

Untersuchungen zur Struktur und Dynamik des Typ I Interferon Rezeptors

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Jennifer Julia Strunk
aus Frankfurt am Main

Frankfurt, 2008

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

1. Gutachter: Prof. Dr. Jacob Piehler

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Dötsch

Datum der Disputation:

A. Zusammenfassung	1
<hr/>	
B. Einleitung	3
1. Zytokine und Zytokinrezeptoren	3
2. Zytokinrezeptoren der Klasse I	5
2.1 Struktur und Mechanismus am Beispiel des GH- und Epo-Rezeptorkomplexes	5
3. Zytokinrezeptoren der Klasse II und seine Liganden	8
4. Typ I Interferone	10
5. Der humane Typ I Interferon Rezeptor	12
5.1 Signaltransduktion	16
6. Molekulare Propagation durch die Membran	17
7. Zielsetzung	19
8. Strategien	20
8.1 Ortsspezifische duale Fluoreszenzmarkierung von ifnar1- und ifnar2-EC	20
8.2 Expression in Insektenzellen	23
8.3 IFN α 2-HEQ	24
9. Charakterisierung von Protein-Interaktionen auf Oberflächen	25
9.1 Simultane Rlfs- und TIRFS-Detektion	25
9.2 Oberflächen Plasmonen Resonanz (SPR)	27
9.3 Immobilisierung der Rezeptoruntereinheiten	28
10. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)	30
<hr/>	
C. Material und Methoden	32
1. Chemikalien	32
2. Zellkultur und Mikrobiologie	33
3. Vektoren, Viren, Proteine, Enzyme und Reagenzien	33
4. Oligonucleotide	35
5. Chromatographiezubehör	35
6. Sonstige Geräte	36
7. Medien	36
8. Puffer und Lösungen	37
<hr/>	
D. Methoden	39
1. Molekularbiologische Methoden	39
1.1 Plasmid-Präparation	39
1.2 Ortsspezifische Mutagenese	39
1.3 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA	41
1.4 Ligation	41
1.5 PCR mit lysierten <i>E. coli</i> (Colony PCR)	42
1.6 Agarose-Gelelektrophorese	42
1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	43
1.8 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	43
1.8.1 Calciumchloridmethode für <i>E. coli</i> DH5 α	43
1.8.2 Magnesiumchloridmethode für <i>E. coli</i> TG1	44
1.9 Transformationsmethoden	44
1.9.1 Transformation in <i>E. coli</i> DH5 α	44
1.9.2 Transformation in <i>E. coli</i> TG1	44
1.10 Sequenzierung	44
2. Zellkultur	45
2.1 Cotransfektion mit linearisierter BaculoGold DNA	45
2.2 Amplifikation der rekombinanten Viren	45
2.3 Expression in Sf9 Insektenzellen	46
2.4 Expression von IFN α 2-HEQ, IFN α 2 E58A und ifnar2-EC in <i>E. coli</i>	46
2.5 Präparation und Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i>	46
2.6 Rückfaltung von solubilisierten IFN α 2-Mutanten und ifnar2-EC	47
2.7 Aufreinigung von renaturierten IFN α 2-Mutanten und ifnar2-EC	47

3. Proteinbiochemische Methoden	48
3.1 Aufreinigung von ifnar1- und ifnar2-EC aus Insektenzellüberstand mittels IMAC	48
3.2 Gelfiltrationschromatographie	48
3.3 Ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung der Cysteinmutanten von ifnar1- und ifnar2-EC	49
3.4 Ionenaustauschchromatographie	50
3.4.1 Anionenaustauschchromatographie von fluoreszenzmarkiertem ifnar1- und ifnar2-EC	50
3.5 Präparation des ternären Komplexes	51
3.6 Bestimmung der Proteinkonzentrationen	51
3.7 Bestimmung der DNA-Konzentrationen	52
3.8 Allgemeine proteinbiochemische Methoden	52
3.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
3.8.2 Western-Blotting	53
4. Funktionsanalyse und Aktivitätsstudien	54
4.1 Proteininteraktion auf Oberflächen mittels RfS / TIRFS	54
4.2 Interaktionsmessungen mittels SPR	55
5. Fluoreszenz-Messungen in Lösung	56
5.1 Ensemble-Fluoreszenz-Messungen	56
5.2 Messungen der Fluoreszenzlebensdauer	57
5.3 <i>Stopped-Flow</i> -Messungen	57
6. Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie	58
6.1 Messungen mit ^{AT655} -ifnar1-H10 N349C	58
6.2 Messungen der Konformationsdynamik von ifnar1-H10 N23C	59
7. Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung	60
E. Ergebnisse	61
1. Proteinbiochemie	61
1.1 Aufreinigung von ifnar1-H10 und unmarkierten ifnar1-EC-Derivaten	61
1.2 Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung der Cysteinmutanten von ifnar1-EC	64
1.3 Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung von ifnar2-H10 S35C	67
1.4 Aufreinigung von ifnar2-EC und Interferonen	68
2. Überprüfung der Funktionalität von fluoreszenzmarkiertem ifnar1- und ifnar2-EC	69
3. Einzelpartikelanalyse des Komplexes aus den Ektodomänen des Typ I Interferon Rezeptors mit IFN α 2	70
3.1 Präparation des ternären Komplexes	70
3.2 Architektur des ternären ifnar1-EC- ifnar2-EC- IFN α 2-HEQ- Komplexes	71
3.3 3D-Rekonstruktion und Modellierung des ternären Komplexes mit IFN α 2-HEQ	73
3.4 Architektur des ternären Komplexes aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN β	75
4. Temperaturabhängige Messungen der Ligandenbindung auf Oberflächen	76
5. Analyse von intramolekularen Abstandsänderungen via FRET	78
5.1 Kalibrierung von Abständen mittels fluoreszenzmarkiertem ifnar2-EC	80
5.2 Untersuchung der Konformationsdynamik von fluoreszenzmarkiertem ifnar1-EC	82
5.3 Fluoreszenz-Lebensdauermessungen	85
5.4 Charakterisierung der Konformationsänderung von ifnar1-EC mittels FCS	86
6. Untersuchungen zu der Dynamik in der Linkerregion zwischen den Zytokinbindemodulen	88
7. Propagation der Konformationsänderung in die membranproximale Domäne von ifnar1-EC	89
7.1 Messungen in Lösung und auf Oberflächen	89
7.2 Fluoreszenzlebensdauermessungen	92
7.3 Analyse der membranproximalen Konformationsänderung von ifnar1-EC mittels FCS	93
8. Charakterisierung der konformationellen Dynamik von ifnar1-EC mittels <i>Stopped-Flow</i>	94

<u>F. Diskussion</u>	<u>97</u>
1. Aufreinigung der ortsspezifisch markierten ifnar1-EC- und ifnar2-EC-Mutanten sowie der Interferone	97
2. Analyse der Architektur des ternären Komplexes	98
3. Untersuchung der Dynamik von ifnar1-EC	101
4. Ausblick	107
<u>G. Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>108</u>
<u>H. Anhang</u>	<u>110</u>
<u>I. Literaturverzeichnis</u>	<u>112</u>
<u>J. Publikationen</u>	<u>119</u>

A. Zusammenfassung

Der Typ I Interferonrezeptor, der aus den Transmembranproteinen ifnar1 und ifnar2 besteht, nimmt eine wichtige Rolle bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort ein. Durch Bindung von Typ I Interferonen werden antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Aktivitäten in der Zelle induziert. Die Wirkung der Interferone wird bereits bei der Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten eingesetzt. Es ist bislang nicht bekannt, wie die verschiedenen Typ I Interferone nach Bindung an einen gemeinsamen Rezeptor, unterschiedliche Zellantworten induzieren. So unterscheiden die Typ I Interferone sich nicht hinsichtlich ihrer Bindungsstelle oder der Stöchiometrie der Bindung an ifnar1 bzw. ifnar2. Sie weisen jedoch unterschiedliche Affinitäten zu den Rezeptoruntereinheiten auf, wobei ihnen eine niedrigere Affinität zu ifnar1 gemeinsam ist. Bislang konnte keine Interaktion zwischen den Rezeptoruntereinheiten nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass bei der Rezeptorassemblierung das Interferon zunächst an ifnar2 bindet und anschließend ifnar1 rekrutiert. Es wird postuliert, dass die unterschiedlichen Zellantworten für verschiedene Typ I Interferone auf Unterschieden in der Stabilität der ternären Komplexe beruhen könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Struktur und Dynamik des Interferonrezeptors *in vitro* für die Typ I Interferone IFN α 2 und IFN β charakterisiert. Die Struktur des ternären Komplexes aus den extrazellulären Domänen von ifnar1 und ifnar2 mit IFN α 2 wurde mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Über Einzelpartikelanalyse aufgereinigter Komplexe von IFN mit den extrazellulären Domänen von ifnar1 (ifnar1-EC) und ifnar2 (ifnar2-EC) konnte ein Strukturmodell des ternären Komplexes erstellt werden. Dieses zeigte eine Verschiebung der membranproximalen Domänen von ifnar1-EC und ifnar2-EC wie sie bereits für den Rezeptor für Erythropoitin und den Wachstumsfaktor beobachtet wurden, welche zu den Typ I Zytokinrezeptoren gehören. Die Struktur des ternären Komplexes ermöglicht als erste Struktur eines Typ II Zytokinrezeptors einen Einblick in die Architektur des Komplexes und mögliche Aktivierungsmechanismen. Die Strukturen der Komplexe für die verschiedenen Typ I Interferone IFN α 2 und IFN β wiesen keine fundamentalen Unterschiede auf, was auf einen gemeinsamen Aktivierungsmechanismus hinweist. Temperatur-abhängige Messungen von Bindungskinetik und -affinität ergaben sehr unterschiedliche Energiehyperflächen für die

Ligandenbindung an ifnar1- und ifnar2-EC, und wiesen auf einen mehrstufigen Prozess und mögliche Konformationsänderungen bei der Bindung an ifnar1-EC hin. Zur Analyse der Dynamik von ifnar1-EC wurden daher verschiedene fluoreszenzbasierte Assays etabliert. Eine besondere Herausforderung bestand darin, das Protein ortsspezifisch und stöchiometrisch mit zwei verschiedenen Fluorophoren zu koppeln. Ifnar1-EC wurde an verschiedenen Stellen kovalent mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Es wurde gezeigt, dass nach Bindung eines geeigneten tris-NTA-Fluorophor-Konjugats an den C-terminalen His-Tag die Fluoreszenz abstandsabhängig durch Förster-Resonanz-Energie-Transfer gelöscht wurde. Für ifnar1-EC wurde eine ligandeninduzierte Abstandsänderung detektiert. Die detaillierte Analyse ergab nach Bindung von IFN α 2 eine Abstandszunahme von 13 Å vom N- zum C-Terminus. Durch die Interferonbindung nimmt demnach ifnar1-EC eine gestrecktere Konformation ein. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Anwesenheit von ifnar2-EC und für IFN β erhalten. Die Einzelmolekülanalysen mittels Fluoreszenz Korrelationsspektroskopie (FCS) zeigten sowohl einen Verlust der Flexibilität von ifnar1-EC nach Ligandenbindung als auch ein ligandeninduziertes Rearangement der Ig-ähnlichen Domänen. Die Änderung der Flexibilität wurde durch Messungen der Fluoreszenzlebensdauer bestätigt. Untersuchungen der Kinetik der Ligand-induzierten Konformationsänderung mittels *Stopped-Flow* Messungen bestätigten eine mehrstufige Umorientierung der Ig-ähnlichen Domänen nach Ligandenbindung.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich nach Ligandenbindung die Zugänglichkeit des Tryptophans in der membranproximalen Domäne von ifnar1-EC ändert. Da die membranproximale Domäne nicht bei der Ligandenbindung beteiligt ist, deutet dieser Effekt auf eine Propagation der Ligand-induzierten Konformationsänderung in diese Domäne hin. Das Tryptophan könnte mit der Membran interagieren, was auf eine wichtige Rolle der membranproximalen Domäne für die korrekte Orientierung von ifnar1 in der Membran hindeutet. Die *Stopped-Flow* Analyse zeigte, dass es sich hierbei um einen einstufigen Prozess handelt, der mit der Interferonbindung korreliert.

Die Ergebnisse wiesen insgesamt auf eine Ligand-induzierte Flexibilitätsänderung und Umorientierung der Ig-ähnlichen Domänen bei ifnar1-EC hin. Vermutlich wird nach Ligandenbindung das Signal in die membranproximale Domäne von ifnar1-EC propagiert. Die Strukturen der ternären Komplexe mit den verschiedenen Typ I Interferonen wiesen keine fundamentalen Unterschiede auf. Auch die Ergebnisse der fluoreszenzbasierten Assays zeigten keine Unterschiede für IFN α 2 und IFN β , was die Hypothese stützt, dass die differentielle Aktivität der Interferone nicht auf grundsätzlichen Unterschieden in der Architektur des ternären Komplexes beruht, sondern in der unterschiedlichen Dynamik der Komplexe codiert sein könnte.

B. Einleitung

1. Zytokine und Zytokinrezeptoren

Zytokine sind körpereigene regulatorisch wirkende Proteine oder Glykoproteine des Immunsystems und der Hämatopoese, welche meistens von mehreren Zelltypen produziert werden und auf unterschiedliche Zellen einwirken. Sie üben ihre Funktion parakrin, autokrin und teilweise auch endokrin über die Bindung an membranständige Rezeptoren aus. Eine besondere Eigenschaft der Zytokine ist der pleiotrophe Effekt: Ein Zytokin ist in der Lage, in verschiedenen Zellen unterschiedliche Wirkungen hervorzurufen. Verschiedene Zytokine können sich auch hinsichtlich ihrer Effekte überschneiden, was als Redundanz der Zytokinaktivität bezeichnet wird. Die Biosynthese sowie die Sezernierung der Zytokine werden durch äußere Faktoren und andere Zytokine reguliert. Die von stimulierten Lymphozyten synthetisierten Zytokine werden auch als Lymphokine bezeichnet. Zu den immunmodulierenden Zytokinen gehören die Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF), der *Transforming growth factor- β* (TGF- β) und die koloniestimulierenden Faktoren (CSF; Hämopoetine). Basierend auf den strukturellen Unterschieden werden die Zytokine in verschiedene Klassen eingeteilt. Mitglieder der Klasse I und II bestehen aus einem Vier-Helix-Bündel, wobei die Länge der Helices der Klasse I mit ca. 15 Aminosäuren etwas kürzer ist als die der Klasse II (jeweils ca. 25 Aminosäuren). Die Mitglieder der Klasse II besitzen eine fünfte α -Helix [1,2]. Mitglieder der Klasse III (z.B. TNF α/β) weisen im Gegensatz zu den Mitgliedern der Klassen I und II keine α -Helices auf. Sie bestehen aus mehreren β -Faltblättern. Zytokine übertragen ihr Signal über die Bindung an Rezeptoren, welche sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzen. Teilweise werden sie auch aufgrund der Eigenschaft, dass sie bestimmte Untereinheiten ihrer Rezeptoren gemeinsam haben, in Sub-Familien eingeteilt. So ist die Rezeptoruntereinheit gp130 ein Teil des Rezeptors für Zytokine des Interleukin-6 Typs (wie z.B. Interleukin-6 (IL-6), IL-11, Oncostatin M (OSM), *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF)). Die β -Untereinheit des IL-3-Rezeptors ist Teil der

Rezeptoren für IL-3, IL-5 und dem Granulozyten Makrophagen-CSF (GM-CSF), währenddessen die IL-2 γ -Untereinheit den Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7 und IL-15 gemeinsam ist [3].

Zytokinrezeptoren sind Transmembranproteine, welche nach Ligandenbindung ein Signal in die Zelle übertragen. Sie bestehen aus einem hydrophoben Segment von 20 bis 26 Aminosäuren, der Transmembrandomäne, und einem extrazellulären bzw. einem intrazellulären Teil. Es gibt drei verschiedene Klassen von Zytokinrezeptoren. Zu den Typ I Zytokinrezeptoren gehört unter anderem der Rezeptor für Erythropoetin und für den Wachstumsfaktor (*growth hormone* (GH)). Die Rezeptoren für IFN γ und IFN α/β sind Mitglieder der Klasse II der Zytokinrezeptoren und der TNF-Rezeptor gehört dem Typus III an.

Bislang gibt es keine Struktur eines kompletten Zytokinrezeptors, welche helfen könnte, zu verstehen, wie das Signal nach Bindung des Zytokins über die Transmembrandomäne in die Zelle propagiert wird. Es wird angenommen, dass durch Bindung der Zytokine an die extrazellulären Domänen der Rezeptoruntereinheiten die intrazellulären Domänen in eine räumliche Nähe gebracht werden, was zur Initiation der Signalkaskade führt. Diese Oligomerisierung könnte demnach den Mechanismus darstellen, auf dem die Signalaktivierung beruht. Die Aktivierung von Zytokinrezeptoren führt zu einer durch Trans-Phosphorylierung induzierten Aktivierung der assoziierten Janus Kinasen. So fehlt dem Typ I Zytokinrezeptor eine intrinsische Kinaseaktivität. Diese Funktion wird von den assoziierten Janus Kinasen erfüllt. Durch Phosphorylierung von Tyrosinen der zytoplasmatischen Rezeptordomänen durch die Kinasen entstehen Andockstellen für intrazelluläre Effektorproteine. Abhängig vom Rezeptor werden unterschiedliche Signalwege aktiviert. Die wichtigen Signalwege sind die STAT-abhängigen Signalwege (*signal transducer and activator of transcription*). Alle Zytokinrezeptoren der Klasse II aktivieren unterschiedlich stark STAT1 und STAT3, welche als Dimer einen Transkriptionsfaktor bilden. Dieser bindet in der Promoterregion von Zielgenen an eine Konsensussequenz, das so genannte GAS-Element (*IFN γ activated sites*). Der Typ I Interferonrezeptor und der IL-28-Rezeptor aktivieren zusätzlich STAT2, welcher zusammen mit STAT1 und IRF9 (*IFN regulatory factor 9*) an *IFN stimulated response elements* (ISREs) bindet und die Transkription einer Reihe von antiviralen Genen induziert [4]. Zu den weiteren aktivierten Signalwegen zählen verschiedene MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalwege und ERK (*extracellular signal-related kinase*), JNK (*JUN N-terminal kinase*) und p38 abhängige Signalwege.

2. Zytokinrezeptoren der Klasse I

Zu den Vertretern der Typ I Zytokinrezeptoren (Hematopoetische Rezeptorfamilie) gehören unter anderem die Rezeptoren für Erythropoetin (Epo), den Wachstumsfaktor, Prolaktin, koloniestimulierenden Faktoren und verschiedene Interleukine. Trotz ihrer zum Teil eingeschränkten Homologie weisen sie einige konservierte Motive auf. Sie besitzen in ihren extrazellulären Domänen Disulfidbrücken und in der membranproximalen Domäne ein konserviertes WSXWS-Motif [5].

Basierend auf die Architektur ihrer extrazellulären Domänen wird zwischen kurzen Zytokinrezeptoren (z.B. Epo-, GH-, Prolaktin- und IL-4-Rezeptor) und den langen Zytokinrezeptoren (z.B. gp130, G-CSF) unterschieden. Die kurzen Zytokinrezeptoren besitzen nur ein Zytokinbindemodul (CBM), d.h. zwei Fibronektin III Domänen (FNIII). Zwei FNIII-Domänen werden als CBM bezeichnet, weil sie zusammen eine Zytokinbindestelle bilden [6]. Die Ektodomänen der komplexen Zytokinrezeptoren hingegen weisen mindestens eine CBM und zusätzliche FNIII- und Ig-ähnliche Domänen auf. Eine FNIII-Domäne (auch oft als Ig-ähnliche Domäne bezeichnet) umfasst etwa 100 Aminosäuren und besteht aus sieben β -Faltblättern und einer Disulfidbrücke.

2.1 Struktur und Mechanismus am Beispiel des GH- und Epo-Rezeptorkomplexes

Der Wachstumsfaktor-Rezeptorkomplex war der erste vier-Helix Zytokinrezeptor, dessen Struktur der extrazellulären Domänen zusammen mit gebundenen Liganden mittels Kristallisation bestimmt wurde [7]. Seine Struktur (Abbildung 1a) wird daher vielfältig bei der Untersuchung von Zytokin-Rezeptorkomplexen herangezogen. Die extrazellulären Domänen bestehen jeweils aus zwei FNIII-Domänen, die sich wieder aus jeweils sieben β -Faltblättern zusammensetzen. Ein Wachstumsfaktor-Molekül bindet über zwei verschiedene Kontaktepitope des Zytokins an zwei (identische) Rezeptormoleküle. Interessanterweise binden beide Rezeptorketten über gleiche Aminosäureseitenketten an die unterschiedlichen Bindungsstellen des Zytokins [7,8]. In den frühen 90er Jahren wurde angenommen, dass der Ligand zunächst über die affine Bindungsstelle an eine Rezeptoruntereinheit bindet und dann die andere identische Rezeptoruntereinheit über eine Bindungsstelle mit niedrigerer Affinität rekrutiert [7]. Die Bindungsstellen der Rezeptorketten befinden sich im Bereich zwischen den beiden FNIII-Domänen und mehreren Schleifen zwischen den β -Faltblättern der FNIII-Domänen. Die zweite Rezeptoruntereinheit ist um 157° zur Membrannormalen im Verhältnis zur anderen Untereinheit gedreht und bindet an die gegenüberliegende Seite des Zytokins. Es wurde angenommen, dass die Bindung des Liganden an die Rezeptoruntereinheiten sequentiell abläuft. Beim zweiten Schritt, der auf der Membranebene

abläuft, kommt es zusätzlich zur Ligandenbindung auch zu Interaktionen der Rezeptoruntereinheiten [9,10].

Einige Jahre später wurde gezeigt, dass der GH Rezeptor *in vivo* ohne Ligand als inaktives Dimer vorliegt [11]. Es wurde vorgeschlagen, dass die Aktivierung nach Ligandenbindung durch eine Rotation und vertikales Verschieben der Rezeptoruntereinheiten vermittelt wird [12]. Insertion von vier Alaninen in der Transmembranregion führte zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors. Der GH-Rezeptor bildet offenbar über Interaktionen zwischen den Transmembrandomänen und den membranproximalen Domänen ein inaktives Dimer. Nach Ligandenbindung an eine Rezeptoruntereinheit wird die andere Untereinheit durch eine Konformationsänderung verschoben und der Ligand bindet auch an diese Untereinheit. Die Energie für die Rotation der Rezeptoruntereinheit beruht anscheinend auf der Interaktion zwischen den beiden Rezeptoruntereinheiten und auf der Liganden-Rezeptoren-Interaktion. Diese führt zu einer Änderung der Orientierung der zyttoplasmatisch assoziierten JAK2 Kinasen, welche eine gegenseitige Phosphorylierung und Aktivierung ermöglicht [12]. Auch von anderen Gruppen wurde gezeigt, dass die JAK Kinasen durch eine Rotation der zyttoplasmatischen Domänen aktiviert werden [13].

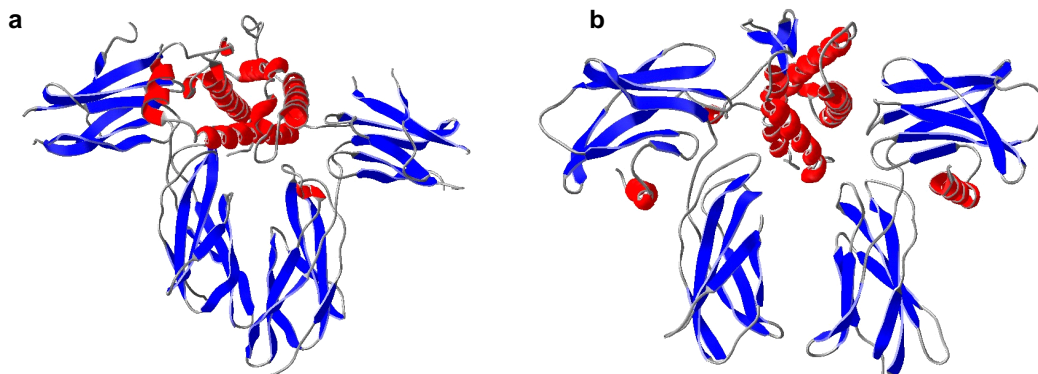


Abbildung 1: Kristallstruktur des Wachstumsfaktor-Rezeptorkomplexes (a, PDB-Nummer: 3HHR) und des Erythropoetin-Rezeptorkomplexes (b, PDB-Nummer: ICN4). Zwei identische Untereinheiten binden jeweils den Liganden.

Der Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) spielt eine wichtige Rolle bei der Erythropoese von Säugetieren. Er besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne, einer Transmembrandomäne (22 AS) und einer intrazellulären Domäne (237 AS) [14-16]. Die extrazellulären Domänen des EpoR bestehen, ähnlich wie beim GH-Rezeptor, aus jeweils zwei FNIII-Domänen, welche aus sieben β -Faltblättern bestehen. N-terminal weisen sie eine kurze α -Helix auf. Der Rezeptorkomplex besteht wie der GH-Rezeptorkomplex aus zwei identischen Untereinheiten und einem gebundenen Liganden [17]. Auch hier bindet der Ligand Epo sequentiell zuerst an eine hochaffine Bindungsstelle ($K_D \sim 1$ nM) und dann an die zweite Rezeptoruntereinheit über eine Bindungsstelle mit niedrigerer Affinität ($K_D \sim 1$ μ M) [18,19].

Ebenso wie beim GH-Rezeptor befindet sich hier die Bindungsstelle in der Region zwischen den beiden FNIII-Domänen [20,21]. Die zweite Rezeptoruntereinheit ist im Verhältnis zur ersten um 110° senkrecht zur Membran gedreht. Außerdem sind für den EpoR-Komplex keine Interaktionen zwischen den Untereinheiten feststellbar. Dies könnte auf einen anderen Mechanismus zur Signalaktivierung hindeuten. Interessanterweise ist in der Kristallstruktur der extrazellulären Domänen des Epo Rezeptors ohne gebundenen Liganden eine Interaktion der Rezeptorketten sichtbar [22]. Für den GH-Rezeptor hingegen ist keine Interaktion in der Kristallstruktur ohne Liganden nachweisbar.

Der EpoR liegt vermutlich ohne Ligandenbindung in der Membran als Dimer vor. Es konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung des EpoR notwendig aber nicht ausreichend für eine Aktivierung ist [22-25] und hauptsächlich durch die Transmembrandomäne vermittelt wird [26]. Es wird postuliert, dass die Bindung von Epo den Rezeptor durch eine induzierte konformationelle Änderung aktiviert [13,26]. Die Orientierung der Rezeptorketten ist wichtig bei der Aktivierung [20]. Elf membranernahe Aminosäuren vermitteln vermutlich eine Rotation der Untereinheiten, welche für die Signaltransduktion essentiell ist [13,27]. Daher wird angenommen, dass es durch die Ligandenbindung zu einer Änderung der relativen Orientierung der beiden Rezeptoruntereinheiten zueinander kommt, welche eine assoziierte JAK in unmittelbare Nachbarschaft zum Tyrosin in der Aktivierungsdomäne der anderen JAK bringt. Durch Phosphorylierung wird die zweite JAK katalytisch aktiv und aktiviert weitere Signalwege [28]. Das Modell für die Rezeptoraktivierung des Epo-Rezeptors beruht hauptsächlich auf der Analyse der verschiedenen Kristallstrukturen mit den extrazellulären Domänen. Um den Mechanismus jedoch ausreichend zu untersuchen, sind weitere Studien mit den kompletten Rezeptorketten notwendig. Die Unterschiede bei der Rezeptoraktivierung des Epo- und den GH- Rezeptors weisen auf eine besondere Komplexität bei der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren hin.

Der Granulozyten-CSF (G-CSF) weist mit seinem vier- α -Helix-Bündel eine ähnliche Struktur wie Epo und GH auf. Jedoch aktiviert G-CSF den Rezeptor wahrscheinlich mit einer 2:2 Stöchiometrie. Er bindet zuerst an eine Rezeptoruntereinheit und bindet danach an ein weiteres G-CSF-Rezeptordimer [29]. Ein Vergleich mit humanen GH lieferte eine homologe Bindungsstelle an G-CSF. Im Komplex mit den Rezeptorketten bleibt diese potentielle Bindungsstelle jedoch exponiert. Mittels Alanin-Mutagenese dieser Bindungsstelle konnte jedoch gezeigt werden, dass sie eine mögliche Rolle bei der Zellantwort spielen könnte [30]. Möglich wäre, dass bei der Signaltransduktion auch höhere (4:4) Komplexe involviert sein könnten [31] und diese putative Bindungsstelle bei der Bildung dieser Komplexe beteiligt sein könnte. In der Struktur des 2:2 Komplexes mit den extrazellulären Domänen fehlen die N-terminalen Ig-Domänen und die drei FNIII-Domänen zwischen D2 und Transmembrandomäne, was eine eingehendere Charakterisierung des Komplexes

erschwert. Insbesondere für die N-terminale Ig-Domäne wurde eine stabilisierende Wirkung nachgewiesen [32].

3. Zytokinrezeptoren der Klasse II und seine Liganden

Ifnar1 und ifnar2 gehören zur Familie der helikalen Zytokinrezeptoren der Klasse II (hCRII). Weitere Mitglieder dieser Klasse sind der IFN γ Rezeptor (IFNGR), der Gewebefaktor (TF), der Interleukin-10 Rezeptor (IL-10R1 und IL-10R2), der Interleukin-20 Rezeptor (IL-20R1 und IL-20R2), Interleukin-28 Bindeprotein (IL-28BP), Interferon λ Rezeptor (IFN-LR), und Interleukin-28 Rezeptor (IL-28R α) [1]. Zytokinrezeptoren der Klasse II bestehen aus Dimeren oder Multimeren mit einer hochaffinen und einer niedrigaffinen Komponente.

Insgesamt sind bislang zwölf verschiedene Mitglieder von Zytokinrezeptoren der Klasse II bekannt [33,34]. Obwohl die Homologie der extrazellulären Domänen sehr niedrig ist, weisen sie alle in ihren extrazellulären Domänen ein Muster an konservierten Aminosäuren auf [35]. Für die Transmembrandomänen und intrazellulären Domänen sind keine Homologien feststellbar. Die extrazellulären Domänen der Mitglieder dieser Familie bestehen meistens aus zwei FNIII-Domänen. Die extrazelluläre Domäne von ifnar1 bildet mit seinen vier FNIII-Domänen eine Ausnahme.

Die Ligandenbindung variiert bei den verschiedenen Ligand-Rezeptorkomplexen. Der IFN γ -Rezeptor besteht aus vier Transmembranuntereinheiten: Zwei Ligandenbindeproteinen (α -Ketten, IFN γ -R1) und zwei zusätzlichen Untereinheiten (β -Ketten, IFN γ -R2), welche für die biologische Aktivität essentiell sind, aber alleine kein IFN γ binden [36-38]. Der IFN γ -Rezeptor liegt vermutlich prä-assembliert als Tetramer vor [39]. IFN γ bindet als Homodimer mit hoher Affinität ($K_D \sim 0,1$ nM) an dieselbe Bindungsstelle der IFN γ -R1-Untereinheit. Im Gegensatz zu den Typ I Zytokinrezeptoren, wo die Bindung des Liganden über unterschiedliche Interaktionsflächen des Liganden stattfindet, bindet IFN γ als Dimer über dieselbe Bindungsstelle an den Rezeptorkomplex. Bislang wurde nur die Kristallstruktur des Komplexes (Abbildung 2) aus den zwei IFN γ -R1-Untereinheiten und gebundenem IFN γ -Dimer gelöst [39].

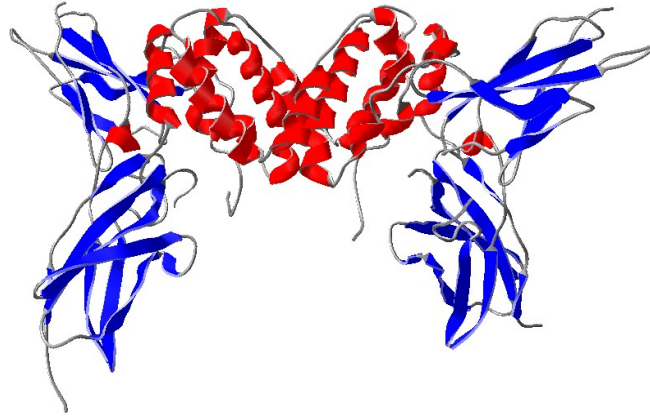


Abbildung 2: Kristallstruktur des Komplexes der extrazellulären Fragmente der hochaffinen IFN γ -R1-Ketten und gebundenem IFN γ -Dimer. In der Zelle liegt der IFN γ -Rezeptor als Komplex mit zwei zusätzlichen IFN γ -R2 Untereinheiten vor. β -Faltblätter sind blau, α -Helices rot dargestellt.

Auf Zellen wurde gezeigt, dass sich nach Zugabe von IFN γ der Abstand zwischen den intrazellulären Domänen von IFN γ -R1 und IFN γ -R2 vergrößert [40]. Die ligandeninduzierte Separierung der Rezeptoruntereinheiten ist abhängig von der Bindung von STAT1 an IFN γ -R1. Inhibierung der Bindung von JAK1, nicht aber von JAK2, verhindert die Interaktion zwischen IFN γ -R1 und IFN γ -R2. Dies impliziert eine wichtige Rolle von JAK1 bei der Prä-Assemblierung des Komplexes. Nach Bindung von IFN γ an den IFN γ -Rezeptorkomplex kommt es vermutlich zu zwei konformationellen Änderungen: Zum einen nimmt der Abstand der zwei IFN γ -R2 Untereinheiten zu, zum anderen kommt es zu einer STAT1 abhängigen Bewegung der IFN γ -R1 und IFN γ -R2 Untereinheiten zueinander [41].

Der IL-10 Rezeptorkomplex mit einer 2:2:2 Stöchiometrie aus IL-10, IL-10R1 und IL-10R2 ähnelt dem IFN γ Rezeptorkomplex. IL-10 besteht aus sechs α -Helices und bildet Dimere. Bei der Rezeptorkomplexbildung bindet das IL-10-Dimer zuerst an die affine Untereinheit IL10-R1 (KD ~ 8 nM). Der Komplex rekrutiert anschließend die niedrig affine Untereinheit IL10-R2. Bislang gibt es nur die Kristallstruktur des Komplexes aus dem IL-10-Dimer mit den affinen Rezeptoruntereinheiten IL-10R1 [42]. Studien mit viralen zu IL-10 homologen Proteinen [43] lieferten Hinweise, dass die Orientierung der Rezeptoruntereinheiten nach Bindung des IL-10-Dimers eine wichtige Rolle bei Aktivierung verschiedener Signalwege spielen könnte. Zusätzlich könnte die Stabilität des Komplexes die differentielle Signalaktivierung beeinflussen.

4. Typ I Interferone

Bereits 1957 wurde die antivirale Wirkung der Interferone, die zum angeborenen Immunsystem gehören, beschrieben [44]. Interferone werden anhand ihres Rezeptors in Klassen eingeteilt. Der bislang einzige Vertreter der Typ II-Interferone ist IFN γ , welcher an den Interferon γ -Rezeptor bindet [127]. Die IFN-ähnlichen Zytokine IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28A) und IFN λ 3 (IL-28B) gehören zu den Typ III Interferonen [45].

Zu den humanen Typ I Interferonen gehören 13 verschiedene IFN α -Subtypen, IFN β , IFN ϵ , IFN ω und IFN κ , welche alle eine signifikante Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen [45,46]. Die Sequenzübereinstimmung der IFN α Isotypen zu IFN ω , β , ϵ und κ beträgt 50 %, 31 %, 28 % und 27 %. Die Homologie der verschiedenen IFN α -Subtypen zueinander ist mit ca. 80% sehr hoch. Die IFN α Isotypen bestehen aus 165 oder 166 Aminosäuren und besitzen zwei konservierte Disulfidbrücken (C29-C138/139 und C1-C98/99). Die Disulfidbrücke zwischen C1 und C98 bzw. C99 ist nicht essentiell für die korrekte Faltung der Interferone oder die Rezeptorbindung. Von IFN α 2 und IFN β wurde die 3D-Struktur mittels Röntgen-Kristallographie gelöst [47,48]. Sowohl die α -Subtypen als auch IFN β setzen sich aus fünf α -Helices zusammen, wobei Helix A, B, C und E zusammen ein Vier-Helix-Bündel bilden (Abbildung 3) [47-51]. Die Helices sind über kurze Schleifen von 2 bis 4 Aminosäuren (BC-, CD- und DE-Schleife) oder einer Sequenz von 30 AS (DE-Schleife) miteinander verbunden. Helix D ist Teil der Schleife zwischen Helix C und E. Die Ausbildung des Vier-Helix-Bündels stellt eine sehr stabile Faltung dar, welche den Interferonen eine hohe Temperatur- und pH-Stabilität verleiht.

IFN β besitzt nur eine konservierte Disulfidbrücke (C31-C141) und ein freies Cystein (C17). Außerdem liegt es glykosyliert vor (N80) [52].

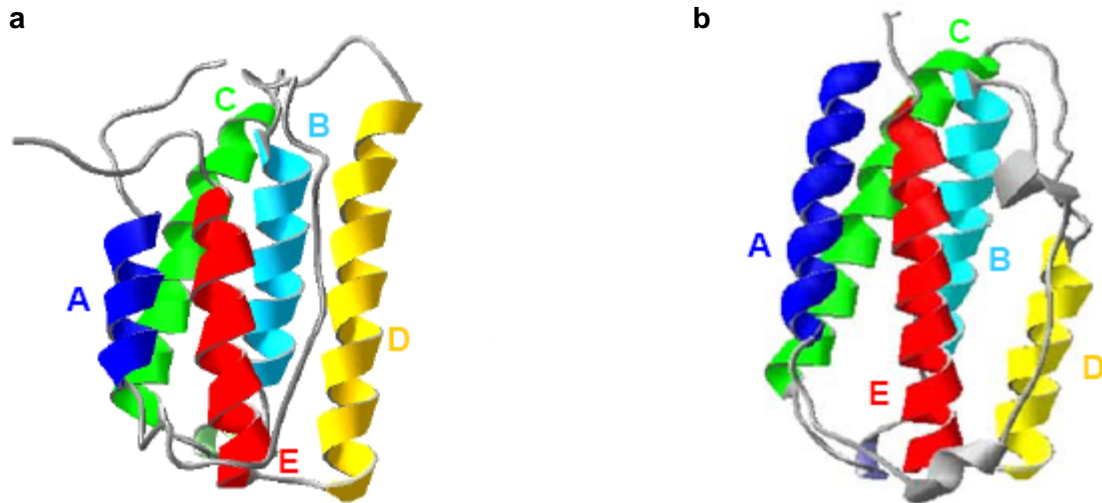


Abbildung 3: NMR-Struktur von IFN α 2 (a, PDB-Nummer: 11ITF) und Kristallstruktur von IFN β (b, PDB-Nummer: 1AU1). IFN β ist ohne Glykosylierung am N80 dargestellt. Beide Typ I Interferone bestehen aus 5 α -Helices (A-E), wobei Helix A, B, C und E ein Vier-Helix-Bündel bilden.

Typ I Interferone werden von fast allen Zelltypen in geringen Mengen sezerniert. IFN α und IFN ω werden jedoch hauptsächlich von hematopoietischen Zellen gebildet, IFN β hingegen hauptsächlich von Fibroblasten [53]. Sie binden alle an denselben Rezeptor, welcher sich aus den zwei Transmembranproteinen ifnar1 und ifnar2 zusammensetzt [54-56].

Sie führen zu antiviralen, wachstumshemmenden und immunmodulatorischen Effekten [54]. Daher werden Typ I Interferone zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten wie z.B. Multipler Sklerose (IFN β), Krebserkrankungen oder viraler Hepatitis (IFN α 2) eingesetzt [57-59]. Der Einsatz von Interferonen wird jedoch durch unerwünschte Nebenwirkungen und auftretende Resistenzen eingeschränkt [60,61].

Obwohl Typ I Interferone eine hohe Sequenzhomologie aufweisen und an denselben Rezeptor binden, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer induzierten Zellantwort [62,63]. So ist die antiproliferative Wirkung von IFN β im Vergleich zu IFN α 2 wesentlich stärker während die antivirale Aktivität ähnlich ist. Der Mechanismus der differentiellen Signalaktivierung ist aber bislang ungeklärt. Es wurde gezeigt, dass die Bindungsaffinität zu ifnar2 mit der antiproliferativen und antiviralen Aktivität korreliert [64], während eine Änderung der Affinität zu ifnar1 zu einer unterschiedlichen Änderung der Aktivitäten führt [65,66]. Eine durch Mutagenesestudien erreichte Affinitätserhöhung von IFN α 2 zu ifnar1 führte zu einer substantiellen Erhöhung der antiproliferativen Aktivität, wobei die antivirale Aktivität kaum beeinflusst wurde [65]. Die differentielle Signalaktivierung durch verschiedene Typ I Interferone kann jedoch nicht allein mit den unterschiedlichen Affinitäten zu den Rezeptoruntereinheiten erklärt werden. Die Unterschiede in der Stabilität des aktivierten

Rezeptorkomplexes, sowie die Effizienz, ifnar1 zu rekrutieren, könnten für die differentielle Aktivität der Typ I Interferone verantwortlich sein. So korrelieren die Unterschiede in der relativen Affinitäten von verschiedenen Interferonen zu ifnar1- EC und ifnar2-EC mit den induzierten zellulären Aktivitäten [66].

5. Der humane Typ I Interferon Rezeptor

Der Typ I Interferon Rezeptor, der den Zytokinrezeptoren der Klasse II zugeordnet wird, wird in fast allen Zellen exprimiert. Er setzt sich aus den zwei Transmembranproteinen ifnar1 und ifnar2c zusammen [35,56,67,68]. Obwohl ifnar2 durch seine hohe Affinität zu IFN einen größeren Anteil an der IFN-Bindung besitzt, bilden die Rezeptoruntereinheiten nur zusammen einen hochaffinen Rezeptorkomplex für alle Typ I Interferone aus [67,69]. Auch die Spezies-Spezifität und Signaltransduktion wird vom Komplex mediert [70,71]. Der Komplex aus IFN, ifnar1 und ifnar2 besitzt eine 1: 1: 1-Stöchiometrie [72,73].

Mittels festkörperunterstützter Membranen mit den isolierten Ektodomänen des Rezeptors (ifnar1-EC und ifnar2-EC) wurde gezeigt, dass es sich bei der Rezeptorassemblierung um einen zweistufigen Prozess handelt (Abbildung 4). Zuerst bindet das IFN α 2 an die hochaffine Untereinheit ifnar2-EC ($K_D = 5$ nM). Der binäre Komplex rekrutiert ifnar1-EC, welcher eine niedrige Affinität zu IFN α 2 ($K_D = 5$ μ M) besitzt [73,74].

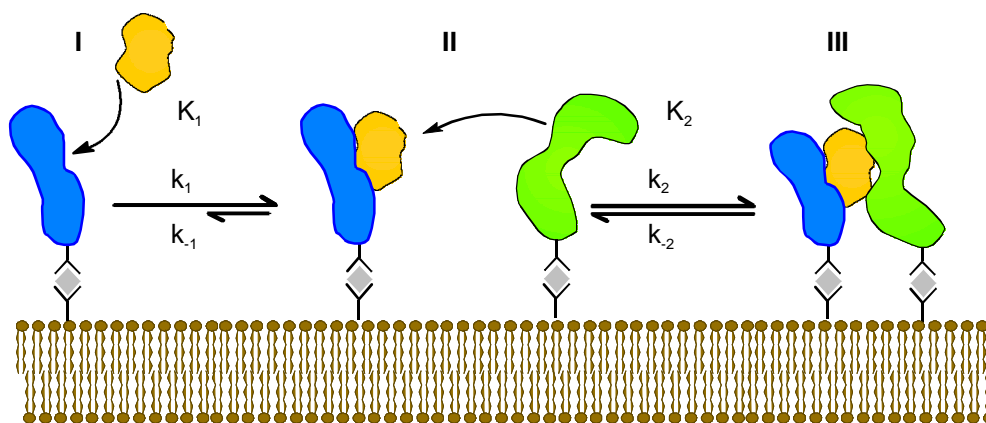


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Assemblierung des ternären Komplexes aus ifnar2-EC (blau), ifnar1-EC (grün) und IFN α 2 (orange) auf festkörperunterstützten Lipid-Doppelschichten. Die Ektodomänen der Rezeptoruntereinheiten wurden mittels His-Tag auf Chelatorlipiden immobilisiert. Nach Bindung des Interferons an ifnar2-EC (I) kommt es zur Rekrutierung von ifnar1-EC (II) und zur Ausbildung des ternären Komplexes (III).

Bedingt durch die geringe Lebensdauer der IFN α 2-ifnar1-EC Interaktion dissoziiert und re-assoziiert der Komplex sehr schnell. Abhängig von den Rezeptor-Oberflächenkonzentrationen liegt nur ein Teil des gebundenen IFN α 2 im ternären Komplex vor. Der gebundene Anteil wird durch die Gleichgewichtskonstante für die Interaktion

zwischen IFN α 2 / ifnar2 und ifnar1 $K_2=k_2/k_{-2}$ beschrieben. Durch hohe Oberflächenkonzentrationen von ifnar1-EC und ifnar2-EC wurde die Dissoziationsratenkonstante von IFN α 2 vom ternären Komplex um das ca. 200-fache reduziert im Vergleich zur Dissoziation von ifnar2-EC. Ansteigende Rezeptorkonzentrationen führen demnach zu einer höheren Stabilität des ternären Komplexes. Die Lebensdauer des ternären Komplexes mit IFN α 2 wurde auf ca. 3-5 s bestimmt [73,75]. Studien mit IFN β zeigten Unterschiede in den Affinitäten zu ifnar1 und ifnar2 und damit Unterschiede in der Stabilität des Komplexes. Durch Analyse verschiedener Mutanten von IFN α 2 wurde ein Zusammenhang zwischen der Affinität zu ifnar2 und antiviraler Aktivität gezeigt [64]. Aufgrund dieser Ergebnisse wird postuliert, dass die differentielle Signalaktivierung der Typ I Interferone auf Unterschieden in der Affinität zu den Rezeptoruntereinheiten basieren könnte. Unterschiedliche Affinitäten implizieren bei niedrigen Rezeptoroberflächenkonzentrationen unterschiedliche Stabilitäten der ternären Komplexe und könnten demnach zu einer differentiellen Aktivierung der Signalwege führen. Unterschiede im Expressionslevel (und / oder Lokalisation) der Rezeptoruntereinheiten in verschiedenen Zelltypen würden zur Aktivierung von anderen Signalwegen führen.

