasen

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens potentieller Substrate in Form von Peptidbindungen ist eine essentielle Funktion proteolytischer Enzyme deren regulierte Katalyse. Die Regulation kann zum Beispiel über die Zymogenaktivierung (Khan und James, 1998), allosterische Effektoren wie Na<sup>+</sup>-Ionen im Falle der Blutgerinnungsprotease Thrombin (Dang und Di Cera, 1996) oder über die Substratspezifität erfolgen.



Im letzteren Fall determinieren die funktionellen Gruppen der Seitenketten des zu spaltenden Peptidrückgrates die Spezifität. Eine Nomenklatur um die Spezifität von Peptidasen zu klassifizieren wurde von Schechter und Berger aufgestellt (1967). Dabei werden die Substratseitenketten mit P (für Peptid) deklariert und die zugehörige Bindestelle, welche mit der jeweiligen Seitenkette interagiert, als S (für *subsite*) bezeichnet. Alle Aminosäurereste N-terminal der zu spaltenden Peptidbindung werden mit P1, P2, Pn nummeriert und C-terminale Reste mit P1', P2', Pn'. Die Peptidbindung wird immer zwischen P1-P1' hydrolysiert, wobei diese Aminosäurereste in der S1- und S1'-Bindetasche gebunden werden. Die Substratspezifität Chymotrypsin-ähnlicher Serin-Endopeptidasen wird hauptsächlich durch deren S1-Spezifität determiniert (Perona und Craik, 1995; Hedstrom, 2002). Eine Trypsin-ähnliche Spezifität für Arginin oder Lysin an P1-Position wird durch ein Asp<sup>c189</sup> am Grunde der S1-Bindetasche hervorgerufen, welches eine ionische Interaktion zu Arginin vermittelt (Huber *et al.*, 1974). Die Gestalt der S1-Bindetasche wird auch durch die Aminosäurereste c190, c216, c226 und c228 geformt (Perona und Craik, 1995). In Trypsin und Chymotrypsin erlauben Gly<sup>c216</sup> und Gly<sup>c226</sup> die Bindung größerer Seitenketten (Steitz *et al.*, 1969; Huber *et al.*, 1974). Für Easter kann aufgrund der konservierten Aminosäurereste, welche die S1-Spezifität determinieren (siehe Anhang 8.1), von einer Trypsin-ähnlichen Spezifität ausgegangen werden (DeLotto und DeLotto, 1998; Rose *et al.*, 2003).

### 1.3 Das NGF-homologe Cytokin Spätzle

#### 1.3.1 Spätzle als Ligand des Toll-Rezeptors

Spätzle wurde entsprechend seines putativen Disulfidmusters als *nerve growth factor* (NGF)-ähnlicher Cystin-Knoten-haltiger Wachstumsfaktor klassifiziert (DeLotto und DeLotto, 1998). Diese stellen im Regelfall dimere Proteine dar und werden in Form eines latenten Vorläuferproteins synthetisiert, bestehend aus einer N-terminalen Prodomäne und einer C-terminalen reifen Domäne oder Cystin-Knoten-Domäne (CK). Letztere umfasst im Falle von Spätzle ein disulfidverbrücktes Dimer der C-terminalen 106 Aminosäuren und stellt die funktionelle Domäne dar (Morisato und Anderson, 1994). *In vivo* erfolgt die Prozessierung oder Reifung durch die Serinproteasen Easter und *Spätzle Processing Enzyme* was zur Freisetzung der dimeren Cystin-Knoten-Domäne führt (DeLotto und DeLotto, 1998; Jang *et al.*, 2006).

Die Pro-Form von Spätzle existiert in 10 verschiedenen Isoformen, welche aus alternativem Spleißen resultieren (DeLotto *et al.*, 2001). Diese Isoformen unterscheiden sich dabei fast ausschließlich in der Sequenz ihrer N-terminalen Prodomänen (siehe Anhang 8.2), was auf eine bisher unbekannte Funktion der einzelnen Isoformen und somit der Prodomänen hindeutet.

Die Prodomäne von Spätzle scheint in Isolation intrinsisch unstrukturiert zu sein, wie limitierte Proteolyse und Gleichgewichtsdenaturierung zeigten (Weber *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2008). Dennoch hat die Prodomäne einen stabilisierenden Einfluss auf das Volllängenprotein. Die Prozessierung einer Spätzle-Variante mit inserierter Erkennungssequenz für die *tobacco etch virus*-Protease ergab, dass ein nicht-kovalenter Komplex zwischen der reifen Cystin-Knoten-Domäne und den Prodomänen bestehen bleibt. Im Gegensatz zu der kovalenten, latenten Pro-Form war dieser prozessierte Komplex in der Lage an den Toll-Rezeptor zu binden, was zur Dissoziation der Prodomänen führte (Weber *et al.*, 2007).

In Bindungsstudien mit der Toll ECD wurde für die isolierte Cystin-Knoten-Domäne eine nanomolare Affinität bestimmt (Weber *et al.*, 2005). Der Aufbau des eigentlichen Signalkomplexes konnte biophysikalisch jedoch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Klassischerweise wird bei Typ-I Transmembranrezeptoren die Signaltransduktion durch Rezeptoroligomerisierung induziert, wie es die Bivalenz von Spätzle suggeriert.

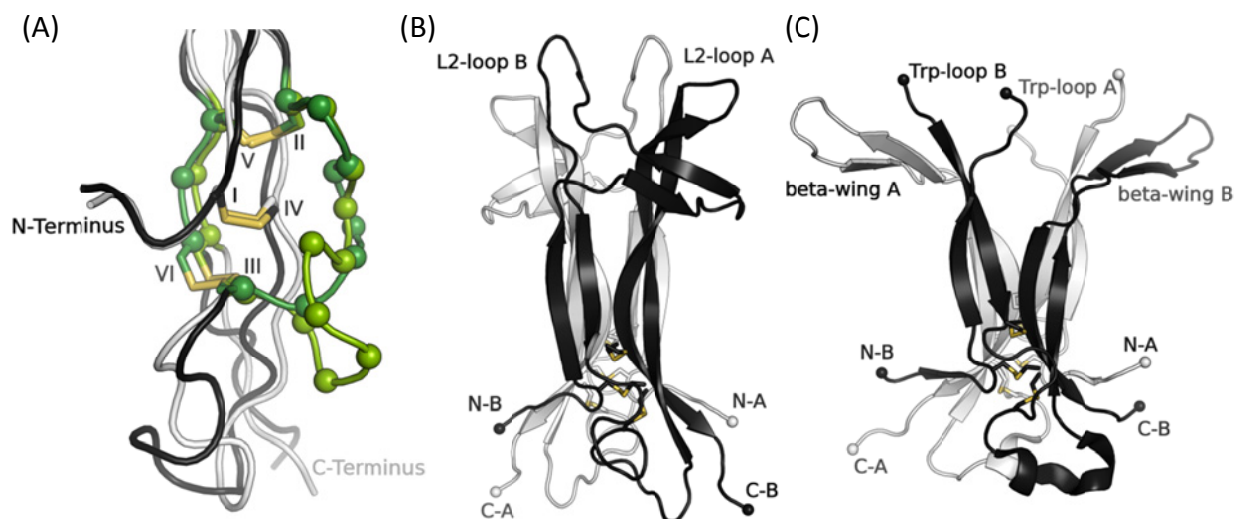
Abhängig von der angewandten Methodik wurden Rezeptor-Ligand-Komplexe mit einer Stöchiometrie von 2 : 1 (zwei Moleküle Toll : ein Molekül Cystin-Knoten-Domäne), 2 : 2 und 1 : 1 gefunden (Weber *et al.*, 2005; Gangloff *et al.*, 2008). Durch eine *epidermal growth factor* (EGF)-induzierte Aktivierung eines EGFR-Toll-Chimären konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Rezeptor-Homodimerisierung die post-Rezeptor-Signalkaskade aktiviert (Sun *et al.*, 2004). Im Falle von EGF ist bereits biochemisch als auch strukturell nachgewiesen, dass die Ligandenbindung eine Dimerisierung des EGF-Rezeptors zu einem 2 : 2-Komplex induziert (Lemmon *et al.*, 1997; Ogiso *et al.*, 2002).

Auch für die homologen *toll-like*-Rezeptoren TLR1/TLR2, TLR3 und TLR4 aus Vertebraten konnten dimere Rezeptor-Ligand-Komplexe strukturell aufgeklärt werden (Jin *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009). Da für den Toll-Spätzle-Komplex hingegen nur eine Proteinstruktur in monomerer Form verfügbar ist (Lewis *et al.*, 2013) kann bisher keine eindeutige Aussage über die Anzahl der gebundenen Spätzle-Liganden im dem Signalkomplex getroffen werden.

### 1.3.2 Allgemeine Struktur von Cystin-Knoten-Proteinen

Die C-terminale reife Domäne von Spätzle und strukturell verwandter Proteine weist ein konserviertes Strukturmotiv auf. Die Faltungstopologie des Cystin-Knoten-Motivs wurde erstmals anhand der Struktur des murinen  $\beta$ -nerve growth factor ( $\beta$ -NGF) beschrieben (McDonald *et al.*, 1991). Dieser bildet ein nicht-kovalentes Dimer, wobei jedes Protomer aus drei antiparallelen stark gewundenen  $\beta$ -Faltblättern besteht. Durch Strukturaufklärung der Wachstumsfaktoren *transforming growth factor*  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) (Daopin *et al.*, 1992) und *platet-derived growth factor* BB (PDGF-BB) (Oefner *et al.*, 1992) wurde festgestellt, dass diese strukturell konservierte Topologie eine neue Superfamilie, die Cystin-Knoten-haltigen Wachstumsfaktoren, definiert (McDonald und Hendrickson, 1993).

Das charakteristische Strukturmotiv besteht dabei aus drei konservierten Cystinen mit der Paarung I-IV, II-V und III-VI. Die Disulfidbrücken II-V und III-VI, sowie die umgebenden Aminosäurereste, bilden einen 8-14-gliedrigen Ring durch welchen die dritte Disulfidbrücke nahezu rechtwinkling verläuft (Abbildung 1-6 (A)). Aus sterischen Gründen ist in der Sequenz Cys(II)-X-Gly-X<sub>(1-7)</sub>-Cys(III) das Gly konserviert, wodurch das Passieren des Disulfides I-IV ermöglicht wird (Murray-Rust *et al.*, 1993).



**Abbildung 1-6: Struktur von Proteinen der Neurotrophin-Familie.**

(A) Ein Strukturvergleich von *DmSpätzle* CK (PDB-Code: 3E07 (Hoffmann *et al.*, 2008)) und murinem  $\beta$ -NGF (PDB-Code: 1BET (McDonald *et al.*, 1991)) ist dargestellt. Spätzle ist als *cartoon*-Darstellung in schwarz/dunkelgrün und  $\beta$ -NGF in weiß/hellgrün gezeigt. Die Cysteinseitenketten des Cystin-Knoten-Motivs sind als Stabdarstellung mit entsprechender Nummerierung verzeichnet. Die Aminosäurereste, welche den Ring formen, sind grün gefärbt und die  $C\alpha$ -Atome als Sphären gezeigt. Die Strukturen von (B) murinem  $\beta$ -NGF und (C) *DmSpätzle* sind als *cartoon*-Darstellungen mit den einzelnen Monomeren (A und B) in schwarz und weiß gezeigt. Cysteine sind als Stabdarstellung gezeigt und die N- und C-Termini beschriftet. C-Atome sind entsprechend der Beschreibung und S-Atome gelb gefärbt.

Obwohl zwischen den verschiedenen Vertretern dieser Proteinfamilie nur geringe Sequenzhomologien bestehen weisen sie äquivalente Sekundär- und Tertiärtopologien auf. Signifikante Unterschiede bestehen in ihrer Quartärstruktur auf Grund der verschiedenen Arten der Dimerassoziation, welche unterschiedliche Oberflächen der protomeren Struktur involvieren (McDonald und Hendrickson, 1993). Im Falle von  $\beta$ -NGF bildet sich ein nicht-kovalentes Dimer durch eine parallele *head-to-head*-Anordnung mit einer Kontaktfläche von  $\sim 1100 \text{ \AA}^2$  zwischen den Protomeren (Abbildung 1-6 (B)). Die Cystin-Knoten-Domäne von Spätzle weist eine NGF-ähnliche Quartärstruktur auf, stellt jedoch durch eine intermolekulare Disulfidbrücke ein kovalent verknüpftes Dimer dar (DeLotto und DeLotto, 1998; Hoffmann *et al.*, 2008).

Dahingegen bilden TGF- $\beta$ 2 und PDGF-BB antiparallele *head-to-tail*-Dimere mit vergleichsweise kleinen Kontaktflächen, welche über eine, beziehungsweise zwei intermolekulare Disulfidbrücken stabilisiert werden (Murray-Rust *et al.*, 1993). Da infolge der Cystin-Knoten-Topologie hydrophobe Seitenketten exponiert werden und die Monomere keinen definierten hydrophoben Kern besitzen, ist für diese Proteinfamilie die Dimerisierung meist essentiell für die Proteinstabilität (Sun und Davies, 1995). Der einzige bisher identifizierte, als Monomer stabile Vertreter ist Coagulogen aus *Tachypleus tridentatus*, welches strukturelle Ähnlichkeit zu  $\beta$ -NGF und Spätzle hat (Bergner *et al.*, 1996).

Eine strukturelle und funktionelle Klassifizierung der Cystin-Knoten-Wachstumsfaktoren erfolgt in vier Subfamilien, welche repräsentiert werden von  $\beta$ -NGF, TGF- $\beta$ 2, PDGF und den Glykoprotein-Hormonen (Sun und Davies, 1995). Die Neurotrophin-Familie umfasst neben  $\beta$ -NGF den *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) sowie die Neurotrophine NT-3, NT-4 und NT-5. Sie steuern allgemein die Entwicklung, das Überleben und die Apoptose sowie Funktionalität neuronaler Zellen (Reichardt, 2006). Dabei agieren sie als Liganden für zwei strukturell nicht verwandte Rezeptorklassen. Der Neurotrophin-Rezeptor (NTR) p75<sup>NTR</sup> der *tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptor-Familie interagiert mit allen reifen Neurotrophinen mit vergleichbarer Affinität. Dahingegen zeigen die Trk Rezeptor-Tyrosin-Kinasen A-C eine Selektivität gegenüber bestimmten Liganden. Der bevorzugte Ligand für Trk A stellt  $\beta$ -NGF dar, BDNF und NT-4 für Trk B und NT-3 für TrkC (Teng und Hempstead, 2004).

Das erste entdeckte Cystin-Knoten-Protein aus Invertebraten war *TtCoagulogen*. In der Hämolymphe-Koagulation des Pfeilschwanzkrebse wird bei einer Pathogeninfektion Coagulogen durch *Proclotting Enzyme* proteolytisch in unlösliches Coagulin überführt (Iwanaga, 1993).

Spätzle und Coagulogen können entsprechend ihrer Struktur eindeutig der Neurotrophin-Familie (vgl. Abbildung 1-6) zugeordnet werden (Bergner *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 2008). Konformationelle Unterschiede zwischen Spätzle und  $\beta$ -NGF bestehen insbesondere in den Bereichen der  $\beta$ -wings und des Trp-loop von Spätzle, respektive dem L2-loop in  $\beta$ -NGF. Diese Bereiche sind putativ in der Bindung der N-terminalen Prodomänen beteiligt (Hoffmann *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2010). Detaillierte Strukturdaten zu den Neurotrophin-Prodomänen existieren bisher nicht, da diese in isolierter Form intrinsisch unstrukturiert sind (Kliemann *et al.*, 2004) und auch innerhalb der Pro-Form zwar eine kompakte aber flexible Konformationen einzunehmen scheinen (Paoletti *et al.*, 2008; Paoletti *et al.*, 2011).

Anhand der Kristallstruktur der Cystin-Knoten-Domäne von *Dm*Spätzle wird ersichtlich, dass in dem Bereich der  $\beta$ -wings und in den  $\beta$ -Faltblättern zahlreiche hydrophobe Seitenketten dem Lösungsmittel exponiert werden, welche potentielle Interaktionsflächen zu den Prodomänen darstellen (Hoffmann *et al.*, 2008). Die Beteiligung des Trp-loop in der Interaktion wird ebenfalls diskutiert (Arnot *et al.*, 2010).

Im Falle von Pro- $\beta$ -NGF im Komplex mit p75<sup>NTR</sup> wird durch das „Fehlen“ von Elektronendichte in der Kristallstruktur sowie konformationellen Änderungen in den L2-loops, im Vergleich zu reifem  $\beta$ -NGF, ein äquivalentes Bindungsmodell postuliert (Feng *et al.*, 2010).

### 1.3.3 Funktion der Pro-Wachstumsfaktoren und Prodomänen

Mit Ausnahme der Glykoprotein-Hormone werden die Cystin-Knoten-haltigen Wachstumsfaktoren als prä-Pro-Protein translatiert (Sun und Davies, 1995). Die N-terminale Signalsequenz vermittelt die co-translationale Translokation in das Endoplasmatische Retikulum, wo die Faltung und Assoziation zu Homo- oder Heterodimeren stattfindet. In Vertebraten verläuft die Reifung der Pro-Proteine in dem trans-Golgi-Netzwerk durch die Subtilisin-ähnlichen Proprotein-Konvertasen. Furin, die erste identifizierte Proprotein-Konvertase, wird in Säugern ubiquitär in allen Geweben exprimiert (Nakayama, 1997). Eine Vielzahl von Prohormonen und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise Pro- $\beta$ -NGF (Seidah *et al.*, 1996) und Pro-BMP-4 (Cui *et al.*, 1998) werden von Furin C-terminal eines polybasischen Konsensusmotivs Arg-Xaa-(Arg/Lys)-Arg prozessiert (Rockwell *et al.*, 2002), was zur Sezernierung der reifen Wachstumsfaktoren führt.

*DmSpätzle* wird *in vivo* während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus ausschließlich als latente Pro-Form sezerniert (Morisato und Anderson, 1994; Schneider *et al.*, 1994; Levashina *et al.*, 1999). Die extrazelluläre Reifung von *DmSpätzle* erfolgt C-terminal eines einzelnen, konservierten Arginins durch die Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen Easter oder SPE (DeLotto und DeLotto, 1998; Jang *et al.*, 2006).

Die N-terminale Prodomäne ist jedoch nicht ausschließlich für die Latenzerhaltung der Wachstumsfaktoren verantwortlich. Für *DmSpätzle* wurde die Prodomäne als essentiell für die Faltung und Sezernierung des gesamten Proteins beschrieben (Weber *et al.*, 2007). Die Eigenschaft der Prodomänen während der Biogenese als *intramolecular chaperone* zu fungieren, ist bereits *in vivo* und *in vitro* für einige Vertreter der Cystin-Knoten-Superfamilie wie BMP-4,  $\beta$ -NGF und BMP-2 beschrieben (Seidah *et al.*, 1996; Rattenholl *et al.*, 2001b; Kuhfahl, 2014).

Interessanterweise zeigen diese Prodomänen eine sogenannte kontextabhängige Faltung. In isolierter Form ist die Prodomäne von humanen  $\beta$ -NGF sowie die Isoform *DmSpätzle*8.24 (ohne Cystin-Knoten-Domäne, siehe Anhang 8.2) intrinsisch unstrukturiert (Kliemann *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2008), wohingegen die  $\beta$ -NGF-gebundene Prodomäne in ihrer Tertiärstruktur stabilisiert ist (Kliemann *et al.*, 2007). Dennoch deutet die Sensitivität der Prodomänen, im Kontext der Pro-Form, gegenüber tryptischen Abbau eine hohe konformationelle Flexibilität an (Rattenholl *et al.*, 2001b; Hoffmann *et al.*, 2008).

Die reifen Domänen von  $\beta$ -NGF und *DmSpätzle* sind hingegen auf Grund ihrer kompakten Struktur stabil und können durch limitierte Proteolyse in physiologisch funktioneller Form erhalten werden (Rattenholl *et al.*, 2001b; Weber *et al.*, 2003).

Die Prodomänen haben auch einen Einfluss auf die Funktionalität des jeweiligen Wachstumsfaktors. Durch eine sequentielle Prozessierung an zwei Furin-Konsensussequenzen in der BMP-4-Prodomäne wird das intrazelluläre *trafficking*, die Freisetzung und die Aktivität des reifen Wachstumsfaktors reguliert (Cui *et al.*, 2001; Degnin *et al.*, 2004; Sopory *et al.*, 2006). Für Pro- $\beta$ -NGF wurde gezeigt, dass die Prodomäne dessen biologische Funktion in zwei komplett gegensätzliche zelluläre Prozesse dirigiert (Ibanez, 2002). Es wurde nachgewiesen, dass  $\beta$ -NGF auch als Pro-Form sezerniert wird und extrazellulär, selektiv durch die Serinprotease Plasmin und die Matrixmetalloprotease MMP-7 prozessiert wird (Lee *et al.*, 2001).

Pro- $\beta$ -NGF fungiert jedoch nicht nur als inaktiver Vorläufer sondern induziert die Apoptose, im Gegensatz zu  $\beta$ -NGF, welches Zellüberleben und -differenzierung vermittelt. Der reife Wachstumsfaktor bindet bevorzugt an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase TrkA wohingegen die Pro-Form mit hoher Affinität an p75<sup>NTR</sup> bindet (Lee *et al.*, 2001). Die p75<sup>NTR</sup>-vermittelte Apoptoseinduktion ist dabei abhängig von dem co-Rezeptor Sortilin (Nykjaer *et al.*, 2004).

Eine derartige funktionelle Diversität konnte auch für *Dm*Spätzle gezeigt werden. Das Vorhandensein der 10 verschiedenen Isoformen (DeLotto *et al.*, 2001) und die Sekretion verschiedener Pro-Formen *in vivo* (Morisato und Anderson, 1994) suggeriert eine explizite Funktion der Prodomäne. Weiterhin wurden in *D. melanogaster* fünf Spätzle-Paraloge, Spz-2 bis Spz-5, beschrieben (Parker *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer Homologie zu den humanen Neurotrophinen werden Spz-2 und Spz-5 als *Drosophila*-Neurotrophin-1 (DNT1) und DNT2 bezeichnet werden. DNT-1 und DNT-2 werden im Zentralnervensystem sowie in Muskeln exprimiert und vermitteln neuronales Überleben (Zhu *et al.*, 2008).

Als einziger Rezeptor für die reife Cystin-Knoten-Domäne von Spätzle wurde bisher lediglich Toll beschrieben (Tauszig *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2003). Spätzle und Toll werden ebenfalls im Zentralnervensystem und in Muskeln exprimiert. Eine *loss-of-function*-Mutation führte zu gesteigerter Apoptose in Neuronen (Zhu *et al.*, 2008). In ihrer neurotrophischen Funktion interagieren die Spätzle-Paraloge DNT-1 und DNT-2 putativ mit den Toll-Homologen Toll-6 und Toll-7 (McIlroy *et al.*, 2014).

## 1.4 Der Toll-Rezeptor - Embryonalentwicklung und angeborene Immunantwort

### 1.4.1 Funktion von Toll- und toll-like-Rezeptoren

*Toll* kodiert für ein Typ-I-Transmembranprotein mit einer N-terminalen extrazellulären Domäne bestehend aus sich wiederholenden *leucine rich repeat* (LRR)-Modulen (Hashimoto *et al.*, 1988). Die C-terminale intrazelluläre Domäne wird wegen ihrer Sequenzhomologie zu dem Interleukin-1 Rezeptor als Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet (Gay und Keith, 1991). Eine Rezeptordimerisierung und -aktivierung erfolgt durch Bindung des endogenen proteolytisch gereiften Liganden Spätzle (Weber *et al.*, 2003).

Für *toll* wurden zahlreiche dominante Allele identifiziert, welche zur Expression eines konstitutiv aktiven Rezeptors führen (Schneider *et al.*, 1991). Dabei wird durch eine artifizielle Dimerisierung über intermolekulare Disulfidbrücken in der membran-proximalen extrazellulären Domäne die Signalvermittlung induziert (Hu *et al.*, 2004). Im post-Rezeptor-Signalweg (Abbildung 1-2 (B)) führt die Dimerisierung zu einer homotypischen TIR-Domänen-Interaktion mit einem vorgeformten heterotrimeren Komplex der Adaptorproteine Myd88 und Tube sowie der Ser-Thr-Kinase Pelle (Sun *et al.*, 2004).

Inzwischen wurden in dem Genom von *D. melanogaster* zusätzlich zu Toll acht weitere Homologe (Toll-2 bis Toll-9) identifiziert (Leulier und Lemaitre, 2008). Die physiologischen Funktionen aller *DmToll*-Rezeptoren sind bisher nicht vollständig verstanden. Für Toll (Toll-1) und Toll-5 wurde nachgewiesen, dass sie die Expression des antifungalen Peptides Drosomycin induzieren und daher in der angeborenen Immunantwort beteiligt sind (Tauszig *et al.*, 2000). Toll-2 (*18-wheeler*) agiert putativ als Zelladhäsionsmolekül oder Membranrezeptor zur Regulation von Zellmigrationen während der Segmentierung (Eldon *et al.*, 1994). Toll-6 und Toll-7 agieren im Zentralnervensystem als Neurotrophinrezeptoren und vermitteln das Überleben von Neuronen (McIlroy *et al.*, 2014). Für Toll-8, und dessen putativen Liganden DNT-1 (*Spz-2*), wurde eine Funktion als negativer Regulator der *imd*-abhängigen Abwehr Gram-negativer Bakterien nachgewiesen (Akhouayri *et al.*, 2011).

In Vertebraten ist für die homologen *toll-like*-Rezeptoren (TLRs) jedoch bis dato hauptsächlich eine Funktion in der pathogen-induzierten Aktivierung der Immunantwort beschrieben (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002). Charles A. Janeway beschrieb 1989 mit „*immunologist's dirty little secret*“ den Fakt, dass eine adaptive Immunantwort auf ein spezifisches Antigen nur erfolgt, wenn dem Immunsystem gleichzeitig unspezifische Adjuvantien pathogener Herkunft präsentiert werden (Janeway, Jr., 1989). Effektorzellen des Immunsystems sollten nicht-klonale *pattern recognition receptors* (PRRs) tragen, welche sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen. Dies sind molekulare Strukturen, welche für das Überleben des jeweiligen Pathogens essentiell und daher evolutiv absolut invariabel sind. Dazu gehören bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid, Teichonsäuren oder virale doppelsträngige RNA. In Vertebraten kommen diese Strukturen nicht vor. Nach der *pattern recognition*-Theorie wurde die Evolution des angeborenen Immunsystems auf die Erkennung dieser invarianten Moleküle ausgerichtet, was eine Diskriminierung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ erlaubt (Medzhitov und Janeway, Jr., 1997; Medzhitov, 2011).



Die klonalen T- und B-Zell-Rezeptoren des adaptiven Immunsystems sind inhärent zu dieser Unterscheidung nicht in der Lage.

Mit der Entdeckung, dass ein *toll-like*-Rezeptor (TLR4) in Säugern zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems, durch Expressionsinduktion der inflammatorischen Cytokine Interleukin-1 $\beta$ , -6 und -8 und des Moleküles B7, führt (Medzhitov *et al.*, 1997), rückte der Toll-Signalweg in den Fokus des Interesses der Immunologie. Als putativer Ligand für TLR4 konnte Lipopolysaccharid (LPS) identifiziert werden, da eine Deletion des TLR4-Locus zu LPS-Hyposensitivität in Mäusen führte (Hoshino *et al.*, 1999). TLR4 stellte damit einen nicht-klonalen Immunrezeptor dar, welcher in der Lage ist das adaptive Immunsystem durch Erkennung von bakteriellen Zellwandbestandteilen zu aktivieren.

Im humanen Genom sind bis heute zehn *toll-like*-Rezeptoren (TLR1 bis TLR10) identifiziert worden (Leulier und Lemaitre, 2008). TLRs werden konstitutiv auf verschiedenen immunrelevanten Zelltypen wie Makrophagen, B- und T-Lymphocyten und Dendritischen Zellen exprimiert (Imler und Hoffmann, 2001). Eine Rezeptoraktivierung induziert unter anderem die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, Interferon- $\beta$ ) und des co-stimulatorischen Moleküls B7. Dadurch reifen Dendritische Zellen zu professionell Antigen-präsentierenden Zellen, welche in der Lage sind naive T-Zellen zu aktivieren (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002).

Für die verschiedenen TLRs wurden bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden beschrieben und deren Interaktionen strukturell charakterisiert (Gay und Gangloff, 2007; Jin und Lee, 2008). TLR2 in Assoziation mit TLR1 oder TLR6 erkennt sowohl bakterielle Lipoteichonsäure als auch Lipoproteine und -peptide (Jin *et al.*, 2007). Lipopolysaccharid der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wird durch den TLR4 in Komplex mit dem co-Rezeptor-Protein MD-2 gebunden (Park *et al.*, 2009). TLR5 ist der bisher einzig bekannte TLR, welcher einen proteinogenen Liganden, bakterielles Flagellin, bindet (Yoon *et al.*, 2012).

Die Agonisten für TLR3, -7, -8 und -9 stellen Nukleinsäuren dar, wie zum Beispiel dsRNA (TLR3, (Liu *et al.*, 2008)), Uracil-reiche ssRNA (TLR7, TLR8) oder DNA mit unmethylierten CpG-Dinukleotide (TLR9). Diese TLRs kommen in Endosomen vor, entsprechend ihrer Liganden viraler Herkunft.

Die *Danger*-Theorie der Immunologie interpretiert die Funktion der TLRs gegensätzlich zu der *pattern recognition*-Theorie (Matzinger, 2002; Medzhitov, 2011). Demnach wird eine Immunantwort nicht durch Erkennung eines pathogenen „Nicht-Selbst“ ausgelöst, sondern durch endogene Alarmsignale verletzter Zellen (durch Pathogene, Toxine, mechanische Schäden).

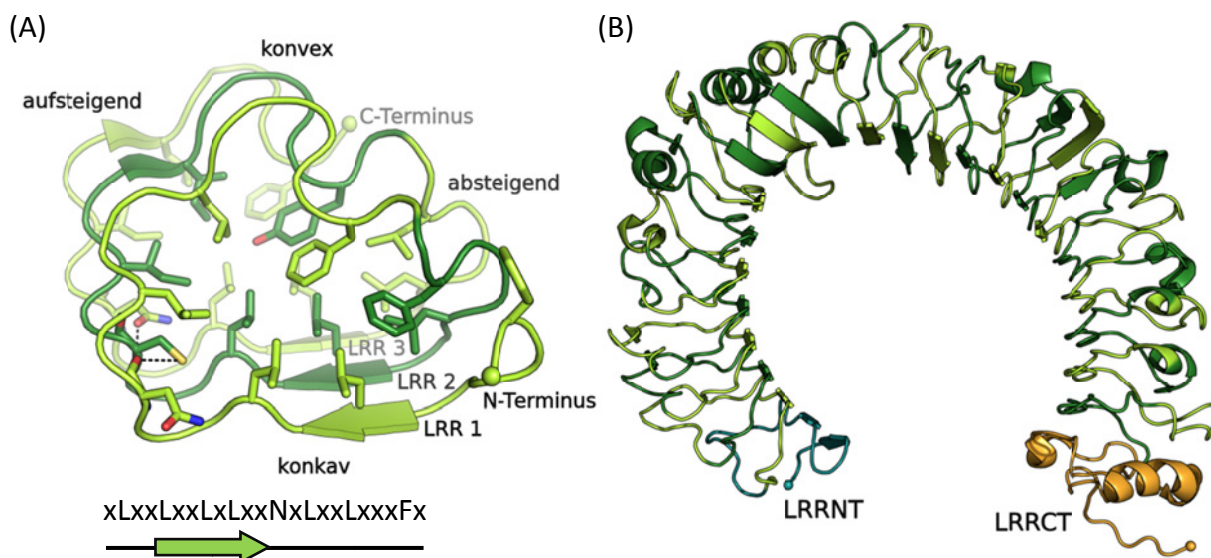
Daher besteht eine Annahme, dass die Evolution der TLRs nicht darauf ausgerichtet war pathogene Strukturen zu erkennen, sondern Pathogene sich entwickelten um TLRs zu binden (Matzinger, 2002). Diese Theorie erfasst zahlreiche Immunmechanismen wie Autoimmunerkrankungen und Organabstoßungsreaktionen, welche nach der *pattern recognition*-Theorie nicht erklärt werden können. Unterstützt wird die *Danger*-Theorie dadurch, dass auch für TLRs endogene Liganden gefunden wurden, wie zum Beispiel Hsp60, Hsp70 und Fibrinogen für TLR4 oder Hyaluronsäure für TLR2, welche die Expression pro-inflammatorischer Cytokine induzieren (Ohashi *et al.*, 2000; Asea *et al.*, 2002; Scheibner *et al.*, 2006).

### 1.4.2 Struktur von *toll-like*-Rezeptoren

Die extrazelluläre Domäne der *toll-like*-Rezeptor-Familie weist eine charakteristische Faltungstopologie auf. Sie ist aus tandemartig angeordneten *leucine-rich repeat* (LRR)-Modulen mit einer typischen Länge von 22 - 29 Aminosäureresten und einem konservierten Cluster hydrophober Aminosäuren aufgebaut (Abbildung 1-7 (A)). LRR-Module wurden bereits in allen Phyla und Proteinen diverser Funktionen gefunden (Buchanan und Gay, 1996).

LRR-Module falten stets in eine typische Sekundärstruktur bestehend aus einem kurzen  $\beta$ -Strang, gefolgt von einem *turn* und einer variablen Region (Gay und Gangloff, 2007). Dabei bilden die konservierten hydrophoben Seitenketten den Kern der LRR-Struktur. Konsekutiv angeordnete LRR-Module bilden eine Solenoidstruktur in der sich auf der konkaven Seite die  $\beta$ -Stränge über Wasserstoffbrückenbindungen zu einem parallelen  $\beta$ -Faltblatt anordnen und die variablen *loop*-Regionen die konvexe Seite bilden.

Typisch für die TLRs ist das Vorhandensein paralleler  $3^{10}$ -Helices auf der konvexen Seite (Jin und Lee, 2008). Die Krümmung entsteht durch eine engere Packung innerhalb des  $\beta$ -Faltblattes im Vergleich zu den *loop*-Strukturen (Botos *et al.*, 2011). Eine Stabilisierung der *loop*-Regionen in der „aufsteigenden“ lateralen Seite des Solenoids erfolgt durch eine „Asparagin-Leiter“ (Buchanan und Gay, 1996). Die  $\gamma$ -Carbonylgruppe des konservierten Asparagin bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Rückgrat-Amidstickstoff des vorherigen LRR. Infolge der Packung der LRR-Module ist der hydrophobe Kern lösungsmittlexponiert. N- und C-terminal der LRR-Domäne wird diese durch Cystein-reiche Motive, welche die disulfidstabilisierten *capping*-Strukturen LRRNT und LRRCT bilden, flankiert (Gay und Gangloff, 2007).



**Abbildung 1-7: Grundstruktur von LRR-Modulen und des humanen TLR4.**

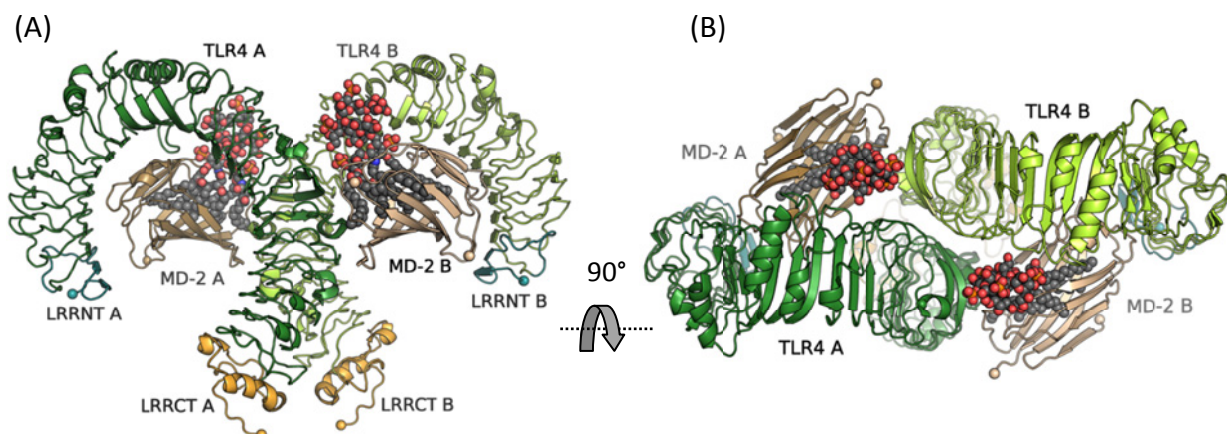
**(A)** Die *leucine-rich repeats* 1 - 3 der extrazellulären Domäne des humanen TLR4 (PDB-Code: 3FXI (Park *et al.*, 2009)) sind als *cartoon*-Darstellung, mit den konservierten Resten des Konsensus-LRR (unten) als Stabdarstellung gezeigt. C-Atome sind grün gefärbt, O-Atome rot, N-Atome blau und S-Atome gelb. **(B)** Die Tertiärstruktur der extrazellulären Domäne des humanen TLR4 ist als *cartoon*-Darstellung abgebildet. Die LRRs sind alternierend grün, die N- und C-terminalen Cystein-reichen Module cyan und orange gefärbt.

Charakteristisch für die *DmToll*-Rezeptoren ist, dass sie, im Gegensatz zu den TLRs aus Vertebraten, mehrere dieser Cystein-reichen Motive besitzen (Imler und Hoffmann, 2001).

Die *toll-like*-Rezeptoren sind in der Lage eine Vielzahl, in ihrer chemischen Struktur und Größe variierende, Liganden wie zum Beispiel kleine hydrophobe Lipopeptide, hydrophile Nucleinsäuren oder proteinogene Liganden und co-Rezeptoren zu binden. Dennoch bilden alle vergleichbar antiparallele, „m“-förmige Dimere wobei die juxtamembran gelegenen C-Termini in engen Kontakt kommen (Jin und Lee, 2008). Die Ligand-induzierte Dimerisierung der extrazellulären Domänen führt dann zu einer Dimerisierung der intrazellulären TIR-Domänen in einer spezifischen Orientierung, wodurch sie in der Lage sind post-Rezeptor-Faktoren zu binden. Dabei assoziieren unter anderem das Adaptorprotein MyD88 und *interleukin-1 receptor-associated kinases* (IRAKs) zu einem Signalkomplex, was zu der Aktivierung der I $\kappa$ B-Kinase und letztlich Kerntranslokation von NF- $\kappa$ B führt (Gay und Gangloff, 2007).

Anhand der bekannten Ligand-Rezeptor-Strukturen von TLR1/2, TLR2/6, TLR3, TLR4 sowie TLR5 zeigt sich, dass die Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung fast ausschließlich über die „aufsteigende“ laterale Seite erfolgt (Botos *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2012).

Dies wird exemplarisch anhand von TLR4, welcher in Assoziation mit dem endogenen co-Rezeptor-Protein *myeloid differentiation factor 2* (MD-2) für die Erkennung von Lipopolysaccharid verantwortlich ist, veranschaulicht (Abbildung 1-8). TLR4 und MD-2 formen in Abwesenheit eines Liganden einen stabilen 1 : 1 -Komplex, wobei MD-2 an der „aufsteigenden“ lateralen Seite assoziiert ist (Kim *et al.*, 2007). Die Bindung des Glykolipides Lipopolysaccharid (LPS) eines Pathogens führt zu einer Assoziation von zwei TLR4–MD-2–LPS-Komplexen zu einem symmetrischen Dimer (Park *et al.*, 2009). Dabei wird die Interaktion zwischen den Dimeren maßgeblich durch gegenseitige Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen stabilisiert, wie es auch bei anderen TLR-Strukturen zu beobachten ist.



**Abbildung 1-8: Quartärstruktur des TLR4–MD-2–LPS-Komplexes.**

(A) Die Quartärstruktur des TLR4–MD-2–Lipolysaccharid-Komplexes ist als *cartoon*-Darstellung gezeigt. (B) Der Komplex mit einer um 90° rotierten Ansicht ist dargestellt (PDB-Code: 3FXI (Park *et al.*, 2009)). Die Monomere des humanen TLR4 sind in dunkel- und hellgrün, die N- und C-terminalen Cystein-reichen Module cyan und orange, und die Moleküle des MD-2-co-Rezeptors bronze gefärbt. Die gebundenen Lipopolysaccharide sind als Kalottenmodelle in schwarz dargestellt. C-Atome sind schwarz gefärbt, O-Atome rot, N-Atome blau und P-Atome orange.

## 2 Zielstellung

Das Cystin-Knoten-Protein Spätzle spielt eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung und in der angeborenen Immunantwort von *D. melanogaster* als Ligand des Toll-Rezeptors (Hoffmann, 2003; Moussian und Roth, 2005). Da *DmSpätzle* in Form von 10 verschiedenen Isoformen vorkommt, welche sich nur in ihrer N-terminalen Prodomäne unterscheiden, und deren spezifische Funktion unbekannt ist, steht die Prodomäne im Fokus des Interesses. In einer vorangegangenen Arbeit wurden bereits zwei Isoformen von *DmSpätzle* biophysikalisch charakterisiert, wobei sich zeigte, dass die Prodomäne eine Stabilisierung des Gesamtproteins bewirkt (Hoffmann *et al.*, 2008). Von dem strukturell verwandten Protein  $\beta$ -NGF ist bekannt, dass die Prodomäne in Isolation intrinsisch unstrukturiert vorliegt, im Kontext des Gesamtproteins jedoch in seiner Struktur stabilisiert ist (Kliemann *et al.*, 2004). Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, biophysikalische Charakteristika der Spätzle-Prodomäne in Isolation und in nicht-kovalenter Assoziation mit der Cystin-Knoten-Domäne, sowie ihre Funktion bei der Toll-Spätzle-Komplexbildung zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte zunächst die Protease Easter *in vitro* renaturiert und die proteolytische Reifung von Spätzle analysiert werden. Biochemische Untersuchungen sollten qualitative sowie quantitative Aussagen über die Aktivität gegenüber einem niedermolekularen Peptidsubstrat und dem natürlichen, makromolekularen Proteinsubstrat Spätzle liefern. Anschließend sollte nachgewiesen werden, welchen Faltungszustand die Spätzle-Prodomäne in isolierter Form aufweist und ob sich strukturelle Änderungen bei Bindung an die reife Domäne ergeben.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur eines Toll-Spätzle-Komplexes veröffentlicht (Parthier *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen TLRs wurde für *DmToll* eine Bindung des gereiften Liganden in der konkaven Seite des Solenoids beschrieben. Die bisher bekannten Strukturen von TLR-Ligand-Komplexen aus Vertebraten verweisen auf eine dimere Form (Jin *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009), was für die Aktivierung des Toll/TLR-Signalweges verantwortlich gemacht wird. Hingegen wurde für *DmToll* nur ein monomerer Komplex im Kristall gefunden (Parthier *et al.*, 2014). Die Bindungsstöchiometrie des Toll-Spätzle-Komplexes wird kontrovers diskutiert, wobei dimere 2 : 1- und 2 : 2 -Komplexe beobachtet wurden (Weber *et al.*, 2005; Gangloff *et al.*, 2008). Daher sollten Analysen durchgeführt werden, um die Bindungsstöchiometrie nachzuweisen und eine Aussage über einen möglichen Signalkomplex zu treffen. Dabei sollte eine mögliche Beteiligung der Prodomänen bei der Rezeptorbindung untersucht werden.

### 3 *Materialien und Methoden*

#### 3.1 *Materialien*

##### 3.1.1 **Chemikalien**

Acetonitril (ACN)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphorese)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
L-Arginin	Ajomoto, Hamburg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Cobalt(II)-chlorid	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blau R250	Merk, Darmstadt
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisen(III)-citrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (AcOH)	VWR, Darmstadt
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
$\alpha$ -D-Glucose Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Glutathion, oxidiert (GSSG)	AppliChem, Darmstadt
Glutathion, reduziert (GSH)	AppliChem, Darmstadt
Glycerin 87 % (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidiniumchlorid (GdmCl)	NIGU Chemie, Waldkraiburg
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Merck, Darmstadt

Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)-chlorid	Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	Wacker Chemie, München
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholsäure (NaDOC)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat	Roth, Karlsruhe
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Nickel(II)-chlorid	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	AppliChem, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)	Life Technologies, Darmstadt
Polyethylenglycol (PEG) 3350	Merck, Darmstadt
Propan-2-ol (Isopropanol)	VWR, Darmstadt
Salzsäure 37 % (w/v) (HCl)	VWR, Darmstadt
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka, Steinheim
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X100	Merck, Darmstadt
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Zinksulfat	Roth, Karlsruhe

Bei der Herstellung von Puffern, Lösungen und Medien wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet.

### 3.1.2 Nährmedien

<i>Lysogeny broth</i> (LB)-Flüssigmedium	5 g·L <sup>-1</sup> Hefeextrakt, 10 g·L <sup>-1</sup> NaCl, 10 g·L <sup>-1</sup> Trypton
LB-Agarplatten	LB-Flüssigmedium + 1,5 % (w/v) Agar-Agar
<i>Super optimal catabolite repression</i> (SOC)-Medium	5 g·L <sup>-1</sup> Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 20 g·L <sup>-1</sup> Trypton, 10 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,8 % (w/v) Glucose
<i>Insect Express Prime</i> -Medium (PAA, Pasching, Österreich)	

### 3.1.3 Bakterien- und Zellkulturstämmen

<i>E. coli</i> XL1 <i>blue</i> (Stratagene, Heidelberg)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Novagen, Darmstadt)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) (Novagen, Darmstadt)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (CamR)
<i>D. melanogaster</i> Schneider2 (S2) (Life Technologies, Darmstadt)	

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm XL1 *blue* verwendet. Die Proteinexpression von Easter<sup>Xa</sup> und der Spätzle-Isoformen (Spz) erfolgte in den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3) und Rosetta (DE3). Bei der Kultivierung wurden die Medien, entsprechend der vektorspezifischen Resistenz, mit 100 µg·mL<sup>-1</sup> Ampicillin versetzt. Im Falle von Rosetta (DE3) erfolgte eine zusätzliche Selektion auf das pRARE2-Plasmid durch Zusatz von 10 µg·mL<sup>-1</sup> Chloramphenicol.

Die Expression der Toll-Rezeptor-Ektodomäne (Toll ECD) wurde in Schneider2-Zellen durchgeführt. Diese wurden abgeleitet von einer primären Kultur von 20 - 24 h alten *D. melanogaster*-Embryozellen (Schneider, 1972). Die Schneider2-Zellen wurden mit dem pMTV5His-A-Vektor, welcher die Gensequenz der Ektodomäne des Toll-Rezeptors aus *D. melanogaster* enthielt, transfiziert, und lagen bereits als stabile Expressionszelllinie vor (Stelter *et al.*, 2013).



### 3.1.4 Plasmide

Der verwendete Expressionsvektor pET21a(+) beinhaltet einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor und kodiert für eine Ampicillinresistenz. Der Vektor pMTV5His-A des *Drosophila Expression Systems* (Life Technologies, Darmstadt) trägt einen Cu<sup>2+</sup>-induzierbaren Metallothionein-Promotor sowie eine Ampicillinresistenz für die Selektion von Transformanten und Amplifikation in *E. coli*.

<i>D. melanogaster</i> Easter <sup>Xa</sup> in pET21a(+), Amp <sup>r</sup>	(Sieg, 2008)
<i>D. melanogaster</i> Spätzle8.19 (Spz8.19) in pET21a(+), Amp <sup>r</sup>	(Hoffmann, 2009)
<i>D. melanogaster</i> Spätzle11.7 (Spz11.7) in pET21a(+), Amp <sup>r</sup>	(Hoffmann, 2009)
<i>D. melanogaster</i> Toll ECD in pMTV5His-A, Amp <sup>r</sup>	(Stelter <i>et al.</i> , 2013)

Das verwendete Konstrukt Easter<sup>Xa</sup> beinhaltet die Aminosäuren 20 - 392 der *wt*-Sequenz (UniProtKB ID P13582, siehe Anhang 8.6) unter Einführung der Insertion (IEG<sup>c14</sup>) (Nummerierung der Aminosäurereste für Easter<sup>Xa</sup> bezieht sich auf die von Shotton und Hartley (1970) eingeführte Nomenklatur).

Alle exprimierten Proteine tragen einen C-terminalen His<sub>6</sub>-*tag*, insofern nicht explizit anders angegeben.

### 3.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Die für die zielgerichtete Mutagenese veränderten Basen sowie 5'-Phosphorylierungen sind hervorgehoben.

Spz8.19chim

Vorwärts: 5' – **P-TTT AAT** AGG ACG GAC ACG GAG GTG – 3'

Rückwärts: 5' – **P-GAG** GAC GAA CGT ATC GTT AAA GAC – 3'

Spz11.7chim

Vorwärts: 5' – **P-TTG CAG** AGG ACG GAC ACG GAG GTG – 3'

Rückwärts: 5' – **P-AGA** TAC AAC TCC CTC ATC ATT GGT – 3'

ncSpz11.7/ncSpz8.19

Vorwärts: 5' – GTG AGC TCT **GCG** GTT GGT GGC TC – 3'

Rückwärts: 5' – GA GCC ACC AAC **CGC** AGA GCT CAC – 3'

Easter<sup>Xa</sup> S<sup>c195</sup>A

Vorwärts: 5' – CGT GGC GAT **GCA** GGC GGT CCG – 3'

Rückwärts: 5' – CGG ACC GCC **TGC** ATC GCC ACG – 3'

Easter<sup>Xa</sup> Δ75-Xa

Vorwärts: 5' – **P-GGC GAA** CTG GAT GTG CCG GTG GAA CGT ACC – 3'

Rückwärts: 5' – **P-GCC TTC TTC** GGT GTT GGT ATC CCA TTC GCC – 3'

### 3.1.6 Standards und Kits

1-kb-DNA-Marker	NEB, Frankfurt (Main)
SDS-PAGE <i>Molecular Weight Standards, Broad Range</i>	Bio-Rad, München
<i>Benchmark His-tagged Protein Standard</i>	Life Technologies, Darmstadt
IEF Marker 3 - 10	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
<i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i>	Thermo Scientific, Schwerte
<i>Pierce Glycoprotein Staining Kit</i>	Thermo Scientific, Schwerte
SERVAGel IEF 3 - 10 <i>Starter Kit</i>	SERVA Electrophoresis, Heidelberg

### 3.1.7 Antikörper, Enzyme und Substrate

Monoklonaler Maus-anti-Pentahistidin-Antikörper	Qiagen, Hilden
Polyklonaler Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper, <i>horseradish</i> -Peroxidase (HRP)-Konjugat	Millipore, Darmstadt
Benzonase	Sigma Aldrich, Steinheim
boviner Faktor Xa	NEB, Frankfurt (Main)
bovines Trypsin	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Dnpl</i>	NEB, Frankfurt (Main)
Lysozym	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt (Main)
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt (Main)
Pefachrome tPA	LOXO, Dossenheim

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Zielgerichtete Mutagenese

Unter Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide (3.1.5) wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach dem *QuikChange*-Protokoll (Stratagene, Heidelberg) verschiedene Mutationen in die Sequenz von *Easter*<sup>Xa</sup> und den zwei Spätzle-Isoformen Spz11.7 und Spz8.19, die kloniert in den pET21a(+)-Vektor (Hoffmann, 2009) als *template* vorlagen, eingeführt. Ein typischer PCR-Ansatz, unter Verwendung der *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase (3.1.7), war wie folgt zusammengesetzt:

5 x HF-Puffer	4 µL
10 mM dNTPs	0,4 µL
10 pmol/µL Vorwärts-Oligonukleotid	1 µL
10 pmol/µL Rückwärts- Oligonukleotid	1 µL
100 ng/µL <i>template</i> -DNA	0,5 µL
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	0,2 µL
ddH <sub>2</sub> O	12,9 µL

Die anschließende PCR wurde in einem Thermocycler (Thermocycler Professionel basic, Biometra, Göttingen) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	98 °C	1 min	
<i>Annealing</i>	56 - 80 °C	1 min	
Elongation	72 °C	3 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

Für einfache Punktmutationen wurde im *Annealing*-Schritt eine Temperatur von 10 °C unterhalb der theoretischen Schmelztemperatur, der paarenden Sequenz der Oligonukleotide, gewählt. Bei Einführung oder Deletion längerer Sequenzabschnitte wurde die optimale *Annealing*-Temperatur durch Einstellung eines Temperaturgradienten im angegebenen Bereich ermittelt.

Im Anschluss daran wurde durch Zusatz von 1  $\mu\text{L}$  *DpnI* (3.1.7) und Inkubation für 2 h bei 37 °C methylierte, parentale Plasmid-DNA abgebaut. Bei Verwendung von 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden wurde im Anschluss 10 x T4-Ligasepuffer (NEB, Frankfurt) und 1  $\mu\text{L}$  T4-DNA-Ligase (3.1.7) zugesetzt und für weitere 2 h bei 25 °C inkubiert.

### 3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation mutierter Plasmid-DNA wurden 1 %-ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer hergestellt. Dazu wurden 0,5 g Agarose in 50 mL TAE-Puffer unter Erwärmen gelöst und 2 Tropfen 0,025 %-ige (w/v) Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 3 x DNA-Probenpuffer versetzt und bei 90 V für 50 min elektrophoretisch getrennt (Consort E835 Elektrophorese Power Supply, Sigma-Aldrich, Steinheim), wobei TAE-Puffer als Laufpuffer verwendet wurde. Zur Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente wurde ein 1-kb-DNA-Marker (3.1.6) mitgeführt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mittels UV-Licht.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0  
3 x DNA-Probenpuffer: 50 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau,  
50 % (v/v) TAE-Puffer

### 3.2.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein 50  $\mu\text{L}$ -Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* XL1 *blue*-Zellen wurde mit 1  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA (3.2.4) oder 10  $\mu\text{L}$  eines PCR-Ansatzes (3.2.1) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden die Zellen auf Eis für 1 min abgekühlt und mit 800  $\mu\text{L}$  SOC-Medium (3.1.2) versehen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 37 °C schüttelnd inkubiert, 200  $\mu\text{L}$  auf einer selektiven LB-Agarplatte ausplattiert (3.1.2) und für weitere 16 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Eine Einzelkolonie transformierter *E. coli* XL1 *blue*-Zellen (3.2.3) wurde in 4 mL LB-Flüssigmedium (3.1.2) mit 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Ampicillin überführt und für 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (3.1.6) nach dem Herstellerprotokoll.

Die Elution der DNA erfolgte mit 50  $\mu\text{L}$  sterilem ddH<sub>2</sub>O. Die Sequenzierung der DNA, um die korrekte Einführung der Mutationen zu überprüfen, erfolgte durch die Firma GATC (Konstanz).

### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Genexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Expression der Spätzle-Varianten erfolgte in *E. coli* Rosetta (DE3)-Zellen nach einem etablierten Protokoll (Hoffmann, 2009). Für die Expression von Easter<sup>xa</sup> wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (3.2.3) und eine 50 mL LB-Flüssigkultur (3.1.2), supplementiert mit 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Ampicillin, mit 50  $\mu\text{L}$  des Transformationsansatzes inokuliert. Die Zellen wurden für 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert und im Anschluss eine 1,5 L LB-Flüssigkultur mit 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Ampicillin mit 10 mL der Vorkultur angeimpft. Anschließend wurden die Zellen weiter bei 37 °C kultiviert und bei Erreichen einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von  $\sim 1,0$  die Expression durch Zusatz von 1 mM IPTG induziert. Nach 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation für 30 min bei 5 000 x *g* und 4 °C geerntet.

Die Expression von <sup>15</sup>N-markiertem Spz11.7 erfolgte in Minimalmedium, dessen Zusammensetzung Tabelle 3-1 zu entnehmen ist. Abweichend vom beschriebenen Protokoll in Komplexmedium wurde eine 50 mL M9-Vorkultur mit 0,5 mL einer LB-Medium Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen der optischen Dichte OD<sub>600</sub>  $\sim 2,0$  kultiviert. Eine 1,5 L M9-Hauptkultur wurde anschließend mit 30 mL der M9-Vorkultur inokuliert und bei einer OD<sub>600</sub>  $\sim 2,5$  die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 20 h bei 20 °C schüttelnd inkubiert und durch Zentrifugation bei 5 000 x *g* und 4 °C für 30 min geerntet.

**Tabelle 3-1: Zusammensetzung von M9-Minimalmedium**

Stammlösung	Volumen (mL)
M9-Puffer	974
20 % (w/v) Glucose	20
Spurenelement-Lösung	2
1 M MgSO <sub>4</sub>	2
0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1
10 mM Fe(III)-citrat	1

M9-Puffer:	17 g·L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O, 3 g·L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g·L <sup>-1</sup> NaCl, 1 g·L <sup>-1</sup> <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl
Spurenelement-Lösung:	0,1 g·L <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O, 0,03 g·L <sup>-1</sup> MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O, 0,3 g·L <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0,2 g·L <sup>-1</sup> CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O, 0,02 g·L <sup>-1</sup> NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O, 0,01 g·L <sup>-1</sup> CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O, 0,9 g·L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O, 0,02 g·L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>

### 3.3.2 Genexpression rekombinanter Proteine in Schneider2-Zellen

Für die Expression der Toll-Rezeptor-Ektodomäne (Toll ECD) wurde eine Schneider2-Zelllinie verwendet, welche eine stabile Expression unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promotors (*DmToll ECD pMTV5His-A*) gewährleistet (Stelter *et al.*, 2013). Die Kultivierung erfolgte dabei in *Insect Express Prime*-Medium, supplementiert mit 1 % (v/v) PenStrep, bei 27 °C mit 5 mL in 25 cm<sup>2</sup>- oder 15 mL in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bei einer Zelldichte von ca. 1 · 10<sup>6</sup> - 1 · 10<sup>7</sup> Zellen·mL<sup>-1</sup>. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe) bestimmt. Die Expression erfolgte in einem 2 L-Maßstab im Schüttelkolben bei einer initialen Zelldichte von 2 · 10<sup>6</sup> Zellen·mL<sup>-1</sup> und einer Induktorkonzentration von 500 µM CuSO<sub>4</sub> für 5 Tage bei 25 °C. Die Zellen wurden vom Kulturüberstand durch Zentrifugation für 30 min bei 5 000 x g und 4 °C abgetrennt. Die weitere Reinigung der Toll ECD erfolgte nach einem etablierten Protokoll (Stelter *et al.*, 2013).

## 3.4 Proteinchemische Methoden

### 3.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE können die zu untersuchenden Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Für allgemeine proteinanalytische Elektrophoresen wurden 15 %-ige (v/v) Tris-Glycin-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Die Analyse von Prozessierungskinetiken der Spätzle-Isoformen wurde mit Tris-Tricin-Gelen nach Schägger und von Jagow (1987) durchgeführt, welche eine bessere Auftrennung von Proteinspezies mit geringen Molekülmassenunterschieden gewährleisten. Proteinproben in GdmCl-haltigen Puffer wurden vor der Elektrophorese mittels NaDOC-Fällung (Arnold und Ulbrich-Hofmann, 1999) präzipitiert und in 3 x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 250 V und 30 mA in einer Elektrophorese-Apparatur (Laufkammer und Elektrophorese Power Supply EPS 300, Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz).

