

Dissertation

**Kernmagnetresonanzspektroskopische
Untersuchungen der Dynamik von HLA-B*27**

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Martin Ballaschk,
geboren in Cottbus

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich
Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

Berlin, 2016

Angefertigt von Januar 2011 bis Dezember 2015 am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie unter der Anleitung von Dr. Peter Schmieder.

Erstgutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat (Freie Universität Berlin)
Zweitgutachter: Prof. Dr. Christian Freund (Freie Universität Berlin)
Tag der Disputation: 24. Oktober 2016

Danksagung

Diese Arbeit ist unter der Betreuung von Dr. Peter Schmieder entstanden, der mich mit schier unerschöpflicher Geduld unterstützt hat und dem ich dafür von ganzem Herzen danken möchte.

Prof. Andreas Ziegler und Dr. Barbara Uchanska-Ziegler danke ich für die Mitbetreuung des Projekts und Christina Schnick für die Präparation zahlreicher Proben.

Monika Beerbaum und Brigitte Schlegel danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Bedienung der Spektrometer, der Programmierung von Pulssequenzen und der angenehmen Arbeitsatmosphäre im Büro.

Bei Prof. Hartmut Oschkinat möchte ich mich für die Unterstützung des Promotionsvorhabens und die Aufnahme in seinen Arbeitskreis bedanken.

Bei Dr. Anne Diehl und ihrem Laborteam, insbesondere aber bei Natalja Erdmann, Lieselotte Handel und Martina Leidert bedanke ich mich für die umfangreiche Unterstützung bei meiner Arbeit.

Prof. Christian Freund danke ich für seinen Rat und sein Engagement in meinem Promotionskomitee.

Meinen Kollegen Dr. Matthias Dorn, Dr. Marcel Jurk, Dr. Marco Röben und Nancy Bittermann möchte ich vor allem für die Unterstützung in der Anfangsphase der Arbeit danken.

Der gesamten AG Oschkinat, allen voran Dr. Anja Voreck, Mahsheed Sohrabi, Dr. Matthias Hiller und allen anderen Kollegen aus der Abteilung danke ich für die freundliche und stets hilfsbereite Atmosphäre und die vielen Diskussionen und Gespräche.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während der gesamten Zeit, in der diese Arbeit angefertigt wurde.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Struktur und Funktion von MHC-Proteinen und HLA-B*27	2
1.2	Der Einfluss der Proteindynamik auf die Immunsynapse	5
1.3	Ankylosierende Spondylitis und die Rolle der Gene	6
1.4	Der Einzelnukleotidpolymorphismus von HLA-B*27:05 und B*27:09	9
1.5	β_2 -Mikroglobulin aus dem Haushuhn	12
1.6	Kernmagnetische Resonanz	13
1.6.1	Relaxation	15
1.6.2	Der <i>model-free</i> -Formalismus	17
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.2	Erzeugung von Plasmiden zur Herstellung der Peptide pVIPR und TIS	29
2.2.1	Vervielfältigung des Inserts	29
2.2.2	Restriktionsverdau	31
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion von DNA	31
2.2.4	Ligation	31
2.2.5	Plasmid-Vervielfältigung	32
2.3	Kultivierung, Expression	32
2.3.1	Transformation	32
2.3.2	Herstellung von Glycerol-Dauerkulturen	32
2.3.3	Expression in Schüttelkolben	32
2.3.4	Expression im HCDF-System	33
2.4	Biochemische und präparative Methoden	34
2.4.1	Zellernte, Zellaufschluss und Lagerung	34
2.4.2	Lösen der Einschlusskörperchen	34
2.4.3	Rückfaltung und HLA-Komplexbildung	35
2.4.4	Konzentration der gefalteten Proteine und Puffertausch	35
2.4.5	Gelpermeationschromatographie	35
2.4.6	Metallchelatchromatographie	36
2.4.7	Proteolytische Spaltung der Fusionsproteine mit YUH1-Hydrolase	36
2.4.8	Hochleistungs-Flüssigchromatographie	37
2.4.9	Peptidisolierung mittels Ultrafiltration und Festphasenextraktion	37
2.4.10	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels UV-Spektroskopie	38
2.4.11	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.5	NMR-Experimente	39
2.5.1	Aufnahme der NMR-Daten	39
2.5.2	Prozessierung der spektralen Daten	42
2.5.3	Datenverarbeitung, statistische Methoden	43

2.5.4	<i>Model-free</i> -Analyse	43
2.5.5	Vorbereitung der PDB-Strukturen	45
2.5.6	Vorhersage von Diffusions- und Relaxationsverhalten von Molekülen	45
2.5.7	Sonstige verwendete Software.	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Probenherstellung	47
3.1.1	Isotopenmarkierte Peptide	47
3.1.2	Herstellung der HLA-Komplexe	49
3.2	Zuordnung der HLA-gebundenen Peptide	51
3.3	Implementierung der NMR-Experimente	52
3.3.1	Pulsprogramme zur Relaxationsanalyse	52
3.3.2	Temperaturkontrolle	56
3.4	Analyse der HLA-Komplexe	59
3.4.1	Zuordnung, Charakterisierung der Linienbreiten und Zahl der Signale der schweren Ketten	59
3.4.2	Zuordnung der Methylgruppen der schweren Ketten	65
3.4.3	Relaxationsanalyse der schweren Ketten und β_2 -Mikroglobulin	72
3.4.4	Konsistenz der Relaxationsdaten	77
3.4.5	Vorhersage der Relaxations- und Diffusionsverhaltens	77
3.4.6	<i>Model-free</i> -Analyse der schweren Kette und des β_2 -Mikroglobulin	80
3.5	Vergleich der freien β_2 -Mikroglobuline aus dem Menschen und dem Huhn	95
3.5.1	Zuordnung der Peptidrückgrat-Signale β_2 -Mikroglobulin aus dem Huhn	95
3.5.2	Relaxationsanalyse der freien β_2 -Mikroglobuline	97
3.5.3	Konsistenz der Relaxationsdaten der freien β_2 -Mikroglobuline	97
3.5.4	<i>Model-free</i> -Analyse der freien β_2 -Mikroglobuline	101
4	Diskussion	107
4.1	Die Proteinstruktur der HLA-Komplexe ist sehr ähnlich und doch unterschiedlich	107
4.2	Die Dynamik der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne ist Liganden- und Subtyp-abhängig	108
4.3	Die $\alpha 3$ -Domäne kann sich vom Rest des Komplexes lösen und wird dynamisch unabhängig	111
4.4	β_2 -Mikroglobulin im Komplex ist strukturell und dynamisch wenig variabel	112
4.5	Die Dynamik des Peptids ist subtypabhängig variabel	113
4.6	Schlussfolgerungen aus der dynamischen Analyse der HLA-Komplexe	114
4.7	Vergleich der freien β_2 -Mikroglobuline	116
4.8	Etablierung eines Peptid-Expressionssystem	117
4.9	Zusammenfassung der Diskussion und Perspektive	118
	Zusammenfassung	121
	Anhang	139
1	Intensitäten der HN-TROSY-Spektren	141
2	Chemische Verschiebungen der schweren Ketten	143
3	Chemische Verschiebungen von β_2 -Mikroglobulin aus dem Huhn	145
4	Relaxationsdaten der HLA-Komplexe	146
5	Ergebnisse der <i>model-free</i> -Analyse der HLA-Komplexe	171

6	Pulsprogramme für die Relaxationsmessungen	176
6.1	Longitudinale Relaxationsraten (TROSY)	176
6.2	Longitudinale Relaxationsraten (HSQC)	178
6.3	Transversale Relaxationsraten (TROSY)	180
6.4	Transversale Relaxationsrate (HSQC)	182
6.5	Hetero-NOE (TROSY)	184
6.6	Hetero-NOE (HSQC)	186
7	Verwendete Hilfsskripte	187
7.1	NMRPipe-Prozessierungsskripte	187
7.2	R-Hilfsskripte	189

Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur der Klasse-I-Komplexe und der Bindetasche.	3
1.2	Die Strukturen von humanem und aviärem β_2m	12
1.3	Modelle für die globale und lokale Bewegung.	18
2.1	Vektorkarte von pET28a und Insert.	29
3.1	HPLC-Elutionsdiagramme mit pVIPR und TIS.	48
3.2	H-N-Korrelationsspektren der Peptide pVIPR und TIS.	50
3.3	H-N-Korrelationsspektren des isotopenmarkierten Peptids TIS im Komplex.	51
3.4	^{15}N -editiertes NOESY des isotopenmarkierten TIS in B*27:09.	53
3.5	TROSY-basierte Pulsprogramme zur Bestimmung von R_1 und R_2	55
3.6	TROSY-basiertes Pulsprogramm zur Bestimmung des Hetero-NOE.	56
3.7	HSQC-basierte Pulsprogramme zur Bestimmung von R_1 , R_2 und Hetero-NOE.	57
3.8	Übersicht über Zuordnung, Sekundärstruktur, Mehrfachkonformationen.	60
3.9	Mappings des Zuordnungsstatus und Doppelkonformationen auf Rückgrat der schweren Ketten.	61
3.10	Mapping: Differenzen der chemischen Verschiebungen der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domänen.	63
3.11	Normalisierte Intensität der TROSY-Spektren gegen die Sequenz und Boxplot.	64
3.12	TROSY-Spektrum von HLA-B*27:05/pVIPR.	66
3.13	TROSY-Spektrum von HLA-B*27:05/TIS.	67
3.14	TROSY-Spektrum von HLA-B*27:09/pVIPR.	68
3.15	TROSY-Spektrum von HLA-B*27:09/TIS.	69
3.16	ILV-Methylgruppen-Spektren von selektiv markierten B*27:09 in Komplex mit pVIPR und TIS.	71
3.17	R_1 , R_2 und Hetero-NOE der schweren Ketten bei 600 MHz.	73
3.18	R_1 , R_2 und Hetero-NOE der schweren Ketten bei 750 MHz.	74
3.19	R_1 , R_2 und Hetero-NOE des β_2m bei 600 MHz.	75
3.20	R_1 , R_2 und Hetero-NOE des β_2m bei 750 MHz.	76
3.21	Konsistenztests der Relaxationsdaten der schweren Ketten.	78
3.22	Konsistenztests der Relaxationsdaten von β_2m	79
3.23	Visualisierung der Diffusionstensoren der schweren Ketten des HLA.	81
3.24	Mapping der S^2 -Werte auf die Struktur der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domänen.	86
3.25	Mapping der S^2 -Werte auf die Struktur der $\alpha 3$ -Domänen.	88
3.26	Mapping der S^2 -Werte aus den lokalen Modellen auf die Struktur der $\alpha 3$ -Domänen.	89
3.27	Mapping der S^2 -Werte auf die Struktur des β_2m	90
3.28	Mapping der R_{ex} -Werte auf die Struktur der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domänen.	92
3.29	Mapping der R_{ex} -Werte auf die Struktur der $\alpha 3$ -Domänen.	93
3.30	Mapping der R_{ex} -Werte auf die Struktur des β_2m	94

3.31	HN-HSQC des β_2m aus dem Huhn.	96
3.32	Diagramm-Darstellung der Zuordnung von β_2m aus dem Huhn.	96
3.33	R_1, R_2 und Hetero-NOE des β_2m aus Mensch und Huhn bei 600 MHz.	98
3.34	R_1, R_2 und Hetero-NOE des β_2m aus Mensch und Huhn bei 750 MHz.	99
3.35	Konsistenztests der Relaxationsdaten von freiem β_2m aus Huhn und Mensch. . .	100
3.36	<i>Model-free</i> -Parameter von β_2m aus dem Menschen und dem Huhn.	102
3.37	Tensoren von β_2m aus dem Menschen und dem Huhn.	103
3.38	S^2 -Werte von β_2m aus dem Menschen und dem Huhn.	103
3.39	R_{ex} -Werte von β_2m aus dem Menschen und dem Huhn.	105
1	Intensitäten der Signale von NH-TROSYs der schweren Ketten.	141
2	Differenzen der chemischen HN-Verschiebungen der schweren Ketten.	143
3	Chemische Verschiebungen der schweren Ketten.	144
4	Chemische Verschiebungen von β_2m aus <i>Gallus gallus</i>	145
5	R_1 der $\alpha 1$ -Domänen bei 600 MHz.	146
6	R_1 der $\alpha 2$ -Domänen bei 600 MHz.	147
7	R_1 der $\alpha 3$ -Domänen bei 600 MHz.	148
8	R_1 des β_2m bei 600 MHz.	149
9	R_2 der $\alpha 1$ -Domänen bei 600 MHz.	150
10	R_2 der $\alpha 2$ -Domänen bei 600 MHz.	151
11	R_2 der $\alpha 3$ -Domänen bei 600 MHz.	152
12	R_2 des β_2m bei 600 MHz.	153
13	Hetero-NOE der $\alpha 1$ -Domänen bei 600 MHz.	154
14	Hetero-NOE der $\alpha 2$ -Domänen bei 600 MHz.	155
15	Hetero-NOE der $\alpha 3$ -Domänen bei 600 MHz.	156
16	Hetero-NOE des β_2m bei 600 MHz.	157
17	R_1 der $\alpha 1$ -Domänen bei 750 MHz.	158
18	R_1 der $\alpha 2$ -Domänen bei 750 MHz.	159
19	R_1 der $\alpha 3$ -Domänen bei 750 MHz.	160
20	R_1 des β_2m bei 750 MHz.	161
21	R_2 der $\alpha 1$ -Domänen bei 750 MHz.	162
22	R_2 der $\alpha 2$ -Domänen bei 750 MHz.	163
23	R_2 der $\alpha 3$ -Domänen bei 750 MHz.	164
24	R_2 des β_2m bei 750 MHz.	165
25	Hetero-NOE der $\alpha 1$ -Domänen bei 750 MHz.	166
26	Hetero-NOE der $\alpha 2$ -Domänen bei 750 MHz.	167
27	Hetero-NOE der $\alpha 3$ -Domänen bei 750 MHz.	168
28	Hetero-NOE des β_2m bei 750 MHz.	169
29	Diffusionstensoren von β_2m im Komplex mit HLA, alternative Ansicht.	171
30	<i>Model-free</i> -Parameter der $\alpha 1$ -Domäne von HLA-B*27:05/09 mit pVIPR/TIS. . . .	172
31	<i>Model-free</i> -Parameter der $\alpha 2$ -Domäne von HLA-B*27:05/09 mit pVIPR/TIS. . . .	173
32	<i>Model-free</i> -Parameter der $\alpha 3$ -Domäne von HLA-B*27:05/09 mit pVIPR/TIS. . . .	174
33	<i>Model-free</i> -Parameter des β_2m in HLA-B*27:05/09 mit pVIPR/TIS.	175

Tabellenverzeichnis

1.1	Biophysikalische Untersuchungen an B*27:05 und B*27:09.	10
2.1	Verzeichnis der Hersteller.	22
2.2	Verwendete Nährmedien.	23
2.3	Sonstige Oligonukleotide.	23
2.4	Verwendete Plasmide.	23
2.5	Verwendete Puffer und Lösungen.	24
2.6	Verwendete Bakterienstämme.	25
2.7	Proteine.	25
2.8	Spezielle Chemikalien.	26
2.9	Kits.	26
2.10	Sonstige Verbrauchsmittel.	26
2.11	Verwendete Geräte.	27
2.12	Verwendete Chromatographie-Säulen.	27
2.13	Verwendete Software.	28
2.14	Heizzyklus-Parameter für der Polymerase-Kettenreaktion.	30
2.15	Verwendete Oligonukleotide für die Peptidklonierung.	30
2.16	Proteinspezifische Extinktionskoeffizienten.	38
2.17	Aufnahmeparameter der Experimente für die Zuordnung der schweren Ketten.	40
2.18	Aufnahmeparameter für die Zuordnung des Hühner- β_2m	40
2.19	Aufnahmeparameter für die Relaxationsmessungen der HLA-Proteine.	41
2.20	Aufnahmeparameter der Relaxationsmessungen der freien β_2m	42
3.1	Massenspektrometrische Bestimmung der biosynthetisch produzierten Peptide.	49
3.2	Die Wartezeiten während der R_1 - oder R_2 -Relaxation.	58
3.3	Zugeordnete, nicht zugeordneten Signale der schweren Ketten, BMRB-IDs.	60
3.4	Vorhersage des Relaxations- und Diffusionsverhaltens mit Hydromr.	80
3.5	AIC-Werte der Diffusionsmodelle für jeden der Komplexe.	82
3.7	Parameter der Diffusionstensoren der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domänen.	83
3.9	Parameter der Diffusionstensoren der $\alpha 3$ -Domänen.	83
3.11	Parameter der Diffusionstensoren von β_2m im Komplex.	84
3.13	Zahl und Prozentsatz der zugeordneten HN-Signale des β_2m aus dem Huhn.	95
3.14	Parameter der prolaten Tensoren der freien β_2 -Mikroglobuline.	101

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AS	Spondylitis ankylosans, auch: ankylosierende Spondylitis, Morbus Bechterew, engl. <i>ankylosing spondylitis</i>
ATP	Adenosyltriphosphat
β_2m	β -2-Mikroglobulin
CD	<i>cluster of differentiation</i> , „Unterscheidungsgruppe“-Molekül
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i> , Anisotropie der chemischen Verschiebung
CPMG	Carl-Purcell-Meiboom-Gill-Pulssequenz
Da	Dalton, atomare Masseneinheit
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i> , dynamische Differenzkalorimetrie
DSS	2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonat
DTT	Dithiothreitol, (2S,3S)-1,4-Bis-sulfanylbutan-2,3-diol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
FID	<i>free induction decay</i> , freier Induktionsabfall
HC	<i>heavy chain</i> , schwere Kette des HLA-Komplexes
HCDF	Hochzelldichte-Fermentationssystem
Hetero-NOE	<i>steady-state</i> $\{^1H\}$ - ^{15}N -heteronuklearer Kern-Overhauser-Effekt
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> , heteronukleare Einzelquanten-Korrelation
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochdruck-Flüssigchromatographie

HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , humanes Leukozyten-Antigen
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
LB	Luria–Bertani-Medium
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Hauptgewebekompatibilitätskomplex
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i> , Kern-Overhauser-Effekt
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetresonanz
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PES	Polyethersulfon
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Protonen bzw. Hydroniumionen
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i> , Wurzel der mittleren quadratischen Verschiebung
R_1	longitudinale Relaxationsrate
R_2	transversale Relaxationsrate
RDC	restliche dipolare Kopplungen, <i>residual dipolar couplings</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
YUH1	<i>Yeast ubiquitin hydrolase 1</i>

1 Einleitung

Seit über vierzig Jahren wird erfolglos nach der Ursache der Erkrankung Morbus Bechterew (auch: Spondylitis Ankylosans oder ankylosierende Spondylitis, AS) gesucht. Bisher steht fest, dass die Krankheit eine starke genetische Komponente hat und dass das Immunprotein HLA-B eine entscheidende Rolle spielt. HLA-B ist Teil des *major histocompatibility complex* (MHC) und präsentiert Peptidfragmente unterschiedlicher Herkunft an der Außenseite fast aller Körperzellen und ist damit eine zentrale Komponente der Immunsynapse, die der Bekämpfung von intrazellulären Krankheitserregern und Krebszellen dient.

In serologischen und genetischen Untersuchungen wurde die Allelgruppe HLA-B*27 mit einem erhöhten AS-Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht. Das Allel (auch: „Subtyp“) HLA-B*27:05 gilt dabei als der genetische Hauptrisikofaktor für AS, wogegen HLA-B*27:09 nicht mit der Erkrankung assoziiert wird. Der einzige unmittelbar erkennbare Unterschied zwischen den Allelen ist der Austausch einer Aminosäure an der Position 116 von Aspartat in HLA-B*27:05 zu Histidin in HLA-B*27:09. Kristallographische Studien ließen keine entscheidenden Unterschiede zwischen den Proteinen erkennen. Mit Hilfe von Molekulardynamik-Simulationen, Infrarotspektroskopie und Fluoreszenzdepolarisationsspektroskopie konnten jedoch Unterschiede in der internen molekularen Dynamik des Proteins detektiert werden. Diese Ansätze haben jedoch ein sehr begrenztes zeitliche oder räumliches Auflösungsvermögen.

Im Gegensatz zu den vorgenannten Methoden ist die Kernmagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie ein zeitlich und räumlich hochauflösendes Werkzeug der Strukturbiologie. Mit NMR kann man dynamische Vorgänge mit atomarer Auflösung auf Zeitskalen erfassen, die sich vom Pikosekunden- bis in den Millisekundenbereich erstrecken. Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie von großen, biologischen Makromolekülen ist allerdings ihre inhärente Unempfindlichkeit, die Notwendigkeit der Verwendung von NMR-aktiven Isotopen wie ¹³C-Kohlenstoff und ¹⁵N-Stickstoff und der erhebliche manuelle und technische Aufwand.

In der vorliegenden Arbeit soll die Dynamik aller Komponenten des HLA-B*27-Trimers mittels NMR charakterisiert werden. Es sollen die beiden Allele HLA-B*27:05 (krankheitsassoziiert) und HLA-B*27:09 (nicht krankheitsassoziiert), jeweils im Komplex mit den beiden Peptiden pVIPR (RRKWRRWHL) und TIS (RRLPIFSR) betrachtet werden. Dafür stehen die Werkzeuge

der semi-quantitativen Linienformanalyse und der *model-free*-Analyse nach LIPARI und SZABO zur Verfügung. Die Etablierung einer kosteneffizienten Produktionsstrategie für isotopenmarkierte Peptide ist ein weiterer Aspekt der Arbeit.

Hühner besitzen, wie alle Wirbeltiere, MHC-Klasse-I-Proteine mit ihrer kleinen Untereinheit β -2-Mikroglobulin (β_2m). Das humane β_2m hat in seiner freien Form ausgedehnte dynamische Bereiche, die sich bei der Bindung an das MHC-Protein strukturieren. Die Dynamik von freiem β_2m aus Huhn und Mensch soll in dieser Arbeit verglichen werden.

1.1 Struktur und Funktion von MHC-Proteinen und HLA-B*27

Der *major histocompatibility complex* ist eine Genregion, die beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 liegt und deren Gene für eine Vielzahl von Proteinen kodieren. Diese werden in drei Klassen eingeteilt. Zu den Klasse-III-Proteinen, die andere physiologische Aufgaben als Klasse-I- oder Klasse-II-Proteine haben, zählen Komponenten des Komplementsystems, Zytokine und Hitzeschockproteine [1].

Die klassischen MHC-Klasse-II-Proteine HLA-DQ, HLA-DR und HLA-DP bilden Heterodimere aus zwei homologen Proteinen, die jeweils eine α 1- und eine α 2-Domäne, bzw. β 1- und β 2-Domäne tragen. Die α 1- und β 1-Domänen bilden eine Bindefurche aus zwei antiparallelen α -Helices und einem β -Sheet mit acht Strängen, in die Peptidantigene integriert werden. Die membranproximalen α 2- und β 2-Domänen aus jeweils einer Immunglobulin-Domäne und einer Transmembran-Helix verankern den Proteinkomplex an der Zellmembran. Klasse-II-Komplexe präsentieren ihre Antigene dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und binden an den CD4-Rezeptor von CD4-positiven T-Helfer-Zellen (CD4⁺ T-Zellen). Die Bindefurche der Klasse-II-Komplexe ist an den Enden offen und kann daher auch Antigene binden, deren Enden über den Komplex herausragen.

Die klassischen MHC-Klasse-I-Proteine sind mit den drei polymorphen Genloci HLA-A, HLA-B und HLA-C vertreten und sind den MHC-Klasse-II-Proteinen strukturell sehr ähnlich. Sie interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor von zytotoxischen T-Lymphozyten und dessen CD-8-Rezeptor (CD8⁺ T-Zellen). Sie alle sind Heterodimere von 45 kDa, bestehend aus der löslichen und invariablen leichten Kette β_2m , die durch eine Immunglobulin-Domäne gebildet wird, sowie einer membrangebundenen, hochvariablen schweren Kette, die wiederum aus den drei Domänen α 1, α 2 und α 3 besteht (Abbildung 1.1, A-B). β_2m ist nicht Teil des MHC, es wird in Menschen von dem Gen *B2M* auf Chromosom 15 kodiert. Die MHC-Region enthält weitere, nicht-klassische Klasse-I-Gene, die als Klasse-Ib-Gene bezeichnet werden [2].

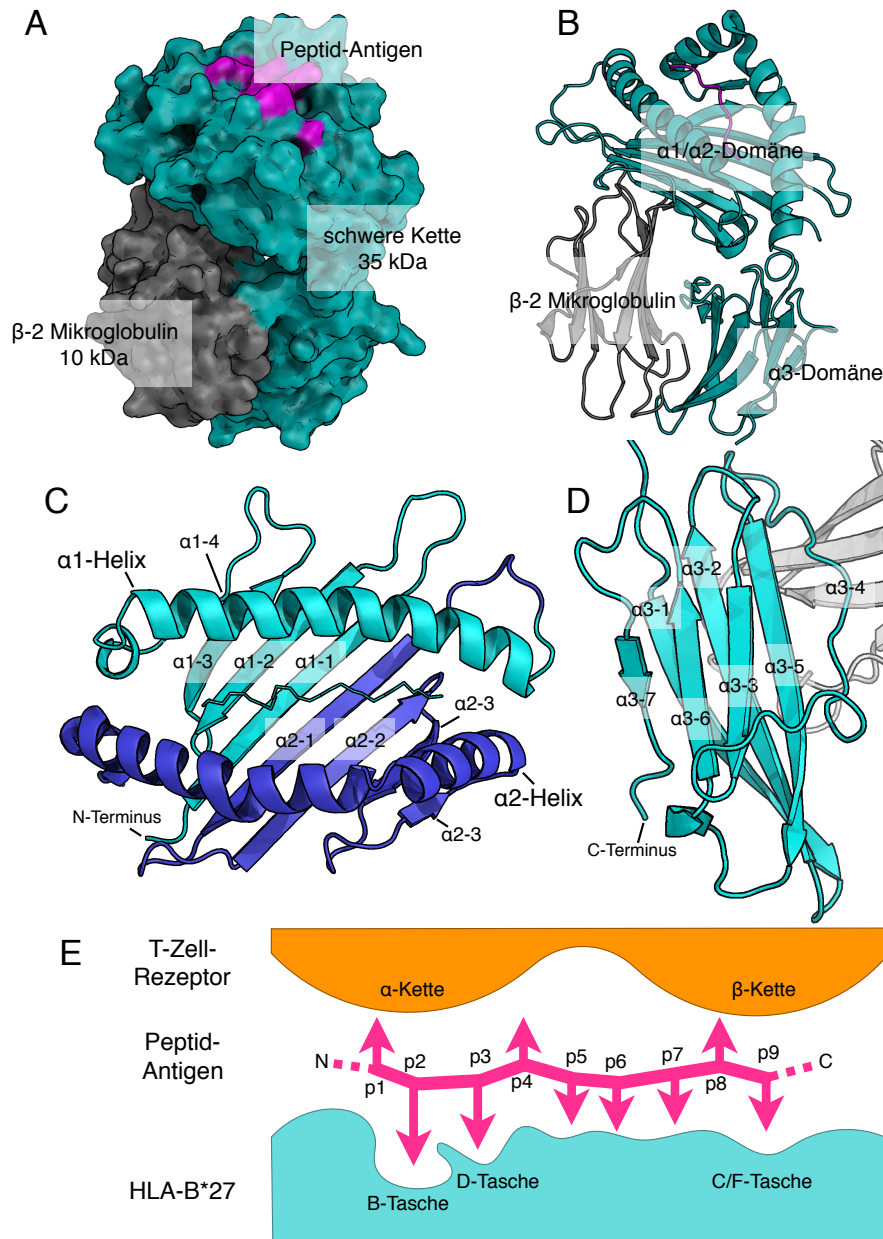


Abb. 1.1: Struktur der Klasse-I-Komplexe. A, raumbüllende Darstellung der drei Peptidketten. B, Cartoon der Domänen des Komplexes. C, Cartoon der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne mit Peptid, $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne sind farblich abgesetzt. Peptidrückgrat ist mit Strichen dargestellt. D, Cartoon der $\alpha 3$ -Domäne. E, Schema eines Längsschnitts durch die Bindetasche mit Peptid und dessen Seitenketten. Der T-Zell-Rezeptor ist mit seinen zwei Untereinheiten α und β dargestellt; nach [3]. Orientierung des Peptids wie in C. Die Reste 2, 3 und 9 des Peptids sind in Taschen gebunden. Erläuterung von β_2m in Abb. 1.2.

Wie auch β_2m ist die α_3 -Domäne eine Immunglobulin-Domäne (Abbildung 1.1, D). Sie trägt eine flexible, negativ geladene Loop-Region, die die primäre Bindestelle für das endoplasmatische Chaperon Tapasin darstellt, welches für die Beladung vieler Klasse-I-Komplexe mit passenden Peptid-Liganden notwendig ist [4]. Diese Loop-Region ist ebenfalls essentiell für die Interaktionsfläche des CD8-Korezeptors [5,6]. An die α_3 -Domäne schließt sich eine Transmembranhelix an, die den Proteinkomplex in der Zellmembran verankert.

Die α_1 - Domäne bildet zusammen mit der α_2 -Domäne die Furche, in die das gewöhnlich 9, seltener zwischen 8 und 12 Aminosäuren lange Peptidantigen integriert wird (Abbildung 1.1, C) [7]. Die Bindefurche wird seitlich von zwei antiparallelen α -Helices begrenzt, der Boden wird durch ein antiparalleles β -Sheet mit acht Strängen gebildet. Jeweils eine Helix und eine Hälfte des β -Sheets bildet eine der beiden α_1 und α_2 -Domänen. Anders als bei MHC-Klasse-II-Komplexen ist die Bindefurche an den Enden geschlossen und die Enden des gebundenen Peptids können nicht über die Bindefurche herausragen. Stattdessen muss sich der zentrale Teil des Peptids nach außen wölben, wo es mit dem TCR oder dem *killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR) interagieren kann.

Mit der Bindung des Peptid-MHC-Komplexes an den $\alpha\beta$ -TCR von Lymphozyten kommt es zur Bildung der Immunsynapse. Der $\alpha\beta$ -TCR besitzt zwei Immunglobulindomänen α und β , deren Loops mit Peptid und MHC interagieren. In den meisten Fällen interagieren die Keimbahn-kodierten TCR-Loops *complimentary determining region 1* (CDR1) und CDR2 mit den ebenfalls Keimbahn-kodierten MHC-Helices. Die durch somatische VDJ-Rekombination hypervariablen CDR3-Loops interagieren dagegen vor allem mit dem Peptid der Bindetasche.

Das Peptid wird durch Taschen an den Enden der Bindefurche gebunden, in die die „Anker“-Seitenketten des Peptides hineinragen (Abbildung 1.1, E). So bindet die A-Tasche üblicherweise den N-terminalen, die F-Tasche den C-terminalen Bereich des Peptids. In fast allen bekannten Klasse-I-Komplexen wird der N-Terminus des Peptids durch ein pentagonales Netzwerk aus Wasserstoffbrücken in der A-Tasche gebunden, an dem neben dem N-Terminus selbst und einem Wassermolekül drei Tyrosine der schweren Kette beteiligt sind (Tyrosin-7, Tyrosin-59 und Tyrosin-171) [8]. Die B-Tasche ist in HLA-B*27 für ein Arginin an Position 2 des Peptids (pArg2) ausgelegt, dessen Seitenkette tief in das Protein hineinreicht und als primärer Anker des Peptids fungiert. Hier wird die Guanidium-Gruppe der Aminosäure durch die zwei negativ geladenen Reste von Glutamin-45 und Glutamin-63 der schweren Kette gebunden. In 3% der B*27:05-gebundenen Peptide scheint die B-Tasche auch ein Glutamin beherbergen zu können [9]. Die B-Tasche enthält auch ein ungepaartes Cystein an Position 67, das schweren Ketten zu Dimeren verbrücken kann, die wiederum mit Rezeptoren des Immunsystems interagieren [10]. Weitere Taschen dienen als sekundäre Anker.

Die Assemblierung der MHC-Klasse-I-Komplexe erfolgt im rauen endoplasmatischen Reticu-

lum (ER). Daran beteiligt ist der multimere Peptidbeladungskomplex (*peptide loading complex*, PLC), der *transporter associated with antigen processing* (TAP), die Chaperone Calnexin, Calreticulin und Tapasin, sowie die Oxidoreduktase ERp57 [2]. Die cytosolisch durch das Proteasom generierten Peptide sind die Hauptquelle für die MHC-gebundenen Antigene. Diese werden durch den dimeren, im MHC kodierten TAP-Transporter unter ATP-Verbrauch in das Lumen des ER importiert. Jede Untereinheit bindet jeweils ein Molekül des MHC-kodierten Glykoproteins Tapasin, das wiederum MHC-I/ β_2m -Dimere und das Chaperon Calreticulin rekrutiert. Über eine Disulfid-Brücke ist die Thio-Oxidoreduktase ERp57 an Tapasin gebunden.

MHC-Klasse-I-Komplexe sind ohne ihre Peptidliganden instabil. Die Expression von „leeren“ Komplexen, die die Zelloberfläche erreichen, war *in vitro* bei reduzierter Temperatur möglich [11]. Die Assemblierung der isolierten Komplexe gelang ebenfalls, jedoch waren diese bei Körpertemperatur von etwa 37 °C instabil [12]. NMR-spektroskopische Untersuchungen an leeren HLA-Cw*07:02 zeigte, dass die peptidbindende $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne in peptidfreier Form teilweise entfaltet ist und teilweise intermediärem Austausch unterworfen ist, während die $\alpha 3$ -Domäne noch strukturiert ist [13].

1.2 Der Einfluss der Proteindynamik auf die Immunsynapse

Bei der Bildung der Immunsynapse aus dem $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor der zytotoxischen T-Lymphozyten, der fest an die mit Peptiden beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle (pMHC) bindet, wird eine Immunantwort ausgelöst und die Antigen-präsentierende Zelle wird durch den Lymphozyten eliminiert [1].

Die Selektivität des TCR für körperfremde (*non-self*) Antigene wird durch negative und positive Selektion im Thymus sichergestellt. Zellen mit TCRs, die entweder nicht oder stark an körpereigene (*self*) Antigene binden, werden aussortiert. In der Peripherie führt eine schwache Bindung an mit *self*-Antigenen beladene MHC-Komplexe zur Stimulation der T-Zellen und stellt so ihr Überleben über lange Zeiträume sicher.

Ein TCR-Rezeptormolekül ist kreuzreaktiv, bindet also mehrere unterschiedliche Antigene. Dies wird durch strukturell plastische hypervariable Loops ermöglicht. Diese können sich an verschiedene Epitope anpassen, aber auch auf Seiten der Epitope kommt es bei der Bindung zu Konformationsänderungen. Eine Hypothese zur Erklärung der Etiologie der autoinflammatorischen, HLA-B*27-assoziierten Erkrankung Spondylitis ankylosans (AS) geht von einer Ähnlichkeit eines körpereigenen zu einem körperfremden Peptids aus (molekulares Mimi-kry, siehe Kapitel 1.3). Ein besseres Verständnis der Mechanismen der Kreuzreaktivität in

HLA-B*27 könnte also entscheidend zur Aufklärung der Entstehung von AS beitragen.

Vor allem durch die Arbeit der Gruppe um BRIAN M. BAKER hat sich in den letzten Jahren unser Verständnis von strukturdynamischen Vorgängen an der Immunsynapse verbessert. Die Gruppe prägte den Begriff des *conformational melting*, bei dem sich alle Komponenten der Bindungsschnittstelle aneinander ausrichten, um gemeinsam für eine Erkennung des Antigens zu sorgen.

Zuletzt konnte die Gruppe anhand eines murinen Systems zeigen, dass bei der Bindung des pMHC (QL9-Peptid im H-2L^d-MHC) an den 2C-TCR zwar die meisten Regionen an Dynamik verlieren, sich aber ein in direktem Peptidkontakt stehender TCR-Loop dynamisch mit dem kontaktierten Peptid synchronisiert [14].

In mehreren Arbeiten mit modifizierten Formen des Tax-Peptids in HLA-A2 und dem A6-TCR demonstrierte die Gruppe, dass sich der TCRs an das das Antigen anpasst, aber auch das Peptid die Struktur und Entropie des MHC beeinflusst [15]. Damit bestätigten sie Befunde aus HLA-B*27, wo ebenfalls ein strukturdynamisches Fein-Tuning demonstriert wurde (siehe Kapitel 1.4).

Diese Arbeiten zeigen, dass die Kreuzreaktivität des TCR maßgeblich von der Dynamik des Bindungspartners abhängt: strukturelle Plastizität und entropische Eigenschaften bestimmen den Charakter der Bindung.

1.3 Ankylosierende Spondylitis und die Rolle der Gene

Ankylosierende Spondylitis (AS) ist eine erbliche, rheumatische Erkrankung, die vor allem die Wirbelsäule und die Sehnenansätze betrifft. Zumeist tritt zuerst eine Entzündung des Kreuzbein-Darmbeingelenks auf, das durch Lymphozyten und Makrophagen infiltriert wird, zunehmend verknöchert und schließlich versteift [16]. In der Wirbelsäule kommt es zur Bildung von Knochenspangen, die zur Bildung einer „Bambuswirbelsäule“ führt. Oft werden im Krankheitsverlauf auch andere Organe geschädigt. Die Krankheit ist möglicherweise seit dem Altertum bekannt [17], was kontrovers diskutiert wird [18,19]. Die Etiologie von AS liegt bislang noch völlig im Dunklen.

Etwa 0,55% aus Populationen mit europäischen Vorfahren leiden unter AS [20]. Von dem erweiterten Krankheitsbild der Spondyloarthropathien sind sogar etwa 1,9% der deutschen Bevölkerung betroffen [21]. Anders als früher angenommen, sind Frauen und Männer in etwa gleich stark betroffen, allerdings wird die Krankheit bei Frauen aufgrund des mildereren

Verlaufs seltener diagnostiziert.

Die Vererbungsrate von AS liegt bei über 90% [22, 23] – gegenüber dem Einfluss von Umweltfaktoren steht deshalb die genetische Komponente klar im Vordergrund. Seit mehr als 40 Jahren ist bekannt, dass bestimmte Allele des HLA-B Locus stark assoziiert mit der Krankheit sind (siehe auch Kapitel 1.1). Die Gruppe der HLA-B*27-Allele wurde bereits 1972 mit AS in Verbindung gebracht und gilt seitdem als Lehrbuchbeispiel für die Assoziation eines HLA-Gens mit einer genetisch bedingten Erkrankung im Menschen [24, 25]. HLA-B*27-positive Individuen haben ein etwa 90-fach erhöhtes Risiko, an AS oder einem anderen seronegativen arthritischen Leiden zu erkranken, und umgekehrt sind fast alle Betroffenen HLA-B*27-positiv. Die Frequenz des HLA-B*27-Allels liegt in der mitteleuropäischen Bevölkerung bei etwa 6%. Nur 1-5% aller Träger des Gens erkranken.

Als Hauptrisikofaktor gilt heute das Allel HLA-B*27:05 (B*27:05), das gleichzeitig die häufigste Variante der Gruppe der HLA-B*27-Allele ist. Es repräsentiert den HLA-B*27-Urtyp, der weltweit verbreitet ist und von dem sich alle bisher identifizierten B*27-Allele ableiten [26]. Neben HLA-B*27:05 wurde auch HLA-B*27:02 und einige andere HLA-B Allele (B*07:02, B*13:02, B*40:01, B*40:02, B*47:01, B*51:01, B*57:01) durch genomweite Assoziationsstudien mit AS in Verbindung gebracht [20, 27]. Darüber hinaus wurden weitere AS-assoziierte Genvarianten außerhalb des MHCs gefunden, etwa die endoplasmatischen Aminopeptidase-Gene *ERAP1* und *ERAP2*, die allerdings ausschließlich in Verbindung mit HLA-B*27-Positivität krankheitsrelevant erscheinen. Die Peptidasen kürzen Peptid-Antigene auf die passende Länge, damit sie von HLA-Proteinen optimal gebunden werden können. Auch Variationen im *IL1A*-Gen, das für das pro-inflammatorische Cytokin Interleukin 1A α kodiert, korrelieren mit der Wahrscheinlichkeit, an AS zu erkranken.

Es besteht die Möglichkeit, dass nicht die HLA-B-Allele selbst, sondern auf dem Chromosom 6 eng benachbarte Genloci für die Krankheit verantwortlich sind. Dagegen spricht die Existenz von minimal unterschiedlichen Subtypen wie B*27:05 und B*27:09, aber auch B*27:04 (krankheitsassoziiert) und B*27:06 (unauffällig), die durch die beiden Aminosäureaustausche His114Asp und Asp116Tyr gekennzeichnet sind. Experimente mit transgenen Tieren legen ebenfalls nahe, dass die für den MHC typischen Koppelungsungleichgewichte nicht maßgeblich für die Ausprägung der Krankheit zu sein scheinen. So besitzen transgene männliche Ratten, die B*27:05 und β_2m exprimieren, einen AS-ähnlichen Phänotyp [28, 29].

Zahlreiche verschiedene Hypothesen über die krankheitsverursachenden Eigenschaften von HLA-B*27 wurden in den vergangenen Jahrzehnten diskutiert [30, 31]. Die meisten beziehen sich auf die Interaktion mit den Rezeptoren auf Immunzellen, wie dem TCR von zytotoxischen T-Lymphozyten oder dem inhibitorischen KIR von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen). Im Folgenden sollen wichtige Erklärungsversuche angesprochen werden.

B*27:05 ist thermodynamisch vergleichsweise wenig stabil und stark vom Chaperon Tapasin abhängig, das an der Beladung des HLAs mit Peptiden im endoplasmatischen Reticulum (ER) beteiligt ist. So wurde in B*27:05-transgenen männlichen Ratten beobachtet, dass HLA-B*27-Akkumulation im ER die zelluläre *unfolded protein response* induzierte, die wiederum eine veränderte Cytokin-Produktion zur Folge hatte und schlussendlich entzündliche und autoimmunreaktive Effekte hatte, die dem AS-Krankheitsbild im Menschen ähnelten [32]. Da aber die Mehrzahl der HLA-B*27:05-positiven Individuen nicht erkrankt, kann diese „ER-Stress“-Hypothese nicht das gesamte Krankheitsbild erklären.

Eine andere Hypothese postuliert einen schädlichen Effekt von β_2m -freien, über freie Cys67 verbrückten HLA-B*27-Homodimeren, die mit Effektorproteinen wie dem TCR oder KIR interagieren. Diese Dimere erreichen *in vitro* und *in vivo* die Zelloberfläche [10,30] und interagieren dort stark mit dem KIR3DL2 [33] oder auch dem Leukozyten-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor LILRB2 [34]. Da aber alle B*27-Allele — also auch die als nicht-assoziiert geltenden HLA-B*27:06 und HLA-B*27:09 — über dieses Cys67 verfügen, ist dessen Existenz allein nicht ausreichend, um den Zusammenhang von HLA-B*27 und AS zu erklären. Zudem konnte bisher nicht direkt gezeigt werden, dass B*27-Homodimere ursächlich für AS verantwortlich sind, und allelische Variation von KIR3DL2 scheint keinen Einfluss auf die AS-Anfälligkeit zu haben [30].

Möglicherweise spielt auch das humane Mikrobiom eine Rolle bei der Krankheitsentstehung [30]. In mehr als der Hälfte der AS-Patienten kommt es zu einer Entzündung des Darms. Das Mikrobiom ist an der Schulung des Immunsystems beteiligt und steht wahrscheinlich mit chronisch-entzündliche Darmerkrankungen in Verbindung, die in der Klinik häufig zusammen mit AS auftreten. In HLA-B*27/ β_2m -transgenen Ratten treten Symptome in Bauchraum und Gelenken auf, hier ist eine Beteiligung des Mikrobioms belegt. Im Kontext dieser Hypothese existieren zur Zeit nur wenige Arbeiten und so kann über die möglichen Mechanismen derzeit nur spekuliert werden [35].

Die „Arthritogenes-Peptid-Hypothese“ ist der klassische Erklärungsansatz für die Assoziation von AS mit HLA-B*27. Hier wird die Existenz eines krankheitsverursachenden, körpereigenen Peptids postuliert, das durch molekulares Mimikry das Antigen eines Krankheitserreger nachempfunden und damit T-Zell-Reaktionen auslöst. Das arthritogene Peptid wurde jedoch trotz intensiver Suche bislang nicht gefunden. Die Entdeckung der Gen-Gen-Interaktion mit ERAP1 legt jedoch nahe, dass Antigenpräsentation eine zentrale Rolle bei AS spielt. Unklar ist ferner, ob der TCR von CD8⁺ T-Zellen oder der KIR von NK-Zellen involviert ist. Der Einfluss von KIR auf AS scheint eher beschränkt zu sein [36]. Im Tiermodell mit B*27:05/ β_2m -transgenen Ratten ist CD8 nicht für die Krankheitsentwicklung erforderlich [29]. Der Polymorphismus des *RUNX3*-Gens, das an der Genese von CD8-positiven

T-Zellen im Thymus beteiligt ist und zusammen mit HLA-B*27 einen Risikofaktor für Psoriasisarthritis darstellt [37, 38], stellt wiederum ein Hinweis auf die Beteiligung von T-Zellen dar. Darüber hinaus scheint HLA-B*27 verschiedene virale Peptide hocheffizient zu präsentieren und wirkungsvolle Immunantworten zu generieren, sodass etwa AIDS-Patienten einen milderen Krankheitsverlauf erfahren. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob diese Effizienz und Reaktivität nicht mit einem Hang zu Fehlreaktionen erkauft wird [38]. Der Polymorphismus in der F-Tasche, welche den C-Terminus des Peptidantigens bindet, könnte das Peptidrepertoire und so das Potential für Autoimmunreaktionen beeinflussen. Die positive T-Zell-Selektion im Cortex des Thymus durch Erhaltung niedrigaffiner TCRs gegen *self*-Antigene geschieht unter dem Einfluss von dem Thymoproteasom generierten Antigenen mit basischen C-Termini. Diese können von den meisten Klasse-I-Proteinen nicht optimal gebunden werden. Damit liegen, anders in der Medulla, in den Cortex-Zellen möglicherweise teilweise instabile, suboptimal komplexierte oder leere MHCs vor, gegen die die positive Selektion vollzogen wird. Die folgende negative Selektion in der Medulla durch Eliminierung hochaffiner TCRs gegen *self*-Antigene steht unter dem Einfluss des konventionellen Proteasoms, das auch hydrophobe C-Termini generiert. HLAs wie HLA-B*27:05, die basische C-Termini akzeptieren, präsentieren in Cortex und Medulla die gleichen Antigene, unterbinden damit eine möglicherweise die Differenzierung von positiver und negativer Selektion und sind damit möglicherweise anfälliger, eine Autoimmunantwort gegen *self*-Peptide zu generieren [39]. Dem steht entgegen, dass die positive Selektion *in vitro* klar peptidabhängig ist [40]. Ungeachtet dessen ist, ähnlich wie bei der Positiv-Selektion, in der Peripherie eine niedrighschwellige *self*-Reaktivität nötig, damit die T-Zellen überleben – jedoch werden zentral und peripher offenbar unterschiedliche Peptide präsentiert [40].

Keine der oben ausgeführten Hypothesen konnte bisher die Ursache der Erkrankung erklären. Nur 1-5% der HLA-B*27-positiven Individuen erkranken an AS. Daher kann eine Beteiligung weiterer, bisher unbekannter Faktoren nicht ausgeschlossen werden.

1.4 Der Einzelnukleotidpolymorphismus von HLA-B*27:05 und B*27:09

Während das Allel HLA-B*27:05 den ursprüngliche B*27-Genotyp darstellt, aus dem sich alle anderen B*27-Subtypen ableiteten, ist HLA-B*27:09 ein Sonderfall, der vor allem auf Sardinien auftritt. Dort ist es mit einem Anteil von etwa 20% der HLA-B*27-Allele vertreten [41]. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Allelen ist die Aminosäure 116, deren Asparaginsäure durch Histidin ersetzt ist. Der Rest 116 ist die veränderlichste Aminosäure nicht nur aller HLA-B*27-Subtypen, sondern auch im Allgemeinen aller HLA-B-Moleküle [42].