Im Gegensatz zu Typ I Zytokinrezeptoren (z.B. GH- [9,76], IL-4- [77] oder IL-6-Rezeptor [78,79]), bei denen stabile Komplexe auch durch die Wechselwirkung der membranproximalen Domänen der extrazellulären Domänen vermittelt werden, konnte für den Interferon Rezeptor keine kooperative IFN-Bindung festgestellt werden. Die Affinität von IFN α 2 zu ifnar1-EC entspricht der Affinität zum binären Komplex aus IFN α 2 und ifnar2-EC. Eine Interaktion zwischen den extrazellulären Domänen der beiden Rezeptoruntereinheiten ifnar1 und ifnar2 konnte nicht beobachtet werden [73].

Ifnar2 besitzt eine hohe Affinität zu Interferonen. Es existieren drei Isoformen von ifnar2: Eine lösliche Variante ifnar2a mit 239 Aminosäuren und einem theoretischen Molekulargewicht von 24 kDa, einer kurzen Variante ifnar2b mit 331 Aminosäuren Länge und einem theoretischen Molekulargewicht von 34 kDa sowie der vollständigen Form ifnar2c mit 515 Aminosäuren und 55 kDa. Alle drei Isoformen besitzen dieselbe extrazelluläre Domäne, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer intrazellulären Domänen. Nur ifnar2c ist an der Signaltransduktion beteiligt [80], wobei für ifnar2a und ifnar2b regulatorische Funktionen postuliert werden [6].

Die NMR-Struktur der Ektodomäne von ifnar2 zeigt zwei FNIII-ähnliche Domänen, welche durch eine kurze α -Helix und einem Prolin-Prolin-Motiv verbunden sind und einen Winkel von ca. 90° einschließen [81]. Zusammen bilden sie eine Zytokinbindestelle.

Die Struktur des Komplexes aus ifnar2 und IFN ist bislang nicht gelöst. Aber Mutagenesestudien dienten zur Identifizierung der Bindungsstellen von ifnar2-EC zu IFN α 2

[64,82]. Ein Modell der Struktur des binären Komplexes aus ifnar2-EC und IFN α 2 konnte mit Hilfe der „double mutant cycle“ Analyse gewonnen werden (Abbildung 5). Die IFN-Bindungsstelle befindet sich an der N-terminalen Domäne und der Linkerregion zwischen den beiden FNIII-ähnlichen Domänen [82]. Mittels NMR-Studien wurde gezeigt, dass durch die Bindung vom Interferon keine drastischen konformationellen Änderungen bei ifnar2-EC und IFN α 2 induziert werden [83].

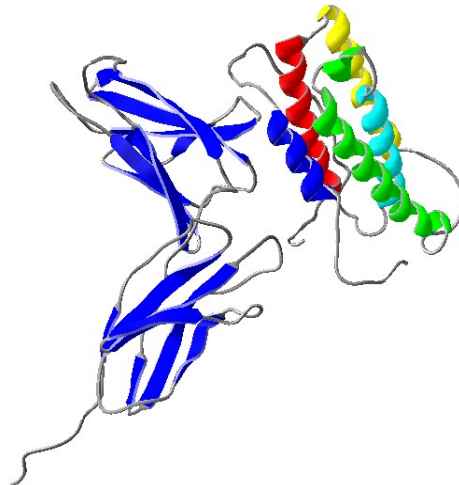


Abbildung 5: Struktur der extrazellulären Domäne von ifnar2 (blau) im Komplex mit IFN α 2 [84].

Ifnar1 besteht aus 530 Aminosäuren und besitzt mit Glykosylierung (15 potentielle Glykosylierungsstellen) ein Molekulargewicht von 120 bis 130 kDa [70]. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 409 Aminosäuren. Die Struktur der extrazellulären Domäne von ifnar1 ist nicht gelöst. Bekannt ist, dass die extrazelluläre Domäne von ifnar1 mit ihren 409 Aminosäuren aus vier FNIII-Domänen von je ca. 100 Aminosäuren besteht (im folgenden SD1 bis SD4 genannt). Die Assoziation mit der Januskinase Tyk2 ist die Voraussetzung für eine funktionale affine Ligandenbindung und für eine stabile Expression an der Zelloberfläche [85,86]. Durch seine geringe Affinität zu Interferonen wird ifnar1 die Rolle des Signalüberträgers zugeschrieben [70].

Der Interferon Rezeptor bindet eine Vielzahl von unterschiedlichen Typ I Interferonen. Da bei anderen Mitgliedern der humanen Klasse II Zytokinrezeptoren zwei FNIII Domänen eine Zytokinbindestelle darstellen, wurde anfangs vermutet, dass die differentielle Signalaktivierung der Typ I Interferone durch unterschiedliche IFN-Bindungsstellen vermittelt wird [87]. Mittels Mutagenese- und Deletionsstudien konnte *in vitro* jedoch gezeigt werden, dass die drei N-terminalen Subdomänen von ifnar1 notwendig und ausreichend für die Bindung von IFN α 2 und IFN β sind. IFN α 2 und IFN β binden offenbar an ein überlappendes Epitop, welches von den drei N-terminalen Subdomänen gebildet wird. Für die Fragmente

bestehend aus den Subdomänen 1 und 2 bzw. 3 und 4, konnte für die getesteten Konzentrationen von bis zu 10 μM für IFN α 2 oder 200 nM für IFN β keine Ligandenbindung nachgewiesen werden [88]. *In vivo* Studien lieferten jedoch Hinweise auf eine wichtige Rolle der membranproximalen Domäne von ifnar1 bei der Rezeptorassembly. Die Deletion dieser Domäne führte zu einem Verlust der hochaffinen IFN α 2-Bindung. Auch Chimäre, bei denen die membranproximale Domäne durch die entsprechende Domäne des IL-10 Rezeptors oder des IFN γ Rezeptors ersetzt worden waren, zeigten keine hochaffine Bindung von IFN α 2 [88].

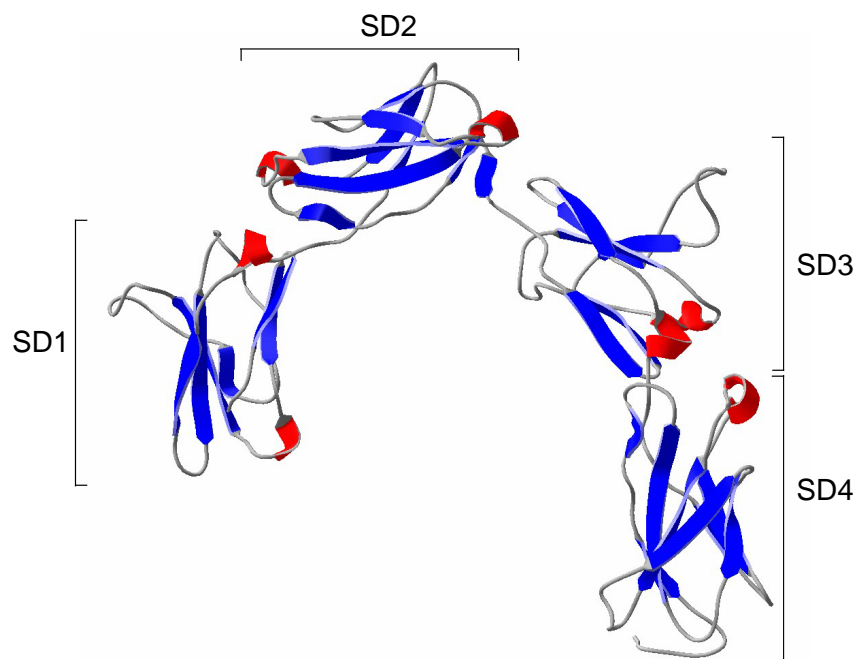


Abbildung 6: Homologiemodell der extrazellulären Domäne von ifnar1 basierend auf der Struktur des IFN γ -Rezeptors. Die β -Faltblätter der Ig-ähnlichen Domänen (SD1 bis SD4) sind blau gekennzeichnet, die α -Helices sind rot markiert.

Die Bindungsstellen für die Interaktion zwischen ifnar1 und IFN α 2 sind bereits teilweise kartiert [89,90]. Von Cajean-Feroldi wurde durch Alaninsubstitution gezeigt, dass die Aminosäuren ²⁷⁸LRV im β -Faltblatt S6 in SD3 essentiell für die biologische Aktivität des Rezeptors nach IFN-Bindung sind. Während die Bindung von IFN α an den Rezeptor im Vergleich zum Wildtyp gleich bleibt, zeigt sich nach Bindung von IFN α 2 eine reduzierte Phosphorylierung von STAT1 und reduzierte Bildung des ISGF3 Komplexes. Für IFN α 8 konnte sogar keine Signalaktivierung mehr festgestellt werden. Die antivirale Aktivität nach Zugabe von IFN α 2 und IFN α 8 war ebenfalls eingeschränkt [91]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Bindung der Interferone nicht zwingend eine biologische Aktivität induziert und dass der positiv geladene Argininrest an Position 279 eine Rolle bei Signalaktivierung spielen könnte.

5.1 Signaltransduktion

Auf der zytoplasmatischen Seite sind die Rezeptoruntereinheiten ifnar1 und ifnar2 mit zwei Mitgliedern der *Janus activated kinase* (JAK)-Familie assoziiert. Die Rezeptoruntereinheit ifnar1 ist dabei konstitutiv mit der Tyrosinkinase TYK2 (*tyrosine kinase 2*) und die Untereinheit ifnar2 mit JAK1 (*janus activated kinase 1*) assoziiert. Die Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen gilt als ein initialer Schritt der Typ I-vermittelten Signaltransduktion. Die Bindung von Typ I Interferonen führt zu einer Autophosphorylierung und Aktivierung der assoziierten JAKs. Nach Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoruntereinheiten dienen diese als Andockstellen für weitere Adaptorproteine. Die aktivierten JAKs vermögen neben dem bedeutenden klassischen JAK-STAT-Signalweg auch weitere Signalkaskaden (MAPK/p38, PI3K, u.a.) direkt oder indirekt zu aktivieren, wodurch die pleiotropen biologischen Effekte von Typ I Interferonen in den Zielzellen oder Geweben erklärt werden könnten.

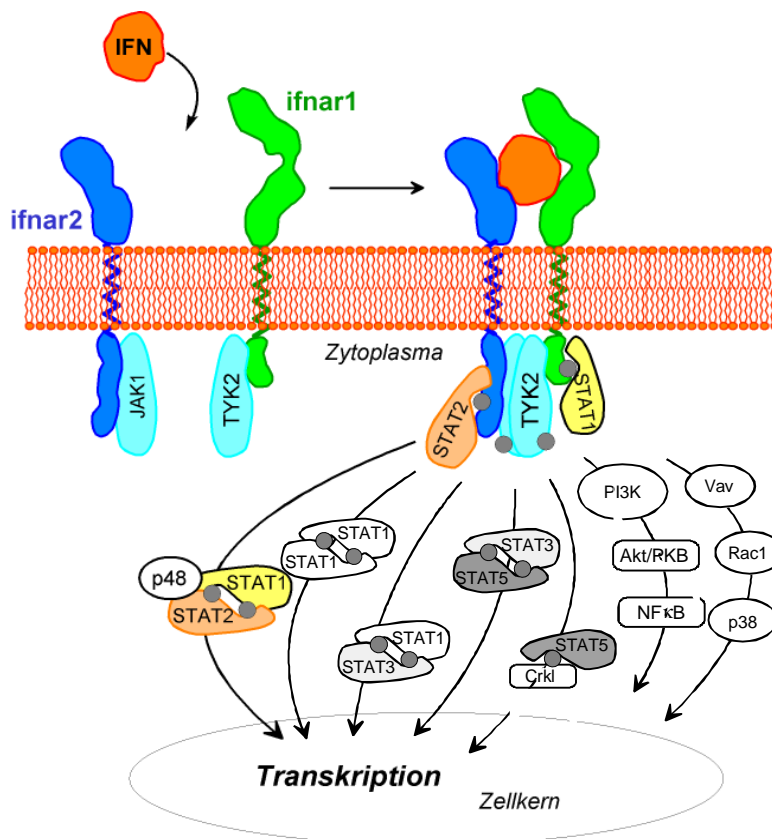


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aktivierung der verschiedenen Signalwege des Typ I Interferon Rezeptors.

Im klassischen JAK-STAT-Signalweg wird nach Aktivierung der Rezeptor-assoziierten JAKs die Phosphorylierung und Aktivierung von STATs (*signal transducer and activator of transcription*) eingeleitet. Dabei werden vor allem STAT1, STAT2, STAT3 und STAT5 als Antwort auf Typ I Interferone an einem Serinrest (STAT1: Serin 727) phosphoryliert. Die

aktivierten STATs bilden anschließend Homo- oder Heterodimere und translozieren in den Zellkern, wo diese die Transkription von Genen nach spezifischer Bindung in der Promotorregion von *IFN-stimulated genes* (ISGs) initiieren. Ein wichtiger Transkriptionskomplex ist der ISGF3-Komplex. Dieser Komplex besteht aus jeweils einem phosphorylierten STAT1- und STAT2-Molekül sowie aus den Faktor IRF9 und bindet an *IFN-stimulated response elements* (ISREs) [38,92,93]. Neben diesem Komplex existieren noch STAT-Homodimere (STAT1-STAT1, STAT3-STAT3) und STAT-Heterodimere (STAT1-STAT3, STAT1-STAT5 und STAT2-STAT3), die meist an *IFN- γ -activated site elements* (GAS) binden.

Neben diesem Signalweg führen Typ I Interferone auch zu einer Aktivierung von p38. Dabei wird wahrscheinlich VAV Interferon-abhängig über TYK2 phosphoryliert, was anschließend zum VAV-abhängigen GDP/GTP-Austausch in der GTPase RAC1 führt. Dies führt zu einer Aktivierung von MAPK-Kinasen (MAPKK3 und MAPKK6), welche schließlich zur Aktivierung von p38 führt [94-99].

Ebenfalls Interferon-abhängig wird der Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K)-Signalweg aktiviert. So induzieren IFN α , IFN β und IFN ω eine Tyrosin-Phosphorylierung von IRS1 (*insulin receptor substrate-1*) und eine anschließende Assoziierung von p85, die regulatorische Untereinheit von PI3K, mittels der N- und C-terminalen SH2-Domäne an IRS1 [100]. Diese Interaktion mit p85 führt schließlich zu einer Aktivierung von p100, die katalytische Untereinheit von PI3K. PI3K ist nun in der Lage, PDK1 (*3-phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1*), AKT (eine Serin/Threonin-Kinase), verschiedene Isoformen der Protein-Kinase C sowie Mitglieder der TEC-Familie von Tyrosin-Kinasen (z.B. TEC, BTK, ITK und RLK) zu aktivieren [101]. So sind Interferone in der Lage, PI3K in einer IRS-abhängigen, aber STAT-unabhängigen Weise zu aktivieren.

6. Molekulare Propagation durch die Membran

Die Änderung der räumlichen Anordnung von Transmembranrezeptoren und damit auch die Veränderung der räumlichen Anordnung der zytoplasmatischen Domänen und assoziierten Proteine führt zu einer Aktivierung von verschiedenen Signalwegen. Die zugrunde liegenden Mechanismen können vielfältig sein: Lange Zeit wurde angenommen, dass bei Membranrezeptoren, die nur eine Transmembrandomäne besitzen, die Aktivierung hauptsächlich auf der lateralen Assoziation der Rezeptoruntereinheiten basiert (horizontale Signalaktivierung) [102]. Rezeptoren, welche ohne Aktivierung als konstitutive Dimere vorliegen, müssen über einen anderen Mechanismus aktiviert werden. Bei der „vertikalen Signalaktivierung“ wird das Signal nach Ligandenbindung durch eine konformationelle Änderung über die Transmembranebene in die Zelle propagiert [23,103]. Die

Rezeptoroligomerisierung kann sich hinsichtlich vieler Faktoren unterscheiden (z.B. Stöchiometrie, Bindungsstellen). Ein Ziel ist es, die Mechanismen der Signaltransduktion für die verschiedenen Zytokinrezeptoren aufzuklären. Oft werden hierzu die Strukturen der Komplexe herangezogen. Dies hat jedoch entscheidende Nachteile, da es noch keine Strukturen inklusive Transmembraneinheiten und zytoplasmatischen Domänen gibt und oft ganze Rezeptorketten im Komplex fehlen. Außerdem liefern die Strukturen nur „Momentaufnahmen“ von Zuständen und keine Aussagen über die Dynamik von Prozessen. *In vivo* Studien liefern oft weitere Erkenntnisse über die Dynamik der Assoziation von Rezeptorkomplexen. Diese müssen jedoch zum Teil kritisch betrachtet werden, da es sich oft um artifizielle Systeme handelt, bei denen die Rezeptoren überexprimiert vorliegen. Eine hohe Anzahl von Rezeptoren kann z.B. zu einer Verschiebung des Gleichgewichts bei der Oligomerisierung führen oder bestimmte Komponenten der Rezeptoren können bei der Rezeptorassemblierung limitierend sein. Auch generische Modelle können zur Aufklärung der Rezeptoraktivierung herangezogen werden. So wurde von Weidemann und Kollegen ein generisches Modell für die Rezeptoraktivierung des IL4-Rezeptors vorgeschlagen. Demnach kommt es bei der Rezeptoraktivierung zu einer Änderung der Zugänglichkeit der Tryptophanreste des WSXWS-Motifs, welche vor der Aktivierung mit der Membran interagieren [104]. Insgesamt kann nur der ganzheitliche Blick auf die mittels *in vitro*- und *in vivo*-Techniken gesammelten Informationen ein möglichst komplettes Bild der Rezeptoraktivierung bei Zytokinrezeptoren liefern.

7. Zielsetzung

Typ I Interferone binden alle an denselben Rezeptorkomplex, welcher sich aus den zwei Rezeptoruntereinheiten ifnar1 und ifnar2 zusammensetzt. Trotzdem unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Wirkung, die sie in der Zelle hervorrufen. Studien mit den isolierten Ektodomänen der Rezeptoruntereinheiten zeigten, dass die Interferone sich nicht hinsichtlich ihrer Bindungsstelle oder Stöchiometrie an ifnar1 oder ifnar2 unterscheiden [88]. Sie weisen jedoch unterschiedliche Affinitäten zu den Rezeptoruntereinheiten auf, wobei ihnen eine niedrigere Affinität zu ifnar1 gemeinsam ist. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die Struktur und Dynamik des Komplexes für die verschiedenen Typ I Interferone IFN α 2 und IFN β charakterisiert werden. Dazu sollte die Struktur der ternären Komplexe mit IFN α bzw. IFN β mittels Elektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktion gelöst werden. Zusätzlich sollten Assays zur Untersuchung der Dynamik der Ektodomäne von ifnar1 etabliert und Konformationsänderungen von ifnar1-EC mittels fluoreszenzbasierter Assays verfolgt werden. Fluoreszenzassays basierend auf Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) sollten der Analyse der Organisation der Ig-ähnlichen Domänen von ifnar1-EC dienen. Um lokale Änderungen der Flexibilität oder eine mögliche Konformationsänderung in der membranproximalen Domäne von ifnar-EC zu charakterisieren, sollte ein auf Elektronentransfer basierender Assay etabliert werden. Die Dynamik von ifnar1-EC sollte sowohl für IFN α 2 als auch für IFN β charakterisiert werden. Außerdem sollte ein möglicher Einfluss von ifnar2-EC im Komplex untersucht werden. Mittels temperaturabhängiger Messungen der Interaktion zwischen IFN α 2 und ifnar1-EC bzw. ifnar2-EC auf Oberflächen sollte die Thermodynamik der Bindung untersucht werden. Die Temperaturabhängigkeit der Bindungskinetik sollte zur Bestimmung der Energiehyperflächen dienen.

8. Strategien

8.1 Ortsspezifische duale Fluoreszenzmarkierung von ifnar1- und ifnar2-EC

Methoden zur Detektion von Abstandsänderungen bzw. Interaktion von Proteinen basieren häufig auf der abstandsabhängigen Energieübertragung von Fluorophoren durch FRET. Zur Untersuchung der Dynamik von ifnar1-EC mittels FRET ist eine ortsspezifische Markierung des Rezeptors mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen unabdingbar. In dieser Arbeit wurden die Markierungen mit zwei Farbstoffen über zwei verschiedene Kopplungsmethoden erreicht. Die ortsspezifische Markierung mittels tris-NTA gekoppelten Fluorophoren beruht auf der Interaktion des Histidin-*Tags* des Proteins mit den in der NTA-Gruppe chelatisierten Ni²⁺-Ionen. Die Affinität der Interaktion zwischen His-Tag und tris-NTA liegt im sub-nanomolaren Bereich und ist somit hochaffin [105]. Eine schematische Darstellung der Interaktion ist in Abbildung 8b dargestellt. Die Verwendung von tris-NTA-Konjugaten bietet die Möglichkeit, durch die Wahl von unterschiedlichen Kopplungsmethoden Proteine mit zwei verschiedenen Fluorophoren selektiv zu markieren. Tris-NTA-Fluorophor-Konjugate können z.B. als Energieakzeptoren eingesetzt werden. Sie löschen abstandsabhängig die Fluoreszenz eines Fluorophors, welcher ortsspezifisch über Thiole an das zu untersuchende Protein gekoppelt wurde (Abbildung 8c). Ifnar1-EC besitzt keine freien Cysteine, alle acht Cysteine sind in Disulfidbrücken eingebunden. Potentielle Glykosylierungsstellen stellen ein mögliches Target zur Mutation in Cysteine für die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen mittels Maleimid-Kopplungsreaktion dar, da sie wahrscheinlich exponiert und so für den Farbstoff zugänglich sind.

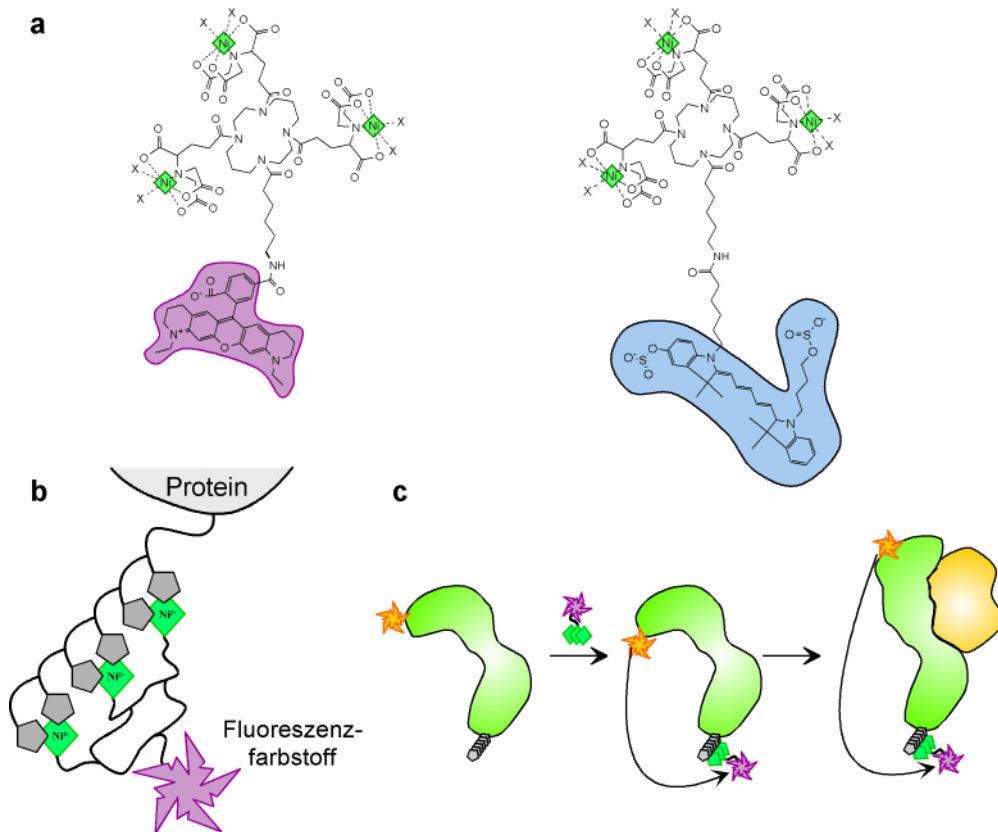


Abbildung 8: Prinzipien des FRET basierten Assays. **a:** Struktur von AT565 tris-NTA (links), FEW646 tris-NTA (rechts). **b:** Schematische Darstellung der Interaktion zwischen tris-NTA-Konjugat und His-Tag. **c:** Abstandsabhängige Fluoreszenzlöschung eines an das Protein gekoppelten Fluorophors nach Bindung des FRET-Akzeptors.

Maleimide reagieren mit Thiolgruppen und bilden eine stabile Thio-Ether-Bindung aus. Der optimale pH für die Reaktion liegt zwischen 7 bis 7,5, da bei diesem pH das Thiol ausreichend nucleophil ist, um mit dem Maleimid über eine Michael-Addition zu reagieren (Abbildung 9).

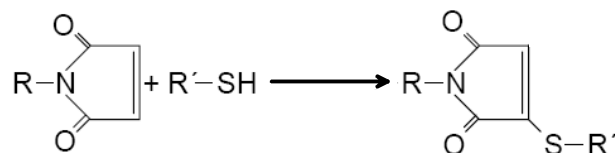


Abbildung 9: Reaktionsmechanismus einer Maleimidkopplung.

Die Aminogruppen im Protein weisen bei diesem pH jedoch eine sehr geringe Reaktivität auf, da sie protoniert vorliegen. Eine Reaktion ist nur möglich, wenn das freie Cystein in protonierter Form vorliegt. Die Bedingungen für die Reduktion des freien Cysteins sollten jedoch nicht zu einer Reduktion der Disulfidbrücken bei ifnar1-EC oder ifnar2-EC führen. Daher liegt aufgrund einer möglichen Reduktion der Disulfidbrücken die Herausforderung bei der ortsspezifischen Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen von ifnar1- und ifnar2-EC darin,

einen Markierungsgrad von möglichst 1 zu erreichen und mehrfach markierte von einfach markierten Proteinen abzutrennen. Ist der gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff elektrisch geladen, kann für die Trennung eine Ionenaustauschchromatographie verwendet werden, da die unterschiedlichen Spezies sich hinsichtlich ihrer Ladung unterscheiden und so bei verschiedenen Ionenstärken eluieren sollten.

Die Effizienz der strahlungslosen Energieübertragung bei FRET hängt vom Fluoreszenzspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum sowie der Quantenausbeute des Akzeptors ab. Eine starke Überlappung der Spektren führt zu einer maximalen Energieübertragung. In Abbildung 10a sind die Fluoreszenzspektren von einigen in dieser Arbeit eingesetzten Fluorophoren gezeigt. Die Fluorophore Oregon Green 488 (OG488) und Alexa Fluor 488 (AF488) sind jeweils über Thiole an das Protein kovalent gebunden. Wie zu erwarten, unterscheiden sich die Spektren der Donoren OG488 und AF488 nur kaum. Bei den Absorptionsspektren von ATTO 565 (AT565) und FEW 646 (FEW646) handelt es sich um tris-NTA-Fluorophore, die über den His-Tag an ifnar1-H10 gebunden sind. Mit Hilfe der Spektren wurden die Förster-Radien berechnet, welche in Abbildung 10b angegeben sind. Bei der Berechnung wurde eine Quantenausbeute von 50 % angenommen.

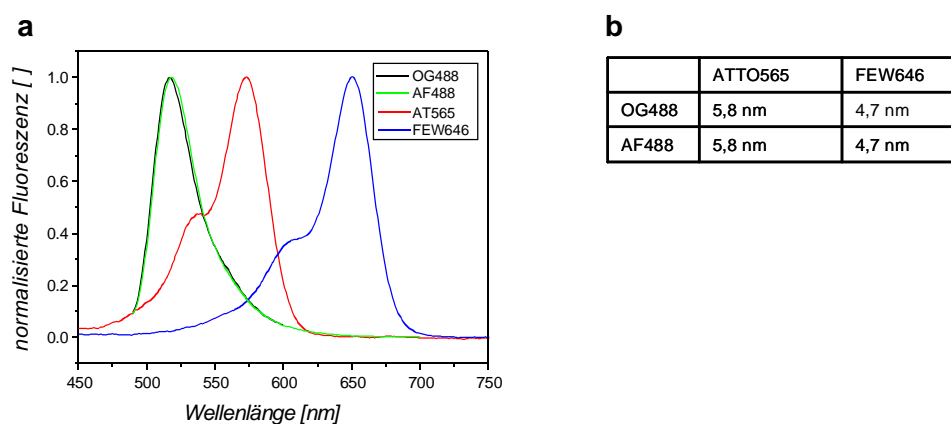


Abbildung 10: a: Absorptionsspektren von OG488 und AF488 markiertem ifnar1-H10 N23C im Vergleich zu den Absorptionsspektren von ^{AT565} tris-NTA und ^{FEW646} tris-NTA gebunden an unmarkierten ifnar1-H10. b: Berechnete Förster-Radien (bei 50 % Quantenausbeute).

Neben der oben beschriebenen Fluoreszenzlöschung durch FRET, wäre auch eine Fluoreszenzlöschung basierend auf Elektronen- und Energietransfer mit den chelatisierten paramagnetischen Übergangsmetallionen Ni²⁺ denkbar [105-110].

8.2 Expression in Insektenzellen

Nicht alle Proteine lassen sich rekombinant in *E. coli* exprimieren. Oft sind die Proteine unlöslich, aggregiert und nicht richtig gefaltet. Die eukaryontische Expression in Insektenzellen kann bei Problemen bei der Expression dieser Proteine erfolgreich sein, da vor allem die posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung und Acetylierung oder Sekretion ins Medium zu einer korrekten Faltung und Stabilität des Proteins führen können. Auch ist die Expression sehr großer Proteine in Insektenzellen oft erfolgreich. Es gibt verschiedene Methoden für die Expression in Insektenzellen. In dieser Arbeit basiert die Expression der Proteine auf der Integration der rekombinanten Gene durch homologe Rekombination in das Baculovirusgenom des *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-Virus (AcNPV). Baculoviren sind doppelsträngige DNA-Viren, welche in der Lage sind, verschiedene Insektenarten zu infizieren. Andere Invertebraten werden jedoch nicht infiziert. Durch Klonierung der rekombinanten Gene in einen Transfervektor, welcher die homologen Flanken für die Rekombination enthält, und die anschließende Co-Transfektion mit der AcNPV DNA kommt es zur Integration in das Virusgenom. Hierbei werden Gene, welche für den Virus in Zellkultur nicht essentiell sind, durch die rekombinanten Gene ersetzt. Nach Infektion mit dem AcNPV wird zugunsten der Expression der Virusgene die Expression der Wirtsgene abgeschaltet.

Für das in dieser Arbeit gewählte Expressionssystem (BaculoGold von BD Bioscience) sind eine Anzahl verschiedener Transfervektoren erhältlich, welche sich z.B. hinsichtlich ihrer Promotoreigenschaften (spät oder sehr spät transkribiert), Promotorenanzahl (für Co-Expressionen), Klonierungsmöglichkeiten, *Tags* oder auch Sekretionssequenzen zur Sezernierung des rekombinanten Proteins ins Medium unterscheiden. Die Expression der Ektodomänen von ifnar1 und ifnar2 in Sf9 Insektenzellen sollte mit Hilfe des Transfervektors pAcGP67-B erreicht werden, da dieser eine N-terminale Sekretionssequenz zur Sezernierung des rekombinanten Proteins in Medium enthält. Dies sollte die Bildung von Disulfidbrücken und Glykosylierung ermöglichen. Außerdem stellt die Expression ins Medium einen ersten Reinigungsschritt dar. Aufgrund des oxidativen Milieus, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht, ist es nötig die freien Cysteine, die zur Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe dienen sollen, vor der Kopplungsreaktion zu reduzieren. Vor der Zugabe des thiolreaktiven Maleinimid-Derivates erfolgte demnach eine Reduktion mittels des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) oder Tris[2-carboxyethyl] phosphin (TCEP).

Der Polyhedrin-Promoter ermöglicht die Expression großer Mengen an Protein in der sehr späten Phase des Replikationszyklus des AcNPV-Virus. Ifnar1-EC wurde bis auf das Konstrukt, welches die membranproximale Domäne (SD4) fehlt (ifnar1-H10- Δ SD4), mit einem C-terminalen Dekahistidin-*Tag* exprimiert. Ifnar1-H10- Δ SD4 enthielt einen N-terminalen His-*Tag*.

8.3 IFN α 2-HEQ

Mittels Alanin-Scanning wurde gezeigt, dass die drei konservierten Aminosäuren H57, E58 und Q61 einen wichtigen Anteil an der geringen Bindungsaffinität von IFN α 2 zu ifnar1 besitzen [65]. Durch Mutation dieser Reste in Alanine konnte die Bindungsaffinität im Vergleich zum IFN α 2 Wildtyp um das dreißigfache gesteigert werden, was zu einer höheren Stabilität des ternären Komplexes führte. [90]. Die bei IFN α 2-HEQ in Alanine mutierten Aminosäuren H57, E58 und Q61 sind räumlich benachbart und in der Nähe von Aminosäuren, welche an der Bindung von ifnar1-EC beteiligt sind (Abbildung 11). Die mutierten Reste liegen gegenüber der Bindungsstelle für ifnar2-EC. Ähnlich wie IFN β weist IFN α 2-HEQ eine höhere antiproliferative als antivirale Aktivität auf. In Zellkultur wurde gezeigt, dass durch Mutation der Reste die antiproliferative Aktivität erhöht wurde, jedoch die antivirale Aktivität mit einer Verdopplung der Wirkung kaum beeinflusst wurde [65]. Bedingt durch die geringe Affinität von Wildtyp IFN α 2 zu ifnar1-EC von $K_d = 5 \mu\text{M}$ wären zur Sättigung der Bindungsstellen an ifnar1-EC hohe Mengen an IFN α 2 nötig. Um eine homogene Komplexbildung zu erreichen, wurden in dieser Arbeit für die Bindungsstudien und für die Aufreinigung des ternären Komplexes IFN α 2-HEQ verwendet.

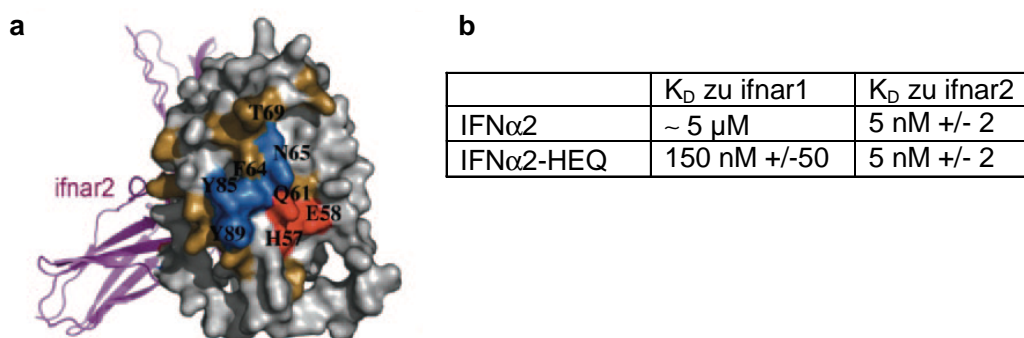


Abbildung 11: a: Bindungsstellen von IFN α 2-HEQ an ifnar1-EC. Es ist das Epitop für die Bindung von IFN α 2 an ifnar1-EC sowie die Anordnung von ifnar2-EC im Komplex dargestellt [84,90]. Die mutierten Reste H57, E58 und Q61 sind rot markiert; Reste, die nach Mutation in Alanine, die Bindung an ifnar1-EC reduzieren, sind blau und inerte Mutationen braun markiert (nach [65]). b: Vergleich der Affinitäten von IFN α 2 und IFN α 2-HEQ zu ifnar1- bzw. ifnar2-EC.

9. Charakterisierung von Protein-Interaktionen auf Oberflächen

Die Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen liefern wertvolle Informationen zur Aufklärung der Initiation von Signalwegen. Zur Charakterisierung der Interaktion von Typ I Interferonen mit den extrazellulären Domänen der Rezeptoruntereinheiten des Interferon Rezeptors wurde die Reflektrometrische Interferenz-Spektroskopie (RIfS) und Biacore-Messungen basierend auf Oberflächen Plasmonen Resonanz (SPR) gewählt. Beide Methoden bieten den Vorteil der markierungsfreien, massensensitiven Detektion von Protein-Protein-Interaktion auf Oberflächen in Echtzeit. Die Kombination von RIfS mit Totalinterner Reflexions Fluoreszenz Spektroskopie (TIRFS) bietet zusätzlich den Vorteil, die Fluoreszenz von markierten Proteinen an der Oberfläche sehr sensitiv zu detektieren und kann damit weitere detaillierte Informationen liefern.

9.1 Simultane RIfS- und TIRFS-Detektion

Die Methode RIfS basiert auf der Änderung der optischen Dichte aufgrund von Bindung an eine Glasoberfläche. Nur an die Oberfläche gebundene Moleküle werden detektiert (Abbildung 12a). Es wird entweder die Verschiebung des Interferenzmaximums oder die Änderung der Interferenz bei einer bestimmten Wellenlänge detektiert und in ein Massensignal konvertiert (Abbildung 12b). Das Signal ist proportional zur gebundenen Masse und kann damit auch zur Berechnung von Stöchiometrien verwendet werden [111]. Sowohl Proteinbindung (Abbildung 12c) als auch Lipidfusion wurden in dieser Arbeit detektiert.

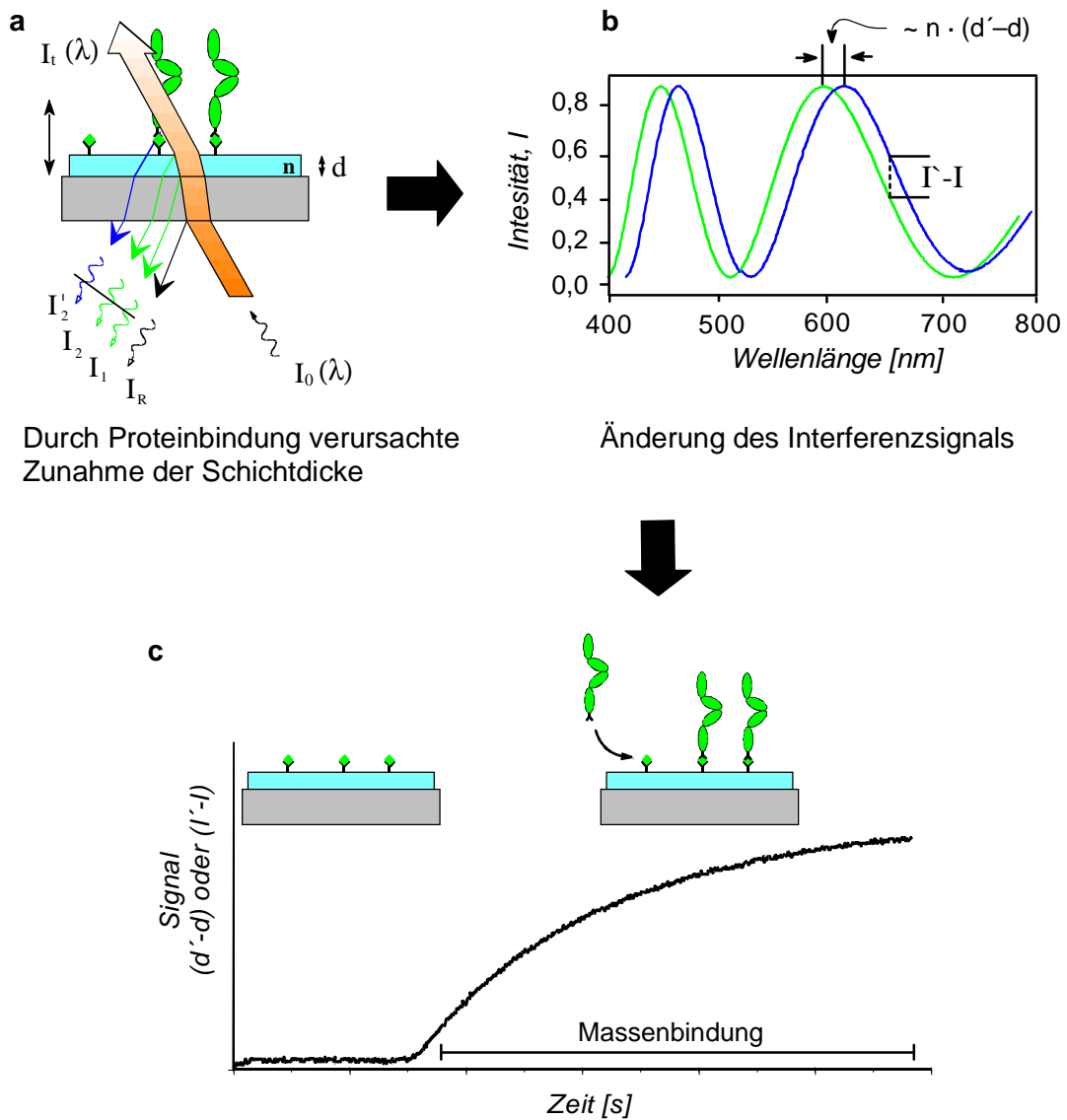


Abbildung 12: Prinzipien von RIFs und TIRFS. a-c: Die Proteinbindung ändert die optische Dichte und führt zu einer Veränderung des Interferenzspektrums.

Bei der Totalinternen Reflexions Fluoreszenz Spektroskopie werden nur an die Oberfläche gebundene fluoreszente Moleküle detektiert. Ein totalreflektierter Lichtstrahl generiert ein evaneszentes Feld, welches bedingt durch seine geringe Eindringtiefe nur Moleküle nahe der Oberfläche (70 - 200 nm) anregt. In Kombination mit RIFs liefert TIRFS detailliertere Informationen über Protein-Protein-Interaktionen. Auch geringe Oberflächenkonzentrationen können aufgrund der hohen Sensitivität von TIRFS detektiert werden.

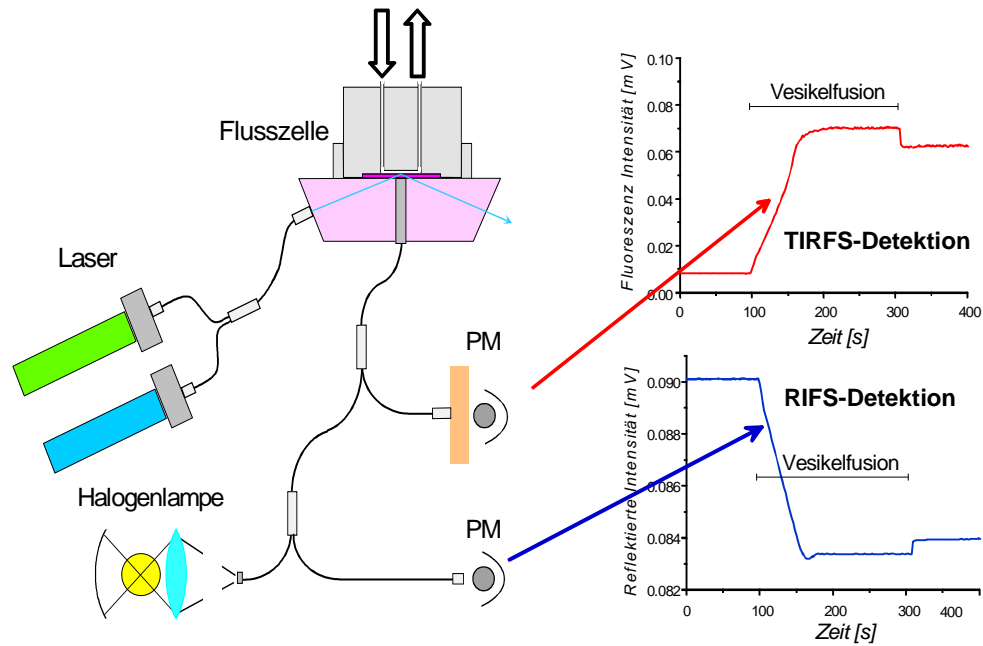


Abbildung 13: Schematische Darstellung der simultanen Detektion mittels RfS und TIRFS.

9.2 Oberflächen Plasmonen Resonanz (SPR)

An der Grenzfläche von zwei transparenten Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes (Glas und Wasser) wird Licht, welches aus dem Medium mit dem höheren Brechungsindex kommt, teilweise reflektiert und gebrochen. Über einen kritischen Einfallswinkel wird kein Licht gebrochen und Totalreflexion tritt auf (*total internal reflection*). Während das Licht komplett reflektiert wird, kommt es zu einem elektromagnetischen Feld, welches über eine kurze Distanz im Medium mit dem niedrigeren Brechungsindex eine exponentiell abfallende „evaneszente Welle“ hervorruft (Abbildung 14a).

Wenn zwischen den beiden Oberflächen eine dünne Metalloberfläche (z.B. Gold) eingeführt wird, wird die Intensität des Lichts bei einer bestimmten Kombination von Einstrahlwinkel und Energie (Wellenlänge) durch den Resonanzenergie transfer zwischen „evaneszierender Welle“ und Oberflächen Plasmonen gemindert. Hierbei interagiert ein Teil des eingestrahnten Lichts mit den delokalisierten Elektronen (Plasmonen) im Metallfilm. Dies ist sichtbar in einem Abfall der Intensität des reflektierten Lichts (Abbildung 14b). Die Resonanzbedingungen sind abhängig vom Brechungsindex im Bereich der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes. Bindung von Molekülen an die Oberfläche führen zu einer Änderung des Brechungsindex, was als Änderung des SPR-Winkels messbar ist. Für biochemisch relevante Moleküle wie Proteine, Zucker und DNA gibt es einen linearen Zusammenhang zwischen Resonanzwinkel und gebundener Masse. Das SPR-Signal, welches in *resonance units* (RU) angegeben wird, beschreibt demnach die Massenbindung an der Sensoroberfläche. Mittels SPR kann die Interaktion in Echtzeit massensensitiv verfolgt werden, ohne die Notwendigkeit des Markierens der Komponenten. Die Änderung des

Brechungsindex ist bei Protein-Protein-Interaktionen proportional zur Änderung der Masse der gebundenen Moleküle. Die Höhe der Änderung des SPR-Signals kann demnach auch für die Berechnung der Stöchiometrie von Interaktionen herangezogen werden. Die Analyse der Änderung des SPR-Signals dient zur Bestimmung der apparenten Raten für die Assoziation und Dissoziation. Der Quotient der apparenten Raten ergibt die apparente Gleichgewichtskonstante (Affinität).