Anschließend wurden die Proteinbanden mittels Silberfärbung nach Nesterenko *et al.* (1994), dem *Glycoprotein Staining Kit* (3.1.6), Western Blot (3.4.2) oder Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung, letztere unter Verwendung der hier aufgeführten Lösungen, detektiert.

3 x SDS-Probenpuffer:	87,5 mM Tris/HCl, 0,0125 % (w/v) Bromphenolblau, 13 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,8
Färbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R250
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure

Für nicht-reduzierende SDS-PAGE wurde 3 x SDS-Probenpuffer ohne Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet.

### 3.4.2 Western Blot

Der spezifische Nachweis von Proteinen mit His<sub>6</sub>-tag erfolgte durch *Western Blot* mittels eines Maus-anti-Pentahistidin-Antikörpers (primärer Antikörper) und einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (sekundärer Antikörper). Dazu wurden die im SDS-Polyacrylamidgel (3.4.1) aufgetrennten Proteinbanden im *semi-dry*-Verfahren in einer TE 77 PWR *Blot*-Apparatur (GE Healthcare, Freiburg) bei 55 mA für 1 h auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad, München) übertragen. Nach einer Inkubation für 1 h in Blocklösung (3 % (w/v) BSA in TBS) wurde die Membran mit 700 ng des primären Antikörpers in 12,5 mL Blocklösung für 1 h inkubiert, gefolgt von drei Waschschritten für je 5 min mit TBST (TBS + 0,05 % (v/v) Tween20). Anschließend wurde die Membran für 1 h mit 800 ng des sekundären Antikörpers in 12,5 mL TBST + 5 % (w/v) Milchpulver inkubiert und erneut dreimal für je 5 min mit TBST gewaschen. Nach einem weiteren Waschschriff mit TBS wurde die Membran in einer Filmkassette mit je 1 mL ECL1 und ECL2 benetzt und ein lichtempfindlicher Film (Kodak Biomax Light Film, Sigma-Aldrich, Steinheim) für 30 s belichtet. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 25 °C.

Transferpuffer:	25 mM Tris, 0,192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
TBS:	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6

ECL1:	0,1 M Tris/HCl, 0,4 mM p-Cumarinsäure, 0,25 mM Luminol, 1,4 % (v/v) DMSO, pH 8,5
ECL2:	0,1 M Tris/HCl, 0,32% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , pH 8,5

### 3.4.3 Isoelektrische Fokussierung

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes und der Probenhomogenität von renaturierten Easter<sup>xa</sup> wurde eine isoelektrische Fokussierung mit dem SERVAGel IEF 3 - 10 *Starter Kit* (3.1.6) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.4.4 *Inclusion Body*-Präparation

Alle Konstrukte von Easter<sup>xa</sup> und ProSpz wurden ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies* (IBs) in *E. coli*-Zellen exprimiert. Die Präparation der IBs erfolgte nach einem etablierten Protokoll (Rudolph *et al.*, 1997), mit geringfügigen Änderungen. Zunächst wurden 10 - 20 g Zellfeuchtmasse in 40 mL IB 1 resuspendiert und mit 1,5 mg Lysozym pro Gramm Zellen versehen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde eine Konzentration von 3 mM MgCl<sub>2</sub> eingestellt, 4 µL Benzonase zugesetzt und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Hochdruckdispersion (Gaulin Micron Lab 40, APV Homogenisator GmbH, Lübeck) bei einem maximalen Druck von 1 200 bar aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde für 30 min bei 25 °C inkubiert, 0,5 Volumen IB 2a zugegeben und für weitere 30 min bei 4 °C gerührt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 78 000 x *g* für 20 min bei 4 °C wurde das erhaltene Sediment in IB 2b mit einem Ultraturrax (Jahnke und Kunkel IKA-Labortechnik, Stauffen) resuspendiert und erneut bei 4 °C 30 min inkubiert. Anschließend wurden die IBs für 15 min bei 4 °C und 78 000 x *g* zentrifugiert und in IB 3 resuspendiert. Nach viermaliger Wiederholung dieses Waschschrittes wurden die *inclusion bodies* in IB 4 für 16 h bei 4 °C solubilisiert, mehrfach gegen 4 M GdmCl, pH 4,0 dialysiert und unlösliches Material durch Zentrifugation bei 78 000 x *g* für 30 min und 4 °C abgetrennt.

IB 1:	0,1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0
IB 2a:	60 mM EDTA, 6 % (v/v) Triton-X100, 1,5 M NaCl, pH 7,0
IB 2b:	60 mM EDTA, 3 % (v/v) Triton-X100, 1,5 M NaCl, pH 7,0
IB 3:	0,1 M Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 7,0
IB 4:	6 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,1 M DTT, pH 8,5



### 3.4.5 *In vitro*-Renaturierung

Alle in dieser Arbeit behandelten Spätzle-Varianten wurden nach einem etablierten Protokoll renaturiert und gereinigt (Hoffmann, 2009). Abweichend davon wurde bei der Renaturierung von halbseitig prozessierbarem hcProSpz11.7 (für „*half-cleaved*“) ein äquimolares Verhältnis von ProSpz11.7 und ncProSpz11.7 (für „*non-cleavable*“, ohne His<sub>6</sub>-tag) eingesetzt. Dazu wurden die solubilisierten Proteine (3.4.4) zu einer Gesamtproteinkonzentration von 15 mg·mL<sup>-1</sup> vereinigt und nach der Methode der schnellen Verdünnung (Rudolph und Lillie, 1996) durch langsames Zutropfen zu einer Endkonzentration von 150 mg·L<sup>-1</sup> bei 4 °C in Spz-Renaturierungspuffer gebracht. Nach einer Inkubation für 48 h bei 4 °C wurde der Renaturierungsansatz mittels *Cross-Flow*-Ultrafiltration (Viva Flow 200, Sartorius, Göttingen) auf ein Zehntel des Volumens aufkonzentriert und gegen 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 dialysiert.

Für die Rückfaltung von Easter<sup>Xa</sup> wurde das erhaltene solubilierte Protein (3.4.4) zuvor über eine denaturierende Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie bei 25 °C an einer *fast protein liquid chromatography*-Anlage (ÄKTA-FPLC, UPC-900, Amersham Biosciences, Freiburg) gereinigt (wie alle im Weiteren beschriebenen chromatographischen Methoden). Die Probe wurde auf 4 M GdmCl, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Imidazol, pH 7,5 eingestellt und auf eine His-Trap HP-Säule (10 mL Säulenvolumen) (GE Healthcare, München) geladen. Nach einem Waschschrift mit 4 M GdmCl, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM Imidazol, pH 7,5 erfolgte die Elution mit 4 M GdmCl, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M Imidazol, pH 7,5. Das Eluat wurde auf 0,1 M DTT eingestellt und mehrfach gegen 4 M GdmCl, pH 4,0 dialysiert. Das so erhaltene gereinigte, denaturierte Protein wurde bei 4 °C mittels Verdünnung in 2 Pulsen (zu je 20 mg pro Faltungspuls, 24 h Pulsintervall) in 2 L Easter<sup>Xa</sup>-Renaturierungspuffer renaturiert. Nach 48 h Inkubation wurde der Faltungsansatz mittels *Cross-Flow*-Ultrafiltration auf ein Zehntel des Volumens aufkonzentriert und je 24 h gegen Dialysepuffer 1, gefolgt von Dialysepuffer 2 dialysiert.

Spz-Renaturierungspuffer	1 M Tris/HCl, 5 mM EDTA, 5 mM GSH, 2 mM GSSG, pH 8,5
Easter <sup>Xa</sup> -Renaturierungspuffer:	0,1 M Tris/HCl, 0,5 M L-Arg, 2,5 mM EDTA, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM Methyl-β-cyclodextrin, 0,05 % (w/v) PEG3350, 1 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8,5
Dialysepuffer 1:	0,1 M Tris/HCl, 50 mM L-Arg, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 8,5
Dialysepuffer 2:	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 8,5

### 3.4.6 Reinigung von Easter<sup>xa</sup>

Das renaturierte Protein (3.4.5) wurde bei 4 °C auf eine mit Dialysepuffer 2 äquilibrierte 5 mL His-Trap HP-Säule geladen und durch Anlegen eines Stufengradienten mit Ni<sup>2+</sup>-Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurde monomeres, gefaltetes Protein von Aggregaten und Oligomeren durch Größenausschlusschromatographie auf einer Superdex200 HiLoad 16/60 Säule (GE Healthcare, München) in SEC-Puffer abgetrennt. Da mittels isoelektrischer Fokussierung (3.4.3) ein isoelektrischer Punkt von ~ 7,0 für monomeres Easter<sup>xa</sup> bestimmt wurde, wurde als finaler Reinigungsschritt eine Anionen-Austausch-Chromatographie mit einer 1 mL Q-Sepharose HP-Säule (GE Healthcare, München) durchgeführt. Das Protein wurde mit AEX-Puffer A als Laufpuffer an der Säule gebunden und durch einen Stufengradienten mit AEX-Puffer B eluiert. Die Lagerung des gereinigten Proteins erfolgte bei -20 °C in AEX-Puffer B.

Ni <sup>2+</sup> -Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM Imidazol, pH 8,5
SEC-Puffer:	20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 8,2
AEX-Puffer A:	20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 % (v/v) Glycerol, pH 8,2
AEX-Puffer B:	20 mM Tris/HCl, 0,3 M NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 % (v/v) Glycerol, pH 8,2

### 3.4.7 Reinigung von hcProSpätzle11.7

Das renaturierte Protein (vorliegend in Spz-Renaturierungspuffer) (3.4.5) wurde durch *Cross-Flow*-Ultrafiltration aufkonzentriert und zu maximal 2 % des Säulenvolumens auf eine Superdex75 HiLoad 26/60-Säule, (20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 als Laufpuffer) geladen, um dimeres, gefaltetes Spätzle von Aggregaten und Monomeren abzutrennen. Da bei der Renaturierung zwei verschiedene Konstrukte (ProSpz11.7-His<sub>6</sub> und ncProSpz11.7 ohne His<sub>6</sub>-tag) eingesetzt wurden, kann es zur Ausbildung von Homo-Dimeren (ProSpz11.7-His<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, Homo-Dimeren von (ncProSpz11.7)<sub>2</sub> und einem Hetero-Dimer aus (ProSpz11.7-His<sub>6</sub> - ncProSpz11.7) kommen. Diese drei Spezies wurden durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie aufgetrennt. Dazu wurde die von der Gelfiltrationssäule eluierte Dimer-Fraktion auf eine 5 mL HisTrap HP-Säule (20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4) geladen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten bis 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 0,5 M Imidazol, pH 7,4 über 60 Säulenvolumen.

Die mittels reduzierender SDS-PAGE (3.4.1) identifizierten homogenen Fraktionen wurden vereinigt, gegen 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 dialysiert und bei -20 °C gelagert.

### 3.4.8 Aktivitätsbestimmung von Easter<sup>Xa</sup>

Da die Renaturierung und Reinigung von Easter<sup>Xa</sup> ausschließlich in Zymogenform erfolgte, erforderten Aktivitätsmessungen eine vorherige proteolytische Aktivierung. Zu diesem Zweck war bereits zuvor in die vorhergesagte Snake-Erkennungssequenz (Chasan und Anderson, 1989; Chasan *et al.*, 1992) für die *in vivo*-Zymogenaktivierung (LSNR<sup>c15</sup>-I<sup>c16</sup>) von Easter eine Erkennungssequenz für bovinen Faktor Xa inseriert worden (LSNIEGR<sup>c15</sup>-I<sup>c16</sup>), wodurch die Faktor Xa-aktivierbare Variante Easter<sup>Xa</sup> (3.1.4) erhalten wurde (Sieg, 2008). Die proteolytische Aktivität von renaturiertem Easter<sup>Xa</sup> wurde gegenüber dem chromogenen Peptidsubstrat CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-D-HHT-Gly-Arg-pNA·AcOH (Pefachrome tPA (3.1.7)) gemessen, um zum einen die Faltungsbedingungen für Easter<sup>Xa</sup> zu optimieren als auch den zeitlichen Verlauf der Zymogenaktivierung zu analysieren. Die dabei erfolgende Freisetzung von p-Nitroanilin kann spektroskopisch bei 405 nm ( $\epsilon_{405} = 9900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , (Lottenberg und Jackson, 1983)) verfolgt werden. Alle Messungen wurden bei einer Substratkonzentration von 400  $\mu\text{M}$  durchgeführt, was für Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen im Allgemeinen einer sättigenden Konzentration entspricht (Hedstrom, 2002).

#### Aktivitätsmessung zur Optimierung der Renaturierung

Teilfaktorielle Faltungs-*screens* wurden entsprechend dem Protokoll von Armstrong *et al.* (1999) durchgeführt. Jeder *screen* beinhaltete 12 Additive, welche in N = 16 Bedingungen variiert wurden. Entsprechend einer statistischen Verteilung war jedes Additiv nur in der Hälfte der Bedingung in einer definierten Konzentration zugesetzt. Gereinigtes denaturiertes Easter<sup>Xa</sup> (3.4.5) wurde zu einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  in 20 mL Faltungspuffer variierender Zusammensetzung verdünnt. Nach einer Inkubation von 48 h wurden alle Ansätze mehrfach gegen 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,5 dialysiert, mit einem 20-fachem molaren Überschuss an bovinem Faktor Xa (3.1.7) versetzt und für weitere 24 h bei 4 °C inkubiert. Die Messung der Proteaseaktivität erfolgte bei 30 °C in einem Volumen von 200  $\mu\text{L}$  in Mikrotiterplatten an einem VersaMax *Microplate Reader* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), initiiert durch Zusatz von 400  $\mu\text{M}$  Pefachrome tPA. Die Zunahme der Absorption bei 405 nm wurde verfolgt und die initialen Anstiege mit der vom Hersteller bereitgestellten Software bestimmt.

Die Auswertung der Faltungs-*screens* und Bestimmung des Faktor-Haupteffektes erfolgte nach Armstrong *et al.* (1999):

$$FHE = \frac{\sum(+)-\sum(-)}{N} \quad \text{Gl. 3-1}$$

FHE: Faktor-Haupteffekt des Additives,  $\sum(+)$ : Summe der Aktivitäten (in  $\text{mAU}\cdot\text{min}^{-1}$ ) aller Ansätze mit dem jeweiligen Additiv,  $\sum(-)$ : Summe der Aktivitäten (in  $\text{mAU}\cdot\text{min}^{-1}$ ) aller Ansätze ohne das jeweilige Additiv, N: Anzahl der Bedingungen

Dabei kann der Faktor-Haupteffekt als Maß für den Einfluss des jeweiligen Additives auf die Faltungsausbeute gewertet werden.

### **Aktivitätsmessung von gereinigten Easter<sup>Xa</sup>**

Ausgehend von renaturiertem, gereinigtem Easter<sup>Xa</sup> (3.4.6) wurde die Kinetik der Zymogenaktivierung untersucht. Da eine Aktivierung mit Faktor Xa zu einer Spaltung zwischen R<sup>c15</sup>-I<sup>c16</sup> führt, kann deren Verlauf in Tris-Glycin-Gelen (3.4.1) verfolgt werden indem unter reduzierenden Bedingungen das aktivierte Easter<sup>Xa</sup> in die katalytische Domäne (30 kDa) und Clip-Domäne (12,5 kDa) aufgetrennt wird. Dazu wurde dem Protein boviner Faktor Xa in 20-fachem molaren Überschuss zugesetzt und der Ansatz auf Eis inkubiert. In definierten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und die weitere Spaltung durch Hitzeinkubation bei 95 °C in reduzierenden SDS-Probenpuffer gestoppt. Semi-quantitative Messungen der Aktivität erfolgten spektroskopisch an einem Spektrophotometer (Ultrospec 4000, Amersham Pharmacia, Freiburg) bei 30 °C in einer Küvette (Schichtdicke  $d = 1 \text{ cm}$ ). Dafür wurde den Aktivierungsansätzen zu entsprechenden Zeitpunkten je 2  $\mu\text{L}$  Easter<sup>Xa</sup> entnommen und in 198  $\mu\text{L}$  vortemperierten Reaktionspuffer (400  $\mu\text{M}$  Pefachrome tPA, 20 mM Tris/HCl, 0,3 M NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 % (v/v) Glycerol, pH 8,2) gegeben. Die Zunahme der Absorption wurde bei 405 nm verfolgt und aus den erhaltenen linearen Anstiegen ( $\Delta E$ ) die spezifische Aktivität von Easter<sup>Xa</sup> berechnet:

$$A_s = \frac{\Delta E}{\epsilon_{405} \cdot d \cdot c} \quad \text{Gl. 3-2}$$

$A_s$ : spezifische Aktivität in  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ,  $\Delta E$ : linearer Anstieg der Absorption in  $\text{min}^{-1}$ ,  $\epsilon_{405}$ : molarer Extinktionskoeffizient in  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $d$ : Schichtdicke in  $\text{cm}$ ,  $c$ : Proteinkonzentration im Reaktionsansatz in  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Da Faktor Xa eine messbare Aktivität gegenüber Pefachrome tPA aufweist, wurden alle spektroskopischen Messungen zusätzlich unter identischen Bedingungen, in Abwesenheit von Easter<sup>Xa</sup> durchgeführt, und die Primärdaten der Aktivierungsansätze um diese Hintergrundaktivität korrigiert.

### 3.4.9 Proteolytische Reifung von ProSpätzle-Varianten

Aktiviertes Easter<sup>Xa</sup> (3.4.8) wurde, nach 12 h Inkubation bei 4 °C mit Faktor Xa, in 50-fachem molaren Überschuss zu der jeweiligen ProSpz-Variante gegeben und bei 30 °C für 2 h in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 inkubiert. Für kinetische Analysen wurde zu definierten Zeitpunkten eine Probe entnommen, die Reaktion durch Zugabe von nicht-reduzierendem 3 x SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proteolyseprodukte anschließend mittels SDS-PAGE in Tris-Tricin-Gelen (3.4.1) aufgetrennt. Eine Quantifizierung erfolgte densitometrisch an einem Densitometer CD60 (Sarstedt, Nümbrecht) mit Hilfe der bereitgestellten Herstellersoftware. Für die Auswertung wurde ein kinetisches Modell einer irreversiblen Konsekutivreaktion angenommen (Gl. 3-3). Dabei wird die dimere Pro-Form (Pro) über ein halbseitig prozessiertes Intermediat (hc) zu der beidseitig prozessierten Cystin-Knoten-Domäne (CK) überführt.



$$c_{\text{Pro}} = c_{0,\text{Pro}} \cdot e^{-k_1 t} \quad \text{Gl. 3-4}$$

$$c_{\text{hc}} = \frac{k_1 \cdot c_{0,\text{Pro}}}{k_2 - k_1} \cdot (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad \text{Gl. 3-5}$$

$$c_{\text{CK}} = c_{0,\text{Pro}} - c_{0,\text{Pro}} \cdot e^{-k_1 t} - \frac{k_1 \cdot c_{0,\text{Pro}}}{k_2 - k_1} \cdot (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad \text{Gl. 3-6}$$

$k_1/k_2$ : Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung in  $\text{min}^{-1}$ ,  $c_{0,\text{Pro}}$ : Anfangskonzentration der Pro-Form in beliebiger Einheit,  $c_{\text{hc}}$ : Konzentration an halbseitig prozessierten Intermediat in beliebiger Einheit,  $c_{\text{CK}}$ : Konzentration an Cystin-Knoten-Domäne in beliebiger Einheit

Die Abnahme der Pro-Form kann über eine kinetische Reaktion 1. Ordnung beschrieben werden (Gl. 3-4), während die zeitliche Zu- und Abnahme der intermediären Spezies über Gl. 3-5 beschrieben wird (Frost und Pearson, 1964). Über den Masseerhaltungssatz ergibt sich die Datenanpassung für das Endprodukt (CK) einer Folgereaktion (Gl. 3-6).

### 3.4.10 Reinigung isolierter Domänen von Spätzle11.7

Die isolierten Domänen von Spz11.7 (Cystin-Knoten-Domäne (CK), 11.7Prodomäne (11.7PD)) wurden nach der Easter<sup>Xa</sup>-vermittelten Reifung von ProSpz11.7 gereinigt. Da nur die CK einen His<sub>6</sub>-tag am C-Terminus trägt ist eine Separierung von der 11.7PD durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie möglich. Dazu wurde prozessiertem Spz11.7 1,5 M GdmCl zugesetzt und auf eine 1 mL HisTrapHP-Säule mit 1,5 M GdmCl, 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 geladen. Durch einen linearen Gradienten von 1,5 M GdmCl, 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 bis 1,5 M GdmCl, 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 0,5 M Imidazol, pH 7,4 über 30 Säulenvolumen wurden die 11.7PD und CK eluiert. Die einzelnen Domänen wurden im Anschluss über eine Superdex200 10/300 GL in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 umgepuffert. Die Cystin-Knoten-Domäne konnte alternativ auch durch eine limitierte Proteolyse mit bovinem Trypsin (3.1.7) erhalten werden. Dazu wurde ProSpz11.7 mit Trypsin im Verhältnis 200 : 1 (w/w) für 2 h bei 4 °C inkubiert und die CK anschließend über das beschriebene Protokoll gereinigt.

## 3.5 Biophysikalische Methoden

### 3.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte durch Aufnahme eines UV-Absorptionsspektrums im Wellenlängenbereich von  $\lambda = 240 - 340$  nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke  $d = 1$  cm) an einem Spektrophotometer (Ultrospec 3300Pro, Amersham Pharmacia, Freiburg). Dabei wird die Absorption bei  $\lambda = 280$  nm maßgeblich durch drei Chromophore bestimmt: den Seitenketten von Tryptophan, Tyrosin und Cystin. Der theoretische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  für ein vollständig denaturiertes Protein in 6 M GdmCl wurde kalkuliert nach Gill und von Hippel (1989), für ein gefaltetes Protein in H<sub>2</sub>O nach Pace *et al.* (1995), unter Berücksichtigung des Oxidationszustandes der Cysteine (Tabelle 3-2). Die von Pace *et al.* empirisch gefundene Gleichung gewährt dabei nur für Tryptophan-haltige Proteine eine ausreichende Genauigkeit. Die Berechnung der molaren Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 3-7}$$

d: Schichtdicke in cm,  $\epsilon_{280}$ : molarer Extinktionskoeffizient in M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>

Wenn eine signifikante Absorption im Bereich von 320 - 340 nm zu verzeichnen war, wurde die Absorption bei 280 nm um den Streulichtanteil korrigiert nach Pace *et al.* (1995).

**Tabelle 3-2: Theoretische Extinktionskoeffizienten**

$M_r$ : relative Molekülmasse, ox/red: vollständig disulfidverbrücktes/reduziertes Protein, nat/denat: Protein in  $H_2O$ /in 6 M GdmCl

Konstrukt	$M_r$	$\epsilon_{280} (M^{-1}\cdot cm^{-1})$	$\epsilon_{280} (M^{-1}\cdot cm^{-1})$	$\epsilon_{280} (M^{-1}\cdot cm^{-1})$
	ox	red, denat	ox, denat	ox, nat
Ea <sup>Xa</sup>	42 426	55 900	56 860	59 330
Ea <sup>Xa</sup> $\Delta$ 75-Xa S <sup>c195</sup> A	40 946	55 900	56 740	59 205
ProSpz11.7	54 384,7	14 650	30 380	32 985
ProSpz8.19	71 335,4	18 490	38 060	41 925
CK	25 959	-	22 460	23 795
11.7PD	14 230,8	-	3 960	4 595
Toll ECD (deglyk.)	89 587,6	-	50 580	52 005

### 3.5.2 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links- und rechtszirkulär polarisiertem Licht chiraler Moleküle. Die chromophore Gruppe im Fern-UV-Bereich ( $\lambda = 190 - 250$  nm) ist dabei die inhärent achirale Peptidbindung, welche jedoch durch Sekundärstrukturelemente in einer asymmetrischen Umgebung fixiert ist. Das CD-Spektrum im Nah-UV-Bereich ( $\lambda = 250 - 320$  nm) resultiert aus der chiralen Umgebung von aromatischen Seitenketten und Disulfidbrücken und gibt daher Aussagen über die Tertiärstruktur von Proteinen. Als gebräuchliche Einheit für Fern-UV-CD-Spektren wird die mittlere residuelle Elliptizität  $[\Theta]_{MRW}$  verwendet (Schmid, 1997):

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N_{AS} \cdot 10} \quad \text{Gl. 3-8}$$

$[\Theta]_{MRW}$ : mittlere residuelle Elliptizität in  $\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ,  $\Theta$ : Elliptizität in mGrad, c: molare Proteinkonzentration in M, d: Schichtdicke in cm,  $N_{AS}$ : Anzahl der Aminosäuren des Proteins

Das Fern-UV-CD-Spektrum eines Proteins kann als eine Linearkombination der Spektren von individuellen Sekundärstrukturen beschrieben werden. Daher können durch eine Dekonvolution der Spektren die apparenten Sekundärstrukturanteile kalkuliert werden. Dafür wurde die frei erhältliche Software CDPro verwendet (Sreerama und Woody, 2000).

Nah-UV-CD-Spektren werden im Allgemeinen in Form des molaren Circular dichroismus  $\Delta\varepsilon$  in  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  angegeben, welcher sich über folgende numerische Beziehung aus der molaren Elliptizität  $[\Theta]$  ergibt (Sreerama und Woody, 2004):

$$\Delta\varepsilon = \frac{[\Theta]}{3298} \quad \text{Gl. 3-9}$$

$\Delta\varepsilon$ : molarer Circular dichroismus in  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $[\Theta]$ : Elliptizität in  $\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$

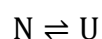
Alle Messungen wurden an einem J810 Spektralpolarimeter (Jasco, Gross-Umstadt) bei 20 °C, einer Bandbreite von 1 nm und *Scan*-Geschwindigkeit von 50  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$  durchgeführt. Die Spektren wurden 60-fach akkumuliert und um die Elliptizität des Puffers korrigiert.

### 3.5.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde genutzt um anhand der Fluoreszenzemissionsspektren von Proteinen Aussagen über die Lösungsmittelexposition der intrinsischen Fluorophore (Seitenketten von Trp und Tyr) zu treffen, sowie um chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge (3.5.4) zu messen. Alle Messungen wurden an einem FluoroMax-2 Spektralfluorimeter (Horiba, Bensheim) in einer Quarzglas-Fluoreszenzküvette (Hellma, Müllheim) bei 20 °C durchgeführt. Emissionsspektren wurden durch Anregung bei 280 nm oder 295 nm und einer Integrationszeit von 0,5 s in 1 nm-Schritten aufgezeichnet. Die Spektren wurden jeweils 5-fach akkumuliert und um die Eigenfluoreszenz des jeweiligen Puffers korrigiert.

### 3.5.4 Analyse chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge

Die konformationelle Stabilität eines Proteins beschreibt die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  für den Übergang eines gefalteten, nativen Proteins (N) in einen entfalteten, denaturierten Zustand (U). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge an Spz11.7 analysiert. Deren Auswertung wird im Folgenden näher erläutert. Für viele globuläre Proteine kann die Entfaltung über ein Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden, wobei die Konzentration an partiell gefalteten Intermediaten im Gleichgewicht vernachlässigbar klein ist (Pace, 1990):





Für eine thermodynamische Analyse ist es essentiell, dass die Entfaltungs- bzw. Faltungsreaktion das Gleichgewicht erreicht hat und die Entfaltung vollständig reversibel ist. Die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G$  ist dabei wie folgt definiert:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K \quad \text{Gl. 3-10}$$

$R$ : universelle Gaskonstante ( $8,314472 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $T$ : absolute Temperatur in K,  $K$ : Gleichgewichtskonstante der Entfaltungsreaktion

Unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells lässt sich die Gleichgewichtskonstante der Entfaltung aus den Stoffmengenanteilen von nativem ( $f_N$ ) und denaturiertem ( $f_U$ ) Protein, welche sich direkt aus den Übergangskurven ergeben, berechnen:

$$K = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f_U}{f_N} = \frac{y_N - y}{y - y_U} \quad \text{Gl. 3-11}$$

$y$ : gemessener physikalischer Parameter,  $y_N/y_U$ : Werte für  $y$ , charakteristisch für nativen (N) und denaturierten (U) Zustand

Als physikalischer Parameter zur Verfolgung der Entfaltungsreaktion wurde die intrinsische Proteinfluoreszenz verwendet. Für die Auswertung der experimentellen Daten wurde das lineare Extrapolationsmodell (Pace und Shaw, 2000) angewandt, welches eine lineare Abhängigkeit der thermodynamischen Stabilität  $\Delta G$  von der Denaturanskonzentration zugrunde legt:

$$\Delta G = \Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m \cdot [D] \quad \text{Gl. 3-12}$$

$$\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = [D]_{0,5} \cdot m \quad \text{Gl. 3-13}$$

$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ : Wert für  $\Delta G$  bei Abwesenheit von Denaturans in  $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $[D]$ : Denaturanskonzentration in M,  $m$ : Maß für Abhängigkeit von  $\Delta G$  von  $[D]$  (Kooperativität) in  $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ,  $[D]_{0,5}$ : Übergangsmittelpunkt in M

Der Übergangsmittelpunkt  $[D]_{0,5}$  ist dabei definiert als die Denaturanskonzentration, bei welcher der Anteil an nativen und denaturierten Protein gleich ist ( $\Delta G = 0$ ).

Es wurde weiterhin angenommen, dass eine lineare Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften des nativen und denaturierten Proteins ( $y_N$  und  $y_U$ ) von der Denaturationskonzentration besteht (Santoro und Bolen, 1988):

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot [D] \quad \text{Gl. 3-14}$$

$y_{N,U}^0$  : spektroskopische Eigenschaft des nativen bzw. denaturierten Proteins in Abwesenheit von Denaturans,  $m_{N,U}$ : Anstieg der prä- und post-Übergangs-Basislinie

Durch die Kombination der Gl. 3-10 - Gl. 3-14 und Umstellen ergibt sich eine Beziehung, welche verwendet wurde, um mittels nicht-linearer Regression die erhaltenen Primärdaten global anzupassen (Santoro und Bolen, 1988):

$$y = \frac{(y_N^0 + m_N \cdot [D]) + (y_U^0 + m_U \cdot [D]) \cdot \{\exp[m \cdot ([D] - [D]_{0,5})/R \cdot T]\}}{1 + \{\exp[m \cdot ([D] - [D]_{0,5})/R \cdot T]\}} \quad \text{Gl. 3-15}$$

Aus den erhaltenen Werten für den Übergangsmittelpunkt  $[D]_{0,5}$  und der Kooperativität  $m$  kann mittels Gl. 3-13 die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G(H_2O)$  berechnet werden.

Im Fall von dimeren (oder oligomeren) Proteinen muss ein erweitertes Entfaltungsmodell betrachtet werden, da eine zusätzliche Stabilisierung der nativen Konformation über Quartärstrukturelemente erfolgt. Dabei können thermodynamisch zwei Extreme für die Entfaltung von Dimeren angenommen werden (Rumfeldt *et al.*, 2008):



Wird die konformationelle Stabilität eines Dimers maßgeblich über Sekundär- und Tertiärinteraktionen bestimmt ( $K_1 \gg K_2$ ), können im Gleichgewicht monomere Intermediate mit nativ-ähnlicher Faltung auftreten (a). Sind Quartärkontakte für den Erhalt der nativen Faltung essentiell ( $K_1 \ll K_2$ ), führt die Dissoziation zur vollständigen Entfaltung, wobei gefaltete monomere Intermediate nicht akkumulieren können und das Entfaltungsmodell sich zu einem dimeren Zwei-Zustands-Modell (b) reduziert (Neet und Timm, 1994). Da es im Verlauf der Entfaltung zu einer Änderung der Molekularität kommt, zeigt die Gleichgewichtskonstante eine Abhängigkeit von der totalen Monomerkonzentration  $[P_t]$ :

$$K = \frac{[U]^2}{[N_2]} = 2 \cdot [P_t] \cdot \frac{f_U^2}{(1 - f_U)} \quad \text{Gl. 3-16}$$

Unter den Annahmen, dass sich die Abhängigkeit der freien Entfaltungsenthalpie und der Einfluss des Denaturans auf Dissoziations- und Entfaltungsreaktionen gleichermaßen linear verhalten, kann  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  durch Extrapolation der im Übergangsbereich berechneten Werte von  $\Delta G$  auf Standardbedingungen (Gl. 3-12) erhalten werden (Neet und Timm, 1994).

Durch Umstellen von Gl. 3-16 und Lösen der quadratischen Gleichung ergibt sich weiterhin:

$$f_U = \left( \frac{K}{4 \cdot [P_t]} \right) \cdot \left[ \sqrt{1 + \frac{8 \cdot [P_t]}{K}} - 1 \right] \quad \text{Gl. 3-17}$$

In Kombination mit Gl. 3-10 und Gl. 3-12 lässt sich eine Beziehung aufstellen, mit welcher die Entfaltungskurven nach einem dimeren Zwei-Zustands-Modell, in Abhängigkeit der Denaturans- und Proteinkonzentration, global angepasst werden können (Mok *et al.*, 1996):

$$y = y_N - (y_N - y_U) \cdot \frac{B}{4 \cdot [P_t]} \cdot \left( \sqrt{1 + 8 \cdot [P_t]/B} - 1 \right) \quad \text{Gl. 3-18}$$

$$B = \exp[(m \cdot [D] - \Delta G(\text{H}_2\text{O})/R \cdot T)] \quad \text{Gl. 3-19}$$

Da für die Berechnung von  $\Delta G$  (Gl. 3-10) eine Normierung auf die Konzentration des Standardzustandes ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) erfolgt, bezieht sich  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  nach dem dimeren Zwei-Zustands-Modell auf eine Konzentration von 1 M für jeden Reaktanden.

Alle Übergangskurven wurden in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 mit variierender Denaturanskonzentration (GdmCl oder Harnstoff) bei 20 °C an einem FluoroMax-2 Spektralfluorimeter (Horiba, Bensheim) und einer Anregungswellenlänge von 280 bzw. 295 nm gemessen. Die Fluoreszenzemission bei  $\lambda = 320 \text{ nm}$  wurde für jeden Messpunkt 60 s, in 0,5 s-Intervallen, und einer Integrationszeit von 0,25 s aufgezeichnet, gemittelt und mittels einer Kalibriergeraden um die Puffer- bzw. Denaturanseigenfluoreszenz korrigiert. Eine Korrektur der Denaturanskonzentration erfolgte durch Bestimmung des Brechungsindex nach Pace und Scholz (1997). Zur Einstellung des Gleichgewichtes wurden alle Proben zuvor 24 h bei 20 °C inkubiert. Zum Vergleich verschiedener Übergangskurven wurden diese entsprechend dem Anteil an nativem Protein normiert und über eine modifizierte Gl. 3-15 angepasst.

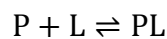
### 3.5.5 Isothermale Titrationskalorimetrie

Jede chemische Reaktion oder physikalische Zustandsänderung ist mit einer Wärme- oder Enthalpieänderung verbunden, was die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) zu einer universalen Methode für thermodynamische Charakterisierungen macht. Die im isobaren Kalorimeter vom System aufgenommene (endothermer Prozess) oder abgegebene (exothermer Prozess) Wärme entspricht dabei dem Produkt der aufgetretenen Stoffmengenänderung und der Reaktionsenthalpie:

$$Q = \left( \frac{\partial H}{\partial n} \right)_{T,p} \cdot \Delta n \quad \text{Gl. 3-20}$$

Der allgemeine Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Kalorimeters entspricht einem Kompensations-Kalorimeter, bei welchem eine adiabatisch abgeschirmte Referenz- und Messzelle durch ein elektrisches Heizelement auf eine konstante Temperatur (isothermal) geheizt bzw. gekühlt werden. Die in der Messzelle freigesetzte oder aufgenommene Reaktionswärme wird dabei durch eine zeitlich veränderliche Heizleistung ( $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ ) kompensiert, um eine mit der Referenzzelle identische Temperatur aufrecht zu erhalten (Freyer und Lewis, 2008).

ITC-Messungen ermöglichen dabei eine komplette thermodynamische Quantifizierung einer Bindungsreaktion durch Bestimmung der Assoziationskonstante  $K_A$  (und damit der freien Bindungsenthalpie  $\Delta_B G$ ), der Stöchiometrie  $n$  und der Bindungsenthalpie  $\Delta_B H$ . Wird eine einfache Protein-Ligand-Interaktion betrachtet, ergibt sich die Gleichgewichts-assoziationskonstante  $K_A$  aus:



$$K_A = \frac{[PL]_{\text{eq}}}{[P]_{\text{eq}} \cdot [L]_{\text{eq}}} \quad \text{Gl. 3-21}$$

Über den Masseerhaltungssatz (Gl. 3-22 und Gl. 3-23) kann eine Beziehung des Stoffumsatzes zu den bekannten Ausgangskonzentrationen hergestellt werden:

$$[P]_0 = [P]_{\text{eq}} + [PL]_{\text{eq}} \quad \text{Gl. 3-22}$$

$$[L]_0 = [L]_{\text{eq}} + [PL]_{\text{eq}} \quad \text{Gl. 3-23}$$

$$K_A = \frac{[PL]_{\text{eq}}}{([P]_0 - [PL]_{\text{eq}}) \cdot ([L]_0 - [PL]_{\text{eq}})} \quad \text{Gl. 3-24}$$

Durch Umformen von Gl. 3-24 und Lösen der quadratischen Polynomfunktion, wobei nur eine Lösung physikalisch sinnvoll ist, ergibt sich:

$$[\text{PL}]^2 + (-[\text{P}]_0 - [\text{L}]_0 - K_A^{-1}) \cdot [\text{PL}] + [\text{P}]_0 \cdot [\text{L}]_0 = 0 \quad \text{Gl. 3-25}$$

$$[\text{PL}] = \frac{1}{2}([\text{P}]_0 + [\text{L}]_0 + K_A^{-1}) - \frac{\sqrt{([\text{P}]_0 + [\text{L}]_0 + K_A^{-1})^2 - 4 \cdot ([\text{P}]_0 \cdot [\text{L}]_0)}}{2} \quad \text{Gl. 3-26}$$

Wird von Gl. 3-26 die 1. Ableitung  $d[\text{PL}]/d[\text{L}]_0$  gebildet erhält man eine Beziehung, welche die Änderungen der Konzentration an Komplex  $[\text{PL}]$  in Abhängigkeit der in jedem Titrationsschritt erhöhten Ligandenkonzentration  $[\text{L}]_0$  beschreibt (Blandamer, 1998):

$$\frac{d[\text{PL}]}{d[\text{L}]_0} = \frac{1}{2} + \frac{\left[1 - \frac{1}{2} \cdot \left\{1 + \frac{1}{K_A \cdot [\text{P}]_0}\right\} - \frac{[\text{L}]_0}{2 \cdot [\text{P}]_0}\right]}{\sqrt{\left[\left\{\frac{[\text{L}]_0}{[\text{P}]_0}\right\}^2 - \frac{2[\text{L}]_0}{[\text{P}]_0} \cdot \left\{1 - \frac{1}{K_A \cdot [\text{P}]_0}\right\} + \left\{1 + \frac{1}{K_A \cdot [\text{P}]_0}\right\}^2\right]}} \quad \text{Gl. 3-27}$$

Wenn der Reaktand  $[\text{P}]$  eine multivalente Spezies, mit  $n$  identischen Bindungsstellen darstellt, wird  $[\text{P}]_0$  ersetzt durch  $n \cdot [\text{P}]_0$ , was die Konzentration an Bindungsstellen darstellt. Durch Umformulierung von Gl. 3-20 und Division durch  $d[\text{L}]_0$  erhält man die Kerngleichung der Titrationskalorimetrie:

$$\frac{dQ}{d[\text{L}]_0} = \left(\frac{\partial H}{\partial n_{\text{PL}}}\right)_{T,p} \cdot \left(\frac{d[\text{PL}]}{d[\text{L}]_0}\right)_{[\text{P}]_0} \cdot V = \Delta_B H \cdot \frac{d[\text{PL}]}{d[\text{L}]_0} \cdot V \quad \text{Gl. 3-28}$$

$\Delta_B H$ : Bindungsenthalpie in  $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $V$ : Reaktionsvolumen (Volumen der Messzelle)

Die Kombination der Gl. 3-27 und Gl. 3-28 liefert somit über nicht-lineare Regression eine komplette Beschreibung einer Bindungsisothermen und ermöglicht die Bestimmung der Bindungsstöchiometrie  $n$ , der Bindungsenthalpie  $\Delta_B H$  und der Assoziationskonstante  $K_A$  (und damit  $\Delta_B G$ ). Die Bindungsentropie  $\Delta_B S$  ergibt sich über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung:

$$\Delta_B G = \Delta_B H - T \cdot \Delta_B S \quad \text{Gl. 3-29}$$

Es ist dabei zu beachten, dass nur apparente Bindungsenthalpien  $\Delta_B H_{\text{app}}$  erhalten werden, da die gemessene Wärme sowohl die für die Bindungsreaktion spezifische Wärme als auch Wärmen unspezifischer Prozesse (Verdünnungswärmen, Ionisationswärmen des Puffers etc.) enthält.

Eine Korrektur um die Pufferionisationswärme  $\Delta_{\text{ion}}H_{\text{Puffer}}$  kann durch Messung der apparenten Bindungsenthalpie  $\Delta_{\text{B}}H_{\text{app}}$  in verschiedenen Puffern erfolgen. Tritt bei der Bindungsreaktion eine Änderung in der Anzahl gebundener Protonen auf, ergibt sich die gemessene Bindungsenthalpie zu (Baker und Murphy, 1996):

$$\Delta_{\text{B}}H_{\text{app}} = \Delta_{\text{B}}H_0 + N_{\text{H}^+} \cdot \Delta_{\text{ion}}H_{\text{Puffer}} \quad \text{Gl. 3-30}$$

$\Delta_{\text{B}}H_{\text{app}}$ : gemessene Bindungsenthalpie in  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $N_{\text{H}^+}$ : Änderung der Zahl gebundener Protonen,  $\Delta_{\text{ion}}H_{\text{Puffer}}$ : Ionisationsenthalpie des Puffer,  $\Delta_{\text{B}}H_0$ : Bindungsenthalpie in Abwesenheit von Pufferionisationswärmern in  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$

Die Präzision, mit welcher eine Bestimmung von  $\Delta_{\text{B}}H$  und  $K_{\text{A}}$  erfolgt, hängt maßgeblich von dem Parameter  $C$  ab (Wiseman *et al.*, 1989):

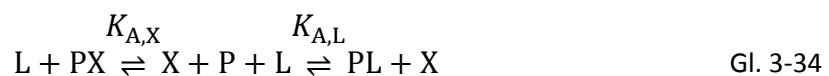
$$C = K_{\text{A}} \cdot [\text{P}]_0 \quad \text{Gl. 3-31}$$

Für hochaffine Interaktionen ( $C \rightarrow \infty$ ) sind dabei  $\Delta_{\text{B}}H$  und  $n$  mit guter Genauigkeit messbar, wohingegen  $K_{\text{A}}$  nicht durch direkte ITC-Experimente bestimmt werden kann, da sich die Bindungsisotherme (siehe Anhang 8.3) mit steigendem  $C$  einer Stufenfunktion annähert (Broecker *et al.*, 2011; Biswas und Tsodikov, 2010).

Durch die methodische Entwicklung der Verdrängungstitration, bei welchem ein Ligand, durch einen zweiten gebundenen Liganden, kompetitiv in seiner Bindung inhibiert wird, kann diese Limitierung der Assoziationskonstante auf  $10^3 < K_{\text{A}} < 10^8 \text{ M}^{-1}$  umgangen werden (Sigurskjold, 2000). Dabei werden zwei mögliche Gleichgewichtsreaktionen betrachtet:



Unter der Voraussetzung, dass im Gleichgewicht kein ternärer Komplex  $[\text{PLX}]$  vorkommt und  $[\text{L}]$  (hochaffiner Ligand) und  $[\text{X}]$  (niederaffiner Ligand) folglich um eine identische Bindungsstelle konkurrieren, ergibt sich makroskopisch eine apparente Assoziationskonstante und  $\Delta_{\text{B}}H_{\text{obs}}$  für die Bindung von  $[\text{L}]$  in Anwesenheit von  $[\text{X}]$  (Hu und Eftink, 1994):



$$K_{A,L,obs} = \frac{[PL]_{eq}}{([P]_{eq} + [PX]_{eq}) \cdot [L]_{eq}} = \frac{K_{A,L}}{(1 + K_{A,X} \cdot [X]_{eq})} \quad \text{Gl. 3-35}$$

$$\Delta_B H_{obs} = \Delta_B H_L - \frac{\Delta_B H_X \cdot [X]_{eq} \cdot K_{A,X}}{1 + K_{A,X} \cdot [X]_{eq}} \quad \text{Gl. 3-36}$$

Aus (Gl. 3-35) wird ersichtlich, dass, unter Kenntnis der Assoziationskonstante  $K_{A,X}$ , durch Variation der Konzentration des kompetitiven Liganden [X] eine apparente Reduktion von  $K_{A,L}$  zu einer messtechnisch zugänglichen Größenordnung möglich ist. Die mathematischen Grundlagen für kompetitive Bindungsmodelle lieferten Wang (1995), Sigurskjold (2000) und Nielsen *et al.* (2003).

Isothermale Titrationskalorimetrie bietet weiterhin die Möglichkeit, durch Bestimmung von  $\Delta_B H$  bei verschiedenen Temperaturen, die Änderung der isobaren Wärmekapazität  $\Delta_B C_p$  für die Komplexbildung zu berechnen:

$$\Delta_B C_p = \frac{d(\Delta_B H)}{dT} = T \cdot \frac{d(\Delta_B S)}{dT} \quad \text{Gl. 3-37}$$

Die Änderung der Wärmekapazität der Entfaltung  $\Delta_D C_p$  korreliert linear mit der Änderung der lösungsmittlexponierten Oberfläche  $\Delta ASA$  (*accessible surface area*) (Freire, 1994; Myers *et al.*, 1995). Aus dem  $\Delta_B C_p$  lassen sich daher auch Rückschlüsse über  $\Delta ASA$  und Konformationsänderungen bei Bindungsreaktionen ziehen (Spolar und Record, Jr., 1994; Jelesarov und Bosshard, 1999). Zwischen  $\Delta ASA$  und  $\Delta_D C_p$  besteht folgender empirischer Zusammenhang (Myers *et al.*, 1995).

$$\Delta_D C_p = 0,19 \cdot (\Delta ASA - 864 \cdot N_{Cys}) \quad \text{Gl. 3-38}$$

$\Delta_D C_p$ : Änderung der Wärmekapazität der Entfaltung in  $\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ,  $N_{Cys}$ : Anzahl der Disulfidbrücken,  $\Delta ASA$ : Änderung der lösungsmittlexponierten Oberfläche in  $\text{\AA}^2$

Alle kalorimetrischen Bindungsstudien wurden an einem VP-ITC Mikrokolorimeter (Microcal LLC, Northampton, MA, USA) bei jeweils angegebener Temperatur in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 oder 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt. Die Reaktanden wurden zweimal bei 4 °C gegen den jeweiligen Messpuffer dialysiert.

In typischen Experimenten wurden, in 300 s-Intervallen, 8 - 12  $\mu\text{L}$  Titrant bei einer Rührgeschwindigkeit von 307 Umdrehungen pro Minute zu der Analytlösung titriert. Alle Messungen wurden um die Verdünnungswärme des Titranten durch Referenzmessung mit Puffer korrigiert. Die Datenauswertung erfolgte mit dem bereitgestellten Software-Paket ORIGIN-7 (Microcal LLC).

### 3.5.6 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Alle NMR-Messungen wurden an einem Bruker Avance-III Spektrometer mit einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz und einem QXI-Raumtemperaturkopf durchgeführt. Die Datenaufnahme und -prozessierung der eindimensionalen Protonenspektren erfolgte mit der Bruker Software TopSpin 2.3. Die zweidimensionalen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  fHSQC-Spektren (*fast heteronuclear single quantum coherence*) wurden mit TopSpin2.3 aufgenommen, mit NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) prozessiert und mit NMRView (Johnson und Blevins, 1994) dargestellt. Die eindimensionalen Protonenspektren der 11.7Prodomäne wurden in 20 mM  $\text{NaHPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ , 20 mM NaCl, 5 % (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7,4 bei 25 °C aufgenommen. Alle Spektren wurden 1024-fach akkumuliert und gemittelt. Die Wasserunterdrückung erfolgte durch Vorsättigung auf Wasserresonanz und der WATERGATE 3-9-19 Sequenz (*water suppression by gradient tailored excitation*) (Piotto *et al.*, 1992). Für die zweidimensionalen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  fHSQC-Spektren wurde  $^{15}\text{N}$ -markiertes Spz11.7 (3.3.1) in 20 mM  $\text{NaHPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ , 20 mM NaCl, 5 % (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7,4 eingesetzt. In einem Titrationsexperiment wurde  $^{15}\text{N}$ -markierte 11.7PD vorgelegt und mit unmarkierter Cystin-Knoten-Domäne titriert. Analog dazu wurde ein reverses Experiment mit  $^{15}\text{N}$ -markierter Cystin-Knoten-Domäne und unmarkierter 11.7PD durchgeführt. Es wurden für jeden Titrationsschritt jeweils 1024 ( $^1\text{H}$ ) x 256 ( $^{15}\text{N}$ ) Punkte mit jeweils 8 Akkumulationen aufgenommen. Alle NMR-Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Michael Kovermann von der Abteilung Biophysik (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jochen Balbach) durchgeführt und ausgewertet.



### 3.5.7 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation ermöglicht die Analytik hydrodynamischer Eigenschaften von Proteinen und Proteinkomplexen sowie die Bestimmung von Molekülmassen. Dabei unterscheidet man zwei grundlegende Methoden - Sedimentationsgeschwindigkeit und Sedimentationsgleichgewicht. Bei der Sedimentationsgeschwindigkeit wird die sich im Schwerefeld verändernde Konzentrationsverteilung als Funktion der radialen Position und der Zeit gemessen, was eine Berechnung des Sedimentations-, Reibungs- und Diffusionskoeffizienten des Makromoleküls erlaubt. Weiterhin können Informationen über Assoziationsverhalten, Stöchiometrie und Gleichgewichtskonstante erhalten werden (Stafford, 2003).

Der Sedimentationskoeffizient ist dabei über die Svedberg-Gleichung definiert:

$$s_{\text{app}} \equiv \frac{u}{\omega^2 \cdot r} = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{N_A \cdot f} \quad \text{Gl. 3-39}$$

$s_{\text{app}}$ : apparenter Sedimentationskoeffizient in S ( $10^{-13}$  s),  $u$ : radiale Sedimentationsgeschwindigkeit,  $\omega$ : Winkelgeschwindigkeit,  $r$ : Radius,  $M$ : Molekülmasse,  $N_A$ : Avogadro-Konstante,  $\rho$ : Dichte der Lösung,  $f$ : Reibungskoeffizient,  $\bar{v}$ : partielles spezifisches Volumen des Makromoleküls

Der Reibungskoeffizient eines sphärischen, kompakten Proteins kann durch die Stokes-Gleichung beschrieben werden:

$$f_0 = 6\pi \cdot \eta \cdot R_0 \quad \text{Gl. 3-40}$$

$f_0$ : Reibungskoeffizient eines sphärischen Partikel,  $\eta$ : Viskosität der Lösung,  $R_0$ : sphärischer Radius

Durch Kombination der Svedberg-Gleichung (Gl. 3-39) und Stokes-Gleichung (Gl. 3-40) und Substitution aller Konstanten ergibt sich eine Beziehung zur Berechnung eines theoretischen Sedimentationskoeffizienten für ein globuläres Protein in Wasser bei 20 °C (Lebowitz *et al.*, 2002):

$$s_{\text{Sphäre}} = 0,012 \cdot \frac{M^{2/3} \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{\bar{v}^{1/3}} \quad \text{Gl. 3-41}$$

Der  $s_{\text{Sphäre}}$ -Wert stellt dabei den maximalen Sedimentationskoeffizienten dar, für ein Protein mit gegebener Molekülmasse, unter Annahme einer kompakten sphärischen Form und einem minimalen Reibungskoeffizienten  $f_0$ .

Eine Korrektur des experimentellen  $s_{app}$ -Wert auf die Standardbedingung (Wasser, 20 °C), um vergleichende Aussagen bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen treffen zu können, ergibt sich über:

$$s_{20,W} = s_{T,P} \cdot \left( \frac{\eta_{T,P}}{\eta_{20,W}} \right) \cdot \frac{(1 - \bar{v} \cdot \rho)_{20,W}}{(1 - \bar{v} \cdot \rho)_{T,P}} \quad \text{Gl. 3-42}$$

Die Indizes T, P definieren die Werte bei der Temperatur T und den vorliegenden Pufferbedingungen, die Standardbedingung (20 °C, Wasser) ist indiziert mit 20, W.

Das Verhältnis des maximal möglichen zu dem gemessenen s-Wert,  $s_{Sphäre}/s_{20,W}$ , ist dabei gleich dem Verhältnis des experimentellen und minimalen Reibungskoeffizienten  $f/f_0$ . Dies gibt die maximale Formasymmetrie wieder (Lebowitz *et al.*, 2002; Stafford, 2003).

Bei einem Sedimentationsgleichgewicht stellt sich im Schwerfeld eine zeitlich stabile Konzentrationsverteilung innerhalb der Probenzelle ein, bei welcher der Sedimentationsfluss durch die Diffusion ausbalanciert wird (Laue, 2001). Die Verteilung wird dabei lediglich von der Molekülmasse des Makromoleküls bestimmt, wodurch bei der Datenauswertung keinerlei Korrekturen bezüglich der Molekülform nötig sind. Im Gleichgewicht ergibt sich eine exponentielle Konzentrationsverteilung, und für eine Mischung nicht-interagierender Moleküle n ist das gemessene Signal als Funktion der radialen Position  $y(r)$  wie folgt definiert (Lebowitz *et al.*, 2002):

$$y(r) = \sum_n c_{n,0} \cdot \varepsilon_n \cdot d \cdot \exp \left[ \left( \frac{M_n \cdot (1 - \bar{v}_n \cdot \rho) \cdot \omega^2}{2 \cdot R \cdot T} \right) \cdot (r^2 - r_0^2) \right] \quad \text{Gl. 3-43}$$

$c_{n,0}$ : Konzentration der Spezies n am Referenzpunkt  $r_0$ ,  $M_n$ : Molekülmasse,  $\varepsilon_n$ : Extinktionskoeffizient,  $\bar{v}_n$ : partielles spezifisches Volumen der Spezies n, d: Schichtdicke

Die Molekülmasse der isolierten Prodomäne von Spz11.7 wurde durch eine Messung des Sedimentationsgleichgewichtes mit 20  $\mu$ M Spz11.7PD in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 bei 18 000 rpm und 20 °C über 22 h bestimmt. Der Sedimentationskoeffizient  $s_{app}$  wurde bei 40 000 rpm, durch Aufnahme der Konzentrationsprofile in Intervallen von 10 Minuten, gemessen.

Die Analyse des Monomer-Dimer-Gleichgewichtes von Toll ECD erfolgte durch Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Bei einem polydispersen, interagierenden System entspricht  $s_{app}$  dem konzentrationsgewichteten Mittelwert der Sedimentationskoeffizienten der einzelnen Spezies (Stafford, 2003). In dem zugrunde liegenden Modell ergibt sich der gemessene apparente Sedimentationskoeffizient wie folgt:

$$2M \rightleftharpoons D \qquad K_D = \frac{[M]_{eq}^2}{[D]_{eq}} \qquad \text{Gl. 3-44}$$

$$s_{app} = \frac{\sum_{i=1}^N s_{app,i} \cdot c_i}{\sum_{i=1}^N c_i} = \frac{s_{app,M} \cdot [M]_{eq} + s_{app,D} \cdot [D]_{eq}}{[M]_{eq} + [D]_{eq}} \qquad \text{Gl. 3-45}$$

Die Konzentration der freien Monomere und Dimere im Gleichgewicht ergibt sich aus Gl. 3-44, dem Masseerhaltungssatz und der Gesamtproteinkonzentration  $[P_t]$  zu:

$$[M]_{eq} = \frac{-K_D + \sqrt{K_D^2 + 8 \cdot [P_t] \cdot K_D}}{4} \qquad \text{Gl. 3-46}$$

$$[D]_{eq} = \frac{4 \cdot [P_t] + K_D - \sqrt{K_D^2 + 8 \cdot [P_t] \cdot K_D}}{8} \qquad \text{Gl. 3-47}$$

Durch Kombination der Gl. 3-45, Gl. 3-46 und Gl. 3-47 konnten die erhaltenen Werte für  $s_{app}$  durch nicht-lineare Regression angepasst und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  für die Dimerisierungsreaktion (Gl. 3-44) bestimmt werden. Die Experimente wurden in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,005 % (w/v) NP40, pH 7,5 bei 40 000 rpm und 20 °C durchgeführt. Weiterhin wurden Titrationsexperimente bei variierenden Konzentrationen an Toll ECD und Cystin-Knoten-Domäne durchgeführt und sowohl Sedimentationsgeschwindigkeiten als auch -gleichgewichte bei 20 °C und 40 000 rpm beziehungsweise 6 000 rpm aufgezeichnet. Alle Ultrazentrifugationsexperimente wurden an einer Optima XL-A Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld), ausgestattet mit einem An50Ti-Rotor und Doppelsektorzellen, durchgeführt. Die Datenaufnahme und Auswertung wurden freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie von der Abteilung Technische Biochemie übernommen.

### 3.5.8 Massenspektrometrie

Die zu analysierenden Proteinproben wurden mittels ZipTip-C4 Pipettenspitzen (Merck Millipore, Darmstadt) entsprechend dem Herstellerprotokoll entsalzt, wobei die Elution mit 70 % (v/v) Ameisensäure erfolgte. Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI-MS) wurden an einem LTQ orbitrap XL *mass spectrometer* (ThermoFisher Scientific, Schwerte) aufgenommen. Die Spektrendekonvolution erfolgte mit Hilfe der vom Hersteller bereitgestellten Software XCalibur (Version 2.0.7, ThermoFisher Scientific). MS/MS-Daten wurden mittels *collision induced dissociation* (CID)-Experimenten erhalten und Fragmentationen manuell zugeordnet. Alle Massenspektren wurden freundlicherweise von Dr. Christian Ihling von der Abteilung Pharmazeutische Chemie & Bioanalytik (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andrea Sinz) aufgenommen und ausgewertet.



## 4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit umfasst biophysikalische Untersuchungen an drei verschiedenen Proteinen der Signalwege der dorsal-ventral-Entwicklung und angeborenen Immunantwort aus *D. melanogaster* - Easter, Spätzle und Toll (Hoffmann, 2003; Moussian und Roth, 2005). Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse können daher in drei grundlegende Teilaspekte untergliedert werden.