Obwohl mit B*27:05 nah verwandt, werden B*27:06 und B*27:09 als schützend oder zumindest

Tab. 1.1: Biophysikalische Untersuchungen an HLA-B*27:05 und B*27:09-Komplexen. „U“ in der Sequenz steht für Citrullin. In den Spalten B*27:05 und B*27:09 sind die bisher vorgenommenen Untersuchungen angegeben (x, Röntgenkristallographie; t, thermodynamische Messungen; f, Fluoreszenzspektroskopie; i, Infrarotspektroskopie; m, Molekulardynamiksimulationen). HHV-4 ist das Eppstein-Barr-Virus, HIV das humane Immundefizienz-Virus. Die Tabelle basiert auf den Aufstellungen in [46,47].

Peptid	Herkunft	Sequenz	B*27:05	B*27:09	PDB	Referenz
ohne	–	–	m	m	–	[48,49]
pVIPR	hyp. <i>self</i>	RRKWRRWHL	x, i, f, m	x, i, f, m	1ogt/1of2	[46,49–54]
TIS	<i>self</i>	RRLPIFSRL	x, t, i, f, m	x, t, i, f, m	1w0v/1w0w	[39,49,52,54,55]
pGR	hyp. <i>self</i>	RRRWHRWRL	x, m	x, m	2a83/3czf	[39,49,56]
IF9/pCatA	<i>self</i>	IRAAPPPLF	x, m	x, m	3bp4/3bp7	[8,48]
pLMP2	HHV-4	RRRWRLTV	x, i, f	x, i, f	1uxs/1uxw	[46,49,52,57]
m9	Modell	GRAAAAIK	x, t, f, m	x, t, f, m	ljge/1k5n	[39,46,56,58–61]
s10R	mod. <i>self</i>	RRLLRGHNQY	t	x, t	–/ljgd	[46,59]
s10G	mod. <i>self</i>	GRLLRGHNQY	t	t	–/–	[46,59]
pLMP2 _{L9}	HHV-4, mod.	RRRWRLTL	–	x	–/3d18	–
pVIPR _{U5}	mod. <i>self</i>	RRKWURWHL	x, i	x, i	3b6s/3b3i	[53,62]
pVIPR _{U5U6}	mod. <i>self</i>	RRKWUWHL	x	x	3dtx/3hcv	–
pCAC	<i>self</i>	SRRWRWNR	x	–	3lv3/–	[56,63]
Ebna3C _{258–266}	HHV-4	RRYDLIEL	x	–	2bsr/–	[64]
NPflu/NP _{383–391}	Influenza	SRYWAIRTR	x,m	–	2bst/–	[54,64]
ga _{264–273}	HIV	KRWIILGLNK	x	–	2bss/–	[64]

neutral angesehen [31,43,44]. Im erweiterten Krankheitsbild der undifferenzierten Spondyloarthropathien verliert HLA-B*27:09 diese Eigenschaft [44], allerdings bleibt die Assoziation mit reiner Spondylitis ankylosans trotz dieser Befunde weiterhin bestehen [45].

Die polymorphe Aminosäure befindet sich bei Position 116 auf dem α 2-Strang des β -Faltblatts der α 2-Domäne, inmitten der F-Tasche [46]. Die F-Tasche bindet den C-Terminus (p Ω) und einen Teil der mittleren Region des Peptids. Die saure, negativ geladene Carbonylfunktion der Seitenkette des Aspartats (pK_S = 3,90) unterscheidet sich stark von dem aromatischen, ungeladenen und basischeren Imidazolring des Histidins (pK_S = 6). Es ist nicht unwahrscheinlich, dass sich die unterschiedlichen ionischen Eigenschaften auf die Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten und damit die dreidimensionale Struktur auswirken, und weitere Eigenschaften des Komplexes modulieren. So kann auch die thermodynamische Stabilität und Dynamik beeinflusst werden und damit die Interaktionskinetik mit Bindungspartnern, die neben enthalpischen auch von entropischen Faktoren abhängt. Der Vergleich der strukturellen, physikochemischen und letztlich auch biologisch-funktionellen Eigenschaften der beiden Allele HLA-B*27:05 und HLA-B*27:09 erscheint daher sinnvoll [43,47].

Es existieren zahlreiche Studien, in denen B*27:05 und B*27:09 im Komplex mit verschiedenen Peptiden untersucht wurden (siehe Tabelle 1.1). Es wurde gezeigt, dass der polymorphe Rest einige strukturelle und dynamische Eigenschaften des Komplexes beeinflusst [46].

NARZIS Molekulardynamik (MD)-Simulationen von leeren B*27:05 und B*27:09, sowie mit den Peptiden pLMP2, pVIPR, pGR und TIS zeigten, dass in B*27:05 peptidunabhängig eine höhere Flexibilität der α 1-Helix und eine stärkere Öffnung der Bindefurche zu erwarten ist [49]. Das Team um ABUALROUS kam bei Studien mit dem pCatA/I9-Peptid zu ähnlichen Ergebnissen [48]. Damit wurden frühere Befunde mit isotope-editierter Infrarotspektroskopie bestätigt, die ebenfalls eine höhere Flexibilität in den helikalen Bereichen diagnostizierte. Diese subtypabhängigen Unterschiede werden mit einem veränderten Wasserstoffbrücken-Netzwerk und einer elektrostatischen Abstoßung des Asp116 von Asp74, Asp77 und Asn97 in B*27:05 erklärt [38,48].

TIS (RRLPIFSRL) wird, wie viele andere Peptide, von B*27:05 und B*27:09 in identischer oder sehr ähnlicher Weise gebunden. So binden auch die Peptide m9 (GRAAAAIK) und IF9/pCatA (IRAAPPPLF) in der für Klasse-I-Komplexe typischen kanonischen Konformation. In der genannten MD-Simulationen [49] blieb TIS als einziges Peptid in beiden HLA-Subtypen fest in der Bindetasche verankert und zeigte vergleichbare dynamische Eigenschaften in einer Konformation, die den röntgenkristallographisch bestimmten Strukturen entsprach. In einer Untersuchung von NURZIA über die Relevanz von Arg62 zeigte TIS keine ausgeprägten Unterschiede zwischen B*27:05 und :09. Von TIS sind keine kreuzreaktiven zytotoxischen T-Lymphozyten bekannt. TIS-Komplexe sind also in jeder Hinsicht unauffällig, es sind kaum peptidabhängige dynamischen Effekte zu erwarten sind.

pVIPR (RRKWRRWHL) dagegen bindet wie das strukturell sehr ähnliche virale Peptid pLMP2 aus dem Eppstein-Barr-Virus (Reste 236-244 des *latent membrane protein 2*) nur an B*27:09 in der kanonischen Konformation. In B*27:05 interagieren die pArg5 der beiden Peptide gleichermaßen mit dem polymorphen Asp116 und bilden so eine stabilisierende Salzbrücke. Sie liegen damit in einer ungewöhnlichen, nach innen gewölbten, nicht-kanonischen Konformation vor. In B*27:05/pVIPR liegt in den Kristallstrukturen neben der nicht-kanonischen gleichzeitig auch die kanonische Konformation vor. Diese ungewöhnliche Eigenschaft könnte direkte funktionelle Auswirkungen haben. So hat die Gruppe um SORRENTINO und FIORILLO in Versuchen mit zytotoxischen T-Lymphozyten aus B*27:05-positiven Spendern gezeigt, dass diese Zellen auf pVIPR in einem B*27:05-Kontext mit einer Immunantwort reagierten. Zellen von B*27:09-positiven Spendern zeigten dieses Verhalten nicht [65]. Die zytotoxischen T-Lymphozyten aus B*27:05-positiven AS-Patienten zeigen Kreuzreaktivität gegen pLMP2 und pVIPR [57].

Möglicherweise kann pVIPR als ein Modell für die ungewöhnliche Dynamik von bestimmten Peptiden in B*27:05 dienen, die die negative Selektion im Thymus beeinflusst [47], oder im Zusammenspiel mit Metallionen für krankheitsrelevante Effekte sorgen (A. Ziegler, B. Loll, unpubliziert). Unklar ist, ob die zweite, mit einem Mangan-Ion und Aminosäureresten der benachbarten Kristallzelle koordinierte Konformation von pVIPR in B*27:05 ein Artefakt der

Kristallisation ist.

pVIPR zeigte in den Studien von NARZI eine deutliche Absenkung der entropischen Energie in Komplex mit B*27:05, verglichen zu den Komplexen mit B*27:09.

Durch gezielte Modifikationen wie der Citrullierung des pArg (pVIPR-U5) lässt sich die kanonische und nicht-kanonische Konformationen erzwingen, sodass die geschilderte Situation partiell umgekehrt wird.

1.5 β_2 -Mikroglobulin aus dem Haushuhn

Neben humanen MHC-Klasse-I-Komplexen sind auch die aus dem Haushuhn (*Gallus gallus*) interessant [66]. Aviäres und humanes β_2 m besitzen eine Sequenzähnlichkeit von lediglich 48%. Trotzdem stabilisiert das humane β_2 m den YF*7.1-Komplex des Huhns stärker als sein natürlicher Bindungspartner [67].

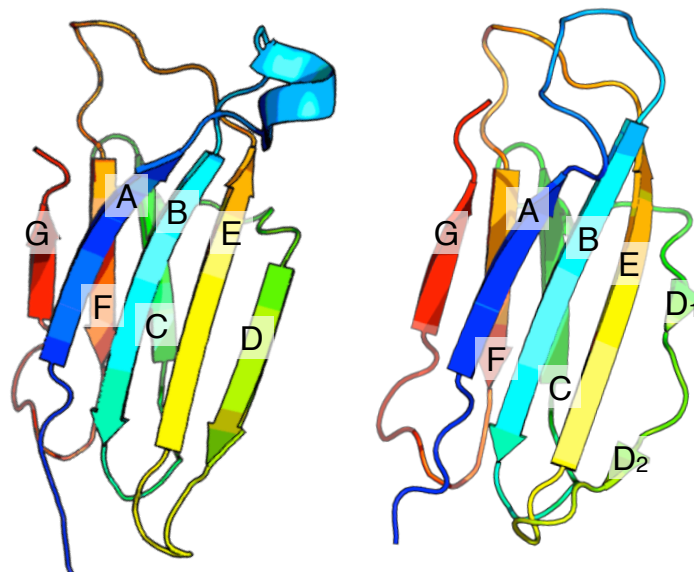


Abb. 1.2: Die Strukturen von humanem (links, PDB-ID: 1lds) und aviärem β_2 m (rechts, 3o81). Die Stränge des β -Faltblatts sind mit den Buchstaben A bis G gekennzeichnet.

Wie auch das humane ist das aviäre β_2 m eine 99 Aminosäuren umfassende Immunglobulin-domäne, die aus zwei β -Sheets mit den sieben Strängen A bis G besteht (Abbildung 1.2). Durch Schleifen AB, BC, usw. werden diese Stränge verbunden. Diese Struktur des Moleküls

ist evolutionär zwischen Mensch und Huhn konserviert. Ein Vergleich der β -Sheets der beiden Kristallstrukturen ergibt, dass sich die Proteine in ihren strukturierten Bereichen durch einen RMSD von 1,8 Å unterscheiden. Das β_2m aus dem Huhn scheint allerdings eine besonders hohe strukturelle Dynamik zu besitzen – auch im Vergleich mit anderen Spezies, wie durch Untersuchungen mit H/D-Austausch und Infrarotspektroskopie festgestellt werden konnte [66].

In NMR-Studien stellte sich heraus, dass der D-Strang des humanen β_2m in freier Lösung konformationelle Plastizität aufweist, was zu verbreiterten Linien im NMR-Spektrum führt [68, 69]. In der vorliegenden Arbeit soll dieser Aspekt auch bei dem β_2m aus dem Huhn untersucht werden. Des Weiteren soll die Dynamik des Hühner- β_2m mit Hilfe klassischer Relaxationsanalyse im Vergleich zu seinem humanen Homolog charakterisiert werden.

1.6 Kernmagnetische Resonanz

Die kernmagnetische Resonanz ist ein Phänomen, das zuerst von Physikern, später Chemikern und schließlich auch Biologen und Medizinern genutzt wurde. Die Anwendungsgebiete reichen dabei von der Strukturaufklärung über die Charakterisierung der Dynamik bis hin zu bildgebenden Verfahren. Allen Anwendungen ist gemein, dass sie durch die Verwendung von Strahlung geringer Energie minimal-invasiv sind — eine Eigenschaft, die mit einer inhärenten Unempfindlichkeit erkaufte wird.

Den Grundstein für die Entdeckung der kernmagnetischen Resonanz wurde durch Physiker gelegt. ISIDOR ISAAC RABI beobachtete 1938 als Erster die Resonanz von Atomkernen, als ein Strahl von Lithiumchlorid-Ionen die Energie von eingestrahlten Radiowellen absorbierte. Außerhalb von Molekülstrahlen und in Materialien konnten MILLS PURCELL und seine Kollegen 1946 als erste die kernmagnetische Resonanz der Protonen eines Kilogramms festen Paraffins beobachten. Ihre Probe befand sich in einem starken, variablen Magnetfeld, das mit Radiowellen fester Frequenz bestrahlt wurde. Das Magnetfeld wurde variiert, bis die Resonanzfrequenz der Protonen erreicht und die elektromagnetische Strahlung absorbiert wurde.

FELIX BLOCH und seine Kollegen konnten etwa zeitgleich die Kernspins von Protonen von etwa 2 ml Wasser beobachten [70]. Dafür wurde die Probe in einem Elektromagneten platziert, ebenfalls mit einer Radiowellen fester Frequenz bestrahlt und das Magnetfeld variiert, bis die Resonanz der Wasserprotonen erreicht wurde. Im Unterschied zu Purcells Versuchsaufbau konnte Blochs ein Induktionssignal von den präzedierenden Kernspins detektieren. Wenig später wurde zunehmend klar, dass die Resonanzfrequenz der Kernspins nicht allein vom externen Magnetfeld abhängt, sondern auch von der lokalen chemischen Umgebung, die das

Magnetfeld moduliert.

Diese „chemische Verschiebung“ der Signale machte NMR für die Chemie attraktiv. 1960 konnte MARTIN PACKARD das erste Protonenspektrum von Ethanol aufnehmen, welches mit seinen drei Linien die drei verschiedenen Protonenspezies (Methyl-, Methylen- und Hydroxylgruppen) des Moleküls widerspiegelte. In den folgenden Jahrzehnten sollte die NMR-Spektroskopie eines der wichtigsten Werkzeuge für die Strukturchemie werden. RICHARD ERNST lieferte mit der Entwicklung der NMR-Fourierspektroskopie einen wichtigen Beitrag: Eine Modulation des externen Feldes war nun nicht mehr nötig und die damit einhergehende Empfindlichkeitssteigerung machte es sogar möglich, andere Kerne außer Wasserstoff mit natürlicher Isotopenhäufigkeit zu untersuchen. Die Entwicklung der multidimensionalen Spektroskopie durch JEAN JEENER und RICHARD ERNST ermöglichten die Korrelation von Spins über chemische Bindungen oder den Raum, und damit die Untersuchung von Makromolekülen. Die Bestimmung von dreidimensionalen Strukturen wurde erst durch das Messen von Abständen zwischen Spins mit Hilfe des Kern-Overhauser-Effekts durch das NOESY-Experiment möglich [71]. ANIL KUMAR wendete dieses Prinzip erstmals erfolgreich auf Proteine an [72]. Breite und praktikable Anwendbarkeit in der Biochemie war durch die Entwicklung von Tripel-Resonanz-Experimenten durch GERHARD WAGNER gegeben, durch die das Rückgrat der Proteine schnell und unkompliziert sequenziell zugeordnet werden konnte.

NMR-Experimente finden in der Regel in starken, statischen Magnetfeldern statt. Dieses externe Magnetfeld B_0 ist dabei entlang der z -Achse orientiert. Bei einem Spin- $\frac{1}{2}$ -Kern findet eine Aufspaltung der Energieniveaus in ein spin-down- und einen spin-up-Zustand statt, von denen der niederenergetische mit dem Feld in $-z$ -Orientierung, der höherenergetische entgegengesetzt in $+z$ -Orientierung ausgerichtet ist. Die Energiedifferenz ΔE zwischen den beiden Zuständen ist von der Stärke des externen Feldes B_0 und dem kernspezifischen gyromagnetischen Verhältnis γ abhängig:

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0 \quad (1.1)$$

Damit ergibt sich auch die Voraussetzung für die Resonanz und Absorption von magnetischen Wechselfeldern: Die Absorption eines Photons mit der Energiedifferenz führt zur Absorption. Mit $\Delta E = \hbar\omega$ ergibt sich für die Larmor-Frequenz ω der betrachteten Kernspins die „Larmor-Gleichung“

$$\omega = \gamma B_0. \quad (1.2)$$

Bei einem ^1H -Wasserstoffkern ergibt sich so bei einem $\gamma = 267,52 \cdot 10^6 (\text{T} \cdot \text{s})^{-1}$ und einer Feldstärke $B_0 = 14,09 \text{ T}$ ein $\frac{\omega}{2\pi} = 600 \text{ MHz}$. Die Larmorfrequenz ist abhängig von dem externen magnetischen Feld, die Kerne innerhalb eines Moleküls können aber durchaus lokal verschiedene Feldstärken erfahren. Diese Unterschiede im lokalen Magnetfeld schlagen sich in leicht unterschiedlichen Larmor-Frequenzen und damit den charakteristischen chemischen Verschiebungen δ nieder, die somit die lokale Umgebung des Kerns repräsentieren. Diese werden üblicherweise als feldunabhängige Werte in *parts per million* (ppm) wiedergegeben, indem die Frequenz des Kerns durch die Basisfrequenz dividiert wird.

1.6.1 Relaxation

Die Larmor-Präzession ist auch als Rotation magnetischer Dipole vorstellbar, die sich im externen Magnetfeld B_0 partiell entlang der z -Achse orientiert und durch magnetische Wechselfelder manipulieren und in die zu B_0 orthogonale xy -Ebene kippen lassen und damit letztlich einen Strom in der Detektorspule induzieren. Da in der Probe eine große Menge Einzelspins vorliegt, ist dieses gemessene Signal die Summe der Signale dieser Einzelspins, die sich synchron (kohärent) verhalten.

Die Spins kehren nach Anregung in ihren Gleichgewichtszustand zurück. Dies geschieht durch Interaktion mit lokalen magnetischen Wechselfeldern, die durch die Brownsche Molekularbewegung erzeugt werden, also durch Kollisionen und Lageveränderungen benachbarter Kerne. Bei $\frac{1}{2}$ -Spins sind dafür vor allem Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Anisotropieeffekte der chemischen Verschiebung (CSA) verantwortlich. Die Rückkehr der Spins zum z -Gleichgewichtszustand ist die longitudinale Relaxation (R_1). Der Verlust der Kohärenz der Einzelspins (transversale Relaxation, R_2) wird durch diese gleichen Wechselfelder und fluktuierende, lokale Feldinhomogenitäten hervorgerufen. So werden dynamische Vorgänge innerhalb von Proteinen zugänglich, indem die Relaxation betrachtet wird [73].

Die Rotation von frei in Lösung diffundierenden Molekülen wird durch die Korrelationszeit τ_c beschrieben, in der das Molekül eine mittlere Lageveränderung um einen Winkel von einem Radiant durchläuft. τ_c ist umso kleiner, und damit die Lageveränderung je Zeiteinheit umso größer, je kleiner das Molekül ist. Die stationäre Autokorrelationsfunktion beschreibt die Summe aller lokalen Felder in Abhängigkeit von einer Zeitänderung und hat für ein kugelförmiges Molekül die Gestalt eines exponentiellen Abfalls. Die spektrale Dichtefunktion $J(\omega)$ ist als Fourier-Transformation der Korrelationsfunktion definiert und spiegelt die Bewegung, die Abhängig von der Frequenz zur Verfügung steht, wider. So gilt für eine einfache

exponentielle Autokorrelationsfunktion die spektrale Dichtefunktion

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2}. \quad (1.3)$$

Die Relaxationsgleichungen von ABRAGAM [73,74] für ein Zweispinsystem stellt die Relaxation als Summe von Spektraldichtefunktionen bei fünf unterschiedlichen Frequenzen dar ($J(0)$, $J(\omega_H)$, $J(\omega_N)$, $J(\omega_H - \omega_N)$ und $J(\omega_H + \omega_N)$). Für die longitudinale Relaxationsrate R_1 und die transversale Relaxationsrate R_2 gelten die folgenden Beziehungen:

$$R_1 = d (J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)) + cJ(\omega_N) \quad (1.4)$$

und

$$R_2 = \frac{d}{2} (4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N) + \frac{c}{6} (4J(0) + 3J(\omega_N))) + R_{ex}. \quad (1.5)$$

mit $J(\omega_X)$ als spektrale Dichte bei der Larmorfrequenz des jeweiligen Kerns, $J(0)$ als spektrale Dichte bei $\omega = 0$ und R_{ex} als Relaxation durch chemischen Austausch. Die dipolare Konstante d und die Konstante der Anisotropie der chemischen Verschiebung c (CSA, *chemical shift anisotropy*) sind gegeben durch

$$d = \frac{1}{4} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{(\gamma_H \gamma_N \hbar)^2}{\langle r^6 \rangle}, \quad (1.6)$$

$$c = \frac{(\omega_H \Delta\sigma)^2}{3} \quad (1.7)$$

mit μ_0 als Permeabilität des Vakuums, γ_H und γ_N als gyromagnetisches Moment des ^1H -Protons und des ^{15}N -Stickstoffs, \hbar das Plancksche Wirkungsquantum geteilt durch 2π , r die Bindungslänge zwischen ^1H und ^{15}N , sowie $\Delta\sigma$ als Anisotropie der chemischen Verschiebung in ppm.

Der Kern-Overhauser-Effekt (NOE) hängt von der Kreuzrelaxation von zwei dipolar wechselwirkenden, räumlich benachbarter Spins ab. Im ^1H - ^{15}N Hetero-NOE-Experiment ist der räumliche Abstand zwischen den beiden Spins konstant und die ^1H -Magnetisierung für einige Zeit gesättigt, bis die Kreuzrelaxation einen Gleichgewichtszustand (*steady-state*-Zustand) erreicht. Im Unterschied zum klassischen NOE-Experiment wird die Relaxation des ^{15}N -

Heterokerns sowohl durch die Kreuzrelaxationsrate σ_{NOE} , als auch die Auto-Relaxationsrate R_1 beeinflusst. Es gilt [73,74]

$$\text{NOE} = 1 + \frac{\gamma_H \sigma_{\text{NOE}}}{\gamma_N R_1} \quad (1.8)$$

$$\sigma_{\text{NOE}} = d (6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)). \quad (1.9)$$

Im Experiment wird die Magnetisierung des ^{15}N -Kerns nach der Sättigung des ^1H detektiert und anschließend mit einem Referenz-Spektrum verglichen, bei dem keine Sättigungspulse auf die Protonen appliziert wurde.

Damit sind die spektralen Dichten $J(0)$, $J(\omega_H)$ und $J(\omega_N)$ experimentell zugänglich, die für die Modellierung der spektralen Dichtefunktion genutzt werden können.

1.6.2 Der *model-free*-Formalismus

Der *model-free*-Formalismus, der in seiner ursprünglichen Form von ATTILA SZABO und GIOVANNI LIPARI publiziert wurde [75,76], bedient sich eines einfachen Modells der Spektral-dichtefunktion, das nur wenige Variablen enthält. Es wird angenommen, dass sich die globale Korrelationszeit τ_c in eine externe τ_e und interne Komponente τ_i aufspalten lässt, da sie auf unterschiedlichen Zeitskalen operieren:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2 \tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} + \frac{(1 - S^2)(\tau_e + \tau_i) \tau_e}{(\tau_e + \tau_i)^2 + (\omega \tau_e \tau_i)^2} \right). \quad (1.10)$$

Die Korrelationszeiten τ_i und τ_e lassen sich vergleichsweise einfach interpretieren und repräsentieren die Zeitskala, auf der die Bewegungen des betrachteten Kerns geschehen. S^2 ist das Quadrat des generalisierten Ordnungsparameters, und beschreibt die Amplitude dieser Bewegung. Die Bewegung kann als Rotation entlang des Mantels eines gedachten Kegels beschrieben werden (siehe Abbildung 1.3). Der S^2 -Parameter beschreibt dabei den halben Öffnungswinkel des Kegels $S_{\text{Kegel}}^2 = [\frac{1}{2} \cos \theta_0 (1 + \cos \theta_0)]^2$ [77].

MARIUS CLORE erweiterte den Formalismus, indem er die zusätzlichen Parameter $S^2 = S_s^2 \cdot S_f^2$ für die Abbildung von langsamen und schnellen Bewegungen einführte [78]. Zusammen mit den Erweiterungen durch MANDEL [79], FUSHMAN [80], OREKHOV [81], KORZHNEV [82] und ZHURAVLEVA [83] lassen sich neun unterschiedliche Modelle für die interne molekulare

Dynamik aufstellen, die in `relax 3` implementiert sind (siehe Kapitel 2.5.4).

Der beschriebene Formalismus in Gleichung 1.10 gilt jedoch nur für isotrop diffundierende Moleküle, deren Reorientierung über die Zeit durch eine Korrelationszeit allein zu beschreiben ist. In einem nicht-kugelförmigen Molekül muss sich die Korrelationszeit zwischen den unterschiedlichen Spins unterscheiden, da nicht alle Orte im Molekül gleich schnell rotieren. Für das Abbilden von realistischer Rotationsdiffusion muss das Modell erweitert werden.

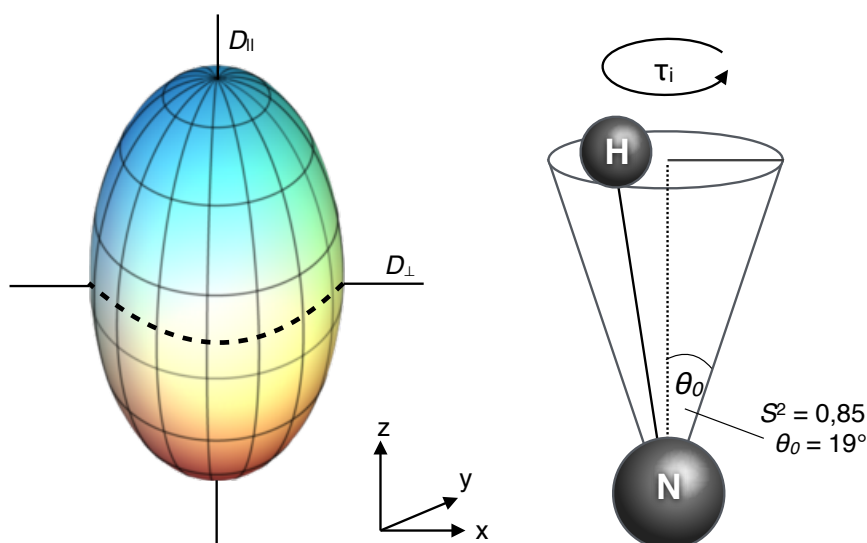


Abb. 1.3: Links, Axialsymmetrischer Tensor mit seinen geometrischen Komponenten D_{\parallel} und D_{\perp} ; rechts, Modell der Rotation der NH-Bindung entlang des Mantels eines Kegels, nach [77].

An die Stelle der einfachen Korrelationszeiten tritt ein Tensor, der die Orientierung und die Amplitude der Rotationsbewegung des Moleküls beschreibt [84]. Ein axialsymmetrischer Diffusionstensor (prolater oder oblater Spheroid) besitzt zwei geometrische Parameter D_{\parallel} und D_{\perp} , sowie die Winkel θ (Polarwinkel) und ϕ (Azimutwinkel), die die Orientierung im Raum definieren (Abbildung 1.3). Ein vollständig asymmetrischer (triaxialer) ellipsoider Diffusionstensor wird dagegen durch die drei geometrischen Parameter D_x , D_y und D_z und die drei Winkel α , β und γ beschrieben.

Alternativ können die geometrischen Parameter des Tensors zu D_{iso} (isotrope Komponente), D_a (anisotrope Komponente) und D_r (rhombische Komponente) vereinfacht werden. Diese Beschreibung wird innerhalb des *model-free*-Programms `relax` [85,86] genutzt.

Komplexere Diffusion, in denen etwa ein Molekül transient zwischen unterschiedlichen Assoziationszuständen wechselt, kann nicht mit Diffusionstensenoren dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind aufgeführt:

- Hersteller (Tabelle 2.1),
- Nährmedien (Tabelle 2.2),
- Primer, die nicht selbst entworfen wurden (Tabelle 2.3),
- Plasmide (Tabelle 2.4),
- Puffer und Lösungen (Tabelle 2.5),
- Bakterienstämme (Tabelle 2.6),
- Proteine (Tabelle 2.7),
- spezielle Chemikalien (Tabelle 2.8),
- Kits (Tabelle 2.9),
- sonstige Verbrauchsmittel (Tabelle 2.10),
- Geräte (Tabelle 2.11),
- Chromatographie-Säulen (Tabelle 2.12),
- Software (Tabelle 2.13).

Tab. 2.1: Verzeichnis der Hersteller.

Hersteller	Sitz
AG Beyermann	FMP Berlin
AG Diehl	FMP Berlin
AG Freund	Freie Universität Berlin
AG Ziegler	Charité Universitätsmedizin Berlin
Avestin	Ottawa, Kanada
Bio-Rad	Hercules, USA
Biotez	Berlin
Bischoff Analysentechnik und -geräte	Leonberg
Bruker Biospin	Karlsruhe
Cambridge Isotope Laboratories	Tewksbury, USA
Carl Roth	Karlsruhe
CCPN	–
Cole-Parmer	Vernin Hills, USA
DASGIP	Jülich
Eppendorf	Hamburg
GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Hoefer	Holliston, USA
Merck Millipore	Billerica, USA
Macherey-Nagel	Düren
Microfluidics	Westwood, USA
New England Biolabs	Ipswich, USA
Novagen/Merck	Darmstadt
Thermo Fisher	Waltham, USA
Roche Diagnostics	Rotkreuz, Schweiz
R Foundation	Wien, Österreich
Schrödinger, LLC	Portland, USA
Shigemi Inc.	Tokio, Japan
VWR International	Radnor, USA
Waters	Milford, USA

Tab. 2.2: Verwendete Nährmedien.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, autoklaviert
LB-Agar	15 g Agar-Agar in 1 l LB-Medium
10x M9-Salze (pH7,5)	80 g/l Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O, 20 g/l KH ₂ PO ₄ , 5 g/l NaCl, autoklaviert
Spurenelemente (pH7,5-7,7)	5 g/l EDTA x 7H ₂ O, 500 mg/l FeSO ₄ , 50 mg/l ZnCl ₂ , 10 mg/l CuSO ₄ , autoklaviert
mod. M9-Medium (1 l)	10 ml Spurenelemente, 1 ml Spurenelemente nach [87], 2 ml MgSO ₄ (1 M), 300 µl CaCl ₂ (1 M), 200 ml 10x M9-Salze, 3 ml Thiamin (1 mg/ml), 30 ml Biotin, (0,1 mg/ml), 5 g Glukose, 1 g NH ₄ Cl; in 1 l H ₂ O oder D ₂ O

Tab. 2.3: Sonstige Oligonukleotide. Ubiquitin- und YUH1-Primer wurden von Andreas Schlundt (AG Freund, FU Berlin) entworfen und eingesetzt. Start- und Stopp-Codons sind zur besseren Orientierung eingeklammert.

Name	Primer-Sequenz
Ubiquitin (Vorwärts)	5'-CGAGTCCAT (ATG) CAAATTTTGTCAAGACTTTGACTGG-3'
Ubiquitin (Rückwärts)	5'-GACTCGCTCGAG (TTA) ACCACCTCTCAATCTC-3'
YUH1 (Vorwärts)	5'-CGAGTCCC (ATG) GACAGCGGAGAAAATCGTGCTGTGGTCCG-3'
YUH1 (Rückwärts)	5'-GGATTGGGCCCTAATTGGGAACCTCGAGCGAGTC-3'

Tab. 2.4: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Insert	Marker	Herkunft
pHN1	β ₂ m	Carbenicillin	David N. Garboczi
pET-46 Ek/LIC	HLA-B*27:05/:09	Ampicillin	AG Ziegler; Novagen/Merck
pET23a	β ₂ m aus Huhn	Ampicillin	AG Ziegler; Novagen/Merck
pET24d	YUH1	Kanamycin	AG Freund; Novagen/Merck
pET28a	Ubiquitin	Kanamycin	AG Freund; Novagen/Merck

Tab. 2.5: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat (pH=8), 100 μ M Na ₂ EDTA
Aufschlusspuffer (<i>inclusion bodies</i>)	50 mM Tris-HCl (pH=8), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50 U/ml Benzonase (Novagen), 1 mM MgSO ₄ , 2 Tbl/100 ml complete (Roche)
Aufschlusspuffer (löslich)	100 mM Tris-HCl (pH=8,0), 200 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 50 U/ml Benzonase (Novagen), 1 mM MgSO ₄ , 2 Tbl/100 ml complete (Roche)
Waschpuffer (<i>inclusion bodies</i>)	50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 mM Dithiothreitol (DTT) und 0,5% Triton-X100
Harnstoffpuffer	8,3 M Harnstoff, 20 mM Tris (pH=7,5), 50 mM NaCl
Rückfaltungspuffer	100 mM Tris-HCl (pH=7,5), 5 mM red. Glutathion, 0,5 mM ox. Glutathion, 400 mM Arginin, 2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF
6 \times SDS-Probenpuffer	375 mM Tris-HCl (pH=6,8), 12% SDS, 60% Glycerol, ca. 0,02% Bromphenolblau, 600 mM DTT
Sarkosyl-Probenpuffer	2 \times SDS-Probenpuffer, 1% Sarkosyl, 1 mM NaOH
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 0,01% SDS
Gel-Fixierlösung	10% Essigsäure, 50% Ethanol, aufgefüllt mit H ₂ O
Gel-Färbelösung (SDS-PAGE)	(0,025% Coomassie Brilliant Blue G250; 0,025% Coomassie Brilliant Blue R250; 10% Essigsäure
Phosphatpuffer	10 mM Phosphat (pH=7,5), 150 mM NaCl

Tab. 2.6: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Selektionsmarker	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F</i> ⁻ 80 <i>dlacZ</i> M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> - <i>thi</i> -1 <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	–	Invitrogen / Thermo Fisher
<i>E. coli</i> Xa90	<i>ara</i> , Δ (<i>lac-pro</i>), <i>nalA</i> , <i>argE</i> (<i>Am</i>), <i>thi</i> , <i>Rifr</i> , <i>F'</i> , (<i>lac+</i> - <i>pro+</i> <i>lacIq1</i>)	–	Dr. David N. Garboczi, National Institutes of Health, Bethesda, USA
<i>E. coli</i> T7-Express Rosetta 2	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene 1 [lon]</i> <i>ompT gal sulA11 R(mcr-</i> <i>73::miniTn10-TetS)2 [dcm]</i> <i>R(zgb-210 NEB</i> <i>::Tn10-TetS)endA1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>)114:: <i>IS10</i> <i>pRARE2 (Cam^R)</i>	Chloramphenicol	New England Biolabs
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta 2	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B m_B</i>) <i>gal dcm (DE3) pRARE2</i> (<i>Cam^R</i>)	Chloramphenicol	New England Biolabs

Tab. 2.7: Proteine.

Protein	Verwendung	Markierungsmuster	Hersteller
B*27:05 (<i>inclusion bodies</i>)	Probe	U- ² H	AG Diehl
	Probe	U- ² H ¹⁵ N	AG Diehl
	Probe	U- ² H ¹³ C ¹⁵ N	AG Diehl
	Probe	U- ² H, ILV-markiert	AG Diehl
	Probe	U- ² H, ILV- ¹³ CH ₃	AG Diehl
B*27:09 (<i>inclusion bodies</i>)	Probe	U- ² H	AG Diehl
	Probe	U- ² H ¹⁵ N	AG Diehl
	Probe	U- ² H ¹³ C ¹⁵ N	AG Diehl
	Probe	U- ² H, ILV-markiert	AG Diehl
	Probe	U- ² H, ILV- ¹³ CH ₃	AG Diehl
β_2 m (human)	Probe	U- ¹⁵ N	AG Diehl
β_2 m (Huhn)	Probe	U- ¹³ C ¹⁵ N	AG Diehl
β_2 m (Huhn)	Probe	U- ¹⁵ N	AG Diehl
Benzonase (Lösung)	DNA-Verdau	–	Novagen

Tab. 2.8: Spezielle Chemikalien.

Chemikalie	Verwendung	Hersteller
¹⁵ N-Ammoniumchlorid	Expression	Cambridge Isotope Laboratories
¹³ C-Glucose	Expression	Cambridge Isotope Laboratories
¹³ C-D ₇ -Glucose	Expression	Cambridge Isotope Laboratories
2-Ketobuttersäure (¹³ C ₄ ; 3,3-D ₂)	ILV-Labeling	Cambridge Isotope Laboratories
2-Ketobuttersäure (Methyl- ¹³ C; 3,3-D ₂)	ILV-Labeling	Cambridge Isotope Laboratories
2-Ketobuttersäure (¹³ C ₄ ; 3,3-D ₂)	ILV-Labeling	Cambridge Isotope Laboratories
3-Methyl-2-Oxobuttersäure (1,2,3,4- ¹³ C ₄ ; 3,4',4',4'-D ₄)	ILV-Labeling	Cambridge Isotope Laboratories
3-Methyl-2-Oxobuttersäure (Methyl- ¹³ C; 3,3-D ₂)	ILV-Labeling	Cambridge Isotope Laboratories
complete protease inhibitor mix	Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics
complete protease inhibitor mix (EDTA-free)	Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics
Rotiphorese 30A	Acrylamid-Lösung	Carl Roth
Prestained Precision Plus	Proteinstandard	Bio-Rad
Fast Ruler	DNA-Standard	Fermentas/Thermo Fisher
pVIPR (RRKWRRWHL)	synth. Peptid	AG Beyermann, FMP
TIS (RRLPIFSRL)	synth. Peptid	AG Beyermann, FMP

Tab. 2.9: Kits.

Kit	Verwendung	Hersteller
KOD Hotstart PCR Kit	PCR	Novagen
FastDigest Restriction System	Restriktionsreaktion	Fermentas/Thermo
NucleoSpin Extract II	DNA-Extraktion aus Agarose-Gel	Macherey-Nagel
Nucleo Spin Extract Plasmid	Extraktion von Plasmid-DNA	Macherey-Nagel
Quick Ligase Kit Ligation	Ligation	New England Biolabs

Tab. 2.10: Sonstige Verbrauchsmittel.

Verbrauchsmittel	Verwendung	Hersteller
Amicon Ultra	Zentrifugationsfilter	Merck Millipore
Complete Filtration Unit, PES, 0,2 µm	Vakuumfiltrationssystem	VWR International
Pellicon XL 50	Tangentialflussfilter	Merck Millipore
Sep-Pak Plus C18	Festphasenextraktion	Waters

Tab. 2.11: Verwendete Geräte.

Gerät	Verwendung	Hersteller
Mastercycler ep-gradient S	Thermocycler	Eppendorf
HE33 Mini Horizontal Agarose	Agarose-Elektrophorese	Hofer
SE250 MightySmall	SDS-PAGE	Hofer
Fedbatch-pro	HCDF-Fermentation	DASGIP
French Press	Zellaufschluss	Thermo Fisher Scientific
Emulsiflex C-3	Zellaufschluss	Avestin
LM10 Microfluidizer	Zellaufschluss	Microfluidics
Masterflex L/S	Peristaltik-Pumpe	Cole-Parmer
Profinia	FPLC	Bio-Rad
ÄktaFPLC	FPLC	GE Healthcare
ÄktaPurifier	HPLC	GE Healthcare
Avance III 600 MHz	NMR	Bruker Biospin
Avance III 750 MHz	NMR	Bruker Biospin
NanoDrop 2000c	UV/Vis-Photometer	Thermo Fisher

Tab. 2.12: Verwendete Chromatographie-Säulen.

Säule	Verwendung	Hersteller
HisTrap HP 5 ml	Metallchelatchromatographie	GE Healthcare
Protino Ni-NTA 5 ml	Metallchelatchromatographie	Macherey-Nagel
HiLoad 26/60 Superdex 75	Gelpermeationschromatographie	(GE Healthcare)
PolyEncap 300 A K040PE050	hydrophobe HPLC (C4)	Bischoff Analystechnik und -geräte

Tab. 2.13: Verwendete Software.

Software	Version	Hersteller	Verwendung	Referenz
Topspin	3.1, 3.2	Bruker	Aufnahme, Prozessierung (NMR)	–
NMRPipe	8.1	F. Delaglio	Prozessierung (NMR)	[88]
NMRDraw	8.1	F. Delaglio	Spektrenbetrachtung (NMR)	[88]
Analysis	2.4.1	CCPN	Zuordnung (NMR)	[89]
Sparky	3.115	UCSF	Spektrenbetrachtung, Peak-Picking	[90]
R	3.2.2	R Foundation	Statistik, Plotting, Datenumformung	[91]
ggplot2	1.0.0	H. Wickham	R-Erweiterung: Plotting	[92]
reshape	0.8	H. Wickham	R-Erweiterung: Datenumformung	[93]
plyr	1.8.3	H. Wickham	R-Erweiterung: Datenumformung	[94]
bio3d	1.1-6	Grant Lab	R-Erweiterung: PDB-Strukturen	[95]
fields	8.3-5	Fields Dev Team	R-Erweiterung: Distanzmatrix	[96]
relax	3.3.5	relax developers	Relaxationsanalyse, <i>mf</i> -Analyse	[97]
PyMol	1.7	Schrödinger	Strukturvisualisierung	–
alphatoall	–	Schrödinger	PyMol-Erweiterung	–
spectrumbar	–	S. Law	PyMol-Erweiterung	–
Reduce	2.17	J. M. Word	Protonen anfügen	[98]
Hydronmr	7c	U de Marcia	Relaxationsvorhersage	[99]
Sednterp	2	U New Hampshire	Viskositätsvorhersage	[100]

2.2 Erzeugung von Plasmiden zur Herstellung der Peptide pVIPR und TIS

Für die Konstruktion der beiden Ubiquitin-Peptid-Fusionsproteine Ubi-pVIPR und Ubi-TIS kamen verschiedene molekularbiologische Techniken zur Anwendung. Wie in Abbildung 2.1 zu sehen, sollte das Ubiquitin im pET28a-Vektor C-terminal verlängert werden.

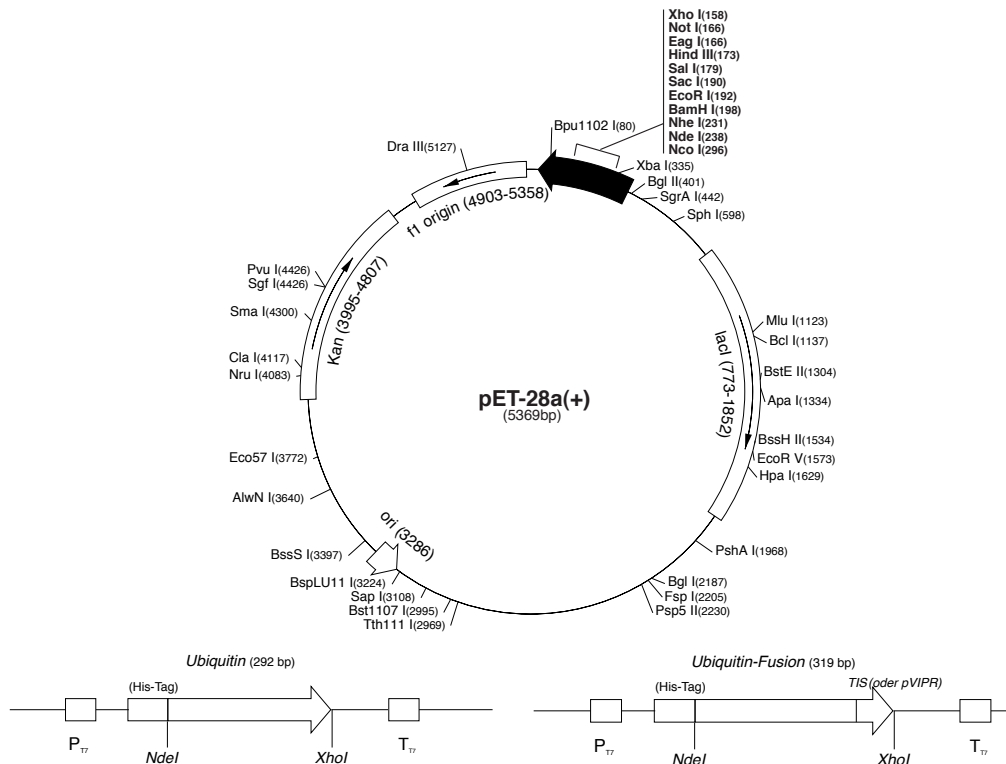


Abb. 2.1: Oben, Vektorkarte von pET28a (© Novagen). Unten, Ausschnitt aus den Plasmiden pET28a-Ubi (links) und pET28a-Ubi-Peptid (rechts). Das Ubiquitin wurde C-terminal verlängert.

2.2.1 Vervielfältigung des Inserts

Für die Konstruktion ist eine Polymerasekettenreaktion (PCR) notwendig. Die PCR wurde mit Hilfe des „Mastercycler“-Thermocyclers (Eppendorf) mit dem „KOD HotStart PCR Kit“ (Novagen) durchgeführt. Die Abfolge der verwendeten Heizzyklen ist in Tabelle 2.14 dargestellt. Als Vorlage für die Reaktion diente das pET28a-Ubi-Plasmid (siehe Tabelle 2.4). Es wurden für je 50 ng Plasmid-DNA jeweils 10 pmol der Vorwärts- und Rückwärtsprimer eingesetzt (Tabelle 2.15).

Tab. 2.14: Heizzyklus-Parameter für der Polymerase-Kettenreaktion.

Reaktionsschritt	Temperatur °C	Zeit s	Zyklen <i>n</i>
–			
initiale Denaturierung	95	30	1
Denaturierung (1)	95	30	
Anlagerung (1)	50	60	5
Verlängerung (1)	68	45	
Denaturierung (2)	95	30	
Anlagerung (2)	45	60	15
Verlängerung (2)	68	45	
terminale Elongation	72	600	10
Lagerung	4	∞	1

Tab. 2.15: Verwendete Oligonukleotide für die Peptidklonierung. Die Oligonukleotide Ubi-Peptid, Ubi-TIS und Ubi-pVIPR wurden für die Herstellung der Peptide entworfen, von Biotex (Berlin) synthetisiert. Start- und Stopp-Codons sind zur besseren Orientierung eingeklammert, die Sequenz für TIS (RRLPIFSRL) und pVIPR (RRKWRRWHL) sind unterstrichen. Restriktionsschnittstellen sind kursiv (*NdeI*, CATATG; *XhoI*, CTCGAG).