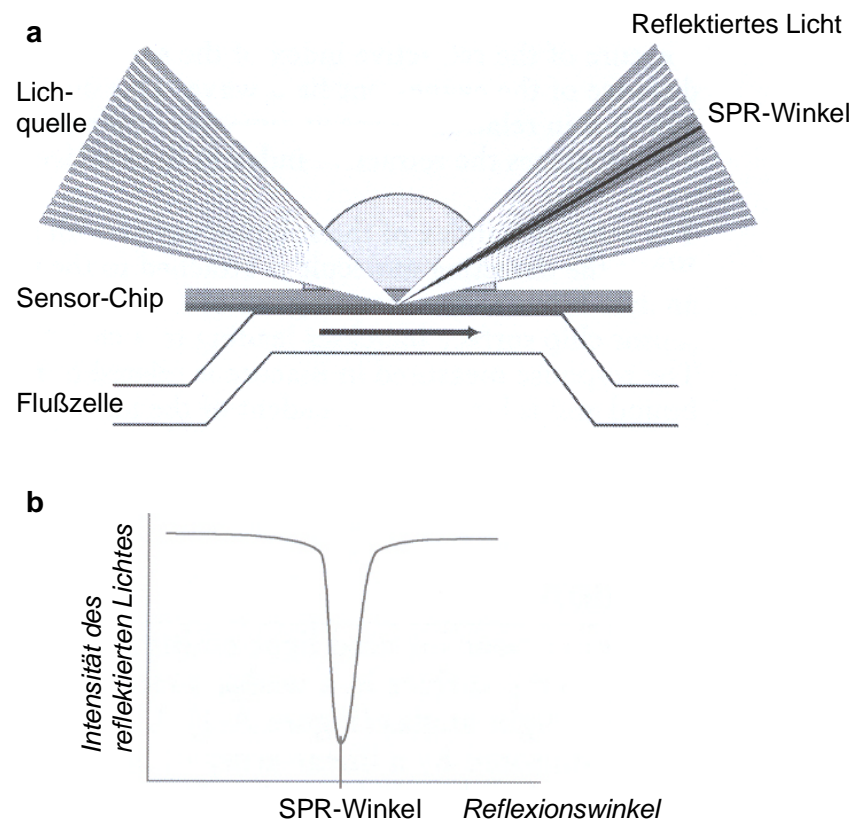


Abbildung 14: Prinzip von SPR. a: Schematische Darstellung der Detektion des SPR-Signals. b: Abhängigkeit der Resonanzbedingung vom Reflexionswinkel (nach dem Handbuch von Biacore).

9.3 Immobilisierung der Rezeptoruntereinheiten

Die Rezeptoruntereinheiten wurden mittels des Histidin-Tag orientiert auf NTA-Oberflächen immobilisiert. Für die Analyse der Interaktion mit Typ I Interferonen mittels RIFS/TIRFS wurden die fluoreszenzmarkierten Rezeptoruntereinheiten mit Hilfe von Chelatorlipiden über den His-Tag auf der Oberfläche einer Lipidmembran immobilisiert. Die Struktur dieser modifizierten Lipide ist in Abbildung 15a dargestellt. Mizellen aus einer Mischung aus Lipiden und Chelatorlipiden fusionieren nach Injektion an der Glasoberfläche des Chips und bilden fluide Lipid-Doppelschichten aus, welche nach Beladung mit Ni^{2+} -Ionen zur Immobilisierung der Rezeptoruntereinheiten dienen. Die Rezeptoruntereinheiten binden stabil an die Oberfläche und die Interaktion mit IFN kann nach Injektion analysiert werden (Abbildung 15b).

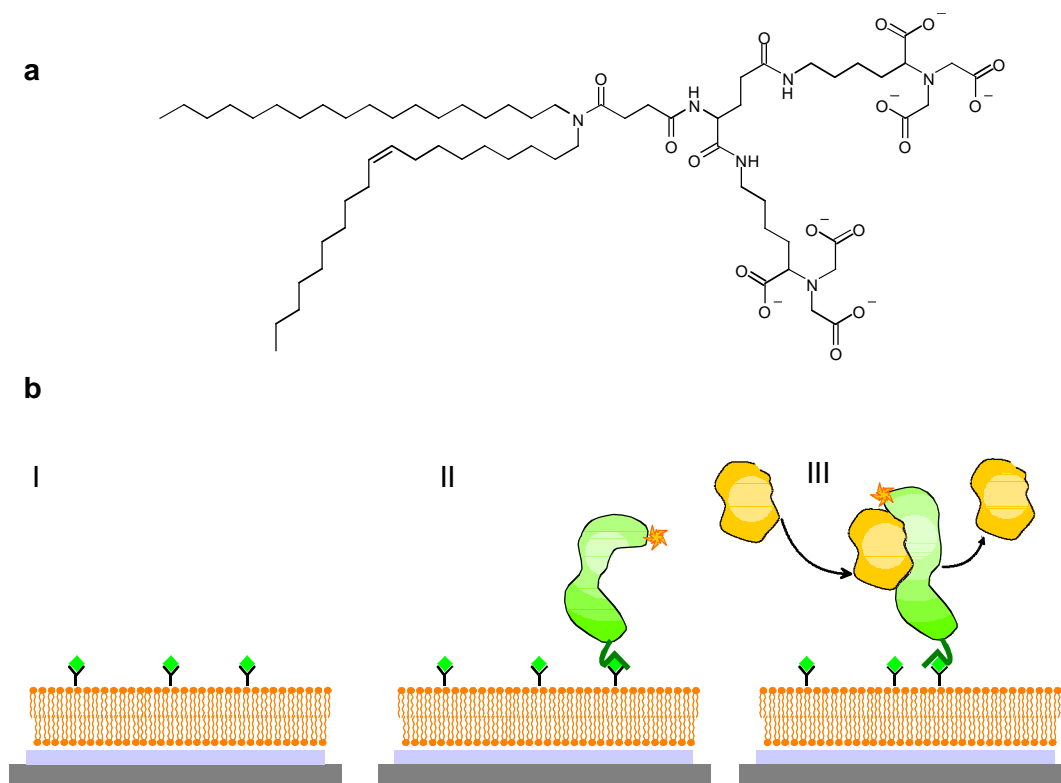


Abbildung 15: Immobilisierung auf Chelator-Lipid-Oberflächen. a: Struktur des bis-NTA Chelator Lipids. b: Schematische Darstellung der Interaktion von fluoreszenzmarkiertem ifnar1-H10 mit IFN α 2. Beladung der Oberfläche mit Ni $^{2+}$ -Ionen (I), Immobilisierung der Rezeptoruntereinheit (II) und anschließende Injektion von IFN α 2 (III).

Für die Analyse von Interaktionen mittels SPR sind verschiedene Sensoroberflächen von Biacore käuflich erhältlich. Generell bestehen sie aus einer Glasoberfläche, welche mit einer 50 nm dicken Goldschicht beschichtet ist. Die Goldoberflächen können mittels SAM (*self-assembling monolayer*) funktionalisiert werden. Die Oberfläche besteht oft aus carboxymethyliertem Dextran, welches eine hydrophile Fläche bildet. Dextran besteht aus einer linearen Kette von Glucoseeinheiten, welches zu einer niedrigen nicht-spezifischen Adsorption von Biomolekülen und einer relativen Flexibilität der gebundenen Moleküle führt.

Die Moleküle können entweder kovalent, nicht-kovalent oder durch Adsorption über hydrophobe Wechselwirkung auf der Oberfläche gebunden werden. Verschiedene funktionalisierte Oberflächen sind bisher erhältlich. Unmodifizierte Goldoberflächen dienen zur Präparation von eigenen Oberflächen.

In dieser Arbeit wurden sowohl NTA Sensor Chips von Biacore als auch in unserer Gruppe hergestellte multivalente tris-NTA Chips verwendet. Der NTA Sensor Chip von Biacore besteht aus einer Dextran-Oberfläche mit NTA-Gruppen. NTA chelatisiert Ni $^{2+}$ -Ionen. Proteine mit Polyhistidin-Tags binden über ihren Tag an die freien Koordinationsstellen des Ni $^{2+}$ -Ions und werden so auf der Oberfläche immobilisiert. Bei multivalenten

NTA-Oberflächen binden mehrere Ni^{2+} -Ionen an den Tag, was zur einer erhöhten Stabilität der Bindung an die Oberfläche führt [112].

10. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)

Proteine weisen oft unterschiedliche Zustände (Konformationen) auf. Verschiedene Zustände können demnach nur durch Synchronisation dieser Zustände aufgelöst werden. Untersuchungen auf Einzelmolekülebene dagegen liefern auch Informationen über einzelne Zustände.

FCS liefert nicht nur Informationen über das Diffusionsverhalten von Molekülen, die Konzentration, sondern auch über strukturelle Änderungen durch Analyse der photophysikalischen Prozesse. Essentiell für Einzelmolekülstudien ist der Einsatz von photostabilen Fluoreszenzfarbstoffen mit hoher Quantenausbeute. Das Detektionsvolumen wird durch die fokussierte Anregung durch einen Laser bestimmt (Abbildung 16a). Diffusion eines fluoreszenzmarkierten Moleküls durch das konfokale Volumen führt zu einer Fluktuationen des Signals (Abbildung 16b). Die Autokorrelationskurve (Abbildung 16d) beschreibt die Ähnlichkeit des Signals nach einer *lag* Zeit τ . Eine langsame Diffusion führt zu einer Verbreiterung des Signals und resultiert in einer Verschiebung der Autokorrelationskurve zu größeren τ . Eine Vergrößerung des Diffusionskoeffizienten ist oft ein Hinweis auf eine Vergrößerung der Masse und somit auf eine Komplexbildung.

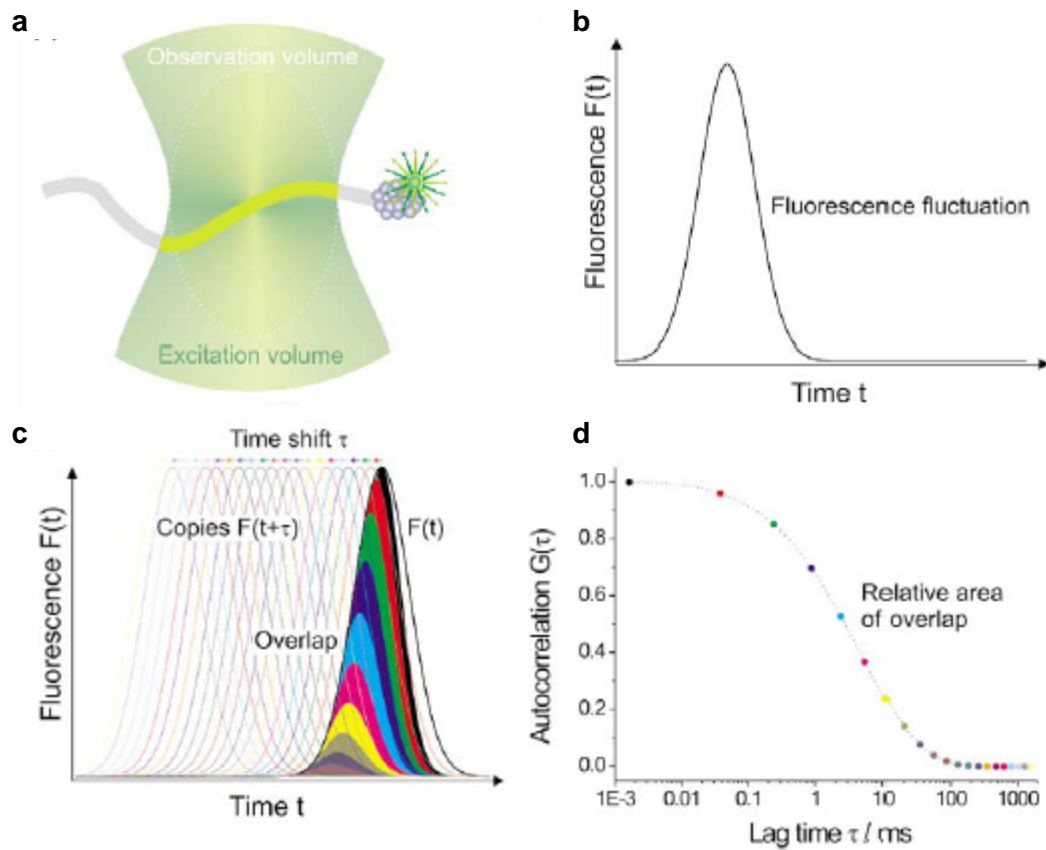


Abbildung 16: Prinzipien der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie. Ein fluoreszenzmarkiertes Molekül diffundiert durch das konfokale Volumen (a), was zur Detektion eines Signals $F(t)$ führt (b). c: Das Signal wurde um die lag Zeit τ relativ zum Originalsignal verschoben. d: Darstellung der Autokorrelationskurve. Die Überlappung nimmt mit steigender lag Zeit τ ab (Abbildungen aus [113]).

C. Material und Methoden

1. Chemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid 30 % (w/v)	Carl Roth GmbH
Agar	GibcoBRL
Agarose	Sigma Chemical CO.
APS	Sigma Chemical CO.
ATP	Sigma Chemicals CO.
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Chemical CO.
Bromphenolblau	Merck KGaA
BSA	Sigma Chemical CO.
Calciumchlorid	Sigma Chemical CO.
Coomassie Brilliant Blau	Sigma Chemical CO.
Cumarin	Sigma Chemical CO.
D-(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie GmbH
Dithiotreitol (DTT)	MBI Fermentas
EDTA, Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH
Essigsäure 99%	Riedel de Haen GmbH
Ethanol, abs.	Riedel de Haen GmbH
Ethidiumbromid	Merck KGaA
Glycerin	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
Harnstoff	MP Biomedicals
HCl, 37 %	Merck KGaA
HEPES	Sigma Chemical CO.
Imidazol	Merck KGaA
Luminol	Carl Roth GmbH
Magnesiumchlorid	Riedel de Haen GmbH
Methanol	Riedel de Haen GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Fluka Chemie GmbH
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid	Riedel de Haen GmbH
Nickelsulfat	Sigma Chemical CO.
Polyethylenglycol	Sigma Chemical CO.
Surfactant P20 10% (v/v)	GE Healthcare
TCEP	Sigma Chemicals CO.
TEMED	Carl Roth GmbH
Tris	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Carl Roth GmbH
Tween 20	Sigma Chemical CO.
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA
Zinkchlorid	Sigma Chemical CO.

2. Zellkultur und Mikrobiologie

Reagenzien	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth GmbH
BaculoGold linearized Baculovirus DNA	BD Bioscience Pharmingen
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
Penicillin/Streptomycin, 100x	PAA laboratories GmbH
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH
Pluronic F68, 10 %	Invitrogen
SF900-II Insektenzellmedium	Invitrogen
Transfektionspuffer A + B	BD Bioscience Pharmingen
IPTG	MBI Fermentas

3. Vektoren, Viren, Proteine, Enzyme und Reagenzien

Vektoren	Hersteller / Bezugsquelle
pAcGP67-B	BD Bioscience Pharmingen
pBluescript II SK(+)-ifnar1-H10	Dr. Peter Lamken
pT7-ifnar2-H10	Prof. Dr. Jacob Piehler
pT7-ifnar2-tagless	Prof. Dr. Jacob Piehler
pT7-IFN α 2 E58A	Prof. Dr. Gideon Schreiber
pT7-IFN α 2-HEQ	Prof. Dr. Gideon Schreiber
pAcGP67-B-ifnar1-EC	Dr. Peter Lamken
pAcGP67-B-ifnar1-H10 N23C	Dr. Peter Lamken
pAcGP67-B-ifnar1-H10 N349C	Dr. Peter Lamken
pAcGP67-B-H10-ifnar1-H10- Δ SD4	Dr. Peter Lamken
pAcGP67-B-ifnar2-H10 S35C	Dr. Peter Lamken

Proteine	Bezugsquelle
^{OG488} ifnar1-H10 S147C	Yvonne Becker
^{OG488} ifnar1-H10 N286C	Yvonne Becker
ifnar1-tl	Dr. Peter Lamken
IFN β	Prof. Dr. Gideon Schreiber

Enzyme	Hersteller
Ampligase	Epicentre Biotechnologies
<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas
<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> (CIAP)	MBI Fermentas
<i>Dpn</i> I	MBI Fermentas
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	MBI Fermentas
<i>Pst</i> I	MBI Fermentas
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PeqLab
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	PeqLab

Reagenzien / DNA-Leitern	Hersteller
1 kb DNA-Leiter	New England BioLabs
100 bp DNA-Leiter	New England BioLabs
<i>Bam</i> HI-Puffer	MBI Fermentas
dNTP-Mix (2 mM)	MBI Fermentas
HPLC-H ₂ O	Merck KGaA
Magnesiumsulfatlösung für PCR	PeqLab
NAD ⁺	Sigma Chemical CO.
Nucleo Spin® Plasmid-Kit (Mini)	Macherey-Nagel
NucleoBond Midi Kit	Macherey-Nagel
PNK Puffer A	MBI Fermentas
Puffer für CIAP	MBI Fermentas
<i>Pwo</i> -Puffer <i>incomplete</i>	PeqLab
QIAEX II Gel-Extraction-Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
T4-Ligase-Puffer	MBI Fermentas
Tango-Puffer	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -Puffer complete für hohe Erträge	PeqLab

4. Oligonucleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
ifnar1 N23C	T ATC CTG AGG TGG TGT AGG AGC GAT GAG TC
ifnar1 N349C	ATT ATT TTT TGG GAA TGT ACT TCA AAT GCT GA
ifnar1 W347F, N349C	CTG ATT TAT GAA ATT ATT TTT TTC GAA TGT ACT TCA AAT GC
ifnar1 N200C	G ACC ACA GTT GAA TGT GAA CTA CCT CCA CC
ifnar1 N200C, L202W	TA AAG ACC ACA GTT GAA TGT GAA TGG CCT CCA CCA GAA AAT ATA G
ifnar1 R279A	GGA ATT TAC CTT CTC GCC GTA CAA GCA TCT G
ifnar1-278LRV-AAA	C CAA AAA GGA ATT TAC CTT GCC GCC GCA CAA GCA TCT GAT GG
pAcGP67B-fw	GCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGG
pAcGP67B-bw	CATTACGGATTTCCCTTGAAGAGAGTGAGTT
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC
Sowie diverse interne Sequenzierprimer für ifnar1-EC	

Fett unterlegt: mutiertes Codon

5. Chromatographiezubehör

Name	Hersteller
HiTrap Chelating HP (1 und 5 ml)	Amersham Biosciences
HiTrap Q HP (1 ml)	Amersham Biosciences
Q Sepharose Fast Flow (batch)	Amersham Biosciences
NTA Agarose, Superflow	QIAGEN
Superdex 200 HiLoad 26/60	Amersham Biosciences
Superdex 75 HiLoad 26/60	Amersham Biosciences
Superdex 200 HiLoad 16/60	Amersham Biosciences
Superdex 200 HR 10/30	Amersham Biosciences
Superdex 200 PC 3.2/30	Amersham Biosciences
Aekta Explorer	Amersham Biosciences
Aekta Prime	Amersham Biosciences
SMART	Amersham Biosciences
Amicon Ultra 0,5, 4 und 15 ml (5 /10 kDa cut off)	Millipore

6. Sonstige Geräte

Name	Typ / Hersteller
UV/Vis-Spektrophotometer	Cary 50 Bio / Varian
UV/Vis-Spektrophotometer	ND-1000 / NanoDrop
Fluoreszenzspektrometer	Cary Eclipse / Varian
<i>Stopped-Flow</i> System	SF-61, DX2 Double Mixing <i>Stopped-Flow</i> System / Hi Tech Scientific
Lumi Imager	Lumi Imager F1 / Roche
Biacore T100	GE Healthcare

7. Medien

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 L mit Aqua bidest, pH 7 optional Zugabe des Antibiotikums Ampicillin (100 µg ml ⁻¹)
Agarplatten	15 g Agar in 1L LB-Medium optional Zugabe des Antibiotikums Ampicillin (100 µg ml ⁻¹)
Medium für Sf9-Zellen	1 L SF900-II Insektenzellmedium 50 ml FCS 10 ml Pluronic F68 5 ml Penicillin/Streptomycin

8. Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Dialysepuffer	20 mM Tris pH 8 200 mM NaCl
IMAC Puffer A	50 mM Tris pH 8 500 mM NaCl
IMAC Puffer B	50 mM Tris pH 8 500 mM NaCl 500 mM Imidazol
Strippingpuffer IMAC	50 mM EDTA 1 M NaCl
HBS	20 mM HEPES pH 7,5 150 mM NaCl
HBS + BSA	20 mM HEPES pH 7,5 150 mM NaCl 1 mg ml ⁻¹ BSA
Gelfiltrationspuffer	20 mM Tris pH 7,5 50 mM NaCl
Ionentauscherpuffer A für ifnar1 (für ^{AT655} ifnar1-H10 pH 9)	5 mM Tris pH 8,5 / 9
Ionentauscherpuffer B für ifnar1 (für ^{AT655} ifnar1-H10 pH 9)	5 mM Tris pH 8,5 / 9 1 M NaCl
Ionentauschpuffer A für IFN α 2 / ifnar2	5 / 20 mM Tris pH 8
Ionentauschpuffer B für IFN α 2 / ifnar2	5 / 20 mM Tris pH 8 1 M NaCl
Gelfiltrationspuffer für IFN α 2	20 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl
Gelfiltrationspuffer für ifnar2	20 mM Tris pH 8 150 mM NaCl
RIfS Laufpuffer	HBS optional 0,1 % Triton X-100
RIfS Regenerationspuffer 1	HBS 200 - 500 mM Imidazol
RIfS Regenerationspuffer 2	HBS 200 mM EDTA
RIfS Metallbindungspuffer	HBS 10 mM NiSO ₄
Biacore Laufpuffer	HBS 0,05 % Surfactant P20
Biacore Regenerationspuffer 1	HBS 500 mM Imidazol
Biacore Regenerationspuffer 2	HBS 200 mM EDTA
Biacore Metallbindungspuffer	HBS 20 mM NiSO ₄
TAE-Puffer	20 mM Tris / Acetat pH 8 1 mM EDTA
Auftragspuffer für Agarosegele (10x)	25 mg Bromphenolblau 5 ml 85 % (v/v) Glycerin 2 ml 50x TAE-Puffer 3 ml Aqua bidest
Sammelgelpuffer für SDS-PAGE	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer für SDS-PAGE	1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS

Auftragspuffer für SDS-PAGE (5x)	2,5 ml 1M Tris pH 8 2,5 ml 85 % (v/v) Glycerin 0,75 g SDS 0,25 ml 10 mg/ml Bromphenolblau ad 10 ml mit Aqua bidest
Laufpuffer (10x) für SDS-PAGE	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS pH ~ 8,3
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie R Brilliant Blau in Coomassie-Entfärbelösung
Coomassie-Entfärbelösung	400 ml Methanol 100 ml Eisessig ad 1 l mit Aqua bidest _e
ECL-Lösung 1	500 µl 1 M Tris pH 8,5 50 µl 250 mM Luminollösung 22 µl 90 mM Cumarinlösung ad 5 ml mit MilliQ-Wasser
ECL-Lösung 2	500 µl 1M Tris, pH 8,5 3,2 µl H ₂ O ₂ ad 5 ml mit MilliQ-Wasser
Transferpuffer (10x)	0,25 M Tris pH 7,5-8,8 1,9 M Glycin
Transferpuffer (1x)	100 ml 10x-Transferpuffer 200 ml Methanol ad 1 l mit Aqua bidest
TBS (10x)	200 mM Tris pH 8 1,5 M NaCl
TBS/T	TBS-Puffer pH 8 0,1 % (v/v) Tween 20
Lysepuffer für <i>E. coli</i>	20 mM Tris pH 7,5 5 mM EDTA

D. Methoden

1. Molekularbiologische Methoden

Die Mutanten der Ektodomäne von *ifnar1* wurden im pBS-Vektor generiert und anschließend die Gene nach Restriktion mit *Bam*HI und *Pst*I Schnittstellen inklusive des C-terminalen Dekahistidin-Tags in den Transfervektor pAcGP67-B transferiert.

1.1 Plasmid-Präparation

Die Plasmide wurden wahlweise mit dem NucleoSpin Mini Kit oder dem NucleoBond Midi Kit von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Für präparative Restriktionen und Co-Transfektionen in Sf9-Zellen wurde aufgrund der größeren Ausbeute und höherer DNA-Reinheit ausschließlich das Midi Kit verwendet.

1.2 Ortsspezifische Mutagenese

Für die gerichtete Mutagenese wurde die LCR (*ligase chain reaction*) gewählt. Hierzu wird im Gegensatz zur Polymerasekettenreaction (PCR) nur ein Primer benötigt, der die gewünschte Mutation mittig trägt.

Die Anzahl der flankierenden Basen hängt vom GC-Gehalt der Matrize ab, üblich sind jedoch ca. 12 Bp auf jeder Seite. Mittels der Pwo-Polymerase, welche eine 5'-3'-Korrekturlesefunktion besitzt, wird der komplementäre Strang synthetisiert und durch die thermostabile Amp-Ligase ligiert.

Zunächst wurden die Primer phosphoryliert. Der Phosphorylierungsansatz ist in Tabelle 1 dargestellt.

Primer (100 µM)	1 µl
PNK-Puffer A (10x)	1 µl
ATP (50 mM)	4 µl
T4-PNK (10 u µl ⁻¹)	0,5 µl
HPLC-H ₂ O	ad 10 µl

Tabelle 1: Pipettierschema zur Phosphorylierung von Primern.

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C und anschließend 20 min bei 75 °C inkubiert. Die Inkubation bei 75 °C diente zur Inaktivierung der Polynukleotidkinase.

Der Primer wurde direkt für die anschließende LCR nach Protokoll in Tabelle 2 eingesetzt. Als Matrizen-DNA diente der Vektor pBS-ifnar1-H10 (~ 4,7 kBp), da sich eine direkte Mutagenese in dem 11kBp großen Transfervektor pAcGP67-B-ifnar1-H10 als kritisch herausstellte. Diese Vorgehensweise machte es erforderlich, dass nach erfolgreicher Mutagenese im pBS-Vektor das Insert in den Vektor pAcGP67-B transferiert werden musste.

Matrizen-DNA (150-200 ng)	1 µl
Primer aus Phosphorylierungsansatz (10 µM)	2 µl
Pwo-Puffer <i>incomplete</i> (10x)	2,5 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl
NAD ⁺ (5 mM)	1,25 µl
MgSO ₄ (25 mM)	4 µl
Pwo-Polymerase (1 u µl ⁻¹)	1 µl
Amp-Ligase (5 u µl ⁻¹)	1 µl
HPLC-H ₂ O	Ad 25 µl

Tabelle 2: Pipettierschema für eine LCR. Zuerst wurde der Ansatz 3 min bei 95 °C inkubiert, dann folgten 30 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 1 min, einer Anlagerung bei 55 °C für 1 min und einer Elongation und Ligation bei 65 °C für 9 min. Es schloss sich ein finaler Elongationsschritt für 20 min bei 65 °C an.

Nach der LCR wurde der Ansatz über ein PCR-Purification-Kit von QIAGEN aufgereinigt und ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* angeschlossen (Tabelle 3).

Aufgereinigter LCR-Ansatz	15 µl
Tango-Puffer (10x)	2,5 µl
<i>DpnI</i> (10 u µl ⁻¹)	1 µl
HPLC-H ₂ O	Ad 25 µl

Tabelle 3: Pipettierschema für die Restriktion methylierter DNA mittels *DpnI*.

DpnI spaltet nur methylierte DNA. Ein Restriktionsverdau mit *DpnI* führt daher zum selektiven Abbau der Matrizen-DNA nach einer PCR, während hingegen die *in vitro* synthetisierte DNA erhalten bleibt. Der Verdau erfolgte für 3 h bei 37 °C. Die DNA nach *DpnI*-Verdau wurde direkt für die Transformation eingesetzt. Als Kontrolle diente die entsprechende unverdaute

DNA-Menge nach LCR. Ausgewählte Kolonien wurden nach DNA-Präparation mittels Sequenzierung überprüft.

1.3 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Für die Co-Transfektion in Insektenzellen war es erforderlich, dass die im pBS-Vektor generierten Mutanten von *ifnar1* in den Vektor pAcGP67-B transferiert wurden. Da die *ifnar1*-Konstrukte im pBS-Vektor bereits die für eine Insertion in den pAc-Vektor geeigneten Restriktionsschnittstellen in den Flanken besaßen, konnte durch Restriktion mit *Bam*HI und *Pst*I das Insert *ifnar1*-EC direkt in den pAcGP67B-Vektor eingesetzt werden. *ifnar1*-EC wurde mitsamt des C-terminalen Dekahistidin-*Tags* aus dem pBS-Vektor geschnitten und mittels Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion isoliert. Mit dem Vektor pAcGP67-B wurde analog verfahren. Hier schloss sich jedoch nach der Restriktion mit *Bam*HI und *Pst*I für 3 h bei 37 °C eine Aufreinigung mittels PCR-Purification Kit und eine Dephosphorylierung mittels der *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) für 3 h bei 37 °C an, welche eine Rezirkularisierung von unvollständig geschnittenen Plasmiden verhindert. Zur Entfernung der CIAP wurde der Ansatz erneut mittels PCR-Purification Kit aufgereinigt. Die Enzyme wurden in den empfohlenen Puffern nach Herstellerangaben verwendet. Für die Doppel-Restriktion mit *Bam*HI und *Pst*I wurde der Puffer für *Bam*HI verwendet.

1.4 Ligation

Für die Ligation wurden Insert und Vektor im molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Je nach verfügbarer Menge betragen die DNA Konzentrationen in den Ligationsansätzen insgesamt ca. 300 ng (Tabelle 4). Die Ligation erfolgte üN bei 16 °C. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert verwendet. Die Ligationsansätze wurden direkt für die Transformation in *E. coli* verwendet.

pAcGP67B, geschnitten, dephosphoryliert	Molares Verhältnis zum Insert 1:3
<i>ifnar1</i> -H10-Mutante, geschnitten	Molares Verhältnis zum Vektor 3:1
T4-Ligase-Puffer (10x)	2 µl
T4-Ligase (5 u µl-1)	1 µl
HPLC-H ₂ O	Ad 20 µl

Tabelle 4: Pipettierschema für Ligationsansätze.

1.5 PCR mit lysierten *E. coli* (Colony PCR)

Die Insertion der ifnar1-H10-Mutanten in pAcGP67-B wurde mittels PCR mit lysierten *E. coli* überprüft. Dies stellte eine kostengünstige und zeitsparende Alternative zur konventionellen Präparation der Plasmid DNA und anschließender Analyse dar. Hierzu wurden auf LB_{amp}-Platten ausgestrichene *E. coli* Klone nach Transformation verwendet. Durch den Hitzeschritt bei 95 °C wurden die Zellen lysiert und die Plasmide freigesetzt. Diese dienten dann bei der anschließenden PCR der Polymerase als Matrize. Die Proben wurden zuletzt mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Hierzu wurde jeweils der komplette Ansatz eingesetzt.

<i>E. coli</i> von Platte	
Primer fw (100 µM)	0,3 µl
Primer bw (100 µM)	0,3 µl
Taq-Polymerase (5 u µl ⁻¹)	0,25 µl
Taq-Puffer complete for hohe Erträge (10x)	1,5 µl
dNTPs (2 mM)	1,5 µl
HPLC-H ₂ O	Ad 15 µl

Tabelle 5: Pipettierschema für die PCR mit *E. coli* Kulturen (Colony PCR). Zuerst wurde der Ansatz 3 min bei 95 °C inkubiert, es folgten 40 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 1 min, einer Anlagerung bei 55 °C für 1 min und einer Elongation bei 72 °C für 1 min. Es schloss sich ein finaler Elongationsschritt für 5 min bei 72 °C an.

1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Aber auch die Form der DNA (z.B. doppelhelikal offen, doppelsträngig linear oder einzelsträngig) beeinflusst die elektrophoretische Mobilität der DNA. Die nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mittels des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Durchführung:

Eine geeignete Menge an Agarose (0,7-1 % (w/v) Agarose) wurde eingewogen und in einem definierten Volumen TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C konnte die Lösung in die Gelkammer mit Kamm für die Probenaschen gegossen werden. Nach Erstarren des Agarosegels wurde die Gelkammer in die Laufkammer eingesetzt. Die Laufkammer wurde mit TAE-Puffer gefüllt und der Kamm entfernt. Die Taschen wurden mit den mit Auftragspuffer versetzten DNA-Lösungen beladen. Außerdem diente ein DNA-Marker als Längenstandard. Es wurde eine geeignete Spannung (bei Gellaufkammern mit 13 Probenaschen 60 V) angelegt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in Richtung der Anode. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das

Agarosegel von der Laufkammer in eine Ethidiumbromid-Färbelösung (1 µg/ml) transferiert und dort ca. 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde das Agarosegel auf einen UV-Tisch überführt und die DNA-Moleküle durch Bestrahlen mit UV-Licht sichtbar gemacht.

1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen nach Enzymreaktionen diente zur Entfernung von Kontaminationen wie z.B. Proteinen oder unerwünschten DNA- oder RNA-Fragmenten. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick® Gel-Extraction-Kits aus den Agarosegelen extrahiert. Hierzu wurden die gewählten Fragmente unter niedriger UV-Bestrahlung mit einem Skalpell sauber aus dem Gel ausgeschnitten. Um Schäden der DNA zu vermeiden, war darauf zu achten, dass die UV-Bestrahlung möglichst gering gehalten wurde. Das Gelstück wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion aus dem Gel erfolgte nach dem Protokoll von QIAGEN. Die DNA wurde mit 30-50 µl HPLC-H₂O eluiert und die Lösung bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

1.8 Herstellung kompetenter *E. coli*

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen, und alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt.

1.8.1 Calciumchloridmethode für *E. coli* DH5α

Eine 5 ml Übernachtskultur wurde in LB-Medium angesetzt. Hierzu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze unter sterilen Bedingungen Bakterien aus der Dauerkultur in das Medium überführt. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit der üN-Kultur 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden in sterilen 50 ml Greiner-Röhrchen bei 4330 g, 5 min geerntet. Pro Pellet wurde 10 ml kaltes steriles 0,1 M Calciumchlorid zugegeben und die Zellen vorsichtig mit der Pipette resuspendiert. Der Ansatz wurde 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 4330 g, 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in je 2 ml kalter 0,1 M Calciumchloridlösung resuspendiert. Es wurde jeweils 400 µl steriles 87 % Glycerin hinzugegeben und der Ansatz gemischt. 100- bzw. 200-µl-Aliquots wurden in gekühlte 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

1.8.2 Magnesiumchloridmethode für *E. coli* TG1

200 ml LB-Medium wurde mit 500 µl kompetenten *E. coli* Zellen angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C angezogen. Die Zellen wurden bei 1000 g für 10 min geerntet und die Bakterienpellets in insgesamt 20 ml LB-Medium mit 10 % (w/v) PEG 6000/ 5 % (v/v) DMSO/ 100 mM Magnesiumchlorid resuspendiert. Die Zellen wurden in gekühlten 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen à 100 oder 200 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung wurden die Bakterien bei –80 °C gelagert.

1.9 Transformationsmethoden

Je nach Bakterienstamm wurden verschiedene Transformationsmethoden verwendet. Als Negativkontrolle dienen kompetente Zellen ohne Zugabe von DNA.

1.9.1 Transformation in *E. coli* DH5α

100 µl nach der Calciumchloridmethode kompetent gemachte Zellen wurden auf Eis aufgetaut und die DNA-Lösung hinzugegeben. Folgende DNA-Mengen wurden im Allgemeinen für die Transformation verwendet: 20 µl beim Ligationsansatz bzw. 10-50 ng nach Plasmid-Präparation. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Hitzeschock von 90 s bei 42 °C an. Es wurde 1 ml LB-Medium unverzüglich hinzugegeben, um die Zellen bei 37 °C für 1 h im Thermoschüttler anwachsen zu lassen. Die Zellen wurden bei 2655 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Das Bakterienpellet wurde vorsichtig resuspendiert und der ganze Ansatz auf einer bei 37 °C vorgewärmten LB_{amp}-Platte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

1.9.2 Transformation in *E. coli* TG1

Die nach der Magnesiumchloridmethode kompetent gemachten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und es wurden jeweils 0,5-1 µg DNA nach Plasmid-Präparation hinzugegeben. Danach wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Der ganze Ansatz wurde auf bei 37 °C vorgewärmten LB_{amp}-Platten ausplattiert und die Platten bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

1.10 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden bei AGOWA Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH durchgeführt. Es wurden die Sequenzierprimer pAcGP67B-fw, pAcGP67B-bw, T7-Promotor und M13-rev, sowie interne ifnar1-EC-Primer, verwendet. Mit

Hilfe des Programms „BioEdit Sequence Alignment software“ wurden die Sequenzen überprüft.

2. Zellkultur

2.1 Cotransfektion mit linearisierter BaculoGold DNA

$0,5 \cdot 10^6$ *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Insektenzellen wurden in 2 Lochungen einer 12-Well-Kulturschale ausgesät und zur Anheftung der Zellen für 10 min bei 27 °C inkubiert. Die Transfervektor-DNA wurde für 15 min bei 60 °C inkubiert, um eventuell vorhandene Proteine zu denaturieren und anschließend bei 15000 g für 3 min zentrifugiert. 1,25 µl linearisierte BaculoGold DNA wurde mit 1 µg Transfervektor-DNA vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 500 µl Puffer A ersetzt. Nach der Inkubation wurde 500 µl Puffer B zum DNA-Ansatz gegeben und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die zweite Lochung mit Zellen wurde mit 1 ml frischem Medium überschichtet und diente zur Kontrolle der Transfektion. Die Kulturschale wurde mit Parafilm abgedichtet und für 4-5 h bei 27 °C inkubiert. Danach wurde der Transfektionspuffer entfernt und mit 1 ml Medium gewaschen. Zuletzt wurde 1 ml Medium zugegeben und die Kulturschale erneut mit Parafilm luftdicht verschlossen und zusammen mit einem feuchten Papiertuch in einem verschlossenen Plastikgefäß 5-7 Tage bei 27 °C inkubiert.

2.2 Amplifikation der rekombinanten Viren

Die Amplifikation der rekombinanten Viren erfolgte bei 27 °C. $0,4 \cdot 10^7$ Sf9 Zellen wurden in eine T25-Flasche eingesät und zur Anheftung 10 min inkubiert. Das Medium wurde durch 5 ml frisches Medium ersetzt und anschließend der Überstand nach der Transfektion tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 7 Tagen Inkubation wurde der Überstand abgenommen und durch Zentrifugation bei 1000 g für 10 min von den Zellen getrennt. Das Medium enthielt die rekombinanten Viren. Durch anschließende Infektion von frisch ausgesäten Zellen in sukzessiv ansteigenden Kulturvolmina wurden die Virenmenge und der Virentiter schrittweise erhöht. Generell wurden die Amplifikationsansätze zunächst auf ansteigende Größen von Einzellagen-Kulturen gegeben und nach einer Infektionsdauer von 7 Tagen geerntet, da zu diesem Zeitpunkt die Zellen zu einem großen Anteil lysiert vorlagen. Durch Abschätzung der Infektionseffizienz wurde die zugegebene Menge an Virus angepasst (100 µl bis 500 µl). Nach Amplifikation in einer T182-Flasche wurden die Viren in Schüttelkulturen bei 110 rpm vervielfältigt.

2.3 Expression in Sf9 Insektenzellen

Für die Expression wurden 200-500 ml Sf9-Zellen bis zu einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen ml^{-1} angezogen und mit Viren im Volumenverhältnis 1:100 infiziert. Die Expression erfolgte in Suspensionskulturen bei 27 °C und 60 rpm für 72 h. Durch Zentrifugation bei 3000 g für 15 min wurden die Expressionsansätze geerntet und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde entweder direkt verwendet oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4 Expression von IFN α 2-HEQ, IFN α 2 E58A und ifnar2-EC in *E. coli*

Die Expression von unmarkiertem ifnar2-EC und IFN α 2-Mutanten erfolgte mit Hilfe des pT7-Vektors in *E. coli* TG1 Zellen. Es wurde eine 100 ml Vorkultur von einer frisch transformierten Kulturplatte in LB-Medium unter Zugabe des Antibiotikums Ampicillin angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in 1 l LB_{amp}-Medium überimpft (1:20 Verdünnung) und bei einer OD_{600nm} von ~ 0,2 2 % T7M13-Phagen zugegeben. Die T7M13-Phagen codieren für die T7-Poymerase, die zur Transkription von T7-Promotoren kontrollierten Genen benötigt wird. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600nm} von 0,7-0,8 mit 300 μM IPTG, und die Expressionsdauer nach Induktion lag bei 5 h. Nach der Zellernte wurde das Pellet in 30 ml Lysepuffer mit 10 mg Lysozym bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5 Präparation und Solubilisierung von *inclusion bodies*

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall für dreimal 5 min mit jeweils 10 minütigen Pausen zwischen den Beschallungszyklen zur Vermeidung von starker Erwärmung der Probe. Die unlöslichen *inclusion bodies* wurden mittels Zentrifugation bei 27000 g für 15 min pelletiert.

Da durch vorherige Studien gezeigt werden konnte, dass die Rückfaltungseffizienz für IFN α 2-HEQ für geringere Proteinmengen effizienter ist, wurden für die Rückfaltung von IFN α 2-HEQ die *inclusion bodies* aus 1 l Expressionskultur auf 2 Ansätze aufgeteilt und parallel weiter verarbeitet. Im Folgenden ist die Solubilisierung, Rückfaltung und Reinigung von IFN α 2-HEQ exemplarisch für *inclusion bodies* aus einem 500 ml Expressionsvolumen dargestellt. Die Aufreinigung von IFN α 2 E58A erfolgte analog zu IFN α 2-HEQ. Durch die bessere Rückfaltungseffizienz von IFN α 2 E58A wurde hier jedoch das Zellpellet aus einer 1 l Expressionskultur verwendet. Die *inclusion bodies* wurden in 80 ml 20 mM Tris pH 9, 8 M Harnstoff bei ~ 35 °C für 3 h solubilisiert und sukzessiv bis zur Sättigung fester Harnstoff

zugegeben (Endvolumen 110-130 ml). Zur Reduzierung der Cysteine wurde 5 mM DTT zugegeben und unter Luftausschluss und Rühren für weitere 60 min bei ~ 35 °C inkubiert. Isolierte *inclusion bodies* von ifnar2-H10 und ifnar2-tagless (ifnar2-tl, besitzt keinen His-Tag) wurden in 300 ml 6 M Harnstoff, 100 mM Tris pH 9 suspendiert und über 4 h unter Rühren sukzessiv fester Harnstoff bis zur Sättigung zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei -20 °C eingefroren.

2.6 Rückfaltung von solubilisierten IFN α 2-Mutanten und ifnar2-EC

Die Rückfaltung der IFN α 2-Mutanten erfolgte durch 1:8 Verdünnung der solubilisierten, reduzierten Proteine in 20 mM Glycin pH 10,6 und anschließender Dialyse gegen je 8 L 5 mM Tris pH 8 für 2 h bei RT und Dialyse bei 4 °C über Nacht. Die anschließende Zentrifugation bei 27000 g für 15 min diente zur Entfernung von unlöslichen Aggregaten und Zellbestandteilen.

Die solubilisierten *inclusion bodies* von ifnar2-EC wurden nach Einfrieren über Nacht zügig aufgetaut und dreimal für je 45 min bei RT gegen je 5 l 20 mM Tris pH 8 dialysiert. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 27000 g für 15 min an.

2.7 Aufreinigung von renaturierten IFN α 2-Mutanten und ifnar2-EC

Die Aufreinigung von renaturiertem IFN α 2-HEQ, IFN α 2 E58A und ifnar2-EC erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie. Aufgrund des großen Probenvolumens wurde im batch-Verfahren gearbeitet. 30 ml einer 50 % Suspension mit Puffer A äquilibrierter Q Sepharose wurden unter gelegentlichem Schütteln mit der Proteinlösung für 6 min inkubiert und anschließend mittels Filtration vom Puffer getrennt. Es wurde zweimal mit ca. 50 ml Puffer A gewaschen und die IFN α 2-Mutanten bzw. ifnar2-EC durch zweimalige Zugabe von je 15 ml Puffer B in ein Greiner-Röhrchen eluiert. Das Eluat wurde direkt für eine Gelfiltrationschromatographie eingesetzt, um Aggregate und Dimere abzutrennen. Es schloss sich eine Dialyse bei 4 °C über Nacht gegen 5 l 5 mM Tris pH 8 für die IFN α 2-Mutanten und für 2 h gegen 5 l 20 mM Tris pH 8 für ifnar2-EC an. Nach Zentrifugation bei 27000 g für 15 min wurden die Proteine mittels Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP, 1 ml) aufkonzentriert. Die IFN α 2-Mutanten bzw. ifnar2-EC wurden mittels eines linearen Gradienten mit 5 bzw. 20 mM Tris pH 8 von 0 bis 500 mM NaCl über 8 ml eluiert.

Für die IFN α 2-Mutanten schloss sich zur Entfernung einer Kontamination eine IMAC an. Hierbei band ausschließlich die Proteinkontamination an das Säulenmaterial. Hierzu wurde eine mit NTA-Agarose (QIAGEN) gepackte 1 ml Säule mit Ni²⁺ beladen (20 mM NiSO₄,

20 mM Tris pH 8) und mit Waschpuffer (20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl) äquilibriert. Anschließend wurden die vereinigten Fraktionen der jeweiligen IFN α 2-Mutante aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Der Durchlauf wurde erneut aufgetragen und sechs Waschschritte mit je 1 ml Waschpuffer angeschlossen. Die Elution erfolgte viermal mit je 1 ml Elutionspuffer (20 mM Tris pH 8, 0,5 M NaCl, 0,5 M Imidazol). Zur Regeneration des Säulenmaterials wurde viermal je 1 ml Strippinglösung aufgetragen. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht.

3. Proteinbiochemische Methoden

3.1 Aufreinigung von ifnar1- und ifnar2-EC aus Insektenzellüberstand mittels IMAC

Der Überstand (bis zu 500 ml) wurde auf 20 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl eingestellt und zweimal für 3 h und über Nacht gegen je 4 l Dialysepuffer dialysiert. Um Zelltrümmer und Präzipitate zu entfernen wurde bei 27000 g für 15 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde direkt für die immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie (IMAC) eingesetzt. Für die IMAC wurde eine mit Zink beladene 5 ml IDA-Säule (Imminodiacetic Acid-Säule) verwendet. Nach dem Beladen mit Zn²⁺-Ionen wurde die Säule mit ca. 50 ml Puffer A äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand nach Expression unter Beimischung von 10 mM Imidazol mit einer Flussrate von 5-8 ml min⁻¹ aufgetragen. Die Zugabe von Imidazol minimiert die unspezifische Bindung anderer Proteine an das Säulenmaterial. Nach dem Auftrag wurde mit 20 mM Imidazol gewaschen bis die Absorption bei 280 nm stabil blieb und schließlich mit einem linearen Imidazolgradienten von 20 bis 500 mM Imidazol über 20 ml eluiert. Die Fraktionen à 2 ml wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Säule wurde nach jedem Lauf durch Behandlung mit 30 ml Strippingpuffer regeneriert und anschließend unter MilliQ-Wasser gelagert.