### 4.1 Charakterisierung von Easter<sup>Xa</sup>

#### 4.1.1 Rekombinante Expression von Easter<sup>Xa</sup>

Für die heterologe Expression und folgende *in vitro*-Renaturierung wurde die Zymogenform des Konstruktes Easter<sup>Xa</sup> verwendet, dessen Klonierung und Mutagenese in vorangegangenen Arbeiten beschrieben wurde (Sieg, 2008; Hoffmann, 2009). In dieser Proteinvariante wurde N-terminal der Zymogenaktivierungsstelle R<sup>c15</sup>-I<sup>c16</sup> die Sequenz IEG<sup>c14</sup> eingefügt (Abbildung 4-1). Dadurch wurde eine Spaltstelle für bovinen Faktor Xa generiert, welche somit für eine proteolytische Aktivierung der Zymogenform von Easter<sup>Xa</sup> genutzt werden kann.

Die Genexpression von Easter<sup>Xa</sup> erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen (3.3.1) ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies*. Um den Verlauf der Expression zu verfolgen, wurden vor der Induktion mit IPTG und nach 4 h Expression Proben entnommen und die Zellen durch Hitzeinkubation in reduzierendem SDS-Ladepuffer bei 95 °C lysiert. Die Analyse des Zelllysates mittels SDS-PAGE zeigte eine deutliche Überexpressionsbande bei einer apparenten Molekülmasse von ungefähr 46 kDa (Abbildung 4-2 (A)).



**Abbildung 4-1: Aufbau der Variante Easter<sup>Xa</sup>.**

Der Domänenaufbau von Easter (links) ist schematisch dargestellt (vgl. Abbildung 1-3) mit der Zymogenaktivierungsstelle R<sup>c15</sup>-I<sup>c16</sup>, der katalytischen Triade (H<sup>c57</sup>, D<sup>c102</sup>, S<sup>c195</sup>) und dem 75-loop (cyan). Die Variante Easter<sup>Xa</sup> (rechts) enthält an der Zymogenaktivierungsstelle eine inserierte Aminosäuresequenz (rot) zur Generierung einer Spaltsequenz für Faktor Xa.

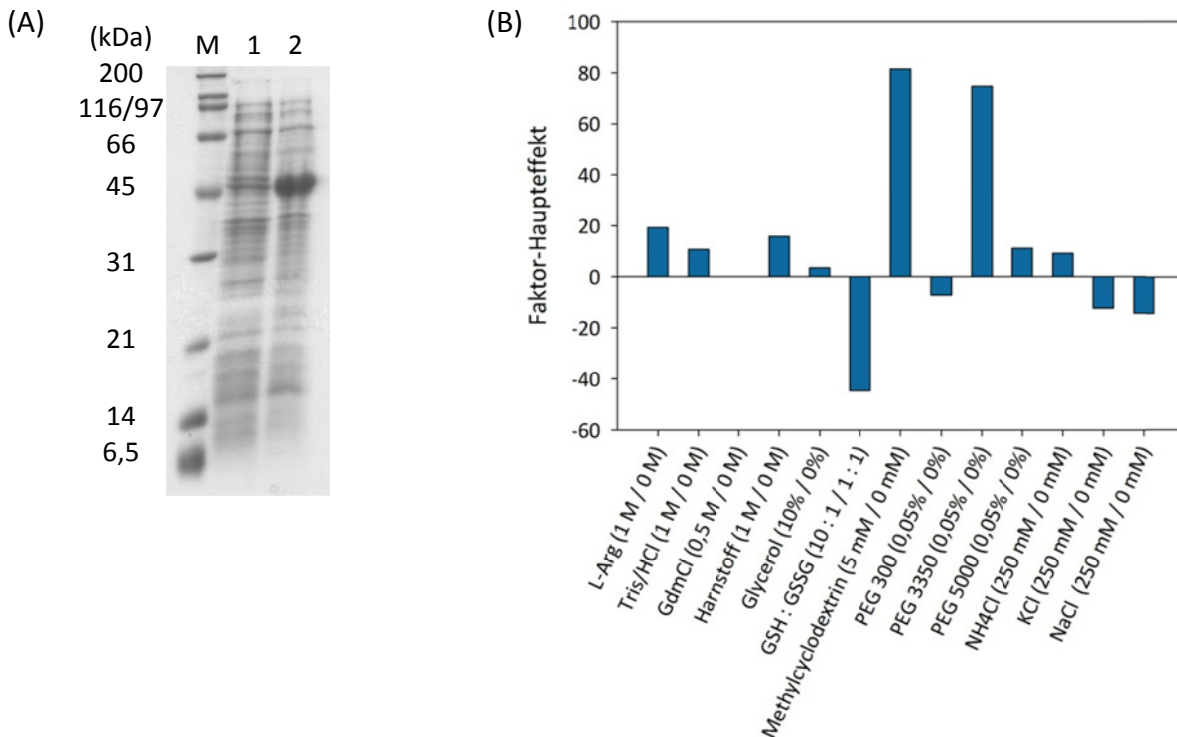
Durch einen *Western Blot* (3.4.2), zur Detektion des His<sub>6</sub>-tags, konnte die Bande bei 46 kDa eindeutig als vollständig translatiertes Easter<sup>Xa</sup> identifiziert werden, da sich der His<sub>6</sub>-tag am C-Terminus des Proteins befindet.

Bei der Genexpression wurden durchschnittlich ~ 3 g Zellfeuchtmasse pro Liter Kulturmedium erhalten. Die anschließende *inclusion body*-Präparation (3.4.4) und denaturierende Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie (3.4.5) resultierte in homogenem, denaturiertem Protein mit einer Ausbeute von ~ 35 mg Easter<sup>Xa</sup> pro Liter Kulturmedium (Daten nicht gezeigt), welches für die *in vitro*-Renaturierung (3.4.5) eingesetzt wurde.

#### 4.1.2 Renaturierung und Reinigung von Easter<sup>Xa</sup>

Zu Beginn der Arbeit wurde ein teilfaktorieller Faltungs-*screen* (3.4.8) nach geeigneten Pufferbedingungen für die Renaturierung durchgeführt. Dazu wurden pro Faltungs-*screen* in jeweils 16 verschiedenen Bedingungen je 12 Additive, entsprechend dem Protokoll von Armstrong *et al.* (1999), variiert. Ein idealer und sensitiver Messparameter der Faltungsausbeute eines Proteins stellt dessen enzymatische Aktivität dar. Im Falle von Easter<sup>Xa</sup> wurde das Peptidsubstrat Pefachrome tPA (3.1.7) ausgewählt. Nach Zugabe von bovinem Faktor Xa, welcher Easter<sup>Xa</sup> von der zymogenen Form in seine aktive Konformation überführt, konnte in den einzelnen Ansätzen eine Proteaseaktivität (korrigiert um die Hintergrundaktivität von zugesetztem Faktor Xa) gegenüber Pefachrome tPA gemessen werden. Weiterhin wurde in Kontrollreaktionen ohne Faktor Xa keinerlei Aktivität nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), sodass davon ausgegangen werden kann, dass renaturiertes Easter<sup>Xa</sup> in seinem zymogenen Zustand vorlag. Aus den erhaltenen Primärdaten wurde nach Gl. 3-1 der Faktor-Haupteffekt jedes getesteten Additivs kalkuliert, wodurch Rückschlüsse auf einen positiven bzw. negativen Einfluss auf die Renaturierungsausbeute erhalten werden konnten. Insbesondere die Additive Methyl- $\beta$ -cyclodextrin und Polyethylenglykol 3350 hatten einen positiven Effekt auf die Renaturierung, wohingegen sich stark reduzierende Bedingungen des eingesetzten Redoxsystems eher negativ auswirkten (Abbildung 4-2 (B)).

In dem finalen Herstellungsprozess wurde gereinigtes denaturiertes Easter<sup>Xa</sup> (4.1.1) im 4 L-Maßstab nach der Methode der schnellen Verdünnung in 0,1 M Tris/HCl, 0,5 M L-Arg, 2,5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Methyl- $\beta$ -cyclodextrin, 0,05 % (w/v) PEG3350, 1 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8,5 renaturiert (3.4.5).

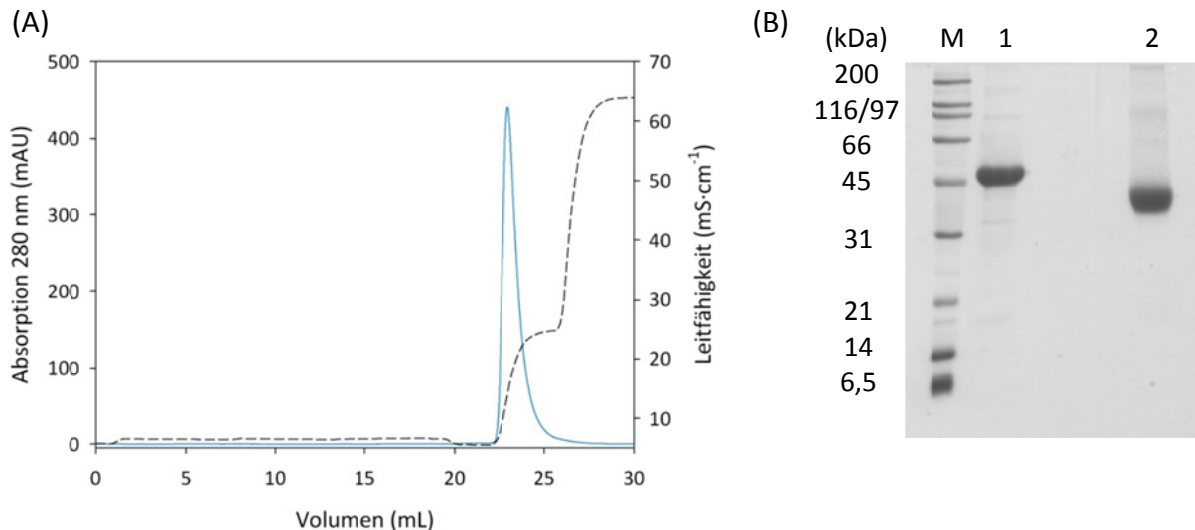


**Abbildung 4-2: Genexpression und teilfaktorierter Faltungs-screen von Easter<sup>Xa</sup>.**

**(A)** SDS-PAGE der Expression von Easter<sup>Xa</sup> in *E. coli* BL21 (DE3) (M: Proteingrößenstandard, 1: Zellysate vor der Induktion, 2: Zellysate 4 h nach der Induktion der Expression). **(B)** Eine Auswahl der getesteten Additive und deren Faktor-Haupteffekt ist gezeigt (in Klammern ist jeweils der definierte (+)-Ansatz und (-)-Ansatz angegeben (Gl. 3-1)).

Das gefaltete Protein wurde in dem sich anschließenden Reinigungsprotokoll (3.4.6) über Ni<sup>2+</sup>-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie von Verunreinigungen, Aggregaten und disulfidverbrückten Oligomeren befreit (siehe Anhang 8.4). Easter<sup>Xa</sup> eluierte im letzten Reinigungsschritt als ein einziger, symmetrischer Peak (Abbildung 4-3 (A)). Eine Analyse mittels SDS-PAGE zeigte, dass Easter<sup>Xa</sup> in hoher Reinheit erhalten werden konnte und in nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer als vorwiegend monomere Spezies mit einer apparenten Molekülmasse von 42 kDa vorlag (Abbildung 4-3 (B)). Renaturiertes Easter<sup>Xa</sup> lag weiterhin ausschließlich in seiner zymogenen Form vor, und wies im Verlauf der Präparation keine Autolyse oder Aktivierung durch endogene Proteasen aus *E. coli* auf. Hinsichtlich der erhaltenen Ausbeuten, quantifiziert über die Proteinmenge, wurden 2 - 3 % des zur Faltung eingesetzten Proteins als monomeres Easter<sup>Xa</sup> erhalten. Dies war vor allem einem hohen Anteil disulfidverbrückter Oligomere geschuldet, welche bei der Größenausschlusschromatographie abgetrennt wurden (siehe Anhang 8.4).





**Abbildung 4-3: Reinigung von renaturiertem Easter<sup>Xa</sup>.**

(A) Das Elutionsprofil einer Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose HP) von renaturiertem Easter<sup>Xa</sup> ist dargestellt (Absorption 280 nm (—), Leitfähigkeit (---)). (B) Die SDS-PAGE des gereinigten Easter<sup>Xa</sup> nach dem finalen Reinigungsschritt ist gezeigt (M: Proteingrößenstandard, 1: Easter<sup>Xa</sup> unter reduzierenden Bedingungen, 2: Easter<sup>Xa</sup> unter nicht-reduzierenden Bedingungen).

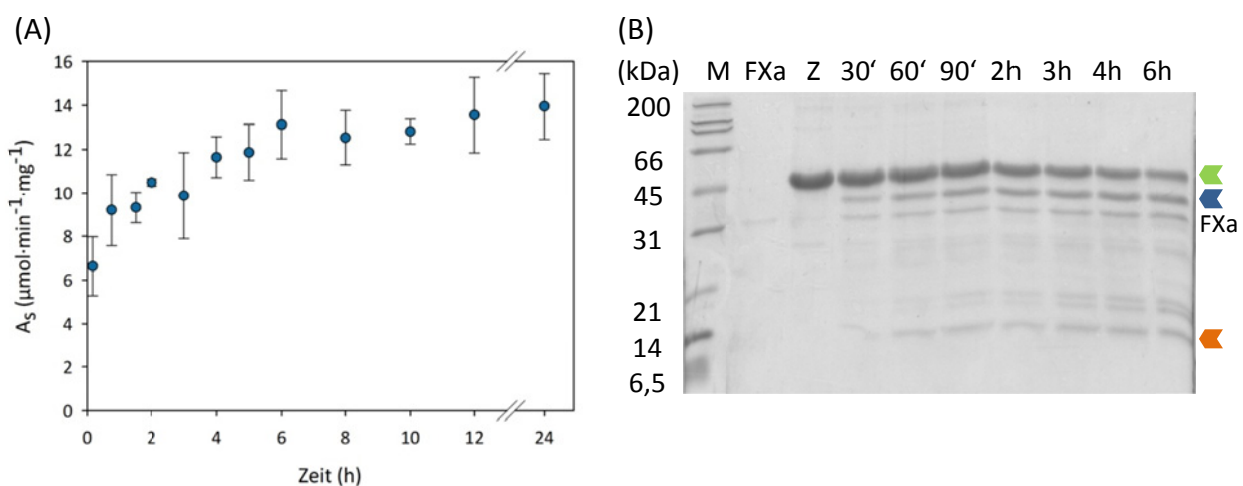
Zur weiteren Analyse der Proteinhomogenität wurde ein ESI-Massenspektrum (3.5.8) einer entsalzten Probe aufgenommen (siehe Anhang 8.5). Dabei zeigten sich dominante Signale bei 42 426,9 Da (was der erwarteten Molekülmasse von vollständig disulfidverbrücktem Easter<sup>Xa</sup> entspricht), sowie bei 43 040,0 Da. Innerhalb des Fehlerbereichs der Methode entspricht die Massendifferenz von 613,1 Da zwischen beiden Spezies der Molekülmasse von oxidiertem Glutathion (612,6 Da). Dies lässt darauf schließen, dass bei der Renaturierung von Easter<sup>Xa</sup> mindestens eine Spezies als gemischtes Disulfid mit zwei gebundenen Glutathionmolekülen (je 306,33 Da) auftrat, welche mit aufgereinigt wurde.

#### 4.1.3 Aktivierung von Easter<sup>Xa</sup>

Die proteolytische Aktivität gegenüber dem Peptidsubstrat Pefachrome tPA, nach der Aktivierung durch bovinen Faktor Xa, ist ein sensibler Parameter die Effizienz der Renaturierung von Easter<sup>Xa</sup> zu verfolgen (4.1.2). Semi-quantitative Untersuchungen sollten zeigen, wie viel des gereinigten Proteins durch Faktor Xa aus der Zymogenform in die aktive Form überführt worden ist und welche spezifische Aktivität *in vitro*-renaturiertes Easter<sup>Xa</sup> aufwies. Dafür wurde, wie unter 3.4.8 beschrieben, das gereinigte Protein mit bovinem Faktor Xa im 20-fachen molaren Überschuss versetzt und in definierten Zeitintervallen Proben genommen.

Da die zymogene Form von Easter<sup>Xa</sup> keinerlei Aktivität besitzt, konnte die Aktivierung sowohl spektroskopisch mit Hilfe des chromogenen Proteasesubstrates Pefachrome tPA als auch über den Nachweis der Spaltung von zymogenen Vollängen-Easter<sup>Xa</sup> in seine beiden Domänen verfolgt werden. In Abbildung 4-4 (A) ist die Zunahme der spezifischen Aktivität von Easter<sup>Xa</sup> gezeigt, welche aus den Anfangsanstiegen der Zeit-Umsatz-Kurven für das Substrat Pefachrome tPA berechnet wurde. Alle gemessenen Daten wurden weiterhin um den durch Faktor Xa hervorgerufenen Umsatz korrigiert. Der relativ große Fehler der Messpunkte wurde durch diese Aktivität von Faktor Xa, welcher mit  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  eine wesentlich höhere spezifische Aktivität als Easter<sup>Xa</sup> aufwies, hervorgerufen. Easter<sup>Xa</sup> unterlag in dem betrachteten Zeitraum keiner autolytischen Aktivierung (Daten nicht gezeigt), wie es für das homologe Konstrukt Snake<sup>Xa</sup> *in vivo* gefunden wurde (Smith *et al.*, 1995). Bereits wenige Minuten nach Zugabe von Faktor Xa nahm die spezifische Aktivität im Reaktionsansatz zu, welche nach sechs Stunden ein Maximum mit ungefähr  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  erreichte.

Eine Analyse der proteolytischen Aktivierung durch Faktor Xa erfolgte weiterhin mittels reduzierender SDS-PAGE (Abbildung 4-4 (B)). Dabei traten zwei Spaltprodukte mit den apparenten Molekülmassen der C-terminalen katalytischen Domäne und der N-terminalen Clip-Domäne auf.

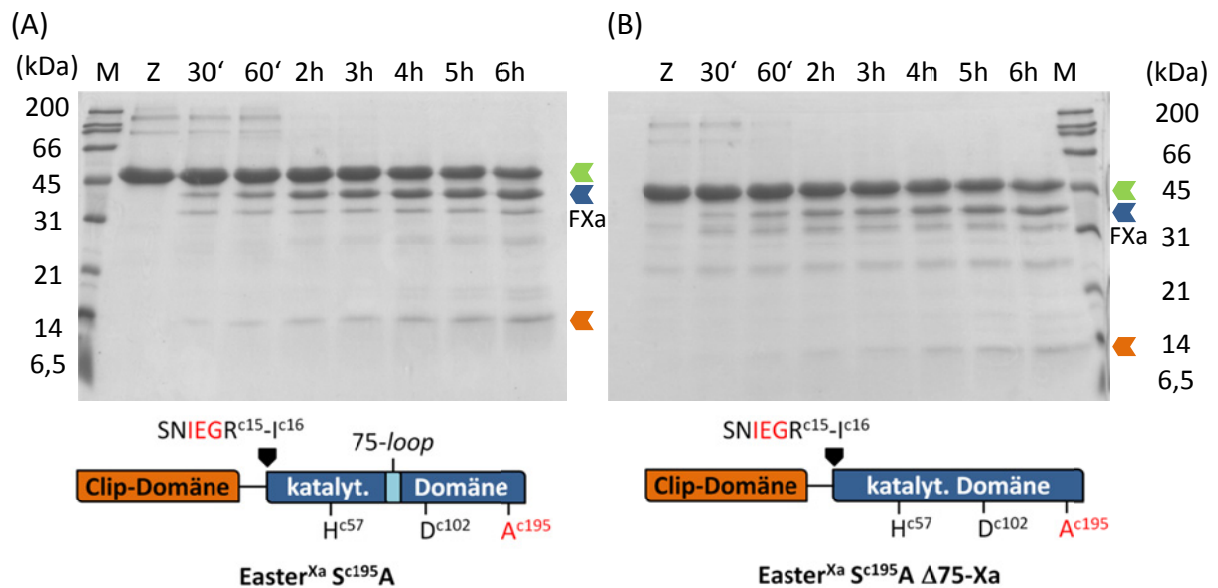


**Abbildung 4-4: Zymogenaktivierung von Easter<sup>Xa</sup>**

**(A)** Die Zunahme der Easter<sup>Xa</sup>-Aktivität gegenüber Pefachrome tPA bei  $30^\circ\text{C}$  ist gezeigt. Alle Punkte wurden in Doppelbestimmung gemessen und um die Faktor Xa-Aktivität korrigiert. Die Standardabweichung der Messpunkte ist als Balken angezeigt. **(B)** Eine SDS-PAGE der proteolytischen Spaltung des Easter<sup>Xa</sup>-Zymogens (Z) in katalytische Domäne (kDa) und Clip-Domäne (kDa) nach Faktor Xa-Zugabe (FXa), unter reduzierenden Bedingungen ist gezeigt (M: Proteingrößenstandard, FXa: Faktor Xa in Puffer, Z: Easter<sup>Xa</sup> Zymogen).

In einem *Western Blot* unter Verwendung eines anti-Pentahistidin-Antikörpers (3.4.2) wurden nur das Zymogen und die katalytische Domäne detektiert, was darauf hindeutet, dass alle weiteren im Gel sichtbaren nicht-identifizierten Spezies C-terminale unspezifische Spaltprodukte darstellen. Ein äquivalentes Experiment (Abbildung 4-5 (A)) mit der inaktiven Variante  $\text{Easter}^{\text{Xa}} \text{S}^{\text{c195}}\text{A}$  (generiert durch Austausch des katalytisch aktiven  $\text{Ser}^{\text{c195}}$ , siehe Anhang 8.1) bestätigte, dass diese Fragmente nicht auf eine Autolyse zurückzuführen sind und daher lediglich eine unspezifische Spaltung durch Faktor Xa (außerhalb der eingeführten Erkennungssequenz  $\text{IEGR}^{\text{c15-1c16}}$ ) in Frage kommt. Die densitometrische Quantifizierung der Aktivierung ergab, dass nur ca. 40 - 50 % des eingesetzten Proteins erfolgreich gespalten wurde.

Zur Überprüfung ob die unzureichende Spaltung von  $\text{Easter}^{\text{Xa}}$  auf eine Unzugänglichkeit der Faktor Xa-Erkennungssequenz durch den *75-loop* (Abbildung 1-3), was für verwandte Proteasen angenommen wurde (Piao *et al.*, 2007; Kellenberger *et al.*, 2011), oder auf eventuelle Fehlfaltung zurückzuführen ist, wurde ausgehend von  $\text{Easter}^{\text{Xa}} \text{S}^{\text{c195}}\text{A}$  die Deletionsvariante  $\text{Easter}^{\text{Xa}} \text{S}^{\text{c195}}\text{A } \Delta 75\text{-Xa}$  erstellt und deren Aktivierbarkeit durch Faktor Xa untersucht (Abbildung 4-5 (B)).



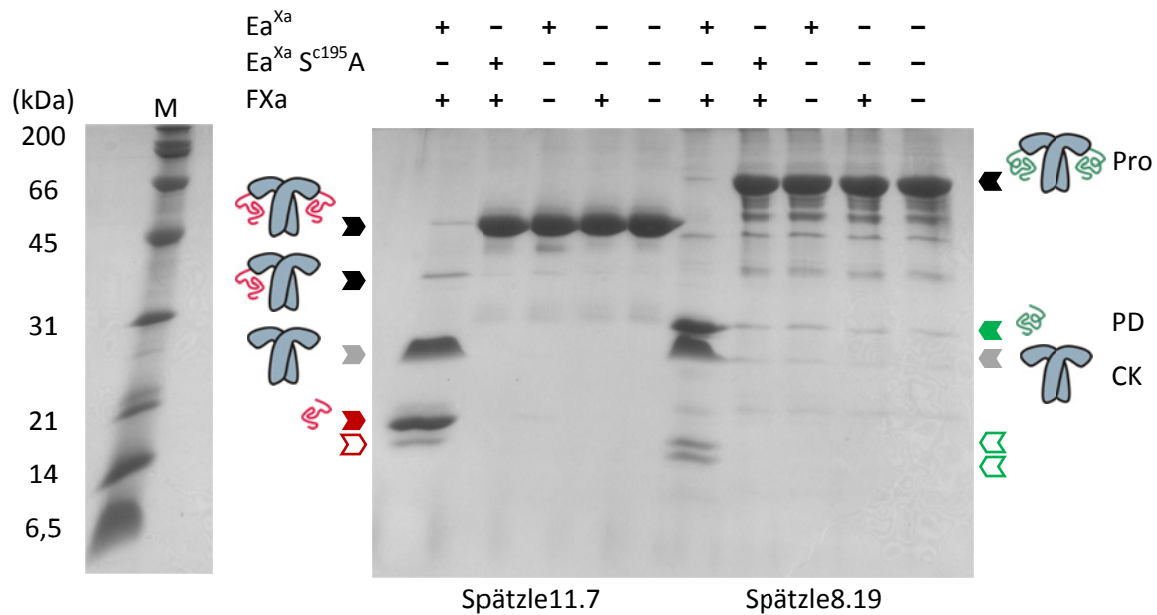
**Abbildung 4-5: Proteolytische Aktivierung von  $\text{Easter}^{\text{Xa}} \text{S}^{\text{c195}}\text{A}$  und der Deletionsvariante  $\Delta 75\text{-Xa}$ .**

Eine SDS-PAGE der Aktivierung von (A)  $\text{Easter}^{\text{Xa}} \text{S}^{\text{c195}}\text{A}$  und (B) der Deletionsvariante  $\text{Easter}^{\text{Xa}} \text{S}^{\text{c195}}\text{A } \Delta 75\text{-Xa}$  ist gezeigt. Nach Zugabe von Faktor Xa (FXa) wurden zu angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen um die Spaltung des Zymogens (  $\blacktriangleleft$  ) in katalytische Domäne (  $\blacktriangleleft$  ) und Clip-Domäne (  $\blacktriangleleft$  ) zu verfolgen (M: Proteingrößenstandard, Z: Zymogen der Variante). Der Domänenbau der Easter-Varianten ist unten schematisch dargestellt (vgl. Abbildung 4-1). Im Vergleich zu *wtEaster* ausgetauschte Aminosäuren sind rot markiert. In der Variante  $\text{Easter}^{\text{Xa}} \text{S}^{\text{c195}}\text{A } \Delta 75\text{-Xa}$  wurde der gesamte *75-loop* (cyan) deletiert

In dieser Proteinvariante wurde der durch eine Disulfidbrücke begrenzte 75-*loop*, sowie die C- und N-terminal flankierenden Prolin-reichen Sequenzbereiche durch die Sequenz des Ca<sup>2+</sup>-Bindungs-*loops* von humanen Faktor Xa ersetzt (siehe Anhang 8.6). Durch die Entfernung der Prolin-reichen Sequenz sollten eventuelle sterische Konflikte eines *hairpin-loops* minimiert werden. Quantitativ und qualitativ zeigten sich zwischen Easter<sup>Xa</sup> S<sup>c195</sup>A und der Deletionsvariante Δ75-Xa keine Unterschiede im Verlauf der proteolytischen Aktivierung mit Faktor Xa (Abbildung 4-5). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die mangelhafte Aktivierung für das hier verwendete renaturierte Zymogen nicht aufgrund einer sterischen Restriktion des Aktivierungs-*loops* auftrat.

#### 4.1.4 Aktivität von Easter<sup>Xa</sup> gegenüber von ProSpätzle-Varianten

Die Pro-Form des Morphogens Spätzle stellt das natürliche Substrat für Easter dar (DeLotto und DeLotto, 1998). Es gelang bereits in einer vorherigen Arbeit zwei Isoformen von ProSpätzle (ProSpz), Spz8.19 und Spz11.7, *in vitro* zu renaturieren und diese biophysikalisch zu charakterisieren (Hoffmann *et al.*, 2008). Beide Isoformen wurden gereinigt (3.4.5) und sollten im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden um zu analysieren, ob diese als Substrat für Easter<sup>Xa</sup> fungieren. Da Faktor Xa für die Aktivierung der Protease Easter<sup>Xa</sup> essentiell ist, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um die proteolytische Reifung von ProSpz der Aktivität von Easter<sup>Xa</sup> zuordnen zu können. ProSpz8.19 und ProSpz11.7 wurden mit einem 50-fachen molaren Überschuss an aktivierten Easter<sup>Xa</sup> versetzt, für 2 h bei 30 °C inkubiert und die erhaltenen Proteolyseprodukte unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Tris-Tricin-Gelen aufgetrennt (3.4.9). In Negativ-Kontrollen, in denen lediglich Faktor Xa, die zymogene Form von Easter<sup>Xa</sup> oder die Faktor Xa-gespaltene inaktive Variante Easter<sup>Xa</sup> S<sup>c195</sup>A zugesetzt wurden, konnte keinerlei Umsatz beobachtet werden (Abbildung 4-6). Dies zeigt, dass Faktor Xa keine Aktivität gegenüber den verwendeten ProSpz-Isoformen aufweist und auch dass das Easter<sup>Xa</sup>-Zymogen gegenüber diesen Substraten inaktiv ist. Dahingegen konnte in Reaktionsansätzen mit aktivierten Easter<sup>Xa</sup> ein quantitativer Umsatz beobachtet werden (Abbildung 4-6). Durch Reifung von ProSpz durch Easter<sup>Xa</sup> trat die für beide Isoformen identische, dimere Cystin-Knoten-Domäne (CK) mit einer Molekülmasse von 24 kDa auf. Im Falle der Isoform Spz8.19 konnte die freie Prodomäne (PD), mit erwarteten 23 kDa, bei einer apparenten Molekülmasse von 25 kDa beobachtet werden. Für die Isoform Spz11.7 ist die Prodomäne, mit einer erwarteten Molekülmasse von 14 kDa, bei der apparenten Molekülmasse von 18 kDa zu erkennen.



**Abbildung 4-6: Prozessierung der ProSpätzle-Isoformen ProSpz11.7 und ProSpz8.19 mit Easter<sup>Xa</sup>.**

Die Analyse der Prozessierung von ProSpz8.19 und ProSpz 11.7 erfolgte mittels SDS-PAGE mit Tris-Tricin-Gelen unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die jeweilige ProSpz-Isoform (Pro (◀)) wurde mit den oben aufgeführten Enzymen für 2 h bei 30 °C inkubiert. Alle theoretisch erwarteten Proteolyseprodukte, die dimere Cystin-Knoten-Domäne (CK (◀)) und die freien Prodomänen (PD (◀, ▶)), sind in Form von Piktogrammen veranschaulicht und markiert. Die sekundären Proteolyseprodukte (◀, ▶), entstanden durch eine proteolytische Spaltung innerhalb der PD, sind ebenfalls gekennzeichnet. Der Proteingrößenstandard (M) ist links gezeigt.

Dies deutet darauf hin, dass in beiden Isoformen die korrekte Spaltsequenz von Easter<sup>Xa</sup> erkannt wurde. Weiterhin wird ersichtlich, dass im Verlauf der Reifung durch Easter<sup>Xa</sup>, die freien Prodomänen beider Isoformen nahezu proteolysestabil verblieben. Im Gegensatz zur Easter<sup>Xa</sup>-vermittelten Prozessierung führte eine limitierte Proteolyse mit bovinem Trypsin zu einer vollständigen Degradation der Prodomänen (Hoffmann *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2003).

Weiterhin trat bei der Reifung von ProSpz8.18 eine Doppelbande bei einer apparenten Molekülmasse von ca. 15 kDa auf und bei ProSpz11.7 eine weitere Bande bei ca. 15 kDa, welche vorerst nicht zugeordnet werden konnten. Zur Validierung der spezifischen Spaltung von ProSpz an der erwarteten Easter-Erkennungssequenz VSSR<sup>266</sup>-V<sup>267</sup> (siehe Anhang 8.2) und zur Identifizierung der unbekannt Spaltprodukte wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt (3.5.8). Dabei konnte für die Isoform Spz8.19 eindeutig ein Molekülion nachgewiesen werden, welches der reifen Cystin-Knoten-Domäne entspricht und damit eine spezifische Spaltung der Sequenz VSSR<sup>266</sup>-V<sup>267</sup> (Tabelle 4-1), folgend als S<sup>1</sup>-Stelle bezeichnet, durch aktiviertes Easter<sup>Xa</sup> zeigt (siehe Anhang 8.8 und 8.9).

**Tabelle 4-1: Analyse der Spätzle-Spaltprodukte mittels ESI-MS.**

Es sind die theoretischen und gemessenen, monoisotopischen Molekülmassen aufgelistet (vgl. Anhang 8.8 und 8.9) sowie die Bezeichnungen der Spaltstellen und -produkte dargestellt (CK: Cystin-Knoten-Domäne, PD: Prodomäne, N/C-PD: N- und C-terminale Spaltprodukte der Prodomänen).



Spaltprodukt	$M_r$ (theoretisch)	$M_r$ (gemessen)
CK	23 813,6	23 813,5
8.19PD	22 692,2	--
N-8.19PD	11 526,7	11 527,7
C-8.19PD	11 183,4	11 183,4
11.7PD	14 222,1	14 222,1
N-11.7PD	3 056,6	3 056,6
C-11.7PD	11 183,4	11 183,4

Weiterhin konnten die bei der Prozessierung auftretenden sekundären Proteolyseprodukte (Abbildung 4-6) für beide Isoformen zugeordnet werden. Es zeigte sich, dass in beiden Isoformen in der Sequenz R<sup>168</sup>-T<sup>169</sup>DT (siehe Anhang 8.2) C-terminal von Arg<sup>168</sup> eine Proteolyse auftrat (folgend als S<sup>2</sup>-Stelle bezeichnet). Aus dem Sequenzvergleich wird ersichtlich, dass die Spaltung unmittelbar an einer Sequenzinsertionsgrenze erfolgte. Diese Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen von ProSpz resultieren dabei direkt aus dem alternativen Spleißen (DeLotto *et al.*, 2001).

Die bei Spz8.19 auftretende Doppelbande bei 15 kDa (Abbildung 4-6) entspricht dem N- und C-terminalen (11,5 kDa bzw. 11,1 kDa) Proteolyseprodukt der Prodomäne nach Spaltung der S<sup>2</sup>-Stelle. Diese beiden Fragmente konnten massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden (siehe Anhang 8.8). Die sekundäre Spaltung in der Prodomäne von Spz11.7 resultiert in einem um 25 Aminosäuren N-terminal-verkürzten Fragment (Abbildung 4-6) mit einer erwarteten Molekülmasse von ca. 11,1 kDa. In ESI-MS-Spektren konnte auch für dieses Fragment ein Molekülion eindeutig zugeordnet werden (siehe Anhang 8.9). Dies zeigt, dass Easter<sup>Xa</sup> in der Lage ist *in vitro* die Isoformen Spz8.19 und Spz11.7 an der erwarteten primären S<sup>1</sup>-Stelle und an einer bisher nicht beschriebenen sekundären S<sup>2</sup>-Stelle zu prozessieren.

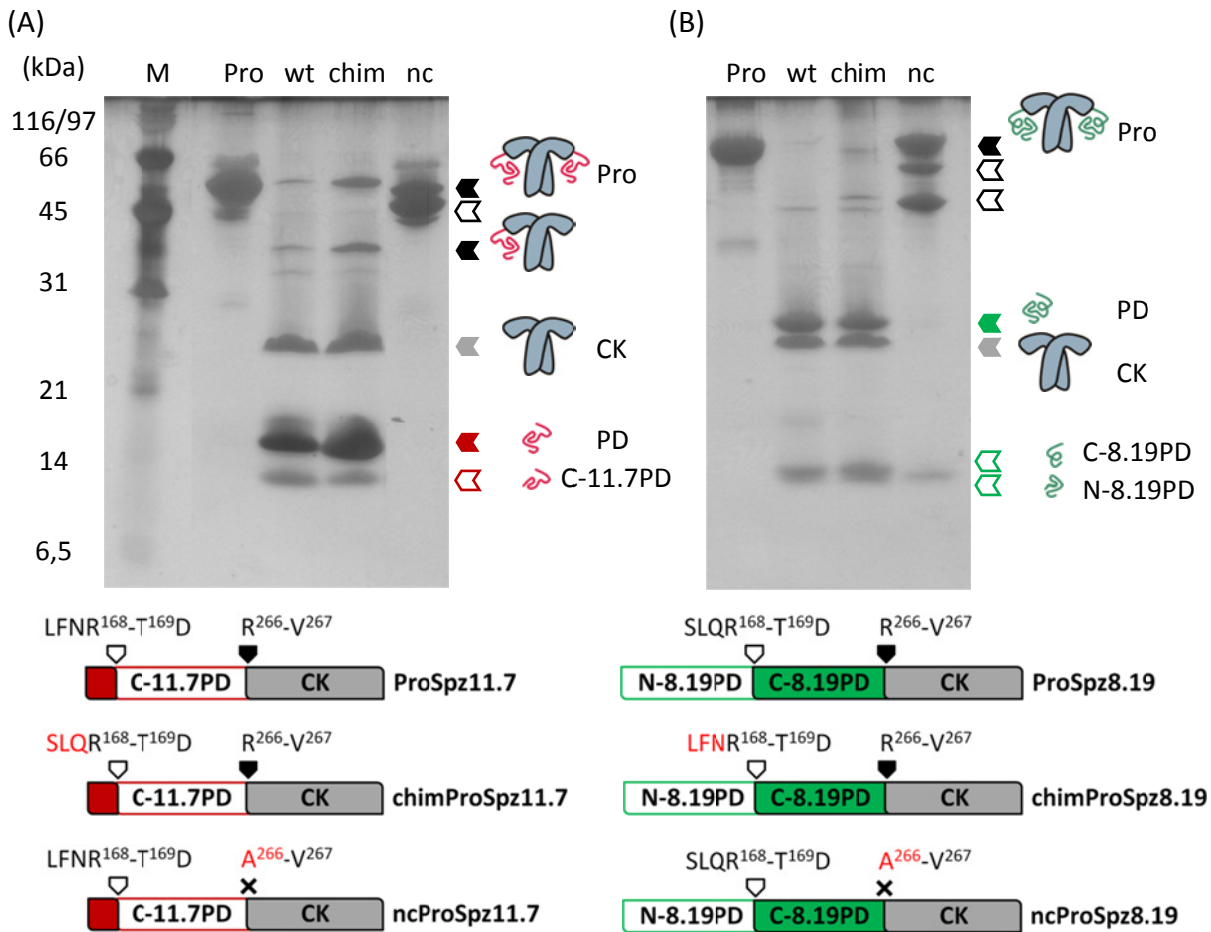
#### 4.1.5 Analyse der sekundären Easter<sup>Xa</sup>-Spaltsequenz in den Spätzle-Prodomänen

Zunächst sollte untersucht werden, ob Easter<sup>Xa</sup> die beiden S<sup>2</sup>-Stellen LFNR<sup>168</sup>-T<sup>169</sup>DT (für Spz11.7) und SLQR<sup>168</sup>-T<sup>169</sup>DT (für Spz8.19) (siehe Anhang 8.2) rein sequenzbasiert erkennt oder diese eventuell in einem für die Isoform spezifischen, strukturellen Epitop liegen. Dafür wurden chimäre ProSpz-Varianten hergestellt, in denen die korrespondierenden Reste P4 - P2 (bezogen auf die Nomenklatur von Schechter und Berger (1967)) der S<sup>2</sup>-Stelle beider Isoformen, Spz11.7 und Spz8.19, gegeneinander ausgetauscht wurden (siehe Anhang 8.7 und Schema Abbildung 4-7). Es wird ersichtlich, dass die beiden chimären Varianten, chimProSpz11.7 und chimProSpz8.19, gleichermaßen prozessiert wurden wie die Wildtyp-Isoformen und identische Proteolyseprodukte auftraten (Abbildung 4-7). Daher spaltet Easter<sup>Xa</sup> die sekundäre S<sup>2</sup>-Stelle unabhängig der jeweiligen Isoform und scheint diese ausschließlich sequenzbasiert zu erkennen.

Weiterhin sollte durch Austausch des P1-Restes in der primären S<sup>1</sup>-Stelle (VSSR<sup>266</sup>-V<sup>267</sup> zu VSSA<sup>266</sup>-V<sup>267</sup>) für Easter<sup>Xa</sup> nicht-spaltbare ProSpz-Varianten (ncProSpz, für „non-cleavable“) erzeugt werden. Diese Varianten sollten zeigen ob die sekundäre Spaltung unabhängig von der Prozessierung der S<sup>1</sup>-Stelle ist. Bei der Easter<sup>Xa</sup>-vermittelten Spaltung dieser ncProSpz-Varianten traten jeweils zwei neue Proteolyseprodukte bei ca. 47 kDa, im Falle von Spz11.7, und bei ca. 60 kDa bzw. 48 kDa für Spz8.19 auf (Abbildung 4-7). Diese Banden entsprechen verkürzten Proteolyseprodukten, ohne die von der S<sup>2</sup>-Stelle N-terminal gelegene Sequenz. Da unter nicht-reduzierenden Bedingungen Spätzle allgemein als disulfidverbrücktes Dimer vorliegt, stellt die jeweils mittlere Bande ein Intermediat der Spaltung dar, in welchem nur ein Protomer prozessiert ist.

Faktor Xa war in Kontrolleexperimente nicht in der Lage diese ProSpz-Varianten zu spalten (Daten nicht gezeigt), weshalb die sekundäre Prozessierung eine spezifische Reaktion von Easter<sup>Xa</sup> darstellt.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Isoformen Spz11.7 und Spz8.19 gleichermaßen als Substrat für Easter<sup>Xa</sup> fungieren und *in vitro* einer sekundären Spaltung innerhalb der Prodomänen unterliegen. Diese sekundäre Spaltung ist dabei unabhängig von der primären Prozessierung. Daher erfolgt die Spaltung der S<sup>2</sup>-Stelle nicht ausschließlich nach Prozessierung der S<sup>1</sup>-Stelle in einer sequentiellen Reaktion.



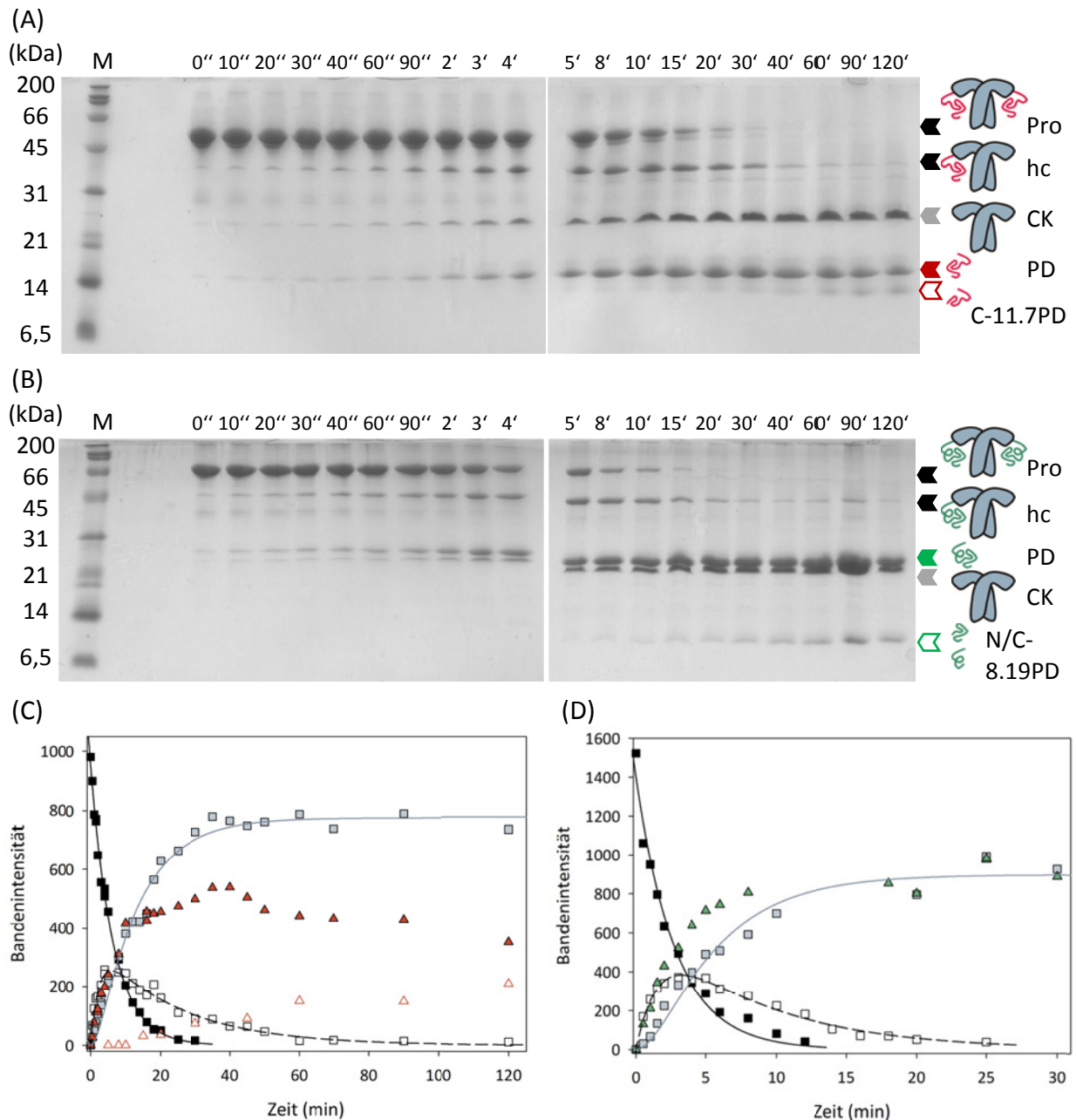
#### Abbildung 4-7: Analyse der sekundären S<sup>2</sup>-Spaltstelle.

Die jeweiligen Pro-Formen (◀) von (A) Spz11.7 und (B) Spz8.19 wurden mit aktivierten Easter<sup>Xa</sup> für 2 h bei 30 °C inkubiert und die Proteolyseprodukte mit Tris-Tricin-Gelen unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Cystin-Knoten-Domäne (CK (◀)), Voll-längen-Prodomeänen (PD (◀, ◀)), sowie N-terminal verkürzte 11.7Prodomäne (C-11.7PD (◀)) und die N- und C-terminalen Spaltprodukte der 8.19Prodomäne (N-8.19PD, C-8.19PD (◀)) sind entsprechend gekennzeichnet. Die N-terminal verkürzten Proteolyseprodukte der nc-Varianten sind ebenfalls markiert (◀) (M: Proteingrößenstandard, Pro: ProSpz der wt-Varianten, chim: chimäre Varianten mit ausgetauschten S<sup>2</sup>-Stellen, nc: nicht-spaltbare Varianten mit mutierter S<sup>1</sup>-Stelle). Schematische Darstellungen der Spz-Varianten sind unten gezeigt und in den Spaltstellen ausgetauschte Aminosäuren rot markiert.

#### 4.1.6 Kinetik der *in-vitro* proteolytischen Spätzle-Reifung

Zur weiteren Charakterisierung der Easter<sup>Xa</sup>-vermittelten Prozessierung wurde die Kinetik der Proteolyse analysiert. Aktiviertes Easter<sup>Xa</sup> wurde zu jeweils 40 μM Pro-Form in 50-fachen molaren Überschuss gegeben und die Ansätze bei 30 °C inkubiert (3.4.9). Die Quantifizierung der in Tris-Tricin-Gelen aufgetrennten Proteolyseprodukte erfolgte densitometrisch. In Abbildung 4-8 (A, B) ist der zeitliche Verlauf der Reifung von ProSpz11.7 und ProSpz8.19 zu sehen.





**Abbildung 4-8: Kinetik der Reifung von ProSpätzle mit Easter<sup>Xa</sup>.**

Die Easter<sup>Xa</sup>-vermittelte Prozessierung von ProSpz wurde zeitlich verfolgt und mittels nicht-reduzierenden Tris-Tricin-Gelen analysiert. Beispielhafte Messungen für (A) Spz11.7 und (B) Spz8.19 sind gezeigt (M: Proteingrößenstandard, Pro: ProSpz, hc: halbseitig gereiftes Spz, CK: Cystin-Knoten-Domäne, PD: Prodomäne, C-11.7PD: sekundär prozessierte 11.7Prodomäne, N/C-8.19PD: sekundär prozessierte 8.19Prodomäne). Eine Auswertung der Prozessierungskinetiken mit (C) Spz11.7 und (D) Spz8.19 erfolgte durch densitometrische Quantifizierung der Banden von Pro (■), hc (□), CK (□) und PD (▲/▲). Die Kurvenanpassung erfolgte wie im Text und unter 3.4.9 beschrieben.

Dabei trat intermediär eine Spezies auf, die einem halbseitig prozessierten Spz entspricht (hc, für „half-cleaved“). Dieses wurde weiter zu der stabilen Cystin-Knoten-Domäne (CK) prozessiert. Weiterhin ist zu sehen, dass die N-terminal verkürzte 11.7Prodomäne (C-11.7PD) zeitlich deutlich versetzt entstand.

Die zeitliche Abnahme der Bande für die Pro-Form von Spz11.7 kann über den gesamten Messzeitraum durch eine kinetische Reaktion 1. Ordnung (Gl. 3-4) beschrieben werden (Abbildung 4-8 (C)). Die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion beträgt  $k_1 = 0,156 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ . Zur Datenanpassung des halbseitig prozessierten Spätzle wurde eine irreversible Konsekutivreaktion angenommen (Gl. 3-5). Dabei wurden Geschwindigkeitskonstanten von  $k_1 = 0,43 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$  und, für die Folgereaktion zu der beidseitig gereiften Cystin-Knoten-Domäne, von  $k_2 = 0,042 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$  bestimmt. Analog wurde für die Cystin-Knoten-Domäne als Endprodukt der gesamten Reaktion, unter Festlegung von  $k_1 = 0,43 \text{ min}^{-1}$ , ein Wert von  $k_2 = 0,086 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  erhalten (vgl. Tabelle 4-2).

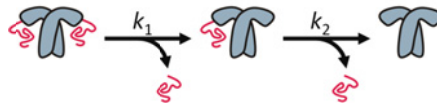
Aus Abbildung 4-8 (C) ist zu erkennen, dass nach ca. 40 - 60 min eine Abnahme der Bandenintensität der intakten 11.7Prodomäne zu verzeichnen ist, da es zur sekundären Prozessierung in der  $S^2$ -Stelle kam. Da jedoch im gewählten Messzeitraum keine quantitative Umsetzung beobachtet werden konnte, wurde davon abgesehen die Geschwindigkeitskonstante dieser sekundären Spaltung zu bestimmen.

Im Falle von Spz8.19 können nur die Pro-Form und das halbseitig prozessierte Intermediat verlässlich quantifiziert werden (Abbildung 4-8 (D)). Auf Grund des geringen Molekülmassenunterschiedes zwischen der Prodomäne und der Cystin-Knoten-Domäne ist die Quantifizierung dieser Spezies mit einem größeren Fehler behaftet. Aus den erhaltenen Daten wurde unter Verwendung der gleichen kinetischen Modelle für den Abbau der Pro-Form die Geschwindigkeitskonstante  $k_1 = 0,35 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$  bestimmt. Für den Auf- und Abbau des halbseitig prozessierten Intermediates wurden  $k_1 = 0,62 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$  und  $k_2 = 0,13 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Für die Bildung der Cystin-Knoten-Domäne wurde ein Wert von  $k_2 = 0,22 \pm 0,09 \text{ min}^{-1}$  erhalten, unter Festlegung von  $k_1 = 0,62 \text{ min}^{-1}$ . Alle ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Prozessierung für beide Spätzle-Isoformen sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Aus den Daten ist zu entnehmen, dass Spz8.19 unter den gewählten Reaktionsbedingungen einer schnelleren proteolytischen Reifung unterliegt als Spz11.7. Aussagen, ob eventuelle Unterschiede in der Spaltung der  $S^1$ -Stelle in der Pro-Form oder in dem halbseitig prozessierten Intermediat bestehen, lassen sich nicht treffen. Es ist zu beachten, dass Spätzle als Dimer vorliegt und daher Konzentrationseffekte, durch eine lokal höhere Konzentration an Spaltsequenzen in der Pro-Form im Vergleich zu der halbseitig prozessierten Form, die kinetischen Messungen beeinflussen können.

**Tabelle 4-2: Kinetische Parameter der Prozessierung von Spätzle durch Easter<sup>Xa</sup>.**

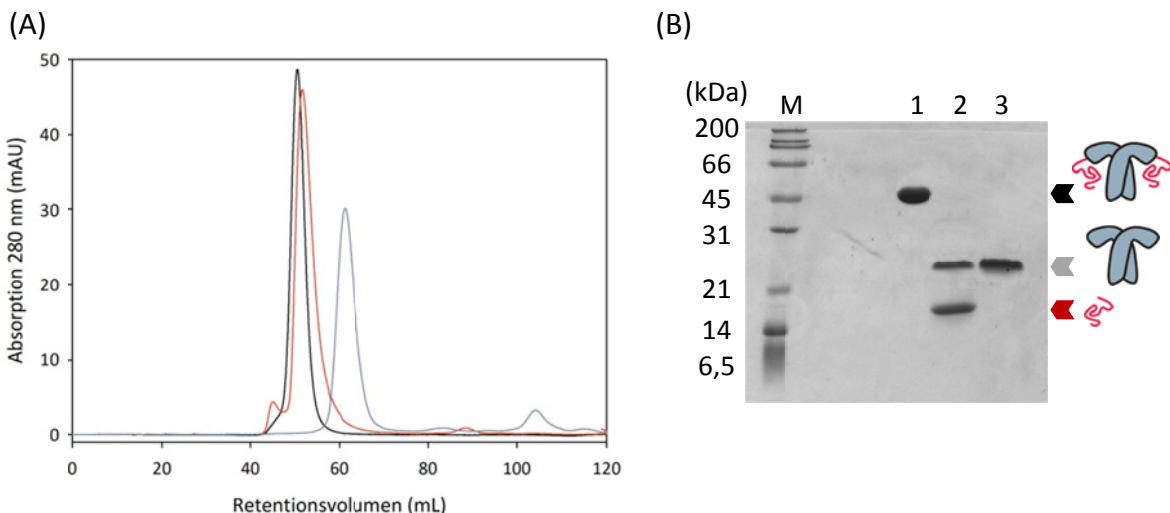
Die mit \* markierten Geschwindigkeitskonstanten wurden bei der nicht-linearen Regression festgesetzt. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf die Standardabweichung aus der nicht-linearen Regression.



	Spz11.7		Spz8.19	
Spezies	$k_1$ in ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_2$ in ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_1$ in ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_2$ in ( $\text{min}^{-1}$ )
Pro	$0,156 \pm 0,005$	--	$0,35 \pm 0,02$	--
hc	$0,43 \pm 0,04$	$0,042 \pm 0,003$	$0,62 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,01$
CK	$0,43^*$	$0,086 \pm 0,01$	$0,62^*$	$0,22 \pm 0,09$

**4.2 Charakterisierung von gereiftem Spätzle11.7****4.2.1 Biochemische Charakterisierung von matSpz11.7**

Die Pro-Form von Spz11.7 wurde zunächst durch Easter<sup>Xa</sup> prozessiert (3.4.9) und mittels Größenausschlusschromatographie analysiert (Abbildung 4-9 (A)). Als Referenzen wurden die Elutionsprofile von ProSpz11.7 und der gereinigten isolierten Cystin-Knoten-Domäne, welche durch Trypsinbehandlung gewonnen wurde (3.4.10), aufgenommen.



**Abbildung 4-9: Bildung eines nicht-kovalenten Komplexes für gereiftes Spz11.7.**

(A) Die Elutionsprofile auf einer S75 16/60-Säule (Laufpuffer 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4) und (B) die nicht-reduzierende SDS-PAGE der jeweiligen Elutionspeaks von ProSpz11.7 (—), der isolierten Cystin-Knoten-Domäne (—) und von Easter<sup>Xa</sup>-prozessierten Spz11.7 (—) sind gezeigt (M: Proteingrößenstandard, 1: ProSpz11.7, 2: matSpz11.7, 3: CK).

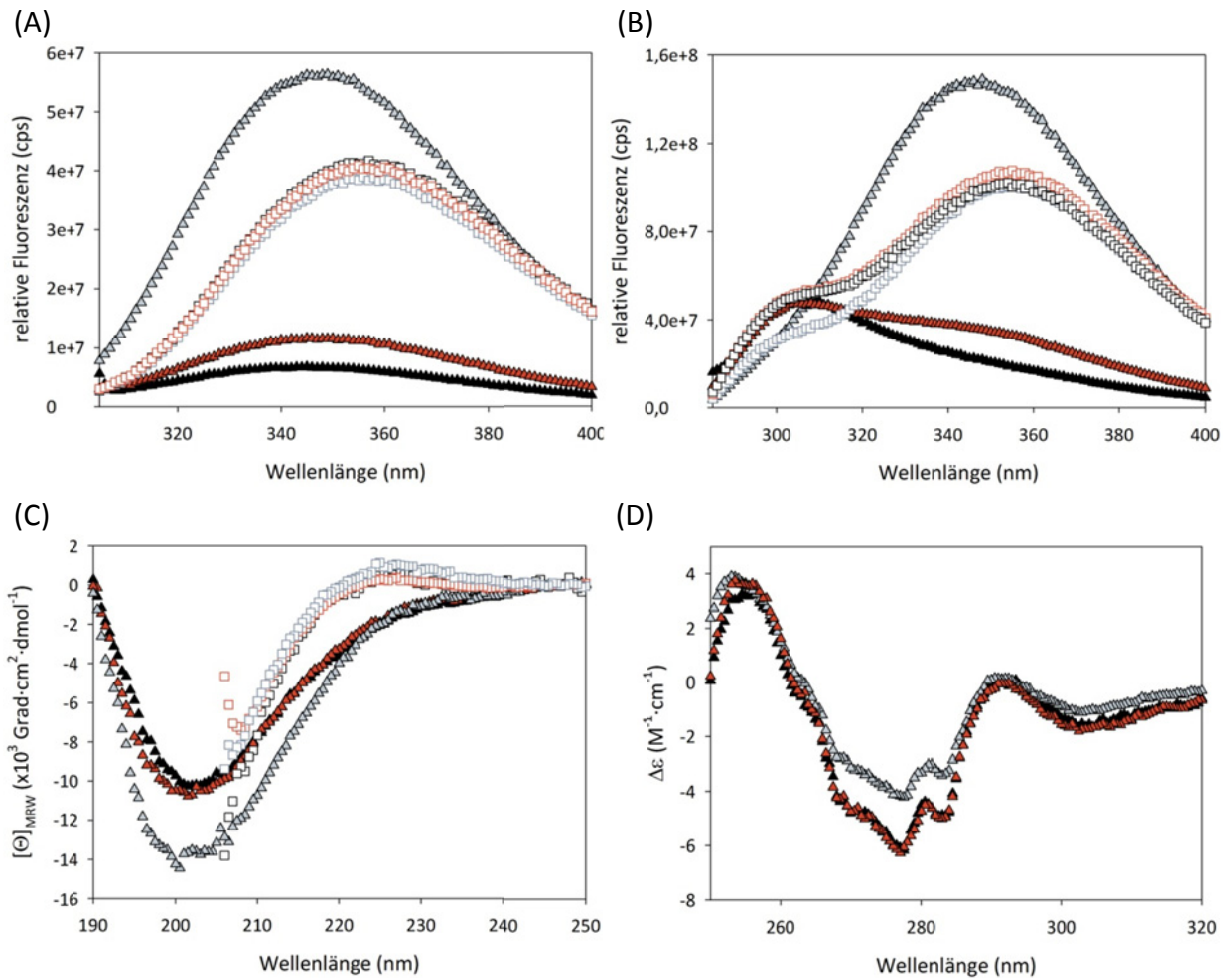
Es ist zu erkennen, dass das Easter<sup>Xa</sup>-gereifte Spz11.7 (folgend als matSpz11.7 bezeichnet) mit einem Retentionsvolumen ähnlich der Pro-Form eluierte. Es ist weiterhin zu entnehmen, dass in den Fraktionen von matSpz11.7 die Prodomäne mit der dimeren Cystin-Knoten-Domäne in Form eines nicht-kovalenten Komplexes eluierte (Abbildung 4-9 (B)).

