

**Epitop-abhängige Pathogenität von PR3-Autoantikörpern  
und  
Charakterisierung einer myofibrillären Myopathie mit  
familiärer arrhythmogener rechtsventrikulärer Dysplasie**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Angelika Kuhl**

aus  
Offenbach/Main

Würzburg 2007



Eingereicht am: 19.12.2007

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

Gutachter: PD Dr. Dieter E. Jenne

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Sämtliche Experimente wurden von mir selbst durchgeführt, soweit nicht explizit auf Dritte verwiesen wird. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe weder bereits früher akademische Grade erworben noch versucht zu erwerben.

Angelika Kuhl

Martinsried, den 19.12.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>Summary</b>	1
<b>Zusammenfassung</b>	3
<b>Teil I – Epitop-anhängige Pathogenität von PR3-Autoantikörpern</b>	
<b>Einleitung I</b>	6
1. Wegener`sche Granulomatose	6
2. Proteinase 3 (PR3)	8
3. $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI)	13
4. Anti-Neutrophile-zytoplasmatische-Antikörper (ANCA)	14
5. PR3 Epitop-Charakterisierung	16
6. Rekombinante Proteinexpression	21
7. Zielsetzung	24
<b>Ergebnisse I</b>	25
1. Charakterisierung des PR3 Homolog in Primaten	25
1.1 Vergleich der Primaten-PR3 Aminosäuresequenz mit humaner PR3	26
1.2 Vergleich der ANCA-Bindungsseigenschaften von Primaten-PR3 mit humaner PR3	28
2. Herstellung rekombinanter PR3	30
2.1 Rekombinante Expression von proPR3 in <i>E. coli</i>	30
2.1.1 Periplasmatische Expression von proPR3 in <i>E. coli</i>	30
2.1.2 Zytoplasmatische Expression von proPR3 in <i>E. coli</i>	31
2.1.3 Reinigung von PR3 über hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	36
2.1.4 Konvertierung von renaturierter proPR3 mit Cathepsin C	37
2.1.5 ”Target directed proteolysis” am Ribosom von <i>E. coli</i>	39
2.1.6 Konvertierung von proPR3 mit Enterokinase unter denaturierenden und nativen Bedingungen	42
2.2 Rekombinante Expression von proPR3 in Insektenzellen	44
2.2.1 Aufreinigung und Konvertierung von proPR3	44
2.3 Rekombinante Expression von proPR3 in Flp-in 293 Zellen	45
2.3.1 Etablierung einer stabil exprimierenden proPR3-Zelllinie	46
2.3.2 Aufreinigung und Konvertierung von proPR3 zu katalytisch aktiver PR3	46
3. Strukturanalyse von gibPR3 im Vergleich zum humanen Homolog	48
3.1 Klonierung der PR3-Mutanten	49

4. Biochemische Charakterisierung von rekombinanter hPR3 und gibPR3	51
5. Epitop-Mapping	53
5.1 Charakterisierung von monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpern	53
5.1.1 Einfluß von $\alpha_1$ -PI auf die Antikörperbindung von 12.8 und MCPR3-2	56
5.1.2 Epitopeingrenzung für die monoklonalen Antikörper 12.8 und MCPR3-2	58
5.2 Charakterisierung der ANCA von Patienten mit Wegener`scher Granulomatose	59
5.2.1 Bindung der PR3-ANCA von WG-Patienten an hPR3/ $\alpha_1$ -PI	61
5.2.2 PR3-ANCA von WG-Patienten überlappen mit dem 12.8-Epitop	62
5.3 ANCA-Bindung an hPR3 in Anwesenheit von $\alpha_1$ -PI	63
<b>Diskussion I</b>	64
1. Analyse von Primaten-PR3	64
2. Etablierung einer Methode zur rekombinanten Expression von PR3	65
3. PR3 Epitop-Mapping	71
3.1 Charakterisierung monoklonaler Anti-hPR3-Antikörper	71
3.2 Analyse des ANCA-Epitopspektrums von WG-Patienten	74
3.3 Modell für ANCA-Bindung an hPR3 in Anwesenheit hoher $\alpha_1$ -PI-Konzentrationen	75
4. Ausblick	79
<b>Teil II – Charakterisierung einer myofibrillären Myopathie mit familiärer arrhythmogener rechtsventrikulärer Dysplasie</b>	
<b>Einleitung II</b>	80
1. Myofibrilläre Myopathie (MFM)	80
2. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD)	81
3. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)	82
4. Zielsetzung	83
<b>Ergebnisse II</b>	84
1. Phänotypische Charakterisierung der Familie mit MFM/ARVD	84
2. Genomtypisierung	85
3. Screening der Kandidatengene auf Exondeletion	87
4. Analyse der bi-allelischen Expression der Kandidatengene	88
5. Analyse von ZASP, Myotilin, Metavinculin und SFTPA	90
<b>Diskussion II</b>	92

---

<b>Material</b>	94
1. Chemikalien und Enzyme	94
2. Geräte	94
3. Bakterienstämme	95
4. Zelllinien	96
5. Plasmide und Vektoren	96
6. Oligonukleotide	96
7. Antikörper	97
<b>Methoden</b>	98
1. Molekularbiologische Methoden	98
1.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	98
1.2 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	98
1.3 RNA-Isolierung aus Muskelzellen	99
1.4 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	99
1.5 DNA-Restriktionsverdau	100
1.6 Dephosphorylierung von DNA am 5`-Ende	100
1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration	100
1.8 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	101
1.9 DNA-Isolierung aus Agarosegelen	101
1.10 Ligation von DNA-Fragmente	101
1.11 DNA-Transformation	102
1.12 DNA-Sequenzanalyse	102
1.13 Klonierung der Expressionskonstrukte	103
2. Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	104
2.1 „Inclusion body“ (IB)-Präparation	105
2.2 Solubilisierung der Inclusion Bodies (IB)	105
2.3 Renaturierung von solubilisiertem Protein	106
2.4 Aktivierung von PR3	107
3. Rekombinante Proteinexpression in Insektenzellen	109
3.1 Kultivierung von High Five-Insektenzellen	109
3.2 Einfrieren von High Five-Insektenzellen	110
3.3 Auftauen von High Five-Insektenzellen	110
3.4 Transfektion von Insektenzellen	110
4. Rekombinante Proteinexpression in 293-Zellen mit dem Flp-in System	110
4.1 Kultivierung von Flp-in 293-Zellen	111
4.2 Einfrieren von Flp-in 293-Zellen	111

---

4.3	Transfektion von Flp-in 293 Zellen	112
4.4	Etablierung einer stabil exprimierenden proPR3-Zelllinie	112
4.5	proPR3-Expression in stabil transfizierten Flp-in 293 Zellen	112
5.	Proteinreinigung	113
5.1	Reinigung von rekombinanter PR3 über Nickel-Affinitätschromatographie	113
5.2	Reinigung von renaturierter PR3 über FPLC	114
5.3	Reinigung von nativer proPR3 über S-Protein-Agarose	115
6.	Proteinanalytische Methoden	115
6.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	115
6.2	Proteindetektion	116
6.3	Western-Blot Analyse von Proteinen	117
6.4	Spektrophotometrische Proteinquantifizierung	118
6.5	Colorimetrische Proteinquantifizierung	118
6.6	Proteinsequenzierung	118
6.7	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von rekombinanter PR3	119
6.8	Inhibition der enzymatischen Aktivität von PR3	120
6.9	Titration des aktiven Zentrums von PR3	120
6.10	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	120
	<b>Literaturverzeichnis</b>	122
	<b>Anhang</b>	138
1.	Abkürzungen	138
2.	PR3 Nukleotid- und Aminosäuresequenz	141
	<b>Lebenslauf</b>	143
	<b>Publikationen</b>	144
	<b>Danksagung</b>	145
		146



---

## Summary

In the first part of this work we characterised antibody-binding epitopes of human proteinase 3 (hPR3), the autoantigen in Wegener's granulomatosis (WG). WG is an autoimmune disorder characterized by chronic inflammation of the upper and lower respiratory tract, perivascular inflammation and glomerulonephritis. WG is associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), which recognize conformational epitopes on the surface of hPR3 from azurophilic granules of neutrophil granulocytes.

To determine, which epitopes are disease specific and pathogenetically relevant, we first identified a humanoid PR3 homolog which was used to map and distinguish the various ANCA-binding epitopes. Previous studies with linear peptides as well as human/mouse PR3 chimera yielded conflicting results and a possible ANCA-epitope could not be identified.

To overcome these difficulties we analysed the PR3 amino acid sequence of primates *Pan troglodytes* versus (chimpanzee), *Macacca mulatta* (macaque) and *Hylobates pileatus* (gibbon) and compared the ANCA-binding pattern of these species to the human homolog. Amino acid differences and ANCA cross-reactivity correlated with the phylogenetic distance to the human homolog. We recognized the most useful PR3 variant was the gibbon equivalent (gibPR3) because it harboured a limited number of amino acid differences and showed an intermediate ANCA binding pattern with binding of some but not all monoclonal anti-hPR3 antibodies and WG patient sera.

To determine the epitopes of monoclonal anti-hPR3 antibodies and to discriminate the various epitopes with regard to disease specificity or pathogenetic relevance, we generated three PR3-chimera by reverting non-conserved PR3-loops to the respective human amino acids. ProPR3 was expressed in Flp-in HEK 293 cells and purified from cell culture supernatant. After conversion of the proform to the active conformation using enterokinase the recombinant material showed specific catalytic activity and was inhibited by the physiological inhibitors  $\alpha_1$ -proteinase-inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) and elafin. This indicated that each PR3-chimera adopted a native and active conformation.

For epitope analysis an enzyme-linked immunosorbent assay was developed, where PR3 was coupled via its C-terminal His<sub>6</sub>-tag to nickel-coated microtiter plates. In this way, no epitope is buried by antibody capturing nor is the PR3 structure changed. Moreover, antibody binding occurs in solution.

The epitope of monoclonal anti-hPR3 antibody MCPR3-2 was mapped to a region defined by amino acids Arg60, Gln63A and Leu90 (chymotrypsinogen numbering), whereas Met35, Asn38A, Pro39B and Arg74 of the N-terminal PR3 domain contributed to the 12.8 epitope. The latter epitope was recognized by the majority of ANCA from Wegener patients tested and seems to be an ANCA-targeted region.

The 12.8 epitope overlaps with the  $\alpha_1$ -PI binding site, too. Therefore antibody and inhibitor directly compete for binding to hPR3. Moreover we showed that antibody binding strongly depends on the concentration of this inhibitor.  $\alpha_1$ -PI-concentrations of 1 mg/ml allowed partial binding to PR3 and

concentrations below shifted the binding towards the antibody. This finding indicates that a protease-inhibitor balance is critical because ANCA-binding to membrane bound PR3 on the surface of neutrophils would lead to activation and release of proteolytic enzymes to the environment and to an uncontrolled proteolytic activity.

This method of epitope-screening using PR3 homologs from various species, exploits the natural conformational diversity of functionally active homologs to identify epitopes on the surface of hPR3 and offers the possibility to develop altered hPR3 antigens with higher diagnostic specificity for WG and monovalent ANCA neutralizing properties for future therapeutic applications.

The second part of this studies were dedicated to the search for the genetic defect in a Swedish family suffering from autosomal dominant myofibrillar myopathy (MFM) in combination with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC7). Previously MFM/ARVC7 was tentatively mapped to chromosome 10q22.3 in this family. To date, neither the genetic defect in ARVC7 nor CMD1C, a cardiomyopathy that also maps to the same region, has been reported. In a comprehensive follow up study we reexamined the previous linkage data for MFM/ARVC7 by genome wide SNP analyses and confirmed the locus assignment using a high density single nucleotide polymorphism (SNP) marker panel from Affymetrix (Human Mapping 10K Array). No other regions with significant evidence for linkage were discovered. The critical interval was narrowed down to 4.1 Mbp between the two markers D10S1645 and D10S1786. This minimal region still overlapped with the previously reported locus for cardiomyopathy, dilated 1C (CMD1C), but up to date the genetic defect in the latter family has also not been clarified.

Because no mutation was found in the coding exons of the 18 candidate genes for MFM/ARVC7 we tried to identify small genomic deletions and generated hybrid cell lines carrying only the affected or the normal chromosome 10 homolog. All sequence tagged sites and exons, however, were present on both homologs excluding the possibility of intragenic and submicroscopic deletions. Furthermore, we identified SNPs within the transcribed sequences of 10 candidate genes and showed expression of both alleles in patient muscle cDNA. Subtle alterations in noncoding transcripts, introns, promoter regions or splicing enhancers, genomic inversions or de novo insertions are probably responsible for both disparate syndromes and have to be investigated.

## Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Antikörper-bindende Epitope von humaner Proteinase 3 (hPR3), dem Autoantigen der Wegener'schen Granulomatose (WG), charakterisiert. WG ist eine Autoimmunerkrankung, die durch chronische Entzündung des oberen und unteren respiratorischen Trakts, Vaskulitis und Glomerulonephritis gekennzeichnet ist. WG ist mit Anti-Neutrophilenzyttoplasmatischen-Antikörpern (ANCA) assoziiert, die spezifisch gegen konformationelle Epitope auf der Oberfläche der Serinprotease hPR3 aus azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten gerichtet sind.

Die Charakterisierung von ANCA-bindenden Epitopen ist für ein besseres Krankheitsverständnis unverzichtbar. Studien mit linearen synthetischen Peptiden der PR3 Sequenz lieferten nur unzureichende Aufschlüsse über mögliche ANCA-Epitope. Auch PR3-Chimäre zwischen Mensch und Maus konnten nicht zur Aufklärung beitragen. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach einem geeigneten PR3-Homolog gesucht, welches sich durch den gezielten Austausch von Oberflächen-Loops für die Kartierung von ANCA-Epitopen eignet. Zunächst wurde die PR3 Aminosäuresequenz der Primaten *Pan troglodytes versus* (Schimpanse), *Macacca mulatta* (Makakke) und *Hylobates pileatus* (Gibbon) analysiert und die Reaktivität gegenüber ANCA mit dem humanen Homolog verglichen. Sowohl Aminosäuresequenz als auch ANCA-Kreuzreaktivität korrelierten mit der phylogenetischen Distanz zu hPR3. Aufgrund der Bindungseigenschaften von Gibbon-PR3 (gibPR3) wurde dieses Homolog für Epitopstudien herangezogen, da die Aminosäuresequenz nur geringfügig von hPR3 abweicht und die Bindung von monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpern und WG-Patientenseren im Immunoblot ein deutlich abgeschwächtes Signal lieferte oder keine Reaktivität mehr aufwies.

Für die Epitop-Charakterisierung wurden anschließend gezielt innerhalb von gibPR3 Aminosäuren gegen die humane Sequenz ausgetauscht und somit drei hPR3/gibPR3-Mutanten generiert. Die rekombinante Expression von proPR3 erfolgte in Flp-in HEK 293 Zellen und wurde von dort aus dem Zellkultur-Überstand gereinigt. Nach Konvertierung der PR3-Proform mittels Enterokinase zeigte das gewonnene Material spezifische katalytische Aktivität und konnte durch die physiologischen Inhibitoren  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) und Elafin inhibiert werden. Dieser Befund belegt klar, dass das rekombinante, konvertierte Material die native Konformation besitzt.

Um das Epitopspektrum genau zu analysieren, wurde ein Festphasenimmunoassay (ELISA) entwickelt, bei dem PR3 über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag an Nickel-beschichtete Mikrotiterplatten gebunden wurde. Dies hat den Vorteil, dass keine Epitope (z. B. beim Capture-ELISA) bei der Immobilisierung mittels Antikörper verdeckt werden oder die Struktur des Proteins durch direkte Bindung an die Plattenoberfläche verändert wird. Die Antikörperbindung erfolgt dabei an die frei in Lösung befindliche PR3.

Für den monoklonalen Anti-hPR3-Antikörper MCPR3-2 konnte die Region auf die Aminosäuren

Arg60, Gln63A und Leu90 (Chymotrypsinogen-Nummerierung), das für 12.8 auf Met35, Asn38A, Pro38B und Arg74 der N-terminalen PR3-Domäne eingegrenzt werden. Letztere wurde von der Mehrheit der getesteten ANCA der WG-Patienten erkannt und zeigt somit, dass es sich hierbei um ein krankheitsrelevantes Epitop handelt. Diese Region schließt dabei auch den Bindungsbereich von  $\alpha_1$ -PI ein.

Im weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Bindung des Antikörpers bei gleichzeitiger Anwesenheit von  $\alpha_1$ -PI stark von dessen Konzentration abhängig ist. Bereits bei einer  $\alpha_1$ -PI-Konzentration von 1 mg/ml, konnte eine partielle Antikörperbindung beobachtet werden. Sinkt die Konzentration deutlich, so besitzen Anti-hPR3-Antikörper die Möglichkeit an diese zu binden. Somit konkurrieren Antikörper und Inhibitor um die PR3-Bindungsstellen. Ein ausgewogenes Protease-Inhibitor-Gleichgewicht ist allerdings für eine kontrollierte Protease-Aktivität notwendig. Ist dieses gestört, so kann es zur Bindung von ANCA an hPR3 auf der Membran von Neutrophilen und deren Aktivierung kommen. Dies hat zur Folge, dass vermehrt proteolytische Enzyme freigesetzt werden, welche durch unkontrollierte enzymatische Aktivität Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigung hervorrufen.

Durch die hier beschriebene Methode des Epitop-Screenings unter Verwendung von PR3-Homologen verschiedener Spezies wurden die natürlichen konformationellen Unterschiede funktionell aktiver Varianten für die Epitop-Charakterisierung auf der Oberfläche von hPR3 genutzt. Sie bietet außerdem die Möglichkeit veränderter PR3-Antigene mit einer verbesserten diagnostischen Spezifität für WG zu entwickeln oder die ANCA-neutralisierende Eigenschaften für zukünftige therapeutische Anwendungen zu nutzen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung einer autosomal-dominant vererbten myofibrillären Myopathie (MFM) in Kombination mit familiärer arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie 7 (ARVD7) einer schwedischen Familie.

Bei MFM handelt es sich um eine genetisch heterogene Gruppe chronischer Muskelfunktionsstörungen mit einem gemeinsamen Phänotyp. MFM ist durch eine langsam fortschreitende Muskelschwäche und -atrophie gekennzeichnet, wobei die proximale und/oder distale Skelettmuskulatur betroffen ist. ARVD ist durch eine fibrös-fettige Degeneration der rechtsventrikulären Kardiomyozyten gekennzeichnet.

Der Defekt für MFM/ARVD7 wurde vor einigen Jahren auf Chromosom 10q22.3 zwischen D10S605 und D10S215 vermutet, da für multiple Marker aus dieser Region 10q22.3 ein Multipunkt LOD-score von 3 erzielt wurde. Diese Region überlappt mit dem bekannten Locus für dilatative Kardiomyopathie 1C (CMD1C), einer krankhaften Dilatation des Herzmuskels. Der genetische Defekt innerhalb der beiden Familien konnte bis heute nicht aufgeklärt werden. Durch genomweite Kartierung mittels SNP (*single nucleotide polymorphism*)-Typisierung (Affymetrix Human Mapping 10K Array) konnte der

Locus auf 10q22.3 bestätigt werden. Die Region wurde anschließend bis auf 4.1 Mbp zwischen den Markern D10S1645 und D10S1786 eingegrenzt. In diesem Intervall befinden sich 18 Kandidatengene. Nachdem die Protein-kodierenden Exons aller Gene im Krankheitsintervall sequenziert und dennoch keine signifikanten Abweichungen zwischen Patient und der Normalpopulation aufgefallen waren, wurde gezielt nach einer intragenische Deletion gesucht. Um diese auszuschließen und die Lage von Bruchpunkten für Rekombinationen zwischen parentalen Haplotypen abzusichern, wurden von einem der Patienten zwei Maus-Hybridlinien generiert, die jeweils nur eines der beiden 10-er Homologe des Patienten enthalten. Doch auch hier waren die kodierenden Exons der 18 Gene aus beiden Hybridlinien durch PCR mit gleicher Effizienz und Größe amplifizierbar, so dass eine intragenische Deletionen mit großer Sicherheit bei allen Genen ausgeschlossen werden konnte. Des weiteren wurde nach SNPs in der transkribierten Sequenz der Kandidatengene gesucht, und die Expression beider Allele für 10 von 18 Kandidatengenen in Muskel-cDNA nachgewiesen. Kleine Veränderungen in nicht-kodierenden Bereichen, Introns, Promotor-Regionen, genomische Veränderungen oder de novo Insertionen sind mögliche pathogene Mechanismen, die im weiteren untersucht werden müssen.

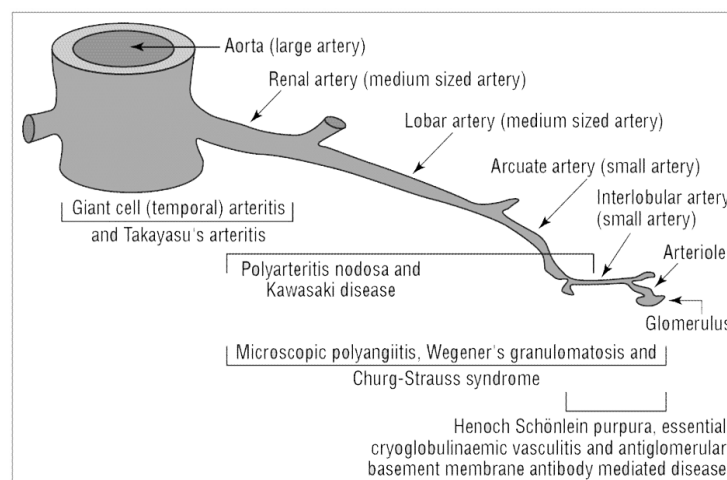
## Teil I

# Epitop-abhängige Pathogenität von PR3-Autoantikörpern

## Einleitung I

### 1. Wegener`sche Granulomatose

Die Wegener`sche Granulomatose (WG) wurde zuerst von Klinger im Jahre 1931 beschrieben [Klinger *et al.*, 1931]. Eine detailliertere Beschreibung lieferte 1939 Friedrich Wegener. Er berichtete über eine "eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und den Nieren" [Wegener *et al.*, 1939]. Der Begriff Wegener`sche Granulomatose wurde 1954 von Godman und Churg eingeführt. Sie identifizierten drei Merkmale: systemische, nekrotisierende "Angiitis", nekrotisierende Entzündung des respiratorischen Trakts und nekrotisierende Glomerulonephritis [Godman & Churg, 1954]. Der Zusammenhang zwischen WG und Anti-Neutrophilen-zytoplasmatischen-Antikörpern (ANCA, *anti neutrophil cytoplasmic antibodies*) wurde 1982 von Davies und Mitarbeitern bei 8 Patienten hergestellt [Davies *et al.*, 1982]. Van der Woude und Kollegen postulierten 1985, dass die Detektion von ANCA ein wichtiger diagnostischer und prognostischer Marker der WG sei [van der Woude *et al.*, 1985]. Durch weitere Studien konnte gezeigt werden, dass ANCA mit drei Kategorien von Vaskulitiden der kleinen Gefäße assoziiert ist: Wegener`sche Granulomatose, Mikroskopische Polyangiitis und Churg-Strauss Syndrom [Gross *et al.*, 1993; Jennette J.C. & Falk R.J., 1995; Kallenberg *et al.*, 1994].



**Abb. 1:** Spektrum systemischer Vaskulitiden und die vorwiegend betroffenen Gefäßtypen nach ihrer Größe. Darstellung anhand der Gefäßtypen der Niere (aus [Savage *et al.*, 2000]).

Die WG ist eine sehr seltene Krankheit über deren Häufigkeit aufgrund der schwierigen Diagnose nur Vermutungen angestellt werden können. Die Zahlen reichen von 0.8-3 Fällen pro 100 000 in Nordamerika und Europa [Cotch *et al.*, 1996; Watts *et al.*, 1995]. Männer und Frauen sind von dieser Krankheit gleichermaßen betroffen. Sie kann in jedem Alter auftreten, wobei die Erstdiagnose häufig bei 50-60 jährigen Patienten erfolgt [Falk *et al.*, 1990a; Pettersson *et al.*, 1995]. Die WG ist gekennzeichnet durch Entzündungen der kleinen Gefäße, hauptsächlich Venolen, Kapillaren, Arteriolen aber auch Arterien und Venen [Jennette *et al.*, 1991]. Bei über 90% der Patienten ist der obere und/oder untere respiratorische Trakt involviert [Duna *et al.*, 1995; Fauci *et al.*, 1983; Leavitt *et al.*, 1990] und in 80% der Fälle kommt es zu einer Beteiligung der Nieren in Form einer Glomerulonephritis [Duna *et al.*, 1995].

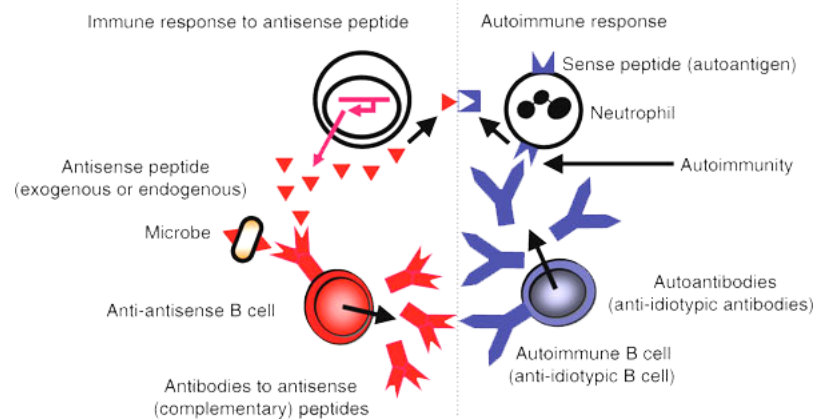
Die Behandlung erfolgt in drei Phasen: Induktion der Remission, Aufrechterhaltung der Remission und Behandlung eines Rückfalls [Bacon *et al.*, 1994]. Eine immunsuppressive Therapie mit Cyclophosphamiden in Kombination mit Corticosteroiden führt in 90% der Fälle zu einer Besserung bzw. in 75% zu einer Remission [Hoffman *et al.*, 1992]. Unbehandelt verläuft die Krankheit oft tödlich. In bis zu 50% der Patienten in Remission kommt es allerdings zu einem Rückfall [Kamesh *et al.*, 2002].

Bis heute ist eine genetische Disposition nicht eindeutig bewiesen. Ein Polymorphismus in der PR3-Promotorregion, welcher zur Überexpression der Protease führt, soll mit WG assoziiert sein [Segelmark *et al.*, 1994]. Auch haben Träger des Z-Allels des Proteaseinhibitors  $\alpha_1$ -PI ein erhöhtes Risiko an WG zu erkranken (s. 3.). Bei Patienten mit bestimmten Polymorphismen im Fc-gamma IIa und IIIa Rezeptor ist das Rückfallrisiko erhöht [Dijstelbloem *et al.*, 1999]. Ferner steht ein CA-Mikrosatellit-Repeat im Promotorbereich von Interleukin 10 im Zusammenhang mit erhöhter Antikörperproduktion und WG [Zhou *et al.*, 2002]. Auch weisen bestimmte Haplotypen der Gene HLA-DPB1 (DP beta 1) und RXRB (Retinoid X Rezeptor  $\beta$ ) eine starke Assoziation zur WG auf [Jagiell *et al.*, 2004].

Eine Theorie zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen am Beispiel der WG entwarf 2003 Pendergraft und Mitarbeiter (s. Abb. 2) [Pendergraft *et al.*, 2004]. Hierbei wird eine Immunantwort durch komplementäre anti-sense-PR3-Peptide (cPR3, complementary PR3), welche die Aminosäuren 98-191 (Chymotrypsinogen-Nummerierung) der PR3-Sequenz umfassen und durch den anti-sense-DNA-Strang von PR3 kodiert wird, initiiert. Daraufhin kommt es zur Bildung von Anti-cPR3-Antikörpern. In einer sekundären Immunantwort, können diese Anti-cPR3-Antikörper ihrerseits eine Anti-Antikörper-Antwort (Anti-Idiotyp) auslösen. Diese Anti-Idiotyp-Antikörper zeigten ihrerseits Kreuzreaktivität mit PR3. In einigen Patienten konnten sowohl Antikörper gegen PR3, als auch cPR3 nachgewiesen werden.

Abschnitte dieser cPR3-Sequenz waren in bakteriellen Antigenen präsent, was für molekulares Mimikry als weiteren pathogenen Mechanismus sprechen würde. Hierbei werden durch Kontakt mit bakteriellen Antigenen, welche ähnliche Epitope wie das komplementäre Peptid besitzen, eine Immunantwort

ausgelöst, bei der diese Antikörper Kreuzreaktivität mit Epitopen des Autoantigens aufweisen [Liang & Mamula, 2000].



**Abb. 2: Autoimmunität wird durch cPR3, einem Peptid komplementär zum humanen Autoantigen PR3, ausgelöst.** Schematische Darstellung der komplementär PR3 (cPR3)-Theorie zur Entstehung von Autoimmunität. Autoimmunität ist eine Immunantwort auf ein Peptid, dessen Aminosäuresequenz komplementär zum eigentlichen Autoantigen (hier cPR3) ist. Diese cPR3 wird vom PR3 anti-sense-DNA-Strang kodiert und umfasst die Aminosäuren 98-191 (Chymotrypsinogen-Nummerierung). Das Immunogen der initialen Immunantwort (idiotypische Antwort) löst nun eine zweite Immunantwort, die Anti-Idiotyp-Antwort, aus, was zur Bildung von Anti-Idiotyp-Antikörpern führt. Diese Anti-Idiotyp-Antikörper sind nun gegen das eigentliche Antigen (hier PR3) gerichtet (aus [Pendergraft et al., 2004]).

## 2. Proteinase 3 (PR3)

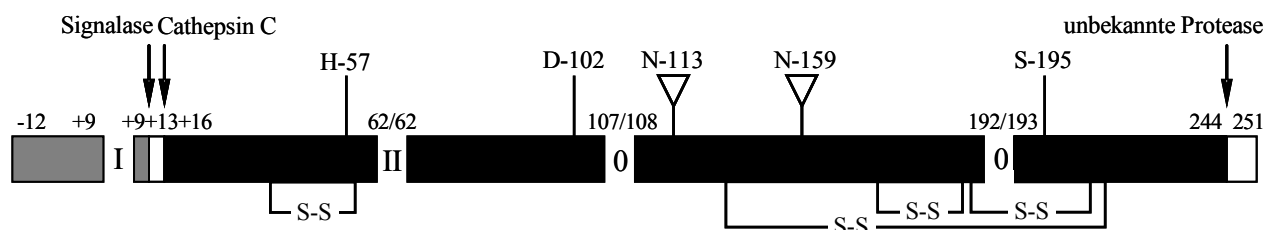
### *Expression und Genregulation*

Humane Proteinase 3 (hPR3) ist neben humaner Neutrophilen-Elastase (NE), Azurocidin (AZU) und Cathepsin G (CatG) eine von vier Serinproteasen, die in neutrophilen Granulozyten und Monozyten lokalisiert ist. Die Gene für PR3, NE und AZU sind in einem Cluster auf Chromosom 19p13.3 lokalisiert [Sturrock et al., 1993; Zimmer et al., 1992]. Die Transkription erfolgt in der selben Orientierung [Zimmer et al., 1992]. Das PR3-Gen umfaßt 5 Exons und 4 Introns. Jede Aminosäure der katalytischen Triade, His57, Asp102 und Ser195 (Chymotrypsinogen-Nummerierung), ist auf einem separaten Exon angeordnet. Drei Polymorphismen in der kodierenden Region des PR3-Gens nahe Asp102 des aktiven Zentrums sind beschrieben: Val103-Ile (rs351111), Ala119-Thr (rs1042281) und Thr120-Ser (rs1042282) [Bories et al., 1989; Campanelli et al., 1990a; Sturrock et al., 1993]. Ob diese Aminosäurevariationen sich auf die Funktion von PR3 auswirken oder krankheitsrelevant sind konnte bis jetzt nicht gezeigt werden.

PR3 mRNA wird in der frühen Phase von myeloiden und monocytischen Zellen synthetisiert [Abrink et al., 1994; Labbaye et al., 1991; Sturrock et al., 1993]. Dabei ist die Expression auf das



promyelozytische und promonozytische Stadium der myeloiden Differenzierung begrenzt. Das Transkriptionsniveau sinkt während der Reifung von Granulozyten und Monozyten [Bories *et al.*, 1989; Cowland & Borregaard, 1999; Zimmer *et al.*, 1992]. In diesen Zellen ist PR3 zusammen mit Myeloperoxidase (MPO), NE und CatG in den Granula von Monozyten [Calafat *et al.*, 1990; Csernok *et al.*, 1990] und den azurophilen Granula von Granulozyten lokalisiert [Calafat *et al.*, 1990; Csernok *et al.*, 1990; Egesten *et al.*, 1994]. In dem sauren Milieu dieser Granula besitzt PR3 eine inaktive Konformation und wird erst in neutralem pH aktiv [Baici *et al.*, 1996].



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteinase 3 (PR3)-Genstruktur.** Die Balken repräsentieren die kodierenden Regionen der 5 Exons, die Lücken zwischen den Balken deuten die Introns an. Die Nummerierung der Proteinsequenz startet nach der Chymotrypsinogen-Nummerierung mit der ersten Aminosäure (+16) des nativen Enzyms, die Nummerierung des Propeptids mit -7. Die Intronnummern deuten den Typ des Introns an. Das erste Intron (Typ I) spaltet Rest +13 nach der ersten Base, das zweite Intron (Typ II) das Kodon für Rest +62 nach der zweiten Base. Die schwarzen Segmente repräsentieren die native PR3-Sequenz, grau das Signalpeptid und weiß Propeptid und C-terminale Extension. Diese werden durch eine Signalpeptidase und andere Proteasen entfernt (s. Pfeil). Die Aminosäuren des aktiven Zentrums Histidin (H), Aspartat (D) und Serin (S), die beiden Glykosylierungsstellen (Dreiecke) und die 4 Disulfidbrücken sind eingezeichnet (verändert nach [Jenne, 1996]).

### Prozessierung und katalytischer Mechanismus

PR3 wird als Präproenzym synthetisiert und in vier aufeinander folgenden Schritten zum nativen Enzym bestehend aus 222 Aminosäuren prozessiert. Zuerst erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids während der Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER). Anschließend wird PR3 an zwei Stellen, Asn113 und Asn159, mit Mannose-Oligosacchariden glykosyliert und im Golgi-Apparat in komplexe Saccharidketten mit terminalem Sialinsäurerest umgewandelt [Garwicz *et al.*, 1997; Goldschmeding *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1996; Witko-Sarsat *et al.*, 1996].

PR3 liegt als monomeres Protein mit 4 Disulfidbrücken vor und migriert in einem nicht reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel als vier diffuse Banden zwischen 28 und 34 kDa. Diese Heterogenität kommt durch ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster während der Biosynthese zustande [Gabay *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1991a; Wilde *et al.*, 1990].

Im dritten Schritt wird das amino-terminale Propeptid, besteht aus Ala-Glu, von Cathepsin C

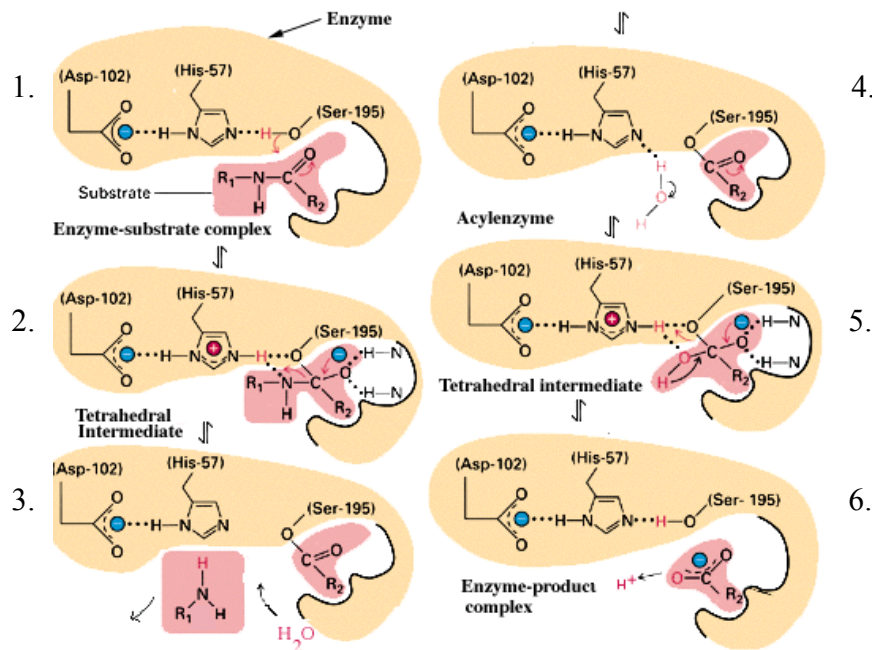
abgespalten. Nach Abspaltung des Dipeptids wird ein Konformationswechsel induziert, die Substratbindungsstelle wird zugänglich, und PR3 dadurch enzymatisch aktiv [Fujinaga *et al.*, 1996; Garwicz *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1996]. Der neue N-Terminus Isoleucin geht dabei eine ionische Wechselwirkung mit Asp194 (Chymotrypsinogen-Nummerierung) ein. Dadurch wird die Orientierung von Lys145 verändert und die Ausbildung einer spezifischen Substratbindungstasche ermöglicht (Zusammenfassung in [Stroud *et al.*, 1974]).

Im vierten und letzten Schritt wird eine 7 Aminosäure lange C-terminale Extension durch eine Trypsin-ähnliche Proteinase entfernt [Garwicz *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1996]. Im sauren Milieu der azurophilen Granula verbleibt PR3 zunächst in einer inaktiven Konformation, die während der Translokation in einen neutralen pH-Bereich durch Konformationswechsel aufgehoben wird [Baici *et al.*, 1996]. Neben diesen Granula wurde PR3 auch in sekretorischen Vesikeln nachgewiesen [Gullberg *et al.*, 1997; Witko-Sarsat *et al.*, 1999].

PR3 gehört zur Familie der Trypsin-ähnlichen neutralen Serinproteasen. Diese Gruppe leitet sich aus der hochkonservierten Struktur des katalytischen Zentrums, der sog. katalytischen Triade, bestehend aus Histidin, Aspartat und Serin, ab. Ein Teil des Substrats wird bei dieser Proteasefamilie während der Katalyse kovalent an das Enzym gebunden. Im ersten Schritt wird nach Bindung des Substrats in die Bindungstasche des Enzyms und Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes die Esterbindung des Substrats gespalten. Dabei greift das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe von Ser195 nukleophil das Carbonylatom der Peptidbindung des Substrats an. Gleichzeitig wird ein Proton von Ser195 auf His57 übertragen. Der positiv geladene Imidazolring wird durch elektrostatische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Asp102 stabilisiert. Dieses tetraedrische Zwischenprodukt wird durch Übertragung des Protons vom Imidazolring des His57 auf das Stickstoffatom der Peptidbindung aufgelöst. Das C-terminale Fragment mit dem neu gebildeten N-Terminus diffundiert ab, womit der Acylierungsschritt vollzogen ist. Die danach erfolgende Deacylierung stellt die Umkehrung der Acylierung dar, wobei die Aminkomponente durch Wasser ersetzt wird. Zuerst zieht His57 ein Proton vom Wasser ab, die verbleibende Hydroxylgruppe greift das Carbonylkohlenstoffatom der an Ser195 gebundenen Acylgruppe an. Wie bei der Acylierung entsteht vorübergehend ein tetraedrisches Zwischenprodukt. Im letzten Schritt gibt His57 ein Proton an Ser195 ab, welches die saure Komponente des Substrats entlässt [Stryer *et al.*, 1995]. In Abb. 4 ist der katalytische Mechanismus von Serinproteasen bildlich dargestellt. Die Spezifität von PR3 wird durch die Aminosäuren Gly189, Ile190, Phe192, Asp213, Val216 und Asp226 bestimmt [Bode *et al.*, 1989; Brubaker *et al.*, 1992]. PR3 bevorzugt kleine, aliphatische Aminosäuren wie Alanin, Serin oder Valin an P1-Position [Brubaker *et al.*, 1992; Kam *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1991a].

Die Aktivität von PR3 wird präzise durch endogene Proteininhibitoren reguliert. Der wichtigste physiologische Inhibitor ist  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI, s. auch 3.) [Bergenfeldt *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1991a]. Hierbei unterliegt PR3 einer starken Regulation durch hohe Konzentrationen an

zirkulierendem  $\alpha_1$ -PI. Weitere PR3 Inhibitoren sind Elafin, ein Inhibitor der vor allem in der Haut gefunden wird [Wiedow *et al.*, 1991], und  $\alpha_2$ -Makroglobulin [Bergensfeldt *et al.*, 1992].



**Abb. 4: Katalytischer Mechanismus der Serin-Proteasen:** (1.) Bindung des Substrats in die Bindungstasche des Enzyms und Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes. (2.) Spaltung der Esterbindung des Substrats, wobei das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe von Ser195 nukleophil das Carbonylatom der Peptidbindung des Substrats angreift und ein Proton von Ser195 auf His57 übertragen wird. Der positiv geladene Imidazolring wird dabei durch Asp102 stabilisiert. Das tetraedrische Zwischenprodukt wird durch Übertragung des Protons vom Imidazolring des His57 auf das Stickstoffatom der Peptidbindung, aufgelöst. (3.) Die Aminkomponente diffundiert ab, womit der Acylierungsschritt beendet ist. (4.-6.) Die nun folgende Deacylierung stellt die Umkehrung der Acylierung dar, wobei die Aminkomponente durch Wasser ersetzt wird

### Physiologische Funktion

PR3 besitzt ein pleiotopes Wirkungsspektrum, welches teilweise mit dem von NE überlappt. Hauptsächlich weist PR3 bakterizide Aktivität gegenüber Gram-negativen Bakterien, wie z.B. *E. coli*, auf, kann aber auch Gram-positive Bakterien (z.B. *S. faecalis*) und Pilze (z.B. *Candida albicans*) abtöten. Die bakterizide Aktivität ist unabhängig von der enzymatischen Aktivität und schließt die Inhibierung der Synthese von Makromolekülen, Energie-abhängigen Membrantransport und Inhibierung des Sauerstoffmetabolismus von Bakterien ein.

Zusammen mit NE kann PR3 nach Migration der Neutrophilen durch die Basalmembran eine Vielzahl von extrazellulären Matrix- und Basalmembranproteinen wie Elastin [Csernok *et al.*, 1994; Kao *et al.*, 1988; Rao *et al.*, 1991a], Fibrinogen und Proteoglykan [Ohlsson & Olsson, 1973], Fibronectin, Laminin,

Vitronectin und Collagen IV [Rao *et al.*, 1991b] degradieren. Die Degradation von Casein und Hämoglobin erfolgt ausschließlich durch PR3 [Campanelli *et al.*, 1990a].

Die enzymatische Aktivität der Protease spielt bei der Modulation von inflammatorischen Mediatoren eine Rolle. PR3 spaltet und inaktiviert den C1 Inhibitor [Leid *et al.*, 1993], zusammen mit NE spaltet es membrangebundenes TNF $\alpha$  [Coeshott *et al.*, 1999; Robache-Gallea *et al.*, 1995], IL-1 $\beta$  [Coeshott *et al.*, 1999], den IL-2 Rezeptor [Bank *et al.*, 1999b] und degradiert und inaktiviert sowohl IL-6 [Bank *et al.*, 1999a] als auch TGF $\beta$  [Csernok *et al.*, 1996]. Allerdings konnte nur für PR3 eine Spaltung von IL-8 zu einer biologisch aktiveren Form gezeigt werden [Padrines *et al.*, 1994].

Die Spaltung des Proteinase-aktivierenden Rezeptors (PAR) der Blutplättchen und Endothelzellen durch PR3 und NE verhindert die Aktivierung des Rezeptors durch Thrombin [Dery *et al.*, 1998]. Beide Proteasen können außerdem Apoptose von humanen Endothelzellen induzieren [Taekema-Roelvink *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1996]. PR3 inhibiert die Aktivierung von neutrophiler NADPH-Oxidase. Dieser Vorgang geschieht unabhängig von der enzymatischen Aktivität [Tal *et al.*, 1998].

### *Membranexpression von PR3*

Obwohl alle Neutrophilen PR3 intrazellulär besitzen, exprimieren nur wenigen PR3 auf der Plasmamembran, welches die Interaktion mit ANCA ermöglicht [Halbwachs-Mecarelli *et al.*, 1995]. Die Menge dieser Membran-PR3 exprimierenden Zellen ist stabil innerhalb eines Individuums und durch genetische Unterschiede beeinflusst [Halbwachs-Mecarelli *et al.*, 1995; Schreiber *et al.*, 2003; von Vietinghoff *et al.*, 2006]. Auch ist die Membranexpression von PR3 in Patienten mit aktiver Wegener'scher Granulomatose erhöht [Csernok *et al.*, 1994; Muller Kobold *et al.*, 1998] und korrelierte mit dem Krankheitsverlauf [Muller Kobold *et al.*, 1998]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Membran-PR3 nur auf Zellen vorzufinden ist, die auch das Neutrophilen-Glykoprotein NB1, ein 50 kDa über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Plasmamembran verankerter Oberflächenrezeptor, exprimieren [von Vietinghoff *et al.*, 2007]. NB1, auch bekannt als CD177 wurde zuerst in Patienten mit neonataler Alloimmun-Neutropenie beschrieben [Klippel *et al.*, 2002; Lalezari *et al.*, 1971]. Vietinghoff und Kollegen zeigten weiterhin, dass die Expression von Membran-PR3 stark mit der Membranexpression von NB1 (mNB1) korreliert und Membran-PR3-Expression auf NB1 positive Neutrophile beschränkt ist. Nach Entfernung von NB1 von der Plasmamembran der Neutrophilen durch Phospholipase C, welches den GPI-linker spaltet [Skubitz *et al.*, 1991], zeigten die Zellen sowohl eine verminderte mNB1 Expression als auch eine Reduktion in der Membran-PR3 Menge. Nach NB1-Transfektion in HEK293 Zellen konnte NB1 auf der Membran detektiert und eine Bindung von hPR3 an die Membran der transfizierten Zellen beobachtet werden, wohingegen bei MPO und NE keine Oberflächenbindung gezeigt werden konnte.

### 3. $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI)

$\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI), auch als  $\alpha_1$ -Antitrypsin ( $\alpha_1$ -AT) bekannt, wird durch ein hochpolymorphes Gen mit mehr als 75 Allelen kodiert. Es ist ein 394 Aminosäuren langes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ~53 kDa. Der Inhibitor besteht aus einer einzigen Polypeptidkette ohne interne Disulfidbrücken.  $\alpha_1$ -PI stellt den wichtigsten Inhibitor von Serinproteasen dar und wird daher auch als Serpin (*serine protease inhibitor*) bezeichnet. Die Inhibition erfolgt in zwei Schritten. Zuerst fungiert  $\alpha_1$ -PI als Substrat. Im zweiten Schritt erfolgt die Inhibition durch eine starke Veränderung der Konformation. Die Konformationsänderung wird durch Reaktion des aktiven Serinrestes (Ser195) der Protease mit dem Reaktionszentrum (RCL, *reactive center loop*) Met358 von  $\alpha_1$ -PI initiiert, welches gespalten wird und sich auf die gegenüberliegende Seite bewegt. Anschließend wird Ser195 der Protease von His57 des aktiven Zentrums wegbewegt und die Salzbrücke zwischen Asp194 und Ile16 gelöst. Asp194 interagiert nun mit Lys328 von  $\alpha_1$ -PI. Dieser Konformationswechsel entspricht der reversiblen Aktivierung des Zymogens, wobei die Protease 37% ihrer ursprünglichen Konformation verliert [Huntington *et al.*, 2000]. Die Struktur des Komplexes von  $\alpha_1$ -PI mit Elastase aus Schweinepankreas ist in Abb. 5 dargestellt.



**Abb. 5: Struktur des  $\alpha_1$ -PI/Elastase-Komplexes.** Elastase (aus Schweinepankreas) ist in grün,  $\alpha_1$ -PI in rot und die RCL in orange gezeichnet. Die Seitengruppen des Ser195 von Elastase (gelb) und Met358 von  $\alpha_1$ -PI (orange) sind farblich dargestellt (PDB 2D26 [Dementiev *et al.*, 2006]).

Verschiedene  $\alpha_1$ -PI-Formen können PR3 nicht so stark inhibieren, welches zu einem gestörten Protease-Serpin-Gleichgewicht und durch unkontrollierte Proteolyseaktivität zu Gewebeschäden führen kann [Esnault *et al.*, 1997]. Homozygote Träger des Z-Allels ( $\alpha_1$ -PI<sub>ZZ</sub>) des  $\alpha_1$ -PI Gens führt zu einem Mangel an  $\alpha_1$ -PI. Die Plasmakonzentration beträgt hierbei nur 150  $\mu$ g/ml [Laurell & Eriksson, 1963], wohingegen normalerweise Konzentrationen im Bereich von 1-1.3 mg/ml vorzufinden sind [Jeppson *et al.*, 1973]. Hinweise auf ein Sekretionsproblem des Proteins in Pi<sub>ZZ</sub>-Trägern lieferten Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*, IB) im rauhen endoplasmatischen Retikulum von Hepatocyten. Diese bestanden hauptsächlich aus einer unlöslichen, polymerisierten Form von  $\alpha_1$ -PI [Eriksson & Larsson, 1975; Lieberman *et al.*, 1972]. Auslöser dieses Translokationsdefekts ist ein Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Lysin an Position 342. Dieser Austausch beeinflusst posttranslationale Modifikationen und dadurch die Sekretion von  $\alpha_1$ -PI<sub>ZZ</sub> [Jeppson *et al.*, 1976; Owen & Carrell, 1977; Yoshida *et al.*, 1976]. Träger des Z-Allels haben ein erhöhtes Risiko an Wegener'scher Granulomatose zu erkranken [Callea *et al.*, 1997; Segelmark *et al.*, 1995].

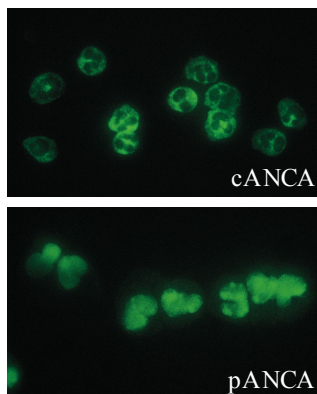
#### 4. Anti-Neutrophile-zytoplasmatische-Antikörper (ANCA)

Anti-Neutrophile-zytoplasmatische-Antikörper (ANCA) sind Autoantikörper, die mit Antigenen im Cytoplasma von Neutrophilen und Monozyten reagieren [Wiik *et al.*, 1989] und deren Nachweis heute als wichtiger und sensitiver Marker von ANCA-assoziierten Vaskulitiden wie WG [van der Woude *et al.*, 1985], Church-Strauss-Syndrom (CSS) und mikroskopische Polyangiitis (MPA) dient. Die beste Diagnose wird bei einer Kombination von Immunfluoreszenz und PR3- bzw. MPO-spezifischen ELISA-Tests erzielt. In der indirekten Immunfluoreszenz auf Ethanol-fixierten Neutrophilen lassen sich drei Fluoreszenzmuster unterscheiden: cANCA, pANCA und aANCA.

cANCA zeigen ein diffuses, cytoplasmatisches und pANCA ein perinukleäres Färbemuster (Abb. 6). cANCA sind hauptsächlich gegen PR3 gerichtet [Goldschmeding *et al.*, 1989] selten MPO [Segelmark *et al.*, 1994], wohingegen es für pANCA mehrere Antigene gibt. Überwiegend erfolgt eine Reaktivität gegenüber MPO [Falk & Jennette, 1988], aber auch NE [Nassberger *et al.*, 1989; Tervaert *et al.*, 1993], Cathepsin C [Halbwachs-Mecarelli *et al.*, 1992], Azurozidin [Zhao & Lockwood, 1996] Lysozym [Hauschild *et al.*, 1993] und selten PR3 [Jennings *et al.*, 1994] werden erkannt. Die perinukleäre Fluoreszenz stellt ein Artefakt dar. Während der Ethanol-Fixierung wird MPO von zytoplasmatischen Granula entlassen, wodurch es zu einer Interaktion des kationischen Moleküls mit negativ geladenen Bereichen der Zellkernmembran kommt.

Atypische oder aANCA sind mit chronischen Infektionen assoziiert und stellen eine Mischung aus cANCA- und pANCA-Fluoreszenzmuster dar. Zielantigene sind Lysozym [Hauschild *et al.*, 1993] und BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) [Savage *et al.*, 2003].

Eine Korrelation von ANCA und Autoimmunvaskulitiden beschränkt sich nicht nur auf WG, CSS oder MPA. Sie wurden auch bei Patienten mit rheumatischen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA), systemischem Lupus erythematodes (SLE) und Sjögren Syndrom beschrieben. Auch bei entzündlichen Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa, Crohn`s disease), Autoimmunhepatitis Typ I oder chemisch induzierten Erkrankungen (z.B. Propylthiouracil, Minocyclin) wurden ANCA nachgewiesen (Zusammenfassung in [Bosch *et al.*, 2006]). Bei Kokain-induzierten Läsionen der Nasenscheidewand wurden ANCA mit doppelter Spezifität für PR3 und NE gefunden [Wiesner *et al.*, 2004]. Die stärkste Krankheitsassoziation ist allerdings für WG beschrieben.



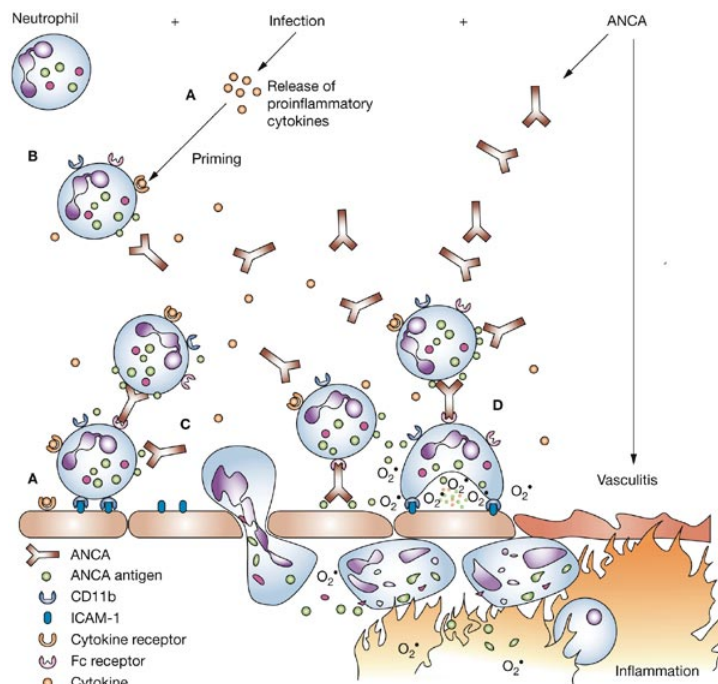
**Abb. 6: ANCA Immunfluoreszenzmuster auf Ethanol-fixierten Neutrophilen.** Zytoplasmatische oder "classic" ANCA (cANCA) liefern ein diffuses, zytoplasmatisches Bemuster und sind hauptsächlich gegen PR3 gerichtet (oben). Perinukleäre ANCA (pANCA) erkennen vorwiegend MPO und weisen ein perinukleäres Muster (unten).