3.2 Gelfiltrationschromatographie

Für die Präparation von monodispersen Protein, zum Pufferaustausch, zur Abtrennung von niedermolekularen Substanzen wie z.B. EDTA, DTT, TCEP oder zur Entfernung von im Überschuss eingesetzten ifnar2-EC nach Ausbildung des ternären Komplexes (ifnar1-EC, ifnar2-EC, IFN) wurde eine Gelfiltrationschromatographie verwendet. Je nach Proteingröße und Probenvolumen wurde eine geeignete Säule verwendet (Tabelle 6). Die Superdex 75 separiert globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 3 bis 70 kDa und wurde daher für die Trennung von den Interferonen verwendet. Die Gelfiltrationssäule

Superdex 200 besitzt einen Trennbereich von 10 bis 600 kDa. Sie wurde daher für die Reinigung von ifnar1-EC, ifnar2-EC und Präparation des ternären Komplexes eingesetzt.

Säulenname	Max. Flussrate	Maximaldruck	Max. Probenvolumen	Ausschlußvolumen	Bettvolumen [ml]
Superdex 200/75 HiLoad 26/60	4 ml min ⁻¹	0,5 MPa	15 ml	~ 110 ml	~ 320
Superdex 200 HiLoad 16/60	2 ml min ⁻¹	0,5 MPa	5 ml	~ 50 ml	~ 122
Superdex 200 HR 10/30	0,5 ml min ⁻¹	1,5 MPa	0,5 ml	~ 7,5 ml	~ 24
Superdex 200 PC 3.2/30	100 µl min ⁻¹	1,5 MPa	50 µl	~ 0,8 ml	~ 2,4

Tabelle 6: Verwendete Säulen für die Gelfiltrationschromatographie.

3.3 Ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung der Cysteinmutanten von ifnar1- und ifnar2-EC

Die Ektodomänen von ifnar1 und ifnar2 wurden ortsspezifisch an eingeführten freien Cysteinen mittels Maleimid-Kopplungsreaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach der IMAC wurden die proteinhaltigen Proben vereinigt und 1 mM EDTA zugeben, um eventuell an den Histidin-Tag gebundene Zn²⁺-Ionen zu entfernen. Nach 10 min Inkubation bei 4 °C wurde das für das jeweilige Protein geeignete Reduktionsmittel in den in Tabelle 7 angegebenen Konzentrationen zugegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Zugabe des Reduktionsmittels stellt einen essentiellen Schritt dar, da die Kopplungsreaktion nur mit reduzierten Cysteinen möglich war und die Proteine nach Sekretion ins Medium oxidiert vorlagen.

Protein	DTT	TCEP
ifnar1-H10 N23C	-	3 mM
ifnar1-H10 N349C	100 µM	-
ifnar1-H10 W347F, N349C	100 µM	-
ifnar1-H10 N200C	-	3 mM
ifnar1-H10 N200C, L202W	-	3 mM
ifnar1-H10 R279A, N349C	100 µM	-
ifnar2-H10 S35C	300 µM	-

Tabelle 7: Angaben zur Verwendung der Reduktionsmittel zur Reduzierung der freien Cysteine.

Zur Entfernung des Reduktionsmittels und des EDTAs wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit Gelfiltrationspuffer angeschlossen und monomere Fraktionen des jeweiligen Proteins vereinigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/Vis-Spektroskopie (vergleiche Abschnitt 3.6) wurde der Maleimid-funktionalisierte Fluoreszenzfarbstoff im zweifach molaren Überschuss zugegeben und der Ansatz bei 4 °C ün unter Lichtausschluss inkubiert.

3.4 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie basiert auf der Bindung von geladenen Molekülen an ein mit gegensätzlich geladenen Gruppen besetztes Trägermaterial. Am isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins besitzt es eine Nettoladung von null. Oberhalb des isoelektrischen Punktes ist es negativ geladen und bindet somit an ein Anionenaustauschermaterial, oberhalb ist es positiv geladen und bindet an ein Kationenaustauschermaterial. Für eine feste Bindung an das Trägermaterial sollte der pH des Puffers mindestens eine pH-Einheit vom pI entfernt sein. Gebundene Proteine können entweder durch eine Änderung des pHs oder der Ionenstärke eluiert werden.

Die Kopplung eines geladenen Fluoreszenzfarbstoffes an ifnar1- oder ifnar2-EC ändert die Nettoladung des Proteins. Da für die geplanten Fluoreszenzstudien ortsspezifisch, einfach markierte Proteine essentiell waren, wurde für die Abtrennung von unmarkiertem und mehrfachmarkiertem Protein bzw. freiem Farbstoff die Ionenaustauschchromatographie gewählt. Bei den unmarkierten Proteinen IFN α 2-HEQ, IFN α 2 E58A, ifnar2-H10 und ifnar2-*tl* diente sie zur Konzentrierung der Proteine nach der Gelfiltration.

Für die Reinigung von fluoreszenzmarkiertem ifnar1-EC, ifnar2-EC, unmarkiertem ifnar2-EC, IFN α 2 E58A und IFN α 2-HEQ wurde eine Anionenaustauschchromatographie verwendet. Die mit ProtParam tool von ExPASy berechneten theoretischen pIs der Proteine sind in Tabelle 8 angegeben. Die 1 ml HiTrap Q HP Säulen wurden vor jeder Chromatographie folgendermaßen vorbereitet: Zunächst wurde das Ethanol durch Spülen mit MilliQ-Wasser entfernt. Danach wurde mit ca. 5 ml Puffer B gespült und zuletzt mit Puffer A äquilibriert bis die Leitfähigkeit konstant blieb. Nach dem Lauf wurde die Säule mit Wasser gespült und unter 20 % Ethanol gelagert. Die Q Sepharose für die Aufreinigung im batch-Verfahren wurde zunächst mit Wasser, anschließend mit 4 M NaCl und zuletzt mit Puffer A äquilibriert.

Protein	Isoelektrischer Punkt (theoretisch)
ifnar1-H10	8,04
ifnar2-H10	5,73
IFN α 2 E58A	6,37
IFN α 2-HEQ	6,21

Tabelle 8: Theoretische isoelektrische Punkte einiger isolierter Proteine (berechnet mit ExPASy Proteomics Server).

3.4.1 Anionenaustauschchromatographie von fluoreszenzmarkiertem ifnar1- und ifnar2-EC

Die fluoreszenzmarkierten Ektodomänen von ifnar1 und ifnar2 wurden nach der Markierungsreaktion 1:5 in Puffer A verdünnt. Dies diente zur Reduzierung der Ionenstärke.

Nach dem Probenauftrag wurde mit Puffer A gewaschen, bis die Leitfähigkeit konstant blieb und anschließend durch einen linearen Salzgradienten die Proteine vom Trägermaterial eluiert (Gradient über 10 ml, Ziel: 500 mM NaCl). Zuletzt wurde die Salzkonzentration einstufig auf 1 M erhöht. Die Fraktionsgröße betrug 500 μ l. Die gesammelten Proben wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie und SDS-PAGE analysiert.

3.5 Präparation des ternären Komplexes

Für die Einzelmolekülanalyse des ternären Komplexes mittels Elektronenmikroskopie wurden präparative Mengen des Komplexes bestehend aus den Ektodomänen von ifnar1, ifnar2 und Interferon benötigt. Der ternäre Komplex bestehend aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ wurde durch Mischen der Komponenten im Verhältnis von 1: 1,2: 1 hergestellt, so dass sich eine nominelle Gesamtkonzentration des ternären Komplexes von 30 μ M ergab. Durch die anschließende Gelfiltrationschromatographie mit einer Superdex 200 Säule und HBS als Laufpuffer wurden ungebundene Proteine abgetrennt. Bei der Präparation des ternären Komplexes aus ifnar1-H10- Δ SD4, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ wurde analog verfahren.

IFN β lag in nicht in einem zur Ausbildung des ternären Komplexes geeigneten Puffer und pH vor. Deshalb wurde zunächst ifnar2-EC mit einer geeigneten Menge an 0,5 M HEPES pH 7,5 vorgelegt, IFN β zugefügt und zügig vermischt. Nach Inkubation für 10 min bei RT wurde ifnar1-EC hinzugefügt, gemischt und für 15 min bei 17000 g zentrifugiert. Es folgte die schon für die anderen ternären Komplexe beschriebene Gelfiltrationschromatographie. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

3.6 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationen für ifnar1- und ifnar2-EC wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Hierzu wurden die theoretischen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm von ifnar1-EC ($84.830 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ifnar1-H10- Δ SD4 ($73.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und ifnar2-EC ($27.670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verwendet, welche mittels des Programms ProtParam des ExPASy Proteomics Server berechnet worden waren.

Die Konzentrationen von IFN α 2 E58A und IFN α 2-HEQ wurden anhand der Bandenintensitäten in SDS-Gelen im Vergleich zu einem Standard mit Hilfe des Lumi Imagers von Roche bestimmt. Als Standard diente hier aufgereinigtes IFN α 2 bekannter Konzentration.

3.7 Bestimmung der DNA-Konzentrationen

Die DNA-Konzentrationen wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie durch die Absorption bei 260 nm bestimmt oder über ein analytisches Agarosegel durch Vergleich mit einem Massenstandard abgeschätzt.

3.8 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

3.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine einfache Methode, um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Proteine werden mit SDS-haltigem Probenpuffer versetzt. Dieses anionische Detergenz denaturiert die Proteine und überdeckt ihre Eigenladungen, so dass die Auftrennung im elektrischen Feld proportional ihrer Masse erfolgt. Optional kann die Auftrennung auch unter reduzierenden Bedingungen durch Zugabe von β -Mercaptoethanol oder DTT zwecks Aufspaltung der Disulfidbrücken durchgeführt werden.

Es wurde die diskontinuierliche Elektrophorese verwendet. Bei der diskontinuierlichen Elektrophorese wird mit einem weitporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel gearbeitet. Die SDS-Gele wurden mit Coomassie gefärbt oder für Western-Blotting eingesetzt. Bei fluoreszenzmarkierten Proteinen wurde vor der Coomassie-Färbung die Fluoreszenz mittels des Lumi Imagers von Roche bei der geeigneten Wellenlänge angeregt und detektiert. Durch Vergleich der Intensität der Fluoreszenz mit der Intensität der Coomassie-gefärbten Banden konnten erste Rückschlüsse auf den Markierungsgrad gezogen werden.

Durchführung:

Das Gießen der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte in einer Gießkammer für acht Gele. Die Lösungen für das Trenngel wurden, wie Tabelle 9 zu entnehmen ist, angesetzt. Zuletzt wurde der Radikalstarter APS zugegeben und das Trenngel zügig gegossen. Eine Übersichtung mit Isopropanol sorgte für Bildung einer scharfen, horizontalen Grenzschicht und verhinderte die Bildung von Luftblasen. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt. Das Sammelgel wurde zusammenpipettiert und über das Trenngel gegossen. Es folgte das Stecken der Probenkämme.

	Sammelgel 5 %	Trenngel	
		12 %	15 %
AA/BA	6,8 ml	29 ml	37,5 ml
Tris/ SDS pH 8,8 (1,5 M)	-	18 ml	18,75 ml
Tris/ SDS pH 6,8 (0,5 M)	5 ml	-	-
MilliQ-Wasser	28 ml	25 ml	18,75 ml
10 % APS (100 mg/ml)	320 μ l	470 μ l	300 μ l
TEMED	32 μ l	40 μ l	70 μ l

Tabelle 9: Pipettierschema für die Präparation von SDS-Gelen (Angaben bezogen auf 8 Gele).

Nach Auftrag der Proben wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Nachdem die Proben in das Trenngel eingelaufen waren, wurde die Spannung auf 160 bis 180 V erhöht.

3.8.2 Western-Blotting

Beim Western-Blotting werden Proteine, die zuvor nach Größe mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, auf einem Trägermaterial immobilisiert und mittels Immunodetektion sichtbar gemacht. Der Vorteil dieser Methode ist, dass selektiv Proteine visualisiert und identifiziert werden können, wenn spezifische Antikörper gegen dieses Protein verwendet und Kreuzreaktionen ausgeschlossen wurden.

Es wurde Elektroblothing nach der „*semi dry*“-Methode verwendet. Auf einer Lage in Transferpuffer getränktem Filterpapier wurde eine in Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde luftblasenfrei aufgelegt und durch eine Lage in Transferpuffer getränktem Filterpapier bedeckt.

Die negativ geladenen Proteine wanderten bei Anlegen des elektrischen Feldes senkrecht zum Gel von der Kathode zur Anode und wurden so auf der Nitrocellulosemembran immobilisiert. Das Blotting nach der „*semi dry*“-Methode erfolgte für eine Stunde bei konstanten 100 mA pro Gel. Nach dem Blotting wurde die Membran zweimal für 5 min mit MilliQ-Wasser gewaschen und anschließend für 1 h in TBS-Puffer mit 3 % Milchpulver geblockt. Danach wurde zweimal für 10 min mit TBS/T-Puffer gewaschen der Anti-ifnar1-EC-Antikörper in einer Verdünnung von 1:7000 in TBS/T mit 3 % Milchpulver über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger oder unspezifisch gebundener Antikörper wurde dreimal mit TBS/T für je 10 min gewaschen und der 2. Antikörper (Anti-Maus-HRP) 1:13000 in TBS/T mit 3 % Milchpulver für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurde zweimal mit TBS/T und einmal mit TBS für je 10 min gewaschen und der Blot mittels Chemilumineszenz entwickelt.

Hierzu wurde der Blot für 5 min in ECL-Lösung 1 geschwenkt, die Lösung durch ECL-Lösung 2 ersetzt und für 1 min geschwenkt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem Lumi Imager von Roche.

4. Funktionsanalyse und Aktivitätsstudien

4.1 Proteininteraktion auf Oberflächen mittels RIfS / TIRFS

Bindungsstudien von unmarkierten und fluoreszenzmarkierten Mutanten der Ektodomänen von ifnar1 und ifnar2 wurden mittels reflektrometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) [111] unter kontinuierlichen Fluß durchgeführt. Bei ATTO 655 markiertem ifnar1-H10 N349C wurde optional zusätzlich die Fluoreszenz mittels Totalinterner Fluoreszenz Reflexionsspektroskopie (TIRFS) [114] detektiert. Die Rezeptoruntereinheiten wurden über ihre C-terminalen His-*Tags* ortsspezifisch auf multivalenten NTA-Oberflächen immobilisiert. Zur Immobilisierung dienten fluide Lipid-Doppelschichten, welche mit bis-NTA-Lipiden dotiert waren oder PEG-Oberflächen mit tris-NTA-Köpfen [73]. Als Laufpuffer wurde RIfS Laufpuffer verwendet, wobei bei den Messungen auf festkörperunterstützten Lipidoberflächen auf die Zugabe des Triton X-100 verzichtet wurde. Zur Präparation der Vesikel wurde SOPC (Stearoyl-Oeylel-Phosphatidylcholin) in Chloroform mit 5 mol % bis-NTA Chelatorlipiden (SOA-bis-NTA) versetzt und das Lösungsmittel mit Hilfe einer Vakuumpumpe unter Erwärmung für 20 min entzogen. Der Ansatz wurde in HBS-Puffer für mindestens 15 min bei RT unter Rühren resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Durch Beschallung mit Ultraschall für 15 min wurden unilaminare Vesikel erzeugt. Die Glasoberflächen wurden für mindestens 15 min in einer Lösung aus einem Teil (v/v) Wasserstoffperoxid und zwei Teilen konzentrierter Schwefelsäure (v/v) inkubiert und anschließend mit gereinigtem Wasser gespült. Vor Einsetzen des Glaschips in die Flusszelle wurden sie unter einem N₂-Strom getrocknet. Das System wurde unter Laufpuffer gesetzt und eine 250 µM Lösung der sonifizierten Lipide injiziert. Die Vesikel fusionierten spontan mit der Glasoberfläche unter Ausbildung einer fluiden Lipid-Doppelschicht. Die erfolgreiche Fusion ließ sich anhand des RIfS-Signals verfolgen. Die Regeneration der Oberfläche erfolgte durch Injektion von 200-500 mM Imidazol, 200 mM EDTA und 10 mM Ni²⁺ in HBS.

Nach Immobilisierung der Rezeptoruntereinheiten (Signalintensität 0,2 bis 2 nm) wurden IFNα2 oder IFNα2-HEQ in verschiedenen Konzentrationen injiziert und die Bindung detektiert. Zum Vergleich der Affinitäten wurden die Gleichgewichtssignale auf die Rezeptorbeladung normalisiert.

4.2 Interaktionsmessungen mittels SPR

Temperaturabhängige Messungen der Kinetik auf Oberflächen liefern nicht nur Informationen zur Kinetik der Reaktion, sondern können auch zur Aufklärung molekularer Mechanismen der Komplexbildung und Dissoziation dienen. Sie liefern Daten zur Thermodynamik wie Gibb'scher Energie (ΔG^0), Reaktionsenthalpie (ΔH^0) und Entropie (ΔS^0). Die Änderung der freien Energie steht im Zusammenhang mit der Reaktionsenthalpie, der Entropie und der Gleichgewichtsassoziationskonstante (Gleichung 1). R ist die allgemeine Gaskonstante mit $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K_A \quad (\text{Gleichung 1})$$

$$\ln K_A = \Delta H^0/RT - \Delta S^0/R \quad (\text{Gleichung 2})$$

Wenn sich die Reaktionsenthalpie nicht mit der Temperatur ändert liefert das van't Hoff Diagramm, bei dem $\ln K_A$ gegen $1/T$ aufgetragen wird, eine Gerade mit der Steigung von $\Delta H^0/R$. Der Achsenabschnitt liefert ΔS^0 (Gleichung 2). ΔS^0 ist auch durch Auftragung von ΔG^0 gegen T berechenbar, wobei der y-Achsenabschnitt hier ΔH^0 entspricht (Gleichung 1).

Zusätzlich liefern thermodynamische Messungen Informationen über die Energiehyperflächen und die Übergangszustände. Die Aktivierungsenergien des Übergangszustandes können nach Arrhenius mit Hilfe der Formel $\ln k = \ln A - E_A/RT$ berechnet werden, wobei A den präexponentiellen Faktor darstellt. Im Gegensatz zur mikrokalorimetrischen Messungen wird bei SPR basierten Messmethoden nur die direkte Bindung gemessen und keine anderen Effekte (z.B. Hydratation). Ein Vorteil ist auch der geringere Probenverbrauch.

Für die thermodynamischen Messungen wurde das Biacore T100 gewählt, da durch die automatisierte Pufferentgasung die Luftblasenbildung im System minimiert wurde. Außerdem war durch die automatisierte Probenentnahme und die Möglichkeit der Programmierung die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sehr hoch. Durch die Verwendung von vier Messkanälen (zwei davon dienten als Referenzkanäle) wurden bei entsprechender Beladung der Kanäle durch eine Injektion von IFN α 2 simultan zwei Bindungskurven erhalten.

Es wurden die Ektodomänen der Rezeptoruntereinheiten jeweils auf handelsüblichen NTA-Oberflächen von GE Healthcare oder auf „*self assembled monolayer*“ tris-NTA-Gold-Oberflächen unserer Gruppe [115] immobilisiert. Hierzu wurden unbehandelte Goldchips (Sensor Chip Au, GE Healthcare) mit multivalenten NTA Gruppen versehen. Als Ligand wurde für ifnar2-H10 das Typ I Interferon IFN α 2 verwendet, welches eine Affinität zu ifnar2-EC von 5 nM und zu ifnar1-EC von $\sim 5 \mu\text{M}$ besitzt. Aufgrund der geringen Affinität zu ifnar1-EC wurde hier die Mutante IFN α 2-HEQ verwendet, welche eine Affinität zu ifnar1-EC von 150 nM besitzt [65]. Zur Kontrolle wurden die Messungen mit IFN α 2-HEQ auch für

ifnar2-EC durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei Temperaturen zwischen 5 und 40 °C in Schritten von 5 °C. Es wurden möglichst niedrige Rezeptorbeladungen auf der Oberfläche gewählt, um Massentransportprobleme zu vermeiden. Die Immobilisierung sowie die Injektion der Interferone erfolgten in Biacore Laufpuffer. Die Injektion der Interferone erfolgte bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l min}^{-1}$ für 60 s bis 120 s. Zur Regeneration der Oberfläche wurde eine 500 mM Imidazolösung (Biacore Regenerationspuffer 1), eine 200 mM EDTA-Lösung (Biacore Regenerationspuffer 2) injiziert und die Oberfläche erneut mit Ni^{2+} beladen (Biacore Metallbindungspuffer).

5. Fluoreszenz-Messungen in Lösung

5.1 Ensemble-Fluoreszenz-Messungen

Fluoreszenz-Messungen in Lösung wurden am Cary Eclipse (Varian) durchgeführt. Die Fluorophore wurden jeweils bei den in Tabelle 10 angegebenen Wellenlängen angeregt und Fluoreszenzspektren ab den angegebenen Wellenlängen aufgenommen. Es wurden jeweils 100 nM ortsspezifisch fluoreszenzmarkierte Ektodomänen von ifnar1-H10 bzw. ifnar2-H10 in HBS + BSA für die Messungen verwendet. Nach Zugabe von 250 nM des geeigneten tris-NTA-Fluorophor-Konjugats wurden Fluoreszenzspektren bis zur Sättigung der Fluoreszenzlöschung aufgenommen. Es wurden unter anderem tris-NTA-Konjugate gewählt, deren Fluorophorspektren sich nicht mit den Spektren des Fluorophors am Protein überlappen. Hier sollte die Fluoreszenzlöschung basierend auf dem Elektronentransfer mit dem Übergangmetallion Ni^{2+} untersucht werden. Außerdem wurden tris-NTA-Fluorophore gewählt, deren Spektren sich langwellig verschoben mit denen des Fluorophors am Protein überlappen. Hier basiert die Fluoreszenzlöschung (zusätzlich) auf dem Energietransfer durch FRET. Anschließend wurde 1 μM IFN α 2-HEQ alleine oder im Komplex mit ifnar2-tl oder 500 nM IFN β im Komplex mit ifnar2-tl zugegeben. Der Komplex aus IFN β bzw. IFN α 2-HEQ und ifnar2-tl wurde zuvor durch Mischen der jeweiligen Komponenten im Verhältnis 1:1,2 und anschließender Inkubation für 5 min bei RT hergestellt. Durch Zugabe von 10 μM unmarkiertem ifnar1-tl sollte die Spezifität der Fluoreszenzintensitätsänderung gezeigt werden. Hierbei wurde ifnar1-EC verwendet, welcher keinen His-Tag trägt, um eine mögliche Konkurrenz um tris-NTA-Konjugate zu vermeiden. Zur Kontrolle wurden Fluoreszenzspektren der entsprechenden 250 nM tris-NTA-Konjugate aufgenommen.

Fluoreszenzmessungen mit ATTO 655 markierten ifnar1-H10-Mutanten wurden wie oben beschrieben durchgeführt, nur erfolgte hier keine Zugabe von tris-NTA-Fluorophor, da die Fluoreszenz des Farbstoffes ATTO 655 durch das benachbarte Tryptophan an Position 347

gelöscht wird. Nach Ligandenbindung sollte durch Zugabe von 10 μM unmarkiertem ifnar1-H10 die Spezifität der Fluoreszenzänderung überprüft werden.

Fluorophor	Anregung	Detektion	Detektorempfindlichkeit
Oregon Green 488	470 nm	ab 490 nm	600
Alexa Fluor 488	470 nm	ab 490 nm	600
Dy 556	530 nm	ab 550	600
ATTO 655	640 nm	ab 660 nm	800

Tabelle 10: Parameter für die Ensemble-Fluoreszenzmessungen.

5.2 Messungen der Fluoreszenzlebensdauer

Fluoreszenzlebensdauer-Messungen wurden an einem FluoTime 200 Instrument (Picoquant GmbH, Deutschland) durchgeführt. ATTO 655 wurde mit einer 640 nm LED (Picoquant GmbH, Deutschland) angeregt. Die Pulsbreite betrug 200 ps und die Wiederholungsrate für die Anregung 20 MHz. OG488 wurde mit einer gepulsten LED (PLS500, Picoquant GmbH, Deutschland) mit einer Pulsbreite von 500 ps und einer Wiederholungsrate von 20 MHz bei 493 nm angeregt. Die Probenvorbereitungen entsprachen den Vorbereitungen für die Fluoreszenzmessungen in Lösung (5.1).

5.3 Stopped-Flow-Messungen

Stopped-Flow-Messungen wurden bei 26 °C an einem SF-61, DX2 Double Mixing *Stopped-Flow* System (Hi Tech Scientific) in HBS + BSA durchgeführt. ATTO 655 markierter ifnar1-H10 N349C wurde mit einem He/Ne Laser bei 633 nm angeregt und die Fluoreszenz durch einen Bandpassfilter (640–750 nm) detektiert. 50 nM ^{AT655}ifnar1-H10 N349C wurde mit ansteigenden Konzentrationen von IFN α 2 E58A (2, 8, 12,5 and 20 μM) gemischt. Durch Mischen von 25 nM ^{AT655}ifnar1-H10 N349C im Komplex mit 1 μM IFN α 2 E58A und 10 μM unmarkiertem ifnar1-H10 wurde die Dissoziation von IFN α 2 E58A detektiert.

Die OG488 markierten Mutanten von ifnar1-H10 wurden durch eine Xe-Lampe bei 480 nm angeregt und die Fluoreszenz durch einen Bandpassfilter (500-570 nm) detektiert. 50 nM OG488 markierte ifnar1-H10-Mutanten wurden mit 100 nM ^{AT565}tris-NTA für 30 min inkubiert und anschließend mit ansteigenden Konzentrationen an IFN α 2 E58A gemischt. Die Endkonzentrationen von IFN α 2 E58A lagen zwischen 1 und 10 μM . Zur Kontrolle wurden die Messungen analog mit OG488 markiertem ifnar2-H10 S35C durchgeführt.

6. Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie

Die ligandeninduzierten konformationellen Änderungen sollten zusätzlich auf Einzelmolekülniveau charakterisiert werden. Alle für die Einzelmolekülstudien verwendeten fluoreszenzmarkierten Proteine wurden einen Tag vor der Messung gefiltert (Superdex 200, HBS), um eventuell bei der Lagerung entstandene Aggregate abzutrennen.

6.1 Messungen mit ^{AT655}ifnar1-H10 N349C

Es sollte die konformationelle Dynamik in der membranproximalen Domäne auf Einzelmolekülebene untersucht werden. ^{AT655}ifnar1-H10 N349C wurde in einer Konzentration von 1 nM in HBS + BSA eingesetzt. Der Verlust des markierten ifnar1-H10 durch unspezifische Bindung an die Oberflächen wurde durch Zugabe von 100 nM unmarkiertem ifnar1-H10 minimiert. Für die Bildung des Komplexes wurde IFN α 2-HEQ in einer Konzentration von ca. 1 μ M hinzugefügt und 5 min inkubiert. Die Datenaufnahme erfolgte über 30 min.

Die Einzelmolekül-Experimente wurden an einem eigens aufgebauten Setup durchgeführt, welches [116] bereits beschrieben wurde. Als Anregungslaser wurde ein gepulster Diodenlaser (LDH 635, PicoQuant GmbH, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 640 nm verwendet, welcher Impulse mit einer Dauer von ca. 100 ps liefert und mit einer Impulsfrequenz von 40 MHz arbeitet. Das Laserlicht wurde in eine *single-mode* Glasfaser eingekoppelt und anschließend kollimiert, so dass ein Laserstrahl mit gaußförmigem Profil und einem Radius von 5 mm entstand. Der so resultierende Strahl wurde mit Hilfe eines apochromatischen Wasserimmersion-Objektiv (UPLSAPO 60 \times , N.A. 1.2 w, Olympus) in die Probe fokussiert, das Fluoreszenz-Emissionslicht in diesem Epifluoreszenz-Aufbau durch dasselbe Objektiv eingesammelt, vom Anregungslicht mittels eines Strahlenteiler (650DRLP, Omega Optical) getrennt und durch eine Tubuslinse auf eine kreisförmige Lochblende (Durchmesser 100 μ m) fokussiert. Nach einem Bandfilter (690DF40, Omega Optical) wurde das Fluoreszenz-Emissionslicht in zwei Kanäle aufgeteilt und auf diese Weise auf zwei Einzelphoton-Avalanchediode (SPAD: single-photon avalanche diodes; PDM-50-C, Micro Photon Devices) fokussiert. Zur Aufzeichnung der detektierten Photonen in einem *time-correlated time-tagged* Aufnahmemodus wurde eine sehr schnelle Elektronik (PicoHarp 300, PicoQuant GmbH, Germany) verwendet. Aus den gewonnenen Rohdaten konnten die Autokorrelationskurven über die Kreuzkorrelation der Photonensignale aus den beiden SPADs berechnet werden.

6.2 Messungen der Konformationsdynamik von ifnar1-H10 N23C

Das zu analysierende Protein wurde in einer Konzentration von 1 nM in HBS + BSA eingesetzt, wobei zur Reduzierung von unspezifischer Bindung von fluoreszenzmarkiertem ifnar1-H10 an die Oberflächen 100 nM unmarkierter ifnar1-tl zugefügt wurde. ^{AT565}tris-NTA wurde im Überschuss von 100 nM eingesetzt. Nach Zugabe des FRET Akzeptors schloss sich eine Inkubation für 15 min bei RT an, um die vollständige Bindung an den markierten ifnar1-H10 sicherzustellen. Für die Messungen nach Ligandenbindung wurde IFN α 2-HEQ in einer Konzentration von ca. 1 μ M eingesetzt und 5 min bei RT inkubiert. Für die Messungen ohne ^{AT565}tris-NTA wurde 1 mM EDTA zugegeben, um alle eventuell vorhandenen Übergangsmetallionen zu entfernen. Die Datenaufnahme erfolgte über 30 min.

Die Einzelmolekül-Experimente wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Als Anregungslaser wurde ein gepulster Diodenlaser (PDL 470, PicoQuant GmbH, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 470 nm verwendet, welcher Impulse mit einer Dauer von ca. 50 ps liefert und mit einer Impulsfrequenz von 40 MHz arbeitet. Das Laserlicht wurde in eine *single-mode* Glasfaser eingekoppelt und anschließend kollimiert, so dass ein Laserstrahl mit gaußförmigem Profil und einem Radius von 5 mm entstand. Der so resultierende Strahl wurde mit Hilfe eines apochromatischen Wasserimmersion-Objektiv (UPLSAPO 60 \times , N.A. 1.2 w, Olympus) in die Probe fokussiert, das Fluoreszenz-Emissionslicht in diesem Epifluoreszenz-Aufbau durch dasselbe Objektiv eingesammelt, vom Anregungslicht mittels eines Strahlenteiler (505 DRLP, Omega Optical) getrennt und durch eine Tubuslinse auf eine kreisförmige Lochblende (Durchmesser 100 μ m) fokussiert. Nach einem Bandfilter (535AF26, Omega Optical) wurde das Fluoreszenz-Emissionslicht in zwei Kanäle aufgeteilt und auf diese Weise auf zwei Einzelphoton-Avalanchedioden (SPAD, SPCM AQR-13, Perkin Elmer) fokussiert. Zur Aufzeichnung der detektierten Photonen in einem *time-correlated time-tagged* Aufnahmemodus wurde eine sehr schnelle Elektronik (PicoHarp 300, PicoQuant GmbH, Deutschland) verwendet. Aus den gewonnenen Rohdaten konnten die Autokorrelationskurven über die Kreuzkorrelation der Photonensignale aus den beiden SPADs berechnet werden.

7. Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung

Die Negativfärbung der Proben erfolgte wie beschrieben [117] mit 0,75 % (w/v) Uranylformat. Bilder wurden an einem mit einem LaB6 Filament versehenen Tecnai T12 Elektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV aufgenommen (FEI, Hillsboro, OR). Die Bilder wurden auf Platten mit einer 67000-fachen Vergrößerung und einem Defocus von -1,5 μm aufgenommen. Die Platten wurden mit einem Ditabis micron imaging plate scanner (DITABIS Digital Biomedical Imaging System AG, Pforzheim, Germany) mit einer Schrittgröße von 15 μm und einer Verstärkung von 20000 ausgelesen. Die Laserstärke betrug 30 %. 2 x 2 Pixels wurden gemittelt, und die Pixelgröße betrug 4,2 \AA auf Probenebene. Partikel wurden mit Hilfe von BOXER interaktiv gewählt, das Darstellungsprogramm war assoziiert mit der EMAN Software [128]. Die ausgewählten Partikel (18379 Partikel von 66 Bildern für den ternären Komplex mit IFN α 2-HEQ) und 14782 Partikel von 112 Bildern für den ternären Komplex mit IFN β) wurden zusammengefasst in 64 x 64 Pixelbilder. Die Partikel wurden rotational und translational angeordnet und zehn Zyklen Multi-Referenz Zuordnung mit der SPIDER Software [118] angeschlossen. Nach jeder Runde der Multi-Referenz Zuordnung wurde eine Komponentenanalyse und eine K-Mittelwert Klassifizierung durchgeführt, welche 50 Klassen ergab. Die Referenzen für die erste Multi-Referenz-Zuordnung wurden zufällig aus den Rohbildern ausgewählt.

E. Ergebnisse

1. Proteinbiochemie

1.1 Aufreinigung von ifnar1-H10 und unmarkierten ifnar1-EC-Derivaten

Die Ektodomäne von ifnar1 wurde in Sf9 Insektenzellen exprimiert und mittels eines C-terminalen Dekahistidin-*Tags* über immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt. Die Deletionsmutante ifnar1-H10- Δ SD4, der die membranproximale Subdomäne 4 fehlt, besaß einen N-terminalen Dekahistidin-*Tag*. Die Proteine wurden durch Fusion mit der Sekretionssequenz des Baculovirus Hüllproteins gp67 ins Medium sezerniert. Hierdurch sollte die Bildung der Disulfidbrücken und durch Glykosylierung die korrekte Faltung und Stabilität der Proteine ermöglicht werden.

In Abbildung 17 ist exemplarisch die Elution von ifnar1-H10 von einer mit Zn^{2+} beladenen IDA-Säule dargestellt. Das Protein eluierte bei einer Imidazolkonzentration von ca. 240 mM. Im Gel der korrespondierenden SDS-PAGE war eine Bande bei ca. 50 kDa zu sehen, die dem erwarteten Molekulargewicht für die Ektodomäne von ifnar1 von 48,9 kDa entsprach. Die Bande war nicht sehr scharf abgegrenzt, was auf die Glykosylierung des Proteins zurückzuführen war [88]. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem aufgereinigten Protein um ifnar1-H10 handelte, wurde optional ein Western-Blot angefertigt. Zur Detektion wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die Ektodomäne von ifnar1 gerichtet ist. In Abbildung 17c ist ein Western-Blot exemplarisch dargestellt, der die Identität von ifnar1-EC bestätigte.

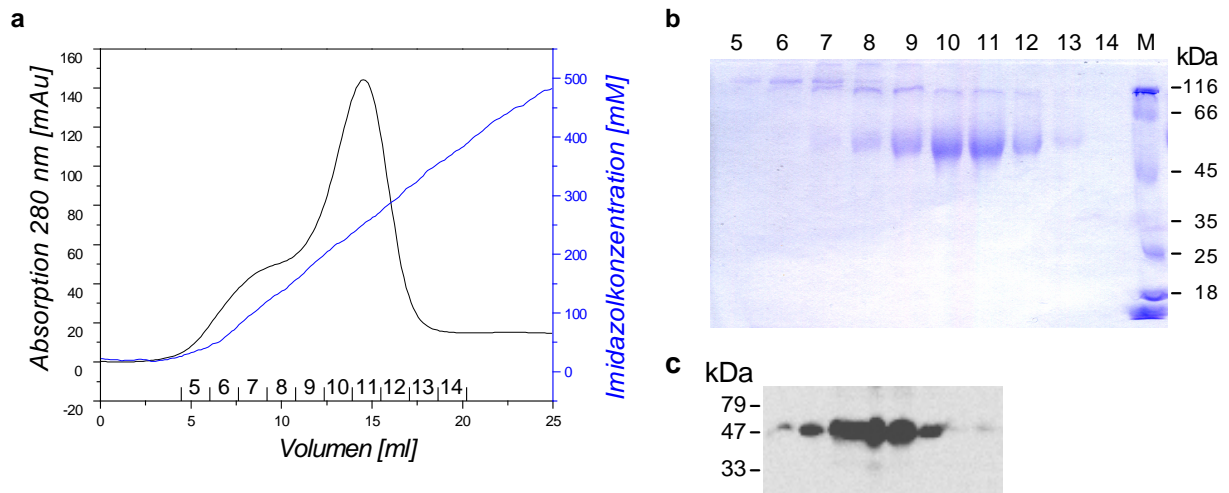


Abbildung 17: Reinigung von ifnar1-H10 aus Insektenzellüberstand mittels IMAC. a: Chromatogramm der IMAC. b: Korrespondierende 12 % SDS-PAGE der Fraktionen nach IMAC. c: Western-Blot einer 15 % SDS-PAGE mit Fraktionen einer IMAC von ifnar1-H10, Detektion mittels ifnar1-EC-Antikörper.

Zur Abtrennung von Proteinaggregaten, sowie zur Entfernung des Imidazols und EDTAs, wurde für alle ifnar1-EC-Derivate, außer der Cysteinmutanten, direkt nach der IMAC eine Gelfiltrationschromatographie angeschlossen. Die Chromatogramme der Gelfiltration von ifnar1-H10 und ifnar1-H10- Δ SD4 sind exemplarisch in Abbildung 18 dargestellt. Monomeres ifnar1-EC wies ein Retentionsvolumen von ca. 215 ml bei der verwendeten Säule auf. Die Deletionsmutante ifnar1-H10- Δ SD4 zeigte gegenüber der kompletten Ektodomäne von ifnar1 eine erwartete deutliche Verschiebung zu größeren Elutionsvolumina. Auch der Dimerpeak war deutlich verschoben. Beide Proteine wurden bis zu über 95 % Homogenität gereinigt.

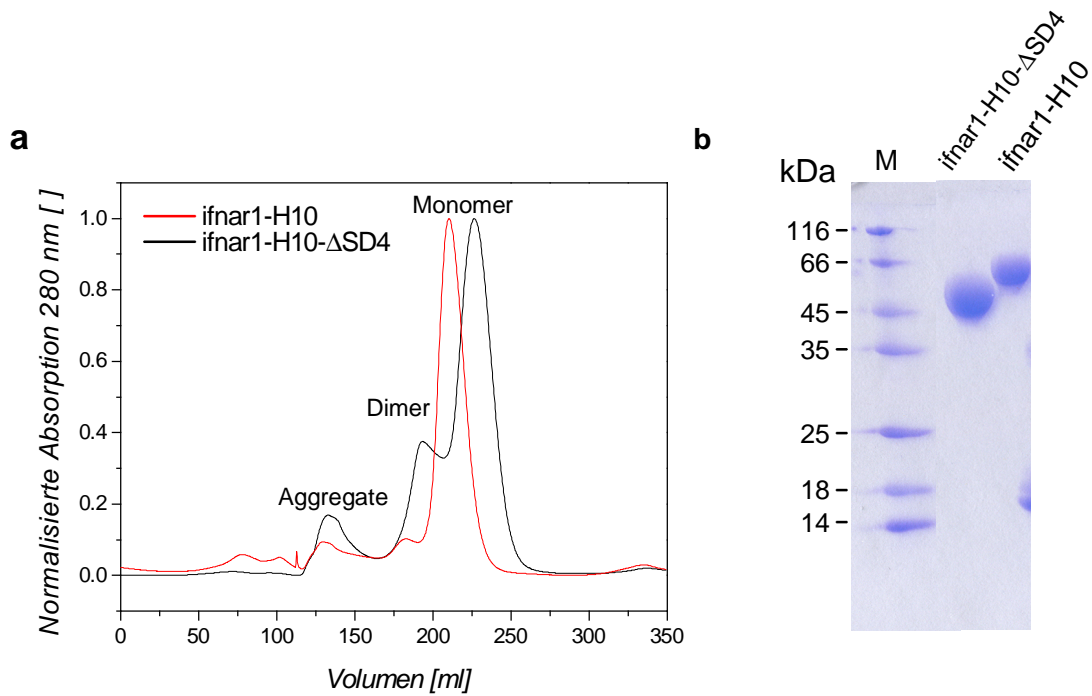


Abbildung 18: Gelfiltrationschromatographie von ifnar1-H10 und ifnar1-H10-ΔSD4 (Superdex 200 HiLoad 26/60): a: Chromatogramm. Die Absorption bei 280 nm ist für ifnar1-H10 in rot, für ifnar1-H10-ΔSD4 in schwarz dargestellt. b: 15 % SDS-PAGE der monomeren Fraktionen von ifnar1-H10 und ifnar1-H10-ΔSD4.

Für die Untersuchungen der möglichen Funktion der Aminosäuren ²⁷⁸LRV in der Ektodomäne von ifnar1 wurde eine Dreifachmutante und eine Mutante, bei der nur das Arginin 279 gegen Alanin ausgetauscht wurde, generiert.

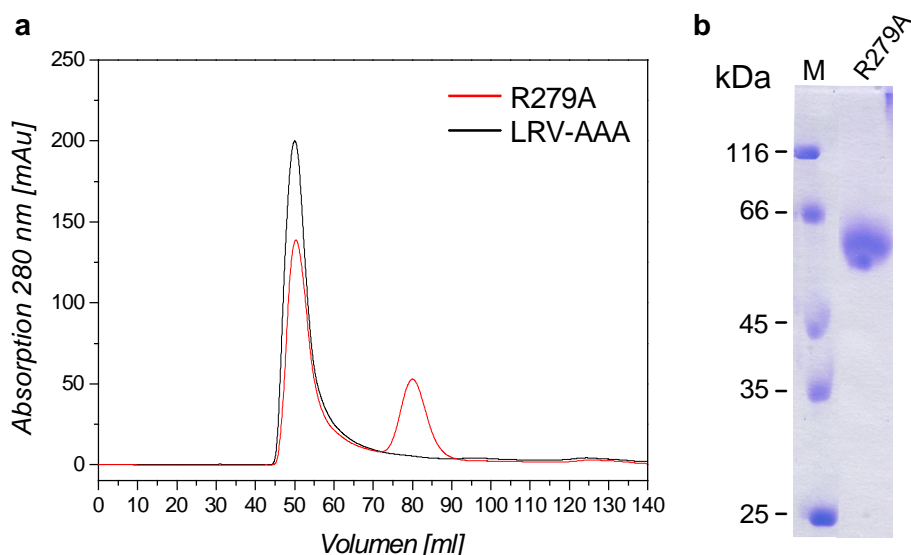


Abbildung 19: a: Gelfiltration von ifnar1-H10 R279A und ifnar1-H10-LRV-AAA nach IMAC. a: Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 200 HiLoad 16/60), b: 12 % SDS-PAGE von monomerelem ifnar1-H10 R279A nach Gelfiltration.

Für die Dreifachmutante konnte kein monomeres Protein gewonnen werden und auch bei ifnar1-H10 R279A lag ein Teil des Proteins nach der Aufreinigung mittels IMAC als Aggregate vor (Abbildung 19a). Für ifnar1-H10 R279A konnte jedoch ausreichende Mengen an monodispersem Protein gewonnen werden. Die Reinheit lag bei über 95 % (Abbildung 19b).

1.2 Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung der Cysteinmutanten von ifnar1-EC

Die IMAC der Cysteinmutanten von ifnar1-EC erfolgte analog der Aufreinigung von ifnar1-H10. Jedoch wurde bei bestimmten Mutanten aufgrund der vermehrten Neigung zur Bildung von Dimeren bevorzugt geringere Volumina der Insektenzellüberstände nach Expression für die IMAC verwendet, da durch langes Verweilen auf dem Säulenmaterial eine Dimerisierung der Proteine favorisiert wurde. Die Tendenz zur Bildung von Dimeren hing stark von der Lokalisierung des neu eingeführten Cysteins ab (Abbildung 20c). In Abbildung 20a und b ist exemplarisch die Aufreinigung der Cysteinmutanten ifnar1-H10 N23C und ifnar1-H10 N200C gezeigt. Die SDS-PAGE der Fraktionen nach IMAC wies für beide Proteine eine Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht von 50 kDa auf. Bei ifnar1-H10 N23C war eine zusätzliche Bande bei ca. 100 kDa sichtbar, welche auf Dimerbildung des Proteins hindeutete. Es handelte sich hierbei um über Disulfidbrücken verknüpfte kovalente Dimere. Auch die etwas verzögerte Elution des Proteins von etwa 100 kDa bei höheren Imidazolkonzentrationen sprach für ein kovalentes Dimer, welches durch das Vorhandensein von zwei Histidin-*Tags* stärker an das Säulenmaterial band. Die Identität des Dimers wurde durch Western-Blot-Analyse mit α -ifnar1-EC Antikörper bestätigt (nicht gezeigt). Auch in der Gelfiltrationschromatographie war der Anteil an dimerem ifnar1-H10 bei der N23C-Mutante signifikant höher als für die N200C-Mutante (Abbildung 20b).

In Abbildung 20d sind die SDS-PAGEs der aufgereinigten monomeren Cysteinmutanten von ifnar1-H10 gezeigt. Die Reinheit der monomeren Fraktionen lag für alle Cysteinmutanten bei über 95 %. Bedingt durch den unterschiedlichen Anteil an Aggregaten nach der IMAC unterschieden sich die Ausbeuten an monomeren Protein (Abbildung 20e).