Dieses Ergebnis ist ein Einklang mit früheren Daten einer durch *tobacco-etch-virus* (TEV)-Protease spaltbaren Variante der Spätzle-L-Isoform, wonach eine nicht-kovalente Assoziation beider Domänen bestehen bleibt (Weber *et al.*, 2007).

Spz11.7 besitzt nur ein einzelnes Tryptophan, welches in der Cystin-Knoten-Domäne lokalisiert ist. In ProSpz11.7 ist die intrinsische Proteinfluoreszenz nach Anregung bei 295 nm, der spezifischen Anregungswellenlänge von Tryptophan, im Vergleich zur isolierten Cystin-Knoten-Domäne fast vollständig gequencht (Abbildung 4-10 (A)). Die durch Easter<sup>Xa</sup> prozessierte Spezies matSpz11.7 zeigt eine leichte Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Die Spektren deuten auf eine ähnliche chemische Umgebung des einzelnen Tryptophans in der Pro-Form und dem gereiften Komplex matSpz11.7 hin. Die Fluoreszenzspektren indizieren somit, dass das Tryptophan der Cystin-Knoten-Domäne in der Bindung der 11.7Prodomäne involviert ist, wie es bereits für die Spätzle-L-Isoform nachgewiesen wurde (Arnot *et al.*, 2010).

Durch Denaturierung kommt es zu einer bathochromen Verschiebung des Fluoreszenzmaximums aller drei Spezies von  $\lambda_{\max} = 346$  nm auf  $\lambda_{\max} = 358$  nm, was auf eine höhere Lösungsmittelexposition des Tryptophans zurückzuführen ist. Die durch die Interaktion zwischen Cystin-Knoten-Domäne und 11.7Prodomäne hervorgerufene Fluoreszenzlöschung kann also durch Denaturierung in 4 M GdmCl vollständig aufgehoben werden, sowohl in der kovalent-gebundenen Pro-Form als auch dem nicht-kovalenten matSpz11.7.

Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Abbildung 4-10 (B)) ist in den Emissionsspektren von ProSpz11.7 und matSpz11.7 bei  $\sim 300$  nm eine Schulter zu verzeichnen, welche auf die Tyrosinfluoreszenz zurückzuführen ist (Schmid, 1997). Da Spz11.7 pro Monomer nur ein einziges Tryptophan und 7 Tyrosine enthält, ist hier eine Auflösung der Emissionsspektren beider Aminosäuren sichtbar. Unter nativen Bedingungen ist keine Tyrosinfluoreszenz für die Cystin-Knoten-Domäne sichtbar, was auf eine Kopplung, und damit räumliche Nähe, zu dem einzelnen Tryptophan hindeutet. Dieser Fluoreszenzresonanzenergietransfer wurde durch die Denaturierung aufgehoben, was anhand der auftretenden Tyrosinfluoreszenz erkennbar ist.



**Abbildung 4-10: Fluoreszenz- und Circular dichroismusspektren von Spätzle11.7.**

Es sind die Fluoreszenzspektren bei einer Anregungswellenlänge von (A) 295 nm und (B) 280 nm gezeigt. Die Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 10  $\mu$ M gemessen. Circular dichroismus-Spektren wurden im (C) Fern-UV-Bereich sowie im (D) Nah-UV-Bereich aufgezeichnet. Es sind jeweils die Spektren von ProSpz11.7 (▲, □), der isolierten Cystin-Knoten-Domäne (△, □) und matSpz11.7 (▲, □) gezeigt. Alle Messungen wurden bei 20 °C in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt. Die offenen Symbole (□, □, □) zeigen die jeweiligen Spektren der denaturierten Proteine durch Zusatz von 4 M GdmCl.

Weiterführend wurde eine Analyse mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie durchgeführt (Abbildung 4-10 (C)). Unter nativen Bedingungen zeigen ProSpz11.7, matSpz11.7 und die Cystin-Knoten-Domäne ein für  $\beta$ II-Proteine typisches Spektrum, welches mit einer negativen Bande bei  $\sim$  202 nm Charakteristika von *random coils* oder poly(Pro)II-Helices aufweist (Sreerama und Woody, 2003; Sreerama und Woody, 2004). Die negative Elliptizität bei 210 - 220 nm sowie die geringe Elliptizität bei 190 nm deuten auf einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen hin, wie es aus der Struktur erwartet war (Hoffmann *et al.*, 2008).  $\beta$ II-Proteine sind gekennzeichnet durch einen relativ hohen Anteil an poly(Pro)II-Helix-ähnlicher Konformationen (Sreerama und Woody, 2003).

Eine Spektrendekonvolution mittels CDPro (Sreerama und Woody, 2000) bestätigte eine von *random coil*- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen dominierte Struktur (Tabelle 8-1). ProSpz11.7, matSpz11.7 und die isolierte Cystin-Knoten-Domäne zeigen dabei identische Sekundärstrukturanteile.

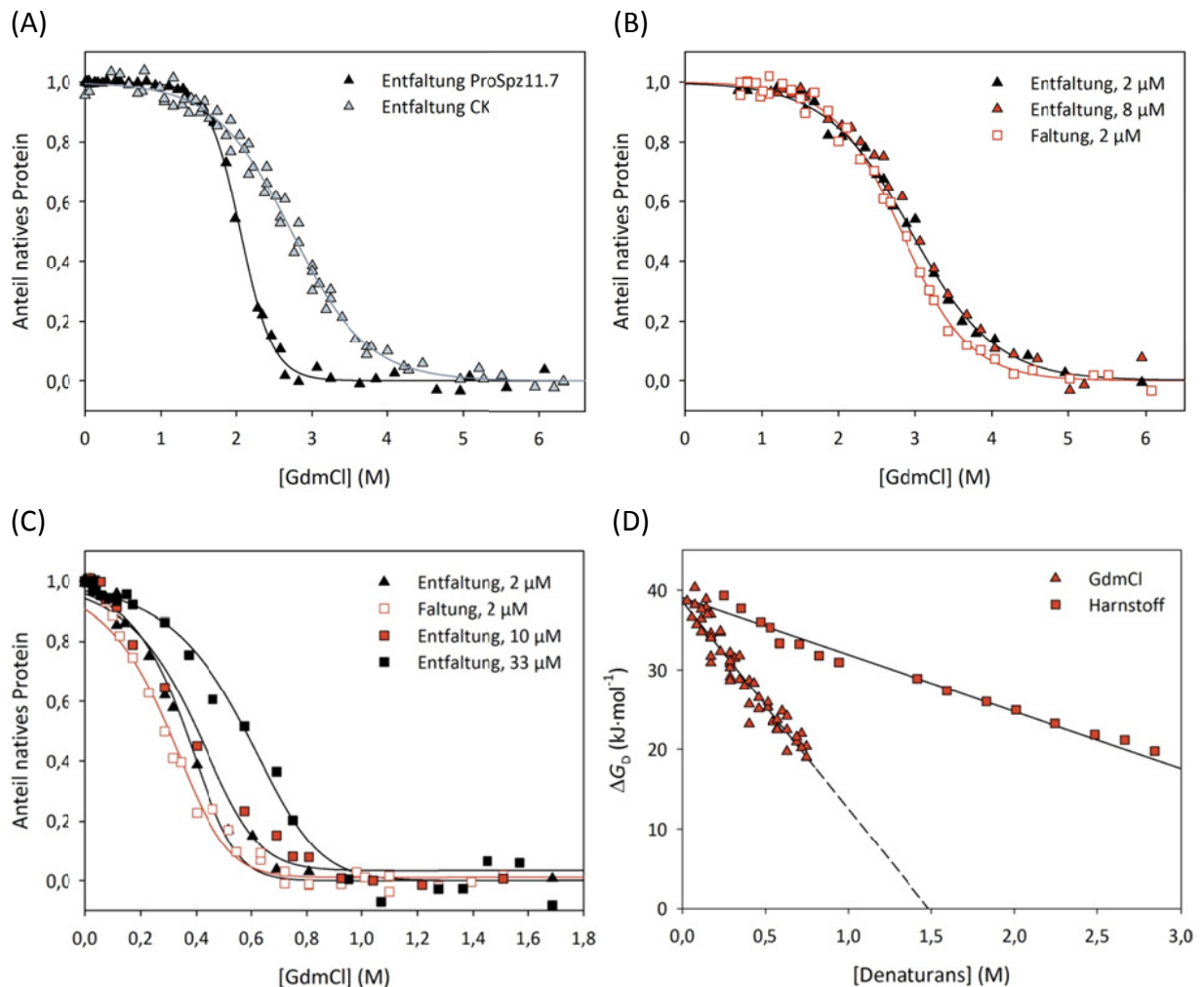
Unter denaturierenden Bedingungen weisen alle Spezies ein deckungsgleiches Spektrum auf, mit einer stark negativen Bande bei  $\sim 205$  nm sowie einer schwach positiven Elliptizität bei 225 nm was dem Modellspektrum eines *random coils* entspricht. Diese Spektren unterscheiden sich signifikant von den nativen Spektren, was auf eine definierte Struktur unter nativen Bedingungen hindeutet.

Circulardichroismusspektren im Nah-UV-Bereich zeigen, dass ProSpz11.7 und matSpz11.7 ähnliche, und von der Cystin-Knoten-Domäne zu unterscheidende, Tertiärkontakte aufweisen. Aufgrund der vielen Faktoren, die das charakteristische Nah-UV-CD-Spektrum eines Proteins beeinflussen, lassen sich jedoch keine detaillierten Aussagen über die Tertiärstruktur treffen.

#### 4.2.2 Entfaltungsübergänge von matSpz11.7

Zur weiteren biophysikalischen Charakterisierung wurden chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge des nicht-kovalenten Komplexes matSpz11.7 aufgenommen (3.5.4). Die konformationelle Stabilität für ProSpz11.7 und der Cystin-Knoten-Domäne wurde bereits ausführlich beschrieben (Hoffmann, 2009) und im Rahmen dieser Arbeit als Referenzen vermessen (Abbildung 4-11 (A)). Für die Entfaltung der Pro-Form wurde dabei die konformationelle Stabilität  $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 23,4 \pm 0,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  erhalten (alle weiteren thermodynamischen Parameter der Entfaltung sind in Tabelle 4-3 aufgeführt). Für die isolierte Cystin-Knoten-Domäne konnte die Stabilität von  $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 13,1 \pm 0,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  bestimmt werden. Die erhaltenen Werte stimmen gut mit den bereits ermittelten  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  überein (Hoffmann, 2009). Beide zeigten einen einzigen kooperativen Entfaltungsübergang, welcher mit einem Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden kann (3.5.4).

Für die Entfaltung von matSpz11.7 waren zwei distinkte Übergänge erkennbar, welche unabhängig voneinander ausgewertet wurden (Abbildung 4-11 (B-D)). Zum einen war bei GdmCl-Konzentrationen unter 1 M ein Übergang erkennbar, der mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei 320 nm einherging, bei konstantem  $\lambda_{\text{max}} = 346$  nm. Bei GdmCl-Konzentrationen von  $\sim 2,5$  M war ein zweiter Übergang, durch eine bathochrome Verschiebung der Tryptophanfluoreszenz (von  $\lambda_{\text{max}} = 346$  nm auf  $\lambda_{\text{max}} = 358$  nm), zu verzeichnen.



**Abbildung 4-11: Entfaltungsübergänge von matSpz11.7.**

Die normierten Übergangskurven von ProSpz11.7 (▲) und der Cystin-Knoten-Domäne (△) sind in (A) dargestellt. Die Entfaltungs- und Faltungsübergänge von matSpz11.7 wurden in Abhängigkeit der Proteinkonzentration gemessen und zeigten zwei unabhängig voneinander ausgewertete Übergangskurven. In (B) ist der Übergang bei hohen und in (C) bei niedrigeren GdmCl-Konzentrationen gezeigt. Die Auswertung der in (C) dargestellten Daten nach Gl. 3-16 (3.5.4) sowie einer Harnstoff-induzierten Entfaltungskurve von matSpz11.7 ist in (D) dargestellt. Alle Daten wurden bei 20 °C, einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 320 nm aufgenommen.

Anhand der Proteinfluoreszenzspektren (Abbildung 4-10 (A)) wurden diese beiden Prozesse als die Dissoziation beziehungsweise Entfaltung der Prodomänen und die Entfaltung der Cystin-Knoten-Domäne interpretiert. Da infolge der Änderung der Molekularität bei Dissoziationsreaktionen die Gleichgewichtslage abhängig von der Proteinkonzentration wird, wurden Entfaltungskurven in einem Konzentrationsbereich von 2 - 33 μM aufgezeichnet.

Der zweite Übergang (Entfaltung der CK) zeigte keine Konzentrationsabhängigkeit und konnte mit Hilfe eines Zwei-Zustands-Modell angepasst werden (Abbildung 4-11 (B)).

Der ermittelte  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  von  $13,1 \pm 1,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $m = 4,44 \pm 0,32 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ) ist dabei in guter Übereinstimmung mit den erhaltenen Wert für die isolierte Cystin-Knoten-Domäne.

Für den ersten Prozess wurde bei Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration eine Verschiebung des Übergangsmittelpunktes zu höheren Denaturationskonzentrationen beobachtet (Abbildung 4-11 (C)), was damit eine Änderung der Molekularität anzeigt. Für die Auswertung wurde eine dimeres Zwei-Zustands-Modell (3.5.4 (Gl. 3-16)) angewandt, welches die Entfaltung der als Dimer gebundenen 11.7Prodomänen beschreibt. Die Auswertung mehrerer unabhängiger Übergangskurven (Abbildung 4-11 (D)) ergab dabei einen  $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 38,58 \pm 0,51 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $m = 26,05 \pm 1,02 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ) für GdmCl-induzierte Entfaltung und  $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 39,06 \pm 0,57 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $m = 7,16 \pm 0,22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ) für Harnstoff-induzierte Entfaltung.

Die Messung eines Faltungsüberganges, ausgehend von vollständig denaturiertem matSpz11.7, zeigte, dass sowohl die Entfaltung der Cystin-Knoten-Domäne als auch die Dissoziation/Entfaltung der gebunden 11.7Prodomänen vollständig reversibel verläuft (Abbildung 4-11) und daher eine thermodynamische Auswertung möglich war.

Um eventuelle Änderungen in der chemischen Umgebung von Tyrosinen zu detektieren wurden alle Entfaltungsübergänge bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm gemessen. Jedoch zeigte keine der Spezies Unterschiede zu den Übergangskurven, die aus der Tryptophanfluoreszenz resultierten (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 4-3: Thermodynamische Parameter der GdmCl- und Harnstoff-induzierten Entfaltung von Spätzle11.7.**

Die angegebenen Fehler beziehen sich auf die Standardabweichung aus der nicht-linearen Regression.

Spezies	m-Wert in ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ )	$[\text{D}]_{0,5}$ in (M)	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ in ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Modell
ProSpz11.7	$11,42 \pm 0,38$	$2,05 \pm 0,01$	$23,4 \pm 0,9$	$\text{N} \rightleftharpoons \text{U}$
CK	$4,82 \pm 0,22$	$2,73 \pm 0,02$	$13,1 \pm 0,7$	$\text{N} \rightleftharpoons \text{U}$
CK (matSpz11.7)	$4,44 \pm 0,32$	$2,94 \pm 0,04$	$13,1 \pm 1,1$	$\text{N} \rightleftharpoons \text{U}$
11.7PD (matSpz11.7)	$26,05 \pm 1,02$	--	$38,58 \pm 0,51$	$\text{N}_2 \rightleftharpoons 2\text{U}$
11.7PD (matSpz11.7) Harnstoff	$7,16 \pm 0,22$	--	$39,06 \pm 0,57$	$\text{N}_2 \rightleftharpoons 2\text{U}$

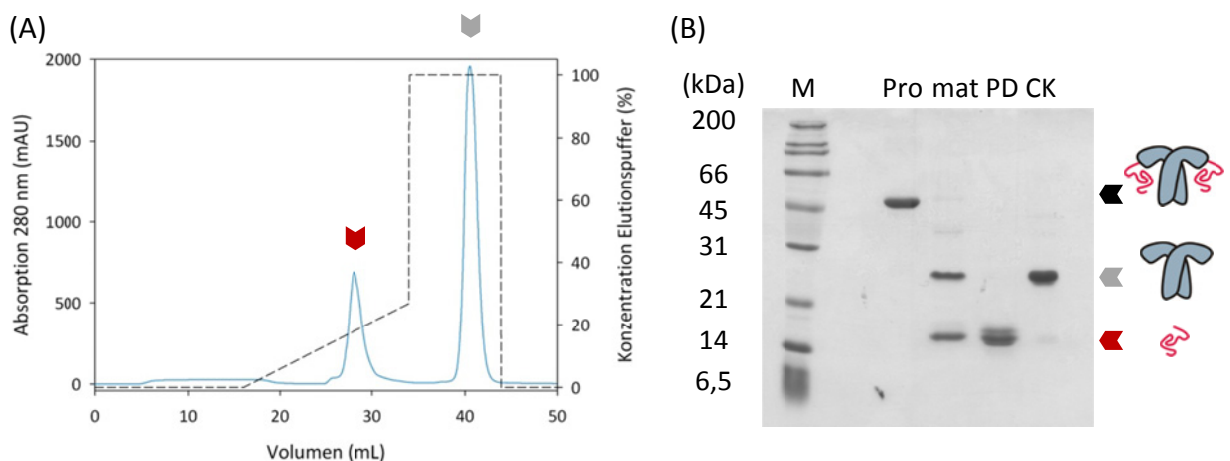


### 4.3 Charakterisierung der isolierten 11.7Prodomäne

#### 4.3.1 Reinigung und spektroskopische Charakterisierung der 11.7PD

Die Expression der isolierten 11.7Prodomäne (Aminosäuren 1 - 123, siehe Anhang 8.7), kloniert in dem Vektor pET21a(+), in diversen kommerziellen *E. coli*-Expressionsstämmen führte ausschließlich zu unlöslichem Protein in Form von *inclusion bodies* (Daten nicht gezeigt). Daher wurde beschlossen die 11.7Prodomäne ausgehend von dem renaturierten Volllängenprotein zu reinigen. Dazu wurde ProSpz11.7 mit aktiviertem Easter<sup>Xa</sup> bis zu einem quantitativen Umsatz (vgl. Abbildung 4-8 (A)) prozessiert (3.4.9). Durch Zusatz von 1,5 M GdmCl wurde die Assoziation der 11.7Prodomäne zur Cystin-Knoten-Domäne aufgelöst. Dies entspricht einer Denaturationskonzentration, bei welcher die 11.7Prodomäne vollständig dissoziiert ist, die Cystin-Knoten-Domäne hingegen weitestgehend in nativer Konformation vorliegen sollte (Abbildung 4-11 (A-C)).

Eine Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie unter diesen Bedingungen sollte in einer Trennung von freier 11.7Prodomäne und der C-terminal His<sub>6</sub>-tag-tragenden Cystin-Knoten-Domäne führen. Unter Verwendung dieses Protokolls (3.4.10) konnten aus matSpz11.7 zwei Spezies aufgereinigt werden (Abbildung 4-12). Die 11.7Prodomäne konnte in hoher Reinheit erhalten werden (Abbildung 4-12 (B)).

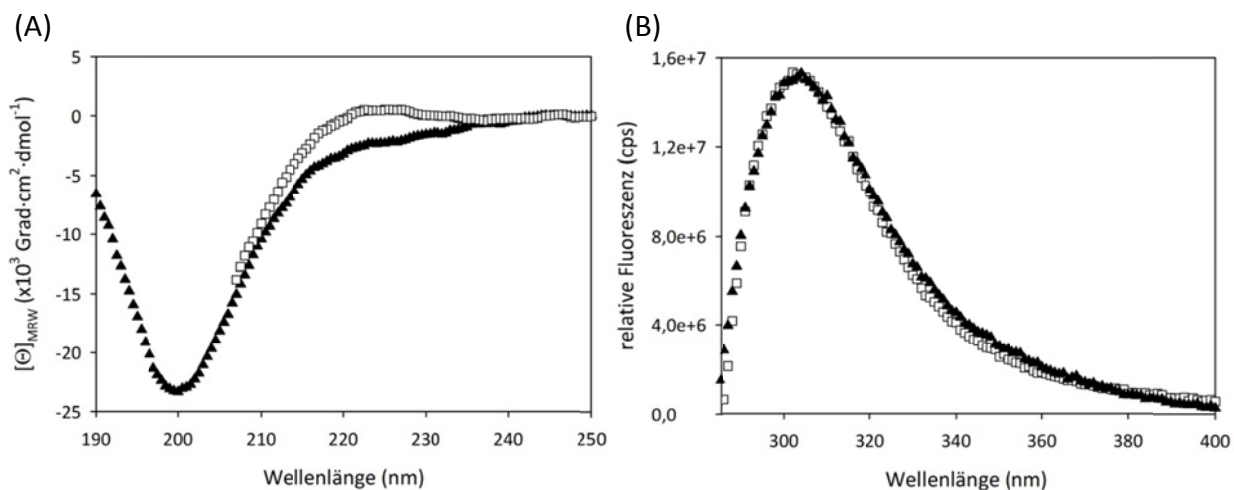


**Abbildung 4-12: Reinigung der 11.7Prodomäne.**

**(A)** Ein Elutionsprofil einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie von matSpz11.7 in 1,5 M GdmCl (Absorption 280 nm (—), Konzentration Elutionspuffer (---)) ist dargestellt. **(B)** Eine nicht-reduzierende SDS-PAGE des prozessierten matSpz11.7 vor der Reinigung sowie der Elutionsfraktionen der 11.7Prodomäne (♥) und der Cystin-Knoten-Domäne (♠) ist gezeigt (M: Proteingrößenstandard, Pro: ProSpz11.7, mat: matSpz11.7 vor der Reinigung, PD: Elutionsfraktion der 11.7Prodomäne, CK: Elutionsfraktion der Cystin-Knoten-Domäne).

Die leichte Inhomogenität in der Präparation der 11.7Prodomäne beruht auf einer Spaltung durch Easter<sup>Xa</sup> in der S<sup>2</sup>-Stelle (4.1.5). Die prozessierte Cystin-Knoten-Domäne konnte ebenfalls zu homogenem Protein gereinigt werden. Anschließend wurde für beide Domänen eine Größenausschlusschromatographie zur Entfernung des Denaturans durchgeführt.

Unter nativen Bedingungen zeigte die 11.7Prodomäne in Fern-UV-CD-Spektren eine stark ausgeprägte negative Elliptizität bei  $\sim 200$  nm (Abbildung 4-13 (A)). Dies entspricht einem typischen Spektrum für intrinsisch unstrukturierte Proteine oder poly(Pro)II-Helices (Uversky, 2002; Sreerama und Woody, 2004). Das Spektrum unter denaturierenden Bedingungen zeigt im Bereich von  $\sim 230 - 215$  nm mit einer leicht positiven Elliptizität nur geringe Unterschiede im Vergleich zu dem nativen Spektrum auf, was auf einen geringen Anteil an  $\beta$ -Strukturen im nativen Protein hindeutet.



**Abbildung 4-13: Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Spektren der 11.7Prodomäne.**

(A) Die Fern-UV-CD-Spektren und (B) Fluoreszenzspektren der isolierten 11.7Prodomäne unter nativen Bedingungen (▲) sind gezeigt. Alle Spektren wurden in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 bei 20 °C aufgenommen. Die offenen Symbole (□) zeigen die jeweiligen Spektren der denaturierten 11.7Prodomäne durch Zusatz von 1,5 M GdmCl. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 280 nm.

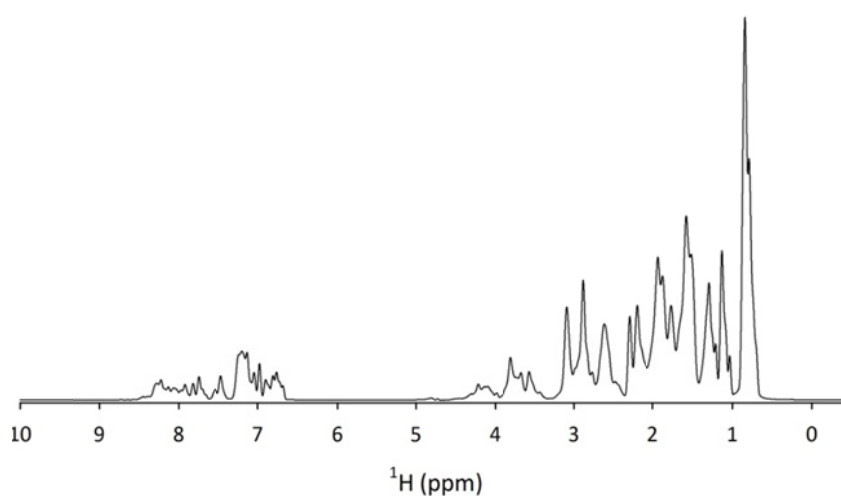
Eine Dekonvolution des Spektrums (Sreerama und Woody, 2000) ergab einen dominierenden Anteil an ungeordneten Strukturen (siehe Anhang 8.10, Tabelle 8-1).

Theoretische Spektren der an der Cystin-Knoten-Domäne gebundenen 11.7Prodomäne wurden durch entsprechende Differenzspektren kalkuliert. Hier zeigen sich insbesondere in dem Bereich  $\sim 200 - 230$  nm spektrale Unterschiede zu der isolierten 11.7Prodomäne (Abbildung 8-10 (A)). Die Dekonvolution der Differenzspektren deutet auf einen höheren Anteil  $\alpha$ -helikaler Strukturen und eine signifikante Abnahme des Anteils ungeordneter Bereiche in der gebundenen 11.7Prodomäne hin (Tabelle 8-1).

Dies ist im Einklang mit einer 15 Aminosäure langen, amphipathischen  $\alpha$ -Helix innerhalb der Spätzle-Prodomäne, welche sequenzbasiert postuliert wurde (Arnot *et al.*, 2010) (siehe Anhang 8.2).

Die Fluoreszenzemissionspektren (Abbildung 4-13 (B)) mit einem Maximum bei 300 nm sind charakteristisch für Tyrosinfluoreszenzspektren, da die 11.7Prodomäne kein Tryptophan, aber drei Tyrosine enthält. Da keine Änderungen in der Fluoreszenzintensität zwischen den Spektren unter nativen und denaturierenden Bedingungen zu beobachten sind, sind alle Fluorophore vermutlich lösungsmittlexponiert. Somit deuten die Circular dichroismus- und Fluoreszenzspektren darauf hin, dass die isolierte 11.7Prodomäne keine signifikanten Sekundär- und Tertiärstrukturen aufweist. Aufgrund der geringen spektralen Unterschiede konnten auch keine chemisch-induzierten Entfaltungsübergänge auf diesem Wege gemessen werden.

Zur weiteren strukturellen Charakterisierung der 11.7Prodomäne wurden daher eindimensionale Protonenspektren aufgezeichnet (3.5.6). Es ist zu erkennen, dass die Amidprotonenregion (für strukturierte Proteine kann allgemein eine chemische Verschiebung von 6 - 10 ppm angenommen werden) nur Signale bis 8,5 ppm zeigt (Abbildung 4-14). Dieser schmale Dispersionbereich legt eine eher unstrukturierte 11.7Prodomäne nahe. Insbesondere ein breiter Peak bei  $\sim 8,3$  ppm ist ein Indikator für Rückgrat-Amidprotonen, welche sich in einem *random coil* befinden (Rehm *et al.*, 2002).

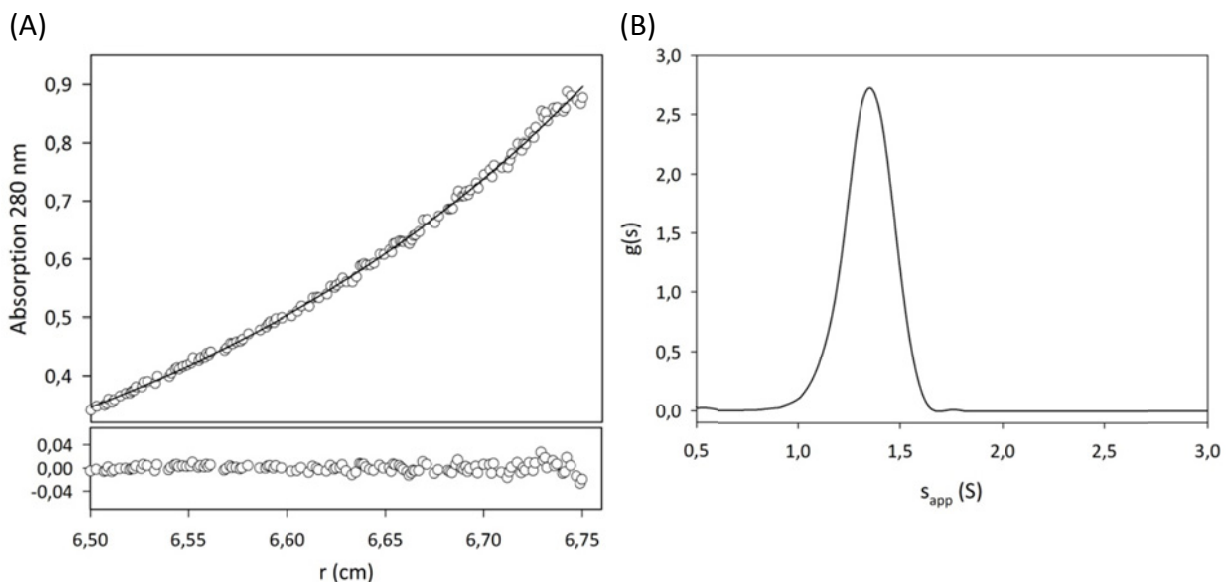


**Abbildung 4-14: Eindimensionales Protonenresonanzspektrum der 11.7Prodomäne.**

Das eindimensionale Protonenspektrum der isolierten 11.7PD ist dargestellt. Das Spektrum wurde in 20 mM NaHPO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM NaCl, 5 % (v/v) D<sub>2</sub>O, pH 7,4 bei 25 °C und einer Proteinkonzentration von 180  $\mu$ M aufgezeichnet.

Es konnten keine Protonenresonanzen hochfeldverschoben von 0,6 ppm, wie für Methylgruppen mit Tertiärkontakten zu erwarten wäre, detektiert werden. Dies ist ebenfalls ein Indiz dafür, dass die isolierte 11.7Prodomäne intrinsisch unstrukturiert vorliegt und somit die fluoreszenz- und CD-spektroskopischen Daten bestätigt.

Weiterhin wurden Ultrazentrifugationsexperimente (3.5.7) bei einer Proteinkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  durchgeführt (Abbildung 4-15). Die Datenanpassung der Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse ergab einen  $s_{\text{app}} = 1,32 \text{ S}$  ( $s_{20,W} = 1,32 \text{ S}$ ) und für ein Sedimentationsgleichgewicht eine apparente Molekülmasse von  $M_{r,\text{app}} = 15\,100$ , was für einen monomeren Zustand der isolierten 11.7Prodomäne spricht.



**Abbildung 4-15: Analytische Ultrazentrifugation der 11.7Prodomäne.**

**(A)** Das Sedimentationsgleichgewicht wurde für 22 h bei 18 000 rpm (An50Ti-Rotor) eingestellt. Das obere Diagramm zeigt die radiale Konzentrationsverteilung und das untere die residuale Abweichung der nicht-linearen Regression. **(B)** Die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung, gemessen bei 40 000 rpm, ist gezeigt. Die Daten wurden in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 bei 20 °C mit einer Proteinkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  aufgezeichnet.

### 4.3.2 Interaktionsanalyse von 11.7Prodomäne und Cystin-Knoten-Domäne mittels zweidimensionaler Kernspinresonanz

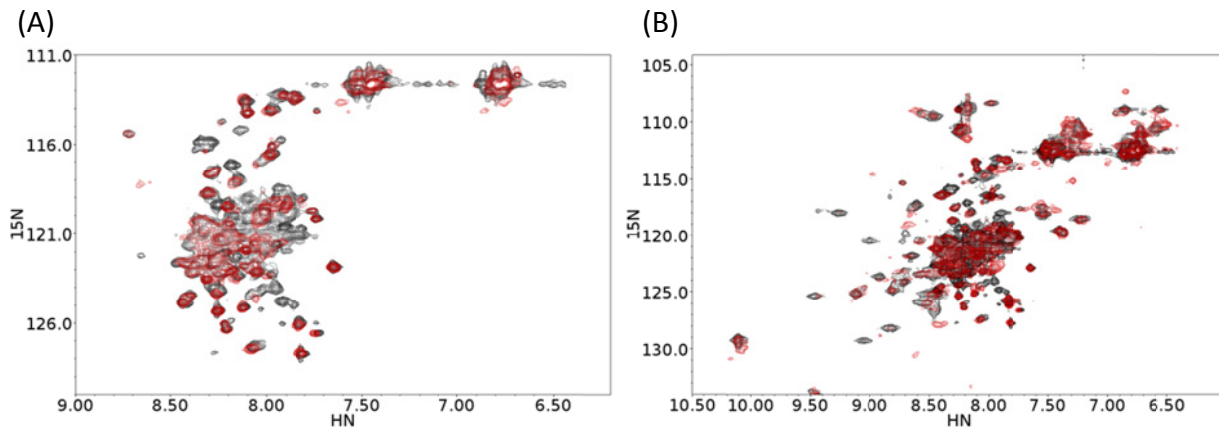
Die zweidimensionale Kernspinresonanzspektroskopie erlaubt sowohl eine strukturelle Charakterisierung von Proteinen als auch die Untersuchung der Proteindynamik in hoher Ortsauflösung. Weiterhin ermöglicht die NMR-Spektroskopie neben der Strukturbestimmung gefalteter Polypeptidketten auch eine Charakterisierung intrinsisch unstrukturierter Proteine.

In fHSQC-Spektren werden alle Amidgruppen entsprechend ihrer  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzfrequenz dargestellt. Diese zweidimensionalen Korrelationen geben Informationen über die chemische Umgebung aller Rückgratamidgruppen und lassen Aussagen über den Faltungszustand eines Proteins zu. Die Pro-Form von Spz11.7 als auch matSpz11.7 sind mit 54 kDa, aufgrund der zu erwartenden kurzen transversalen Relaxationszeit ( $T_2$ ) und der damit verbundenen großen Linienbreite und geringen Signalintensität, für Kernspinresonanzmessungen ungeeignet.

Durch jeweilige Titration einer  $^{15}\text{N}$ -markierten Domäne mit unmarkiertem Bindungspartner, sollten die Anzahl der Signale in zweidimensionalen fHSQC-Spektren reduziert und strukturelle Änderungen nachgewiesen werden. Für eine  $^{15}\text{N}$ -Markierung wurde ProSpz11.7 in Minimalmedium, supplementiert mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , exprimiert (3.3.1). Ausgehend von der Pro-Form wurde nach Easter<sup>xa</sup>-Prozessierung die  $^{15}\text{N}$ -markierte 11.7PD und  $^{15}\text{N}$ -markierte Cystin-Knoten-Domäne gereinigt (3.4.10). Anschließend wurden  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -fHSQC-Spektren der freien 11.7Prodomäne sowie der Cystin-Knoten-Domäne aufgezeichnet (3.5.6).

Die isolierte 11.7Prodomäne weist nur eine geringe Dispersion und Ansammlung der meisten Signale um die Protonenresonanzfrequenz von  $\sim 8,3$  ppm auf (Abbildung 4-16 (A)), was charakteristisch für entfaltete Proteine ist (Rehm *et al.*, 2002). Die zwei dominanten Signale bei den Protonenresonanzfrequenzen von  $\sim 6,9$  und  $7,5$  ppm bei gleicher  $^{15}\text{N}$ -Resonanz entsprechen den Amidprotonen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin. Für die Cystin-Knoten-Domäne wurde eine bessere Signaldispersion beobachtet was auf einen größeren Anteil geordneter Strukturen hinweist (Abbildung 4-16 (B)).

Durch Titration der  $^{15}\text{N}$ -markierten 11.7PD mit der unmarkierten Cystin-Knoten-Domäne sollten Änderungen in der chemischen Umgebung, durch Bildung des nicht-kovalenten Komplexes matSpz11.7 oder eventuell auftretende Änderungen des Faltungszustandes, analysiert werden.



**Abbildung 4-16:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -fHSQC-Spektren der 11.7PD und der Cystin-Knoten-Domäne.**

Die Spektren von **(A)**  $^{15}\text{N}$ -11.7PD bei einer Konzentration von  $143\ \mu\text{M}$  (schwarz) sowie nach der Titration mit  $^{14}\text{N}$ -CK zu einer Endkonzentration von  $102\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -11.7PD und  $97\ \mu\text{M}$   $^{14}\text{N}$ -CK (rot) sind dargestellt. **(B)** In dem reziproken Experiment wurden  $100\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -CK (schwarz) mit unmarkierter  $^{14}\text{N}$ -11.7PD zu Endkonzentrationen von  $48\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -CK und  $103\ \mu\text{M}$   $^{14}\text{N}$ -11.7PD titriert (rot). Alle Messungen wurden in  $20\ \text{mM}$   $\text{NaHPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $20\ \text{mM}$   $\text{NaCl}$ ,  $5\ \%$  (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7,5 bei  $25\ ^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Es ist zu erkennen, dass es lediglich zu einer Abnahme der Signalintensität distinkter Kreuzsignale kommt. Diese Intensitätsabnahme kann die Zunahme der Molekülmasse durch die Assoziationsreaktion widerspiegeln, wodurch die Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$  kleiner wird (größer werdende Rotationskorrelationszeit  $\tau_m$ ) (Kay *et al.*, 1998) und die Linienbreite der NMR-Resonanzen anwächst. Weiterhin können auch Austauschprozesse, wie beispielsweise eine Assoziation und Dissoziation der Domänen, zu einer Linienverbreiterung und damit Intensitätsabnahme führen. Dies kann dazu führen, dass diese zwei Zustände ( $\omega_A$  und  $\omega_B$ ) NMR-spektroskopisch nicht getrennt aufgelöst werden (Palmer *et al.*, 2001).

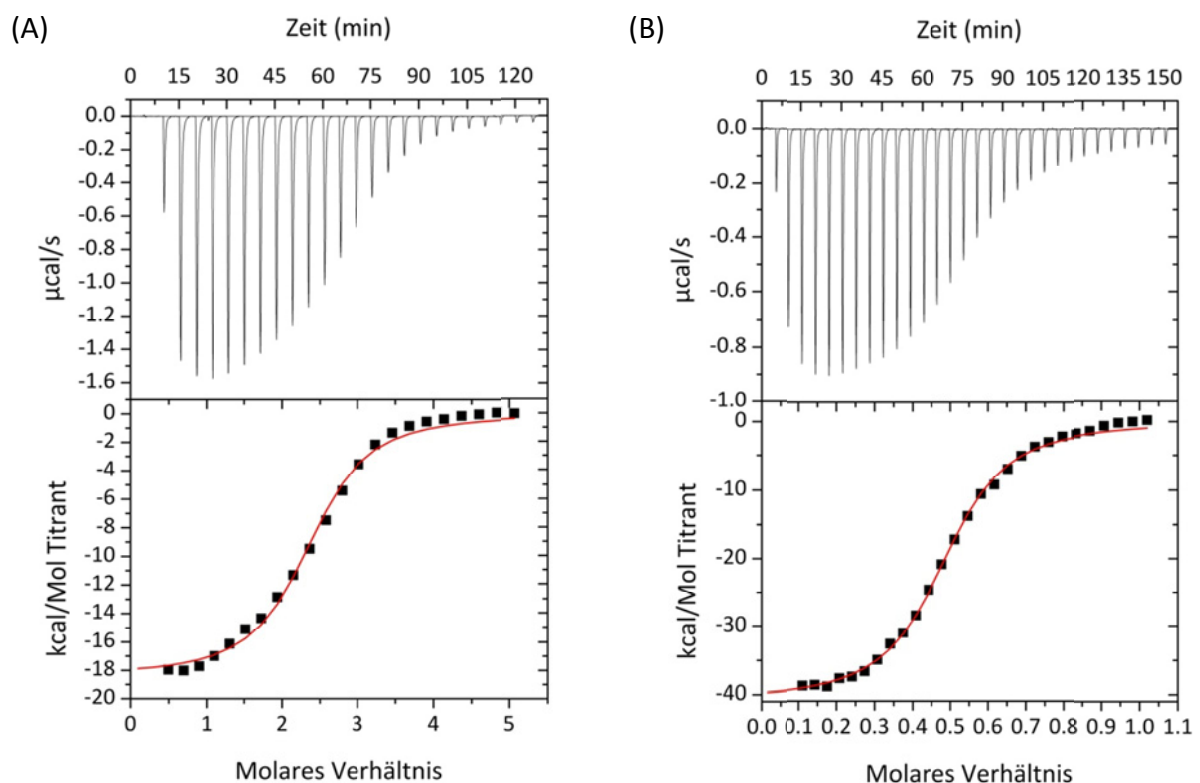
In dem reziproken Experiment mit  $^{15}\text{N}$ -markierter Cystin-Knoten-Domäne und unmarkierter 11.7Prodomäne ergaben sich qualitativ ähnliche Ergebnisse (Abbildung 4-16 (B)). Aus den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -fHSQC-Spektren lässt sich allgemein ableiten, dass nur geringe konformationelle Änderungen in den Domänen NMR-spektroskopisch erfassbar sind.

### 4.3.3 Interaktionsanalyse der 11.7PD und CK mittels ITC

Eine quantitative Charakterisierung der Interaktion zwischen der 11.7Prodomäne und Cystin-Knoten-Domäne wurde mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (3.5.5) durchgeführt. Die Cystin-Knoten-Domäne und die 11.7Prodomäne wurden gereinigt (3.4.10) und in zueinander inversen Experimenten jeweils als Titrant (Protein in der Injektionsspritze) und Analyt (Protein in der Messzelle) eingesetzt.

Bei Titration der 11.7Prodomäne zu der Cystin-Knoten-Domäne wurde die erwartete Stöchiometrie von zwei gebundenen Prodomänen pro CK-Dimer erhalten (Abbildung 4-17 (A), Tabelle 4-4). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante wurde dabei zu  $K_D = 0,73 \pm 0,09 \mu\text{M}$  bestimmt. Das reziproke Experiment lieferte eine analoge Stöchiometrie mit 0,5 CK-Dimer pro 11.7PD und einer Gleichgewichtskonstante von  $K_D = 0,22 \pm 0,01 \mu\text{M}$  (Abbildung 4-17 (B)).

Aus den gemessenen apparenten Bindungsenthalpien  $\Delta_B H_{\text{app}} = -18,42 \pm 0,31 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  bzw.  $-40,90 \pm 0,36 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  wird ersichtlich, dass in beiden Experimenten derselbe Prozess beobachtet wird. Die Messungengenauigkeit der Bindungsstöchiometrie für die 11.7Prodomäne resultiert vermutlich aus der Ungenauigkeit der Bestimmung der Proteinkonzentration, da die 11.7Prodomäne keinerlei Tryptophane aufweist. Dies erklärt auch, warum sich in den inversen Titrationen die apparenten Bindungsenthalpien nicht exakt um den Faktor zwei unterscheiden (Tabelle 4-4).



**Abbildung 4-17: Isothermale Titration der 11.7PD und der Cystin-Knoten-Domäne.**

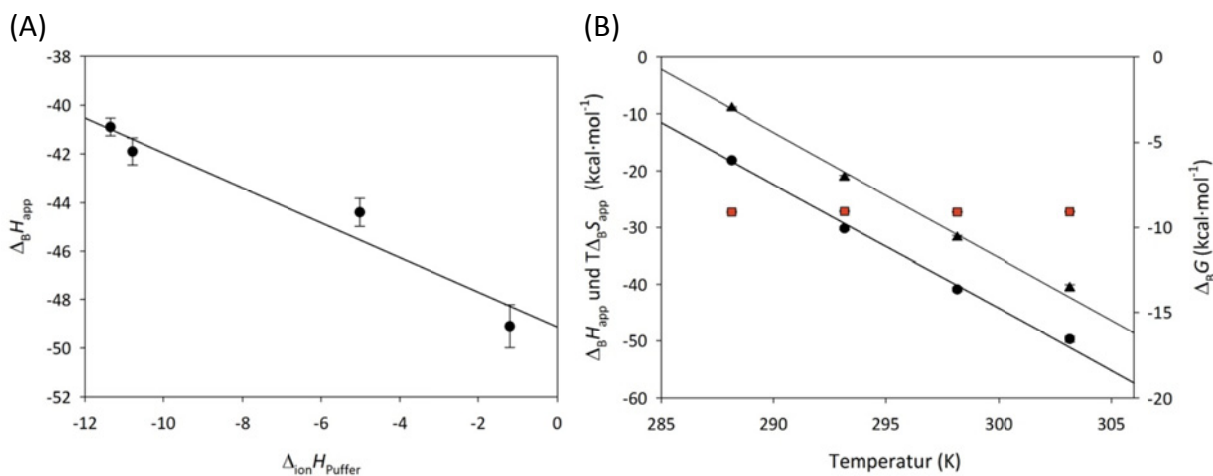
Es sind die Thermogramme und ausgewerteten Bindungskurven für die isothermale Titrationskalorimetrie der 11.7PD und der Cystin-Knoten-Domäne gezeigt. **(A)** 248  $\mu\text{M}$  11.7PD wurde zu 10,8  $\mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne titriert und in dem inversen Ansatz **(B)** wurde 66  $\mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne zu 15  $\mu\text{M}$  11.7PD titriert. Alle Messungen wurden bei 25  $^{\circ}\text{C}$  in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt und um die Verdünnungswärme des Titranten korrigiert. Die nicht-lineare Regression erfolgte mit Hilfe eines Modells für einen Satz identischer Bindungsstellen.

**Tabelle 4-4: Bindungsparameter der Interaktion von 11.7PD und CK bei 25 °C.**

Für ITC erfolgt die Angabe der gemessenen Wärmen im Allgemeinen in Form von Kalorie (cal). Die Umrechnung in die SI-Einheit Joule ist definiert mit: 1 cal = 4,182 J. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf die Standardabweichung aus der nicht-linearen Regression.

Titrant	Analyt	n	$K_D$ in ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta_B G$ in ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$\Delta_B H_{\text{app}}$ in ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$T\Delta_B S_{\text{app}}$ in ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
11.7PD	CK	$2,33 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,09$	$-8,37 \pm 0,07$	$-18,42 \pm 0,31$	$-10,05$
CK	11.7PD	$0,48 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$	$-9,08 \pm 0,03$	$-40,90 \pm 0,36$	$-31,82$

Durch Messung der Bindungsparameter in Puffern unterschiedlicher Ionisationsenthalpie konnte eine Änderung der Anzahl gebundener Protonen bei der Bindungsreaktion  $M_{H^+} = 0,71 \pm 0,12$  bestimmt werden (Abbildung 4-18 (A), siehe Anhang 8.11). Dabei erfolgt bei der Bindung eine Aufnahme von Protonen aus der Lösung. Durch Extrapolation auf eine theoretische Bedingung mit  $\Delta_{\text{ion}}H_{\text{Puffer}} = 0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  wurde die tatsächliche Bindungsenthalpie für die Interaktion der 11.7Prodomänen und der Cystin-Knoten-Domäne mit  $\Delta_B H = -49,13 \pm 1,09 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  und die Bindungsentropie mit  $T\Delta_B S = -40,19 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  bestimmt.

**Abbildung 4-18: Puffer- und Temperaturabhängigkeit der 11.7PD-Bindung.**

**(A)** Die apparente Bindungsenthalpie  $\Delta_B H_{\text{app}}$  wurde in Puffern unterschiedlicher Ionisationswärme gemessen ( $\Delta_{\text{ion}}H_{\text{Puffer}}$  Phosphat:  $-1,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , HEPES:  $-5,02 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , Bis-Tris-Propan:  $-10,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , Tris:  $-11,26 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Freire, 1994; Tellmann, 1998)) und über Gl. 3-30 angepasst. Alle Messungen wurden in 20 mM Puffer, 20 mM NaCl, pH 7,4 bei 25 °C durchgeführt. Es wurden jeweils 60 - 85  $\mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne zu 10 - 15  $\mu\text{M}$  11.7Prodomäne titriert. **(B)** Die Bindungsreaktion wurde bei variierender Temperatur analysiert. Die gemessene apparente Bindungsenthalpie  $\Delta_B H_{\text{app}}$  (●), die aus der Assoziationskonstante berechnete freie Bindungsenthalpie  $\Delta_B G$  (rechte Skala, (■)) sowie die kalkulierten Werte der Bindungsentropie  $T\Delta_B S_{\text{app}}$  (▲) sind dargestellt. Die lineare Anpassung der Bindungsenthalpien erfolgte über Gl. 3-37. Die Messungen wurden in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt und jeweils 66  $\mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne zu 15  $\mu\text{M}$  11.7Prodomäne titriert. Alle Daten wurden um die Verdünnungswärme des Titranten korrigiert.



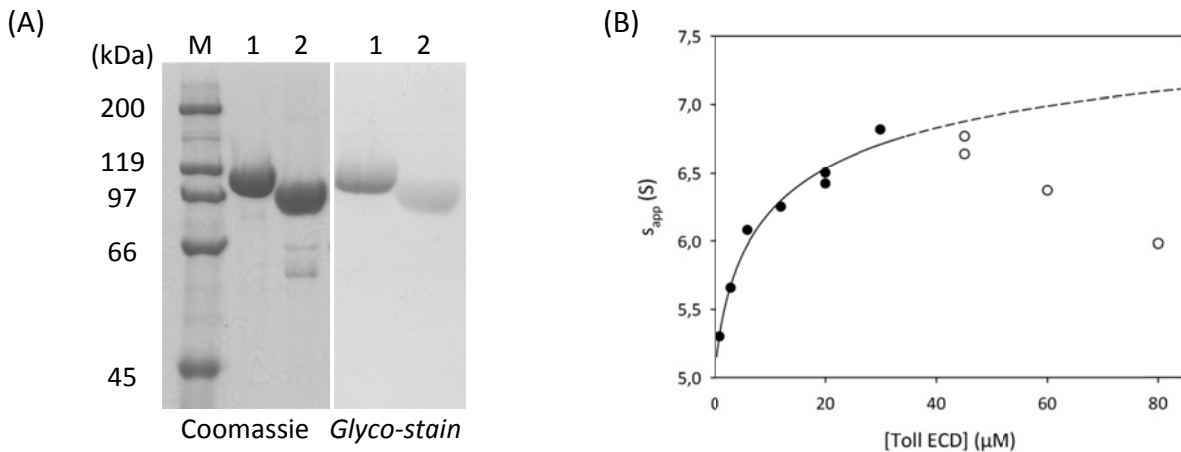
Zur weiteren thermodynamischen Charakterisierung des Bindungsprozesses sollte die bei der Interaktion auftretende Änderung der isobaren Wärmekapazität  $\Delta_B C_p$  bestimmt werden. Dadurch können qualitative Aussagen über die Art der Wechselwirkung getroffen werden (Ha *et al.*, 1989). Die isothermalen Bindungskurven wurden in Abhängigkeit der Temperatur aufgenommen und aus den erhaltenen Werten der apparenten Bindungsenthalpien  $\Delta_B H_{app}$  über Gl. 3-37 der  $\Delta_B C_p = -2,18 \pm 0,09 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$  berechnet (Abbildung 4-18 (B), siehe Anhang 8.12). In dem betrachteten Temperaturbereich blieb  $K_D$  und damit  $\Delta_B G$  weitestgehend konstant. Diese Enthalpie-Entropie-Kompensation resultiert aus dem stark negativen  $\Delta_B C_p$  und ist eine allgemeine Eigenschaft von Reaktionen bei denen  $|\Delta_B C_p| \gg |\Delta_B S|$  gilt (Ha *et al.*, 1989).

#### 4.4 Interaktion von Spätzle11.7 und der Toll-Rezeptor-Ektodomäne

##### 4.4.1 Dimerisierung der Toll-Rezeptor-Ektodomäne

Die Toll-Rezeptor-Ektodomäne (Toll ECD) wurde in einer stabilen S2-Expressionszelllinie exprimiert (3.3.2) und nach einem etablierten Protokoll gereinigt (Stelter *et al.*, 2013). Dies führte zu homogenem Protein mit einer Ausbeute von 50 - 80 mg pro Liter Kulturmedium. Eine Glykoprotein-Färbung (*Glycoprotein Staining Kit*, 3.1.6) zeigte, dass die gereinigte Toll ECD glykosyliert vorlag (Abbildung 4-19 (A)). Massenspektrometrisch wurden bereits 17 Glykosylierungsstellen nachgewiesen (Stelter *et al.*, 2013). Nach Deglykosylierung der Toll ECD mit der Endoglucosidase Endo H<sub>f</sub> (3.1.7) für 4 Stunden bei 37 °C war eine Änderung des elektrophoretischen Laufverhaltens zu sehen. Die erhaltene apparente Molekülmasse von ~ 90 kDa entsprach dem erwarteten Wert für die deglykosylierte Toll ECD. Die schwache Färbung des mit Endo H<sub>f</sub> behandelten Proteins beruht auf dem Verbleib von N-Acetylglucosamin-Gruppen an den glykosylierten Asn-Seitenketten, da dieses Enzym nur den Chitobiose-Kern der mannosereichen Oligosaccharide spaltet (Maley *et al.*, 1989).

Zur Untersuchung des Assoziationsgrades wurden analytische Ultrazentrifugationsexperimente durchgeführt (3.5.7) und die Sedimentationsgeschwindigkeit der glykosylierten Toll ECD in Abhängigkeit von der Gesamtproteinkonzentration gemessen (Abbildung 4-19 (B)). Mit zunehmender Proteinkonzentration war eine Zunahme von  $s_{app}$  zu verzeichnen, was mit einem Assoziationsprozess erklärt werden kann.



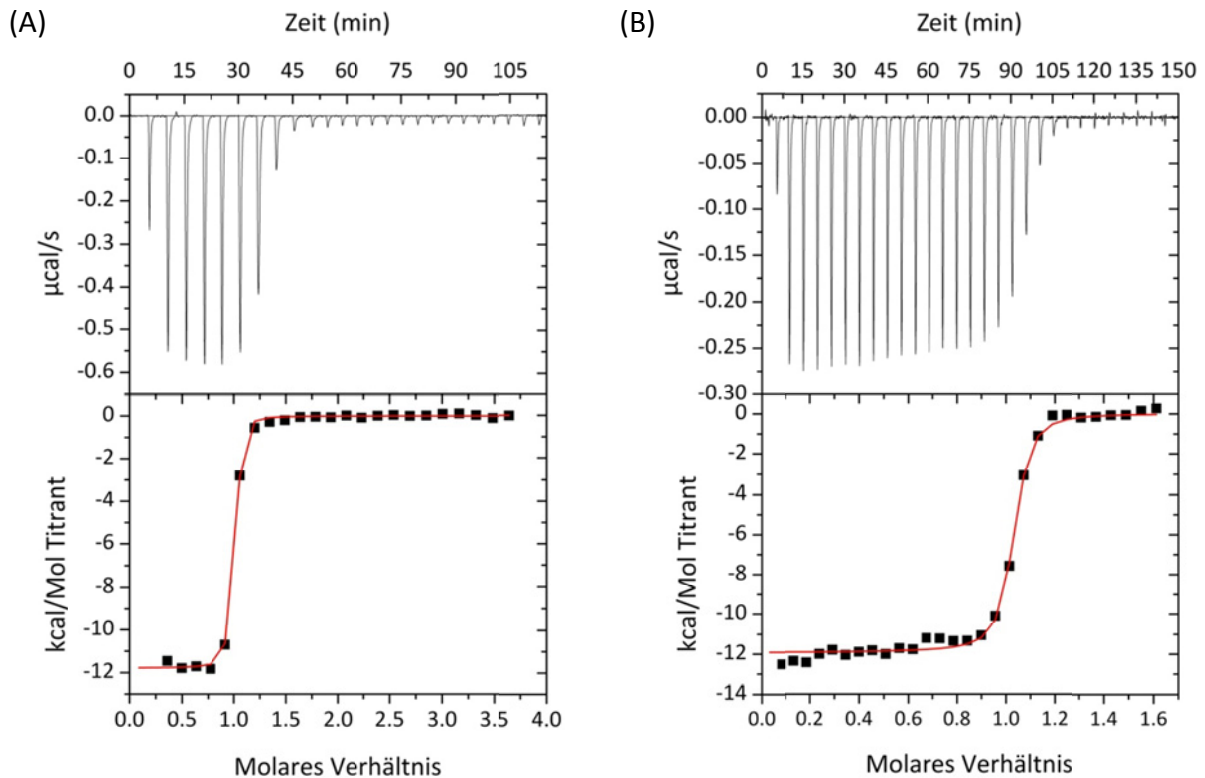
**Abbildung 4-19: Reinigung und analytische Ultrazentrifugation der Toll ECD.**

(A) Eine reduzierende SDS-PAGE der gereinigten Toll ECD nach Coomassie-Färbung und *Glycoprotein-staining* (3.1.6) ist gezeigt (M: Proteingrößenstandard, 1: gereinigte Toll ECD, 2: nach Endo H<sub>F</sub>-Behandlung). (B) Die Sedimentationsgeschwindigkeit der glykosylierten Toll ECD wurde in Abhängigkeit der Proteinkonzentration gemessen und nach einem Dimerisierungsmodell angepasst (Gl. 3-44 - Gl. 3-47, (●)). Die experimentellen Daten, die eine Nicht-Idealität der Lösung anzeigten, wurden nicht mit einbezogen (○). Alle Messungen wurden in 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,005 % (w/v) Nonidet P40, pH 7,4 bei 25 °C und 40 000 rpm (An50Ti-Rotor) durchgeführt.

Die erhaltenen Daten wurden über ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht angepasst. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante wurde zu  $K_D \approx 6,0 \pm 5,4 \mu\text{M}$  bestimmt. Für die monomere Spezies wurde ein  $s_{app,M} = 4,9 \pm 0,3 \text{ S}$  und für das Dimer  $s_{app,D} = 8,0 \pm 0,6 \text{ S}$  erhalten. Da auf Grund der experimentellen Parameter das Assoziationsgleichgewicht nicht bis zum Erreichen der Sättigung gemessen werden konnte, ist der  $K_D$  nur als Näherungswert zu betrachten.