Name	Primer-Sequenz
Ubi-Peptid (Vorwärts)	5'-CGAGTCCAT (ATG) CAAATTTTGTCAAGACTTTGACTGGTAAG-3'
Ubi-TIS (Rückwärts)	5'-GACTCG <u>CTCGAG</u> (TTA) <u>CAGACGAGAGAAGATCGGCAGACGACG</u> ACCACCTCTCAATCTCAAGACC-3'
Ubi-pVIPR (Rückwärts)	5'-GACTCG <u>CTCGAG</u> (TTA) <u>CAGGTGCCAACGACGCCATTTACGACG</u> ACCACCTCTCAATCTCAAGACC-3'

2.2.2 Restriktionsverdau

Die für die Verknüpfung von PCR-Produkt (Ubiquitin-Peptid-Sequenz) und pET28a-Ubiquitin-Plasmid erforderlichen komplementären Termini wurden durch die Restriktionsenzyme NdeI und XhoI erzeugt. Es wurde dafür das „FastDigest Restriction System“ (Fermentas) verwendet. Gemäß Herstellerangaben wurden PCR-Produkt und Plasmid separat mit den beiden Restriktionsenzymen in dem mitgelieferten „Green Buffer“ für 2 h bei 37 °C geschnitten. Durch anschließendes Erhitzen auf 80 °C für 10 min wurden die Enzyme inaktiviert.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion von DNA

Zur Trennung des geschnittenen PCR-Produkts und des linearisierten Plasmid wurde eine Agarose-Gelelektrophorese in einer „HE33 Mini Horizontal Agarose Electrophoresis Unit“ (Hoefer) durchgeführt. Dafür wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration von 1,2% (PCR-Produkt, etwa 300 bp) oder 0,8% (linearisiertes Plasmid, etwa 6000 bp) in TAE-Puffer (Tabelle 2.5) hergestellt. Zur Sichtbarmachung der Nukleotide enthielt der Puffer 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die Proben mit den Polynukleotiden wurden als 15 µl-Aliquots auf das Gel aufgetragen. Bei der Elektrophorese wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Als molekulare Größenstandards dienten „Fast Ruler“ (Fermentas) mit passenden Abstufungen der Nukleotidlängen.

Die Banden wurden mit ultraviolettem Licht niedriger Intensität sichtbar gemacht, mit einem frisch geöffneten Skalpell zur Einmalverwendung ausgeschnitten. Mit Hilfe des „NucleoSpin Extract II“ (Macherey-Nagel) wurden die Polynukleotide aus dem Gel extrahiert.

2.2.4 Ligation

Für die Verknüpfung von geschnittenem PCR-Produkt (Insert) und linearisiertem Plasmid wurde das „Quick Ligase Kit“ (New England Biolabs) verwendet. Das Insert lag gegenüber dem Plasmid in fünffachem molarem Überschuss vor. Die Ligationsreaktion erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Dieser Ansatz wurde sofort für die Transformation in *E. coli* DH5α-Zellen weiterverwendet, in denen das finale Plasmid vervielfältigt und anschließend isoliert wurde (siehe Kapitel 2.2.5). Ob das Insert erfolgreich in das Plasmid integriert wurde, konnte durch Restriktionsverdau und Beurteilung der Bandenposition nach Gelelektrophorese beurteilt werden. Die Fehlerfreiheit des Reaktionsprodukts wurde durch Sequenzierung (Invitak, Berlin) überprüft.

2.2.5 Plasmid-Vervielfältigung

Für die Vervielfältigung der Plasmide wurden frisch transformierte *E. coli* DH5 α -Zellen auf LB-Agar ausgestrichen und bei 37 °C für etwa 12 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurden Einzelkolonien gepickt und in 4 ml LB-Selektionsmedium in Kulturröhrchen überführt. Diese Zellen wurden bis zur Sättigung bei 37 °C kultiviert. Antibiotika mussten entsprechend des Markergens des Plasmids gewählt werden (siehe Tabelle 2.4).

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde das Kit „Nucleo Spin Extract Plasmid“ (Macherey-Nagel) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit destilliertem Wasser eluiert. So gewonnene Plasmidlösungen hatten eine Konzentration von etwa 100 ng/ μ l und wurden bei -20 °C gelagert, bis sie für Transformationen eingesetzt wurden.

2.3 Kultivierung, Expression

2.3.1 Transformation

Die Transformation der Plasmide in Tabelle 2.4 erfolgte durch Hitzeschock in chemisch kompetenten *Escherichia coli*-Zellen der Stämme aus Tabelle 2.6. Dafür wurden Volumina von 50 μ l Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0,5 μ l Plasmidlösung ($c \approx 100$ ng/l) versetzt, für 60 Sekunden dem Hitzeschock (42 °C) unterzogen und 5 min lang auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden mit 0,4 ml LB-Medium ohne Antibiotika versetzt und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Von diesen Zellen wurden unterschiedliche Volumina von 100-200 μ l auf LB-Agar mit Antibiotika ausplattiert.

2.3.2 Herstellung von Glycerol-Dauerkulturen

Einzelkolonien wurden von Kulturen auf LB-Agar gepickt, in 4 ml LB-Selektionsmedium überführt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 kultiviert. 500 μ l Kultur wurden zu gleichen Teilen mit 50%igem Glycerol (in LB-Medium) vermischt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Expression in Schüttelkolben

Proteine ohne Isotopen-Markierung wurden in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika hergestellt. Dafür wurden Einzelkolonien von frisch transformierten Zellen oder von

ausplattierten Glycerol-Dauerkulturen selektiert und in je 4 ml LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm über Nacht kultiviert. Diese wurden dann in 400 mL LB-Medium mit 2 g/l Glukose in 2 l-Schüttelkolben überführt und bei einer für das Protein geeigneten Temperatur kultiviert. Die Expression wurde dann mit 1 mM Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) bei einer OD_{600} von etwa 1 induziert und bei einer geeigneten Temperatur bis zur Ernte fortgesetzt.

Yeast ubiquitin hydrolase 1 (YUH1)-Protease (in pET24d-Plasmid) wurde in *E. coli* BL21(DE3) T7 Express Rosetta 2 hergestellt. Die Expression erfolgte bei 37 °C, die nach 4-5 h beendet wurde.

Die Ubi-Peptide (in pET28a-Plasmiden) wurde ebenfalls in *E. coli* BL21(DE3) T7 Express Rosetta 2 hergestellt. Die Expression erfolgte bei 25 °C über Nacht (ca. 16 h).

β_2m (pHN1-Plasmid) wurde in XA90-Zellen hergestellt (keine frische Transformation, von Glycerol-Dauerkultur). Die Induktion der Expression erfolgte abweichend mit 0,5 mM IPTG und wurde für 37 °C für 6 h fortgesetzt.

2.3.4 Expression im HCDF-System

Die Herstellung des β_2m und der Ubiquitin-Fusionsproteine erfolgte im Hochzelldichte-Fermentationssystem (HCDF) „Fedbatch-pro“ (Dasgip). Die Expression erfolgte wie in [101] beschrieben.

Für die Expression der Ubiquitin-Fusionproteine wurden *E. coli* BL21(DE3) T7 Express Rosetta 2 verwendet, die mit dem pET28a-Plasmid transformiert und auf LB-Agar ausplattiert wurden. Einzelkolonien wurden von einer Plattenkultur gepickt und in 4 ml LB-Medium bei 37 °C bis für ca. 6 h Stunden kultiviert (1. Vorkultur). Die Kultur wurde in 400 ml LB-Medium in 2 l-Schüttelkolben überführt und über Nacht bei 20 °C bis zu einer OD_{600} von ca. 1 kultiviert (2. Vorkultur). Diese Zellen wurden abzentrifugiert und in M9-Batchmedium mit 8 g/l Glukose und 2 g/l NH_4Cl zu einer OD_{600} von 1,2–1,5 resuspendiert. Dann erfolgte die Kultivierung in der HCDF-Anlage bei 37 °C (Reaktoren mit 250 ml und 1000 ml). Die Drehzahl des Rührers, die Sauerstoffversorgung, die Temperatur und der pH-Wert wurden computergestützt geregelt. Die Expression wurde durch einen zweistufigen Mechanismus ausgelöst: Zuerst musste der Gehalt von gelöstem Sauerstoff einen Schwellenwert von 30% unterschreiten und anschließend 70% überschreiten. Die Expression wurde mit 1 mM IPTG induziert, bei einer Temperatur von 25 °C fortgeführt und nach dem Verbrauch aller Stickstoff- und Kohlenstoffquellen beendet (11-14 h). Während der Expressionsphase wurden Glucose und NH_4Cl (beide gegebenenfalls isotopenmarkiert) bis zu einer Gesamtkonzentration von 15 g/l und 3,75 g/l kontinuierlich zugeführt.

Für die Expression von β_2m wurden pHN1-transformierte XA90-Zellen vom Glycerol-Stock auf Selektionsmedium ausplattiert. Es wurde wie oben beschrieben vorgegangen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C. Nach 12-14 h waren Kohlenstoff- und Stickstoffquellen verbraucht und eine OD_{600} von etwa 12 erreicht.

2.4 Biochemische und präparative Methoden

Die verwendeten Puffer, Medien, Kits und Chemikalien sind in den Tabellen in Kapitel 2.1 aufgeführt.

2.4.1 Zellernte, Zellaufschluss und Lagerung

Die Ernte der Zellen erfolgte durch Abzentrifugieren bei 2000 g. Das Pellet wurde entweder direkt in Aufschlusspuffer (Tabelle 2.5) resuspendiert und aufgeschlossen, oder in Stickstoffschockgefroren und bei -80 °C gelagert, oder in Aufschlusspuffer resuspendiert und dann eingefroren. Zellen mit *inclusion bodies* wurden bei mindestens 1200 bar aufgeschlossen, Zellen mit löslichem Protein bei 1000 bar. Nach Zentrifugation für 30 min bei 48000 g und 4 °C wurden entweder die Zelltrümmer oder der lösliche Überstand verworfen.

2.4.2 Lösen der Einschlusskörperchen

Für die weitere Aufbereitung und das Lösen der Proteine im Einschlusskörperchen in Harnstoff diente das Protokoll von GARBOCZI [102] als Orientierung.

Nach dem Aufschluss wurde das Proteinsediment mit den *inclusion bodies* mindestens vier Mal in Waschpuffer (Tabelle 2.5) resuspendiert und zentrifugiert, bis es reinweiß war. Zuletzt wurde das Sediment in 50 mM Tris-HCl (pH=8,0) mit 100 mM NaCl suspendiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Suspension wurde in Reaktionsgefäße (2 ml) aliquotiert, abzentrifugiert und das Sediment in je 1 ml Harnstoff-Puffer gelöst, für 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Nicht lösliche Anteile wurden verworfen. Die Konzentration des gelösten Proteins im Überstand wurde mittels UV-Absorption bei 280 nm und proteinspezifischer Extinktionskoeffizienten [103] bestimmt. Das in Harnstoff gelöste Protein wurde bei 4 °C gelagert oder für die Rückfaltung (siehe Kapitel 2.4.3) eingesetzt.

2.4.3 Rückfaltung und HLA-Komplexbildung

Das Protokoll für die Herstellung HLA-Komplexe basierte auf dem *rapid dilution*-Verfahren nach GARBOCZI [102].

Je 1000 mL Rückfaltungspuffer wurden folgende Mengen biologischen Materials eingesetzt: 10 mg Peptid (10 μ M bei 1 kDa, als Lyophilisat), 25 mg β_2 m (2,5 μ M bei 10 kDa, in Harnstoff gelöst oder bereits gefaltet), 30 mg der schweren Ketten HLA-B*27:05 oder HLA-B*27:09 (0,9 μ M bei 31,9 kDa, in Harnstoff gelöst). Der Puffer wurde auf 4 °C vorgekühlt. Gegenüber dem ursprünglichen Protokoll betrug der pH 7,5 statt 8. Das Peptid wurde im Puffer gelöst. Die in Harnstoff gelösten Proteine wurden dann mit etwa 1 Tropfen/s in den schnell rührenden Rückfaltungspuffer getropft. Zuerst wurde die Harnstoff- β_2 m-Lösung eingetropft und etwa 2 h inkubiert. Dann wurde die Lösung mit schwerer Kette eingetropft und 10-12 h gekühlt gerührt. Die Lösung wurde für mindestens 96 h, üblicherweise für 2-3 Wochen bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden unlöslichen Anteile der Lösung über ein *bottle-top* Vakuumfiltrationssystem von VWR abgetrennt und verworfen.

2.4.4 Konzentration der gefalteten Proteine und Puffertausch

Proteinlösungen mit Volumina von mehreren hundert Millilitern wurden mittels „Millipore Pellicon XL 50“-Tangentialflussfiltern (Merck Millipore) an einer „Masterflex L/S“ Peristaltik-Pumpe (Cole-Parmer) konzentriert. Dies geschah bei einer Temperatur von 4 °C und einer Filtrationsrate von maximal 200 ml/h. Das Zielvolumen lag bei etwa 10 ml. Die Filter wurden mit 0,5 M NaOH regeneriert und für weitere Anwendungen genutzt. Benutzte Schläuche wurden in 20% Ethanol aufbewahrt und ebenfalls wiederverwendet. Mit „Amicon Ultra“-Zentrifugationsfiltern (Merck Millipore) wurde das Volumen der Lösung auf ca. 1 ml eingengt. Durch wiederholtes Auffüllen mit Phosphatpuffer wurde der Puffer effektiv getauscht.

2.4.5 Gelpermeationschromatographie

Zur Isolierung von β_2 m und der HLA-Proteinkomplexe wurde Gelpermeationschromatographie verwendet. Die Auftrennung erfolgte in vorgekühltem Phosphat-Puffer. Vor der Applikation wurde die Probe mit „Amicon-Ultra“-Zentrifugenfiltern mit geeigneter Porengröße (β_2 m: 10 kDa; HLA-Komplexe: 30 kDa) eingengt und abzentrifugiert.

Es wurde die „HiLoad 26/60 Superdex 75“-Säule (GE Healthcare) an einer „ÄktaFPLC“ (GE Healthcare) unter Verwendung des mitgelieferten Säulenprogramms und bei 4 °C betrieben. Nach Äquilibration der Säule mit 1,5 Säulenvolumen wurde die Probe injiziert und mit einer Flussrate von 1-2 ml/min chromatographiert.

Die Identität der eluierten Proteine wurde anhand eines Vergleichs mit der Retentionszeit von Referenzproteinen, mit Hilfe von SDS-PAGE oder bei ¹⁵N-isotopenmarkierten Proteinen mit Hilfe eines ¹⁵N-¹H-Korrelationsspektrums überprüft.

2.4.6 Metallchelatchromatographie

Für die Metallchelatchromatographie wurden verschiedene Systeme genutzt. Die Puffer basierten auf 50-100 mM Tris-HCl (pH=8,0) mit 100-200 mM NaCl.

Das Zellysat mit den Ubi-Peptiden lag in Aufschlusspuffer wie in Tabelle 2.5) vor und wurde mit einer „ÄktaFPLC“-Anlage auf die mit Nickelionen beladene 5 ml-Säule „HisTrap HP“ (GE Healthcare) aufgetragen (0,5 ml/min). Die Ubi-Peptide wurde mit einem Imidazolgradienten von 0-1000 mM (in 100 mM Tris bei pH=8,0; 200 mM NaCl) eluiert.

Für Ubi-TIS und YUH1 wurde ein Puffersystem mit 50 mM Tris-HCl und 100 mM NaCl verwendet, mit sonst gleichbleibenden Bedingungen.

Für YUH1 wurde eine „Profinia“-Anlage (Bio-Rad) mit der 5 ml-Säule „Protino Ni-NTA“ (Macherey-Nagel) verwendet. Hier folgte nach zwei Waschschritten (20 mM, 30 mM Imidazol) die Elution mit einer Stufe mit 250 mM Imidazol. Das Eluat wurde mit 10 kDa-Amicon-Ultra Zentrifugenfiltern auf 10 mg/ml konzentriert und zu gleichen Teilen mit 25% Glycerol gemischt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.7 Proteolytische Spaltung der Fusionsproteine mit YUH1-Hydrolase

Ubiquitin-Fusionsproteine wurden durch Spaltung mit der Protease YUH1 in Ubiquitin und das N-terminale Peptid zerlegt. Im Vergleich mit üblichen Spaltungsansätzen [104,105] wurde YUH1-Protease in einem verringerten Massenverhältnis von ca. 10% eingesetzt (entspricht einem molarem Verhältnis von ca. 5%).

Wegen fehlender aromatischer Aminosäuren von Ubi-TIS konnte die Proteinkonzentration nur geschätzt werden. Hier wurden je Eluat aus 5 g Zellmasse etwa 5 mg YUH1-Protease eingesetzt.

Als Kompromiss zwischen idealen Reaktionsbedingungen [106] und Löslichkeit von Fusionsprotein und Peptid wurde die Spaltung in einem 50 mM Tris-Puffer mit pH 8,0 bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) für mindestens drei Stunden durchgeführt. Es wurde eine Ubiquitin-Konzentration von etwa 1-3 mg/ml angestrebt. Dieser Parameter wurde nicht optimiert. Die im Eluat enthaltenen 500 mM Imidazol störten die Reaktion nicht.

2.4.8 Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Für die Peptidreinigung mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) wurde eine C₄-Umkehrphase an einer „ÄktaPurifier“ (GE Healthcare) verwendet.

Als hydrophobe stationäre Phase wurde durch eine präparative „PolyEncap 300 A“-Säule (Bischoff Analysetechnik und -geräte) mit 20 cm Länge, 2,5 cm Durchmesser verwendet. Als mobile Phase wurde ein Acetonitril-Wasser-Gradient mit 0,3% Trifluoressigsäure (TFA) gebildet.

Vor dem Auftragen der Probe auf die Säule wurde diese zentrifugiert und der Betriebstemperatur der Anlage angeglichen (Raumtemperatur, ca. 21 °C). Das Probenvolumen betrug 2-3 ml. Die Probe wurde mit 4 ml/min auf das Säulenmaterial gebunden. Das Peptid eluierte in einem Gradienten aufsteigender Acetonitril-Konzentration bei einer Konzentration von etwa 25% Acetonitril. Allen mobilen Phasen wurde 0,3% TFA zugesetzt. Das Peptid wurde durch einen UV-Detektor mit zwei Kanälen (220 nm und 280 nm), der somit auch für Peptide ohne aromatische Aminosäuren empfindlich war, detektiert.

Zur Abtrennung des Lösungsmittels wurde das Eluat lyophilisiert. Zur Regenerierung des Säulenmaterials diente eine 50%ige Dimethylsulfoxidlösung (DMSO).

2.4.9 Peptidisolierung mittels Ultrafiltration und Festphasenextraktion

Die Peptide TIS und pVIPR wurden aus dem Spaltungsansatz (Kapitel 2.4.7) mittels Ultrafiltration und Festphasenextraktion gewonnen.

Im ersten Schritt wurde das Peptid (1 kDa) mit „Amicon-Ultra“ Zentrifugenfiltern (3 kDa-Membran) von der YUH1-Protease (27,6 kDa) und dem Ubiquitin (10,7 kDa) abgetrennt.

Im zweiten Schritt wurde das Peptid von nicht-hydrophoben Stoffen mit Hilfe einer hydrophoben C₁₈-Matrix getrennt. Dazu dienten zwei in Reihe gesteckte Festphasen-Extraktionskartuschen „Sep-Pak Plus C18“ (Waters) mit jeweils 700 µl Bettvolumen, die mit Hilfe einer

Injektionsspritze beladen wurden. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren: Priming mit 10 Säulenvolumen 90% Acetonitril/10% Wasser mit 0,3% TFA, Äquilibration mit 10 Säulenvolumen Wasser, Beladen, Spülen mit 10 Säulenvolumen Wasser. Die Elution erfolgte mit 10 Säulenvolumen 90% Acetonitril/10% Wasser mit 0,3% TFA.

Das Lösungsmittel wurde abgetrennt, indem das Eluat in flüssigem Stickstoff gefroren und lyophilisiert wurde.

2.4.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels UV-Spektroskopie

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde an einem „NanoDrop 2000c“ (Thermo Fisher) unter Verwendung proteinsequenzspezifischer Extinktionskoeffizienten [103] bestimmt. Verwendete Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 2.16 aufgeführt. Es wurde das Messprogramm „Protein 280 nm“ genutzt.

Da vor allem die molare Konzentration von Interesse war, wurden Massenkonzentrationen nicht auf die jeweiligen schweren Isotope umgerechnet und lediglich als Orientierungswerte genutzt.

Tab. 2.16: Verwendete proteinsequenzspezifischen molare Extinktionskoeffizienten, die anhand des ProtParam-Programms ermittelt wurden [103]. Die Molekülmasse bezieht sich auf die natürliche Isotopenverteilung.

Protein	Extinktionskoeffizient $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei $\lambda = 280\text{nm}$	Molekülmasse Da
HLA-B*27:05	69120	31885,1
HLA-B*27:09	69120	31907,2
$\beta_2\text{m}$ (human)	20065	11862,3
$\beta_2\text{m}$ (aviär)	17085	11252,7
HLA-B*27:05/pVIPR	100185	45105,1
HLA-B*27:05/TIS	89185	44956,0
HLA-B*27:09/pVIPR	100185	45127,2
HLA-B*27:09/TIS	89185	44890,9
YUH1-Protease	28420	27555,5
Ubiquitin	1490	10720,1
Ubiquitin-pVIPR	12490	12095,7
Ubiquitin-TIS	1490	11859,5
pVIPR	11000	1393,6
TIS	–	1157,4

2.4.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteingemische wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt [107]. Die Elektrophorese fand in einer „SE250 MightySmall“ Elektrophoresekammer (Hofer) statt. Sammelgele (125 mM Tris-HCl, pH= 6,8) besaßen eine Polyacrylamidkonzentration von 5%, Trenngele (750 mM Tris-HCl, pH= 8,8) 18%. Beide Geltypen wurden mit Hilfe der Acrylamidlösung „Rotiphorese 30A“ (Carl Roth) hergestellt.

Die zu analysierende Proteinlösung wurde mit 6× Probenpuffer versetzt. Die Proteinkonzentration der Proben wurden gegebenenfalls mit verdünntem Probenpuffer angepasst, um einen Überladung des Gels zu vermeiden. Die Proben wurden in dem Probenpuffer für 15 min bei 95 °C denaturiert und anschließend abgekühlt auf das Gel aufgetragen.

Sollten die Proteine ganzer Zellen analysiert werden, wurde deren Absorption bei $\lambda=600$ nm bestimmt, das Äquivalent von 1 OD pelletiert und in 25 μ l Sarkosyl-Lysepuffer aufgenommen und für 15 min bei 95 °C denaturiert, dann in 75 μ l 1× SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen.

Als Größenstandard wurde „Prestained Precision Plus“ (Bio-Rad) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei konstanter Wattzahl (4 W je Gel). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in Gel-Fixierlösung fixiert, für mindestens 30 min mit Gel-Färbelösung gefärbt und anschließend in Wasser entfärbt. Zur Beschleunigung wurde die Entfärbeflüssigkeit auf etwa 90 °C erhitzt und ein Zellstofftuch zugegeben.

2.5 NMR-Experimente

2.5.1 Aufnahme der NMR-Daten

Die Messungen wurden an Spektrometern von Bruker (600 MHz, 750 MHz) mit Topspin in den Versionen 2 und 3 durchgeführt. Die Geräte waren mit heliumgekühlten Cryo-Messköpfen und z-Gradienten ausgestattet. Die Experimente wurden bei ca. 310 K (Zuordnungsexperimente) bzw. genau 309,6 K (Relaxationsexperimente) ausgeführt und mit 2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonat (DSS) auf eine Protonenfrequenz von 0.0 ppm kalibriert. Die gewählten Aufnahmeparameter für die HLA-Komplexe finden sich in den Tabellen 2.17 und 2.19; die Parameter für humanes und Hühner- β_2 m in den Tabellen 2.18 und 2.20.

Tab. 2.17: Die Aufnahmeparameter der dreidimensionalen NMR-Experimente für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Kerne H, N, C α , C β , CO und der Methylgruppen-Kohlenstoffe und -Protonen der HLA-Proteine.

Komplex HLA-B*27	<i>c</i> μ M	ID –	Experiment –	Pulsprogramm –	scans <i>n</i>	TD ₃ <i>n</i>	TD ₂ <i>n</i>	TD ₁ <i>n</i>
:05/pVIPR	244	120822.7	HNCACB	MFhncacbwg_tr	32	1024	100	110
	244	121012.4	HN(CO)CACB	MFhncocacbwg_tr	40	1024	110	118
	127	111222.15	HNCA	MFhncawg_tr	32	1024	100	100
	244	120103.3	HNCA	MFhncawg_tr	24	1024	172	100
	172	120217.4	HN(CO)CA	MFhncocaiwg_tr	32	1024	100	92
	127	111222.17	HNCO	MFhncowg_tr	16	1024	128	128
	172	120223.4	HN(CA)CO	MFhncacowg_tr	48	1024	100	128
:05/TIS	330	120719.16	HNCA	MFhncawg_tr	32	1024	100	118
	330	141222.8	HN(CO)CA	MFhncocaiwg_tr	32	1024	110	118
:09/pVIPR	606	110627.4	HNCACB	MFhncacbwg_tr	16	1024	140	100
	606	110627.6	HN(CO)CACB	MFhncocacbwg_tr	16	1024	140	100
	606	110706.6	HNCA	MFhncawg_tr	16	1024	270	100
	606	110719.4	HN(CO)CA	MFhncocaiwg_tr	16	1024	270	100
	606	110623.14	HNCO	MFhncowg_tr	8	1024	140	128
	606	110706.4	HN(CA)CO	MFhncacowg_tr	16	1024	140	100
	151	120417.21	CH ₃ -Zuord.	pFkaych3wtgf2_nostep	8	1024	128	n.a.
	151	120424.13	CH ₃ -Zuord.	pFkaych3wtgf2_onestep.2	8	1024	128	80
	151	120522.13	CH ₃ -Zuord.	pFkaych3wtgf2_threesteps.2	24	1024	141	80
:09/TIS	477	111004.6	HNCACB	MFhncacbwg_tr	16	1024	140	100
	477	111011.5	HN(CO)CACB	MFhncocacbwg_tr	16	1024	140	100
	477	111025.4	HNCA	MFhncawg_tr	16	1024	226	100
	477	111114.6	HN(CO)CA	MFhncocaiwg_tr	16	1024	270	100
	477	111004.8	HNCO	MFhncowg_tr	8	1024	132	128
	477	111011.7	HN(CA)CO	MFhncacowg_tr	16	1024	108	100
	255	120615.5	CH ₃ -Zuord.	pFkaych3wtgf2_nostep	8	1024	256	n.a.
	255	120615.8	CH ₃ -Zuord.	pFkaych3wtgf2_onestep.2	16	1024	128	80
	255	120615.10	CH ₃ -Zuord.	pFkaych3wtgf2_threesteps.2	48	1024	112	80

Tab. 2.18: Aufnahmeparameter der dreidimensionalen NMR-Experimente für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Kerne H, N, C α , C β , CO und der Methylgruppen-Kohlenstoffe und -Protonen des Hühner- β_2 m.

<i>c</i> mM	ID –	Experiment –	Pulsprogramm –	scans <i>n</i>	TD ₃ <i>n</i>	TD ₂ <i>n</i>	TD ₁ <i>n</i>
1,38	110414.5	HNCACB	MFhncacb_best	8	1024	128	128
1,38	110414.7	HN(CO)CACB	MFhncocacb_best	8	1024	128	128
1,38	110420.9	HNCA	MFhncacb_best	16	1024	180	96
1,38	110420.10	HN(CO)CA	MFhncocai_best	16	1024	180	96
1,38	110414.9	HNCO	MFhncoc_best	4	1024	128	128
1,38	110414.11	HN(CA)CO	MFhncaco_best	16	1024	128	128

Tab. 2.19: Aufnahmeparameter der NMR-Experimente, mit denen die ^{15}N -Relaxation der HLA-Proteine bestimmt wurde. Die markierten Untereinheiten sind in der Spalte „UE“ aufgeführt (HC, schwere Kette). Pulsprogramme sind in Anhang 6 aufgeführt.

Komplex HLA-B*27	UE	ω MHz	c μM	Exp.	Pulsprogramm	ID	scans n	TD_2 n	TD_1 n
	HC	600	330	R_1	mb15nt1trosey_3d_3	140117.4	32	1024	180
	HC	600	330	R_2	mb15nt2trosey_3d_4	150212.4	64	2048	240
	HC	600	330	NOE	pF15nnoetrosey_3d_3	131129.10	96	1024	200
	HC	750	330	R_1	mb15nt1trosey_3d_3	140128.4	24	1024	200
	HC	750	330	R_2	mb15nt2trosey_3d_4	140128.6	64	1024	200
	HC	750	330	NOE	pF15nnoetrosey_3d_3	140128.8	96	1024	194
:05/pVIPR	$\beta_2\text{m}$	600	330	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140120.4	40	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	600	330	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140120.6	40	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	600	330	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140806.4	80	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140416.4	40	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140416.6	40	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140416.8	80	1024	128
	HC	600	330	R_1	mb15nt1trosey_3d_3	141222.4	32	1024	240
	HC	600	330	R_2	mb15nt2trosey_3d_4	150106.4	64	1024	240
	HC	600	330	NOE	pF15nnoetrosey_3d_3	150106.6	64	1024	240
	HC	750	330	R_1	mb15nt1trosey_3d_3	141203.4	32	1024	240
	HC	750	330	R_2	mb15nt2trosey_3d_4	141121.6	64	1024	220
:05/TIS	HC	750	330	NOE	pF15nnoetrosey_3d_3	141203.6	48	1024	240
	$\beta_2\text{m}$	600	330	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140521.4	24	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	600	330	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140521.6	64	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	600	330	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140521.8	96	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140428.4	40	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140428.6	40	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140428.8	80	1024	128
	HC	600	330	R_1	mb15nt1trosey_3d_3	141002.4	24	1024	200
	HC	600	330	R_2	mb15nt2trosey_3d_4	131230.6	32	1024	200
	HC	600	330	NOE	pF15nnoetrosey_3d_3	131230.8	96	1024	171
	HC	750	330	R_1	mb15nt1trosey_3d_3	131219.4	32	1024	200
	HC	750	330	R_2	mb15nt2trosey_3d_4	140606.4	64	1024	200
	HC	750	330	NOE	pF15nnoetrosey_3d_3	131219.8	96	1024	200
:09/pVIPR	$\beta_2\text{m}$	600	330	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140610a.4	32	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	600	330	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140610a.6	64	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	600	330	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140610a.8	80	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140610b.4	40	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140610b.6	64	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140624.4	72	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140610b.8	80	1024	128
	HC	600	330	R_1	mb15nt1trosey_3d_3	140221.4	24	1024	180
	HC	600	330	R_2	mb15nt2trosey_3d_4	140221.6	64	1024	100
	HC	600	330	NOE	pF15nnoetrosey_3d_3	140221.8	96	1024	194
	HC	750	330	R_1	mb15nt1trosey_3d_3	131230.4	32	1024	200
	HC	750	330	R_2	mb15nt2trosey_3d_4	140320.4	32	1024	200
	HC	750	330	NOE	pF15nnoetrosey_3d_3	140320.6	96	1024	200
:09/TIS	$\beta_2\text{m}$	600	330	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140527.4	24	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	600	330	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140527.6	64	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	600	330	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140527.8	96	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140411.4	40	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140411.6	40	1024	128
	$\beta_2\text{m}$	750	330	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140602.4	80	1024	128

Tab. 2.20: Aufnahmeparameter der NMR-Experimente, mit denen die ^{15}N -Relaxation des humanen und Hühner- $\beta_2\text{m}$ bestimmt wurde. Pulsprogramme sind in Anhang 6 aufgeführt.

Protein $\beta_2\text{m}$	ω MHz	c μM	Exp. –	Pulsprogramm –	ID –	<i>scans</i> <i>n</i>	TD_2 <i>n</i>	TD_1 <i>n</i>
Mensch	600	430	R_1	mb15nt1wtg_3d_11	140627.4	48	1024	128
	600	430	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140627.6	40	1024	128
	600	430	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140627.8	96	1024	128
	750	430	R_1	mb15nt1wtg_3d_11	140815.4	32	1024	128
	750	430	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140815.6	40	1024	128
	750	430	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140423.8	96	1024	128
Huhn	600	430	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140815.6	32	1024	128
	600	430	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140815.4	40	1024	128
	600	430	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140605.8	96	1024	126
	750	430	R_1	mb15nt1wtg_3d_10	140528.4	32	1024	128
	750	430	R_2	mb15nt2wtg_3d_3	140528.6	40	1024	128
	750	430	NOE	pF15nnoewtg_3d_6	140528.8	96	1024	128

2.5.2 Prozessierung der spektralen Daten

Die Verarbeitung und Fourier-Transformation der Daten für die Relaxationsanalyse erfolgte mit Hilfe von `NMRpipe` [88]. Die Bruker-Daten wurden mit `bruk2pipe` und dem `fid.com`-Skript in das `NMRpipe`-Format konvertiert, das in Anhang 7 wiedergegeben ist. Das Pseudo-3D-Spektrum wurde mit Hilfe des `pseudo3D.com`-Makros in 2D-Spektren zerlegt. Bei der Prozessierung wurden *truncation*-Artefakte möglichst vermieden, da diese benachbarte Signale stark beeinflussen können. Eine Interpolation durch *zero-filling* auf bis zu 8192 Punkte stellte sicher, dass das Signal-Picking nicht durch die digitale Auflösung des Spektrums verfälscht wird. Ein Beispiel für typische verwendete Prozessierungsparameter findet sich in Anhang 7.1. Die Spektren wurden anschließend mit `Sparkys pipe2ucsf` in das UCSF-Format konvertiert.

Die Bestimmung der Signalintensitäten erfolgte mit `Sparky` [90]. Dafür wurden das erste Einzelspektrum geöffnet und eine zuvor aus `CCPN Analysis` exportierte Signal-Liste mit der `rp`-Funktion eingelesen. Die Signalpositionen dieser Liste wurden mit der `pc`-Funktion und ggf. manuell korrigiert und mit `lt` als neue Signal-Liste abgespeichert. Für alle weiteren Spektren wurden die Signalpositionen dieser Liste kopiert, und die Signalhöhe an dieser identischen Stelle neu bestimmt. Damit sollte eine systematische Fehlbestimmung der Signalhöhe vermieden werden [108].

Für die Bestimmung der Signalintensität wurden Peakhöhen verwendet. Signale, die näher

als eine Peakbreite zusammen lagen, wurden von der Analyse ausgeschlossen (siehe auch Hilfsskript `determine_unresolved.R`, lauffähig in R [91], in Anhang 7). Zur Bestimmung des Basislinien-Rauschens wurde die `rm`-Funktion von Sparky verwendet.

2.5.3 Datenverarbeitung, statistische Methoden

Bestimmung der Raten und des Hetero-NOEs. Die Bestimmung der Raten R_1 und R_2 , und des *steady-state* $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -heteronuklearer Kern-Overhauser-Effekt (Hetero-NOE)-Wertes erfolgte in `relax` 3 [97] mit Hilfe der mitgelieferten Skripte `relax_fit.py` und `noe.py`. Für die Abschätzung des Fehlers in der Bestimmung der Raten verwendete das Programm 500 Monte-Carlo-Simulationen. Mit Hilfe einer Programmiererweiterung von Gary Thompson, `OpenMPI` [109] und dem Python-Modul „MPI for Python“ (`mpi4py`, Centro de Investigación de Métodos Computacionales, Santa Fe, Argentinien) wurde die Berechnung auf mehreren Rechenkernen parallelisiert und somit beschleunigt.

Konsistenztests und Sicherstellung der Vergleichbarkeit. Daten aus Messungen, die bei verschiedenen Feldstärken aufgenommen wurden, sollten untereinander konsistent sein, damit sie gemeinsam mit Hilfe des *model-free*-Formalismus analysierbar waren. So wurden mit Hilfe von `relax` Konsistenztests durchgeführt [110]. Dabei wurden feldunabhängige Werte wie die spektrale Dichte bei Nullfrequenz $J(0)$ für jeden Spin errechnet und miteinander verglichen. Im Idealfall weichen diese Parameter nicht voneinander ab und spiegeln nur die zufällige experimentelle Unsicherheit wider. Vor der Verwendung der Relaxationsparameter für die *model-free*-Analyse wurde eine grobe Normierung von deren experimentellen Fehlern vorgenommen, um die Vergleichbarkeit der Daten von den vier verschiedenen HLA-Komplexen zu verbessern. Verschiedene Fehlerwerte kommen durch unterschiedliche Qualitäten der zugrundeliegenden Spektren zustande: so kann sich das Signal-Rausch-Verhältnis einzelner Messungen voneinander abweichen, weil sich das Probenvolumen, die Qualität des *shims* oder die Qualität der Lösungsmittelunterdrückung unterschieden. Dafür wurde die mittlere Unsicherheit des Datensatzes mit den größten Fehlerwerten bestimmt und als Referenzwert festgelegt. Die Unsicherheiten der weiteren Datensätze wurden daraufhin auf diesen Wert normalisiert. Extreme Fehler (Ausreißer) wurden von diesem Verfahren ausgeschlossen.

2.5.4 Model-free-Analyse

Die *model-free*-Analyse basiert auf der Regression und Optimierung von vereinfachten Spektraldichtefunktions-Modellen, deren Parameter durch experimentelle Daten bestimmt wer-

den [75,76]. Diese *model-free*-Modelle verfügen über bis zu sechs Parameter; für die Charakterisierung des Relaxationsverhaltens stehen allerdings experimentell nur drei Parameter (R_1 , R_2 und Hetero-NOE) zur Verfügung. Damit die Regressionsanalyse nicht an einem unterbestimmten System stattfindet, sollen die Relaxationsparameter bei mindestens zwei Feldstärken bestimmt werden. Damit stehen mindestens sechs unabhängige Parameter für die Analyse zur Verfügung. Diesem Grundsatz folgend, wurden für alle Proteinkomplexe die Parameter R_1 , R_2 und heteronuklearer NOE bei den beiden Feldstärken 14,09 T (600 MHz) und 17,6 T (750 MHz) bestimmt.

Die *model-free*-Analyse wurde mit Hilfe von `relax 3` vorgenommen und erfolgte nach dem Protokoll von EDWARD D'AUVERGNE [85, 86, 97, 111]. Wie `Modelfree4`, `Dasha`, `Tensor2` oder `Dynamics` baut `relax` auf dem ursprünglichen Formalismus [75,76] und dessen Erweiterungen [78] auf, verwendet aber robustere Verfahren zur Selektion der *model-free*-Modelle und der Optimierung ihrer Parameter [85,86].

So werden die Modellfunktionen der Spinsysteme zuerst lokal optimiert und mit Hilfe von Akaikes Informationskriterium (*Akaike's information criterion*, AIC) selektiert [112]. Das AIC wägt die Güte der Anpassung des Modells an die Daten gegen die Zahl der Parameter ab. Niedrigere Werte sind ein Maß für ein besseres Modell, das bei einer niedrigen Zahl von Parametern immer noch eine gute Anpassung liefert. Fehlerhafte Modelle werden verworfen [111].

Aus den optimierten lokalen Modellen schätzt `relax` das initiale Diffusionsmodell ab, auf dessen Grundlage die lokalen Modelle der Spinsysteme abermals optimiert wurden. Iterativ wird so eine Konvergenz des globalen Modells (Diffusionstensor und *model-free*-Modelle) erreicht. Aus optimierten Modellen mit isotroper, prolater, oblater und ellipsoider Diffusionscharakteristik wird am Ende durch das AIC das statistisch beste Modell ausgewählt. Abschließend berechnet `relax` die Unsicherheiten der *model-free*-Parameter mit Hilfe von Monte-Carlo-Simulationen und verwirft fehlerhafte Simulationen.

Hybride Diffusionsmodelle berücksichtigen die Beweglichkeit zwischen strukturell unabhängige Untereinheiten [113]. Die Untereinheiten werden unabhängig voneinander analysiert und dann zu einem hybriden Modell zusammengefügt.

Verwendete *model-free*-Modelle für die lokale Dynamik umfassten die Parameter

$$\begin{aligned}
m0 &= \{\}, \\
m1 &= \{S^2\}, \\
m2 &= \{S^2, \tau_e\}, \\
m3 &= \{S^2, R_{ex}\}, \\
m4 &= \{S^2, \tau_e, R_{ex}\}, \\
m5 &= \{S^2, S_f^2, \tau_s\}, \\
m6 &= \{S^2, \tau_f, S_f^2, \tau_s\}, \\
m7 &= \{S^2, S_f^2, \tau_s, R_{ex}\}, \\
m8 &= \{S^2, \tau_f, S_f^2, \tau_s, R_{ex}\}, \\
m9 &= \{R_{ex}\}.
\end{aligned}$$

Für die initiale Modellierung der lokalen Modelle durch `relax` tritt der Parameter τ_m hinzu. Die Bindungslänge zwischen H und N wurde auf $r=1,02 \text{ \AA}$ festgelegt, die Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA) auf $\Delta_\sigma=172 \text{ ppm}$.

2.5.5 Vorbereitung der PDB-Strukturen

Die Strukturen aus der Proteindatenbank (PDB) enthielten keine Protonen. Diese wurden mit `reduce` (AMBER11) angefügt, dabei wurden die Optionen `-build -allalt` gesetzt. `Reduce` produziert fehlerhafte PDB-Dateien ohne fortlaufende Identifikationsnummern. Dies wurde mit dem R-Pakets `bio3d` korrigiert:

```

library(bio3d)
pdb <- read.pdb("mypdb.pdb")
pdb$atom[, "eleno"] <- 1:length( pdb$atom[, "eleno"] )
write.pdb(pdb, file="correctpdb.pdb", chainter=T)

```

Die Orientierung der HLA-Strukturen wurde mit `PyMol` und dessen `cealign`-Funktion normiert.

2.5.6 Vorhersage von Diffusions- und Relaxationsverhalten von Molekülen

Für die Vorhersage von NMR-Korrelationszeiten und zur Abschätzung des Diffusionsverhaltens wurde `Hydronmr 7c` genutzt. `Hydronmr` simuliert die Diffusion und hydrodynamischen

Eigenschaften eines Moleküls in einer Lösung bestimmter Viskosität, basierend auf einem einfachen, statischen Kugelmodell. Damit können auch Relaxationsparameter bei einer gegebenen Feldstärke vorhergesagt werden. Dem Programm wurden 3D-Strukturen (PDB-Einträge: 1ogt, 1of2, 1w0w, 1w0v, 1lds, 3o81), die Temperatur (37 °C) und die Viskosität der Lösung zur Verfügung gestellt. Die Viskosität des 150 mM Phosphatpuffers (pH=7,5; 10mM NaCl) wurde mit `Sednterp 2` auf $\eta = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ kg/s}\cdot\text{m}$ berechnet.

2.5.7 Sonstige verwendete Software.

Die Datenaufbereitung und deren graphische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistik-Umgebung R [91] unter Zuhilfenahme der Erweiterungspakete `ggplot2`, `reshape`, `plyr` und `fields`. Für Strukturdarstellungen wurde PyMol (Schrödinger) in der Version 1.7, sowie die Erweiterungen `alphatoall.py` und `spectrumbar.py` verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Probenherstellung

Das vollständige HLA-B*27-Heterotrimer lässt sich nicht direkt in löslicher Form herstellen. Stattdessen wird der Komplex *in vitro* aus seinen Einzelkomponenten durch Rückfaltung mittels *rapid dilution* aus in Harnstoff entfalteten Proteinen hergestellt [102]. Damit ergibt sich im vorliegenden System die Möglichkeit, die Zahl der Signale in den NMR-Spektren zu reduzieren, indem nur eine Komponente des Komplexes mit NMR-aktiven Isotopen markiert wird, während die anderen Untereinheiten unmarkiert bleiben. Die Einzelkomponenten werden separat rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt. Für eine NMR-Probe sind mehrere Milligramm des Peptid-Antigens erforderlich. In unmarkierter Form können kurze Peptide kostengünstig durch Festphasensynthese hergestellt werden. Die Festphasensynthese isotoopenmarkierter Peptide ist wegen der hohen Kosten von isotoopenmarkierten, mit Schutzgruppen ausgestatteten Aminosäurevorstufen extrem teuer. Daher wurde eine Strategie etabliert, um isotoopenmarkierte Peptide biosynthetisch als Ubiquitin-Fusionsproteine herzustellen.

3.1.1 Isotoopenmarkierte Peptide

Die isotoopenmarkierten Peptide wurde biosynthetisch hergestellt. Dabei wird das Zielpeptid C-terminal an das eukaryotische Ubiquitin angehängt (Kapitel 2.2) und nach dessen Reinigung mit einer spezifischen Ubiquitin-Protease (Yeast Ubiquitin Hydrolase, Gen *YUH1*) abgespalten. In ähnlicher Form wurde diese Methode bereits für die Produktion von anderen Peptiden verwendet [104, 105, 114, 115].

Isolation des biosynthetisch hergestellten Peptids. Das Peptid wurde durch Spaltung des Fusionsproteins mit YUH-Protease erhalten (Kapitel 2.4.7). Die Protease wurde separat in LB-Medium exprimiert (Kapitel 2.3.3), mit einer Ausbeute von 80-90 mg je Liter Medium. Die Abtrennung des Peptids aus dem Spaltungsansatz erfolgte durch präparative HPLC (Kapitel 2.4.8). Beispielhafte Elutionsdiagramme sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

Als Alternative zum HPLC-Verfahren wurde eine kostengünstigere Strategie etabliert, die den

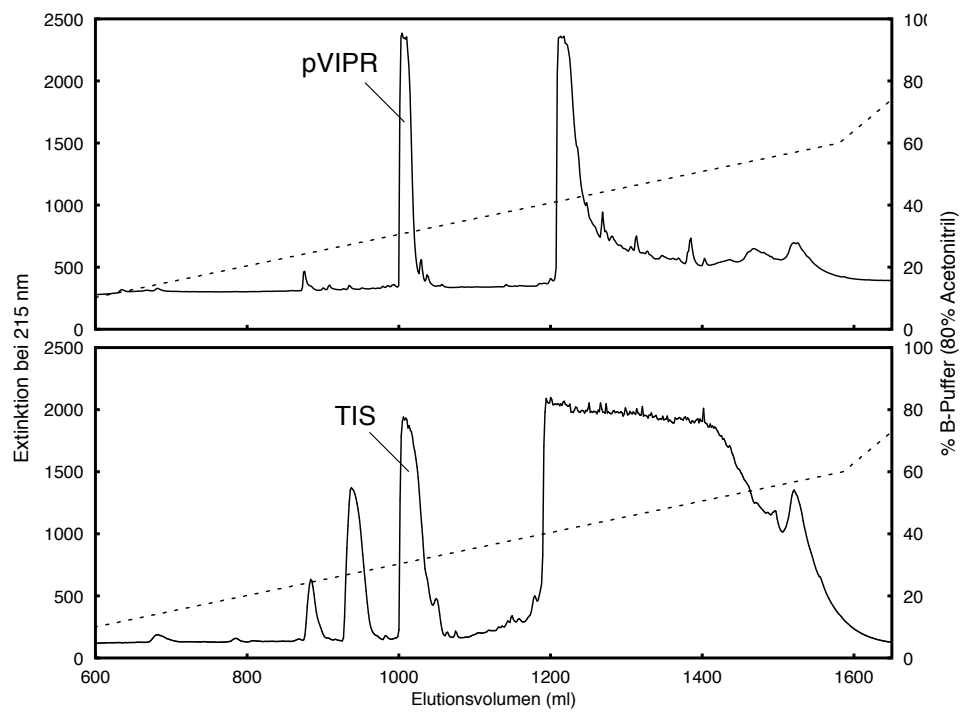


Abb. 3.1: HPLC-Elutionsdiagramme mit UV-Extinktion (durchgezogene Linie) und Acetonitril-Konzentration (gestrichelte Linie). Die Peptide pVIPR (oben) und TIS (unten) wurden von Ubiquitin und YUH, sowie weiteren Verunreinigungen, abgetrennt. Die Peaks mit den Peptiden sind gekennzeichnet.

Lösungsmittelverbrauch reduziert und die Aufreinigung beschleunigt. Dabei kamen Kartuschen zur Ultrafiltration und Festphasenextraktion zum Einsatz (Kapitel 2.4.9). Dabei wurden nicht die Reinheitsgrade einer Reinigung mittels HPLC erreicht, was für die HLA-Komplexbildung aber auch nicht erforderlich war.