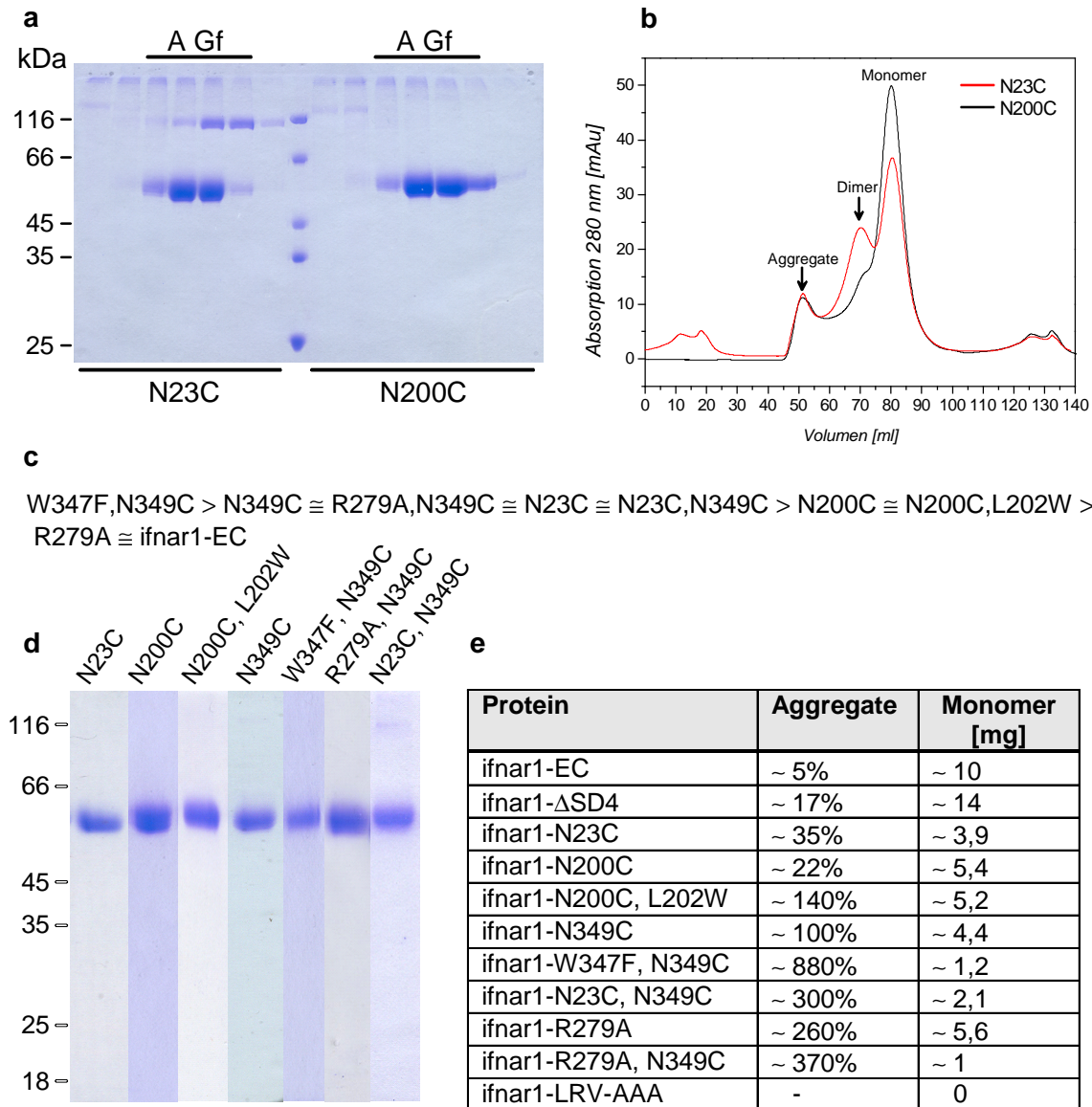


Abbildung 20: Aufreinigung von ifnar1-H10 Einzelcysteinmutanten. Beschriftung der ifnar1-H10-Mutanten nach der Mutation. a: Nicht-reduzierende 12 % SDS-PAGE der Fraktionen nach Elution von der IMAC, A Gf: Fraktionen, die vereinigt für die Gelfiltration verwendet wurden. b: Chromatogramme der Gelfiltrationen (Superdex 200 HiLoad 16/60). c: Tendenz zur Dimerisierung der ifnar1-EC-Mutanten. Abgeschätzt durch das Verhältnis von Aggregaten zu Monomer. d: SDS-PAGE der mittels IMAC und Gelfiltration aufgereinigten ifnar1-H10-Mutanten. e: Übersicht über Ausbeute und Anteil an Aggregaten nach Gelfiltration von verschiedenen ifnar1-H10-Mutanten. Der Anteil der Aggregate ist im Verhältnis zum Monomer berechnet. Die Ausbeute an monomerem Protein bezieht sich jeweils auf 1 l Insektenzellüberstand nach Expression.

Eine Kopplung der mittels IMAC und Gelfiltration gereinigten Cysteinmutanten mit den Fluoreszenzfarbstoffen mittels Maleimid-Reaktion war nicht möglich, da die freien Cysteine nach Expression ins Insektenzellmedium oxidiert vorlagen. Für jede Cysteinmutante wurden die optimalen Reduktionsbedingungen (Reduktionsmittel, Konzentration des Reduktionsmittels, Inkubationsdauer) etabliert. Hierbei wurden die Bedingungen so gewählt,

dass die Disulfidbrücken von ifnar1-EC nicht zerstört wurden. Die korrekte Faltung der Proteine nach Reduktion wurde mittels Gelfiltrationschromatographie überprüft (nicht gezeigt). Die monomeren Fraktionen der Cysteinmutanten wurden mittels Maleimid-funktionalisierten Fluorophorderivaten ortsspezifisch markiert und anschließend mittels Anionenaustauschchromatographie einfach markiertes von mehrfach- bzw. unmarkiertem Protein abgetrennt. Die Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie ist hier nicht explizit für ifnar1-EC dargestellt. Sie erfolgte jedoch analog der Aufreinigung von fluoreszenzmarkiertem ifnar2-EC (Abschnitt 1.3). Um sicherzustellen, dass die Kopplung mit den Fluorophoren nicht zur Aggregation des Proteins führte, wurden alle ifnar1-EC Cysteinmutanten nach Kopplung mit dem jeweiligen Fluorophor und Ionenaustauschchromatographie erneut mittels Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Hierbei zeigte sich, dass die Kopplung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Oregon Green 488 (OG488), Alexa Fluor 488 (AF488), DY 556 und ATTO 655 (AT655) keine Aggregation der jeweiligen ifnar1-EC-Mutanten induzierte. In Abbildung 21b ist exemplarisch das Chromatogramm der Gelfiltration von AF488 markiertem ifnar1-H10 N23C dargestellt. Das Protein eluierte in einem Hauptpeak bei ca. 1,4 ml, welcher monomeres ifnar1-H10 entspricht. Die Identität des Proteins wurde durch Vergleich mit Läufen von unmarkiertem monomeren ifnar1-H10 sowie SDS-PAGE überprüft. Ein kleinerer Peak bei ca. 1 ml Retentionsvolumen entsprach multimerem ^{AF488}ifnar1-H10 N23C. Die mit Coomassie-gefärbten Banden in den SDS-PAGEs sowie die Detektion der Fluoreszenz von ausgewählten im Rahmen dieser Arbeit präparierten fluoreszenzmarkierten ifnar1-H10 Konstrukten sind in Abbildung 21c dargestellt. Alle im Rahmen dieser Arbeit präparierten fluoreszenzmarkierten ifnar1-H10-Mutanten sind tabellarisch in Abbildung 21a aufgelistet.

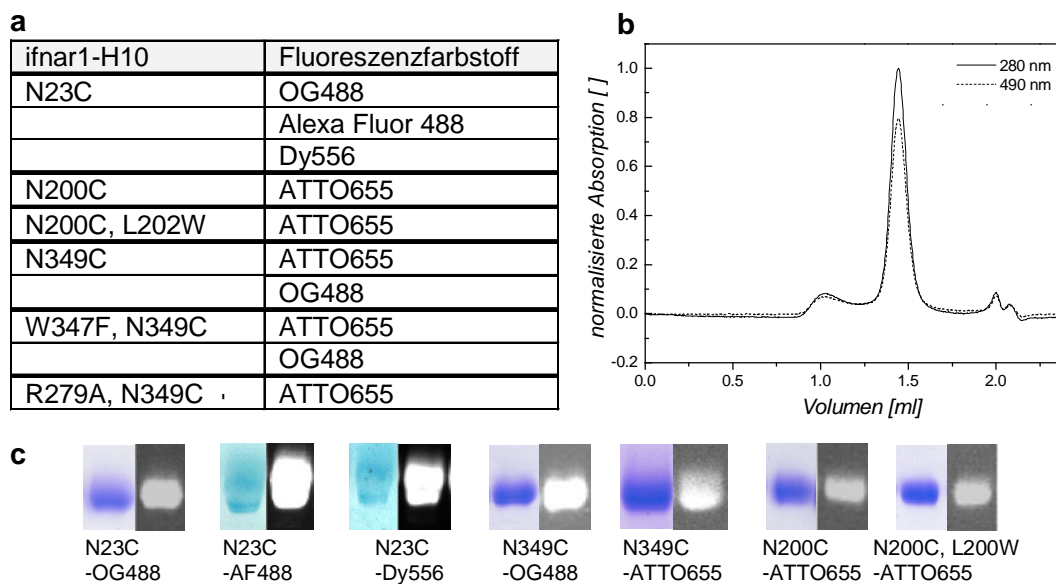


Abbildung 21: Fluoreszenzmarkierung der Cysteinmutanten von ifnar1-H10. a: Übersicht über die präparierten fluoreszenzmarkierten ifnar1-H10-Mutanten. b: Gelfiltrationschromatographie (Superdex 200 PC 3.2/30) von AF488 markiertem ifnar1-H10 N23C. c: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE sowie Detektion der Fluoreszenz ausgewählter fluoreszenzmarkierter ifnar1-H10-Mutanten.

Nach Fluoreszenzmarkierung von ifnar1-H10 N23C mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konnte kein monomeres Protein gewonnen werden. Nach Zentrifugation des markiertem Proteins war ein farbiges Pellet sichtbar und der Überstand lieferte nach Gelfiltration keinen Peak im Chromatogramm (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde mittels analytischer Gelfiltration gezeigt, dass die Proteine nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ teilweise aggregiert vorlagen. Eine finale Gelfiltration nach Fluoreszenzmarkierung stellte demnach einen essentiellen Schritt bei der Präparation von monomeren fluoreszenzmarkierten Proteinen dar.

1.3 Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung von ifnar2-H10 S35C

Für die Kalibrierung der Abstände zwischen tris-NTA-Fluorophor (FRET-Akzeptor) und Fluoreszenzlabel (FRET-Donor) wurde ortsspezifisch fluoreszenzmarkierter ifnar2-H10 benötigt.

Die Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung mittels IMAC und Gelfiltration erfolgte analog der Cysteinmutanten von ifnar1-H10. Jedoch wurden die freien Cysteine, die nach Expression oxidiert vorlagen, mit $300\text{ }\mu\text{M}$ DTT reduziert. Chromatogramme der IMAC und der Gelfiltrationen nach Reduktion sind hier für ifnar2-H10 S35C nicht gezeigt. Nach Gelfiltration wurde etwa 7 mg monomeres ifnar2-H10 S35C aus einem Liter Expressionsansatz erhalten, welcher anschließend mit den Fluoreszenzfarbstoffen OG488 oder AT655 ortsspezifisch markiert wurde. In Abbildung 22 ist exemplarisch die Aufreinigung

von OG488 markiertem ifnar2-H10 S35C mittels Anionenaustauschchromatographie gezeigt. Durch die negative Ladung des Fluoreszenzfarbstoffes erhöht sich die Negativladung von ifnar2-H10 S35C, und das markierte Protein eluierte bei höheren Ionenstärken vom Säulenmaterial. Anhand des Chromatogramms und des Vergleichs der Intensität der Banden in der Coomassie-gefärbten korrespondierenden SDS-PAGE mit der Fluoreszenzintensität eluierte nachweisbar zuerst unmarkierter ifnar2-H10 S35C. Ab einer Leitfähigkeit von ca. 25 mS/cm eluierte einfach markierter ifnar2-H10 S35C, und ab einer Ionenstärke von ca. 33 mS/cm eluierte mehrfach markierter ifnar2-H10 S35C.

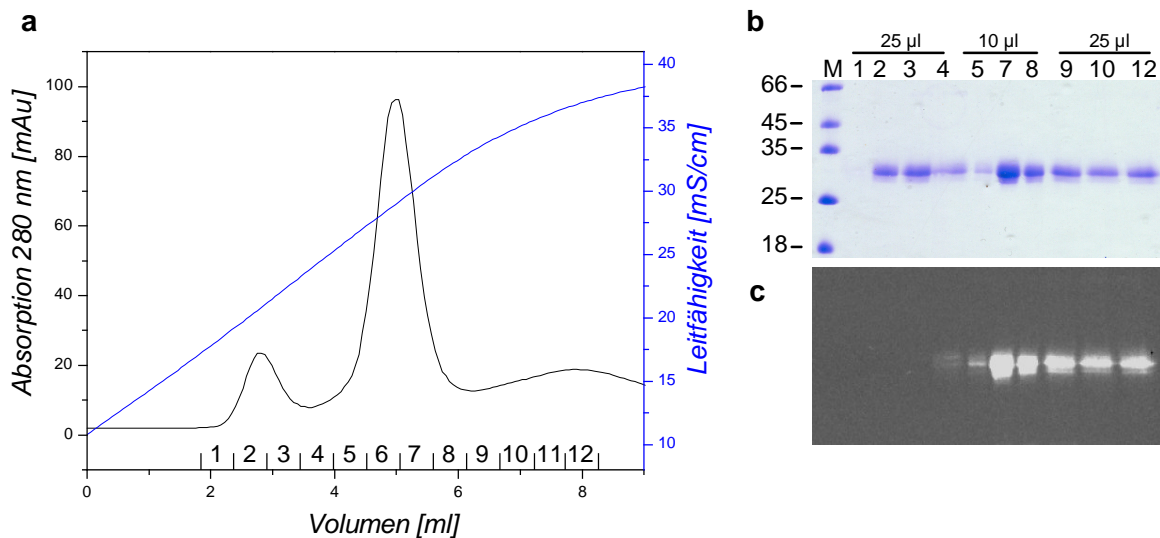


Abbildung 22: Aufreinigung von OG488 markiertem ifnar2-H10 S35C. a: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie. b, c: Korrespondierende 15 % SDS-PAGE der Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie. b: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE. c: Detektion der Fluoreszenz mittels Lumi Imager (Emission bei 520 nm über 10 ms)

Fraktionen mit einfach markiertem ifnar2-H10 S35C wurden zur finalen Aufreinigung vereinigt, mit 1 mM EDTA versetzt und eine Gelfiltration angeschlossen. Hierbei eluierte sowohl AT655 als auch OG488 markierter ifnar2-H10 S35C als monomeres Protein (nicht gezeigt).

1.4 Aufreinigung von ifnar2-EC und Interferonen

Ifnar2-H10, ifnar2-tl (*tagless*) sowie IFN α 2 E58A und IFN α 2-HEQ lagen nach Expression in *E. coli* unlöslich in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vor. Nach Solubilisierung und Renaturierung wurden folgende Mengen an monomeren Proteinen gewonnen. Die Ausbeuten aus einem Liter *E. coli* Kulturvolumen betragen für ifnar2-H10 ~1 mg, für ifnar2-tl ~0,5 mg, für IFN α 2-HEQ ~150 µg und für IFN α 2 E58A ~300 µg. Die Reinheit von ifnar2-H10 und ifnar2-tl war nach Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration größer als 95 %

(Abbildung 23). Die Aufreinigung der Mutanten von IFN α 2 lieferte monomeres Protein, welches eine Verunreinigung mit einer Größe von ca. 30 kDa aufwies. Durch einen weiteren Aufreinigungsschritt über IMAC konnte die Verunreinigung selektiv entfernt werden, da dieses Protein an die Metallionen des Säulenmaterials band. Die Chromatogramme der IMAC und korrespondierenden SDS-Gele zur Entfernung der Verunreinigung sind hier nicht gesondert gezeigt. In Abbildung 23 ist die Reinheit der nach Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und IMAC aufgereinigten IFN α 2-Mutanten mittels SDS-PAGE gezeigt. Die Reinheit der Proteinpräparation konnte durch Durchführung der IMAC von ca. 60 % auf ca. 95 % verbessert werden.

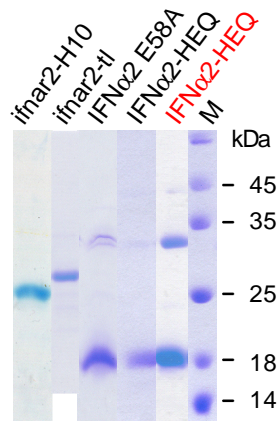


Abbildung 23: 15 % SDS-PAGE von monomerem ifnar2-H10, ifnar2-tl, IFN α 2 E58A und IFN α 2-HEQ (rot markiert: vor zusätzlichem Reinigungsschritt mittels IMAC). M: Marker

2. Überprüfung der Funktionalität von fluoreszenzmarkiertem ifnar1- und ifnar2-EC

Die Interaktion von IFN α 2-HEQ bzw. IFN α 2 mit den fluoreszenzmarkierten Mutanten von ifnar1-EC bzw. ifnar2-EC wurde zusätzlich zu den Messungen in Lösung auch auf Oberflächen mittels RfS [111] untersucht. Dies diente der Überprüfung der Funktionalität von ifnar1-EC und ifnar2-EC nach der Kopplung mit den Fluoreszenzfarbstoffen. Die fluoreszenzmarkierten Mutanten von ifnar1-EC und ifnar2-EC wurden hierzu jeweils über ihren C-Terminalen His-Tag auf fluiden, festkörperunterstützten Lipid-Doppelschichten, welche 5 % Bis-NTA-Lipide enthielten, oder tris-NTA-PEG-Polymer Oberflächen immobilisiert und IFN α 2-HEQ bzw. IFN α 2 unter kontinuierlichen Fluss injiziert. Die Bindung und Dissoziation wurde in Echtzeit detektiert. Alle verwendeten Mutanten zeigten die gleiche Kinetik und Affinität zu IFN α 2-HEQ bzw. IFN α 2 wie unmarkierter ifnar1-EC bzw. ifnar2-EC (nicht gezeigt). Die Fluoreszenzmarkierung beeinträchtigte demnach nicht die Funktionalität von ifnar1-EC und ifnar2-EC hinsichtlich der IFN-Bindung.

3. Einzelpartikelanalyse des Komplexes aus den Ektodomänen des Typ I Interferon Rezeptors mit IFN α 2

3.1 Präparation des ternären Komplexes

Für die Analyse des ternären Komplexes mittels Elektronenmikroskopie (EM) wurde ternärer Komplex bestehend aus den Ektodomänen von ifnar1, ifnar2 und IFN α 2-HEQ bzw. IFN β präpariert. Die Komplexe wurden mittels Uranylformat negativ gefärbt. Zusätzlich wurde auch ternärer Komplex mit ifnar1-H10- Δ SD4 präpariert und mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Das Fehlen einer Ig-ähnlichen Domäne im Komplex mit ifnar1-H10- Δ SD4 erleichterte durch Vergleich mit den anderen Komplexen später die Zuordnung der vom Farbstoff ausgesparten Regionen in den EM-Bildern. Nicht angefärbte Regionen werden im Folgenden als „Dichte“ bezeichnet.

Der ternäre Komplex bestehend aus den Ektodomänen von ifnar1, ifnar2 sowie IFN α 2-HEQ bzw. IFN β wurde durch Mischen der verschiedenen Komponenten im Verhältnis 1: 1,2: 1 und anschließender Gelfiltration präpariert. Für die Präparation des Komplexes mit ifnar1-H10- Δ SD4 wurde analog verfahren. In Abbildung 24 ist exemplarisch die Präparation des ternären Komplexes bestehend aus ifnar1-H10, ifnar2-H10 und IFN α 2-HEQ dargestellt. Der ternäre Komplex eluierte bei 1,35 ml. Der Überschuss an ungebundenen ifnar2-H10 eluierte bei 1,65 ml. Zur Kontrolle wurden auch Gelfiltrationsläufe mit den einzelnen Komponenten sowie des binären Komplexes von ifnar2-H10 und IFN α 2-HEQ durchgeführt, welche in Abbildung 24a vergleichend zur Präparation des ternären Komplexes dargestellt sind. Die Fraktionen, welche für die EM-Studien eingesetzt werden sollten, wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Es wurde bestätigt, dass alle drei Komponenten zusammen von der Gelfiltrationssäule eluierten (Abbildung 24b).

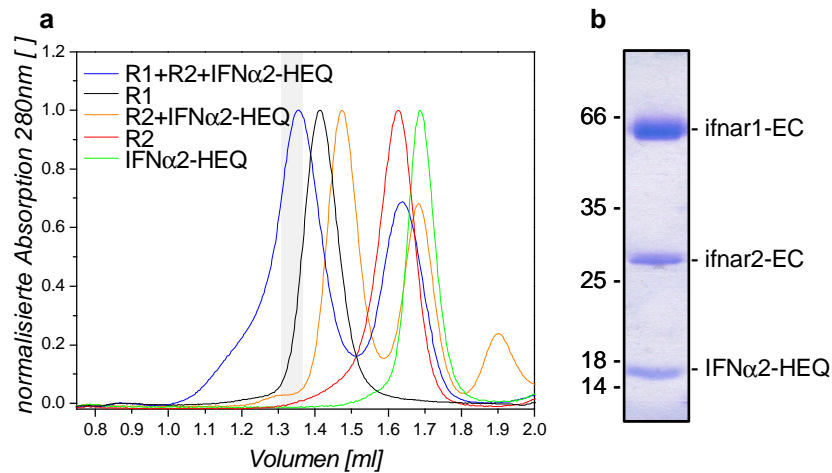


Abbildung 24: Präparation des ternären Komplexes bestehend aus den Ektodomänen von ifnar1 (R1), ifnar2 (R2) und IFN α 2-HEQ mittels Gelfiltration. a: Chromatogramm (Superdex 200 PC 3.2/30) des ternären Komplexes in Vergleich zu den Elutionsprofilen der einzelnen Proteine sowie des binären Komplexes bestehend aus ifnar2-H10 und IFN α 2-HEQ. b: Korrespondierende SDS-PAGE der Fraktion, welche für die Einzelpartikelanalyse eingesetzt wurde (in a grau hinterlegt).

3.2 Architektur des ternären ifnar1-EC- ifnar2-EC- IFN α 2-HEQ- Komplexes

Um die Architektur des ternären Komplexes zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit Thomas Walz und Zongli Li von der Harvard Medical School in Boston der negativgefärbte ternäre Komplex aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Kryo-EM wurde aufgrund der geringen Größe des Komplexes von ca. 100 kDa ausgeschlossen, da diese Methode in gefrorenem Eis nicht ausreichend Kontrast bietet. Die Aufnahmen der Proben ergaben eine Vielfalt von Partikeln, was eine Interpretation der Bilder anfänglich erschwerte (Abbildung 25a). Es ließen sich jedoch Partikel mit ähnlicher Größe und Struktur identifizieren, welche in Abbildung 25a durch Kreise markiert sind und wahrscheinlich dem ternären Komplex entsprachen. Bei den anderen Partikeln könnte es sich um aggregierte oder dissoziierte Komplexe handeln. Zunächst wurden 2748 Partikel ähnlicher Größe von 56 Aufnahmen gewählt und in 50 Klassen eingeteilt. Trotz der geringen Größe des Komplexes waren alle 12,5-kDa großen Ig-ähnlichen Domänen von ifnar1-EC und ifnar2-EC, sowie IFN α 2-HEQ mittels Negativfärbung in den gemittelten Projektionen deutlich erkennbar (nicht gezeigt). Daher wurde eine größere Anzahl (18379) von Partikelpaaren ausgewählt, und die Partikel der Bilder von den planaren Bildern wurden in 50 Klassen zusammengefasst. Ein Teil der Klassen zeigte hierbei Partikel mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften, aber ein Teil der Klassen zeigte eine sehr ähnliche Architektur (Abbildung 25b, Felder 1-6). Die Partikel wiesen eine zentrale Dichte auf, die von sechs weiteren Dichten umschlossen wurde. Die sechs peripheren Dichten bildeten einen Kreis, welcher die zentrale Dichte zu dreiviertel umschloss. Wenige Partikelklassen wiesen eine

kleinere Lücke unterhalb der zentralen Dichte auf, welche die zwei Dichten auf der linken Seite von den vier Dichten auf der rechten Seite trennte (Abbildung 25b, Feld 5 und 6). Die Dichten auf der linken Seite könnten den zwei Ig-ähnlichen Domänen von ifnar2-EC, die vier Dichten auf der rechten Seite denen von ifnar1-EC entsprechen. Zusammen umschließen sie das IFN (schematische Darstellung in Abbildung 25b).

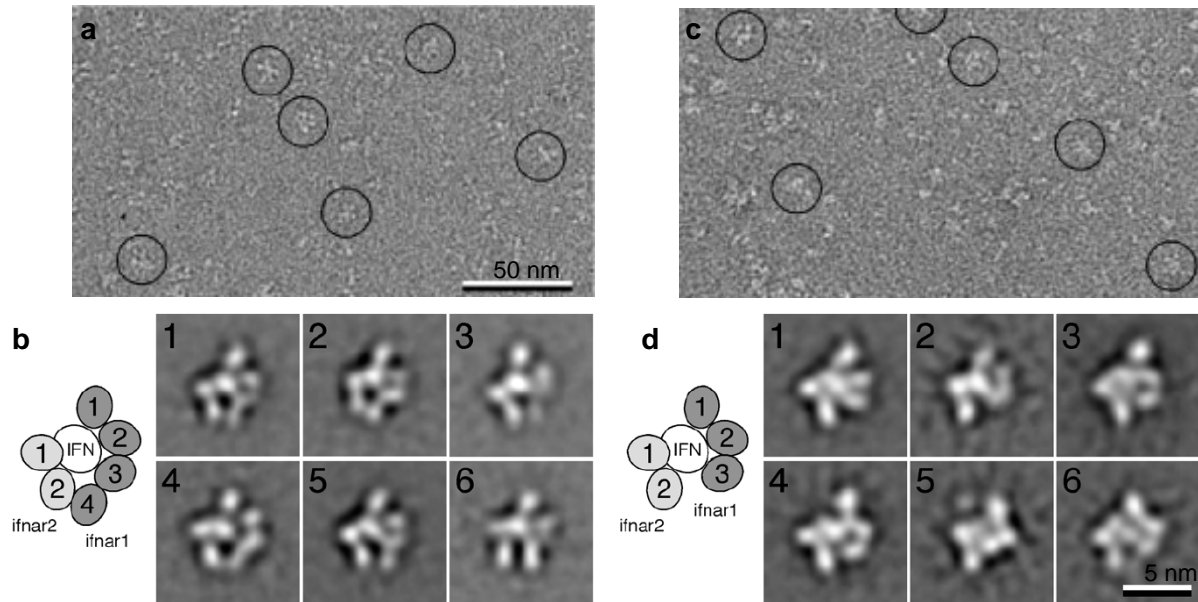


Abbildung 25: Elektronenmikroskopie des negativgefärbten ternären Komplexes aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ (a) bzw. ifnar1-H10- Δ SD4, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ (c). a, c: Aufnahmen von negativ gefärbtem ternären Komplex mit ifnar1-EC (a) und ifnar1-H10- Δ SD4 (c). Ausgewählte Partikel sind durch Kreise gekennzeichnet. b, d: Klassen des ternären Komplexes mit ifnar1-EC (b) und ifnar1-H10- Δ SD4 (d); links daneben sind jeweils die Lokalisation der Ig-ähnlichen Domänen von ifnar1-EC und ifnar2-EC sowie IFN α 2-HEQ dargestellt.

Um die Zuordnung der Dichtekarte zu überprüfen, wurde mit derselben Methode ternärer Komplex untersucht, welcher anstatt der kompletten extrazellulären Domäne von ifnar1, die Deletionsmutante ifnar1-H10- Δ SD4 enthielt. Hier ist die membranproximale Domäne, die nicht in der Bindung der IFNs beteiligt ist, deletiert [88]. In den Elektronenmikroskopiebildern zeigte sich eine ähnliche Heterogenität wie für den ternären Komplex mit ifnar1-EC, aber es konnten wiederum Partikel mit ähnlicher Größe und Struktur identifiziert werden (gekennzeichnet durch Kreise in Abbildung 25c), die klassifiziert wurden. 15084 Partikel aus 112 Bildern wurden hierzu in 50 Klassen eingeteilt (nicht gezeigt). Die Dichte, welche der membranproximalen Domäne von ifnar1-EC zugeordnet worden war, fehlte beim ternären Komplex mit ifnar1-H10- Δ SD4. (Abbildung 25d, Felder 1-6). Hierdurch konnte die korrekte Zuordnung der Dichten eindeutig belegt werden.

3.3 3D-Rekonstruktion und Modellierung des ternären Komplexes mit IFN α 2-HEQ

Zur Berechnung der 3D-Rekonstruktion des ternären Komplexes mittels *random conical tilt approach* wurden Aufnahmen bei 60° und 0° durchgeführt [119]. Es wurden 18379 Partikelpaare von 66 60°/0° Bilderpaaren ausgewählt. Für die 3D-Rekonstruktion des Komplexes bestehend aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ wurden aus den 50 Klassen vier Klassen ausgewählt, welche die eindeutigsten Dichteverteilungen aufwiesen (Abbildung 25b, 1-4). Aus diesen vier Klassen wurden alle Partikel der Bilder mit den um 60° gekippten Proben und 10 % der Partikel von den planaren Aufnahmen zur Berechnung der Dichtekarte verwendet (Abbildung 26).

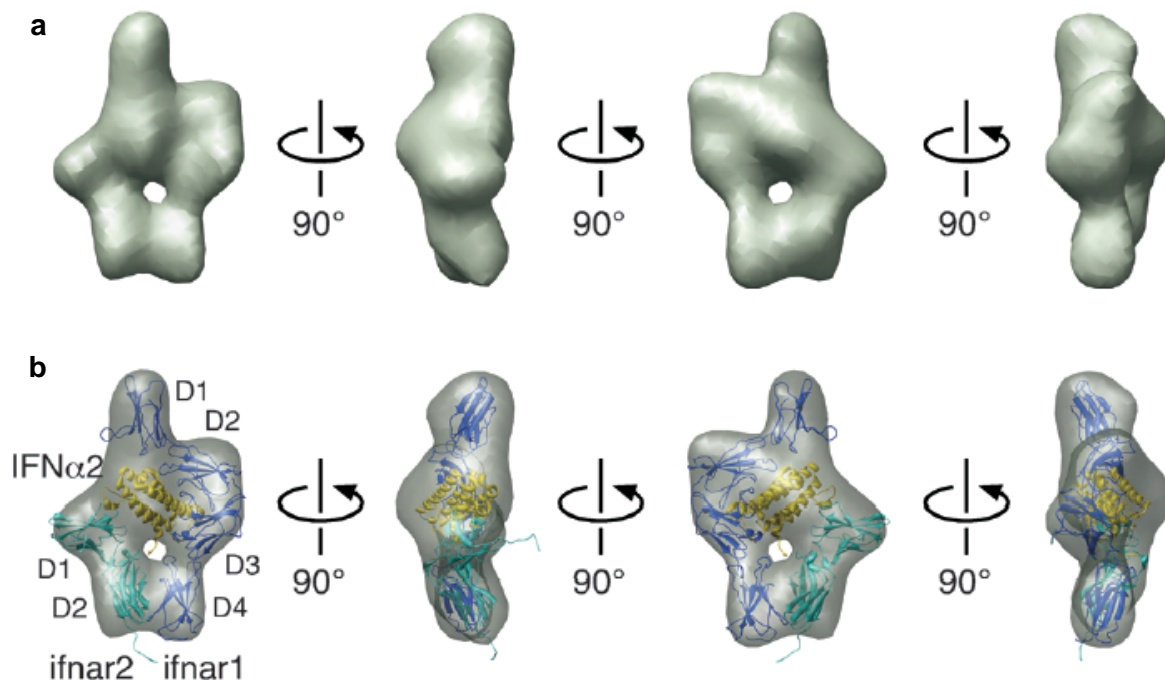


Abbildung 26: 3D-Rekonstruktion des ternären Komplexes aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ. a: Dichtekarte des Komplexes erhalten durch *random conical tilt* Rekonstruktion. b: Dichtekarte mit den eingefügten Modellen von ifnar1-EC (blau), ifnar2-EC (türkis) und IFN α 2-HEQ (gelb).

Die Strukturen bzw. Modelle der einzelnen Komponenten des Komplexes wurden gemäß der Vorhersage der Zuordnung der 2D-Dichtekarten (Abbildung 25b und d) in die 3D-Karte eingefügt. Das mittels NMR ermittelte Modell des binären Komplexes aus ifnar2-EC und IFN α 2 [83] (PDB-Nummer: 2HYM) wurde ohne Modifikationen in die Dichtekarte eingefügt (Abbildung 26b). Für ifnar1-EC wurde ein Homologie-Modell basierend auf der Struktur der Ektodomäne des IFN γ Rezeptors, welcher zu der Klasse II der Zytokinrezeptoren gehört, generiert [120] (PDB-Nummer: 1FYH). Da die Ektodomäne des IFN γ -Rezeptors aus nur zwei Domänen besteht, wird angenommen, dass die zwei weiteren Domänen bei ifnar1-EC durch Gen-Duplikation entstanden sind. [1]. Deshalb wurden zwei separate, identische Modelle für

SD1 und SD2 bzw. SD3 und SD4 für ifnar1-EC generiert. Der Winkel zwischen den jeweiligen Domänen wurde hierbei beibehalten. Die einzelnen Fragmente wurden einzeln in das Modell eingefügt, wobei beachtet wurde, dass der C-Terminus des N-terminalen Fragments sich in räumlicher Nähe zum N-Terminus des C-terminalen Fragments befand. Die beiden Fragmente wurden eingefügt, so dass die in unserer Gruppe durch RfS-Bindungsexperimente identifizierten IFN α 2-Bindungsstellen von ifnar1-EC sich in der Nähe des IFNs befanden (Abbildung 27a und b).

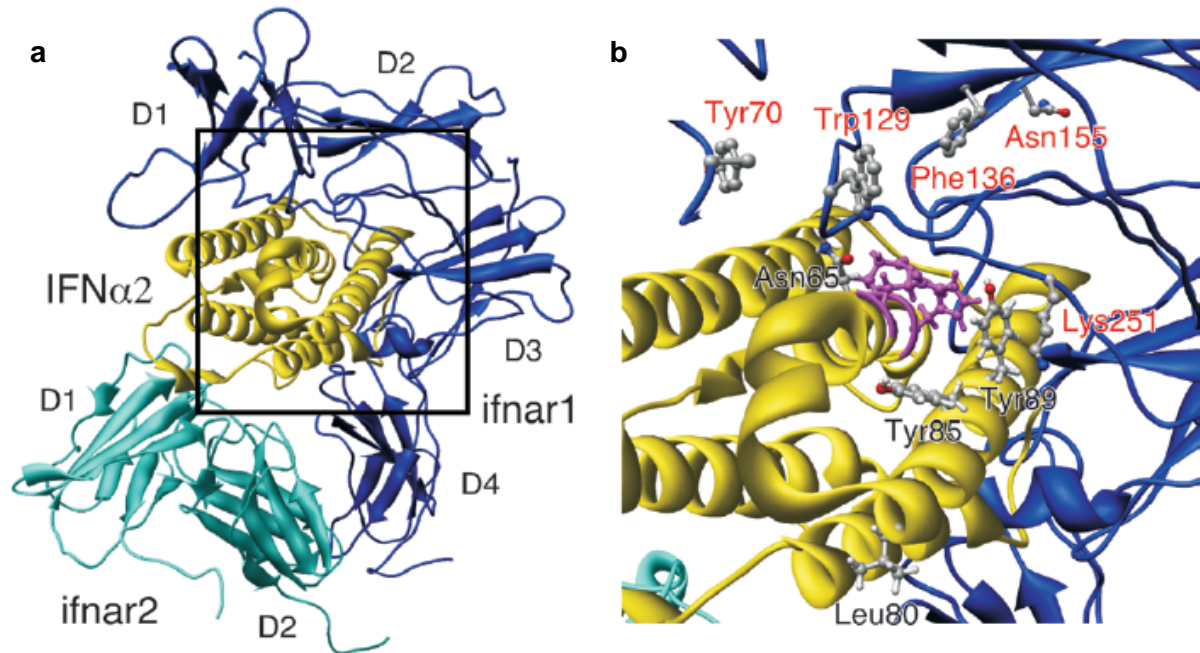


Abbildung 27: Interaktion zwischen ifnar1-EC und IFN α 2-HEQ. a: Ternärer Komplex aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ. Schwarz eingerahmt ist die Region für die Detailansicht. b: Detailansicht der Interaktion zwischen ifnar1-EC und IFN α 2. Die in IFN α 2-HEQ mutierten Reste H57A, E58A und Q61A sind lila markiert. Die durch RfS-Messungen identifizierten Reste für die Interaktion zwischen ifnar1-EC und IFN α 2 sind an ifnar1-EC rot (Tyr 70, Trp 129, Phe 136, Asn 155, Lys 251) und an IFN α 2 schwarz (Asn 65, Leu 80, Tyr 85, Tyr 89) beschriftet.

Da mit dieser Methode nur eine sehr eingeschränkte Auflösung erreicht werden kann, wurden die einzelnen Komponenten visuell in die Dichtekarte eingefügt. Auf weitere Veränderungen mit Hilfe von computerunterstützten Algorithmen wurde verzichtet, da diese aufgrund der Auflösung der Dichtekarte jeder Grundlage entbehrt. Das mit dieser Methode ermittelte Modell des ternären Komplexes aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ spiegelt daher die generelle Architektur des Komplexes wieder und liefert keine hochauflösende Struktur (Abbildung 26). Da bislang keine Struktur eines Klasse II Zytokinrezeptors gelöst wurde, ermöglicht es, einen Eindruck von der generellen Architektur eines solchen Komplexes zu erhalten.

3.4 Architektur des ternären Komplexes aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN β

Typ I Interferone unterscheiden sich hinsichtlich ihrer zellulären Wirkung nach Bindung an den gemeinsamen Interferon Rezeptor. Der Vergleich der Struktur des ternären Komplexes mit verschiedenen Typ I Interferonen könnte Erkenntnisse über die differentielle Signalaktivierung der Interferone liefern. Deshalb wurde analog zum ternären Komplex aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ der ternäre Komplex mit IFN β nach Negativfärbung mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Hierzu wurde der ternäre Komplex durch Mischen der Proteine und anschließender Gelfiltrationschromatographie präpariert. Mittels SDS-PAGE wurden alle drei Komponenten in der für die Elektronenmikroskopie eingesetzten Fraktionen nachgewiesen (nicht gezeigt). In Abbildung 28 sind die mittels Elektronenmikroskopie erhaltenen Aufnahmen der ternären Komplexe mit IFN α 2-HEQ und IFN β gezeigt. Es sind keine fundamentalen Unterschiede in der Architektur für die beiden Typ I Interferone erkennbar. Die differentielle Aktivierung durch IFN α und IFN β beruht demnach nicht auf grundlegenden Unterschieden in der Struktur des Komplexes mit den Ektodomänen aus ifnar1 und ifnar2. Da in den Elektronenmikroskopieaufnahmen keine signifikanten Unterschiede in der Architektur der Komplexe erkennbar waren, wurde auf die Anfertigung einer 3D-Struktur des ternären Komplexes mit IFN β verzichtet.

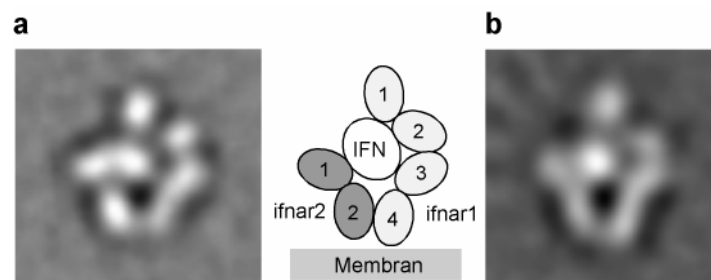


Abbildung 28: Elektronenmikroskopieaufnahmen des ternären Komplexes aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ (a) bzw. IFN β (b) nach Negativfärbung. Mittig ist der Aufbau des ternären Komplexes schematisch dargestellt.

4. Temperaturabhängige Messungen der Ligandenbindung auf Oberflächen

Die Ektodomänen der Rezeptoruntereinheiten wurden jeweils mittels ihres C-terminalen His-*Tags* auf NTA funktionalisierten Oberflächen immobilisiert und die Interaktion mit IFN α 2 bzw. IFN α 2-HEQ mittels SPR bei Temperaturen zwischen 5 und 40 °C analysiert. Für ifnar2-EC zeigte sich eine Zunahme der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante mit der Temperatur, wobei der Effekt für die Dissoziation stärker ausfiel (Abbildung 29a,b,c). Die Arrhenius-Analyse ergab für ifnar2-EC eine Aktivierungsenergie für die Assoziation bzw. Dissoziation von 60 kJ/mol und 85 kJ/mol (Abbildung 29g,h). Die lineare Darstellung nach van't Hoff ergab eine temperaturunabhängige Reaktionsentropie (ΔS^0) von 63 ± 9 J/mol/K und eine Reaktionsenthalpie (ΔH^0) von 27 ± 3 kJ/mol für die Bildung des Komplexes aus IFN α 2 und ifnar2-H10 (Abbildung 29i). Für die Messungen mit ifnar1-EC wurde die Mutante IFN α 2-HEQ verwendet. Daher wurden zur Kontrolle die Messungen für ifnar2-EC analog mit IFN α 2-HEQ durchgeführt. Die Ergebnisse der thermodynamischen Messungen für IFN α 2-HEQ stimmte mit denen für IFN α 2 überein (Daten nicht gezeigt).

Analog wurden thermodynamische Messungen mit der Ektodomäne von ifnar1 durchgeführt. Die Analyse der Interaktion von ifnar1-H10 mit IFN α 2-HEQ zeigte überraschend eine Verringerung der Dissoziationsratenkonstanten mit zunehmender Temperatur bis ca. 30 °C. Bei höheren Temperaturen nahm die Dissoziationsratenkonstante wieder zu (Abbildung 29d). Ein Vergleich der Affinitäten bei einer Temperatur von 5 und 25 °C zeigte, dass die Affinität bei 25 °C geringer als bei 5 °C war (Abbildung 29e,f). Dies war auf die substantielle Zunahme der Dissoziationsratenkonstante bei niedrigen Temperaturen zurückzuführen. Die Auftragung nach van't Hoff lieferte für die Interaktion zwischen ifnar1-H10 und IFN α 2-HEQ einen nichtlinearen Zusammenhang (Abbildung 29i).

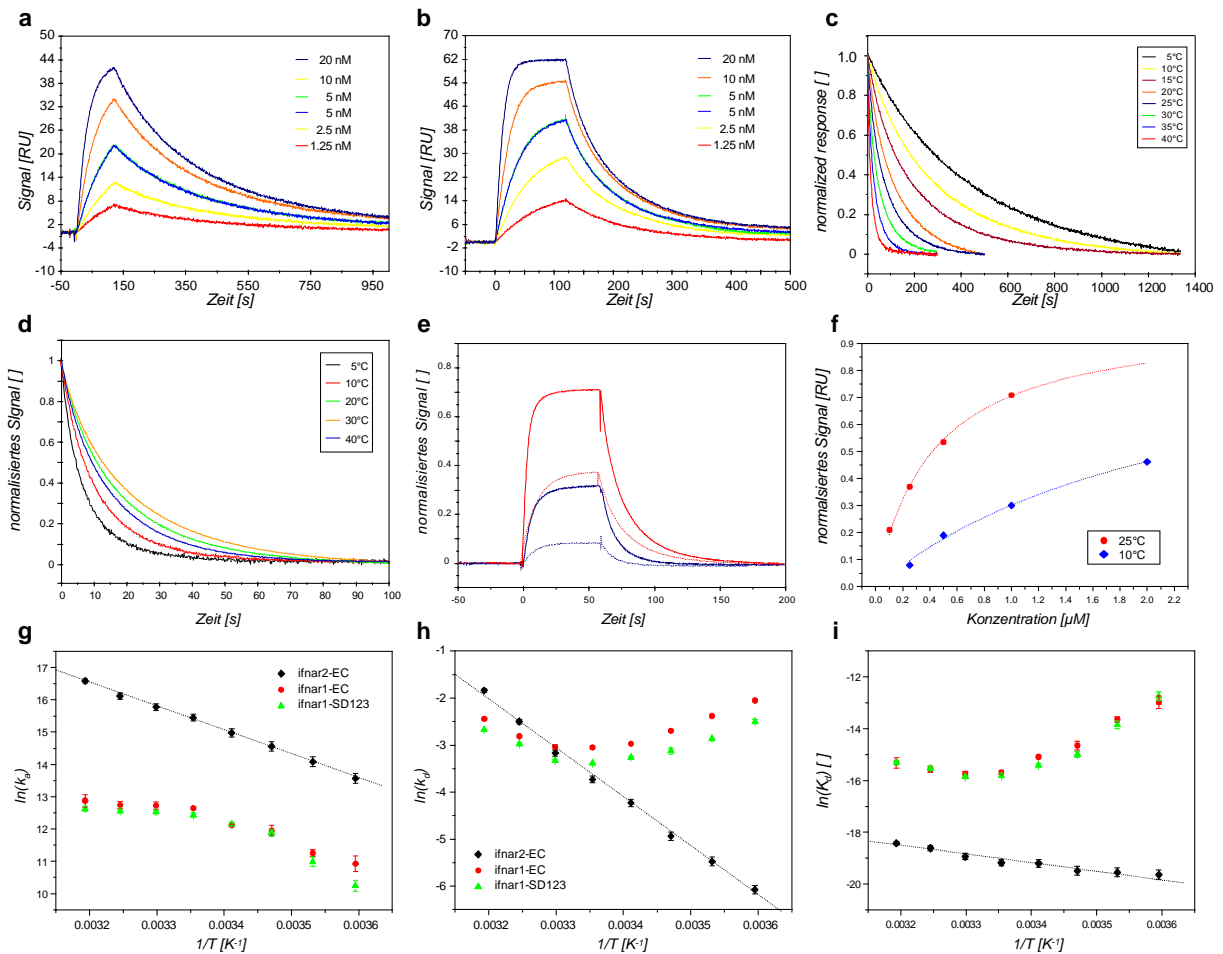


Abbildung 29: Temperaturabhängige Messungen der Rezeptor-Liganden-Interaktion zur Bestimmung thermodynamischer Parameter. Bindungskurven nach Injektion von IFN α 2 verschiedener Konzentrationen an immobilisiertem ifnar2-H10 bei 10 °C (a) und 25 °C (b). Auf das Maximalsignal normalisierte Dissoziationskurven bei verschiedenen Temperaturen von IFN α 2 und ifnar2-H10 (c) bzw. IFN α 2-HEQ und ifnar1-H10 (d). e, f: Interaktion von IFN α 2-HEQ und ifnar1-H10 bei verschiedenen Temperaturen; e: Auf R_{\max} normalisierte Bindungskurven nach Injektion von 250 nM und 1 μ M IFN α 2-HEQ bei 10 °C (blaue Kurve) und 25 °C (rote Kurve). f: Auftragung der Signalintensität im Gleichgewicht bei verschiedenen Konzentrationen an IFN α 2-HEQ bei 10 °C (blaue Kurven) und 25 °C (rote Kurven). Die Kurven wurden nach dem Massenwirkungsgesetz angepasst. Arrhenius-Analyse der Bildung (g) und Dissoziation (h) des IFN α 2 / ifnar2-, IFN α 2-HEQ / ifnar1- und IFN α 2 / ifnar1-H10- Δ SD4-Komplexes. i: Van't Hoff-Plot der Komplexbildung aus IFN α 2 / ifnar2, IFN α 2-HEQ / ifnar1 und IFN α 2 / ifnar1-H10- Δ SD4.