#### 4.4.2 Interaktionsanalyse von Toll ECD und Spz11.7 mittels ITC

Die isothermale Titrationskalorimetrie erlaubt die gleichzeitige Bestimmung von Bindungsstöchiometrie, Gleichgewichtsdissoziationskonstante und der apparenten Bindungsenthalpie. Zu Beginn wurde die Interaktion der Toll ECD und der gereinigten Cystin-Knoten-Domäne untersucht. Damit sollte überprüft werden, ob die spezifische Prozessierung mittels Easter<sup>Xa</sup>, im Gegensatz zu dem allgemein verwendeten Protokoll der limitierten Proteolyse mit Trypsin (Weber *et al.*, 2003), die Bindungseigenschaften der Cystin-Knoten-Domäne beeinflusst. Dazu wurde die Cystin-Knoten-Domäne aus der Pro-Form von Spz11.7 durch Easter<sup>Xa</sup>-Prozessierung isoliert (3.4.9, 3.4.10). Für alle Interaktionsstudien wurde ausschließlich die vollständig glykosylierte Toll ECD (Abbildung 4-19, (A)) verwendet.



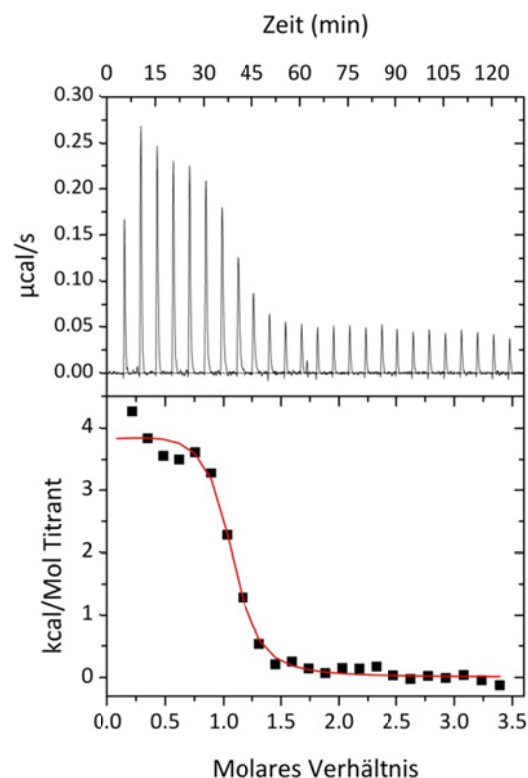
**Abbildung 4-20: Isothermale Titration der Toll ECD und Cystin-Knoten-Domäne.**

Die ITC-Kurven wurden aufgenommen durch **(A)** Titration von 131 µM Toll ECD zu 8,4 µM Cystin-Knoten-Domäne, sowie **(B)** in einem reziproken Experiment mit 68 µM Cystin-Knoten-Domäne und 9 µM Toll ECD. Alle Messungen wurden bei 25 °C in 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt und um die Verdünnungswärme des Titranten korrigiert. Die Datenanpassung erfolgte mit einem Modell für einen Satz identischer Bindungsstellen.

Isothermale Titrationsexperimente zeigten, dass die Cystin-Knoten-Domäne mit einer nanomolaren Affinität an die Toll ECD bindet, wobei nur geringfügige Unterschiede zwischen der direkten und reziproken Titration zu verzeichnen waren. Bei Titration der Toll ECD zu der Cystin-Knoten-Domäne wurde die Gleichgewichtsdissoziationskonstante zu  $K_D = 5,9 \pm 1,1$  nM und die apparente Bindungsenthalpie zu  $\Delta_B H_{app} = -11,78 \pm 0,07$  kcal·mol<sup>-1</sup> bestimmt (Abbildung 4-20, Tabelle 4-5). Für das reziproke Experiment wurden Werte von  $K_D = 9,8 \pm 1,7$  nM und  $\Delta_B H_{app} = -11,92 \pm 0,08$  kcal·mol<sup>-1</sup> erhalten. In beiden Fällen wurde eine Stöchiometrie von  $n = 1$  mit einem gebundenen Dimer Cystin-Knoten-Domäne pro Monomer Toll ECD erhalten. Auf Grund der messtechnischen Detektionsgrenze von  $\sim 0,2$  µcal·s<sup>-1</sup> war es jedoch nötig die Messungen mit einer Analytkonzentration (bei  $C \geq 1000$  (Gl. 3-31)) durchzuführen, bei welcher nur  $\Delta_B H_{app}$  und  $n$  mit hoher Genauigkeit bestimmt werden können,  $K_D$  jedoch nicht (Wiseman *et al.*, 1989; Jelesarov und Bosshard, 1999). Eine Möglichkeit diese Limitierung zu umgehen, neben der Variation der Pufferbedingungen, stellt die Verdrängungstitration dar (3.5.5).

Bei dieser Methode wird die Gleichgewichtsassoziationskonstante eines hochaffinen Bindungspartners, durch ein kompetitives Gleichgewicht mit einem niederaffinen Liganden, in einen messtechnisch zugänglichen Bereich apparent gesenkt (Gl. 3-34). Übertragen auf das hier bearbeitete System können die 11.7Prodomäne und die Toll ECD als konkurrierende Liganden um die Bindung an die Cystin-Knoten-Domäne betrachtet werden. Voraussetzung für die Auswertung nach einem kompetitiven Bindungsmodell ist, dass kein ternärer Komplex gebildet wird, also an einem CK-Protomer entweder die 11.7Prodomäne oder Toll ECD gebunden ist. Dies konnte anhand bereits publizierter Daten (Weber *et al.*, 2007) ausgeschlossen werden.

In einer Verdrängungstitration wurde als Analyt eine Lösung von 10  $\mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne und 40  $\mu\text{M}$  11.7Prodomäne verwendet, zu welcher 151  $\mu\text{M}$  Toll ECD titriert wurden (Abbildung 4-21). An der aufgebrachten Heizleistung ist bereits erkennbar, dass im Gegensatz zur direkten Bindung von Toll ECD an die Cystin-Knoten-Domäne (Abbildung 4-20) hier ein endothermer Prozess beobachtet wird. Dies ist mit der Verdrängung der 11.7Prodomäne zu erklären.



**Abbildung 4-21: Verdrängungstitration von Toll ECD und matSpz11.7.**

Bei einer kompetitiven Titration wurde 152  $\mu\text{M}$  Toll ECD zu 10  $\mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne und 40  $\mu\text{M}$  11.7PD titriert. Die Daten wurden um die Verdünnungswärme des Titranten sowie um die Verdünnungswärme des Analyten mit Puffer korrigiert. Die nicht-lineare Regression erfolgte mit einem kompetitiven Bindungsmodell mit festgesetzten Werten für  $K_{A,PD} = 1,36 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  und  $\Delta_B H_{PD,app} = -18,42 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Tabelle 4-4). Die Messung wurde in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 bei 25 °C durchgeführt.

Die exotherme Bindungsenthalpie  $\Delta_B H_{\text{Toll,app}} = -11,78 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  wird durch die in diesem Fall endotherme Dissoziationsenthalpie  $\Delta_D H_{\text{PD,app}} = 18,42 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  kompensiert. Zur Auswertung der Daten nach einem kompetitiven Bindungsmodell (Gl. 3-34) wurden die unter 4.3.3 (Tabelle 4-4) bestimmten Werte für  $K_{\text{D,PD}}$  und  $\Delta_B H_{\text{PD,app}}$  für die Bindung der 11.7Prodomäne in der nicht-linearen Regression festgesetzt. Dabei ergab sich eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_{\text{D,Toll}} = 2,56 \pm 0,6 \text{ nM}$  und eine Bindungsenthalpie von  $\Delta_B H_{\text{Toll,app}} = -14,13 \pm 0,08 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  für die Interaktion der Toll ECD und der Cystin-Knoten-Domäne (Tabelle 4-5). Die Daten konnten ebenfalls nach einem einfachen Bindungsmodell, mit einem Satz identischer Bindungsstellen, ausgewertet werden. In Näherung können dann die gemessenen Werte  $K_{\text{D,obs}}$  und  $\Delta_B H_{\text{obs}}$ , unter Verwendung einer über die gesamte Titration gemittelten Konzentration [PD], mit Gl. 3-35 und Gl. 3-36 in die tatsächlichen Bindungsparameter umgerechnet werden (Sigurskjold, 2000), welche in Abwesenheit der 11.7Prodomäne messbar wären. Dadurch wurden Werte von  $K_{\text{D,Toll}} = 2,4 \text{ nM}$  und  $\Delta_B H_{\text{Toll,app}} = -14,25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  erhalten. Alle erhaltenen Werte zur Analyse der Interaktion von Spz11.7 und der Toll ECD sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

**Tabelle 4-5: Bindungsparameter der Interaktion von Toll ECD und Spz11.7.**

Zur Auswertung der Verdrängungstitration wurde ein kompetitives Bindungsmodell angenommen. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf die Standardabweichung aus der nicht-linearen Regression.

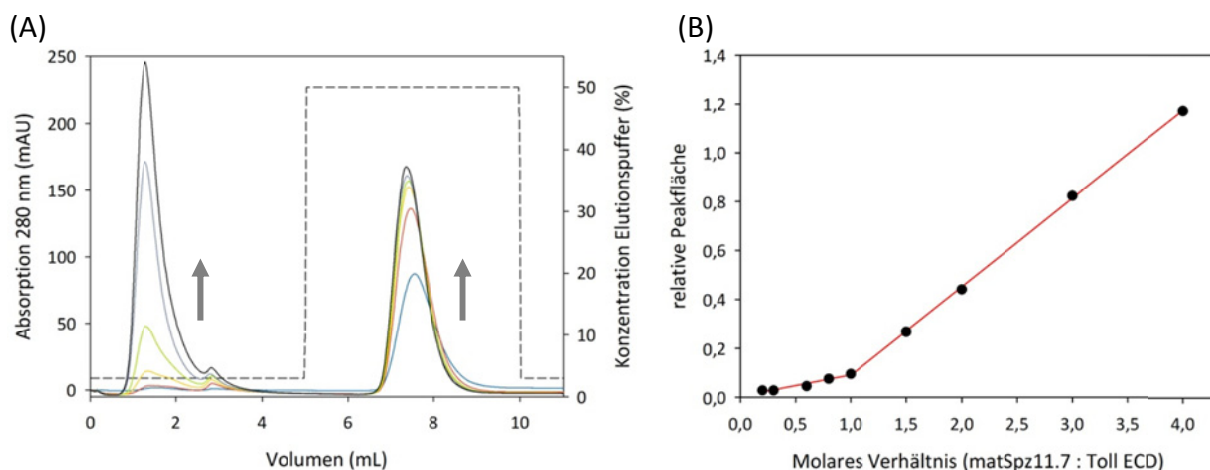
Titrant	Analyt	n	$K_D$ in (nM)	$\Delta_B G$ in (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta_B H_{\text{app}}$ in (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta_B S_{\text{app}}$ in (kcal·mol <sup>-1</sup> )
Toll ECD	CK	$0,940 \pm 0,003$	$5,9 \pm 1,1$	$-11,22 \pm 0,11$	$-11,78 \pm 0,07$	-0,56
CK	Toll ECD	$1,010 \pm 0,003$	$9,2 \pm 1,6$	$-10,96 \pm 0,10$	$-11,92 \pm 0,08$	-0,96
Toll ECD	CK + 11.7PD	$1,01 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,6$	$-11,73 \pm 0,14$	$-14,13 \pm 0,08$	-2,40

Es ist zu erkennen, dass für die direkte Titration und die Verdrängungstitration ein nahezu identischer  $K_{\text{D,Toll}}$  erhalten wurde. Die erhaltene apparente Bindungsenthalpie von  $\Delta_B H_{\text{Toll,app}} = -14,13 \pm 0,08 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  der Verdrängungstitration weicht jedoch von dem erwarteten Wert  $\Delta_B H_{\text{Toll,app}} = -11,78 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  signifikant ab.

Aus den Daten ist weiterhin ersichtlich, dass die Bindung von Toll ECD an die dimere Cystin-Knoten-Domäne vermutlich nicht zu einer Dissoziation beider gebundenen 11.7Prodomänen führt. Dies hätte zu einer messbaren Bindungsenthalpiedifferenz von  $\Delta_B H_{\text{obs}} \approx 29 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  geführt. Es wurden jedoch nur  $\Delta_B H_{\text{obs}} = 3,95 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  gemessen (Abbildung 4-21).

#### 4.4.3 Säulenchromatographische Interaktionsanalyse von Toll und Spz11.7

Als weitere unabhängige, direkte Messung der Bindungsstöchiometrie wurde ein Titrationsexperiment durchgeführt, welches auf der säulenchromatographischen Trennung von Komplex und freien Liganden beruht. Dafür wurde in einzelnen Ansätzen Toll ECD, bei einer konstanten Konzentration von 20  $\mu\text{M}$ , mit steigenden Konzentrationen matSpz11.7 (4.2.1) titriert. Um eine Trennung von Toll ECD bzw. dem gebildeten Komplex von dem freien Liganden auf einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätssäule zu gewährleisten, wurde eine Spz-Variante ohne C-terminalen His<sub>6</sub>-tag mit den Aminosäureresten 1 - 229 (siehe Anhang 8.7) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 25 °C wurden die einzelnen Titrationsansätze auf eine 1 mL HisTrapHP-Säule geladen und die Peakflächen der Durchflussfraktion, welche den freien Ligand matSpz11.7 enthalten, sowie der Elutionsfraktion mit dem gebildeten Komplex und freier Toll ECD, bestimmt (Abbildung 4-22). Mit zunehmender Konzentration an matSpz11.7 stieg die Absorption der Durchflussfraktion an, wohingegen in der Elutionsfraktion auf Grund der konstanten Konzentration an Toll ECD ein Sättigungsverhalten auftrat. Bei Auftragung der relativen Peakflächen gegen das molare Verhältnis ergab sich ein scharfer Titrationspunkt bei einer Stöchiometrie von  $n = 1$  (Abbildung 4-22 (B)).

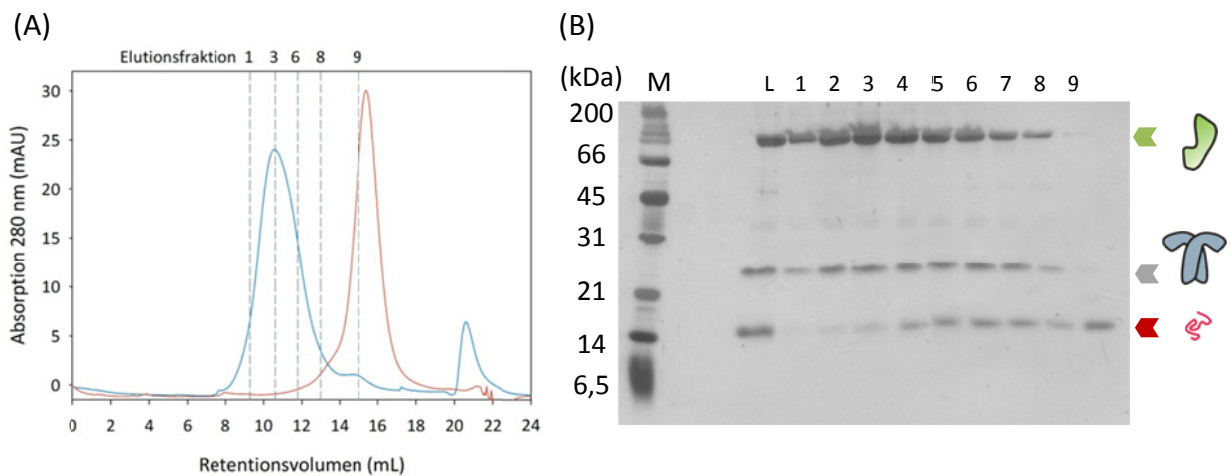


**Abbildung 4-22: Bindungsstöchiometrie der Spz11.7-Toll-Bindung.**

**(A)** Die Elutionsprofile (Konzentration Elutionspuffer (---)) der einzelnen Titrationsansätze bei 4 °C sind gezeigt. Die Pfeile zeigen den Verlauf bei steigender Konzentration von matSpz11.7 an. Als Bindepuffer diente 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 15 mM Imidazol, pH 7,4 und als Elutionspuffer 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 0,5 M Imidazol, pH 7,4. Alle Ansätze enthalten 20  $\mu\text{M}$  Toll ECD und 0,2 - 80  $\mu\text{M}$  matSpz11.7. **(B)** Die relativen Peakflächen der Durchflussfraktion und Elutionsfraktion wurden gegen das eingesetzte molare Verhältnis aufgetragen. Eine Integration der Peakflächen erfolgte mit der bereitgestellten Software von Amersham Biosciences (Freiburg).

Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE zeigte, dass in dem eluierten Komplex keinerlei 11.7Prodomäne detektierbar war (siehe Anhang 8.13). Da infolge der Immobilisierung und Trennung des Komplexes von dem freien Liganden für die Dauer der Affinitätschromatographie nicht alle Komponenten im Gleichgewicht standen war eine artifizielle Dissoziation der 11.7Prodomäne nicht auszuschließen.

Daraufhin wurde das Elutionsverhalten eines äquimolaren Komplexes von Toll ECD und matSpz11.7 über eine Größenausschlusschromatographie untersucht (Abbildung 4-23). Die Analyse der einzelnen Elutionsfraktionen mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE und Silberfärbung (3.4.1) zeigte, dass die Toll ECD und die Cystin-Knoten-Domäne zusammen eluieren und vergleichbare Änderungen der Bandenintensität zeigten. Hingegen wies die 11.7Prodomäne mit jeweils  $\sim 11,8$  mL und  $\sim 15$  mL maximale Intensitäten abseits der Hauptelutionsfraktion von Toll ECD auf. Ein Vergleich mit einem Referenzprofil der isolierten 11.7Prodomäne zeigt jedoch, dass innerhalb des putativen Komplexes Toll ECD–matSpz11.7 die 11.7Prodomäne auch bei geringeren Retentionsvolumen eluierte als in der Referenz.



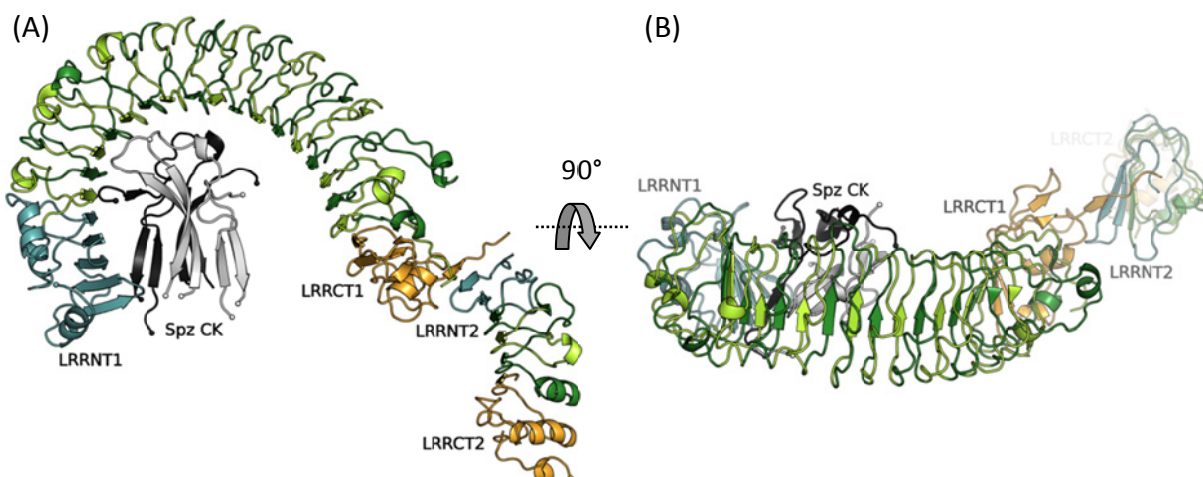
**Abbildung 4-23: Größenausschlusschromatographie des Toll ECD–matSpz11.7-Komplexes.**

(A) Die Elutionsprofile von einem Toll ECD -matSpz11.7-Komplex bei einer Proteinkonzentration von  $20 \mu\text{M}$  (—) sowie der freien 11.7Prodomäne bei  $250 \mu\text{M}$  (—) auf einer S75 10/300 GL ist gezeigt. Als Laufpuffer wurde  $20 \text{ mM Tris/HCl}$ ,  $20 \text{ mM NaCl}$ ,  $\text{pH } 7,4$  verwendet. (B) Die Probe vor der Größenausschlusschromatographie (L) als auch die einzelnen Elutionsfraktionen (1-9) wurden mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Die Toll ECD (◀), CK (◀) und 11.7Prodomäne (◀) sind gekennzeichnet (M: Proteingrößenstandard, 1:  $9,3 \text{ mL}$ , 2:  $10,1 \text{ mL}$ , 3:  $10,6 \text{ mL}$ , 4:  $11,0 \text{ mL}$ , 5:  $11,4 \text{ mL}$ , 6:  $11,8 \text{ mL}$ , 7:  $12,2 \text{ mL}$ , 8:  $13,0 \text{ mL}$ , 9:  $15 \text{ mL}$ ).



#### 4.4.4 Der halbseitig gereifte Ligand hcSpz11.7

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur eines Komplexes der *DmToll* ECD mit der Spätzle Cystin-Knoten-Domäne publiziert (Parthier *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu den TLR-Ligand-Komplexen aus Vertebraten, welche eine Ligand-induzierte Rezeptordimerisierung zeigen (1.4.2), wurde für *DmToll* nur ein monomerer Komplex (bestehend aus einem Molekül Toll ECD und einem Molekül Cystin-Knoten-Domäne) kristallisiert (Abbildung 4-24). Weiterhin bindet die Cystin-Knoten-Domäne an der konkaven Seite des Solenoids der Toll ECD und nicht an der lateralen, „aufsteigenden“ Seite, wie es für die Ligandenbindung der TLRs beschrieben wurde (Botos *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2012). Die beiden Protomere der Cystin-Knoten-Domäne weisen in dem Toll-Spätzle-Komplex einen asymmetrischen Beitrag bei der Rezeptorinteraktion auf (Parthier *et al.*, 2014), wobei die potentielle Interaktionsfläche für die Prodomäne (Hoffmann *et al.*, 2008) des einen Protomers nicht in der Rezeptorbindung involviert ist. Da die Spätzle-Prodomänen die Interaktion zu dem Toll-Rezeptor blockieren (Weber *et al.*, 2003) stellte sich die Frage, ob die Prozessierung einer Dimer-Hälfte in Spätzle ausreichend ist um eine Bindung an die Toll ECD zu ermöglichen. Weiterhin indizierte die isothermale Verdrängungstitration, dass die Bindung der zweiten 11.7Prodomäne, unabhängig der Bindung der Toll ECD an dem ersten Protomer, bestehen bleiben kann (4.4.2).



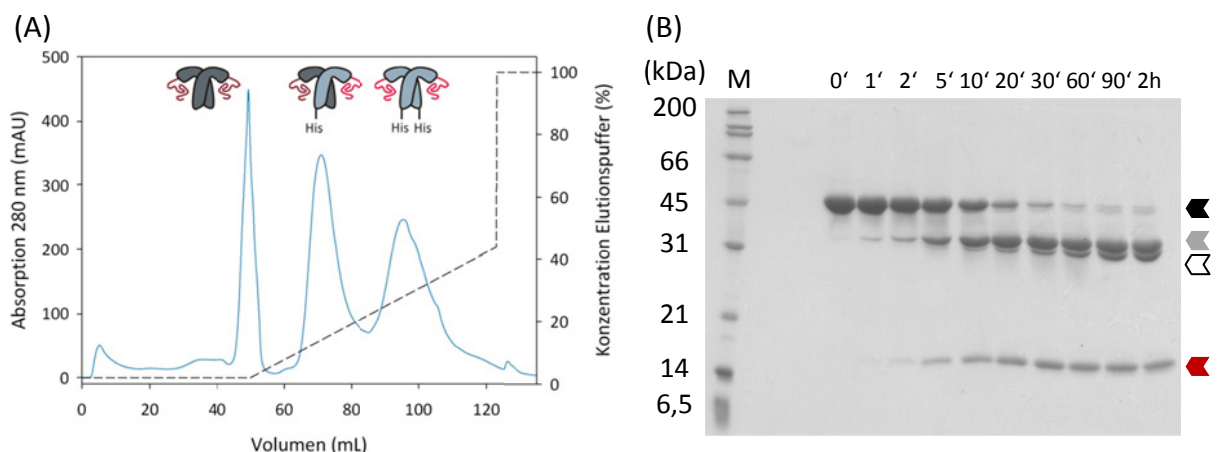
**Abbildung 4-24: Quartärstruktur des *DmToll* ECD–Spätzle CK-Komplexes**

(A) Die Quartärstruktur des *DmToll* ECD–Spätzle CK-Komplexes ist als *cartoon*-Darstellung gezeigt. (B) Der Komplex mit einer um 90° rotierten Ansicht ist dargestellt (PDB-Code: 4LXR (Parthier *et al.*, 2014)). Die LRRs der Toll ECD sind alternierend grün und cyan und orange gefärbt. Die Cystin-Knoten-Domäne ist mit den einzelnen Monomeren in weiß und schwarz gezeigt.



Zu diesem Zweck wurde ein Proteinkonstrukt erstellt, welches nur halbseitig durch Easter<sup>Xa</sup> prozessierbar ist, und in Interaktionsanalysen den asymmetrischen Bindungsmodus bestätigen sollte. Dazu wurde bei der *in vitro*-Renaturierung (3.4.5) ein äquimolares Verhältnis von ProSpz11.7 mit C-terminalem His<sub>6</sub>-tag (Aminosäurereste 1 - 237, siehe Anhang 8.7) und nicht-prozessierbaren ncProSpz11.7 ohne His<sub>6</sub>-tag (Aminosäurereste 1 - 229) verwendet. Dies sollte in drei dimeren Spezies, welche sich in der Anzahl ihrer His<sub>6</sub>-tags unterscheiden, resultieren, die anschließend über eine Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie getrennt werden können (3.4.7). Es ist zu erkennen, dass eine Spezies bereits im Durchfluss eluierte, welche ein Dimer von ncProSpz11.7 ohne His<sub>6</sub>-tag darstellt. Es traten weiterhin zwei Elutionsfraktionen auf, welche das Dimer hcProSpz11.7 mit einem His<sub>6</sub>-tag und ein Dimer von ProSpz11.7 mit zwei His<sub>6</sub>-tags repräsentieren (Abbildung 4-25 (A)).

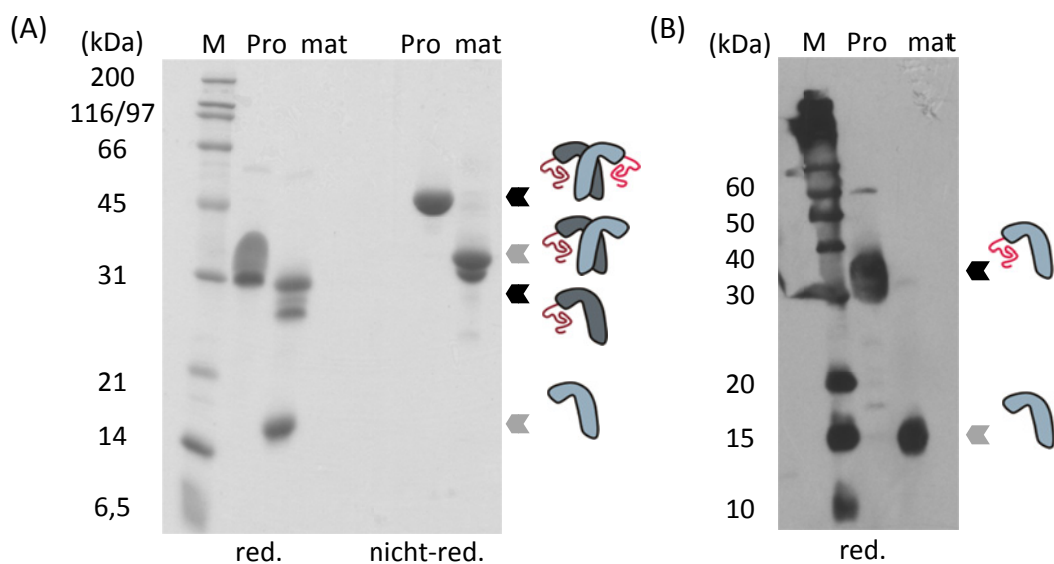
Eine Analyse der Prozessierungskinetik von hcProSpz11.7 mit Easter<sup>Xa</sup> zeigte, dass wie erwartet keine Reifung zu der Cystin-Knoten-Domäne erfolgte (Abbildung 4-25 (B)). Vielmehr akkumulierte eine Bande bei einer apparenten Molekülmasse von ~ 35 kDa, welche dem halbseitig prozessierten Intermediat (~ 39 kDa erwartet) entspricht. Weiterhin ist ersichtlich, dass eine zweite Bande bei ~ 31 kDa auftrat. Diese ist auf die Spaltung an der noch vorhandenen S<sup>2</sup>-Stelle LFNR<sup>168</sup>-T<sup>169</sup>DT von ncSpz11.7 zurückzuführen (4.1.5). Die 11.7Prodomäne ist bei ~ 18 kDa erkennbar. Das halbseitig gereifte hcSpz11.7 konnte nach dem etablierten Protokoll (3.4.10) von der 11.7Prodomäne abgetrennt werden.



**Abbildung 4-25: Reinigung und Prozessierung von hcSpz11.7.**

**(A)** Ein Elutionsprofil (Absorption 280 nm (—), Konzentration Elutionspuffer (...)) einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie zur Reinigung von hcProSpz11.7 ist gezeigt. **(B)** Der zeitliche Verlauf der Prozessierung von hcProSpz11.7 (◼) mit Easter<sup>Xa</sup> zu hcSpz11.7 (◻) und 11.7PD (◼) wurde mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE analysiert. Das sekundäre Proteolyseprodukt (◻) durch Spaltung der S<sup>2</sup>-Stelle ist markiert. Es wurden 20 µM der Pro-Form mit einem 50-fachen molaren Überschuss an Easter<sup>Xa</sup> bei 30 °C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen (M: Proteingrößenstandard).

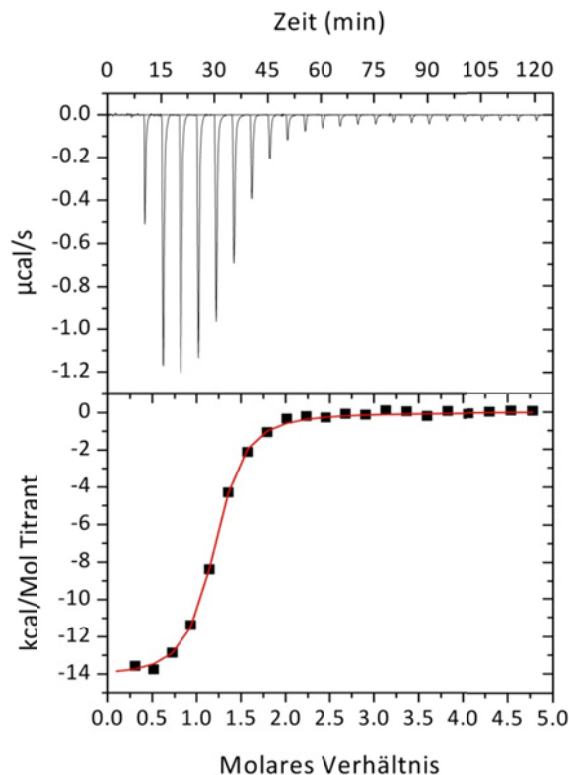
Eine Analyse des gereinigten Proteins mittels SDS-PAGE und *Western Blot* (Abbildung 4-26) bestätigte, dass prozessiertes hcSpz11.7 aus zwei unterschiedlichen disulfidverbrückten Protomeren aufgebaut ist. Unter reduzierenden Bedingungen wurden diese getrennt in die monomere Pro-Form von ncSpz11.7 mit einer apparenten Molekülmasse von  $\sim 30$  kDa (26 kDa erwartet) und eine monomere gereifte Cystin-Knoten-Domäne bei  $\sim 15$  kDa (13 kDa erwartet). Die Bande bei  $\sim 28$  kDa entspricht wiederum der durch sekundäre Prozessierung N-terminal verkürzten Pro-Form von ncSpz11.7. Die Analytik mittels *Western Blot*, unter Verwendung eines anti-Pentahistidin Antikörpers, zeigte ein deutliches Signal bei  $\sim 15$  kDa für die monomere Cystin-Knoten-Domäne, während auf Höhe der Pro-Form von ncSpz11.7, welches keinen His<sub>6</sub>-tag trägt, kein Signal detektiert werden konnte. Somit kann geschlussfolgert werden, dass in dem disulfidverbrückten Dimer von hcSpz11.7 lediglich ein Monomer in gereifter Form vorlag.



**Abbildung 4-26: Analyse des prozessierten hcSpz11.7.**

(A) Das Easter<sup>Xa</sup>-prozessierte, gereinigte hcSpz11.7 wurde mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. (B) Ein *Western-Blot* unter Verwendung eines anti-Pentahistidin-Antikörpers ist vergleichend dargestellt. Die Pro-Form (◀) und prozessierte Form (◀) sind entsprechend gekennzeichnet (M: Proteingrößenstandard, Pro: Pro-Form von hcSpz11.7, mat: Easter<sup>Xa</sup>-gereiftes und gereinigtes hcSpz11.7).

Zur weiteren Analyse wurde mittels isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht, ob das gereifte Protomer in der Lage ist die 11.7Prodomäne nicht-kovalent zu binden (Abbildung 4-27). Es konnte eine Bindungsstöchiometrie von  $n = 1,13$  beobachtet werden. Dies spiegelt wider, dass lediglich ein Protomer in der Lage war eine 11.7Prodomäne nicht-kovalent zu binden.



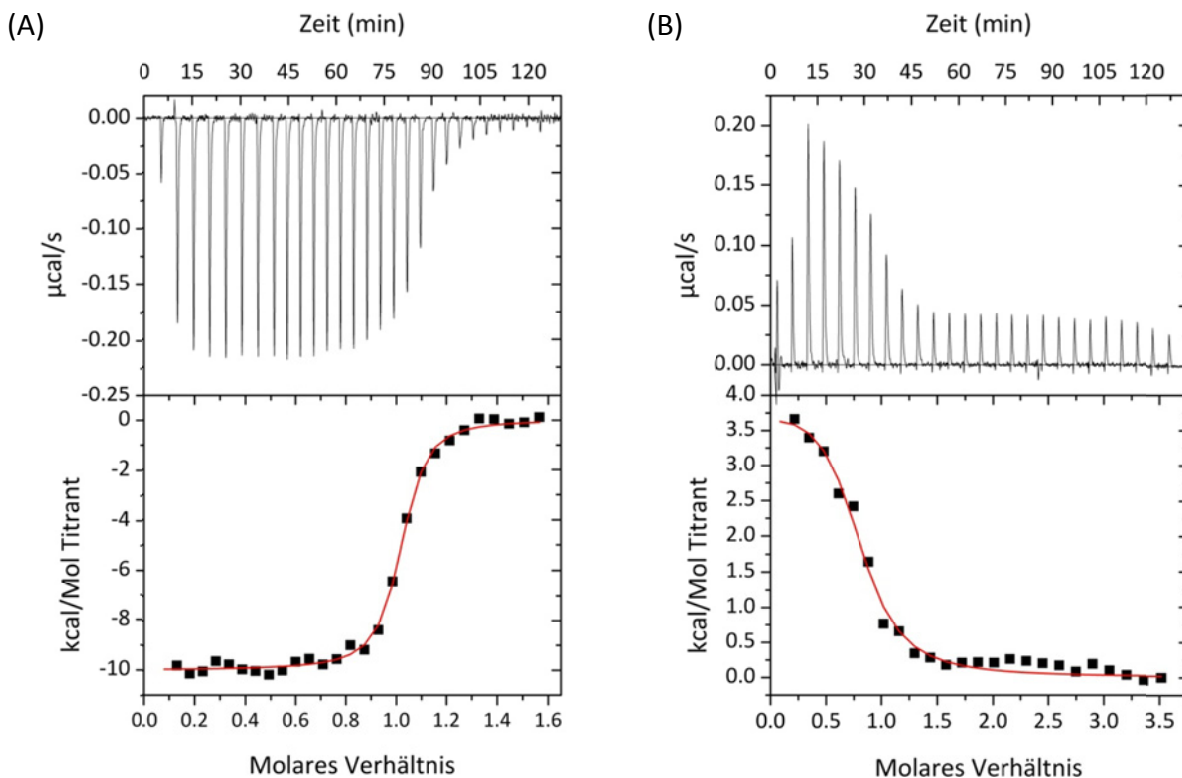
**Abbildung 4-27: Isothermale Titration von hcSpz11.7 und der 11.7Prodomäne.**

Das Thermogramm und die ausgewertete Bindungskurve der Titration von 10  $\mu\text{M}$  hcSpz11.7 mit 248  $\mu\text{M}$  11.7Prodomäne ist gezeigt. Die Messung wurde bei 25  $^{\circ}\text{C}$  in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt und um die Verdünnungswärme des Titranten korrigiert. Die nicht-lineare Regression erfolgte mit Hilfe eines Modells für einen Satz identischer Bindungsstellen.

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante konnte zu  $K_D = 0,25 \pm 0,02 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Somit weist hcSpz11.7 eine vergleichbare Affinität zu der 11.7Prodomäne wie die vollständig gereifte Cystin-Knoten-Domäne auf ( $K_D = 0,73 \mu\text{M}$ , vgl. Tabelle 4-4). Für die Bindungsenthalpie wurde ein Wert von  $\Delta_B H_{\text{app}} = -14,2 \pm 0,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  bestimmt, welcher signifikant von der ermittelten Bindungsenthalpie für die Interaktion zu der isolierten Cystin-Knoten-Domäne abweicht ( $\Delta_B H_{\text{app}} = -18,42 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , vgl. Tabelle 4-4). Dies deutet darauf hin, dass die kovalent gebundene Prodomäne in dem ncSpz11.7-Protomer die Assoziation der zweiten 11.7Prodomäne an dem gereiften Protomer beeinflusst.

#### 4.4.5 Interaktionsanalyse von Toll und hcSpz11.7 mittels ITC

Das Easter<sup>Xa</sup>-gereifte und gereinigte hcSpz11.7 wurde folgend zur Interaktionsanalyse, analog zu den beschriebenen Experimenten mit der vollständig gereiften Cystin-Knoten-Domäne (4.4.2), eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Prozessierung eines Protomers ausreichend ist um die Interaktion mit der Toll ECD zu gewährleisten (Abbildung 4-28 (A)).



**Abbildung 4-28: Isothermale Titration der Toll ECD und hcSpz11.7.**

Die Thermogramme und ausgewerteten Bindungskurven für **(A)** eine direkte Titration von 9 µM Toll ECD mit 68 µM hcSpz11.7 sowie **(B)** einer Verdrängungstitration mit 10 µM hcSpz11.7 und 20 µM 11.7Prodomäne als Analyt und 152 µM Toll ECD als Titrant sind gezeigt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die direkte Titration wurde in 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 und die Verdrängungstitration in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt. Alle Messungen wurden um die entsprechenden Verdünnungswärmen korrigiert. Die nicht-lineare Regression erfolgte mit Hilfe eines Modells für einen Satz identischer Bindungsstellen (A) bzw. nach einem kompetitiven Bindungsmodell (B).

Die direkte isothermale Titrationskalorimetrie ergab eine Bindungsstöchiometrie von  $n = 1$  wie es bereits für die Cystin-Knoten-Domäne beschrieben wurde. Mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 23,04 \pm 2,6$  nM wies hcSpz11.7 eine vergleichbar hohe Affinität zu der Toll ECD wie die CK auf. Die apparente Bindungsenthalpie von  $\Delta_B H_{app} = -9,99 \pm 0,06$  kcal·mol<sup>-1</sup> zeigte jedoch einen deutlichen Unterschied zur Bindungsreaktion der Cystin-Knoten-Domäne ( $\Delta_B H_{app} = -11,78$  kcal·mol<sup>-1</sup>, vgl. Tabelle 4-5).

Zur exakten Bestimmung der Gleichgewichtskonstante wurden kompetitive Titrationsexperimente mit der 11.7Prodomäne durchgeführt. Dazu wurde als Analyt eine Lösung von 10 µM hcSpz11.7 und 20 µM 11.7Prodomäne eingesetzt, welche mit 152 µM Toll ECD titriert wurde (Abbildung 4-28 (B)). Die in unabhängigen Messungen bestimmten Bindungsparameter  $K_{D,PD}$  und  $\Delta_B H_{PD,app}$  der 11.7Prodomäne an hcSpz11.7 (4.4.4, Abbildung 4-27) wurden bei der Datenauswertung festgesetzt.

Die Titration mit Toll ECD führte zu einer Dissoziation der nicht-kovalent gebundenen 11.7Prodomäne, da die exotherme Bindungsenthalpie  $\Delta_B H_{\text{Toll,app}} = -9,99 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  durch die endotherme Dissoziationsenthalpie  $\Delta_D H_{\text{PD,app}} = 14,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  kompensiert wurde.

Mit einem kompetitiven Bindungsmodell konnte die Gleichgewichtsdissoziationskonstante zu  $K_{D,\text{Toll}} = 6,85 \pm 1,3 \text{ nM}$  bestimmt werden, welche sehr gut mit den erhaltenen Wert für die Interaktion mit der isolierten Cystin-Knoten-Domäne (Tabelle 4-5) übereinstimmt. Für die apparente Bindungsenthalpie konnte ein Wert von  $\Delta_B H_{\text{Toll,app}} = -9,93 \pm 0,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  erhalten werden, welcher identisch ist mit dem Wert bei einer direkt gemessenen Interaktion zwischen Toll ECD und hcSpz11.7 (Tabelle 4-6).

**Tabelle 4-6: Bindungsparameter der Interaktion von Toll ECD und hcSpz11.7.**

Zur Auswertung der Verdrängungstitration wurde ein kompetitives Bindungsmodell angenommen. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf die Standardabweichung aus der nicht-linearen Regression.

Titrant	Analyt	n	$K_D$ in (nM)	$\Delta_B G$ in (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta_B H_{\text{app}}$ in (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta_B S_{\text{app}}$ in (kcal·mol <sup>-1</sup> )
hcSpz11.7	Toll ECD	$1,00 \pm 0,003$	$23,04 \pm 2,6$	$-10,42 \pm 0,07$	$-9,99 \pm 0,06$	0,43
Toll ECD	hcSpz11.7	$1,05 \pm 0,005$	$11,45 \pm 3,65$	$-10,84 \pm 0,79$	$-9,53 \pm 0,12$	1,31
Toll ECD	hcSpz11.7 + 11.7PD	$0,78 \pm 0,02$	$6,85 \pm 1,3$	$-11,14 \pm 0,11$	$-9,93 \pm 0,13$	1,21

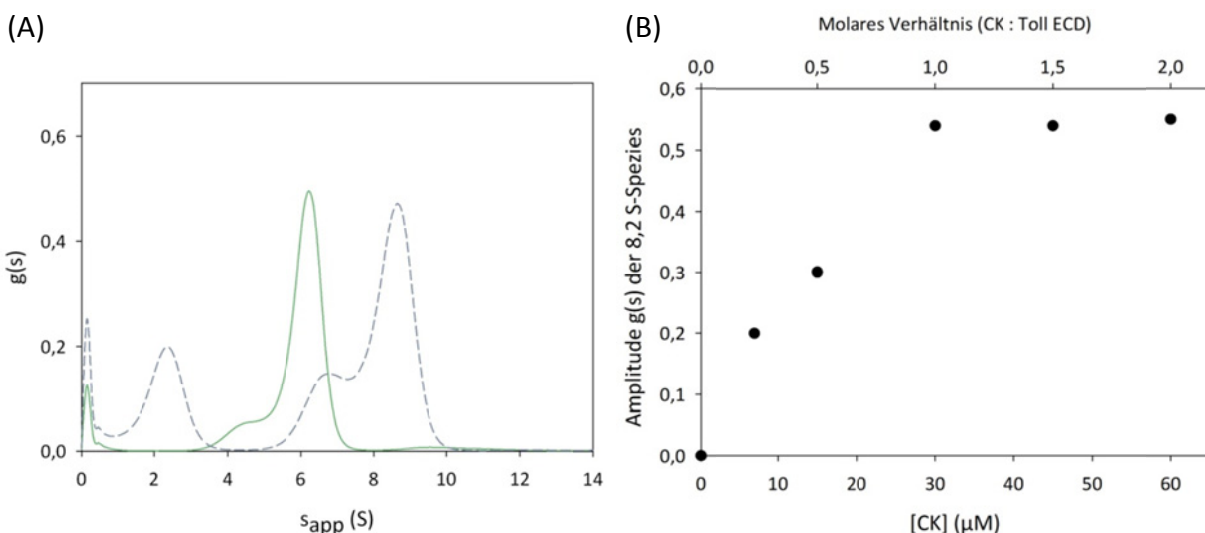
Die Daten konnten weiterhin mit einem einfachen Bindungsmodell ausgewertet werden. Aus den gemessenen Werten von  $K_{D,\text{obs}}$  und  $\Delta_B H_{\text{obs}}$  wurden über Gl. 3-35 und Gl. 3-36 die tatsächlichen thermodynamischen Parameter, welche in Abwesenheit der 11.7Prodomäne messbar wären, kalkuliert. Es wurden Werte von  $K_{D,\text{Toll}} = 6,77 \text{ nM}$  und  $\Delta_B H_{\text{Toll,app}} = -10,04 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  erhalten, welche in guter Näherung mit den Werten des kompetitiven Modells übereinstimmen.

#### 4.4.6 Interaktionsanalyse mittels analytischer Ultrazentrifugation

Die bisher beschriebenen Bindungsanalysen gaben sowohl qualitative als auch quantitative Informationen zu den Proteininteraktionen. Jedoch kann hinsichtlich der Stöchiometrie inhärent nur das Verhältnis der im Komplex beteiligten Komponenten, nicht jedoch die Anzahl aller Komponenten bestimmt werden. Die analytische Ultrazentrifugation erlaubt es, die hydrodynamischen Eigenschaften von Proteinen und Proteinkomplexen zu untersuchen und damit Aussagen über das Assoziationsverhalten und die Molekülmasse zu treffen.

Daher sollte mit Hilfe dieser Methodik untersucht werden, ob die beschriebenen Toll ECD-Spätzle-Komplexe monomere 1 : 1 - oder dimere 2 : 2 -Assoziate bilden. Ausgehend von bisherigen Analysen mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde zunächst von einer niederaffinen Dimerassoziation der Toll ECD mit  $K_D \approx 6,0 \mu\text{M}$  ausgegangen (4.4.1).

Daher wurde in einem Titrationsexperiment die Sedimentationsgeschwindigkeit von  $30 \mu\text{M}$  Toll ECD mit variierenden Konzentrationen an Cystin-Knoten-Domäne gemessen. Dies stellte die maximal mögliche Proteinkonzentration dar, bei welcher noch eine Idealität der Lösung besteht (4.4.1, Abbildung 4-19 (B)). Aus den berechneten Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilungen (Abbildung 4-29 (A)) ist erkennbar, dass die freie Toll ECD nahezu homogen mit  $s_{\text{app}} = 6,2 \text{ S}$  sedimentierte. Dieser Wert entspricht dem konzentrationsgewichteten Mittel (Gl. 3-45) der Sedimentationsgeschwindigkeit von monomeren und dimeren Toll ECD (4.4.1). Bei sukzessiver Zugabe der Cystin-Knoten-Domäne trat eine hochmolekulare Spezies mit  $s_{\text{app}} = 8,2 \text{ S}$  auf, deren Amplitude  $g(s)$  der Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilung linear anstieg bis zum Erreichen des äquimolaren Titrationspunktes (Abbildung 4-29 (B)). Dies bestätigt die bereits in vorangegangenen Experimenten (4.4.2, 4.4.3) gefundene Bindungsstöchiometrie von  $n = 1$ .



**Abbildung 4-29. Sedimentationsgeschwindigkeit von Toll ECD-Spätzle-Komplexen.**

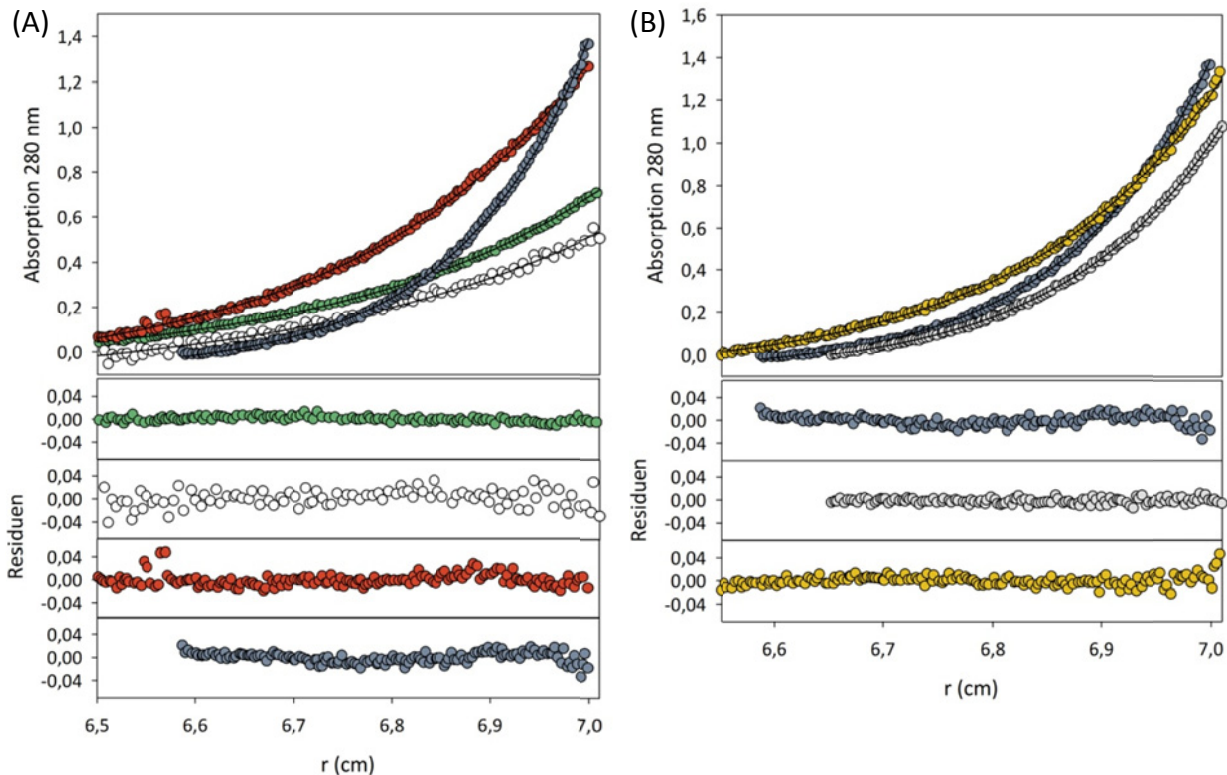
Eine Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse von  $30 \mu\text{M}$  Toll ECD mit steigenden Konzentrationen von CK wurde durchgeführt. (A) Es wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilungen berechnet und die erhaltenen Daten für  $30 \mu\text{M}$  Toll ECD (—) und  $30 \mu\text{M}$  Toll ECD +  $60 \mu\text{M}$  CK (---) exemplarisch dargestellt. (B) Die Amplitude  $g(s)$  der Spezies mit  $8,2 \text{ S}$  wurde gegen die Konzentration der Cystin-Knoten-Domäne aufgetragen. Alle Messungen wurden in  $50 \text{ mM}$  Tris/HCl,  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $0,005 \%$  (w/w) Nonidet P40, pH 7,5 durchgeführt. Die Konzentrationsprofile wurden bei  $40\,000 \text{ rpm}$  (An50Ti-Rotor) und  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  im Abstand von  $15 \text{ min}$  aufgenommen (siehe Anhang 8.14).

Wird ein Wert von  $s_{app,M} = 4,9$  S für die freie, monomere Toll ECD zugrunde gelegt (4.4.1), kann durch Umstellen von Gl. 3-41 ein Assoziationsgrad von  $N \approx 2,1$  (für einen homooligomeren Proteinkomplex aus sphärischen Partikeln) berechnet werden. Aufgrund der nicht-globulären Struktur der Toll ECD ist dieser Wert fehlerbehaftet, jedoch lässt sich bereits auf einen dimeren Ligand-Rezeptor-Komplex (2 : 2 -Komplex) schließen.

Bei Erreichen des Ligandenüberschusses war in den Sedimentationsgeschwindigkeitsprofilen die freie Cystin-Knoten-Domäne anhand ihrer deutlich langsameren Sedimentation detektierbar (siehe Anhang 8.14), welche mit  $s_{app} = 2,3$  S sedimentierte (Abbildung 4-29 (A)). Die Auftragung der gemessenen Amplitude der freien Cystin-Knoten-Domäne gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor ergab ebenfalls einen scharfen Titrationspunkt bei einer äquimolaren Stöchiometrie (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde in den Ansätzen zu einem geringen Anteil eine Spezies mit  $s_{app} = 6,2$  S detektiert, deren Amplitude jedoch keine Korrelation mit dem molaren Verhältnis von Ligand und Rezeptor aufwies, und vermutlich einen monomeren Ligand-Rezeptor-Komplex darstellte. Im Gegensatz dazu wurde in vergleichbaren Experimenten bei einem Überschuss an Cystin-Knoten-Domäne ausschließlich ein 1 : 1 -Komplex beobachtet (Weber *et al.*, 2005).

Zur Bestimmung der Molekülmasse der Ligand-Rezeptor-Komplexe wurde eine Sedimentationsgleichgewichtsanalyse durchgeführt. Zunächst wurden Gleichgewichtsläufe von Toll ECD und der Cystin-Knoten-Domäne in äquimolarem Verhältnis bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass unabhängig von der Proteinkonzentration, in Anwesenheit des Liganden stets eine homogene hochmolekulare Spezies beobachtet wurde, welche einen 2 : 2-Komplex darstellen könnte. Daher wurden alle weiteren Messungen bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  Toll ECD durchgeführt (Abbildung 4-30). Für die isolierte Toll ECD wurde eine Molekülmasse von  $M_{r,app} = 110\,000 - 115\,000$  ermittelt, was der theoretisch erwarteten Masse für ein vollständig glykosyliertes, monomeres Protein ( $M_r = 110\,000$ , (Stelzer *et al.*, 2013)) entspricht. Weiterhin wurden ein  $s_{app} = 5,0$  S ( $s_{20,W} = 5,0$  S) ermittelt, welcher gut mit dem extrapolierten Wert für ein Toll ECD-Monomer übereinstimmt (4.4.1, Abbildung 4-19 (B)). Unter Berücksichtigung eines theoretischen, maximalen Sedimentationskoeffizienten  $s_{Sphäre}$  (Gl. 3-41) ergibt sich ein Verhältnis  $f/f_0 = 1,65$  was die starke Formasymmetrie der Toll ECD, die auch in der Kristallstruktur zu beobachten ist (Parthier *et al.*, 2014), widerspiegelt.





**Abbildung 4-30: Sedimentationsgleichgewicht von Toll ECD-Spätzle-Komplexen.**

(A) Sedimentationsgleichgewichtsprofile mit je 1  $\mu\text{M}$  Toll ECD in Komplex mit verschiedenen Spätzle-Liganden (1  $\mu\text{M}$  Toll ECD ( $\bullet$ ), Toll ECD + 1  $\mu\text{M}$  ProSpz11.7 ( $\circ$ ), Toll ECD + 1  $\mu\text{M}$  hcSpz11.7 ( $\bullet$ ), Toll ECD + 1  $\mu\text{M}$  CK ( $\bullet$ )) und (B) verschiedenen molaren Verhältnissen an Toll ECD : CK (1  $\mu\text{M}$  Toll ECD + 0,5  $\mu\text{M}$  CK ( $\circ$ ), Toll ECD + 1  $\mu\text{M}$  CK ( $\bullet$ ), Toll ECD + 5  $\mu\text{M}$  CK ( $\bullet$ )) sind gezeigt. Die residuellen Abweichungen der nicht-linearen Regressionen sind entsprechend dargestellt. Alle Messungen wurden in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,005 % (w/w) Nonidet P40, pH 7,5 durchgeführt. Die Gleichgewichte wurden bei 6 000 rpm (An50Ti-Rotor) und 20 °C über 85 h eingestellt.

In einem Kontrollexperiment mit 1  $\mu\text{M}$  ProSpz11.7 ergab sich  $M_{r,\text{app}} = 89\,000$ . Die apparent geringere Molekülmasse, im Vergleich zu der isolierten Toll ECD ( $M_r = 110\,000$ ), spiegelt den Anteil von nicht-interagierenden ProSpz11.7 ( $M_r = 54\,000$ ) in der Konzentrationsverteilung wider. In Anwesenheit von halbseitig prozessierten hcSpz11.7 wurde eine einzelne homogene Spezies mit  $M_{r,\text{app}} = 150\,000$  sowie  $s_{\text{app}} = 6,05\text{ S}$  ( $s_{20,\text{W}} = 6,06\text{ S}$ ,  $f/f_0 = 1,67$ ) erhalten. Dies zeigte eindeutig das Vorhandensein eines 1 : 1 -Komplexes ( $M_r = 150\,000$ ). Im Gegensatz dazu wurde in einem Ansatz mit 1  $\mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne eine homogene Spezies mit  $M_{r,\text{app}} = 260\,000 - 270\,000$  und  $s_{\text{app}} = 9,4\text{ S}$  ( $s_{20,\text{W}} = 9,41\text{ S}$ ,  $f/f_0 = 1,61$ ) gefunden. Dies entspricht mit sehr guter Übereinstimmung der erwarteten Molekülmasse für einen 2 : 2 -Komplex ( $M_r = 270\,000$ ). Somit bestätigte das Sedimentationsgleichgewicht die vorangegangenen Bindungsstöchiometrien für die Interaktion von Toll ECD und der Cystin-Knoten-Domäne (4.4.2, 4.4.3).



Da bei einer Proteinkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  ein homogener 2 : 2 -Komplex erhalten wurde, ist das Rezeptor-Dimer des Komplexes mit  $K_D \leq 0,1 \mu\text{M}$  wesentlich stabiler als das Dimer der isolierten Toll ECD (4.4.1), was im Einklang mit einer Ligand-induzierten Rezeptordimerisierung ist, wie sie bereits in den Strukturen von *toll-like*-Rezeptoren aus Vertebraten beobachtet wurde (Gay und Gangloff, 2007). Dahingegen inhibiert die kovalent gebundene 11.7Prodomäne in hcSpz11.7 offensichtlich die Dimerisierung. Weiterhin ist zu erkennen, dass in keiner der Ligand-Rezeptor-Komplexe eine signifikante Abnahme des Verhältnisses  $f/f_0$  bei der Sedimentation zu beobachten war, was auf eine hohe Formasymmetrie, des Spätzle-gebundenen und des dimeren Zustandes von Toll ECD, hindeutet.