Das lyophilisierte Peptid wurde in Wasser gelöst und für die Probenherstellung eingesetzt (Kapitel 3.1.2). Durch massenspektrometrische Messungen (Tabelle 3.1) sowie die Aufnahme von NMR-Spektren und den Vergleich mit Spektren synthetisch hergestellter Peptide mit natürlicher Isotopenhäufigkeit wurde die Identität des Peptids überprüft. Die Peptidmasse für pVIPR weicht leicht vom erwarteten Wert ab (Differenz: 1,16). Diese Differenz ist nicht durch posttranslationale Modifikationen, wie sie etwa auf www.unimod.org aufgeführt sind, erklärbar. Im NMR-Spektrum ist eine Abweichung der chemischen Verschiebungen zu beobachten. Vermutlich ergeben unterschiedliche pH-Werte leichte Unterschiede in der chemischen Verschiebung (Abbildung 3.2). Die Peptidmasse von TIS ist identisch zum erwarteten Wert. Im TIS-Spektrum ist allerdings ein Peak erkennbar, das in den unmarkierten Peptiden nur sehr schwach erkennbar ist. Die Intensitäten und Breiten der Signale in den SOFAST-HMQC-Spektren sind unterschiedlich.

Die Lyophilisate wurden nach der HPLC gewogen. Die Ausbeuten lagen bei ca. 20 mg (TIS) bzw. 5 mg (pVIPR) je Liter M9-Medium.

Tab. 3.1: Mittels MALDI-TOF bestimmte Massen der biosynthetisch produzierten Peptide pVIPR und TIS (unmarkiert, MH^+ -Ionisierung, TIS: monoisotopischer Wert, pVIPR: Durchschnittswert).

Peptid	erwartete Masse (Da)	gefundene Masse (Da)
TIS	1157,65	1157,73
pVIPR	1394,67	1395,83

3.1.2 Herstellung der HLA-Komplexe

Die extrazellulären Domänen der schweren Ketten von B*27:05 und B*27:09 wurden in *inclusion bodies* in *Escherichia coli* exprimiert. Zellen mit HLA-B*27:05 und B*27:09 wurden in der AG Diehl je nach Anwendung in verschiedenen Markierungsmustern hergestellt. Die Ausbeute an rückgelöstem HLA-Protein betrug zwischen 100 und 250 mg Protein je Liter M9-Medium. Der Markierungsgrad der Proteine wurde nicht bestimmt, da die Proben bereits NMR-Spektren hoher Qualität lieferten. Die auf diese Art hergestellten HLA-Proteine wurden denaturiert für die Rückfaltung und Komplex-Herstellung (Kapitel 2.4.2) eingesetzt.

Die HLA-Komplexe wurden durch ein *rapid-dilution*-Verfahren hergestellt, bei dem die Pro-

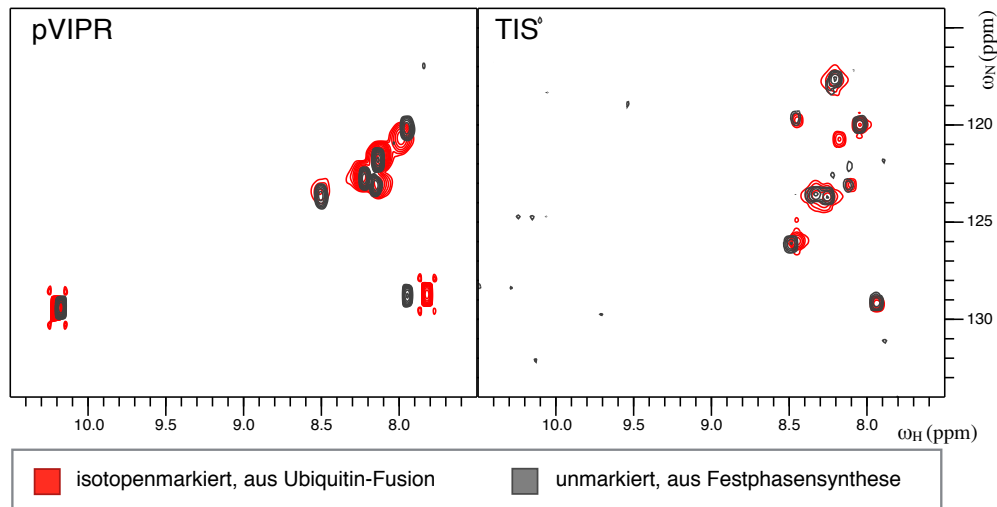


Abb. 3.2: ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren der Peptide pVIPR (links) und TIS (rechts), jeweils mit natürlicher Isotopenhäufigkeit (grau) und $\text{U-}^{15}\text{N}$ -isotopenmarkiert (rot). Alle vier Spektren sind vom Typ SOFAST-HMQC [116].

teine denaturiert und in Harnstoff gelöst vorlagen und infolge anschließender starker Verdünnung in einer Pufferlösung renaturierten und zu Proteinkomplexen zusammenfügten (Kapitel 2.4.3). Entsprechend der gewünschten Zusammensetzung der zu untersuchenden HLA-Komplexe wurde das entsprechende Markierungsmuster gewählt.

Nachdem die Faltung der Komplexe abgeschlossen war, wurde das Probenvolumen von 1000-2000 ml auf 1-2 ml verringert (Kapitel 2.4.4). Die Pufferlösung wurde, da das Peptid noch im Überschuss vorlag, für weitere Komplexbildungen eingesetzt. Der Puffer der Probe wurde gegen einen 10 mM Phosphatpuffer (pH=7,5 mit 150 mM NaCl) getauscht. Die konzentrierte Probe wurde einer Gelpermeationschromatographie (Kapitel 2.4.5) unterzogen, um Multimer fehlgefalteter Komplexe und $\beta_2\text{m}$ von reinem HLA-Trimer abzutrennen.

Die Lösung mit dem korrekt assemblierten Komplex wurde mit Hilfe von Amicon Ultra-Zentrifugationsröhrchen auf das Zielvolumen eingestellt und mit 10% D_2O versetzt. Gefaltetes $\beta_2\text{m}$ wurde gesammelt und für weitere Komplexbildungen eingesetzt.

Für die Proben, die für die Aufnahme von Spektren für die sequenzielle Zuordnung verwendet wurden, wurde eine möglichst hohe Konzentration von bis zu etwa 0,6 mM angestrebt. Die Proben für die Relaxationsmessungen wurden auf möglichst genau auf 0,330 mM eingestellt, um eine Vergleichbarkeit der Einzelmessungen zu gewährleisten und gleichzeitig ausreichend Probenvolumen zur Verfügung zu haben. Anstatt konventioneller 5 mm-NMR-Messröhrchen, die ca. 600 μl Probe benötigen, wurden Shigemi-Messröhrchen (Shigemi Inc.)

aus Spezialglas und mit Glasstempel verwendet. Dadurch konnte das Probenvolumen auf etwa jeweils 300 μl reduziert werden. Gleichzeitig wurde durch den Glasstempel der Gasaustausch verringert, sodass die Lebensdauer der Probe verlängert wurde.

Für die Gewinnung von zwei NMR-Proben mit je 0,33 mM in etwa 300 μl war der Einsatz von mindestens 45 mg (1,41 μmol) HLA-Protein notwendig. Bezogen auf die HLA-Stoffmenge ergibt sich so eine Ausbeute des assemblierten HLA-Komplexes von maximal 14%.

3.2 Zuordnung der HLA-gebundenen Peptide

Durch das oben beschriebene Protokoll konnten zwei Proben mit stickstoff- und kohlenstoffmarkiertem TIS hergestellt werden. ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von TIS (Sequenz RRLPIFSRL) in den beiden HLA-Komplexen B*27:05 und B*27:09 sind in Abbildung 3.3 zu sehen.

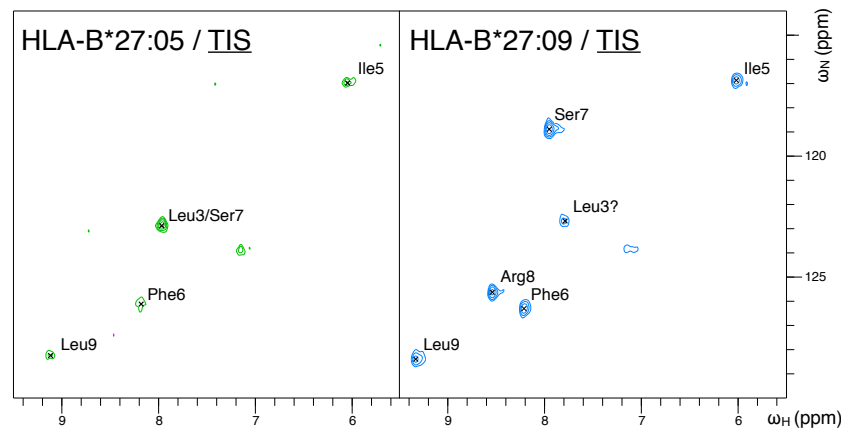


Abb. 3.3: ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren des Peptids TIS (RRLPIFSRL) in HLA-B*27:05 und B*27:09. Es sind lediglich die Korrelationen der Amide der fünf terminalen Aminosäuren erkennbar, sowie ein schwaches Arg-Seitenkettensignal (hier nicht beschriftet).

Die Amid-Signale der Peptide im Komplex sollten zugeordnet werden. Die markierten Peptide im ansonsten unmarkierten ($\beta_2\text{m}$) bzw. deuterierten (HC) 45-kDa-Komplex zeigten extrem breite und schwache Signale. Somit waren diese nicht für Tripel-Resonanz-Spektroskopie zugänglich. Durch die gute Dispersion der Signale in der Protonendimension konnte zur Etablierung der Konnektivitäten auf ein ^{15}N -editiertes NOESY-Experiment (MFnoesyhsqc3, implementiert von Peter Schmieder und Monika Beerbaum) zurückgegriffen werden. Das

schlechte Signal/Rausch-Verhalten erforderte trotzdem bis zu 1000 Wiederholungen. Führt diese Strategie bei B*27:09/TIS noch zu einem zufriedenstellenden Ergebnis, war die Signalintensität bei B*27:05/TIS selbst bei der extrem hohen Zahl an Wiederholungen zu schwach, um die Konnektivitäten der Signale untereinander bestimmen zu können. Die Zuordnungen wurden daher von TIS in B*27:09 auf TIS in B*27:05 übertragen. Bei der Übertragung der Zuordnung des Signals bei $\omega_{\text{H}}=7,96$ ppm und $\omega_{\text{N}}=122,8$ ppm bestand jedoch noch Unsicherheit. Aus Spektren, die nicht Teil dieser Arbeit waren, von TIS mit selektiv $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -isotopenmarkierten Argininen und Phenylalanin war bekannt, dass das fragliche Signal weder Arginin noch Phenylalanin sein konnte. Damit verblieben als Möglichkeiten der Zuordnung noch pLeu3 und pSer7.

Als Gründe der so stark unterschiedlichen Spektrenqualität sind (effektive) Konzentrationsunterschiede, Probleme mit dem *shim* oder eine Denaturierung und Entfaltung des B*27:05-Proteins denkbar. Die Proteinkonzentration beider Proben war mit $330\ \mu\text{M}$ gleich. Ebenso bot die Qualität der eindimensionalen Protonenspektren keinen Anlass, an der Qualität des *shims* zu zweifeln. Mit hoher Wahrscheinlichkeit entfaltete oder denaturierte das instabilere B*27:05/TIS kurz vor oder während der Messung, sodass für die Messung effektiv weniger Peptid im Komplex zur Verfügung stand. Signale von freiem Peptid (Abb. 3.2) konnten nicht detektiert werden.

Es sind Gemeinsamkeiten in den Spektren beider Peptide erkennbar. Es zeigte sich, dass in beiden Komplexen nur der C-terminale Teil IFSRL des Peptids in den Spektren sichtbar ist. Von den drei N-terminalen Aminosäuren RRL vor dem unsichtbaren Prolin wären ohnehin nur die zwei Amide von Arginin-2 (pArg2) und pLeu3 detektierbar. Im Spektrum findet sich neben dem mehrfach gefalteten Arginin-Seitenkettensignal bei $\omega_{\text{H}}=7,1$ ppm nur noch ein schwaches Signal bei $\omega_{\text{H}}=7,8$ ppm, das als Kandidat für pArg2 oder pLeu3 gelten könnte.

Betrachtet man die Unterschiede, ist in B*27:05 das Signal von pArg8 nicht sichtbar. Ebenso sind die Signalintensitäten stark vermindert. Die meisten chemischen Verschiebungen sind weitestgehend identisch, nur pLeu3/pSer7 befindet sich an einer anderen Position.

3.3 Implementierung der NMR-Experimente

3.3.1 Pulsprogramme zur Relaxationsanalyse

Für die Relaxationsanalyse wurden drei Parameter bei den zwei Feldstärken 600 MHz und 750 MHz betrachtet: die longitudinale Relaxationsrate R_1 , die transversale Relaxationsrate R_2 und des Hetero-NOE. HSQC-basierte Experimente wurden bei der Messung von ^{15}N - $\beta_2\text{m}$

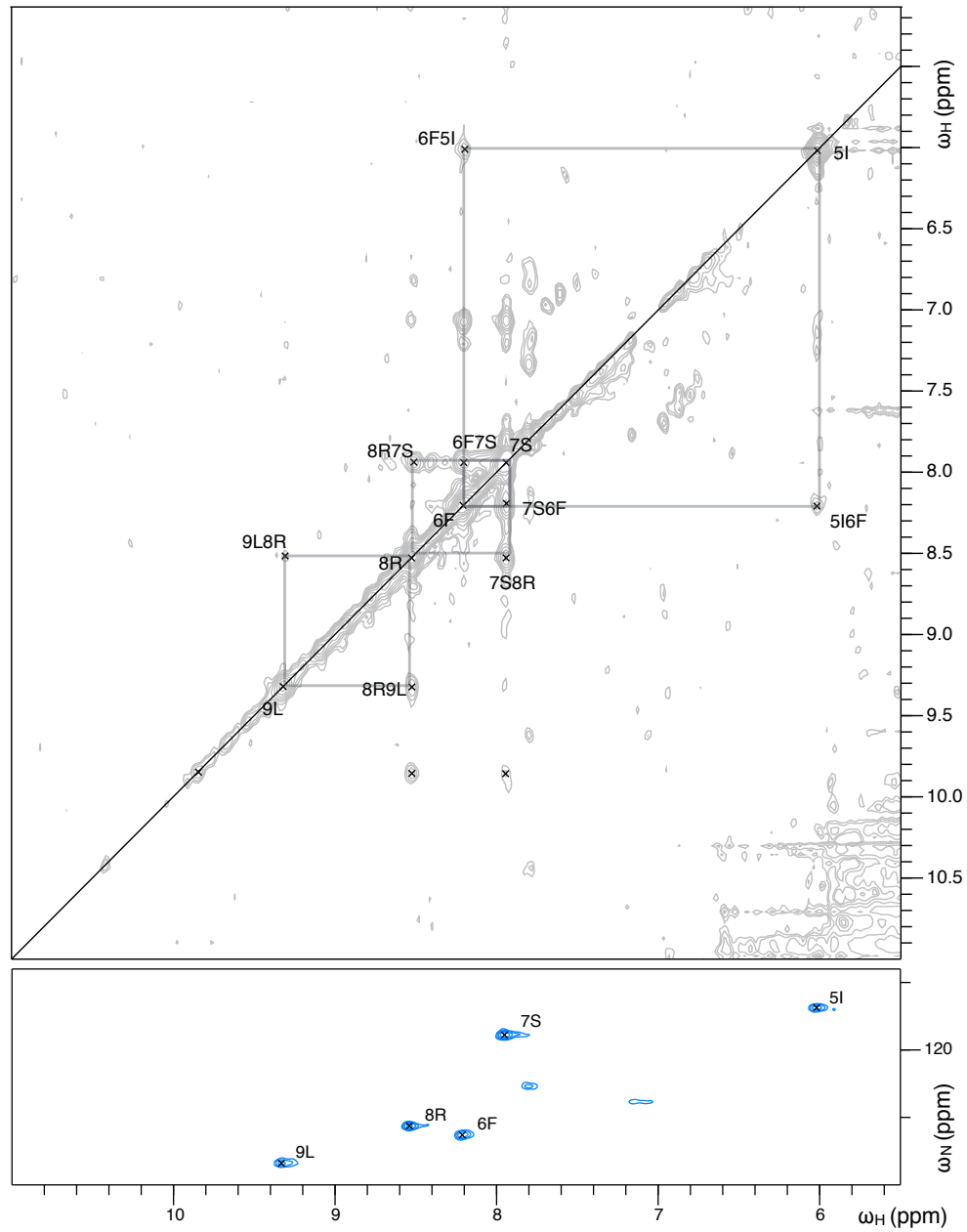


Abb. 3.4: Oben: Amidregion des ^{15}N -editierten NOESYs des isotopenmarkierten Peptids TIS in B*27:09. Unten: ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum des markierten Peptids in B*27:09. Die Konnektivitäten der Amidprotonen sind mit transparenten Rechtecken markiert.

in freier Form oder im Komplex angewendet. Die TROSY-basierten Varianten wurden für die ^2H - ^{15}N -markierten schweren Ketten des HLA-Komplexes verwendet. Die Unterdrückung des Lösungsmittelsignals wurde durch die Verwendung der WATERGATE-Sequenz [117] bewerkstelligt. Die schematische Darstellung der Pulssequenzen der Experimente findet sich in den Abbildungen 3.5 bis 3.7.

Die longitudinale Relaxationsrate R_1 wurde über ein modifiziertes *inversion-recovery*-Experiment gemessen, das durch eine Anpassung des Phasenzyklus einen Abfall der Intensität vom höchsten Wert bis hin zu null ermöglicht. Da die Sättigung des Wassers die Relaxationsraten durch NOE-Effekte und chemischen Austausch beeinflusst, wurden zur Kontrolle der Wassermagnetisierung selektive 90° -*water-flipback*-Pulse eingesetzt [118]. In der TROSY-Variante des Experiments kam zur Refokussierung der ^1H -Kerne ein selektiver, auf die Amidprotonen zentrierter I-BURP-2-Puls [119], zum Einsatz. Dieser sollte unerwünschte Relaxationseffekte durch Kreuzkorrelationen unterdrücken [120]. Die Wartezeit zwischen den Wiederholungen betrug bei der Messung 3,5 s.

Die transversale Relaxationsrate R_2 wurde anhand von Carl-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)-Stickstoffpulsen variabler Länge bestimmt. Dazu wurde die Magnetisierung zuvor von Protonen auf die benachbarten Stickstoffspins übertragen, und nach erfolgter Relaxationsperiode zur Detektion zurück auf die Amidprotonen transferiert. Durch die rasche Abfolge der Stickstoffpulse gab es keine Möglichkeit, lange, selektive Pulse zur Refokussierung der ^1H -Magnetisierung zu verwenden. Obwohl in der Literatur aus praktischen Erwägungen von der Verwendung dieses Experiments abgeraten wird und stattdessen $R_{1\rho}$ -Messungen bevorzugt werden sollen, kann nicht darauf verzichtet werden, wenn chemischer Austausch (R_{ex}) detektiert werden soll. Die Wartezeit zwischen den Wiederholungen betrug in diesen Messungen 2 s.

Zur Messung des hetNOE wurde ein neues Sättigungsschema verwendet [121–123] und ebenfalls selektive 90° -*water-flipback*-Pulse eingesetzt (Rechteckform, 1 ms) [121]. Die Wartezeit zwischen den Wiederholungen betrug 10 s (Referenzexperiment) bzw. 2 s beim Sättigungsexperiment.

Insbesondere während des R_2 -Experiments kann es durch die Verwendung von zahlreichen 180° -Stickstoffpulsen während der Relaxationszeit zu einem Temperaturunterschied zwischen den Einzelmessungen kommen und die Signalqualität durch das Auftreten von Temperaturinhomogenitäten verschlechtern. Daher wurden Temperaturkompensierungs-Blöcke implementiert, die die Energieeintrag während eines jeden Experiments konstant hält.

Es besteht die Möglichkeit, dass sich das Signal-Rausch-Verhältnis während der Messung verändert, da Teile des gelösten Proteins ausfallen können und nicht mehr zum NMR-Signal

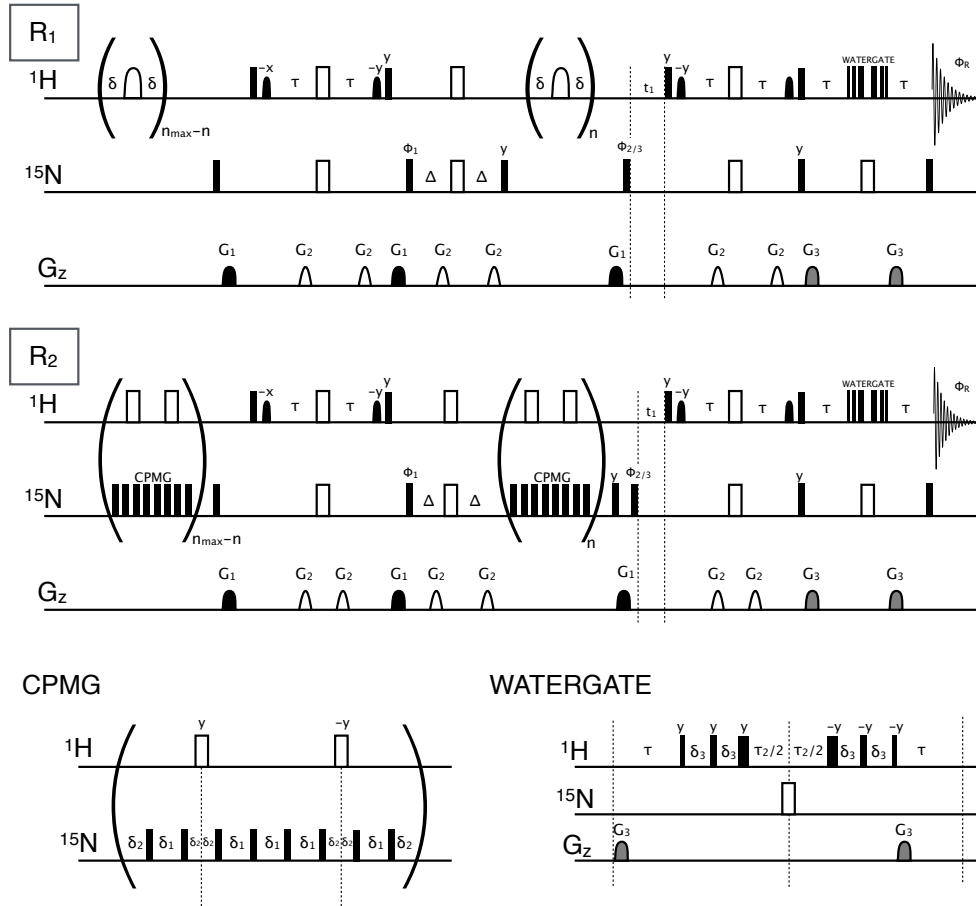


Abb. 3.5: Pulssequenzen für die Bestimmung der longitudinalen Relaxationsrate (R_1) und transversalen Relaxationsrate (R_2), mit TROSY. Schwarze Kästchen repräsentieren harte 90° -Pulse, offene Kästchen 180° -Pulse. Kleine schwarze Formen repräsentieren wasserselektive 90° *water-flipback*-Pulse mit einer Rechteckform und einer Länge von 1 ms bei 600 MHz. Große offene Formen sind Amidprotonen-selektive I-BURP-2-Pulse mit einer Länge von 2 ms (600 MHz). Delays: $\tau = \Delta = 1/2J_{\text{HN}} = 2,75$ ms. R_1 : $\delta = 20$ ms. R_2 : $\delta_1 = 1$ ms; mit $\delta_2 = \delta_1/2$. Evolution während t_1 . Gradienten: Die z-Gradienten G_z besitzen eine Sinusform und sind 1 ms (G_1, G_3) oder 200 μs (G_2) lang mit $G_1=5,5$ G/cm, $G_2=16,5$ G/cm und $G_3=19,25$ G/cm. Phasenzyklus: Pulse kommen aus der x-Richtung, sofern nicht anders angegeben. $\phi_1 = 4x, 4(-x)$; $\phi_2 = y, -x, -y, x$; $\phi_3 = y, x, -y, -x$; die Receiver-Phase $\phi_R = y, -x, -y, x, -y, x, y, -x$ folgt den Phasen ϕ_2 und ϕ_3 . Quadraturdetektion ist gemäß der Echo/Antiecho-Sequenz implementiert. So wechselt der Phasenzyklus aufeinanderfolgender FIDs zwischen ϕ_2 und ϕ_3 . Eingeklammerte Bereiche repräsentieren Abschnitte, die wiederholt werden und besitzen eine Gesamtlänge von $2\delta = 40$ ms (R_1) oder $8\delta_1 = 8$ ms (R_2). Die Zahl der Wiederholungen wird so variiert, dass Gesamtzahl der Pulse und damit der Temperatureintrag je Experiment stets gleich ist. Die ^1H -Pulse der Watergate-Sequenz haben die $\{0,231; 0,692; 1,4621\}$ -fache Länge des 90° -Protonenpulses. Das Watergate-Delay δ_3 hat die Länge von 210 μs bei 600 MHz. Die Länge von τ_2 errechnet sich aus der Länge des 180° -Stickstoffpulses mit $\tau_2 = \delta_3 - \tau_{p180}(\text{N})$.

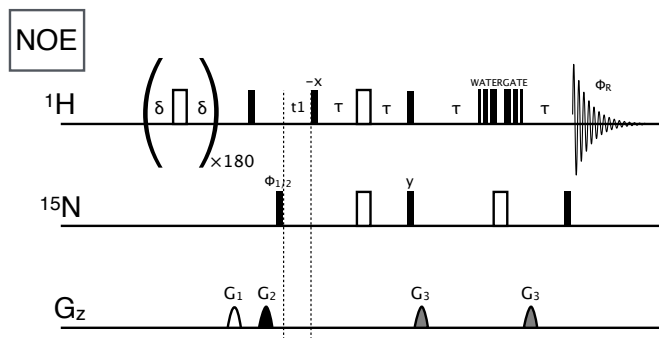


Abb. 3.6: Pulssequenz für die Bestimmung des heteronuklearen NOE, mit TROSY. Schwarze Kästchen repräsentieren harte 90° -Pulse, offene Kästchen 180° -Pulse. Delays: $\tau = 1/2J_{\text{HN}} = 2,75$ ms. $\delta = 11$ ms. Evolution während t_1 . Gradienten: Die z-Gradienten G_z besitzen eine Sinusform und sind 1 ms (G_1 , G_3) oder $200 \mu\text{s}$ (G_2) lang mit $G_1 = 5,5$ G/cm, $G_2 = 16,5$ G/cm und $G_3 = 19,25$ G/cm. Phasenzyklus: Pulse kommen aus der x-Richtung, sofern nicht anders angegeben. $\phi_1 = y, x, -y, -x$; $\phi_2 = y, -x, -y, x$; $\phi_R = -y, -x, -y, x$. Aufeinanderfolgende FIDs wechseln zwischen ϕ_1 und ϕ_2 . Für die Sättigung der Amidprotonen wird der eingeklammerte Bereich 180 mal wiederholt und der Transmitter auf die Amidprotonen zentriert. Im Referenzexperiment tritt an die Stelle der Sättigungspulse eine Wartezeit. Watergate-Sequenz wie in Abbildung 3.5 beschrieben.

beitragen, sich die Temperatur über die Messzeit hinweg verändert oder die Qualität des *shims* abnimmt. Alle Experimente wurden daher als Pseudo-3D mit *single-FID-interleaving* aufgenommen, und damit über die gesamte Messzeit gemittelt. Der Einfluss der genannten Einflüsse auf die Signalintensität und somit den Kurvenverlauf der zu bestimmenden Raten sollte so minimiert werden [77].

3.3.2 Temperaturkontrolle

Die Proben­temperatur hat einen großen Einfluss auf die molekulare Bewegung. Zu starke Temperaturunterschiede während der Messungen können eine *model-free*-Analyse unmöglich machen, da die molekulare Bewegung und damit die Spektraldichtefunktion und das Relaxationsverhalten temperaturabhängig ist. Werden diese inkonsistenten Daten durch Regression an die *model-free*-Modellfunktionen angepasst, können diese nur durch zusätzliche Modellparameter aufgefangen werden. So kommt es infolge von Temperaturunterschieden zu einer Überschätzung der Dynamik durch die zusätzlichen Parameter.

Während der Messung lässt sich die genaue Temperatur innerhalb des Probenröhrchens nicht bestimmen, da sich der Temperatursensor des Spektrometers außerhalb des Probenröhrchens befindet und die Strahlung des Spektrometers (insbesondere die CPMG-Pulssequenz es R_2 -

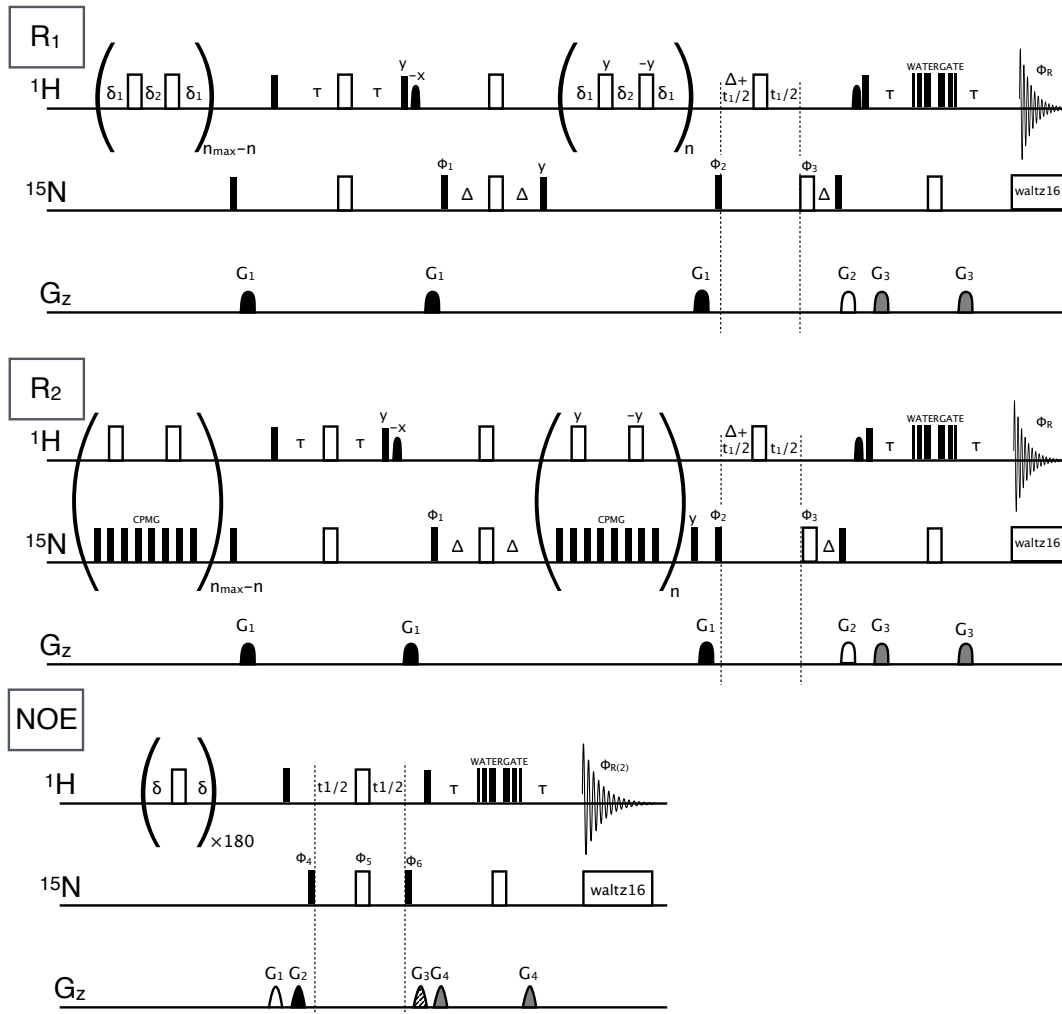


Abb. 3.7: Pulssequenzen zur Bestimmung longitudinaler Relaxationsraten (R_1), transversaler Relaxationsraten (R_2) und des Hetero-NOE. Schwarze Kästchen: harte 90° -Pulse, offene Kästchen: 180° -Pulse. Kleine schwarze Formen: selektive 90° waterflipback-Pulse (Rechteckform, 1 ms bei 600 MHz). Delays: $\delta_1 = 2,5$ ms; $\delta_2 = 5$ ms, $\tau = 2,25$ ms, $\Delta = 2,75$ ms. R_1 -Delay $\delta = 10$ ms. Evolution während t_1 . Gradienten: z-Gradienten G_z (Sinusform) sind 1 ms lang mit $G_1=16,5$ G·cm $^{-1}$, $G_2=19,25$ G·cm $^{-1}$, $G_3=22$ G·cm $^{-1}$, $G_4=24,75$ G·cm $^{-1}$. Phasenzyklus: Pulse aus x-Richtung, sofern nicht anders notiert. R_1 und R_2 -Experimente: $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = y, y, -y, -y$; $\phi_3 = 4x, 4y, 4(-x), 4(-y)$; $\phi_R = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. NOE-Experiment: $\phi_4 = y, -y$; $\phi_5 = 4x, 4y, 4(-x), 4(-y)$; $\phi_6 = x, x, -x, -x$; $\phi_R = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Wiederholung eingeklammerter Bereiche, Gesamtlänge: 10 ms (R_1), 8 ms (R_2). Wiederholungen werden variiert, dass Gesamtzahl der Pulse je Experiment stets gleich ist. Im Hetero-NOE-Experiment wird der Abschnitt 180 mal wiederholt, der Transmitter wird auf die Amidprotonen zentriert. Im Referenzexperiment tritt Wartezeit an Stelle der Sättigungspulse. Entkopplung mit Waltz16-Sequenz. WATERGATE- und CPMG-Sequenz wie in Abb. 3.5.

Tab. 3.2: Die Wartezeiten während der R_1 - oder R_2 -Relaxation, in aufsteigender Länge. Zur Bestimmung der experimentellen Unsicherheit wurden drei Werte doppelt aufgenommen. Da sich das Relaxationsverhalten von der Korrelationszeit und damit von Proteingröße und Proteinform abhängt, wurde für die großen HLA-Komplexe (45 kDa) und das in freier Form relativ kleine β_2m (10 kDa) unterschiedliche Wartezeiten eingesetzt.

<i>delay</i> Nr.	großes Protein		kleines Protein	
	R_1	R_2	R_1	R_2
1	0,08	0,016	0,08	0,016
2	0,08	0,016	0,08	0,016
3	0,24	0,032	0,24	0,032
4	0,40	0,048	0,40	0,048
5	0,40	0,048	0,40	0,080
6	0,64	0,064	0,64	0,080
7	0,88	0,080	0,88	0,112
8	0,88	0,080	0,88	0,144
9	1,28	0,096	1,28	0,144
10	2,00	0,112	1,60	0,200

Experiments und die Sättigungssequenz während des Hetero-NOE-Experiments) für kaum kontrollierbaren Energieeintrag in die Probe sorgen, der von dem Sensor des Spektrometers nicht erfasst wird. Eine anderweitige Kontrolle der Temperatur während der Messung ist somit notwendig. Eine etablierte Methode zur Kalibrierung der Temperatur ist die Bestimmung der Positionen der beiden Protonensignale (CH_3 und OH) von Methanol, die stark temperaturabhängig sind. So wurden sämtliche verwendeten Geräte und Pulssequenzen mit 99,98% d4-Methanol auf die gleiche Temperatur bzw. auf den Signalabstand von 1,432 ppm kalibriert, was einer Temperatur von 309,60 K entspricht [124]. Die Zusammensetzung des für alle Messungen verwendeten Phosphat-Puffers hat eine untergeordnete Bedeutung für die Temperaturentwicklung. Die Signalpositionen von Methanol-d4, gemessen in einem 5 mm-Röhrchen, unterschieden sich nicht wesentlich von denen einer mit Methanol-d4 gefüllten Kapillare, die in einem mit Puffer gefüllten 5 mm-Röhrchen untergebracht war. Eine solche interne Temperaturkontrolle durch eine Methanol-Kapillare ist für reguläre Messungen nicht praktikabel, da die Kapillare im Probenröhrchen die Feldhomogenität negativ beeinflusst und nicht in einem Shigemi-Spezialröhrchen untergebracht werden kann.

3.4 Analyse der HLA-Komplexe

3.4.1 Zuordnung, Charakterisierung der Linienbreiten und Zahl der Signale der schweren Ketten

Die Basis für die Mehrzahl der quantitativen Analysen bildeten ^{15}N - ^1H -Korrelationen des Proteinrückgrats, weshalb der Fokus der Zuordnung hierauf lag. Die Zuordnung der Signale der Proteine erfolgte durch heteronukleare Tripel-Resonanz-Experimente [125–127] mit WATERGATE-Wasserunterdrückung [117]. Insbesondere die Komplexität der HLA-Proteine machte die Verwendung von TROSY-basierten Sequenzen notwendig [128]. Für die Analyse von $\beta_2\text{m}$ konnte auf HSQC-basierte Korrelationsspektren zurückgegriffen werden [129].

Zuordnungsstrategie. Die dynamische Analyse basierte auf ^{15}N - ^1H -Korrelationsspektren, deren Resonanzen zugeordnet werden mussten. Kernstück der Zuordnung bildete das Spektrenpaar aus HNCACB und HN(CO)CACB. Dieses korreliert die chemischen Verschiebungen von N und H des Rückgrats einer Aminosäure mit den eigenen C_α - und C_β - Verschiebungen und denen des sequenziellen Vorgängers (HNCACAB), bzw. nur des Vorgängers (HN(CO)CACB). Weitere Information lieferte das Paar HN(CA)CO und HNCO, was N und H in analoger Weise mit dem eigenen Carbonyl und dem des Vorgängers korreliert. So lässt sich das Polypeptid sequenziell zuordnen. Alle chemischen Verschiebungen werden auch zur Identifizierung des Aminosäuretyps verwendet, indem sie mit den in der BMRB hinterlegten Verschiebungen anderer Proteine verglichen werden. Die Experimente HNCA und HN(CO)CA sind zwar redundant zu den HNCACB/HN(CO)CACB-Spektren, waren allerdings empfindlicher und durch eine *constant-time*-Konstruktion hochauflösend. Sie wurden genutzt, um Überlappungen von Signalen aufzulösen und eindeutig zuzuordnen. Wegen anhaltender Probleme mit der Stabilität des B*27:05/TIS-Komplexes konnte hier nur das HNCA/HN(CO)CA-Paar aufgenommen werden. Da sich die Kohlenstoffresonanzen aller vier HLA-Komplexe ähnelten (siehe Anhang 3), konnte für B*27:05/TIS die Zuordnung der anderen Komplexe genutzt werden. Vor der Zuordnung wurden diese Spektren mit Hilfe von bruk2ucsf [90] in das UCSF-Dateiformat konvertiert und mit Hilfe der semiautomatisierten Zuordnungsroutine in CCPN Analysis [89] ausgewertet.

Zuordnung der chemischen Verschiebungen. Es konnten zwischen 90 und 97% der Signale der schweren Ketten von den betrachteten HLA-B*27-Komplexen zugeordnet werden. Die ^{15}N - ^1H -Korrelationsspektren sind in den Abbildungen 3.12 bis 3.15 zu sehen. Die Tabelle 3.3 und die Abbildungen 3.8 und 3.9 fassen die Ergebnisse der Zuordnung zusammen.

Tab. 3.3: Übersicht über die Zahl der zugeordneten Signale der Komplexe, der nicht zugeordneten (freien) Signale und die zugeordneten Resonanzen, sowie die BMRB-Zugriffs-Nummern, unter denen die chemischen Verschiebungen, Relaxationsdaten und *model-free*-Ergebnisse daten hinterlegt sind. Die Prozentzahl der zugeordneten Signale in Spalte 2 bezieht sich auf die Gesamtzahl der erwarteten NH-Signale (269). Die Seitenkettensignale der neun Tryptophane sind von der Gesamtzahl abgezogen. Die 15 Aminosäuren des His-Tag-Linkers und Asparagin- und Glutamin-Seitenkettensignale flossen ebenfalls nicht in die Zählung ein.

Komplex B*27	zugeordnet <i>n</i> (%)	frei <i>n</i>	Resonanzen Kernsorte	Zuordnung BMRB-ID	Relaxation BMRB-ID
:05/pVIPR	240 (92%)	10	NH, N, Ca, Cb, CO	25714	26710
:05/TIS	236 (90%)	10	NH, N, Ca	25711	26711
:09/pVIPR	252 (97%)	13	NH, N, Ca, Cb, CO	25713	26712
:09/TIS	246 (94%)	14	NH, N, Ca, Cb, CO	25715	26713

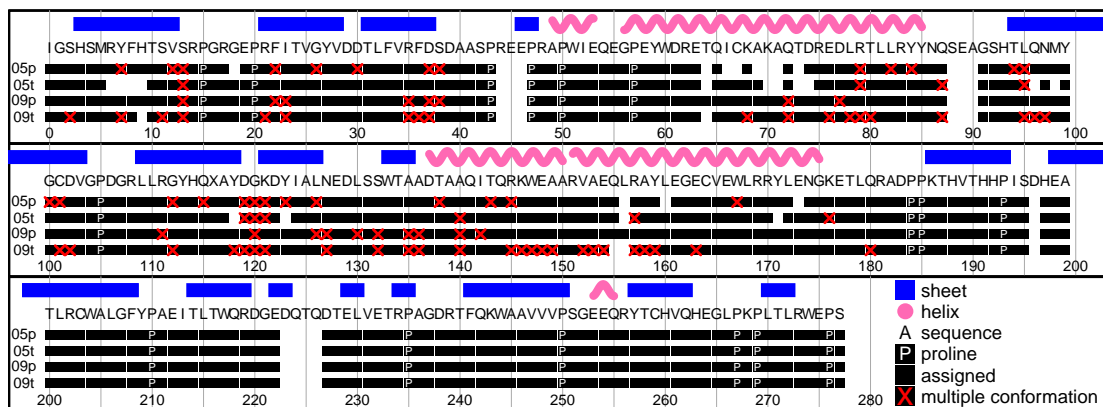


Abb. 3.8: Übersicht über die Zuordnung der ^1H - ^{15}N -Korrelationen der schweren Ketten der vier HLA-Komplexe mit deren Aminosäure-Sequenz. Die Sekundärstruktur ist der PDB-Struktur 1of2 entnommen. Zugeordnete Reste mit einfacher Konformation sind als schwarze Kästchen angegeben, zugeordnete Reste mit einer Doppelkonformation durch ein rotes Kreuz markiert. Nicht zugeordnete Aminosäuren sind nicht markiert und erscheinen daher weiß. 05p, HLA-B*27:05/pVIPR; 05t, B*27:05/TIS; 09p, B*27:09/pVIPR; 09t, B*27:09/TIS.

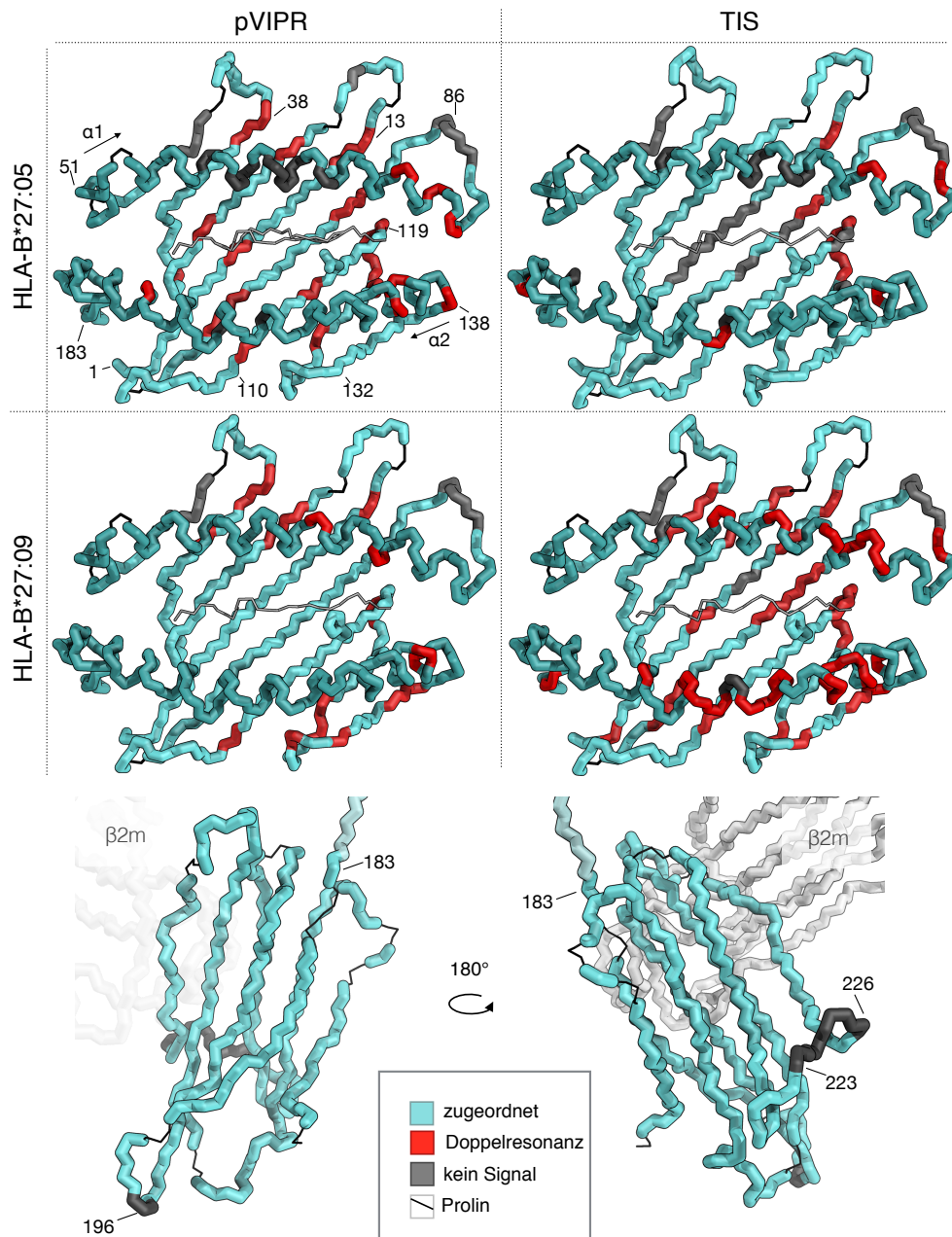


Abb. 3.9: Mappings des Zuordnungsstatus und Doppelkonformationen auf Rückgrat der HLA-B*27-Komplexe. Zuordnungsstatus, Doppelkonformationen und Proline sind farbig markiert. Oben: $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne, jeweils in Komplex mit pVIPR und TIS (Draufsicht). Peptid in Strichdarstellung. Die $\alpha 3$ -Domäne ist nicht dargestellt. Unten: Ausschnitt, die identische $\alpha 3$ -Domäne abbildend (Seitenansichten). Im Hintergrund ist das $\beta_2 m$ erkennbar.

Chemische Verschiebungen sind äußerst sensitiv gegenüber Veränderungen der chemischen Umgebung der jeweiligen Kerne. Auch im vorliegenden System waren subtyp- und peptid-abhängige Unterschiede zu sehen. In Abbildung 3.10 und Anhang 2 werden die chemischen Verschiebungen anhand des euklidischen Abstands der Signale im 2D-Spektrum verglichen. Die Unterschiede der HN-Verschiebungen liegen meistens unter 0,3 ppm.