Die Arrhenius-Analyse der Assoziationsratenkonstanten für ifnar1-EC ergab zwischen 20 und 25 °C keine Gerade, sondern eine Änderung der Steigung (Abbildung 29g). Die negative Steigung zwischen 5 und 30 °C für die Dissoziationsratenkonstanten impliziert eine negative Aktivierungsenergie für diesen Temperaturbereich (Abbildung 29h). Negative Aktivierungsenergien werden bei der Proteinfaltung Wärmekapazitätsänderungen im aktivierten Komplex oder temperaturinduzierten Änderungen des Grundzustandes zugeschrieben [121]. Bei gefalteten Proteinen können die negativen Aktivierungsenergien

mit Änderungen des ratenlimitierenden Schrittes von mehrstufigen Reaktionen erklärt werden [122]. Dies könnte bei der temperaturabhängigen Kinetik der IFN-Bindung an ifnar1-EC ein Hinweis auf eine Änderung des ratenlimitierenden Schrittes zwischen 20 und 30 °C sein. Diese Ergebnisse weisen auf eine ligandeninduzierte Konformationsänderung bei ifnar1-EC hin.

5. Analyse von intramolekularen Abstandsänderungen via FRET

Die Ergebnisse der thermodynamischen Messungen wiesen bei der Bindung des Interferons an ifnar1-EC auf einen mehrstufigen Prozess hin. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein FRET-basierter Assay entwickelt, welcher eine mögliche konformationelle Änderung bei ifnar1-EC detektieren und quantifizieren kann. Die besondere Herausforderung bestand darin, das Protein selektiv und ortsspezifisch mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zu koppeln. Die gerichtete Kopplung mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte zum einen kovalent durch die Reaktion von Maleimid-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffen mit dem jeweiligen freien Cystein. Der zweite Fluoreszenzfarbstoff wurde in Form eines tris-NTA-Fluorophor-Konjugats an den C-terminalen His-Tag des Proteins gebunden (vergleiche Abschnitt B.8.1). Dies stellt eine elegante Methode zur Kopplung mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen dar.

Die Energieübertragung über FRET wurde für AF488 und OG488 markierten ifnar1-H10 N23C als Fluoreszenzdonor und ^{AT565}tris-NTA als Fluoreszenzakzeptor im Detail untersucht. Aufgrund der sehr ähnlichen photophysikalischen Eigenschaften von OG488 und AF488 waren ähnliche Effekte zu erwarten. Exemplarisch sind im Folgenden die Ergebnisse für AF488 markierten ifnar1-H10 dargestellt. Durch den Einsatz eines 1,5-fachen Überschuss an ^{AT565}tris-NTA im Verhältnis zu AF488 markiertem ifnar1-H10 N23C (^{AF488}:ifnar1-H10 N23C) ergab sich eine Hintergrundfluoreszenz von AT565. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz von AT565 durch die drei chelatisierten räumlich benachbarten Ni²⁺-Ion stark gelöscht (ca. 80 %) [105]. Nach Bindung an ^{AF488}ifnar1-H10 N23C nahm die Fluoreszenz von ATTO 565 zu. Bei unmarkiertem ifnar1-H10 war hingegen keine Änderung der Fluoreszenz nachweisbar (nicht gezeigt). Nach Ligandenzugabe zeigte sich eine Abnahme der Fluoreszenz von AT565, was mit der detektierten Fluoreszenzzunahme von AF488 markiertem ifnar1-H10 N23C übereinstimmt (Abbildung 30a,b). Zugabe des Liganden IFN α 2-HEQ in Abwesenheit des Akzeptors ergab keine Änderung des Fluoreszenzspektrums von ^{AF488}ifnar1-H10 N23C (Abbildung 30c). Die Reihenfolge der Zugabe von Ligand und tris-NTA-Fluorophor-Konjugat zeigte keinen Einfluss auf die Änderung der Fluoreszenzintensitäten und damit auf die Berechnung der Abstandsänderungen (Abbildung 30c). Für OG488 markierten ifnar1-H10 N23C wurden wie erwartet ähnliche Ergebnisse erhalten.

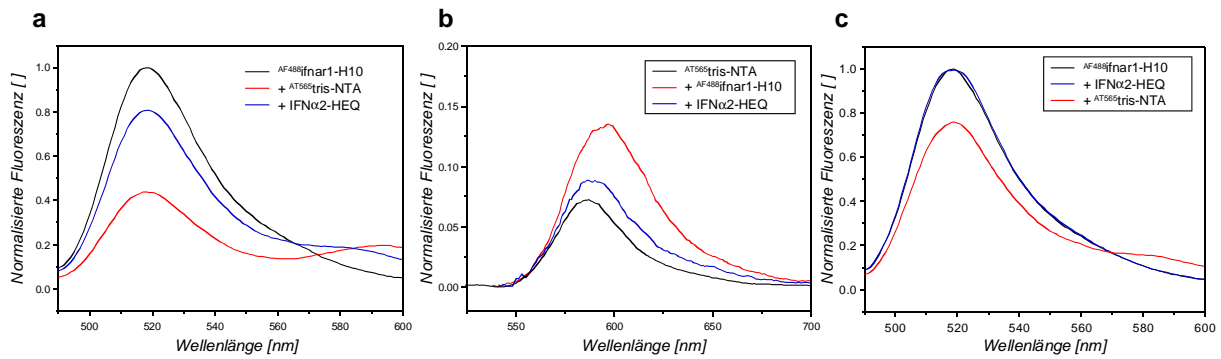


Abbildung 30: FRET-Experimente mit AF488 markiertem ifnar1-H10 N23C und ^{AT565} tris-NTA.
a: Fluoreszenzspektrum von ^{AF488}ifnar1-H10 N23C und nach Bindung von ^{AT565} tris-NTA sowie anschließender Zugabe von IFN α 2-HEQ. b: Fluoreszenz von ATTO 565 aus dem Spektrum in a nach Subtraktion der Fluoreszenz von AF488. c: Fluoreszenzspektrum von ^{AF488}ifnar1-H10 N23C vor und nach Zugabe von IFN α 2-HEQ sowie anschließender Zugabe des Akzeptors ^{AT565} tris-NTA.

Neben Fluoreszenzlöschung durch FRET war auch eine Fluoreszenzlöschung basierend auf dem Elektronentransfer mit den chelatisierten Übergangsmetallionen Ni²⁺ denkbar. Um dies zu untersuchen, wurde ein tris-NTA-Konjugat verwendet, welches mit einer Biotin-Gruppe gekoppelt ist (^{Biotin} tris-NTA) (Abbildung 31a). Nach Bindung von ^{Biotin} tris-NTA an den His-Tag von OG488 markierten ifnar1-H10 trat keine Änderung der Fluoreszenzintensität des OG488 auf. Zur Überprüfung der Bindung von ^{Biotin} tris-NTA an den His-Tag, wurde ein Überschuss an ^{AT565} tris-NTA zugegeben. Nach Zugabe von ^{AT565} tris-NTA zeigte sich keine Änderung der Fluoreszenzintensität, was darauf hindeutet, dass die Bindungsstellen am His-Tag bereits durch Bindung des ^{Biotin} tris-NTA-Konjugats belegt waren (Abbildung 31b). Elektronentransfer mit Ni²⁺ war daher nicht verantwortlich für die Fluoreszenzlöschung. Die Fluoreszenzlöschung nach Bindung der tris-NTA-Fluorophor-Konjugate basierte alleine auf FRET.

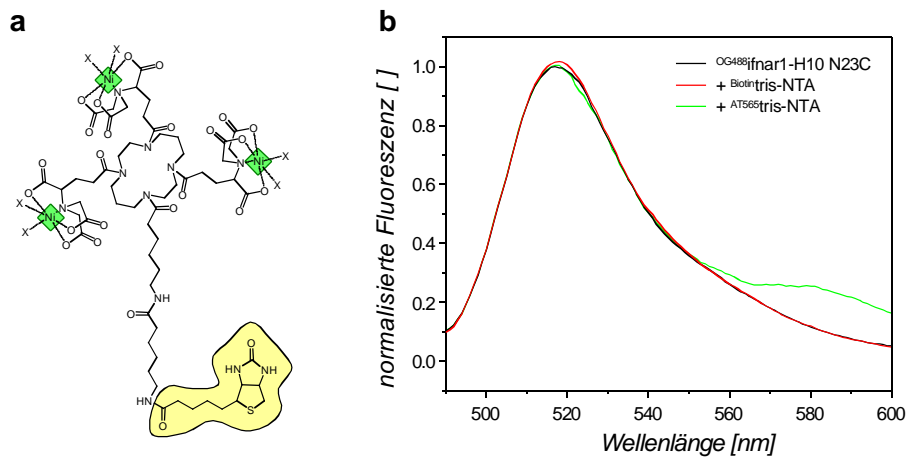


Abbildung 31: a: Struktur von Biotin-tris-NTA. b: Fluoreszenzspektrum von OG488 markiertem ifnar1-H10 N23C vor und nach Zugabe von Biotin-tris-NTA und nachfolgender Zugabe von AT565-tris-NTA.

5.1 Kalibrierung von Abständen mittels fluoreszenzmarkiertem ifnar2-EC

Mit Hilfe von FRET-Experimenten können Aussagen über Abstände und damit über die Architektur von ifnar1-EC gemacht werden. Fluoreszenzlöschungs-Experimente wurden zunächst mit ortsspezifisch OG488 markiertem ifnar2-H10 durchgeführt, da mit Hilfe der bekannten Struktur von ifnar2-EC die Abstände zwischen FRET-Donor und Akzeptor kalibriert werden können. Für die Kalibrierung der FRET-Effizienzen wurden drei ifnar2-EC Einzelcysteinmutanten generiert (Abbildung 32a). Nach Zugabe der FRET-Akzeptoren FEW646-tris-NTA bzw. AT565-tris-NTA banden diese an den His-Tag und löschten abstandsabhängig die Fluoreszenz von OG488. In Abbildung 32b ist exemplarisch das Fluoreszenzspektrum von OG488 markiertem ifnar2-H10 S35C vor und nach Zugabe von FEW646-tris-NTA dargestellt. Die Fluoreszenzlöschung durch FEW646 betrug etwa 20 %. Nach Zugabe des Liganden IFN α 2-HEQ änderte sich die Fluoreszenz nicht.

Es wurden Messungen mit ifnar2-H10, welcher an verschiedenen Positionen mit OG488 markiert wurde, durchgeführt. Die Aminosäuren, welche nach Mutation in Cysteine zur kovalenten Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes an ifnar2-H10 dienen, sind Abbildung 32a zu entnehmen.

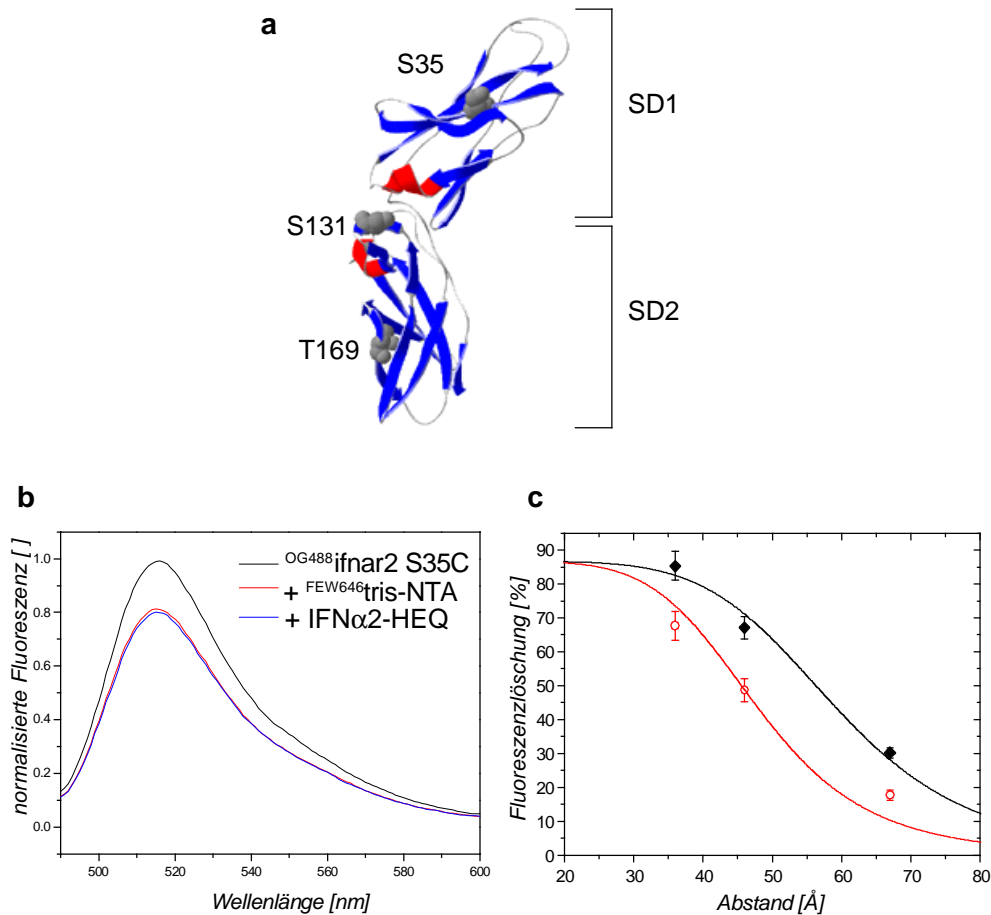


Abbildung 32: Kalibrierung mit OG488 markiertem ifnar2-H10. a: NMR-Struktur der Ektodomäne von ifnar2-EC. Die zur Maleimid-Kopplung in Cysteine mutierten Aminosäuren sind grau markiert. b: Fluoreszenzspektrum von OG488 markiertem ifnar2-H10 S35C vor und nach Zugabe des Akzeptors ^{FEW646}tris-NTA und nach Zugabe von IFN α 2-HEQ. c: Mittels Förster-Gleichung angepasste Kalibrierungskurve der OG488 markierten ifnar2-EC-Mutanten mit ^{AT565}tris-NTA (rot) bzw. ^{FEW646}tris-NTA (schwarz).

Um Unterschiede durch die Wahl des FRET-Partners zu untersuchen, wurden die Messungen sowohl für ^{FEW646}tris-NTA als auch für ^{AT565}tris-NTA durchgeführt. Nach anschließender Zugabe von IFN α 2-HEQ zeigte sich für alle Mutanten keine Änderung der Fluoreszenzintensität. Die Ergebnisse der Messungen mit ^{FEW646}tris-NTA sind exemplarisch in Abbildung 32b gezeigt. Die Kalibrierungskurve in Abbildung 32c wurde mit der Förster-Gleichung angepasst. Aus der Kurve wurde der Förster-Radius für ^{OG488}ifnar2-H10 und ^{FEW646}tris-NTA bzw. ^{AT565}tris-NTA abgeschätzt. Die Försterradien stimmen mit 48 Å und 59 Å für ^{FEW646}tris-NTA bzw. ^{AT565}tris-NTA sehr gut überein mit den aus den Absorptionsspektren und Emissionsspektren bei einer angenommenen Quantenausbeute von 50 % berechneten Försterradien von 47 Å und 58 Å. Abstände konnten aber auch direkt mit Hilfe der Förster-Gleichung berechnet werden, da die Förster-Radien bekannt waren. Der in dieser Arbeit etablierte FRET-basierte Assay ist demnach zur Bestimmung intramolekularer Abstände geeignet.

5.2 Untersuchung der Konformationsdynamik von fluoreszenzmarkiertem ifnar1-EC

Zur Untersuchung der Architektur von ifnar1-EC wurden verschiedene Cysteinmutanten zur ortsspezifischen Fluoreszenzmarkierung generiert. Die Lokalisation der Mutationen sind dem Model von ifnar1-EC in Abbildung 33a zu entnehmen. Der mögliche Abstand zum C-terminalen His-Tag ist für alle mutierten Aminosäuren eingezeichnet. Die Ergebnisse der in Lösung durchgeführten Fluoreszenzlöschungsexperimente mit OG488 markiertem ifnar1-H10 und ^{FEW646}tris-NTA als FRET-Akzeptor sind in Abbildung 33c dargestellt. Die Fluoreszenzlöschung nach Bindung von ^{FEW646}tris-NTA an den C-terminalen His-Tag waren für die ifnar1-H10-Mutanten N23C, S147C und N286C mit ca. 30 % gleich, was auf eine gebogene Konformation von ifnar1-EC hindeutet. Nur in dieser Konformation sollten die Abstände des OG488 zum FRET-Akzeptor für alle Mutanten etwa gleich sein. Auf der Basis des Förster-Radius für OG488 und FEW646 (47 Å) ergab sich ein Abstand zwischen N23C und dem C-Terminus von weniger als 6 nm.

Durch Zugabe des Liganden IFN α 2-HEQ sollte überprüft werden, ob die Bindung eine Auswirkung auf die Orientierung der Subdomänen von ifnar1-EC hat. Hierbei zeigte sich nach Ligandenbindung eine Erhöhung der Donorfluoreszenz für fluoreszenzmarkierte Mutanten in den Subdomänen 1,2 und 4, wobei der Effekt mit 20 % für die N-terminale Domäne am größten war (Abbildung 33c). Dies deutete auf ein Rearrangement der Ig-ähnlichen Domänen hin, welches möglicherweise auf einer ligandeninduzierten Abstandsänderung zwischen N- und C-terminaler Domäne oder auf einem Verlust der Flexibilität in der Linkerregion zwischen SD2 und SD3 beruhte. Um zu überprüfen, ob die Fluoreszenzlöschung auf die Bindung des tris-NTA-Fluorophors an den His-Tag von ifnar1-EC basierte, wurde Imidazol zugeben. Die Fluoreszenzintensität von ^{OG488}ifnar1-H10 N23C erreichte nach Dissoziation des tris-NTA-Konjugats vom His-Tag wieder den Ausgangswert vor Zugabe des Konjugats (Abbildung 33b). Zur Überprüfung der Spezifität der Fluoreszenzzunahme nach Ligandenbindung wurde IFN α 2-HEQ in Abwesenheit des Akzeptors ^{FEW646}tris-NTA zugegeben. Es zeigte sich hierbei für alle Mutanten, außer für ^{OG488}ifnar1-H10 N349C, keine Fluoreszenzzunahme nach Ligandenbindung. Die Fluoreszenzspektren von OG488 markiertem ifnar1-H10 N23C und ifnar1-H10 N349C und nach Zugabe von IFN α 2-HEQ sind exemplarisch in Abbildung 33e und f dargestellt.

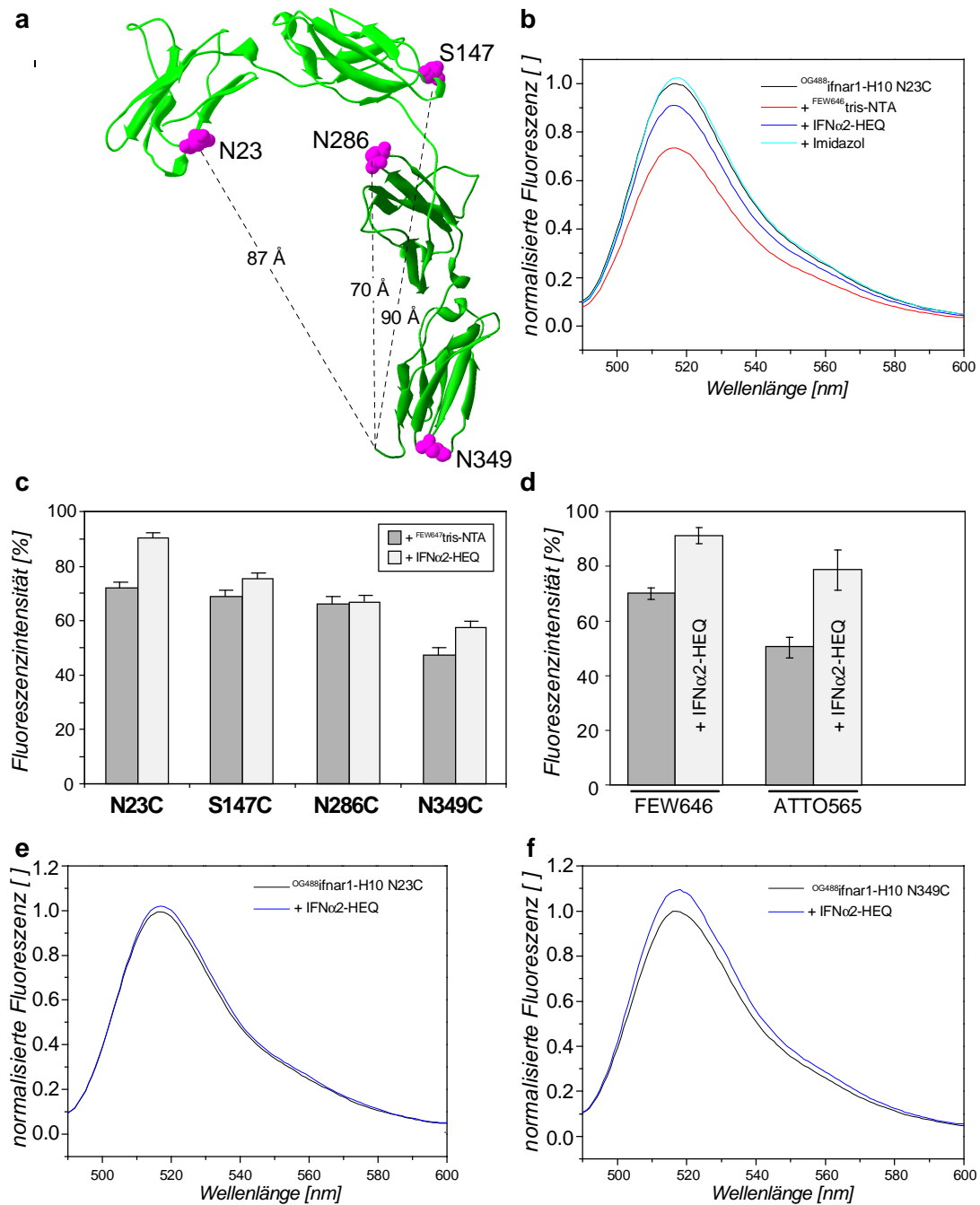


Abbildung 33: Fluoreszenzlöschung in Lösung. a: Modell von ifnar1-EC, mutierte Aminosäuren sind magenta markiert. Abstand zum His-Tag (-----). b: Fluoreszenzspektrum von OG488 markiertem ifnar1-H10 N23C vor (schwarz) und nach Zugabe von FEW646 tris-NTA (rot) und nach Zugabe von IFN α 2-HEQ (blau). Die Dissoziation von FEW646 tris-NTA erfolgte durch Zugabe von 50 mM Imidazol (türkis). c: Ergebnis der Fluoreszenzmessungen in Lösung mit OG488 markierten ifnar1-H10-Mutanten nach Zugabe des FRET Akzeptors FEW646 tris-NTA und IFN α 2-HEQ. d: Vergleich für verschiedene tris-NTA-Fluorophor-Konjugate. Relative Fluoreszenzintensität von OG488 ifnar1-H10 N23C nach Zugabe von FEW646 tris-NTA oder AT565 tris-NTA, sowie nach Zugabe von IFN α 2-HEQ. e, f: Fluoreszenzspektrum von OG488 ifnar1-H10 N23C (e) bzw. OG488 ifnar1-H10 N349C (f) und nach Zugabe von IFN α 2-HEQ.

Überraschend war die Fluoreszenzintensitätserhöhung nach Ligandenbindung für die membranproximale Domäne, die hier aufgrund des geringen Abstandes keine große

Abstandsänderung zwischen Donor und Akzeptor zu erwarten gewesen wäre. Außerdem zeigte OG488 markierter ifnar1-H10 N349C auch ohne Zugabe des FRET-Akzeptors eine Fluoreszenzintensitätserhöhung nach Ligandenzugabe (Abbildung 33f). Dieser Effekt konnte durch weitere Untersuchungen geklärt werden (Abschnitt E.7.).

Neben den Messungen mit ^{FEW646}tris-NTA wurde auch das mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 565 gekoppelte tris-NTA-Konjugat (^{AT565}tris-NTA) als FRET-Akzeptor für Fluoreszenzlöschungsexperimente verwendet. Der Farbstoff ATTO 565 weist ein größeres Überlappungsintegral mit OG488 auf und stellt daher einen effizienteren FRET-Akzeptor für OG488 dar. In Abbildung 33d sind die Ergebnisse der Messungen mit OG488 markiertem ifnar1-H10 N23C für beide FRET-Akzeptoren vergleichend dargestellt. OG488 überträgt seine Energie auf ^{AT565}tris-NTA etwa um 25 % besser als auf ^{FEW646}tris-NTA.

Mit Hilfe des berechneten Förster-Radius für OG488 und ATTO 565 wurde der Abstand zwischen der N-terminalen Domäne (N23) und dem C-Terminus ohne Ligandenbindung auf ~ 6 nm bestimmt und die Messungen mit ^{FEW646}tris-NTA bestätigt. In dem in dieser Arbeit mittels Elektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktion erstellten Modells des Komplexes aus ifnar1-EC und IFN α 2 beträgt der Abstand jedoch ~ 11 nm. Auch bei den Fluoreszenzmessungen nahm nach Ligandenbindung die Fluoreszenzintensität zu, was auf einer Abstandszunahme zwischen dem N- und dem C-Terminus beruht. Basierend auf den ermittelten Förster-Radien wurden Abstände vor der Ligandenbindung (~ 56 Å) und nach der Ligandenbindung (~ 67 Å) bestimmt. Die berechneten Abstände waren unabhängig von der Wahl des FRET Partners. Ein möglicher Grund für die Diskrepanz der mittels Elektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktion bzw. FRET-Analyse berechneten Abstände zwischen N23 und dem C-Terminus von 110 Å bzw. 67 Å könnte eine unvollständige Sättigung der Bindungsstellen von ifnar1-EC bei den FRET-Analysen sein. Außerdem lieferte die Strukturanalyse mittels Elektronenmikroskopie eine limitierende Auflösung. Nach Ligandenbindung bewegt sich demnach die N-terminale Domäne ~ 13 Å von der C-terminalen Domäne weg. Dies könnte möglicherweise auf einer flexiblen Organisation der Ig-ähnlichen Domänen beruhen.

Für die Messungen mit AF488 markiertem ifnar1-H10 N23C wurde als FRET-Akzeptor ^{AT565}tris-NTA eingesetzt. Die Ergebnisse der Messungen in Lösung mit AF488 markiertem ifnar1-H10 N23C sind in Abbildung 34 dargestellt. Nach Zugabe von ^{AT565}tris-NTA wurde die Fluoreszenz von ^{AF488}ifnar1-H10 N23C um ca. 55 % gelöscht. Nach Zugabe von IFN α 2-HEQ zeigte sich eine Fluoreszenzzunahme um ca. 30 %. Die Fluoreszenzänderung nach Zugabe des Liganden IFN α 2-HEQ war unabhängig von der Anwesenheit von ifnar2-tl im Komplex. Auch nach Zugabe von IFN β im Komplex mit ifnar2-tl zeigte sich eine ähnliche Fluoreszenzzunahme. Dies bewies, dass die ligandeninduzierte Konformationsänderung

unabhängig von der Anwesenheit von ifnar2-EC im Komplex war. Außerdem unterschied sich die Abstandsänderung nicht für die verwendeten IFN-Subtypen. Die Unabhängigkeit von der Anwesenheit von ifnar2-EC sowie vom verwendeten IFN-Subtyp zeigte sich auch für OG488 markierten ifnar1-H10 N23C und verschiedene FRET-Akzeptoren (nicht gezeigt).

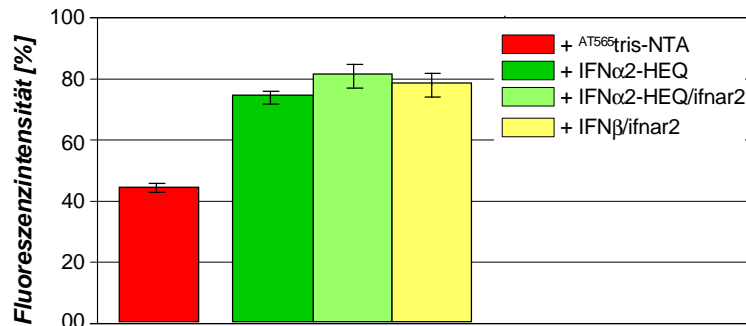


Abbildung 34: Fluoreszenzintensität von AF488 markierten ifnar1-H10 N23C nach Zugabe von ^{AT565}tris-NTA und Fluoreszenzzunahme nach Zugabe von verschiedenen Typ I Interferonen. Die Interferone wurden entweder alleine oder im binären Komplex mit ifnar2-tl zugegeben.

5.3 Fluoreszenz-Lebensdauermessungen

Die Fluoreszenz-Lebensdauermessungen und die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie wurden in Zusammenarbeit mit Ingo Gregor und Jörg Enderlein am Forschungszentrum Jülich durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die beobachtete Änderung der Abstände zwischen N- und C-terminaler Subdomäne von ifnar1-EC auf einer Flexibilitätsänderung beruht, wurde der intramolekulare FRET über Lebensdauermessungen verfolgt. Insgesamt nahm die Fluoreszenz-Lebensdauer nach Zugabe der Akzeptoren ^{AT565}tris-NTA (Abbildung 35a) bzw. ^{FEW646}tris-NTA (Abbildung 35b) ab, wobei es nach Ligandenbindung zu einer Zunahme der Fluoreszenz-Lebensdauer kam. Quantitativ stimmten diese Ergebnisse sehr gut mit den Fluoreszenzintensitätsmessungen in Lösung überein, bei denen auch stärkere Effekte für ^{AT565}tris-NTA detektiert wurden. Da der Effekt, wie erwartet, für ^{AT565}tris-NTA größer war, wurden diese Messungen detailliert ausgewertet. Alle Proben zeigten ein bi-exponentielles Verhalten, was auf zwei mögliche Zustände des OG488 Farbstoffes hindeutet. Gründe könnten in der Flexibilität des Linkers zum Fluorophor liegen, die es dem Farbstoff ermöglicht, zwei verschiedene Positionen am Protein einzunehmen oder einer möglichen Flexibilität von ifnar1-EC.

OG488 markierter ifnar1-H10 alleine weist zwei Lebensdauern von ~ 2.3 ns und ~ 4 ns auf. Nach Bindung von ^{AT565}tris-NTA nehmen beide Lebensdauern ab, wobei der Effekt für die kleinere Lebensdauer stärker ausfällt. Nach Bindung des Liganden nehmen beide Lebensdauern wieder zu, wobei auch diesmal der Effekt stärker für die geringere Lebensdauer ausfällt. Um die FRET-Effizienz und die Abstände zu berechnen, wurden beide

Komponenten unabhängig voneinander betrachtet. Die Quantenausbeute der Komponenten wurden mit Hilfe der Fluoreszenz-Ratenkonstante $k_{fl} = 0.281 / \text{ns}$ berechnet. Aufgrund der bekannten Förster-Radien konnte auf eine Abstandsänderung des His-Tags von etwa 1,2 bis 1,4 nm zur N-terminalen Domäne geschlossen werden. Dies bestätigt die mittels Fluoreszenzintensitätsmessungen bestimmte Abstandsänderung von ca. 13 Å. Die Ergebnisse weisen aber auch auf eine eher flexible Anordnung der Ig-ähnlichen Domänen hin, welche durch Bindung von IFN rigider wird. Letztendlich konnten diese Messungen nicht eindeutig klären, ob die Änderung der Fluoreszenzlebensdauern auf einer möglichen Flexibilitäts- oder Konformationsänderung in der Ektodomäne von ifnar1 beruhen.

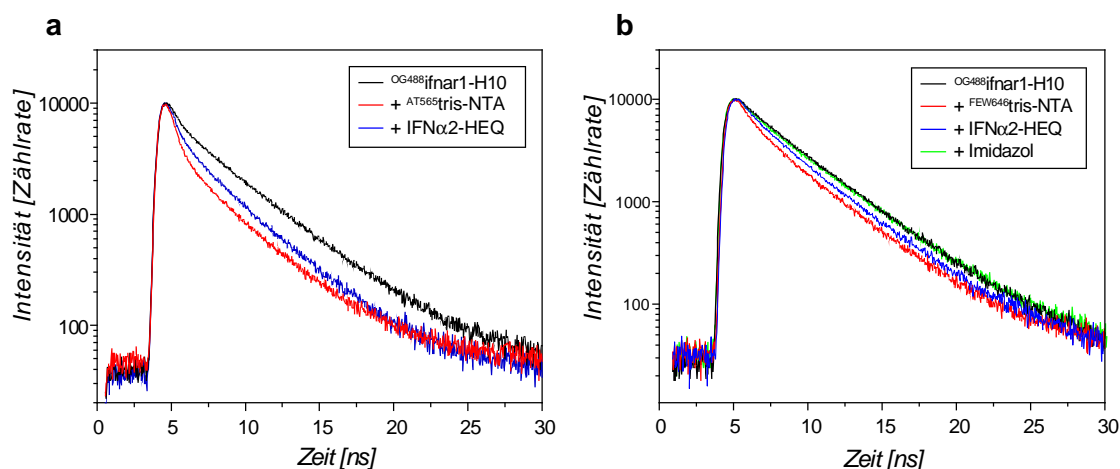


Abbildung 35: Mittels Fluoreszenzlebensdauer-Spektroskopie bestimmte Fluoreszenzlöschung von OG488 -ifnar1-H10 N23C vor und nach Zugabe von AT565 -tris-NTA (a) bzw. FEW646 -tris-NTA (b) und anschließender Zugabe von IFN α 2-HEQ (a, b). Zuletzt wurde Imidazol hinzugegeben (b).

5.4 Charakterisierung der Konformationsänderung von ifnar1-EC mittels FCS

Für Messungen auf Einzelmolekülniveau wurde ifnar1-H10 N23C mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Dy556 ortsspezifisch über das freie Cystein markiert. Es wurden diese Farbstoffe gewählt, da sie eine höhere Photostabilität als OG488 besitzen. Leider konnte für Cy3 und Dy556 markierten ifnar1-H10 nach Markierung kein stabiles, monodisperses Protein gewonnen werden. Daher wurde für Messungen auf Einzelmolekülebene AF488 markierter ifnar1-H10 N23C als FRET-Donor und AT565 -tris-NTA als FRET-Akzeptor eingesetzt. Es sollte die Natur des Rearangements der Subdomänen von ifnar1-EC auf Einzelmolekülniveau mittels TR-FCS näher untersucht werden. Messungen zeigten, dass AF488 markierter ifnar1-H10 N23C mit AT565 -tris-NTA als FRET-Akzeptor geeignet erschien, da hier die ligandeninduzierte Fluoreszenzintensitätsänderung mit ca. 30 % relativ hoch war (vergleiche E.5.2) und daher auch auf Einzelmolekülebene wahrscheinlich gut detektierbar sein würde. Zudem ist AF488 photostabil. Änderungen von FRET-Effizienzen aufgrund von Änderungen der Dynamik von ifnar1-EC sollten bei der

Autokorrelationskurve zu einer zusätzlichen Abklingzeit führen. Die Autokorrelationskurven für AF488 markierten ifnar1-H10 sind in Abbildung 36a,b dargestellt. Nach Zugabe von ^{AT565}tris-NTA war eine Veränderung der Kurvenform sichtbar, welche nach anschließender Ligandenzugabe die Ausgangsform wieder annahm (Abbildung 36a). Beim Komplex aus ^{AF488}ifnar1-H10 N23C / ^{AT565}tris-NTA war eine Fluoreszenzlöschung detektierbar, welche nach Ligandenbindung komplett verschwand. Ohne Zugabe von ^{AT565}tris-NTA war keine Änderung des Kurvenverlaufs nach Ligandenzugabe erkennbar (Abbildung 36b). Die detaillierte Auswertung ergab nach Bindung des FRET Akzeptors eine zusätzliche Autokorrelationszeit von $\sim 200 \mu\text{s}$, die der konformationellen Dynamik von ifnar1-EC (ohne Liganden) zugeordnet werden konnte. Die Ergebnisse weisen auf eine Flexibilität der Konformation von ifnar1-EC hin, die nach Ligandenbindung verloren geht. Da alle drei N-terminalen Domänen von ifnar1-EC in der Ligandenbindung beteiligt sind, könnte die Flexibilität in der Linkerregion zwischen SD2 und SD3 eingeschränkt werden. Die Amplitude der Fluoreszenzlöschung betrug $\sim 1/4$ der Amplitude für die Diffusion.

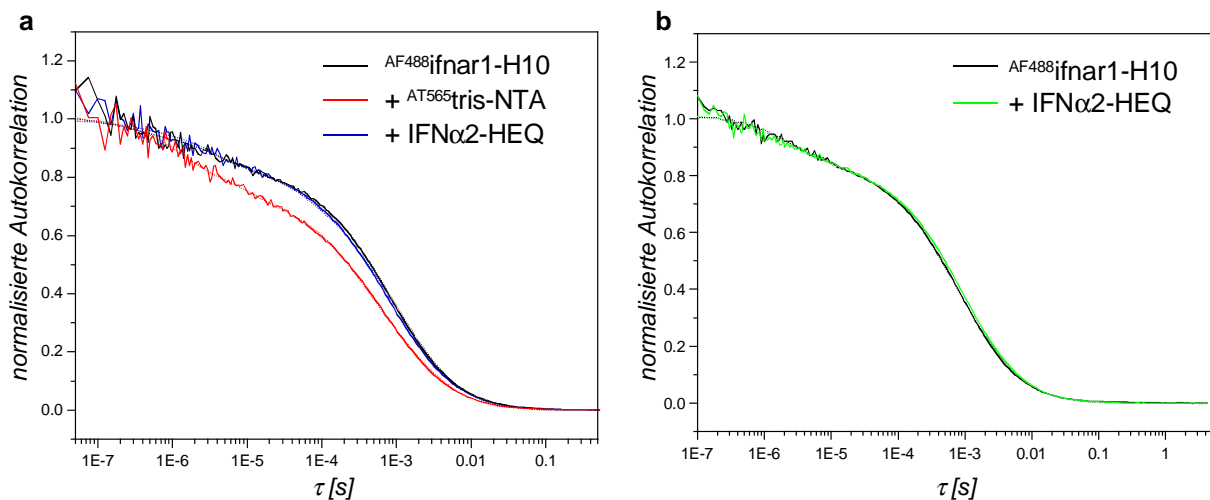


Abbildung 36: Analyse der ligandeninduzierten Konformationsänderung von ifnar1-EC mittels FCS. a: Autokorrelationskurven für AF488 markierten ifnar1-H10 N23C alleine und nach Bindung von ^{AT565}tris-NTA und IFN α 2-HEQ. b: Autokorrelationskurven für ^{AF488}ifnar1-H10 N23C alleine und nach Bindung von IFN α 2-HEQ.

Messungen mit OG488 markiertem ifnar1-H10 N23C führten zu sehr ähnlichen Ergebnissen (nicht gezeigt).

6. Untersuchungen zu der Dynamik in der Linkerregion zwischen den Zytokinbindemodulen

Die in Abschnitt E.5.2 beschriebene Konformationsänderung von ifnar1-EC sowie der modulare Aufbau von ifnar1-EC lässt vermuten, dass zwischen den zwei Zytokinbindemodulen ein flexibler Linker die Abstandsänderung nach Ligandenbindung vermittelt. Um eine mögliche ligandeninduzierte Konformations- oder Flexibilitätsänderung in der Linkerregion zu untersuchen, wurde in der Linkerregion zwischen SD2 und SD3 der Asparaginrest 200 zur Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 655 in ein Cystein mutiert. Außerdem wurde eine Mutante generiert, welche zusätzlich in Position 202 anstatt des Lysins ein Tryptophan trägt. Tryptophan löscht die Fluoreszenz von ATTO 655 durch Elektronentransfer [123]. Für beide Mutanten war keine Fluoreszenzänderung nach Ligandenzugabe detekierbar (Abbildung 37a). Die Bindung des Interferons führte demnach nicht zu einer Änderung der Zugänglichkeit des Tryptophans für ATTO 655. Dies könnte daran liegen, dass an dieser Position in der Linkerregion keine Konformationsänderung stattfindet. Wahrscheinlicher jedoch ist, dass trotz Konformationsänderung sich aufgrund der Flexibilität des gekoppelten ATTO 655 noch Kontakt zu dem Tryptophan möglich ist. Ein Vergleich der absoluten Fluoreszenzintensitäten von AT655 ifnar1-H10 N200C mit ATTO 655 markiertem ifnar1-H10 N200C, L202W zeigte, dass die Fluoreszenz um ca. 50 % bei AT655 ifnar1-H10 N200C, L202W gelöscht wird (nicht gezeigt). Die Funktionalität der fluoreszenzmarkierten Konstrukte wurde mittels RfS überprüft. Die Bindungskurve für ATTO 655 markierten ifnar1-H10 N200C, L202W mit IFN α 2-HEQ ist exemplarisch in Abbildung 37b gezeigt.

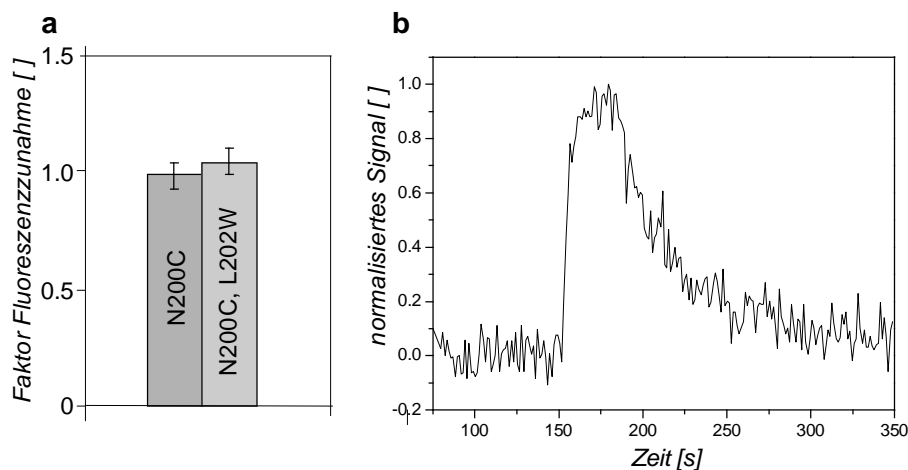


Abbildung 37: a: Fluoreszenzlöschungsexperimente durch Elektronentransfer in Lösung von ATTO 655 markiertem ifnar1-H10 N200C und N200C, L202W nach Zugabe von IFN α 2-HEQ. b: Überprüfung der Aktivität von AT655 ifnar1-H10 N200C, L202W. Mittels RfS detektierte Bindung von IFN α 2-HEQ an AT655 ifnar1-H10 N200C, L202W.

7. Propagation der Konformationsänderung in die membranproximale Domäne von ifnar1-EC

7.1 Messungen in Lösung und auf Oberflächen

Die Untersuchungen mit OG488 markiertem ifnar1-H10 nach Bindung des FRET-Akzeptors an den *His-Tag* zeigten nach Zugabe von IFN α 2-HEQ überraschend eine Fluoreszenzerhöhung auch für ^{OG488}ifnar1-H10 N349C. Diese Fluoreszenzerhöhung könnte auf einem Elektronentransfer zwischen dem OG488 und dem benachbarten Tryptophanrest 347 basieren. Um die Fluoreszenzintensitätsänderung in der membranproximalen Domäne von ifnar1-EC nach Ligandenbindung näher zu untersuchen, wurde an Position 349 anstatt des OG488 der Oxazin-Fluoreszenzfarbstoff ATTO 655 gekoppelt, dessen Fluoreszenz durch Elektronentransfer mit Tryptophan gelöscht wird [123]. Die Positionen zur Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff sowie die Lokalisation des benachbarten Tryptophans sind in Abbildung 38a dargestellt.

Messungen in Lösung ergaben eine Fluoreszenzintensitätserhöhung von über 100 % nach Zugabe von IFN α 2-HEQ. Nach Ligandenbindung ändert sich demnach die Zugänglichkeit des Tryptophans für den Fluoreszenzfarbstoff ATTO 655. Um die Spezifität dieses Effektes zu untersuchen wurde ein Überschuss von unmarkiertem ifnar1-H10 hinzugegeben. Nach Zugabe von unmarkiertem ifnar1-H10 erreichte die Fluoreszenzintensität wieder das Niveau vor Ligandenzugabe (Abbildung 38b). Dies deutet auf eine ligandeninduzierte Änderung der Zugänglichkeit des Tryptophans und damit auf eine konformationelle Änderung nach Ligandenbindung in der membranproximalen Domäne hin.

Die Untersuchung der Fluoreszenzzunahme nach Ligandenbindung wurde ebenfalls auf Oberflächen mittels RIfS und TIRFS untersucht. Hierzu wurde die ATTO 655 markierte extrazelluläre Domäne von ifnar1 auf Bis-NTA-Lipid-Doppelschichten immobilisiert und simultan die IFN-Bindung sowie die Fluoreszenz detektiert. Der Vergleich der Signale während der Interferoninjektion zeigt, dass die Interferonbindung und Fluoreszenzzunahme die gleiche Kinetik aufweisen (Abbildung 38c und d). Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich bei der detektierten Fluoreszenzzunahme um eine ligandeninduzierte Konformationsänderung bei ifnar1-EC handelte.