Zu klären bleibt die Existenz von Ligand-Rezeptor-Komplexen mit einer alternativen Stöchiometrie. Bei 5-fachem molarem Überschuss des Liganden wurde eine Molekülmasse von  $M_{r,app} = 170\ 000$  beobachtet, was einer Mischspezies aus einem 2 : 2 -Komplex und dem überschüssigen freien Liganden entspricht. Dahingegen zeigte sich bei einem weiteren Experiment, dass bei einer Stöchiometrie von  $1 \mu\text{M}$  Toll ECD zu  $0,5 \mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne eine Spezies mit  $M_{r,app} = 250\ 000 - 260\ 000$  beobachtet wurde. Dies würde auf das Vorhandensein eines 2 : 1 -Komplexes ( $M_r = 245\ 000$ ), bestehend aus einem Molekül der Cystin-Knoten-Domäne und zwei Molekülen Toll ECD, hindeuten. Obwohl in vorangegangenen Experimenten kein intermediärer 2 : 1 -Komplex beobachtet werden konnte, kann dessen Existenz jedoch nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, wie die Gleichgewichtsuptrazentrifugation belegte.

## 5 Diskussion

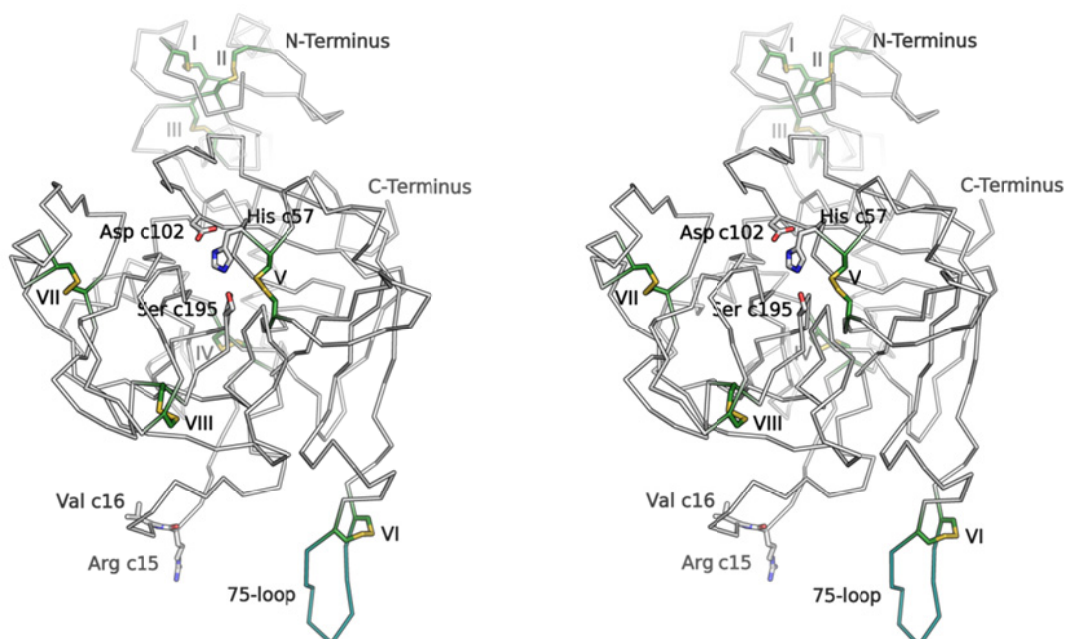
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der Spätzle-Prodomäne bei verschiedenen Teilprozessen des Spätzle-Toll-Signalweges untersucht. Zunächst wurde die Generierung der Serinprotease Easter dargelegt und ihre Aktivität gegenüber dem Cytokin Spätzle und dessen Prodomäne beschrieben. Spätzle, als Cystin-Knoten-haltiger Wachstumsfaktor, wurde hinsichtlich der für diese Proteinfamilie typischen kontextabhängigen Faltung untersucht und die Interaktion zwischen den zwei Proteindomänen analysiert. Der letzte Abschnitt umfasste die Interaktionsanalytik des gereiften Spätzle-Liganden mit dem Toll-Rezeptor um eine mögliche Beteiligung der Spätzle-Prodomäne zu untersuchen. Diese drei Aspekte sollen im Folgenden diskutiert und sich aus den proteinchemischen Daten ergebende funktionellen Aspekte der Spätzle-Prodomäne erläutert werden.

### 5.1 Faltung der Proprotein-Konvertase Easter<sup>Xa</sup> und Cytokin-Reifung

#### Generierung der Clip-Domänen-Protease Easter<sup>Xa</sup>

Der Spätzle-Toll-Signalweg, zur Determinierung der dorsal-ventral-Achse in *D. melanogaster*, wird über eine extrazelluläre Serinproteasekaskade initiiert (LeMosy *et al.*, 1999), wobei der finale Schritt dieser Kaskade die proteolytische Reifung des Cytokins Spätzle durch die Protease Easter ist (DeLotto und DeLotto, 1998). Easter ist ein Vertreter der Clip-Domänen-Serinproteasen, welche in Vertebraten in Differenzierungsprozesse und der angeborenen Immunantwort involviert sind (Jiang und Kanost, 2000; Jang *et al.*, 2008). Bisher ist die Kristallstruktur lediglich von drei Clip-Domänen-Proteasen, *DmGrass*, *HdPPAF-I* und *HdPPAF-III*, aufgeklärt worden (Piao *et al.*, 2005; Piao *et al.*, 2007; Kellenberger *et al.*, 2011). In die putative Erkennungssequenz für die Zymogenaktivierung durch *DmSnake* (Chasan und Anderson, 1989; Chasan *et al.*, 1992) wurde durch Einführung der Sequenz LSNIEGR<sup>C15</sup>-I<sup>C16</sup> das Konstrukt Easter<sup>Xa</sup> erhalten, welches durch bovinen Faktor Xa artifiziell aktivierbar sein sollte (Sieg, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Zymogen von Easter<sup>Xa</sup> heterolog exprimiert, renaturiert und anschließend zu nahezu homogenem Protein gereinigt werden, mit einer Ausbeute von ~ 1 mg pro Liter Kulturmedium. Diese geringe Faltungsausbeute kann für Easter<sup>Xa</sup> im Wesentlichen auf einen hohen Anteil disulfidverbrückter Oligomerspezies zurückgeführt werden. Da diese Oligomere keinerlei proteolytische Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat ProSpz11.7 aufweisen, kann nur die monomere Spezies von Easter<sup>Xa</sup> als funktionell angesehen werden (Ursel, 2009).

Eine massenspektrometrische Analyse zeigte, dass die Präparationen zu einem signifikanten Anteil eine oder mehrere Glutathion-modifizierte Spezies enthielten, was auf ein teilweise inkorrekt ausgebildetes Disulfidmuster hindeutet. In den Kristallstrukturen der Easter-homologen Clip-Domänen-Proteasen *DmGrass* und *HdPPAF-I* (Piao *et al.*, 2007; Kellenberger *et al.*, 2011) ist der für diese Enzyme typische 75-loop mit der stabilisierenden Disulfidbrücke dem Lösungsmittel exponiert (Abbildung 5-1), und daher vermutlich sensitiv gegenüber einer Modifikation mit Glutathion. In dieser Arbeit konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, welche Cysteine modifiziert sind, und ob diese Spezies eine enzymatische Aktivität aufweisen.



**Abbildung 5-1: Disulfidbrücken in *DmGrass*.**

Eine Stereoabbildung der Tertiärstruktur von *DmGrass* ist als *ribbon*-Darstellung gezeigt (PDB-Code: 2XXL (Kellenberger *et al.*, 2011)). Die Aminosäurereste der Zymogenaktivierungsstelle und der katalytischen Triade (weiß) sowie Disulfidbrücken (grün, nummeriert wie in Anhang 8.6) sind als Stabdarstellung hervorgehoben. Der 75-loop ist cyan gefärbt. C-Atome sind analog der Beschreibung gefärbt, O-Atome rot, N-Atome blau und S-Atome gelb.

### Zymogenaktivierung und Aktivität von Easter<sup>Xa</sup>

Zur Bestätigung des funktionellen Zustandes des renaturierten Enzyms wurde die katalytische Aktivität gegenüber dem niedermolekularen Peptidsubstrat Pefachrome tPA sowie zwei makromolekularen Proteinsubstraten, ProSpz11.7 und ProSpz8.19, untersucht. Eine Aktivierung von Easter<sup>Xa</sup> durch Faktor Xa konnte nachgewiesen werden. Die proteolytische Aktivität von Easter<sup>Xa</sup> gegenüber dem chromogenen Peptidsubstrat belegte die enzymatische Funktionalität des *in vitro*-renaturierten Proteins.

Dennoch war ein hoher Anteil an „nicht-aktivierbarem“ Zymogen von Easter<sup>Xa</sup> detektierbar. Es ist bereits bekannt, dass *in vivo* nur ein Bruchteil des sezernierten Enzyms aktiviert wird (Chasan *et al.*, 1992), und auch in co-Expressionsstudien mit der natürlichen aktivierenden Protease *DmSnake* wurde nur eine partielle Zymogenaktivierung erhalten (Dissing *et al.*, 2001). Bei den verwandten Enzymen *DmGrass* (Kellenberger *et al.*, 2011) und *HdPPAF-I* (Piao *et al.*, 2007) wurde *in vitro* ebenfalls eine nicht-quantitative Zymogenaktivierung beobachtet. Strukturell wurde dies der sterischen Restriktion des Aktivierungs-loops durch den sogenannten 75-loop zugeschrieben. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden, da eine Deletionsvariante Easter<sup>Xa</sup>  $\Delta 75$ -Xa qualitativ identische Ergebnisse lieferte. Da mangels vergleichbarer Studien oder enzymkinetischer Daten für Easter aus *Drosophila*-Zelllinien keine Referenz für vollständig nativ gefaltetes Enzym zur Verfügung steht, muss ein signifikanter Anteil nicht-funktionellen Proteins in Betracht gezogen werden.

ProSpätzle, als Proteinsubstrat für Easter, kommt infolge alternativen Spleißens in 10 verschiedenen Isoformen vor, wobei mindestens vier sezerniert werden (DeLotto *et al.*, 2001). Eine Prozessierung der beiden Isoformen Spz11.7 und Spz8.19 durch Easter wurde bereits in co-Expressionsexperimenten qualitativ nachgewiesen (Misra *et al.*, 1998; Chang und Morisato, 2002). Das renaturierte und aktivierte Easter<sup>Xa</sup> bewirkte ebenfalls eine spezifische Reifung beider Isoformen durch Spaltung in der postulierten Erkennungssequenz zwischen Prodomäne und Cystin-Knoten-Domäne. Die restriktive Substratspezifität von Easter<sup>Xa</sup> ist bereits daran zu erkennen, dass die putativ intrinsisch unstrukturierten Prodomänen keinen weiteren proteolytischen Abbau unterliegen, wie es mit bovinem Trypsin beobachtet wurde (Hoffmann *et al.*, 2008). Eine kinetische Quantifizierung ergab weiterhin, dass die Isoform Spz8.19 signifikant schneller prozessiert wird als die kleinere Isoform Spz11.7, obwohl identische primäre Erkennungssequenzen vorhanden sind. Eine vergleichende Untersuchung mit niedermolekularen Peptidsubstraten mit der nativen Erkennungssequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

### **Die sekundäre Prozessierungsstelle in der Spätzle-Prodomäne**

Die Substratspezifität von Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen ist im Allgemeinen durch eine Restriktion der S1-Spezifität charakterisiert (Perona und Craik, 1995), was auch hier in Easter<sup>Xa</sup> anhand der strikten Erkennung von Arginin in P1-Position der Fall war. Für Spätzle wird in der Literatur eine proteolytische Prozessierung in der Sequenz VSSR<sup>266</sup>-V<sup>267</sup>, hier als S<sup>1</sup>-Stelle bezeichnet, beschrieben (DeLotto und DeLotto, 1998).

Die Identifizierung einer sekundären Prozessierungsstelle war unerwartet, konnte jedoch in beiden Isoformen eindeutig verifiziert werden. Die beiden identifizierten  $S^2$ -Stellen SLQR<sup>168</sup>-T<sup>169</sup> (Spz8.19) und LFNR<sup>168</sup>-T<sup>169</sup> (Spz11.7) weisen jedoch, abgesehen von der P1-Position, keine Homologie zu der  $S^1$ -Stelle VSSR<sup>266</sup>-V<sup>267</sup> auf. Es konnte keine sequentielle Spaltung beobachtet werden da ncSpz-Varianten ebenfalls einer Prozessierung in der  $S^2$ -Stelle unterlag. Eine physiologische Relevanz dieser sekundären Spaltsequenz bleibt allerdings ungeklärt. *In vivo* exprimiertes Spätzle zeigt diverse immunreaktive Banden mit Molekülmassen von 20 - 50 kDa (Chang und Morisato, 2002) und auch die Expression einzelner Isoformen in Insektenzellen resultierte in der Sekretion diverser Spezies, mit nur geringen Molekülmassenunterschieden (DeLotto *et al.*, 2001). Es ist daher theoretisch möglich, dass die hier beschriebene  $S^2$ -Stelle auch *in vivo* relevant ist, und durch bisher unbekannte Proteasen erkannt und prozessiert wird. Weiterhin sollte in Betracht gezogen werden, dass *Spätzle Processing Enzyme* (Jang *et al.*, 2006) eine Spezifität für diese alternativen Spaltstellen besitzt, und diese eventuell auch im Verlauf der angeborenen Immunantwort prozessiert werden. Die spezifische Funktion der 10 verschiedenen Spätzle-Isoformen (DeLotto *et al.*, 2001), welche sich ausschließlich in ihrer Prodomäne unterscheiden, ist bisher unbekannt. Es wäre auch möglich, dass die alternative Prozessierung zu einer weiteren funktionellen Diversität von Spätzle führt.

Diverse Vorläuferproteine weisen neben der  $S^1$ -Stelle, mit einer polybasischen Furin-Erkennungssequenz R-X-(R/K)-R für die proteolytische Reifung, auch sekundäre  $S^2$ -Stellen mit einer minimalen Konsensussequenz auf. Pro-BMP-4 besitzt innerhalb der Prodomäne zwei Spaltsequenzen für die Prohormon-Konvertase Furin (Cui *et al.*, 1998). In Pro-BMP-4 erfolgt die Spaltung in der  $S^1$ - und  $S^2$ -Stelle sequentiell, wobei die sekundäre Prozessierung die Aktivität von reifem BMP-4 moduliert (Cui *et al.*, 2001). Erfolgt im trans-Golgi-Netzwerk die Spaltung durch Prohormon-Konvertasen ausschließlich in der  $S^1$ -Stelle wird der entstehende nicht-kovalente Komplex aus reifen BMP-4 und Prodomänen in sauren Endosomen proteosomal abgebaut, wodurch BMP-4 nur als „kurzlebiges“ Signalmolekül agiert (Degnin *et al.*, 2004). Dahingegen führt die sukzessive Spaltung in der  $S^2$ -Stelle zur Dissoziation der Prodomänen und Sekretion des reifen BMP-4 mit „langlebiger“-Signalvermittlung. Anhand des *glass bottom boat*-Proteins, dem *Drosophila*-Ortholog von BMP-5, wurde ebenfalls gezeigt, dass eine sekundäre Prozessierung gewebespezifisch verläuft und die Aktivität des reifen Liganden reguliert (Akiyama *et al.*, 2012). Weiterhin wurde für humanes Pro- $\beta$ -NGF und Pro-BDNF eine gewebespezifische Prozessierung durch verschiedene extrazelluläre Matrix-Metalloproteasen nachgewiesen (Lee *et al.*, 2001).

In der Prodomäne von Pro- $\beta$ -NGF sind insgesamt drei dieser polybasischen Konsensussequenzen vorhanden (Pagadala *et al.*, 2006), deren Funktion jedoch nicht bekannt ist. Da sezerniertes Pro- $\beta$ -NGF und Pro-BDNF über p75<sup>NTR</sup>-Sortillin neuronale Apoptose induzieren (Nykjaer *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2005), kann die Funktion dieser Cytokine durch Proteasen reguliert werden.

## 5.2 Kontextabhängige Faltung und Interaktionsanalytik des Cytokins Spätzle

### Die Struktur der isolierten 11.7Prodomäne

Die isolierte Prodomäne von humanem  $\beta$ -NGF weist keine kooperativ stabilisierte Struktur auf (Kliemann *et al.*, 2004), was auch für Spätzle bei der „Prodomänen“-Isoform Spz8.24, welche als einzige Isoform keine Cystin-Knoten-Domäne besitzt, nachgewiesen wurde (Hoffmann *et al.*, 2008). Durch die Generierung der Serinprotease Easter<sup>Xa</sup>, welche eine Reifung von Spätzle *in vitro* ermöglichte, konnten im Rahmen dieser Arbeit die beiden Domänen von Spz11.7 in isolierter Form charakterisiert werden. Die isolierte 11.7Prodomäne wies Charakteristika intrinsisch unstrukturierter Protein auf. Eine allgemeine Nomenklatur für „intrinsisch unstrukturierte“ oder „intrinsisch ungeordnete“ Proteine existiert nicht. Nach der einfachsten Definition weisen diese Proteine unter physiologischen Bedingungen *in vitro* lokal oder global keine definierte, kooperativ stabilisierte Struktur auf (Dunker *et al.*, 2001). Das fluktuierende konformationelle Ensemble eines intrinsisch unstrukturierten Proteins stellt dessen physiologische, funktionelle Form dar (Dunker *et al.*, 2008). Sie sind oftmals in zellulären Regulationsmechanismen wie Zellzyklus-, Transkriptions- und Differenzierungsregulation involviert und stellen insbesondere Knotenpunkte in Protein-Interaktions-Netzwerken dar (Dunker *et al.*, 2005).

Die isolierte 11.7Prodomäne zeigte ein Fern-UV-CD-Spektrum, welches für ungeordnete Proteine oder poly(Pro)II-Helices typisch ist (Uversky, 2002; Sreerama und Woody, 2003). Dies spiegelt das Fehlen definierter Sekundärstrukturelemente wider. Weiterhin indizierten Fluoreszenz- und zweidimensionale fHSQC-Spektren, dass die isolierte 11.7Prodomäne keine stabilisierte Tertiärstruktur aufweist. Eine Sedimentationsgleichgewichtsanalyse verwies auf eine ausschließlich monomere Form, wie es auch für die NGF-Prodomäne gezeigt wurde (Kliemann *et al.*, 2004). Demnach liegt die 11.7Prodomäne in Isolation als intrinsisch unstrukturiertes Monomer vor.

Intrinsisch unstrukturierte Proteine können unter anderem aufgrund ihrer geringen Sequenzkomplexität vorhergesagt werden, da diese eine vergleichsweise geringere mittlere Hydrophobizität und eine erhöhte Nettoladung aufweisen, was diese von strukturierten Proteinen klar unterscheidet (Uversky *et al.*, 2000; Dunker *et al.*, 2008). Die 11.7Prodomäne wird auch, allein basierend auf deren Sequenz, als putativ unstrukturiert klassifiziert (siehe Anhang 8.10).

Das Fehlen einer geordneten Struktur für die 11.7Prodomäne kann als eine Konsequenz des alternativen Spleißens von Spätzle (DeLotto *et al.*, 2001) betrachtet werden. Alternatives Spleißen ist ein wichtiger Mechanismus, um in Eukaryoten die Proteindiversität und -funktionalität zu erweitern (Graveley, 2001). Alternatives Spleißen würde zu einer nichtfunktionellen Proteinfaltung führen, wenn ein für die Proteinstabilität essentielles Strukturelement betroffen ist. Daher kodieren Sequenzen, die alternativem Spleißen unterliegen zu einem signifikanten Anteil für vollständig intrinsisch unstrukturierte Proteine (Dunker *et al.*, 2008).

In den Fern-UV-CD-Spektren von ProSpz11.7 und dem Easter<sup>Xa</sup>-gereiften matSpz11.7 war im Vergleich zu der Cystin-Knoten-Domäne keine signifikante Zunahme des Anteils an *random coil*-Strukturen zu verzeichnen. Differenzspektren indizierten weiterhin einen geringen  $\alpha$ -helikalen Anteil in der 11.7Prodomäne der Pro-Form und des gereiften matSpz11.7 (siehe Anhang 8.10), was im Einklang mit einer postulierten amphipathischen  $\alpha$ -Helix ist, welche die Interaktion der 11.7Prodomäne mit dem Trp-*loop* der Cystin-Knoten-Domäne vermittelt (Arnot *et al.*, 2010). Aus diesen Daten kann entnommen werden, dass die 11.7Prodomäne in gebundener Form distinkte Sekundärstrukturelemente aufweist.

### **Struktur der 11.7Prodomäne im Kontext der Cystin-Knoten-Domäne**

Bei der Denaturierung der Pro-Form von Spz11.7 wurde ein einzelner kooperativer Entfaltungsübergang beobachtet, weshalb davon ausgegangen wurde, dass Prodomänen und Cystin-Knoten-Domäne zusammen entfalten (Hoffmann *et al.*, 2008). Dies ist ein Indiz dafür, dass die 11.7Prodomäne in kovalenter Assoziation eine kooperativ stabilisierte Struktur aufweist. Weiterhin führte die 11.7Prodomäne im Kontext der Pro-Form zu einer Stabilisierung der Cystin-Knoten-Domäne. Die proteolytische Spaltung von ProSpätzle in der S<sup>1</sup>-Stelle durch Easter<sup>Xa</sup> zeigte, dass im Falle von Spz11.7, die beiden Prodomänen in Form eines nicht-kovalenten Komplexes an der reifen Cystin-Knoten-Domäne assoziiert bleiben, wie es bereits an einer *tobacco-etch-virus* (TEV)-Protease-prozessierbaren Variante der Spätzle-L-Isoform nachgewiesen wurde (Weber *et al.*, 2007).

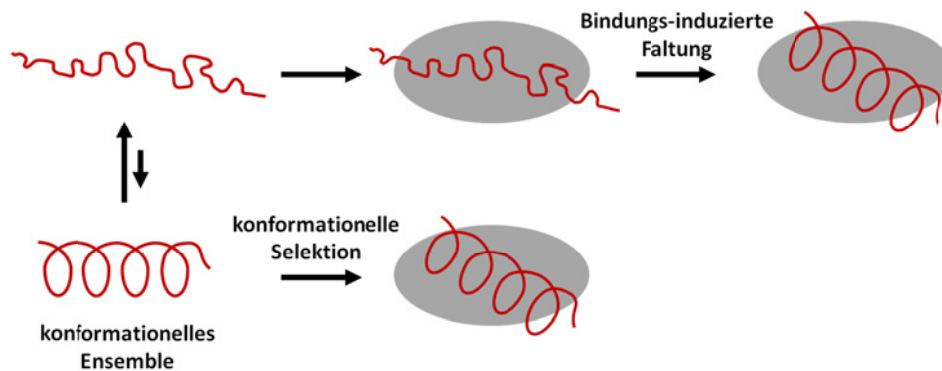
Es wurden auch an anderen Cystin-Knoten-Proteinen, wie BMP-4 (Degnin *et al.*, 2004), TGF- $\beta$  (Shi *et al.*, 2011) und PDGF-A (Shim *et al.*, 2010) derartige nicht-kovalente Komplexe zwischen der reifen Domäne und den Prodomänen beschrieben und im Fall von TGF- $\beta$  und PDGF-A strukturell charakterisiert.

Bei der chemischen Denaturierung der nicht-kovalenten Form matSpz11.7 wurden zwei unabhängige kooperative Übergänge beobachtet. Distinkte Entfaltungsübergänge für die Prodomäne und die Cystin-Knoten-Domäne wurden auch bei humanem Pro- $\beta$ -NGF oder Pro-BMP-2 gefunden (Kliemann *et al.*, 2004; Hillger *et al.*, 2005). Die Entfaltung der Cystin-Knoten-Domäne, welche durch ein einfaches Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden konnte, ist im Kontext des nicht-kovalenten matSpz11.7 absolut identisch mit der isolierten Domäne (Hoffmann *et al.*, 2008). Daher ist eine kovalente Bindung zu der 11.7Prodomäne offensichtlich essentiell für eine Stabilisierung der Cystin-Knoten-Domäne wie sie für ProSpz11.7 gemessen wurde. Auch im Fall von Pro- $\beta$ -NGF konnte nachgewiesen werden, dass die kovalent-gebundene Prodomäne eine Stabilisierung des reifen  $\beta$ -NGF bei thermischer Denaturierung bewirkt (Paoletti *et al.*, 2011).

Im Kontext der proteolytisch gereiften Form matSpz11.7 wurde für die 11.7 Prodomäne ein kooperativer, vollständig reversibler Entfaltungsübergang erhalten, was für eine gefaltete Struktur der gebundenen 11.7Prodomäne spricht. Dieser Übergang konnte mit einem dimeren Zwei-Zustands-Modell ohne Akkumulation nativer Monomere (Neet und Timm, 1994; Rumfeldt *et al.*, 2008) beschrieben werden, und wird mit der Dissoziation und gleichzeitiger Entfaltung der in dimerer Form gebundenen 11.7Prodomäne interpretiert. Dies steht im Einklang damit, dass die 11.7Prodomäne in Isolation instrinsisch unstrukturiert ist, und ein Verlust der Quartärkontakte zu der Cystin-Knoten-Domäne mit einer Entfaltung einhergehen sollte. Es lässt sich ableiten, dass die unstrukturierte 11.7Prodomäne durch die nicht-kovalente Assoziation an die reife Cystin-Knoten-Domäne eine kooperativ stabilisierte Struktur einnehmen kann. Eine derartige Stabilisierung durch die Assoziation mit der reifen Domäne wurde auch für die Prodomäne von Pro- $\beta$ -NGF nachgewiesen (Kliemann *et al.*, 2004).

Intrinsisch unstrukturierte Proteine können durch Bindung an ihre Interaktionspartner lokal oder global einen *disorder-to-order-transition* durchlaufen und sich dadurch strukturieren (Wright und Dyson, 2009). Dabei kann zwischen den zwei Extremen „Bindungs-induzierte Faltung“ und „konformationelle Selektion“ unterschieden werden (Abbildung 5-2).





**Abbildung 5-2: Schematische Darstellung der Bindung intrinsisch unstrukturierter Proteine.**

Intrinsisch unstrukturierte Proteine werden in Abwesenheit des physiologischen Bindungspartners durch ein Ensemble multipler Konformationen repräsentiert, wobei transient strukturierte Elemente auftreten können. Der Vorteil von intrinsisch unstrukturierten Proteinen in Interaktionsnetzwerken sind eine hohe Spezifität, geringe Affinität (Reversibilität), aber auch Promiskuität bezüglich der Bindungspartner (Dunker *et al.*, 2001; Dunker *et al.*, 2005). Adaptiert nach Wright und Dyson (2009).

Sequenzbereiche, welche einen *disorder-to-order-transition* unterliegen und die Interaktion zu dem Bindungspartner ermöglichen, werden als MoRFs (*molecular recognition features*) bezeichnet (Pansca und Fuxreiter, 2012). Tendenziell bilden diese MoRFs vermehrt  $\alpha$ -helikale Strukturen aus (Mohan *et al.*, 2006; Pansca und Fuxreiter, 2012). Der erhöhte  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturanteil in der gebundenen 11.7Prodomäne, im Vergleich zu der isolierten Prodomäne, könnte daher einen durch die Cystin-Knoten-Domäne stabilisierten MoRF repräsentieren. Weiterhin liegt die putative  $\alpha$ -Helix in einem Sequenzbereich, welcher in den meisten Spätzle-Isoformen keinem alternativen Spleißen unterliegt und die These einer Interaktion über eine amphipathische  $\alpha$ -Helix untermauert (Arnot *et al.*, 2010).

In zweidimensionalen fHSCQ-Spektren konnten hingegen keine signifikanten Strukturänderungen in der 11.7Prodomäne durch Bindung an die Cystin-Knoten-Domäne nachgewiesen werden, da es lediglich zu einer Intensitätsabnahme weniger distinkter Kreuzsignale kam. Entsprechend der Molekülmasse des nicht-kovalenten Komplexes matSpz11.7 wurde erwartet, dass eine Intensitätszunahme dieser Spezies NMR-spektroskopisch nicht sichtbar ist. Dies ist mit der langen Rotationskorrelationszeit  $\tau_m$ , welche die Molekülbewegung beschreibt, und die damit verbundene kurze Spin-Spin-Relaxationzeit  $T_2$  zu erklären (Kay *et al.*, 1998). Bei der gegebenen Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Prodomänen-Bindung mit  $K_D^{CK-PP} = 0,22 \mu\text{M}$  kann von einem „*slow exchange limit*“ gesprochen werden, bei welchem aufgrund der Austauschrate der Bindungsreaktion die zwei Zustände nicht getrennt aufgelöst werden können ( $k_{ex} \approx \Delta\omega$ ) (Palmer *et al.*, 2001).

Da auch keine globale Intensitätsabnahme aller Signale zu verzeichnen war, kann vermutet werden, dass distinkte Aminosäuren in dem Komplex eine höhere intrinsische Flexibilität aufweisen, welche durch die verbleibenden Kreuzsignale repräsentiert wurden.

Eine ähnliche konformationelle Flexibilität wurde auch für die NGF-Prodomäne im gebundenen Zustand beobachtet, wobei vermutlich ein Gleichgewicht zwischen einem Ensemble verschiedener Konformationen besteht (Paoletti *et al.*, 2008; Paoletti *et al.*, 2011). Die konformationelle Flexibilität der 11.7Prodomäne zeigte sich auch anhand der hohen Sensitivität gegenüber proteolytischen Abbau (Gangloff *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2008), da die proteolytische Zugänglichkeit ein sensibler Parameter für wenig strukturierte Bereiche in Proteinen ist (Dunker *et al.*, 2001). Für die NGF-Prodomäne wurde ebenfalls eine hohe Proteolyseempfindlichkeit nachgewiesen (Rattenholl *et al.*, 2001a). Biologisch relevant ist diese Flexibilität insbesondere für intrinsisch unstrukturierte Sequenzelemente oder Domänen, welche aufgrund ihrer Flexibilität in der Lage sind, die Bindung an multiple, strukturell unterschiedliche, Interaktionspartner zu vermitteln (Dunker *et al.*, 2005). Weiterhin sind oftmals in Proteinkomplexen jene Bereiche, welche die Interaktion vermitteln und essentiell für die Funktionalität sind, in ihrer Konformation polymorph oder sogar ungeordnet, was als „fuzziness“ bezeichnet wird (Tompa und Fuxreiter, 2008).

Für die Prodomäne von Spätzle wurden bisher keine spezifischen Interaktionspartner beschrieben. Jedoch legt das Vorhandensein der verschiedenen Isoformen (DeLotto *et al.*, 2001) sowie die diversen Funktionen in der Embryonalentwicklung (Schneider *et al.*, 1994), der angeborenen Immunantwort (Lemaitre *et al.*, 1996) und der Neurogenese (Zhu *et al.*, 2008) nahe, dass die Prodomänen eine spezifische Funktion vermitteln. Die isolierte NGF-Prodomäne ist beispielsweise in der Lage hochaffin an den p75<sup>NTR</sup>-co-Rezeptor Sortilin zu binden. Daher wird vermutet, dass die Prodomäne die Assoziation von Pro-β-NGF an Sortilin vermittelt und damit die Apoptose induziert (Nykjaer *et al.*, 2004).

### **Interaktion zwischen der Prodomäne und Cystin-Knoten-Domäne**

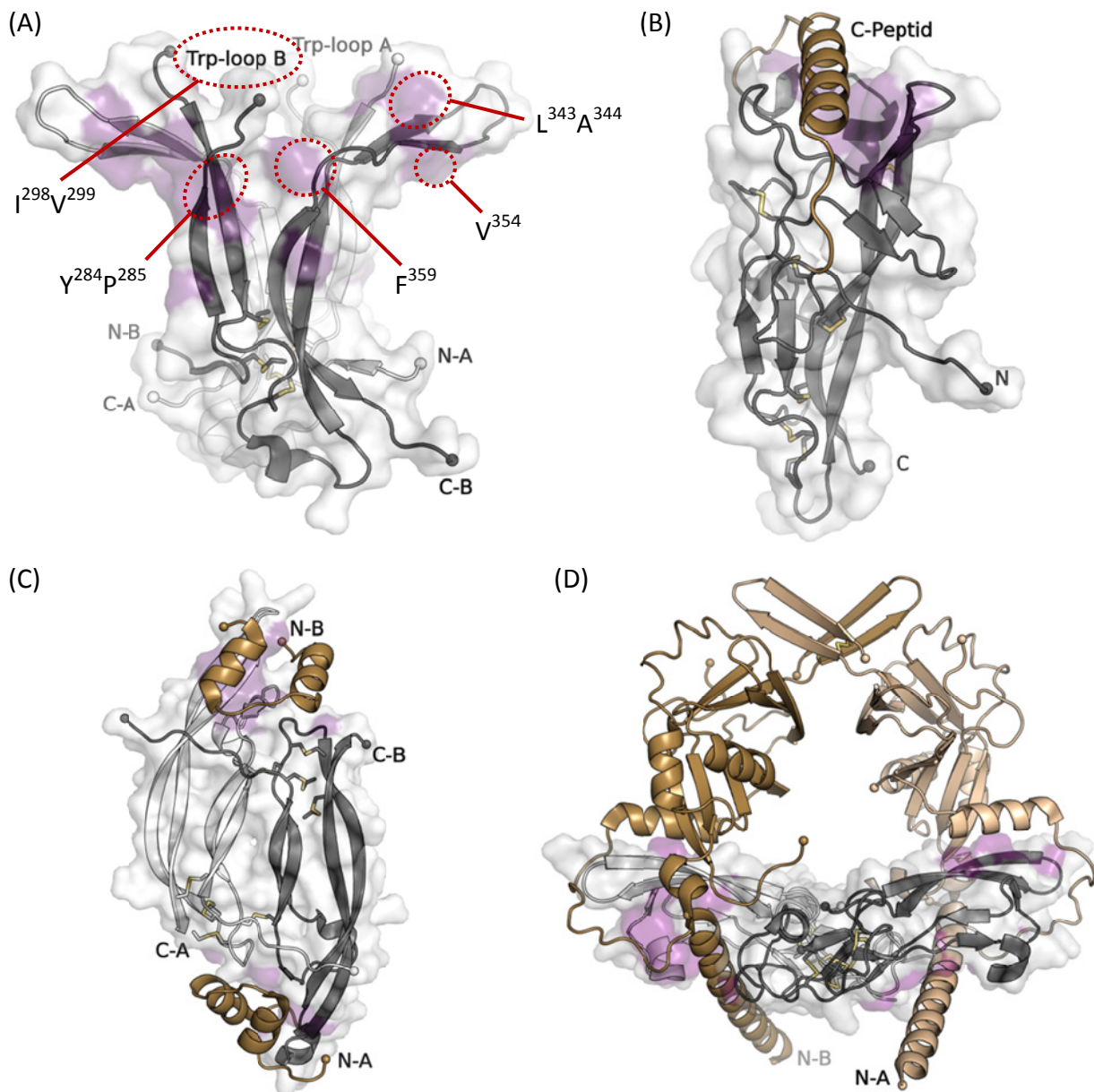
Eine thermodynamische Charakterisierung der Interaktion zwischen der Cystin-Knoten-Domäne und der 11.7Prodomäne mittels isothermaler Titrationskalorimetrie ergab mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_D^{CK-PP} = 0,22 \mu\text{M}$  ( $\Delta_B G = -37,98 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) eine moderate Bindungsaffinität. Die leichten Unterschiede in der Gleichgewichtskonstante für die reziproke Titration könnten eventuell durch eine negative Kooperativität bei der Bindung von zwei Prodomänen erklärt werden.

Hervorzuheben ist die gute Übereinstimmung der freien Bindungsenthalpien mit dem ermittelten  $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 38,58 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  für die Dissoziation und Entfaltung der 11.7Prodomänen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das angenommene dimere Zwei-Zustands-Modell für die Entfaltung als hinreichend angesehen werden kann.

Die Bindung der 11.7Prodomäne ist mit einem ungünstigen Entropieterm ( $T\Delta_{\text{B}}S = -40,19 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) verbunden, welcher durch die stark exotherme Bindungsenthalpie ( $\Delta_{\text{B}}H = -49,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) kompensiert wird. Ein hoher entropischer Preis ist ein allgemeines Charakteristikum für die Interaktion intrinsisch unstrukturierter Proteine, da die mit der Bindung einhergehende Faltung mit einem großen Verlust konformationeller Freiheitsgrade verbunden ist (Pansca und Fuxreiter, 2012). Diese entropischen Kosten können durch das Aufrechterhalten der Flexibilität im gebundenen Zustand (Tompa und Fuxreiter, 2008), wie es auch für die 11.7Prodomäne beschrieben wurde, oder durch Freisetzung von geordnetem Wasser infolge einer vorwiegend hydrophoben Interaktion minimiert werden. Dass die Interaktion zwischen der 11.7Prodomäne und der Cystin-Knoten-Domäne hydrophober Natur ist, lässt sich anhand der gemessenen Änderung der Wärmekapazität für die Komplexbildung ( $\Delta_{\text{B}}C_p = -2,18 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) bestätigen, da ein stark negativer  $\Delta_{\text{B}}C_p$  allgemein mit einer Reduktion Wasser-zugänglicher, nicht-polarer Seitenketten interpretiert wird (Ha *et al.*, 1989; Livingstone *et al.*, 1991). Eine Analyse von Proteinkomplexen zeigte, dass die Kontaktfläche zu intrinsisch unstrukturierten Proteinen substantiell größer und hydrophober ist als Interaktionsflächen globulärer Proteine (Meszaros *et al.*, 2007).

Von Cystin-Knoten-Proteinen, die strukturell beschrieben sind, finden sich Interaktionsflächen zwischen der reifen Domäne und der Prodomäne von  $\approx 620 \text{ \AA}^2$  für *TtCoagulogen* (Bergner *et al.*, 1996), über  $\approx 1\,400 \text{ \AA}^2$  für humanes PDGF-A (Shim *et al.*, 2010) bis  $\approx 2\,100 \text{ \AA}^2$  für *SsTGF- $\beta$ 1* (Shi *et al.*, 2011). Diese Varianz spiegelt die strukturelle Diversität hinsichtlich der Größe der Prodomänen sowie der unterschiedlichen Dimerisierungen von Cystin-Knoten-Proteinen wieder (Abbildung 5-3).

Aus empirischen Erhebungen kann  $\Delta_{\text{B}}C_p$  mit  $\Delta\text{ASA}$  korreliert werden (Spolar und Record, Jr., 1994; Myers *et al.*, 1995). Für die Interaktion der 11.7Prodomäne mit der Cystin-Knoten-Domäne konnte ein Wert von  $\Delta\text{ASA} \approx 13\,000 \text{ \AA}^2$  berechnet werden, was einer Kontaktfläche von  $\approx 3\,200 \text{ \AA}^2$  pro Monomer entsprechen würde. Aus der Kristallstruktur der freien Cystin-Knoten-Domäne ergibt sich für die putativen Bindungsepitope (Hoffmann *et al.*, 2008) eine theoretische Interaktionsfläche von  $\approx 1\,500 \text{ \AA}^2$  pro Monomer.



**Abbildung 5-3: Bindung der Prodomänen von Cystin-Knoten-Proteinen.**

Es sind die Kristallstrukturen der (A) Spätzle Cystin-Knoten-Domäne (PDB-Code: 3E07 (Hoffmann *et al.*, 2008)), von (B) Coagulogen (PDB-Code: 1AOC (Bergner *et al.*, 1996)), von (C) PDGF-A (PDB-Code: 3MJK (Shim *et al.*, 2010)) und (D) Pro-TGF- $\beta$ 1 (PDB-Code: 3RJR (Shi *et al.*, 2011)) als *cartoon*-Darstellung gezeigt. Die reifen Domänen sind schwarz und weiß (mit weißer transparenter Oberfläche) gefärbt. Das Coagulogen-C-Peptid, die PDGF-A-Prodomänen und die TGF- $\beta$ 1-Prodomänen sind bronze gefärbt. Cysteine sind als Stabdarstellung gezeigt mit den S-Atomen in gelb. Lösungsmittlexponierte hydrophobe Seitenketten, welche (putativ) in der Bindung der Prodomänen involviert sind, sind in der Oberfläche lila gezeigt. Die phylogenetisch konservierten Epitope in Spätzle (Wang und Zhu, 2009) sind entsprechend der Nummerierung aus Anhang 8.2 markiert.

Da dieser Korrelation  $\Delta C_p - \Delta ASA$  experimentelle Daten aus der Analyse der thermischen Entfaltung von Proteinen zu Grunde liegt, ist eine gute Übereinstimmung zwischen theoretischen und experimentellen Werten nur bei der mittleren Schmelztemperatur ( $T_m \approx 60 \text{ °C}$ ) von Proteinen gewährleistet (Xie und Freire, 1994). Aus diesem Grund wird der erhaltene Wert hier lediglich als grobe Näherung betrachtet. Es ist weiterhin zu beachten, dass dieser Wert auch Beiträge von  $\Delta ASA$  infolge eventueller Konformationsänderungen enthält. Daher kann die signifikant größere Interaktionsfläche für die 11.7Prodomäne, im Vergleich mit anderen Prodomänen oder der Cystin-Knoten-Domäne, auch eine Faltung zu einer kompakteren Struktur widerspiegeln.

Aus den Kristallstrukturen wird weiterhin ein für die Prodomänen ubiquitär vorkommendes Bindungsmotiv ersichtlich. Die Kristallstrukturen von Pro-TGF- $\beta$  (Shi *et al.*, 2011), PDGF-A (Shim *et al.*, 2010) und Coagulogen (Bergner *et al.*, 1996) zeigen, dass die Prodomänen hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der reifen Domäne interagieren (Abbildung 5-3). Dies ist im Einklang mit der vorwiegend hydrophoben Interaktion für die Spätzle-Prodomäne, die hier qualitativ anhand der stark negativen  $\Delta_B C_p$  belegt wurde und durch die Kristallstruktur der Cystin-Knoten-Domäne postuliert wurde (Hoffmann *et al.*, 2008). Weiterhin wurden in der Sequenz der Cystin-Knoten-Domäne phylogenetisch konservierte Epitope identifiziert (Abbildung 5-3 (A)) (Wang und Zhu, 2009). Mutanten dieser Epitope zeigten in *drosomycin*-Reporter-Studien signifikant verringerte Funktionalität, was mit einer verminderten Affinität zu dem Toll-Rezeptor interpretiert wurde. Jedoch ist keines dieser Epitope in der Bindung an die Toll ECD beteiligt (Parthier *et al.*, 2014). Daher kann vermutet werden, dass die vorwiegend hydrophoben Seitenketten dieser Epitope essentiell für die Prodomänenbindung sind.

### 5.3 Interaktionsanalyse des gereiften Spätzle-Liganden mit dem Toll-Rezeptor

#### Ligand-induzierte Dimersierung des Toll-Rezeptors

Im Gegensatz zu anderen Typ-I-Transmembranrezeptoren wie Rezeptor-Tyrosinkinasen besitzen der Toll-Rezeptor und TLRs aus Vertebraten keine enzymatische Aktivität. Die Aktivierung des post-Rezeptor-Signalweges wird durch eine Ligand-induzierte Rezeptordimerisierung bewirkt (Gay und Gangloff, 2007).

Durch Sedimentationsgeschwindigkeitsanalysen konnte eine schwache Selbstassoziation der freien Toll ECD mit  $K_D \approx 6,0 \mu\text{M}$  zu einem Rezeptor-Dimer nachgewiesen werden, in guter Übereinstimmung mit der bereits publizierten Gleichgewichtskonstante von  $K_D = 2,0 \mu\text{M}$  (Weber *et al.*, 2005). Da jedoch keine vollständige Sättigung der Dimerisierung erreicht werden konnte, liegt der tatsächliche  $K_D$  vermutlich höher. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen für die Interaktionsanalysen ist die Toll ECD dennoch zu einem nicht zu vernachlässigbaren Anteil in dimerer Form vorhanden.

Es zeigte sich, dass die Cystin-Knoten-Domäne von Spätzle11.7 mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_D = 9,2 \text{ nM}$  und einer apparenten Bindungsenthalpie von  $\Delta_B H_{\text{Toll,app}} = -11,78 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  hochaffin an die Toll ECD bindet. Dabei waren in der Affinität der Cystin-Knoten-Domänen, entweder generiert durch Easter<sup>Xa</sup>-vermittelte Prozessierung oder durch limitierte Proteolyse mit Trypsin (Weber *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2005), keine signifikanten Unterschiede sichtbar. Die erhaltene Stöchiometrie von  $n = 1$  gab zunächst keinen Aufschluss über eine Rezeptordimerisierung da eine direkte Unterscheidung zwischen einem 1 : 1 - und einem 2 : 2 -Komplex mittels isothermaler Titrationskalorimetrie nicht möglich ist.

Zur Bestimmung des Assoziationsgrades und der Molekülmasse des Rezeptor-Ligand-Komplexes wurde eine analytische Ultrazentrifugation durchgeführt. Durch eine Titration von Toll ECD mit der Cystin-Knoten-Domäne konnte zunächst eine Stöchiometrie von  $n = 1$  über die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit bestätigt werden. Die apparente Sedimentationsgeschwindigkeit der gebildeten hochmolekularen Spezies mit  $s_{\text{app}} = 8,2 \text{ S}$  war dabei zu hoch, als das diese einen monomeren 1 : 1 -Komplex repräsentieren könnte. Die Berechnung des Assoziationsgrades, unter Annahme idealer sphärischer Partikel, ergab einen Wert von  $N \approx 2,1$ . Auch wenn diese Berechnung auf Grund der solenoidalen Struktur der Toll ECD (Parthier *et al.*, 2014) stark fehlerbehaftet ist, weist dies bereits auf einen 2 : 2 -Komplex, bestehend aus zwei Molekülen Toll ECD mit zwei gebundenen Cystin-Knoten-Domänen, hin. In Sedimentationsgleichgewichtsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass die isolierte, monomere Toll ECD in Anwesenheit der Cystin-Knoten-Domäne dimerisiert. Während die freie Toll ECD als Monomer vorlag, zeigte sich bei Anwesenheit der Cystin-Knoten-Domäne ein homogener Komplex mit einer apparenten Molekülmasse von  $M_{r,\text{app}} = 260\,000$ , was einem 2 : 2 -Komplex aus zwei Molekülen Toll ECD und zwei gebundenen Molekülen Cystin-Knoten-Domäne entspricht. Die gemessene Molekülmasse von  $M_{r,\text{app}} = 250\,000$  bei einem zweifachen Überschuss an Cystin-Knoten-Domäne würde dagegen für einen stabilen 2 : 1 -Komplex sprechen.

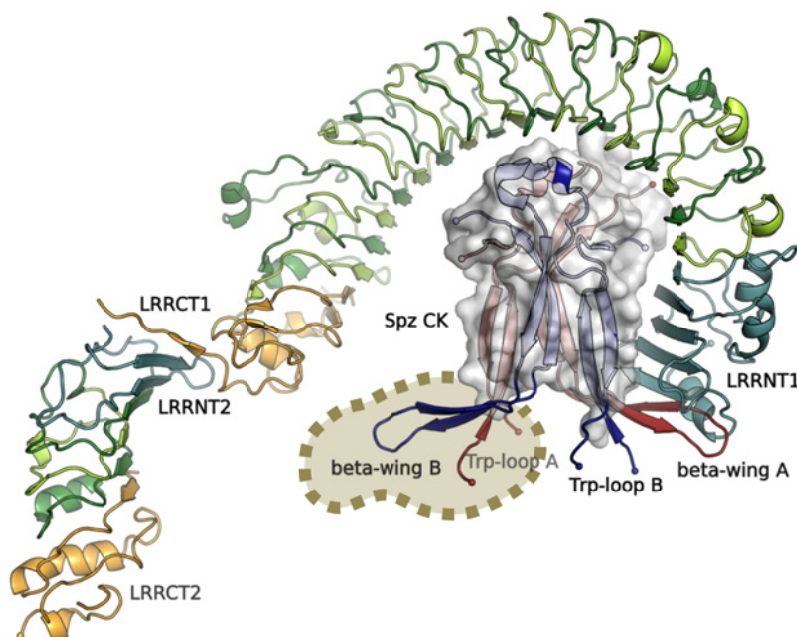
Da sowohl mittels isothermaler Titrationskalorimetrie als auch der Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse keine distinkten Titrationspunkte bei dieser Stöchiometrie gefunden wurden, ist dieses Ergebnis schwer zu bewerten. Ein eventuell intermediär auftretender 2 : 1-Komplex wäre kalorimetrisch nicht erfassbar, wenn die Bindungsenthalpie für die Assoziation des ersten und zweiten Liganden identisch sind. Daher kann eine sequentielle Bindung von zwei Molekülen Cystin-Knoten-Domäne und ein stabiler 2 : 1-Komplex nicht ausgeschlossen werden.

Die Stöchiometrie des *DmToll*-Spätzle CK-Komplexes konnte bisher nicht eindeutig belegt werden. Während mittels *ion-mobility*-Massenspektrometrie eine überwiegende Population an 2 : 2-Komplex, neben geringen Anteilen an 1 : 1- und 2 : 1-Komplex, beobachtet wurde (Gangloff *et al.*, 2008), konnte in isothermalen Titrationsexperimenten eine 2 : 1-Stöchiometrie nachgewiesen werden (Weber *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2005). Ein Hinweis auf die Bindungsstöchiometrie *in vivo* erbrachte ein EGFR-Toll-Chimär, bestehend aus der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors und der Transmembranhelix und TIR-Domäne des Toll-Rezeptors, welches durch EGF aktiviert werden konnte (Sun *et al.*, 2004). Dies kann nicht als direkter Nachweis der Stöchiometrie gewertet werden, jedoch zeigt es, dass die bekannte 2 : 2-Bindungsstöchiometrie des EGF-Rezeptors (Lemmon *et al.*, 1997; Ogiso *et al.*, 2002) eine spezifische, signalkompetente, intrazelluläre Interaktion der TIR-Domänen nicht beeinträchtigt. Daher kann auch die hier gefundene 2 : 2-Stöchiometrie, welche durch mehrere unabhängige Methoden bestätigt wurde, für den Toll-Rezeptor als physiologisch interpretiert werden.

Aus den Sedimentationsgleichgewichtsanalysen war weiterhin zu entnehmen, dass der Komplex aus der Toll ECD und der Cystin-Knoten-Domäne mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_D \leq 0,1 \mu\text{M}$  hochaffin zu einem dimeren Rezeptor-Ligand-Komplex assoziierte, im Gegensatz zu der niederaffinen Assoziation der freien Toll ECD. Dies spiegelt die Ligand-induzierte Rezeptordimerisierung und -aktivierung der Toll- und *toll-like*-Rezeptoren wider (Gay und Gangloff, 2007). Die Rezeptordimerisierung ist bisher lediglich anhand der TLRs zweifelsfrei belegt durch dimere Ligand-Rezeptor-Komplexe der extrazellulären Domänen (Jin *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2012) sowie eines putativ physiologischen Dimers der TLR10-TIR-Domäne (Nyman *et al.*, 2008).



Es ist bereits bekannt, dass die kovalent-gebundenen Prodomänen in der Pro-Form von Spätzle die Interaktion mit dem Toll-Rezeptor blockieren (Weber *et al.*, 2003). Durch Generierung von halbseitig prozessiertem hcSpz11.7 zeigte sich, dass die Reifung eines Protomers des bivalenten Spätzle ausreichend ist, um die Bindung an die Toll ECD zu vermitteln. Dies konnte durch die Kristallstruktur des *DmToll* ECD–Spätzle CK-Komplexes strukturell erklärt werden (Parthier *et al.*, 2014). Beide Protomere der Cystin-Knoten-Domäne weisen unterschiedliche Bindungsepitope zu dem Toll-Rezeptor auf, wobei die putativen Bindungsbereiche für die 11.7Prodomäne eines Protomers in dem Komplex lösungsmittlexponiert sind (Abbildung 5-4).



**Abbildung 5-4: Bindung der Spätzle-Prodomäne in dem Toll-Komplex.**

Es ist die Quartärstruktur des *DmToll* ECD–Spätzle CK-Komplexes abgebildet (PDB-Code: 4LXR (Parthier *et al.*, 2014)). Die Toll ECD ist als *cartoon*-Darstellung gezeigt, die LRRs sind alternierend grün und die N- und C-terminalen Cystein-reichen Module cyan und orange gefärbt. Die Rezeptor-gebundene Cystin-Knoten-Domäne ist in Form einer weißen transparenten Oberfläche dargestellt. Die Kristallstruktur der freien Cystin-Knoten-Domäne (PDB-Code: 3E07 (Hoffmann *et al.*, 2008)) wurde überlagert und ist als *cartoon*-Darstellung mit den Monomeren in blau und rot gezeigt. Die putativen Interaktionsbereiche zu der 11.7Prodomäne sind schematisch veranschaulicht (braun).

Isothermale Bindungsstudien zeigten, dass hcSpz11.7 mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_D = 23,04$  nM eine vergleichbar hohe Affinität zu der Toll ECD aufwies wie die vollständig prozessierte Cystin-Knoten-Domäne. Durch analytische Ultrazentrifugation konnte nachgewiesen werden, dass der gebildete Komplex einen monomeren 1 : 1 -Komplex darstellt. Daher ist die Reifung des zweiten Protomers von Spätzle nicht essentiell für die Bindung aber für eine Rezeptordimerisierung.



Die Bindungsenthalpie von hcSpz11.7 mit  $\Delta_B H_{app} = -9,99 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  weicht mit einer Differenz von  $\Delta\Delta_B H_{app} = -1,93 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  signifikant von der Bindungsenthalpie der vollständig prozessierten Cystin-Knoten-Domäne ab. Die vergleichbaren Affinitäten von hcSpz11.7 und Cystin-Knoten-Domäne legen jedoch nahe, dass die Interaktionsfläche zu der Toll ECD nicht maßgeblich beeinträchtigt ist. Die reine Rezeptor-Rezeptor-Interaktion zeigte unter den hier gegebenen Reaktionsbedingungen keine Wärmetönung (siehe Anhang 8.15), da die Verdünnung von Toll ECD, welches vollständig dimerisiert vorlag und durch Titration in Puffer dissoziieren sollte ( $[\text{Toll ECD}] < K_D$ ), kein Signal lieferte. Daher ist die reine Rezeptordimersierung der freien Toll ECD vermutlich entropisch getrieben, sodass diese Enthalpiedifferenz nicht zwangsläufig den Dimerinteraktionen von Toll ECD zugeordnet werden kann. Demzufolge wird vermutet, dass die gemessene Enthalpiedifferenz eine exotherme Ligand-Ligand-Wechselwirkung der Cystin-Knoten-Domänen in dem 2 : 2 -Komplex repräsentiert, welche in dem monomeren Toll ECD–hcSpz11.7-Komplex nicht vorkommt. Durch den halbseitig prozessierten Liganden hcSpz11.7 konnte damit indirekt nachgewiesen werden, dass eine Dimerisierung des Toll-Rezeptors durch den gebundenen Liganden vermittelt wird. Dies wurde auch in den strukturell charakterisierten TLR-Ligand-Komplexen gefunden (Jin und Lee, 2008; Botos *et al.*, 2011).

### **Beteiligung der Spätzle-Prodomäne in einem Ligand-Rezeptor-Komplex**

Die ermittelte Bindungskonstante für die Interaktion von Spätzle mit der Toll ECD liegt außerhalb des verlässlich messbaren Bereiches von  $\sim 10^3 < K_A < 10^8 \text{ M}^{-1}$  (Wiseman *et al.*, 1989). Da angenommen wurde, dass es infolge der Bindung der Toll ECD zu einer Dissoziation der nicht-kovalent gebundenen Spätzle-Prodomänen kommt (Weber *et al.*, 2007), sollte die 11.7Prodomäne als kompetitiver Ligand um die Bindung an die Cystin-Knoten-Domäne in einer Verdrängungstitration (Sigurskjold, 2000) verwendet werden. Dadurch sollte die exakte Bindungskonstante für die Interaktion zwischen der Toll ECD und der Cystin-Knoten-Domäne bestimmt werden sowie eine mögliche Beteiligung der 11.7Prodomäne in der Ligandenbindung untersucht werden.

Unter den gegebenen Bedingungen konnte die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Bindung der Cystin-Knoten-Domäne an die Toll ECD zu  $K_D = 2,5 \text{ nM}$  bestimmt werden. Interessanterweise deutet die gemessene apparente Bindungsenthalpie von  $\Delta_B H_{obs} = 3,96 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  darauf hin, dass durch die Bindung der Toll ECD an das dimere matSpz11.7 nur die 11.7Prodomäne eines Protomers dissoziiert.

Im Falle einer vollständigen Dissoziation von zwei 11.7Prodomänen ( $\Delta_D H_{app} = 40,90 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) wäre eine messbare Bindungsenthalpie von  $\Delta_B H_{obs} \approx 29 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  erwartet worden. Ein Protomer wird durch die Bindung der Toll ECD in seiner Interaktion zu der Prodomäne nicht beeinflusst, sodass es zu einem 2 : 2 : 2 -Komplex kommen könnte. Dies bestätigt erneut, dass die bivalente Cystin-Knoten-Domäne asymmetrisch an die Toll ECD bindet und jedes Protomer unterschiedliche Beiträge zu der Rezeptorbindung liefert. Ein Vergleich der apparenten Bindungsenthalpien zeigte, dass die Interaktionen von matSpz11.7 beziehungsweise der isolierten Cystin-Knoten-Domäne mit der Toll ECD eine Bindungsenthalpiedifferenz  $\Delta\Delta_B H_{app} = -2,35 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  aufweisen. Unter der Annahme, dass mit matSpz11.7 als Ligand ein 2 : 2 : 2 -Komplex gebildet wird, könnte diese Differenz einen zusätzlichen exothermen Beitrag der nicht-kovalenten 11.7Prodomäne zu der Ligand-Ligand- oder Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung widerspiegeln. Für das halbseitig prozessierte hcSpz11.7, in welchem eine Dimerisierung durch die kovalent gebundene Prodomäne unterdrückt wird, wurde hingegen in einer Verdrängungstitration eine identische Bindungsenthalpie wie in Abwesenheit der nicht-kovalenten 11.7Prodomäne erhalten. Weiterhin wird in den strukturell charakterisierten TLR-Ligand-Komplexen ersichtlich, dass die Dimerisierung maßgeblich über eine Interaktion der Liganden vermittelt wird, und nicht über Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkungen (Jin und Lee, 2008; Botos *et al.*, 2011). Daher wäre es möglich, dass auch für den Toll-Rezeptor der Ligand (in Form der Cystin-Knoten-Domäne und/oder der nicht-kovalenten Prodomäne) zu der Stabilisierung der Dimerinteraktion beiträgt.