#### *cANCA und ihre Rolle in der WG*

Zahlreiche *in vitro* Befunde und klinische Beobachtungen lassen eine direkte oder indirekte Beteiligung von ANCA bei der Entstehung von Vaskulitiden bei WG vermuten.

Ein Modell abgeleitet aus diesen Beobachtungen ist in Abb. 7 gezeigt. ANCA, zusammen mit proinflammatorischen Stimuli lösen einen Entzündungsprozess aus, der Aktivierung von Neutrophilen, "oxidativen Burst", Degranulation und Produktion von Zytokinen einschließt [Savage *et al.*, 2002]. Zuerst werden durch lokale oder systemische Infektion Zytokine bzw. Chemokine wie TNF $\alpha$  freigesetzt und es erfolgt die vermehrte Bildung von Endotheladhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM). Die Freisetzung von TNF $\alpha$  führt zur Aktivierung der Neutrophilen und es kommt zur verstärkten Bildung von CD11b, einem Adhäsionsmolekül der Neutrophilen. Es erfolgt die Translokation von ANCA-Antigenen (PR3 und MPO) aus den Granula an die Zelloberfläche [Csernok *et al.*, 1994]. Dort bindet PR3 möglicherweise über den Fc $\gamma$ IIa-Rezeptor oder über den kürzlich entdeckten NB1-Rezeptor [von Vietinghoff *et al.*, 2007] an die Oberfläche der Neutrophilen. Im folgenden Schritt interagiert das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des ANCA-Antikörpers mit dem PR3-Antigen auf der Zelloberfläche. Gleichzeitig findet eine Interaktion zwischen Fc-Teil des Antikörpers und Fc-Rezeptor (IIa und IIIb) der Neutrophilen statt, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird, die zur vollständigen Aktivierung der Neutrophilen und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS, *reactive oxygen species*) führt [Falk *et al.*, 1990b]. Infolge dessen adherieren Neutrophile an die Gefäßwand und es kommt zur

Transmigration. Die Neutrophilen degranulieren und setzen somit vermehrt proteolytische Enzyme frei. Dies führt schließlich zu Gewebeschädigung und Vaskulitis (Zusammenfassung in [Rarok *et al.*, 2003a]).



**Abb. 7: Modell der ANCA-vermittelten Aktivierung von Neutrophilen.** (A) Proinflammatorische Zytokine und Chemokine (z.B.  $TNF\alpha$ ) werden aufgrund einer Infektion freigesetzt, was zu einer vermehrten Produktion von Endotheladhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, VCAM) und der Aktivierung von Neutrophilen führt. (B) Diese Aktivierung löst eine Hochregulation von neutrophilen Adhäsionsmolekülen (CD11b) aus und es kommt zur Translokation der ANCA-Antigene von den Granula an die Zelloberfläche. (C) Die CDR-Regionen des ANCA-Antikörpers binden nun an das ANCA-Antigen, der Fc-Teil des Antikörpers reagiert mit dem Fc-Rezeptor der Neutrophilen. Dies bewirkt eine erhöhte Adhärenz der Neutrophilen an die Gefäßwand und es kommt zur Transmigration der Neutrophilen. (D) Die ANCA-vermittelte Aktivierung der Neutrophilen führt zur Bildung von Sauerstoffradikalen und möglicherweise zur Degranulation der Neutrophilen. Dadurch werden vermehrt proteolytische Enzyme freigesetzt und es kommt zur Entzündungsreaktion (verändert nach [Heeringa *et al.*, 2005]).

## 5. PR3 Epitop-Charakterisierung

Seit mehr als 10 Jahren wurden verschiedene Versuche unternommen, die Interaktion zwischen ANCA und PR3 genauer zu charakterisieren. Da der Großteil der PR3-ANCA konformationelle Epitope erkannt waren diese Studien schwierig. Die Epitope sind zudem relativ instabil und gehen durch niedrigen pH Wert (unter 3), Reduktion der Disulfidbrücken und Erhitzen der Protease in SDS verloren. Ein weiterer Beweis für konformationelle Epitope lieferte die Beobachtung, dass eine Bindung von



ANCA an *in vitro* translatierte PR3 unterblieb [Bini *et al.*, 1992]. Trotz der offensichtlichen Notwendigkeit einer intakten PR3-Tertiärstruktur, gibt es drei Studien, in denen ANCA-Bindung an synthetische, lineare Peptide gezeigt werden konnte [Williams *et al.*, 1994; Griffith *et al.*, 2001; van der Geld *et al.*, 2001].

Im Jahre 1994 identifizierte Williams *et al.* [Williams *et al.*, 1994] mehrere antigenspezifischen Bereiche auf der PR3 Oberfläche. Er synthetisierte überlappende Oligopeptide (7 mers) der linearen PR3 Sequenz auf Pins und analysierte so mittels ELISA WG Patientenseren. 11 Epitope wurden identifiziert (s. Tabelle 1). Einige dieser Regionen sind nahe des aktiven Zentrums lokalisiert bzw. ein Epitop schloss sogar Bereiche der katalytischen Triade ein. Durch gezielte Aminosäuresubstitution (Glycin oder Alanin) konnten einzelne immuno-dominante Reste (Arg12, Val119, Prolin120, His121, Arg 132, Ala 135, His136 und Gly178) bestimmt werden. Problem dieses sog. Pin-ELISA besteht darin, dass Aminosäuresequenz und Reinheit dieser Peptide nur durch Entfernung von den Pins bestimmt werden kann. Außerdem konnte eine Interaktion von Kontrollpersonen mit diesen synthetischen Peptiden beobachtet werden und aufgrund ungenügender Daten bezüglich Krankheitsstatus war eine Korrelation zu den identifizierten Epitopen nicht möglich. Chang und Kollegen gelang es allerdings aufgrund hoher unspezifischer Bindungen nicht, mit synthetischen Peptiden PR3-Epitope zu identifizieren [Chang *et al.*, 1995].

In einer weiteren Studie mit synthetischen Peptiden, diesmal 15 Aminosäuren lange Peptide die Signal- und Propeptid einschlossen und über N-terminale Cysteinreste an Mikrotiterplatten gekoppelt wurden, konnten vier Epitope (s. Tabelle 1) mittels ELISA bestimmt werden. Diese reagierten bevorzugt mit WG-Seren in der Anfangsphase (bei Erstdiagnose) der Krankheit. Diese Differenzen im pathogenen Potential von ANCA lassen einen Unterschied in der Epitopspezifität der Autoantikörper vermuten. Auch hier fand man zwei Epitope, die in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert sind. Epitope am C-Terminus bzw. im Signal- oder Propeptid konnten nicht identifiziert werden. Monoklonale PR3-Antikörper (12.8, 4A3, 4A5, 1F12, MCPR3-2, PR3G-2, PR3G-4, PR3G-4) zeigten keine Reaktivität gegenüber diesen synthetischen Peptiden [van der Geld *et al.*, 2001].

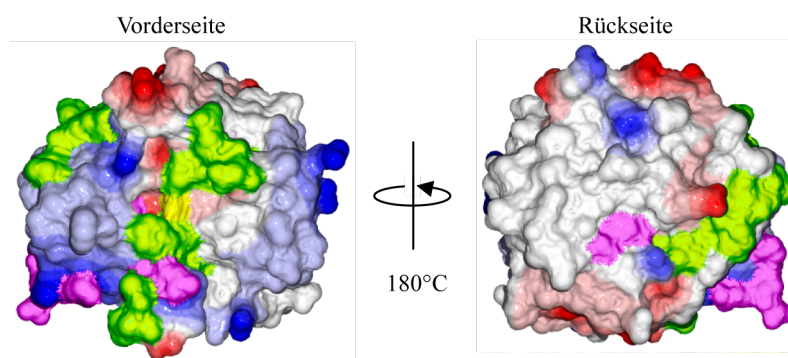
Griffith und Kollegen [Griffith *et al.*, 2001] nutzten das SPOT-System zur Identifizierung der ANCA-Epitope. Hierbei werden Peptide als Spots auf Nitrozellulose synthetisiert. Positive Spots zeigen nach Antikörperbindung eine Farbreaktion, die optisch von unabhängigen Personen ausgewertet wird. Zehn Aminosäuren lange Peptide der PR3-Sequenz wurden synthetisiert und 5 lineare Epitope (s. Tabelle 1) charakterisiert. Vier dieser Epitope wiesen eine Verbindung zum aktiven Zentrum auf.

Obwohl einige Epitope überlappen, scheinen die Ergebnisse dieser drei Studien unschlüssig, da verschiedene PR3-Regionen als Epitope identifiziert worden sind. In Abb. 8 sind die überlappenden Epitope am Strukturmodell von PR3 (PDB 1FUJ) gezeigt. Diese bilden möglicherweise ein oder zwei diskontinuierliche Epitope, da manche Bereiche in der 3D-Struktur benachbart sind. Auch kann die Theorie der komplementären PR3-Peptide (cPR3) nicht für die Entstehung aller PR3-Antikörper

verantwortlich sein, da nur zwei identifizierte PR3-Epitope in dieser Sequenz lokalisiert sind, die WG-Patienten in der Anfangsphase der Krankheit erkennen.

**Tabelle 1: PR3-Epitop-Mapping mit synthetischen Peptiden**

Epitop	Sequenz	verwendeter Assay	getestete WG-Seren	getestete mAK	Referenz
1	GHEAQPH				
2	QPHSRPY				
3	TQEPTQQ				
4	ATVQLPQ				
5	QLPQQDQ				
6	PVPHGTQ	PIN-ELISA	14	-	Williams <i>et al.</i> (1994)
7	RVGAHDP				
8	FCRPHNI				
9	PRRKAGI				
10	FGDSGGP				
11	IDSFVIW				
1	PYMASLQMRGNPGSHFCGG	Kopplung der Cys-Peptide an NH-Platten/ELISA	27	8	van der Geld <i>et al.</i> (2001)
2	TLIHPSFVLTAHCLRD				
3	CLAMGWGRV				
4	VVTFCTPHN				
1	PRRKAGICFGDS				
1	AHCLRDIPQRLVNV	SPOT-System	8	-	Griffith <i>et al.</i> (2001)
2	HGTQCLAMGWGRVGAH				
3	NICTFCPRRKAGIC				
4	CATRLFPDFFTRVAL				
5	WIRSTLRRVEAKGRP				



**Abb. 8: PR3-Epitope basierend auf der Charakterisierung mit synthetischen Peptiden.** 1FUJ Kristallstrukturmodell von humaner PR3 [Fujinaga *et al.*, 1996] gibt die Lage der einzelnen Epitope auf der Oberfläche an. Die Epitope wurden durch Verwendung von synthetischen Peptiden von drei unabhängigen Gruppen bestimmt [Griffith *et al.*, 2001; van der Geld *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1994]. Die grünen Bereiche wurden von mindestens zwei der drei Autoren als Epitop, violette von allen drei beschrieben. Epitope, die nur von einem Autor identifiziert wurden sind hier nicht gezeigt. Das linke Bild zeigt PR3 mit Blick auf das aktive Zentrum. Der aktive Serinrest 195 der katalytischen Triade ist gelb markiert. Im rechten Bild ist PR3 von der Rückseite nach Drehung um 180° zu sehen.

Einen anderen Ansatz für Epitopstudien lieferte kürzliche Selga *et al.* [Selga *et al.*, 2004]. Mit der rekombinanten Generierung von Chimären aus humaner und Maus-PR3. Anti-PR3 monoklonale Antikörper (mAK) unterschieden sich in ihrer Reaktivität gegenüber den einzelnen Chimären aber die Identifizierung eines Epitops war nicht möglich. Auch wurden WG-Seren mit Beteiligung der Niere zum Zeitpunkt der Diagnose von den verschiedenen PR3-Molekülen erkannt, was darauf schließen lässt, dass das Antikörperrepertoire schon zu Beginn der Krankheit variiert.

Rekombinant hergestellte PR3 liefert aber auch Aufschlüsse über die verschiedenen intrazellulären Prozessierungsschritte und deren Bedeutung für die Antikörpererkennung. So wird z.B. der N-Terminus von ANCA nicht erkannt [Sun *et al.*, 1998b] und Strukturänderungen bedingt durch carboxy-terminale Prozessierung [Capizzi *et al.*, 2003] oder Glykosylierung [Specks *et al.*, 2000] scheinen für ANCA-Bindung wenig relevant zu sein, wobei erst kürzlich gezeigt wurde, dass in ca. 20% der Patienten ANCA-Bindung vom PR3-Glykosylierungsmuster beeinflusst ist [Specks *et al.*, 2007].

Eine weitere Frage stellt sich: kommt es zu einer Änderung der PR3-Epitope, die von ANCA im Verlauf der Krankheit erkannt werden (*intramolecular epitope spreading*)? Eine erste Antwort lieferten Russell und Kollegen [Russell *et al.*, 2001]. Sie zeigten, dass ANCA, die konformationelle Epitope auf der Proform und der aktiven PR3 erkennen, mit dem Krankheitsverlauf besser korrelieren als ANCA, welche nur mit PR3-Epitopen der aktiven Protease reagieren. Unter Verwendung der Biosensor-Technologie wurden Kreuz-Inhibitionsstudien mit cANCA verschiedener Personen zum Zeitpunkt der Diagnose und während des letzten Rückfalls durchgeführt. Hierbei konnte einer Änderung im erkannten Epitop festgestellt werden. Interessanterweise konnte bei zwei Patienten eine Epitopausdehnung während des Krankheitsverlaufs beobachtet werden, wohingegen bei den anderen Patienten kein Unterschied zu beobachten war [Rarok *et al.*, 2003b]. Dies zeigt, dass sich ein PR3-Epitop während des Krankheitsverlaufs ändern kann und liefert möglicherweise einen Hinweis auf unterschiedliche funktionelle Eigenschaften dieser Autoantikörper innerhalb verschiedener Krankheitsstadien.

Einen Einfluss von ANCA auf die proteolytische Aktivität von PR3 [Daouk *et al.*, 1995; van de Wiel *et al.*, 2002] und der Interaktion mit der Bindung von  $\alpha_1$ -PI, dem physiologischen PR3-Inhibitor, konnte in mehreren Studien gezeigt werden [Daouk *et al.*, 1995; Dolman *et al.*, 1995; van de Wiel *et al.* 1992; van der Geld *et al.*, 2002]. Die Krankheitsaktivität scheint hierbei im direkten Zusammenhang mit der PR3/ $\alpha_1$ -PI -Komplexbildung zu stehen. ANCA von vielen Patienten während der aktiven Phase von WG interferieren mit der enzymatischen Aktivität von PR3 und der Inhibition durch  $\alpha_1$ -PI. Dies legt die Vermutung nahe, dass – zumindest initial – ANCA an ähnliche Epitope binden, welche das aktive Zentrum einschließen. Allerdings weisen auch ANCA-positive Patienten in Remission aktivitätsinhibierende Antikörper auf. Diese könnten als alternative Inhibitoren fungieren und PR3-induzierte Degradation von extrazellulären Matrixproteinen verhindern [van der Geld *et al.*, 2001]. Andererseits konnte eine Spaltung von ANCA durch PR3 selbst in Entzündungsregionen beobachtet werden [Dolman *et al.*, 1995].

Eine weitere Methode zur Charakterisierung und Einengung von PR3-Epitopen zeigte van der Geld *et al.* [van der Geld *et al.*, 1999]. Mit der Biosensor-Technologie wurden 12 monoklonale PR3-Antikörper (teilweise kommerziell erhältlich) in Inhibitionsstudien analysiert und anschließend in 4 Gruppen eingeteilt, wobei jede Gruppe ein anderes Epitop auf der PR3-Oberfläche erkennt (s. Tabelle 2). Diese Antikörper können nun in Inhibitionsstudien mit einer großen Anzahl von WG-Seren getestet werden, um z.B. einen möglichen Epitopshift innerhalb eines Krankheitsverlaufs detektieren zu können.

**Tabelle 2: Einteilung von monoklonalen anti-PR3 Antikörpern**

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>	<b>Gruppe 4</b>
<b>Anti-hPR3- Antikörper</b>	12.8	PR3G-4	PR3G-3	MCPR3-2
	PR3G-2	PR3G-6	4A5	4A3
	6A6		WGM2	WGM3
	H21F12			

## 6. Rekombinante Proteinexpression

Die Herstellung rekombinanter Proteine ist in den letzten Jahren rasant angestiegen. Dies ist auf die Vielzahl der vorhandenen Expressionssysteme und Aufreinigungsmethoden zurückzuführen. So werden heute neben Bakterien auch Hefen, Pflanzen, Insekten- und Säugerzellen verwendet. Die Wahl des geeigneten Expressionssystems hängt von mehreren Parametern ab. In Bakterien können zwar schnell große Mengen an rekombinantem Protein hergestellt werden, doch sind posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierung oder Phosphorylierung für die Funktion des Proteins notwendig, so muss ein eukaryotisches System herangezogen werden.

### *Prokaryotische Expressionssysteme*

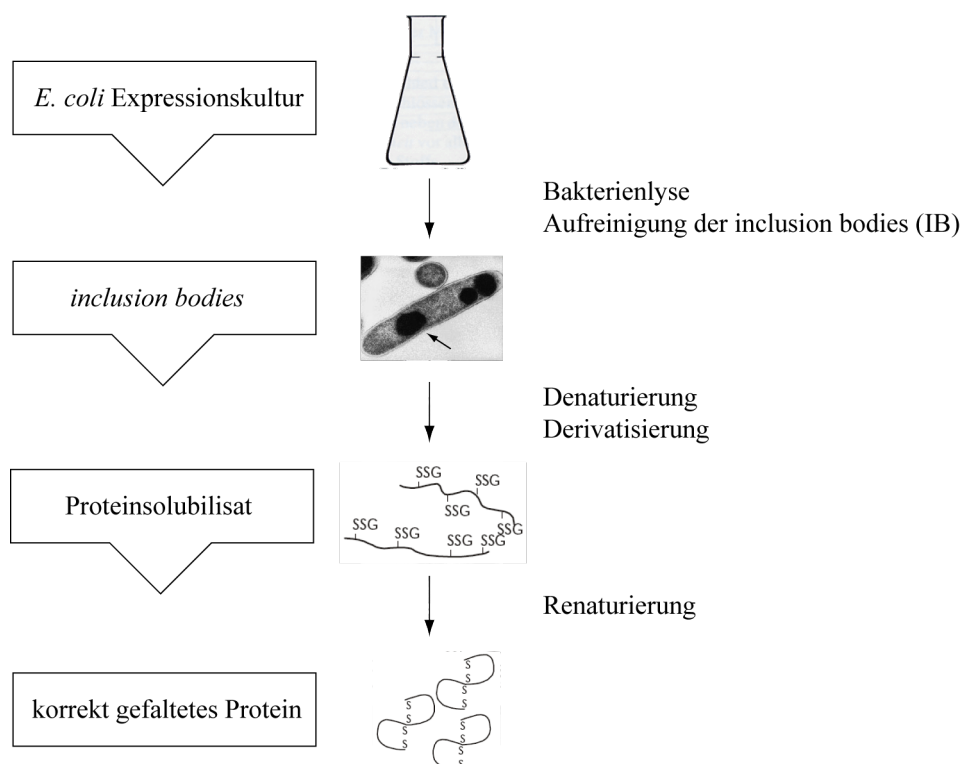
Die Proteinexpression in Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*) ist eine kostengünstige Methode, bei der schnelles Wachstum und hohe Zelldichten in Kombination mit einer hohen Produktionsrate des rekombinanten Proteins erzielt werden können.

Die Überexpression von Proteinen in Bakterien führt allerdings in den meisten Fällen nicht zur Bildung des funktionellen, aktiven und löslichen Proteins im Cytoplasma oder Periplasma. Aufgrund des reduzierenden Milieus wird die korrekte Bildung von Disulfidbrücken verhindert und es entstehen unlösliche, inaktive Proteinaggregate, so genannte Einschlusskörper, auch als *inclusion bodies* (IB) bekannt. Dieses rekombinante Material muss daher solubilisiert und in die dreidimensionale Struktur überführt werden.

Nach Aufschluß der Zellen durch Lysozym oder Druck und Isolierung der IB erfolgt die Solubilisierung unter Verwendung von hochmolaren, chaotropen Lösungen wie Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff. Guanidiniumhydrochlorid wird gegenüber Harnstoff bevorzugt angewendet, da letzteres Cyanat enthalten kann, was zur Carbamylierung von Aminogruppen der Polypeptidkette führt. Da IB nur geringe Mengen an kontaminierenden Proteinen enthalten, kann das Solubilisat direkt für die Renaturierung eingesetzt werden. Hierbei werden die Disulfidbrücken gebildet. Meist geschieht dies durch rasche Verdünnung des Solubilisats in einem geeigneten Puffer. Bei Maus-PR3 hat sich die Methode der Oxidation zu gemischten Disulfiden bewährt [Pfister, 2002]. Die SH-Gruppen des denaturierten Proteins werden durch Zugabe von oxidierenden Thiolkomponenten (Glutathion in oxidierte Form) modifiziert und im anschließenden Renaturierungsschritt die Disulfidbrückenbildung durch Zugabe einer reduzierten Thiolkomponente katalysiert (Abb. 9).

Die Formation von Disulfidbrücken gestaltet sich manchmal als schwierig, da geringe Löslichkeit der denaturierten Polypeptidkette zu starker Aggregation oder Ausbildung falscher Disulfidbrücken führen kann. Die *in vitro* Rückfaltungseffizienz wird durch verschiedene Parameter wie pH, Ionenstärke oder Temperatur stark beeinflusst und muss für jedes Protein optimiert werden. Es zeigte sich, dass L-Arginin als "Faltungshelfer" fungieren kann. Der genaue Mechanismus ist allerdings nicht geklärt. Auch Additive wie Tris, Polyethylenglykol, Glycerin, Triton X-100, CHAPS oder hohe Salzkonzentrationen

können Faltungsintermediate stabilisieren und dadurch die Renaturierungsausbeute verbessern (Zusammenfassung in [Rudolph & Lilie, 1996]).



**Abb. 9: Schematische Übersicht zur Proteinexpression in *E. coli* und Gewinnung von gefaltetem Protein aus Einschlusskörperchen.** 1. Proteinüberexpression in *E. coli* führt zur Bildung von unlöslichen, inaktiven Einschlusskörperchen (inclusion bodies, IB). 2. Gewinnung des IB-Materials durch Bakterienlyse und Zentrifugation. Die Einschlusskörperchen in *E. coli* sind im Bild als schwarze Punkte (s. Pfeil) sichtbar. 3. Solubilisierung der Proteinaggregate in hochmolarem Guanidiniumhydrochlorid und Derivatisierung der Cysteinreste durch Glutathion in oxidierter Form. 4. Schnelle Verdünnung des solubilisierten Proteins in einem geeigneten Puffer unter Zugabe einer reduzierten Thiolkomponente führt zur Faltung des Proteins (Bildung der Disulfidbrücken).

### Eukaryotische Expressionssysteme

Eine andere Möglichkeit zur rekombinanten Proteinexpression bieten eukaryotische Zellsysteme. Diese sind meist zeitaufwendiger und kostenintensiver, da stabil exprimierende Zelllinien etabliert und teure Zellkulturmedien verwendet werden müssen. Zusätzlich ist die Aufreinigung des rekombinanten Proteins aufgrund kontaminierender Proteine der Wirtszelle oder aufgrund serumhaltiger Medien schwierig. Vorteile gegenüber *E. coli* zeigen sich allerdings neben posttranslationaler Modifikation in der korrekten Faltung des exprimierten Proteins.

Die Proteinexpression in Insektenzellen mit dem Bakulovirus-Expressionssystem gestaltet sich als langwierig, da die Herstellung rekombinanter Viren zeitaufwendig ist. Aufgrund der Zelllyse nach

Virusinfektion ist eine Etablierung von stabilen Zelllinien nicht möglich, so dass für jeden Expressionszyklus neue Zellen infiziert werden müssen. Im Jahre 2004 konnten Farrell und Iatrou [Farrell & Iatrou, 2004] zeigen, dass eine transiente Expression in Insektenzellen unter Verwendung von geeigneten Expressionsvektoren möglich ist. Dabei wurden High-five-Zellen in Suspension transfiziert. Dies hat den Vorteil, dass hohe Zelldichten erreicht werden können und ermöglicht eine Expression von mehreren Milligramm an rekombinantem Protein innerhalb weniger Tage. Sind die Zellen an synthetische, serumfreie Medien adaptiert, wird zusätzlich die nachfolgende Aufreinigung erleichtert.

Auch die Verwendung von anderen eukaryotischen Zellen wie CHO oder HEK 293 ist in der Herstellung rekombinanter Proteine weit verbreitet. Die Etablierung von stabilen Zelllinien, die ausreichende Mengen des rekombinanten Proteins exprimieren, ist allerdings auch hier zeitaufwendig, teuer und oft ineffizient.

Die erste erfolgreiche rekombinante Expression von humaner PR3 wurde bereits 1996 durch Halenbeck und Koths (Chiron Corporation, Emeryville USA, US Patent 5843693) [Fujinaga *et al.*, 1996] beschrieben. Die Expression des Zymogens in Sf9-Insektenzellen mit darauf folgender Aufreinigung und Aktivierung lieferte homogenes Material, welches für Kristallisation und hochauflösende Strukturanalysen (2.2 Å) eingesetzt werden konnte. PR3-Expressionen in *Escherichia coli* hingegen lieferten zwar große Mengen an rekombinantem Protein (mehrere mg/l Expressionskultur), allerdings wurde das Antigen nur von polyklonalem Anti-PR3-Kaninchenserum, nicht aber von monoklonalen PR3-Antikörpern erkannt, was auf eine inkorrekte Faltung des Proteins zurückzuführen ist. *Pichia pastoris* exprimierte und sekretierte nur mehrere hundert Milligramm rekombinanter hPR3 in den Zellkulturüberstand. Diese zeigte proteolytische Aktivität und wurde von Kaninchenserum erkannt, reagierte aber nur mit einigen monoklonalen Antikörpern [Harmsen *et al.*, 1997]. Die zur Zeit bevorzugte Methode zur PR3-Expression ist die Verwendung von eukaryotischen Zelllinien, welche sekretorische Granula produzieren wie z.B. HMC-1 Zellen [Specks *et al.*, 1996] oder das Zymogen in den Zellkulturüberstand sekretieren (CHO, HEK293) [Sun *et al.*, 1998a; van der Geld *et al.*, 2000]. Hierbei muss das Proenzym vom Zellkulturüberstand gereinigt und in katalytisch aktive PR3 konvertiert werden.

## 7. Zielsetzung

Die Charakterisierung von PR3-Epitopen wird im wesentlichen durch zwei Faktoren limitiert:

1. geeignetes PR3-Homolog
2. Verfügbarkeit des Antigens

Bis heute gibt es kein geeignetes PR3-Homolog, welches sich durch den gezielten Austausch von Oberflächen-Loops für die Kartierung von ANCA-Epitopen eignet. Studien mit linearen synthetischen Peptiden der PR3 Sequenz lieferten nur unzureichende Aufschlüsse über ANCA Epitope [Griffith *et al.*, 2001; van der Geld *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1994], was die Notwendigkeit einer intakten PR3-Tertiärstruktur nahelegt. Da die Maus-PR3 Aminosäuresequenz nur zu 67 % identisch zu humaner PR3 ist und humane ANCA nicht mit Maus-PR3 kreuzreagieren [Jenne *et al.*, 1997], muss ein humanoideres PR3-Homolog für die Epitopstudien herangezogen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die PR3 Aminosäure-Sequenz von verschiedenen Primaten analysiert, mit dem humanen Homolog verglichen und die Reaktivität gegenüber ANCA getestet werden. Ziel war es, ein PR3-Homolog zu finden, welches von einigen, aber nicht allen ANCA gebunden wird und die Bindungsstärke verglichen mit humaner PR3 deutlich abgeschwächt ist. Durch den gezielten Austausch von nicht konservierten Oberflächenstrukturen innerhalb der Primaten-PR3 hin zur humanen Sequenz sollte das ANCA-Signal verstärkt und das Bindungsepitop von monoklonalen Anti-PR3 Antikörpern bzw. Seren von Wegener Patienten bestimmt werden.

Für diese Epitopstudien war eine effiziente Methode zur rekombinanten Expression des Antigens erforderlich. In der Literatur sind zwar verschiedene Expressionssysteme beschrieben [van der Geld *et al.*, 2000], doch sind diese aufgrund inkorrekt gefalteter oder geringer Ausbeute nur bedingt einsetzbar. Daher sollte für die Herstellung von humaner und Primaten PR3 eine Methode zur rekombinanten Expression dieser Serinprotease etabliert werden, mit der sich enzymatisch aktive, d.h. korrekt gefaltete PR3 herstellen lässt. Dabei standen Effizienz, Reproduzierbarkeit, Ausbeute und Homogenität des rekombinanten Proteins im Vordergrund.



# Ergebnisse I

Als wichtiger pathogener Marker für Wegener`sche Granulomatose (WG) dient der Nachweis von Anti-Neutrophilen-zytoplasmatischen-Antikörpern (ANCA). ANCA von WG-Patienten sind gegen spezifische, konformationelle Epitope auf der Oberfläche von Proteinase 3 (PR3) gerichtet, d.h. sie erkennen das korrekt gefaltete, funktionell aktive Autoantigen mit der N-terminalen Sequenz Ile-Val-Gly-Gly [Specks, 2000]. Erste Schritte ANCA bindenden PR3-Epitope genauer zu charakterisieren, wurde bereits mit synthetischen Peptiden, bestehend aus Abschnitten der PR3-Proteinsequenz, von verschiedenen Gruppen unternommen [Bini *et al.*, 1992; Griffith *et al.*, 2001; van der Geld *et al.*, 2001]. Diese Peptide repräsentieren allerdings nicht die native PR3-Struktur, so dass nur vermutet werden kann, wo mögliche Epitope auf der Oberfläche lokalisiert sind.

Da PR3-Epitope innerhalb der Evolution nicht konserviert sind, somit humane ANCA nicht mit Maus-PR3 (mPR3) interagieren und Human/Maus-PR3-Hybride nur wenig Aufschluß über mögliche Epitope lieferten [Selga *et al.*, 2004], wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einem geeigneten PR3-Homolog gesucht, welches humane ANCA bindet, die Bindungsstärke, verglichen mit humaner PR3 (hPR3), jedoch abgeschwächt ist. Um zu bestimmen, welche Epitope für die Antikörperbindung notwendig bzw. krankheitsrelevant sind, erfolgte anschließend die Generierung von PR3-Mutanten durch gezielten Austausch von Peptidloops auf der PR3-Oberfläche.

Für die Epitopcharakterisierung am Beispiel des nativen Antigens ist die Herstellung rekombinanter, homogener und funktionell aktiver PR3 bzw. PR3-Mutanten unumgänglich. Für die rekombinante Proteinexpression wurden daher verschiedene Systeme getestet um eine gleichbleibende Qualität und Homogenität des Autoantigens zu gewährleisten.

## 1. Charakterisierung des PR3 Homolog in Primaten

ANCA-bindende PR3-Epitope des humanen Antigens sind innerhalb der Primaten nicht konserviert. Daher bestand der erste Schritt der Epitop-Charakterisierung darin, ein passendes humanoides Homolog zu finden, welches einen Teil der Antikörper bindet, die Bindungsstärke jedoch im Vergleich zu humaner PR3 deutlich abgeschwächt ist. Die Analyse von Primaten-PR3 schien hierfür geeignet, da diese durch ihre phylogenetische Distanz nah mit dem Menschen verwandt sind und somit von einer Reaktivität gegenüber ANCA ausgegangen werden kann. Für die Charakterisierung verschiedener ANCA-bindender PR3-Epitope wurde die Aminosäuresequenz von drei verschiedenen Primaten bestimmt, mit dem humanen Antigen verglichen und die Reaktivität gegenüber humanen ANCA mittels Western-blot analysiert.

## 1.1 Vergleich der Primaten-PR3 Aminosäuresequenz mit humaner PR3

RNA aus Gesamtblut des Primaten *Hylobates pileatus* (Gibbon) wurden mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Mit PR3-spezifischen Primern erfolgte anschließend die Amplifikation der PR3-cDNA. Nach Sequenzierung des PCR-Fragments wurde die DNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz übersetzt (Expasy translate tool). Die Sequenzen für Schimpansen- und Makakken-PR3 wurde durch Genomanalysen bestimmt. Abb. 10 zeigt den PR3-Sequenzvergleich der drei Primaten *Pan troglodytes* (Schimpanse, chimpPR3), *Macacca mulatta* (Makakke, mulPR3), *Hylobates pileatus* (Gibbon, gibPR3) und *Mus musculus* (Maus, mPR3) mit dem humanen Homolog (hPR3). Die Proteinsequenz startet mit Ile-16 (Chymotrypsinogen-Nummerierung) der nativen PR3-Sequenz. Unterschiede in der Aminosäuresequenz zu hPR3 sind rot dargestellt, die katalytische Triade (His57, Asp102, Ser195) ist durch fette Buchstaben gekennzeichnet. An Position 103 befindet sich ein Polymorphismus. Hier kann sowohl die Aminosäure Isoleucin als auch Valin vorkommen [Bories *et al.*, 1989; Campanelli *et al.*, 1990b].

Der zur Gruppe der Hominoiden gehörende Schimpanse ist das "menschenähnlichste" PR3-Homolog, was durch eine Differenz in nur 7 Aminosäuren verdeutlicht wird. Gibbons werden zwar auch zu den Hominoiden gezählt, haben sich aber vor 20 Millionen Jahren von der gemeinsamen Entwicklungslinie des Menschen getrennt und sich in eine eigene Richtung weiterentwickelt. Der Aminosäureunterschied, bestehend aus 16 Differenzen, ist somit deutlich höher als die des Schimpansen. Die gemeinsame Entwicklungslinie der Hominoiden und Altweltaffen, denen der Makakke angehört, hat sich bereits vor 35 Millionen Jahren in unterschiedliche Richtungen entwickelt. Diese phylogenetische Distanz wird in der PR3-Differenz deutlich. Hier sind 35 Aminosäureunterschiede vorzufinden. In Tabelle 3 ist der Aminosäuresequenzvergleich nochmal zusammengefasst.

**Tabelle 3: Aminosäuresequenzvergleich (aa 16-243)**

Spezies	Aminosäuredifferenz	Identisch zu hPR3 (%)
Schimpanse	7	97
Gibbon	16	93
Makakke	35	84
Maus	71	67

	16	26	36	44	54
hPR3	IVGGHEAQPH	SRPYMASLQM	RGNPGSHFCG	GTLIHPSFVL	TAAHCLRDIP
chimpPR3	IVGGHEAQP <b>L</b>	SRPYMASLQM	RGNPGSHFCG	GTLIHPSFVL	TAAHCL <b>Q</b> DIP
gibPR3	IVGGHEAQPH	SRPYMASLQ <b>V</b>	RG <b>SL</b> GS <del>SH</del> FCG	GTLIHPSFVL	TAAHCL <b>Q</b> DIP
mulPR3	IVGG <b>RE</b> AQPH	SRPYMASLQ <b>I</b>	<b>QRDL</b> GS <del>SH</del> FCG	GTLIHPSFVL	TAAHCL <b>Q</b> EIP
mPR3	IVGG <b>HEAR</b> PH	SRPY <b>VAS</b> LQL	<b>SRF</b> PGSHFCG	GTLIH <b>PR</b> FVL	TAAHCL <b>Q</b> DIS
	***:***:	***:***:	*****	***** **	*****:*.:
	63A	71	81	92	102
hPR3	QRLVNVVLGA	HNVRTQEPTQ	QHFSVAQVFL	NNYDAENKLN	DILLIQLSSP
chimpPR3	QRLVNVVLGA	HNVRTQEPTQ	QHFSVAQVFL	NNYDAENKLN	DVLLIQLSSP
gibPR3	<b>HRLV</b> NVVLGA	HNV <b>QT</b> QEPTQ	QHFSVAQV <b>FQ</b>	NNYDAENKLN	DVLLIQLSSP
mulPR3	<b>HH</b> LVNVVLGA	HNVRTQE <b>PGQ</b>	QHFSVAQV <b>FQ</b>	NNYDAENKLN	DVLLI <b>QVR</b> GQ
mPR3	<b>WQLV</b> TVVLGA	<b>HDLLS</b> SEPEQ	<b>QKFTIS</b> QV <b>FQ</b>	NNY <b>NPE</b> ENLN	DVLL <b>LQ</b> L <b>NRT</b>
	:**.*****	*: : .*. * *	*:***:***	***:.*:***	*:***:*
	112	122	132	142	153
hPR3	ANLSASVATV	QLPQQDQVVP	HGTQCLAMGW	GRVGAHDPPA	QVLQELNVTV
chimpPR3	ANLS <b>DS</b> VATV	QLPQQDQVVP	HGTQCLAMGW	GRV <b>GTH</b> DPPA	QVLQELNVTV
gibPR3	ANLSASVATV	QLPQQDQVVP	HGTQCLAMGW	GRV <b>GTH</b> DPPA	QVLQELNVTV
mulPR3	<b>ANIS</b> ASV <b>STV</b>	<b>QMPR</b> QDQVVP	HGTQCLAM <b>GR</b>	GRV <b>GTH</b> DPPA	QVLQELNVTV
mPR3	<b>ASLG</b> KEV <b>AVA</b>	<b>SLP</b> QQD <b>Q</b> TL <b>S</b>	<b>QGT</b> QCLAMGW	<b>GRLGT</b> Q <b>APT</b> P	<b>RVL</b> QELNVTV
	*.:. .*:..	.*:***:..	:*****	*:***: *..	:*****
	163	182	190	200	214
hPR3	VTFFCRPHNI	CTFVPRRKAG	ICFGD <b>SGG</b> PL	ICDGIIQ <b>GID</b>	SFVIWGCATR
chimpPR3	VTFFCRPHNI	CT <b>L</b> VPRR <b>R</b> AG	ICFGD <b>SGG</b> PL	ICDGIIQ <b>GID</b>	SFVIWGCATR
gibPR3	VT <b>L</b> CRPHNI	CTFVPRR <b>G</b> AG	ICFGD <b>SGG</b> PL	ICDG <b>VI</b> Q <b>GVD</b>	SFVI <b>R</b> ACATR
mulPR3	VT <b>LLCR</b> TH <b>NV</b>	CTFVPRR <b>S</b> AG	ICFGD <b>SGG</b> PL	ICDG <b>VI</b> Q <b>GVD</b>	SFVI <b>RE</b> CAT <b>G</b>
mPR3	VT <b>L</b> CR <b>EH</b> NV	CT <b>L</b> VPRR <b>A</b> AG	ICFGD <b>SGG</b> PL	IC <b>NGIL</b> H <b>GVD</b>	SFVI <b>RE</b> CAS <b>L</b>
	*:*** **:	***:*** **	*****	*:***:***:	*** **:
	223	233			
hPR3	LFPDFFTRVA	LYVDWIRSTLR			
chimpPR3	LFPDFF <b>A</b> RVA	LYVDWIRSTLR			
gibPR3	<b>H</b> FPDFF <b>A</b> RVA	LYVDWIRSTLR			
mulPR3	<b>Q</b> FPDFF <b>A</b> RVA	LYVDWIR <b>S</b> ILR			
mPR3	<b>Q</b> FPDFF <b>A</b> RV <b>S</b>	<b>MY</b> VDW <b>I</b> Q <b>N</b> VL <b>R</b>			
	*****:***:	:*****:.. **			

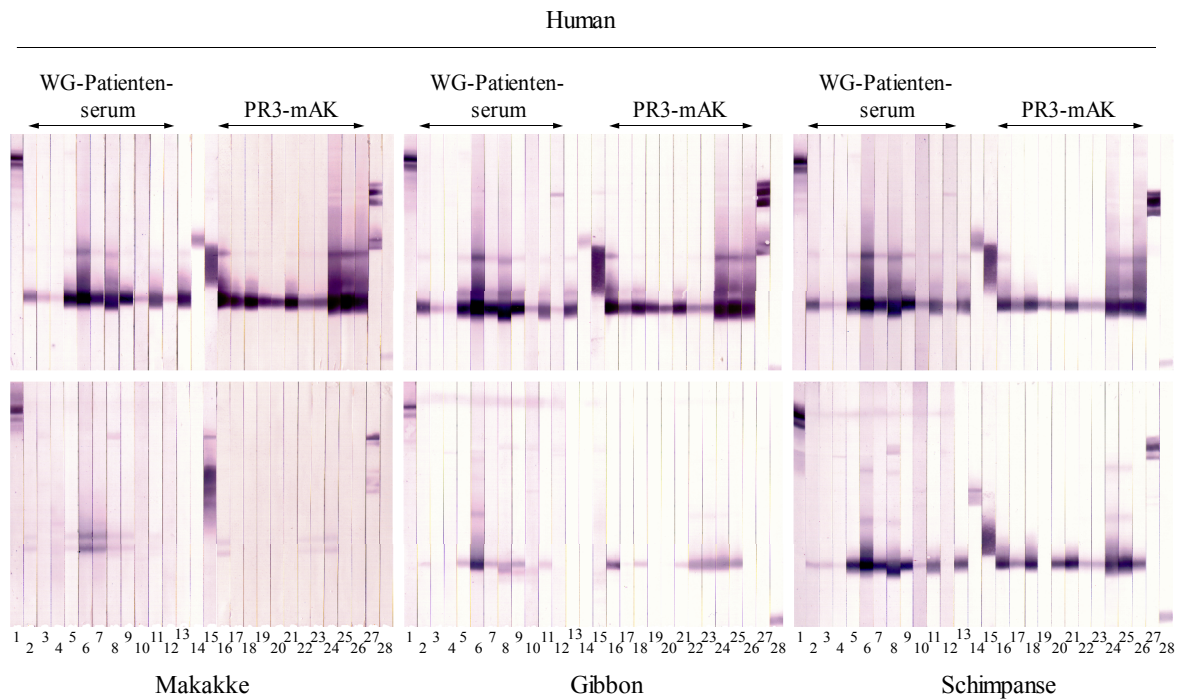
**Abb. 10: Sequenzvergleich der Primaten-PR3 mit dem humanen Homolog und der Maus.** Die Aminosäuresequenz von humaner PR3 (hPR3) wurde mit Schimpanse (chimpPR3), Gibbon (gibPR3), Makakke (mulPR3) und Maus (mPR3) aliniert. Sequenzunterschiede zu hPR3 sind rot, die katalytische Triade bestehend aus His57, Asp102 und Ser195 fett dargestellt. Der Vergleich zeigt außerdem den Grad der Konservierung für jede einzelne Aminosäure innerhalb einer Säule. Identische Aminosäuren in allen alinierten Sequenzen sind durch das Symbol "\*" gekennzeichnet. Ein ":" bedeutet einen konservierten Aminosäureaustausch. Eine semi-konservierte Substitution ist durch einen "." angedeutet. An Position 103 befindet sich ein Polymorphismus (Ile-Val). Das Gibbon PR3-Gen wurde aus Granulozyten-cDNA amplifiziert und die Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz übersetzt. Die Sequenzen von Schimpanse und Makakke wurden durch Genomanalysen bestimmt. Die Sequenz startet mit Ile16 nach der Chymotrypsinogen-Nummerierung.

## 1.2 Vergleich der ANCA-Bindungseigenschaften von Primaten-PR3 mit humaner PR3

Für die Analyse der ANCA-Bindungseigenschaften von Primaten-PR3 im Vergleich zum humanen Antigen wurde aus Gesamtblut von Makakke (*Macacca mulatta*), Gibbon (*Hylobates pileatus*) und Schimpanse (*Pan troglodytes versus*) Granulozyten isoliert, die Zellen aufgeschlossen und über native, nicht reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Auftrennung der Proteine im nicht reduzierenden Zustand ist notwendig, um eine PR3-Denaturierung zu verhindern, da Anti-hPR3-Antikörper konformationelle Epitope erkennen und nur an die native, gefaltete Struktur binden. Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrozellulose-Membran geblottet. Parallel dazu wurde mit humanem Granulozytenextrakt ebenso verfahren. Jede Membran wurde in 28 Streifen geschnitten und PR3 unter Verwendung von Wegener-Patientenseren bzw. monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpern mittels Western-blot detektiert (Abb. 11). Der Nachweis der Granulozytenproteine Myeloperoxidase, Elastase, Azurocidin, Lactoferrin und Lysozym diente zur Überprüfung der analysierten Proteinmenge. Native SDS-PAGE bzw. Western-blot Analysen wurden von Bert Utecht (Utecht & Lüdemann GmbH, Klausdorf) durchgeführt.

Im direkten Vergleich von humaner PR3 mit dem jeweiligen Primaten-Homolog zeigte sich, dass die Kreuzreaktivität von ANCA mit der Differenz in der PR3-Aminosäuresequenz korreliert. Wie zu erwarten war, wurden alle getesteten Wegener-Patientenseren bzw. monoklonalen Antikörper (mAK) von hPR3 gebunden (Abb. 11, obere Reihe). Die sehr nah verwandte Schimpansen-PR3 erkannte fast alle getesteten Seren und Antikörper. 9 von 11 Patientenseren bzw. 11 von 12 monoklonalen Antikörpern zeigten Reaktivität gegenüber Schimpansen-PR3 (Abb. 11, unten rechts). Auch war die Bindungsstärke vergleichbar mit humaner PR3. Im Gegensatz dazu zeigte Makakken-PR3 kaum Reaktivität. Es wurden nur 2 Patientenseren und 2 mAK gebunden. Die Bindungsstärke war, verglichen mit humaner PR3, deutlich abgeschwächt, was durch ein vermindertes Signal im Western-blot zu beobachten war (Abb. 11, unten links). Gibbon-PR3 wies ein gemischtes ANCA-Bindungsmuster auf. Manche Antikörper bzw. Seren wurden nicht gebunden, andere zwar erkannt, doch war auch hier die Bindungsstärke deutlich abgeschwächt. Vier der Patientenseren wiesen gegenüber dem Gibbon-Homolog keine Reaktivität auf. Auch zeigten die vier monoklonale Antikörper 1F11, MCPR3-2, 12.8 und 1F10 ein negatives Western-blot Signal (Abb. 11, unten mitte).

Aufgrund der Bindungseigenschaften von Gibbon-PR3 im direkten Vergleich mit dem humanen Antigen schien dieses Homolog für Epitopstudien geeignet zu sein, da die Aminosäuresequenz nur geringfügig von hPR3 abweicht und die ANCA-Bindung im Western-blot ein deutlich abgeschwächtes Signal lieferte bzw. gegenüber einzelnen monoklonalen Antikörpern keine Reaktivität mehr aufwies..



**Abb. 11: Western-blot Analyse der ANCA-Bindungseigenschaften von Primaten-PR3 im Vergleich zu humaner PR3.** Granulozyten-Zellaufschluß aus Gesamtblut des Mensch (obere Reihe), Makakke (unten links), Gibbon (unten mitte) und Schimpanse (unten rechts) wurden mittels nativer SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran geblottet und anschließend jede Membran in 28 Streifen geschnitten. Der Nachweis von PR3 erfolgte mittels Western-blot. Für die Detektion wurden Wegener Patientenserum (2-12) bzw. monoklonale Anti-hPR3-Antikörper (13, 16-26) verwendet. Zur Kontrolle der analysierten Proteinmenge dienten die Granulozytenproteine Myeloperoxidase (1), Elastase (14), Azurocidin (15), Lactoferrin (27) und Lysozym (28).

Spur 1: Anti-Myeloperoxidase-Patientenserum  
 Spur 2: Anti-PR3-Patientenserum 12/70  
 Spur 3: Anti-PR3-Patientenserum 12/32  
 Spur 4: Anti-PR3-Patientenserum 23/36  
 Spur 5: Anti-PR3-Patientenserum 23/72  
 Spur 6: Anti-PR3-Patientenserum 15/11  
 Spur 7: Anti-PR3-Patientenserum 12/8  
 Spur 8: Anti-PR3-Patientenserum 12/34  
 Spur 9: Anti-PR3-Patientenserum 12/35  
 Spur 10: Anti-PR3-Patientenserum 17/8  
 Spur 11: Anti-PR3-Patientenserum 12/53  
 Spur 12: Anti-PR3-Patientenserum 24/14  
 Spur 13: PR3 mAK 12.8  
 Spur 14: Anti-humane Leukozytenelastase mAK

Spur 15: Anti-Azurocidin mAK  
 Spur 16: Anti-PR3 mAK WGM1  
 Spur 17: Anti-PR3 mAK WGM2  
 Spur 18: Anti-PR3 mAK 1B10  
 Spur 19: Anti-PR3 mAK 1F11  
 Spur 20: Anti-PR3 mAK 1F10  
 Spur 21: Anti-PR3 mAK 2E1  
 Spur 22: Anti-PR3 mAK PR3G-4  
 Spur 23: Anti-PR3 mAK PR3G-6  
 Spur 24: Anti-PR3 mAK 4A5  
 Spur 25: Anti-PR3 mAK 6A6  
 Spur 26: Anti-PR3 mAK MCPR3-2  
 Spur 27: Anti-Lactoferrin mAK  
 Spur 28: Anti-Lysozym mAK

## 2. Herstellung rekombinanter PR3

Vorraussetzung für die Charakterisierung von hPR3-Epitopen am Beispiel des nativen Autoantigens ist die Verfügbarkeit dieser Serienprotease bzw. deren Mutanten. Nach der Identifikation des Wegener-Autoantigens im Jahre 1990 [Jenne *et al.*, 1990], wurde die cDNA von humaner PR3 sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellsystemen exprimiert [van der Geld *et al.*, 2000]. Da die Mehrzahl der ANCA von Wegener Patienten nur das korrekt gefaltete, enzymatisch aktive Protein erkennen, ist Homogenität und Qualität des Autoantigens das wichtigste Kriterium für reproduzierbare, sensitive Antikörperdetektions-Assays (z.B. ELISA, Western-blot).

Da PR3-Präparationen aus Granulozyten Unterschiede in Reinheit als auch posttranslationaler Modifikationen aufweisen, nur geringe Mengen an Protein liefern und die Generierung von PR3-Mutanten nicht möglich ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Verfahren zur Expression rekombinanter PR3 getestet und auf Effizienz, Homogenität und Aktivität des rekombinanten Proteins hin analysiert.

### 2.1 Rekombinante Expression von proPR3 in *E. coli*

In *E. coli* können große Mengen an rekombinantem Protein in löslicher und unlöslicher Form exprimiert werden. Dies führt allerdings in den meisten Fällen nicht zur Bildung des nativen und aktiven Proteins. Bei Überexpression bilden sich in der Zelle unlösliche, inaktive Aggregate, sogenannte Einschlusskörperchen oder *inclusion bodies* (IB). Ist die native Struktur für die Funktion des Proteins notwendig, so muss dieses renaturiert werden. In diesem Schritt werden die Disulfidbrücken gebildet und die native Proteinstruktur entsteht. Für die Expression von löslichen, nativen Proteinen werden oft Fusionsproteine verwendet, die die Löslichkeit des zu exprimierenden Proteins in der Zelle erhöhen. Im folgenden werden beide Systeme für die Expression von proPR3 beschrieben.

#### 2.1.1 Periplasmatische Expression von proPR3 in *E. coli*

Das Periplasma von *E. coli* stellt ein günstiges Milieu für Faltung und Disulfidbrückenbildung von Proteinen dar [Raina & Missiakas, 1997; Rietsch *et al.*, 1996; Sone *et al.*, 1997]. Eine Möglichkeit, lösliches, gefaltetes Protein zu exprimieren, ist die Verwendung von Vektoren, die ein Signalpeptid besitzen, welches den Export in das Periplasma ermöglichen. Der hier verwendete pET39b-Vektor exprimiert neben dem Signalpeptid zusätzlich die Disulfidbrücken-Oxidoreduktase DsbA. DsbA ist ein periplasmatisches *E. coli*-Protein welches die Bildung von Disulfidbrücken katalysiert. Für die rekombinante Expression wurde zunächst ein Ansatz gewählt, bei dem humane PR3 als N-terminales DsbA-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und ins Periplasma transloziert werden sollte. Die Proteinexpression erfolgt nach Induktion mit IPTG im *E. coli* Stamm Origami 2. Dieser besitzt

Mutationen in Thioredoxinreduktase bzw. Glutathionreduktase und fördert somit die Bildung von Disulfidbrücken. In *E. coli* Gesamtzelllysat konnte zwar nach Induktion eine zusätzliche Bande auf entsprechender Höhe in einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel detektiert werden, nach Präparation der periplasmatischen Fraktion war allerdings kein DsbA-PR3-Fusionsprotein nachweisbar. Das rekombinant exprimierte Material lag in Form von unlöslichen IB vor.

Auch eine Expression von löslicher prohPR3 im Cytoplasma des *E. coli* Stamms Origami 2 war nicht möglich.