Subtypabhängig gab es an der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne die größten Unterschiede am polymorphen Rest 116 und den umgebenden Resten 113 bis 118, sowie auf dem Nachbarstrang um Rest 98. Erwartungsgemäß war die subtypabhängige Differenz bei den TIS-Komplexen geringer als bei den pVIPR-Komplexen, da hier ausgehend von den Röntgenkristallstrukturen geringe Konformationsunterschiede des Peptids erwartet wurden. Trotzdem war eine subtypabhängig veränderte Struktur in den TIS-Komplexen offensichtlich, denn große Teile der F-Taschen-Region zeigten Shift-Veränderungen. In den pVIPR-Komplexen waren neben Teilen des β -Faltblatts in der F-Taschen-Region auch die Helices von Shiftänderungen betroffen. Der Austausch des Peptids wirkte sich stets auf weite Teile der Bindungstasche aus, und zwar nicht nur auf Reste, die wie etwa Arg62 in unmittelbarem Kontakt mit dem Peptid standen. So werden Ala158 und 162 im zentralen Bereich der $\alpha 2$ -Helix von dem gebundenen Peptid beeinflusst. Hier liegt ein durch den Bruch in der Helix entstehendes Gelenk vor, das Teilen der $\alpha 2$ -Helix erlaubt, sich im Ganzen zu bewegen. Im Kontrast zur peptidbindenden Domäne waren in der $\alpha 3$ -Domäne keine signifikanten Unterschiede detektierbar.

Intensität der HN-TROSY-Signale. Die relative Intensität der Signale aller vier Komplexe war ähnlich, es gab aber deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Domänen. In Abbildung 3.11, in der überlappende Signale ($\Delta\delta < 30$ Hz) nicht wiedergegeben sind, kann die Signalintensität aller zugeordneten Signale verglichen werden. Die relative Intensität der Signale aller vier Komplexe war ähnlich. Die $\alpha 3$ -Domänen besaßen eine signifikant höhere Intensität, als die Helices der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domänen. Insbesondere die zentralen Regionen der beiden Helices wiesen eine vergleichsweise geringe Intensität auf.

Fehlende und duplizierte Signale. In allen Spektren traten Signale auf, die keiner Aminosäure zugeordnet werden konnten, weil in den Tripel-Resonanz-Spektren keine Kohlenstoff-Korrelation zu erkennen war, oder die gefundenen Kohlenstoff-Verschiebungen keine Konnektivität zum Rest des Proteins zeigten (Abbildungen 3.8 und 3.9). Gleichzeitig gab es umgekehrt Regionen innerhalb der Sequenz, denen kein Signal zugeordnet werden konnte. In einigen Fällen spalteten sich Resonanzen in zwei Signale auf, wie es etwa bei Serin-13 in allen Komplexen der Fall war. In der Regel konnte ein schwächeres und ein intensiveres Signal beobachtet werden. Hier war die Identität der Aminosäure stets in den Kohlenstoff-

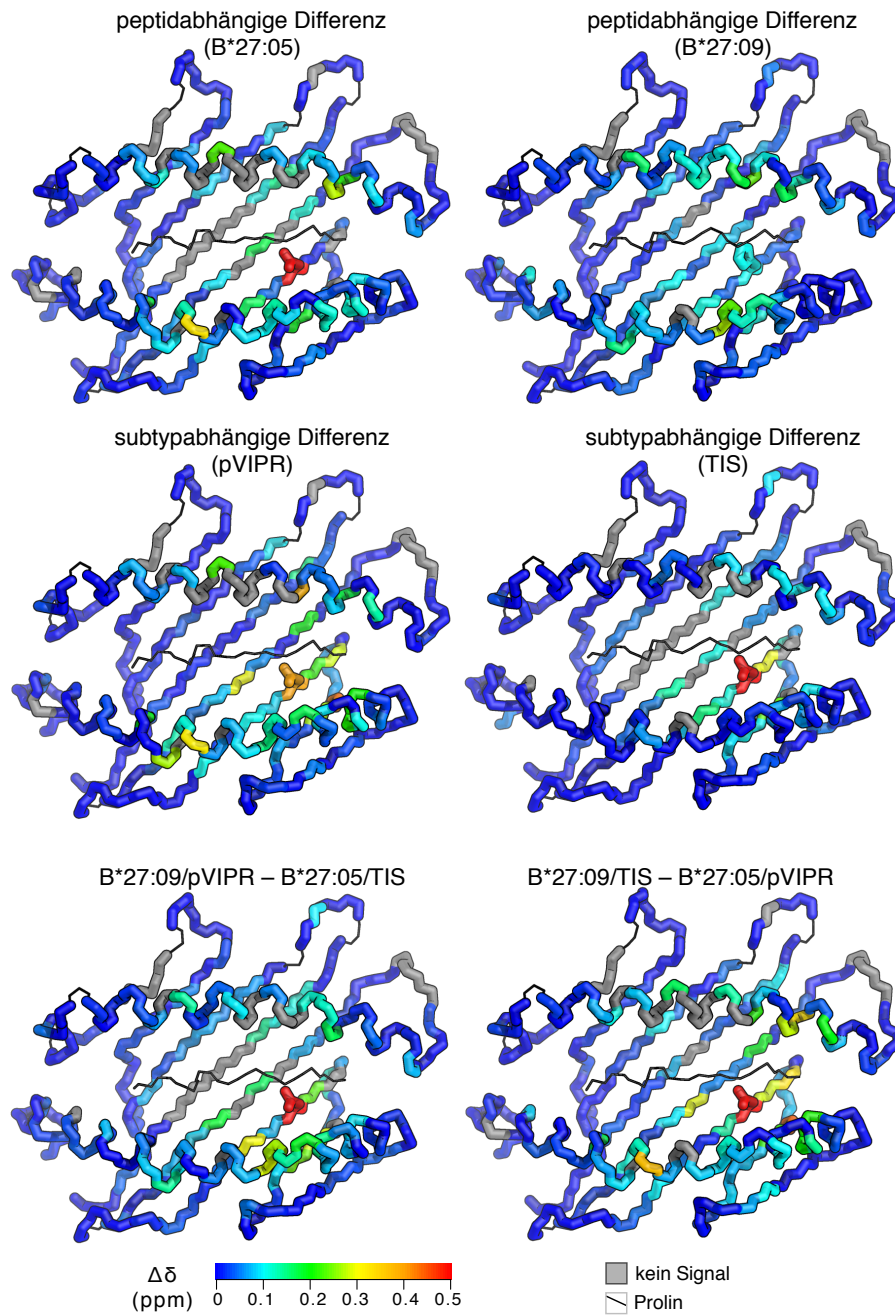


Abb. 3.10: Mapping der Differenzen der chemischen HN-Verschiebungen der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domänen der schweren Ketten HLA-B*27:05 oder HLA-B*27:09 mit pVIPR oder TIS auf den jeweiligen Strukturen. Die Unterschiede sind um das Peptid und den polymorphen Rest 116 herum am größten. Peptid in Strichdarstellung.

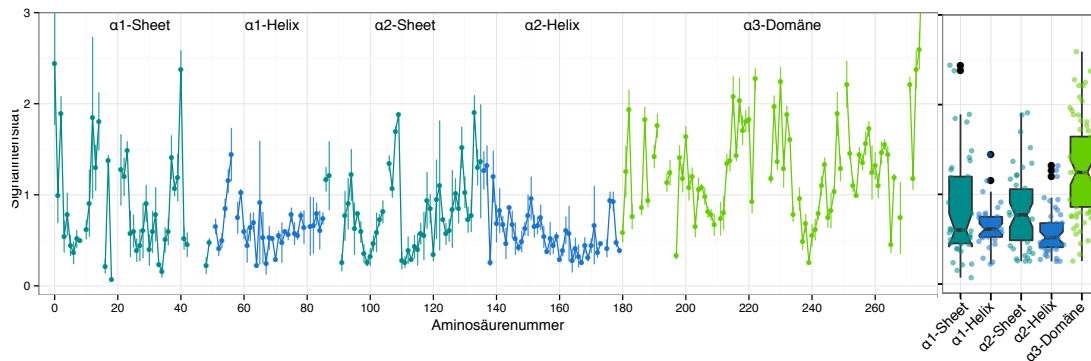


Abb. 3.11: Links: Normalisierte Intensität der Signale von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren der schweren Ketten der HLA-B*27-Komplexe, aufgetragen gegen die Aminosäurezahl. Die Helix-Region des α 1- α 2-Domäne ist türkis dargestellt, das β -Faltblatt-Region der α 1- α 2-Domäne blau. Die Werte der α 3-Domäne sind grün dargestellt. Rechts: Box-plot, der die Verteilung der Signalintensitäten der farblich markierten Segmente miteinander vergleicht. Auf der Abbildung 1 im Anhang auf Seite 141 sind die Werte separat dargestellt.

Dimensionen der Tripel-Resonanz-Spektren erkennbar, die Konnektivität des Signalsatzes zu den umliegenden Aminosäureresten wurde somit gewahrt.

Die α 3-Domäne verhielt sich in allen vier Proteinen sehr ähnlich und bis auf Aspartat-196 und einen Loop-Bereich, der die Reste 223 bis 226 umfasste, konnten alle Aminosäuresignale identifiziert werden. Bei keinem der Reste der α 3-Domäne konnte eine Verdopplung der Signale beobachtet werden.

In keiner der peptidbindenden α 1- α 2-Domänen waren die Signale der Regionen 43-46 und 88-90 sichtbar und waren möglicherweise austauschverbreitert. Auch in den Kristallstrukturen (PDB-Strukturen 1of2, 1ogt, 1w0w und 1w0v) erschienen diese Regionen ohne definierte Sekundärstruktur. In den Spektren von B*2705/pVIPR, B*27:05/TIS und B*27:09/TIS waren weitere Signale nicht auffindbar. So konnten unter gleichen experimentellen Bedingungen in den Spektren von HLA-B*27:05 lediglich 240 (pVIPR) bzw. 236 (TIS) Signale zugeordnet werden, während in B*27:09 252 (pVIPR) bzw. 246 (TIS) Signale gefunden wurden. Fehlende Signale bewegten sich nicht zu anderen Stellen innerhalb des Spektrums, sondern verschwanden. Daher ist die Gesamtzahl aus zugeordneten und nicht zugeordneten Signalen in B27:05 geringer, als in B*27:09. Die nicht zuzuordnenden Signale in den Spektren von B*27:05 besaßen keine Kohlenstoffresonanzen, die zu den bekannten chemischen Verschiebungen der abwesenden Aminosäuren gepasst hätten.

Selbst in Abschnitten, die in den Kristallstruktur wohlgeordnete Sekundärstrukturen aufwie-

sen, verschwanden Signale. Nennenswert ist hier die α -1-Helix in den B*27:05-Komplexen. In der Region 66-73 in B*27:05/pVIPR und 70-74 in B*27:05/TIS schienen die Signale der Aminosäuren zu verschwinden, die zum Lumen der Bindetasche orientiert sind. In den B*27:09-Komplexen sind diese Signale eindeutig identifizierbar. In den Spektren von B27:05/TIS verschwinden die Signale 6-9, obwohl sie sich in einer β -Faltblattstruktur befinden.

Zudem traten in allen α 1- α 2-Domänen der vier Komplexe Signalverdopplungen auf. Hier sind neben Ser13 auch die Reste 35-38, 76-80, 94-97 und 118-123 auffällig, die in unterschiedlichem Umfang in allen vier Komplexen eindeutige Signalverdopplungen zeigen. Glu73 ist bei B*27:05 sichtbar, in B*27:09 hat es einen doppelten Signalsatz. Mit einer ausgedehnten Region 145-159 mit verdoppeltem Signalsatz entlang der α -2-Helix nimmt B*27:09/TIS eine Sonderstellung ein.

Die Faltblattstruktur der α 1- α 2-Domäne bildet den Boden der Peptid-Bindefurche. Die beiden zentralen β -Stränge (α 1-Strang 1 und α 2-Strang 1, Reste 6-9, 96, 98) sind in B*27:05 stark verbreitert. In B*27:09/TIS zeigen die selben Abschnitte Doppelkonformationen, α 1-Strang 1 zeigt Verbreiterung an Rest 7 und Verdopplung an Rest 9. Im gegenüberliegenden α 2-Strang 1 zeigt die Region 95-97 Signalverdopplungen. Die Region um Rest 95 verhält sich auch in den anderen Komplexen auffällig. In allen Komplexen außer B*27:05/TIS tritt auch eine Signalverdopplung an den Enden von α 1-Strang 1 und Strang 2 auf (21-23 und 35-38). Die Loop-Regionen, die die Sekundärstrukturelemente verbinden, scheinen in allen Komplexen flexibel zu sein. Sie liefern entweder wie 15, 40, 132 oder 223-226 extrem starke Signale, wie es für schnellen konformationellen Austausch typisch ist, oder die für intermediären Austausch charakteristischen schwache Signale wie um Rest 86. Die Region um Rest 119 hat laut der Kristallstrukturen keine definierte Sekundärstruktur und führt in allen Komplexen zu Signalverdopplungen, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Serin-13, das ebenfalls in allen Komplexen zu Doppelsignalen führt, liegt am Ende eines Faltblatt-Stranges und wechselt möglicherweise instabil zwischen einer strukturierten und unstrukturierten Konformation.

3.4.2 Zuordnung der Methylgruppen der schweren Ketten

Die Zuordnung der Methylgruppen von Isoleucin/Leucin/Valin (ILV) der schweren Kette erfolgte mit je zwei Proben [130, 131]. Die erste Probe besaß „linearisierte“ ILV-Spinsysteme, die ^{13}C -isotopenmarkiert und bis auf die terminale Methylgruppe deuteriert waren. Dadurch war der Magnetisierungstransfer möglichst effizient. Die zweite Probe besaß nur noch in der terminalen Methylgruppe die ^{13}C -Markierung und Protonierung, da daran nur noch Relaxationsmessungen durchgeführt werden sollten und daher kein Magnetisierungstransfer entlang der Aminosäureseitenkette notwendig war.

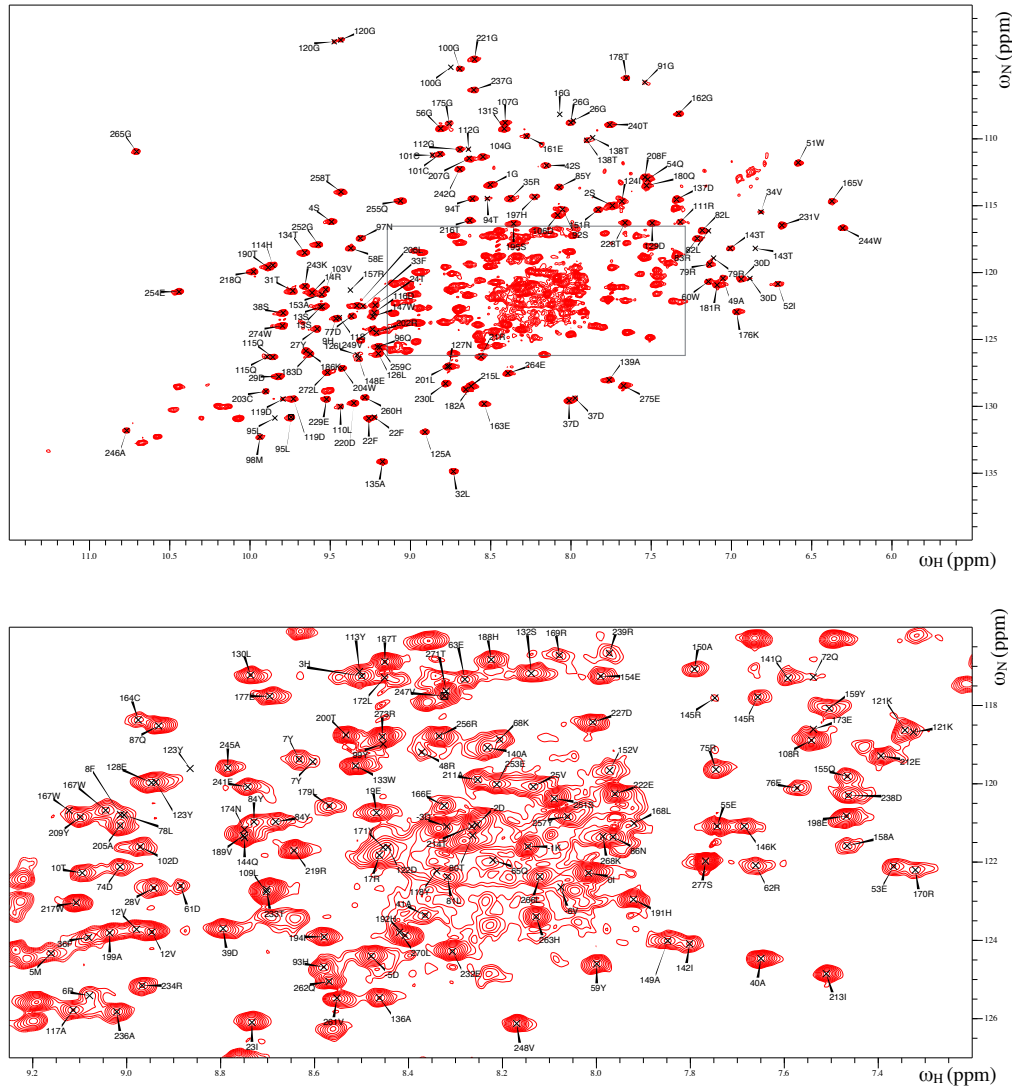


Abb. 3.12: Zugeordnetes ^{15}N - ^1H -Korrelationsspektrum (TROSY-HSQC) von HLA-B*27:05/pVIPR in 10 mM Phosphat (pH 7,5) und 150 mM NaCl mit 10% D_2O . Es ist lediglich die schwere Kette des Komplexes mit ^2H , ^{15}N -isotopenmarkiert, die Amidprotonen befinden sich in chemischem Austausch mit dem Puffer und sind daher in dem sonst deuterierten Protein detektierbar. BMRB-ID: 2514.

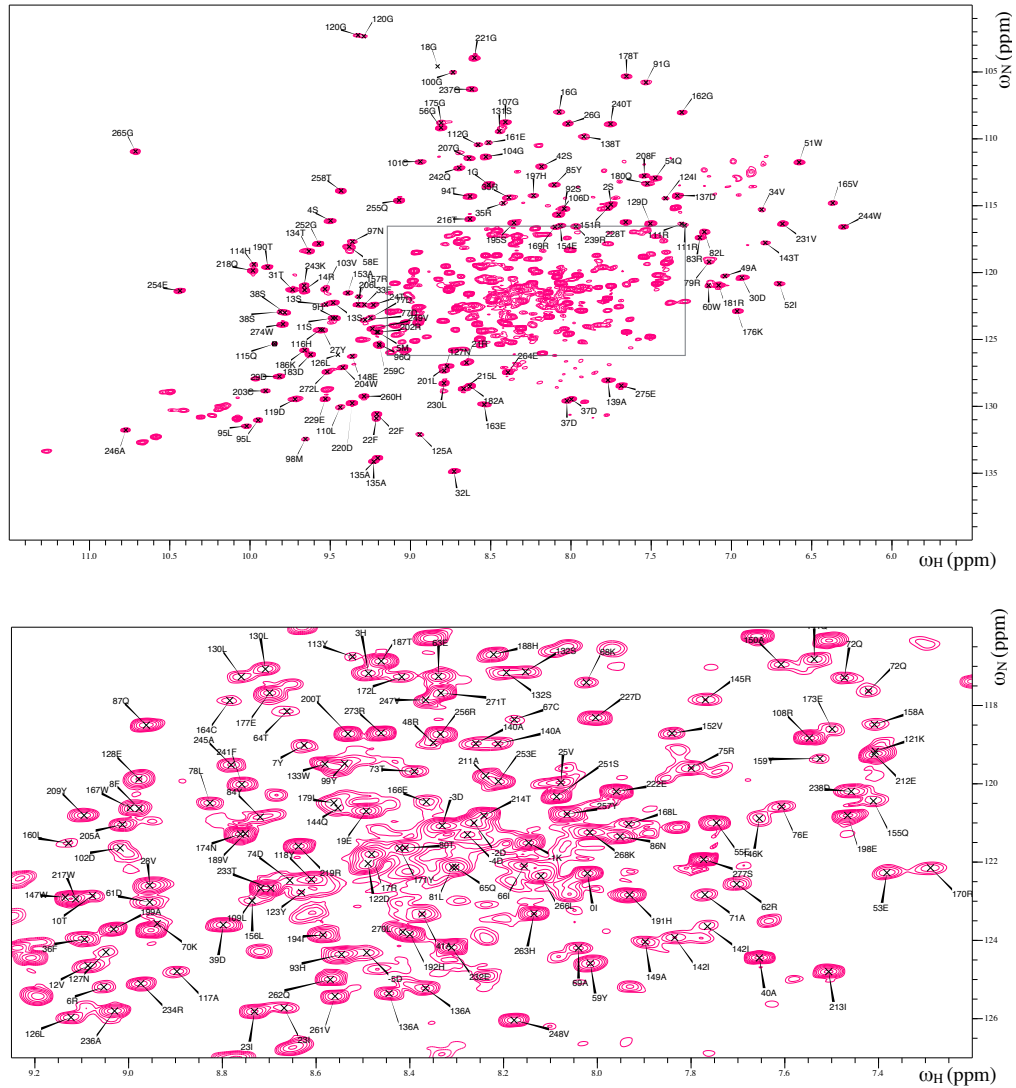


Abb. 3.14: Zugeordnetes ^{15}N - ^1H -Korrelationsspektrum (TROSY-HSQC) von HLA-B*27:09/pVIPR in 10 mM Phosphat (pH 7,5) und 150 mM NaCl mit 10% D_2O . Es ist lediglich die schwere Kette des Komplexes mit ^2H , ^{15}N -isotopenmarkiert, die Amidprotonen befinden sich in chemischem Austausch mit dem Puffer und sind daher in dem sonst deuterierten Protein detektierbar. BMRB-ID: 2513.

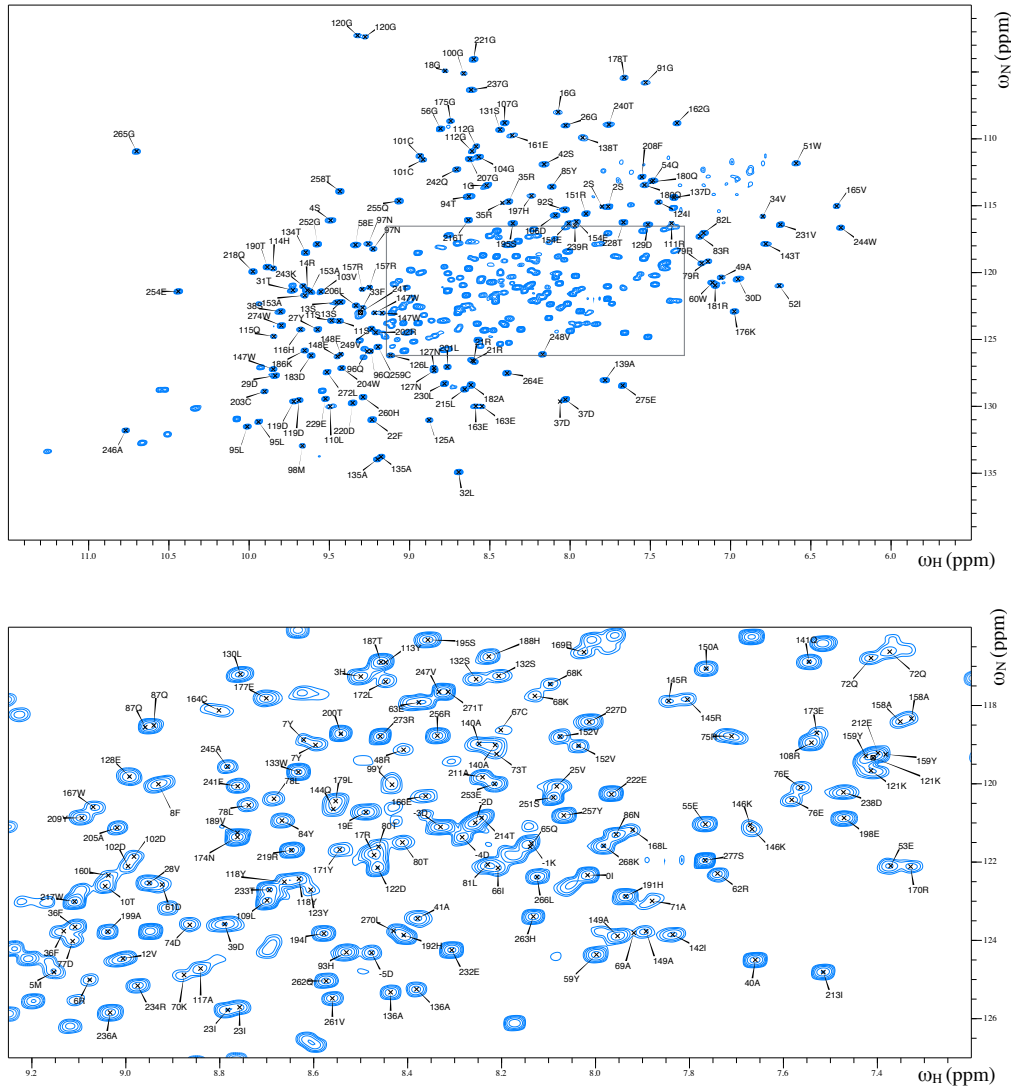


Abb. 3.15: Zugeordnetes ^{15}N - ^1H -Korrelationsspektrum (TROSY-HSQC) von HLA-B*27:09/TIS in 10 mM Phosphat (pH 7,5) und 150 mM NaCl mit 10% D_2O . Es ist lediglich die schwere Kette des Komplexes mit ^2H , ^{15}N -isotopenmarkiert, die Amidprotonen befinden sich in chemischem Austausch mit dem Puffer und sind daher in dem sonst deuterierten Protein detektierbar. BMRB-ID: 2515.

Mit Pulsprogrammen, die auf dem schrittweisen Magnetisierungstransfer von der terminalen Methylgruppe auf die weiteren Kohlenstoffe der Aminosäurekette basierte [130], konnten die C_{α} - und C_{β} -Resonanzen mit denen aus den HNCACB-Experimenten verknüpft werden. Die Spektren enthalten mehr Signale, als erwartet – die Stoffwechselläufer wurden während der Synthese teilweise in andere Aminosäuren eingebaut (*scrambling*). Einige Signale waren so stark überlagert, dass eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war. Trotzdem konnten die Methylgruppen der drei Aminosäuren der Komplexe HLA-B*27:09/pVIPR und HLA-B*27:09/TIS zugeordnet werden. Spektren mit den zugeordneten Signalen finden sich in Abbildung 3.16. Die Mehrzahl der Signale aus den beiden Komplexen mit B*27:09 ist deckungsgleich. Diese Daten bilden einen Ausgangspunkt für zukünftige kohlenstoffbasierte Relaxationsmessungen an den HLA-Komplexen.

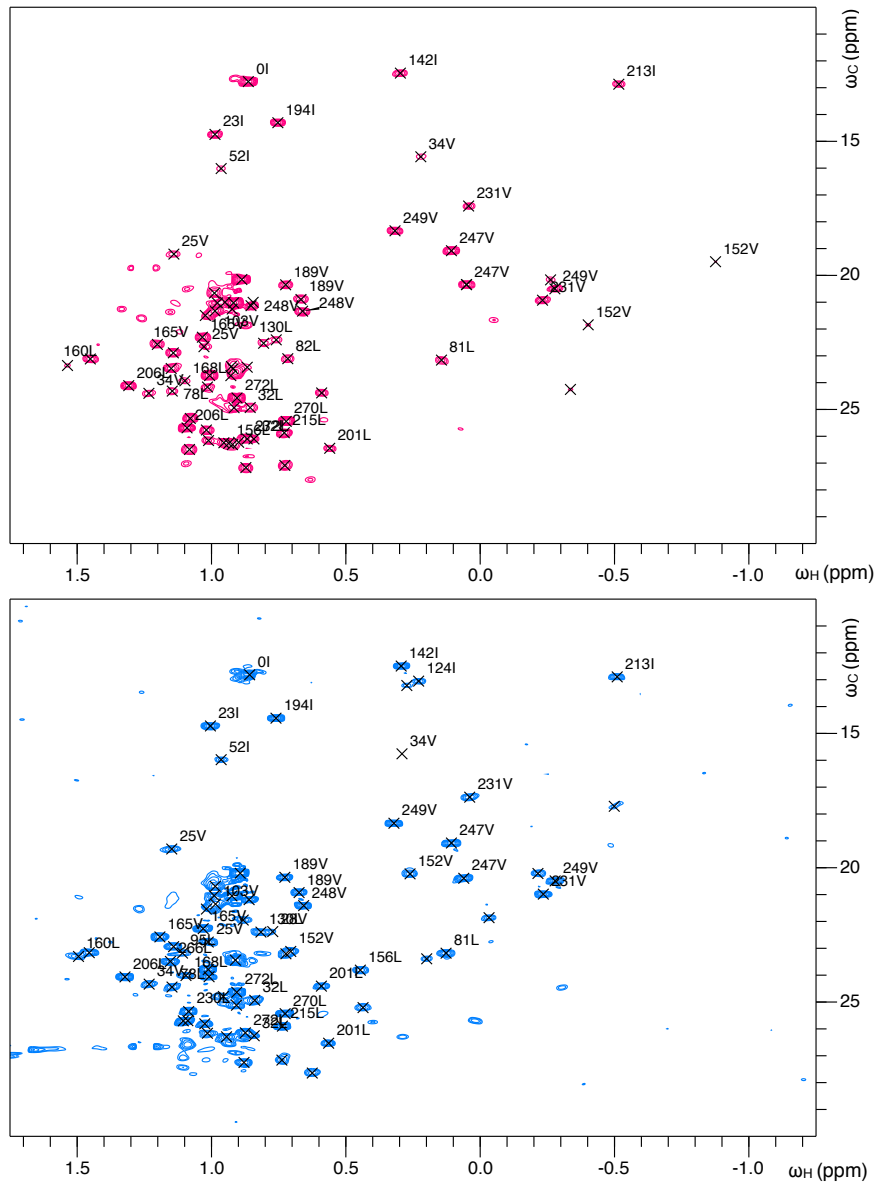


Abb. 3.16: ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektren der Methylgruppen von Isoleucin, Leucin und Valin von selektiv methylgruppenprotonierten B*27:09 in Komplex mit pVIPR (magenta, oben) und TIS (cyan, unten).

3.4.3 Relaxationsanalyse der schweren Ketten und β_2 -Mikroglobulin

Die longitudinale Relaxationsrate, die transversale Relaxationsrate und der $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ -heteronukleare *steady-state* Kern-Overhauser-Effekt (Hetero-NOE) wurde für die schweren Ketten von HLA-B*27:05 und B*27:09 und das assoziierte $\beta_2\text{m}$, jeweils in Komplex mit pVIPR oder TIS, bei den zwei verschiedenen Feldstärken 600 MHz und 750 MHz bestimmt. Somit ergeben sich für jeden der Komplexe zwei unabhängige Datensätze, die für die schweren Ketten in den Abbildungen 3.17 und 3.18, und für das $\beta_2\text{m}$ in den Abbildungen 3.19 und 3.20 dargestellt sind und einen Überblick erlauben. Diese Daten sind in den Abbildungen 5 bis 27 des Anhangs nochmals für jede Domäne und jeden Parameter separat aufgeführt. Sie sind vollständig in der BMRB (siehe Tabelle 3.3) hinterlegt.

Für die Analyse des $\beta_2\text{m}$ im Komplex wurden die bereits publizierten HN-Verschiebungen (BMRB-IDs 19120, 19121, 19113, 19116) genutzt.

Gemeinsamkeiten. In den Messungen offenbarte sich die starke Ähnlichkeit der vier Komplexe, die eine fast identische Molekülgröße und damit Rotationskorrelationszeit besitzen. Bei einer Feldstärke von 600 MHz lagen die R_1 -Raten der schweren Ketten und $\beta_2\text{m}$ bei etwa 0,6; die R_2 -Raten lagen zwischen 25 und 30. Loop-Regionen besaßen eine verbesserte Longitudinalrelaxation, und eine verminderte Transversalrelaxation. Hier waren auch Hetero-NOE-Werte niedriger als in den restlichen Regionen. Variationen in den Relaxationsraten folgten den Sekundärstrukturen der sehr ähnlichen Komplexe. Neben den relativ stetigen Werten in Sekundärstrukturen fallen die unstrukturierten Regionen um die Aminosäuren 18, 40, 90 und 180 mit erniedrigten Hetero-NOE-Werten, verminderten R_2 -Werten und erhöhten R_1 -Werten auf. Einige Signale waren sehr schwach und lieferten Werte mit großen Unsicherheiten.

Unterschiede. Geringe systematische Unterschiede der Raten der schweren Ketten sind erkennbar. Diese wurden durch die Messungen von $\beta_2\text{m}$ nicht bestätigt. So unterscheidet sich generell die Relaxation der $\alpha 3$ -Domäne von der Relaxation der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne. Die longitudinale Relaxation ist erhöht, während die transversale Relaxation vermindert ist. Besonders stark tritt dieser Effekt bei HLA-B*27:09/TIS zutage, am geringsten ist er bei HLA-B*27:05/TIS ausgeprägt. Der Fehler war in der $\alpha 3$ -Domäne geringer, da hier die Ausgangsintensität der Signale deutlich höher war, als in der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne. Die Fehler von $\beta_2\text{m}$ in B*27:09/pVIPR waren höher als in den anderen Komplexen.

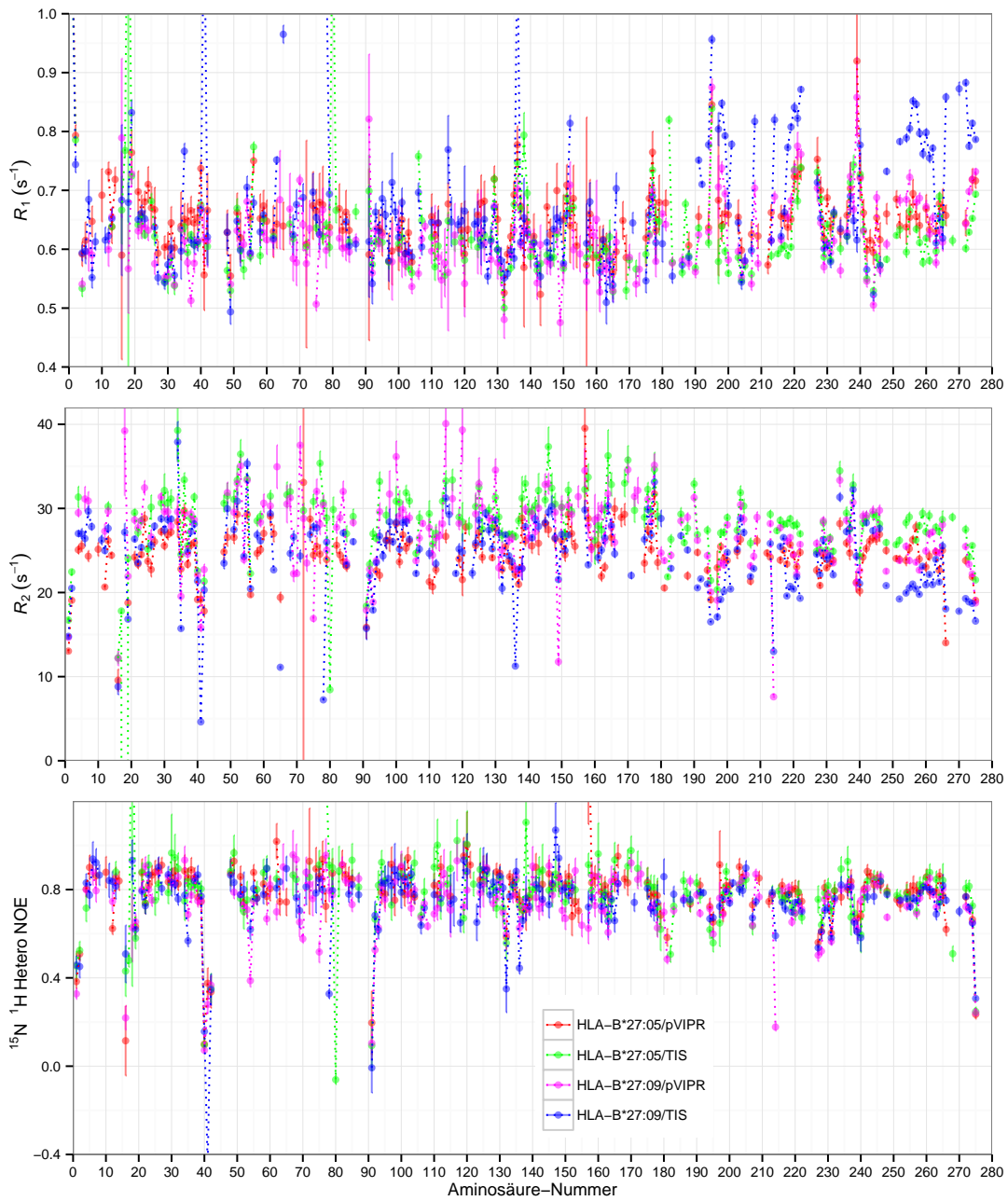


Abb. 3.17: Sequentielle Auftragung der Relaxationsraten (R_1, R_2) und des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE der schweren Ketten von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz. Extreme Werte sind nicht dargestellt. BMRB-IDs wie auf Seite 72 angegeben.

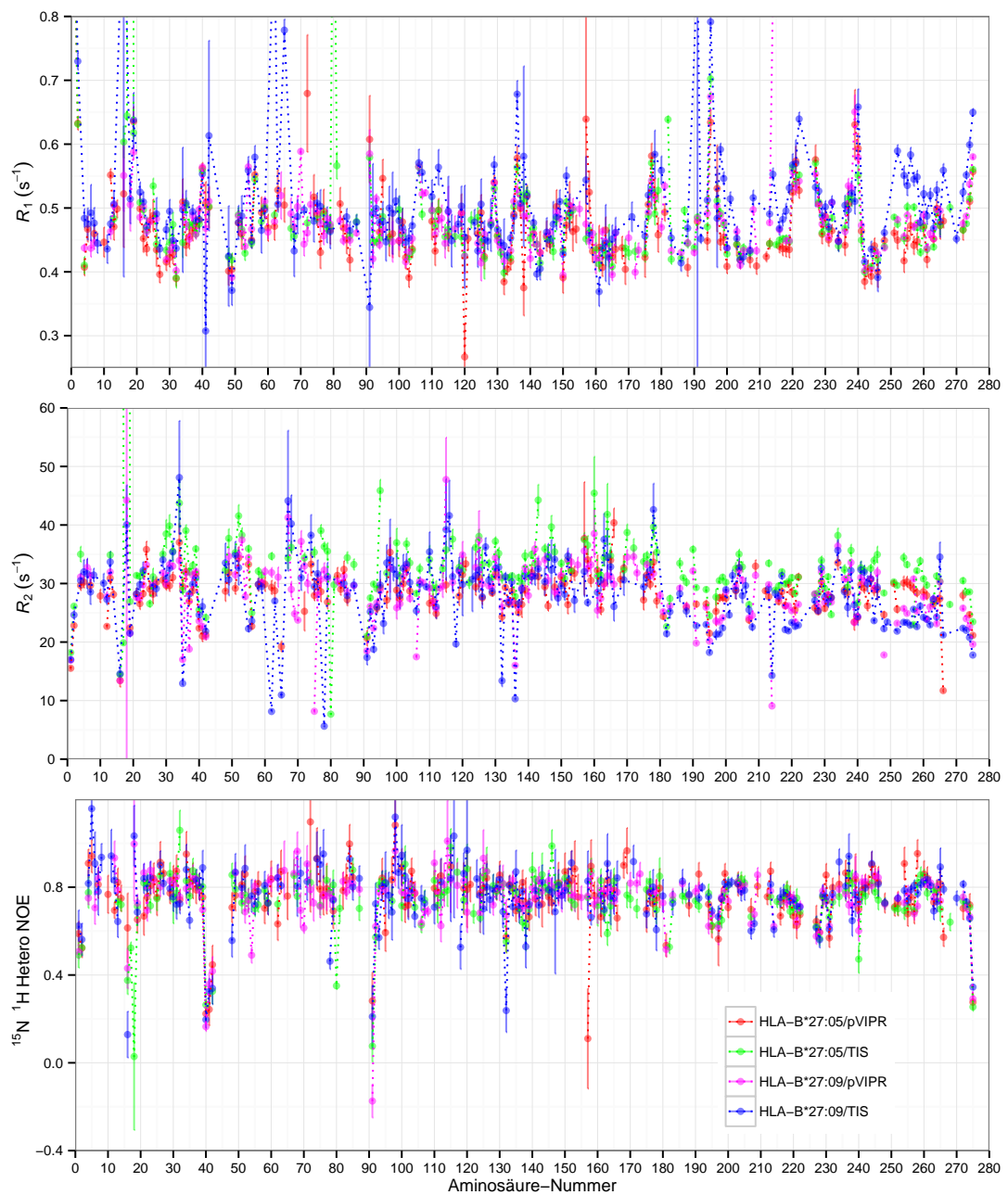


Abb. 3.18: Sequentielle Auftragung der Relaxationsraten (R_1 , R_2) und des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE der schweren Ketten von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz. Extreme Werte sind nicht dargestellt und befinden sich außerhalb des Diagramm-Bereichs. BMRB-IDs wie auf Seite 72 angegeben.

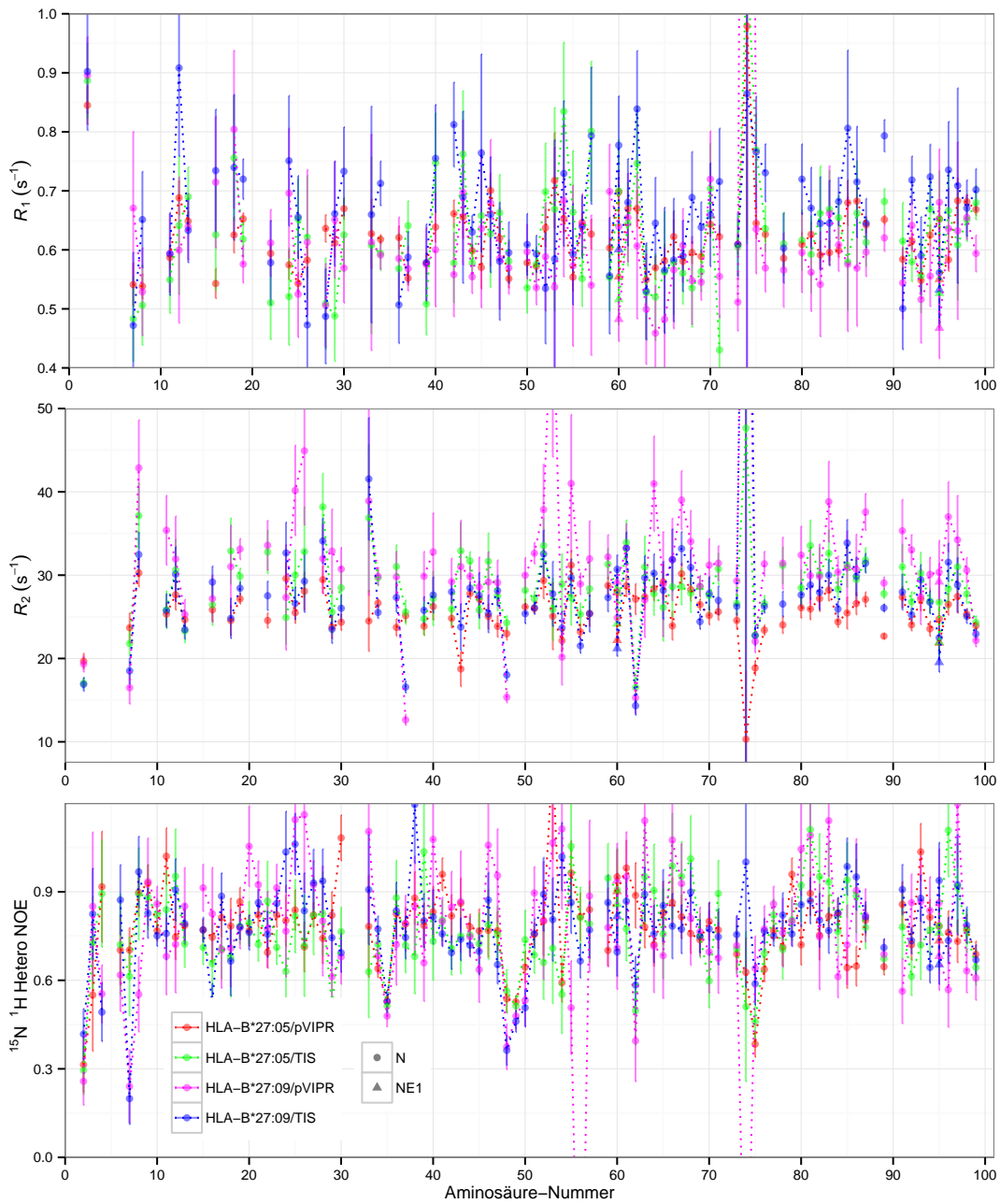


Abb. 3.19: Sequentielle Auftragung der Relaxationsraten (R_1 , R_2) und des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE des $\beta_2\text{m}$ im Komplex mit HLA-B*27:05 oder B*27:09 und mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz. Extreme Werte sind nicht dargestellt. BMRB-IDs wie auf Seite 72 angegeben.

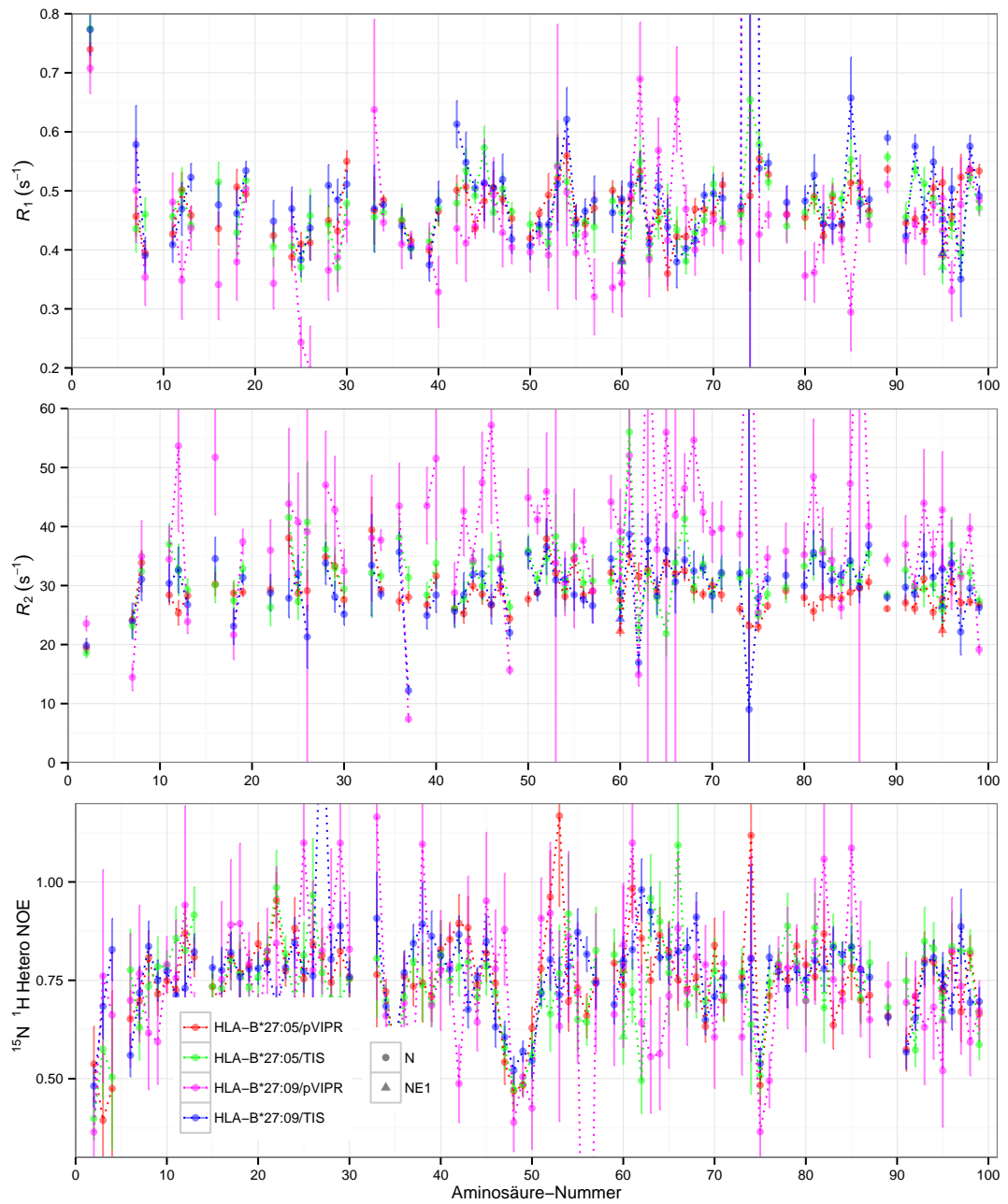


Abb. 3.20: Sequentielle Auftragung der Relaxationsraten (R_1 , R_2) und des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE des $\beta_2\text{m}$ im Komplex mit HLA-B*27:05 oder B*27:09 und mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz. Extreme Werte sind nicht dargestellt. BMRB-IDs wie auf Seite 72 angegeben.