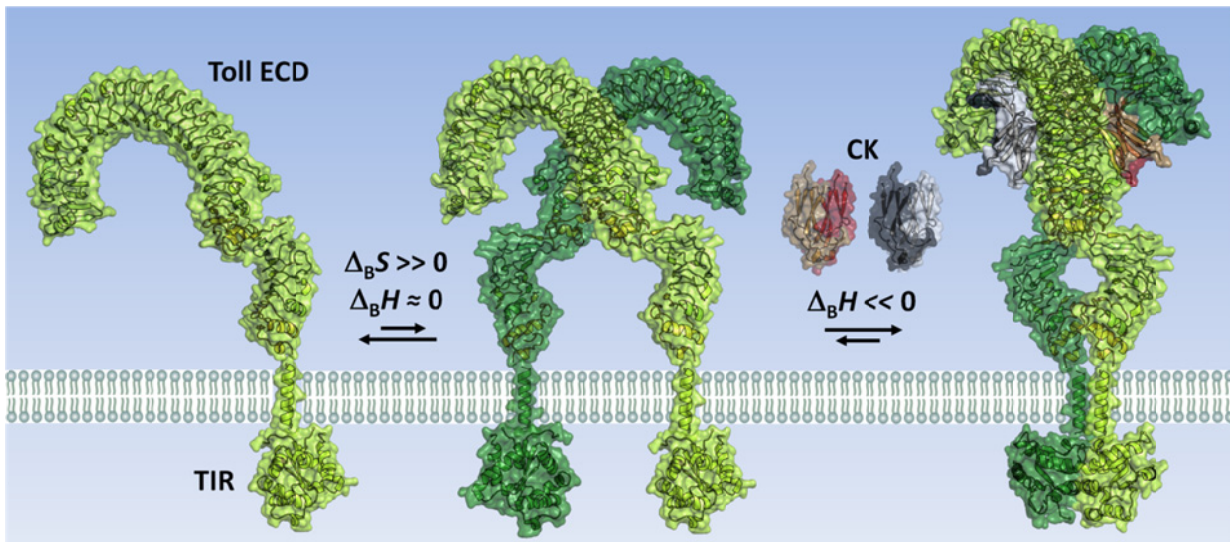
In Analysen mittels Affinitäts- sowie Größenausschlusschromatographie konnte mit dem Liganden matSpz11.7 eine physikalische Beteiligung der 11.7Prodomäne in dem Ligand-Rezeptor-Komplex nicht zweifelsfrei belegt werden. Ein direkter Nachweis, ob in einem dimeren 2 : 2 -Komplex die Bindung der 11.7Prodomäne an einem Protomer möglich ist existiert nicht, da bisher nur 1 : 1 -Komplexe strukturell charakterisiert wurden (Lewis *et al.*, 2013; Parthier *et al.*, 2014). Dennoch lässt die Struktur des *DmToll*-Spätzle CK-Komplexes diese Interpretation zu, da die zusätzliche Bindung der 11.7Prodomäne in einem ternären Komplex zumindest aus sterischen Gründen nicht ausgeschlossen werden kann.

### **Modell der Rezeptordimerisierung**

Aus den vergleichenden Betrachtungen aller in dieser Arbeit beschriebenen Methoden kann ein Modell der Ligand-induzierten Rezeptordimerisierung postuliert werden (Abbildung 5-5). Für Typ-I-Transmembranrezeptoren ist die Dimerisierung der klassische Weg zur Aktivierung, wie es auch für den Toll-Rezeptor allgemein angenommen wird (Gay und Gangloff, 2007). Die Toll ECD ist in der Lage schwach assoziierte Dimere zu bilden, wobei diese Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung vermutlich entropisch getrieben ist.

Durch Interaktion mit der Cystin-Knoten-Domäne kommt es zur Ausbildung eines stabilen 2 : 2 -Komplexes. Während in der Literatur, abhängig von der gewählten Methode, unterschiedliche Bindungsstöchiometrien und Affinitäten gefunden wurden (Weber *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2005; Gangloff *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2013), konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von vier unabhängigen Methoden eine Stöchiometrie  $n = 1$  nachgewiesen werden. Die Bindung der Cystin-Knoten-Domäne an Toll ECD ist enthalpisch getrieben, was durch eine vorwiegend hydrophile Wechselwirkung in der Rezeptor-Ligand-Struktur (Parthier *et al.*, 2014) erklärbar ist. Inwiefern der Ligand bevorzugt an ein vorgeformtes Dimer oder den monomeren Rezeptor bindet, kann nicht geschlussfolgert werden, da mittels isothermaler Titrationskalorimetrie keine unabhängigen Bindungsereignisse detektierbar waren. Aufgrund der gemessenen Bindungsenthalpiedifferenzen kann weiterhin geschlussfolgert werden, dass in dem 2 : 2 -Komplex die Ligand-Ligand-Wechselwirkungen oder auch „übergreifende“ Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen den dimeren Komplex stabilisieren, wie es auch in den TLR-Ligand-Komplexen zu finden ist (Botos *et al.*, 2011). Eine Aussage über die Gesamtstruktur des 2 : 2 -Komplexes kann nicht getroffen werden, jedoch legen die gemessenen apparenten Sedimentationsgeschwindigkeiten eine hohe Formasymmetrie dieses Komplexes nahe. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der dimere Toll-Spätzle-Komplex nicht maßgeblich von der allgemeinen „m“-förmigen, elongierten Form der TLR-Ligand-Strukturen abweicht (Jin und Lee, 2008).

Die monomere Struktur des Komplexes mit hcSpz11.7 zeigte, dass die Reifung eines Protomers ausreichend ist, um die Bindung an die Toll ECD zu vermitteln, die Rezeptordimerisierung jedoch nicht induziert wird. Aus sterischen Betrachtungen kann abgeleitet werden, welches der zwei möglichen Protomere eine kovalent gebundene Prodomäne tragen kann ohne die Rezeptorbindung zu beeinflussen (Parthier *et al.*, 2014). Die Bindungsepitope für diese Prodomäne weisen in Richtung der lateralen, „aufsteigenden“ Seite der Toll ECD, welches die allgemeine Seite für die Dimerinteraktion der TLRs darstellt (Botos *et al.*, 2011).



**Abbildung 5-5: Modell der Ligand-induzierten Toll-Dimerisierung.**

Ein Modell zur Rezeptor-Dimerisierung ist schematisch dargestellt. Der Toll-Rezeptor (grün) ist in der Lage schwach assoziierte vorgeformte Dimere zu bilden. Diese reine Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung ist vermutlich entropisch getrieben. Die Bindung der Cystin-Knoten-Domäne (rot-bronze, schwarz-weiß) an das vorgeformte Dimer oder auch an die monomere Toll ECD führt zu einem stabilen 2 : 2 -Komplex, welcher den putativen signalkompetenten Komplex darstellt. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor ist dabei enthalpisch getrieben. Verwendete PDB-Codes: 4LXR, Toll ECD-Spätzle CK-Komplex (Parthier *et al.*, 2014); 2J6R, TLR-10 TIR-Domäne Dimer (Nyman *et al.*, 2008).

Eine Beteiligung der 11.7Prodomäne in einem möglichen 2 : 2 : 2-Komplex sollte vorsichtig interpretiert werden. Anhand der Verdrängungstitrationen konnte belegt werden, dass bei Bindung der Toll ECD lediglich eine Prodomäne pro dimeres matSpz11.7 verdrängt wird. Eine physikalische Bindung der 11.7Prodomäne in dem Komplex aus Toll ECD und Cystin-Knoten-Domäne konnte jedoch nicht direkt bestätigt werden. Im Falle der Neurothrophine wurde eine Beteiligung der N-terminalen Prodomäne bei der Interaktion zu dem Apoptose-induzierenden Rezeptor p75<sup>NTR</sup> aufgezeigt (Nykjaer *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2005). Für die Spätzle-Prodomäne wurden hingegen bisher keine Interaktionspartner aufgezeigt.

Eine mögliche Funktion der Spätzle-Prodomänen wäre daher, dass für die verschiedenen Spätzle-Isoformen, welche sich nur in ihrer Prodomäne unterscheiden nicht jedoch in der Cystin-Knoten-Domäne (DeLotto *et al.*, 2001), unterschiedliche Spezifitäten für die verschiedenen Toll-Rezeptoren geschaffen werden, durch eine Beteiligung der Prodomänen in einem ternären Rezeptor-Ligand-Komplex.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Dissertation beschreibt biochemische und biophysikalische Charakterisierungen der Proteine Easter, Spätzle und Toll zum Verständniss der Struktur-Funktions-Beziehungen des Spätzle-Toll-Signalweges, mit besonderem Augenmerk auf die Rolle der Spätzle-Prodomäne.

Die *in vitro*-Renaturierung und Reinigung einer artifiziell aktivierbaren Zymogenvariante der Protease *DmEaster* in einem präparativen Maßstab wurde etabliert. Da eine vollständige Aktivierung zu einer homogenen, aktiven Protease nicht gelang, wurde die postulierte sterische Einschränkung durch den *75-loop* untersucht und konnte dabei ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte die proteolytische Aktivität von Easter gegenüber zwei Spätzle-Isoformen, Spätzle11.7 und Spätzle8.19, auf enzymkinetischen Weg analysiert werden. Die bereitgestellte Protease bietet auch die Möglichkeit vergleichende Betrachtungen mit weiteren Spätzle-Isoformen und niedermolekularen Peptidsubstraten durchzuführen. Für die Isoformen Spätzle11.7 und Spätzle8.19 wurden erstmalig alternative Spaltstellen innerhalb der Prodomänen an den Exon-Grenzen identifiziert und als eine spezifische Aktivität von Easter nachgewiesen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung der Spätzle11.7-Prodomäne. Es wurde gezeigt, dass diese in Isolation intrinsisch unstrukturiert ist, jedoch in kooperativer Weise nicht-kovalent, durch vorwiegend hydrophobe Wechselwirkungen, an die reife Cystin-Knoten-Domäne bindet. Ferner wurde bestätigt, dass die Prodomäne die reife Domäne in ihrer Faltung stabilisiert, jedoch nur in kovalent-gebundener Form. Mittels chemisch-induzierten Entfaltungsübergängen konnte eine kontextabhängige Faltung für die 11.7Prodomäne nachgewiesen werden, da diese in dem nicht-kovalenten Komplex mit der Cystin-Knoten-Domäne ihrer Struktur stabilisiert ist.

Der letzte Schwerpunkt der Dissertation befasste sich mit Rezeptorbindungsstudien, in denen erstmalig der putative Signalkomplex durch mehrere unabhängige Methoden übereinstimmend als ein Komplex aus zwei Molekülen Cystin-Knoten-Domäne und zwei Molekülen Toll-Rezeptor nachgewiesen wurde. Durch Generierung eines artifiziellen, halbseitig gereiften Liganden konnte auch der Bindungsmodus eines monomeren *DmToll*-Spätzle CK-Komplexes, welcher mit den bisher beschriebenen TLR-Ligand-Komplexen nicht konform ist, indirekt bestätigt werden.

Dadurch konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass nach Easter-vermittelter Reifung die an der Cystin-Knoten-Domäne gebundenen Prodomänen in einem heterotrimeren Komplex mit dem Toll-Rezeptor beteiligt sein könnten.

Die vorliegende Arbeit lieferte durch biophysikalische Charakterisierungen neue Erkenntnisse zu der Spätzle-Prodomäne und ihren möglichen Funktionen im Spätzle-Toll-Signalweg. Dennoch müssen die Ergebnisse in einen biologischen Kontext gebracht werden. Eine funktionelle Analytik der sekundären Spaltstellen durch Identifikation eines damit assoziierten Phänotyps in transgenen *D. melanogaster*-Embryonen wurde bereits begonnen durch Klonierung und Mutagenese des Spätzle-Locus (Daten nicht gezeigt, in Kooperation mit Dipl.-Biol. Matthias Walther, Abteilung Entwicklungsgenetik, AG Prof. Dr. Gunther Reuter). Es konnten bisher jedoch keine transgenen Embryonen generiert werden um den *in vitro* identifizierten sekundären Spaltstellen eine funktionelle Relevanz *in vivo* zuzuordnen. Für ein detailliertes Verständnis der Spätzle-Isoformen und ihrer Rolle bei der Etablierung des morphogenetischen Gradienten sowie die Auslösung der angeborenen Immunantwort sind weitere enzymkinetische Untersuchungen dieser putativen Substrate unabdingbar.

Für folgende Arbeiten wäre zudem interessant, ob die Interaktion zwischen der 11.7Prodomäne und der Cystin-Knoten-Domäne, wie postuliert und hier indirekt nachgewiesen, durch eine amphipathische  $\alpha$ -Helix in der Prodomäne vermittelt wird. Durch Zusatz von  $\alpha$ -Helix-stabilisierenden Agentien wie Trifluorethanol könnte nachgewiesen werden, ob die isolierte Prodomäne prinzipiell dazu in der Lage ist  $\alpha$ -helikale Strukturen zu bilden. Auch eine Optimierung der Messbedingungen und weiterführende strukturelle Charakterisierung durch heteronukleare Kernspinresonanz-Experimente wären interessant.

Weiterhin wurde eine mögliche Beteiligung der Spätzle-Prodomäne in einem ternären Komplex mit der Cystin-Knoten-Domäne und dem Toll-Rezeptor beschrieben. Ein zweifelsfreier Nachweis dieses putativen 2 : 2 : 2 -Komplexes kann beispielsweise durch eine fluoreszenzmarkierte 11.7Prodomäne und analytischer Ultrazentrifugation mit Fluoreszenzdetektion erbracht werden. Dadurch könnte der Spätzle-Prodomäne erstmalig eine funktionelle Relevanz, über die Latenzvermittlung hinaus, zugeordnet werden, um zu klären ob die Prodomäne den verschiedenen Isoformen eine Spezifität für die verschiedenen Toll-Rezeptoren zuweisen kann.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Akhouayri,I., Turc,C., Royet,J., and Charroux,B. (2011). Toll-8/Tollo negatively regulates antimicrobial response in the Drosophila respiratory epithelium. *PLoS Pathog.* 7, e1002319.
2. Akiyama,T., Marques,G., and Wharton,K.A. (2012). A large bioactive BMP ligand with distinct signaling properties is produced by alternative proconvertase processing. *Sci. Signal.* 5, ra28.
3. Anderson,K.V. and Nüsslein-Volhard,C. (1984). Information for the dorsal--ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311, 223-227.
4. Armstrong,N., de Lencastre,A., and Gouaux,E. (1999). A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci.* 8, 1475-1483.
5. Arnold,U. and Ulbrich-Hofmann,R. (1999). Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Anal. Biochem.* 271, 197-199.
6. Arnot,C.J., Gay,N.J., and Gangloff,M. (2010). Molecular mechanism that induces activation of Spatzle, the ligand for the Drosophila Toll receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 19502-19509.
7. Asea,A., Rehli,M., Kabingu,E., Boch,J.A., Bare,O., Auron,P.E., Stevenson,M.A., and Calderwood,S.K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277, 15028-15034.
8. Baker,B.M. and Murphy,K.P. (1996). Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophys. J.* 71, 2049-2055.
9. Baker,D., Shiau,A.K., and Agard,D.A. (1993). The role of pro regions in protein folding. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 966-970.
10. Belvin,M.P. and Anderson,K.V. (1996). A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 393-416.
11. Bergner,A., Oganessyan,V., Muta,T., Iwanaga,S., Typke,D., Huber,R., and Bode,W. (1996). Crystal structure of a coagulogen, the clotting protein from horseshoe crab: a structural homologue of nerve growth factor. *EMBO J.* 15, 6789-6797.
12. Biswas,T. and Tsodikov,O.V. (2010). An easy-to-use tool for planning and modeling a calorimetric titration. *Anal. Biochem.* 406, 91-93.

13. Blandamer, M.J. (1998). Thermodynamic Background to Isothermal Titration Calorimetry. In *Biocalorimetry - Application of Calorimetry in the Biological Sciences*, J.E.Ladbury and B.Z.Chowdhry, eds. John Wiley & Sons), pp. 5-25.
14. Bode, W., Fehlhammer, H., and Huber, R. (1976). Crystal structure of bovine trypsinogen at 1.8 Å resolution. I. Data collection, application of Patterson search techniques and preliminary structural interpretation. *J. Mol. Biol.* *106*, 325-335.
15. Bode, W. and Schwager, P. (1975a). The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *J. Mol. Biol.* *98*, 693-717.
16. Bode, W. and Schwager, P. (1975b). The single calcium-binding site of crystallin bovine beta-trypsin. *FEBS Lett.* *56*, 139-143.
17. Botos, I., Segal, D.M., and Davies, D.R. (2011). The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure.* *19*, 447-459.
18. Broecker, J., Vargas, C., and Keller, S. (2011). Revisiting the optimal c value for isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* *418*, 307-309.
19. Bryan, P.N. (2002). Prodomains and protein folding catalysis. *Chem. Rev.* *102*, 4805-4816.
20. Buchanan, S.G.S. and Gay, N.J. (1996). Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *65*, 1-44.
21. Chang, A.J. and Morisato, D. (2002). Regulation of Easter activity is required for shaping the Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo. *Development* *129*, 5635-5645.
22. Chasan, R. and 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.
23. Chasan, R., Jin, Y., and Anderson, K.V. (1992). Activation of the easter zymogen is regulated by five other genes to define dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Development* *115*, 607-616.
24. Cho, Y.S., Stevens, L.M., Sieverman, K.J., Nguyen, J., and Stein, D. (2012). A ventrally localized protease in the *Drosophila* egg controls embryo dorsoventral polarity. *Curr. Biol.* *22*, 1013-1018.
25. Cho, Y.S., Stevens, L.M., and Stein, D. (2010). Pipe-dependent ventral processing of Easter by Snake is the defining step in *Drosophila* embryo DV axis formation. *Curr. Biol.* *20*, 1133-1137.
26. Cui, Y., Hackenmiller, R., Berg, L., Jean, F., Nakayama, T., Thomas, G., and Christian, J.L. (2001). The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev.* *15*, 2797-2802.



27. Cui,Y., Jean,F., Thomas,G., and Christian,J.L. (1998). BMP-4 is proteolytically activated by furin and / or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J.* *17*, 4735-4743.
28. Dang,Q.D. and Di Cera,E. (1996). Residue 225 determines the Na(+)-induced allosteric regulation of catalytic activity in serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 10653-10656.
29. Daopin,S., Piez,K.A., Ogawa,Y., and Davies,D.R. (1992). Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* *257*, 369-373.
30. Degnin,C., Jean,F., Thomas,G., and Christian,J.L. (2004). Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5012-5020.
31. Delaglio,F., Grzesiek,G., Vuister,W., Zhu,G., Pfeifer,J., and Bax,A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* *6*, 277-293.
32. DeLotto,Y. and DeLotto,R. (1998). Proteolytic processing of the Drosophila Spatzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. *Mech. Dev.* *72*, 141-148.
33. DeLotto,Y., Smith,C., and DeLotto,R. (2001). Multiple isoforms of the Drosophila Spatzle protein are encoded by alternatively spliced maternal mRNAs in the precellular blastoderm embryo. *Mol. Gen. Genet.* *264*, 643-652.
34. Dissing,M., Giordano,H., and DeLotto,R. (2001). Autoproteolysis and feedback in a protease cascade directing Drosophila dorsal-ventral cell fate. *EMBO J.* *20*, 2387-2393.
35. Dodson,G. and Wlodawer,A. (1998). Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 347-352.
36. Dunker,A.K., Cortese,M.S., Romero,P., Iakoucheva,L.M., and Uversky,V.N. (2005). Flexible nets - The role of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J.* *272*, 5129-5148.
37. Dunker,A.K., Lawson,J.D., Brown,C.J., Williams,R.M., Romero,P., Oh,J.S., Oldfield,C.J., Campen,A.M., Ratliff,C.M., Hipps,K.W., Ausio,J., Nissen,M.S., Reeves,R., Kang,C.H., Kissinger,C.R., Bailey,R.W., Griswold,M.D., Chiu,W., Garner,E.C., and Obradovic,Z. (2001). Intrinsically disordered proteins. *J. Mol. Graph. Model.* *19*, 26-59.
38. Dunker,A.K., Oldfield,C.J., Meng,J., Romero,P., Yang,J.Y., Chen,J.W., Vacic,V., Obradovic,Z., and Uversky,V.N. (2008). The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* *9*.

39. Eldon,E., Kooyer,S., D'Evelyn,D., Duman,M., Lawinger,P., Botas,J., and Bellen,H. (1994). The *Drosophila* 18 wheeler is required for morphogenesis and has striking similarities to Toll. *Development* *120*, 885-899.
40. Fehllhammer,H., Bode,W., and Huber,R. (1977). Crystal structure of bovine trypsinogen at 1-8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, refined crystal structure and comparison with bovine trypsin. *J. Mol. Biol.* *111*, 415-438.
41. Feng,D., Kim,T., Özkan,E., Light,M., Torkin,R., Teng,K.K., Hempstead,B.L., and Garcia,K.C. (2010). Molecular and Structural Insight into proNGF Engagement of p74NTR and Sortilin. *J. Mol. Biol.* *396*, 967-984.
42. Freire,E. (1994). Statistical thermodynamic analysis of differential scanning calorimetry data: structural deconvolution of heat capacity function of proteins. *Methods Enzymol.* *240*, 502-530.
43. Freyer,M.W. and Lewis,E.A. (2008). Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol.* *84*, 79-113.
44. Frost,A.A. and Pearson,R.G. (1964). Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen. In *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, L.Riekert, ed. Verlag Chemie GmbH, p. 519.
45. Gangloff,M., Murali,A., Xiong,J., Arnot,C.J., Weber,A.N., Sandercock,A.M., Robinson,C.V., Sarisky,R., Holzenburg,A., Kao,C., and Gay,N.J. (2008). Structural insight into the mechanism of activation of the Toll receptor by the dimeric ligand Spätzle. *J. Biol. Chem.* *283*, 14629-14635.
46. Gangloff,M., Weber,A.N., Gibbard,R.J., and Gay,N.J. (2003). Evolutionary relationships, but functional differences, between the *Drosophila* and human Toll-like receptor families. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 659-663.
47. Gay,N.J. and Gangloff,M. (2007). Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 141-165.
48. Gay,N.J. and Keith,F.J. (1991). *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* *351*, 355-356.
49. Gill,S.C. and von Hippel,P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* *182*, 319-326.
50. Gobert,V., Gottar,M., Matskevich,A.A., Rutschmann,S., Royet,J., Belvin,M., Hoffmann,J.A., and Ferrandon,D. (2003). Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* *302*, 2126-2130.
51. Gottar,M., Gobert,V., Matskevich,A.A., Reichardt,L.F., Wang,C., Butt,T.M., Belvin,M., Hoffmann,J.A., and Ferrandon,D. (2006). Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell* *127*, 1425-1437.

52. Graveley, B.R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* *17*, 100-107.
53. Ha, J.H., Spolar, R.S., and Record, M.T., Jr. (1989). Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes. *J. Mol. Biol.* *209*, 801-816.
54. Hashimoto, C., Gerttula, S., and Anderson, K.V. (1991). Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial *Drosophila* embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation. *Development* *111*, 1021-1028.
55. Hashimoto, C., Hudson, K.L., and 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.
56. Hashimoto, C., Kim, D.R., Weiss, L.A., Miller, J.W., and Morisato, D. (2003). Spatial regulation of developmental signaling by a serpin. *Dev. Cell* *5*, 945-950.
57. Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* *102*, 4501-4524.
58. Hillger, F., Herr, G., Rudolph, R., and 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. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 14974-14980.
59. Hoffmann, A., Funkner, A., Neumann, P., Juhnke, S., Walther, M., Schierhorn, A., Weininger, U., Balbach, J., Reuter, G., and Stubbs, M.T. (2008). Biophysical Characterization of Refolded *Drosophila* Spätzle, a Cystine Knot Protein, Reveals Distinct Properties of Three Isoforms. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 32598-32609.
60. Hoffmann, Anita (2009) Biophysikalische Charakterisierung der Isoformen von *Drosophila melanogaster* Spätzle, einem NGF-ähnlichen Protein der Familie der Cystinknoten. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biochemie und Biotechnologie.
61. Hoffmann, J.A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* *426*, 33-38.
62. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* *162*, 3749-3752.
63. Hu, D.D. and Eftink, M.R. (1994). Thermodynamic studies of the interaction of trp aporepressor with tryptophan analogs. *Biophys. Chem.* *49*, 233-239.
64. Hu, X., Yaga, Y., Tanji, T., Zhou, S., and Ip, Y.T. (2004). Multimerization and interaction of Toll and Spätzle in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 9369-9374.

65. Huang,R., Lu,Z., Dai,H., Velde,D.V., Prakash,O., and Jiang,H. (2007). The solution structure of clip domains from *Manduca sexta* prophenoloxidase activating proteinase-2. *Biochemistry* *46*, 11431-11439.
66. Huber,R. and Bode,W. (1978). Structural Basis of the Activation and Action of Trypsin. *Accounts of Chemical Research* *11*, 114-122.
67. Huber,R., Kukla,D., Bode,W., Schwager,P., Bartels,K., Deisenhofer,J., and Steigemann,W. (1974). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *89*, 73-101.
68. Ibanez,C.F. (2002). Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci.* *25*, 284-286.
69. Imler,J.L. and Hoffmann,J.A. (2001). Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* *11*, 304-311.
70. Iwanaga,S. (1993). The limulus clotting system. *Curr. Opin. Immun.* *5*, 74-82.
71. Janeway,C.A., Jr. (1989). Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54*, 1-13.
72. Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197-216.
73. 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., and Lee,W.J. (2006). A Spatzle-processing enzyme required for toll signaling activation in *Drosophila* innate immunity. *Dev. Cell* *10*, 45-55.
74. Jang,I.H., Nam,H.J., and Lee,W.J. (2008). CLIP-domain serine proteases in *Drosophila* innate immunity. *BMB. Rep.* *41*, 102-107.
75. Jelesarov,I. and Bosshard,H.R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* *12*, 3-18.
76. Jiang,H. and Kanost,M.R. (2000). The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *30*, 95-105.
77. Jin,M.S., Kim,S.E., Heo,J.Y., Lee,M.E., Kim,H.M., Paik,S.G., Lee,H., and Lee,J.O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* *130*, 1071-1082.
78. Jin,M.S. and Lee,J.O. (2008). Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. *Immunity* *29*, 182-191.
79. Johnson,B.A. and Blevins,R.A. (1994). NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* *4*, 603-614.

80. Kambris,Z., Brun,S., Jang,I.H., Nam,H.J., Romeo,Y., Takahashi,K., Lee,W.J., Ueda,R., and Lemaitre,B. (2006). *Drosophila* immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. *Curr. Biol.* *16*, 808-813.
81. Kay,L.E., Torchia,D.E., and Bax,A. (1998). Backbone dynamics of proteins as studied by <sup>15</sup>N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* *28*, 8972-8979.
82. Kellenberger,C., Leone,P., Coquet,L., Jouenne,T., Reichhart,J.M., and Roussel,A. (2011). Structure-function analysis of grass clip serine protease involved in *Drosophila* Toll pathway activation. *J. Biol. Chem.* *286*, 12300-12307.
83. Khan,A.R. and James,M.N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* *7*, 815-836.
84. 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., and Lee,J.O. (2007). Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* *130*, 906-917.
85. Kliemannel,M., Golbik,R., Rudolph,R., Schwarz,E., and Lilie,H. (2007). The pro-peptide of proNGF: structure formation and intramolecular association with NGF. *Protein Sci.* *16*, 411-419.
86. Kliemannel,M., Rattenholl,A., Golbik,R., Balbach,J., Lilie,H., Rudolph,R., and Schwarz,E. (2004). The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett.* *566*, 207-212.
87. Kuhfahl, Silke (2014) Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Prodomäne von BMP-2. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biochemie und Biotechnologie.
88. Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
89. Laue,T. (2001). Analytical centrifugation: equilibrium approach. *Curr. Protoc. Protein Sci.* *Chapter 20*, Unit20.
90. Lebowitz,J., Lewis,M.S., and Schuck,P. (2002). Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci.* *11*, 2067-2079.
91. Lee,R., Kermani,P., Teng,K.K., and Hempstead,B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* *294*, 1945-1948.
92. Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
93. Lemmon,M.A., Bu,Z., Ladbury,J.E., Zhou,M., Pinchasi,D., Lax,I., Engelman,D.M., and Schlessinger,J. (1997). Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J.* *16*, 281-294.

94. LeMosy,E.K., Hong,C.C., and Hashimoto,C. (1999). Signal transduction by a protease cascade. *Trends Cell Biol.* 9, 102-107.
95. Leulier,F. and Lemaitre,B. (2008). Toll-like receptors - taking an evolutionary approach. *Nature* 9, 165-178.
96. Levashina,E.A., Langley,E., Green,C., Gubb,D., Ashburner,M., Hoffmann,J.A., and Reichhart,J.M. (1999). Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science* 285, 1917-1919.
97. Lewis,M., Arnot,C.J., Beeston,H., McCoy,A., Ashcroft,A.E., Gay,N.J., and Gangloff,M. (2013). Cytokine Spatzle binds to the *Drosophila* immunoreceptor Toll with a neurotrophin-like specificity and couples receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
98. Liu,S.C., Botos,I., Wang,Y., Leonard,J.N., Shiloach,J., Segal,D.M., and Davies,D.R. (2008). Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 320, 379-381.
99. Livingstone,J.R., Spolar,R.S., and Record,M.T., Jr. (1991). Contribution to the thermodynamics of protein folding from the reduction in water-accessible nonpolar surface area. *Biochemistry* 30, 4237-4244.
100. Lottenberg,R. and Jackson,C.M. (1983). Solution composition dependent variation in extinction coefficients for p-nitroaniline. *Biochim. Biophys. Acta* 742, 558-564.
101. Maley,F., Trimble,R.B., Tarentino,A.L., and Plummer,T.H., Jr. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* 180, 195-204.
102. Matzinger,P. (2002). The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* 296, 310-305.
103. McDonald,N.Q. and Hendrickson,W.A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73, 421-424.
104. McDonald,N.Q., Lapatto,R., Murray-Rust,J., Gunning,J., Wlodawer,A., and Blundell,T.L. (1991). New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 354, 411-414.
105. McIlroy,G., Foldi,I., Aurikk,J., Wentzell,J., Lim,M.A., Fenton,J.C., Gay,N.J., and Hidalgo,A. (2014). Toll-6 and Toll-7 function as neurotrophin receptors in the *Drosophila melanogaster* CNS. *Nat. Neurosci.* 16, 1248-1256.
106. Medzhitov,R. (2011). Approaching the Asymptote: 20 Years Later. *Immunity* 30, 766-775.
107. Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* 91, 295-298.

108. Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (1998). An ancient system of host defence. *Curr. Opin. Immun.* *10*, 12-15.
109. Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
110. Meszaros,B., Tompa,P., Simon,I., and Dosztanyi,Z. (2007). Molecular principles of the interactions of disordered proteins. *J. Mol. Biol.* *372*, 549-561.
111. Michel,T., Reichhart,J.M., Hoffmann,J.A., and Royet,J. (2001). *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* *414*, 756-759.
112. Misra,S., Hecht,P., Maeda,R., and 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.
113. Mohan,A., Oldfield,C.J., Radivojac,P., Vacic,V., Cortese,M.S., Dunker,A.K., and Uversky,V.N. (2006). Analysis of molecular recognition features (MoRFs). *J. Mol. Biol.* *362*, 1043-1059.
114. Mok,YK., dePrat Gay,G., Butler,P.J., and Bycroft,M. (1996). Equilibrium dissociation and unfolding of the dimeric human papillomavirus strain-16 E2 DNA-binding domain. *Protein Sci.* *5*, 310-319.
115. Morisato,D. and 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.
116. Morisato,D. and Anderson,K.V. (1995). Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu. Rev. Genet.* *29*, 371-399.
117. Moussian,B. and Roth,S. (2005). Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo-shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr. Biol.* *15*, R887-R899.
118. Murray-Rust,J., McDonald,N.Q., Blundell,T.L., Hosang,M., Oefner,C., Winkler,F., and 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.
119. Myers,J.K., Pace,C.N., and Scholz,J.M. (1995). Denaturant *m* values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* *4*, 2138-2148.
120. Nakayama,K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* *327*, 625-635.
121. Neet,K.E. and Timm,D.E. (1994). Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* *3*, 2167-2174.

122. Nesterenko, M.V., Tilley, M., and Upton, S.J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* **28**, 239-242.
123. Nielsen, A.D., Fuglsang, C.C., and Westh, P. (2003). Isothermal titration calorimetric procedure to determine protein-metal ion binding parameters in the presence of excess metal ion or chelator. *Anal. Biochem.* **314**, 227-234.
124. 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., and Petersen, C.M. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**, 843-848.
125. Nyman, T., Stenmark, P., Flodin, S., Johansson, I., Hammarström, M., and Nordlund, P. (2008). The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer. *J. Biol. Chem.* **283**, 11861-11865.
126. Oefner, C., D'Arcy, A., Winkler, F.K., Eggiman, B., and Hosang, M. (1992). Crystal structure of human platelet-derived growth factor-BB. *EMBO J.* **11**, 3921-3926.
127. Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775-787.
128. Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* **164**, 558-561.
129. Pace, C.N. (1990). Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol.* **8**, 93-98.
130. Pace, C.N. and Scholz, J.M. (1997). Measuring the conformational stability of a protein. T.E.Creighton, ed. Oxford University Press), pp. 299-321.
131. Pace, C.N. and Shaw, K.L. (2000). Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins Suppl* **4**, 1-7.
132. Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
133. Pagadala, P.C., Dvorak, L.A., and Neet, K.E. (2006). Construction of a mutated pro-nerve growth factor resistant to degradation and suitable for biophysical and cellular utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 17939-17943.
134. Palmer, A.G.3., Kroenke, C.D., and Loria, J.P. (2001). Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Methods Enzymol.* **339**, 204-238.
135. Pansca, R. and Fuxreiter, M. (2012). Interactions via Intrinsically Disordered Region: What Kind of Motifs? *IUBMB Life* **64**, 513-520.



136. Paoletti,F., Covaceuszach,S., Konarev,P.V., Gonfloni,S., Malerba,F., Schwarz,E., Svergun,D.I., Cattaneo,A., and Lamba,D. (2008). Intrinsic structural disorder of mouse proNGF. *Proteins* 75, 990-1009.
137. Paoletti,F., Malerba,F., Kelly,G., Noinville,S., Lamba,D., Cattaneo,A., and Pastore,A. (2011). Conformational Plasticity of proNGF. *PLoSOne* 6, e22615.
138. Park,B.S., Song,D.H., Kim,H.M., Choi,B.S., Lee,H., and Lee,J.O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191-1195.
139. Parker,J.S., Mizugushi,K., and Gay,N.J. (2001). A family of proteins related to Spätzle, the toll receptor ligand, are encoded in the *Drosophila* genome. *Proteins* 45, 71-80.
140. Parthier,C., Stelter,M., Ursel,C., Fandrich,U., Lilie,H., Breithaupt,C., and Stubbs,M.T. (2014). Structure of the Toll-Spätzle complex, a molecular hub in *Drosophila* development and innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 111, 6281-6286.
141. Pasare,C. and Medzhitov,R. (2004). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* 6, 1382-1387.
142. Perona,J.J. and Craik,C.S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 4, 337-360.
143. Piao,S., Kim,S., Kim,J.H., Park,J.W., Lee,B.L., and Ha,N.C. (2007). Crystal structure of the serine protease domain of prophenoloxidase activating factor-I. *J. Biol. Chem.* 282, 10783-10791.
144. Piao,S., Song,Y.L., Kim,J.H., Park,S.Y., Park,J.W., Lee,B.L., Oh,B.H., and Ha,N.C. (2005). Crystal structure of a clip-domain serine protease and functional roles of the clip domains. *EMBO J.* 24, 4404-4414.
145. Piotto,M., Saudek,V., and Sklenar,V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* 2, 661-665.
146. Prilusky,J., Felder,C.E., Zeev-Ben-Mordehai,T., Rydberg,E.H., Man,O., Beckmann,J.S., Silman,I., and Sussman,J.L. (2005). FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* 21, 3435-3438.
147. Rattenholl,A., Lilie,H., Grossmann,A., Stern,A., Schwarz,E., and Rudolph,R. (2001a). The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* 268, 3296-3303.
148. Rattenholl,A., Ruopollo,M., Flagiello,A., Monti,M., Vinci,F., Mariono,G., Lilie,H., Schwarz,E., and Rudolph,R. (2001b). Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 305, 523-533.
149. Rehm,T., Huber,R., and Holak,T.A. (2002). Application of NMR in structural proteomics: screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure.* 10, 1613-1618.

150. Reichardt,L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *361*, 1545-1564.
151. Rock,F., Hardiman,G., Timans,J., Kastelein,R., and Bazan,J. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 588-593.
152. Rockwell,N.C., Krysan,D.J., Komiyama,T., and Fuller,R.S. (2002). Precursor processing by *kex2*/furin proteases. *Chem. Rev.* *102*, 4525-4548.
153. Rose,T., LeMosy,E.K., Cantwell,A.M., Banerjee-Roy,D., Skeath,J.B., and Di Cera,E. (2003). Three-dimensional models of proteases involved in patterning of the *Drosophila* Embryo. Crucial role of predicted cation binding sites. *J. Biol. Chem.* *278*, 11320-11330.
154. Rudolph,R., Böhm,G., Lilie,H., and Jaenicke,R. (1997). *Protein Function: A Practical Approach*. T.E.Creighton, ed. Oxford University Press), pp. 57-99.
155. Rudolph,R. and Lilie,H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* *10*, 49-56.
156. Rumfeldt,J.A., Galvagnion,C., Vassall,K.A., and Meiering,E.M. (2008). Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *98*, 61-84.
157. Santoro,M.M. and Bolen,D.W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* *27*, 8063-8068.
158. Schägger,H. and von Jagow,G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* *166*, 368-379.
159. Schechter,I. and Berger,A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *27*, 157-162.
160. Scheibner,K.A., Lutz,M.A., Boodoo,S., Fenton,M.J., Powell,J.D., and Horton,M.R. (2006). Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.* *177*, 1272-1281.
161. Schmid,F.X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure: A Practical Approach*, T.E.Creighton, ed. Oxford University Press), pp. 261-297.
162. Schneider,D.S., Hudson,K.L., Lin,T.Y., and Anderson,K.V. (1991). Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* *5*, 797-807.

163. Schneider,D.S., Jin,Y., Morisato,D., and Anderson,K.V. (1994). A processed form of the Spatzle protein defines dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Development* *120*, 1243-1250.
164. Schneider,I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *27*, 353-365.
165. Seidah,N.G., Benjannet,S., Pareek,S., Savaria,D., Hamelin,J., Goulet,B., Laliberte,J., Lazure,C., Chretien,M., and Murphy,R.A. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* *314*, 951-960.
166. Shi,M., Zhu,J., Wang,R., Chen,X., Mi,L., Walz,T., and Springer,T.A. (2011). Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* *474*, 343-349.
167. Shim,A.H., Liu,H., Focia,P.J., Chen,X., Lin,P.C., and He,X. (2010). Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *107*, 11307-11312.
168. Shotton,D.M. and Hartley,B.S. (1970). Amino-acid sequence of porcine pancreatic elastase and its homologies with other serine proteinases. *Nature* *225*, 802-806.
169. Sieg, T. (2008) Rückfaltung und Charakterisierung von Easter und Spätzle Processing Enzyme. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biochemie und Biotechnologie.
170. Sigurskjold,B.W. (2000). Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* *277*, 260-266.
171. Smith,C.L. and DeLotto,R. (1992). A common domain within the proenzyme regions of the *Drosophila* snake and easter proteins and *Tachypleus* proclotting enzyme defines a new subfamily of serine proteases. *Protein Sci.* *1*, 1225-1226.
172. Smith,C.L. and DeLotto,R. (1994). Ventralizing signal determined by protease activation in *Drosophila* embryogenesis. *Nature* *368*, 548-551.
173. Smith,C.L., Giordano,H., Schwartz,M., and DeLotto,R. (1995). Spatial regulation of *Drosophila* snake protease activity in the generation of dorsal-ventral polarity. *Development* *121*, 4127-4135.
174. Sopory,S., Nelsen,S.M., Degrin,C., Wong,C., and Christian,J.L. (2006). Regulation of bone morphogenetic protein-4 activity by sequence elements within the prodomain. *J. Biol. Chem.* *281*, 34021-34031.
175. Spolar,R.S. and Record,M.T., Jr. (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* *263*, 777-784.
176. Sreerama,N. and 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. *Anal. Biochem.* *287*, 252-260.

177. Sreerama,N. and Woody,R.W. (2003). Structural composition of betal- and betall- proteins. *Protein Sci.* *12*, 384-388.
178. Sreerama,N. and Woody,R.W. (2004). Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.* *383*, 318-351.
179. Stafford,W. (2003). Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity analysis. *Curr. Protoc. Protein Sci.* *Chapter 20*, Unit.
180. Stein,D. and 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.
181. Stein,D., Roth,S., Vogelsang,E., and Nusslein-Volhard,C. (1991). The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* *65*, 725-735.
182. Steitz,T.A., Henderson,R., and Blow,D.M. (1969). Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. 3. Crystallographic studies of substrates and inhibitors bound to the active site of alpha-chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* *46*, 337-348.
183. Stelter,M., Fandrich,U., Franzke,K., Schierhorn,A., Breithaupt,C., Parthier,C., and Stubbs,M.T. (2013). High level expression of the *Drosophila* Toll receptor ectodomain and crystallization of its complex with the morphogen Spatzle. *Biol. Chem.* *394*, 1091-1096.
184. Steward,R. (1989). Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* *59*, 1179-1188.
185. Steward,R., Zusman,S.B., Huang,L.H., and Schedl,P. (1988). The dorsal protein is distributed in a gradient in early *Drosophila* embryos. *Cell* *55*, 487-495.
186. Stroud,R.M., Kossiakoff,A.A., and Chambers,J.L. (1977). Mechanisms of zymogen activation. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* *6*, 177-193.
187. Sun,H., Towb,P., Chiem,D.N., Foster,B.A., and Wasserman,S.A. (2004). Regulated assembly of the Toll signaling complex drives *Drosophila* dorsoventral patterning. *EMBO J.* *23*, 100-110.
188. Sun,P.D. and Davies,D.R. (1995). The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *24*, 269-291.
189. Tauszig,S., Jouanguy,E., Hoffmann,J.A., and Imler,J.L. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 10520-10525.
190. Tellgmann, Gabriele (1998) Messung der Reaktionsenthalpie von Teilreaktionen der visuellen Kaskade. Humboldt-Universität Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für medizinische Physik und Biophysik der Charité.

191. Teng,H.K., Teng,K.K., Lee,R., Wright,S., Tevar,S., Almeida,R.D., Kermani,P., Torkin,R., Chen,Z.Y., Lee,F.S., Kraemer,R.T., Nykjaer,A., and Hempstead,B.L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci.* *25*, 5455-5463.
192. Teng,K.K. and Hempstead,B.L. (2004). Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol. Life Sci.* *61*, 35-48.
193. Tompa,P. and Fuxreiter,M. (2008). Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 2-8.
194. Ursel, Christian (2009) Optimierung der in vitro-Renaturierung von Easter und Spätzle Processing Enzyme zur biophysikalischen Charakterisierung. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biochemie und Biotechnologie.
195. Uversky,V.N. (2002). What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* *269*, 2-12.
196. Uversky,V.N., Gillespie,J.R., and Fink,A.L. (2000). Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* *41*, 415-427.
197. Valanne,S., Wang,J.H., and Ramet,M. (2011). The Drosophila Toll signaling pathway. *J. Immunol.* *186*, 649-656.
198. Wang,Y. and Zhu,S. (2009). Evolutionary and functional epitopes of the Spatzle protein: new insights into activation of the Toll receptor. *Cell Mol. Life Sci.* *66*, 1595-1602.
199. Wang,Z.X. (1995). An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS Lett.* *360*, 111-114.
200. Weber,A.N., Gangloff,M., Moncrieffe,M.C., Hyvert,Y., Imler,J.L., and Gay,N.J. (2007). Role of the Spätzle Pro-domain in the generation of an active toll receptor ligand. *J. Biol. Chem.* *282*, 13522-13531.
201. Weber,A.N., Moncrieffe,M.C., Gangloff,M., Imler,J.L., and Gay,N.J. (2005). Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the Drosophila toll pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 22793-22799.
202. Weber,A.N., Tauszig-Delamasure,S., Hoffmann,J.A., Lelievre,E., Gascan,H., Ray,K.P., Morse,M.A., Imler,J.L., and Gay,N.J. (2003). Binding of the Drosophila cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat. Immunol.* *4*, 794-800.
203. Wiseman,T., Williston,S., Brandts,J.F., and Lin,L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* *179*, 131-137.
204. Wright,P.E. and Dyson,H.J. (2009). Linking folding and binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 31-38.

205. Xie,D. and Freire,E. (1994). Structure based prediction of protein folding intermediates. *J. Mol. Biol.* *242*, 62-80.
206. Yoon,S.I., Kurnasov,O., Natarajan,V., Hong,M., Gudkov,A.V., Osterman,A.L., and Wilson,I.A. (2012). Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* *335*, 859-864.
207. Zhang,Z., Stevens,L.M., and Stein,D. (2009). Sulfation of eggshell components by Pipe defines dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Curr. Biol.* *19*, 1200-1205.
208. Zhu,B., Pennack,J.A., McQuilton,P., Forero,M.G., Mizugushi,K., Sutcliffe,B., Gu,C.J., Fenton,J.C., and Hidalgo,A. (2008). *Drosophila* neurotrophins reveal a common mechanism for nervous system formation. *PLoS Biol.* *6*, e284.

## 8 Anhang

### 8.1 Sequenzvergleich von Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen

	16	20	30	40	50	60																																																						
<i>BtTrypsin</i>	I	V	G	G	Y	T	C	G	A	N	T	V	P	Y	Q	V	S	L	N	S	-----	G	Y	H	F	C	G	G	S	L	I	N	S	Q	W	V	V	S	A	A	H	C	Y	K	S	G	-----													
<i>HsFaktorXa</i>	I	V	G	G	Q	E	C	K	D	G	E	C	P	W	Q	A	L	L	I	N	E	E	---	N	E	G	F	C	G	G	T	I	L	S	E	F	Y	I	L	T	A	A	H	C	L	Y	Q	A	K	-----	R									
<i>DmGrass</i>	V	S	N	G	Y	E	V	K	L	S	S	R	P	W	M	A	L	L	R	Y	Q	Q	-	F	G	E	S	R	F	L	C	G	G	A	M	I	S	E	R	Y	I	L	T	A	A	H	C	V	H	G	---	L	Q	N	D	---	L			
<i>DmEaster</i>	I	Y	G	M	K	T	K	I	D	E	F	P	W	M	A	L	I	E	Y	T	K	S	Q	G	K	G	H	H	C	G	G	S	L	I	S	T	R	Y	V	I	T	A	S	H	C	V	N	G	K	-	A	L	P	T	D	W	R	L		
		70		80	90	100																																																						
<i>BtTrypsin</i>	I	Q	V	R	L	G	E	D	N	I	N	V	V	E	G	N	-----	E	Q	F	I	S	A	S	K	S	I	V	H	P	S	Y	N	---	S	N	T	L	N	N	D	I	M	L	I	K	L													
<i>HsFaktorXa</i>	F	K	V	R	V	G	D	R	N	T	E	Q	E	E	G	---	E	A	V	H	E	V	E	V	I	K	H	N	R	F	T	---	K	E	T	Y	D	F	D	I	A	V	L	R	L															
<i>DmGrass</i>	Y	E	I	R	L	G	E	H	R	I	S	T	E	E	D	C	R	Q	Q	G	R	-	K	K	K	C	A	P	P	V	V	N	V	G	I	E	K	H	L	I	H	E	K	Y	D	---	A	R	H	I	M	H	D	I	A	L	L	K	L	
<i>DmEaster</i>	S	G	V	R	L	G	E	W	D	T	N	T	N	P	D	C	E	V	D	V	R	G	M	K	D	C	A	P	P	H	L	D	V	P	V	E	R	T	I	P	H	P	D	Y	I	P	A	S	K	N	Q	V	N	D	I	A	L	L	R	L
		110	120	130	140	150	160																																																					
<i>BtTrypsin</i>	K	S	A	A	S	L	N	S	R	V	A	S	I	S	L	P	-----	T	S	C	A	S	A	G	T	Q	C	L	I	S	G	W	G	N	T	K	S	S	G	T	S	Y	P	D	V	L	K	C	L	K	A	P	I	L	S	D				
<i>HsFaktorXa</i>	K	T	P	I	T	F	R	M	N	V	A	P	A	C	L	P	E	R	D	W	A	E	S	T	L	M	T	Q	K	T	G	I	V	S	G	F	G	R	T	H	E	K	G	R	Q	S	-	T	R	L	K	M	L	E	V	P	Y	V	D	R
<i>DmGrass</i>	N	R	S	V	P	F	Q	K	H	I	K	P	I	C	L	P	I	T	D	E	L	K	E	K	A	E	Q	I	S	T	Y	F	V	T	G	W	G	T	T	E	N	G	S	S	D	V	L	L	Q	A	N	V	P	L	Q	P	R	S	A	
<i>DmEaster</i>	A	Q	Q	V	E	Y	T	D	F	V	R	P	I	C	L	P	L	D	V	N	L	R	S	A	T	F	D	G	I	T	M	D	V	A	G	W	G	K	T	E	Q	L	S	A	N	L	K	L	K	A	A	V	E	G	S	R	M	D	E	
				<i>autolysis loop (142-152)</i>																																																								
		170	180	190	200	210																																																						
<i>BtTrypsin</i>	S	S	C	K	S	A	Y	P	G	Q	I	T	S	N	-	M	F	C	A	G	Y	L	E	G	G	K	D	S	C	Q	G	D	S	G	G	P	V	V	C	S	G	K	-----	L	Q	G	I	V	S	W	G									
<i>HsFaktorXa</i>	N	S	C	K	L	S	S	S	F	I	I	T	Q	N	-	M	F	C	A	G	Y	D	T	K	Q	E	D	A	C	Q	G	D	S	G	G	P	H	V	T	R	F	K	D	T	-----	Y	F	V	T	G	I	V	S	W	G					
<i>DmGrass</i>	C	S	Q	A	Y	R	-	R	A	V	P	L	S	-	-	Q	L	C	V	G	G	G	D	-	L	Q	D	S	C	K	G	D	S	G	G	P	L	Q	A	P	A	Q	Y	L	G	E	Y	A	P	K	M	V	E	F	G	I	V	S	Q	G
<i>DmEaster</i>	C	Q	N	V	Y	S	S	Q	D	I	L	L	E	D	T	Q	M	C	A	G	G	K	E	-	G	V	D	S	C	R	G	D	S	G	G	P	L	I	G	-	-	L	D	T	N	K	V	N	T	Y	Y	F	L	A	G	V	V	S	F	G
		<i>surface loop I (184-193)</i>																																																										
		220	230	240																																																								
<i>BtTrypsin</i>	S	G	-	C	A	Q	K	N	K	P	G	V	Y	T	K	V	C	N	Y	V	S	W	I	K	Q	T	I	A	S	N	-----																													
<i>HsFaktorXa</i>	E	G	-	C	A	R	K	G	K	Y	G	I	Y	T	K	V	T	A	F	L	K	W	I	D	R	S	M	K	T	R	G	L	P	K	A	K	S	H	A	P	E	V	I	T	S	S	P	L	K											
<i>DmGrass</i>	V	V	T	C	G	Q	I	S	L	P	G	L	Y	T	N	V	G	E	Y	V	Q	W	I	T	D	T	M	A	S	N	G	L	-----																											
<i>DmEaster</i>	P	T	P	C	G	L	A	G	W	P	G	V	Y	T	L	V	G	K	Y	V	D	W	I	Q	N	T	I	E	S	-----																														
		<i>surface loop II (216-223)</i>																																																										

**Abbildung 8-1: Sequenzvergleich von Easter mit verwandten Proteasen der S1-Familie.**

Die Sequenz der katalytischen Domäne von *D. melanogaster* Easter (*DmEaster*, P13582) wurde verglichen mit aktivierten bovinen Trypsin (*BtTrypsin*, P00760), der aktivierten schweren Kette von humanen Faktor X (*HsFaktor Xa*, P00742) und der katalytischen Domäne von *D. melanogaster* Grass (*DmGrass*, Q9VB68). Die Aminosäurereste der katalytischen Triade H<sup>c57</sup>, D<sup>c102</sup> und S<sup>c195</sup> sind rot markiert, die Sequenz des 75-loop blau hervorgehoben. Aminosäurereste D<sup>c189</sup>, G<sup>c216</sup> und G<sup>c226</sup>, welche die S1-Spezifität bestimmen (Perona und Craik, 1995) sind grün hervorgehoben. Abschnitte mit Sequenzidentität zwischen Trypsin und Easter sind grau unterlegt, bei Sequenzhomologie unterstrichen. Die jeweiligen UniProt-Identifikationsnummern sind angegeben. Die Nummerierung bezieht sich auf die von Shotton und Hartley (1970) eingeführte Nomenklatur.

## 8.2 Sequenzvergleich der Isoformen von Spätzle

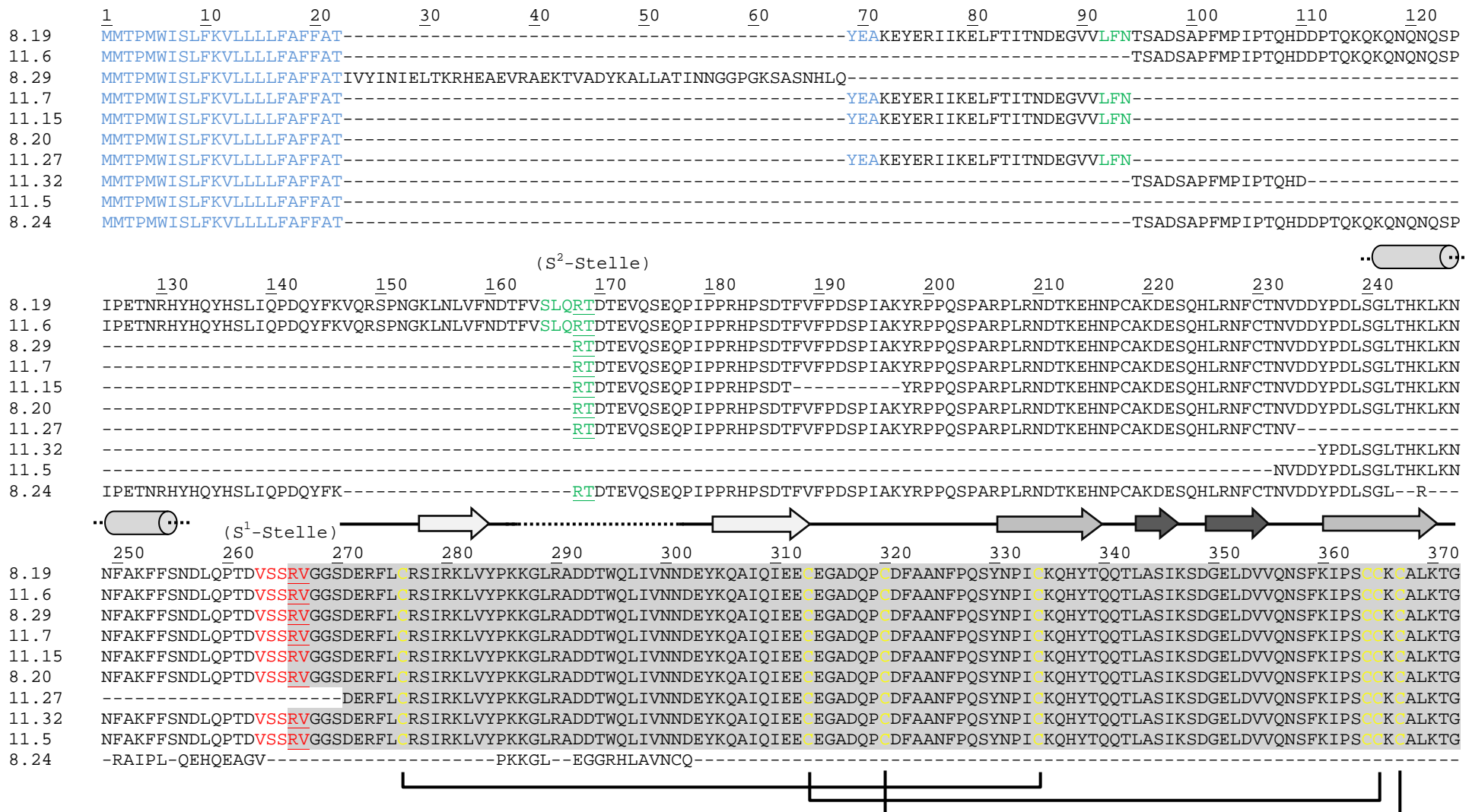
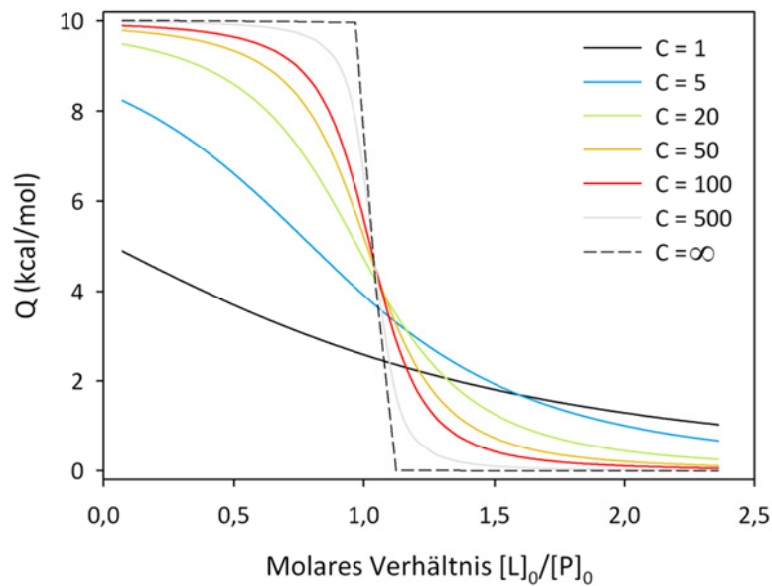


Abbildung 8-2: Sequenzvergleich der bekannten Isoformen von *DmSpätzle*.

Die Signalsequenz ist blau gekennzeichnet und die Cystin-Knoten-Domäne grau unterlegt. Die S<sup>1</sup>-Spaltstelle ist rot und die S<sup>2</sup>-Spaltstelle grün gekennzeichnet. Der Sequenzvergleich erfolgte nach maximaler Identität. Die Cysteine der Cystin-Knoten-Domäne (gelb) und deren Disulfidverbrückung sowie die aus der Kristallstruktur ermittelten Sekundärstrukturelemente sind dargestellt (Hoffmann *et al.*, 2008). Paarende  $\beta$ -Stränge sind entsprechend farblich markiert. Der in der Struktur nicht aufzulösende Trp-loop ist durch die gepunktete Linie gezeigt. Eine postulierte  $\alpha$ -Helix (Arnot *et al.*, 2010) ist als Zylinder markiert.