### 2.1.2 Zytoplasmatische Expression von proPR3 in *E. coli*

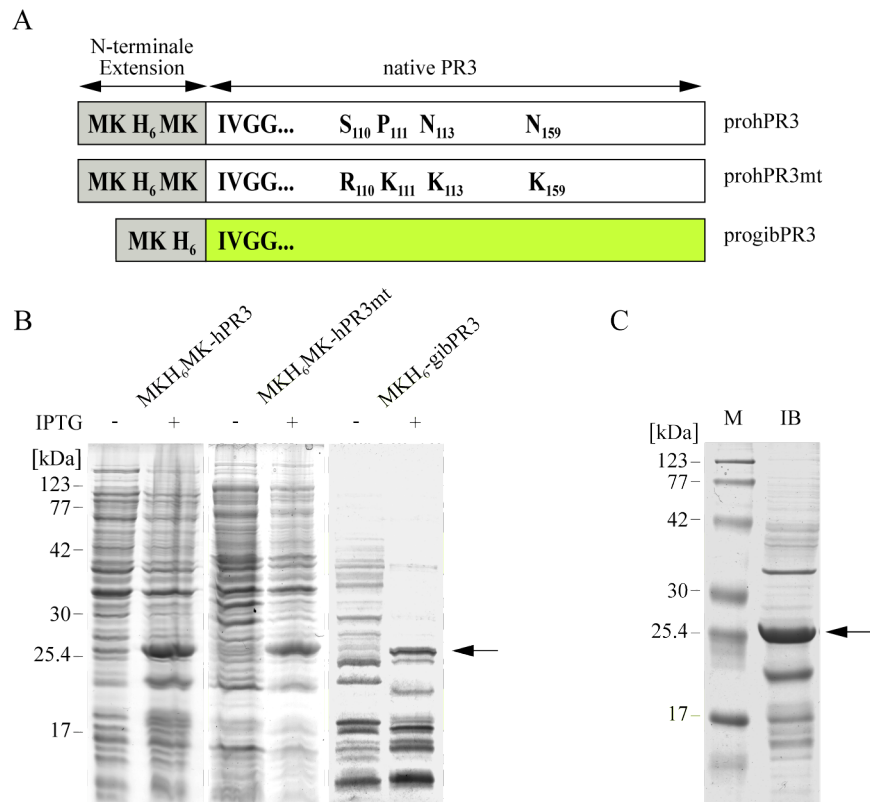
Die Expression von hPR3 im Zytoplasma von *E. coli* in Form von unlöslichem, aggregiertem Protein ist an ein Verfahren angelehnt, das bereits für mPR3 erfolgreich eingesetzt worden ist [Pfister *et al.*, 2004]. Humane bzw. Gibbon-PR3 wurden unter Verwendung eines Expressionssystems der Firma Novagen zytoplasmatisch in *E. coli* B834 (DE3) in Form von Einschlußkörperchen, sogenannten *inclusion bodies* (IB) exprimiert. Zunächst wurde die kodierende cDNA für hPR3 mit der N-terminaler Extension Met-Lys-His<sub>6</sub>-Met-Lys und für gibPR3 mit dem Propeptid Met-Lys. His<sub>6</sub> in den Vektor pET24c kloniert. Die sechs aufeinander folgenden Histidine des N-Terminus ("His<sub>6</sub>-Tag") können für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Ni-Affinitätschromatographie genutzt werden. In Abb. 12A ist das proPR3-Konstrukt schematisch dargestellt. Das rekombinant exprimierte Protein lieferte nach Induktion eine Bande bei entsprechender Größe in einem Coomassie- bzw. Silber-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel (Abb. 12B). Die relativ hohen Expressionsraten und die einfache Reinigung der PR3-IB waren gute Ausgangsbedingungen für den Versuch, das aggregierte, unlösliche Protein nach Solubilisierung *in vitro* zu falten. Im ersten Schritt wurden die IB aufgrund ihrer Masse nach Lyse der Bakterien von den löslichen Proteinen getrennt und durch mehrmaliges Waschen mit dem Detergenz Triton X-100 unter Hochsalzbedingungen der Großteil kontaminierender Proteine entfernt (Abb. 12C). Zur Solubilisierung der IB wurde das Denaturierungsmittel Guanidiniumhydrochlorid in hochmolarer Konzentration eingesetzt. Es hat gegenüber Harnstoff den Vorteil, dass keine Carbamylierungen auftreten. Zur Reduktion von intermolekularen Disulfidbrücken und zur Derivatisierung wurde ein Glutathion-Redoxsystem eingesetzt, welches gemischte Disulfide bildet und durch die Einführung von Ladungen in der nachfolgenden Renaturierung die Löslichkeit des Proteins erhöht [Rudolph & Lilie, 1996].

Bei der korrekten Faltung von PR3 werden jeweils acht Cysteine zu vier Disulfidbrücken verknüpft. Unter der Vielzahl der theoretischen Kombinationen wird dabei die Struktur des nativen Proteins durch seine minimale freie Energie bevorzugt. Durch Zusatz von geringen Mengen an Cystein im Renaturierungspuffer als Thiolkomponente mit geringem Molekulargewicht wurde der Prozeß des *Shufflings*, des schnellen und reversiblen Knüpfens und Lösens von Disulfidbrücken, gestartet. Der Renaturierungsprozeß wurde durch schnelle Verdünnung des Proteinsolubilisats in einem

---

physiologischen Tris-Puffer mit Arginin gestartet (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.5 M Arginin, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM Cystein, pH 7). Arginin hält Faltungsintermediate in Lösung und verhindert Aggregation. Da hPR3, ähnlich wie mPR3, zur Degradation bei längerer Inkubation im Rückfaltungspuffer neigt [Pfister, 2002], wurde über Nacht bei 4°C renaturiert und anschließend der Ansatz gegen einen MES-Puffer dialysiert (25 mM MES, 100 mM NaCl, pH 6). Während dieses Vorgangs konnte starke Präzipitation des Proteins, welches sich durch weißen Niederschlag zeigte, beobachtet werden. Die Analyse von prohPR3 und progibPR3 mittels SDS-PAGE und Silberfärbung zeigte keine Bande bei entsprechender Höhe. Es wurde in Betracht gezogen, dass hPR3 aufgrund der Hydrophobizität zu Aggregation während der Renaturierung neigt und dadurch die Ausbeuten sehr gering sind. Daher wurden innerhalb der hPR3-Sequenz hydrophobe Aminosäuren durch basische, hydrophile Aminosäuren ersetzt. Folgende Aminosäureaustausche wurden vorgenommen (Chymotrypsinogen-Nummerierung): Ser110→Arg, Pro111→Lys, Asp113→Lys, Asp159→Lys (s. Abb. 12A). Diese Mutante wird im folgenden als hPR3mt bezeichnet. Es zeigte sich nach Renaturierung von prohPR3mt jedoch kein Unterschied zu prohPR3.





**Abb. 12: Schematische Darstellung der Expressionskonstrukte, Gesamtzellysat der Expressionskulturen und aufgereinigte Inclusion bodies.** (A) Balkendiagramme symbolisieren schematisch die N-terminalen Propeptide der proPR3-Expressionskonstrukte (grau) mit His<sub>6</sub>-Tag (H<sub>6</sub>) und humaner (weiß) bzw. Gibbon-PR3 (grün). Die Aminosäureaustausche im prohPR3mt-Konstrukt sind jeweils gekennzeichnet. (B) Silber- bzw. Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von *E. coli* Gesamtzellysat der Expressionskulturen vor und nach Induktion mit IPTG. Die erwartete Migrationsfront von proPR3 (~ 25 kDa) nach Induktion ist durch Pfeil gekennzeichnet. (C) Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel zeigt aufgereinigtes inclusion body (IB)-Material am Beispiel von progibPR3. IB wurden in Laemmli-Puffer solubilisiert und aufgetrennt. Die Präparation ist bereits mit progibPR3 (s. Pfeil) angereichert. M, Molekulargewichtsstandard.

Da der Austausch von Aminosäuren offensichtlich keinen Einfluß auf die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken hat, wurden im folgenden die Rückfaltungsbedingungen optimiert. Zum Standard-Renaturierungspuffer (s.o.) wurden verschiedene Zusätze beigefügt, die die Aggregation während der Rückfaltung verhindern und die Bildung der nativen PR3-Struktur begünstigen sollten. Um die Rückfaltungseigenschaften von humaner mit Gibbon-PR3 vergleichen zu können, wurden beide Proteine für die Renaturierungsstudie eingesetzt. In Tabelle 4 sind die verwendeten Additive und Konzentrationen im Rückfaltungspuffer aufgeführt. Jeder Puffer wurde außerdem bei drei verschiedenen pH-Werten getestet (pH 6, 7.5 und 9.5).

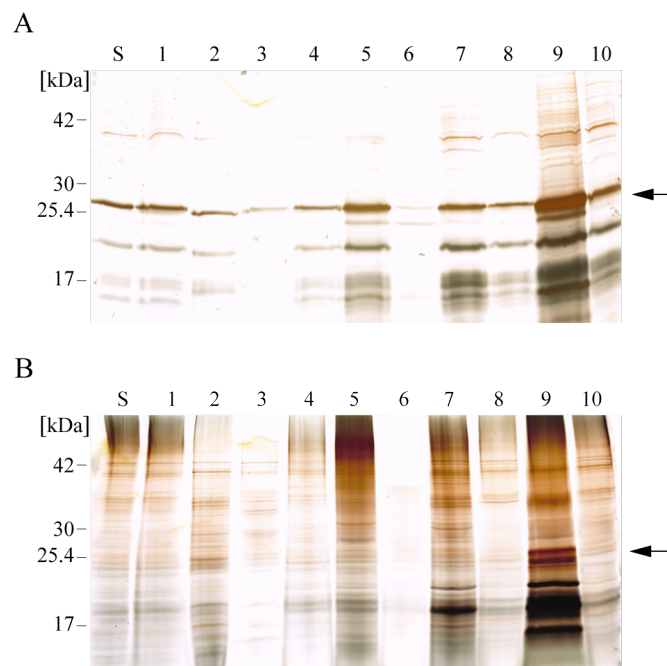
**Tabelle 4: Renaturierungspuffer für proPR3**

Renaturierungspuffer	Additive
50 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.5 M Arginin, 20 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.5 mM Cystein, pH 6, 7.5, 9.5	0.5 % PEG 4000 20 % Glycerol 1 M Glukose 25 % Sorbitol 0.6 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 31 mM CHAPS 0.3 mM Laurylmaltosid 2.5 M Acetamid 25 % Ethanol 2 M Harnstoff 5 mM GSH (kein Cystein im Rückfaltungspuffer)
50 mM Tris, 1 M NaCl, 0.5 mM Cystein, pH 6, 7.5, 9.5	5 mM EDTA, 0.5 M GdnHCl, 2 mM GSH, 1 mM GSSG, 0.75 M CHES

Für die Rückfaltung wurden 40 µg/ml prohPR3- bzw. progibPR3-Solubilisat eingesetzt. Die Renaturierung wurde bei RT gestartet und der Puffer über Nacht auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurde jeder Ansatz mittels nativer, nicht denaturierender SDS-PAGE auf Aggregatbildung im Renaturierungspuffer hin analysiert. Da sich kein Unterschied in den einzelnen pH-Bereichen zeigte, konnte ein Einfluß des pH-Wertes auf die Rückfaltung ausgeschlossen werden. Auch war kein Unterschied in den Renaturierungseigenschaften zwischen humaner und Gibbon-PR3 zu beobachten. In den Rückfaltungsansätzen mit den Additiven Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Ethanol war aufgrund starker Präzipitation keine proPR3 detektierbar und wurde daher nicht weiter analysiert. Jeder prohPR3-Renaturierungsansatz wurde anschließend gegen einen Trispuffer dialysiert und in einem reduzierenden als auch nicht reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert (Abb. 13).

Es war zu beobachten, dass prohPR3 unter reduzierenden Bedingungen zwar als Bande bei entsprechender Höhe sichtbar war (Abb. 13A), in einem nicht reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gel allerdings fast vollständig in aggregierter Form vorlag (Abb. 13B). Hier migrierte prohPR3 nicht als

einzelne Bande auf entsprechender Höhe, sondern war in Form hochmolekularer Aggregate sichtbar. Es zeigte sich, dass das zwitterionische Detergenz CHAPS im Renaturierungspuffer durch Erhöhung der Löslichkeit von prohPR3 weitgehend eine Aggregatbildung verhindert und diese auch nach Dialyse in einem physiologischen Tris-Puffer stabil bleibt. Andere Puffersysteme wie z.B. PBS, Natriumacetat oder MES hatten einen negativen Einfluss auf die proPR3-Stabilität und wurden daher nicht verwendet. Durch weitere Optimierung konnte die CHAPS-Konzentration im Rückfaltungspuffer (pH 7.5) von 31 mM auf 10 mM gesenkt werden. Um zusätzlich starke Aggregation zu verhindern, wurde die Proteinkonzentration im Rückfaltungspuffer von 10 µg/ml nicht überschritten. Die Ausgangstemperatur für die Renaturierung lag zu Beginn bei ca. 20°C und wurde über Nacht auf 4°C abgekühlt. Die Proteinlösung wurde dann auf ca. 1/10 des Ausgangsvolumens eingeeengt und gegen Trispuffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5) dialysiert.

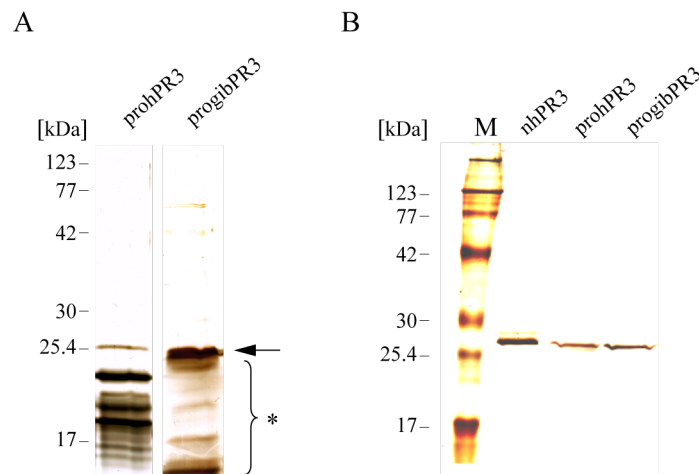


**Abb. 13: Einfluß verschiedener Rückfaltungspuffer auf die Renaturierung von prohPR3.** Analyse von renaturierter prohPR3 in einem silbergefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel unter reduzierenden (A) und nicht reduzierenden (B) Bedingungen. Die erwartete Migrationsfront ist durch Pfeil gekennzeichnet. S, Standard-Rückfaltungspuffer; Spur 1-10 Additive im Standardrückfaltungspuffer (Spur 1: 0.5% PEG 4000, Spur 2: 50 mM Tris, 1 M NaCl, 0.5 mM Cystein, 5 mM EDTA, 0.5 M GuaCl, 2 mM GSH, 1 mM GSSG, 0.75 M CHES, Spur 3: 5 mM GSH ohne Cystein, Spur 4: 20% Glycerol, Spur 5: 0.3 mM Laurylmaltosid, Spur 6: 1 M Glukose, Spur 7: 2 M Harnstoff, Spur 8: 25 % Sorbitol, Spur 9: 31 mM CHAPS, Spur 10: 2.5 M Acetamid

### 2.1.3 Reinigung von PR3 über hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Um bakterielle Kontaminationen nach der Renaturierung zu entfernen, erfolgte zunächst die Aufreinigung von renaturierter proPR3 über Ni-Affinitätschromatographie. Durch diese Methode konnte proPR3 zwar ohne größere Verluste gereinigt werden, die Analyse des Proteins im SDS-Polyacrylamid-Gel zeigte jedoch, dass kleinere, N-terminale PR3-Fragmente koeluierten. Diese Spaltfragmente entstehen zum Teil während der Expression in *E. coli*, aber auch während des Rückfaltungsprozesses. Eine Expression von proPR3 im *E. coli* Stamm Rosetta 2 (DE3), welcher für die Optimierung der Proteinexpression von eukaryotischen Proteinen mit seltenen *E. coli* Kodons verwendet wird, brachte keine wesentliche Verbesserung.

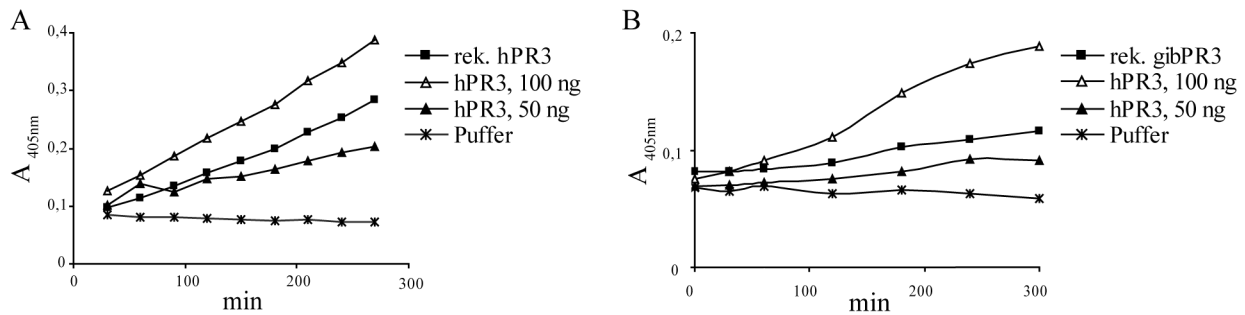
Um eine bessere Aufreinigung zu erzielen und um mögliche PR3-Spaltfragmente zu eliminieren, wurde proPR3, wie zuvor für mPR3 beschrieben, über hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) aufgereinigt [Pfister, 2002]. HIC dient nicht nur zur Proteinaufreinigung. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die korrekt gefaltete Form von falsch gefaltetem Protein abgestrennt werden kann [Scheich *et al.*, 2004]. Für die Aufreinigung von proPR3 wurde eine Phenyl-Sepharose verwendet. ProPR3 wurde dabei an die Sepharose-Matrix gebunden und mit einem Isopropanol-Gradienten eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE/Silberfärbung analysiert. Allerdings koeluierten zusammen mit proPR3 kleinere Spaltfragmente (Abb. 14A). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gepoolt und gegen Tris-Puffer dialysiert. Es zeigte sich jedoch, dass nach Aufreinigung und Dialyse proPR3 im Tris-Puffer nicht stabil ist. Daher wurden 10 mM CHAPS vor der Dialyse zugesetzt um die Löslichkeit und Stabilität von proPR3 zu gewährleisten. Eine erneute SDS-Gel-Analyse zeigte, dass die PR3-Spaltfragmente nicht mehr detektierbar waren und proPR3 als einzelne Bande bei entsprechender Höhe migrierte (Abb. 14B). Für die Aufreinigung von Gibbon-proPR3 erwies sich eine Butyl-Sepharose als geeigneter. Die Elution erfolgte wiederum mit einem Isopropanol-Gradienten. GibPR3-Spaltfragmente konnten auch hier beobachtet werden (Abb. 14A), doch im Gegensatz zu proPR3 waren diese bei Zugabe von CHAPS vor der Dialyse in einen Tris-Puffer stabil. Deshalb wurde auf das Additiv CHAPS verzichtet, da es sich zeigte, dass Gibbon-proPR3 stabil war und nach Dialyse im SDS-Polyacrylamid-Gel als einzelne Bande auf entsprechenden Höhe zu detektieren war (Abb. 14B). Eine proPR3-Aufreinigung über HIC ergab reines Protein, war aber mit hohen Verlusten verbunden.



**Abb. 14: Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel: Renaturierte proPR3 und progibPR3 können über hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) aufgereinigt werden. (A) Renaturierte proPR3 (s. Pfeil) neigt während des Rückfaltungsprozesses zur Bildung von proPR3-Spaltfragmenten (s. Stern). (B) FPLC-gereinigte proPR3 migriert als einzelne Bande auf entsprechender Höhe. Zum Vergleich dient humane PR3 aus Neutrophilen (nhPR3). M, Molekulargewichtsstandard.**

#### 2.1.4 Konvertierung von renaturierter proPR3 mit Cathepsin C

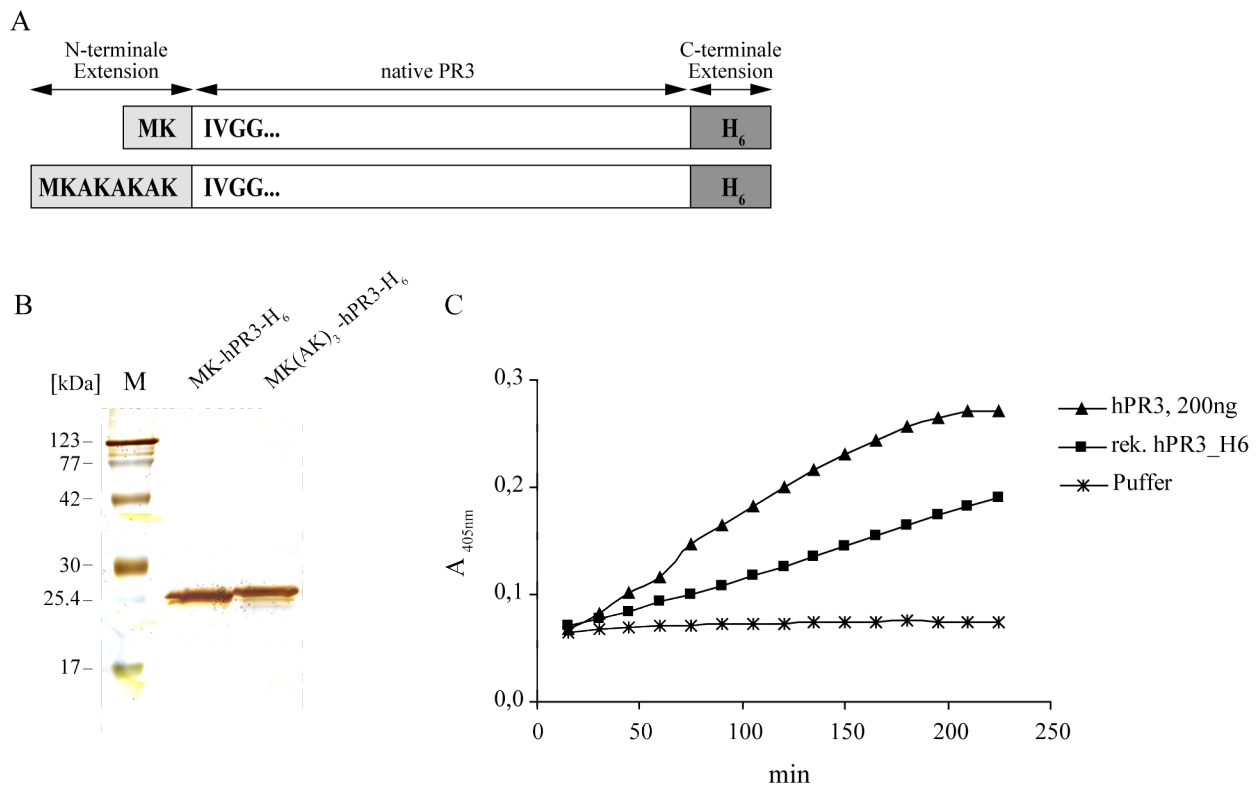
*In vivo* werden Granula-assoziierte Serinproteasen im rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) als Proenzym synthetisiert und anschließend in zwei Schritten prozessiert. Als erstes erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids während der Translokation durch die Plasmamembran des ER [Jenne, 1996]. Während des Transports in die Granula wird das Propeptid entfernt. Die Abspaltung des Propeptids wird bei fast allen Serinproteasen durch Cathepsin C, einer Diaminopeptidylpeptidase (DPPI) vermittelt [McGuire *et al.*, 1993; Pham & Ley, 1999]. Es spaltet sukzessiv Dipeptide vom N-Terminus ab. Die Konvertierung der enzymatisch inaktiven PR3-Proform in die reife, aktive Konformation erfolgt durch Abspaltung des Propeptids, wodurch der N-Terminus Ile-Val-Gly-Gly entsteht. Der neu entstandene N-Terminus bewegt sich nun in das Innere des PR3-Moleküls und das aktive Zentrum wird gebildet. In *E. coli* kann dieser "Ile"-N-Terminus nicht generiert werden, da das Startkodon Methionin von der *E. coli* Methionin-Aminopeptidase (MAP) nur vor kleinen Aminosäuren abgespalten wird [Hirel *et al.* 1989]. Für die Abspaltung des Propeptids wurde Cathepsin C verwendet. Der Erfolg der Konvertierungsreaktion konnte durch direkte Messung der katalytischen Aktivität unter Verwendung eines PR3-spezifischen Substrats beobachtet werden. Sowohl hPR3 als auch gibPR3 zeigten nach der Konvertierung nur sehr geringe Aktivität (Abb. 15). Diese Beobachtung legte mehrere Vermutungen nahe. Zum einen scheint die Renaturierung von proPR3 sehr wenig korrekt gefaltetes Material zu liefern, so dass nach Rückfaltung ein großer Anteil falsch gefaltetes Protein stabil bleibt und nicht – wie erwartet – präzipitiert. Zum anderen ist die Konvertierung unter sauren Bedingungen (pH 5.5) für PR3 oder das verwendete Propeptid (MKH<sub>6</sub>MK für hPR3, MKH<sub>6</sub> für gibPR3) möglicherweise ungeeignet.



**Abb. 15: Enzymatische Aktivität von rekombinanter hPR3 und gibPR3 nach Konvertierung mit Cathepsin C.** Nach erfolgter Konvertierung von prohPR3 und progibPR3 mit Cathepsin C wurde dem Reaktionsgemisch 1 mM Substrat (MeOSuc-AAPV-pNA) in Reaktionspuffer zugesetzt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen. Rekombinante hPR3 zeigte geringfügige enzymatische Aktivität (A), wohingegen gibPR3 so gut wie keine Aktivität aufweist (B). Für die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität wurden 50 bzw. 100 ng hPR3 aus Neutrophilen im gleichen Reaktionsvolumen inkubiert.

Da bereits für mPR3 eine effiziente Konvertierung gezeigt werden konnte [Pfister, 2002], wurde ein PR3-Konstrukt mit ähnlicher Prosequenz, hier Met-Lys, kloniert. Für eine Konvertierung im neutralen pH-Bereich wurde dabei Glutaminsäure (enthalten im Propeptid von mPR3) durch Lysin ersetzt. Ein zweites Konstrukt mit der Prosequenz Met-Lys-(Ala-Lys)<sub>3</sub> sollte zeigen, ob lange Propeptide für die Konvertierung von PR3 im neutralen pH-Bereich besser geeignet ist. Die beiden Konstrukte besitzen neben dem N-terminalen Propeptid einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Eine schematische Darstellung der Konstrukte ist in Abb. 16A gezeigt.

ProhPR3 wurden wie oben beschrieben als IB in *E. coli* exprimiert. Da beide Proteine einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag besitzen, wurde dieser für die Aufreinigung über Ni-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen genutzt. Dieser Aufreinigungsschritt diente dazu, möglichst sauberes Material für die anschließende Rückfaltung zu generieren. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass bakterielle Kontaminationen die Renaturierung negativ beeinflussen. Ein weiterer Vorteil des C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags zeigte sich darin, dass prohPR3 als Gesamtlängenprotein ohne Spaltfragmente aufgereinigt werden konnte (Abb. 16B). Nach Renaturierung wurden MK-hPR3-H<sub>6</sub> und MK(AK)<sub>3</sub>-hPR3-H<sub>6</sub> mit Cathepsin C bei pH 7 konvertiert. Für MK(AK)<sub>3</sub>-hPR3-H<sub>6</sub> konnte nur geringe PR3-Aktivität festgestellt werden (Abb. 16C), wohingegen MK-hPR3-H<sub>6</sub> keine Aktivität aufwies (Daten nicht gezeigt).

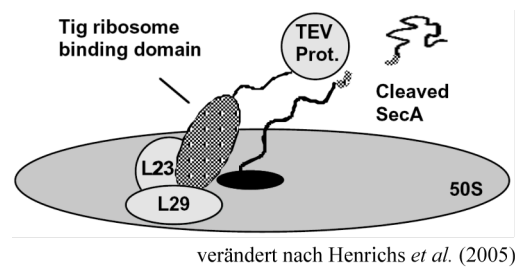


**Abb. 16:** MK-hPR3-H<sub>6</sub> und MK(AK)<sub>3</sub>-hPR3-H<sub>6</sub> lassen sich über Ni-Affinitätschromatographie als Gesamtlängenprotein ohne Spaltfragmente aufreinigen, zeigen aber nach Konvertierung nur geringe enzymatische Aktivität. (A) Schematische Darstellung der beiden proPR3-Expressionskonstrukte mit N-terminalem Propeptid (hellgrau) und C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag (dunkelgrau). Die native PR3-Sequenz ist weiß dargestellt. (B) Beide Zymogene migrieren nach Aufreinigung in einem silbergefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel als einzelne Bande bei entsprechender Höhe und weisen keine Verunreinigung mit proPR3-Spaltfragmenten auf. (C) Nach Konvertierung von MK(AK)<sub>3</sub>-hPR3-H<sub>6</sub> mit Cathepsin C kann enzymatische Aktivität nach Zugabe von 1 mM MeOSuc-AAPV-pNA zum Konvertierungsansatz und Messung der Farbentwicklung bei 405 nm detektiert werden. Als Kontrolle wurden 200 ng hPR3 aus Neutrophilen im gleichen Reaktionsvolumen eingesetzt. M, Molekulargewichtsstandard

### 2.1.5 "Target directed proteolysis" am Ribosom von *E. coli*

Da eine *in vitro* Konvertierung von proPR3 mit Cathepsin C unzureichende Mengen an katalytisch aktiver PR3 liefert, wurde nach einem Weg gesucht *in vivo*, d.h. direkt in *E. coli*, den korrekten N-Terminus zu generieren. Die sogenannte "target directed proteolysis" erlaubt eine spezifische *in vivo*-Prozessierung von Proteinen am Ribosom von *E. coli*. Die Methode basiert auf der Verwendung der Tobacco Etch Virus N1a Protease (TEV), welche eine 7 Aminosäuren lange Konsensussequenz (ExxYxQ/S) erkennt. Die TEV-Protease wird hierbei an den Trigger-Faktor von *E. coli* gekoppelt. Dieser Trigger-Faktor ist eine nichtessentielle endogene Proteinkomponente der 50S Untereinheit des Ribosoms und erlaubt die Expression des TEV-Fusionsproteins direkt am Austrittskanal. Während der

Translation kann somit die Polypeptidkette prozessiert werden bevor sie sich partiell oder komplett in die dreidimensionale Struktur auffaltet. Es konnte am Beispiel des Sekretionsfaktors SecA, welcher für die Sekretion von Proteinen aus dem Zytosol ins Periplasma essentiell ist, gezeigt werden, dass die Proteinsekretion komplett unterbunden werden kann. SecA wurde dazu mit einer TEV-Protease-Spaltstelle exprimiert, am Ribosom spezifisch prozessiert und dadurch inaktiviert. In Abb. 17 ist das Schema der *in vivo*-Prozessierung dargestellt [Henrichs *et al.*, 2005].

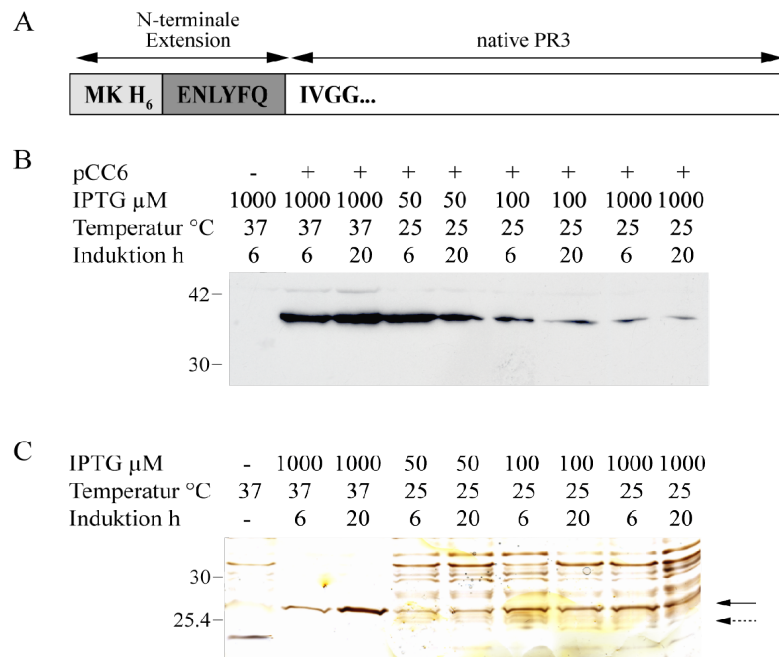


**Abb. 17: "Target directed proteolysis" am Ribosom von *E. coli*.** Schematische Darstellung des Prinzips der kotranslationalen Modifikation von Polypeptidketten am Beispiel von SecA. Die TEV-Protease ist an den Trigger-Faktor (grau gepunktet) gekoppelt und das endogene *E. coli*-Protein SecA mit einer TEV-Protease-Spaltstelle (hellgrauer Bereich der Polypeptidkette) wird spezifisch am Ribosom geschnitten (verändert nach Henrichs *et al.*, 2005).

Um zu überprüfen, ob dieses Verfahren der kotranslationalen Modifikation am Ribosom eine allgemeine Anwendung im Bereich der rekombinanten Proteinexpression findet, wurde ein Vektor kloniert, der die Herstellung von PR3 mit diesem System erlaubt. Humane cDNA für PR3 mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, gefolgt von der TEV-Protease-Erkennungssequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln (ENLYFQ) wurde in den pCS19 Vektor kloniert (Abb. 18A). Die Proteinexpression erfolgte analog zum IPTG-induzierbaren pET-System. Nach Kotransfektion des proPR3-Expressionsvektors pCS19 mit dem Vektor pCC6 (kodiert für Trigger-TEV-Fusionsprotein) in den Trigger-Faktor defizienten *E. coli* Stamm CC4 erfolgte die Proteinexpression nach IPTG-Induktion. Zur Optimierung der Expression wurden abgesehen von der IPTG-Konzentration (10 µM - 1 mM) auch Expressionstemperatur (25°C, 37°C) und -dauer (5-20 h) variiert. Ein negativer Einfluß auf das Bakterienwachstum während der proPR3-Expression konnte ausgeschlossen werden. Der Nachweis des TEV-Fusionsproteins mittels Western-blot unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen Anti-TEV-Protease-Antikörpers zeigte die Expression des Trigger-TEV-Fusionsproteins. Das stärkste Signal war sowohl bei 37°C, 1 mM IPTG und einer Expressionsdauer von 6 bzw. 20 h als auch nach 6 h bei 25°C und Induktion mit 50 µM IPTG zu finden (Abb. 18B). Bei erfolgreicher Prozessierung von PR3 am Ribosom wäre nach Auftrennung der Bakterien-Gesamtzelllysate in einem SDS-Polyacrylamid-Gel eine Größenminimierung von 26 kDa auf 24.3 kDa zu erwarten. Eine Expression der konvertierten hPR3 konnte aber bei keiner der getesteten Bedingungen beobachtet werden (Abb. 18C). Dies legt die Vermutung nahe, dass entweder eine *in vivo*-Prozessierung der überexprimierten hPR3 nicht



stattgefunden hat oder die Mengen so gering sind, dass diese in einem silbergefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel nicht detektierbar sind. Um sicherzustellen, dass eine *in vivo*-Modifikation stattfinden kann, wurde prohPR3 in CC4 bei 37°C überexprimiert, die IB aufgereinigt und renaturiert. Nach Konvertierung von prohPR3 mittels AcTEV-Protease (Invitrogen) konnte keine PR3-Aktivität gemessen werden. Wahrscheinlich ist die erste Aminosäure des reifen N-Terminus von PR3 (Isoleucin), in der P1'-Position für die Konvertierung durch TEV-Protease nicht geeignet.

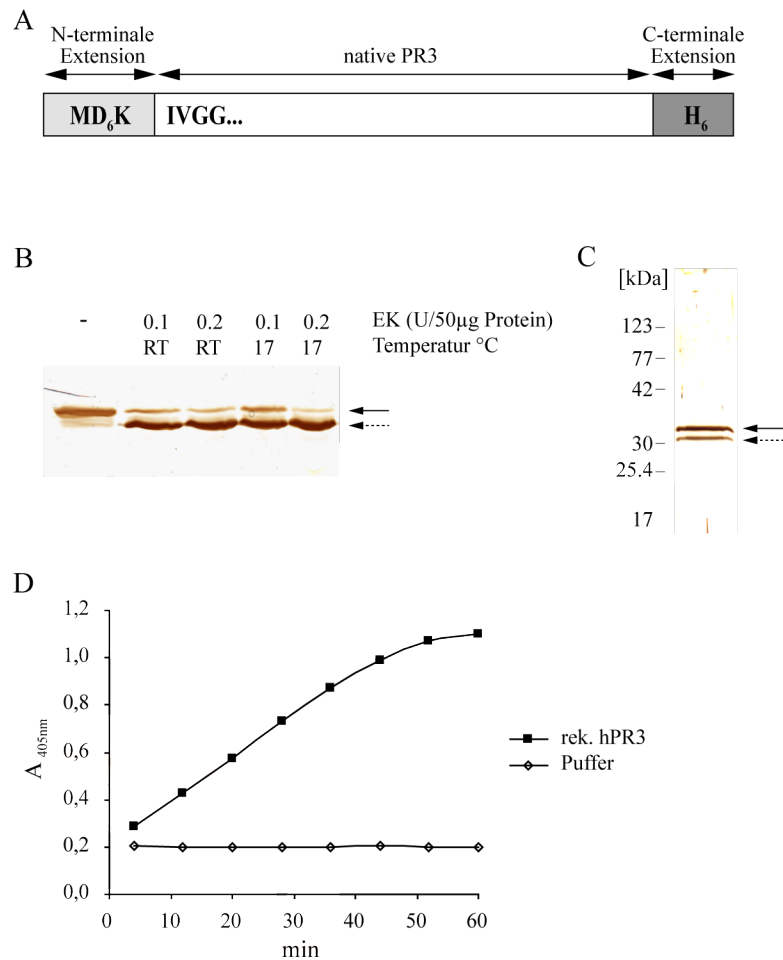


**Abb. 18: Koexpression von prohPR3 und dem Trigger-TEV-Fusionsprotein in *E. coli*:** (A) Schematische Darstellung des prohPR3-Konstrukts mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag (hellgrau), gefolgt von einer TEV-Protease-Schnittstelle (dunkelgrau). (B) Im Western-blot unter Verwendung eines polyklonalen Anti-TEV-Protease-Antikörpers lässt sich die Expression des Trigger-TEV-Fusionsproteins nachweisen. (C) Silber-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von *E. coli* Gesamtzelllysate bei gleichzeitiger Expression von prohPR3 und dem Trigger-TEV-Fusionsprotein. Nach IPTG-Induktion wird prohPR3 im Trigger-defizienten *E. coli* Stamm CC4 exprimiert (s. Pfeil), welches durch eine Bande bei ~26 kDa sichtbar ist. Die ~24 kDa große konvertierte PR3-Form ist auf entsprechender Höhe nicht detektierbar (s. gepunkteter Pfeil).

### 2.1.6 Konvertierung von proPR3 mit Enterokinase unter denaturierenden und nativen Bedingungen

Enterokinase (EK) ist eine heterodimere Serinprotease, welche bei der Initiation der Verdauungskaskade der Säugetiere eine Rolle spielt. EK konvertiert hierbei im Dünndarm Trypsinogen zu Trypsin durch spezifische Spaltung nach dem Pentapeptid (Asp)<sub>4</sub>-Lys. Diese Sequenzspezifität kann für die Spaltung von Fusionsproteinen genutzt werden. EK toleriert fast alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Lys-Pro, in der P1'-Position und ist unter verschiedensten Reaktionsbedingungen aktiv. So z.B. spaltet EK Fusionsproteine über einen weiten pH-Bereich (pH 4.5 bis 9.5), bei Temperaturen von 4 bis 45°C, in Anwesenheit verschiedener Detergentien und unter denaturierenden Bedingungen [Collins-Racie *et al.*, 1995]. Dieses weite Reaktionsspektrum der EK wurde für die Konvertierung von proPR3 genutzt. Hierzu wurde ein Vektor mit humaner cDNA für PR3 mit N-terminaler EK-Spaltstelle (Asp)<sub>6</sub>-Lys und C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in pET24c kloniert (Abb. 19A). Das Konstrukt MD<sub>6</sub>K-hPR3-H<sub>6</sub> wurde in *E. coli* exprimiert und die IB anschließend über Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Konvertierung unter denaturierenden Bedingungen mittels EK fand in Anwesenheit von 2 M Harnstoff statt. Pro mg Protein wurden 4.5 U EK zugesetzt und über Nacht bei 17°C inkubiert. Die anschließende Analyse in einem SDS-Polyacrylamid-Gel zeigte eine fast 100%ige Konvertierung der prohPR3 (Abb. 19B). Das hPR3-Solubilisat wurde derivatisiert und renaturiert. Es zeigte sich jedoch, dass PR3 mit nativem N-Terminus zu verstärkter Aggregation während der Rückfaltung neigt und anschließend nur sehr geringe Aktivität aufweist. Daher wurde im weiteren auf eine Konvertierung vor Renaturierung verzichtet.

Für eine Konvertierung von MD<sub>6</sub>K-hPR3-H<sub>6</sub> unter nativen Bedingungen wurde IB-Solubilisat renaturiert, über HIC aufgereinigt und mit EK konvertiert. Zu 100 µg prohPR3 wurden 3 Einheiten EK zugegeben und über Nacht bei 17°C inkubiert. Die Proteinlösung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Ca. 50% prohPR3 wurden konvertiert (Abb. 19C) und enzymatische Aktivität konnte gemessen werden (Abb. 19D). Dies ließ darauf schließen, dass korrekt gefaltete hPR3 mit nativem N-Terminus vorlag. Zur Abtrennung der Proform vom aktiven Protein und zur Entfernung von EK erfolgte eine erneute Aufreinigung über HIC. Es zeigte sich jedoch, dass keine Separation der beiden Formen möglich ist und zudem mit einem hohen Verlust der PR3-Aktivität verbunden war.



**Abb. 19: Konvertierung von MD<sub>6</sub>K-hPR3-H<sub>6</sub> liefert aktives Enzym.** (A) Schematische Darstellung des prohPR3-Expressionskonstrukts mit N-terminaler Enterokinasestelle (hellgrau) und C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag (dunkelgrau). (B) Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel der Konvertierungsreaktion von prohPR3 unter denaturierenden Bedingungen in 2 M Harnstoff mit Enterokinase (EK) zeigt die Abspaltung des N-terminalen Propeptids von prohPR3 (s. Pfeil) durch Größen-Reduktion von ~ 1kDa (gestrichelter Pfeil). (C) Konvertierungsreaktion von FPLC gereinigter prohPR3 (s. Pfeil) zu aktiver PR3 (gestrichelter Pfeil) weist eine ca. 50%ige Abspaltung des Propeptids auf. (D) Enzymatische Aktivität von hPR3 nach Konvertierung mit EK und Zugabe von 1 mM Boc-Ala-Pro-Nva-SBzl zum Konvertierungsansatz. Die Farbentwicklung wurde bei 405 nm gemessen.

## 2.2 Rekombinante Expression von proPR3 in Insektenzellen

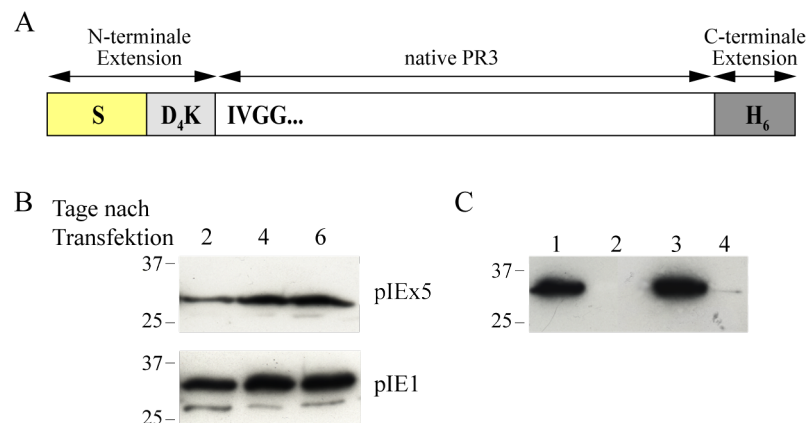
Da es in *E. coli* nicht möglich ist, ausreichende Mengen an korrekt gefaltetem, aktivem Protein für nachfolgende Epitopstudien herzustellen, wurde im folgenden nach einem eukaryotischen Expressionssystem gesucht, welches schnell größere Mengen an nativem Protein liefert und nachfolgend eine einfache Aufreinigung gewährleistet. Das Bakulovirus/Insektenzell-Expressionssystem ist eine gut etablierte Methode für die transiente Produktion von rekombinanten Proteinen. Allerdings weist dieses System einige Nachteile auf. So ist die Herstellung von rekombinanten Viren sehr zeitaufwendig, die Proteinexpression endet mit dem Infektionszyklus und die nachfolgende Aufreinigung wird durch intrazelluläre Proteine der Wirtszelle nach Virus-induzierter Lyse erschwert. Neuere Vektoren ermöglichen die transiente oder stabile Expression von Proteinen in Insektenzellen im Milligramm-Maßstab. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Vektoren findet sich in Kap. 4 des Methoden-Teils.

Da eine Expression von reifer PR3 mit dem nativen N-Terminus Ile-Val-Gly-Gly aufgrund der Toxizität in eukaryotischen Zellen nicht möglich ist, wurde hPR3 mit N-terminalem S-Tag, gefolgt von einer Enterokinase-Schnittstelle und C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in die Vektoren pIEx-5 und pIE1 kloniert (Abb. 20A). Der S-Tag dient zum einen dem schnellen Nachweis des exprimierten Proteins mittels Western-blot, zum anderen kann er für die Aufreinigung über S-Protein-Agarose genutzt werden, wobei der S-Tag von prohPR3 an das S-Protein der Agarose bindet. High-Five (Hi5)-Insektenzellen wurden mit den prohPR3-Expressionsvektoren transfiziert. Die Transfektionseffizienz konnte durch Verwendung von pIE1-gfp (*green fluorescent protein*) bzw. pIEx-βGal (*β-Galaktosidase*) bestimmt werden. Sie lag im Durchschnitt zwischen 60 und 90%. Die Expression erfolgt aufgrund des N-terminal gelegenen Sekretionssignals in den Zellkultur-Überstand. Das Sekretionssignal wird während der Translokation ins Medium durch eine Signalpeptidase abgespalten. Die Analyse des Zellkultur-Überstands erfolgte 2, 4 und 6 Tagen nach Transfektion mittels Western-blot unter Verwendung von S-Protein-HRP (*horse radish peroxidase*). Abb. 20B zeigt die Expression und Sezernierung von prohPR3 in das Zellkulturmedium. Im direkten Vergleich der beiden Vektoren zeigte sich eine geringfügig bessere und schnellere Expression von prohPR3 bei Verwendung des pIE1-Vektors.

### 2.2.1 Aufreinigung und Konvertierung von proPR3

Zellkulturmedium von prohPR3-exprimierenden Hi-five-Zellen wurde mit S-Protein-Agarose inkubiert. Während dieses Schrittes bindet der S-Tag von prohPR3 an das S-Protein. Es konnte gezeigt werden, dass prohPR3 von S-Protein-Agarose gebunden wurde, so dass im Überstand kein Nachweis mehr möglich war. Die Agarose wurde anschließend mit Tris-Puffer gewaschen und gebundene prohPR3 wurde mittels EK abgespalten. Aktive hPR3 wird dabei in den Überstand entlassen. Der Erfolg der Konvertierungsreaktion von prohPR3 wurde durch Messung der enzymatischen Aktivität und Analyse

der S-Protein-Agarose vor und nach EK-Prozessierung mittels Western-blot bestimmt. Im Überstand war nach Zugabe von EK enzymatische PR3-Aktivität zu beobachten, während die Analyse von S-Protein-Agarose keine gebundene prohPR3 mehr aufwies (Abb. 20C). Somit fand eine vollständige Konvertierung der gebundenen prohPR3 statt. Sind nur geringe Mengen an rekombinantem Protein für weitere Studien nötig, so stellt die transiente Expression in Insektenzellen eine schnelle und effektive Methode dar. Durch weitere Optimierung der Transfektions- und Expressionsbedingungen kann die Ausbeute des zu exprimierenden Proteins erhöht werden.



**Abb. 20: Expression von prohPR3 in Insektenzellen.** (A) Schematische Darstellung des prohPR3-Expressionskonstrukts mit N-terminalem S-Tag (gelb), Enterokinase-Spaltstelle (hellgrau) und C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag (dunkelgrau). (B) Western-blot mit S-Protein-HRP zum Nachweis von prohPR3 im Zellkultur-Überstand transient transfizierter High-five-Zellen 2, 4 und 6 Tage nach Transfektion zeigt eine geringfügig bessere Expression von PR3 mit dem Vektor pIE1. (C) Western-blot mit S-Protein-HRP. prohPR3 lässt sich über S-Protein-Agarose reinigen und gebundene prohPR3 kann nach EK-Zugabe von der Agarose abgespalten werden. 1, Zellkultur-Überstand von prohPR3-exprimierenden High-five-Zellen; Spur 2, Zellkultur-Überstand nach Zugabe von S-Protein-Agarose; Spur 3, prohPR3-beladene S-Protein-Agarose; Spur 4, S-Protein-Agarose nach Zugabe von Enterokinase

### 2.3 Rekombinante Expression von proPR3 in Flp-in 293 Zellen

Für die Expression von proPR3 in eukaryotischen Zellen wurde das Flp-in Expressionssystem von Invitrogen gewählt. Hierbei erfolgt die Integration des Expressionsvektors über Rekombination an einer spezifischen Stelle im Genom der Zelle. Die anschließende polyklonale Selektion transfizierter Zellen ermöglicht die schnelle Generierung einer stabilen proPR3-exprimierenden Zelllinie. Eine genaue Beschreibung des Systems findet sich in Kap. 5 des Methoden-Teils.

### 2.3.1 Etablierung einer stabil exprimierenden proPR3-Zelllinie

Die beiden Konstrukte zur Expression von humaner und Gibbon-PR3 basieren auf dem Vektor pcDNA5/FRT (Invitrogen). In diesen Vektor wurde das Ig $\kappa$ -Sekretionssignal, welches die Translokation des exprimierten Proteins in den Zellkultur-überstand ermöglicht, eingebracht. Humane bzw. Gibbon-PR3 cDNA wurden N-terminal in den Leserahmen des Sekretionssignals kloniert. Über einen CMV-Promotor wird PR3 mit einem S-Tag, gefolgt von einer Enterokinaschnittstelle (Asp<sub>4</sub>-Lys) als Propeptid exprimiert. Für die Aufreinigung aus dem Zellkultur-Überstand dient ein C-terminal gelegener His<sub>6</sub>-Tag. Eine genaue Darstellung der verwendeten proPR3-Expressionskonstrukte findet sich in Abb. 24A.

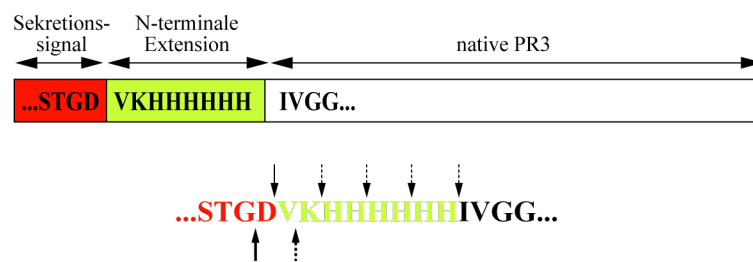
Die Vektoren für die Expression von prohPR3 (pcDNA5/FRT/prohPR3-H<sub>6</sub>) und progibPR3 (pcDNA5/FRT/progibPR33-H<sub>6</sub>) wurden in Flp-in 293 Zellen transfiziert. Die Selektion transfizierter Zellen erfolgte mit Hygromycin B. Um zu überprüfen, ob Einzelzellklone eine höhere Expressionsrate aufweisen als der Zellpool, wurden 10-14 Tage nach Transfektion je 10 Klone mit einer sterilen Pipette vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die restlichen Zellen wurden gepoolt. Nach Expansion der Zellen für weitere 10-14 Tage wurden für die Expressionsanalyse die 10 Einzelzellklone bzw. der Zellpool mit gleicher Zelldichte in einer 12-Well-Zellkulturschale ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde 4 Tage später auf proPR3-Expression mittels Western-blot analysiert. Im direkten Vergleich zum Zellpool wiesen die einzelnen Klone keine erhöhte proPR3-Expression auf, so dass im folgenden alle Zellen gepoolt und expandiert wurden. Dies hat den Vorteil, dass auf ein zeitaufwendiges Kultivieren von Einzelzellen und Analyse der Expressionsraten verzichtet werden kann. Abb. 24B zeigt die Western-blot Analyse des Zellkultur-Überstands von proPR3-exprimierenden Flp-in 293 Zellen.

### 2.3.2 Aufreinigung und Konvertierung von proPR3 zu katalytisch aktiver PR3

Für die Expression mit anschließender Aufreinigung von proPR3 aus dem Zellkultur-Überstand von stabil transfizierten Flp-in 293 Zellen wurde der FCS-Anteil von 10% auf 5% reduziert. Dies gewährleistet eine bessere Aufreinigung des exprimierten Proteins über Ni-Affinitätschromatographie. Der Zellkultur-Überstand wurde auf ca. 1/5 Volumen eingengt und gegen 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 7.4 bei 4°C dialysiert. Die Proteinlösung wurde über Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt und gebundene Proteine mit einem Imidazol-Gradienten eluiert. ProPR3-haltige Fraktionen wurden gepoolt und für die anschließende Konvertierung mit Enterokinase gegen 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 dialysiert.

Die Abspaltung des Propeptids erfolgte mit Enterokinase. Cathepsin C kann in diesem Fall nicht verwendet werden, was am Beispiel eines prohPR3-Konstrukts gezeigt werden konnte. Hier wurde in den Leserahmen des Ig $\kappa$ -Sekretionssignals ein Oktapeptid (Val-Lys-His<sub>6</sub>) für die Konvertierung mittels

Cathepsin C, gefolgt von hPR3-cDNA, inseriert. Nach Aufreinigung von prohPR3 über Ni-Affinitätschromatographie und Konvertierung der PR3 Proform mit Cathepsin C konnte keine Aktivität detektiert werden. N-terminale Sequenzierung von prohPR3 zeigte, dass die Abspaltung des Signalpeptids nach Glycin und nicht, wie von Invitrogen behauptet, nach Aspartat erfolgte. Die Konvertierung durch Cathepsin C schlug durch ein Stoppsignal im zweiten Dipeptid und einer ungeraden Anzahl an Aminosäuren fehl (Abb. 21).



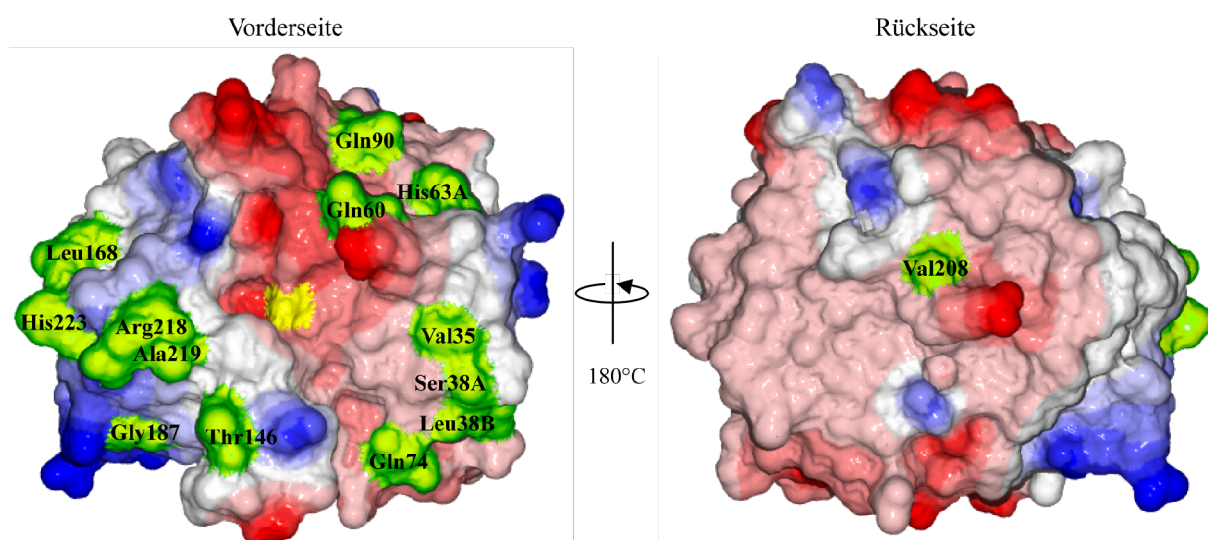
**Abb. 21: Problem der Konvertierung von  $VKH_6$ -hPR3 mit Cathepsin C.** Schematische Darstellung des prohPR3-Expressionskonstrukts mit N-terminalem  $VKH_6$ -Propeptid (grün) und Sekretionssignal (rot), welches bei der Translokation in den Zellkultur-Überstand abgespalten wird. Die Signalpeptidase spaltet nicht nach Aspartat (Pfeil über der Sequenz), wodurch eine Konvertierung von prohPR3 zu aktiver PR3 durch Abspaltung von Dipeptiden durch Cathepsin C (gestrichelte Pfeile oben) möglich gewesen wäre. Die Abspaltung des Sekretionssignals erfolgte nach Glycin (unterer Pfeil). Die Konvertierung war aufgrund eines Stoppsignals im zweiten Dipeptid (Lysin in der ersten Position, gestrichelter Pfeil unten) und einer ungeraden Anzahl an verbliebenen Aminosäureresten nicht möglich.