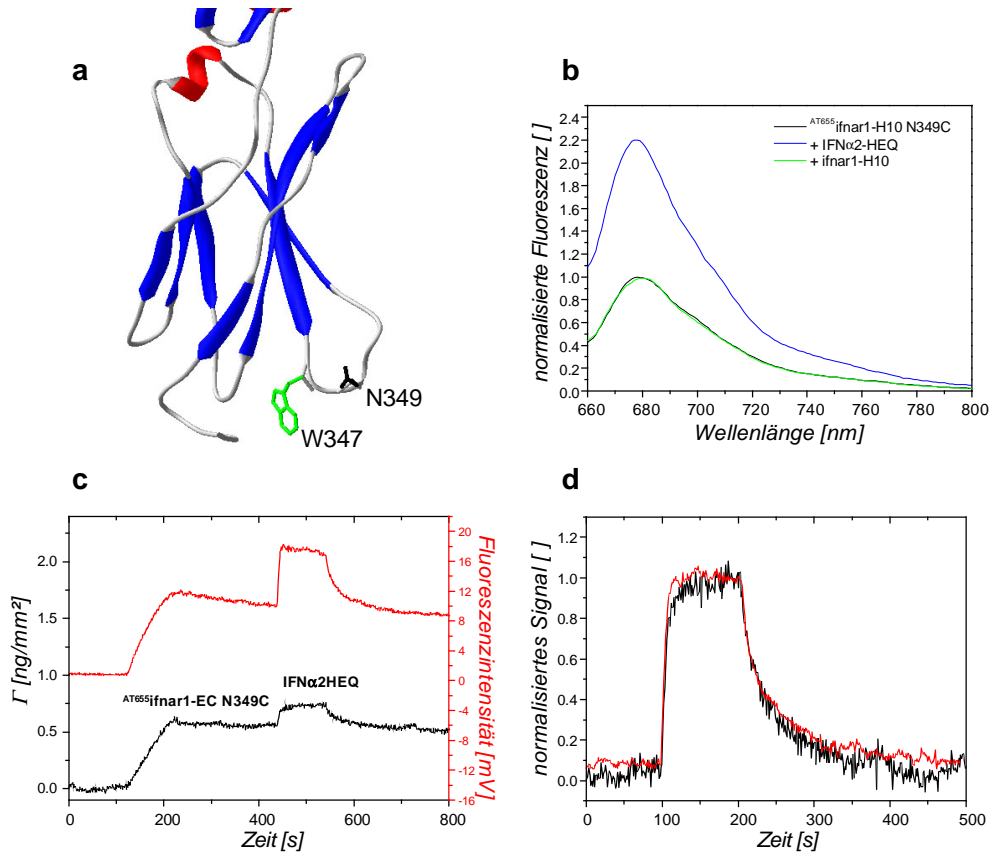


Abbildung 38: Fluoreszenzmessungen von ATTO 655 markiertem ifnar1-H10 N349C in Lösung (b) und auf Oberflächen (c, d). a: Struktur der membranproximalen Domäne von ifnar1-EC. Der Tryptophanrest 347 sowie die Position für die Kopplung mit ATTO 655 sind als Seitenketten dargestellt. b: Fluoreszenzspektrum von ATTO 655 markiertem ifnar1-H10 N349C vor und nach Zugabe von IFN α 2-HEQ sowie anschließender Konkurrenz mit einem Überschuss an unmarkiertem ifnar1-H10. c, d: Mittels RfS (schwarz) und TIRFS (rot) detektierte Bindung von IFN α 2-HEQ an immobilisierten ^{ATTO655}ifnar1-H10 N349C. d: Vergleich der mittels RfS (schwarz) und TIRFS (rot) detektierten, normalisierten Bindungskurven.

Zusätzlich sollte geprüft werden, ob die ligandeninduzierte Fluoreszenzänderung abhängig vom IFN-Subtyp oder der Anwesenheit von ifnar2-EC war. In Abbildung 39a sind die Ergebnisse der Messungen in Lösung nach Zugabe von IFN α 2-HEQ sowie IFN α 2-HEQ und IFN β im Komplex mit ifnar2-EC dargestellt. Nach Zugabe der Liganden nahm die Fluoreszenzintensität um über 100 % zu. Dieser Effekt war unabhängig von der Anwesenheit von ifnar2-EC im Komplex. Auch für IFN β im Komplex mit ifnar2-EC lag die Fluoreszenzzunahme nach Ligandenbindung bei ~ 100 %.

Um zu untersuchen, ob die Fluoreszenzänderungen auf Änderungen der Zugänglichkeit des benachbarten Tryptophans beruhten, wurde eine Mutante generiert, bei der zusätzlich zu dem eingefügten Cysteinrest 349 der benachbarte Tryptophanrest 347 durch einen Phenylalaninrest ersetzt wurde. Messungen mit ATTO655 markiertem ifnar1-H10 N349C, W347F zeigten keine ligandeninduzierten Fluoreszenzänderungen (Abbildung 39a). Um zu zeigen, dass die Interferonbindung bei mit ATTO 655 markiertem

ifnar1-H10 W347F, N349C nicht eingeschränkt ist, wurde die Ligandenbindung mittels RfS untersucht. Hierbei ergab sich im Vergleich zum Wildtyp keine Beeinträchtigung der Interferonbindung durch die Mutation und die Kopplung des Farbstoffes (Abbildung 39b).

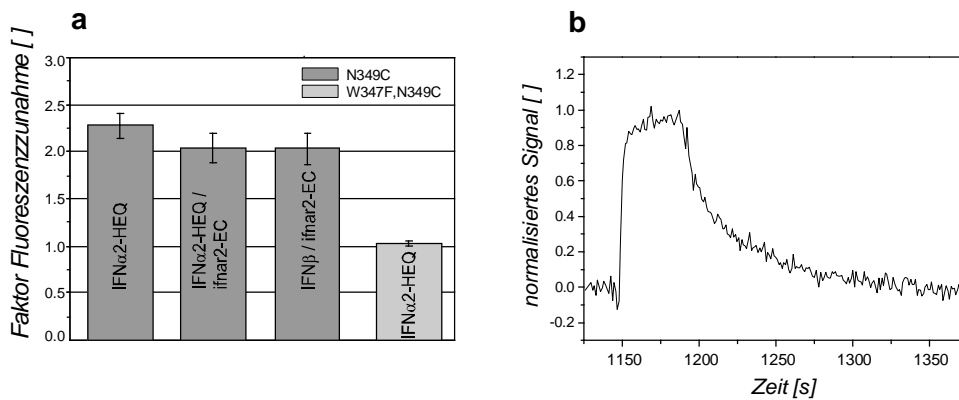


Abbildung 39: a: Fluoreszenzintensitätserhöhung von ^{AT655}ifnar1-H10 N349C (dunkelgrau) nach Zugabe von IFN α 2-HEQ alleine und im vorgefertigten Komplex mit ifnar2-EC. IFN β wurde im Komplex mit ifnar2-EC zugegeben. Die Kontrolle ^{AT655}ifnar1-H10 N349C, W347F ist hellgrau dargestellt. b: Mittels RfS detektierte Bindung von IFN α 2-HEQ an ^{AT655}ifnar1-H10 W347F, N349C.

Messungen der Fluoreszenz bei verschiedenen Temperaturen dienten der Untersuchung des Einflusses möglicher Flexibilitätsänderungen des Proteins auf die Fluoreszenzintensität. Hier zeigte sich keine signifikante Änderung der Intensität bei unterschiedlichen Temperaturen (nicht gezeigt).

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob bei der Mutante ifnar1-H10 R279A die ligandeninduzierte Konformationsänderung in der membranproximalen Domäne beeinflusst wurde, da diese Mutation zwar die Ligandenbindung nicht beeinflusst, aber das Signal nicht mehr in die Zelle propagiert wird. Die Fluoreszenzmessungen in Lösung mit ATTO 655 markierten ifnar1-H10 R279A, N349C zeigten jedoch wie für ATTO 655 markierten ifnar1-H10 N349C nach Zugabe von IFN α 2-HEQ eine Zunahme der Fluoreszenz um ~ 100 % (nicht gezeigt). Die zusätzliche Mutation des Arginins 279 in ein Alanin hat also keinen Einfluss auf die ligandeninduzierte Konformationsänderung in der membranproximalen Domäne von ifnar1.

Messungen mit OG488 markiertem ifnar1-H10 N349C W347F zeigten, dass die beobachtete Fluoreszenzzunahme nach Ligandenzugabe auch hier auf einer Änderung der Zugänglichkeit von OG488 zum Tryptophan 347 und damit auf Elektronentransfer beruht. Für OG488 markierten ifnar1-H10 N349C, W347F war nach Zugabe von ^{FEW646}tris-NTA oder ^{AT565}tris-NTA und anschließender Zugabe des Liganden IFN α 2-HEQ keine Fluoreszenzzunahme detektierbar (Abbildung 40).

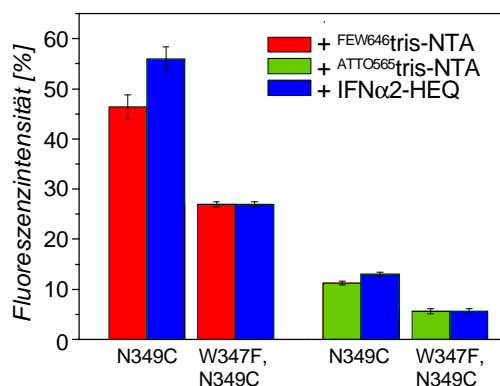


Abbildung 40: Fluoreszenzintensität von OG488 markiertem ifnar1-H10 N349C und ifnar1-H10 W347F, N349C nach Zugabe von ^{AT565} tris-NTA (grün) oder ^{FEW646} tris-NTA (rot) und nach anschließender Zugabe von IFNα2-HEQ (blau).

7.2 Fluoreszenzlebensdauermessungen

Die Ensemble-Messungen der Fluoreszenz-Lebensdauer von ATTO 655 markiertem ifnar1-H10 N349C vor und nach Zugabe des Liganden IFNα2-HEQ zeigten kaum Unterschiede in der Lebensdauer für den an ifnar1-EC gebundenen Farbstoff im Vergleich zum freien Farbstoff ATTO 655 (Abbildung 41).

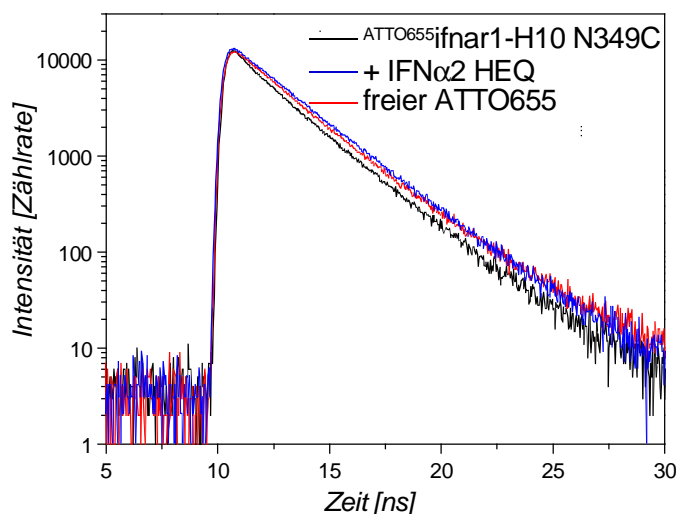


Abbildung 41: Ensemble-Messungen der Fluoreszenzlebensdauer für ATTO 655 markierten ifnar1-H10 N349C vor und nach Zugabe von IFNα2-HEQ, sowie für den freien Farbstoff ATTO 655.

Dies war überraschend, da die Ensemble-Messungen nach Ligandenbindung eine Zunahme der Fluoreszenzintensität von über 100 % gezeigt hatten (siehe auch Abschnitt 7.1). Die Fluoreszenzlöschung basierend auf Elektronentransfer beruht auf dem Kontakt des Farbstoffes zu dem benachbarten Tryptophan. Nur die Lebensdauer des Farbstoffes, welcher keinen Kontakt zu dem Tryptophan besitzt, ist detektierbar. Dies weist darauf hin, dass der an ifnar1-EC gebundene Farbstoff ATTO 655 in Abwesenheit von IFNα2-HEQ

zwischen einem komplett gelöschten und einem ungelöschten Zustand wechselt. Die Lebensdauer des Farbstoffes ohne Kontakt zum Tryptophan entspricht im Wesentlichen der Lebensdauer des freien Farbstoffes. Nach Ligandenzugabe kommt es zu einer Konformationsänderung in der membranproximalen Domäne von ifnar1-EC. Die Messungen der Fluoreszenz-Lebensdauer zeigten nur eine leichte Zunahme der Lebensdauer nach Ligandenbindung.

7.3 Analyse der membranproximalen Konformationsänderung von ifnar1-EC mittels FCS

Um zu untersuchen, ob die Änderung der Zugänglichkeit des Tryptophans in der membranproximalen Domäne auf einer Flexibilitätsänderung oder einer Konformationsänderung beruhte, wurden Messungen auf Einzelmolekülebene mit ca. 1 nM ^{AT655}ifnar1-H10 N349C vor und nach Zugabe von IFN α 2-HEQ mittels *time resolved fluorescence correlation spectroscopy* (TR-FCS) durchgeführt. Die Autokorrelationskurven konnten mit einer *lag* Zeit τ zwischen 25 ns und 1 s bestimmt werden. Die Auswertung ergab für die Messung ohne Ligandenzugabe zwei Korrelationszeiten. Eine Zeit lag im Millisekundenbereich und entsprach der Diffusionszeit, die zweite Korrelationszeit lag mit 6 μ s im Mikrosekundenbereich, was auf eine dynamische Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes hindeutet. Nach Ligandenbindung war die Korrelationszeit im Mikrosekundenbereich fast komplett verschwunden (Abbildung 42a). Messungen mit ATTO 655 markiertem ifnar1-H10 W347F, N349C ergaben keine Korrelationszeiten im Mikrosekundenbereich (Abbildung 42b).

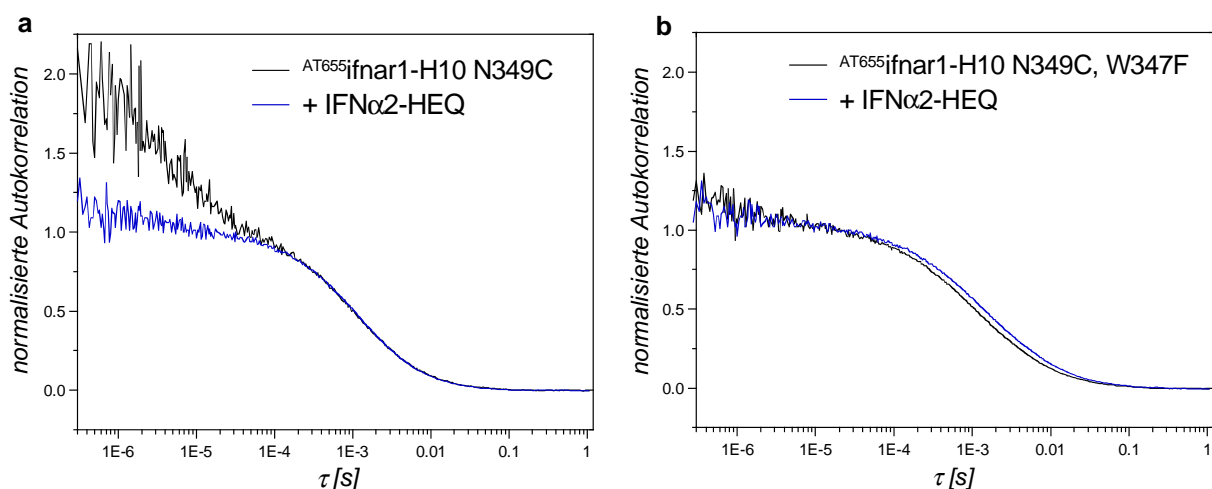


Abbildung 42: Analyse der Propagation der Konformationsänderung in die membranproximale Domäne von ifnar1-EC auf Einzelmolekülebene. a, b: Mittels TR-FCS ermittelte Autokorrelationskurven für ^{AT655}ifnar1-H10 N349C sowie ^{AT655}ifnar1-H10 W347F, N349C in An- und Abwesenheit von IFN α 2-HEQ.

Dies bestätigte, dass die dynamische Fluoreszenzlöschung bei ^{AT655}ifnar1-H10 N349C auf Elektronentransfer mit dem Tryptophanrest an Position 347 beruhte. Außerdem wurde die Hypothese der ligandeninduzierten membranproximalen Konformationsänderung bestätigt. Die Korrelationszeit von ~ 5 µs entsprach zudem der durch Neuweiler et al. [124] bestimmten Autokorrelationszeit von 5.8 µs für ein Peptid, welches ein Tryptophan enthält, und an einen analogen Farbstoff gekoppelt ist. Da nach Ligandenbindung die kurze Autokorrelationszeit kaum mehr nachweisbar war, zeigt, dass die Zugänglichkeit zum Tryptophan 347 eingeschränkt war. Die Messungen auf Einzelmolekülebene lieferten Hinweise, dass es die Ligandenbindung eine Konformationsänderung in der membranproximalen Domäne induziert und nicht eine bloße Änderung der Flexibilität.

8. Charakterisierung der konformationellen Dynamik von ifnar1-EC mittels Stopped-Flow

Um die Kinetik der Konformationsdynamik von ifnar1-EC näher zu untersuchen, wurden *Stopped-Flow*-Messungen durchgeführt. Zur Charakterisierung der Konformationsänderung in SD4 wurde ATTO 655 markierter ifnar1-H10 N349C mit ansteigenden Konzentrationen von IFN α 2 E58A gemischt und die Fluoreszenzzunahme detektiert. IFN α 2 E58A besitzt eine ca. 5-fach höhere Affinität zu ifnar1-EC als der Wildtyp und die Ausbeute an monodispersen Protein nach Solubilisierung und Rückfaltung ist höher als für IFN α 2-HEQ. Die Zunahme der Fluoreszenz zeigte einen nahezu monoexponentiellen Verlauf (Abbildung 43a). Die Anpassung für die Bestimmung der apparenten Ratenkonstanten ergab ein Assoziationsratenkonstante von $k_a = (9 \pm 2) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und eine Dissoziationsratenkonstante von $k_d = (1.2 \pm 0.3) \text{ s}^{-1}$. Die Dissoziationsratenkonstante wurde experimentell durch Detektion der Fluoreszenzabnahme nach Mischen von ^{AT655}ifnar1-H10 N349C im Komplex mit IFN α 2 E58A mit einem Überschuss an unmarkiertem ifnar1-H10 bestätigt (Abbildung 43e). Unmarkierter ifnar1-H10 entfernt hier kompetitiv IFN α 2 E58A aus dem Gleichgewicht. Die Dissoziationsratenkonstante betrug $k_d = (1.1 \pm 0.1) \text{ s}^{-1}$. Sowohl die Ratenkonstante für die Assoziation als auch für die Dissoziation waren ca. 5mal größer als die Ratenkonstanten aus den Messungen auf Oberflächen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante von $K_D = 1.3 \text{ }\mu\text{M}$ stimmte gut mit der aus der auf Oberflächen gemessenen von $K_D = 0.8 \text{ }\mu\text{M}$ überein (nicht gezeigt).

Analog wurden Messungen mit OG488 markierten ifnar1-Mutanten durchgeführt. Hier wurde nach Mischen von jeweils ^{OG488}ifnar1-H10 N23C bzw. ^{OG488}ifnar1-H10 S147C oder ^{OG488}ifnar1-H10 N286C im Komplex mit ^{AT565}tris-NTA mit ansteigenden Konzentrationen von IFN α 2 E58A gemischt und die Fluoreszenzzunahme detektiert. Für die fluoreszenzmarkierten Mutanten von ifnar1-H10 konnte die Fluoreszenzzunahme über 120 s

mit einer triexponentiellen Anpassung beschrieben werden (Abbildung 43b). Zwei der drei Ratenkonstanten zeigten keine Abhängigkeit von der IFN α 2 E58A-Konzentration und wurden daher für alle IFN-Konzentrationen global angepasst. Die beiden Ratenkonstanten betragen $k_2 = 0,3 \text{ s}^{-1}$ und $k_3 = 0,03 \text{ s}^{-1}$. Die dritte Ratenkonstante zeigte eine nahezu lineare Abhängigkeit von der IFN α 2-Konzentration (Abbildung 43d). Ein Vergleich der Amplituden der Ratenkonstanten ist ein Hinweis auf ihre Signifikanz bei der konformationellen Änderung von ifnar1-EC. Die Ratenkonstante k_2 betrug etwa 35 - 50 % der Amplitude der konzentrationsabhängigen Ratenkonstante k_1 . Das Verhältnis der Amplituden war von der IFN α 2-Konzentration unabhängig. Die Signifikanz der Ratenkonstante k_3 , die nur ca. 20 % der Amplitude von k_1 betrug, ist unklar. Auch für OG488 markierten ifnar1-H10 S147C ergab die triexponentielle Anpassung ähnliche Ratenkonstanten mit den gleichen relativen Amplituden (Abbildung 43d). Die Messungen mit ^{OG488}ifnar1-H10 N286C zeigten ebenfalls eine multiexponentielle Bindungskinetik. Jedoch waren hier die detektierten Fluoreszenzänderungen zu gering, um die Ratenkonstanten zuverlässig bestimmen zu können.

Die Ergebnisse der *Stopped-Flow*-Messungen wiesen auf eine zwei- oder mehrstufige ligandeninduzierte Konformationsänderung bei ifnar1-EC hin. Dies bestätigte die mittels thermodynamischen Messungen erhaltene negative Aktivierungsenergie für die Bindung von IFN α 2-HEQ an ifnar1-EC, welche auch auf einen mehrstufigen Prozess hindeutet. Es könnte sich hierbei um eine ligandeninduzierte Umordnung der der Ig-ähnlichen Domänen bei ifnar1-EC handeln.

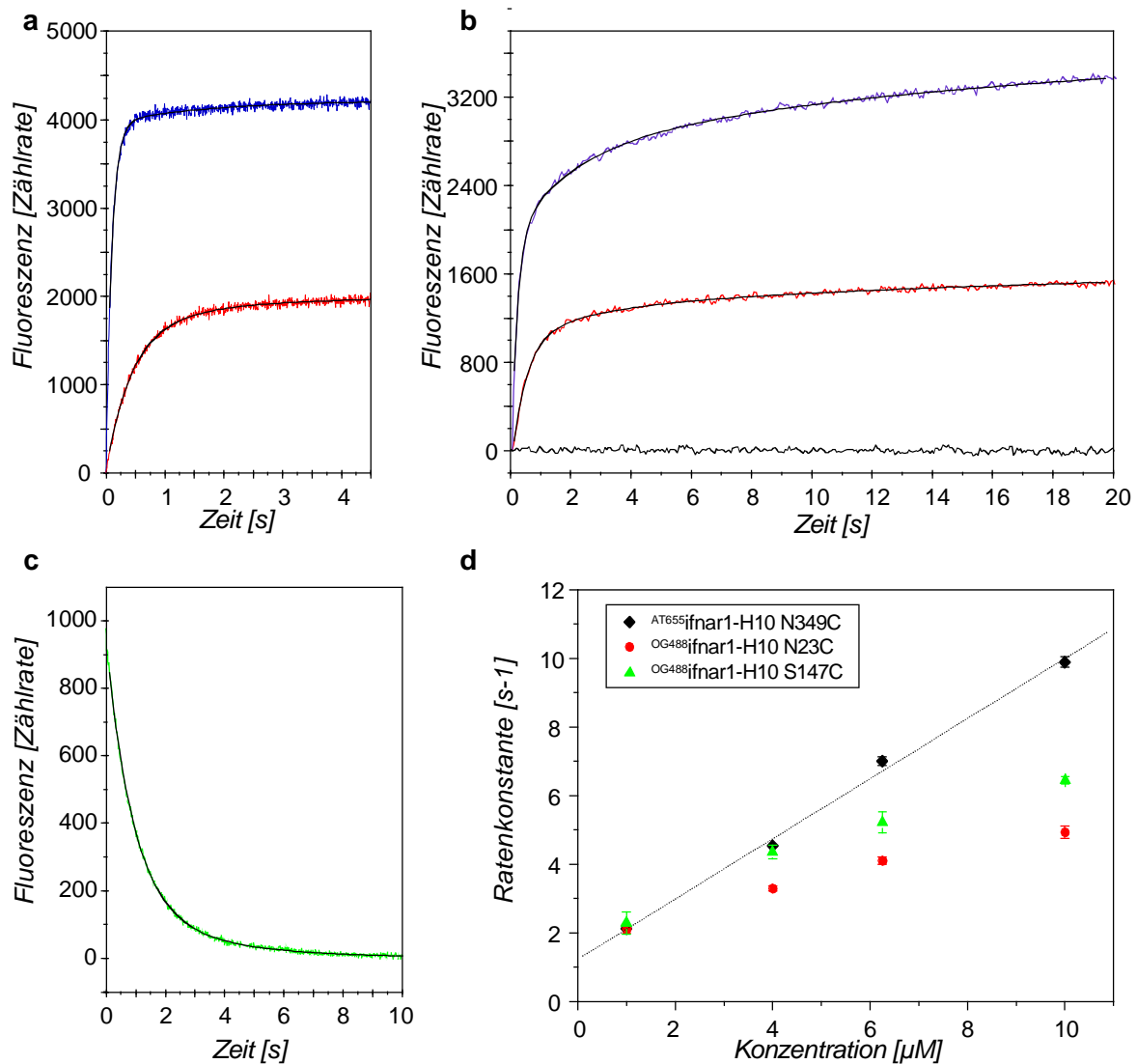


Abbildung 43: Detektion der ligandeninduzierten Konformationsänderung bei ifnar1-EC mittels *Stopped-Flow*-Fluoreszenzmessungen. Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Mischen von 50 nM ^{AT655}ifnar1-H10 N349C (a) bzw. ^{OG488}ifnar1-H10 N23C im Komplex mit ^{AT565}tris-NTA (b) mit 1 µM (rot) und 10 µM (blau) IFNα2 E58A. Zur Kontrolle wurden Experimente mit OG488 markiertem ifnar2-H10 S35C im Komplex mit ^{AT565}tris-NTA und Injektion von 10 µM IFNα2 E58A (schwarz) durchgeführt. c: Abnahme der Fluoreszenz nach Mischen von 25 nM ^{AT655}ifnar1-H10 N349C vorinkubiert mit 1 µM IFNα2 E58A mit 10 µM unmarkiertem ifnar1-H10. d: Vergleich der konzentrationsabhängigen Ratenkonstanten von ^{OG488}ifnar1-H10 N23C, ^{OG488}ifnar1-H10 S147C und ^{AT655}ifnar1-H10 N349C.

Die Messungen wurden zur Kontrolle analog mit OG488 markiertem ifnar2-H10 S35C durchgeführt. Bei allen eingesetzten Konzentrationen von IFNα2 E58A waren keine Änderungen der Fluoreszenzintensität detektierbar. Dies zeigte die Spezifität der Fluoreszenzintensitätsänderung nach IFNα2 E58A-Bindung von ifnar1-EC.

F. Diskussion

Alle Typ I Interferone binden an denselben Rezeptor, der sich aus den zwei Transmembranproteinen ifnar1 und ifnar2 zusammensetzt. Trotz der Bindung an dieselben Bindungsstellen üben sie unterschiedliche Effekte auf die Zellen aus. Bisher ist ungeklärt, auf welchen Mechanismen die Signalaktivierung des Typ I Interferon Rezeptors beruht. Es wird jedoch vermutet, dass die differentielle Aktivität der Typ I Interferone hauptsächlich der Aktivität von ifnar1 zuzuschreiben sind. Leider gibt es bisher keine Strukturen von ifnar1 oder des ternären Komplexes, welche zur Klärung von möglichen Unterschieden in der Architektur nach Bindung des Liganden oder nach Assemblierung des ternären Komplexes herangezogen werden könnten. Bisher ist unbekannt, wie nach Ligandenbindung das Signal in die Zelle übertragen wird. Es sollte in dieser Arbeit die Architektur des ternären Komplexes für verschiedene Typ I Interferone untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung der ligandeninduzierten konformationellen Änderung in der extrazellulären Domäne von ifnar1, welche Aufschlüsse über die Signalaktivierung liefern sollte.

1. Aufreinigung der ortsspezifisch markierten ifnar1-EC- und ifnar2-EC-Mutanten sowie der Interferone

Die Ektodomänen von ifnar1 und ifnar2 wurden nach Mutation von ausgewählten Aminosäuren in Cysteine ortsspezifisch mit Maleimid-funktionalisierten Fluorophorkonjugaten versehen. Eine besondere Herausforderung stellte hier die chromatographische Trennung der einfach markierten Proteine von den mehrfach markierten Proteinen dar. Außerdem zeigte sich, dass die Mutation von einzelnen Aminosäuren in Cysteine zum Teil drastische Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten der Proteine hatte. Für eine ifnar1-EC-Mutante, bei der drei Aminosäuren durch Alanine substituiert worden waren, konnte kein monodisperses Protein gewonnen werden.

Auch die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes zeigte Auswirkungen auf die Stabilität der Proteine. So aggregierte beispielsweise Cy3 markierter ifnar1-H10 N23C nach der Kopplungsreaktion. Trotzdem war es möglich, ifnar1- und ifnar2-EC ortsspezifisch mit

verschiedenen Fluorophoren zu versehen. Teilweise tendierten einige Proteine nach Schockgefrierung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Aggregation. Daher wurden die Proteine möglichst zeitnah vor der Verwendung einer Gelfiltrationschromatographie unterzogen.

Für anschließende Aktivitätsuntersuchungen der Rezeptoruntereinheiten wurden große Mengen an aufgereinigtem IFN α 2 benötigt. Da die Affinität von IFN α 2 zu ifnar1-EC mit $\sim 5\text{ }\mu\text{M}$ sehr gering ist, wurden die Mutanten IFN α 2-HEQ und IFN α 2 E58A verwendet, deren Affinitäten zu ifnar1-EC 20-fach bzw. 8-fach höher sind als der Wildtyp. Die Aufreinigung von IFN α 2-HEQ lieferte nur geringe Ausbeuten, die Ausbeuten für monodisperses IFN α 2 E58A waren vergleichsweise höher. Daher wurde für Untersuchungen mit einem hohen Verbrauch an IFN α 2-HEQ IFN α 2 E58A verwendet.

2. Analyse der Architektur des ternären Komplexes

Die Einzelmolekülanalyse ist eine geeignete Methode zur Analyse der Struktur und Dynamik von großen Makromolekülen oder Proteinkomplexen. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Proteine nicht kristallisiert vorliegen müssen und auch die benötigte Proteinmenge relativ gering ist. Bisher ist es mit dieser Methode möglich, die Struktur von Proteinen bis zu einer theoretischen Größe von ca. 100 kDa zu lösen [125]. Die Ermittlung der Struktur des ternären Komplexes mit dieser Methode stellte bedingt durch seine geringe Größe von ca. 100 kDa und der Tendenz zur Dissoziation des Komplexes aufgrund der geringen Affinität von IFN α 2 zu ifnar1-EC eine besondere Herausforderung dar. Die Negativfärbung besitzt eine maximale Auflösung von 10-20 Å. Dies beruht auf der Bewegung der Farbstoffmoleküle während der Aufnahme, Abflachung der 3D-Struktur durch Dehydrierung und der Größe der Farbstoffmoleküle, welche nicht in die Proteinoberfläche eindringen können. Geringe Unterschiede in der Architektur des ternären Komplexes für verschiedene Typ I Interferone konnten demnach mit dieser Methode nicht aufgelöst werden.

Die mittels Einzelpartikel-Analyse ermittelte Struktur ergab keine Unterschiede in der Architektur des ternären Komplexes bestehend aus den extrazellulären Domänen von ifnar1, ifnar2 mit den verschiedenen Typ I Interferonen IFN α 2-HEQ und IFN β . Da jedoch bislang keine Struktur von einem Zytokinrezeptorkomplex des Typ II bekannt ist, ermöglicht die Struktur des Typ I Interferon Rezeptorkomplexes erste Aussagen und Hypothesen über die Architektur von Typ II Zytokinrezeptoren. Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Die berechneten 2D-Klassen des ternären Komplexes wurden zur Erstellung einer 3D-Dichtekarte verwendet, welche die einzelnen Subdomänen der Komponenten enthielt. Eine eindeutige Zuordnung wurde durch die Verwendung einer Deletionsmutante von ifnar1-EC erreicht, bei der die membranproximale Domäne deletiert worden war. Zunächst

wurde das Modell aus ifnar2-EC und IFN α 2 in die Dichtekarte eingefügt. Das auf NMR-Messungen basierende Modell [83] fügte sich ohne Modifikationen in die Dichtekarte ein, was darauf hindeutet, dass die Bindung von ifnar1-EC im ternären Komplex keine grundlegende Strukturänderung im binären Komplex bestehend aus ifnar2-EC und IFN α 2 induziert. Die Unabhängigkeit der Ligandenbindung von ifnar1-EC und ifnar2-EC wurde bereits durch Studien in unserer Gruppe gezeigt [73]. Die Homologiemodelle für jeweils zwei Subdomänen von ifnar1-EC basierend auf der Struktur der Ektodomäne des IFN γ Rezeptors wurden nacheinander in die Dichtekarte eingefügt. Zusätzlich zur korrekten Lokalisation der Termini wurden die kartierten IFN-Bindungsstellen von ifnar1-EC in räumliche Nähe zum IFN α 2 gebracht. Das erhaltene Modell des ternären Komplexes ähnelt stark dem Modell, welches von Anglistler und Kollegen vorgestellt wurde [81].

Bei ifnar1-EC sind nur die drei N-terminalen Subdomänen in der Ligandenbindung beteiligt und essentiell. Identifizierte IFN-Bindungsstellen befinden sich alle in den drei N-terminalen Subdomänen. Die membranproximale Domäne ist nicht für die Bindung der Interferone notwendig [88]. Auch die 2D-Bilder weisen eine Variabilität der Lokalisation der membranproximalen Domäne auf, was darauf hindeutet, dass die membranproximale Domäne nur lose an der IFN beteiligt sein könnte. Aufgrund der geringen Größe des Komplexes und der limitierenden technischen Möglichkeiten von negativ gefärbten Elektronenmikroskopieaufnahmen könnten die strukturellen Abweichungen auch auf Unterschieden bei der Färbung beruhen. Trotzdem weisen einige Ergebnisse auf eine eher lockere Assoziation der membranproximalen Domäne von ifnar1-EC im Komplex hin. So führt die Berechnung der 3D-Struktur mit offenen Komplexen zu einem Verlust der Auflösung hauptsächlich in dieser Domäne. Auch die bei der Mutante IFN α 2-HEQ mutierten Aminosäuren, welche die Affinität zu ifnar1-EC um das 20-fache erhöhen, sind im Komplex weit entfernt von der membranproximalen Domäne.

Die Verschiebung der membranproximalen Domänen von ifnar1-EC und ifnar2-EC, welche nicht auf zusätzlichen Modellierungsprozessen beruhen, weisen auf einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus wie bei den zu den Typ I der hematopoetischen Zytokinrezeptorfamilie gehörenden Rezeptoren für Erythropoetin und den Wachstumsfaktor hin (Abbildung 44). Im Gegensatz zum Typ I Interferon Rezeptor bestehen die Ektodomänen des humanen Erythropoetin Rezeptors und des humanen Wachstumsfaktor Rezeptors nur aus zwei Ig-ähnlichen Domänen, welche zusammen ein CBM bilden. Es wird vermutet, dass sie auch ohne Ligand prä-assoziiert vorliegen. Die Signaltransduktion wird beim Epo Rezeptor durch Annäherung der Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen initiiert. Für den human Wachstumsfaktorrezeptor wurde nach Ligandenbindung eine Verschiebung der Untereinheiten relativ zueinander nachgewiesen [12]. Zur Signalinitiierung nach Zytokinbindung ist offenbar eine Dimerisierung nicht ausreichend. Vielmehr scheint die

Orientierung der Rezeptordomänen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung zu spielen [12,20]. Die Asymmetrie der Komplexe aus EpoR-Epo [20] (Abbildung 44a) und den GHR-GH [7] (Abbildung 44c) basiert jeweils auf den unterschiedlichen Affinitäten der Untereinheiten zum jeweiligen Liganden. Bindung des Liganden induziert unterschiedliche Konformationsänderungen in den Rezeptoruntereinheiten. Interessanterweise weisen sowohl für den EpoR-Epo und den GHR-GH Komplex die affineren Untereinheiten eine größere Verschiebung relativ zur Membran auf. Auch in unserem Modell vom ternären Komplex des Typ I Interferon Rezeptors weist die affine Untereinheit ifnar2-EC diese Verschiebung auf. Obwohl der Interferon Rezeptor aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten besteht, weist die charakteristische Verschiebung der hoch-affinen Rezeptoruntereinheit auf einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus wie für den EpoR-Epo und den GHR-GH Komplex hin.

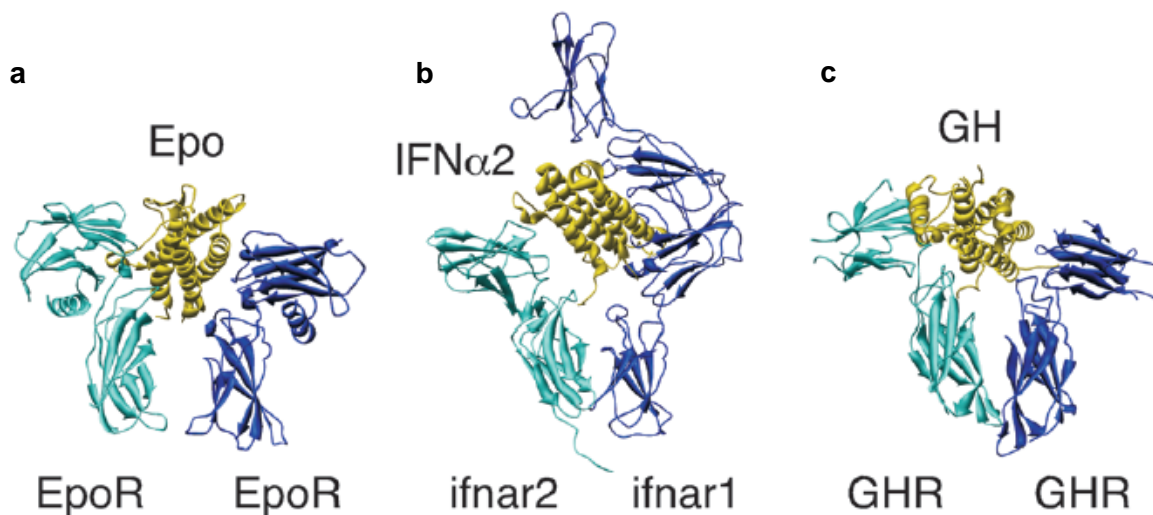


Abbildung 44: Vergleich des ternären Komplexes aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ mit den Komplexen der extrazellulären Domänen des humanen Erythropoetin (Epo)-Rezeptor-Komplexes und der extrazellulären Domänen des humanen Wachstumsfaktor (GH)-Rezeptor-Komplexes. a: Kristallstruktur des Komplexes bestehend aus zwei extrazellulären Domänen des Epo-Rezeptors [20] (PDB-Nummer: 1EER). b: Modell des Komplexes aus ifnar1-EC, ifnar2-EC und IFN α 2-HEQ. c: Kristallstruktur der Ektodomänen des Wachstumsfaktor-Rezeptors im Komplex mit Wachstumsfaktor [7] (PDB-Nummer: 3HHR). a-c: Die niedrigaffine Untereinheit ist in blau gezeigt, die hochaffine Untereinheit in türkis.

Die zwei Rezeptoruntereinheiten des Typ I Interferon Rezeptorkomplexes liegen wahrscheinlich im Gegensatz zum Epo-Rezeptor und dem GH-Rezeptor in Abwesenheit des Liganden nicht prä-assoziiert vor. Dies lässt auf einen unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus schließen. Denkbar wäre, dass nach Bindung des Interferons an die hochaffine Untereinheit ifnar2 das IFN in eine optimale räumliche Nähe für eine Bindung an ifnar1 gebracht wird. Ifnar1 wird zum binären Komplex rekrutiert und ein stabiler ternärer Komplex gebildet. Da bis auf die membranproximale Domäne von ifnar1 alle drei anderen Domänen an der Bindung des IFNs beteiligt sind, kommt es folglich zu einer Annäherung der

membranproximalen Domänen von ifnar2 und ifnar1. Dies könnte den Abstand der zytoplasmatischen Domänen verringern, so dass die konstitutiv assoziierten Janus Kinasen sich durch Trans-Phosphorylierung aktivieren und durch verschiedene Phosphorylierungsreaktionen die Signalkaskaden einleiten. Denkbar wäre auch, dass die Transmembrandomänen der Rezeptoruntereinheiten eine Affinität zueinander haben, die nach der Komplexbildung einen Anteil an der Annäherung der zytoplasmatischen Domänen haben. Von Jaitin und Kollegen wurde postuliert, dass die differentielle Signalaktivierung durch die Typ I Interferone auf den unterschiedlichen Stabilitäten der Komplexbildung basiert [65]. Dieses Modell setzt unabhängige Bindungseigenschaften der verschiedenen Interferone voraus. Diese Hypothese wird durch das in dieser Arbeit mittels EM ermittelte Modell des ternären Komplexes gestützt.

3. Untersuchung der Dynamik von ifnar1-EC

Kinetische und thermodynamische Parameter können für die Aufklärung von molekularen Mechanismen der Rezeptor-Liganden-Interaktion heran gezogen werden. Mittels temperaturabhängiger Messungen der Bindung von IFN α 2-HEQ an ifnar1-EC und ifnar2-EC auf Oberflächen sollten die Thermodynamik und die Energiehyperflächen der Bindung von IFN α 2 an ifnar1-EC und ifnar2-EC bestimmt werden. Die Bindung von IFN α 2 an ifnar2-EC verhielt sich erwartungsgemäß: Die Ratenkonstanten für die Assoziation und Dissoziation nahmen mit ansteigender Temperatur zu. Die mittels Arrhenius-Analyse erhaltenen Aktivierungsenergien für die Assoziation bzw. Dissoziation betragen 60 bzw. 85 kJ/mol. Die Auftragung nach van't Hoff lieferte eine Gerade, aus der die Reaktionsenthalpe und die Entropie berechnet wurden ($\Delta H^0 = -27 \pm 3$ kJ/ mol, $\Delta S^0 = 63 \pm 9$ J/ mol K).

Die Bindung von IFN α 2-HEQ an ifnar1-EC zeigte ein unerwartetes Verhalten. Die Dissoziation wurde mit zunehmender Temperatur langsamer, nahm ab ca. 30 °C dann mit der Temperatur zu. Daher ergab die Auftragung nach Arrhenius und van't Hoff keine lineare Abhängigkeit. Die negative Aktivierungsenergie für die Dissoziation könnte mit Änderungen des ratenlimitierenden Schrittes von mehrstufigen Reaktionen erklärt werden [122]. Diese Ergebnisse deuten auf eine ligandeninduzierte konformationelle Änderung bei ifnar1-EC hin.

Daher wurde in dieser Arbeit ein FRET-basierter Assay zur Detektion und Charakterisierung einer möglichen ligandeninduzierten konformationellen Änderung in der extrazellulären Domäne von ifnar1 etabliert. Es wurde gezeigt, dass tris-NTA-Fluorophor-Konjugate nach Bindung an den His-Tag von ortsspezifisch fluoreszenzmarkierten ifnar1-H10 abstandsabhängig die Fluoreszenz über intramolekularen FRET löschen. Der große Vorteil dieser Methode ist die ortsspezifische und orthogonale Kopplung mit zwei verschiedenen

Fluoreszenzfarbstoffen basierend auf einer kovalenten, chemischen (Maleimid-Reaktion) und einer affinitätsbasierenden Kopplung (His-Tag - tris-NTA-Interaktion).

Ortsspezifisch fluoreszenzmarkierter ifnar2-EC diente als Kalibrierungsstandard, da hier die Struktur bereits bekannt war [81]. Auch für den binären Komplex bestehend aus ifnar2-EC und IFN α 2 waren Modelle vorhanden, aus denen Abstände berechnet werden konnten [84]. Wie bereits auch von anderen Gruppen gezeigt [83], war bei allen fluoreszenzmarkierten Mutanten von ifnar2-EC keine Konformationsänderung nach Ligandenbindung detektierbar.

Über die experimentelle Bestimmung der Spektren (Absorption bzw. Fluoreszenz) und anschließende Berechnung der Förster-Radien konnten die Abstände für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe abgeschätzt werden. Die Abstände der für die Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe verwendeten Reste in den drei N-terminalen Subdomänen im Modell der Ektodomäne von ifnar1 zum C-terminalen His-Tag sind etwa alle gleich groß. Die FRET-Experimente in Lösung ergaben für diese drei Mutanten eine ähnliche Fluoreszenzlöschung von ca. 33 % und damit ähnliche Abstände zum His-Tag. Erwartungsgemäß wurde die Fluoreszenz in der membranproximalen Domäne am stärksten gelöscht, da hier der Abstand zum His-Tag am geringsten war. Nach Ligandenbindung zeigte sich interessanterweise eine starke Fluoreszenzzunahme für den N-terminal markierten ifnar1-EC. Berechnungen der Abstände für Messungen in Ab- und Anwesenheit des Liganden zeigten, dass die Entfernung der N-terminalen Domäne zum C-Terminus nach Ligandenbindung um $\sim 13 \text{ \AA}$ zunimmt. Vor der Bindung des Liganden besitzt ifnar1-EC folglich eine gekrümmte Konformation, bei der sich N- und C-terminale Subdomänen relativ nahe kommen ($\sim 56 \text{ \AA}$). Durch die Ligandenbindung nimmt ifnar1-EC eine mehr gestreckte Konformation ein und der Abstand vergrößert sich ($\sim 67 \text{ \AA}$). Die berechneten Abstandsänderungen waren unabhängig von der Anwesenheit von ifnar2-EC im Komplex und zeigten keine Unterschiede für die verwendeten Typ I Interferone IFN α 2-HEQ und IFN β .

Der Abstand von $\sim 67 \text{ \AA}$ stimmte nicht mit dem mittels EM und 3D-Rekonstruktion erhaltenen Abstand von $\sim 110 \text{ \AA}$ überein. Ein möglicher Grund könnte eine unvollständige Sättigung der Bindung von fluoreszenzmarkiertem ifnar1-EC sein. Außerdem lieferte die Analyse der negativ gefärbten Komplexe mittels EM eine limitierte Auflösung.

Überraschend war die ligandeninduzierte Zunahme der Fluoreszenz für die membranproximale Domäne, da aufgrund des geringen Abstands zwischen Donor-Fluorophor und FRET-Partner, welche sich an der selben Subdomäne befanden, keine signifikante Abstandsänderung zu erwarten war. Dieser Effekt konnte später aufgeklärt werden.

Kontrollexperimente zeigten, dass die Fluoreszenzzunahme nach Ligandenbindung nicht auf der unspezifischen Interaktion des IFNs mit dem Fluoreszenzfarbstoff beruhte, da bei

Messungen in Abwesenheit des FRET-Akzeptors keine Fluoreszenzänderung nach IFN-Bindung detektierbar war. Außerdem zeigte sich nach Zugabe eines Überschuss an unmarkiertem ifnar1-EC eine vollständige Reversibilität der Fluoreszenzänderung, was auf einer vollständigen Konkurrenz des Liganden aus dem fluoreszenzmarkierten Komplex beruhte. Die Konformationsänderung nach Ligandenbindung war demnach reversibel, und ifnar1-EC nahm nach Dissoziation des Liganden seine Ausgangskonformation wieder an.

Zusätzlich wurden die konformationellen Änderungen von ifnar1-EC auf Einzelmolekülebene untersucht. Messungen mit geringen Proteinkonzentrationen spiegeln eher die Oberflächenkonzentration von ifnar1 auf Zellen wieder. Bei Ensemble-Messungen werden Unterschiede bei der konformationellen Änderung gemittelt. Einzelmolekülstudien können jedoch verschiedene Zustände von ifnar1-EC auflösen. Die konformationelle Änderung bei ifnar1-EC nach Ligandenbindung wurde mittels Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS) untersucht. Die Messungen ergaben Hinweise auf eine Flexibilität zwischen den Ig-ähnlichen Domänen. Dabei ist eine Flexibilität in der Linkerregion zwischen den beiden konservierten CBMs am wahrscheinlichsten. Die Messungen zeigten, dass die Ligandenbindung zu einem Verlust dieser Flexibilität bei ifnar1-EC führt.