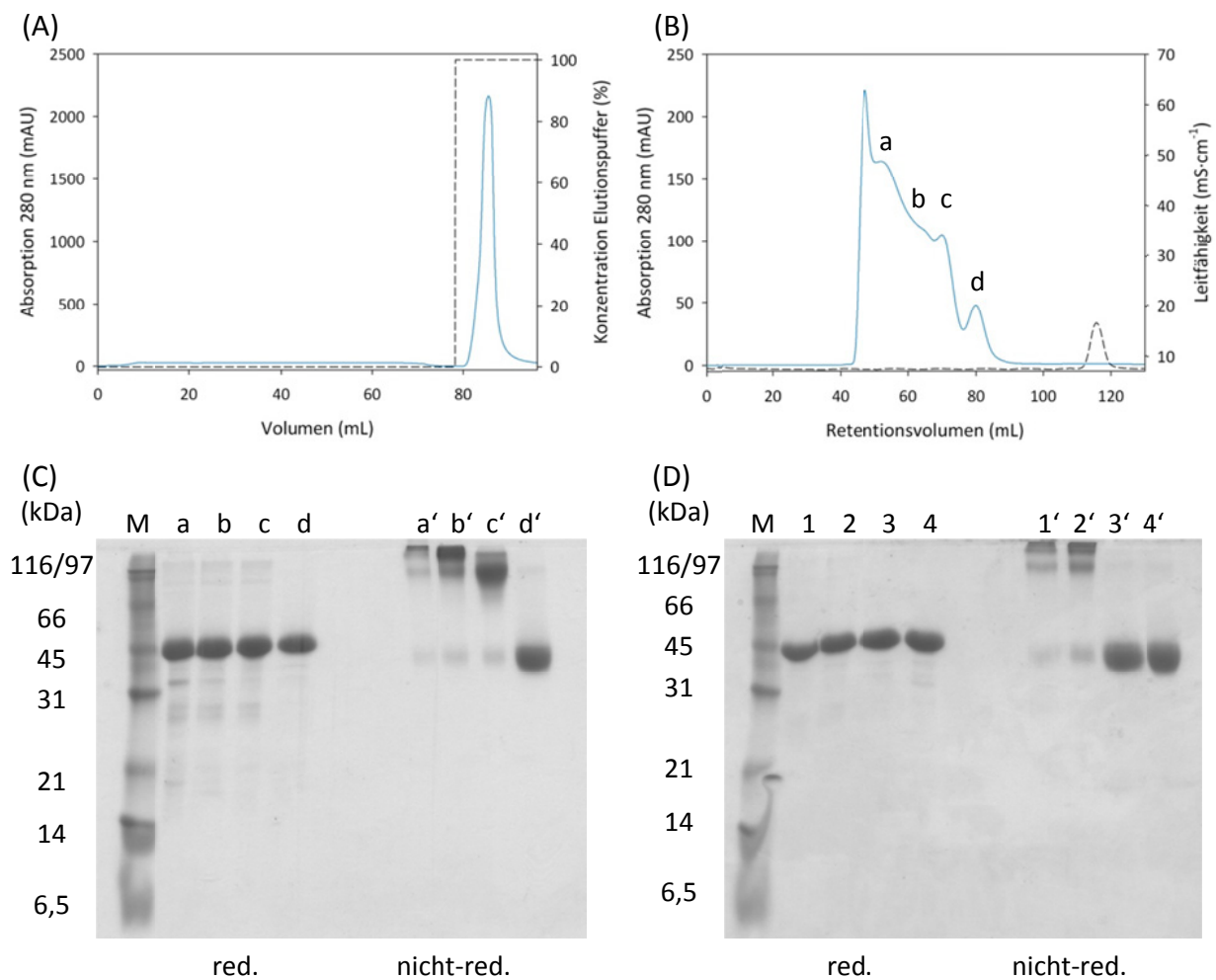
### 8.3 Einfluss des Parameters C auf die Form von Bindungsisothermen



**Abbildung 8-3: Einfluss von C auf die Form von Bindungsisothermen.**

Theoretische Bindungsisothermen für eine Bindungsreaktion (Gl. 3-21) wurden simuliert mit  $[L]_0 = 10 \mu\text{M}$  Titrant,  $[P]_0 = 1 \mu\text{M}$  Analyt in der Messzelle,  $\Delta_B H = 10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  und  $K_A = 1 \cdot 10^3 - \infty \text{ M}^{-1}$ . Die Simulation erfolgte nach einem modifizierten Programm von Biswas und Tsodikov (2010).

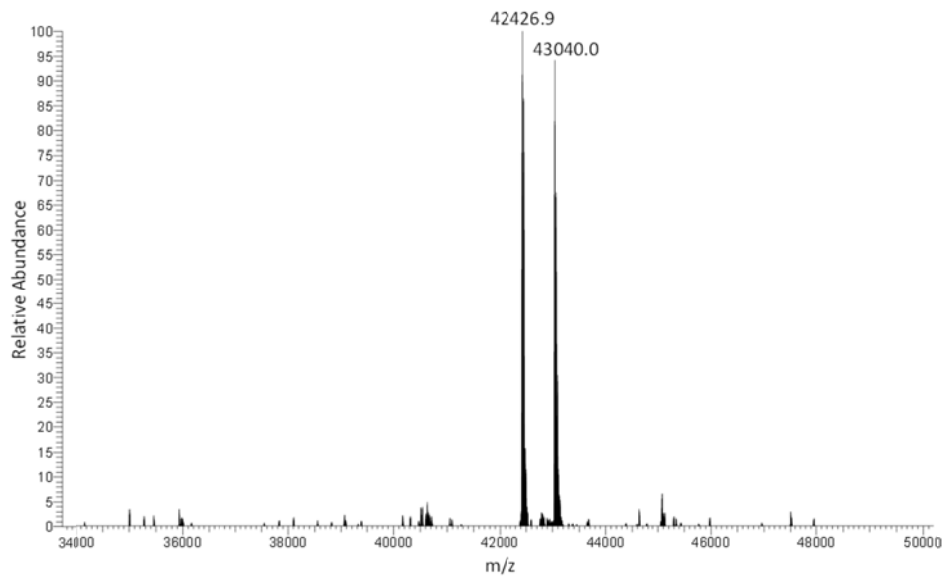
### 8.4 Reinigung von renaturiertem Easter<sup>Xa</sup>



**Abbildung 8-4: Reinigung von Easter<sup>Xa</sup>.**

(A) Das Elutionsprofil einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie sowie (B) der sich anschließenden Größenausschlusschromatographie von renaturiertem Easter<sup>Xa</sup> ist gezeigt (Absorption 280 nm (—), Konzentration Elutionspuffer bzw. Leitfähigkeit (---)). (C) SDS-PAGE der Elutionsfraktionen einer Größenausschlusschromatographie (M: Proteingrößenstandard, a-d: Fraktionen aus (B) unter reduzierenden Bedingungen, a'-d': Fraktionen aus (B) unter nicht-reduzierenden Bedingungen). (D) SDS-PAGE des gesamten Reinigungsverlaufes (3.4.6) (1: nach Faltung, 2: nach Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie, 3: nach Größenausschlusschromatographie, 4: nach Anionenaustauschchromatographie, 1'-4': identische Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen).

### 8.5 Massenspektrum von Easter<sup>Xa</sup> Zymogen



**Abbildung 8-5: Dekonvoliertes ESI-Orbitrap-Massenspektrum von zymogenen Easter<sup>Xa</sup>.**

Die theoretische Molekülmasse des vollständig disulfidverbrückten Proteins ohne Start-Methionin beträgt 42 426,0 Da. Die Massendifferenz von 613,1 Da zwischen den zwei Spezies entspricht vermutlich einer Modifikation mit zwei Glutathionmolekülen (je 306,33 Da).

## 8.6 Aminosäuresequenz der verwendeten Easter<sup>Xa</sup>-Varianten

		I	II	III	II
Ea <sup>Xa</sup>		MGQFYFNPNEAAQVPNYGRCITPNRERALCIHLEDCKYLYGLLLTTTPLRDTDRLYLSRSQC			
Ea <sup>Xa</sup>	S <sup>c195</sup> A	MGQFYFNPNEAAQVPNYGRCITPNRERALCIHLEDCKYLYGLLLTTTPLRDTDRLYLSRSQC			
Ea <sup>Xa</sup>	Δ75-Xa	MGQFYFNPNEAAQVPNYGRCITPNRERALCIHLEDCKYLYGLLLTTTPLRDTDRLYLSRSQC			
		I	III	IV	<u>16</u>
Ea <sup>Xa</sup>		GYTNGKVLICCP		DRYRESSSETTPPPKPNVTSNSLLPLPGQCGNILSNI	
Ea <sup>Xa</sup>	S <sup>c195</sup> A	GYTNGKVLICCP		DRYRESSSETTPPPKPNVTSNSLLPLPGQCGNILSNI	
Ea <sup>Xa</sup>	Δ75-Xa	GYTNGKVLICCP		DRYRESSSETTPPPKPNVTSNSLLPLPGQCGNILSNI	
		V	57 v		
Ea <sup>Xa</sup>		IDFFPWMALIEYTKSQGKKGHHCCGGSLISTRYVITAS			
Ea <sup>Xa</sup>	S <sup>c195</sup> A	IDFFPWMALIEYTKSQGKKGHHCCGGSLISTRYVITAS			
Ea <sup>Xa</sup>	Δ75-Xa	IDFFPWMALIEYTKSQGKKGHHCCGGSLISTRYVITAS			
		VI	VI	<u>102</u>	
Ea <sup>Xa</sup>		TNTNPDCEVDVRGMKDCAPPHLDVPVERTIPHPDYIPASKNQVND			
Ea <sup>Xa</sup>	S <sup>c195</sup> A	TNTNPDCEVDVRGMKDCAPPHLDVPVERTIPHPDYIPASKNQVND			
Ea <sup>Xa</sup>	Δ75-Xa	TNT <span style="color: blue;">EEGGE</span> -----LDVPVERTIPHPDYIPASKNQVND			
		IV	VII		
Ea <sup>Xa</sup>		VRP ICLPLDVNLR SATFDGITMDVAGWGKTEQLSASNK LKAAVEGSRMDECQNVYSSQD			
Ea <sup>Xa</sup>	S <sup>c195</sup> A	VRP ICLPLDVNLR SATFDGITMDVAGWGKTEQLSASNK LKAAVEGSRMDECQNVYSSQD			
Ea <sup>Xa</sup>	Δ75-Xa	VRP ICLPLDVNLR SATFDGITMDVAGWGKTEQLSASNK LKAAVEGSRMDECQNVYSSQD			
		VII	VIII	<u>195</u>	VIII
Ea <sup>Xa</sup>		ILLEDTQMCAGGKEGVDSCRGD		SGGPLIGLDTNKVNTYYFLAGVVSFGPTPCGLAGWPGV	
Ea <sup>Xa</sup>	S <sup>c195</sup> A	ILLEDTQMCAGGKEGVDSCRGD		AGGPLIGLDTNKVNTYYFLAGVVSFGPTPCGLAGWPGV	
Ea <sup>Xa</sup>	Δ75-Xa	ILLEDTQMCAGGKEGVDSCRGD		AGGPLIGLDTNKVNTYYFLAGVVSFGPTPCGLAGWPGV	
Ea <sup>Xa</sup>		YTLVGKYVDWIQNTIESLEHHHHHH			
Ea <sup>Xa</sup>	S <sup>c195</sup> A	YTLVGKYVDWIQNTIESLEHHHHHH			
Ea <sup>Xa</sup>	Δ75-Xa	YTLVGKYVDWIQNTIESLEHHHHHH			

**Abbildung 8-6: Aminosäuresequenzen der verwendeten Easter<sup>Xa</sup>-Varianten.**

Die Sequenz der Clip-Domäne ist grau unterlegt, die Reste der katalytischen Triade H<sup>c57</sup>, D<sup>c102</sup> und S<sup>c195</sup> sind rot und die der *linker*-Sequenz grau markiert. Die inserierte Spaltsequenz für Faktor Xa ist unterstrichen. Eine proteolytische Aktivierung erfolgt durch eine Spaltung zwischen R<sup>c15</sup>-I<sup>c16</sup>. Die Cysteine, welche Disulfidbrücken bilden, sind dementsprechend nummeriert. Der inserierte Ca<sup>2+</sup>-Bindungs-*loop* von Faktor Xa in der Deletionsvariante Δ75-Xa ist blau markiert.

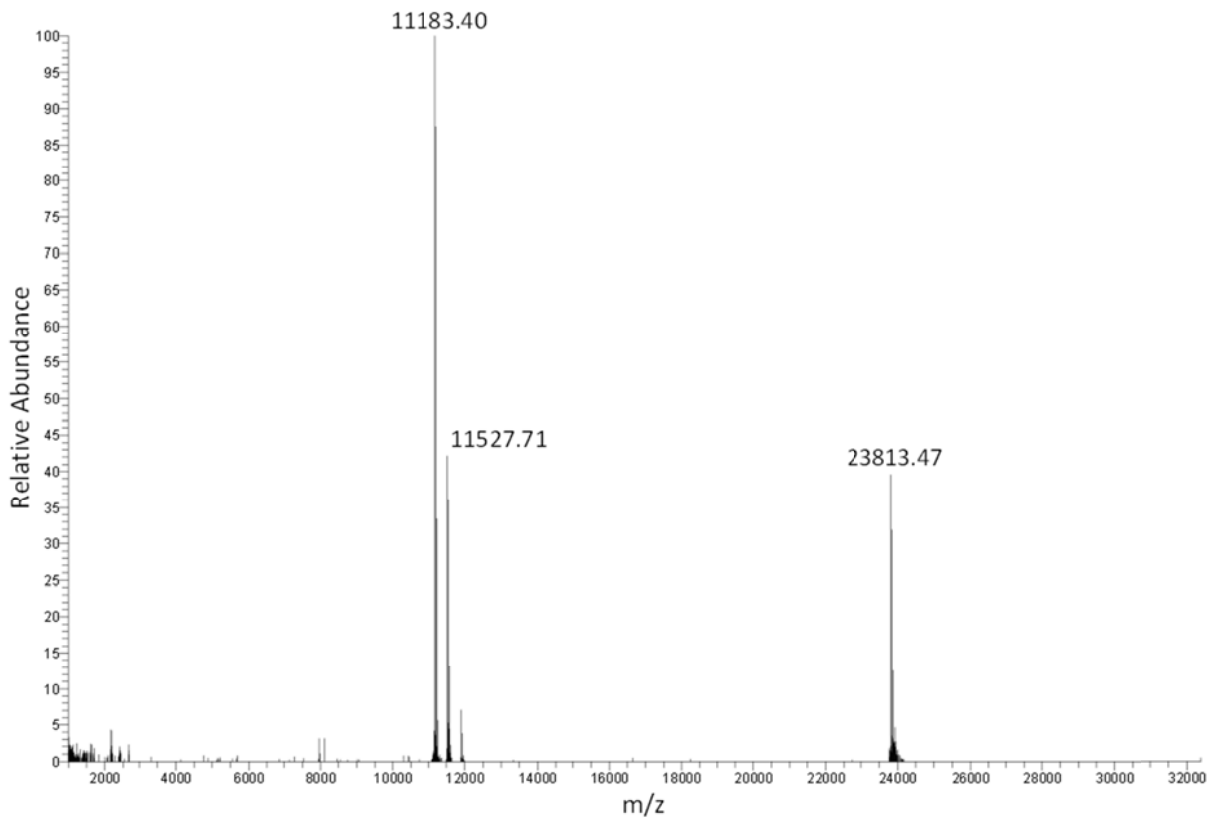
### 8.7 Aminosäuresequenzen der verwendeten ProSpätzle-Konstrukte

Spz11.7	MKEYERIIKELFTITNDEGVVLFN-----	24
ncSpz11.7	MKEYERIIKELFTITNDEGVVLFN-----	24
Spz11.7chim	MKEYERIIKELFTITNDEGVVSLQ-----	21
Spz8.19	MKEYERIIKELFTITNDEGVVLFNTSADSAPFMP IPTQHDDPTQKQKQNQNQSPIPETNR	60
ncSpz8.19	MKEYERIIKELFTITNDEGVVLFNTSADSAPFMP IPTQHDDPTQKQKQNQNQSPIPETNR	60
Spz8.19chim	MKEYERIIKELFTITNDEGVVLFNTSADSAPFMP IPTQHDDPTQKQKQNQNQSPIPETNR	60
	S <sup>2</sup> -Stelle	
Spz11.7	-----RTDTEVQSEQPIPPRHPSDTFVF	47
ncSpz11.7	-----RTDTEVQSEQPIPPRHPSDTFVF	47
Spz11.7chim	-----RTDTEVQSEQPIPPRHPSDTFVF	47
Spz8.19	HYHQYHSLIQPDQYFKVQRSPNGKLNLFNDTFVSLQRTDTEVQSEQPIPPRHPSDTFVF	120
ncSpz8.19	HYHQYHSLIQPDQYFKVQRSPNGKLNLFNDTFVSLQRTDTEVQSEQPIPPRHPSDTFVF	120
Spz8.19chim	HYHQYHSLIQPDQYFKVQRSPNGKLNLFNDTFVLFNRTDTEVQSEQPIPPRHPSDTFVF	120
Spz11.7	PDSPIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA KDESQH LRNFCTNVDDYPDL SGLTHK LKNNF	107
ncSpz11.7	PDSPIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA KDESQH LRNFCTNVDDYPDL SGLTHK LKNNF	107
Spz11.7chim	PDSPIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA KDESQH LRNFCTNVDDYPDL SGLTHK LKNNF	107
Spz8.19	PDSPIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA KDESQH LRNFCTNVDDYPDL SGLTHK LKNNF	180
ncSpz8.19	PDSPIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA KDESQH LRNFCTNVDDYPDL SGLTHK LKNNF	180
Spz8.19chim	PDSPIAKYRPPQSPARPLRNDTKEHNPCA KDESQH LRNFCTNVDDYPDL SGLTHK LKNNF	180
	S <sup>1</sup> -Stelle	
Spz11.7	AKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFLCRSIRKLVYPKKGLRADDTWQLIVNNDEYKQAIQI	167
ncSpz11.7	AKFFSNDLQPTDVSSAVGGSDERFLCRSIRKLVYPKKGLRADDTWQLIVNNDEYKQAIQI	167
Spz11.7chim	AKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFLCRSIRKLVYPKKGLRADDTWQLIVNNDEYKQAIQI	167
Spz8.19	AKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFLCRSIRKLVYPKKGLRADDTWQLIVNNDEYKQAIQI	240
ncSpz8.19	AKFFSNDLQPTDVSSAVGGSDERFLCRSIRKLVYPKKGLRADDTWQLIVNNDEYKQAIQI	240
Spz8.19chim	AKFFSNDLQPTDVSSRVGGSDERFLCRSIRKLVYPKKGLRADDTWQLIVNNDEYKQAIQI	240
Spz11.7	EECEGADQPCDFAANFPQSYNPICKQHYTQQT LASIKSDGELDVVQNSFKIPSCCKCALK	227
ncSpz11.7	EECEGADQPCDFAANFPQSYNPICKQHYTQQT LASIKSDGELDVVQNSFKIPSCCKCALK	227
Spz11.7chim	EECEGADQPCDFAANFPQSYNPICKQHYTQQT LASIKSDGELDVVQNSFKIPSCCKCALK	227
Spz8.19	EECEGADQPCDFAANFPQSYNPICKQHYTQQT LASIKSDGELDVVQNSFKIPSCCKCALK	300
ncSpz8.19	EECEGADQPCDFAANFPQSYNPICKQHYTQQT LASIKSDGELDVVQNSFKIPSCCKCALK	300
Spz8.19chim	EECEGADQPCDFAANFPQSYNPICKQHYTQQT LASIKSDGELDVVQNSFKIPSCCKCALK	300
Spz11.7	TGLEHHHHHHH 237	
ncSpz11.7	TG----- 229	
Spz11.7chim	TGLEHHHHHHH 237	
Spz8.19	TGLEHHHHHHH 310	
ncSpz8.19	TG----- 302	
Spz8.19chim	TGLEHHHHHHH 310	

#### Abbildung 8-7: Aminosäuresequenzen der Pro-Formen der verwendeten Spätzle-Konstrukte.

Die Sequenzen der zwei verwendeten Isoformen, Spz11.7 und Spz8.19, sowie die nicht-spaltbaren (nc) und chimären (chim) Konstrukte sind vergleichend dargestellt. In rot ist die primäre Prozessierungsstelle markiert, welche den Übergang von der N-terminalen Prodomäne zur C-terminalen Cystin-Knoten-Domäne festlegt. In grün sind die sekundären Spaltstellen hervorgehoben, welche in den chimären Varianten gegeneinander ausgetauscht wurden. Die proteolytische Spaltung durch Easter<sup>xa</sup> erfolgt jeweils C-terminal des Arginins.

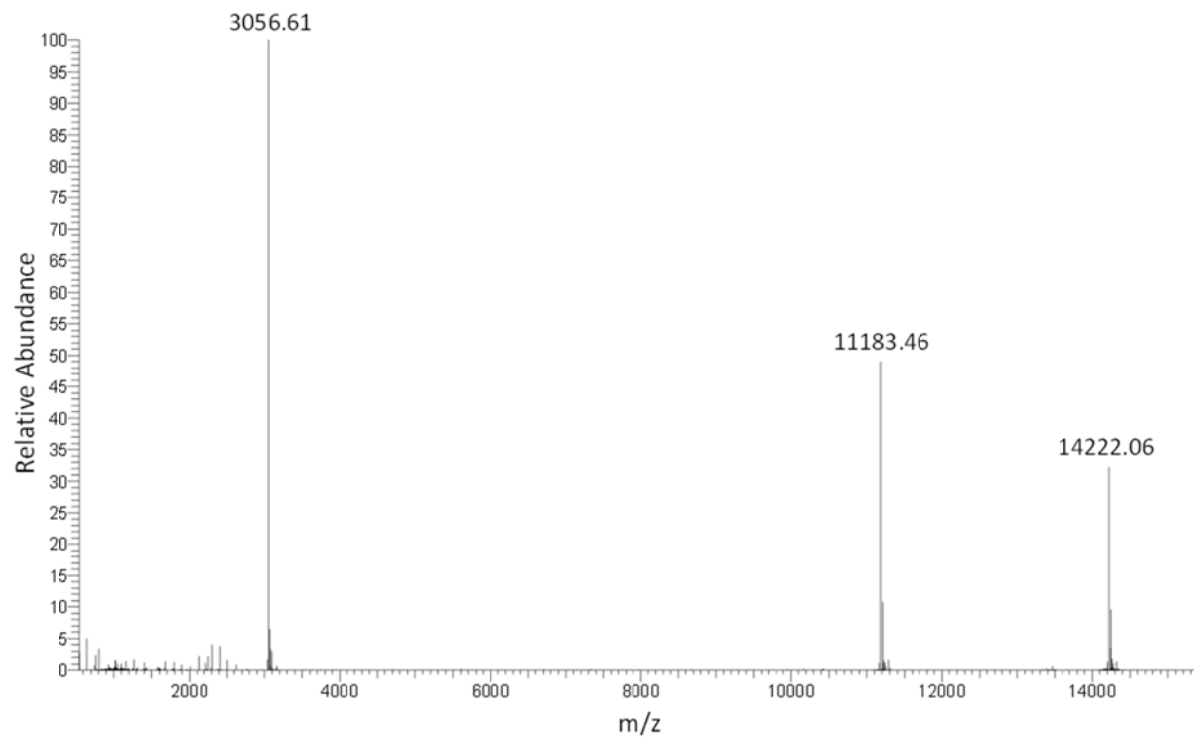
## 8.8 Massenspektrum von *Easter*<sup>Xa</sup>-prozessierten Spz8.19



**Abbildung 8-8: Dekonvoliertes ESI-Orbitrap-Massenspektrum von matSpz8.19.**

Die theoretischen, monoisotopischen Molekülmassen der vollständig disulfidverbrückten Proteolyseprodukte (Sequenz siehe Anhang 8.7) sind: 1 - 98 (N-8.19PD) = 11 526,7 Da, 99 - 196 (C-8.19PD) = 11 183,4 Da, 197 - 302 (disulfidverbücktes Dimer, Cystin-Knoten-Domäne) = 23 813,6 Da. Für die Analyse wurde ein Konstrukt ohne His<sub>6</sub>-tag verwendet (Aminosäuren 1-302). In MS/MS-Experimenten wurde den hier gezeigten Mutterionen die angegebene Sequenz zugeordnet.

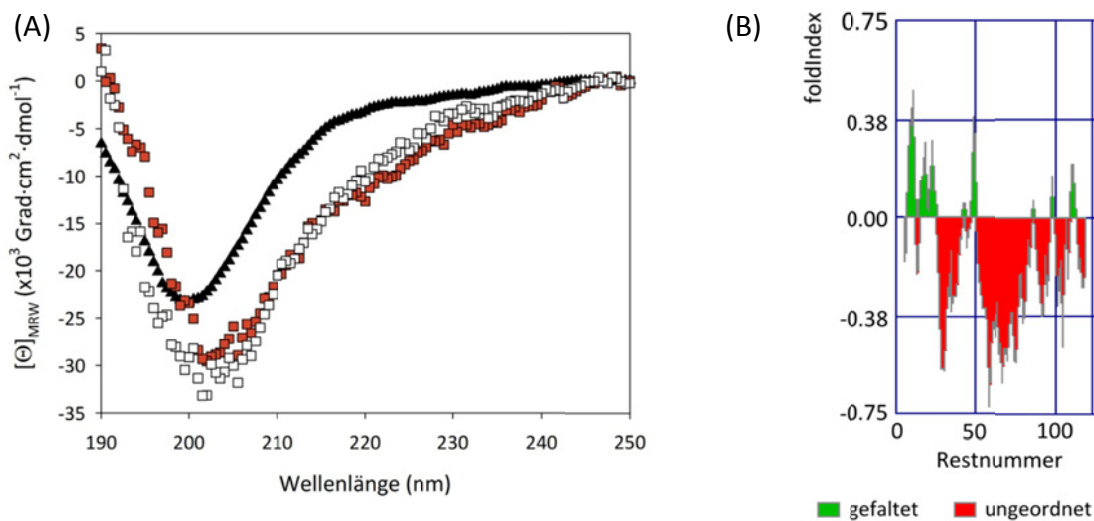
### 8.9 Massenspektrum von Easter<sup>xa</sup>-prozessierten Spz11.7



**Abbildung 8-9: Dekonvoliertes ESI-Orbitrap-Massenspektrum von matSpz11.7.**

Die theoretischen, monoisotopischen Molekülmassen der vollständig disulfidverbrückten Proteolyseprodukte (Sequenz siehe Anhang 8.7) sind: 1 - 123 (11.7PD) = 14 222,0 Da, 1 - 25 (N-11.7PD) = 3 056,6 Da, 26 - 123 (C-11.7PD) = 11 183,4 Da. In MS/MS-Experimenten wurde den hier gezeigten Mutterionen die angegebene Sequenz zugeordnet.

### 8.10 Sekundärstrukturgehalt der 11.7Prodomäne



**Abbildung 8-10: Fern-UV-CD-Spektren der 11.7Prodomäne.**

(A) Das native Fern-UV-CD-Spektrum der isolierten 11.7Prodomäne ( $\blacktriangle$ ) sowie die Differenzspektren ProSpz11.7 – CK ( $\blacksquare$ ) und matSpz11.7 – CK ( $\square$ ) sind gezeigt. Alle Messungen wurden bei 20 °C in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt. (B) Die Analyse der Sequenz der 11.7Prodomäne mit FoldIndex (mit einer Auflösung von 10 Resten), zur Vorhersage intrinsisch unstrukturierter Proteine (Prilusky *et al.*, 2005), ist abgebildet.

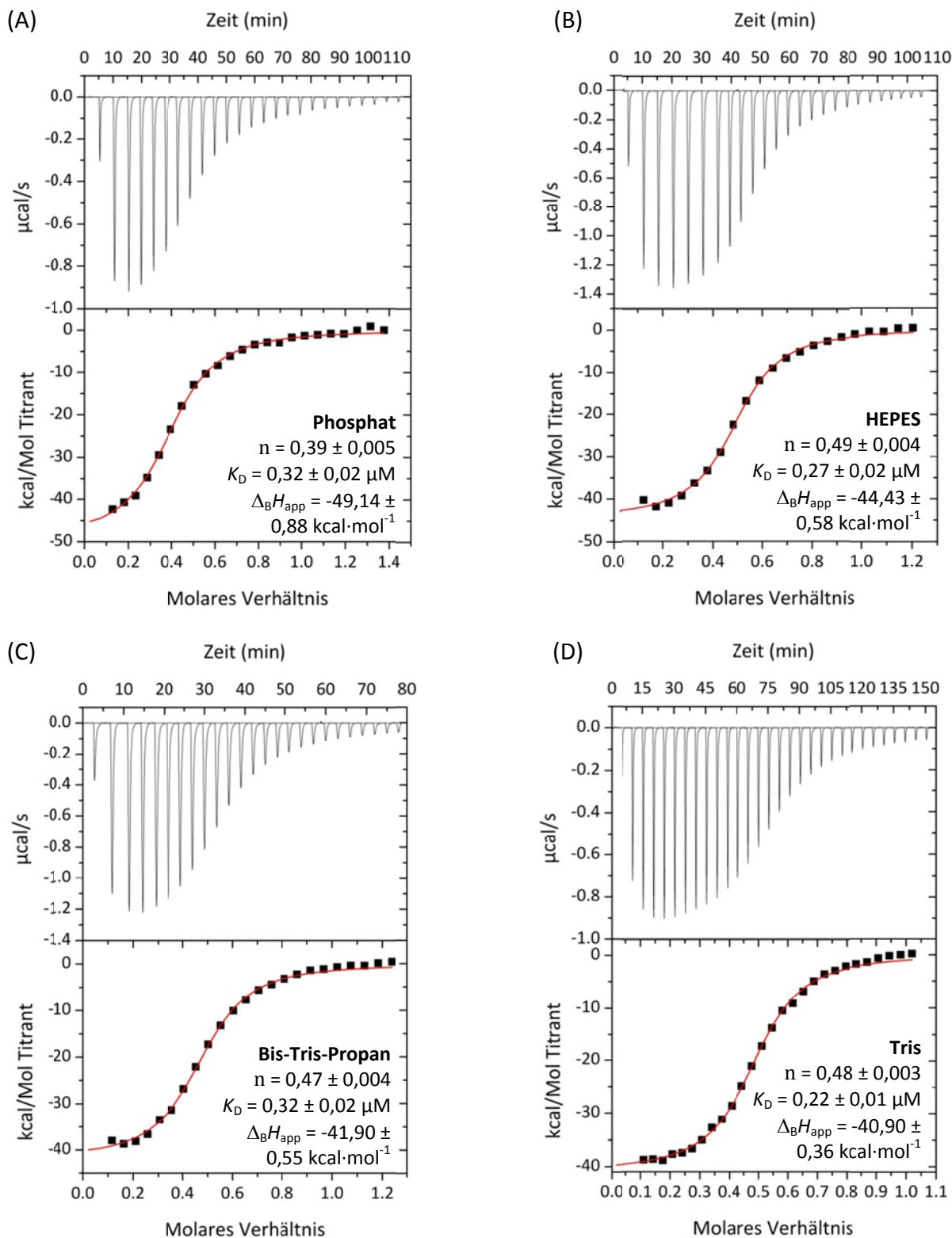
**Tabelle 8-1: Dekonvolution der Fern-UV-CD-Spektren.**

Die Fern-UV-CD-Spektren von Spz11.7 sowie die Differenzspektren (Pro–CK) und (mat–CK) wurden mittels CDPro analysiert (Sreerama und Woody, 2000). Anteile von regulären (r) und „distorted“ (d)  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Strängen sowie *turns* (t) und ungeordneten (u) Bereichen sind angegeben. Es wurde eine Referenz-Set mit 48 Proteinen verwendet.

	Spektrum	Methode	$\alpha(r)$	$\alpha(d)$	$\beta(r)$	$\beta(d)$	t	u
gemessene Spektren	Pro11.7	CDSSTR	0,007	0,035	0,174	0,096	0,177	0,497
		CONTIN-LL	0,028	0,047	0,171	0,095	0,173	0,486
		SELCON3	0,048	0,056	0,155	0,087	0,164	0,442
	CK	CDSSTR	0,008	0,033	0,182	0,099	0,209	0,47
		CONTIN-LL	0,01	0,062	0,224	0,119	0,233	0,353
		SELCON3	0,027	0,061	0,180	0,096	0,192	0,444
	mat11.7	CDSSTR	0,001	0,034	0,177	0,099	0,186	0,487
		CONTIN-LL	0,025	0,043	0,176	0,095	0,165	0,496
		SELCON3	0,03	0,047	0,137	0,081	0,165	0,495
11.7PD	CDSSTR	0,011	0,039	0,080	0,042	0,106	0,714	
	CONTIN-LL	0,017	0,052	0,082	0,045	0,111	0,693	
	SELCON3	0,021	0,053	0,085	0,051	0,113	0,675	
Differenzspektren	Pro – CK	CDSSTR	0,218	0,218	0,097	0,065	0,152	0,252
		CONTIN-LL	0,123	0,172	0,061	0,045	0,191	0,408
		SELCON3	0,152	0,138	0,133	0,086	0,220	0,324
	mat – CK	CDSSTR	0,089	0,126	0,162	0,096	0,203	0,328
		CONTIN-LL	0,083	0,120	0,067	0,032	0,157	0,540
		SELCON3	0,068	0,142	0,162	0,066	0,168	0,415



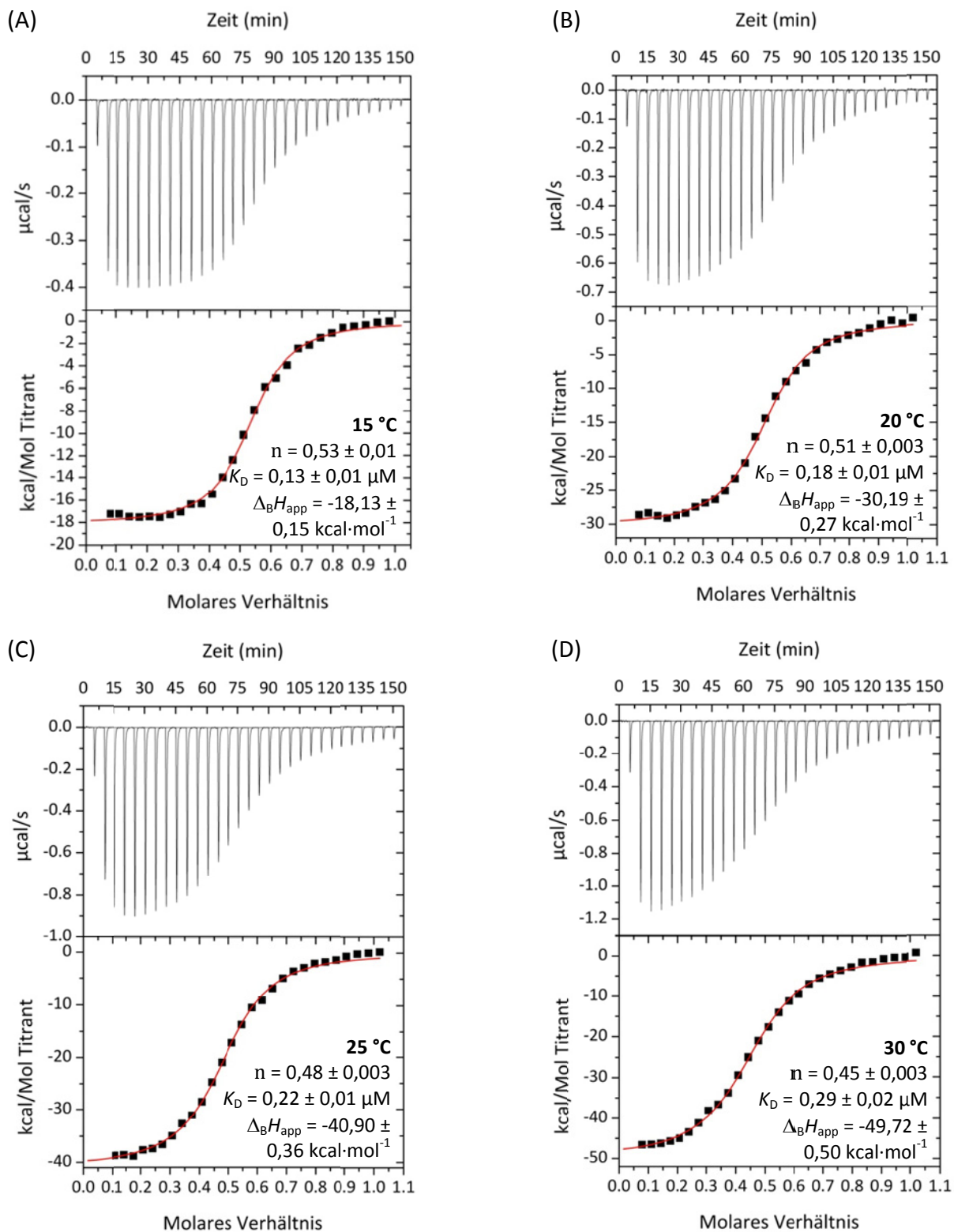
### 8.11 Pufferabhängigkeit der 11.7Prodomänen-Bindung



**Abbildung 8-11: ITC von 11.7PD und Cystin-Knoten-Domäne in verschiedenen Puffern.**

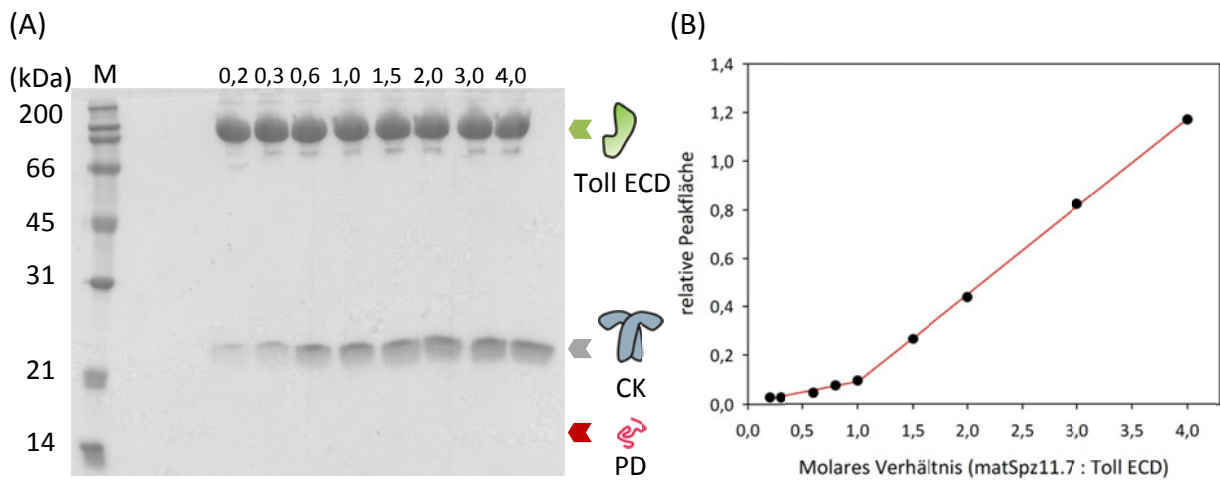
Alle Messungen wurden in 20 mM Puffer, 20 mM NaCl, pH 7,4 bei 25 °C durchgeführt. Es wurden jeweils 60 - 85  $\mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne zu 10 - 15  $\mu\text{M}$  11.7Prodomäne titriert. Die jeweils verwendeten Puffersubstanzen und ermittelten Bindungsparameter sind angegeben.

### 8.12 Temperaturabhängigkeit der 11.7Prodomänen-Bindung



**Abbildung 8-12: ITC von 11.7PD und Cystin-Knoten-Domäne bei verschiedenen Temperaturen.** Alle Messungen wurden in 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 7,4 durchgeführt. Es wurden jeweils 66  $\mu\text{M}$  Cystin-Knoten-Domäne zu 15  $\mu\text{M}$  11.7Prodomäne titriert. Die jeweiligen Messtemperaturen und ermittelten Bindungsparameter sind angegeben.

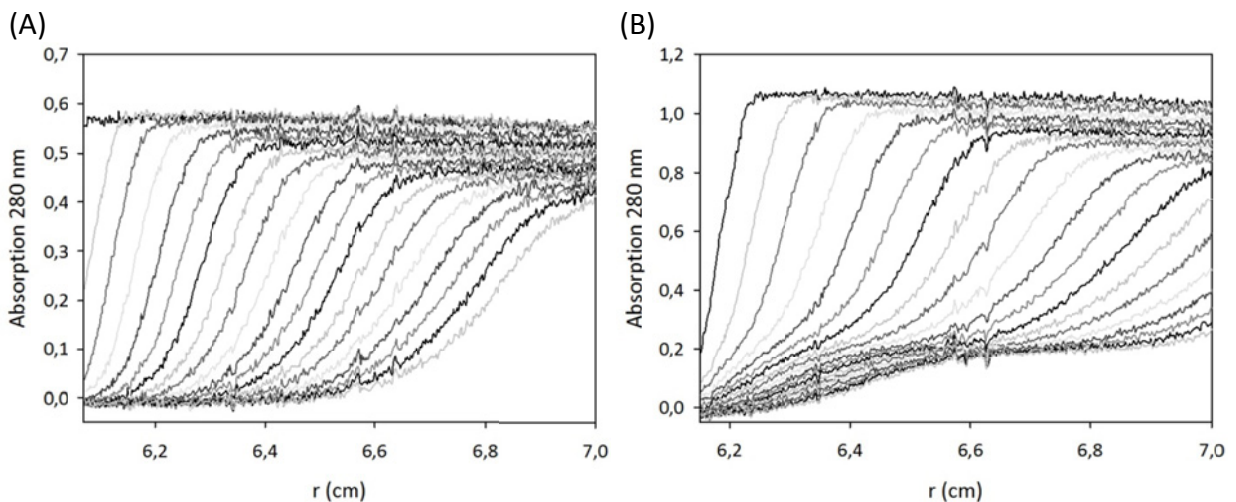
### 8.13 Titration von Toll ECD und matSpz11.7 mittels Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie



**Abbildung 8-13: Bindungsstöchiometrie der Spz11.7-Toll-Bindung.**

(A) Eine nicht-reduzierende SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der einzelnen Titrationsansätze ist gezeigt (M: Proteingrößenstandard, die Bahnen sind entsprechend dem molaren Verhältnis matSpz11.7 : Toll ECD beschriftet). Ein co-Elution der 11.7Prodomäne konnte nicht detektiert werden. (B) Die relativen Peakflächen der Durchflussfraktion und Elutionsfraktion wurden gegen das molare Verhältnis aufgetragen. Eine Integration der Peakflächen erfolgte mit der bereitgestellten Software von Amersham Biosciences (Freiburg).

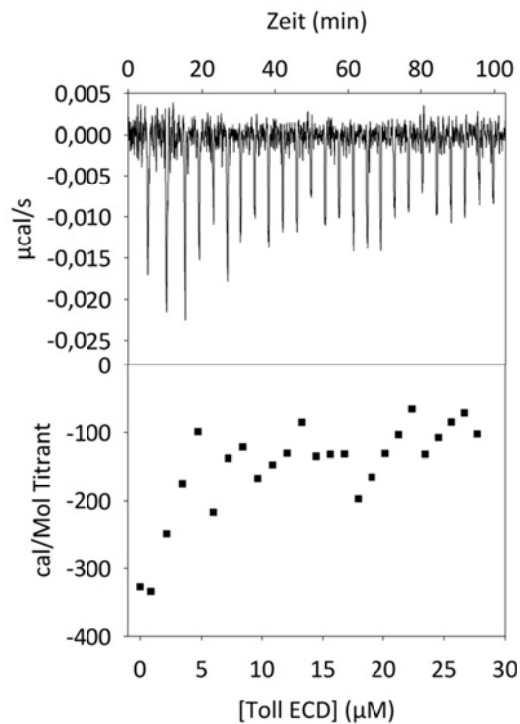
### 8.14 Sedimentationsgeschwindigkeit des Toll ECD-CK-Komplexes



**Abbildung 8-14: Sedimentationsgeschwindigkeit des Toll ECD-CK-Komplexes.**

Eine Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse von 30  $\mu$ M Toll ECD mit steigenden Konzentrationen an CK wurde durchgeführt. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsprofile für (A) 30  $\mu$ M Toll ECD und (B) 30  $\mu$ M Toll ECD + 60  $\mu$ M CK sind exemplarisch dargestellt. Alle Messungen wurden in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,005 % (w/w) Nonidet P40, pH 7,5 durchgeführt. Die Konzentrationsprofile wurden bei 40 000 rpm (An50Ti-Rotor) und 20 °C im Abstand von 15 min aufgenommen.

### 8.15 Verdünnungstitration von Toll ECD



**Abbildung 8-15: Isothermale Titration der Toll ECD in Puffer.**

Die ITC-Kurve wurde durch Titration von 150 µM Toll ECD in 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 bei 25 °C aufgenommen.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström, $10^{-10}$ m
ASA	<i>accessible surface area</i>
AU	frei wählbare Einheit ( <i>arbitrary unit</i> )
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
<i>Bt</i>	<i>Bos taurus</i>
CK	Cystin-Knoten-Domäne
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Ea	Easter
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FXa	Faktor Xa
GdmCl	Guanidiniumchlorid
<i>Hd</i>	<i>Holotrichia diomphalia</i>

<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie
$K_D$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
$M_r$	relative Molekülmasse
$\beta$ -NGF	$\beta$ -nerve growth factor
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PDB	Proteindatenbank
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
Spz	Spätzle
<i>Ss</i>	<i>Sus scrofa</i>
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TLR	<i>toll-like-Rezeptor</i>
Toll ECD	Toll-Rezeptor-Ektodomäne
<i>Tt</i>	<i>Tachypleus tridentatus</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>
x g	x-fache der Erdbeschleunigung
Xaa	beliebiger Aminosäurerest

Abkürzungen der in der Arbeit verwendeten Proteinvarianten:

Easter <sup>Xa</sup>	Factor Xa-aktivierbare Variante von Easter (durch Insertion von IEG <sup>c14</sup> )
Spz8.19	Spätzle-Isoform 8.19
Spz11.7	Spätzle-Isoform 11.7
ncSpz8.19/11.7	nicht-spaltbare Varianten R <sup>266</sup> A der Spätzle-Isoformen
hcSpz11.7	halbseitig prozessierte Spezies aus <i>wt</i> ProSpz11.7-ncProSpz11.7
chimSpz11.7	Variante (LFNR <sup>168</sup> ersetzt durch SLQR <sup>168</sup> ) der Spätzle-Isoform 11.7
chimSpz8.19	Variante (SLQR <sup>168</sup> ersetzt durch LFNR <sup>168</sup> ) der Spätzle-Isoform 8.19
Toll ECD	Toll-Rezeptor-Ektodomäne

Aus dem Englischen übernommene Begriffe, welche in der naturwissenschaftlichen Literatur allgemein gebräuchlich sind, sowie lateinische Artenbezeichnungen werden in *kursiver Schreibweise* dargestellt. Abkürzungen für Aminosäuren (Einbuchstabencode bzw. Dreibuchstabencode) werden gemäß der biochemischen Literatur verwendet.

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Phänotyp der „dorsal-Gene“ .....	6
Abbildung 1-2: Der Spätzle-Toll-Signalweg in der Embryonalentwicklung. ....	7
Abbildung 1-3: Allgemeine Struktur von Clip-Domänen-Proteasen. ....	11
Abbildung 1-4: Zymogenaktivierung Chymotrypsin-ähnlicher Serinproteasen. ....	13
Abbildung 1-5: Allgemeiner Katalysemechanismus für Serin-Endopeptidasen. ....	14
Abbildung 1-6: Struktur von Proteinen der Neurotrophin-Familie. ....	17
Abbildung 1-7: Grundstruktur von LRR-Modulen und des humanen TLR4.....	25
Abbildung 1-8: Quartärstruktur des TLR4–MD-2–LPS-Komplexes. ....	26
Abbildung 4-1: Aufbau der Variante Easter <sup>Xa</sup> .....	60
Abbildung 4-2: Genexpression und teilfaktorieller Faltungs- <i>screen</i> von Easter <sup>Xa</sup> .....	62
Abbildung 4-3: Reinigung von renaturiertem Easter <sup>Xa</sup> .....	63
Abbildung 4-4: Zymogenaktivierung von Easter <sup>Xa</sup> .....	64
Abbildung 4-5: Proteolytische Aktivierung von Easter <sup>Xa</sup> S <sup>c195</sup> A und der Deletionsvariante $\Delta$ 75-Xa.....	65
Abbildung 4-6: Prozessierung der ProSpätzle-Isoformen ProSpz11.7 und ProSpz8.19 mit Easter <sup>Xa</sup> . ...	67
Abbildung 4-7: Analyse der sekundären S <sup>2</sup> -Spaltstelle. ....	70
Abbildung 4-8: Kinetik der Reifung von ProSpätzle mit Easter <sup>Xa</sup> .....	71
Abbildung 4-9: Bildung eines nicht-kovalenten Komplexes für gereiftes Spz11.7.....	73
Abbildung 4-10: Fluoreszenz- und Circular dichroismusspektren von Spätzle11.7. ....	75
Abbildung 4-11: Entfaltungsübergänge von matSpz11.7.....	77
Abbildung 4-12: Reinigung der 11.7Prodomäne. ....	79
Abbildung 4-13: Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Spektren der 11.7Prodomäne.....	80
Abbildung 4-14: Eindimensionales Protonenresonanzspektrum der 11.7Prodomäne.....	81
Abbildung 4-15: Analytische Ultrazentrifugation der 11.7Prodomäne.....	82
Abbildung 4-16: <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-fHSQC-Spektren der 11.7PD und der Cystin-Knoten-Domäne. ....	84
Abbildung 4-17: Isothermale Titration der 11.7PD und der Cystin-Knoten-Domäne. ....	85
Abbildung 4-18: Puffer- und Temperaturabhängigkeit der 11.7PD-Bindung.....	86
Abbildung 4-19: Reinigung und analytische Ultrazentrifugation der Toll ECD.....	88
Abbildung 4-20: Isothermale Titration der Toll ECD und Cystin-Knoten-Domäne.....	89
Abbildung 4-21: Verdrängungstitration von Toll ECD und matSpz11.7. ....	90
Abbildung 4-22: Bindungsstöchiometrie der Spz11.7-Toll-Bindung. ....	92
Abbildung 4-23: Größenausschlusschromatographie des Toll ECD–matSpz11.7-Komplexes. ....	93
Abbildung 4-24: Quartärstruktur des <i>Dm</i> Toll ECD–Spätzle CK-Komplexes.....	94
Abbildung 4-25: Reinigung und Prozessierung von hcSpz11.7.....	95
Abbildung 4-26: Analyse des prozessierten hcSpz11.7. ....	96
Abbildung 4-27: Isothermale Titration von hcSpz11.7 und der 11.7Prodomäne. ....	97

Abbildung 4-28: Isothermale Titration der Toll ECD und hcSpz11.7.....	98
Abbildung 4-29. Sedimentationsgeschwindigkeit von Toll ECD-Spätzle-Komplexen. ....	100
Abbildung 4-30: Sedimentationsgleichgewicht von Toll ECD-Spätzle-Komplexen. ....	102
Abbildung 5-1: Disulfidbrücken in <i>DmGrass</i> . ....	105
Abbildung 5-2: Schematische Darstellung der Bindung intrinsisch unstrukturierter Proteine. ....	111
Abbildung 5-3: Bindung der Prodomänen von Cystin-Knoten-Proteinen.....	114
Abbildung 5-4: Bindung der Spätzle-Prodomäne in dem Toll-Komplex.....	118
Abbildung 5-5: Modell der Ligand-induzierten Toll-Dimerisierung. ....	122
Abbildung 8-1: Sequenzvergleich von Easter mit verwandten Proteasen der S1-Familie.....	141
Abbildung 8-2: Sequenzvergleich der bekannten Isoformen von <i>DmSpätzle</i> .....	142
Abbildung 8-3: Einfluss von C auf die Form von Bindungsisothermen. ....	143
Abbildung 8-4: Reinigung von Easter <sup>Xa</sup> .....	144
Abbildung 8-5: Dekonvoliertes ESI-Orbitrap-Massenspektrum von zymogenen Easter <sup>Xa</sup> .....	145
Abbildung 8-6: Aminosäuresequenzen der verwendeten Easter <sup>Xa</sup> -Varianten.....	146
Abbildung 8-7: Aminosäuresequenzen der Pro-Formen der verwendeten Spätzle-Konstrukte. ....	147
Abbildung 8-8: Dekonvoliertes ESI-Orbitrap-Massenspektrum von matSpz8.19. ....	148
Abbildung 8-9: Dekonvoliertes ESI-Orbitrap-Massenspektrum von matSpz11.7. ....	149
Abbildung 8-10: Fern-UV-Spektren der 11.7Prodomäne.....	150
Abbildung 8-11: ITC von 11.7PD und Cystin-Knoten-Domäne in verschiedenen Puffern. ....	151
Abbildung 8-12: ITC von 11.7PD und Cystin-Knoten-Domäne bei verschiedenen Temperaturen. ....	152
Abbildung 8-13: Bindungsstöchiometrie der Spz11.7-Toll-Bindung. ....	153
Abbildung 8-14: Sedimentationsgeschwindigkeit des Toll ECD-CK-Komplexes.....	153
Abbildung 8-15: Isothermale Titration der Toll ECD in Puffer. ....	154

## **11 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 3-1: Zusammensetzung von M9-Minimalmedium .....	35
Tabelle 3-2: Theoretische Extinktionskoeffizienten.....	45
Tabelle 4-1: Analyse der Spätzle-Spaltprodukte mittels ESI-MS.....	68
Tabelle 4-2: Kinetische Parameter der Prozessierung von Spätzle durch Easter <sup>Xa</sup> . ....	73
Tabelle 4-3: Thermodynamische Parameter der GdmCl- und Harnstoff-induzierten Entfaltung von Spätzle11.7. ....	78
Tabelle 4-4: Bindungsparameter der Interaktion von 11.7PD und CK bei 25 °C.....	86
Tabelle 4-5: Bindungsparameter der Interaktion von Toll ECD und Spz11.7.....	91
Tabelle 4-6: Bindungsparameter der Interaktion von Toll ECD und hcSpz11.7. ....	99
Tabelle 8-1: Dekonvolution der Fern-UV-CD-Spektren. ....	150

## **12 Tagungsbeiträge**

03.-05.03.2011

„Native-like processing of Spätzle with Easter - the patterning protease of *Drosophila melanogaster*“ Poster

2<sup>nd</sup> International Meeting of GRK 1026, Halle (Saale)

23.-28.09.2012

„*In vitro* refolding of Spätzle and Easter for biophysical und structural analysis“ Poster

14<sup>th</sup> International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, Huntsville, USA

27.02.-03.03.2013

„*In vitro* maturation of *Drosophila melanogaster* Spätzle protein with refolded Easter reveals a novel cleavage site within the prodomain“ Vortrag

30th Winter School on Proteinases und their Inhibitors, Tiers, Italien

## **13 Eigene Publikationen**

**Ursel,C.**, Fandrich,U., Hoffmann,A., Sieg,T., Ihling,C., und Stubbs,M.T. (2013). *In vitro* maturation of *Drosophila melanogaster* Spätzle protein with refolded Easter reveals a novel cleavage site within the prodomain. Biol. Chem. 394, 1069-1075.

**Parthier,C., Stelter,M., Ursel,C.**, Fandrich,U., Lilie,H., Breithaupt,C., und Stubbs,M.T. (2014). Structure of the Toll-Spätzle complex, a molecular hub in *Drosophila* development und innate immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 6281-6286

**Tziridis,A.**, Rauh,D., Neumann,P., Kolenko,P., Menzel,A., Bräuer,U., **Ursel,C.**, Steinmetzer,P., Stürzebecher,J., Schweinitz,A., Steinmetzer,T., und Stubbs,M.T. (2014). Correlating structure und ligand affinity in drug discovery: role of second shell residues. Biol. Chem. 395, 891-903



## ***14 Lebenslauf***

### **Zur Person**

Name:	Ursel	Vorname:	Christian
Geburtstag:	21.08.1983	Geburtsort:	Wippra
Familienstand:	ledig		

### **Bildungsweg**

10/09 - 12/13	Dissertation unter Anleitung von Prof. Milton T. Stubbs, Arbeitsgruppe Physikalische Biotechnologie am Institut für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität zum Thema: „Untersuchungen zur Rolle der Spätzle-Prodomäne in der dorsal-ventral-Entwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> “
08/09	Abschluss des Studiums als Diplom-Biochemiker (Gesamtnote: 1,1)
10/08 - 07/09	Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Milton T. Stubbs, Physikalische Biotechnologie am Institut für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität
10/04 - 08/09	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/03	Abitur (Gesamtnote: 1,4)
09/95 - 07/03	Schulbildung am Gymnasium am Markt Hettstedt

## ***15 Danksagung***

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst möchte ich Prof. Milton T. Stubbs für seine Betreuung bei diesem interessanten Thema und der mir überlassenen Freiheit in der wissenschaftlichen Arbeit danken. Ich danke ihm insbesondere für den unentwegten Optimismus, gerade wenn wieder einmal keine Kristalle gewachsen sind.

Ich möchte mich bei Dr. Annett Weidner und Dr. Christoph Parthier dafür bedanken, dass sie stets Zeit fanden aktuelle Probleme zu diskutieren und für die zahlreichen Hinweise zum Verfassen dieser Arbeit.

PD Dr. Hauke Lilie danke ich für die vielen Gespräche, in denen ich viel lernte und dadurch einen kritischeren Blick auf viele Daten erhielt. Ich danke ihm auch für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation, welche sehr schöne Ergebnisse lieferte und einige unschlüssige Fragen beantwortete.

Dr. Michael Kovermann danke ich für die Durchführung und Analyse der NMR-Spektroskopie und die Zeit, die er aufbrachte die Daten mit mir zu diskutieren und mich in die Materie einzuführen.

Dr. Christian Ihling möchte ich danken für die Durchführung und Analyse der Massenspektrometrie.

Dipl.-Biol. Matthias Walther danke ich für die Klonierung des Spätzle-Locus und die vielen Versuche einen transgenen *Drosophila*-Stamm herzustellen.

Pia Rosenberg möchte ich für die unzähligen Hilfen im Laboralltag danken, was mir viel Arbeit abgenommen hat.

Uwe danke ich besonders für seine Hilfe bei vielen Arbeiten im Labor und den ganzen Spaß den wir dabei hatten.

Ich möchte allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die schöne Zeit danken, den vielen Hinweisen und Diskussionen und den Spaß auf den Ausflügen. Insbesondere die täglichen Kaffeepausen mit den „konstruktiven“ Gesprächen werden mir in Erinnerung bleiben.

Ich danke meinen Freunden, besonders Silke und Frank, für ihren positiven Zuspruch und ihre Geduld wenn ich wieder mal wegen eines „strukturlosen“ Projektes gefrustet war und der vielen schönen Zeit, die wir verbringen konnten.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium und die Promozionszeit erst ermöglicht haben und für ihre Unterstützung, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

## ***16 Eidesstattliche Erklärung***

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass ich mich mit dieser Arbeit an keiner anderen Hochschule oder Universität um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe.

Halle (Saale), den

Christian Ursel