Für die Konvertierung von proPR3 wurde das Gesamtprotein von Rinderenterokinase, bestehend aus der "leichten" katalytischen und der "schweren" Untereinheit, verwendet. Der Erfolg der Konvertierungsreaktion wurde mittels SDS-PAGE bzw. Messung der enzymatischen Aktivität bestimmt. Alle verwendeten proPR3-Konstrukte zeigten eine 100%ige Abspaltung des Propeptids (Abb. 24C).

Die Ausbeute an proPR3 aus Zellkultur-Überstand von stabil transfizierten Flp-in 293 Zellen lag zwischen 0.8-1 mg/Liter Medium. Nach EK-Konvertierung von proPR3 war ein Verlust von ca. 50% für hPR3 bzw. 10-20% für gibPR3 zu verzeichnen. Zur Überprüfung, ob PR3 als vollständiges Protein exprimiert wird und es nach EK-Behandlung nicht zu einer Abspaltung des C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag kommt, wurde mittels Western-blot unter Verwendung eines Anti-His-Antikörpers die korrekte Expression und Konvertierung der PR3-Konstrukte bestätigt (Abb. 24D).

### 3. Strukturanalyse von gibPR3 im Vergleich zum humanen Homolog

Die Strukturanalyse von gibPR3 gibt Aufschluß über die Lage der Aminosäuredifferenzen im Vergleich zum humanen Homolog. Nur Aminosäuren, die zur Oberflächenstruktur des Antigens beitragen, sind für Epitop-Studien relevant. Basierend auf den Atomkoordinaten (PDB 1FUJ) von hPR3 [Fujinaga *et al.*, 1996] wurden die Aminosäuren entsprechend der Gibbon-Sequenz ausgetauscht (Swiss-Pdb Viewer 3.7, GlaxoSmithKline). Abb. 22 zeigt die dreidimensionale Oberflächenstruktur von gibPR3 im Vergleich zu hPR3 mit Blick auf das aktive Zentrum (links) und von der Rückseite (rechts). Aminosäureunterschiede sind grün dargestellt, der reaktive Serin-Rest 195 des aktiven Zentrums ist gelb unterlegt. Der Strukturvergleich macht deutlich, dass sich die meisten Substitutionen auf der Vorderseite in der Nähe des aktiven Zentrums des Proteins befinden, wohingegen die Rückseite bis auf Val 208 konserviert ist. Die Aminosäuren Val 212 und Ala 229 befinden sich im Inneren des Moleküls und tragen somit nicht zur Oberfläche bei.



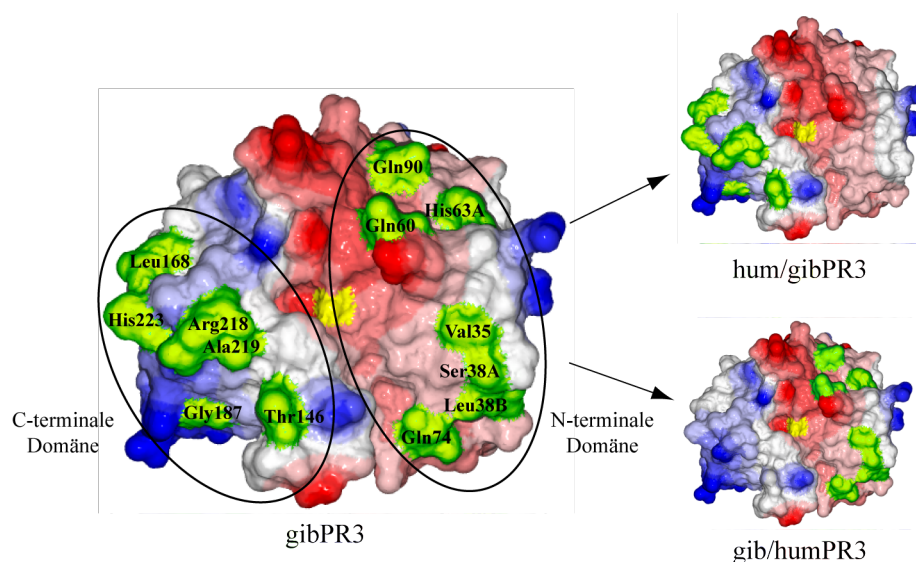
**Abb. 22: Strukturanalyse von gibPR3.** Basierend auf den Atomkoordinaten von hPR3 (PDB 1FUJ) [Fujinaga *et al.*, 1996] wurden die Aminosäuren entsprechend der Gibbon-Sequenz ausgetauscht. Gezeigt ist die dreidimensionale Oberflächenstruktur mit seinem elektrostatischen Potential (blau: positive geladene Regionen, rot: negative geladene Regionen). Serin195 der katalytischen Triade ist gelb eingezeichnet. Die Aminosäuredifferenzen zu humaner PR3 sind grün markiert. Das linke Bild zeigt gibPR3 mit Blick auf das aktive Zentrum, rechts ist die Rückseite des Moleküls zu sehen. Die Strukturanalyse macht deutlich, dass die meisten Substitutionen auf der Vorderseite lokalisiert sind, wohingegen die Rückseite mit Ausnahme von Val 208 nicht betroffen ist.



### 3.1 Klonierung der PR3-Mutanten

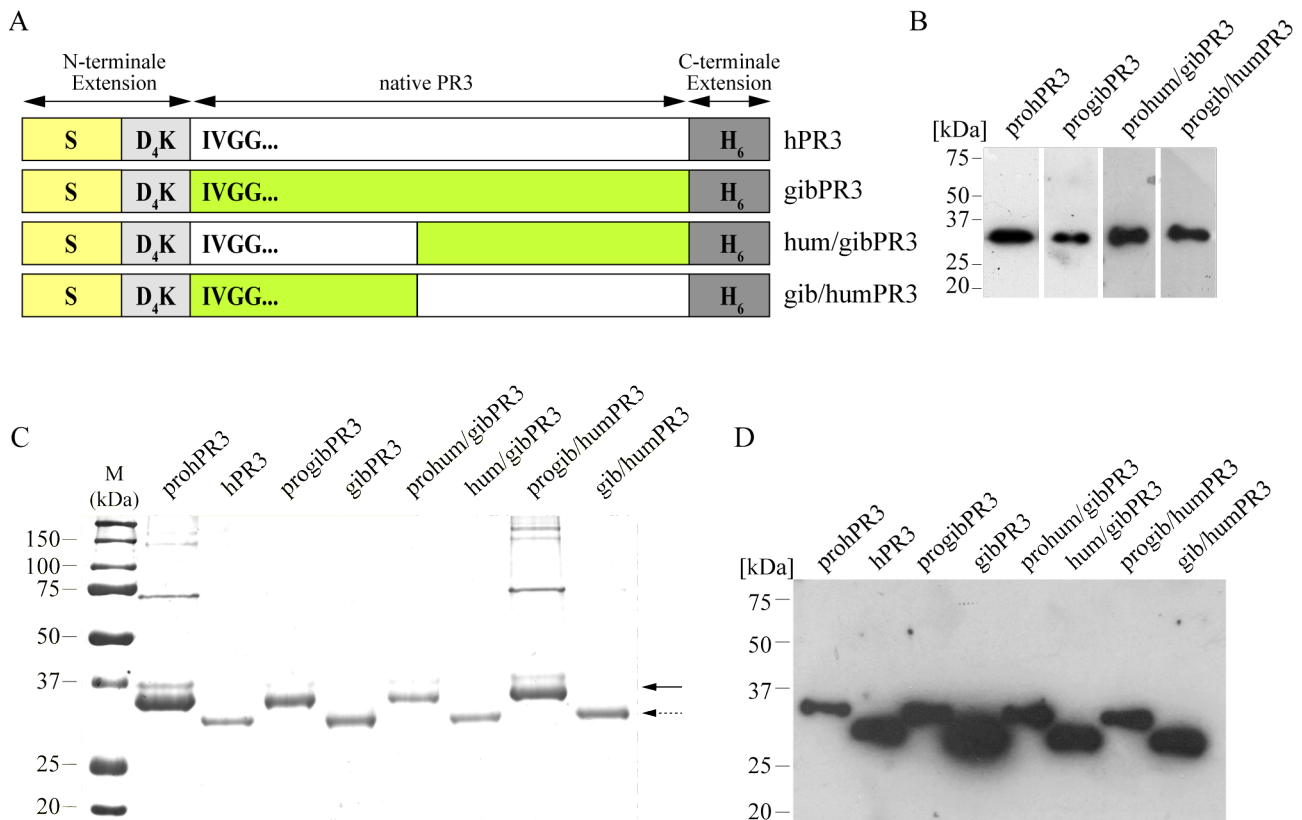
Strukturanalysen von hPR3 und gibPR3 zeigten, dass Aminosäuredifferenzen vorwiegend auf der Vorderseite des Proteins zu finden sind (Abb. 22). Diese Unterschiede lassen sich in zwei Bereiche einteilen: der N-terminale Bereich schließt die Aminosäure-Differenzen an Position 35, 38A, 38B, 60, 63A, 74 und 90 ein, die C-terminale Domäne umfasst die Aminosäuren an Position 146, 168, 187, 218, 219, und 223 (Abb. 23).

Für die Epitop-Studien wurden zwei Konstrukte für die Expression von proPR3-Hybriden in Flp-in 293 Zellen kloniert (Abb. 23). Im hum/gibPR3-Konstrukt entspricht der N-terminale Bereich von Ile16 bis Leu108 der humanen Sequenz und der C-terminale Bereich von Ser109 bis Arg243 der Gibbon-PR3. In einem zweiten Konstrukt wurde der C-terminale Bereich humanisiert, wohingegen die N-terminale Domäne der gibPR3-Sequenz entspricht. Diese Mutante wird im folgenden als gib/humPR3 bezeichnet.



**Abb. 23: Strukturmodell der human/gibbonPR3-Hybride.** Durch Austausch der N-terminalen Domäne (Aminosäuren 16-108) bzw. des C-terminalen Bereichs (Aminosäuren 109-243, Chymotrypsinogen-Nummerierung) zur humanen Aminosäuresequenz in gibPR3 wurden die beiden Mutanten hum/gibPR3 (rechts oben) und gib/humPR3 (rechts unten) generiert.

Expression, Aufreinigung und Konvertierung der beiden Mutanten wurde wie unter 2.3 beschrieben durchgeführt. Abb. 24 zeigt die vier exprimierten, aufgereinigten und konvertierten PR3-Konstrukte hPR3, gibPR3, hum/gibPR3 und gib/humPR3.

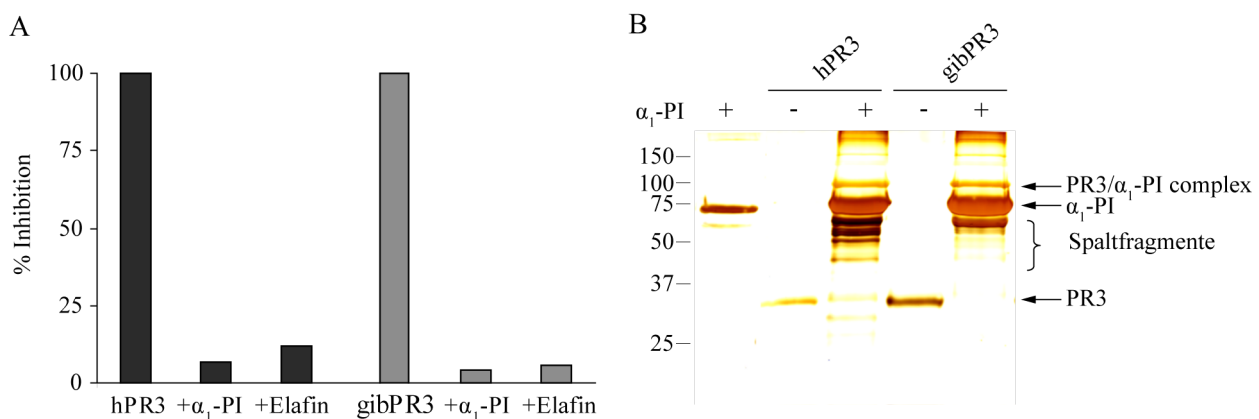


**Abb. 24: rekombinante Expression von proPR3 in Flp-in 293 Zellen, Aufreinigung und Konvertierung zu katalytisch aktiver PR3.** (A) Schematische Darstellung der Expressionskonstrukte mit N- und C-terminaler Extension. Der S-Tag ist gelb, die EK-Spaltstelle hellgrau, humane PR3 weiß, Gibbon-PR3 grün und der His<sub>6</sub>-Tag dunkelgrau gekennzeichnet. (B) Western-blot des Zellkultur-Überstands von proPR3 exprimierenden Flp-in 293 Zellen mit S-Protein-HRP zum Nachweis des S-Tag zeigt die Expression und Sekretion der einzelnen proPR3-Konstrukte. (C) Gereinigte PR3 vor und nach Konvertierung mit EK migriert auf einer Höhe von 32 kDa für proPR3 (s. Pfeil) und 29 kDa für aktive PR3 (s. gestrichelter Pfeil). Die Abspaltung des Propeptids ist durch eine Größenreduktion in einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel sichtbar. (D) Nachweis des C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags von proPR3 und aktiver PR3 mit Western-blot (Anti-His-HRP) zeigt die Gesamtlänge des Proteins.

#### 4. Biochemische Charakterisierung von rekombinanter hPR3 und gibPR3

Für die Charakterisierung der funktionellen und biochemischen Eigenschaften rekombinant hergestellter humaner PR3 im Vergleich zu gibPR3 wurde die Sensitivität gegenüber den beiden natürlich vorkommenden Inhibitoren  $\alpha_1$ -Protease-Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) und Elafin getestet.

Hierzu wurden hPR3 und gibPR3 mit einem 10-fach molaren Überschuss an  $\alpha_1$ -PI bzw. Elafin für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Aktivität bestimmt (Abb. 25A). Die enzymatische Aktivität von hPR3 und gibPR3 läßt sich sowohl durch  $\alpha_1$ -PI als auch Elafin inhibieren. Da  $\alpha_1$ -PI einen kovalenten Komplex mit PR3 eingeht, kann dieser mittels reduzierender SDS-PAGE detektiert werden (Abb. 25B). Freie PR3 komplexiert vollständig mit  $\alpha_1$ -PI und ist durch eine zusätzliche Bande bei ca. 100 kDa sichtbar. Der Inhibitor wird von PR3 auch als Substrat erkannt und umgesetzt. Dies ist durch kurze Spaltfragmente im Silber-gefärbten SDS-Gel zu beobachten. Überraschenderweise zeigte gibPR3 nicht so starke enzymatische Eigenschaften gegenüber  $\alpha_1$ -PI, sodass kaum Spaltfragmente sichtbar waren.

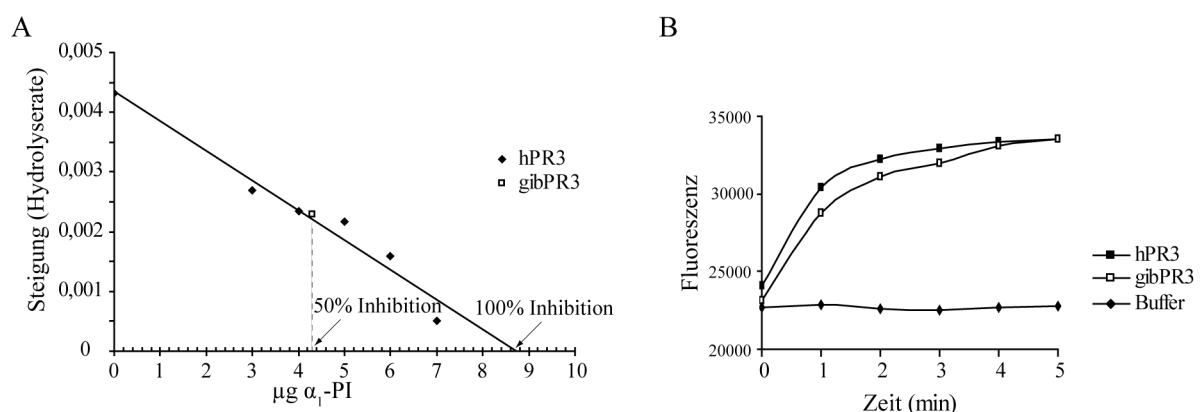


**Abb. 25: Inhibition der enzymatischen Aktivität von hPR3 und gibPR3.** (A) 500 ng rekombinante hPR3 und gibPR3 wurden mit einem 10-fach molaren Überschuss an  $\alpha_1$ -PI bzw. Elafin für 1 h bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde mit 1 mM Substrat (Boc-Ala-Pro-Nva-SBzl) in Substrat-Puffer für 15 min in Duplikaten bei  $A_{405\text{ nm}}$  gemessen. Sowohl hPR3 als auch gibPR3 lassen sich fast vollständig durch  $\alpha_1$ -PI und Elafin inhibieren. (B) Silber-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von rekombinanter hPR3 und gibPR3 vor und nach Inkubation mit  $\alpha_1$ -PI. Der kovalente PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex migriert bei ca. 100 kDa. Freie PR3 komplexiert vollständig mit  $\alpha_1$ -PI. Humane PR3 zeigt im Vergleich zu gibPR3 stärkere enzymatische Eigenschaften gegenüber  $\alpha_1$ -PI, was durch kleine Spaltfragmente sichtbar ist.

Für die Bestimmung der Konzentration enzymatisch aktiver PR3 Moleküle wurde die Titration des aktiven Zentrums mit  $\alpha_1$ -PI durchgeführt. Dabei wurden 300 ng hPR3 mit unterschiedlichen Konzentrationen  $\alpha_1$ -PI für 1 h bei 37°C inhibiert und anschließend die enzymatische Aktivität in den ersten 3 min bestimmt. Für jedes hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Verhältnis wurde die Hydrolyserate (=Anstieg der

Farbentwicklung bei 405 nm) errechnet und gegen die  $\alpha_1$ -PI-Konzentration extrapoliert (s. Abb. 26A). Aus der resultierenden Geraden wurden die  $\alpha_1$ -PI-Konzentration, die zur Reduktion der hPR3-Aktivität um 50% führt, bestimmt (hier: 4.3  $\mu\text{g}$ ). Anschließend wurden 4.3  $\mu\text{g}$   $\alpha_1$ -PI mit unterschiedlichen gibPR3-Konzentrationen inhibiert und die gibPR3-Menge, die zu einer Verminderung der Aktivität um 50% führt, bestimmt. Hierfür waren 309 ng gibPR3 notwendig. Der Konzentrationsunterschied ist auf geringfügige Varianz in der Durchführung der Messung zurückzuführen und kann vernachlässigt werden. Somit korreliert die Proteinkonzentration von hPR3 und gibPR3 mit der Anzahl der aktiven Moleküle.

Um die enzymatischen Eigenschaften von gibPR3 mit humaner PR3 genauer zu untersuchen, wurde das FRET-Substrat Abz-Val-Ala-Asp-Cys-Ala-Gln-EDDnp (Abz-VADCAQ-EDDnp) eingesetzt. Dies ist ein sehr sensibles Substrat für humane PR3 mit einer  $k_{\text{cat}}/K_m$  von  $292 \text{ mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  [Korkmaz *et al.*, 2007]. 1  $\mu\text{g/ml}$  hPR3 bzw. gibPR3 wurden mit 2.6 nM Substrat versetzt und die Hydrolyserate durch Messung der Fluoreszenz bestimmt (Abb. 26B). Erwartungsgemäß zeigte gibPR3 eine ähnliche Geschwindigkeit in der Substratumsetzung wie humane PR3.



**Abb. 26: Titration des aktiven Zentrums und Vergleich der enzymatischen Aktivität von hPR3 und gibPR3.** (A) Für die Bestimmung der enzymatisch aktiven hPR3-Moleküle im Vergleich zu gibPR3 wurde eine Titration des aktiven Zentrums mit  $\alpha_1$ -PI durchgeführt. Dabei wurden 300 ng hPR3 mit 0-7  $\mu\text{g}$   $\alpha_1$ -PI für 1 h bei 37°C inhibiert und anschließend die enzymatische Aktivität mit 1 mM Substrat (Boc-Ala-Pro-Nva.SBzl) in den ersten 3 min bestimmt. Für jedes hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Verhältnis wurde die Hydrolyserate (=Anstieg der Farbentwicklung bei 405 nm) errechnet und gegen die  $\alpha_1$ -PI-Konzentration extrapoliert. Aus der resultierenden Geraden wurden die  $\alpha_1$ -PI-Konzentration, die zur Reduktion der hPR3-Aktivität um 50% führt, bestimmt (hier: 4.3  $\mu\text{g}$ , s. Pfeil). Anschließend wurden 4.3  $\mu\text{g}$   $\alpha_1$ -PI mit unterschiedlichen Mengen gibPR3 inhibiert und nach dem gleichen Verfahren die Hydrolyserate bestimmt. Zur Verminderung der enzymatischen Aktivität um 50% müssen 309 ng gibPR3 eingesetzt werden. (B) Für den Vergleich der enzymatischen Aktivität von hPR3 und gibPR3 wurde das fluorogene Substrat AbzVADCAQ-EDDnp verwendet. 1  $\mu\text{g/ml}$  hPR3 und gibPR3 wurden mit 2.6 nM Substrat versetzt und die Hydrolyserate in den ersten 5 min gemessen. GibPR3 weist eine ähnliche Geschwindigkeit in der Spaltung des Substrats auf wie hPR3.

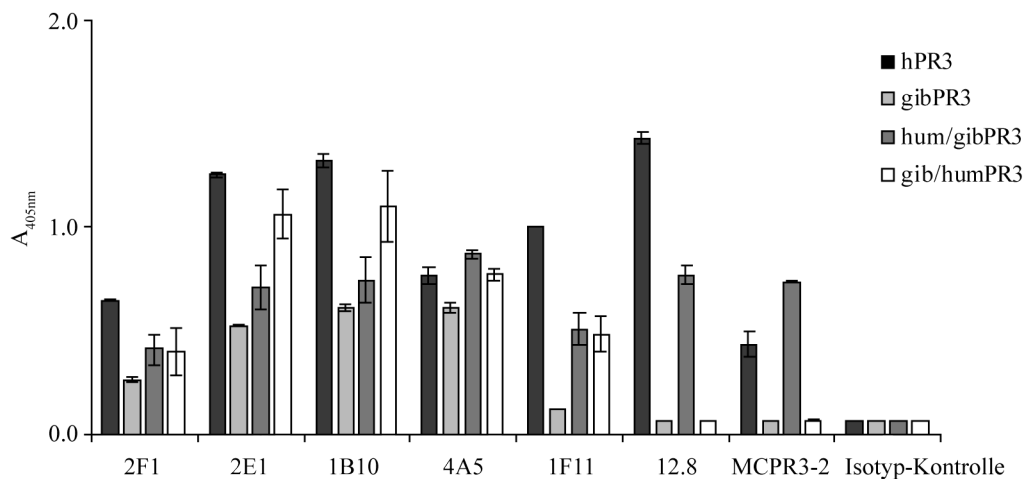
## 5. Epitop-Mapping

### 5.1 Charakterisierung von monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpern

Das Epitop-Spektrum von monoklonalen Maus-Anti-hPR3 Antikörpern wurde mit Hilfe eines Festphasen-Immunoassays (ELISA) bestimmt. Dabei wurde PR3 über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag an Nickel-beschichtete Mikrotiterplatten [van der Geld *et al.*, 1999] gebunden. Dies hat den Vorteil, dass keine Epitope wie z. B. bei der Immobilisierung mittels Antikörper (Capture-ELISA) verdeckt werden oder die Struktur des Proteins durch direkte Bindung an die Plattenoberfläche verändert wird. Die Antikörperbindung erfolgt an die frei in Lösung befindliche PR3, was entscheidend für die Sensitivität des Assays ist.

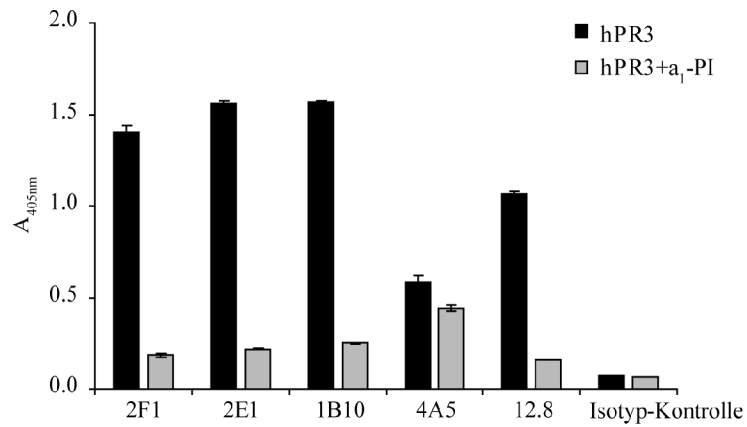
Für jeden monoklonalen Antikörper (mAk) wurde die Bindung an hPR3, gibPR3 und die beiden Mutanten hum/gibPR3 und gib/humPR3 getestet (Abb. 27). Die Antikörper 2F1, 2E1, 1B10 und 4A5 zeigten eine Bindung an alle vier Proteine. Signale für gibPR3 im Vergleich zu hPR3 waren abgeschwächt. Dies war am stärksten bei 2F1, 2E1 und 1B10 zu beobachten, wo eine Reduktion der Bindung um ~50% erfolgte. Außerdem wurde die Mutante gib/humPR3 von 2E1 und 1B10 stärker erkannt als hum/gibPR3. Somit scheinen Epitope auf dem N-terminalen Bereich lokalisiert zu sein. 4A5 wurde von allen vier PR3-Molekülen gleich stark erkannt, was auf ein konserviertes Epitop schließen lässt. Verglichen mit dem Western-blot nativer gibPR3 (s. Abb. 11) konnte die Bindungseigenschaft für 2E1 und 1B10 bestätigt werden. 4A5 wurde allerdings im Western-blot von gibPR3 deutlich schwächer erkannt als von hPR3. Der Antikörper 2F1 wurde im Western-blot nicht getestet.

Für die Antikörper 1F11, 12.8 und MCPR3-2 stimmen die Daten von Western-blot und ELISA überein. In beiden Tests konnte keine Bindung an gibPR3 festgestellt werden. Die PR3-Bindung wurde für 12.8 und MCPR2-2 an die Mutante hum/gibPR3 wieder erzielt, nicht aber für gib/humPR3. Beide Antikörper binden somit an Bereiche der N-terminalen Domäne, wobei die Aminosäure-Austausche an Position 35, 38A, 38B, 60, 63A, 74 und 90 innerhalb des Gibbon-Moleküls für die Bindung entscheidend sind. Für 1F11 hingegen konnte eine Bindung an beide Mutanten beobachtet werden, wobei jede Mutante partiell erkannt wurde. Somit ist für die Bindung von 1F11 sowohl die N- als auch C-terminale Domäne wichtig.



**Abb. 27: Festphasenimmunassay (ELISA) zur Charakterisierung monoklonaler Anti-hPR3-Antikörper.** hPR3, gibPR3, hum/gibPR3 und gib/humPR3 wurden über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag an Nickel-beschichtete Mikrotiterplatten gekoppelt und die Bindung von monoklonalen Maus-Anti-hPR3-Antikörpern an rekombinante PR3 analysiert. Als Negativprobe wurde eine Maus-IgG-Isotyp-Kontrolle verwendet. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm in Duplikaten. Fehlerbalken stellen die Standard-Abweichung der gemessenen Werte dar.

Die weitere Epitop-Eingrenzung für mAk 2F1, 2E1, 1B10 und 4A5 gestaltet sich schwierig, da alle PR3-Proteine gebunden werden. Dies trifft auch für 1F11 zu. Hier werden beide PR3-Mutanten partiell erkannt. Daher lassen sich nur Vermutungen über mögliche Epitope anstellen. Um zu untersuchen, ob eine Antikörperbindung auf der Vorderseite des Proteins in der Nähe des aktiven Zentrums stattfindet, wurde die Bindung an den hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex mittels ELISA analysiert. Hierzu wurde hPR3 mit einem 10-fach molaren Überschuss an  $\alpha_1$ -PI inhibiert und der Komplex anschließend an ELISA-Platten über His<sub>6</sub>-Tag der PR3 gebunden. Eine Bindung an inhibierte hPR3 wurde für 2F1, 2E1, 1B10 und 1F11 nicht mehr beobachtet, was auf ein Epitop in der Nähe des aktiven Zentrums hindeutet. Die Bindung von 4A5 wurde durch den hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex nicht beeinflusst und lässt auf ein Epitop schließen, dass nicht von  $\alpha_1$ -PI betroffen ist (Abb. 28).

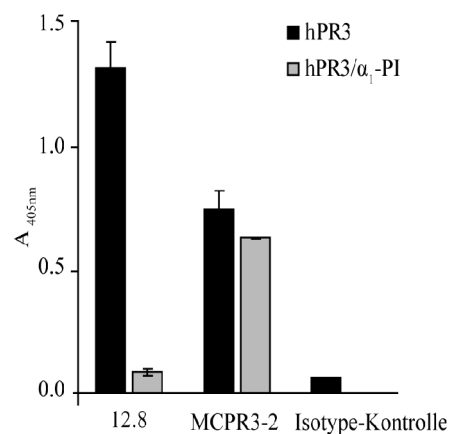


**Abb. 28: Bindung der Anti-hPR3-Antikörpern 2F1, 2E1, 1B10 und 4A5 an hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplexe.** hPR3 wurde durch Inkubation mit einem 10-fach molaren Überschuss von  $\alpha_1$ -PI für 1 h bei 37°C inhibiert und die Bindung der monoklonalen Anti-hPR3-Antikörper an komplexierte hPR3 mittels ELISA untersucht. Mit Ausnahme von 4A5 ist die Bindung der Antikörper 2F1, 2E1 und 1B10 an den Komplex nicht mehr möglich. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm in Duplikaten. Fehlerbalken stellen die Standard-Abweichung der gemessenen Werte dar. Als Negativprobe wurde eine Maus-IgG-Isotyp-Kontrolle verwendet.

### 5.1.1 Einfluß von $\alpha_1$ -PI auf die Antikörperbindung von 12.8 und MCPR3-2

Die weitere Epitopeingrenzung der beiden mAk 12.8 und MCPR3-2 wird dadurch erleichtert, dass mit ELISA-Tests das Epitop bereits auf die N-terminale Domäne eingegrenzt werden konnte (s. Abb. 27). Auch hier wurde die Bindung an den PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex untersucht, um zu bestimmen, ob  $\alpha_1$ -PI das Epitop verdeckt und somit für den Antikörper unzugänglich macht. Für 12.8 ist bekannt, dass eine Bindung an den hPR3/ $\alpha_1$ -P-Komplex nicht mehr möglich ist [Rooney *et al.*, 2001]. Außerdem soll analysiert werden, ob sowohl 12.8 als auch MCPR3-2 ähnliche Bereiche erkennen oder ob es sich um verschiedene Epitope handelt. Die Bindung von 12.8 und MCPR3-2 an PR3 und PR3/ $\alpha_1$ -PI im ELISA ist in Abb. 29 gezeigt.

Wie bereits bekannt, war eine Bindung von 12.8 an den PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex nicht mehr möglich. Überraschenderweise wurde die Bindung von MCPR3-2 durch  $\alpha_1$ -PI nicht beeinflusst. Obwohl beide nur an die Mutante hum/gibPR3 binden und somit Epitope der N-terminale Domäne erkannt werden, scheinen diese nicht identisch zu sein.

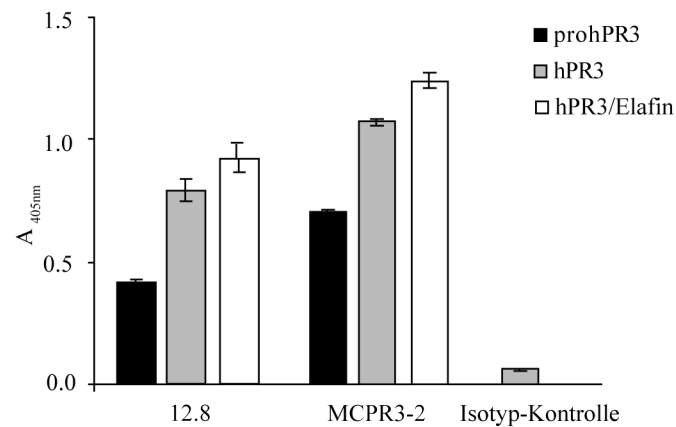


**Abb. 29: Bindung von 12.8 und MCPR3-2 an hPR3/ $\alpha_1$ -PI.** Inhibition von hPR3 durch 10-fach molaren Überschuss an  $\alpha_1$ -PI für 1 h bei 37°C und anschließender Analyse der Bindung der beiden monoklonalen Anti-hPR3-Antikörper 12.8 (links) und MCPR3-2 (rechts) im ELISA. 12.8 bindet nicht mehr an den PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex, wohingegen die MCPR3-2-Bindung von  $\alpha_1$ -PI unbeeinflusst bleibt. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm in Duplikaten. Fehlerbalken stellen die Standard-Abweichung der gemessenen Werte dar. Als Negativprobe wurde eine Maus-IgG-Isotyp-Kontrolle verwendet.

Es stellt sich nun die Frage, ob  $\alpha_1$ -PI das Epitop von 12.8 aufgrund der Größe des Inhibitors von ca. 53 kDa (vgl. rekombinante hPR3 29 kDa) verdeckt und somit für den Antikörper unzugänglich macht oder ob Strukturänderungen von PR3 während der Komplexbildung dafür verantwortlich sind. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde in einem weiteren ELISA die Bindung von 12.8 und MCPR3-2 an den hPR3/Elafin-Komplex untersucht. Elafin ist ein 6 kDa großer Inhibitor und somit deutlich kleiner als  $\alpha_1$ -PI. Die reversible Bindung von Elafin an PR3 hat keine Auswirkungen auf die Struktur der Protease. Um den Einfluß von Strukturänderungen zu untersuchen, wurde die Antikörperbindung an die



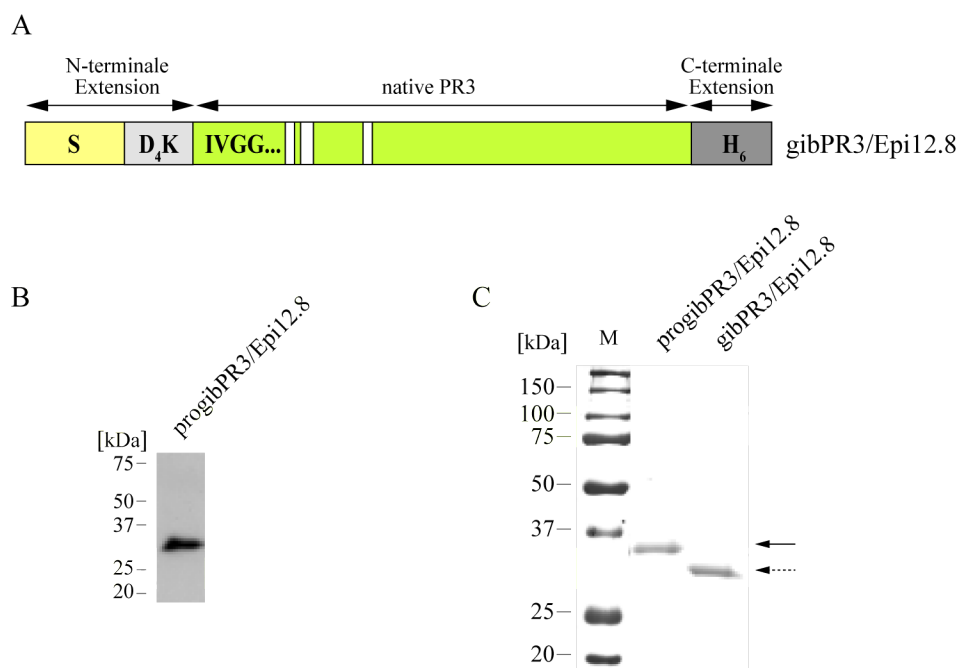
PR3 Proform untersucht. ProhPR3 wird im ELISA etwas schwächer erkannt als aktive hPR3. Dennoch ist eine Bindung von 12.8 möglich. Auch wird der hPR3/Elafin-Komplex von 12.8 erkannt (Abb. 30). ProhPR3 und der hPR3/Elafin-Komplex wurden von MCPR3-2 gebunden (Abb. 30). Somit scheint nicht die PR3-Struktur eine entscheidende Rolle in der Antikörpererkennung zu spielen, sondern die Größe des Inhibitors.  $\alpha_1$ -PI verdeckt das 12.8-Epitop und macht es dadurch unzugänglich.



**Abb. 30: Bindung von 12.8 und MCPR3-2 an prohPR3 und hPR3/Elafin.** ProhPR3 wird direkt im ELISA eingesetzt. Die Inhibition von hPR3 erfolgt durch 10-fach molaren Überschuss Elafin für 1 h bei 37°C und anschließender Analyse der Bindung der beiden monoklonalen Anti-hPR3 Antikörper 12.8 (links) und MCPR3-2 (rechts) im ELISA. Sowohl 12.8 und MCPR3-2 binden an prohPR3 und den hPR3/Elafin-Komplex. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm in Duplikaten. Fehlerbalken stellen die Standard-Abweichung der gemessenen Werte dar. Als Negativprobe wurde eine Maus-IgG-Isotyp-Kontrolle verwendet.

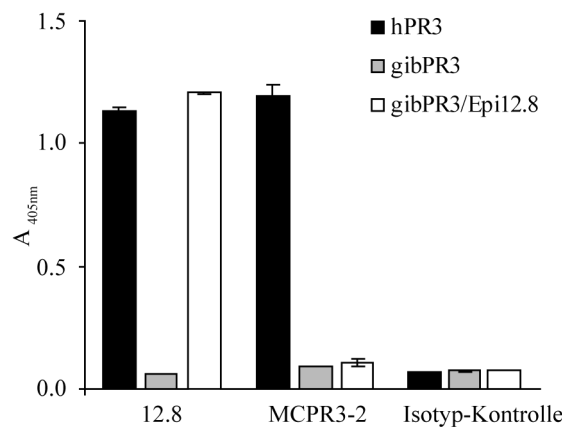
### 5.1.2 Epitopeingrenzung für die monoklonalen Antikörper 12.8 und MCPR3-2

Aus Strukturdaten ist bekannt, dass  $\alpha_1$ -PI unterhalb des aktiven Zentrums bindet [Dementiev *et al.*, 2006]. Da 12.8 nicht mehr mit dem PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex interagiert, scheinen die Aminosäuren im unteren Bereich der N-terminalen Domäne an Position 35, 38A, 38B und 74 wichtig für die Bindung des Antikörpers zu sein. Diese werden im Komplex durch  $\alpha_1$ -PI verdeckt und für den Antikörper unzugänglich. Das Epitop für MCPR3-2 hingegen, welches nicht durch den Inhibitor beeinflusst wird, scheint den oberen Bereich einzuschließen. Aminosäuren an Position 60, 63A und 90 sind somit in die MCPR3-2 Bindung involviert (s. Abb. 22). Um diese beiden Epitope genauer voneinander zu diskriminieren und die Vermutung der Lokalisation der Epitope zu bestätigen, wurde eine weitere PR3-Mutante generiert. Im gibPR3/Epi12.8-Konstrukt wurden innerhalb von gibPR3 nur die Aminosäuren 35, 38A, 38B und 74 gegen die humane Sequenz ausgetauscht. Expression in Flp-in 293 Zellen, Aufreinigung und Aktivierung der Proform zu katalytisch aktiver PR3 erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Konstrukten (s. Abb. 31).



**Abb. 31: rekombinante Expression von progibPR3/Epi12.8 in Flp-in 293 Zellen, Aufreinigung und Konvertierung zu katalytisch aktiver PR3.** (A) Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts mit N- und C-terminaler Extension. Der S-Tag ist gelb, die EK-Spaltstelle hellgrau, Gibbon-PR3 grün und die humanisierten Aminosäuren an Position 35, 38A, 38B und 74 durch weiße Balken gekennzeichnet. Der His<sub>6</sub>-Tag ist dunkelgrau gekennzeichnet. (B) Western-blot des Zellkultur-Überstands von progibPR3/Epi12.8 exprimierenden Flp-in 293 Zellen mit S-Protein-HRP zum Nachweis des S-Tag zeigt die Expression und Sekretion in den Zellkulturüberstand. (C) Gereinigte gibPR3/Epi12.8 vor und nach Konvertierung mit EK migriert auf einer Höhe von 32 kDa für progibPR3/Epi12.8 (s. Pfeil) und 29 kDa für aktive PR3 (s. gestrichelter Pfeil). Die Abspaltung des Propeptids ist durch eine Größenreduktion in einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel sichtbar.

Abb. 32 zeigt, dass durch die Mutante gibPR3/Epi12.8 das Epitop des Antikörpers 12.8 rekonstituiert wurde, wohingegen für MCPR3-2 keine Bindung an diese PR3-Mutante detektiert werden konnte. Diese Daten zeigen, dass MCPR3-2 und 12.8 unterschiedlicher Epitope der N-terminalen Domäne erkennen.

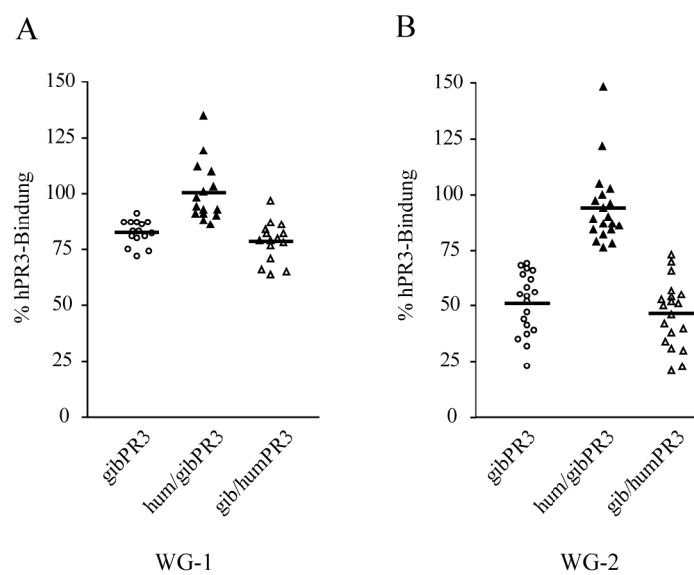


**Abb. 32: Bindung von 12.8 und MCPR3-2 an gibPR3/Epi12.8.** hPR3, gibPR3 und gibPR3/Epi12.8 wurden über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag an Nickel-beschichtete Mikrotiterplatten gekoppelt und die Bindung von monoklonalen Maus Anti-hPR3-Antikörpern MCPR3-2 und 12.8 an rekombinante PR3 analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein Maus-Anti-IgG-Antikörper verwendet. MCPR3-2 binden nicht an gibPR3/Epi12.8 während für 12.8 das Signal durch diese PR3-Mutante regeneriert werden kann. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm in Duplikaten. Fehlerbalken stellen die Standard-Abweichung der gemessenen Werte dar. Als Negativprobe wurde eine Maus-IgG-Isotyp-Kontrolle verwendet.

## 5.2 Charakterisierung der ANCA von Patienten mit Wegener`scher Granulomatose

Die Charakterisierung des Epitopspektrums von Wegener Patienten ist ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Krankheit und deren Verlauf. Bis heute konnte kein pathogenes ANCA-Epitop genau definiert werden, da geeignete dreidimensionale Strukturmodelle fehlten. Aufschluss über das Bindungsmuster von ANCA sollen die in Kapitel 2.3 generierten rekombinanten PR3-Moleküle liefern. Die Analyse der PR3-Epitope erfolgte auch hier mittels ELISA. Da die Konzentration an spezifischen Anti-hPR3-Antikörpern im Serum von WG-Patienten sehr gering ist, wurde eine 1:50 Verdünnung des Serums im ELISA eingesetzt. 34 Seren von Patienten mit diagnostizierter WG wurden auf PR3-Bindung gegenüber rekombinanter hPR3 und gibPR3 getestet. Die WG-Seren wurden aufgrund ihrer Reaktivität gegenüber gibPR3 im Vergleich zu hPR3 in 2 Gruppen eingeteilt. War eine Signalreduktion im ELISA bezogen auf gibPR3 um weniger als 30% zu beobachten, so wurden diese Seren zur ersten Gruppe (WG-1) gezählt. Wurde gibPR3 vom ANCA-Repertoire der WG Patienten um mindestens 30% schlechter erkannt als hPR3, erfolgte die Einteilung in Gruppe 2 (WG-2). Die Bindung an die Mutanten hum/gibPR3 und gib/humPR3 wurde anschließend für jedes Serum bestimmt (Abb. 33). ANCA der

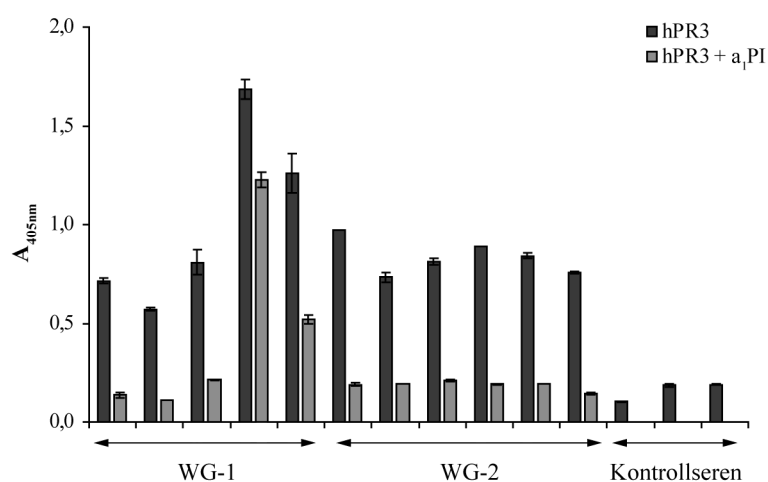
Gruppe WG-1 (n=15) erkannten hPR3, gibPR3 und die beiden Mutanten ungefähr gleich stark. Die ANCA-Bindung wurde gegenüber gibPR3 und gib/humPR3 durchschnittlich um nur ca. 20% reduziert. Mit der Mutante hum/gibPR3 konnte keine Abnahme der ANCA-Bindung beobachtet werden. In WG-2 (n=19) war jedoch die ANCA-Bindung sowohl an gibPR3 als auch gib/humPR3 um fast 50% herabgesetzt. Durch hum/gibPR3 konnte eine vollständige Regeneration des Signals erzielt werden, was einer Bindung an hPR3 entspricht und darauf hindeutet, dass ANCA dieser Gruppe vorwiegend an die N-terminale PR3 Domäne binden. Kontrollseren (n=8) zeigten keine Reaktivität gegenüber den einzelnen PR3-Molekülen.



**Abb. 33: Charakterisierung des ANCA-Repertoire von WG-Patienten.** hPR3, gibPR3, hum/gibPR3 und gib/humPR3 wurden über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag an Nickel-beschichtete Mikrotiterplatten gekoppelt und die Bindung von ANCA an rekombinante PR3 mittels ELISA analysiert. WG-Patientenseren (n=34) sowie Kontrollseren (n=8) wurden 1:50 verdünnt. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm in Duplikaten. Für jedes Serum wurde die ANCA-Bindung in % errechnet, wobei das Signal für hPR3 gleich 100% gesetzt wurde. Wurde gibPR3 um weniger als 30% im Vergleich zu hPR3 erkannt, erfolgte die Einteilung in WG-1 (n=15). Bei einer Signalreduktion um mindestens 30% wurden die Seren der Gruppe WG-2 (n=19) zugeordnet. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten. Der Mittelwert jeder Gruppe ist durch einen Strich gekennzeichnet.

### 5.2.1 Bindung der PR3-ANCA von WG-Patienten an hPR3/ $\alpha_1$ -PI

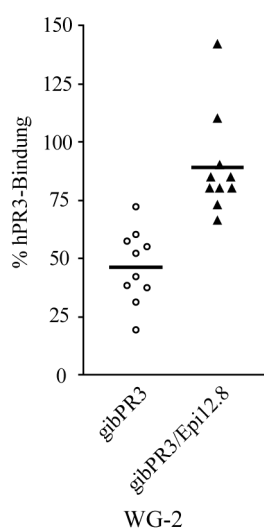
Wie bereits für den monoklonalen Antikörper 12.8 gezeigt (s. Kap. 5.1.1), wurde auch für WG-Seren die Bindung an den hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex untersucht (Abb. 34). Hierzu wurden 5 Seren aus Gruppe 1 (WG-1) und 6 Seren der Gruppe 2 (WG-2) analysiert. Für 3 der 5 Seren aus Gruppe 1 konnte eine ANCA-Bindung an hPR3 im Komplex mit  $\alpha_1$ -PI verhindert werden. Zwei der getesteten Seren zeigten nur geringe Signalabschwächung. Eine ANCA-Bindung an inhibierte hPR3 unterblieb für alle Seren der Gruppe 2. Der Inhibitor Elafin hatte keinen Einfluß auf die Antikörperbindung (Daten nicht gezeigt). Somit sind ANCA-Epitope vorwiegend gegen N-terminale Bereiche gerichtet, die durch Komplexbildung mit  $\alpha_1$ -PI nicht mehr zugänglich sind.



**Abb. 34: ANCA-Bindung an hPR3/ $\alpha_1$ -PI.** hPR3 wurde durch Inkubation mit einem 10-fach molaren Überschuss an  $\alpha_1$ -PI für 1 h bei 37°C inhibiert und die Bindung von ANCA der WG-Seren an komplexbildende hPR3 mittels ELISA untersucht. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm in Duplikaten. Alle verwendeten Seren wurden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Fehlerbalken stellen die Standard-Abweichung der gemessenen Werte dar. Als Negativkontrolle wurden Seren von Normalpersonen verwendet. 3 der 5 WG-Seren aus WG-1 bzw. 6 von 6 Seren der Gruppe WG2 zeigten keine Bindung an den hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex. Für die Einteilung der WG-Seren in die einzelnen Gruppen s. Kapitel 5.2.

### 5.2.2 PR3-ANCA von WG-Patienten überlappen mit dem 12.8-Epitop

Für WG-2 der analysierten PR3-ANCA von WG-Patienten zeigten bisherige Bindungsstudien, dass Antikörper gegen die N-terminale PR3-Domäne gerichtet sind. Diese Epitope werden durch den Inhibitor  $\alpha_1$ -PI verdeckt, so dass eine Bindung an PR3 im Komplex nicht mehr stattfinden kann. Da PR3-ANCA von WG-Patienten ähnliche Bindungseigenschaften wie der monoklonale Antikörper 12.8 aufweisen, scheinen die Bindungsbereiche zu überlappen. Für 12.8 konnte bereits das Epitop auf die Aminosäuren Met35, Asn38A, Pro38B und Arg74 eingegrenzt werden. Um dieses Epitop auch für WG-Patienten bestätigen zu können, wurde daher die Antikörperbindung an die Mutante gibPR3/Epi12.8 im Vergleich zu hPR3 bzw. gibPR3 untersucht. Die ANCA-Bindung an gibPR3 gegenüber hPR3 reduzierte sich, wie bereits gezeigt, deutlich. Hier konnte eine Abschwächung um durchschnittlich 54% auf 46% verzeichnet werden. Durch gibPR3/Epi12.8 erfolgte eine Regeneration des Signals um 43% auf 90% (Abb. 35). Da es sich bei WG-Patienten um ein polyklonales Antikörper-Spektrum handelt, das verschiedene PR3-Bereiche abdeckt, war eine vollständige Inhibition der ANCA-Bindung an gibPR3 als auch eine komplette Wiederherstellung der Bindung an gibPR3/Epi12.8 nicht zu erwarten. Die Bindungsstudien zeigen allerdings deutlich, dass Epitope von PR3-ANCA der WG-Patienten mit dem des monoklonalen Antikörpers 12.8 überlappen.



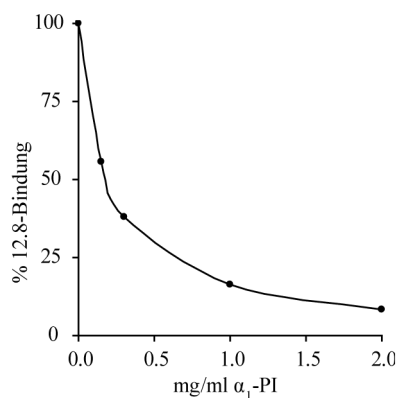
**Abb. 35: Eingrenzung des ANCA-Repertoire von Patienten der Gruppe WG-2.** hPR3, gibPR3 und gibPR3/Epi12.8 wurden über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag an Nickel-beschichtete Mikrotiterplatten gekoppelt und die Bindung von ANCA an rekombinante PR3 mittels ELISA analysiert. WG-Patientenserum (n=10) sowie Kontrollserum (n=6) wurden 1:50 verdünnt. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm in Duplikaten. Für jedes Serum wurde die ANCA-Bindung in % errechnet, wobei das Signal für hPR3 gleich 100% gesetzt wurde. Jedes Symbol repräsentiert ein Patientenserum. Gezeigt ist der Mittelwert jeder Gruppe. Kontrollserum zeigten keine Reaktivität gegenüber rekombinanter PR3.

### 5.3 ANCA-Bindung an hPR3 in Anwesenheit von $\alpha_1$ -PI

Ein ausgewogenes Protease-Inhibitor Gleichgewicht im Blut ist für eine geregelte Proteaseaktivität wichtig. Sinkt lokal die Konzentration von  $\alpha_1$ -PI oder kommt es zu einem Mangel des Inhibitors, wie es bei Trägern des  $\alpha_1$ -PI<sub>ZZ</sub>-Allels auftritt [Laurell & Eriksson, 1963], so kann es zu unkontrollierter Proteolyseaktivität und Gewebeschädigung kommen [Esnault *et al.*, 1997].