Zusätzlich wurde die Ursache für die überraschende ligandeninduzierte Fluoreszenzintensitätserhöhung in der membranproximalen Domäne von ifnar1-EC näher untersucht. Durch den Einsatz eines Biotin gekoppelten tris-NTA-Konjugats wurde bewiesen, dass die ligandeninduzierte Fluoreszenzintensitätsänderung in der membranproximalen Domäne nicht, wie ursprünglich angenommen, auf einer Fluoreszenzlöschung durch das chelatisierte Übergangsmetallion Ni^{2+} beruht. Bei Experimenten mit ^{OG488}ifnar1-H10 W347F, N349C zeigte sich keine ligandeninduzierte Fluoreszenzänderung. Die Fluoreszenzänderung beruhte demnach auf Änderungen der Zugänglichkeit des Tryptophanrests 347 für den Fluoreszenzfarbstoff OG488 am Cystein 349. Diese Ergebnisse führten zu weiteren Untersuchungen dieses überraschenden Effektes in der membranproximalen Domäne. Eine Propagation des Signals in die membranproximale Domäne wurde bisher nicht beschrieben, aber es wurde vermutet, dass die membranproximale Domäne eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen könnte, da die Deletion oder Austausch dieser Domäne mit homologen Domänen anderer Rezeptoren zu einer Inhibition der Signalweiterleitung führte [88]. Änderungen der Struktur in dieser Domäne könnten eine wichtige Rolle bei der Orientierung des Rezeptors in der Membran einnehmen.

Um die Änderung der Zugänglichkeit des Tryptophanrests in der membranproximalen Domäne näher zu untersuchen, wurde ifnar1-EC über das Cystein 349 mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 655 versehen. ATTO 655 gehört zu der Klasse der Oxazine, und er ist ein guter Elektronenakzeptor, d.h. seine Fluoreszenz wird z.B. durch Guanin und

Tryptophan gelöscht. Diese Eigenschaft wurde beim Nachweis der ligandeninduzierten Änderung der Zugänglichkeit des Tryptophanrests in der SD4 von ifnar1-EC genutzt.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Ligandenbindung die Fluoreszenz von ATTO 655 um über 100 % zunimmt. Die Änderung der Zugänglichkeit des Tryptophanrests ist ein Hinweis auf eine mögliche Signalpropagation in die membranproximale Domäne nach Ligandenbindung, da diese Domäne nicht bei der Ligandenbindung beteiligt ist. Es wäre denkbar, dass dieses Signal weiter über die Transmembrandomäne ins Zellinnere geleitet werden könnte.

Ein Vergleich der ligandeninduzierten Fluoreszenzintensitätsänderung in SD4 von ifnar1-EC nach Zugabe von IFN α 2-HEQ bzw. IFN β zeigte keine Unterschiede für die verschiedenen Typ I Interferone. Dies weist darauf hin, dass die Konformationsänderung in der membranproximalen Domäne nicht für die differentielle Aktivität der Typ I Interferone verantwortlich ist. Sie könnte aber eine essentielle Rolle bei der Aktivierung des Komplexes durch Änderung der Orientierung von ifnar1 in der Membrannähe haben.

Durch Kontrollexperimente mit der Mutante ^{AT655}ifnar1-H10 W347F, N349C, bei der der Tryptophanrest 347 durch einen Phenylalaninrest ersetzt wurde, wurde gezeigt, dass die detektierte Konformationsänderung lokal auf die membranproximale Domäne zurückzuführen ist. Außerdem konnte durch Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem ifnar1-EC bewiesen werden, dass die Fluoreszenzänderung spezifisch auf der Bindung der Interferone beruhte. Die Messungen der Fluoreszenzänderung nach Zugabe eines Komplexes aus IFN α 2-HEQ und der extrazellulären Domäne von ifnar2 zeigten, dass die konformationelle Änderung unabhängig von der Anwesenheit von ifnar2-EC war. Auch für andere Zytokinrezeptoren wurde bereits gezeigt, dass nicht alleine die Rezeptordimerisierung, sondern auch die Orientierung bei der Rezeptoraktivierung essentiell ist. Der membranproximalen Domäne wird dabei eine wichtige Rolle bei der korrekten Rezeptororientierung auf der Membran zugeschrieben [126].

Die Änderung der Zugänglichkeit des Tryptophanrests für ATTO 655 in der membranproximalen Domäne bestätigte sich auch durch Messungen auf Einzelmolekülebene. Nach Bindung des Liganden war die Zugänglichkeit des Tryptophanrests eingeschränkt. Typ I Zytokinrezeptoren besitzen in ihrer membranproximalen Domäne ein konserviertes WSXWS-Motif, dem eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung zugesprochen wird. Bei der Aktivierung des IL-4-Rezeptors wird postuliert, dass es zu einer Änderung der Zugänglichkeit der Tryptophane dieses Motifs kommt, welche vor der Aktivierung mit der Membran interagieren [104]. Obwohl der Typ I Interferon Rezeptor zu den Typ II Zytokinrezeptoren gehört, könnte dem Tryptophanrest in der membranproximalen Domäne eine ähnliche Funktion zugeschrieben

werden. Die Ligandenbindung würde zu einer Unterbindung der Assoziation des Tryptophans mit der Membran führen und damit die Orientierung der Rezeptoruntereinheit in der Membran verändern. Auch die Konservierung dieses Tryptophans bei den niedrigaffinen Untereinheiten der Typ II Zytokinrezeptoren (IL-10R2, IFN- γ R2, and IL-20R2) unterstützt die wichtige Funktion dieses Restes. Alle hochaffinen Rezeptor-Untereinheiten, mit Ausnahme von IFN- λ R1, besitzen nicht dieses Tryptophan.

Mittels *Stopped-Flow*-Messungen mit den fluoreszenzmarkierten Ektodomänen von ifnar1 wurden sowohl die Konformationsänderung in der membranproximalen Domäne als auch die Abstandsänderung zwischen N- und C-Terminus detektiert. Hier zeigte sich, dass es sich bei dem ligandeninduzierten Rearrangement der Ig-ähnlichen Domänen um einen mehrstufigen Prozess handelt. Die Ergebnisse der Messungen wiesen darauf hin, dass sich der N-Terminus zunächst 6 Å vom C-Terminus entfernt und danach zwei weitere Änderungen der Orientierung von je 3 Å folgen, so dass der Abstand sich insgesamt um 12 Å vergrößert. Einer der beiden letzten Schritte könnte dem mittels FCS detektierten Verlust der Flexibilität zugeordnet werden. Die Konformationsänderung in der membranproximalen Domäne hingegen zeigte einen monoexponentiellen Verlauf, die offenbar der Bindung des Interferons zuzuschreiben war. Dieser einstufige Prozess könnte damit erklärt werden, dass das Tryptophan nach Interferonbindung nicht mehr zugänglich ist. Elektronentransfer zwischen ATTO 655 und dem Tryptophan ist nur bei Kontakt möglich. Zwischenzustände können nicht detektiert werden.

Sowohl die Fluoreszenz-Lebensdauer-messungen als auch die FCS Messungen sprechen für eine Flexibilität der Ig-ähnlichen Domänen von ifnar1-EC. Die Ergebnisse beider Methoden zeigten eine Abnahme der Flexibilität nach Ligandenbindung. Mittels FCS und *Stopped-Flow*-Messungen wurde jedoch gezeigt, dass die Ligandenbindung nicht alleine zu einer Abnahme der Flexibilität von ifnar1-EC führt, sondern die Bindung zu einem Rearrangement der Subdomänen führt, bei der der Abstand der N-terminalen Domäne zum C-Terminus größer wird. Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine ligandeninduzierte Konformationsänderung in der Ektodomäne von ifnar1 hin, welche gleichzeitig zu einem Verlust der Flexibilität der Ig-ähnlichen Domänen führt. Gleichzeitig wird offenbar das Signal in die membranproximale Domäne propagiert, was dort in einer Änderung der Lokalisation des Tryptophans 347 resultiert (Abbildung 45).

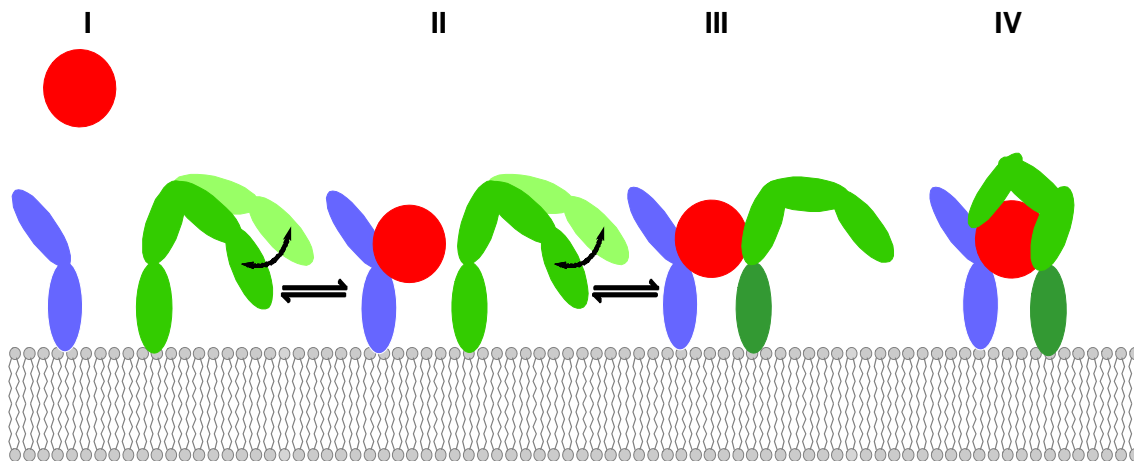


Abbildung 45: Modell der Assemblierung des ternären Komplexes aus den Ektodomänen von ifnar2 (blau), ifnar1 (grün) und IFN α 2 (rot). Die Rezeptoruntereinheiten liegen auf der Membran nicht prä-assoziert vor (I). IFN bindet an die hochaffine Untereinheit ifnar2-EC (II). Ifnar1-EC wird rekrutiert und bindet auch an das IFN. Gleichzeitig wird das Signal in die membranproximale Domäne propagiert (dunkelgrün) (III). Es kommt zu einem ligandeninduzierten Rearrangement der Ig-ähnlichen Domänen von ifnar1-EC, bei der sich der Abstand vom N- zum C-Terminus um 13 Å vergrößert (IV).

Die übereinstimmende Architektur für den ternären Komplex mit den verschiedenen Typ I Interferonen unterstützt die Ergebnisse der Charakterisierung der ligandeninduzierten Konformationsänderung in Lösung und auf Oberflächen. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Methoden zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der konformationellen Änderungen von ifnar1-EC für verschiedene Typ I Interferone. Auch weisen beide Strukturen der Komplexe mit IFN α 2-HEQ bzw. IFN β eine Verschiebung der membranproximalen Domänen zur Membranebene auf. Sowohl die fluoreszenzbasierten Assays als auch die in dieser Arbeit ermittelten Strukturen der ternären Komplexe sprechen für keine signifikanten Unterschiede bei der Signalaktivierung des Typ I Interferon Rezeptors durch die verschiedenen Typ I Interferone. Dies stützt die Hypothese, dass die differentielle Signalaktivierung nicht auf fundamentalen Unterschieden in der Architektur des Rezeptorkomplexes oder im Mechanismus der Signalaktivierung beruht. Vielmehr wird die bereits von Jaitin und Kollegen [65] postulierte Hypothese gestützt, dass die differentielle Signalaktivierung auf Unterschieden in der Rezeptorstabilität bedingt durch unterschiedliche Affinitäten der Interferone zurückzuführen ist. Wie die unterschiedlichen Stabilitäten der aktivierten Rezeptorkomplexe zu der differentiellen Aktivität führen könnten, ist bislang ungeklärt. Mögliche Gründe könnten Unterschiede in der Stärke der Rekrutierung der Signalmoleküle oder in der ligandeninduzierten Rezeptorinternalisierung oder Regulierung der Rezeptorexpression sein.

4. Ausblick

Die Strukturen der ternären Komplexe für die verschiedenen Typ I Interferone zeigten keine fundamentalen Unterschiede in der Architektur. Auch die Ergebnisse der fluoreszenzbasierten Assays lieferten keine signifikanten Unterschiede für die verschiedenen Typ I Interferone. Dies stützt die Hypothese, dass sich der Mechanismus der Rezeptoraktivierung für die verschiedenen Interferone nicht prinzipiell unterscheidet, sondern die differentielle Signalaktivierung vielmehr auf unterschiedlichen Stabilitäten der ternären Komplexe bedingt durch Unterschiede in den IFN-Affinitäten und den Rezeptoroberflächenkonzentrationen basiert [73].

Die Ermittlung einer hochaufgelösten Struktur des Typ I Interferon Rezeptorkomplexes bleibt trotzdem ein Ziel, denn sie könnte auch kleinste Unterschiede in der Architektur für die Typ I Interferone auflösen, welche zur Aufklärung des Mechanismus der differentiellen Aktivität der Typ I Interferone dienen könnte. Außerdem könnte sie helfen, hochwirksame Interferone zur Behandlung von bestimmten Krankheiten systematisch zu generieren. Die Struktur wäre insbesondere interessant, da es bislang keine hochauflösende Struktur eines Typ II Zytokinrezeptors gibt. Auch die Struktur der kompletten Rezeptoruntereinheiten inklusive Transmembrandomänen und intrazellulären Domänen könnte wichtige Informationen liefern. Obwohl mehrere Forschergruppen sich mit der Lösung der Struktur der Rezeptoruntereinheiten beschäftigen, ist bislang kein Fortschritt in dieser Hinsicht bekannt. Vor allem die Instabilität von ifnar1 nach Deglykosylierung stellt ein generelles Problem dar.

Da sich bislang alle *in vitro* Untersuchungen auf Studien mit den Ektodomänen der Rezeptoruntereinheiten konzentrierten, würden Experimente mit Konstrukten inklusive der Transmembrandomänen oder sogar der zytoplasmatischen Domänen weitere Erkenntnisse über die Architektur des ternären Komplexes und der differentiellen Signaltransduktion liefern. Auch ist bislang nicht bekannt, ob die Transmembrandomänen eine Affinität zueinander besitzen. Bindungsstudien mit den isolierten Transmembrandomänen könnten weitere Informationen hierzu liefern.

G. Abkürzungsverzeichnis

AF488	Alexa Fluor 488
AT565	ATTO 565
AT655	ATTO 655
ATP	Adenosintriphosphat
Au	Arbitrary units
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CBM	Zytokinbindemodul
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Extrazelluläre Domäne
Epo	Erythropoetin
FNIII	Fibronectin-III
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GH	<i>Growth Hormone (Wachstumsfaktor)</i>
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IDA	<i>Iminodiacetic Acid</i>
ifnar1-EC	Ektodomäne von ifnar1
ifnar1-H10	Ektodomäne von ifnar1 mit C-terminalen His-Tag
ifnar1-tl	Ektodomäne von ifnar1 ohne His-Tag
ifnar2-tl	Ektodomäne von ifnar2 ohne His-Tag
IMAC	immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani
MW	Molekulargewicht
NTA	<i>Nitrilotriacetic Acid</i>
OG488	Oregon Green 488
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PNK	Polynukleotidkinase
R1	ifnar1-EC
R2	ifnar2-EC
RfS	Reflektrometrische Interferenzspektroskopie
RT	Raumtemperatur
SD	Subdomäne
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>

SH2	Src Homologie 2
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TIRFS	Totalinterne Reflexions Fluoreszenz Spektroskopie
üN	über Nacht
VEGF	Endothelwachstumsfaktor

H. Anhang

T [°C]	ifnar2-H10/IFN α 2			ifnar1-H10/IFN α 2-HEQ		
	k_a [M $^{-1}$ s $^{-1}$] ^a	k_d [s $^{-1}$] ^b	K_D [nM] ^c	k_a [M $^{-1}$ s $^{-1}$]	k_d [s $^{-1}$]	K_D [nM]
5	7.8×10^5	0.0023	3.0	5.6×10^4	0.13	2300
10	1.3×10^6	0.0042	3.2	7.7×10^4	0.092	1200
15	2.1×10^6	0.0072	3.4	1.5×10^5	0.067	430
20	3.2×10^6	0.015	4.6	1.8×10^5	0.051	280
25	5.1×10^6	0.024	4.7	3.1×10^5	0.047	150
30	7.1×10^6	0.042	5.9	3.4×10^5	0.048	140
35	1.0×10^7	0.082	8.2	3.5×10^5	0.060	170
40	1.6×10^7	0.16	9.9	3.9×10^5	0.087	220

Tabelle 11: Durch temperaturabhängige Bindungsstudien auf Oberflächen ermittelte Ratenkonstanten und Gleichgewichtskonstanten. {^a Assoziationsratenkonstante (SD ~15%); ^b Dissoziationsratenkonstante (SD ~10%); ^c aus den Ratenkonstanten berechnete Gleichgewichtsdissoziationskonstante (SD ~17%)}

	ifnar2-H10/IFN α 2	ifnar1-H10/IFN α 2-HEQ	ifnar1-H10- Δ SD4/IFN α 2-HEQ
	ΔG^0	-46.5 ± 0.3 kJ/mol	-38.1 ± 0.2 kJ/mol
ΔH^0	27 ± 3 kJ/mol	30 ± 5 kJ/mol	30 ± 4 kJ/mol
ΔH^0	63 ± 9 J/mol/K	230 ± 20 J/mol/K	230 ± 20 J/mol/K
ΔC_p^0	-	-6.7 kJmol $^{-1}$ K $^{-1}$	-7.4 kJmol $^{-1}$ K $^{-1}$
$E_A(k_a)$	60 ± 1 kJ/mol	~ 25 kJ/mol	~ 25 kJ/mol
$E_A(k_d)$	85 ± 2 kJ/mol	~ 0 kJ/mol	~ 0 kJ/mol

Tabelle 12: Thermodynamische Parameter bei 25 °C.

	OG488:ifnar1-H10		OG488:ifnar1-H10/IFN α 2-HEQ	
	Q [%] ^a	r [Å] ^b	Q [%] ^a	r [Å] ^b
^{AT565} tris-NTA	55±2	56±1	30±2	67±1
^{FEW646} tris-NTA	25±2	56±1	10±2	68±1

Tabelle 13: Relative Fluoreszenzlöschung und abgeschätzte intramolekulare Abstände bei OG488:ifnar1-H10. {^a relative Abnahme der Fluoreszenz im Vergleich zu OG488:ifnar1-H10; ^b mit Hilfe der Förster-Radien (47 Å für ^{FEW646}tris-NTA und 58 Å für ^{AT565}tris-NTA) abgeschätzte Abstände zwischen Donor und Akzeptor}.

ifnar1-H10 im Komplex mit	t_1 [ns]	A ₁ [%]	t_2 [ns]	A ₂ [%]
— ^a	2,5	21	4,4	79
^{AT565} tris-NTA ^a	1,5	27	3,9	73
^{AT565} tris-NTA/IFN α 2-HEQ ^a	2,0	24	4,0	76
— ^a	2,2	14	4,2	86
^{FEW646} tris-NTA ^a	1,6	20	4,0	80
^{FEW646} tris-NTA/IFN α 2-HEQ ^a	2,0	21	4,0	79
— ^b	1,0	29	4,2	71
^{AT565} tris-NTA ^b	1,0	50	3,8	50
^{AT565} tris-NTA/IFN α 2-HEQ ^b	1,2	42	3,8	58
— ^c	1,3	35	4,3	65
^{AT565} tris-NTA ^c	1,1	50	4,0	50
^{AT565} tris-NTA/IFN α 2-HEQ ^c	1,5	40	4,1	60

Tabelle 14: Analyse der Fluoreszenz-Lebensdauerkurven für OG488:ifnar1-H10 unter verschiedenen Bedingungen. {^a OG488-markiert, durch Ensemble-Messungen bestimmt; ^b OG488-markiert, bestimmt mittels TCSPC; ^c AF488-markiert, bestimmt mittels TCSPC}.

ifnar1-H10 im Komplex mit	τ_{diff} [ms]	A _{diff} [%]	τ_1 [ns]	A ₁ [%]	τ_2 [ns]	A ₂ [%]	τ_3 [ns]	A ₃ [%]
—	5,2	70	21	7	3,4	7	0,2	14
IFN α 2-HEQ	5,2	69	10	7	2	7	0,14	18
^{AT565} tris-NTA	5,2	62	224	11	10	13	1,2	14
^{AT565} tris-NTA/IFN α 2-HEQ	5,2	69	39	9	3,2	8	0,2	14

Tabelle 15: Mittels FCS-Messungen bestimmte Autokorrelationszeiten (t) und Amplituden (A).

I. Literaturverzeichnis

1. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S: **The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, **15**:33-48.
2. Belardelli F, Ferrantini M: **Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity.** *Trends Immunol* 2002, **23**:201-208.
3. Grotzinger J: **Molecular mechanisms of cytokine receptor activation.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1592**:215-223.
4. Renaud JC: **Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**:667-676.
5. Taga T, Kishimoto T: **Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines.** *Annu Rev Immunol* 1997, **15**:797-819.
6. Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uze G: **The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business.** *J Interferon Cytokine Res* 1999, **19**:1069-1098.
7. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA: **Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex.** *Science* 1992, **255**:306-312.
8. Clackson T, Wells JA: **A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface.** *Science* 1995, **267**:383-386.
9. Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA: **Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule.** *Science* 1991, **254**:821-825.
10. Wells JA, de Vos AM: **Structure and function of human growth hormone: implications for the hematopoietins.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1993, **22**:329-351.
11. Rowlinson SW, Behncken SN, Rowland JE, Clarkson RW, Strasburger CJ, Wu Z, Baumbach W, Waters MJ: **Activation of chimeric and full-length growth hormone receptors by growth hormone receptor monoclonal antibodies. A specific conformational change may be required for full-length receptor signaling.** *J Biol Chem* 1998, **273**:5307-5314.
12. Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos RA, Wan Y, McKinstry WJ, Palethorpe K, Seeber RM, Monks TA, Eidne KA, Parker MW, et al.: **Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer.** *Nat Struct Mol Biol* 2005, **12**:814-821.
13. Seubert N, Royer Y, Staerk J, Kubatzky KF, Moucadel V, Krishnakumar S, Smith SO, Constantinescu SN: **Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer.** *Mol Cell* 2003, **12**:1239-1250.
14. D'Andrea AD, Fasman GD, Lodish HF: **Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor beta chain: a new receptor family.** *Cell* 1989, **58**:1023-1024.
15. Koury MJ, Bondurant MC: **The molecular mechanism of erythropoietin action.** *Eur J Biochem* 1992, **210**:649-663.

16. Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish HF: **Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor.** *Blood* 1993, **81**:2223-2236.
17. Wilson IA, Jolliffe LK: **The structure, organization, activation and plasticity of the erythropoietin receptor.** *Curr Opin Struct Biol* 1999, **9**:696-704.
18. Matthews DJ, Topping RS, Cass RT, Giebel LB: **A sequential dimerization mechanism for erythropoietin receptor activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:9471-9476.
19. Philo JS, Aoki KH, Arakawa T, Narhi LO, Wen J: **Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction.** *Biochemistry* 1996, **35**:1681-1691.
20. Syed RS, Reid SW, Li C, Cheetham JC, Aoki KH, Liu B, Zhan H, Osslund TD, Chirino AJ, Zhang J, et al.: **Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation.** *Nature* 1998, **395**:511-516.
21. Zhan H, Liu B, Reid SW, Aoki KH, Li C, Syed RS, Karkaria C, Koe G, Sitney K, Hayenga K, et al.: **Engineering a soluble extracellular erythropoietin receptor (EPObp) in *Pichia pastoris* to eliminate microheterogeneity, and its complex with erythropoietin.** *Protein Eng* 1999, **12**:505-513.
22. Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA: **Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation.** *Science* 1999, **283**:987-990.
23. Ballinger MD, Wells JA: **Will any dimer do?** *Nat Struct Biol* 1998, **5**:938-940.
24. Livnah O, Johnson DL, Stura EA, Farrell FX, Barbone FP, You Y, Liu KD, Goldsmith MA, He W, Krause CD, et al.: **An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation.** *Nat Struct Biol* 1998, **5**:993-1004.
25. Remy I, Wilson IA, Michnick SW: **Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change.** *Science* 1999, **283**:990-993.
26. Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M, Nam H, Henis YI, Lodish HF: **Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:4379-4384.
27. Constantinescu SN, Huang LJ, Nam H, Lodish HF: **The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif.** *Mol Cell* 2001, **7**:377-385.
28. Lu X, Gross AW, Lodish HF: **Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains.** *J Biol Chem* 2006, **281**:7002-7011.
29. Aritomi M, Kunishima N, Okamoto T, Kuroki R, Ota Y, Morikawa K: **Atomic structure of the GCSF-receptor complex showing a new cytokine-receptor recognition scheme.** *Nature* 1999, **401**:713-717.
30. Reidhaar-Olson JF, De Souza-Hart JA, Selick HE: **Identification of residues critical to the activity of human granulocyte colony-stimulating factor.** *Biochemistry* 1996, **35**:9034-9041.
31. Hiraoka O, Anaguchi H, Ota Y: **Formation of 1:1 complex of the cytokine receptor homologous region of granulocyte colony-stimulating factor receptor with ligand.** *Biosci Biotechnol Biochem* 1995, **59**:2351-2354.
32. Hiraoka O, Anaguchi H, Asakura A, Ota Y: **Requirement for the immunoglobulin-like domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor in formation of a 2:1 receptor-ligand complex.** *J Biol Chem* 1995, **270**:25928-25934.
33. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, et al.: **IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R.** *Nat Immunol* 2003, **4**:63-68.
34. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP: **IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex.** *Nat Immunol* 2003, **4**:69-77.

35. Bazan JF: **Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**:6934-6938.
36. Pestka S, Kotenko SV, Muthukumar G, Izotova LS, Cook JR, Garotta G: **The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor.** *Cytokine Growth Factor Rev* 1997, **8**:189-206.
37. Soh J, Donnelly RJ, Kotenko S, Mariano TM, Cook JR, Wang N, Emanuel S, Schwartz B, Miki T, Pestka S: **Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor.** *Cell* 1994, **76**:793-802.
38. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: **How cells respond to interferons.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:227-264.
39. Walter MR, Windsor WT, Nagabhushan TL, Lundell DJ, Lunn CA, Zauodny PJ, Narula SK: **Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor.** *Nature* 1995, **376**:230-235.
40. Krause CD, Mei E, Xie J, Jia Y, Bopp MA, Hochstrasser RM, Pestka S: **Seeing the Light: Preassembly and Ligand-Induced Changes of the Interferon gamma Receptor Complex in Cells.** *Mol Cell Proteomics* 2002, **1**:805-815.
41. Krause CD, Lavnikova N, Xie J, Mei E, Mirochnitchenko OV, Jia Y, Hochstrasser RM, Pestka S: **Preassembly and ligand-induced restructuring of the chains of the IFN-gamma receptor complex: the roles of Jak kinases, Stat1 and the receptor chains.** *Cell Res* 2006, **16**:55-69.
42. Walter MR: **Structure of interleukin-10/interleukin-10R1 complex: a paradigm for class 2 cytokine activation.** *Immunol Res* 2002, **26**:303-308.
43. Jones BC, Logsdon NJ, Josephson K, Cook J, Barry PA, Walter MR: **Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:9404-9409.
44. Isaacs A, Lindenmann J: **Virus interference. I. The interferon.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957, **147**:258-267.
45. Pestka S, Krause CD, Walter MR: **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.** *Immunol Rev* 2004, **202**:8-32.
46. Chen J, Baig E, Fish EN: **Diversity and relatedness among the type I interferons.** *J Interferon Cytokine Res* 2004, **24**:687-698.
47. Karpusas M, Nolte M, Benton CB, Meier W, Lipscomb WN, Goelz S: **The crystal structure of human interferon beta at 2.2-A resolution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:11813-11818.
48. Radhakrishnan R, Walter LJ, Hruza A, Reichert P, Trotta PP, Nagabhushan TL, Walter MR: **Zinc mediated dimer of human interferon-alpha 2b revealed by X-ray crystallography.** *Structure* 1996, **4**:1453-1463.
49. Klaus W, Gsell B, Labhardt AM, Wipf B, Senn H: **The three-dimensional high resolution structure of human interferon alpha-2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution.** *J Mol Biol* 1997, **274**:661-675.
50. Mitsui Y, Senda T: **Elucidation of the basic three-dimensional structure of type I interferons and its functional and evolutionary implications.** *J Interferon Cytokine Res* 1997, **17**:319-326.
51. Radhakrishnan R, Walter LJ, Subramaniam PS, Johnson HM, Walter MR: **Crystal structure of ovine interferon-tau at 2.1 A resolution.** *J Mol Biol* 1999, **286**:151-162.
52. Karpusas M, Whitty A, Runkel L, Hochman P: **The structure of human interferon-beta: implications for activity.** *Cell Mol Life Sci* 1998, **54**:1203-1216.
53. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD: **The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling.** *Annu Rev Immunol* 1997, **15**:563-591.
54. Brierley MM, Fish EN: **Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry.** *J Interferon Cytokine Res* 2002, **22**:835-845.
55. Cohen B, Novick D, Barak S, Rubinstein M: **Ligand-induced association of the type I interferon receptor components.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:4208-4214.

56. Uze G, Lutfalla G, Gresser I: **Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA.** *Cell* 1990, **60**:225-234.
57. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S: **Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons.** *Cancer Res* 1998, **58**:2489-2499.
58. Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP, Jr., Halper J, Likosky WH, Lublin FD, Silberberg DH, Stuart WH, van den Noort S: **Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines.** *Neurology* 2002, **58**:169-178.
59. Cooksley WG, Piratvisuth T, Lee SD, Mahachai V, Chao YC, Tanwandee T, Chutaputti A, Chang WY, Zahm FE, Pluck N: **Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B.** *J Viral Hepat* 2003, **10**:298-305.
60. Einhorn S, Grander D: **Why do so many cancer patients fail to respond to interferon therapy?** *J Interferon Cytokine Res* 1996, **16**:275-281.
61. Slaton JW, Karashima T, Perrotte P, Inoue K, Kim SJ, Izawa J, Kedar D, McConkey DJ, Millikan R, Sweeney P, et al.: **Treatment with low-dose interferon-alpha restores the balance between matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin expression in human transitional cell carcinoma of the bladder.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**:2840-2853.
62. Grumbach IM, Fish EN, Uddin S, Majchrzak B, Colamonici OR, Figulla HR, Heim A, Plataniias LC: **Activation of the Jak-Stat pathway in cells that exhibit selective sensitivity to the antiviral effects of IFN-beta compared with IFN-alpha.** *J Interferon Cytokine Res* 1999, **19**:797-801.
63. Rosenblum MG, Yung WK, Kelleher PJ, Ruzicka F, Steck PA, Borden EC: **Growth inhibitory effects of interferon-beta but not interferon-alpha on human glioma cells: correlation of receptor binding, 2',5'-oligoadenylate synthetase and protein kinase activity.** *J Interferon Res* 1990, **10**:141-151.
64. Piehler J, Roisman LC, Schreiber G: **New structural and functional aspects of the type I interferon-receptor interaction revealed by comprehensive mutational analysis of the binding interface.** *J Biol Chem* 2000, **275**:40425-40433.
65. Jaitin DA, Roisman LC, Jaks E, Gavutis M, Piehler J, Van der Heyden J, Uze G, Schreiber G: **Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:1888-1897.
66. Jaks E, Gavutis M, Uze G, Martal J, Piehler J: **Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation.** *J Mol Biol* 2007, **366**:525-539.
67. Domanski P, Witte M, Kellum M, Rubinstein M, Hackett R, Pitha P, Colamonici OR: **Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling.** *J Biol Chem* 1995, **270**:21606-21611.
68. Novick D, Cohen B, Rubinstein M: **The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning.** *Cell* 1994, **77**:391-400.
69. Lutfalla G, Holland SJ, Cinato E, Monneron D, Reboul J, Rogers NC, Smith JM, Stark GR, Gardiner K, Mogensen KE, et al.: **Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster.** *Embo J* 1995, **14**:5100-5108.
70. Domanski P, Colamonici OR: **The type-I interferon receptor. The long and short of it.** *Cytokine Growth Factor Rev* 1996, **7**:143-151.
71. Langer J, Garotta G, Pestka S: **Interferon receptors.** *Biotherapy* 1996, **8**:163-174.

72. Arduini RM, Strauch KL, Runkel LA, Carlson MM, Hronowski X, Foley SF, Young CN, Cheng W, Hochman PS, Baker DP: **Characterization of a soluble ternary complex formed between human interferon-beta-1a and its receptor chains.** *Protein Sci* 1999, **8**:1867-1877.
73. Lamken P, Lata S, Gavutis M, Piehler J: **Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers.** *J Mol Biol* 2004, **341**:303-318.
74. Piehler J, Schreiber G: **Biophysical analysis of the interaction of human ifnar2 expressed in E-coli with IFN alpha 2.** *Journal of Molecular Biology* 1999, **289**:57-67.
75. Gavutis M, Jaks E, Lamken P, Piehler J: **Determination of the two-dimensional interaction rate constants of a cytokine receptor complex.** *Biophys J* 2006, **90**:3345-3355.
76. Bernat B, Pal G, Sun M, Kossiakoff AA: **Determination of the energetics governing the regulatory step in growth hormone-induced receptor homodimerization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:952-957.
77. Letzelter F, Wang Y, Sebald W: **The interleukin-4 site-2 epitope determining binding of the common receptor gamma chain.** *Eur J Biochem* 1998, **257**:11-20.
78. Hecht O, Dingley AJ, Schwanter A, Ozbek S, Rose-John S, Grotzinger J: **The solution structure of the membrane-proximal cytokine receptor domain of the human interleukin-6 receptor.** *Biol Chem* 2006, **387**:1255-1259.
79. Ozbek S, Grotzinger J, Krebs B, Fischer M, Wollmer A, Jostock T, Mullberg J, Rose-John S: **The membrane proximal cytokine receptor domain of the human interleukin-6 receptor is sufficient for ligand binding but not for gp130 association.** *J Biol Chem* 1998, **273**:21374-21379.
80. Novick D, Cohen B, Tal N, Rubinstein M: **Soluble and membrane-anchored forms of the human IFN-alpha/beta receptor.** *J Leukoc Biol* 1995, **57**:712-718.
81. Chill JH, Quadt SR, Levy R, Schreiber G, Anglister J: **The human type I interferon receptor. NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding.** *Structure (Camb)* 2003, **11**:791-802.
82. Piehler J, Schreiber G: **Mutational and structural analysis of the binding interface between type I interferons and their receptor ifnar2.** *Journal of Molecular Biology* 1999, **294**:223-237.
83. Quadt-Akabayov SR, Chill JH, Levy R, Kessler N, Anglister J: **Determination of the human type I interferon receptor binding site on human interferon-alpha2 by cross saturation and an NMR-based model of the complex.** *Protein Sci* 2006, **15**:2656-2668.
84. Roisman LC, Piehler J, Trosset JY, Scheraga HA, Schreiber G: **Structure of the interferon-receptor complex determined by distance constraints from double-mutant cycles and flexible docking.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:13231-13236.
85. Gauzzi MC, Barbieri G, Richter MF, Uze G, Ling L, Fellous M, Pellegrini S: **The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon alpha receptor 1, a component of the interferon alpha/beta receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:11839-11844.
86. Ragimbeau J, Dondi E, Alcover A, Eid P, Uze G, Pellegrini S: **The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression.** *Embo J* 2003, **22**:537-547.
87. Lewerenz M, Mogensen KE, Uze G: **Shared receptor components but distinct complexes for alpha and beta interferons.** *J Mol Biol* 1998, **282**:585-599.
88. Lamken P, Gavutis M, Peters I, Van der Heyden J, Uze G, Piehler J: **Functional cartography of the ectodomain of the type I interferon receptor subunit ifnar1.** *J Mol Biol* 2005, **350**:476-488.
89. Cutrone EC, Langer JA: **Identification of critical residues in bovine IFNAR-1 responsible for interferon binding.** *J Biol Chem* 2001, **276**:17140-17148.
90. Roisman LC, Jaitin DA, Baker DP, Schreiber G: **Mutational analysis of the IFNAR1 binding site on IFNalpha2 reveals the architecture of a weak ligand-receptor binding-site.** *J Mol Biol* 2005, **353**:271-281.

91. Cajean-Feroldi C, Nosal F, Nardeux PC, Gallet X, Guymarho J, Baychelier F, Sempe P, Tovey MG, Escary JL, Eid P: **Identification of residues of the IFNAR1 chain of the type I human interferon receptor critical for ligand binding and biological activity.** *Biochemistry* 2004, **43**:12498-12512.
92. Plataniias LC, Fish EN: **Signaling pathways activated by interferons.** *Exp Hematol* 1999, **27**:1583-1592.
93. Prejean C, Colamonici OR: **Role of the cytoplasmic domains of the type I interferon receptor subunits in signaling.** *Semin Cancer Biol* 2000, **10**:83-92.
94. Bustelo XR: **Regulatory and signaling properties of the Vav family.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:1461-1477.
95. Crespo P, Schuebel KE, Ostrom AA, Gutkind JS, Bustelo XR: **Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product.** *Nature* 1997, **385**:169-172.
96. Micouin A, Wietzerbin J, Steunou V, Martyre MC: **p95(vav) associates with the type I interferon (IFN) receptor and contributes to the antiproliferative effect of IFN-alpha in megakaryocytic cell lines.** *Oncogene* 2000, **19**:387-394.
97. Plataniias LC, Sweet ME: **Interferon alpha induces rapid tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in hematopoietic cells.** *J Biol Chem* 1994, **269**:3143-3146.
98. Uddin S, Sweet M, Colamonici OR, Krolewski JJ, Plataniias LC: **The vav proto-oncogene product (p95vav) interacts with the Tyk-2 protein tyrosine kinase.** *FEBS Lett* 1997, **403**:31-34.
99. Li Y, Batra S, Sassano A, Majchrzak B, Levy DE, Gaestel M, Fish EN, Davis RJ, Plataniias LC: **Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 3 and MKK6 by type I interferons.** *J Biol Chem* 2005, **280**:10001-10010.
100. Uddin S, Yenush L, Sun XJ, Sweet ME, White MF, Plataniias LC: **Interferon-alpha engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase.** *J Biol Chem* 1995, **270**:15938-15941.
101. Deane JA, Fruman DA: **Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation.** *Annu Rev Immunol* 2004, **22**:563-598.
102. Heldin CH: **Dimerization of cell surface receptors in signal transduction.** *Cell* 1995, **80**:213-223.
103. Jiang G, Hunter T: **Receptor signaling: when dimerization is not enough.** *Curr Biol* 1999, **9**:R568-571.
104. Weidemann T, Hofinger S, Muller K, Auer M: **Beyond dimerization: a membrane-dependent activation model for interleukin-4 receptor-mediated signalling.** *J Mol Biol* 2007, **366**:1365-1373.
105. Lata S, Gavutis M, Tampe R, Piehler J: **Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation.** *J Am Chem Soc* 2006, **128**:2365-2372.
106. Fabbrizzi L, Licchelli M, Pallavicini P, Taglietti A: **A Zinc(II)-Driven Intramolecular Photoinduced Electron Transfer.** *Inorg Chem* 1996, **35**:1733-1736.
107. Hutschenreiter S, Neumann L, Radler U, Schmitt L, Tampe R: **Metal-chelating amino acids as building blocks for synthetic receptors sensing metal ions and histidine-tagged proteins.** *Chembiochem* 2003, **4**:1340-1344.
108. Richmond TA, Takahashi TT, Shimkhada R, Bernsdorf J: **Engineered metal binding sites on green fluorescence protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **268**:462-465.
109. Rurack K: **Flipping the light switch 'on'--the design of sensor molecules that show cation-induced fluorescence enhancement with heavy and transition metal ions.** *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2001, **57**:2161-2195.
110. Varnes AW, Dodson RB, Wehry EL: **Interactions of transition-metal ions with photoexcited states of flavins. Fluorescence quenching studies.** *J Am Chem Soc* 1972, **94**:946-950.

111. Piehler J, Schreiber G: **Fast transient cytokine-receptor interactions monitored in real time by reflectometric interference spectroscopy.** *Anal Biochem* 2001, **289**:173-186.
112. Lata S, Reichel A, Brock R, Tampé R, Piehler J: **High-affinity adaptors for switchable recognition of histidine-tagged proteins.** *J Am Chem Soc* 2005, **127**:10205-10215.
113. Hausteil E, Schwille P: **Single-molecule spectroscopic methods.** *Curr Opin Struct Biol* 2004, **14**:531-540.
114. Gavutis M, Lata S, Lamken P, Müller P, Piehler J: **Lateral ligand-receptor interactions on membranes probed by simultaneous fluorescence-interference detection.** *Biophys J* 2005, **88**:4289-4302.
115. Tinazli A, Tang J, Valiokas R, Picuric S, Lata S, Piehler J, Liedberg B, Tampe R: **High-affinity chelator thiols for switchable and oriented immobilization of histidine-tagged proteins: a generic platform for protein chip technologies.** *Chemistry* 2005, **11**:5249-5259.
116. Böhmer M, Pampaloni F, Wahl M, Rahn HJ, Erdmann R, Enderlein J: **Time-resolved confocal scanning device for ultrasensitive fluorescence detection.** *Review of Scientific Instruments* 2001, **72**:4145-4152.
117. Ohi M, Li Y, Cheng Y, Walz T: **Negative Staining and Image Classification - Powerful Tools in Modern Electron Microscopy.** *Biol. Proced. Online* 2004, **6**:23-34.
118. Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A: **SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields.** *J. Struct. Biol.* 1996, **116**:190-199.
119. Radermacher M, Rao V, Grassucci R, Frank J, Timmerman AP, Fleischer S, Wagenknecht T: **Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle.** *J Cell Biol* 1994, **127**:411-423.
120. Randal M, Kossiakoff AA: **The structure and activity of a monomeric interferon-gamma:alpha-chain receptor signaling complex.** *Structure* 2001, **9**:155-163.
121. Oliveberg M, Tan YJ, Fersht AR: **Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:8926-8929.
122. Saecker RM, Tsodikov OV, McQuade KL, Schlax PE, Jr., Capp MW, Record MT, Jr.: **Kinetic studies and structural models of the association of E. coli sigma(70) RNA polymerase with the lambdaP(R) promoter: large scale conformational changes in forming the kinetically significant intermediates.** *J Mol Biol* 2002, **319**:649-671.
123. Dose S, Neuweiler H, Sauer M: **A close look at fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan.** *Chemphyschem* 2005, **6**:2277-2285.
124. Neuweiler H, Schulz A, Bohmer M, Enderlein J, Sauer M: **Measurement of submicrosecond intramolecular contact formation in peptides at the single-molecule level.** *J Am Chem Soc* 2003, **125**:5324-5330.
125. Kuhlbrandt W, Williams KA: **Analysis of macromolecular structure and dynamics by electron cryo-microscopy.** *Curr Opin Chem Biol* 1999, **3**:537-543.
126. Timmermann A, Kuster A, Kurth I, Heinrich PC, Muller-Newen G: **A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor.** *Eur J Biochem* 2002, **269**:2716-2726.
127. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE: **Interferons and their actions.** *Annu Rev Biochem* 1987, **56**:727-777.
128. Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W: **EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions.** *J Struct Biol* 1999, **128**:82-97.

J. Publikationen

Teile dieser Arbeit werden in folgenden Veröffentlichungen publiziert:

Jennifer Julia Strunk, Yvonne Becker, Martynas Gavutis, Eva Jaks, Peter Lamken, Zongli Li, Thomas Walz, Ingo Gregor, Jörg Enderlein, Jacob Piehler

Ligand binding induces a conformational change in ifnar1 that is propagated to its membrane-proximal domain

Journal of Molecular Biology, in Druck

Jennifer Julia Strunk, Ingo Gregor, Yvonne Becker, Peter Lamken, Suman Lata, Annett Reichel, Jörg Enderlein, Jacob Piehler

Probing protein conformations by in *situ* non-covalent fluorescence labeling

Eingereicht

Zongli Li, Jennifer Julia Strunk, Peter Lamken, Jacob Piehler, Thomas Walz

The EM structure of a type I interferon - receptor complex reveals a novel mechanism for cytokine signaling

Journal of Molecular Biology, in Druck

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön gilt Prof. Dr. Jacob Piehler für das interessante Thema und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, sowie seinen nie erlöschenden Optimismus.

Prof. Dr. Volker Dötsch danke ich für die Übernahme der Co-Korrektur dieser Arbeit.

Prof. Dr. Robert Tampé danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Ein großer Dank gebührt den Kooperationspartnern Prof. Dr. Jörg Enderlein sowie Dr. Ingo Gregor für ihr Engagement und Zeit im Projekt „Einzelmolekülanalyse und Fluoreszenz-Lebensdauer“. Außerdem möchte ich mich bei Iris von der Hocht und Dr. Thomas Gensch für ihre Unterstützung bedanken.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Thomas Walz und Dr. Zongli Li gebührt großer Dank für die Analyse des ternären Komplexes mittels Elektronenmikroskopie.

Prof. Dr. Gideon Schreiber und Eyal Kalie danke ich für die Plasmide zur Expression der IFN α 2-Mutanten.

Dr. Klaus Fendler und Juan Jose Garcia Celma danke ich für die freundliche Einweisung und die Benutzung ihres *Stopped-Flow*-Gerätes. Pierre Eid danke ich für den ifnar1-Antikörper.

Peter Lamken und Yvonne Becker danke ich für die tolle Zusammenarbeit und Diskussionen bei der Untersuchung der Konformationsdynamik von ifnar1-EC sowie für die Analyse der ifnar1-Mutanten. Eva Jaks gebührt ein besonderer Dank für die langjährige freundschaftliche Zusammenarbeit u.a. am Rifs/Tirfs-System und die Einführung in die Mysterien der Interferon- und ifnar2-Rückfaltung.

Ali Tinazli und Helge Großmann danke ich herzlich für die Herstellung von Gold-tris-NTA-Chips. Ich danke Suman Lata und Annett Reichel für die Bereitstellung der tris-NTA-Derivate. Bei Eckhard Linker bedanke ich mich für die *Sf9* Insektenzellen sowie die kompetente Einweisung in der Zellkultur.

Meinen oben genannten Kollegen sowie Dirk Schaible, Martynas Gavutis, Natalie Al-Furoukh, Dirk Paterok und Irina Ohlmer danke ich für die gute Zusammenarbeit im Laboralltag.

Vielen Dank auch an meine Eltern und engsten Freunde, die mich immer unterstützt haben.