3.4.4 Konsistenz der Relaxationsdaten

Die Relaxationswerte aus den beiden Feldstärken sollten unter den gleichen experimentellen Bedingungen aufgenommen und somit konsistent sein. Aus den Daten, die bei den zwei verschiedenen Feldstärken aufgenommen wurden, wurde daher jeweils ein feldstärkeunabhängiger Parameter bestimmt. Dafür eignet sich etwa die spektrale Dichte bei Nullfrequenz $J(0)$, die sich durch reduziertes Spektraldichte-Mapping errechnen lässt. Die Ergebnisse dieser Konsistenztests [110] sind in den Abbildungen 3.21 und 3.22 dargestellt. Die Histogramme stellen die Verteilung der Verhältnisse der Daten aus beiden unabhängigen Messungen dar; im Idealfall liegen hier alle Werte bei 1, bei Berücksichtigung von zufälligen experimentellen Fehlern sollten diese symmetrisch um 1 streuen. Im Streudiagramm sind die $J(0)$ -Werte aus den Daten der beiden Messungen gegeneinander aufgetragen. Im Idealfall streuen die Werte symmetrisch um die Diagonale herum. Da die beiden Untereinheiten getrennt voneinander gemessen wurden, wurden sie auch separat auf ihrer Konsistenz überprüft.

Die Konsistenz der Relaxationsdaten der schweren Ketten ist mit $\frac{J(0)_{600} - J(0)_{750}}{J(0)_{750}} < 2\%$ sehr hoch, insbesondere für die Daten von HLA-B*27:05/pVIPR und HLA-B*27:09/TIS mit Werten unter 1%. Für HLA-B*27:09/pVIPR ergibt sich mit einem Wert von 8,7% eine geringe Inkonsistenz, die sich auch im Streudiagramm widerspiegelt. Auch aus der Abbildung 3.17 ist erkennbar, dass die Raten R_1 und R_2 von HLA-B*27:09/pVIPR von denen der anderen Komplexe abweichen. Dieser systematische Fehler wurde bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt.

Auch die Konsistenz der Relaxationsdaten des β_2m im HLA-Komplex ist mit $\frac{J(0)_{600} - J(0)_{750}}{J(0)_{750}} < 5\%$ sehr hoch, die $J(0)$ -Werte streuen aber im Vergleich zu den Daten der schweren Kette stärker. Abermals zeigt HLA-B*27:09/pVIPR leicht erhöhte Werte von 5,7%, die vergleichsweise stark streuen. Abbildung 3.20 lässt erkennen, dass hier etwas erhöhte R_2 -Raten mit vergleichsweise großen Fehlern vorliegen.

3.4.5 Vorhersage der Relaxations- und Diffusionsverhaltens

Die Vorhersage des Relaxations- und Diffusionsverhaltens in einer Lösung mit definierter Viskosität und bei gegebener Temperatur erfolgte mit dem Programm Hydronmr. Damit sollte ein Anhaltspunkt für den Vergleich der Korrelationszeiten der *model-free*-Analyse geschaffen werden. Da Hydronmr die Hydrathülle der Moleküle nur unzureichend berücksichtigt, wird der effektive hydrodynamische Radius des Moleküls üblicherweise unterschätzt und eine zu geringe Korrelationszeit τ_c bestimmt.

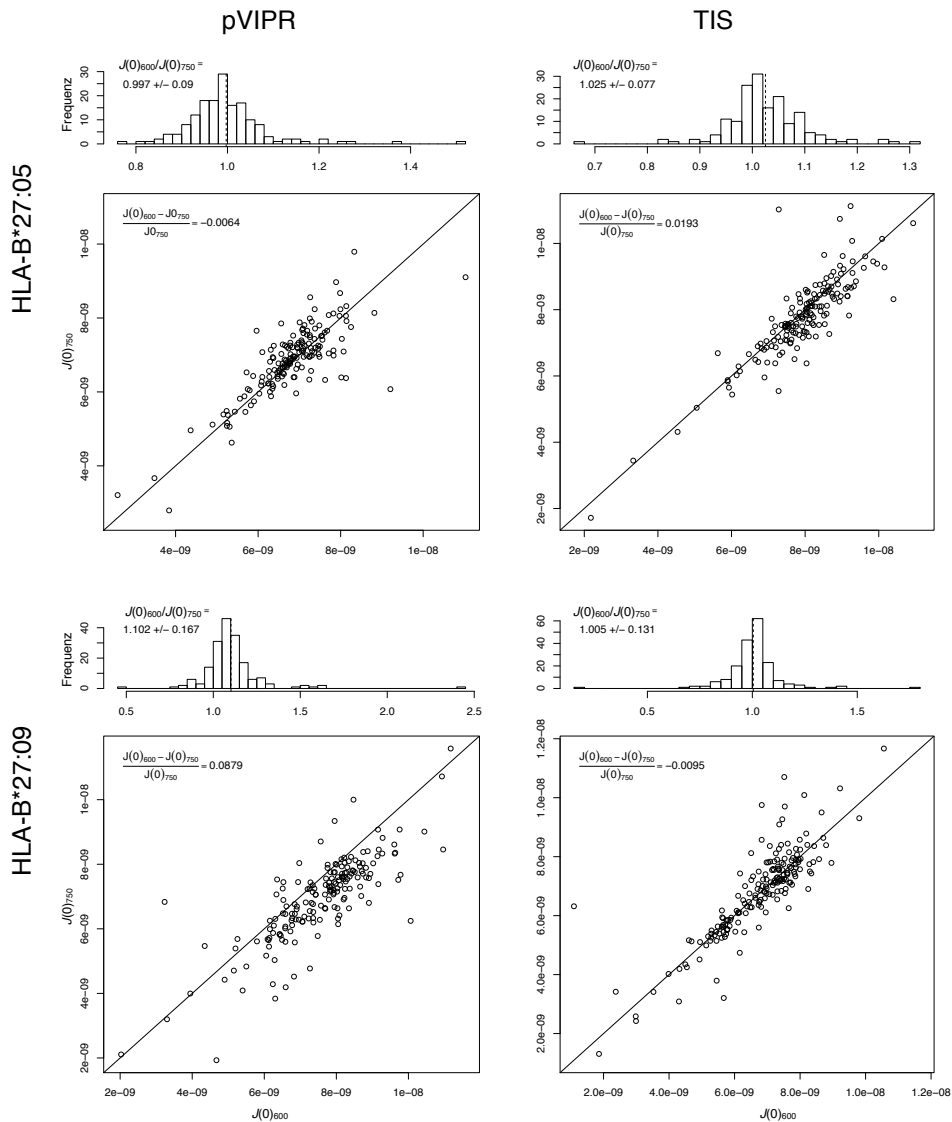


Abb. 3.21: Sammelgrafik der Konsistenztests auf Basis der in den Abbildungen 3.17 und 3.17 ab Seite 73 dargestellten Relaxationsdaten der schweren Ketten HLA-B*27:05 und B*27:09, jeweils in Komplex mit pVIPR oder TIS, aufgenommen bei den Feldstärken 600 MHz und 750 MHz. Es sind die feldstärkeunabhängigen $J(0)$ -Werte (spektrale Dichte bei Nullfrequenz) aus dem reduzierten Spektraldichtemapping dargestellt. Jeweils oben: Histogramm, die Verteilung der Verhältnisse der $J(0)$ -Werte errechnet aus den Daten, die bei den beiden Feldstärken aufgenommen wurden. Es ist der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Jeweils unten: Streudiagramm der $J(0)$ -Werte, Daten der beiden Feldstärken gegeneinander aufgetragen. Es ist die normalisierte Differenz der beiden Datensätze angegeben.

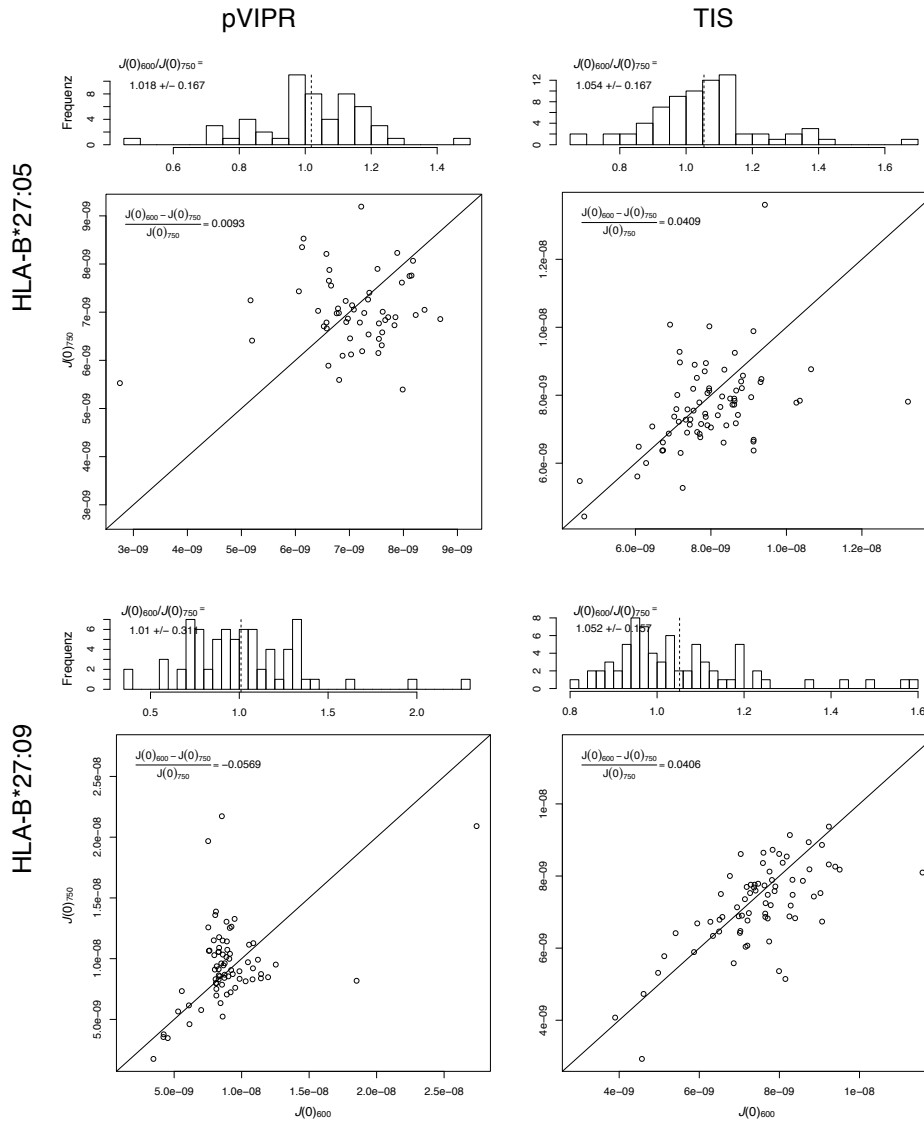


Abb. 3.22: Sammelgrafik der Konsistenztests auf Basis der in den Abbildungen 3.19 und 3.17 ab Seite 75 dargestellten Relaxationsdaten des β_2m , jeweils in Komplex mit HLA-B*27:05 oder B*27:09, sowie pVIPR oder TIS, aufgenommen bei den Feldstärken 600 MHz und 750 MHz. Darstellung wie in Abbildung 3.21

Wie erwartet, verhielten sich die vier HLA-Komplexe in der Simulation identisch (Tabelle 3.4). Es konnten nur leichte Abweichungen in der Korrelationszeit (23,2-23,7 ns) und in den Relaxationsraten festgestellt werden.

Tab. 3.4: Daten aus der Vorhersage des Diffusionsverhaltens mit Hydromr.

Komplex	PDB-ID	τ_c
-	-	10^{-9} s
B*27:05/pVIPR	1ogt	23,76
B*27:05/TIS	1w0v	23,21
B*27:09/pVIPR	1of2	23,97
B*27:09/TIS	1w0w	23,76

3.4.6 *Model-free*-Analyse der schweren Kette und des β_2 -Mikroglobulin

Relaxationsraten und Hetero-NOE werden von globaler und lokaler Dynamik beeinflusst. Der *model-free*-Formalismus (siehe Kapitel 1.6 und 2.5.4) trennt globale von lokaler Dynamik und berücksichtigt die anisotrope Rotations-Diffusion des Moleküls. In den folgenden Abschnitten werden globale Modelle und die *order parameter* S^2 und die Austauschraten R_{ex} der lokalen Modelle betrachtet.

Die vollständigen *model-free*-Daten sind in der BMRB (siehe Tabelle 3.3) hinterlegt und im Anhang ab Seite 171 im Diagramm dargestellt.

Diffusionsmodelle

Die Relaxation der α_3 -Domäne von HLA-B*27:09/TIS unterscheidet sich von der Relaxation von dessen α_1 - α_2 -Domäne (siehe Kapitel 3.4.3). Daher wurden die beiden Domänen α_1 - α_2 und α_3 , sowie die β_2 m-Untereinheit bei der *model-free*-Analyse als eigenständige strukturelle Einheiten behandelt. Durch dieses hybride Modell lässt sich detektieren, ob sich die beiden Domänen unabhängig voneinander bewegen [113]. Die durch `relax 3` optimierten Tensoren der schweren Ketten und des β_2 m im Komplex sind in Abbildung 3.23 zusammen dargestellt. Die betrachteten Parameter der Diffusionstensoren sind die Korrelationszeit, die Geometrie und die Orientierung des Modells bezogen auf die Proteinstruktur.

Das hybride Diffusionsmodell. Die verschiedenen Untereinheiten wurden so einzeln und in Kombination analysiert. Aikakes Informationskriterium (AIC) wägt die Güte eines statistischen Modells gegen die Zahl seiner Parameter ab. Modelle mit einem niedrigen AIC-Wert

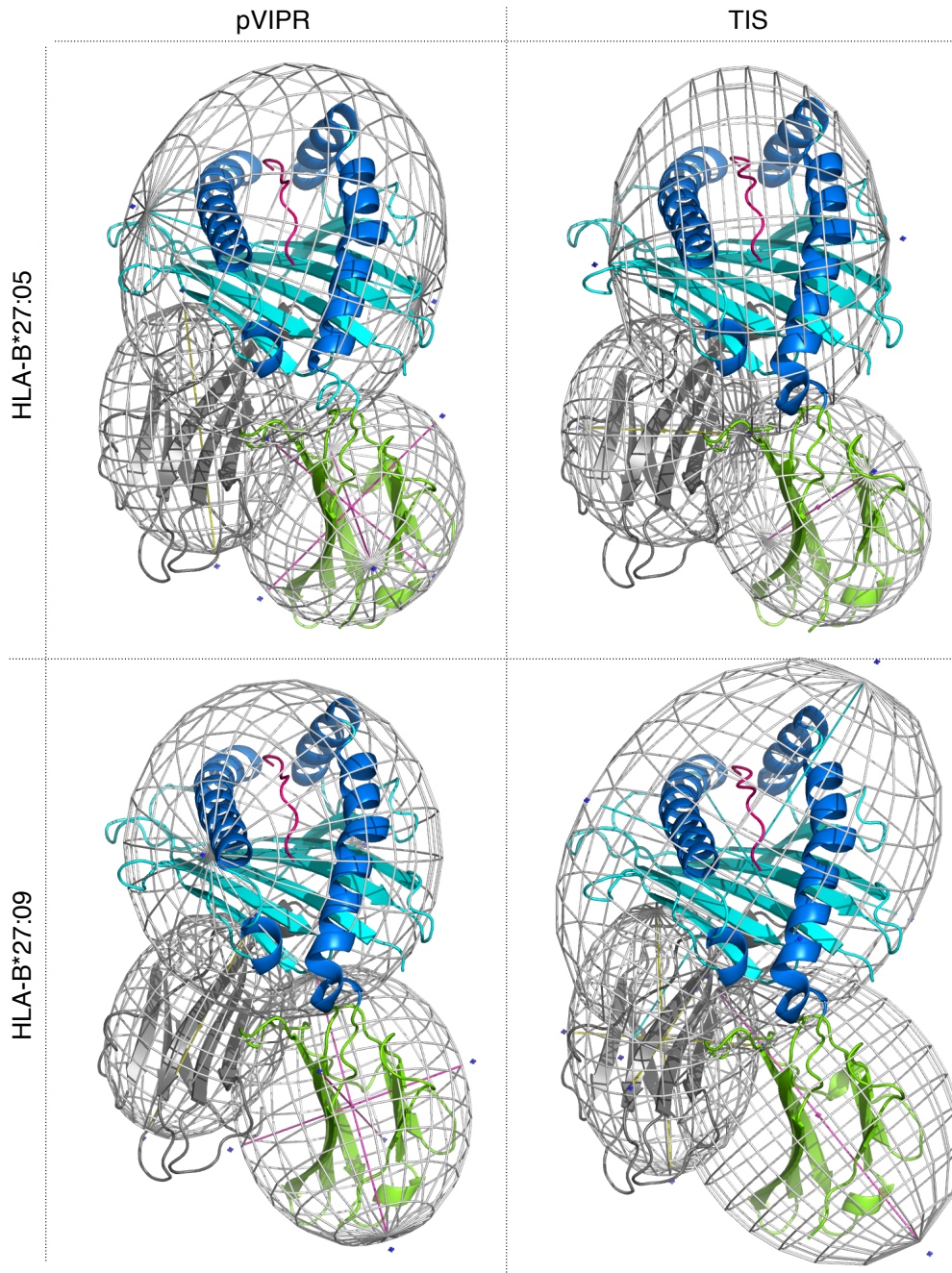


Abb. 3.23: Visuelle Repräsentation der Diffusionstensoren der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domänen (blau/cyan) und der $\alpha 3$ -Domäne (grün) der schweren Ketten und des $\beta_2 m$ mit den Strukturen von HLA-B*27:05 oder :09 in Komplex mit pVIPR oder TIS. Tensoren auf das Massenzentrum der jeweiligen Domäne zentriert. Tensorenparameter in Tabellen 3.7 und 3.9. Darstellung der Strukturen wie in Abb. 1.1.

sind zu bevorzugen, da sie eine Überanpassung vermeiden und die Zahl der benötigten Parameter auf ein Minimum beschränken. Vergleicht man die AIC-Werte in Tabelle 3.5, sind deren Summen bei einer Einzeldomänen-Analyse stets niedriger als die AIC-Werte der Analyse, in denen der gesamte Komplex oder die gesamte schwere Kette als Ganzes betrachtet wurde. Damit ist eine Einzeldomänen-Analyse gerechtfertigt. In der folgenden Einzelbetrachtung sind nur noch die selektierten Diffusionstensoren berücksichtigt.

Tab. 3.5: AIC-Werte der Diffusionsmodelle für jeden der Komplexe. Es wird das einfache Diffusionsmodell den Modellen für die einzelnen strukturellen Einheiten gegenübergestellt. Der niedrigste AIC-Wert ist jeweils markiert. Die Optimierung des vollständigen B*27:09/pVIPR konvergierte nicht (n.k.).

(a) HLA-B*27:05/pVIPR.						(b) HLA-B*27:05/TIS.					
Modell	alles	HC	$\alpha 1-\alpha 2$	$\alpha 3$	β_{2m}	Modell	alles	HC	$\alpha 1-\alpha 2$	$\alpha 3$	β_{2m}
Kugel	2773	2037	1085	940	451	Kugel	3758	3219	1917	1246	528
prolat	2768	2030	1073	929	432*	prolat	3610	3015	1719	1085	522
oblat	2752*	1976*	1042*	929	449	oblat	3374	2854	1554*	1078*	521*
ellips.	2753	2004	1058	928*	436	ellips.	3304*	2786*	1596	1101	522

(c) HLA-B*27:09/pVIPR.						(d) HLA-B*27:09/TIS.					
Modell	alles	HC	$\alpha 1-\alpha 2$	$\alpha 3$	β_{2m}	Modell	alles	HC	$\alpha 1-\alpha 2$	$\alpha 3$	β_{2m}
Kugel	n.k.	10479	3908	5619	1001	Kugel	6684	5518	2367	2705	586
prolat	n.k.	10322	3770	5323	999*	prolat	6232*	5073*	2187	2483*	579
oblat	n.k.	10191*	3737*	5471	1029	oblat	6277	5137	2224	2823	574
ellips.	n.k.	10346	3766	5310*	1026	ellips.	6477	5264	2159*	2483	564*

Diffusionsmodelle der $\alpha 1/\alpha 2$ -Domäne. Die $\alpha 1-\alpha 2$ -Domänen von B*27:05/pVIPR, B*27:05/TIS und B*27:09/pVIPR wurden durch oblate Diffusionstensoren beschrieben (Tabelle 3.8a). Deren Korrelationszeiten τ_m waren mit 19,5-22,5 ns vergleichbar. Die Geometrie der leicht oblaten Tensoren war ebenfalls ähnlich mit $D_{\parallel}/D_{\perp} = 0,75-0,81$. Wie sich am besten aus der Abbildung 3.23 ersehen lässt, unterschied sich die Orientierung nicht sehr stark. Der Diffusionstensor von B*27:09/TIS hatte eine ellipsoide Gestalt, deren Geometrie und Orientierung sich stark von den anderen Tensoren unterschied. Die Korrelationszeit von B*27:09/TIS ist mit 19,7 ns vergleichbar mit der der anderen Komplexe.

Diffusionsmodelle der $\alpha 3$ -Domäne. Die Modelle, die Geometrie und Orientierung der Diffusionstensoren der $\alpha 3$ -Domänen der schweren Ketten unterschieden sich stark voneinander. Für B*27:05/pVIPR und B*27:09/pVIPR wurden ellipsoide Tensoren, für B*27:05/TIS und B*27:09/TIS spheroidale Tensoren bestimmt. Die Korrelationszeiten waren vergleichbar (16,2-20,8 ns), allerdings in allen Fällen geringer als in den $\alpha 1-\alpha 2$ -Domänen. Eine besonders

Tab. 3.7: Parameter der Diffusionstensoren der α 1- α 2-Domänen.(a) Spheroidale Tensoren der α 1- α 2-Domäne von B*27:05/pVIPR, B*27:05/TIS und B*27:09/pVIPR.

Komplex	τ_m	D_{iso}	D_a	$D_{ }$	D_{\perp}	$D_{ }/D_{\perp}$	θ	ϕ
–	10^{-9} s	10^6 /s	10^6 /s	10^6 /s	10^6 /s	–	–	–
:05/pVIPR	19,53	8,53	-1,76	7,36	9,12	0,81	0,94	1,67
:05/TIS	21,11	7,89	-2,13	6,47	8,60	0,75	1,45	1,60
:09/pVIPR	22,54	7,39	-1,77	6,21	7,98	0,78	3,94	0,83

(b) Der ellipsoide Tensor der α 1- α 2-Domäne von B*27:09/TIS.

Komplex	τ_m	D_{iso}	D_a	D_r	D_x	D_y	D_z	α	β	γ
–	10^{-9} s	10^6 s $^{-1}$	10^6 s $^{-1}$	–	10^6 s $^{-1}$	10^6 s $^{-1}$	10^6 s $^{-1}$	–	–	–
:09/TIS	19,65	8,48	3,02	0,40	6,27	8,68	10,59	1,87	2,30	2,04

niedrige Korrelationszeit von $\tau_m=16,2$ ns wurde für B*27:09/TIS bestimmt. In allen Fällen unterschieden sie sich von den Tensoren der α 1- α 2-Domäne (siehe Tabellen 3.5 und 3.9).

Tab. 3.9: Parameter der Diffusionstensoren der α 3-Domänen.(a) Spheroidale Tensoren der α 3-Domänen von B*27:05/TIS und B*27:09/TIS.

Komplex	τ_m	D_{iso}	D_a	$D_{ }$	D_{\perp}	$D_{ }/D_{\perp}$	θ	ϕ
–	10^{-9} s	10^6 /s	10^6 /s	10^6 /s	10^6 /s	–	–	–
:05/TIS	20,80	8,014	-2,46	6,37	8,84	0,72	2,37	1,95
:09/TIS	16,24	10,26	2,14	11,69	9,55	1,22	1,02	2,56

(b) Ellipsoide Tensoren der α 3-Domänen von B*27:05/pVIPR und B*27:09/pVIPR.

Komplex	τ_m	D_{iso}	D_a	D_r	D_x	D_y	D_z	α	β	γ
–	10^{-8} s	10^6 s $^{-1}$	10^6 s $^{-1}$	–	10^6 s $^{-1}$	10^6 s $^{-1}$	10^6 s $^{-1}$	–	–	–
:05/pVIPR	19,00	8,77	1,26	0,37	7,89	8,81	9,61	2,57	1,98	0,11
:09/pVIPR	18,66	8,93	2,67	0,26	7,36	8,72	10,72	2,91	1,28	0,09

Diffusionsmodelle des β_2 m im HLA-Komplex. Für die Tensoren der β_2 m-Untereinheit wurden prolata (B*27:05/pVIPR, B*27:09/pVIPR) und oblate (B*27:05/TIS) Modelle, sowie für B*27:09/TIS ein ellipsoides Modell selektiert. Diese wiesen zahlreiche Ähnlichkeiten auf (Tabelle 3.11 und Abbildung 3.23). Die Korrelationszeiten von $\tau_m=20,0$ - $22,9$ ns waren vergleichbar mit denen der α 1- α 2-Domäne der schweren Ketten und damit höher als die der α 3-Domäne. Im Anhang auf Seite 171 befindet sich eine Abbildung, die das β_2 m im Vordergrund zeigt.

Die Geometrie der beiden prolata Tensoren war fast identisch ($D_{||}/D_{\perp}=1,3$ - $1,4$) und auch die Orientierung war mit $\theta \approx 2,4$ vergleichbar. Der ellipsoide Tensor von B*27:05/pVIPR und

B*27:09/pVIPR wies mit $D_r = 0,18$ eine nur geringe Rhombizität auf, die sonstige Geometrie war sehr ähnlich zu den beiden oben beschriebenen prolaten Tensoren. Die Orientierung war ebenfalls ähnlich, wie es Abbildung 3.23 wiedergibt. Die Geometrie des oblaten Tensors von B*27:05/TIS unterscheidet sich von den restlichen Tensoren. Die Äquatorialebene des oblaten Tensors von B*27:05/TIS ist vereinbar mit der Längsachse der anderen Tensoren.

Die langen Achsen der sehr ähnlichen Tensoren von B*27:05/pVIPR, B*27:05/pVIPR und B*27:09/TIS deuteten in eine ähnliche Richtung. Die Diffusionstensoren unterschieden sich in Orientierung und Geometrie sowohl von der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne, als auch von der $\alpha 3$ -Domäne. Auffällig ist die fast identische Korrelationszeit und sehr ähnliche Geometrie der Diffusionstensoren von β_2m und $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne von B*27:05/TIS.

Tab. 3.11: Parameter der Diffusionstensoren von β_2m im Komplex.

(a) Spheroidale Tensoren von β_2m in B*27:05/pVIPR, B*27:05/TIS und B*27:09/pVIPR.

Komplex	τ_m 10^{-9} s	D_{iso} $10^6/s$	D_a $10^6/s$	$D_{ }$ $10^6/s$	D_{\perp} $10^6/s$	$D_{ }/D_{\perp}$	θ	ϕ
-						-	-	-
:05/pVIPR	20,64	8,07	2,01	9,42	7,40	1,27	2,43	0,10
:05/TIS	21,33	7,81	-1,56	6,77	8,33	0,81	5,02	2,11
:09/pVIPR	22,89	7,28	2,42	8,90	6,47	1,37	2,39	1,02

(b) Der ellipsoide Tensor von β_2m in B*27:09/TIS.

Komplex	τ_m 10^{-9} s	D_{iso} $10^6/s$	D_a $10^6/s$	D_r	D_x $10^6/s$	D_y $10^6/s$	D_z $10^6/s$	α	β	γ
-				-				-	-	-
:09/TIS	20,00	8,32	2,94	0,18	6,80	7,87	10,28	1,65	2,67	2,86

Sub-Nanosekunden-Dynamik

In den *model-free* Modellen $m1$ bis $m8$ wird der quadrierte Ordnungsparameter S^2 ermittelt. Dieser gibt Auskunft über die Amplitude von Bewegung im Sub-Nanosekunden-Bereich. Die errechneten Werte finden sich neben den anderen *model-free*-Parametern im Anhang ab Seite 146 und sind auf den Abbildungen 3.24 bis 3.27 auf den Strukturen der Komplexe dargestellt. Der generalisierte quadrierte Ordnungsparameter S^2 (siehe auch Gleichung 1.10) spiegelt die Entropie des betreffenden Bindungsvektors wider. Ein S^2 von 0 beschreibt völlig freie Beweglichkeit, während ein S^2 von 1 einen vollständig rigiden Bindungsvektor beschreibt.

Die S^2 -Werte der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne. Die $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne der HLA-B*27-Komplexe (Abbildung 3.24) wies eine Reihe Gemeinsamkeiten auf. Diese betrafen in erster Linie unstrukturierte Loop-Regionen. So wies der Loop um Rest 17 in allen Komplexen stark erniedrigte S^2 -

Werte von unter 0,4 auf. Die Region um Aminosäure 90 hatte S^2 -Wert von etwa 0,5 in allen Komplexen. Auch der Loop um Aminosäure 41 schien insbesondere in den beiden B*27:09-Komplexen signifikant erniedrigte Werte zu besitzen. Die Signale dieses Loops überlappten in B*27:05/TIS und waren nicht aufgelöst, daher war kein Vergleich möglich. Auch für die Regionen um Aminosäure 106 oder 130 sind die zugrundeliegenden Daten unvollständig. Auch die strukturierten Regionen der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne sind nicht durch vollständige Relaxationsdaten beschrieben, insbesondere die Helices waren durch konformationellen Austausch verbreitert. Hier traten einige spezifische Unterschiede zutage.

Zahlreiche Signale der $\alpha 1$ -Helix konnten nicht detektiert oder nicht aufgelöst werden, weshalb ein Vergleich nur eingeschränkt möglich war. In allen Komplexen, in denen sie detektiert werden konnten, waren die der S^2 -Werte der Aminosäuren 48, 49, 56 erniedrigt. Insbesondere in der $\alpha 1$ -Helix der beiden B*27:09-Komplexe tauchten Reste mit erniedrigten S^2 -Werten auf, die allerdings in den anderen Komplexen nicht aufgelöst oder austauschverbeitert waren. Der zentrale Bereich der Helix in B*27:05/TIS wies hohe S^2 -Werte auf, gleichzeitig besaß Rest 80 einen stark erniedrigten Wert. Dieser Rest war bei den anderen Komplexen nicht aufgelöst.

Die $\alpha 2$ -Helix war in den vier Komplexen sehr unterschiedlich. So erschien B*27:05/TIS mit hohen S^2 -Werten rigider als alle anderen Komplexe. Im Vergleich von B*27:05/pVIPR mit B*27:05/TIS war eine etwas erhöhte Beweglichkeit im Bereich 140-150 in B*27:05/pVIPR erkennbar. Im Vergleich von B*27:09/pVIPR mit B*27:09/TIS gab es deutliche Unterschiede: in B*27:09/pVIPR besaßen nach außen weisende Reste im N-terminalen Bereich der $\alpha 2$ -Helix (Aminosäuren 140-150) mit Werten unter 0,5 offenbar eine stark ausgeprägte Dynamik auf; im Bereich 160-165 der Helix dagegen waren die S^2 -Werte nur leicht höher als in anderen Komplexen. In B*27:09/TIS ist die Situation umgekehrt und der Bereich 140-150 erscheint rigide, während 160-165 vergleichsweise beweglicher ist. So ergibt sich in B*27:09 ein deutlicher ligandenabhängiger Unterschied. Subtypabhängig scheint es in pVIPR-Komplexen eine Zunahme der S^2 -Dynamik in der $\alpha 2$ -Helix zu geben.

Innerhalb der β -Faltblatt-Strukturen der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne war S^2 lediglich in der Region 132-138 von B*27:09 erniedrigt, in B*27:05 erscheint der Bereich weitaus rigider. Alle anderen β -Strukturen erschienen unauffällig und suggerieren mit S^2 -Werten von mindestens 0,8 eine insgesamt rigide Struktur.

Die S^2 -Werte der $\alpha 3$ -Domäne. Die S^2 -Werte der $\alpha 3$ -Domäne wurden für das hybride Tensormodell separat von der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne ermittelt. Sie sind in Abbildung 3.25 wiedergegeben.

Die S^2 -Werte der $\alpha 3$ -Domäne der Komplexe B*27:05/pVIPR, B*27:05/TIS und B*27:09/pVIPR waren im Wesentlichen sehr ähnlich. Die strukturierten Bereiche besaßen recht hohe S^2 -Werte,

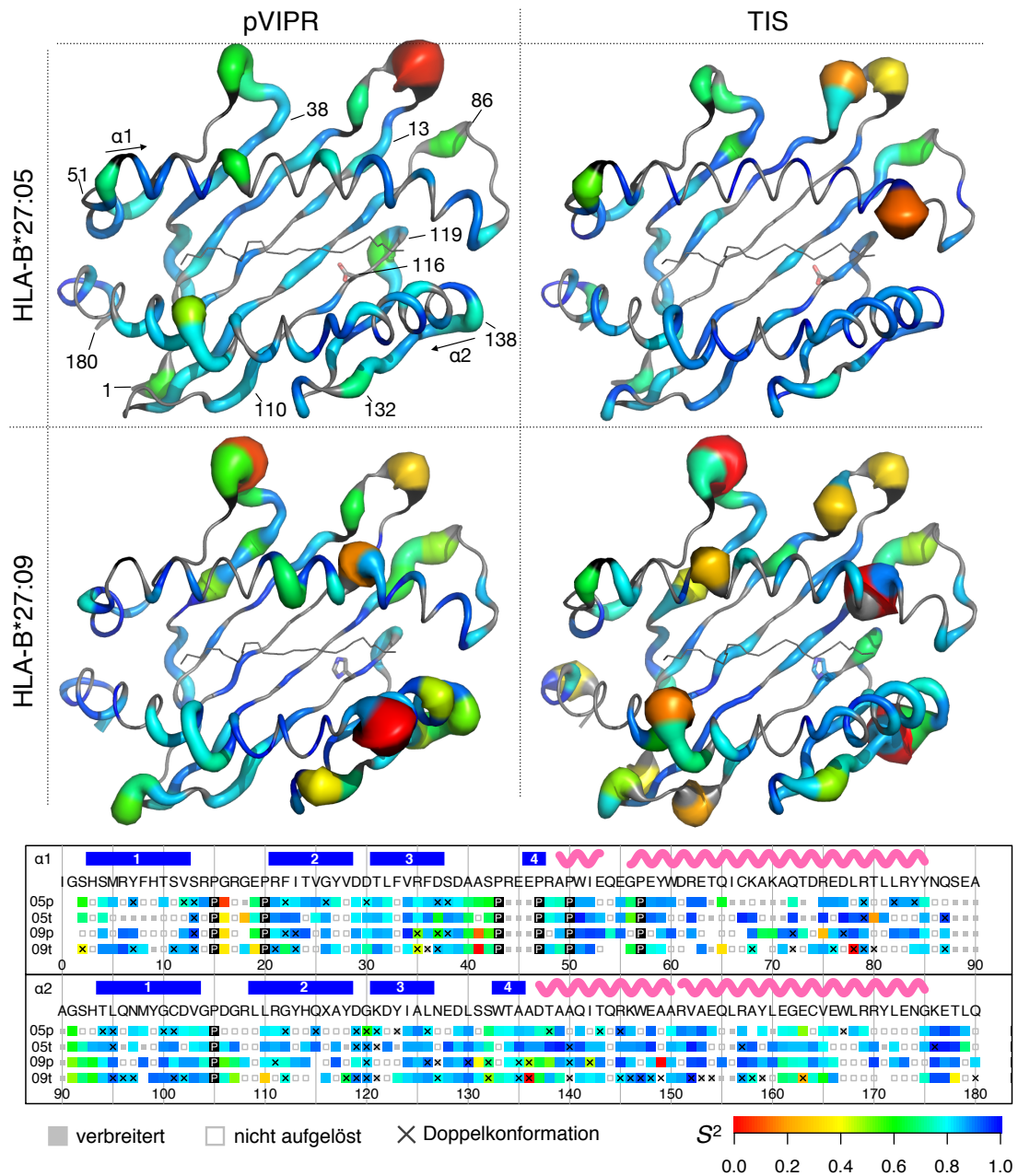


Abb. 3.24: Die S^2 -Werte der *model-free*-Analyse farbig kodiert, zusammen mit der Struktur der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne. Oben: Vereinfachende Röhren-Darstellung der Struktur, die Farbe entspricht den Werten auf der Skala. Die Dicke der Röhre (zwischen 0,5 und 10 Å) ist invers proportional zum S^2 -Wert. $\beta 2m$ und $\alpha 3$ -Domäne sind nicht dargestellt. Unten: Sequentielle Darstellung mit Sekundärstruktur, Sequenz und weiteren Annotationen. 05p, HLA-B*27:05/pVIPR; 05t, HLA-B*27:05/TIS; 09p, HLA-B*27:09/pVIPR; 09t, HLA-B*27:09/TIS.

in den Loops zwischen Strang 1 und 2, bzw. zwischen Strang 6 und 7 hatten die Reste 197 in B*27:05/pVIPR und 266 in B*2705/TIS vereinzelt erniedrigte Werte. In B*27:09/pVIPR besaß der Rest 214 einen stark erniedrigten S^2 -Wert, der mit hohen Fehlern behaftet war. Der hohe Wert war mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Artefakt der extremen Raten ist, die sich aus der Messung an einem sehr schwachen Signal ergaben.

Die $\alpha 3$ -Domäne von B*27:09/TIS wies ausgeprägt niedrige S^2 -Werte in allen β -Faltblatt-Strängen außer Strang 6 auf. Dies spiegelte sich bereits in den außergewöhnlichen R_1 - und R_2 -Raten wieder, die auf eine vom Restkomplex unabhängige Diffusion hindeuten. Es war daher unklar, ob diese S^2 -Werte real sind, oder durch die Unzulänglichkeit der Beschreibung durch einen einzigen Diffusionstensor zustande kamen.

Um auszuschließen, dass es sich hierbei lediglich um Modellierungsartefakte eines unzureichenden Tensormodells handelte, wurden die Werte aus den lokalen Modell in Abbildung 3.26 verglichen. Diese lokalen Modelle ignorieren den globalen Diffusionstensor und können folglich von diesem nicht beeinflusst werden. Die Raten aus den lokalen Modellen befanden sich in guter Übereinstimmung mit den Raten aus der vollständigen Analyse (mit Tensormodell). Die S^2 -Werte waren gegenüber der vollständigen Analyse leicht vermindert. Bei B*27:09/TIS jedoch waren die Werte stark erhöht, was ein starker Hinweis auf das Auftreten von artifiziellen Dynamiken ist, die durch ein unpassendes Tensormodell verursacht werden. Dennoch blieben auch in den lokalen Modellen mobile Regionen erhalten, wie etwa Strang 4.

Die S^2 -Werte des β_2 -Mikroglobulins. Die S^2 -Werte des β_2m in B*27:05/pVIPR, B*27:05/TIS und B*27:09/TIS waren sehr ähnlich. B*27:09/pVIPR wies dagegen stellenweise stark erniedrigte S^2 -Werte auf. Verglichen mit den anderen Komplexen, zeigten in B*27:09 die Reste 7 und 37 erhöhte S^2 -Werte, die mit großen Fehlern behaftet waren. In B*27:05/TIS waren die S^2 -Werte von 29, 62 leicht erhöht. Das sonstige Bild lässt nur wenige Gemeinsamkeiten erkennen.

Austauschraten R_{ex}

Neben S^2 wird in den Modellen m_3, m_4, m_7, m_8 und m_9 der R_{ex} -Parameter optimiert, der Auskunft über die Rate von Austauschprozessen aus der Mikro- bis Millisekundenzeitskala gibt und seinen Ursprung in der R_2 -Rate hat. Die R_{ex} -Raten sind in den Abbildungen 3.28 bis 3.30 dargestellt. Eine Selektion eines Modells mit einem R_{ex} -Parameter beweist nicht das wirkliche Vorliegen von Austausch. Die Relevanz muss aus der Höhe und Frequenz der Werte

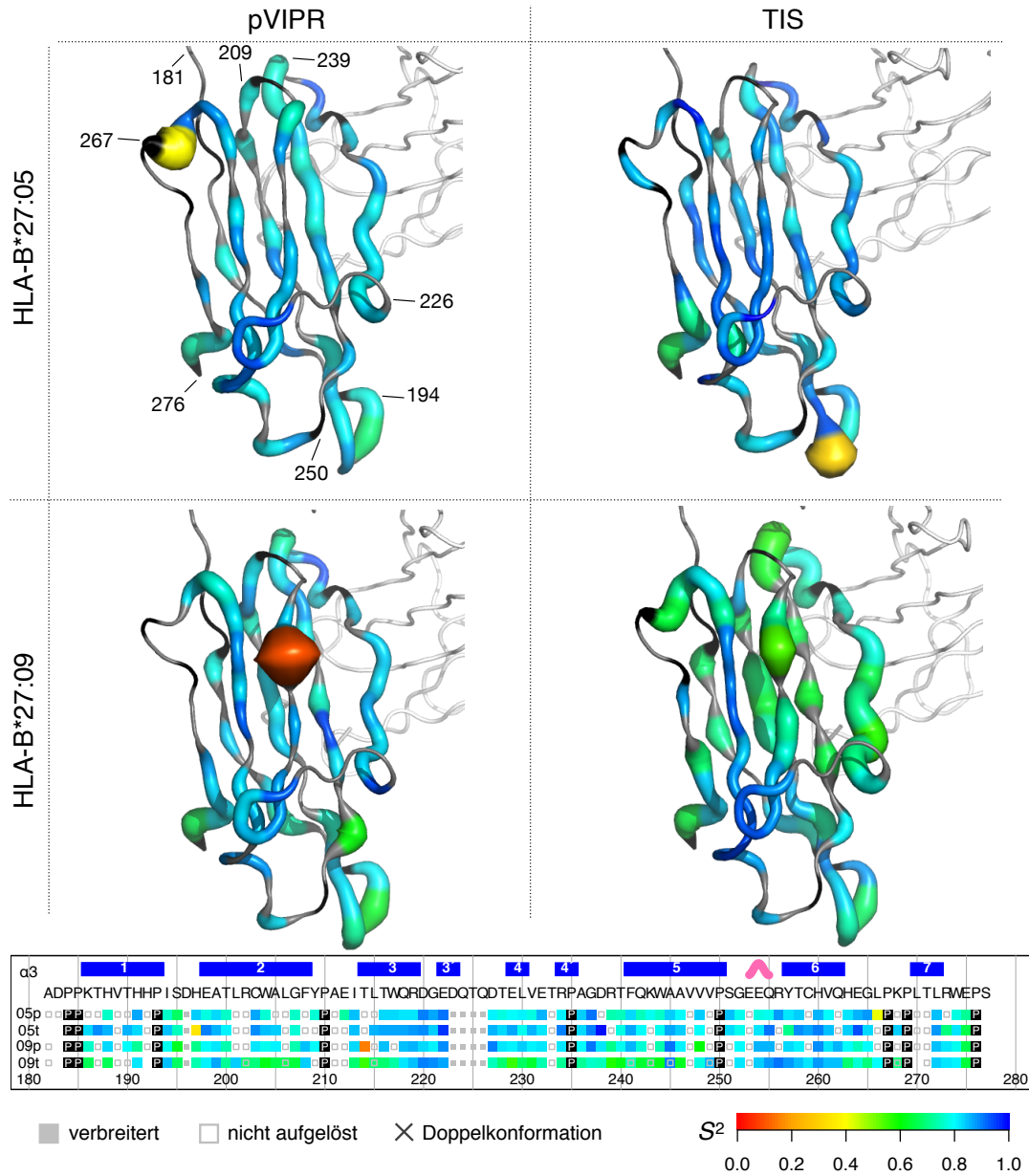


Abb. 3.25: Die S^2 -Werte der *model-free*-Analyse farbig kodiert, zusammen mit der Struktur der $\alpha 3$ -Domäne. Darstellung wie in Abbildung 3.24. Im Hintergrund ist ein Teil des $\beta 2m$ zu sehen.

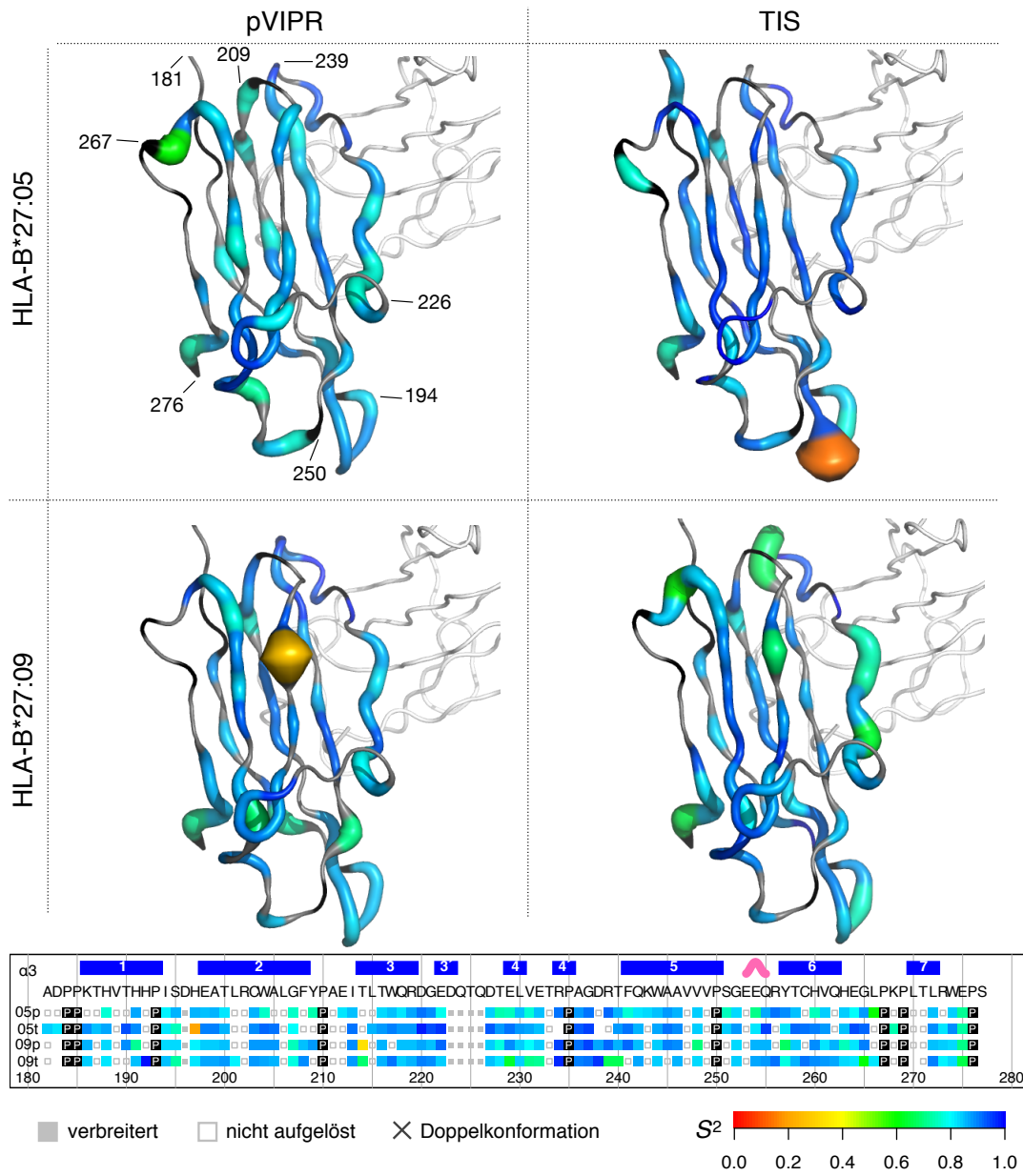


Abb. 3.26: Die S^2 -Werte der lokalen Modelle der *model-free*-Analyse farbig kodiert, zusammen mit der Struktur der $\alpha 3$ -Domäne. Darstellung wie in Abbildung 3.28.