Sowohl für monoklonale Anti-hPR3-Antikörper als auch für ANCA von Wegener Patienten konnte gezeigt werden, dass eine Bindung an hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplexe nicht mehr möglich ist. Somit überlappen die Bindungsstellen für Antikörper und Inhibitor und stehen daher in direkter Konkurrenz um die Bindung an hPR3. Da  $\alpha_1$ -PI im Plasma in viel höheren Konzentrationen vorkommt (1-1.3 mg/ml [Jeppson *et al.*, 1973]) als spezifische Anti-hPR3-Antikörper (geschätzte Konzentration 1‰), stellt sich die Frage, ob ANCA von WG-Patienten in Anwesenheit von  $\alpha_1$ -PI an hPR3 auf der Oberfläche von Neutrophilen binden und diese aktivieren können. Im folgenden Modellexperiment wurde der monoklonale Antikörper 12.8 eingesetzt, da gezeigt werden konnte, dass dieser an den hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex nicht mehr bindet (Abb. 29).

hPR3 wurde zusammen mit 12.8 und  $\alpha_1$ -PI gleichzeitig bei 37°C für 30 min inkubiert. Hierbei blieb die Konzentration von hPR3 (100 ng/Ansatz) und 12.8 (50 ng/Ansatz) konstant, wohingegen steigende Mengen von  $\alpha_1$ -PI zugesetzt wurden. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz im ELISA eingesetzt. Nach Bindung von hPR3 über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag an Nickel-beschichtete Mikrotiterplatten erfolgte der Nachweis von an hPR3 gebundenem Antikörper 12.8. Abb. 36 zeigt, dass die Antikörperbindung von 12.8 stark von der  $\alpha_1$ -PI Konzentration abhängig ist. Bereits unterhalb einer  $\alpha_1$ -PI-Konzentration von 2 mg/ml, konnte eine partielle Antikörperbindung beobachtet werden. Sinkt die Konzentration deutlich, so besitzt der Anti-hPR3-Antikörper die Möglichkeit an hPR3 zu binden.



**Abb. 36: Bindung von 12.8 an hPR3 in Abhängigkeit von der  $\alpha_1$ -PI-Konzentration.** Zu 100 ng hPR3 wurden gleichzeitig 50 ng des monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpers 12.8 und steigende Mengen von  $\alpha_1$ -PI zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde anschließend im ELISA getestet. Hierbei wurde hPR3 über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag an Nickel-beschichtete Mikrotiterplatten gekoppelt und gebundener 12.8-Antikörper durch Messung der Absorption bei 405 nm in Duplikaten bestimmt. Als Negativprobe wurde eine Maus-IgG-Isotyp-Kontrolle verwendet. Nach Abzug des Hintergrundsignals (entspricht der OD der Negativkontrolle) wurde die Bindung von 12.8 an hPR3 in Prozent errechnet, wobei eine Bindung in Abwesenheit von  $\alpha_1$ -PI gleich 100% gesetzt wurde.

---

# Diskussion I

Für die Charakterisierung von Epitopen auf der PR3-Oberfläche anhand eines dreidimensionalen Strukturmodells ist das Vorhandensein eines geeigneten PR3 Homologs und ausreichende Mengen dieser Protease bzw. Mutanten notwendig. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende methodische Ansätze gewählt:

1. Vergleich der PR3-Aminosäuresequenz von verschiedenen Primaten mit dem humanen Homolog und Analyse der ANCA-Bindungsmuster
2. Etablierung einer geeigneten Methode zur rekombinanten Expression von PR3
3. Epitop-Charakterisierung von monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpern und ANCA von WG-Patienten

## 1. Analyse von Primaten-PR3

Bis heute existiert kein geeignetes PR3-Strukturmodell für die Charakterisierung von ANCA-bindenden Epitopen. Studien mit synthetischen Peptiden aus Abschnitten der PR3-Sequenz sind widersprüchlich, da verschiedene Epitope identifiziert wurden [ Williams *et al.*, 1994; Griffith *et al.*, 2001; van der Geld *et al.*, 2001]. mPR3 ist aufgrund von 71 Aminosäuredifferenzen nur zu 67% identisch mit hPR3. Dadurch sind konservierte Bereiche gering, wodurch sich große Unterschiede in der Oberflächenstruktur ergeben. Benachbarte Aminosäuren von möglichen ANCA-Epitopen können unterschiedliche Ladungen aufweisen und somit die Antikörperbindung negativ beeinflussen. Eine Bestimmung von Epitopen auf der PR3-Oberfläche wäre somit deutlich erschwert. Auch die Analyse unter Verwendung von Chimären aus humaner und mPR3 lieferte keinen Aufschluss über mögliche Epitope [Selga *et al.*, 2004].

Ein Primatenmodell ist durch die geringe phylogenetische Distanz zum Menschen besser geeignet. Daher wurde von Makakke, Gibbon und Schimpanse zunächst die PR3-Aminosäuresequenz bestimmt und mit dem humanen Homolog verglichen. Für Makakke ergab sich eine Übereinstimmung von 84%, für Gibbon 93% und den am nächsten mit dem Menschen verwandten Schimpansen 97% (Tabelle 3). Somit korreliert die Aminosäuredifferenz mit der phylogenetischen Distanz zum Menschen. Dies zeigte sich auch in den ANCA-Bindungseigenschaften. Je größer der Aminosäureunterschied, desto weniger monoklonale Anti-hPR3-Antikörper bzw. ANCA von WG-Patienten wurden von der jeweiligen Primaten-PR3 im Western-blot erkannt (Abb. 11). Auch zeigte sich eine deutliche Abschwächung in der Bindungsstärke im Vergleich zu humaner PR3 und innerhalb der Primaten. So war das Signal für Gibbon-PR3 im Vergleich zu Schimpansen-PR3 deutlich vermindert. Gibbon-PR3 ist somit das Beste



PR3-Homolog für die Charakterisierung von ANCA-Epitopen, da sich die Aminosäuredifferenz auf 16 Austausche beschränkt und sich dennoch die Antikörpererkennung und Bindungsstärke deutlich von hPR3 unterscheidet. Ist ein ANCA-Bindungssepitop von diesem Austausch betroffen, so kann die Bindungsintensität zwischen Antigen und Antikörper durch gezielten Austausch von PR3-Oberflächenloops im Gibbon-Molekül hin zur humanen Sequenz, erhöht werden. Somit ist es z.B. möglich, das Epitop eines monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpers exakt zu bestimmen oder ANCA von WG-Patienten genauer zu analysieren.

## 2. Etablierung einer Methode zur rekombinanten Expression von PR3

Wichtigste Voraussetzung für die Charakterisierung von ANCA-bindenden Epitopen war die Etablierung einer geeigneten Methode zur rekombinanten Expression von PR3. Eine Aufreinigung der Protease z.B. aus Blut ist zum einen ineffizient und zum anderen ungeeignet, da eine Generierung von PR3-Chimären bzw. -Mutanten nicht möglich ist. Da der Großteil der PR3-ANCA konformationelle Epitope erkennt [Bini *et al.*, 1992], ist eine korrekte, gefaltete dreidimensionale Struktur unumgänglich. Bei der Wahl des Expressionssystems spielt dabei neben Ausbeute und Reinheit des rekombinanten Proteins vor allem die korrekte Faltung und die gleich bleibende Qualität des Antigens eine entscheidende Rolle.

Bisher veröffentlichte Verfahren zur Herstellung von Proteinase 3 beschränkten sich auf eukaryotische Expressionssysteme. So wurde hPR3 bereits 1996 erfolgreich in Sf9 Insektenzellen mittels eines Baculovirus-Systems exprimiert und kristallisiert [Fujinaga *et al.*, 1996]. Auch in sekretorischen Granula von HMC-1 Zellen [Specks *et al.*, 1996] oder als Zymogen, welches in den Zellkultur-Überstand von CHO oder HEK 293 Zellen sezerniert wird, konnte PR3 produziert werden [Sun *et al.*, 1998a; van der Geld *et al.*, 2000]. Allerdings muss hierbei das Proenzym aus dem Zellkultur-Überstand gereinigt und in katalytisch aktive PR3 konvertiert werden. Die Aufreinigung wird hierbei oft durch geringe Expression und kontaminierende Proteine erschwert. Auch kann die Konvertierung unvollständig ablaufen, so dass inhomogenes Material entsteht und eine gleich bleibende Qualität nicht garantiert werden kann.

Da der Weg der Expression von humaner PR3 in *E. coli* bislang nicht beschrritten worden ist, wurden hierfür zunächst folgende Ansätze gewählt:

1. periplasmatische Expression als lösliches Protein
2. zytoplasmatisch in Form von unlöslichen *inclusion bodies*

### *Periplasmatische Expression von PR3*

Die periplasmatische Expression von Proteinen bietet den Vorteil der (korrekten) Ausbildung von Disulfidbrücken durch ein oxidatives Milieu und somit die Isolierung des nativen, gefalteten Proteins. Andererseits ist die Ausbeute oft sehr gering, da das Periplasma ein begrenztes Volumen aufweist und Transport- und Faltungssystem limitierende Faktoren darstellen. Durch Verwendung von geeigneten Signalsequenzen und Fusionsproteinen können jedoch Ausbeute und Qualität optimiert werden.

In dieser Arbeit wurde hPR3 als DsbA-Fusionsprotein exprimiert. Diese Methode wurde bereits für Enterokinase [Collins-Racie *et al.*, 1995] aber auch Proinsulin [Winter *et al.*, 2001] erfolgreich angewandt. DsbA ist eine Oxidoreduktase, welche die Faltung von komplexen Disulfidbrücken katalysiert [Maskos *et al.*, 2003]. Die geringe Größe von DsbA (21.1 kDa) erleichtert die Expression des Fusionsproteins und sollte zusätzlich die Löslichkeit von PR3 erhöhen. Eine Expression des Fusionsproteins im Periplasma von *E. coli* unter Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors scheiterte. Nach Induktion der Expression konnte zwar das DsbA-hPR3-Fusionsprotein nachgewiesen werden, doch lag das gesamte Material in Form unlöslicher Einschlusskörperchen vor. Somit war eine Isolierung des Proteins aus dem Periplasma nicht möglich. Das periplasmatische Transport- und Faltungssystem scheint demnach für PR3 ungeeignet zu sein, da unter anderem zytosolische Aggregation des rekombinanten Proteins über Translokation und Faltung dominierten.

### *Zytoplasmatische Expression von PR3*

Die zytoplasmatische Expression in Form von *inclusion bodies* (IB) in Prokaryoten mit anschließender *in vitro* Faltung zum nativen Protein wurde bereits erfolgreich für mPR3, [Pfister *et al.*, 2004] aber auch für andere Serinproteasen gezeigt. Sowohl Granzym K [Wilharm *et al.*, 1999], Granzym B [Kurschus *et al.*, 2005] als auch Granzym H [Fellows *et al.*, 2007] konnten zytoplasmatisch in *E. coli* exprimiert, renaturiert und aufgereinigt werden. Hierbei können Proteinnengen im Milligramm-Maßstab produziert werden. Die zytoplasmatische Überexpression unlöslicher Einschlusskörperchen in *E. coli* erleichtert zudem die Aufreinigung von kontaminierenden Proteinen und stellt außerdem ein kostengünstiges und schnelles Verfahren dar. Der Vorteil hoher Proteinnengen als Ausgangsmaterial bei zunächst fehlender Funktionalität macht allerdings die Entwicklung einer Renaturierungsmethode notwendig. Durch Optimierung der Rückfaltungsbedingungen kann jedoch die Ausbeute an nativem, korrekt gefaltetem Protein gesteigert werden.

Da es kein universelles Renaturierungsprotokoll gibt, muss die optimale Pufferzusammensetzung bzw. Rückfaltungsbedingung für jedes Protein individuell ermittelt werden. Dabei wurden zunächst die aggregierten IB unter Ausbildung von gemischten Disulfidbrücken durch Oxidation der SH-Gruppen solubilisiert und anschließend renaturiert. Da kontaminierende Proteine die Rückfaltung nicht negativ beeinflussen, wurde auf ein aufwendiges Reinigungsverfahren vor Renaturierung verzichtet [Jaenicke *et al.*, 1981]. Sowohl hPR3 als auch gibPR3 neigten während des Rückfaltungsprozesses zu

starker Aggregation. Daher wurde für die Generierung enzymatisch aktiven Proteins ein Rückfaltungsprotokoll etabliert. Hierbei wurde bei hoher Argininkonzentration, welches als Faltungsverstärker fungiert, zurückgefaltet. Es zeigte sich, dass das zwitterionische Detergenz CHAPS im Renaturierungspuffer PR3-Aggregation weitgehend verhindern kann und somit entscheidend zur Löslichkeit und Stabilität des Proteins beiträgt. Zur weiteren Optimierung wurde die Proteinkonzentration von 10 µg/ml während der Rückfaltung nicht überschritten und lag somit im unteren Bereich der von Rudolph empfohlenen Konzentration von 10-50 µg/ml [Rudolph & Lilie, 1996]. Die Faltung erfolgte durch rasche Verdünnung im neutralen pH-Bereich. Wie bereits für mPR3 beschrieben [Pfister, 2002], wurde aufgrund der Instabilität die Rückfaltungsphase verkürzt und das renaturierte Protein in einen Puffer mit neutralem pH-Wert überführt, da PR3 in Puffern mit saurem pH instabil ist und auch hier zu Aggregation neigt.

#### *Konvertierung von proPR3 mit Enterokinase geeigneter als Cathepsin C oder TEV-Protease*

Vorraussetzung für die Herstellung von katalytisch aktivem Protein ist neben der Etablierung eines Renaturierungsschemas die Generierung des nativen N-Terminus Isoleucin von PR3. Dieser kann in *E. coli* nicht direkt erzeugt werden, da das Startkodon ATG für Methionin kodiert. Daher erfolgte die Expression als Zymogen mit N-terminalem Propeptid, welches anschließend durch ein geeignetes Enzym abgespalten werden kann. Die Abspaltung des Propeptids bedingt einen Konformationswechsel, der die Substratbindungsstelle zugänglich macht und PR3 dadurch enzymatisch aktiv wird [Fujinaga *et al.*, 1996; Garwicz *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1996]. Der neue N-Terminus Isoleucin geht dabei eine ionische Wechselwirkung mit Asp194 (Chymotrypsinogen-Nummerierung) ein. Dadurch wird die Orientierung von Lys145 verändert und die Ausbildung einer spezifischen Substratbindungstasche ermöglicht (Zusammenfassung in [Stroud, 1974]).

Für die Konvertierung von proPR3 wurde zunächst die Dipeptidylpeptidase Cathepsin C gewählt. Diese spaltet Dipeptide vom N-Terminus und wurde bereits effizient für die Konvertierung von mPR3 und Granzymen eingesetzt [Fellows *et al.*, 2007; Kurschus *et al.*, 2005; Pfister, 2002; Wilharm *et al.*, 1999]. Als Prosequenz wurde Met-Lys-His<sub>6</sub>-Met-Lys für hPR3 und Met-Lys-His<sub>6</sub> für gibPR3 gewählt, wobei die sechs aufeinander folgenden Histidine für die Aufreinigung über Ni-Affinitätschromatographie genutzt werden können. Außerdem besitzen längere Propeptide gegenüber kurzen den Vorteil, dass der Erfolg der Konvertierungsreaktion mittels SDS-PAGE anhand der Größenreduktion des konvertierten Proteins detektiert werden kann. Es zeigte sich jedoch, dass nach Konvertierung von proPR3 mit Cathepsin C nur geringe enzymatische Aktivität nachzuweisen war. Dies ließ darauf schließen, dass der Anteil an korrekt gefaltetem Protein sehr gering bzw. eine Konvertierung mit Cathepsin C für humane bzw. Gibbon-PR3 eher ungeeignet war.

Für die Verbesserung der Konvertierung wurden daher im folgenden verschiedene Prosequenzen getestet. Da bereits für mPR3 eine effiziente Konvertierung gezeigt werden konnte [Pfister, 2002],

wurde ein hPR3-Konstrukt mit ähnlicher Prosequenz, hier Met-Lys, gewählt. Da das pH-Optimum für Cathepsin C bei 5.5 liegt, PR3 dabei allerdings relativ instabil ist und zu Aggregation neigt, wurde Glutaminsäure (enthalten im Propeptid von mPR3) durch Lysin ersetzt. Dadurch wird eine Konvertierung im neutralen pH-Bereich ermöglicht. Ein zweites Konstrukt mit der Prosequenz Met-Lys-(Ala-Lys)<sub>3</sub> sollte zeigen, ob lange Propeptide für die Konvertierung von PR3 im neutralen pH-Bereich besser geeignet sind. Bei beiden Konstrukten zeigte sich keine Verbesserung in der Ausbeute katalytisch aktiver PR3.

Neuere Studien zeigten, dass eine Konvertierung *in vivo* am Ribosom von *E. coli* mittels TEV-Protease möglich ist [Henrichs *et al.*, 2005]. Dies hat den entscheidenden Vorteil, dass Proteine mit nativem N-Terminus generiert werden können. Ein PR3-Konstrukt sollte daher Aufschluss geben, ob dieses System generell auf die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* übertragen werden kann. Ein prohPR3-Konstrukt mit einer TEV-Protease-Spaltstelle Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln zeigte jedoch weder eine *in vivo* noch eine *in vitro* Konvertierung mit TEV-Protease. Wahrscheinlich erwies sich die erste Aminosäure des reifen N-Terminus von PR3 (Isoleucin) in der P1'-Position für die Konvertierung durch TEV-Protease als ungünstig.

Die größte Ausbeute katalytisch aktiver hPR3 wurde nach Konvertierung mit Enterokinase, einer Endopeptidase, erzielt. EK erkennt das Pentapeptid Asp<sub>4</sub>-Lys und spaltet direkt nach der terminalen Carboxylgruppe der Erkennungssequenz. EK besitzt ein weites Wirkungsspektrum. So werden pH-Werte zwischen 4.5 und 9.5 toleriert, aber auch Temperaturen zwischen 4 und 45°C. Auch in Anwesenheit verschiedener Detergentien und unter denaturierenden Bedingungen ist EK aktiv. Außerdem werden fast alle Aminosäuren in P1'-Position zugelassen [Collins-Racie *et al.*, 1995]. Ein hPR3-Konstrukt mit der Prosequenz Met-Asp<sub>6</sub>-Lys wurde erfolgreich unter denaturierenden Bedingungen konvertiert. Allerdings war eine Renaturierung von PR3 mit nativem N-Terminus nicht möglich, da eine fast vollständige Aggregation des Proteins zu beobachten war. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

Die Konvertierungsausbeuten unter nativen Bedingungen für hPR3 und gibPR3 blieben trotz Optimierung der Faltungs- und Prozessierungsbedingungen gering. Dies liegt wahrscheinlich an dem im Renaturierungspuffer verwendeten Detergenz CHAPS. Dieses stabilisiert PR3 und erhöht die Löslichkeit nicht nur von korrekt gefaltetem Protein. CHAPS kann trotz seiner geringen Mizellen-Größe von nur 6 kDa nicht vollständig durch Dialyse entfernt werden wodurch nach Renaturierung ein großer Anteil an falsch gefaltetem Protein stabil in Lösung bleibt und eine spätere Konvertierung bzw. Aufreinigung stört.

Ein weiteres Problem bestand darin, dass PR3 nur in Konzentrationen von ungefähr 50 µg/ml stabil war. Dies ist möglicherweise auf fehlende Glykosylierung zurückzuführen, die PR3 bei höheren Konzentrationen stabilisiert und eine Konvertierung erleichtert [Specks *et al.*, 2007]. Eine Konvertierung wurde hier aufgrund des geringen Enzym-Substrat-Verhältnisses zusätzlich erschwert.

### *Aufreinigung von PR3*

Für die Aufreinigung von PR3 wurde zunächst der hydrophobe Charakter für die chromatographische Reinigung genutzt. Die Aufreinigung über hydrophobe Interaktionschromatographie war allerdings mit großen Verlusten verbunden. Wahrscheinlich wurde die Aufreinigung auch hier durch das Detergenz CHAPS, welches während der PR3 Renaturierung eingesetzt wurde, erschwert. Dieses behindert die Interaktion mit der Chromatographie-Matrix. Zudem war eine Reinigung der aktiven Form nach Konvertierung nicht möglich. Dies ist allerdings notwendig, um die Proform als auch das Konvertierungsenzym abzutrennen.

Für die Reinigung war ein His<sub>6</sub>-Tag, bestehend aus sechs aufeinander folgenden Histidinen, besser geeignet. Über Ni-Affinitätschromatographie konnten die meisten kontaminierenden Proteine entfernt und PR3 angereichert werden. Ein C-terminal gelegener His<sub>6</sub>-Tag erwies sich günstiger als ein N-terminaler, da hierbei kleinere PR3-Spaltfragmente, die während der Expression in *E. coli* bzw. während des Renaturierungsprozesses entstanden, abgetrennt werden konnten. Diese Aufreinigungsmethode lieferte homogenes Material mit der erwarteten Größe ohne PR3-Spaltprodukte. Einen weiteren Vorteil dieser Methode war die Möglichkeit der Aufreinigung sowohl unter denaturierenden Bedingungen als auch von renaturierter PR3. Ein C-terminaler His<sub>6</sub>-Tag ermöglichte jedoch nicht die Trennung von Pro- und aktiver Form nach Konvertierung.

Weitere Optimierung der Aufreinigungsmethode unter Verwendung von Ionenaustauschchromatographie wie es bereits für hPR3 beschrieben wurde, scheiterten [Kao *et al.*, 1988].

### *Eukaryotische Expression von PR3 in 293 Zellen*

Rekombinante Proteinexpression basierend auf eukaryotischen Expressionssystemen sind zeitaufwendig und kostenintensiv. Sind posttranslationale Modifikation für die spätere Funktion des Proteins nicht wichtig, so ist oft *E. coli* der bevorzugte Organismus für die Proteinproduktion. Im Fall von PR3 lieferte das prokaryotische System allerdings keine ausreichenden Mengen an homogenem, nativem und enzymatisch aktiven Material. Außerdem gestaltete sich die Renaturierung und Aktivierung als äußerst schwierig. Ein eukaryotisches System schien daher geeigneter. Zunächst wurde hPR3 transient in Insektenzellen exprimiert. Unter optimalen Bedingungen können hier Proteine im Milligramm-Maßstab produziert werden [Farrell & Iatrou, 2004]. Da allerdings die Expressionsrate gering war und nur durch zeitaufwendige Verfahren, wie z.B. die Optimierung der Transfektionsbedingungen oder durch Transfektion von Suspensionskulturen höhere Ausbeuten erwarten ließ, wurde im weiteren auf eine Insektenzellexpression verzichtet.

Die Expression von hPR3 und gibPR3 mit dem Flp-in System in 293 Zellen erwies sich für die Produktion dieser Serinprotease als schnelles und effizientes Verfahren. Eine Expression von aktiver PR3 mit nativem N-Terminus ist aufgrund der Toxizität nicht möglich. Es wurde zunächst eine stabile Zelllinie etabliert wobei proPR3 in den Zellkultur-Überstand sezerniert und von dort aufgereinigt

werden konnte. Es zeigte sich, dass keine höhere Expressionsrate von Einzelzellklonen gegenüber dem Zellpool auftrat, wodurch eine polyklonale Selektion innerhalb kurzer Zeit die Etablierung einer stabilen Zelllinie erlaubte. Durch Aufreinigung von proPR3 über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag aus dem Zellkultur-Überstand mittels Ni-Affinitätschromatographie konnten ca. 90% der kontaminierenden Proteine entfernt werden und lieferte reine, homogene proPR3. Die Ausbeute aus 1 l Medium beliefen sich hierbei auf 0.8-1 mg. Die proPR3-Expressionskonstrukte besitzen eine EK-Spaltstelle sowie einen N-terminalen S-Tag, der für den Nachweis des rekombinanten Proteins mittels Western-blot herangezogen werden kann. Außerdem ermöglichte das längere Propeptid mit einer Größe von ungefähr 3 kDa die genaue Detektion der Konvertierungseffizienz mittels EK. Durch Verwendung von Rinderenterokinase konnte eine Effizienz von 100% erzielt werden. Hierbei zeigte sich für hPR3 ein Verlust von 50%. Für gibPR3 war die Konvertierungsreaktion mit geringen Verlusten von etwa 10 bis 20% verbunden. Zusätzlich erhöhte sich die PR3-Reinheit, da neben der Abspaltung des Propeptids eine Präzipitation von kontaminierenden Proteinen beobachtet werden konnte. Da EK in nachfolgenden Experimenten nicht störte, wurde auf einen zweiten Aufreinigungsschritt verzichtet.

Für die Charakterisierung ANCA-bindender Epitope wurden zwei Hybride aus humaner und Gibbon-PR3 generiert. Hierbei wurde auf die Substitution einzelner Aminosäuren verzichtet. Der Austausch von größeren PR3-Bereichen hat gegenüber der Substitution einzelner Aminosäuren den Vorteil, dass diskontinuierliche Epitope, bestehend aus Aminosäuren verschiedener Loops, berücksichtigt werden können. Da die Rückseite von gibPR3 im Vergleich zu hPR3 mit Ausnahme von Val208 konserviert ist, wurden Substitutionen nur auf der Vorderseite vorgenommen. Innerhalb der N-terminalen Domäne wurden 7 Aminosäuren zurück zur humanen Sequenz mutiert, die Austausche der C-terminalen Domäne beliefen sich auf 6 Aminosäuren. Somit sind Mutationen innerhalb der beiden Chimären hum/gibPR3 und gib/humPR3 unter Berücksichtigung aller Substitutionen auf der PR3-Oberfläche gleich verteilt. Nach Konvertierung der beiden Hybride zeigte sich, dass die C-terminale Domäne entscheidend zur Stabilität und Ausbeute des Proteins beiträgt. Die Chimäre hum/gibPR3 wies ähnliche Eigenschaften während der Prozessierung auf wie gibPR3 und Konvertierung von gib/humPR3 war hier mit hohen Verlusten verbunden.

Konvertierte rekombinante hPR3, gibPR3 und die beiden Chimären zeigten ähnliche katalytische Aktivität, die durch die beiden physiologischen Inhibitoren  $\alpha_1$ -PI und Elafin inhibiert werden konnte. Dieser Befund belegt klar, dass das rekombinante, konvertierte Material die native Konformation besitzt. Auch blieb PR3 bei höheren Konzentrationen bis 1 mg/ml stabil, was darauf hindeutet, dass die Glykosylierung für die Stabilität des Proteins wichtig ist.

Das rekombinante Material zeichnete sich außerdem durch Homogenität aus und wiederholte Aufreinigungen lieferten eine gleich bleibende Qualität. Zudem war kein Expressionsverlust der Flp-in 293 Zellen auch über einen längeren Zeitraum zu verzeichnen. Dies ist auf kontinuierliche Antibiotikaselektion zurückzuführen, die zu keinem Zeitpunkt unterbrochen wurde [Liu *et al.*, 2006].

Ausbeute und Reinheit des rekombinanten Materials könnte durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen gesteigert werden. Durch Adaption der Zellen an serumfreies Medium wird die Aufreinigung von kontaminierenden Proteinen zusätzlich erleichtert. Die Etablierung einer Suspensionskultur ermöglicht höhere Zelldichten und somit größere Ausbeuten an rekombinant exprimiertem Material. Dies ist allerdings nur sinnvoll, wenn PR3 für Kristallisationsstudien eingesetzt werden bzw. in der Diagnostik Anwendung finden soll.

### 3. PR3 Epitop-Mapping

Die Etablierung eines sensitiven, reproduzierbaren Tests war Voraussetzung für die Epitopanalysen. Der Festphasenimmunassay (ELISA) stellt ein gängigen Verfahren dar, das vor allem in der Diagnostik Anwendung findet [Csernok *et al.*, 2004; Hagen *et al.*, 1996]. Auch rekombinante PR3 aus HMC-1 Zellen wurde bereits erfolgreich im ELISA eingesetzt und von WG-Patientenseren erkannt [Sun *et al.*, 1998a]. Wird PR3 indirekt über einen Antikörper an die Platte gekoppelt, können jedoch Epitope verdeckt werden und eine Analyse erschweren. Rekombinante PR3 besitzt den Vorteil, dass verschiedene Tags an den C-Terminus des Proteins angehängt werden können und dieser für die Bindung an Mikrotiterplatten genutzt werden kann [Lee *et al.*, 2005], da carboxy-terminale Modifikationen keine signifikanten Auswirkungen auf die Antikörperbindung haben [Capizzi *et al.*, 2003].

Der in dieser Arbeit etablierte ELISA-Test basiert auf der Bindung von PR3 über den C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag an Nickel-beschichtete Mikrotiterplatten. Dies hat den Vorteil, dass keine Epitope durch direkte Bindung an die Platte verdeckt werden oder dabei die Struktur des Proteins verändert wird. Die Antikörperbindung erfolgt an die frei in Lösung befindliche PR3, was entscheidend zur Sensitivität des Assays beiträgt. Auch kann PR3 im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren direkt eingesetzt werden, da diese aufgrund des fehlenden His<sub>6</sub>-Tag nicht an die Mikrotiterplatte binden und die Antikörperbindung beeinflussen.

#### 3.1 Charakterisierung monoklonaler Anti-hPR3-Antikörper

Mehrere Versuche wurden bereits unternommen, ANCA-bindende Epitope auf der PR3-Oberfläche zu charakterisieren [Bini *et al.*, 1992; Capizzi *et al.*, 2003; Rarok *et al.*, 2003b; Sun *et al.*, 1998b]. Studien mit synthetischen Peptiden aus Abschnitten der PR3-Sequenz [Griffith *et al.*, 2001; van der Geld *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1994] konnten keine einheitlichen Epitope definieren bzw. wurden aufgrund hoher unspezifischer Bindungen erschwert [Chang *et al.*, 1995]. Auch PR3-Chimäre zwischen Mensch und Maus konnten keinen Aufschluss über die genaue Lokalisation von pathogenen Bereichen liefern, noch das Epitop eines monoklonalen Antikörpers definieren [Selga *et al.*, 2004]. Einzig van der Geld

gelang es, monoklonale Antikörper in 4 Kategorien einzuteilen, wobei jede Gruppe ein separates Epitop erkannte [van der Geld *et al.*, 1999].

Das in dieser Arbeit verwendete Primatenmodell für die Epitopcharakterisierung hat den Vorteil, dass ein mit dem Menschen nah verwandtes PR3-Homolog verwendet wird, welches zu 93% mit hPR3 identisch ist. Vorherige ANCA-Bindungsstudien mittels Western-blot und Gibbon-PR3 Strukturanalysen, lieferten bereits erste Hinweise auf mögliche Epitope. So wurden die monoklonalen Antikörper 1F11, MCPR3-2, 12.8 und 1F10 von der Primaten-PR3 nicht mehr gebunden. Da viele monoklonale Anti-hPR3-Antikörper kommerziell erhältlich sind, wurden dadurch die Studien erleichtert. Außerdem sollte gezeigt werden, ob der hier gewählte Ansatz auch Aufschlüsse über die Lage von PR3-ANCA-Epitopen der WG-Patienten geben kann.

Im ELISA konnte für die Antikörper 2F1, 2E1 und 1B10 eine Bindung sowohl an hPR3, als auch gibPR3 und die beiden Chimären hum/gibPR3 bzw. gib/humPR3 gezeigt werden. Das Signal für gibPR3 im Vergleich zu hPR3 war für diese Antikörper deutlich abgeschwächt und eine Bindung an den PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex nicht mehr möglich. Dies machte deutlich, dass hier Epitope auf der Vorderseite nahe des aktiven Zentrums lokalisiert sind und  $\alpha_1$ -PI Bereiche auf der PR3-Oberfläche verdeckt. Diese sind somit für die Antikörper nicht mehr zugänglich. Eine genaue Bestimmung der Epitope ist mit diesem Modell jedoch nicht möglich, da konservierte Bereiche bei der Antikörperbindung involviert sind, die von den Substitutionen weitgehend unbeeinflusst sind.

4A5 wurde von allen vier PR3-Molekülen gleich stark erkannt, was auf ein konserviertes Epitop schließen lässt. Auch war eine Bindung des Antikörpers an den PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex möglich. Hier kann ein Epitop, welches sich z.B. auf der konservierten Rückseite von PR3 befindet in Betracht gezogen werden.

1F11 wurde, wie bereits im Western-blot gezeigt, nicht mehr von gibPR3 erkannt, doch konnte eine Bindung an beide Mutanten beobachtet werden. Sowohl die N-terminale als auch C-terminale Domäne scheinen dabei zur Antikörperbindung beizutragen. Auch hier wurde die Bindung an PR3 durch  $\alpha_1$ -PI verhindert, was wiederum auf ein Epitop auf der PR3-Vorderseite schließen lässt.

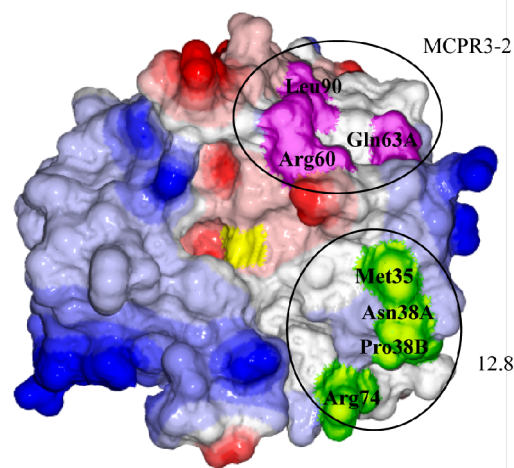
Für die beiden Antikörper 12.8 und MCPR3-2 konnte das Epitop auf die N-terminale PR3 Domäne eingegrenzt werden, da eine vollständige Regeneration des Signals nur mit hum/gibPR3 erzielt wurde. Überraschenderweise ließ sich die Bindung von MCPR3-2 im Gegensatz zu 12.8 [Rooney *et al.*, 2001] durch  $\alpha_1$ -PI nicht verhindern. Da proPR3 sowohl von MCPR3-2 als auch 12.8 erkannt wurde, konnte somit ein Bindungsverlust aufgrund von Strukturänderung während der Komplexbildung von PR3 mit  $\alpha_1$ -PI ausgeschlossen werden. Der nur 6 kDa große Inhibitor Elafin hatte keinen Einfluss auf die Antikörperbindung. Daher scheint auch hier  $\alpha_1$ -PI aufgrund der Größe das Epitop für 12.8, nicht aber für MCPR3-2, zu verdecken. Obwohl beide Antikörper nur Aminosäuren des N-terminalen Bereichs erkennen, scheinen sich die Epitope dennoch zu unterscheiden. Um diese genauer voneinander diskriminieren zu können wurde eine weitere PR3-Mutante generiert. Strukturdaten von Pankreas-



Elastase im Komplex mit  $\alpha_1$ -PI zeigten, dass eine Bindung des Inhibitors unterhalb des aktiven Zentrums stattfindet [Dementiev *et al.*, 2006]. Für komplexierte hPR3 würde dies bedeuten, dass Aminosäuren an Position 35, 38A, 38B und 74 nicht mehr zugänglich sind. Eine weitere gibPR3-Mutante (gibPR3/Epi12.8), bei der nur diese Aminosäuren gegen die humane Sequenz ausgetauscht wurden, bestätigte beide Epitope. Hier war eine Bindung von 12.8, nicht aber von MCPR3-2, zu beobachten. Das Epitop für MCPR3-2 liegt somit oberhalb, das von 12.8 unterhalb des aktiven Zentrums. Die genauen Bindungsepitope von MCPR3-2 und 12.8 auf der Oberfläche von hPR3 sind in Abb. 37 dargestellt.

Die von van der Geld [van der Geld *et al.*, 1999] vorgenommene Einteilung monoklonaler Anti-hPR3-Antikörper beruhend auf der Erkennung unterschiedlicher Epitope kann hier bestätigt werden. So erkennen 12.8 (Gruppe 1), 4A5 (Gruppe 3) und MCPR3-2 (Gruppe 4) aufgrund ihres Bindungsmusters gegenüber gibPR3, hum/gibPR3 und gib/humPR3 im Vergleich zu hPR3 und ihrer Reaktivität bezüglich des PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplexes unterschiedliche Bereiche auf der PR3-Oberfläche.

In der vorliegenden Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen durch die Methode eines Evolutionsbasierten Epitopscreenings ein geeignetes dreidimensionales Strukturmodell zu finden mit dem konformationelle Epitope charakterisiert werden können. Durch Analyse weiterer PR3-Sequenzen, z.B. aus der phylogenetisch entfernten Gruppe der Neuweltaffen wäre es durchaus möglich, weitere monoklonale Antikörper zu kartieren.



**Abb. 37: Epitope der monoklonalen Anti-hPR3-Antikörper MCPR3-2 und 12.8.** Die beiden Antikörper MCPR3-2 und 12.8 binden an die N-terminale Domäne von hPR3, erkennen dort aber unterschiedliche Bereiche. Das Epitop von MCPR3-2 besteht aus den Aminosäuren Arg60, Gln63A und Leu90 (violett), das für 12.8 aus Met35, Asn38A, Pro38B und Arg74 (grün). Diese Positionen werden im PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex verdeckt und sind somit für 12.8 nicht mehr zugänglich. Beide Epitope wurden durch die PR3-Mutante gibPR3/Epi12.8 bestätigt. Hierbei waren innerhalb von gibPR3 nur Aminosäuren an Position 35, 38A, 38B und 74 gegen die humane Sequenz ausgetauscht. Diese Mutante wurde nur von 12.8, nicht aber von MCPR3-2, gebunden. Gezeigt ist die dreidimensionale Oberflächenstruktur von hPR3 (PDB 1FUJ) mit seinem elektrostatischen Potential (blau: positive geladene Regionen, rot: negative geladene Regionen). Der aktive Serinrest 195 ist gelb markiert.

### 3.2 Analyse des ANCA-Epitopspektrums von WG-Patienten

Die Epitopanalyse von WG-Patienten gestaltet sich oft schwierig. Zum einen liegen keine oder nur wenige Patientendaten z.B. über Geschlecht, Alter oder Krankheitsstatus vor, zum anderen sind ausreichende Mengen an Serum oft nicht verfügbar. Daher ist es nicht möglich, spezifische Anti-hPR3-Antikörper aus dem Serum zu reinigen und in geeigneter Verdünnung in ELISA-Tests einzusetzen. Hohe Hintergrundsignale aufgrund unspezifischer Bindung von kontaminierenden Proteinen bzw. Antikörpern erschweren die Analyse, wodurch WG-Seren häufig in hohen Verdünnungen zwischen 1:4000 und 1:5000 [Chang *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1994]) eingesetzt werden. Da sich die Konzentration von spezifischen PR3-ANCA im Promille-Bereich bewegt, sind bei hohen Verdünnungen daher Signalunterschiede zu Kontrollpersonen kaum zu erwarten. Der hier entwickelte ELISA erlaubt eine Serumverdünnung von 1:50 und ermöglicht somit auch die Analyse von WG-Seren mit geringem ANCA-Titer.

Für zwei der getesteten monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpern konnte bereits das Epitop auf drei (MCPR3-2) und vier Aminosäuren (12.8) eingegrenzt werden. Dies zeigt, dass gibPR3 trotz der starken Homologie zu hPR3 als Modell für Epitopstudien herangezogen werden kann. Im folgenden wurden 34 Seren von Patienten mit diagnostizierter WG und 8 Kontrollseren im ELISA mit den in dieser Arbeit hergestellten vier rekombinanten PR3-Molekülen getestet. Alle Seren wiesen einen spezifischen PR3-ANCA-Titer von mindestens 5 Units/ml auf. Kontrollseren zeigten keine Reaktivität gegenüber PR3. Zwei Tendenzen waren zu beobachten: Die ersten Gruppe (44%) der WG-Seren wies keinen oder nur geringen Unterschied im Bindungsmuster gegenüber gibPR3 oder einer der Chimären auf. Die Signalintensität variierte um ungefähr 20%. In der zweiten Gruppe (56%) war die Bindung an gibPR3 um fast 50% reduziert. Eine Regeneration des Signals wurde mit der Mutante hum/gibPR3 erlangt, nicht aber mit gib/humPR3. ANCA dieser Gruppe sind somit vorwiegend gegen Bereiche der N-terminalen Domäne gerichtet. Da aber keine 100%ige Signalreduktion für gibPR3 bzw. gib/humPR3 erreicht werden konnte, wie es für die beiden monoklonalen Antikörper 12.8 und MCPR3-2 gezeigt wurde, sind wahrscheinlich konservierte Bereiche bei der ANCA-Bindung involviert oder verschiedene Antikörper-Subpopulationen vorhanden, die an unterschiedliche Epitope binden.

Für eine weitere Epitop-Eingrenzung wurden Seren aus beiden Gruppen bezüglich Bindung an den PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex getestet. Mit Ausnahme von zwei Seren aus der ersten Gruppe konnte keine Bindung an komplexierte PR3 beobachtet werden. Somit werden auch hier Epitope durch  $\alpha_1$ -PI verdeckt und für ANCA unzugänglich. Elafin zeigte auch hier keinen Effekt auf die ANCA-Bindung. Somit nimmt  $\alpha_1$ -PI eine wichtige Funktion in der ANCA-Bindung ein. Um zu überprüfen, ob das Epitop des monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpers 12.8 mit PR3-ANCA überlappt, wurden Seren der zweiten Gruppe hinsichtlich Bindung an die PR3-Mutante gibPR3/Epi12.8 untersucht. Es konnte eine fast vollständige Regeneration der ANCA-Bindung an PR3 erzielt werden. Dies zeigt, dass das Epitop von 12.8 ein humanes pathogen-relevantes ANCA-Epitop darstellt. Zieht man weitere monoklonale Anti-

hPR3-Antikörper für eine Analyse heran, so können aufgrund der vorliegenden Daten von van der Geld *et al.* [van der Geld *et al.*, 1999] bereits zwei der vier Gruppen als pathogen-relevante Epitope ausgeschlossen werden, da die Bindung mit dem PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplexe nicht interferiert. Dazu gehört 4A5 der Gruppe 3 und MCPR3-2 der Gruppe 4. Antikörper der Gruppe 1, zu denen 12.8 gezählt wird, scheinen mit PR3-ANCA-Epitopen zu überlappen.

### 3.3 Modell für ANCA-Bindung an hPR3 in Anwesenheit hoher $\alpha_1$ -PI-Konzentrationen

Ein ausgewogenes Protease-Inhibitor Gleichgewicht ist für eine geregelte Proteaseaktivität wichtig. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl für monoklonale Anti-hPR3-Antikörper als auch für ANCA von WG-Patienten gezeigt werden, dass Bindungsstellen an hPR3 mit der von  $\alpha_1$ -PI überlappen und eine Antikörperbindung durch  $\alpha_1$ -PI verhindert werden kann. Somit stehen Antikörper und Inhibitor in direkter Konkurrenz um die PR3-Bindungsstelle.

Rooney *et al.* zeigte, dass  $\alpha_1$ -PI die ANCA-vermittelte Aktivierung von Neutrophilen blockieren kann [Rooney *et al.*, 2001]. Doch wie kann es *in vivo* trotz hoher  $\alpha_1$ -PI-Konzentrationen im Blut zu einer Bindung von ANCA an hPR3 auf der Membran mit nachfolgender Aktivierung der Neutrophilen kommen? Ein Modellexperiment mit dem monoklonalen Antikörper 12.8 lieferte erste Hinweise auf das fein abgestimmte Zusammenspiel zwischen Protease und Inhibitor. Es konnte gezeigt werden, dass eine Bindung des Antikörpers bei gleichzeitiger Anwesenheit von  $\alpha_1$ -PI stark von dessen Konzentration abhängt. Bereits bei einer  $\alpha_1$ -PI-Konzentration von 1 mg/ml, konnte eine partielle Antikörperbindung beobachtet werden. Sinkt die Konzentration deutlich, so besitzt der Anti-hPR3-Antikörper die Möglichkeit an PR3 zu binden. Diese Bindung kann auch dann noch stattfinden, wenn  $\alpha_1$ -PI in molarem Überschuss vorhanden ist.

Ein gestörtes Protease-Inhibitor-Gleichgewicht kann zum Beispiel durch genetische Faktoren bedingt werden, die zu einem  $\alpha_1$ -PI-Mangel führen. Da  $\alpha_1$ -PI von einem hochpolymorphen Gen kodiert wird, trägt der Phenotyp entscheidend zur Serumkonzentration bei (s. Tabelle 5). So haben WG-Patienten mit PI<sub>ZZ</sub>-Phenotyp nur einen  $\alpha_1$ -PI-Level von 10-15% der normalen Konzentration [Crystal *et al.*, 1989] und eine aggressiver verlaufende Vaskulitis als Patienten mit MZ- oder MM-Phenotyp [Esnault *et al.*, 1993]. Die Mehrheit der WG-Patienten mit einem verminderten  $\alpha_1$ -PI-Spiegel tragen allerdings den PI<sub>MZ</sub>-Phenotyp und Studien beschreiben eine normale  $\alpha_1$ -PI-Konzentration bei aktiver Vaskulitis [Savigne *et al.*, 1995; Segelmark *et al.*, 1995]. Obwohl eine normale  $\alpha_1$ -PI-Konzentration vorhanden ist, haben diese Patienten einen schlechteren Krankheitsverlauf [Esnault *et al.*, 1993; Segelmark *et al.*, 1995]. Eine mögliche Erklärung liefert die Geschwindigkeit der Komplexbildung. Für  $\alpha_1$ -PI<sub>ZZ</sub> konnte eine um das 4-fache verminderte Assoziationskonstante  $k_{\text{ass}}$  im Vergleich zu  $\alpha_1$ -PI<sub>MM</sub> gezeigt werden [Lomas *et al.*, 1992]. Somit ist die Reaktionszeit deutlich länger. Um equimolare Mengen an HNE zu inhibieren, erhöht sich die Zeit um das 22-fache von 0.2 s auf 2.4 s [Ogushi *et al.*, 1988].

Tabelle 5: Klassifikation der  $\alpha_1$ -PI-Varianten (Zusammenfassung in [Brantly et al., 1988])

Kategorie	Name	Phenotyp	Serumkonzentration mg/dl	Funktion*	Allel- Frequenz	Krankheits- risiko
Normal	M1 (Ala213)	MM, MS, MZ, M Null	150-350	normal	0.20-0.23	–
	M1 (Val213)	MM, MS, MZ, M Null	150-350	normal	0.44-0.49	–
Defizient	S (Glu264→Val)	SS	100-200	normal	0.02-0.04	–
	Z (Glu342→Lys)	ZZ	15-50	vermindert <sup>§</sup>	0.01-0.02	ja (Lunge, Leber)
Null	Null (Tyr160→Stop, Lys217→Stop)	homozygot	0	–	selten	hoch (Lunge)
Dysfunktionell	Pittsburgh (Met358→Arg)	nur heterozygote Vererbung	Normal	verändert <sup>#</sup>	selten	ja (Bluter- krankheit)

\* sofern nicht ander angegeben inhibitorische Funktion gegenüber HNE getestet

#  $\alpha_1$ -PI-Variante, welche als Thrombininhibitor fungiert

§ Assoziationskonstante für HNE von  $8-12 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  auf  $3-6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  vermindert, erhöht die Reaktionszeit für die Inhibition von HNE

Wie ist aber dann eine Aktivierung von Neutrophilen in Anwesenheit hoher Inhibitorkonzentrationen möglich, wenn genetische Faktoren ausgeschlossen werden können? Hierbei handelt es sich um ein weitaus komplexeres Zusammenspiel. Eine Veränderung von PR3 und somit einer Verhinderung der Inhibition durch  $\alpha_1$ -PI kann ausgeschlossen werden, da gezeigt werden konnte, dass funktionelles exogenes  $\alpha_1$ -PI die Aktivierung der Neutrophilen verhindern kann [Rooney et al., 2001]. Somit ist PR3, welches auf der Oberfläche von Neutrophilen der WG-Patienten exprimiert wird, für  $\alpha_1$ -PI zugänglich und funktionell aktiv.

Die Affinität des Antikörpers könnte eine wichtige Rolle spielen. Hochaffine PR3-Antikörper könnten trotz großer Inhibitorkonzentration an PR3 binden. Ist die Bindung des Antikörpers an PR3 schneller als die des Inhibitors kommt es zur Aktivierung der Neutrophilen [Charles et al., 1991; Falk et al., 1990b]. Die Assoziationskonstante  $k_{\text{ass}}$  für  $\alpha_1$ -PI beträgt  $8.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Rao et al., 1991a]. Je nach Antikörper variiert  $k_{\text{ass}}$  über einen weitaus größeren Bereich. So wurden Werte zwischen  $3 \times 10^4 - 7.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Karlsson et al., 1991] und  $4.1-9.3 \times 10^6 - 1.5-3.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Xavier & Willson, 1998] ermittelt.

Eine weitere Erklärung könnte die Inaktivierung von  $\alpha_1$ -PI durch reaktive Sauerstoffintermediate (ROS, *reactive oxygen species*) liefern. Oxidation von  $\alpha_1$ -PI findet an zwei Methioninresten der RCL (*reactive centre loop*) statt. Die Assoziationskonstante  $k_{\text{ass}}$  von oxidiertem  $\alpha_1$ -PI wird dadurch deutlich vermindert. Für HNE konnte eine Reduktion von  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  auf  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  gezeigt werden [Beatty et al., 1980]. PR3 wurde durch oxidiertes  $\alpha_1$ -PI nicht mehr inhibiert und behielt seine Aktivität [Weiss, 1989]. Esnault et al. [Esnault et al., 1997] vermutet, dass es bei andauernder Infektion zu einer vermehrten ROS-Bildung und daraus resultierender Inaktivierung von  $\alpha_1$ -PI kommt, was eine lokale  $\alpha_1$ -PI-Defizienz zur Folge hat. Dadurch behalten neben PR3 auch andere Serinproteasen wie HNE oder

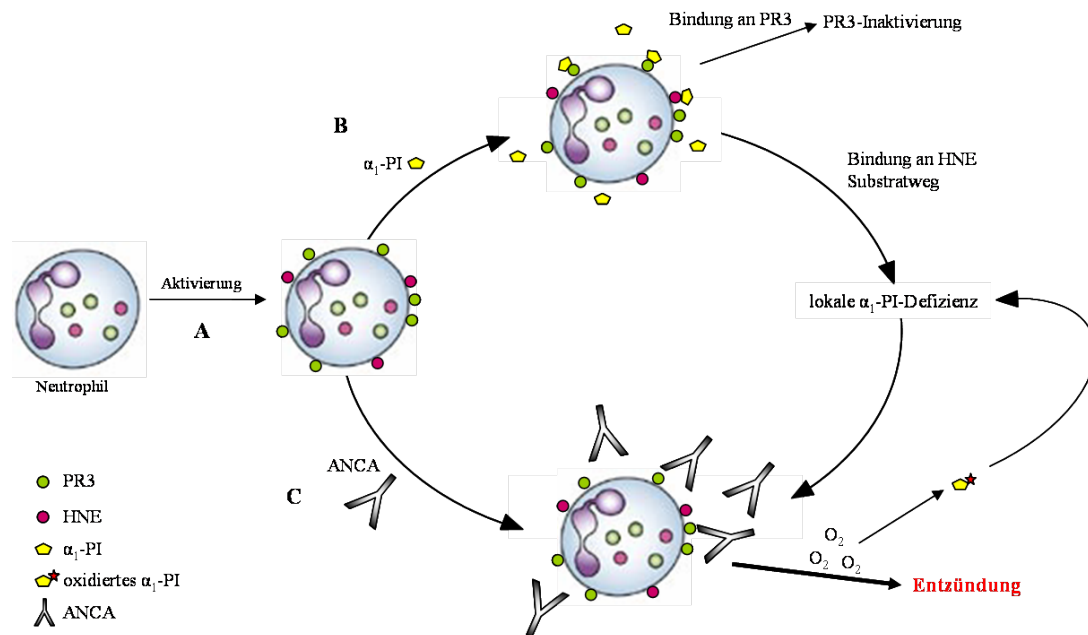
---

CatG ihre proteolytische Aktivität und es kommt zur Gewebeschädigung.

$\alpha_1$ -PI kann von PR3 aber auch als Substrat umgesetzt werden. Ist der PR3/Substrat-Komplex instabil, kommt es im zweiten Schritt nicht zur Inhibition und gespaltenes  $\alpha_1$ -PI dissoziiert vom Komplex ab. Gespaltenes  $\alpha_1$ -PI kann PR3 somit nicht mehr inaktivieren, was auch hier zu einer uneingeschränkten Proteaseaktivität führt.

Da  $\alpha_1$ -PI nicht nur PR3 sondern auch HNE und CatG inhibiert, kann eine lokale Verminderung der  $\alpha_1$ -PI-Konzentration auch durch HNE hervorgerufen werden. Diese wird ungefähr 10 mal schneller gebunden als PR3. Bei equimolaren Mengen HNE, PR3 und CatG bleibt die Aktivität von PR3 und CatG vollständig erhalten, wohingegen für HNE keine Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Erst bei einer Erhöhung der  $\alpha_1$ -PI-Konzentration um das dreifache nimmt auch die Aktivität von PR3 ab. Wurde Bronchial-Lavage-Flüssigkeit, welches eine natürliche Körperflüssigkeit darstellt und somit nicht nur  $\alpha_1$ -PI enthält, für die Inhibition von PR3 auf der Zelloberfläche von polymorphonukleären Leukozyten (PMNs) verwendet, so konnte auch hier bei vollständiger HNE-Inhibition Aktivität membrangebundener PR3 und CatG nachgewiesen werden [Korkmaz *et al.*, 2005]. In Abb. 38 ist diese Modellvorstellung der ANCA-vermittelten Aktivierung der Neutrophilen bei gleichzeitiger Anwesenheit hoher  $\alpha_1$ -PI-Konzentrationen zusammengefasst.

Um tatsächlich einen Bezug zwischen  $\alpha_1$ -PI, ANCA und dem Krankheitsverlauf bei WG stellen zu können sind weitere Studien notwendig. Dabei müsste während der einzelnen Krankheitsstadien gezielt die lokale  $\alpha_1$ -PI-Konzentration und deren inhibitorisches Potential untersucht werden. Auch könnte durch Generierung neuer PR3-Mutanten, die vorwiegend Austausch innerhalb der  $\alpha_1$ -PI-Interaktionsfläche besitzen, ANCA-bindende Epitope genauer analysiert und eingegrenzt werden.



**Abb. 38: Modell der ANCA-vermittelten Aktivierung von Neutrophilen in Anwesenheit des Inhibitors  $\alpha_1$ -PI.** (A) Aufgrund einer lokalen Infektion kommt es zur Aktivierung von Neutrophilen. Dadurch erfolgt die Translokation der ANCA-Antigene von den Granula an die Zelloberfläche. (B) Der Inhibitor  $\alpha_1$ -PI kann nun an PR3 binden und diese inaktivieren. Dadurch ist eine Bindung von ANCA an PR3 auf der Membran von Neutrophilen nicht mehr möglich. Bindet  $\alpha_1$ -PI allerdings schneller an HNE oder wird der Inhibitor von PR3 als Substrat umgesetzt und dissoziiert vom PR3/ $\alpha_1$ -PI-Komplex, so kann es zu einer lokalen Reduktion der  $\alpha_1$ -PI-Konzentration kommen. Dies ermöglicht die Bindung von PR3-ANCA an ihr Antigen. (C) Sind ANCA mit hoher Affinität vorhanden, so können diese trotz großer Inhibitorkonzentrationen an membranständige PR3 binden. Es kommt zur Degranulation der Neutrophilen, Freisetzung von proteolytischen Enzymen und Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Dies hat eine massive Entzündungsreaktion zur Folge. Die Sauerstoffradikale wiederum oxidieren zwei Methioninreste der RCL von  $\alpha_1$ -PI. Dadurch vermindert sich die Assoziationskonstante und es kommt auch hier zu einer lokalen  $\alpha_1$ -PI-Defizienz.

## 4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das Epitopspektrum von monoklonalen Anti-hPR3-Antikörpern bzw. ANCA von WG-Patienten anhand eines Primatenmodells analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das gewählte Modell für die Charakterisierung geeignet ist, so dass Epitope zweier monoklonaler Antikörper definiert werden konnten. Das Modell erlaubt aber auch Rückschlüsse auf pathogene Epitope der WG-Patienten. Dies ist für ein besseres Krankheitsverständnis unverzichtbar. Können weitere ANCA-Epitope identifiziert werden, so könnten spezielle PR3-Hybride in der Diagnostik eingesetzt werden. Es könnte z.B. aufgrund des Epitop-Spektrums von PR3-ANCA eine Krankheitsprognose gemacht oder sogar ein Rückfall vorhergesagt werden. Dadurch wäre eine bessere Betreuung der Patienten möglich. Therapien könnten gezielt auf das ANCA-Repertoire abgestimmt werden, so dass Rückfälle minimiert oder sogar verhindert werden könnten.

Im weiteren wurde gezeigt, dass der physiologische Serinprotease-Inhibitor  $\alpha_1$ -PI eine wichtige Rolle bei der Bindung von Antikörpern an PR3 einnimmt. Geeignete dreidimensionale Strukturmodelle, die die  $\alpha_1$ -PI-Interaktionsfläche von PR3 berücksichtigen, könnten ANCA-bindende Epitope weiter eingrenzen. Die Generierung eines speziellen PR3-Moleküls könnte dann für die Neutralisation pathogener ANCA herangezogen werden. Auch könnte eine genaue Bestimmung der  $\alpha_1$ -PI-Konzentration während des Krankheitsverlaufs eine alternative Behandlungsmöglichkeit für Patienten eröffnen. Durch eine Therapie mit  $\alpha_1$ -PI würden auch hier Antikörper abgefangen und Entzündungsprozesse eingedämmt.

Rekombinante hPR3 könnte in diagnostischen ELISA-Tests eingesetzt werden und eine gleich bleibende Qualität und uneingeschränkte Verfügbarkeit des Antigens gewährleisten oder auch für Kristallisationsstudien herangezogen werden. Die Identifikation von Antikörperbindungsstellen wie es bereits für MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), einem Antigen bei der Multiplen Sklerose, gezeigt wurde [Breithaupt *et al.*, 2003], könnte die strukturelle Basis für Diagnostik und therapeutische Strategien liefern. Die Optimierung der Expressionsbedingungen sollte zu besseren Ausbeuten führen und die Aufreinigung erleichtern. Schließlich könnte das rekombinante Material für Kristallisationsstudien z.B. in Verbindung mit dem pathogenrelevanten Antikörper 12.8 eingesetzt werden.

---

## Teil II

# Charakterisierung einer myofibrillären Myopathie mit familiärer arrhythmogener rechtsventrikulärer Dysplasie

## Einleitung II

### 1. Myofibrilläre Myopathie (MFM)

Die myofibrilläre Myopathie (MFM) ist eine seltene Krankheit, deren Häufigkeit unbekannt ist. Es handelt sich hierbei um eine genetisch heterogene Gruppe chronischer Muskel-Funktionsstörungen mit einem gemeinsamen Phänotyp. MFM ist durch eine langsam fortschreitende Muskelschwäche und -atrophie gekennzeichnet. Hierbei ist die proximale und/oder distale Skelettmuskulatur betroffen. Der Beginn der Erkrankung erfolgt meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Die Diagnose erfolgt durch den Nachweis abnormer intrazellulärer Protein-Einschlüsse in einer Muskelbiopsie. Hierbei akkumulieren verschiedene Proteine in Form von zytoplasmatischen Einschlusskörpern [Wolburg *et al.*, 1982], granulofilamentösen Ablagerungen [Fardeau *et al.*, 1978] oder spheroiden Komplexen (Mallory-Körperchen) im Muskelgewebe [Fidzianska *et al.*, 1983].

MFM, auch Einschlußkörper-Myopathie oder Desmin-assoziierte Myopathie genannt, wurde in den 1970er und 1980er Jahren beschrieben [Goebel *et al.*, 1978; Kinoshita *et al.*, 1975; Nakashima *et al.*, 1970]. A. G. Engel (Mayo Clinic) führte später den Begriff der "myofibrillären Myopathie" ein, der für alle Formen pathologischer Muskelveränderungen mit Einschlüssen verwendet wird, die von den Z-Scheiben der Myofibrillen ausgehen und myofibrilläre Komponenten und Z-Scheiben-assoziierte Proteine enthalten [Selcen *et al.*, 2004].

Einige der MFM verursachenden Gene konnten aufgeklärt werden. Es wurden pathogene Mutationen im Desmin-, Alpha-B-Crystallin-, Myotilin-, ZASP- und Filamin-Gen gefunden (s. Tabelle 1). Für das Desmin-Gen sind 21 verschiedene Mutationen (Zusammenfassung in [Paulin & Li, 2004]) und ein autosomal-dominanter Erbgang beschrieben [Selcen *et al.*, 2004]. Im CRYAB-Gen wurden 3 Defekte gefunden [Selcen & Engel, 2003; Vicart *et al.*, 1998], für die Myotilinopathie sind Mutationen im Myotilin verantwortlich [Hauser *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2002; Selcen & Engel, 2004] und im ZASP-Gen konnten drei Mutationen identifiziert werden [Selcen & Engel, 2005]. In den meisten Fällen blieb allerdings die pathogene Mutation ungeklärt.



**Tabelle 1: Übersicht über die myofibrilläre Myopathie (MFM)**

Synonym	Locus	Protein/Gen	OMIM
Desminopathie	2q35	Desmin/DES	601419
Alpha-B Crystallinopathie	11q22.3-q23.1	Alpha-B Crystallinopathie/CRYAB	608810
Myotilinopathie	5q31	Myotilin/TTID	609200
ZASP-related	10q22.2-q23.3	Z-band alternatively spliced PDZ motiv containing protein/ZASP	609452
Filaminopathie	7q32	Filamin C/FLNC	609524

## 2. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD)

Bei arrhythmogener rechtsventrikulärer Dysplasie (ARVD) handelt sich um eine genetisch heterogene Gruppe von Kardiomyopathien, die sich durch eine fibrös-fettige Degeneration der rechtsventrikulären Kardiomyozyten auszeichnet. Dieser degenerative Prozess der Ventrikelwand schreitet von außen nach innen voran und ist in 25% der Fälle Ursache des plötzlichen Herztodes. Die Prävalenz innerhalb einer Population reicht von 1:2000 bis 1:5000, wobei Männer 3-mal mehr betroffen sind als Frauen. ARVD ist verantwortlich für 3-4% des plötzlichen Todes bei Sportlern und 5% plötzlichen Herztods bei Personen jünger als 65 Jahre [Thiene *et al.*, 1988], [Corrado *et al.*, 1990], [Peters *et al.*, 1999].

Verschiedene ARVD-Loci wurden bisher auf Chromosom 1, 2, 3, 6, 10, 12, 14, 17 und 18 beschrieben (s. Tabelle 2). Die Ätiologien der bisher 12 kartierten ARVDs sind in den letzten Jahren teilweise aufgeklärt worden. So scheint ARVD1 durch regulatorische Mutationen im TGFβ3-Gen ausgelöst zu werden. Die bisher publizierten Daten zur Überexpression von TGFβ3 beweisen jedoch nicht den Zusammenhang zwischen den beobachteten Mutationen in der nichttranslatierten mRNA-Region und der Erkrankung [Nattel & Schott, 2005]. ARVD2 wird durch Mutationen im Ryanodin-Rezeptor (RYR2), ARVD8 durch Defekte im Desmoplakin (DSP) und ARVD9 durch Mutationen im Plakophilin-2 (PKP2) verursacht. ARVD10 ist auf Mutationen im Desmoglein 2-Gens zurückzuführen [Syrris *et al.*, 2007] und bei ARVD11 ist das DSC2-Gen, welches für Desmocollin 2 kodiert, betroffen [Syrris *et al.*, 2006]. Hinzu kommt das komplexe Krankheitsbild der autosomal-rezessiven Naxos-Krankheit (ARVD12), die durch Plakoglobin-Mutationen (JUP) auf 17q21 zustande kommt [Ahmad, 2003].

**Tabelle 2: Übersicht über arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD)**

Synonym	Locus	Protein/Gen	OMIM
ARVD1	14q23-q24	TGFβ3/TGFB3	107970
ARVD2	1q42-q43	Ryanodin-Rezeptor/RYR2	600996
ARVD3	14q12-q22		602086
ARVD4	2q32.1-q32.2		602087
ARVD5	3p23		604400
ARVD6	10p14-p12		604401
ARVD7	10q22.3		609160
ARVD8	6p24	Desmoplakin/DSP	607450
ARVD9	12p11	Plakophilin/PKP2	609040
ARVD10	18q12.1-q12.	Desmoglein 2/DSG2	610193
ARVD11	18q12.1	Desmocollin 2/DSC2	610476
ARVD12	17q21	Junction Plakoglobin/JUP	611528

### 3. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Herzinsuffizienzen stellen eines der größten Gesundheitsprobleme unserer Zeit dar. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist mit einem Anteil von bis zu 30 % die am häufigsten vorkommende Form [Cowie *et al.*, 1997]. Die Prävalenz liegt Studien zufolge in den USA bei 36 von 100 000 Personen [Codd *et al.*, 1989]. Die DCM kann in jedem Alter auftreten. Dabei handelt es sich um eine Schwächung des Herzmuskels wobei es zu einer erheblichen Erweiterung der linken oder beider Herzkammern und einer Reduktion der linksventrikulären Pumpleistung (verminderte Ejektionsfraktion) und Reduzierung der Wanddicke kommt. Bei 25-30% aller DCM-Erkrankungen liegt eine genetische Ursache vor [Grunig *et al.*, 1998], größtenteils mit einem autosomal dominantem Erbgang. Aber auch autosomal rezessive, X-chromosomal gekoppelte und maternale Erbgänge, verursacht durch Mutationen der mitochondrialen DNA, wurden beschrieben [Mestroni *et al.*, 1999]. Eine Übersicht über DCM und die durch Mutationen betroffenen Gene liefert Tabelle 3.

**Tabelle 3: Übersicht über dilatative Kardiomyopathie (DCM)**

Synonym	Locus	Protein/Gen	OMIM
CMD1A	1q21.2, 11p11.2	Lamin A, C/LMNA	115200
CMD1B	9q13		600884
CMD1C	10q22-q23	ZASP, Cypher/LDB3	601493
CMD1D	1q32	Troponin T2/TNNT2	601494
CMD1E	3p	Sodium channel type V, alpha subunit/SCN5A	601154
CMD1G	2q31	Titin/TTN	604145
CMD1I	2q35	Desmin/DES	604765
CMD1J	6q23-q24	Eyes absent/EYA4	605362
CMD1L	5q33	$\delta$ -Sarcoglycan/SGCD	606685
CMD1M	11p15.1	Cystein- and glycine rich protein 3/CSRP3	607482
CMD1N	17q12	Telethonin/TCAP	607487
CMD1O	12p12.1	Sulfonylurea-Rezeptor 2/ABCC9	608569
CMD1P	6q22.1	Phospholamban/PLN	609909
CMD1R	15q14	$\alpha$ -Aktin/ACTC	102540
CMD1S	14q12	Myosin, schwere Kette 7/MYH7	160760
CMD1T	12q22	Thymopoietin/TMPO	188380
CMD1U	14q24.3	Presenilin 1/PSEN1	115200
CMD1V	1q31-q42	Presenilin 2/PSEN2	115200
CMD1W	10q22.1-q23	Metavinculin/VCL	611407
CMD1X	9q31	Fukutin/FKTN	611615

#### 4. Zielsetzung

In der hier untersuchten schwedischen Familie wurde MFM in Kombination mit ARVD diagnostiziert. Einige Personen entwickelten zusätzlich ein Myopathie des rechten Ventrikels. Die Ursache des autosomal-dominanten Erbgangs ist bis heute nicht geklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Locus durch einen genomweiten Screen bestätigt, maximal eingegrenzt und die Exons der Familie auf eine submikroskopische und intragenetische Deletion hin analysiert bzw. die Expression beider Allele in Muskel-cDNA untersucht werden.

---

## Ergebnisse II

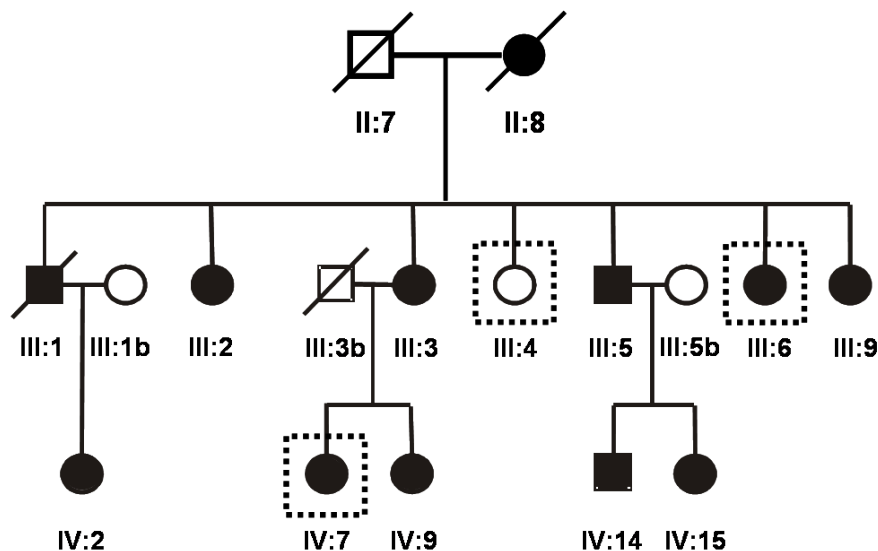
### 1. Phänotypische Charakterisierung der Familie mit MFM/ARVD

In der vorliegenden Arbeit wurde eine schwedische Familie bestehend aus 17 Mitgliedern in 3 Generationen untersucht (Abb. 1). Bereits 1999 diagnostizierten Mehlberg und Mitarbeiter [Melberg *et al.*, 1999] MFM in Kombination mit ARVD in dieser Familie. Allerdings konnte bis heute der autosomal-dominant vererbte Defekt nicht aufgeklärt werden.

Patienten dieser Familie leiden an Schwäche und Atrophie der distalen Gliedmaßen und axialen Rumpfmuskulatur. Drei Patienten (III:1, III:5 und IV:14) entwickelten zusätzlich eine Myopathie des rechten Ventrikels, Dilatation und Arrhythmie und erfüllten somit die Kriterien einer ARVD [McKenna *et al.*, 1994]. Erste klinische Symptome traten zwischen dem dritten bis sechsten Lebensjahrzent auf. Ausprägung der Krankheitssymptome und klinischer Verlauf variierte innerhalb der betroffenen Personen. Obwohl die Familie 17 Mitglieder aus drei Generation umfasst, konnte eine gesicherte Diagnose von MFM nur bei 10 Personen festgestellt werden, wobei ein Familienmitglied (III:4) im Alter von 69 Jahre keine klinischen Symptome zeigte und als gesund eingestuft wurde [Melberg *et al.*, 1999].

Die histopathologischen Untersuchungen erkrankter Skelettmuskulatur bei 7 Patienten zeigten fokale Veränderungen der Myofibrillen, Anhäufung von granulofilamentösem Material und/oder Proteinablagerungen wie Desmin, Dystrophin und  $\gamma$ -Sarcoglycan.

Ein Patient verstarb im Alter von 59 Jahren an Herzversagen. Untersuchungen des rechten Ventrikels zeigten eine Degeneration der Kardiomyocyten und stark fibrös-fettiges Gewebe. Da der Muskelphänotyp erst im späten Erwachsenenalter aber vor Vollendung des 60. Lebensjahres festgestellt wurde, ist für jüngere Familienmitglieder der klinische Status unbekannt.



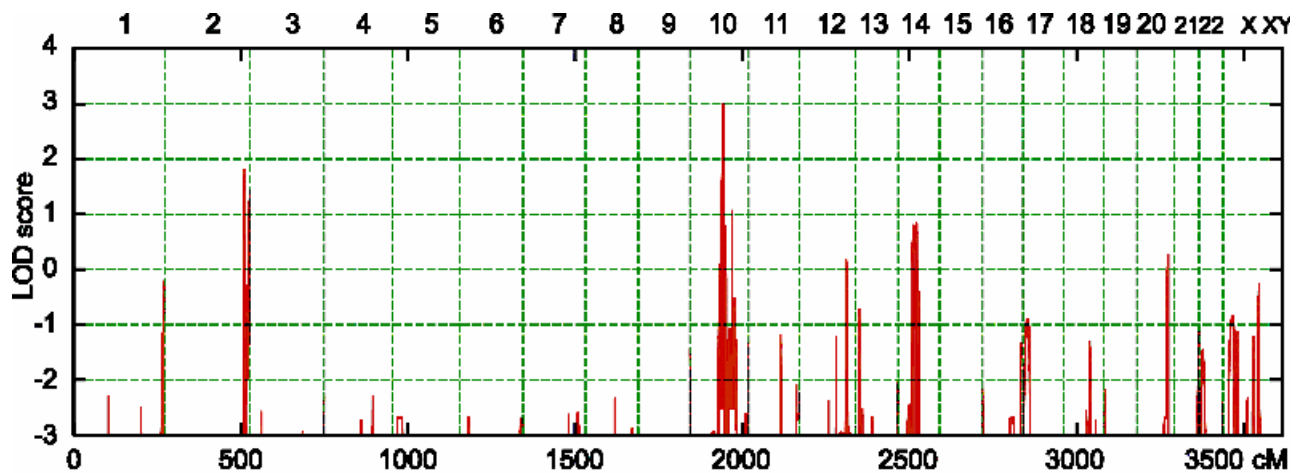
**Abb. 1: Stammbaum und klinischer Status der schwedischen Familie mit MFM/ARVD.** DNA von 13 der 17 Familienmitglieder wurden für die genomweite SNP-Typisierung verwendet. Der Phänotyp wird autosomal dominant vererbt. Ausgefüllte Symbole repräsentieren erkrankte Patienten. Offene Symbole stellen gesunde Individuen oder Individuen ohne gesicherte Diagnose dar. Bei III:4, III:6 und IV:7 (gestricheltes Quadrat) erfolgte die Diagnose auf Basis von klinischen Symptomen und Elektromyographie. Durchgestrichene Symbole zeigen Personen, für die keine DNA-Proben zugänglich waren. Kreise symbolisieren Frauen und Quadrate Männer. Eine gesunde Person (III:4) zeigte keine Symptome einer Myopathie im Alter von 69 Jahren und wurde in die Analyse mit einbezogen. Die histomorphologischen Daten von Patient III:6 waren nicht zugänglich bzw. bei einem Patienten (IV:7) mit axialer Muskelschwäche normal.

## 2. Genomtypisierung

Das Ziel einer Genomtypisierung ist die Kartierung eines Locus, der mit einem speziellen phänotypischen Merkmal segregiert. Die Analyse erfolgte mit DNA-Proben von acht klinisch kranken Individuen mit einer positiven Muskelhistologie (III:2, III:3, III:5, III:9, IV:2, IV:9, IV:14, IV:15), zwei kranken Personen, bei denen nur eine Veränderung im Elektromyogramm beobachtet wurde (III:6, IV:7) und der gesunden Person III:4. Zusätzlich wurden zwei gesunde Mitglieder (III:1b, III:5b), die durch Heirat eines Familienmitglieds dem Stammbaum zugeordnet wurden, analysiert.

Der Locus für MFM/ARVD auf Chromosom 10q22.3 konnte unter Verwendung des Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K Array durch genomweite SNP (*single nucleotide polymorphism*)-Typisierung verifizieren (LOD-Score 3.01) und auf ca. 4,4 Mbp eingengt werden (in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Nürnberg, Universität Köln). In Abb. 2 ist das Ergebnis der Typisierung gezeigt. Ein maximaler LOD-Score von 3.01 konnte nur für die Region 10q22.3 auf Chromosom 10 beobachtet werden. Zwei weitere Regionen auf Chromosom 2 und 14 zeigten erhöhte LOD-Scores, doch konnten

diese beiden Regionen durch weitere Analysen ausgeschlossen werden. Somit konnte eine eindeutige Kartierung der MFM/ARVD-Familie auf Chromosom 10q22.3 bestätigt werden.



*Abb. 2: Multipunkt-LOD-Score für den MFM/ARVD-Stammbaum und ihre chromosomale Position (dargestellt mit GeneHunter 2.1). Auf der y-Achse ist der entsprechende Score gezeigt. Jedes Fenster umfasst 90 nichtüberlappende SNPs. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Chromosomen (oben) bzw. die genaue genetische Position (unten) dargestellt.*

Mit Hilfe von Dinukleotidrepeat-Markern und SNPs konnte die kartierte Region weiter eingegrenzt werden. Der rekombinante Marker D10S1645 stellt das proximale Ende, der Marker D10S1786 die distale Grenze des Krankheitsintervalls dar. In diesem 4,1 Mbp-großen Intervall befinden sich insgesamt 17 funktionelle Gene und das erste Exon von Neuregulin-3 (Tabelle 4). Eine familiäre Form von dilatativer Kardiomyopathie, CMD1C (OMIM 601492) zeigte ebenfalls Kopplung mit dieser Region. Somit stimmen die beiden Krankheitsintervalle für CMD1C und MFM/ARVD7 über eine Strecke von 3,6 Mbp überein. Darin liegen insgesamt 17 gemeinsame Kandidaten-Gene. Es wird vermutet, dass es sich bei diesen zwei Krankheiten um allelische Varianten von Defekten im selben Gen handelt.

**Tabelle 4: Gen-Repertoire der Kandidatenregion 10q22.3**

Ref. ID	Humaner Genname, Alias	Exons	Maus-Homolog
NM_020338	ZMIZ1,RAI17,KIAA1224, ZIMP10 androgen receptor coactivator	21	NM_183208
NM_005729	PPIF, peptidylprolyl-isomerase	6	NM_134084 <sup>b</sup>
NM_153367	C10ORF56, AL049949, Zn-finger	4	BC003991
NM_006929	SFTPA2, SFTPA2B	4	NM_023134
NM_005411	SFTPA1 <sup>a</sup> , SFTPA1B	4	-
NM_003019	SFTPD	8	NM_009160
NM_025125	C10ORF57	4	NM_025311
NM_001012973	PLAC9, BC066348	4	NM_207229
NM_001157	ANXA11	15	NM_013469
NM_000429	MAT1A <sup>a</sup>	9	NM_133653 <sup>b</sup>
NM_138812	DYDC1 (testis, DPY-30 motif)	6	AK006511
NM_032372	DYDC2, MGC16186 (DPY30 motif)	3	AK016963
NM_032333	C10ORF58	5	AK017688
NM_030927	TSPAN14, DC-TM4F2	8	NM_145928
NM_207372	SH2D4B, AX776199, SHOCA1	9	AX776199
NM_001010848	NRG3	1	NM_008734
Gesamtanzahl kodierender Exons		111	

<sup>a</sup> pathogene Mutation im Menschen bekannt

<sup>b</sup> knockout-Maus publiziert

### 3. Screening der Kandidatengene auf Exondeletion

Nachdem die Protein-kodierenden Exons aller Gene im Krankheitsintervall sequenziert worden sind und dennoch keine signifikanten Abweichungen von der Normalpopulation aufgefallen waren, sollten intragenische Deletionen eines der kodierenden Exons ausgeschlossen werden.

Da genomische Deletionen oder Mutationen im Bereich der Primerbindungsstellen im betroffenen Haplotyp bei Exon-Amplifizierung der diploiden Gesamt-DNA nicht auffallen, wurden monochromosomale Hybridlinien für die beiden 10-er Homologe des Patienten IV:14 hergestellt (durchgeführt von Frau Dr. Kehrer-Sawatzki, Universität Ulm). Diese Hybridlinien (#1 und #38) enthalten nur die DNA des krankheitsassoziierten Chromosoms (#38) oder des nicht betroffenen Homologs (#1). Jedes Exon der Kandidatengene (s. Tabelle 4) wurde mit Exon-spezifischen Primern aus beiden Hybridlinien durch PCR amplifiziert und die Amplifikate miteinander verglichen. Sowohl Menge als auch Länge waren identisch, so dass eine intragenische Mikrodeletion im Bereich eines Exons mit hoher Wahrscheinlichkeit bei allen Genen ausgeschlossen werden konnte.

#### 4. Analyse der bi-allelichen Expression der Kandidatengene

Da eine Amplifizierung und Sequenzierung der 111 Exons sowohl mit Gesamt-DNA als auch mit den beiden Hybrid-Zelllinien #1 und #38 keinen Hinweis auf krankheitsrelevante Mutationen bzw. Deletionen lieferte, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei möglicherweise um einen regulatorischen Defekt handelt. Die Analyse solcher regulatorischen Defekte erfolgte zunächst auf Basis genomischer Patienten-DNA. Hier wurde nach SNPs im kodierenden Bereich der Kandidatengene gesucht. Da in diesen Abschnitten nur selten Basen-Polymorphismen vorzufinden waren, wurden auch weitere nichtkodierende Polymorphismen im 3'-nichttranslatierten Bereich (UTR, *untranslated region*) der jeweiligen Gene für diese Untersuchungen herangezogen. Das Ziel bestand zuletzt darin, die bi-alleliche Transkription möglichst aller Gene zumindest bei einem Patienten zu verifizieren. Dazu wurde aus Muskel-Biopsien der Patienten IV:7, IV:9 und IV:15 Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit entsprechenden Primern die jeweiligen SNPs mittels PCR amplifiziert (Tabelle 5). Um eine unspezifische Amplifikation von kontaminierender genomischer DNA zu verhindern, wurden die Primer so gewählt, dass ein Intron innerhalb des zu amplifizierenden Abschnitts lokalisiert war. In Abb. 3 ist die bi-alleliche Expression der jeweiligen Gene im Muskel gezeigt.

**Tabelle 5: Verwendete Primer für die SNP-Analyse von Muskel-cDNA der Kandidatengene**

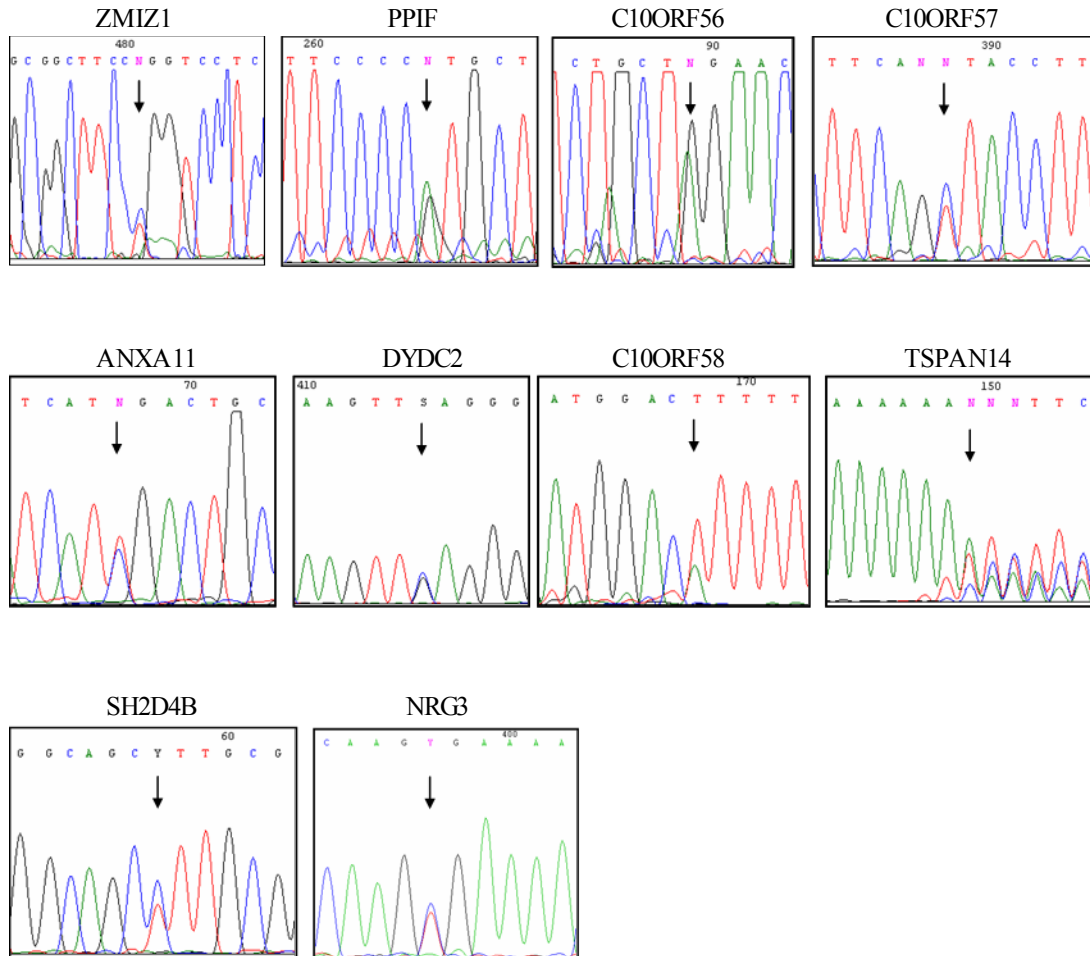
Genname	Primer-Name	Primer-Sequenz (5' → 3')	Patient	SNP
ZMIZ1	DJ3195U DJ3196L	AACCCCTCCTCAGCCTTAGA GGAAGAACCTTGGGGACACT	IV:15	rs2296422
PPIF	DJ2840U DJ2841L	GACCCACCACATTGCTTCCTA CAGCTCAAGTGAGGTTTGTTC	IV:9	rs7332
C10ORF56	DJ3149U DJ3150L	CAAGTGTCCCAAGTGCAAGA GAAACTGAGGCTGGAGATG	IV:15	rs4980069
C10ORF57	DJ3096U DJ3079L	GGCTGATTCATGTGGGAGAG AGGGCTAGTGTCCCCAGAAA	IV:7	nicht annotiert (3'-UTR)
ANXA11	DJ2869U DJ2870L	CCGAGGCACCATCACTGAT TGTCACGTTTGTGCTTTCA	IV:7	rs2228427
DYDC2	DJ3209U DJ3192L	GCCTCAAGGAAATGGAAATG GGAGTAGGCTGGAGAGTCCC	IV:15	rs1047952
C10ORF58	DJ3097U DJ2843L	GGCTGATTCATGTGGGAGAG ATTTTCCTGGTCATTTCAAACC	IV:9	rs8735
TSPAN14	DJ3098U DJ2849L	CGCGGAACATTTACATTGTG CCGCGTTTACCACTGAGATG	IV:7	rs11571658
SH2D4B	DJ3193U DJ3205L DJ3204U DJ3194L <sup>1</sup>	AAGGAGGCAGAGATCACCAA GTAGAGCTCCTTCGCCCTCT CGGAGAAGTGGAAAGTGGAG TCTGCTCTTCTCCTCGCTTC	IV:15	nicht annotiert (Exon 3)
NRG3	DJ3101U DJ3102L	TGTTGAAAGACCCCTGGACT CTGATTTGGCTGTGGGACTC	IV:9	rs2295933

U = upper (5'-Primer)

L = lower (3'-Primer)

<sup>1</sup>nested PCR





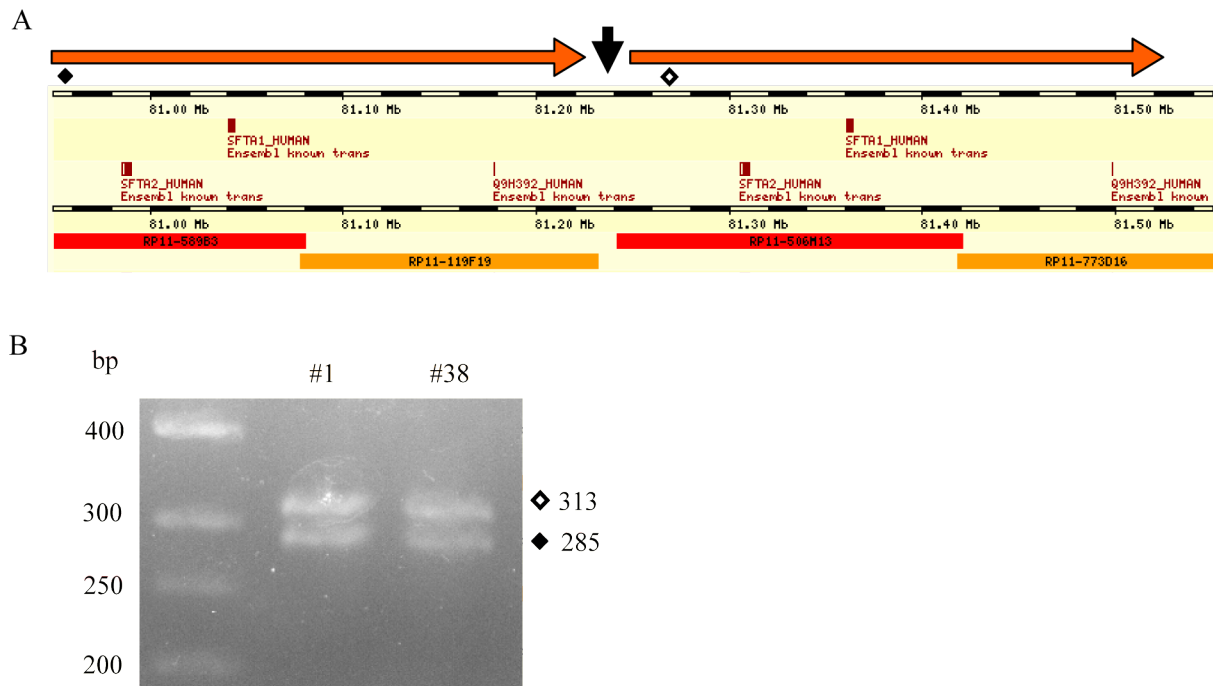
**Abb. 3: Bi-allele Expression der Kandidatengene in Muskel-RNA.** Amplifikation der SNPs der jeweiligen Gene mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung des Fragments zeigt die bi-alleliche Expression der Kandidatengene in Patienten-Muskel-cDNA. Die heterozygoten Basen der jeweiligen Transkripte sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

## 5. Analyse von ZASP, Myotilin, Metavinculin und SFTPA

Mutationen im ZASP-Gen und im zweiten Exon des Myotilin-Gens wurden bereits für MFM-Patienten beschrieben [Selcen & Engel, 2005] und ein Zusammenhang zwischen DCM und dem Metavinculin-spezifischen Exon 20, einem weiteren Gen auf Chromosom 10, gezeigt [Olson *et al.*, 2002]. Um auch diese Möglichkeit auszuschließen, obwohl sie außerhalb des kartierten Bereichs liegen, wurden die jeweiligen kodierenden Exons sequenziert. Eine krankheitsassoziierte Mutation innerhalb der drei Gene konnte nicht detektiert werden und kann somit als pathogene Ursache ausgeschlossen werden.

Bei weiteren Untersuchungen der Genomsequenz des humanen Chromosom 10 fiel eine Lücke in der Mitte des Krankheitsintervalls zwischen den BAC-Klonen AL132656 und AC068139 auf. Diese Lücke ist vermutlich sehr klein (10 kb) [Deloukas *et al.*, 2004] und liegt zwischen zwei hoch konservierten Tandem-Kopien von mehr als 300 kb Länge. Jede Kopie enthält zwei Kopien für die Surfactant-Proteine SFTPA1 und SFTPA2. Ein Vergleich des humanen, Hunde-, Ratten- und Maus-Genoms ergab, dass die Gene in dieser Region ursprünglich eine einfachere Anordnung hatten. Im Hunde-Genom befindet sich nur eine einzige Kopie der SFTPA. Somit scheint die Duplikation des ursprünglichen Gens während der Säugarentwicklung in zwei Stufen erfolgt zu sein. Im ersten Schritt entstanden die beiden ursprünglichen Surfactant-Proteine (SFPA1 und SFTPA2) durch eine segmentale Inversion. Im zweiten Schritt wurde dieser Tandem-Repeat vollständig dupliziert und es entstand die heutige Genanordnung (SFTPA1,SFTPA2, SFTPA1B, SFTPA2B).

Ein Längenunterschied zwischen den beiden Duplikons wurden genutzt, um eine potentielle intrachromosomale Deletion durch Rekombination dieser Kopien auszuschließen. Hierzu wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer DJ3044 (5'-GGGAAATCCACAGYGACTTA-3') und DJ3045 (5'-GTGCTTCACATCCCCTCATC-3') und der monochromosomalen Hypbridlinien #1 bzw. #38 das entsprechende Fragment amplifiziert. Sowohl der 313 bp als auch der 285 bp lange DNA-Abschnitt konnten amplifiziert werden, wobei mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Dublikon-Deletion durch ungleiches Cross-over ausgeschlossen werden kann.



**Abb. 4: Analyse der SFTPA-Region auf Chromosom 10.** (A) Die Region mit der 300 kb Tandem-Duplikation der SFTPA-Gene A1 und A2 weist eine Lücke in der Genom-Sequenz auf (vertikaler Pfeil). Längenunterschiede zwischen den beiden Duplikons (horizontale Pfeile) wurde genutzt, um eine potentielle intrachromosomale Deletion durch Rekombination dieser Kopien, auszuschließen. (B) Die DNA-Fragment für die beiden monochromosomalen Hybrizelllinien #1 (gesunder Haplotyp) und #38 (kranker Haplotyp) resultierend aus der PCR mit DJ3044/DJ3045 sind identisch. Das schließt eine größere Deletion im Bereich des SFTPA-Genoms aus. Die Position der PCR-Produkte sind durch Rechtecke (offen und ausgefüllt) in (A) und (B) gekennzeichnet. Die DNA wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

## Diskussion II

Vor einigen Jahren wurde auf 10q22.3 des Chromosom 10 die Ursache für MFM in Kombination mit ARVD bei einer schwedischen Familie vermutet [Melberg *et al.*, 1999]. Diese ARVD wird als der siebte ARVD-Locus (ARVD7) in der OMIM-Datenbank (609160) aufgeführt und kartiert in der selben Region wie CMD1C, eine familiäre Form dilatativer Kardiomyopathie [Bowles *et al.*, 1996]. Es wurde vermutet, dass ARVD7 und CMD1C durch unterschiedliche Defekte im selben Gen verursacht werden könnten [Bowles *et al.*, 2000]. In der vorliegenden Arbeit wurde die genomweite Kartierung dieser Familie mit MFM/ARVD7 erstmals durchgeführt. Für die Analyse wurden 11 Familienmitglieder herangezogen: eine gesunde Person im Alter von über 69 Jahren (III:4), acht Patienten mit einer positiven Muskelhistologie und einem pathologischen Elektromyogramm und zwei Patienten (III:6, IV:7), die nur ein auffälliges Elektromyogramm aufwiesen. Von Patient III:6 lag zum Zeitpunkt der Analyse keine Muskelbiopsie vor bzw. war bei Patient IV:7 unauffällig. Die krankheitsrelevante Region 10q22.3 konnte hierbei mit einem LOD-Score von 3.01 bestätigt werden.

Da eine Analyse der Kandidatengene im Krankheitsintervall keine Mutation zeigte, wurde im folgenden nach einer intragenischen Deletion gesucht. Hierbei wurden monochromosomale Hybridlinien für die beiden 10-er Homologe des Patienten IV:14 hergestellt und die Sequenzierung der kodierenden Exons wiederholt. Auch hier zeigte sich keine Abweichung zur Normalpopulation wodurch eine Deletion ausgeschlossen werden konnte.

Da die Region für CMD1C größer ist als der hier kartierte Bereich, müssen für die CMD1C-Patienten weitere Gene in Betracht gezogen werden. Bei CMD1C ist der proximale Bereich größer. In diesem Abschnitt sind vier Gene (KCMA1, DLG5, POLR3A und RPS24) zu finden, die als zusätzlicher Grund für CMD1C in Frage kommen. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass CMD1C und ARVD7 durch genetische Defekte im selben Gen ausgelöst werden. Klinische Symptome innerhalb der Familien sind auf Muskelgewebe, Kardiomyocyten in der einen Familie und Herz- und Skelettmuskulatur in der anderen Familie beschränkt. Die Symptome sind relativ mild und treten erst im späten Erwachsenenalter auf. Eine Vielzahl von Beispielen ist bereits bekannt, bei denen eine Mutation im selben Gen (z.B. Desmin, Myotilin, ZASP) zu unterschiedlichen Phänotypen wie Desmin-abhängige Myopathie, dilatative Kardiomyopathie oder ARVD, führt.

Da weder eine Exon-Mutation noch eine Exon-Deletion innerhalb der Familie beobachtet wurde, liegt es nahe anzunehmen, dass ein regulatorischer Defekt innerhalb eines Gens zu pathogenen Effekten führt. Für die Analyse regulatorischer Sequenzen oder funktioneller Elemente im Promotor-Bereich der Kandidatengene von ARVD7 und CMD1C, wurde ein indirekter Ansatz gewählt, der es ermöglicht, verschiedene Insertionen, Gen-Umordnungen oder -Veränderungen zu bestimmen. Splicing-Anomalie führen oft zu einer Verschiebung des Leserahmens, welches den Abbau der RNA des veränderten Allels

zur Folge hat (*nonsense-mediated RNA decay*). Auch können Mutationen im Promotorbereich die Transkription verhindern bzw. zur Überexpression führen. Beides führt zu einem Ungleichgewicht in der transkribierten RNA. Daher liefert der Nachweis der bi-allelischen Expression der Kandidatengene im Muskel einen ersten wichtigen Hinweis auf mögliche Mutationen. In 10 Genen war es möglich SNPs nachzuweisen und deren normale Expression im Muskel zu zeigen.

Fünf Kandidatengene, kodierend für die Proteine SFTPA1, SFTPA1B, SFTPA2, SFTPA2B und SFTPD [Deloukas *et al.*, 2004], werden ausschließlich in der Lunge und im respiratorischen Trakt exprimiert. Dort fungieren sie als sekretorische Proteine und stellen Komponenten des Surfactant-Proteolipid-Komplexes dar. Sie besitzen außerdem eine antimikrobielle Funktion und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Nach heutigem Stand der wissenschaftlichen Forschung ist es auszuschließen, dass Mutationen innerhalb dieser fünf Gene zu einer Erkrankung des Muskels führen, wie sie in der hier untersuchten Familie auftritt. SFTPA1-Mutationen führen zu akuter Atemnot (OMIM 267450) und idiopathischer Lungenfibrose (OMIM 178500). Auch MAT1A und DYDC1 sind keine muskelspezifischen Proteine. MAT1A wird ausschließlich in der Leber, DYDC1 im Hoden (GNF SymAtlas, [www.gnf.org](http://www.gnf.org)) exprimiert. Mutationen im MAT1A-Gen führen zu einer Hypermethioninämie im Plasma und schädigt weder Herz- noch Skelett-Muskulatur. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese gewebespezifischen Proteine die Ursache für MFM/ARVD7 in der hier untersuchten schwedischen Familie sind.

Zusätzlich wurden die beiden Kandidatengene ZASP und Metavinculin analysiert [Olson *et al.*, 2002], obwohl diese außerhalb der 10q22-Region liegen. Für ZASP sind Mutationen sowohl bei MFM (16%) als auch DCM-Patienten beschrieben worden [Arimura *et al.*, 2004; Selcen & Engel, 2005; Vatta *et al.*, 2003]. Daher stellt dieses Gen eines der plausibelsten Kandidaten dar. Dennoch war, wie zu erwarten, das Ergebnis der Sequenzierung der entsprechenden Exons negativ.

In der vorliegenden Arbeit konnte innerhalb der Familie weder eine pathogene Mutation noch eine Exondeletion oder Defekte in der Expression innerhalb eines der Kandidatengene festgestellt werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine ungewöhnliche Mutation in einer regulatorischen Sequenz der Grund für die langsame Degeneration von Myocyten ist. Um den pathogenen Mechanismus aufzuklären, ist die genomweite Kartierung weiterer Familien mit MFM, ARVD oder DCM notwendig. Familien, deren Defekt in die hier identifizierten Region fällt, könnten zur Klärung der genetischen Krankheitsursache beitragen.

# Material

## 1. Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia, New England Biolabs (NEB), Corning, GibcoBRL, Dianova, Difco, Fluka, Invitrogen, Merck, Millipore, MWG Biotech, Novagen, Promega, Qiagen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Restriktionsenzyme von New England Biolabs (NEB) bezogen. Weitere Bezugsquellen sind im einzelnen in der Methodenbeschreibung aufgeführt.

## 2. Geräte

Autoklav	Varioklav, H+P Labortechnik
Begasungsschrank	BBD6220, Heraeus
Brutschrank	Jouan
	Incucell, MMM Medcenter
Computer	
Hardware	ThinSTAR Terminal, NCD Pentium PC, verschiedene
Software	Windows NT 4.0, Microsoft Windows CE, Microsoft Microsoft office, Microsoft Adobe Illustrator, Adobe DeepView/Swiss-Pdb Viewer v3.7, GlaxoSmithKline
Elektrophoresekammern/Netzgeräte	Bio-Rad, Amersham-Pharmacia, institutseigene Werkstatt
Elektroblotter	Biometra
Filme Hyperfilm ECL	Amersham-Pharmacia
Filmentwickler X-Omat M35	Kodak
FPLC	ÄKTaprime, Amersham-Pharmacia
Geldokumentationsanlage	Image Master VDS, Amersham-Pharmacia
Heizblöcke Thermomixer 5436	Eppendorf
Kühlinkubator	Frigomix U2, Braun
Lyophilisator	LYOVAC GT 2, Leybold

Magnetrührer	MR3003, Heidolph
Mikroskop	Axioplan, Zeiss
Mikrotiterplatten-Lesegerät	VICTOR <sup>2</sup> 1420 Multilabel counter, PerkinElmer FLUOStar Optima, BMG Labtech
Mikrowellenofen	Micromat, AEG
PCR-Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra
pH-Meßgerät	pH 537, WTW
Schüttelinkubatoren	HT, Infors
Spektrophotometer	BioPhotometer, Eppendorf UV-160A, Shimadzu
Sterilbank	LaminAir HB 2472S, Heraeus
Schüttler	130 basic, IKA KS 260 basic, IKA KS
Ultraschallgenerator	Sonifier 450, Branson
Ultrafiltrationsgerät	Pellicon-2, Millipore
Waagen	PM 4800 Delta Range, Mettler 2001 MP2, Sartorius
Wasserbadinkubator	MA6, Lauda
Zentrifugen	5417R, Eppendorf 5417C, Eppendorf RC-5C Plus, Sorvall Evolution RC, Sorvall L8-70M Ultracentrifuge, Beckman Varifuge 3.0R, Heraeus

### 3. Bakterienstämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>
DH5 $\alpha$ ,mK+)	F-, $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 <i>recA1</i> , <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK- <i>supE44</i> $\lambda$ -, <i>tfi-1</i> <i>gyrA</i> <i>relA1</i>
BL21 (DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)
B834 (DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>met</i> (DE3)
Rosetta 2 (DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pRARE2
Origami 2 (DE3) <i>rpsL</i>	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 $\Delta$ <i>lacX74</i> $\Delta$ <i>phoA</i> <i>PvuII</i> <i>phoR</i> <i>araD139</i> <i>ahpC</i> <i>galE</i> <i>galk</i> F'[lac+ <i>lacI</i> <i>q pro</i> ] (DE3) <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i> pLacI (Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )
CC4	MC4100 <i>tig::kan</i>

#### 4. Zelllinien

<u>Linie</u>	<u>ATCC Nummer</u>	<u>Herkunft</u>
Flp-in 293	CRL-1573	Humane embryonale Nierenzellen
High Five (BTI-Tn-5B1-4)		Ovarzellen aus <i>Trichoplusia ni</i> (Kohlspannerraupe)

#### 5. Plasmide und Vektoren

<u>Plasmid</u>	<u>Herkunft</u>
pET24c(+)	Novagen
pET21c(+)	Novagen
pET39b(+)	Novagen
pCS19	Dr. Michael Ehrmann, Universität Cardiff, England
pCC6	Dr. Michael Ehrmann, Universität Cardiff, England
pcDNA5/FRT	Invitrogen
pOG44	Invitrogen
pIEx-5	Invitrogen
pIE-1	Cytostore

#### 6. Oligonukleotide

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5`-3`)</u>
DJ1990	TGCCCGACATATGGAAATCGTGGGCGGTCACGA
DJ1991	GCGAATTCTTAACGCAGGGTAGAACGGATCCAGTCCAC
DJ2826	CTCATCCAGCTGAGCCGCAAAGCCAAACTC
DJ2827	TGCTAGCCATATGAAACATCATCATCACCACCACATGAAAATC
DJ2924	TGCGGAGATCGTGGGCGG
DJ2929	GGAACGGATCCAGTCCACGTA
DJ3001	Pho-CATGAAACATCACCATCACCATCACGAAAACCTGTACTTC CA
DJ3002	Pho-GATCTGGAAGTACAGGTTTTTCGTGATGGTGATGGTGATG TTT
DJ3035	CTAGCCGGTCTCAGATCGTGGGCGGTCACGA
DJ3062	GTCCCGAAGCTTATTAGTGATGGTGATGGTGATGCACGTGAC GCAGGGTAGAACGGATCCA



<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5'-3')</u>
DJ3071	TGCCCCGACATATGAAAATCGTGGGGCGGGCACGAGGCG
DJ3072	TGCCCCGACATATGAAAGCGAAAGCTAAAGCGAAAATCGTGG GCGGGCACGAGGCG
DJ3073	TGCCCCGACATATGGATGACGATGACGACGACAAAATCGTG GGCGGGCACGAGGCG
DJ3103	GGGGGTACCGATGACGACGACAAAATCGTG
DJ3112	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
DJ3116	GTCCATGTGCTGGCGTTC
DJ3117	AGAATGCGGCCGCACTATGTACAAGCTCACAG
DJ3118	CGGACTAGTGGTTCCGATGACGACGACAAG
DJ3151	GTGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACA TGGACAGCGGAAGCGGTGGACAC
DJ3152	GTGTCCACCGCTTCCGCTGTCCATGTGCTGGCGTTCGAATT TAGCAGCAGCGGTTTCTTTTAC
DJ3153	TGGACACGTGGATGACGACGACAAAATCGTGGGCGGTTCAC GAGGC
DJ3156	CCCCACCGGTTTTTCAGGGTAGAACGGATCCA

Verwendung der Primer s. Methoden-Teil, Kap. 1.13

## 7. Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Antigen</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Firma</u>
12.8	hPR3	Maus	Sanquin, Niederlande
MCPR3-2	hPR3	Maus	NeoMarkers, USA
1B10, 1F11, 2F1, 2E1, 1F10	hPR3	Maus	HyTest, Finnland
4A5	hPR3	Maus	Wieslab, Schweden
S-Protein-HRP	S-Tag		Novagen
anti-His <sub>6</sub> -HRP	poly-Histidin	Maus	Sigma, Deutschland
IgG-Isotyp-Kontrolle	Trinitrophenol	Maus	BD Biosciences
Anti-Maus-IgG-AP	Maus-IgG	Ziege	Sigma, Deutschland
Anti-Human-IgG-AP	Human-IgG	Kaninchen	Utecht&Lüdemann GmbH, Deutschland

# Methoden

## 1. Molekularbiologische Methoden

### 1.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Präparationen kleinen Maßstabs (Minipräparationen, max. 5 ml Kulturvolumen) wurden mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit, Präparationen großen Maßstabs (Maxipräparationen, 400-500 ml Kulturvolumen) mit dem Qiagen® Plasmid Maxi Kit und zugehörigem Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt.

### 1.2 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Zur Klonierung der in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte wurden PfuTurbo-DNA Polymerase (Stratagene) und die vom Hersteller mitgelieferten Puffer unter folgenden Reaktionsbedingungen verwendet.

50 ng template DNA  
 5 µl 10 x Pfu-Puffer  
 5 µl 2 mM dNTP-Mix  
 10 µM forward Primer  
 10 µM reverse Primer  
 2.5 U PfuTurbo-DNA Polymerase  
 ddH<sub>2</sub>O ad 50 µl

Die Reaktion durchlief in einem Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra) folgende Schleifen:

Denaturierung	95°C, 2 min	
Denaturierung	95°C, 30 sec	} 3 Zyklen (1. touchdown)
Annealing	primerspezifische Annealingtemperatur + 4°C, 30 sec	
Elongation	72°C, 1 min/kb	
Denaturierung	95°C, 45 sec	} 3 Zyklen (2. touchdown)
Annealing	primerspezifische Annealingtemperatur + 2°C, 30 sec	
Elongation	72°C, 1 min/kb	
Denaturierung	95°C, 45 sec	} 28 Zyklen
Annealing	primerspezifische Annealingtemperatur	
Elongation	72°C, 1 min/kb	
Elongation	72°C, 10 min	
Abkühlen auf 4°C		

Die sogenannten "touchdown"-Zyklen erhöhen die Spezifität einer Amplifizierungsreaktion, da in den initialen Zyklen durch allmähliches Annähern an die spezifische Annealing-Temperatur der Primer nur Sequenzen mit größtmöglicher Homologie erkannt werden.

### 1.3 RNA-Isolierung aus Muskelzellen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Muskelzellen wurden von der Muskel-Biopsie 10µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Trizol-Reagenz, das zuvor auf Raumtemperatur gebracht wurde, resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt, durch kräftiges Schütteln gemischt und nach weiteren 2-3 min Inkubation für 15 min bei 11 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine Trennung der Phasen deutlich zu erkennen. Die obere, wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA besser sichtbar zu machen, wurde je 1 µl Glycogen hinzugefügt. Zum Präzipitieren der RNA wurden 250 µl 2-Propanol (Isopropanol) zugegeben und nach kräftigem Schütteln für 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 11 000 rpm bei 4°C wurde der Überstand vollständig abgenommen. Zum Waschen der RNA wurden 500 µl 75% Ethanol hinzugefügt, nach kurzem Vortexen für 5 min bei 7000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Nach Trocknen der RNA für 5-10 min wurde diese in 10 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und anschließend durch 10 minütiges Erhitzen auf 55-60°C vollständig gelöst. Die RNA wurde entweder bei -80°C gelagert oder sofort in cDNA umgeschrieben.