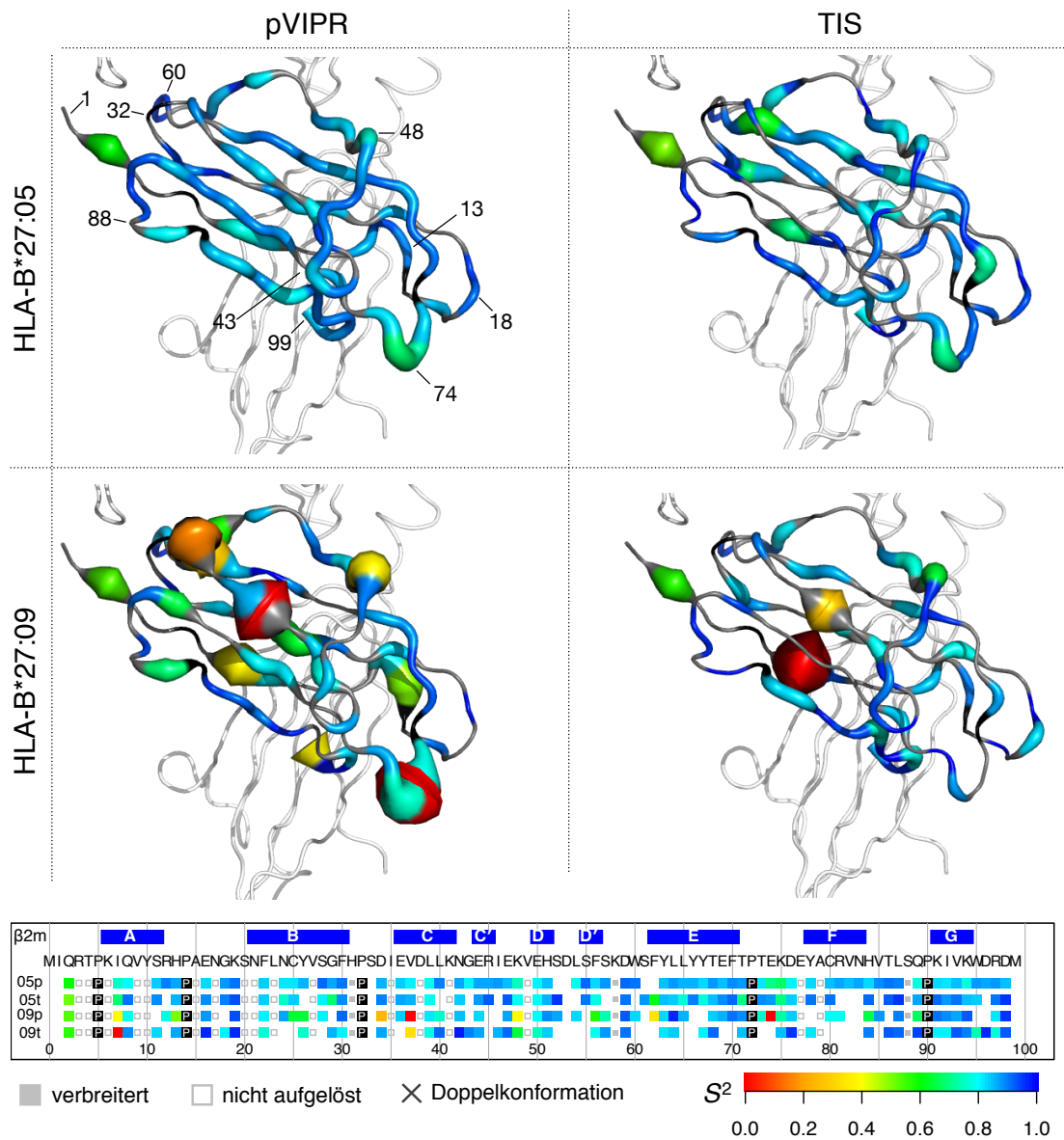


Abb. 3.27: Die S^2 -Werte der *model-free*-Analyse, zusammen mit der Struktur des β_2m . Darstellung wie in Abbildung 3.24. Im Hintergrund ist die α_3 -Domäne der schweren Kette zu sehen.

abgeschätzt werden.

Die R_{ex} -Werte der $\alpha 1/\alpha 2$ -Domäne. In allen Proteinen wurde geringer Austausch über weite Teile der Sekundärstrukturen und signifikant erhöhte Austauschparameter in einigen Loop-Regionen festgestellt. Dies kann man aus den Darstellungen in Abbildung 3.28 ablesen. In allen Proteinen konnte neben Austauschraten innerhalb der unstrukturierten Bereiche auch Austausch in Sekundärstrukturen beobachtet werden, wie in der C-terminalen Hälfte der $\alpha 2$ -Helix um die Aminosäure 165 in B*27:05/pVIPR, B*27:05/TIS und B*27:09/TIS. In den beiden TIS-assoziierten Komplexen fällt der erhöhte Austausch am in der Region 29-53 auf, der das N-terminale Ende der $\alpha 1$ -Helix, die $\alpha 1$ -Strängen 3 und 4, sowie in dem Loop zwischen Strang 2 und 3 umfasst. Rest 34 zeigte einen besonders erhöhten Wert. Dagegen besaß B*27:05/TIS etwas erhöhte Werte in der N-terminalen Hälfte der $\alpha 2$ -Helix. B*27:05/pVIPR und B*27:09/TIS besaßen signifikant erhöhte Austauschwerte in der C-terminalen Hälfte der $\alpha 2$ -Helix. Auch B*27:05/TIS zeigte hier leicht erhöhte Werte. B*27:09/pVIPR zeichnete dagegen ein stark erhöhter Austauschwert in der N-terminalen Hälfte der $\alpha 2$ -Helix aus (Reste 142, 149), die einen Teil der F-Taschen-Region bildet. In der selben Region waren auch die R_{ex} -Werte der Reste 115 und 131 erhöht.

Die R_{ex} -Werte der $\alpha 3$ -Domäne. Die R_{ex} -Werte $\alpha 3$ -Domäne von B*27:05 mit pVIPR oder TIS, sowie B*27:09 mit pVIPR unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Wie aus Abbildung 3.29 hervorgeht, sind die Raten hier durchgehend sehr niedrig und damit wahrscheinlich nicht signifikant. Eine auffallende Ausnahme stellt B*27:09 mit TIS dar. Hier wurden Austauschraten von bis zu etwa 10 s^{-1} erreicht.

Die R_{ex} -Werte des $\beta 2\text{m}$. Modellierete R_{ex} -Raten von $\beta 2\text{m}$ im Komplex waren meistens sehr niedrig und nur vereinzelt anzutreffen (siehe Abbildung 3.30). In B*27:05/pVIPR waren mehr und höhere Werte zu finden. Der erhöhte Wert von Ile7 in B*27:09/TIS ist mit einem sehr hohen Fehler behaftet und daher nicht aussagekräftig.

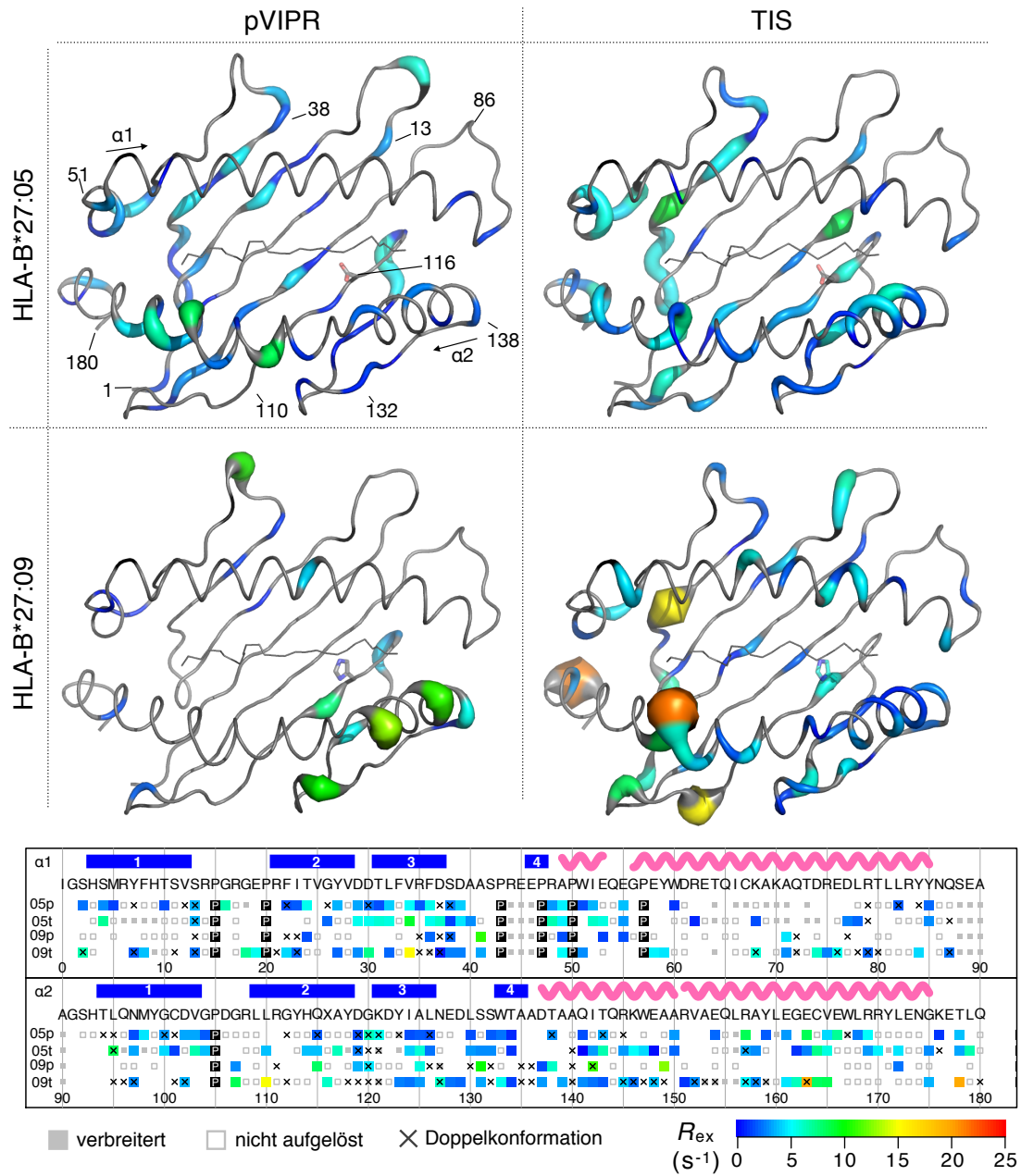


Abb. 3.28: Die R_{ex} -Werte der *model-free*-Analyse farbig kodiert, zusammen mit der Struktur der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne. Oben: Vereinfachende Röhren-Darstellung der Struktur, die Farbe entspricht den Werten auf der Skala. Die Dicke der Röhre (zwischen 0,5 und 10 Å) ist proportional zum R_{ex} -Wert. β_2 m und $\alpha 3$ -Domäne sind nicht dargestellt. Unten: Sequentielle Darstellung mit Sekundärstruktur, Sequenz und weiteren Annotationen. 05p, HLA-B*27:05/pVIPR; 05t, HLA-B*27:05/TIS; 09p, HLA-B*27:09/pVIPR; 09t, HLA-B*27:09/TIS.

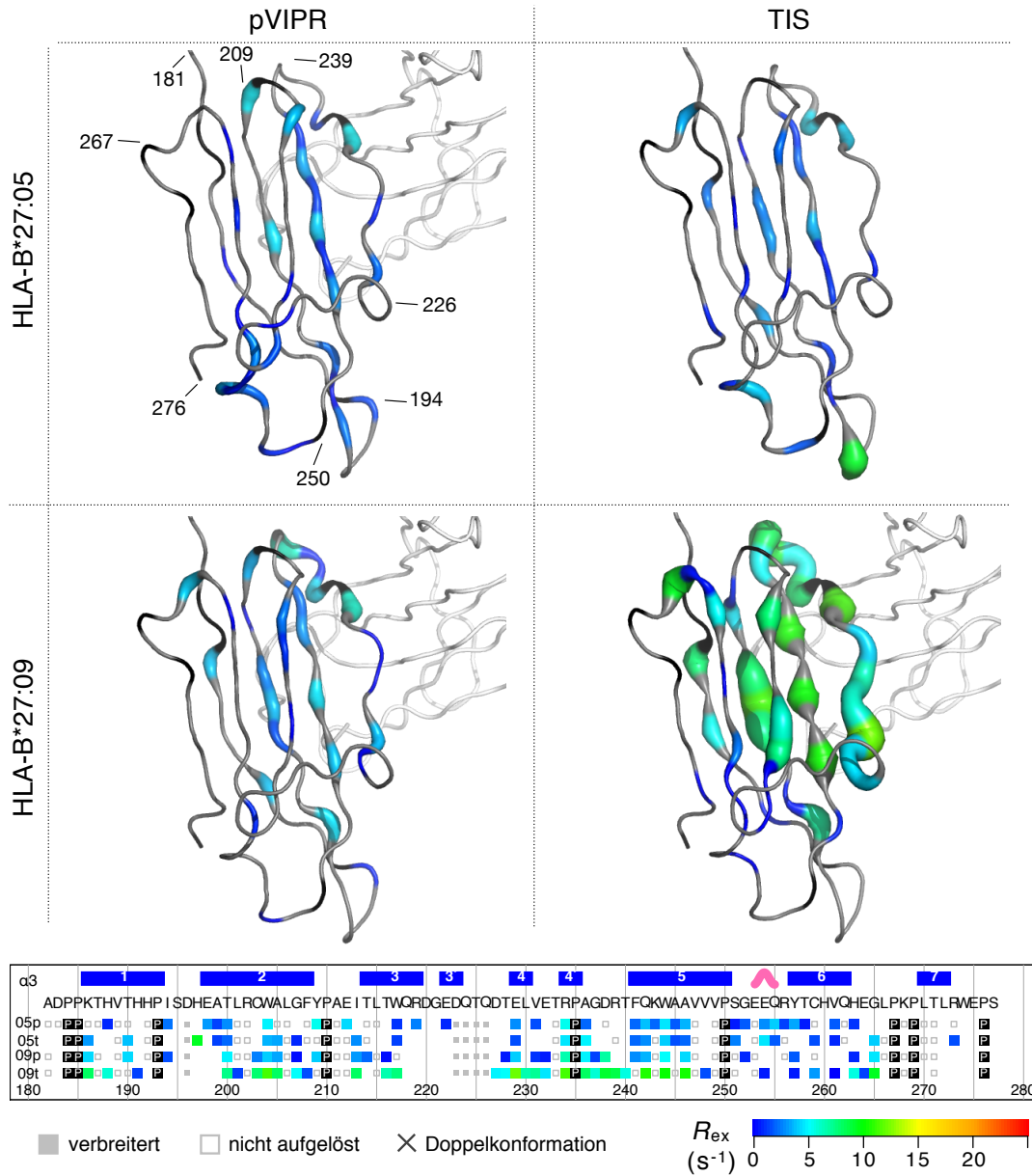


Abb. 3.29: Die R_{ex} -Werte der *model-free*-Analyse farbig kodiert, zusammen mit der Struktur der $\alpha 3$ -Domäne. Darstellung wie in Abbildung 3.28. Im Hintergrund ist ein Teil des β_2m zu sehen.

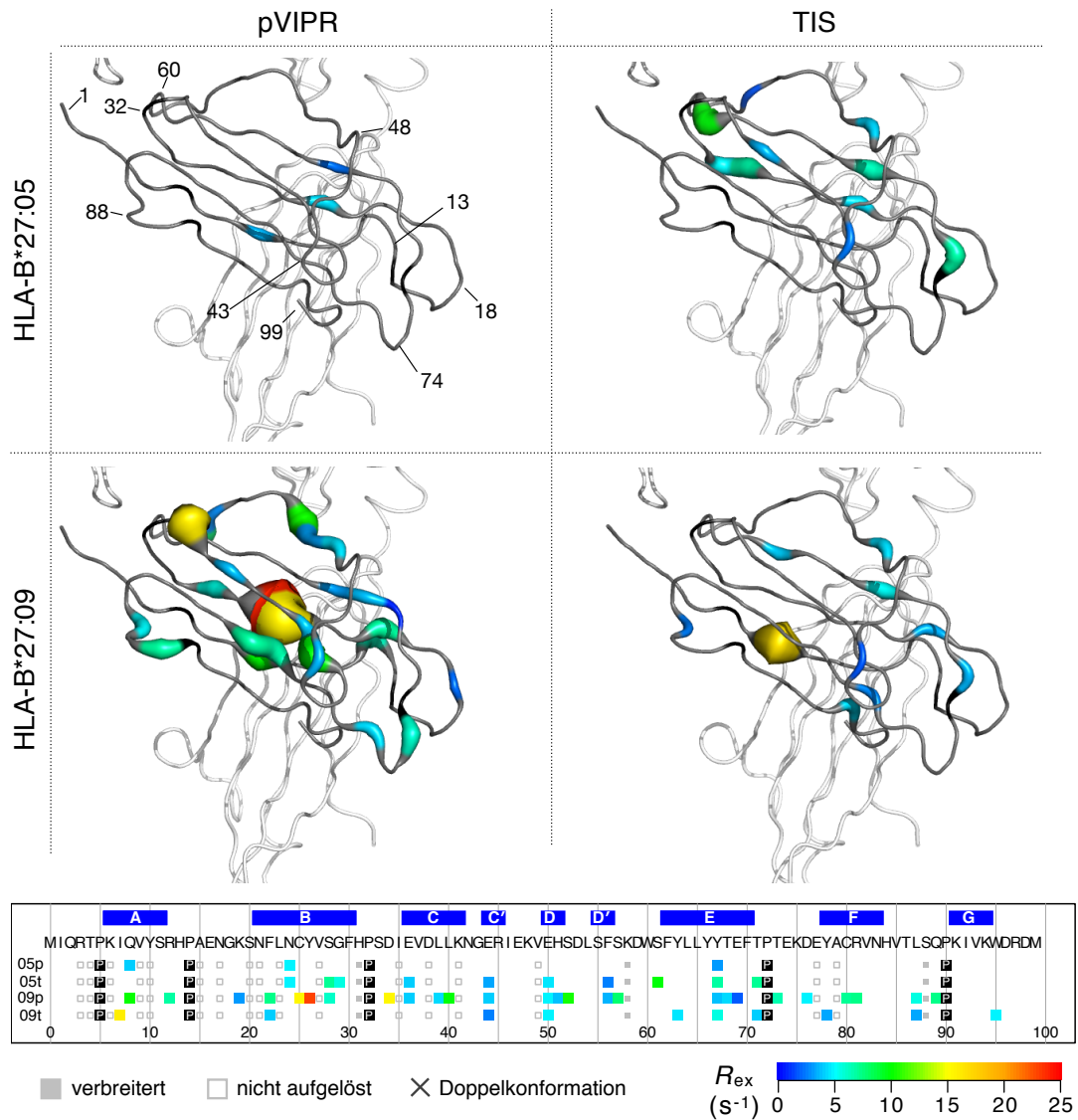


Abb. 3.30: Die R_{ex} -Werte der *model-free*-Analyse farbig kodiert, zusammen mit der Struktur des β_2m . Darstellung wie in Abbildung 3.28. Im Hintergrund ist die α_3 -Domäne der schweren Kette zu sehen.

3.5 Vergleich der freien β_2 -Mikroglobuline aus dem Menschen und dem Huhn

Es sollte die Dynamik von humanem β_2 m mit der Dynamik von β_2 m aus dem Haushuhn verglichen werden. Dafür wurden beide Proteine heterolog in *inclusion bodies* exprimiert, per *rapid dilution* zurückgefaltet und mit Hilfe von Gelpermeationschromatographie gereinigt.

Für die Zuordnung der Signale diente eine $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markierte Probe mit einer Konzentration von 1,4 mM in einem 10 mM Phosphatpuffer (pH=7,5; mit 150 mM NaCl; 10% D_2O). Anschließend mussten die Signale des Hühner- β_2 m zugeordnet werden. Die klassische Relaxationsanalyse erfolgte mit dem Programm *relax*. Die chemischen Verschiebungen des humanem β_2 m wurden der BMRB-ID 19099 entnommen.

3.5.1 Zuordnung der Peptidrückgrat-Signale von β_2 -Mikroglobulin aus dem Huhn

Wie auch schon die HLA-Proteine, wurde das Peptidrückgrat des β_2 m aus dem Haushuhn (*Gallus gallus*) mit Hilfe der folgenden Spektren zugeordnet. Das ^1H - ^{15}N -Korrelationspektrum (HSQC) in Abbildung 3.31 bildete die Basis, auf dem die Tripelresonanzspekten aufbauten. Ein ^1H - ^{15}N -HSQC findet sich in Abbildung 3.31. Es wurden die Spektrenpaare HN-CA/HNC(CO)CA, HNCACB/HN(CO)CACB und HN(CA)CO/HNCO aufgenommen, über die die Resonanzen der Spins H, N, C_α , C_β und C_O zugeordnet wurden.

Tab. 3.13: Übersicht über die Zahl der erwarteten und theoretisch sichtbaren HN-Signale, die zugeordneten HN-Signale und die Art der zugeordneten Resonanzen von aviärem und humanem β_2 m. Die Prozentzahl der zugeordneten Signale in Spalte 3 bezieht sich auf die Gesamtzahl der erwarteten HN-Signale.

β_2 m	erwartete HN	zugeordnete HN	freie HN	sonstige Resonanzen
aviär	90	63 (70%)	19	NH, N, C_α , C_β , C_O
human	93	75 (81%)	6	NH, N, C_α , C_β , C_O

Wie aus Abbildung 3.32 erkennbar, konnten in beiden Proteinen der BC-Loop und Teile des FG-Loops nicht zugeordnet werden. In beiden Proteinen waren große Teile des D- und E-Strangs, sowie des verbindenden DE-Loops nicht zuzuordnen. Wie aus Tabelle 3.13 hervorgeht, konnten im Vergleich zum humanen β_2 m deutlich weniger Resonanzen zugeordnet werden. Es ergaben sich zusätzliche Lücken im AB-Loop, CD-Loop und EF-Loop.

Zusätzlich war die Zahl der zwar im Spektrum vorhandenen, aber nicht zuzuordnenden Signale des Hühner- β_2 m mit 19 vergleichsweise hoch (siehe Tabelle 3.13). Addiert man dazu die 63 zugeordneten Signale, ergibt sich eine Gesamtzahl von 82 der 90 möglichen Amid-

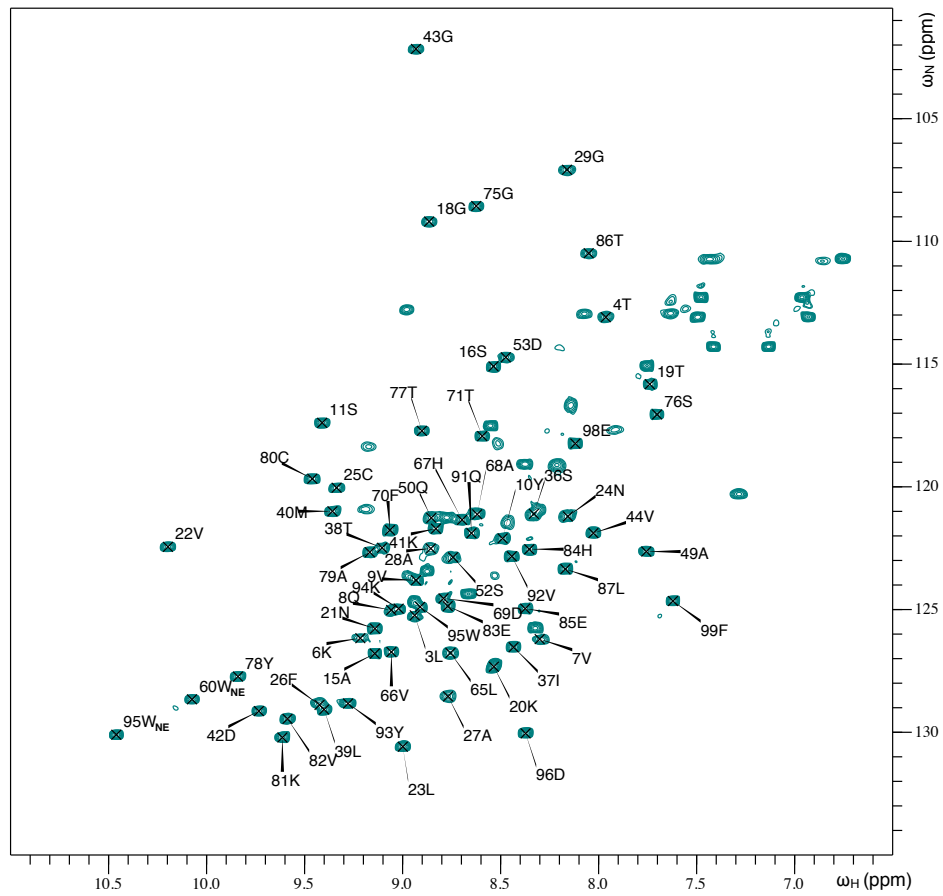


Abb. 3.31: ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum (HSQC) des $\beta_2\text{m}$ aus dem Huhn.

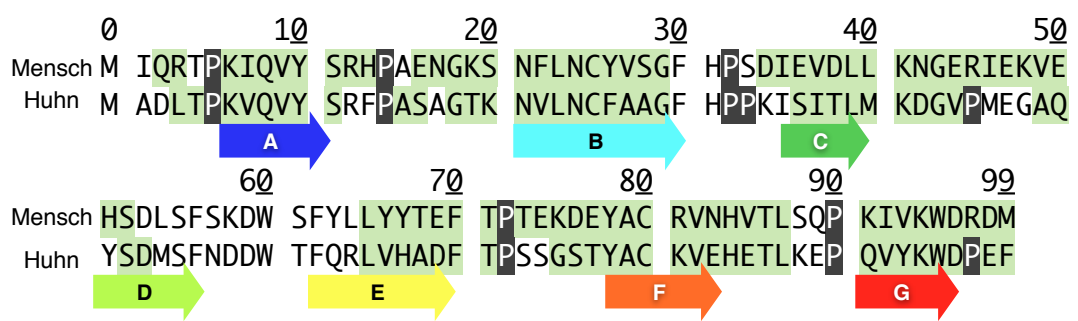


Abb. 3.32: Vergleich der Zuordnung des $\beta_2\text{m}$ aus Huhn und Mensch. Zugeordnete Reste sind grün hinterlegt. Nicht zugeordnete Reste sind nicht hinterlegt. Proline sind grau hinterlegt. Die Darstellung der β -Stränge ist farblich an Abbildung 1.2 angelehnt. Das humane $\beta_2\text{m}$ wurde von Monika Beerbaum zugeordnet.

signale, die im Spektrum sichtbar sind, aber wegen fehlender Kohlenstoffresonanzen nicht zugeordnet werden. Beim humanen β_2m konnten nur 6 Signale im HSQC des humanen β_2m nicht zugeordnet werden.

3.5.2 Relaxationsanalyse der freien β_2 -Mikroglobuline

Von freiem β_2m aus Mensch und dem Haushuhn wurden R_1 , R_2 , Hetero-NOE bei den zwei Feldstärken 600 MHz und 750 MHz bestimmt. Die Aufnahme der Relaxationsdaten erfolgte an Proben mit 430 μ M und bei 310 K in 10 mM Phosphatpuffer (pH=7,5) mit 150 mM NaCl, unter den selben Bedingungen wie die HLA-Komplexe (siehe Kapitel 3.4.3).

Es wurden HSQC-basierte Pulssequenzen (siehe Kapitel 3.3.1) und Delay-Zeiten für „kleine Proteine“ (siehe Tabelle 3.2) verwendet. Die Wartezeiten zwischen den Experimenten lag bei 2,5 s (R_1 -Experimente), 1,3 s (R_2 -Experimente), 2 s (Hetero-NOE-Experiment, Sättigung) und 6 s (Hetero-NOE-Experiment, Referenz).

Diese Relaxationsdaten der beiden Proteine sind in den Abbildungen 3.33 und 3.34 vergleichend dargestellt. Einzeln finden sich diese Diagramme im Anhang. Überlappende Signale wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Da von dem β_2m aus dem Huhn nicht alle Signale des HSQCs zugeordnet werden konnten, sind mehr Werte für das humane β_2m vorhanden.

Das Relaxationsverhalten der beiden Proteine war sehr ähnlich. Besonders in den Bereichen 0-11 und 65-86 zeigten sie ein fast identisches Relaxationsverhalten. Stark verminderte Relaxationswerte waren in der Region 45-50 (CD-Loop) des humanen Proteins erkennbar. Im Hühner- β_2m konnten für diesen Bereich keine Daten erhoben werden.

3.5.3 Konsistenz der Relaxationsdaten der freien β_2 -Mikroglobuline

Die Konsistenz der Relaxationsdaten der freien Mikroglobuline wurde wie schon in Kapitel 3.4.4 beschrieben, mittels reduziertem Spektraldichtemapping bei Nullfrequenz überprüft.

Die Konsistenz der Daten war hoch, wie aus den Diagrammen in Abbildung 3.35 erkennbar ist. Im Histogramm ist erkennbar, dass die $J(0)$ -Werte nur wenig von 1 abweichen. Die Standardabweichung ist bei dem β_2m aus dem Menschen höher ($1,066 \pm 0,146$) als bei β_2m aus dem Huhn ($0,971 \pm 0,054$). Bei dem β_2m aus dem Huhn war eine systematische Abweichung bei den höheren $J(0)$ -Werten zu erkennen, die nicht entlang der diagonalen Linie lagen.

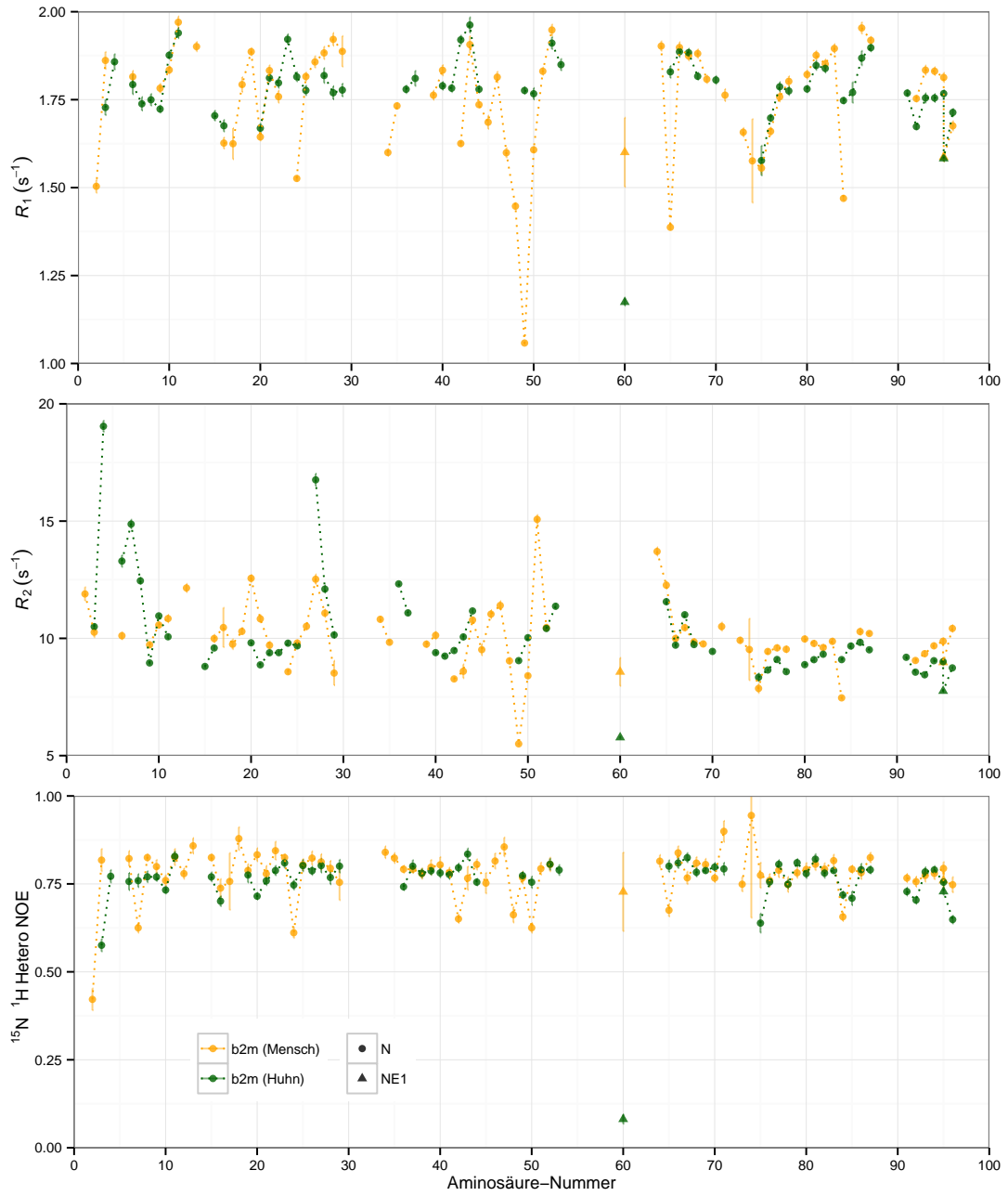


Abb. 3.33: Sequentielle Auftragung der Relaxationsraten (R_1, R_2) und des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE des $\beta_2\text{m}$ aus Mensch und Huhn bei 600 MHz.

3.5 Vergleich der freien β_2 -Mikroglobuline aus dem Menschen und dem Huhn

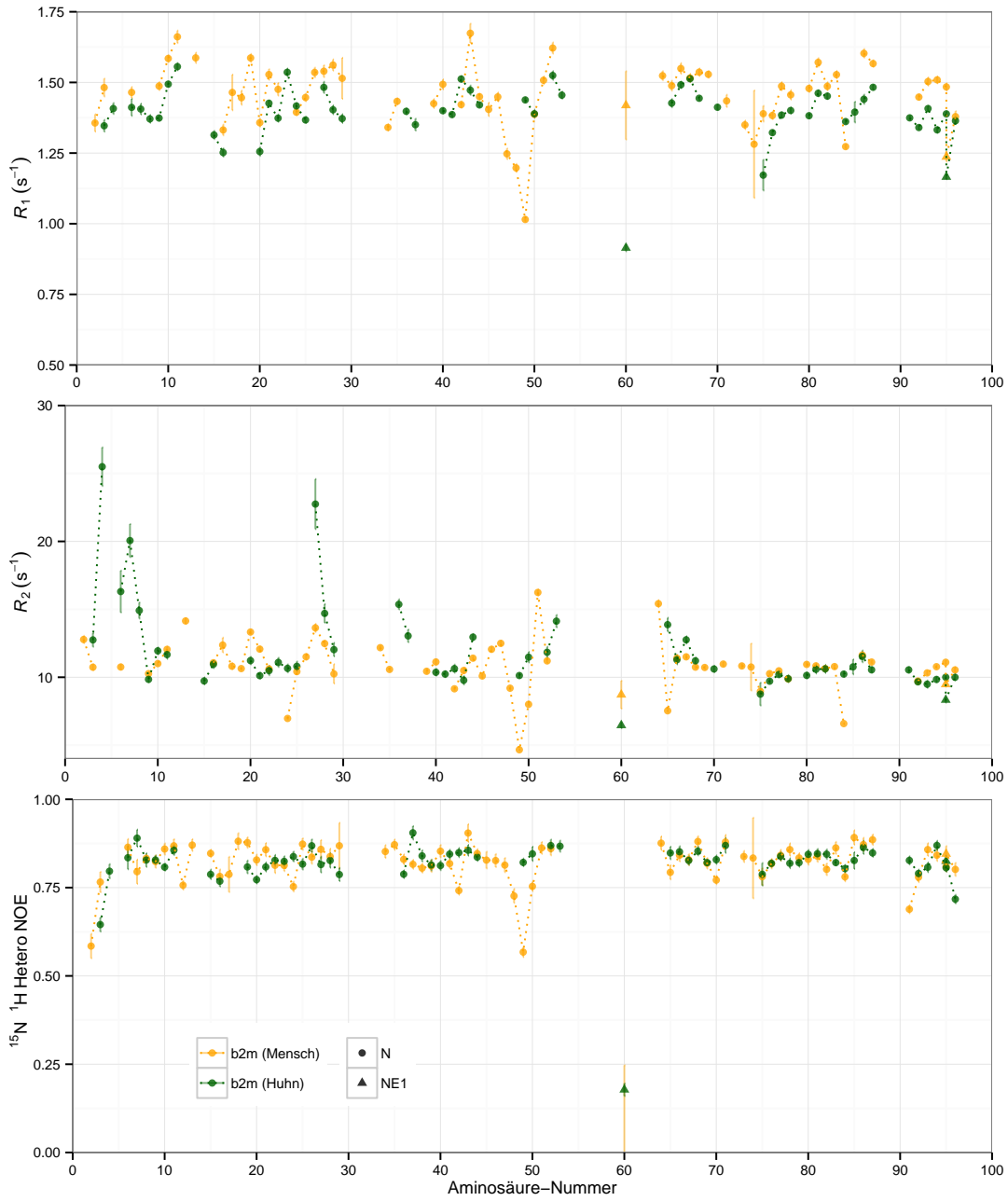


Abb. 3.34: Sequentielle Auftragung der Relaxationsraten (R_1, R_2) und des $\{^1H\}$ - ^{15}N heteronuklearen *steady-state* NOE des β_2m aus Mensch und Huhn bei 750 MHz.

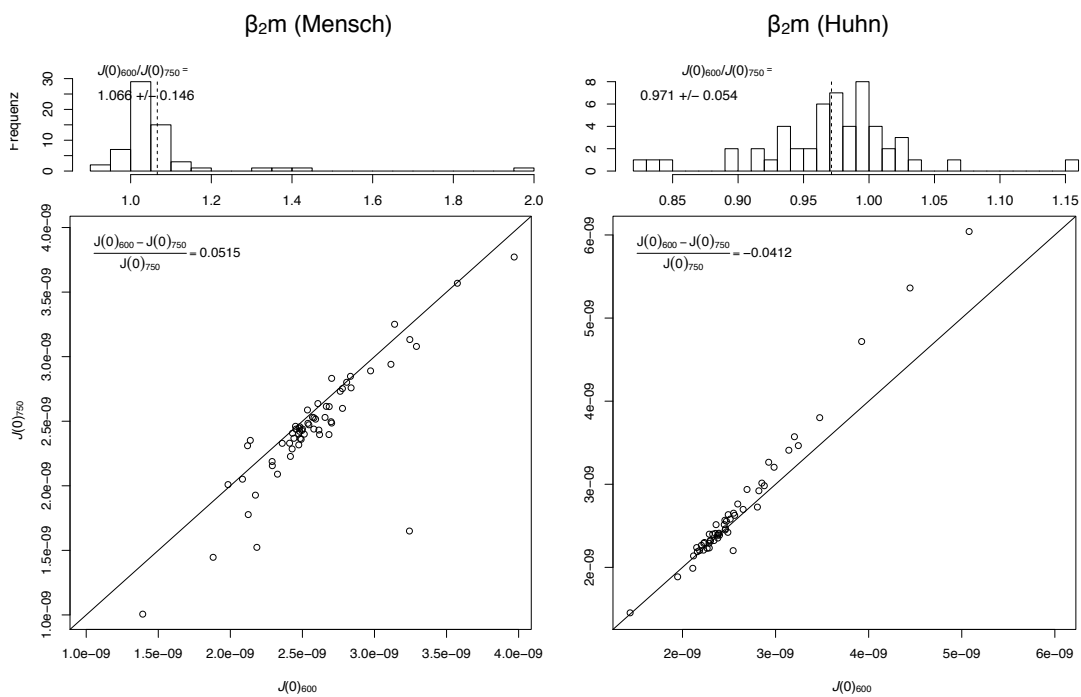


Abb. 3.35: Sammelgrafik der Konsistenztests auf Basis der in den Abbildungen 3.33 und 3.33 ab Seite 98 dargestellten Relaxationsdaten des freien β_{2m} aus Mensch und Huhn, aufgenommen bei den Feldstärken 600 MHz und 750 MHz. Darstellung wie in Abbildung 3.21.

3.5.4 Model-free-Analyse der freien β_2 -Mikroglobuline

Die *model-free*-Analyse wurde mit `relax` und nach dem mitgelieferten D'AUVERGNE-Protokoll durchgeführt. Wie für die HLA-Komplexe in Kapitel 3.4.6 ausgeführt, werden dazu zuerst lokale Modelle optimiert, daraus die Parameter für ein globales Modell abgeschätzt und iterativ lokale und globale *model-free*-Parameter optimiert. Die Parameter der *model-free*-Modelle sind in Abbildung 3.36 wiedergegeben. Die Betrachtung der globalen Diffusionsmodelle folgt im folgenden Abschnitt.

Diffusionsmodelle

Die Parameter der Diffusionsmodelle sind in Tabelle 3.14 angegeben. Eine visuelle Repräsentation zusammen mit den Strukturen findet sich in Abbildung 3.37.

Tab. 3.14: Parameter der prolaten Tensoren der freien β_2 -Mikroglobuline.

β_2m	τ_m	D_{iso}	D_a	$D_{ }$	D_{\perp}	$D_{ }/D_{\perp}$	θ	ϕ
-	10^{-9} s	$10^7/s$	$10^7/s$	$10^7/s$	$10^7/s$	-	-	-
Mensch	6,69	2,49	2,04	3,85	1,81	2,12	2,01	2,83
Huhn	6,90	2,42	2,21	3,89	1,68	2,31	3,49	2,97

Das Diffusionsverhalten von β_2m aus Mensch und Huhn erschien mit Korrelationszeiten von 6,7-6,9 ns sehr ähnlich. Auch die Geometrie der beiden prolaten Tensoren erschien mit einem annähernd gleichen D_{iso} von 2,42-2,49 ähnlich. Der Tensor des humanen β_2m erschien allerdings gedrungener, was sich in den unterschiedlichen D_a -Werten widerspiegelte. Die Orientierung der Tensoren war unterschiedlich. Folgte der Diffusionstensor im Hühner- β_2m noch der Form des Proteins, war dies in dem humanen Protein nicht der Fall. Die Orientierung der Hauptachsen der beiden Tensoren unterschied sich deutlich voneinander.

Sub-Nanosekunden-Dynamik

Die *order parameter* S^2 aus der *model-free*-Analyse sind in Abbildung 3.38 grafisch wiedergegeben und auf die Strukturen der Proteine gemappt.

Gemeinsamkeiten. In beiden Proteine konnte für die meisten Aminosäuren ein S^2 -Parameter bestimmt werden. Erniedrigte S^2 -Werte fanden sich in den Loop-Regionen: Die AB- und EF-

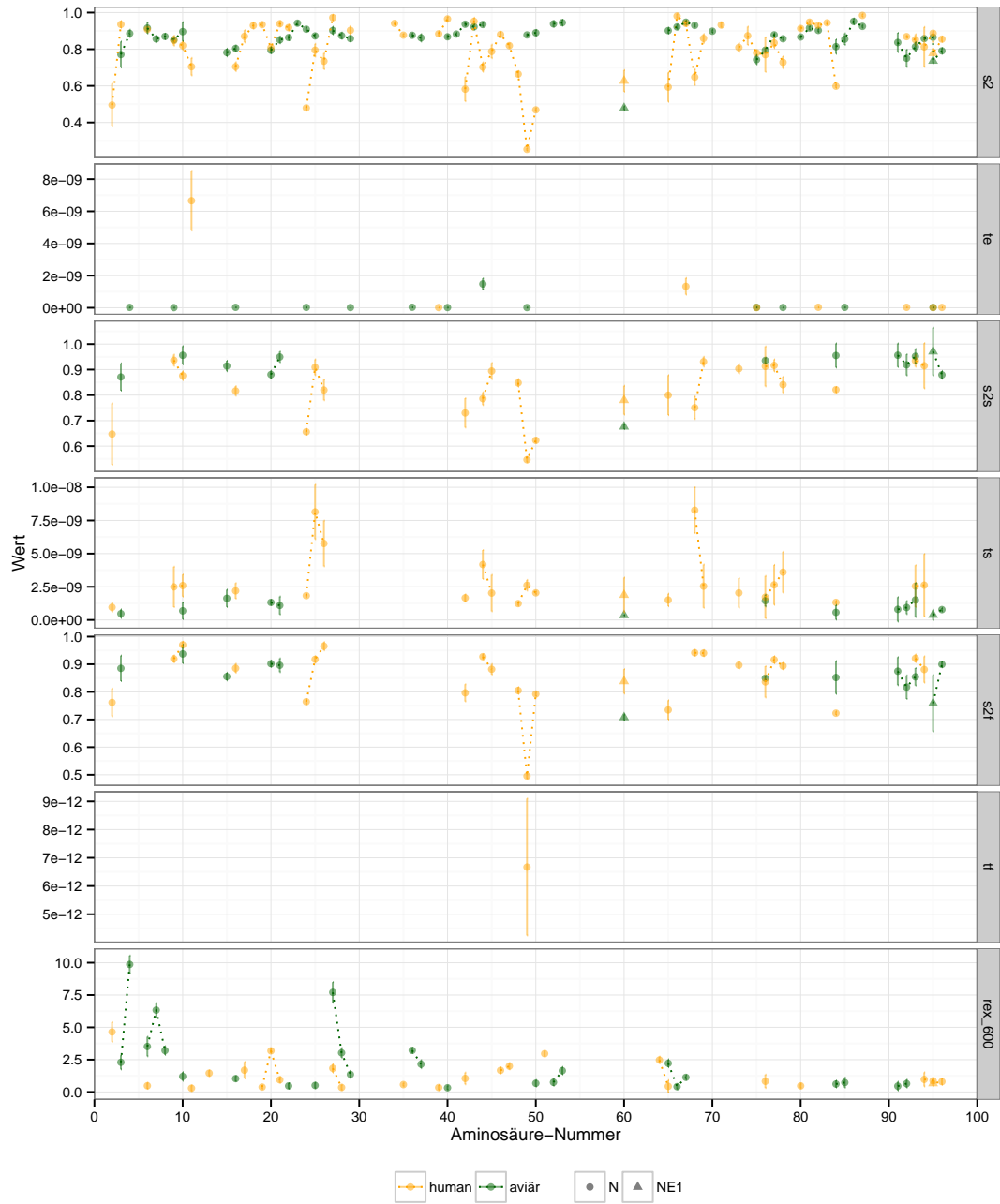


Abb. 3.36: Model-free-Parameter S^2 , τ_e , S^2_s , τ_s , S^2_f , τ_f und R_{ex} aus der model-free-Analyse der ^{15}N -Relaxation von humanem $\beta_2\text{m}$ (orange) und Hühner- $\beta_2\text{m}$ (grün).