### 1.4 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Reverse Transkriptasen (RT) ermöglichen die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA). Die hier verwendete Transkriptase stammt aus dem „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MLV, Promega). Es handelt sich hierbei um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die für die Synthese von cDNA aus mRNA eingesetzt wird. Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer bzw. Primer (hier Oligo-dT-Primer, Promega) verwendet. Zu 2 µg RNA wurden 1 µg Oligo-dT-Primer gegeben und für 5 min auf 70°C erhitzt. Um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern, wurde der Ansatz danach sofort auf Eis abgekühlt. Folgende Komponenten wurden anschließend dem Reaktionsansatz zugefügt:

5 µl 5 x M-MLV-Puffer  
10 mM dNTP-Mix  
200 U M-MLV RT  
ddH<sub>2</sub>O ad 25 µl

---

Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 42°C inkubiert. Die cDNA wurde ohne weitere Aufreinigung für PCR-Reaktionen eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C

### 1.5 DNA-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA erfolgte nach Standardprotokollen [Sambrook *et al.*, 1989]. Die Konzentration der eingesetzten Restriktionsenzyme wurde aus der spezifischen Aktivität des Enzyms unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer errechnet. 1 U entspricht der Enzymmenge, die in einer Stunde unter optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg λ-DNA schneidet. In der Regel wurde je nach Stabilität und unspezifischer Aktivität (star activity) des jeweiligen Enzyms das 2- bis 5-fache der errechneten Menge eingesetzt. Die Endkonzentration des Enzyms betrug wegen der inhibitorischen Wirkung des im Enzymlagerpuffers verwendeten Glycerins nicht mehr als 1/10 des Reaktionsvolumens. Bei Doppelrestriktionsverdau wurde, sofern kein Konsensuspuffer laut Herstellerangaben verwendet werden konnte, zwischen dem ersten und zweiten Restriktionsverdau die DNA über den QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Nach erfolgter Restriktionsspaltung wurde die DNA über Gelextraktion und dem QIAquick® Gel Extraktion Kit (Qiagen) aufgereinigt. Erfolgte keine Aufreinigung über Agarose-Gelelektrophorese, wurde auch hier die DNA unter Verwendung des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) und des zugehörigen Protokolls aufgereinigt.

### 1.6 Dephosphorylierung von DNA am 5'-Ende

Um eine Religation von restriktionsverdaulichem Plasmid während der Ligationsreaktion zu vermeiden, wurde am 5'-Ende der DNA die Phosphatgruppe entfernt. Zu 1-2 µg DNA wurden 2-3 U alkalische Phosphatase (USB) mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern versetzt und anschließend mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) und zugehörigem Protokoll aufgereinigt.

### 1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit dem Spektrophotometer „BioPhotometer“ (Eppendorf) bestimmt.

## 1.8 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA nach Molekulargewicht erfolgte in horizontalen Agarosegelen unter Verwendung von TAE und Ethidiumbromid nach einem Standardprotokoll [Sambrook *et al.*, 1989]. Die Größenbestimmung wurde unter UV-Licht anhand eines Molekulargewichtsstandards (1 kb-DNA Leiter, 50 bp-DNA Leiter, Peqlab) durchgeführt.

50 x TAE	242 g Tris
	57.1 ml Essigsäure
	100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
	ad 1 l H <sub>2</sub> O
Ethidiumbromidlösung	1 mg/ml
10 x DNA-Auftragspuffer	0.25 % Bromphenolblau
	0.25 % Xylencyanol
	50 % Glycerin

## 1.9 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Elution und Reinigung der DNA erfolgte unter Verwendung des .QIAquick® Gel Extraction Kit und des zugehörigen Protokolls der Firma Qiagen.

## 1.10 Ligation von DNA-Fragmente

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte nach einem Standardprotokoll [Ausubel *et al.*, 1999]. Insertionsfragmente wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen vorbehandelt (s. 1.5). Der Klonierungsvektor wurde mit dem gleichen Restriktionsenzym geöffnet (nicht notwendig bei „blunt-end“-Klonierungen) und gereinigt. In einem 20 µl Ligationsansatz wurden 50 ng Vektor-DNA und ein 3- bis 5-facher molarer Überschuss an Insert-DNA unter Verwendung von 1 µl T4-Ligase und zugehörigem Puffer (NEB) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert. Für die anschließende CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation wurde der gesamte Ligationsansatz eingesetzt.

## 1.11 DNA-Transformation

### a) Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Eine *E. coli* Übernachtskultur (ÜNK) wurde zunächst in LB-Medium verdünnt ( $OD_{600nm} < 0,1$ ) und unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis eine  $OD_{600nm}$  von 0,375 erreicht wurde. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis und 10-minütigem Abzentrifugieren (3500 g, 4°C) wurde das Bakterienpellet in 1/5 Volumen eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert (3500 g, 4°C). Das Pellet wurde wieder in eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde noch einmal abzentrifugiert (3500 g, 10 min, 4°C) und in 1/10 Volumen eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Für die Lagerung der kompetenten Zellen bei -80°C wurden diese aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

CaCl <sub>2</sub> -Lösung	60 mM CaCl <sub>2</sub>
	15 % Glycerin
	10 mM PIPES (piperazine-N,N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid))
	pH 7.0 (steril filtrieren)

### b) CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation

100 µl kompetente Zellen wurden mit 10 ng Plasmid-DNA oder 20 µl Ligationsansatz gemischt, 45 min auf Eis inkubiert und anschließend für 2 min auf 42°C erwärmt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde die Suspension in 1 ml LB-Medium verdünnt und für 60 min bei 37°C, 200 rpm inkubiert. Nach kurzem abzentrifugieren (1700 g, 3 min) wurde das resuspendierte Bakterienpellet auf Selektions-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 1.12 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Produkten wurden von der Firma Medigenomix (Martinsried) bzw. durch den Sequenzierservice des MPI für Neurobiologie unter Verwendung von fluoreszenzfarbstoffmarkierten Nukleotiden nach Sanger durchgeführt [Sanger *et al.*, 1977].

### 1.13 Klonierung der Expressionskonstrukte

Name	Vektor	Restriktions-schnittstellen Vektor (5' / 3')	PCR-Template	Primer (5' / 3')	AT [°C]
pET24c-MKH <sub>6</sub> MK-hPR3	pET24c	NdeI / EcoRI	pET24c-MKH <sub>6</sub> ME-hPR3 (Heidrun Novak)	DJ2827/T7ter	56
pET21c-MKH <sub>6</sub> MK-hPR3	pET21c	NdeI / EcoRI	Subklonierung von pET24c-MKH <sub>6</sub> MK-hPR3 in pET21c	-	-
pET24c-MKH <sub>6</sub> MK-hPR3mt	pET24c	BlpI / BlnI	pET24c-MKH <sub>6</sub> MK-hPR3 (N156→K), Heidrun Novak	DJ2826/T7ter	52
pET21c-MKH <sub>6</sub> MK-hPR3mt	pET21c	NdeI / EcoRI	Subklonierung von pET24c-MKH <sub>6</sub> MK-hPR3mt in pET21c	-	-
pET24c-MKH <sub>6</sub> -gibPR3	pET24c	NdeI / EcoRI	1) Gibbon cDNA (aus Blut) 2) Gibbon-PCR Fragment aus 1)	DJ2924/DJ2929 DJ1990/DJ1991	52 50
pET24c-MK-hPR3-H <sub>6</sub>	pET24c	NdeI / HindIII	pCS19-Strep-IEPD-hPR3-H <sub>6</sub>	DJ3071/DJ3062	50
pET24c-MK(AK) <sub>3</sub> -hPR3-H <sub>6</sub>	pET24c	NdeI / HindIII	pCS19-Strep-IEPD-hPR3-H <sub>6</sub>	DJ3072/DJ3062	50
pET24c-MD <sub>6</sub> K-hPR3-H <sub>6</sub>	pET24c	NdeI / HindIII	pCS19-Strep-IEPD-hPR3-H <sub>6</sub>	DJ3073/DJ3062	45
pET39b-DsbA-H <sub>6</sub> -S-hPR3-H <sub>6</sub>	pET39b	KpnI / HindIII	pET24c-MD <sub>6</sub> K-hPR3-H <sub>6</sub>	DJ3103/DJ3062	45
pET39b-DsbA-hPR3-H <sub>6</sub>	pET39b	SpeI / HindIII	pET39b-DsbA-H <sub>6</sub> -S-hPR3-H <sub>6</sub>	DJ3118/DJ3062	50
pCS19-HisTEV	pCS19	NcoI / BglII	Oligo-duplex	DJ3001/DJ3002	-
pCS19-HisTEV-hPR3	pCS19-HisTEV	BglII / HindIII	pET21c-MKH <sub>6</sub> MK-hPR3, PCR-Produkt BsaI / HindIII	DJ3035/T7ter	58
pCS19-HisTEV-gibPR3	pCS19-HisTEV	BglII / HindIII	pET21c-MKH <sub>6</sub> MK-gibPR3, PCR-Produkt BsaI / HindIII	DJ3035/T7ter	58
pIEx5-S-hPR3-H <sub>6</sub>	pIEx5	Ecl136II / HindIII	Fragment aus pET39b-DsbA-H <sub>6</sub> -S-hPR3-H <sub>6</sub> , Scal / Hind III verdaut	-	-
pIE1-S-hPR3-H <sub>6</sub>	pIE1	NotI	pIEx5-S-hPR3-H <sub>6</sub>	DJ3117/DJ3116	58
pcDNA5/FRT/VKH <sub>6</sub> -hPR3	pcDNA5/FRT		Kai Kessenbrock	-	-
pcDNA5/FRT/S-VKH <sub>6</sub> -hPR3	pcDNA5/FRT/VKH <sub>6</sub> -hPR3	BmgBI	Oligo-Duplex	DJ3151/DJ3152	
pcDNA5/FRT-prohPR3-H <sub>6</sub>	pcDNA5/FRT/S-VKH <sub>6</sub> -hPR3	PmlI / AgeI	pET24c-MKH <sub>6</sub> MK-hPR3	DJ3153/DJ3156	55
pcDNA5/FRT-progibPR3-H <sub>6</sub>	pcDNA5/FRT/S-VKH <sub>6</sub> -hPR3	PmlI / AgeI	pET24c-MKH <sub>6</sub> -gibPR3	DJ3153/DJ3156	55
pcDNA5/FRT-prohum/gibPR3-H <sub>6</sub>	pcDNA5/FRT-pro-hPR3-H <sub>6</sub>	BlpI / AgeI	gibPR3-Fragment BlpI/AgeI	-	-
pcDNA5/FRT-progib/humPR3-H <sub>6</sub>	pcDNA5/FRT-pro-gibPR3-H <sub>6</sub>	BlpI / AgeI	hPR3-Fragment BlpI/AgeI	-	-
pcDNA5/FRT-progibPR3-H <sub>6</sub> /Epi128	pcDNA5/FRT-pro-gibPR3-H <sub>6</sub>	PmlI / BlnI	synthetisches Gen	-	-

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle hier aufgeführten Expressionskonstrukte im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

## 2. Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Rekombinante Proteinexpression von PR3 wurde in einem System der Firma Novagen durchgeführt. In diesem System wird eine konstitutive Expression des Zielgens während der Klonierung verhindert, indem die codierende Sequenz des zu exprimierenden Gens hinter den *T7lac*-Promotor des Klonierungsvektors (pET24c, pET21c) kloniert wird. Da für die Klonierung der Expressionskonstrukte ein Bakterienstamm ohne chromosomal oder episomal codierte T7-Polymerase verwendet wird (*E. coli* DH5 $\alpha$ ), kann eine negative Selektion aufgrund bakteriostatischer oder bakterizider Effekte des zu exprimierenden Proteins während der Klonierung ausgeschlossen werden. Die durch Sequenzierung ausgewählten Expressionskonstrukte wurden dann in einen *E. coli*-Expressionsstamm (z.B. B834 (DE3), BL21 (DE3), Rosetta, Origami) transformiert (LB-Agar-Platten inkl. entsprechender Antibiotika, 2% Glukose). In diesem Stamm steht die chromosomal kodierte T7-Polymerase aus dem lysogenen Bakteriophagen DE3 unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors. Konstitutive Expression wird hier durch Zugabe von 2% Glukose als Katabolitrepresor verhindert. 5 Transformandenkolonien wurden auf Expression des gewünschten Proteins getestet, indem eine ÜNK in LB-Medium (inkl. entsprechender Antibiotika und 2% Glukose) angelegt wurde. Die ÜNK wurde pelletiert, in LB-Medium resuspendiert und in 10 ml LB-Medium (inkl. entsprechender Antibiotika) inokuliert. Bei 37°C wurden die Kulturen bis OD<sub>600nm</sub> 0.8-1 angezogen und die Induktion der T7-Expression und damit die Expression des Zielgens durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Der Verlauf der Proteinexpression wurde durch stündliche Probenentnahme von je 50  $\mu$ l mittels SDS-PAGE/Silber- oder Coomassiefärbung überprüft und die optimale Inkubationszeit nach Induktion bestimmt. Dazu wurden die Proben kurz abzentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und mit Probenauftragspuffer versetzt. Die Proben wurden für 5 min auf 95°C erhitzt, abzentrifugiert (2 min, 18000 g) und auf einem 15% igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Für präparative Proteinexpressionen wurde eine ÜNK (1 l LB-Medium inkl. entsprechender Antibiotika, 2% Glukose) zentrifugiert (1700 g, 5 min) und in 10-12 l LB-Medium (inkl. entsprechender Antibiotika) resuspendiert. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C so lange geschüttelt, bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0.8-1 erreicht wurde. Die Expression des Zielgens erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG für 4-5 h. Wie die meisten zytoplasmatisch überexprimierten Proteine in *E. coli* lagen die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Proteine, sofern nicht anders angegeben, in Form von unlöslichen Aggregaten, sogenannten Einschlußkörperchen oder *inclusion bodies* (IB), vor. Diese konnten durch Zentrifugation aus dem Bakterienlysat aufgrund ihrer Masse und Hydrophobizität leicht isoliert und anschließend durch Waschen von bakteriellen Proteinen und Membranfragmenten gereinigt werden.



## 2.1 „Inclusion body“ (IB)-Präparation

Die Expressionskulturen wurden zentrifugiert (5000 g, 30 min) und anschließend einmal mit PBS pH 7.2 gewaschen. Die Bakterien wurden anschließend in 20 ml pro Liter Kulturvolumen Lysepuffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Bakterien mit Ultraschall für 20 min im Eiswasserbad bei 320 Watt aufgeschlossen. Das Bakterienlysate wurde nach Zugabe von 1/3 Volumen Waschpuffer 1 eine Stunde lang bei RT rotiert. Die unlöslichen Proteinaggregate wurden durch Zentrifugation (20000 g, 20 min, 4°C) abgetrennt und in Waschpuffer 1 unter Verwendung eines elektrischen Potters resuspendiert. Nach einstündiger Rotation wurde nochmals zentrifugiert und anschließend dieser Waschschrift einmal wiederholt, jedoch über 24 h ausgeführt. Zur Entfernung von Triton X-100 wurden die gleichen Waschschrift mit Waschpuffer 2 wiederholt. Das Zentrifugat wurde direkt solubilisiert oder bei -20°C gelagert.

Lysepuffer	50 mM Tris, pH 7.2 2 mM MgCl <sub>2</sub> 10 µg/ml DNase 1 mg/ml Lysozym
Waschpuffer 1	50 mM Tris, pH 7.2 60 mM EDTA 1.5 M NaCl 6 % Triton X-100
Waschpuffer 2	50 mM Tris, pH 7.2 60 mM EDTA

## 2.2 Solubilisierung der Inclusion Bodies (IB)

*Inclusion bodies* (IB) sind aggregierte Proteine mit teilweiser Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken. Vor einer Renaturierung müssen die Proteinmoleküle gelöst und monomerisiert vorliegen. Die Rückfaltung von PR3 stellt eine Kinetik erster Ordnung dar. Die Solubilisierung der Proteinaggregate wurde unter Verwendung von 6 M Guanidiniumchlorid (GdnHCl) durchgeführt. Das häufig eingesetzte Denaturierungsmittel Harnstoff wurde nicht verwendet, um eine Derivatisierung der Aminosäuren (Carbamylierung) zu vermeiden. Um Aggregation während der späteren Rückfaltung zu verhindern, wurde dem Solubilisierungspuffer das Redoxsystem GSSG-GSH (Glutathion in oxidierter und reduzierter Form) zugesetzt. Es führt zur Bildung gemischter Disulfide, die die Löslichkeit des Proteins während der Rückfaltung erhöhen. Die gereinigten Aggregate wurden in Solubilisierungspuffer (ca. 1-2 ml pro mg IB) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension im Eiswasserbad 20 min bei

320 Watt beschallt. Die Lösung wurde dann für 24 h bei RT rotiert, zentrifugiert (3500 g, 30 min) und der Überstand mit 1 M HCl auf pH 5.0 eingestellt. Die Entfernung von überschüssigem Glutathion und EDTA erfolgte durch dreimalige Dialyse für 24 h gegen das 50-fache Volumen Dialysepuffer bei 4°C. Die Lösung wurde schließlich filtriert (0.2 µm) und sofort für die Renaturierung eingesetzt bzw. bei -20°C gelagert.

Solubilisierungspuffer	6 M GdnHCl
	100 mM Tris, pH 8.0
	20 mM EDTA
	15 mM GSH (Glutathion, reduziert)
	150 mM GSSG (Glutathion, oxidiert)
Dialysepuffer	6 M GdnHCl

### 2.3 Renaturierung von solubilisiertem Protein

Die Renaturierung von solubilisiertem Protein erfolgte durch rasche Verdünnung im Renaturierungspuffer. Die geringe Proteinkonzentration im Rückfaltungspuffer minimiert die Aggregation von ungefalteten Molekülen und Faltungsintermediaten. Bei der *in vitro*-Faltung von Proteinen konkurrieren Fehlfaltung und Aggregation mit dem Prozeß der korrekten Faltung. Aggregation ist sowohl auf unspezifische, hydrophobe Interaktionen ungefalteter Proteine als auch auf Interaktionen partiell gefalteter Intermediate zurückzuführen. Im Gegensatz zur korrekten Faltung, die als monomolekularer Prozeß erster Ordnung abläuft, stellen Aggregationen Prozesse zweiter oder höherer Ordnung dar, die bei hohen Konzentrationen ungefalteter Proteine über die korrekte Faltung dominieren.

Die korrekte Faltung von Proteinase 3 schließt die Ausbildung von 4 Disulfidbrücken ein. Theoretisch gibt es für Proteine mit 8 Cysteinen 105 Möglichkeiten für die Formation von vier S-S-Brücken. Die korrekte native Möglichkeit ist dabei kinetisch durch ihre geringe freie Energie bevorzugt. Faltung unter gleichzeitiger Ausbildung von Disulfidbrücken wird häufig durch geringe Löslichkeit des denaturierten Proteins kompliziert und kann massive Aggregation in einer frühen Faltungsphase bedingen. Die Konkurrenz aus Faltung und Aggregation bei der Rückfaltung kann durch Einführung von gemischten Disulfiden während der Solubilisierung verringert (s. 2.2) und durch Zugabe von geringen Mengen Cystein als reduzierte Thiolkomponente mit geringem Molekulargewicht katalysiert werden. Zur Optimierung der Renaturierungsausbeuten für PR3 wurde neben Arginin, welches in der Literatur als empirisch gefundener Faltungsverstärker beschrieben ist, weitere Additiven in verschiedenen Konzentrationen getestet.

Um eine möglichst effiziente Rückfaltung zu gewährleisten, gleichzeitig aber Degradationsprozesse der

PR3 zu minimieren, wurde der Renaturierungspuffer auf ca. 15°C temperiert und das Proteinsolubilisat unter starkem Rühren dem Renaturierungspuffer (mind. 100-faches Volumen des Solubilisats) tropfenweise zugemischt. Die Proteinkonzentration im Rückfaltungspuffer betrug höchstens 10 µg/ml. Der Rückfaltungsansatz wurde ohne weitere Agitation über Nacht auf 4°C abgekühlt, anschließend auf ca. 1/10 Volumen durch Ultrafiltration bei 4°C eingeengt und sofort dialysiert. Die Ansätze wurden spektrophotometrisch quantifiziert und durch SDS-PAGE analysiert.

Renaturierungspuffer	50 mM Tris, pH 8 0.5 M Arginin 100 mM NaCl 20 mM CaCl <sub>2</sub> 10-15 mM CHAPS 0.5 mM Cystein
Dialysepuffer	50 mM Tris, pH7.5 100 mM NaCl

## 2.4 Aktivierung von PR3

Die Aktivierung von PR3 bezeichnet die Konvertierung der enzymatisch inaktiven Proform in die aktive reife Form. Dabei werden die N-terminalen Aminosäuren, die dem reifen und hochkonservierten N-Terminus in den verwendeten Expressiononstrukturen vorausgehen, abgespalten. Der nun neu generierte N-Terminus verlagert sich ins Innere des Proteins und das aktive Zentrum des Enzyms entsteht. Der Erfolg der Konvertierung wurde durch Messung der Aktivität von PR3 unter Verwendung eines PR3-spezifischen Substrats bestimmt.

### a) Cathepsin C

Cathepsin C ist eine Diaminopeptidase, die sequenziell und nicht sequenzspezifisch Dipeptide am N-Terminus von Proteinen abspaltet. Wie von Murakami und Mitarbeitern postuliert, können Serinproteasen auch ohne spezifische Stopsequenzen (Lys an Position 1 des Dipeptids, Pro an zweiter oder dritter Position) konvertiert werden, da der nach der Abspaltung des Peptids generierte N-Terminus Ile-16 eine Salzbrücke mit Asp-194 (Chymotrypsinogennumerierung) ausbildet. Dies verhindert eine weitere sukzessive Abspaltung von Dipeptiden [Murakami *et al.*, 1995].

Pro mg renaturierter proPR3 wurden 0.5 U Cathepsin C (Sigma) zugesetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Um eine Oxidation des aktiven Zentrums der Cysteinprotease Cathepsin C zu vermeiden, wurde die Reaktion in Anwesenheit von 1 mM Dithioerythritol (DTE) durchgeführt.

---

Cathepsin C-Konvertierungspuffer	50 mM Natriumacetat, pH5.5
	100 mM NaCl
	1 mM DTE

b) Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease

AcTEV-Protease (Invitrogen) ist eine Form der Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease. Sie zeichnet sich durch hohe Spezifität bzw. Aktivität aus und ist stabiler als native TEV-Protease. AcTEV erkennt die 7 Aminosäuren lange Sequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly und spaltet zwischen Gln und Gly. Die optimale Spaltungstemperatur liegt bei 30°C. Zu 5-15 µg proPR3 wurden 30 U AcTEV in TEV-Protease-Konvertierungspuffer gegeben und für 2 h bei 30°C inkubiert.

TEV-Protease Konvertierungspuffer	50 mM Tris, pH 8.0
	0.5 mM EDTA
	1 mM DTT

c) Enterokinase

Enterokinase ist eine Endopeptidase, die im Dünndarm das Proenzym Trypsinogen zu Trypsin konvertiert. Enterokinase erkennt das Pentapeptid (Asp)<sub>4</sub>-Lys, spaltet direkt nach der terminalen Carboxylgruppe der Erkennungssequenz und ermöglicht somit die Generierung eines nativen Aminoterminus von rekombinanten Proteinen. Auch werden fast alle Aminosäuren in der P1'-Position zugelassen [Collins-Racie *et al.*, 1995]. Das heterodimere Enzym besteht aus zwei Untereinheiten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die hier verwendete rekombinante humane Enterokinase (rEK) Tag•off™ High Activity rEK (Novagen) besteht nur aus der "leichten", katalytisch aktiven Untereinheit und zeichnet sich durch hohe Substrataffinität und daraus resultierender hoher spezifischer Aktivität aus.

1 mg proPR3 wurden mit 4 Units Tag•off™ High Activity rEK in rEK-Konvertierungspuffer versetzt und für ca. 16 h bei 17°C inkubiert.

Die Konvertierung von in Flp-in 293-Zellen exprimierter proPR3 erfolgte mit Rinderenterokinase (Roche). Diese besteht sowohl aus der "schweren" als auch der "leichten", katalytischen Untereinheit. Die Konvertierungsreaktion fand in einem Enzym zu Substrat Verhältnis von 1:20 (in µg) statt. Der Reaktionsansatz wurde für 20 h bei RT inkubiert.

rEK Konvertierungspuffer	20 mM Tris, pH7.4
	50 mM NaCl
	2 mM CaCl <sub>2</sub>

### 3. Rekombinante Proteinexpression in Insektenzellen

Rekombinante Proteinexpression in Insektenzellen ist ein sehr zeitaufwendiger Vorgang. Insektenzellen müssen mit Viren (Bakuloviren) infiziert werden. Die Herstellung und Vermehrung dieser rekombinanten Viren kann mehrere Wochen dauern. Zudem ist die Bakulovirus-vermittelte Proteinexpression ein lytisches System, d.h. die proteinexprimierenden Zellen lysieren nach erfolgreicher Virusinfektion. Dadurch ist die Etablierung von stabil exprimierenden Zelllinien nicht möglich.

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren (pIEx-5, pIE-1) erlauben eine schnelle Proteinexpression mit hohen Expressionsraten in transient transfizierten Insektenzellen ohne die zeitaufwendige Herstellung von rekombinanten Bakuloviren. Auch eine Etablierung von stabilen Zelllinien ist mit diesen Vektoren möglich. Die Transkription im pIEx-5 Vektor (Novagen) erfolgt über den IE1 (*immediate early*) Promotor. Zusammen mit dem am 5'-Ende des Promotors gelegene hr5 Element, einer Variante der *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus (BmNPV) homologen Region 3 (hr3), erfolgt die Initiation der Transkription. Das rekombinant exprimierte Protein besitzt ein AKH-Signalpeptid (*adipokinetic hormone signal peptide*) am N-Terminus, welches die Translokation in den Zellkulturüberstand ermöglicht und dabei durch eine Signalpeptidase abgespalten wird.

Der pIE-1 Vektor besitzt eine Expressionskassette, mit einem sehr starken, konstitutiven Promotoren, der vom Aktin A3 Gen von *Bombyx mori* stammt. Die Transkription vom Aktin-Promotor wird durch den Transkriptionsfaktor ie-1 (*immediate early transkription factor* von BmNPV) verstärkt.

#### 3.1 Kultivierung von High Five-Insektenzellen

Die hier verwendeten High Five Zellen (Hi5) sind Ovarzellen der Zelllinie BTI-TN-5B-1-4 und stammen ursprünglich aus der Kohlspannerraupe *Trichoplusia ni*.

Alle beschriebenen Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt. Verwendete Zellkulturmedien, lösliche Substanzen und Lösungen wurden durch steriles Abfüllen keimfrei gehalten, autoklaviert bzw. im Fall von hitzelabilen Reagenzien sterilfiltriert. Die adhärent wachsenden Hi5-Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 27°C in TC-100 Medium (Gibco) mit 5% FCS kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage vom Flaschenboden abgespült und im Verhältnis 1:5 gesplittet.

Medium

1 x TC-100 (Gibco)

5 % FCS (PAN), hitzeinaktiviert 56°C, 30 min

### 3.2 Einfrieren von High Five-Insektenzellen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben vom Flaschenboden abgelöst, zentrifugiert und wie unter 4.2 aufgeführt eingefroren.

### 3.3 Auftauen von High Five-Insektenzellen

Der Inhalt eines Kryoröhrchens wurde bei 37°C aufgetaut, mit frischem Medium verdünnt und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden für 2-3 Stunden im Brutschrank inkubiert bis zur vollständigen Adhäsion am Flaschenboden. Anschließend wurde das Medium zur Entfernung des DMSO gewechselt.

### 3.4 Transfektion von Insektenzellen

Für die Transfektion von Hi5-Zellen wurden diese mit einer Zelldichte von  $0.5 \times 10^5$  Zellen/Well in einer 24-Well-Platte in TC-100 Medium (Gibco) inkl. 5 % FCS ausgesät und bei 27°C für 16-20 h weiter kultiviert. Für die Transfektion der Insektenzellen mit den Plasmiden pIE<sub>x</sub>-5-S-D<sub>6</sub>K-hPR3-H<sub>6</sub> bzw. pIE-1-S-D<sub>6</sub>K-hPR3-H<sub>6</sub> wurde FuGene HD (Roche) verwendet. Zu 100 µl ddH<sub>2</sub>O wurden 2 µg Plasmid-DNA gegeben. Anschließend wurde die DNA-Lösung mit 2 µl FuGene HD versetzt, gemischt und bei RT für 15 min inkubiert. Pro Well wurden 25 µl Transfektionsansatz gegeben und die Zellen für weitere 2-6 Tage bei 27°C kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde für die Aufreinigung von prohPR3 bzw. Western-blot-Analysen verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde mit den Vektoren pIE<sub>x</sub>-β-Gal bzw. pIE-gfp detektiert.

## 4. Rekombinante Proteinexpression in 293-Zellen mit dem Flp-in System

Das Flp-in System von Invitrogen ermöglicht die Integration und Expression eines Gens in Säugerzellen an einer definierten, genomischen Lokalisation. Für die Generierung einer Flp-in Zelllinie wird eine "*Flp Recombination Target*"-Sequenz (FRT) in Kombination mit dem *lacZ*-Zeocin-Fusionsgen in das Genom der Säugerzellen eingebracht. Ein Expressionsvektor, der neben FRT-Regionen auch das zu exprimierende Gen enthält, wird anschließend in das Genom der Zelllinie über Flp Rekombinase-abhängige DNA-Rekombination der FRT-Sequenz integriert. Hierzu wird ein Expressionsvektor (pcDNA5/FRT) zusammen mit dem Flp-Rekombinase exprimierenden pOG44-Plasmid kotransfiziert. Flp-Rekombinase ermöglicht die Rekombination zwischen den FRT-Regionen der Zelllinie und des Expressionsvektors. Über den Expressionsvektor wird zusätzlich eine Hygromycin-Resistenzkassette in die Zellen eingebracht, die eine anschließende Selektion von transfizierten Zellen ermöglicht. Nach erfolgreicher Transfektion zeigen Flp-in Zellen keine β-Galaktosidaseaktivität und Zeocin-Resistenz

mehr, sind jedoch resistent gegenüber Hygromycin B. Da der Expressionsvektor an einer bestimmten Stelle in das Genom der Zelle integriert, kann durch polyklonale Selektion mit Hygromycin B schnell und effizient eine stabil exprimierende Zelllinie generiert werden. Weitere Informationen können über das Internet unter [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) bezogen werden.

#### 4.1 Kultivierung von Flp-in 293-Zellen

293 Zellen sind humane embryonale Adenovirus-transformierte Nierenepithelzellen, die adhären wachen. Flp-in 293 Zellen (Invitrogen) exprimieren stabil das *lacZ*-Zeocin-Fusionsgen und können für das Flp-in System verwendet werden. Diese Zelllinie besitzt eine einzelne, integrierte FRT-Region, ist Zeocin-resistent und zeichnet sich durch  $\beta$ -Galactosidaseaktivität aus.

Flp-in 293-Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 100% kultiviert. Bei einer Zellkonfluenz von ~ 80-90% wurden diese gesplittet. Dazu wurde das Medium der Zellkulturflasche entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin vom Untergrund der Zellkulturschale gelöst. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde Medium zugesetzt, um die Wirkung von Trypsin aufzuheben und irreparable Zellschäden zu verhindern. Die Zelllösung wurde anschließend im Verhältnis 1:5 bis 1:10 in neue Zellkulturflaschen verdünnt und im vorgelegten Medium gleichmäßig verteilt.

Medium	1 x DMEM (Gibco)
	10 % FCS (PAN), hitzeinaktiviert 56°C, 30 min
	100 µg/ml Zeocin

#### 4.2 Einfrieren von Flp-in 293-Zellen

Zur Lagerung von Flp-in 293 Zellen wurden diese eingefroren. Hierzu wurden Zellen wie oben beschrieben vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, zentrifugiert (250 g, 5 min) und das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert. Die Zelllösung wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium	90 % FCS
	10 % DMSO

### 4.3 Transfektion von Flp-in 293 Zellen

Für die Transfektion von Flp-in 293 Zellen wurde das Transfektionsreagenz FuGene HD (Roche) verwendet. Dazu wurden vor der Transfektion die Zellen in 6-Well Platten mit einer Zelldichte von  $1.4 \times 10^6$  Zellen/Well in DMEM + 10% FCS ausgesät, so dass diese am nächsten Tag eine Zelldichte von 80-90% erreicht hatten. 24 h nach Aussaat erfolgte die Kotransfektion des "Flp-in"-Vektors (kodiert für das zu exprimierende Protein) und pOG44 (Expression der Flp-Rekombinase). Je Well wurden 200 ng Flp-in Vektor und 1.8  $\mu$ g pOG44 (entspricht einem Verhältnis Flp-in Vektor zu pOG44 von 1:9) in 100  $\mu$ l OptiMEM gemischt. Anschließend wurden 7  $\mu$ l FuGene HD zugegeben, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Pro Well wurden 100  $\mu$ l des Transfektionsansatzes auf die Zellen getropft und gleichmäßig verteilt.

### 4.4 Etablierung einer stabil exprimierenden proPR3-Zelllinie

48 h nach Transfektion der Flp-in 293 Zellen wurde mit der Selektion begonnen. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und durch Antibiotikum-haltiges Medium ersetzt. Da der pcDNA5/FRT-Vektor eine Hygromycin-Resistenzkassette besitzt, wurden die Zellen mit 75  $\mu$ g/ml Hygromycin selektiert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen. Nach 10-14 Tagen waren einzelne Zellkolonien sichtbar. 10 Einzelzellklone wurden mit einer Pipettenspitze vom Zellboden abgesaugt und in ein Well einer 12-Well-Platte überführt. Bei entsprechender Zelldichte wurden diese in ein 6-Well Schale überführt und auf proPR3-Expression und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität hin analysiert. Die restlichen Zellen wurden trypsinisiert, gepoolt und zur Expansion in eine T75-Zellkulturflasche überführt. Dabei wurden alle Zellen ohne Unterbrechung in Selektionsmedium kultiviert.

Selektionsmedium	1 x DMEM (Gibco)
	10 % FCS (PAN), hitzeinaktiviert 56°C, 30 min
	75 $\mu$ g/ml Hygromycin B

### 4.5 proPR3-Expression in stabil transfizierten Flp-in 293 Zellen

Die Expression von pro-PR3 in den Zellkulturüberstand von Flp-in 293 Zellen erfolgte in sogenannten Cellstacks (Corning). Ein Cellstack mit 5 Kammern besitzt eine Fläche von 3180 cm<sup>2</sup> und wird für die Gewinnung von großen Mengen an proPR3-haltigem Medium während der Expressionsphase eingesetzt. 3 T175 Zellkulturflaschen stabil transfizierter Flp-in 293 Zellen mit einer Zelldichte von 90-100% wurden trypsinisiert, die Zellen zentrifugiert und das Zellpellet in 500 ml frischem Medium resuspendiert. Das Medium wurde anschließend in ein Cellstack mit 5 Kammern überführt, die Zellen gleichmäßig auf den einzelnen Böden verteilt und für 8-10 Tage für die Proteinexpression bei 37°C, 5%



CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei 90-100%iger Zellkonfluenz wurden die Zellen trypsinisiert und im Verhältnis 1:5 in frisches Medium gesplittet. Während der proPR3-Expression wurden die Zellen in DMEM mit 5% FCS und 75 µg/ml Hygromycin B kultiviert. Die Reduktion des FCS von 10% auf 5% erleichtert die spätere Aufreinigung über Ni-Affinitätschromatographie.

## 5. Proteinreinigung

### 5.1 Reinigung von rekombinanter PR3 über Nickel-Affinitätschromatographie

Recombinant exprimierte PR3, die in Form von IB vorlag, wurde ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Renaturierte PR3 bzw. PR3, welche in eukaryotischen Zellsystemen (z.B. Insekten-, Flp-in 293-Zellen) exprimiert wurde, wurde unter nativen Bedingungen aufgereinigt.

#### a) Unter denaturierenden Bedingungen

Proteinase 3 wurde in *E. coli* B834 als IB wie unter 2 beschrieben exprimiert. Die Bakterien wurden lysiert und IB isoliert. Da die inclusion bodies nach Aufreinigung noch relativ unsauber waren, wurden diese von bakteriellen Proteinen über Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-NTA) gereinigt. Rekombinante proPR3 mit N- bzw. C-terminalem His<sub>6</sub>-tag wurde hierzu in Solubilisierungspuffer (6 M GdnHCl, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8, ~1 ml/mg IB) aufgenommen. Die Proteinaufreinigung erfolgte bei 4°C unter Verwendung der "Äkta Prime" -Anlage (Amersham). Als Säulenmaterial diente HisTrap™ HP-Sepharose (Amersham). Die Säule wurde zunächst mit Solubilisierungspuffer äquilibriert und das Proteinsolubilisat bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1-2 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde mit Solubilisierungspuffer gewaschen und gebundenes Protein mit einem Imidazolgradienten von 6 M GdnHCl, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8 bis 6 M GdnHCl, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH 8 eluiert. Aliquots der Elutionsfraktionen wurden gegen 8 M Urea, pH 8 dialysiert und mittels SDS-PAGE/Coomassiefärbung analysiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden gepoolt und gegen 6 M GdnHCl, 100 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8 dialysiert. Anschließend wurden der Proteinlösung 15 mM GSH, 150 mM GSSG zugesetzt, 20 min bei 320 Watt sonifiziert und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Die Proteinlösung wurde auf pH 5 eingestellt und gegen 6 M GdnHCl, pH 5 dialysiert. Das Solubilisat wurde direkt für die Rückfaltung eingesetzt.

## a) unter nativen Bedingungen

Zellkulturmedium (DMEM, 5% FCS, 75 µg/ml Hygromycin) von proPR3-exprimierenden Flp-in 293-Zellen wurde auf ca. 1/3 Volumen aufkonzentriert und gegen 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, 50 mM Imidazol, pH 7.5 bei 4°C dialysiert. Die hohe Salz- und Imidazolkonzentration soll unspezifische Bindungen an die Säulenmatrix verhindern. Die Proteinlösung wurde über eine Auftragspumpe unter Verwendung der Äka *prime* (Amersham) auf eine HisTrap HP-Sepharose (Amersham) aufgetragen. Die Säule wurde vorher mit dem gleichen Phosphatpuffer equilibriert und nach dem Binden der Proteine mit diesem gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit einem Imidazolgradienten von 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, 50 mM Imidazol, pH 7.5 zu 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, 1 M Imidazol, pH 7.5 eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und gegen 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> (Enterokinase-Konvertierungspuffer) bei 4°C dialysiert.

Dialyse-, Equilibrierungs- und Waschpuffer	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH7.5 500 mM 0.5 M NaCl 50 mM Imidazol
Elutionspuffer	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.5 500 mM 0.5 M NaCl 1 M Imidazol

## 5.2 Reinigung von renaturierter PR3 über FPLC

Aufgrund der Hydrophobizität von PR3 wurde als Chromatographie-Matrix Phenyl-Sepharose (High-Performance, Amersham) eingesetzt. Die als HIC (*hydrophobic interaction chromatography*) beschriebene Methode beruht auf der reversiblen, hydrophoben Interaktion zwischen Protein und der Oberfläche der Chromatographie-Matrix. Die Aufreinigung des renaturierten Zymogens erfolgte bei 4°C unter Verwendung der FPLC-Anlage "Äkta Prime" (Amersham). Die Proteinlösung wurde über eine der Auftragspumpen aufgetragen, nachdem das Säulenmaterial mit 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5 äquiliert wurde. Die Elution des Proteins erfolgte über einen Isopropanol-Gradienten mit ca. 10 Säulenvolumina 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5 bis 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5/30% Isopropanol (Vol./Vol.). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE/Silberfärbung analysiert und nach Zugabe von 5 mM CHAPS (nur für hPR3) gegen 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 4°C dialysiert.

### 5.3 Reinigung von nativer proPR3 über S-Protein-Agarose

Zellkulturüberstand von transient transfizierten proPR3-exprimierenden High-Five Insektenzellen wurde mit S-Protein-Agarose (Novagen) unter Rotation für 2 h bei RT inkubiert. Hierbei bindet der S-Tag von proPR3 an das an Agarose gekoppelte S-Protein. Die Agarose wurde anschließend zentrifugiert (500 g, 1 min), mit 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 gewaschen und im selben Puffer mit Enterokinase über Nacht bei RT unter ständiger Rotation inkubiert. Gebundene PR3 wird in diesem Schritt von der Agarose abgespalten und aktive PR3 in den Überstand entlassen. Der Überstand kann anschließend für enzymatische Tests oder Analyse mittels SDS-PAGE eingesetzt werden.

## 6. Proteinanalytische Methoden

### 6.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung wurde nach Standardprotokollen [Ausubel *et al.*, 1999] in Mini-Protean Apparaturen (Bio-Rad) durchgeführt. Dem reduzierenden Probenauftragspuffer nach Laemmli wurden aufgrund der geringen Löslichkeit von PR3 zusätzlich 10 %  $\beta$ -Mercaptoäthanol und 2 % SDS zugegeben. Für nicht reduzierenden Probenauftragspuffer wurde auf die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoäthanol ganz verzichtet.

Sammelgel (10 ml)	6.8 ml H <sub>2</sub> O
	1.66 ml 30 %Acrylamid/Bisacrylamid (29:0.8)
	1.26 ml 1M Tris, pH 6.8
	50 $\mu$ l 20% SDS
	100 $\mu$ l 10 % APS
	10 $\mu$ l TEMED
Trenngel (15 %, 20ml)	4.7 ml H <sub>2</sub> O
	10 ml 30 %Acrylamid/Bisacrylamid (29:0.8)
	5 ml 1.5 M Tris, pH 8.8
	100 $\mu$ l 20% SDS
	200 $\mu$ l 10 % APS
	8 $\mu$ TEMED
Laufpuffer (5x)	250 mM Tris
	1.92 M Glycin
	1 % SDS

Probenauftragspuffer (4x), reduzierend	200 mM Tris, pH 6.8
	40 % Glycerin
	10 % SDS
	30 % $\beta$ -Mercaptoethanol
	0.2 % Bromphenolblau

Molekulargewichtsstandards wurden von Bio-Rad (Precision Plus Protein Standard) und Roth (Roti-Mark, prestained) bezogen.

## 6.2 Proteindetektion

- a) Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue [Fazekas de *et al.*, 1963; Meyer & Lamberts 1965; Wilson, 1983]

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde in Coomassie-Färbelösung in der Mikrowelle auf ca. 60°C erwärmt und für 5-10 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde solange in Entfärbelösung inkubiert, bis ein möglichst großes Signal-Hintergrund-Verhältnis erreicht war. Auch die Entfärbung konnte durch Erwärmen beschleunigt werden.

Coomassie Brilliant Blue Färbelösung	0.25 % Coomassie Brilliant Blue
	40 % MeOH
	7 % Essigsäure
Entfärbelösung	10 % Essigsäure

- b) Proteinfärbung mit Silbernitrat [Blum *et al.*, 1987]

Die Silberfärbung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen ist eine sehr sensitive Methode, mit der bereits 3-10 ng Protein detektiert werden können. Die Sensitivität ist gegenüber Coomassiegefärbten Gelen ca. 10-fach höher und kommt der des Western-Blot nahe.

Polyacrylamidgele wurden eine Stunde in Fixierlösung und anschließend 3 mal 20 min in 50 % Ethanol geschwenkt. Danach wurde eine Minute in Thiosulfatlösung, 3 mal 20 sec in H<sub>2</sub>O und 20 min in Silbernitratlösung unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde das Gel noch 3 mal für 20 sec mit H<sub>2</sub>O gewaschen und die Proteinbanden mit Entwicklerlösung detektiert. Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>O abgestoppt, dann für 10 min mit 50 % Methanol/12 % Essigsäure und für 30 Minuten mit 50 % Methanol fixiert. Die Lagerung der Gele erfolgte in H<sub>2</sub>O.

Fixierer	50 % Methanol
	12 % Essigsäure
	0.5 ml/l 37 % Formaldehyd

Thiosulfatlösung	0.2 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
Silbernitratlösung	2 g/l $\text{AgNO}_3$ 750 $\mu\text{l/l}$ 37 % Formaldehyd
Entwicklerlösung	60 g/l $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 4 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0.5 ml 37 % Formaldehyd

### 6.3 Western-Blot Analyse von Proteinen [Bronstein *et al.*, 1992; Towbin *et al.*, 1979]

Die Proteinlösungen wurden wie unter Kap. 6.1 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels "semidry" Elektrobplot auf eine Hybond ECL (Nitrocellulose)-Membran (Amersham) für ECL-vermittelte Antikörperdetektion oder auf Immobilon-PSQ (PVDF)-Membranen (Millipore) für N-terminale Proteinsequenzierungen übertragen. Dabei wurde die Membran zunächst kurz in Transfer-Puffer äquilibriert und anschließend für 30 min bei 2 mA/cm<sup>2</sup> unter Verwendung der Apparatur von Biometra geblottet. Die Membran wurde dann für eine Stunde oder über Nacht bei 4°C mit PBS-T/5% Magermilchpulver blockiert, kurz in PBS-T gewaschen und schließlich 1 h oder über Nacht bei 4°C mit dem primären Peroxidase-konjugierten Antikörper (S-Protein-HRP 1:5000 Verdünnung; anti-His<sub>6</sub>-HRP 1:1000 Verdünnung) in PBS-T/2% Magermilchpulver unter Rotation inkubiert. Nach 3 mal 10-minütigem Waschen mit PBS-T wurde die ECL-Substratlösung nach Herstellerangaben (Lösung 1 zu gleichen Teilen mit Lösung 2 gemischt) auf die Membran gegeben und 1 min darauf inkubiert. Nach Abtropfen erfolgte die Exposition eines ECL-Films (Amersham-Pharmacia) in einer Expositionskammer je nach Signalstärke für 20 sec bis 10 min.

Für die Proteinsequenzierung bestimmte Membranen wurden nach dem Proteintransfer direkt 20 sec mit Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung gefärbt, und mit 30% Essigsäure entfärbt, bis ein möglichst großes Signal-Hintergrund-Verhältnis erreicht war.

Transferpuffer	35 mM Trisma 150 mM Glycin 10 % Methanol
PBS-T	140 mM NaCl 2.7 mM KCl 3.2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ 1.5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4 0.05 % Tween-20

## 6.4 Spektrophotometrische Proteinquantifizierung [Layne, 1957]

Die spektrophotometrische Quantifizierung beruht auf der Absorption von Proteinen bei 280 nm, die sich aus der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei dieser Wellenlänge ergibt und in Abhängigkeit von der Aminosäurezusammensetzung für jedes Protein eine individuelle physikalische Größe ist. Der molare Absorptionskoeffizient eines Proteins bei 280 nm berechnet sich aus der Summe der Einzelabsorptionen der bei 280 nm absorbierenden aromatischen Aminosäuren. Dies sind hauptsächlich Tryptophan mit  $\epsilon_{280\text{nm}} = 5.559 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Tyrosin mit  $\epsilon_{280\text{nm}} = 1.197 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und in geringem Maß Phenylalanin mit  $\epsilon_{280\text{nm}} = 0.0007 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [Fasman, 1989]. Die Proteinkonzentration errechnet sich nach

$$c \text{ [mg/ml]} = \frac{A_{280\text{nm}} \times \text{MW}}{\epsilon_{280\text{nm}} \times b}$$

mit  $A_{280}$  = gemessene Absorption, MW = Molekulargewicht,  $\epsilon_{280}$  = molarer Absorptionskoeffizient, b = Schichtdicke. Der molare Absorptionskoeffizient wurde anhand der Aminosäuresequenz mit dem Computerprogramm ProtParam tool (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) errechnet. Die Messungen wurden in einer Küvette mit der entsprechenden Pufferlösung als Referenz in einem Spektrophotometer (Eppendorf) durchgeführt.

## 6.5 Colorimetrische Proteinquantifizierung [Smith *et al.*, 1985]

Für die colorimetrische Proteinquantifizierung wurde der BC (*bicinchonic acid*) Assay (Uptima) verwendet. Dieser Test basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Peptidbindungen des Proteins.  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden dabei einen wasserlöslichen, violetten Chelatkomplex. Diese Reaktion kann bei einer Absorption von 562 nm gemessen werden. Die Absorption ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration innerhalb eines linearen Bereichs von 5-250  $\mu\text{g/ml}$ . Die Proteinquantifizierung erfolgte nach dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers.

## 6.6 Proteinsequenzierung

Die N-terminale Ansequenzierung von PR3 wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt. Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden auf PVDF-Membran geblottet, die Proteinbanden mit Coomassie angefärbt und direkt nach der Methode des Edmann-Abbaus analysiert.

## 6.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von rekombinanter PR3

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PR3 wurde als chromogener Test in 96-Well-Platten durchgeführt und im Mikrotiterplatten-Lesegerät "FluoStar Optima" (BMG Labtech) quantifiziert. Als synthetisches, chromogenes Substrat wurde N-Methoxysuccinyl-alanyl-alanyl-prolyl-valyl-p-nitroanilid (AAPV-pNA, Sigma) in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt [Nakajima *et al.*, 1979]. Die Abspaltung des Tetrapeptids durch PR3 entläßt die Paranitroanilidgruppe, die durch einen hohen Absorptionskoeffizienten bei 405-410 nm ( $\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) gekennzeichnet ist.

Als weitaus sensitiveres synthetisches, chromogenes Substrat für PR3 wurde der Thiobenzylester Boc-Ala-Pro-Nva-4-chloro-SBzl (Bachem) verwendet. Norvalin (Nva) ist hierbei ein nicht natürlich vorkommendes Aminosäurederivat von Valin. Bei Spaltung des Substrats durch PR3 kommt es in Anwesenheit von 5, 5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DNTB) zur Bildung von 2-Nitro-5-thiobenzoat-Ionen. Die Hydrolyse-Rate des Thioesters wird bei 405 nm gemessen (molarer Absorptionskoeffizient  $\epsilon = 14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [Niles *et al.*, 1998]. Boc-Ala-Pro-Nva-4-chloro-SBzl wird in einer Konzentration von 1 mM und 0.5 mM DTNB eingesetzt.

Um die enzymatische Aktivität von hPR3 im Vergleich zu gibPR3 zu bestimmen, wurde das FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Substrat Abz-Val-Ala-Asp-Cys-Ala-Gln-EDDnp (Abz-VADCAQ-EDDnp) verwendet. Dies ist eines der besten Substrate für humane PR3 mit einer spezifischen Konstante für die Hydrolyserate  $k_{\text{cat}}/K_m$  von  $292 \text{ mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$  [Korkmaz *et al.*, 2007]. Abz-VADCAQ-EDDnp wurde in einer Konzentration von 2.6 nM eingesetzt und die Fluoreszenz durch Anregung bei 320 nm und Emission bei 405 nm gemessen.

Die eingesetzten Enzymmengen, Inkubationszeiten und PR3-Substrate sind bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen genauer aufgeführt.

Aktivitätsassay-Puffer	100 mM Tris, pH 8.1 700 mM NaCl 1 % Igepal
Aktivitätsassay-Puffer für FRET-Substrat	50 mM HEPES, pH7.5 750 mM NaCl 0.03% Egepal

## 6.8 Inhibition der enzymatischen Aktivität von PR3

Die Inhibition der enzymatischen Aktivität erfolgte durch Inkubation von PR3 mit einem mindestens 10-fachen molaren Überschuß an  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) oder Elafin für 1 h bei 37°C. Der Erfolg der Inhibition wurde durch Messung der enzymatischen Aktivität bestimmt und anschließend direkt für ELISA-Tests eingesetzt. Da  $\alpha_1$ -PI kovalent an PR3 bindet, kann dieser Komplex mittels reduzierender SDS-PAGE analysiert werden.

## 6.9 Titration des aktiven Zentrums von PR3

Bei der Titration des aktiven Zentrums wird die Konzentration der katalytischen Zentren und somit die Konzentration enzymatisch aktiven Proteins ermittelt. Sie dient außerdem dazu, die aktiven PR3 Moleküle von hPR3 mit gibPR3 und den Human/Gibbon-Hybride zu vergleichen. Für die Titration wurde zunächst 6  $\mu\text{g/ml}$  hPR3 mit unterschiedlichen Mengen  $\alpha_1$ -PI für 1 h bei 37°C in 100 mM Tris-HCl, pH 8.1, 700 mM NaCl, 1% Igepal inkubiert. Die verbleibende PR3-Aktivität nach  $\alpha_1$ -PI-Inhibition wurde für jede Probe bestimmt. Die Hydrolyse von 1 mM Substrat (Boc-Ala-Pro-Nva-SBzl) in Anwesenheit von 0.5 mM DTNB wurde durch Messung der Absorption bei 405 nm gemessen. Die Hydrolysegeschwindigkeit für jedes hPR3/ $\alpha_1$ -PI-Verhältnis wurde durch Errechnung der Steigung bestimmt. Die Steigung ergibt sich aus dem Anstieg der Absorption bei 405 nm durch Substratspaltung in den ersten 3 Minuten. Anschließend wurde die Steigung auf der Y-Achse gegen die  $\alpha_1$ -PI-Konzentration auf der X-Achse extrapoliert. Daraus wurde die Menge  $\alpha_1$ -PI, die für die Inhibition von 50 % der hPR3-Aktivität benötigt wird, errechnet. In einer zweiten Titration wurden nun konstante Mengen  $\alpha_1$ -PI mit unterschiedlichen Konzentrationen gibPR3, hum/gibPR3 bzw. gib/humPR3 eingesetzt und nach dem oben beschriebenen Verfahren die Steigung berechnet. Für jedes Konstrukt wurde die Proteinkonzentration für eine 50 %ige Inhibition der enzymatischen Aktivität bestimmt und mit der errechneten hPR3-Konzentration verglichen.

## 6.10 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

In dieser Arbeit wurde ein ELISA angewandt, der auf der Bindung des C-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tags von PR3 an Nickel-beschichtete 96-Well Platten (Nunc) beruht. Zunächst wurden die Vertiefungen von 96-Well Platten mit 100  $\mu\text{l}$  Antigen (1  $\mu\text{g/ml}$ ) in PBS-T (1 x PBS, pH 7.4 0.05 % Tween-20, genaue Zusammensetzung s. 6.3) über Nacht bei RT inkubiert. Die Vertiefungen wurden anschließend 3 mal mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen. Monoklonale Antikörper bzw. Seren von Wegener-Patienten wurden in Verdünnungspuffer verdünnt und je Well mit 100  $\mu\text{l}$  für 1 h bei RT inkubiert. Erneut wurde jede Vertiefung mit 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen und mit 100  $\mu\text{l}$  sekundärem alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltem Antikörper in Verdünnungspuffer für 1 h bei RT inkubiert. Der Waschschrift wurde



anschließend wiederholt und 100 µl/Well Substratpuffer zugegeben. Die Quantifizierung erfolgte im Mikrotiterplatten-Lesegerät (VICTOR<sup>2</sup> 1420 Multilabel counter, PerkinElmer) bei 405 nm. Dabei wurde die Umsetzung des chromogenen Substrats p-Nitrophenylphosphat (pNPP) durch alkalische Phosphatase gemessen.

Waschpuffer, Verdünnungspuffer und anti-Human-AP Antikörper wurden von der Firma Utecht&Lüdemann (Klausdorf) bezogen und nach Herstellerangaben verdünnt. Anti-Maus-AP Antikörper (Sigma) wurden 1:5000 verdünnt, Wegener Seren 1:50 und monoklonale anti-hPR3-Antikörper wie folgt: 2F1, 2E1, 1B10 1:5000; 4A5, MCPR3-2, 12.8 1:1000; 1F11 1:100.

Für den Kompetitions-ELISA wurde das oben beschriebene Protokoll abgeändert. PR3,  $\alpha_1$ -PI und Antikörper (hier: 12.8) wurden in PBS-T ad 10 µl für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde PR3 auf eine Konzentration von 1 µg/ml mit PBS-T, 350 mM NaCl verdünnt und 100 ng PR3 je Well einer Nickel-beschichteten 96-Well Platten zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben weiter bearbeitet.

Substratpuffer	97 mM Diethanolamin (Sigma)
	0.02 % Natriumazid
	4 mM Magnesiumchlorid
	pH 9.8
	10 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Sigma), Zugabe unmittelbar vor der Verwendung

---

## Literaturverzeichnis

- Abrink, M., Gobl, A. E., Huang, R., Nilsson, K. & Hellman, L. (1994) *Human cell lines U-937, THP-1 and Mono Mac 6 represent relatively immature cells of the monocyte-macrophage cell lineage*. *Leukemia*, 8: 1579-84.
- Ahmad, F. (2003) *The molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia-cardiomyopathy*. *Clin Invest Med*, 26: 167-178.
- Arimura, T., Hayashi, T., Terada, H., Lee, S., Zhou, Q., Takahashi, M., Ueda, K., Nouchi, T., Hohda, S., Shibutani, M., Hirose, M., Chen, J., Park, J., Yasunami, M., Hayashi, H., Kimura, A. (2004) *A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C*. *J Biol Chem*, 279: 6746-6752.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. R., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., Struhl K (1999) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons Inc. NY
- Bacon, P. A. (1994) *Therapy of vasculitis*. *J Rheumatol*, 21: 788-90.
- Baici, A., Szedlaczek, S. E., Fruh, H., Michel, B.A. (1996) *pH-dependent hysteretic behaviour of human myeloblastin (leucocyte proteinase 3)*. *Biochem J*, 317 ( Pt 3): 901-905.
- Bank, U., Kupper, B., Reinhold, D., Hoffmann, T. & Ansorge, S. (1999a) *Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation*. *FEBS Lett*, 461: 235-40.
- Bank, U., Reinhold, D., Schneemilch, C., Kunz, D., Synowitz, H. J. & Ansorge, S. (1999b) *Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation*. *J Interferon Cytokine Res*, 19: 1277-87.
- Beatty, K., Bieth, J., Travis, J. (1980) *Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin*. *J Biol Chem*, 255: 3931-3934.
- Bergensfeldt, M., Axelsson, L. & Ohlsson, K. (1992) *Release of neutrophil proteinase 4(3) and leukocyte elastase during phagocytosis and their interaction with proteinase inhibitors*. *Scand J Clin Lab Invest*, 52: 823-9.
- Bini, P., Gabay, J. E., Teitel, A., Melchior, M., Zhou, J. L., Elkou, K.B. (1992) *Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in Wegener's granulomatosis recognize conformational epitope(s) on proteinase 3*. *J Immunol*, 149: 1409-1415.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987) *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- Bode, W., Meyer, E. J. & Powers, J.C. (1989) *Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors*. *Biochemistry*, 28: 1951-63.

- Bories, D., Raynal, M. C., Solomon, D. H., Darzynkiewicz, Z., Cayre, Y.E. (1989) *Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells*. Cell, 59: 959-968.
- Bosch, X., Guilabert, A. & Font, J. (2006) *Antineutrophil cytoplasmic antibodies*. Lancet, 368: 404-18.
- Bowles, K. R., Abraham, S. E., Brugada, R., Zintz, C., Comeaux, J., Sorajja, D., Tsubata, S., Li, H., Brandon, L., Gibbs, R. A., Scherer, S. E., Bowles, N. E., Towbin, J.A. (2000) *Construction of a high-resolution physical map of the chromosome 10q22-q23 dilated cardiomyopathy locus and analysis of candidate genes*. Genomics, 67: 109-127.
- Bowles, K. R., Gajarski, R., Porter, P., Goytia, V., Bachinski, L., Roberts, R., Pignatelli, R., Towbin, J.A. (1996) *Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23*. J Clin Invest, 98: 1355-1360.
- Brantly, M., Nukiwa, T., Crystal, R.G. (1988) *Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency*. Am J Med, 84: 13-31.
- Breithaupt, C., Schubart, A., Zander, H., Skerra, A., Huber, R., Linington, C., Jacob, U. (2003) *Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 9446-9451.
- Bronstein, I., Voyta, J. C., Murphy, O. J., Bresnick, L., Kricka, L.J. (1992) *Improved chemiluminescent western blotting procedure*. Biotechniques, 12: 748-753.
- Brubaker, M. J., Groutas, W. C., Hoidal, J. R. & Rao, N.V. (1992) *Human neutrophil proteinase 3: mapping of the substrate binding site using peptidyl thiobenzyl esters*. Biochem Biophys Res Commun, 188: 1318-24.
- Calafat, J., Goldschmeding, R., Ringeling, P. L., Janssen, H. & van der Schoot, C.E. (1990) *In situ localization by double-labeling immunoelectron microscopy of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in neutrophils and monocytes*. Blood, 75: 242-50.
- Callea, F., Gregorini, G., Sinico, A., Gonzales, G., Bossolasco, M., Salvidio, G., Radice, A., Tira, P., Candiano, G., Rossi, G., Petti, A., Ravera, G., Ghiggeri, G. & Gusmano, R. (1997) *alpha 1-Antitrypsin (AAT) deficiency and ANCA-positive systemic vasculitis: genetic and clinical implications*. Eur J Clin Invest, 27: 696-702.
- Campanelli, D., Detmers, P. A., Nathan, C. F. & Gabay, J.E. (1990a) *Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties*. J Clin Invest, 85: 904-15.
- Campanelli, D., Melchior, M., Fu, Y., Nakata, M., Shuman, H., Nathan, C., Gabay, J.E. (1990b) *Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils*. J Exp Med, 172: 1709-1715.
- Capizzi, S. A., Viss, M. A., Hummel, A. M., Fass, D. N., Specks, U. (2003) *Effects of carboxy-terminal modifications of proteinase 3 (PR3) on the recognition by PR3-ANCA*. Kidney Int, 63: 756-760.
- Chang, L., Binos, S., Savige, J. (1995) *Epitope mapping of anti-proteinase 3 and anti-myeloperoxidase antibodies*. Clin Exp Immunol, 102: 112-119.
- Charles, L. A., Caldas, M. L., Falk, R. J., Terrell, R. S., Jennette, J.C. (1991) *Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro*. J Leukoc Biol, 50: 539-546.

- Codd, M. B., Sugrue, D. D., Gersh, B. J. , Melton, L.J.3. (1989) *Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984*. Circulation, 80: 564-572.
- Coeshott, C., Ohnemus, C., Pilyavskaya, A., Ross, S., Wieczorek, M., Kroona, H., Leimer, A. H. & Cheronis, J. (1999) *Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 6261-6.
- Collins-Racie, L. A., McColgan, J. M., Grant, K. L., DiBlasio-Smith, E. A., McCoy, J. M. , LaVallie, E.R. (1995) *Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in Escherichia coli using the novel secretory fusion partner DsbA*. Biotechnology (N Y), 13: 982-987.
- Corrado, D., Thiene, G., Nava, A., Rossi, L. , Pennelli, N. (1990) *Sudden death in young competitive athletes: clinicopathologic correlations in 22 cases*. Am J Med, 89: 588-596.
- Cotch, M. F., Hoffman, G. S., Yerg, D. E., Kaufman, G. I., Targonski, P. & Kaslow, R.A. (1996) *The epidemiology of Wegener's granulomatosis. Estimates of the five-year period prevalence, annual mortality, and geographic disease distribution from population-based data sources*. Arthritis Rheum, 39: 87-92.
- Cowie, M. R., Mosterd, A., Wood, D. A., Deckers, J. W., Poole-Wilson, P. A., Sutton, G. C. , Grobbee, D.E. (1997) *The epidemiology of heart failure*. Eur Heart J, 18: 208-225.
- Cowland, J. B. & Borregaard, N. (1999) *The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules*. J Leukoc Biol, 66: 989-95.
- Crystal, R. G., Brantly, M. L., Hubbard, R. C., Curiel, D. T., States, D. J. , Holmes, M.D. (1989) *The alpha 1-antitrypsin gene and its mutations. Clinical consequences and strategies for therapy*. Chest, 95: 196-208.
- Csernok, E., Ernst, M., Schmitt, W., Bainton, D. F. & Gross, W.L. (1994) *Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo*. Clin Exp Immunol, 95: 244-50.
- Csernok, E., Holle, J., Hellmich, B., Willem, J., Tervaert, C., Kallenberg, C. G. M., Limburg, P. C., Niles, J., Pan, G., Specks, U., Westman, K., Wieslander, J., De Groot, K. , Gross, W.L. (2004) *Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study*. Rheumatology (Oxford), 43: 174-180.
- Csernok, E., Ludemann, J., Gross, W. L. & Bainton, D.F. (1990) *Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis*. Am J Pathol, 137: 1113-20.
- Csernok, E., Szymkowiak, C. H., Mistry, N., Daha, M. R., Gross, W. L. & Kekow, J. (1996) *Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis*. Clin Exp Immunol, 105: 104-11.
- Daouk, G. H., Palsson, R. & Arnaout, M.A. (1995) *Inhibition of proteinase 3 by ANCA and its correlation with disease activity in Wegener's granulomatosis*. Kidney Int, 47: 1528-36.

- Davies, D. J., Moran, J. E., Niall, J. F. & Ryan, G.B. (1982) *Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology?*. Br Med J (Clin Res Ed), 285: 606.
- Deloukas, P., Earthrowl, M. E., Grafham, D. V., Rubenfield, M., French, L., Steward, C. A., Sims, S. K., *et al.* (2004) *The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10*. Nature, 429: 375-381.
- Dementiev, A., Dobo, J., Gettins, P.G.W. (2006) *Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins: structure of the covalent complex of alpha1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase*. J Biol Chem, 281: 3452-3457.
- Dery, O., Corvera, C. U., Steinhoff, M. & Bunnett, N.W. (1998) *Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases*. Am J Physiol, 274: C1429-52.
- Dijstelbloem, H. M., Scheepers, R. H., Oost, W. W., Stegeman, C. A., van der Pol, W. L., Sluiter, W. J., Kallenberg, C. G., van de Winkel, J. G. & Tervaert, J.W. (1999) *Fc gamma receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse*. Arthritis Rheum, 42: 1823-7.
- Dolman, K. M., Jager, A., Sonnenberg, A., von dem Borne, A. E. & Goldschmeding, R. (1995) *Proteolysis of classic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (C-ANCA) by neutrophil proteinase 3*. Clin Exp Immunol, 101: 8-12.
- Duna, G. F., Galperin, C. & Hoffman, G.S. (1995) *Wegener's granulomatosis*. Rheum Dis Clin North Am, 21: 949-86.
- Egesten, A., Breton-Gorius, J., Guichard, J., Gullberg, U. & Olsson, I. (1994) *The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein*. Blood, 83: 2985-94.
- Eriksson, S. & Larsson, C. (1975) *Purification and partial characterization of pas-positive inclusion bodies from the liver in alpha 1-antitrypsin deficiency*. N Engl J Med, 292: 176-80.
- Esnault, V. L. (1997) *ANCA-positive vasculitis and alpha 1-antitrypsin deficiency: could free ANCA antigens released by neutrophils mediate vasculitic lesions?*. Nephrol Dial Transplant, 12: 249-251.
- Esnault, V. L., Testa, A., Audrain, M., Roge, C., Hamidou, M., Barrier, J. H., Sesboue, R., Martin, J. P., Lesavre, P. (1993) *Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis*. Kidney Int, 43: 1329-1332.
- Falk, R. J. & Jennette, J.C. (1988) *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis*. N Engl J Med, 318: 1651-7.
- Falk, R. J., Hogan, S., Carey, T. S. & Jennette, J.C. (1990a) *Clinical course of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and systemic vasculitis. The Glomerular Disease Collaborative Network*. Ann Intern Med, 113: 656-63.
- Falk, R. J., Terrell, R. S., Charles, L. A., Jennette, J.C. (1990b) *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87: 4115-4119.

- Fardeau, M., Godet-Guillain, J., Tome, F. M., Collin, H., Gaudeau, S., Boffety, C., Vernant, P. (1978) *[A new familial muscular disorder demonstrated by the intra-sarcoplasmic accumulation of a granulo-filamentous material which is dense on electron microscopy (author's transl)]*. Rev Neurol (Paris), 134: 411-425.
- Farrell, P., Iatrou, K. (2004) *Transfected insect cells in suspension culture rapidly yield moderate quantities of recombinant proteins in protein-free culture medium*. Protein Expr Purif, 36: 177-185.
- Fasman, G. D. (1989) *Protein conformational prediction*. Trends Biochem Sci, 14: 295-299.
- Fauci, A. S., Haynes, B. F., Katz, P. & Wolff, S.M. (1983) *Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years*. Ann Intern Med, 98: 76-85.
- Fazekas de, S., Groth, S., Webster, R. G., Datyner, A. (1963) *Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips*. Biochim. Biophys. Acta, 71
- Fellows, E., Gil-Parrado, S., Jenne, D. E., Kurschus, F.C. (2007) *Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program*. Blood, 110: 544-552.
- Fidzianska, A., Goebel, H. H., Osborn, M., Lenard, H. G., Osse, G., Langenbeck, U. (1983) *Mallory body-like inclusions in a hereditary congenital neuromuscular disease*. Muscle Nerve, 6: 195-200.
- Fujinaga, M., Chernaia, M. M., Halenbeck, R., Koths, K., James, M.N. (1996) *The crystal structure of PR3, a neutrophil serine proteinase antigen of Wegener's granulomatosis antibodies*. J Mol Biol, 261: 267-278.
- Gabay, J. E., Scott, R. W., Campanelli, D., Griffith, J., Wilde, C., Marra, M. N., Seeger, M. & Nathan, C.F. (1989) *Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 86: 5610-4.
- Garwicz, D., Lindmark, A., Hellmark, T., Gladh, M., Jogi, J. & Gullberg, U. (1997) *Characterization of the processing and granular targeting of human proteinase 3 after transfection to the rat RBL or the murine 32D leukemic cell lines*. J Leukoc Biol, 61: 113-23.
- Godman, G. C. & Churg, J. (1954) *Wegener's granulomatosis: pathology and review of the literature*. AMA Arch Pathol, 58: 533-53.
- Goebel, H. H., Muller, J., Gillen, H. W., Merritt, A.D. (1978) *Autosomal dominant "spheroid body myopathy"*. Muscle Nerve, 1: 14-26.
- Goldschmeding, R., van der Schoot, C. E., ten Bokkel Huinink, D., Hack, C. E., van den Ende, M. E., Kallenberg, C. G. & von dem Borne, A.E. (1989) *Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils*. J Clin Invest, 84: 1577-87.
- Griffith, M. E., Coulthart, A., Pemberton, S., George, A. J., Pusey, C.D. (2001) *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) from patients with systemic vasculitis recognize restricted epitopes of proteinase 3 involving the catalytic site*. Clin Exp Immunol, 123: 170-177.

- Gross, W. L., Schmitt, W. H. & Csernok, E. (1993) *ANCA and associated diseases: immunodiagnostic and pathogenetic aspects*. Clin Exp Immunol, 91: 1-12.
- Grunig, E., Tasman, J. A., Kucherer, H., Franz, W., Kubler, W., Katus, H.A. (1998) *Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 31: 186-194.
- Gullberg, U., Andersson, E., Garwicz, D., Lindmark, A. & Olsson, I. (1997) *Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development*. Eur J Haematol, 58: 137-53.
- Hagen, E. C., Andrassy, K., Csernok, E., Daha, M. R., Gaskin, G., Gross, W. L., Hansen, B., Heigl, Z., Hermans, J., Jayne, D., Kallenberg, C. G., Lesavre, P., Lockwood, C. M., Ludemann, J., Mascart-Lemone, F., Mirapeix, E., Pusey, C. D., Rasmussen, N., Sinico, R. A., Tzioufas, A., Wieslander, J., Wiik, A., Van der Woude, F.J. (1996) *Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). A report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays*. J Immunol Methods, 196: 1-15.
- Halbwachs-Mecarelli, L., Bessou, G., Lesavre, P., Lopez, S. & Witko-Sarsat, V. (1995) *Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool*. FEBS Lett, 374: 29-33.
- Halbwachs-Mecarelli, L., Nusbaum, P., Noel, L. H., Reumaux, D., Erlinger, S., Grunfeld, J. P. & Lesavre, P. (1992) *Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis*. Clin Exp Immunol, 90: 79-84.
- Harmsen, M. C., Heeringa, P., van der Geld, Y. M., Huitema, M. G., Klimp, A., Tiran, A. & Kallenberg, C.G. (1997) *Recombinant proteinase 3 (Wegener's antigen) expressed in Pichia pastoris is functionally active and is recognized by patient sera*. Clin Exp Immunol, 110: 257-64.
- Hauschild, S., Schmitt, W. H., Csernok, E., Flesch, B. K., Rautmann, A. & Gross, W.L. (1993) *ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases*. Adv Exp Med Biol, 336: 245-51.
- Hauser, M. A., Conde, C. B., Kowaljow, V., Zeppa, G., Taratuto, A. L., Torian, U. M., Vance, J., Pericak-Vance, M. A., Speer, M. C., Rosa, A.L. (2002) *myotilin Mutation found in second pedigree with LGMD1A*. Am J Hum Genet, 71: 1428-1432.
- Hauser, M. A., Horrigan, S. K., Salmikangas, P., Torian, U. M., Viles, K. D., Dancel, R., Tim, R. W., Taivainen, A., Bartoloni, L., Gilchrist, J. M., Stajich, J. M., Gaskell, P. C., Gilbert, J. R., Vance, J. M., Pericak-Vance, M. A., Carpen, O., Westbrook, C. A., Speer, M.C. (2000) *Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A*. Hum Mol Genet, 9: 2141-2147.
- Heeringa, P., Huugen, D. & Tervaert, J.W.C. (2005) *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies and leukocyte-endothelial interactions: a sticky connection?*. Trends Immunol, 26: 561-4.

- Henrichs, T., Mikhaleva, N., Conz, C., Deuerling, E., Boyd, D., Zelazny, A., Bibi, E., Ban, N., Ehrmann, M. (2005) *Target-directed proteolysis at the ribosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 4246-4251.
- Hirel, P. H., Schmitter, M. J., Dessen, P., Fayat, G. & Blanquet, S. (1989) *Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 86: 8247-51.
- Hoffman, G. S., Kerr, G. S., Leavitt, R. Y., Hallahan, C. W., Lebovics, R. S., Travis, W. D., Rottem, M. & Fauci, A.S. (1992) *Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients*. Ann Intern Med, 116: 488-98.
- Huntington, J. A., Read, R. J. & Carrell, R.W. (2000) *Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation*. Nature, 407: 923-6.
- Jaenicke, R., Vogel, W., Rudolph, R. (1981) *Dimeric intermediates in the dissociation of lactic dehydrogenase*. Eur J Biochem, 114: 525-531.
- Jagiello, P., Gencik, M., Arning, L., Wieczorek, S., Kunstmann, E., Csernok, E., Gross, W. L. & Epplen, J.T. (2004) *New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes*. Hum Genet, 114: 468-77.
- Jenne, D. E. (1996) *Gene structure of ANCA target antigens: implications for the pathogenesis of vasculitis*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 13: 209-13.
- Jenne, D. E., Frohlich, L., Hummel, A. M. & Specks, U. (1997) *Cloning and functional expression of the murine homologue of proteinase 3: implications for the design of murine models of vasculitis*. FEBS Lett, 408: 187-90.
- Jenne, D. E., Tschopp, J., Ludemann, J., Utecht, B. & Gross, W.L. (1990) *Wegener's autoantigen decoded*. Nature, 346: 520.
- Jennette J.C., F. R. (1995) *Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: discovery, specificity, disease associations and pathogenic potential*. Adv Pathol Lab Med, 8: 363-378.
- Jennette, J. C. (1991) *Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated diseases: a pathologist's perspective*. Am J Kidney Dis, 18: 164-70.
- Jennings, J. G., Chang, L. & Savige, J.A. (1994) *Anti-proteinase 3 antibodies, their characterization and disease associations*. Clin Exp Immunol, 95: 251-6.
- Jeppson J.O. (1976) . FEBS Lett, 65: 195-197.
- Jeppson, JO, Laurell, CB, Fagerhol, M (1978) . Eur J Biochem, 83: 143-155.
- Kallenberg, C. G., Brouwer, E., Weening, J. J. & Tervaert, J.W. (1994) *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential*. Kidney Int, 46: 1-15.
- Kam, C. M., Kerrigan, J. E., Dolman, K. M., Goldschmeding, R., Von dem Borne, A. E. & Powers, J.C. (1992) *Substrate and inhibitor studies on proteinase 3*. FEBS Lett, 297: 119-23.



- Kamesh, L., Harper, L. & Savage, C.O.S. (2002) *ANCA-positive vasculitis*. J Am Soc Nephrol, 13: 1953-60.
- Kao, R. C., Wehner, N. G., Skubitz, K. M., Gray, B. H. , Hoidal, J.R. (1988) *Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters*. J Clin Invest, 82: 1963-1973.
- Karlsson, R., Michaelsson, A. , Mattsson, L. (1991) *Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system*. J Immunol Methods, 145: 229-240.
- Kinoshita, M., Satoyoshi, E. , Suzuki, Y. (1975) *Atypical myopathy with myofibrillar aggregates*. Arch Neurol, 32: 417-420.
- Klinger H. (1931) *Grenzformen der Periarteriitis nodosa*. Frankf Z Pathol, 42: 455-480.
- Klippel, S., Strunck, E., Busse, C. E., Behringer, D. & Pahl, H.L. (2002) *Biochemical characterization of PRV-1, a novel hematopoietic cell surface receptor, which is overexpressed in polycythemia rubra vera*. Blood, 100: 2441-8.
- Korkmaz, B., Hajjar, E., Kalupov, T., Reuter, N., Brillard-Bourdet, M., Moreau, T., Juliano, L. & Gauthier, F. (2007) *Influence of charge distribution at the active site surface on the substrate specificity of human neutrophil protease 3 and elastase. A kinetic and molecular modeling analysis*. J Biol Chem, 282: 1989-97.
- Korkmaz, B., Poutrain, P., Hazouard, E., de Monte, M., Attucci, S. , Gauthier, F.L. (2005) *Competition between elastase and related proteases from human neutrophil for binding to alpha1-protease inhibitor*. Am J Respir Cell Mol Biol, 32: 553-559.
- Kurschus, F. C., Bruno, R., Fellows, E., Falk, C. S. , Jenne, D.E. (2005) *Membrane receptors are not required to deliver granzyme B during killer cell attack*. Blood, 105: 2049-2058.
- Labbaye, C., Musette, P. & Cayre, Y.E. (1991) *Wegener autoantigen and myeloblastin are encoded by a single mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 88: 9253-6.
- Lalezari, P., Murphy, G. B. & Allen, F.H.J. (1971) *NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia*. J Clin Invest, 50: 1108-15.
- Laurell, C. , Eriksson, S. (1963) . Scand J Clin Lab Invest, 15: 132-140.
- Layne, E. (1957) *Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins*. Methods Enzymol, 3: 447-454.
- Leavitt, R. Y., Fauci, A. S., Bloch, D. A., Michel, B. A., Hunder, G. G., Arend, W. P., Calabrese, L. H., Fries, J. F., Lie, J. T. & Lightfoot, R.W.J. (1990) *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis*. Arthritis Rheum, 33: 1101-7.
- Lee, A. S., Finkielman, J. D., Peikert, T., Hummel, A. M., Viss, M. A. , Specks, U. (2005) *A novel capture-ELISA for detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) based on c-myc peptide recognition in carboxy-terminally tagged recombinant neutrophil serine proteases*. J Immunol Methods, 307: 62-72.

- Leid, R. W., Ballieux, B. E., van der Heijden, I., Kleyburg-van der Keur, C., Hagen, E. C., van Es, L. A., van der Woude, F. J. & Daha, M.R. (1993) *Cleavage and inactivation of human C1 inhibitor by the human leukocyte proteinase, proteinase 3*. Eur J Immunol, 23: 2939-44.
- Liang, B. & Mamula, M.J. (2000) *Molecular mimicry and the role of B lymphocytes in the processing of autoantigens*. Cell Mol Life Sci, 57: 561-8.
- Lieberman J., Mittman C., Gordon H.W. (1972) . Science, 175: 63-65.
- Liu, W., Xiong, Y. , Gossen, M. (2006) *Stability and homogeneity of transgene expression in isogenic cells*. J Mol Med, 84: 57-64.
- Lomas, D. A., Evans, D. L., Finch, J. T. , Carrell, R.W. (1992) *The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver*. Nature, 357: 605-607.
- Maskos, K., Huber-Wunderlich, M. , Glockshuber, R. (2003) *DsbA and DsbC-catalyzed oxidative folding of proteins with complex disulfide bridge patterns in vitro and in vivo*. J Mol Biol, 325: 495-513.
- McGuire, M. J., Lipsky, P. E. & Thiele, D.L. (1993) *Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I*. J Biol Chem, 268: 2458-67.
- McKenna, W. J., Sadoul, N., Slade, A. K. , Saumarez, R.C. (1994) *The prognostic significance of nonsustained ventricular tachycardia in hypertrophic cardiomyopathy*. Circulation, 90: 3115-3117.
- Melberg, A., Oldfors, A., Blomstrom-Lundqvist, C., Stalberg, E., Carlsson, B., Larsson, E., Lidell, C., Eeg-Olofsson, K., Wikstrom, G., Henriksson, K. , Dahl, N. (1999) *Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy linked to chromosome 10q*. Ann Neurol, 46: 684-692.
- Mestroni, L., Maisch, B., McKenna, W. J., Schwartz, K., Charron, P., Rocco, C., Tesson, F., Richter, A., Wilke, A. , Komajda, M. (1999) *Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy*. Eur Heart J, 20: 93-102.
- Meyer, T. S. , Lamberts, B.L. (1965) *Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips*. Biochim Biophys Acta, 107: 144-145.
- Muller Kobold, A. C., Kallenberg, C. G. & Tervaert, J.W. (1998) *Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis*. Br J Rheumatol, 37: 901-7.
- Murakami, M., Karnik, S. S. , Husain, A. (1995) *Human prochymase activation. A novel role for heparin in zymogen processing*. J Biol Chem, 270: 2218-2223.
- Nakajima, K., Powers, J. C., Ashe, B. M. , Zimmerman, M. (1979) *Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site*. J Biol Chem, 254: 4027-4032.

- Nakashima, N., Tamura, Z., Okamoto, S., Goto, H. (1970) *Inclusion bodies in human neuromuscular disorder*. Arch Neurol, 22: 270-278.
- Nassberger, L., Jonsson, H., Sjöholm, A. G., Sturfelt, G. & Heubner, A. (1989) *Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus*. Lancet, 1: 509.
- Nattel, S., Schott, J. (2005) *Arrhythmogenic right ventricular dysplasia type 1 and mutations in transforming growth factor beta3 gene regulatory regions: a breakthrough?*. Cardiovasc Res, 65: 302-304.
- Niles, A. L., Maffitt, M., Haak-Frendscho, M., Wheelless, C. J. & Johnson, D.A. (1998) *Recombinant human mast cell tryptase beta: stable expression in Pichia pastoris and purification of fully active enzyme*. Biotechnol Appl Biochem, 28 ( Pt 2): 125-31.
- Ogushi, F., Hubbard, R. C., Fells, G. A., Casolaro, M. A., Curiel, D. T., Brantly, M. L., Crystal, R.G. (1988) *Evaluation of the S-type of alpha-1-antitrypsin as an in vivo and in vitro inhibitor of neutrophil elastase*. Am Rev Respir Dis, 137: 364-370.
- Ohlsson, K. & Olsson, I. (1973) *The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases*. Eur J Biochem, 36: 473-81.
- Olson, T. M., Illenberger, S., Kishimoto, N. Y., Huttelmaier, S., Keating, M. T., Jockusch, B.M. (2002) *Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy*. Circulation, 105: 431-437.
- Owen, M. C. & Carrell, R.W. (1977) *alpha-1-Antitrypsin: sequence of the Z variant tryptic peptide*. FEBS Lett, 79: 245-7.
- Padrines, M., Wolf, M., Walz, A. & Baggiolini, M. (1994) *Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3*. FEBS Lett, 352: 231-5.
- Paulin, D., Li, Z. (2004) *Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle*. Exp Cell Res, 301: 1-7.
- Pendergraft, W. F. 3., Preston, G. A., Shah, R. R., Tropsha, A., Carter, C. W. J., Jennette, J. C. & Falk, R.J. (2004) *Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3*. Nat Med, 10: 72-9.
- Peters, S., Peters, H., Thierfelder, L. (1999) *Heart failure in arrhythmogenic right ventricular dysplasia-cardiomyopathy*. Int J Cardiol, 71: 251-256.
- Pettersson, E. E., Sundelin, B. & Heigl, Z. (1995) *Incidence and outcome of pauci-immune necrotizing and crescentic glomerulonephritis in adults*. Clin Nephrol, 43: 141-9.
- Pfister, H. (2002). *Wegener'sche Granulomatose: Untersuchung zur Rolle zytoplasmatischer Neutrophilen-Autoantikörper und deren Zielantigen Proteinase 3 sowie Neutrophilen-Elastase bei Entzündungsprozessen in der Maus*. Dissertation

- Pfister, H., Ollert, M., Frohlich, L. F., Quintanilla-Martinez, L., Colby, T. V., Specks, U., Jenne, D.E. (2004) *Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo*. Blood, 104: 1411-1418.
- Pham, C. T. & Ley, T.J. (1999) *Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 8627-32.
- Raina, S., Missiakas, D. (1997) *Making and breaking disulfide bonds*. Annu Rev Microbiol, 51: 179-202.
- Rao, N. V., Rao, G. V., Marshall, B. C. & Hoidal, J.R. (1996) *Biosynthesis and processing of proteinase 3 in U937 cells. Processing pathways are distinct from those of cathepsin G*. J Biol Chem, 271: 2972-8.
- Rao, N. V., Wehner, N. G., Marshall, B. C., Gray, W. R., Gray, B. H., Hoidal, J.R. (1991a) *Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties*. J Biol Chem, 266: 9540-9548.
- Rao, N. V., Wehner, N. G., Marshall, B. C., Sturrock, A. B., Huecksteadt, T. P., Rao, G. V., Gray, B. H. & Hoidal, J.R. (1991b) *Proteinase-3 (PR-3): a polymorphonuclear leukocyte serine proteinase*. Ann N Y Acad Sci, 624: 60-8.
- Rarok, A. A., Limburg, P. C. & Kallenberg, C.G.M. (2003a) *Neutrophil-activating potential of antineutrophil cytoplasm autoantibodies*. J Leukoc Biol, 74: 3-15.
- Rarok, A. A., van der Geld, Y. M., Stegeman, C. A., Limburg, P. C., Kallenberg, C.G.M. (2003b) *Diversity of PR3-ANCA epitope specificity in Wegener's granulomatosis. Analysis using the biosensor technology*. J Clin Immunol, 23: 460-468.
- Rietsch, A., Belin, D., Martin, N., Beckwith, J. (1996) *An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 13048-13053.
- Robache-Gallea, S., Morand, V., Bruneau, J. M., Schoot, B., Tagat, E., Realo, E., Chouaib, S. & Roman-Roman, S. (1995) *In vitro processing of human tumor necrosis factor-alpha*. J Biol Chem, 270: 23688-92.
- Rooney, C. P., Taggart, C., Coakley, R., McElvaney, N. G., O'Neill, S.J. (2001) *Anti-proteinase 3 antibody activation of neutrophils can be inhibited by alpha1-antitrypsin*. Am J Respir Cell Mol Biol, 24: 747-754.
- Rudolph, R., Lilie, H. (1996) *In vitro folding of inclusion body proteins*. FASEB J, 10: 49-56. review.
- Russell, K. A., Fass, D. N. & Specks, U. (2001) *Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with the pro form of proteinase 3 and disease activity in patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis*. Arthritis Rheum, 44: 463-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, A laboratory manual, second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, : .
- Sanger, F. S., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) *DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA, 74: 5463-5467.

- Savage, C. O. S., Harper, L. & Holland, M. (2002) *New findings in pathogenesis of antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis*. *Curr Opin Rheumatol*, 14: 15-22.
- Savage, C. O., Harper, L., Cockwell, P., Adu, D. & Howie, A.J. (2000) *ABC of arterial and vascular disease: vasculitis*. *BMJ*, 320: 1325-8.
- Savige, J. A., Chang, L., Cook, L., Burdon, J., Daskalakis, M. , Doery, J. (1995) *Alpha 1-antitrypsin deficiency and anti-proteinase 3 antibodies in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis*. *Clin Exp Immunol*, 100: 194-197.
- Savige, J., Dimech, W., Fritzler, M., Goeken, J., Hagen, E. C., Jennette, J. C., McEvoy, R., Pusey, C., Pollock, W., Trevisin, M., Wiik, A. & Wong, R. (2003) *Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases*. *Am J Clin Pathol*, 120: 312-8.
- Scheich, C., Niesen, F. H., Seckler, R. , Bussow, K. (2004) *An automated in vitro protein folding screen applied to a human dynactin subunit*. *Protein Sci*, 13: 370-380.
- Schreiber, A., Busjahn, A., Luft, F. C. & Kettritz, R. (2003) *Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined*. *J Am Soc Nephrol*, 14: 68-75.
- Segelmark, M., Baslund, B. & Wieslander, J. (1994) *Some patients with anti-myeloperoxidase autoantibodies have a C-ANCA pattern*. *Clin Exp Immunol*, 96: 458-65.
- Segelmark, M., Elzouki, A. N., Wieslander, J. , Eriksson, S. (1995) *The PiZ gene of alpha 1-antitrypsin as a determinant of outcome in PR3-ANCA-positive vasculitis*. *Kidney Int*, 48: 844-850.
- Selcen, D. , Engel, A.G. (2003) *Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations*. *Ann Neurol*, 54: 804-810.
- Selcen, D. , Engel, A.G. (2004) *Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy*. *Neurology*, 62: 1363-1371.
- Selcen, D. , Engel, A.G. (2005) *Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans*. *Ann Neurol*, 57: 269-276.
- Selcen, D., Ohno, K. , Engel, A.G. (2004) *Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients*. *Brain*, 127: 439-451.
- Selga, D., Segelmark, M., Wieslander, J., Gunnarsson, L. , Hellmark, T. (2004) *Epitope mapping of anti-PR3 antibodies using chimeric human/mouse PR3 recombinant proteins*. *Clin Exp Immunol*, 135: 164-172.
- Skubitz, K. M., Stroncek, D. F. & Sun, B. (1991) *Neutrophil-specific antigen NBI is anchored via a glycosyl-phosphatidylinositol linkage*. *J Leukoc Biol*, 49: 163-71.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D.C. (1985) *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 150: 76-85.

- Sone, M., Akiyama, Y., Ito, K. (1997) *Differential in vivo roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds*. J Biol Chem, 272: 10349-10352.
- Specks, U. (2000) *What you should know about PR3-ANCA. Conformational requirements of proteinase 3 (PR3) for enzymatic activity and recognition by PR3-ANCA*. Arthritis Res, 2: 263-7.
- Specks, U., Fass, D. N., Fautsch, M. P., Hummel, A. M., Viss, M.A. (1996) *Recombinant human proteinase 3, the Wegener's autoantigen, expressed in HMC-1 cells is enzymatically active and recognized by c-ANCA*. FEBS Lett, 390: 265-270.
- Specks, U., Fass, D. N., Finkielman, J. D., Hummel, A. M., Viss, M. A., Litwiller, R. D., McDonald, C.J. (2007) *Functional significance of Asn-linked glycosylation of proteinase 3 for enzymatic activity, processing, targeting, and recognition by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*. J Biochem (Tokyo), 141: 101-112.
- Stroud, R. M. (1974) *A family of protein-cutting proteins*. Sci Am, 231: 74-88.
- Stryer L (1995). Biochemie, 4. Auflage.; Spektrum.
- Sturrock, A. B., Espinosa, R. 3., Hoidal, J. R. & Le Beau, M.M. (1993) *Localization of the gene encoding proteinase-3 (the Wegener's granulomatosis autoantigen) to human chromosome band 19p13.3*. Cytogenet Cell Genet, 64: 33-4.
- Sun, J., Fass, D. N., Hudson, J. A., Viss, M. A., Wieslander, J., Homburger, H. A., Specks, U. (1998a) *Capture-ELISA based on recombinant PR3 is sensitive for PR3-ANCA testing and allows detection of PR3 and PR3-ANCA/PR3 immunocomplexes*. J Immunol Methods, 211: 111-123.
- Sun, J., Fass, D. N., Viss, M. A., Hummel, A. M., Tang, H., Homburger, H. A., Specks, U. (1998b) *A proportion of proteinase 3 (PR3)-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) only react with PR3 after cleavage of its N-terminal activation dipeptide*. Clin Exp Immunol, 114: 320-326.
- Syrris, P., Ward, D., Asimaki, A., Evans, A., Sen-Chowdhry, S., Hughes, S. E., McKenna, W.J. (2007) *Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease*. Eur Heart J, 28: 581-588.
- Syrris, P., Ward, D., Evans, A., Asimaki, A., Gandjbakhch, E., Sen-Chowdhry, S., McKenna, W.J. (2006) *Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2*. Am J Hum Genet, 79: 978-984.
- Taekema-Roelvink, M. E., van Kooten, C., Janssens, M. C., Heemskerk, E. & Daha, M.R. (1998) *Effect of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies on proteinase 3-induced apoptosis of human endothelial cells*. Scand J Immunol, 48: 37-43.
- Tal, T., Sharabani, M. & Aviram, I. (1998) *Cationic proteins of neutrophil azurophilic granules: protein-protein interaction and blockade of NADPH oxidase activation*. J Leukoc Biol, 63: 305-11.

- Tervaert, J. W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H. & Kallenberg, C. (1993) *Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders*. Ann Rheum Dis, 52: 115-20.
- Thiene, G., Nava, A., Corrado, D., Rossi, L., Pennelli, N. (1988) *Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people*. N Engl J Med, 318: 129-133.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 76: 4350-4354.
- Travis, J., Pannell, R. (1973) *Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography*. Clin Chim Acta, 49: 49-52.
- van de Wiel, B. A., Dolman, K. M., van der Meer-Gerritsen, C. H., Hack, C. E., von dem Borne, A. E. & Goldschmeding, R. (1992) *Interference of Wegener's granulomatosis autoantibodies with neutrophil Proteinase 3 activity*. Clin Exp Immunol, 90: 409-14.
- van der Geld, Y. M., Limburg, P. C., Kallenberg, C.G. (1999) *Characterization of monoclonal antibodies to proteinase 3 (PR3) as candidate tools for epitope mapping of human anti-PR3 autoantibodies*. Clin Exp Immunol, 118: 487-496.
- van der Geld, Y. M., Limburg, P. C. & Kallenberg, C.G. (2001) *Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen*. J Leukoc Biol, 69: 177-90.
- van der Geld, Y. M., Oost-Kort, W., Limburg, P. C., Specks, U., Kallenberg, C.G. (2000) *Recombinant proteinase 3 produced in different expression systems: recognition by anti-PR3 antibodies*. J Immunol Methods, 244: 117-131.
- Van Der Geld, Y. M., Simpelaar, A., Van Der Zee, R., Tervaert, J. W., Stegeman, C. A., Limburg, P. C., Kallenberg, C.G. (2001) *Antineutrophil cytoplasmic antibodies to proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: epitope analysis using synthetic peptides*. Kidney Int, 59: 147-159.
- van der Geld, Y. M., Tool, A. T. J., Videler, J., de Haas, M., Tervaert, J. W. C., Stegeman, C. A., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G. M. & Roos, D. (2002) *Interference of PR3-ANCA with the enzymatic activity of PR3: differences in patients during active disease or remission of Wegener's granulomatosis*. Clin Exp Immunol, 129: 562-70.
- van der Woude, F. J., Rasmussen, N., Lobatto, S., Wiik, A., Permin, H., van Es, L. A., van der Giessen, M., van der Hem, G. K. & The, T.H. (1985) *Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis*. Lancet, 1: 425-9.
- Vatta, M., Mohapatra, B., Jimenez, S., Sanchez, X., Faulkner, G., Perles, Z., Sinagra, G., Lin, J., Vu, T. M., Zhou, Q., Bowles, K. R., Di Lenarda, A., Schimmenti, L., Fox, M., Chrisco, M. A., Murphy, R. T., McKenna, W., Elliott, P., Bowles, N. E., Chen, J., Valle, G., Towbin, J.A. (2003) *Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction*. J Am Coll Cardiol, 42: 2014-2027.
- Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M. C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J. M., Paulin, D., Fardeau, M. (1998) *A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy*. Nat Genet, 20: 92-95.

- von Vietinghoff, S., Busjahn, A., Schonemann, C., Massenkeil, G., Otto, B., Luft, F. C. & Kettritz, R. (2006) *Major histocompatibility complex HLA region largely explains the genetic variance exercised on neutrophil membrane proteinase 3 expression*. J Am Soc Nephrol, 17: 3185-91.
- von Vietinghoff, S., Tunnemann, G., Eulenberg, C., Wellner, M., Cristina Cardoso, M., Luft, F. C. & Kettritz, R. (2007) *NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils*. Blood, 109: 4487-93.
- Watts, R. A., Carruthers, D. M. & Scott, D.G. (1995) *Epidemiology of systemic vasculitis: changing incidence or definition?*. Semin Arthritis Rheum, 25: 28-34.
- Wegener F. (1939) *Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und den Nieren*. Beitr Pathol Anat Allg Pathol, 102: 36-68.
- Weiss, S. J. (1989) *Tissue destruction by neutrophils*. N Engl J Med, 320: 365-376.
- Wiedow, O., Luademann, J. & Utecht, B. (1991) *Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3*. Biochem Biophys Res Commun, 174: 6-10.
- Wiesner, O., Russell, K. A., Lee, A. S., Jenne, D. E., Trimarchi, M., Gregorini, G. & Specks, U. (2004) *Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis*. Arthritis Rheum, 50: 2954-65.
- Wiik, A. (1989) *Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA*. APMIS Suppl, 6: 12-3.
- Wilde, C. G., Snable, J. L., Griffith, J. E. & Scott, R.W. (1990) *Characterization of two azurophil granule proteases with active-site homology to neutrophil elastase*. J Biol Chem, 265: 2038-41.
- Wilharm, E., Parry, M. A., Friebel, R., Tschesche, H., Matschiner, G., Sommerhoff, C. P. , Jenne, D.E. (1999) *Generation of catalytically active granzyme K from Escherichia coli inclusion bodies and identification of efficient granzyme K inhibitors in human plasma*. J Biol Chem, 274: 27331-27337.
- Williams, R. C. J., Staud, R., Malone, C. C., Payabyab, J., Byres, L. , Underwood, D. (1994) *Epitopes on proteinase-3 recognized by antibodies from patients with Wegener's granulomatosis*. J Immunol, 152: 4722-4737.
- Wilson, C. M. (1983) *Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures*. Methods Enzymol, 91: 236-247.
- Winter, J., Neubauer, P., Glockshuber, R. , Rudolph, R. (2001) *Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of Escherichia coli by fusion to DsbA*. J Biotechnol, 84: 175-185.
- Witko-Sarsat, V., Cramer, E. M., Hieblot, C., Guichard, J., Nusbaum, P., Lopez, S., Lesavre, P. & Halbwachs-Mecarelli, L. (1999) *Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules*. Blood, 94: 2487-96.
- Witko-Sarsat, V., Halbwachs-Mecarelli, L., Almeida, R. P., Nusbaum, P., Melchior, M., Jamaledine, G., Lesavre, P.,



- 
- Descamps-Latscha, B. & Gabay, J.E. (1996) *Characterization of a recombinant proteinase 3, the autoantigen in Wegener's granulomatosis and its reactivity with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies*. FEBS Lett, 382: 130-6.
- Wolburg, H., Schlote, W., Langohr, H. D., Peiffer, J., Reiher, K. H. , Heckl, R.W. (1982) *Slowly progressive congenital myopathy with cytoplasmic bodies--report of two cases and a review of the literature*. Clin Neuropathol, 1: 55-66.
- Xavier, K. A. , Willson, R.C. (1998) *Association and dissociation kinetics of anti-hen egg lysozyme monoclonal antibodies HyHEL-5 and HyHEL-10*. Biophys J, 74: 2036-2045.
- Yang, J. J., Kettritz, R., Falk, R. J., Jennette, J. C. & Gaido, M.L. (1996) *Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase*. Am J Pathol, 149: 1617-26.
- Yoshida, A., Lieberman, J., Gaidulis, L. & Ewing, C. (1976) *Molecular abnormality of human alpha1-antitrypsin variant (Pi-ZZ) associated with plasma activity deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 73: 1324-8.
- Zhao, M. H. & Lockwood, C.M. (1996) *Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis*. Clin Exp Immunol, 103: 397-402.
- Zhou, Y., Giscoombe, R., Huang, D. & Lefvert, A.K. (2002) *Novel genetic association of Wegener's granulomatosis with the interleukin 10 gene*. J Rheumatol, 29: 317-20.
- Zimmer, M., Medcalf, R. L., Fink, T. M., Mattmann, C., Lichter, P. , Jenne, D.E. (1992) *Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 89: 8215-8219.

# Anhang

## 1. Abkürzungen

A	Adenin
A	Absorption
Abb.	Abbildung
(c/p/a) ANCA	(zytoplasmatische/perinukleäre/atypische) Anti-Neutrophile-zytoplasmatische-Antikörper ( <i>anti neutrophil cytoplasmic antibody</i> )
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
Azu	Azurozidin
BPI	Bakterizides, Permeabilität steigerndes Protein ( <i>bacterial permeability increasing protein</i> )
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Cat (C/G)	Cathepsin (C/G)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
chimpPR3	Schimpansen-PR3
CSS	Churg-Strauss-Syndrom
dd	Doppelt destilliert
dd H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dl	deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxy ribonucleic acid</i> )
DTE	Dithioerythritol
E. coli	Escherichia coli
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylene diamine tetra acetic acid</i> )
EK	Enterokinase
ELISA	Festphasenimmunoassay ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FPLC	fast protein liquid chromatography
FRT	<i>Flp-Recombination target</i> Sequenz
g	Gramm
g	Gravitationskonstante

---

G	Guanin
gibPR3	Gibbon-PR3
Gly	Glycin
Gzm	Granzym
HCl	Salzsäure
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
(h)NE	(humane) Neutrophilen-Elastase
hPR3	humane PR3
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IB	<i>inclusion body</i> , Einschlusskörperchen
ICAM 1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Galaktosid
K <sub>ass</sub>	Assoziationskonstante
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani (-Medium)
M	Mol
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
MPA	mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
mPR3	Maus-PR3
mulPR3	Makakken-PR3
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
Ni	Nickel
nM	Nanomol

---

nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pI	isoelektrischer Punkt
PR3	Proteinase 3
$\alpha_1$ -PI	alpha <sub>1</sub> -Proteinase-Inhibitor
PVDF	Polyvinylidenflourid
RCL	<i>reactive centre loop</i>
rek.	rekombinant
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
T	Thymin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TEV	tobacco etch virus
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i>
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
VCAM	<i>vascular adhesion molecule 1</i>
WG	Wegener`sche Granulomatose

## 2. PR3 Nukleotid- und Aminosäuresequenz

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von humaner PR3 und Gibbon-PR3. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt. Das Stopcodon ist durch einen \* angedeutet.

### Humane PR3

```

5` atcgtgggcggtcacgaggcgagccacactcccggcctacatggcctccctgcagatg
 1 I V G G H E A Q P H S R P Y M A S L Q M      20
   cgggggaacccgggcagccacttctgctggaggcaccttgatccaccccagcttctgtgctg
21 R G N P G S H F C G G T L I H P S F V L      40
   acggccgcgcactgcctgctgggacataccccagcgcctgggtaacgtgggtgctcggagcc
41 T A A H C L R D I P Q R L V N V V L G A      60
   cacaacgtgctggacgcaggagccacccagcagcacttctcgggtggctcaggtgtttctg
61 H N V R T Q E P T Q Q H F S V A Q V F L      80
   aacaactacgacgctgggagaacaaactgaacgacatttctctcatccagctgagcagccca
81 N N Y D A E N K L N D I L L I Q L S S P     100
   gccaacctcagtgctcctccgtcgccacagtccagctgccacagcaggaccagccagtgccc
101 A N L S A S V A T V Q L P Q Q D Q P V P     120
   cacggcaccacagtgcttgccatgggctggggccgctgggtgcccacgacccccagcc
121 H G T Q C L A M G W G R V G A H D P P A     140
   caggtcctgcaggagctcaatgtcacctgggtcaccttcttctgcccggccacataacatt
141 Q V L Q E L N V T V V T F F C R P H N I     160
   tgcactttcgtccctcgccgcaaggccggcatctgcttcggagactcaggtggccccctg
161 C T F V P R R K A G I C F G D S G G P L     180
   atctgtgatggcatcatccaaggaatagactccttcgtgatctggggatgtgccaccgcg
181 I C D G I I Q G I D S F V I W G C A T R     200
   cttttccctgacttcttcacgctggtagccctctacgtggactggatccgttctaccctg
201 L F P D F F T R V A L Y V D W I R S T L     220
   cgtaa
221 R *
3`

```

**Gibbon-PR3**

```

5` atcgtgggcgggcagcagggcgagccacactcccggccctacatggcctccctgcaggtg
1  I V G G H E A Q P H S R P Y M A S L Q V      20
   cgggggagcctggggcagccacttctgcgaggcaccttgatccaccccagcttcgtgctg
21  R G S L G S H F C G G T L I H P S F V L      40
   acggccgcgcaactgcctgcaggacataccccaccgcctgggtaacgtgggtgctcggagcc
41  T A A H C L Q D I P H R L V N V V L G A      60
   cataacgtgcagacgcaggagcccaccagcagcacttctcgggtggctcaagtgtttcag
61  H N V Q T Q E P T Q Q H F S V A Q V F Q      80
   aacaactacgacgctgagaacaaactcaacgacgttctcctcatccagctgagcagcccg
81  N N Y D A E N K L N D V L L I Q L S S P      100
   gccaacctcagtgccctccgtcgccacagtccagctgccacagcaggaccagccagtgccc
101 A N L S A S V A T V Q L P Q Q D Q P V P      120
   cacggcaccagtgccctggccatgggctggggccgctggggcacccatgacccccagcc
121 H G T Q C L A M G W G R V G T H D P P A      140
   caggtcctgcaggagctcaatgtcacctgggtcaccttctgtgcccggccacataacatt
141 Q V L Q E L N V T V V T F L C R P H N I      160
   tgcactttcgtccctcgccgcccggcgcctctgcttcggagactcaggtggccccctg
161 C T F V P R R G A G I C F G D S G G P L      180
   atctgtgacggcgctcatccagggagtagactccttcgtgatccgggcatgtgccaccgc
181 I C D G V I Q G V D S F V I R A C A T R      200
   catttccccgacttcttcgcacgggtcgccctctacgtggactggatccgttctaccctg
201 H F P D F F A R V A L Y V D W I R S T L      220
   cgtaa                                          3`
221 R *

```

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Kuhl
Vorname	Angelika
Geburtsdatum	15.07.1977
Geburtsort	Offenbach/Main

---

## Schule

1984 - 1988	Grundschule
1988 - 1997	Karl-Rehbein-Gymnasium, Hanau

---

## Studium

1998-2003	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
05/1998 - 04/2000	Grundstudium der Biologie
10.04.2000	Vordiplom Biologie
05/2000 - 02/2003	Hauptstudium der Biologie mit den Schwerpunkten Biochemie, Zell- und Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie
04/2002 - 02/2003	Diplomarbeit am Institut für Biochemie. Thema: „Funktionsanalyse von Replikationsproteinen mittels siRNA“
07.02.2003	Diplom-Biologin
07/2003 - 8/2007	Forschungsarbeit im Rahmen der Promotion am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried

---

## Berufliche Erfahrung

seit 9/2007	Postdoc bei Roche Diagnostics, Penzberg
-------------	---

---

## Publikationen

Aus der vorliegenden Dissertation ging hervor:

Jenne D. E., Kuhl A. (2006) *Production and applications of recombinant proteinase 3, Wegener's autoantigen: problems and perspectives*. Clin. Nephrol., 66: 153-9, review

Kuhl A., Melberg A., Meinel E., Nürnberg G., Nürnberg P., Kehrer-Sawatzki H., Jenne D.E., (2007) *Myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 7 (ARVC7): corroboration and narrowing of the critical region on 10q22.3*. EJHG, akzeptiert



---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2003 bis August 2007 am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dieter Jenne für die Betreuung dieser Arbeit, seine engagierte Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit, eigene Ideen zu verwirklichen.

Bei Prof. Dr. Georg Krohne möchte ich mich für die Betreuung seitens der Universität Würzburg und die unkomplizierte Übernahme des "Doktorvaters" bedanken.

Bert Utecht danke ich für die intensive Zusammenarbeit und seine unermüdliche Hilfe im Bereich der rekombinanten Proteinexpression.

Bei Dr. Edgar Meinl und Dr. Klaus Maskos möchte ich mich für die Übernahme des Doktorandenkomitees bedanken und die vielen Tips und Tricks bei der Protein-Rückfaltung.

Den Jungs, Edward Fellows und Kai Kessenbrock, aus dem "Jenne"-Labor danke ich für die unterhaltsamen Stunden zwischen den einzelnen Experimenten und Brice Korkmaz für seine Hilfe in der Zellkultur und der Proteinaufreinigung. Bei Lisa Stegmann und Irene Arnold-Ammer möchte ich mich für ihre technische Unterstützung und die netten Abende am dezentralen Sitzplatz bedanken.

Danken möchte ich auch Sabine Seitz und Anja Hanisch für die kleinen Auszeiten im "ZdB" und ihr offenes Ohr in allen Lebenslagen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und dem Dreizehenfaultier für ihre konsequente Unterstützung außerhalb des Labors, ihre aufmunternden Worte besonders in frustrierenden Zeiten und die gemeinsam verbrachten Stunden, die Abwechslung und Ausgleich zum Laboralltag schafften und durch die diese Arbeit erleichtert wurde, bedanken.

Angelika