3.5 Vergleich der freien β_2 -Mikroglobuline aus dem Menschen und dem Huhn

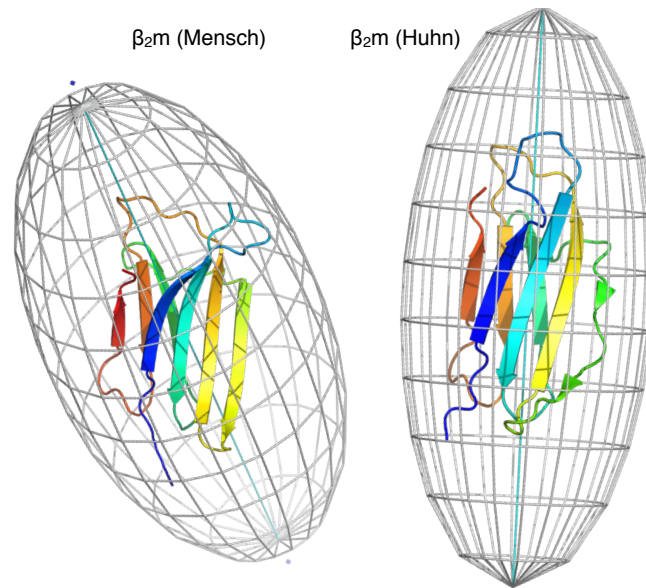


Abb. 3.37: Grafische Repräsentation der Diffusionstensoren aus der *model-free*-Analyse von humanem β_2 m (links) und Hühner- β_2 m (rechts) zusammen mit deren Strukturen (PDB-IDs: 1lds, 3o81). Die Strukturen besitzen die gleiche Orientierung. Farbgebung wie in Abb. 1.2.

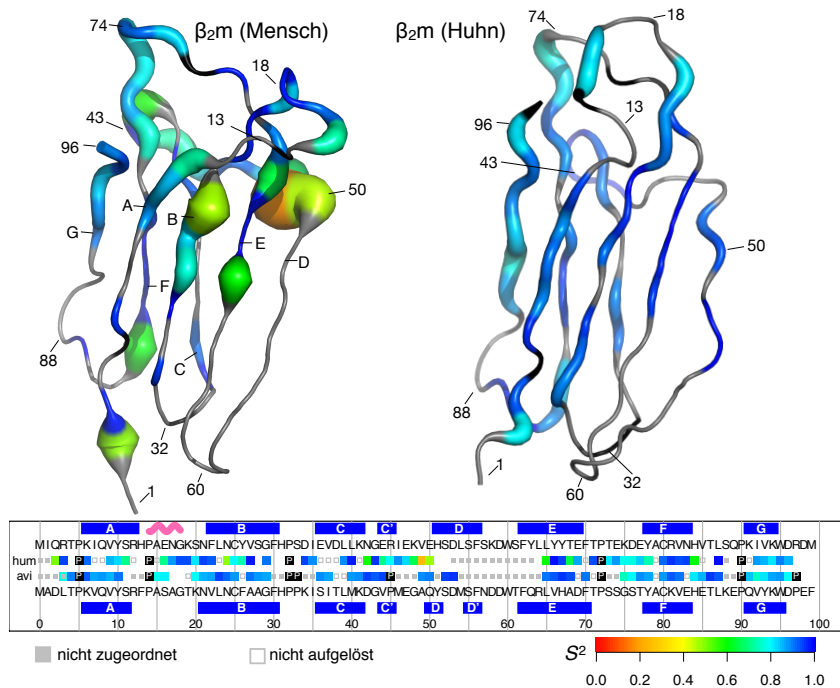


Abb. 3.38: S^2 -Werte aus der *model-free*-Analyse von humanem β_2 m (links) und Hühner- β_2 m (rechts, „aviär“) auf die Strukturen gemappt.

Loops sanken die Werte auf etwa 0,8. Am N-Terminus zeigten die Werte der Aminosäuren 2 (humanes β_2m) und 3 (aviäres β_2m) erniedrigte S^2 -Werte.

Unterschiede. Für das humane β_2m wurden deutlich mehr *model-free*-Parameter wie S_s^2, S_f^2 und R_{ex} bestimmt (Abbildung 3.36). Es fanden sich vereinzelt deutlich erniedrigte S^2 -Werte (Aminosäuren 2, 11, 16, 42, 65, 69, 79). Das war in dem β_2m aus dem Huhn nicht der Fall, es erscheint wesentlich rigider. Besonders auffällig zeigte sich das in den benachbarten B- und E-Strängen, die im humanen Protein weit mobiler erschien, als im aviären Gegenstück. Wie auch das humane Protein zeigte das Hühner- β_2m im G-Strang erniedrigte S^2 -Werte von etwa 0,8. Im Vergleich zu den restlichen Werten des selben Proteins erschienen diese Werte im humanen β_2m eher hoch, im aviären β_2m eher niedrig.

Charakteristisch herausstechend waren im humanen β_2m neben den genannten Werten B- und E-Strängen die erniedrigten *order parameter* um die Aminosäuren 47-50, wo im Hühner- β_2m diese Werte fehlten. Im Hühner- β_2m waren dagegen nur die S^2 -Werte des G-Strangs und der AB- und EF-Loops deutlich erniedrigt.

Austauschraten R_{ex}

Die Austauschraten R_{ex} , skaliert auf 600 MHz, sind in Abbildung 3.39 auf den Strukturen der β_2m -Proteine dargestellt. In beiden Proteinen fanden sich sehr niedrige Austauschraten, die über die gesamte Struktur verteilt waren. Für das humane β_2m konnten kaum R_{ex} bestimmt werden, die deutlich von 0 abwichen. Einzig die Aminosäuren 3, 20 und 51 hatten R_{ex} -Werte über $2,5 s^{-1}$. Im Hühner- β_2m dagegen finden sich signifikante R_{ex} -Werte zwischen $5-10 s^{-1}$ in den benachbarten A- und B-Strängen.

3.5 Vergleich der freien β_2 -Mikroglobuline aus dem Menschen und dem Huhn

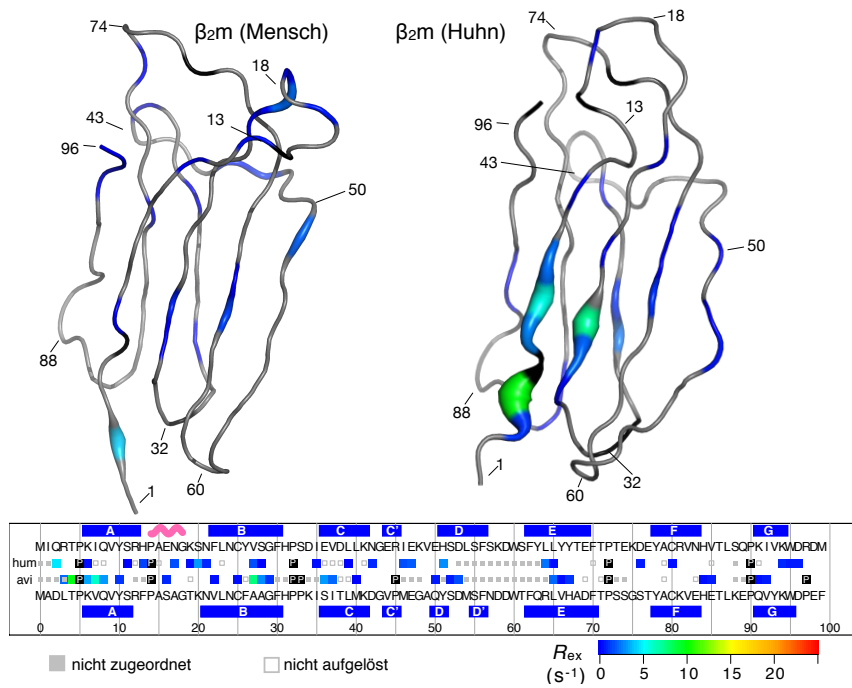


Abb. 3.39: R_{ex} -Werte aus der *model-free*-Analyse von humanem β_2m (links) und Hühner- β_2m (rechts) farbig auf die Strukturen gemappt.

4 Diskussion

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der strukturellen Dynamik von HLA-B*27:05/:09 im Komplex mit den Peptiden pVIPR und TIS. Dafür diente die Betrachtung von Linienformen (intermediäre bis langsamer Austausch), als auch die *model-free*-Analyse (Sub-Nanosekunden-Zeitskala). Die schweren Ketten, die kleine Untereinheit β -2-Mikroglobulin und das TIS-Peptid wurden analysiert. Im Folgenden sollen die Ergebnisse zusammenfassend diskutiert und kontextualisiert werden. Im Anschluss erfolgt die Diskussion der Ergebnisse aus der Analyse der freien β -2-Mikroglobuline aus Mensch und Haushuhn.

4.1 Die Proteinstruktur der HLA-Komplexe ist sehr ähnlich und doch unterschiedlich

Die chemischen Verschiebungen und die relativen Signalintensitäten aus den TROSY-Spektren der HLA-Komplexe bestätigten, was schon die röntgenkristallographischen Untersuchungen suggerierten: Die Struktur der vier Proteinkomplexe ist auch in Lösung im Allgemeinen ähnlich.

So lagen die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$) meistens unter 0,2 ppm und waren auf die Bindefurche beschränkt (Abbildungen 3.10, Abbildung 2 im Anhang). Die Verschiebungen der α 3-Domänen waren praktisch identisch in allen Komplexen. Aus früheren Studien an HLA-B*27 ist bekannt, dass auch die Mehrzahl der Reste von β_2m kaum von Subtyp und gebundenem Peptid beeinflusst wird [101].

Auch die relativen Signalintensitäten (Abbildung 3.11) reflektieren die Gemeinsamkeiten aller vier Komplexe: die Signale der α 1- α 2-Domäne und insbesondere der helikalen Bereiche besaßen vergleichsweise niedrige Intensität, haben folglich wahrscheinlich eine andere Dynamik auf der intermediären Zeitskala. Die α 3-Domäne erzeugte in allen Komplexen starke Signale, die weniger intensiv waren als die der sehr mobilen Termini, und kann damit wahrscheinlich als wohlgefaltete und strukturell stabile Einheit gelten.

Ein genauerer Blick auf die Unterschiede der chemischen Verschiebungen verdeutlicht jedoch die strukturelle Plastizität der Bindefurche von HLA-B*27. Es wurden peptidabhängig auch

die chemischen Verschiebungen von Resten beeinflusst, die nicht in unmittelbarem Kontakt mit dem Peptid stehen. Ein ähnliches Verhalten konnte bereits an dem Seitenketten-Amid des Trp60 vom β_2m demonstriert werden, wo Strukturänderungen des Bodens der Bindefurche von der kleinen Untereinheit wahrgenommen werden konnten [101]. Auch die Helices scheinen sich einer veränderten Ligandenkonformation strukturell anzupassen. Selbst in den beiden TIS-Komplexen sind subtypabhängige Unterschiede in der α 1-Helix (Reste 72, 76, 80) detektierbar, die wohl geringfügige strukturelle Unterschiede widerspiegeln. Die relativ geringen Unterschiede der chemischen Verschiebungen der beiden TIS-Komplexe ($\Delta\delta < 0,1$ ppm) suggerieren eine wenig veränderte Konformation von Peptid und Bindefurche. Die viel stärker ausgeprägten Unterschiede in den pVIPR-Komplexen lassen auf eine unterschiedliche Konformation des Peptids schließen, die eine veränderte Konformation größerer Anteile der Bindefurche nach sich zieht.

Wie in den folgenden Abschnitten ausgeführt, konnte die detaillierte Analyse der Dynamik weitere, individuelle Unterschiede zwischen den HLA-Komplexen aufdecken.

4.2 Die Dynamik der α 1- α 2-Domäne ist Liganden- und Subtyp-abhängig

Die Bindefurchen von MHC-Komplexen müssen eine hohe intrinsische strukturelle Plastizität besitzen. Zum einen müssen sie viele verschiedene Peptide mit teilweise stark unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften beherbergen. Zum anderen müssen während der Beladung Peptide an den Komplex binden und wieder dissoziieren können, da nur so verschiedene Peptide auf ihre Bindungsfähigkeit getestet werden können, um einen stabilen ternären Komplex zu bilden. Auf diese Weise kann trotz einer degenerierten Peptidspezifität eine hochaffine Bindung gewährleistet werden.

Die α 1- α 2-Domäne von B*27:05 und B*27:09 zeigte in allen Komplexen ein starkes Ausmaß struktureller Dynamik, mit Unterschieden in Umfang und betroffenen Zeitskalen, die von Subtyp und Ligand abhängig waren. Die Befunde aus den Linienformbetrachtungen (Kapitel 3.4.1) und der Relaxations- und *model-free*-Analyse bestätigten gemeinsam, dass die Helices der Bindefurche eine hochvariable und individuelle Dynamik besaßen.

In den MD-Simulationen von NARZI [49], NURZIA [54] und ABUALROUS [48], sowie den infrarotspektroskopischen Messungen von Fabian [51,52] deutete sich an, was mit der vorliegenden Arbeit mit atomarer Auflösung und im Detail experimentell bestimmt werden konnte: Die helikalen Bereiche und insbesondere die α 1-Helix zeigt tatsächlich subtypabhängig ein unterschiedliches dynamisches Verhalten. Darüber hinaus ist auch die α 2-Helix dynamischer als der Rest des Proteins, das Ausmaß und die Zeitskala der Dynamik ist aber individuell

abhängig von Subtyp und Peptid. In allen Komplexen zeigten die α 1-3 und α 1-4-Stränge des β -Faltblatts erhöhte Dynamik.

Global betrachtet lassen sich bis auf die Dynamik der α 1-Helix wenige Subtyp- oder Peptid-abhängige Korrelationen sicher feststellen. Das Diffusionsverhalten der Komplexe ähnelt sich weitgehend, bis auf B*27:09/TIS, das in dieser Hinsicht eine Ausnahme darstellt. Um nicht die Einzelbeschreibung aus dem Ergebnisteil zu wiederholen, sollen im Folgenden die herausragenden Charakteristika der Komplexe erläutert und verglichen werden.

B*27:05-Komplexe vs. B*27:09-Komplexe. Im Gegensatz zu B*27:05 zeigen die B*27:09-Komplexe keinen Signalverlust und keine erhöhten R_{ex} -Werte an der α 1-Domäne, dafür aber signifikant erhöhte S^2 -Werte und langsamen Austausch. Auch ist in beiden Komplexen der α 2-4-Strang sehr viel dynamischer als in den beiden B*27:05-Komplexen (S^2). Damit bestätigen sich die Ergebnisse aus der MD-Simulation von NARZI [49], der innerhalb eines 20 ns-Zeitfensters eine im Vergleich zu B*27:05 stark erhöhte Entropie der restlichen Bindefurche (ausgenommen die α 1-Helix) von B*27:09 in Komplex mit TIS und pVIPR feststellte. Die Rotationsdiffusion der α 1- α 2-Domäne unterscheidet sich in B*27:05/pVIPR, B*27:05/TIS und B*27:09/pVIPR kaum voneinander. B*27:09/TIS besitzt dagegen einen Diffusionstensor, der sich stark von den anderen Komplexen unterscheidet.

B*27:05, peptidabhängige Eigenschaften. In B*27:05/pVIPR zeigt sich peptidabhängig eine Veränderung der Dynamik des C-terminalen Teils der α 2-Helix (S^2 und R_{ex}) und eine Verringerung der Signalverbreiterung am α 1-4-Strang. Im TIS-Komplex tritt dagegen R_{ex} -Austausch im α 2-1-Strang auf. Peptidabhängig scheint sich also im Komplex mit pVIPR das β -Faltblatt zu stabilisieren, der C-terminale Teil der α 2-Helix jedoch dynamischer zu werden.

B*27:09, peptidabhängige Eigenschaften. In B*27:09 variiert die strukturelle Dynamik vor allem entlang der α 2-Helix: im Komplex mit pVIPR ist vor allem der N-terminale Teil dynamischer (S^2 und R_{ex}), im Komplex mit TIS gilt dies vor allem für den C-terminalen Teil. Der TIS-Komplex zeigt langsamen Austausch über weite Teile der gesamten α 1- α 2-Domäne, so auch beide Helices und den α 2-1-Strang. Auch das Diffusionsverhalten scheint sich zu ändern, da der Diffusionstensor von B*27:09/TIS eine Geometrie besitzt, die sich von dem pVIPR-Komplex stark unterscheidet.

pVIPR-Komplexe, subtypabhängige Unterschiede. Ausgehend von den verschiedenen Bindungsmodi des pVIPR in den Kristallstrukturen der beiden Subtypen, sind große Unterschiede

de in der Dynamik des MHC-Komplexes plausibel. Auch in den eingangs erwähnten Arbeiten wurden subtypabhängige Unterschiede festgestellt. Hier konnten diese Befunde bestätigt werden. Die α 1-Helix zeigt in B*27:09 weniger intermediären Austausch als B*27:05. Subnanosekundendynamik (S^2) und Austausch (R_{ex}) verlagert sich in B*27:09 vom C-Terminus auf den N-Terminus der α 2-Helix. Ebenso konnte die Erhöhung der Mobilität in den Loops zwischen der α 1-Helix und dem α 2-1-Strang bestätigt werden. Es konnte jedoch nur das Dynamikprofil der nicht-kanonischen pVIPR-Konformation reproduziert werden, nicht das der in den Kristallstruktur ebenfalls sichtbaren kanonischen Konformation. Eine Überlagerung der beiden Zustände, etwa bei Vorliegen zweier konformationeller Spezies, wäre allerdings mit den gegebenen Mitteln nicht detektierbar. Es ist auch denkbar, dass die alternative Orientierung des Peptids nur bei bestimmten Bedingungen, etwa im Komplex mit anderen Molekülen, vorliegt.

TIS-Komplexe, subtypabhängige Unterschiede. Die größte Überraschung waren die großen subtypabhängigen Unterschiede zwischen den beiden TIS-Komplexen. Erwartet wurden eher geringe Unterschiede, da sich die Kristallstrukturen so wenig unterschieden. NARZI [49] schlug aufgrund seiner MD-Simulationen sogar vor, TIS-Komplexe als Standard zu nutzen, da sich deren Dynamik sich nicht signifikant subtypabhängig unterscheiden. Die experimentellen Daten zeichneten ein ganz anderes Bild: Im Vergleich zu B*27:05 nahm die intermediäre Dynamik im α 1-1-Strang und in der α 1-Helix zwar ab, dafür nahm der langsame Austausch an beiden Helices, vor allem aber der α 2-Helix und am α 2-1-Strang massiv zu. Außerdem trat in B*27:09 am C-Terminus der α 2-Helix verstärkt R_{ex} -Austausch und S^2 -Subnanosekundendynamik auf. Diese Dynamik konnte NARZI nicht per MD-Simulationen detektieren.

Alternativerklärung für das außergewöhnliche Verhalten von B*27:09/TIS. Eine Dissoziation des Peptids aus der Bindefurche könnte die Doppelkonformationen und das abweichende Diffusionsverhalten des B*27:09/TIS-Komplexes erklären. Mit anderen Worten, die verdoppelten Signalsätze könnten von völlig unterschiedlichen B*27:09-Spezies stammen: zum einen Komplexe mit fest gebundenem Peptid und zum anderen von Komplexen mit ganz oder teilweise dissoziiertem Peptid. Da B*27:09 im Gegensatz zu B*27:05 ohne Peptid β_2 m binden und die Zelloberfläche erreichen kann [48], ist das denkbar.

Aus mehreren Gründen gibt diese Einschätzung wahrscheinlich nicht die Realität wider. Diese Interpretation würde allen anderen Befunden widersprechen, die dem TIS-Komplex eine hohe Stabilität prognostizierten (siehe Tabelle 1.1, insbesondere [55]). Des Weiteren war das Auftreten der Doppelkonformationen an verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit unabhängig hergestellten Proben zu beobachten (etwa an ^2H - ^{13}C - ^{15}N -markierten Proben für die Zuord-

nung, oder ^2H - ^{15}N -markierten Proben für die Relaxationsmessungen). Ebenso treten auch an B*27:05 ähnliche Doppelkonformationen auf, wenn auch in deutlich geringerem Umfang (Abbildung 3.9). Bei B*27:05 ist laut [48] nahezu ausgeschlossen, dass es in peptidfreier Form stabil ist: die Austauschphänomene sind damit auch an peptidkomplexierten MHC-Molekülen nachgewiesen.

Das Vorliegen eines peptidfreien B*27:09/TIS, das zu einem zweiten Signalsatz führt, ist damit nicht ausgeschlossen, aber sehr unwahrscheinlich. In zukünftigen Untersuchungen sollten die Relaxationsmessungen an weiteren unabhängig produzierten B*27:09/TIS-Komplexen wiederholt, die Präparation von peptidfreien B*27:09-Komplexen versucht und NMR-Spektren an Proben mit TIS-Peptid im stöchiometrischen Überschuss im Puffer aufgenommen werden. Ebenso sollte versucht werden, die Austauschrate zwischen den beiden Konformationen zu bestimmen.

4.3 Die α 3-Domäne kann sich vom Rest des Komplexes lösen und wird dynamisch unabhängig

Die α 3-Domäne erschien wohlgefaltet und in ihrer internen Dynamik vergleichsweise unauffällig, wenn man typische Fehlerquellen der *model-free*-Analyse berücksichtigte. In starkem Kontrast zur α 1- α 2-Domäne konnten fast alle Signale der α 3-Domäne zugeordnet werden. Nur die Signale des Loops 223-226, der die primäre Bindestelle für Tapasin und CD8 darstellt, war nicht sichtbar. Die Signale der Aminosäuren in Sekundärstrukturelementen waren nicht austauschverbreitert und es traten keine doppelten Signalsätze auf, die auf einen langsamen Austausch schließen ließen.

In der Region von Rest 235-240 (Strang α 3-4), die die primäre Interaktionsfläche für $\beta_2\text{m}$ darstellt, trat allerdings Austauschverbreiterung auf, sodass die Signale im HN-TROSY deutlich schwächer waren als in der restlichen Struktur. Der Strang 4 und der anschließende Loop ist homolog zu dem strukturell plastischen D-Strang/DE-Loop von $\beta_2\text{m}$, dessen Signale in freier Lösung ebenfalls austauschverbreitert sind. Die α 3-Domäne ist also möglicherweise plastisch an das $\beta_2\text{m}$ angebunden und kann sich selbst im Komplex bewegen, was zu Austauschverbreiterung am Bindungs-Interface führt.

In B*27:09/TIS erzeugt diese Region schwächere Signale, als die anderen Komplexe – möglicherweise ist die Bindung in diesem speziellen Fall weniger fest. Die Relaxations- und *model-free*-Analyse impliziert, dass sich die α 3-Domäne vom Restkomplex lösen kann und unabhängig diffundiert. Die α 3-Domäne des Komplexes relaxierte anders, als die α 1- α 2-Domäne. Feldunabhängig war die R_1 -Rate erhöht und die R_2 -Rate vermindert, was dem Verhalten ei-

nes kleineren Moleküls entspricht. Die Korrelationszeit der *model-free*-Diffusionstensen der α 3-Domäne lag in diesem Komplex mit $\tau_m=16,2\text{s}^{-1}$ auch deutlich unter der Korrelationszeit der α 3-Domänen der anderen Komplexe $\bar{\tau}_m = 19,5\text{s}^{-1}$. Ein weiteres Indiz liefern die lokalen *model-free*-Modelle: die S^2 -Parameter von Strang 4 der α 3-Domäne sind erniedrigt. Dieser Strang interagiert mit der benachbarten Untereinheit $\beta_2\text{m}$. Unterbleibt diese Interaktion, ist die Beweglichkeit an dieser Stelle möglicherweise verbessert.

In den anderen Komplexen scheint dieses Verhalten weniger stark ausgeprägt zu sein: Die Korrelationszeiten der α 3-Domänen der anderen Komplexe zeigten keine so große Abweichung von der mittleren Korrelationszeit der α 1- α 2-Domänen ($20,7\text{s}^{-1}$). Allerdings weicht die Geometrie der Diffusionstensen der α 3-Domänen der anderen Komplexe in allen Fällen von der Geometrie der Diffusionstensen der α 1- α 2-Domänen ab. Auch ist die experimentell bestimmte Korrelationszeit geringer als die durch die hydrodynamischen Simulationen vorhergesagte von $23\text{-}24\text{s}^{-1}$ – ein weiteres Indiz für eine effektiv schnellere Rotationsdiffusion der Domänen.

4.4 β_2 -Mikroglobulin im Komplex ist strukturell und strukturdynamisch vergleichsweise wenig variabel

Wie in [101] bereits vorgestellt, variieren die chemischen Verschiebungen des $\beta_2\text{m}$ zwar reproduzierbar, aber in geringem Umfang. Es sind vor allem in den zur α 1- α 2-Domäne orientierten Regionen betroffen, was die strukturelle Plastizität der peptidbindenden Strukturen widerspiegelt. Langsamer Austausch, der sich in duplizierten Signalen niedergeschlagen hätte, konnte nicht detektiert werden. Extrem austauschverbreiterte Signale gab es nur in den Resten His31 und Lys58 des DE-Loops und dem nach außen orientierten Ser88 des FG-Loops.

Die dynamische Analyse der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikanten komplexabhängigen Unterschiede in den dynamischen Eigenschaften detektieren. Eine Korrelation zwischen der internen Dynamik von $\beta_2\text{m}$ im Komplex und der α 3-Domäne war nicht feststellbar. Die niedrige Qualität der Relaxationsdaten von $\beta_2\text{m}$ im B*27:09/pVIPR-Komplex erschwerte die Bewertung des Verhaltens dieses Komplexes, da einige modellierte Werte mit großen Fehlern verbunden waren.

4.5 Die Dynamik des Peptids ist subtypabhängig variabel

In dieser Arbeit wurden Komplexe mit isotope-markiertem TIS-Peptid (RRLPIFSRL) analysiert. Da die Peptidliganden und der restliche Teil Komplex in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen, sollten sie im HN-HSQC die gleiche Signalintensität erzeugen.

Die Intensität der Peptidsignale im HN-Korrelationsspektrum war deutlich geringer, als die Signale der Proteinkomponenten (HC oder β_2m), was auf ein intermediäres Austauschverhalten in der Bindefurche schließen lässt.

Überraschenderweise ist nur der C-terminale Teil IFSRL des Peptids in den HN-Korrelationsspektren sichtbar. Es sind auch deutliche Unterschiede zwischen den Subtypen erkennbar, denn im B*27:05-Komplex sind die Signale deutlich schwächer, pSer7 und pArg8 sind sogar überhaupt nicht mehr zu sehen. Diese Spektren sind an einer einzigen Probe entstanden, reproduzieren aber NMR-Experimente, die an selektiv (Arg/Phe)-markierten Peptiden durchgeführt wurden, aber nicht im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurden. Es existieren also tatsächlich Unterschiede im Austauschverhalten zwischen den beiden Subtypen. Das Netzwerk der Wasserstoffbrücken in der F-Tasche ist in B*27:09 dichter [55]. Es ist aber unklar, wie sich das auf die Peptiddynamik auswirkt.

Die Abwesenheit der Signale für den N-terminalen Teil des Peptids ist konsistent mit einer Dissoziation dieses Teils aus der B-Tasche der Bindefurche. In MD-Simulationen beobachtete NARZI, wie sich die Peptide pLMP2, pGR und pVIPR aus den C- oder N-terminalen Taschen der Komplexe lösten, konnte dieses Verhalten allerdings nicht bei den TIS-Komplexen detektieren [49].

In B*27:05 tauchte ein nicht identifizierbares Signal des TIS auf, das im Spektrum von B*27:09 möglicherweise an einer anderen Stelle liegt. Trotz einer Entfernung von 7 Å ist ein Einfluss der aromatischen Ringströme des His116 auf die chemische Verschiebung von pSer7 denkbar. Zusammen mit den veränderten chemischen Verschiebungen der α_1 -Helix ist aber plausibel, dass in den beiden Subtypen leicht unterschiedliche Konformationen des Komplexes vorliegen, die Teile des Peptids und der α_1 - α_2 -Domäne der schweren Kette umfassen. Eine veränderte Konformation des Peptid- und Proteinrückgrats konnte in den Kristallstrukturen [55] nicht detektiert werden.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das TIS-Peptid in der Bindefurche von B*27:05 und B*27:09 eine höhere Mobilität besitzt, als die Proteinkomponenten des Komplexes. Das ist plausibel, da der Ligand nur an den Seitenketten der Ankerresiduen fest am Protein gebunden sind. Die Konformation und Dynamik des Peptids ist subtypabhängig.

4.6 Schlussfolgerungen aus der dynamischen Analyse der HLA-Komplexe

Es findet offenbar ein dynamisches Feintuning des gesamten MHC-Komplexes statt. Die eingangs erwähnten Arbeiten wiesen dies bereits in Simulationen auf einer Zeitskala von weniger als 400 ns, bzw. experimentell und mit geringer räumlicher Auflösung nach. Die vorliegende experimentelle Arbeit erweitert den analysierten Bereich auf die Mikro- bis Millisekunden-Zeitskala. MD-Simulation und *model-free*-Analyse sind beeinflusst von Artefakten in den Röntgenkristallstrukturen, welche den Ausgangspunkt für beide Analysen bilden.

Die allosterische Kopplung von $\alpha 3$ - und $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne. Der Arbeitskreis um TIM ELLIOTT und JOERN WERNER (Southampton) konnte die Verdrehung der $\alpha 3$ -Domäne gegenüber der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne in verschiedenen MHC-Komplexen bestimmen und korrelierte sie mit der internen Dynamik der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne. MD-Simulationen mit den humanen leeren Komplexen der Subtypen HLA-B*44:02 und B*44:05, die sich nur durch einen Einzelaminosäureaustausch an Position 116 unterscheiden, zeigten subtypabhängige Verdrehungen der $\alpha 3$ -Domäne und eine höhere Mobilität der leeren Bindefurche des stabileren B*44:05 [132]. Die erhöhte Mobilität war korreliert mit einer verbesserten Selektion von hochaffinen Peptiden, die zu einem stabilen Komplex führten. Eine Fixierung des Tapasin-bindenden Loops 220-227 wirkte sich unmittelbar auf die Dynamik der Bindefurche aus. In den Hühner-MHCs BF2*15:01 und BF2*19:01 entdeckte die Gruppe einen „Proteinsektor“ aus allosterisch gekoppelten Aminosäureresten, der die $\alpha 3$ -Domäne mit der peptidbindenden $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne verbindet [133]. In Hühnern wirkt sich diese Kopplung direkt auf die Assoziation mit dem Chaperon Tapasin aus, das an der Beladung des Komplexes mit Peptidliganden beteiligt ist und auch an die $\alpha 3$ -Domäne bindet. Diese Verdrehung wurde durch die Bestimmung der *residual dipolar couplings* (restliche dipolare Kopplungen, RDC) experimentell validiert (unpublizierte Arbeiten). Wie die Analyse in der vorliegenden Arbeit demonstriert, liegt auch bei HLA-B*27:05/09 eine Subtyp- und Peptid-abhängige Variation der Dynamik der Untereinheiten vor. Die Quantifizierung der Verdrehungsbewegung wäre auch am HLA-B*27-System durch RDC-Messungen möglich.

Könnte die CD8-Interaktion die MHC-Dynamik allosterisch verändern? Ein Aspekt, den ELLIOTT *et al.* nicht betrachteten, ist die Bindung des CD8-Korezeptors an den $\alpha 3$ -Loop 220-227, der auch essentielle Bindestelle für Tapasin ist. Möglicherweise beeinflusst die Bindung des CD8-Korezeptors allosterisch die Dynamik der Bindefurche und des Peptids und damit das dynamische Feintuning der Bindung an den TCR. Eine allosterische Beeinflussung der CD8-Bindestelle durch Bindung an den TCR wurde bereits nachgewiesen [134]. Das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer scheint auch verschiedene MHCs unterschiedlich binden zu können und ver-

schiedene Konformationen des α 3-Loops zu induzieren [135]. Die vorliegende Arbeit erlaubt keine Aussage über die allosterische Beeinflussung der Bindefurche durch CD8-Bindung. Eine dynamische Analyse von CD8-titrierten Komplexen wären eine interessante Weiterführung der hier vorgestellten Analyse.

Beladungseffizienz und Tapasin-Abhängigkeit. Das Chaperon Tapasin ist im ER an der Beladung von MHC-Klasse-I-Komplexen mit hochaffinen Peptiden beteiligt, indem es die Komplexe strukturell stabilisiert und die Assoziations- und Dissoziationsrate der Peptide beschleunigt [136]. Es bindet wahrscheinlich an die F-Taschen-Region, also das Ende der Bindefurche, das die F-Tasche beherbergt [137, 138].

HLA-B*27:05 ist nur partiell, aber stärker von Tapasin abhängig, als HLA-B*27:09 und zeigt ohne Peptidliganden in der F-Taschen-Region einen hohen Grad an Flexibilität [48]. Diese Region zeigte in B*27:09-Komplexen beachtliche dynamische Variabilität, insbesondere in B*27:09/pVIPR konnte ein hoher Flexibilitätsgrad (niedrige S^2 -Werte) an der α 2-Helix beobachtet werden, in B*27:09/TIS wurde Austausch auf der intermediären bis langsamen Zeitskala an beiden Helices gbestimmt. Es ist nicht bekannt, welchen Einfluss die Mobilität der F-Taschen-Region auf die Tapasin-Abhängigkeit und die Stabilität der Komplexe hat. Die in dieser Arbeit nachgewiesene hohe Plastizität der F-Taschen-Region in B*27:09 korreliert nicht mit einer verminderten Stabilität (vgl. Tabelle 1.1).

Ein molekular-dynamisches Mimikry an B*27:05? Als Ursache von AS und die Assoziation mit B*27:05 wird Autoimmunität durch molekulares Mimikry postuliert. Eine Prämisse für dieses molekulare Mimikry ist das Versagen der negativen Selektion gegenüber autoreaktiven T-Zellen im Thymus. Die Aktivität des corticalen Thymoproteasoms und die unterschiedliche Peptidselektivität von B*27:05 und B*27:09 gegenüber basischen C-Termini bieten dafür einen Erklärungsansatz [39]. T-Zellen mit geringer Affinität gegenüber *self*-Antigenen (wie der TCR A6 gegen das HuD-Peptid in HLA-A2) können der negativen Selektion entkommen, und ohne signifikante Änderung des Bindungsmodus mit *nonself*-Antigenen (wie dem Tax-Peptid) reagieren [15].

Von HLA-B*27:05 ist seine starke Kreuzreaktivität bekannt, wodurch das Molekül hocheffizient virale Peptide präsentiert [38]. Flexibilität und thermodynamische Ambivalenz am Bindungs-Interface der Immunsynapse werden als allgemeine Voraussetzung für die Kreuzreaktivität des TCR gegen eine breite Vielfalt an Antigenen angesehen [139]. Gleichzeitig kann eine wechselseitige „Abstimmung von strukturellen Schwankungen“ [14] die Selektivität des TCR wieder erhöhen, da dadurch die Bindungsenergien minimiert werden. Es müssen strukturell-enthalpische Beiträge der Bindung ebenso bedacht werden, wie dynamisch-

entropische [60,140,141]. Eine detaillierte Analyse der Flexibilität der Bindungsinterfaces von HLA-B*27 könnte also helfen, dessen Kreuzreaktivität und Selektivität zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit verändern bestimmte Regionen des HLA-B*27 kontextabhängig ihre Flexibilität, dabei sind die Veränderungen stark individuell unterschiedlich. Die erhöhte Flexibilität der α 1-Helix von B*27:05 könnte eine breitere konformationelle Basis für die Interaktion mit dem TCR bieten, gleichzeitig zeigte sich eine Zunahme der Flexibilität der α 2-Helix in B*27:09, womit diese Hypothese unplausibel erscheint. Selbst das TIS-Antigen, das in den beiden Subtypen der nahezu der gleichen Struktur vorliegt, zeigt subtypabhängig extrem unterschiedliche dynamische Eigenschaften an Peptid und Protein. Die Unterschiede in der Proteindynamik sind mithin größer, als bei pVIPR, bei dem unterschiedliche Konformationen nachgewiesen sind. Somit sind diese Ergebnisse ein erster Schritt, um zukünftig Antigen-Subtyp-Kombinationen mit dynamischen und funktionellen Eigenschaften zu korrelieren. Eine abschließende Erklärung für die differenzielle AS-Assoziation von B*27:05/:09 kann sie nicht liefern. Nichtsdestotrotz bieten sie als Modellsystem ein eindrucksvolles Beispiel, wie ein Einzelaminosäureaustausch strukturdynamische Unterschiede auf einer globalen Ebene bewirken können [47].

4.7 Vergleich der freien β_2 -Mikroglobuline

Thermodynamische Charakterisierungen des β_2 m aus dem Huhn wurden bereits mittels dynamischer Differenzialkalorimetrie (DSC), Infrarotspektroskopie mit H/D-Austauschexperimenten und in begrenztem Umfang auch durch Röntgenkristallographie vorgenommen [66]. Mit der vorliegenden Arbeit wird der Vergleich der Dynamik durch die NMR-spektroskopischen Untersuchungen und die *model-free*-Analyse erstmals räumlich hochaufgelöst möglich.

Aus der genannten Arbeit ist bekannt, dass das β_2 m aus dem Huhn im Vergleich zum humanen Molekül eine um ca. 4 K erniedrigte Schmelztemperatur besitzt und dessen Amidprotonen schneller mit dem Lösungsmittel austauschen. Die geringere intrinsische Stabilität und damit höhere Flexibilität des aviären Proteins ist damit gut belegt. Röntgenkristallographisch konnten für die Reste Ser55, Asp58 und Trp60 Doppelkonformationen und eine geringe Elektronendichte an Phe60 festgestellt werden – Indikatoren für eine hohe Flexibilität des DE-Loops. Die NMR-Untersuchungen konnten diese Befunde auf unterschiedlichen Zeitskalen und teilweise quantitativ mit atomarer Auflösung abbilden.

So scheinen die Aminosäuren in den AB-, BC-, DE- und FG-Loops, sowie am N-Terminus in beiden Proteinen so stark auszutauschen, dass sie entweder im HN-HSQC (2D) oder in den Tripelresonanzexperimenten (3D) stark verbreitert sind. Die Gesamtzahl der Signale im HSQC

ist jedoch mit 81 beim menschlichen [68] und 82 beim Hühner-Protein in beiden Spektren in etwa gleich. Vermutlich ist in beiden Proteinen der DE-Loop und der D-Strang einem starken intermediären Austauschgeschehen unterworfen, und an weiteren flexiblen Resten im Hühner- β_2m geht die Magnetisierung bei den langen INEPT-Transferschritten im 3D-Experiment durch Relaxation verloren.

Das wird durch die Analyse der Relaxation des konservierten Trp60_{HeNe} bestätigt. In der *model-free*-Analyse des Hühnerproteins zeigt es einen hohen Grad an Entropie. Im menschlichen Molekül gibt es durch den intermediären Austausch nur ein schwaches Signal, dessen *order parameter* S^2 trotz der größeren Fehler ähnlich niedrig sind. Trp95, das Teil des hydrophoben Kerns ist, zeigt in beiden Molekülen wenig Flexibilität. EF-Loop und G-Strang zeigen in beiden Proteinen eine vergleichbare, leicht erhöhte Flexibilität.

Überraschenderweise erscheint das menschliche gegenüber dem Hühner- β_2m flexibler, allerdings sind einige der besonders flexiblen Aminosäuren des menschlichen Proteins (2, 11, 26, 43, 47-50) im Hühner-Protein gar nicht per Relaxationsanalyse zu untersuchen, da sie stark austauschverbreitert sind. Hier ist vor allem der CD-Loop betroffen.

In den B- und E-Strängen des menschlichen β_2m ist punktuell eine hohe Flexibilität auf der Subnanosekundenzeitskala (S^2) zu verzeichnen, die sich im Hühner-Protein nicht detektieren lässt. Im Hühner-Protein wurde an den Strängen A und B signifikanten R_{ex} -Austausch detektiert. Diese Seite des β_2 -Sandwich (Stränge A, B, E, D) scheint also flexibler zu sein, als die gegenüberliegende. Im Komplex mit der schweren Kette weist diese Seite nach außen.

So sind die sequenziell divergenten und strukturell ähnlichen Moleküle auch in ihrer Dynamik grundsätzlich ähnlich. Die gleichen Molekülregionen weisen eine erhöhte Flexibilität auf. Während weite Teile des Hühner- β_2m jedoch vor allem durch Austauschgeschehen bestimmt wird, ist dieses bei dem humanen Protein auf den D-Strang und den DE-Loop beschränkt.

4.8 Etablierung eines Peptid-Expressionssystem

Für die Herstellung einer HLA-B*27-Probe für NMR-Untersuchungen sind Peptide mit definierten Termini im Milligramm-Maßstab erforderlich. Diese in isotopenmarkierter Form durch Festphasensynthese herzustellen, ist aufgrund der hohen Kosten der nötigen Aminosäurevorstufen extrem teuer. Die für die vorliegende Arbeit etablierte Peptid-Herstellung in Form von Ubiquitin-Fusionsproteinen ist eine deutlich wirtschaftlichere Alternative. Im Gegensatz zu einem Verfahren, bei dem Peptide mit Hilfe von Bromcyan gespalten werden [142], stellt die Herstellung kein Gesundheitsrisiko für den Experimentator dar und es fallen keine

hochgiftigen Abfälle an.

Von anderen Gruppen wurde das Ubiquitin-Fusionssystem für die Expression von isotopenmarkierten Peptiden genutzt, etwa dem Tax-Peptid (9 Aminosäuren, [104]), Mastoparan-X (14 Aminosäuren, [105]), Piscidin (22 Aminosäuren, [115]) oder Syndecan 4L (28 Aminosäuren, [114]). In diesen Arbeiten wurden verschiedene *E. coli*-Stämme und M9-Minimalmedium für die Expression genutzt. Die Peptid-Ausbeuten betragen dort zwischen 1,5 und 9 mg bzw. 0,45 bis 4,8 μmol je Gramm eingesetzter Glucose. Die höchsten dieser Angaben [104] sind zweifelhaft, das sie die theoretisch erreichbare Menge des Spaltprodukts um bis zu über 65% überstiegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwar große Ausbeuten je Liter Medium erreicht, normallisiert auf die Masse isotopenmarkierter Glucose sinkt sie allerdings auf 1,3 mg bzw. 1,2 μmol (TIS) je Gramm Glucose. Damit liegt die Ausbeute innerhalb der Variation, die auch andere Gruppen erzielten. Bei der Spaltung von pVIPR kam es mit 0,3 mg bzw. 0,2 μmol je Gramm Glucose praktisch zum Totalverlust des Peptids. Die Ursache konnte bisher nicht gefunden werden, möglicherweise ist das Fusionspeptid nicht stabil. Es besteht weiterer Optimierungsbedarf.

Als Alternative zur Expression mittels Ubiquitin-Fusionen sind SUMO-Proteinfusionen denkbar, die mit Desumoylasen wie SUMO Protease-1 hochspezifisch gespalten werden können. Diese Proteasen sind stabiler, spalten effizienter und über einen größeren pH- und Temperaturbereich und lassen sich einfach in großen Mengen herstellen [143]. Diese Proteasen sind auch kommerziell erhältlich.

4.9 Zusammenfassung der Diskussion und Perspektive

In dieser Arbeit wurde erstmals die vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebungen des Peptidrückgrats von sämtlichen Komponenten von MHC-Klasse-I-Komplexen erreicht. Die erfolgreiche Etablierung eines wirtschaftlichen Expressionssystem für isotopenmarkiertes TIS-Peptid ebnet den Weg für eine Betrachtung der Dynamik des gesamten HLA-B*27-Moleküls durch NMR.

Die Arbeit unterstreicht die unterschätzte Eigenschaft von Biomolekülen, in ihrer Struktur hochdynamisch auf verschiedenen Zeitskalen zu sein. Die hochauflösenden Strukturen der Röntgenkristallographie können also nur einen Teil der realen Struktur abbilden. So sind die zwei strukturell konservierten β_2 -Mikroglobuline aus Mensch und Huhn auch in ihrer strukturellen Dynamik konserviert, prägen diese aber auf unterschiedlichen Zeitskalen aus.

Die vier HLA-Moleküle HLA-B*27:05 und B*27:09, jeweils mit den Liganden pVIPR und TIS, zeigten in der kristallographischen Analyse nur geringe Unterschiede, in der Untersuchung durch NMR traten aber große Unterschiede zutage. Diese Ergebnisse erweitern unser Verständnis für die Funktion der Immunsynapse, was etwa bei dem Design von Impfstoffen gegen Tumorzellen [144] helfen kann.

Die beiden Subtypen HLA-B*27:05 und B*27:09, die genetisch differentiell mit der autoinflammatorischen Erkrankung AS assoziiert sind, zeigen im Komplex mit den beiden Peptidliganden pVIPR und TIS ein hochindividuelles dynamisches Verhalten, das keine einfachen Schlüsse auf die Etiologie von AS zulässt. Die Arbeit demonstriert, dass entropische Beiträge zur Bindung des HLA an Effektorproteine nicht ignoriert werden können. Schwache Interaktionen wie die MHC-TCR-Interaktionen können durch entropische Beiträge entscheidend beeinflusst werden. Des Weiteren sollte die allosterische Wirkung von Korezeptoren nicht unterschätzt werden. Hier ist weitere Forschung zum Verständnis der Immunsynapse nötig.

In zukünftigen Arbeiten kann die Dynamik der Aminosäureseitenketten von Tryptophan, Isoleucin, Leucin und Valin betrachtet werden. Die meisten Vorarbeiten für diese Untersuchungen wurden bereits getroffen. Auch eine Erweiterung der Betrachtung der Dynamik auf der Mikro- bis Millisekundenzeitskala mit Hilfe der quantitativen Relaxationsdispersionsanalyse ist durch die vollständige Zuordnung mit vertretbarem Aufwand zu realisieren. Die Betrachtung kann, aufbauend auf den hier etablierten Verfahren, auf weitere Subtypen und Peptidliganden ausgeweitet werden.

Zusammenfassung

Die Allelgruppe HLA-B*27 ist genetisch mit ankylosierender Spondylitis (AS) assoziiert. AS führt zur Entzündung und Verknöcherung der Wirbelsäulengelenke, starken Schmerzen und Verlust von Lebensqualität. MHC-Klasse-I-Moleküle wie HLA-B präsentieren T-Zellen des Immunsystems Peptid-Antigene, weshalb AS als mögliche Autoimmunerkrankung diskutiert wird.

Schon der Austausch einer einzigen Aminosäure von HLA-B erhöht drastisch das Erkrankungsrisiko für AS. So ist der Subtyp HLA-B*27:05 stark und HLA-B*27:09 nicht mit der Krankheit assoziiert. Die Ursachen dafür sind unbekannt. Die Subtypen unterscheiden sich durch die polymorphe Aminosäure 116 am Boden der Peptid-Bindefurche, die bei B*27:05 ein Aspartat, in B*27:09 aber durch ein Histidin ersetzt ist. Aus biophysikalischen Untersuchungen und Molekulardynamiksimulationen ist eine peptidunabhängig erhöhte Flexibilität der helikalen Regionen von B*27:05 bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe von Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR) die strukturelle Dynamik der beiden Subtypen, jeweils in Komplex mit den *self*-Peptiden TIS (RRLPIFSRL) oder pVIPR (RRKWRRWHL), charakterisiert werden. Dies sollte mit semiquantitativer Linienformanalyse, Relaxationsmessungen und *model-free*-Analyse geschehen.

Die untersuchten HLA-B*27-Komplexe zeigten eine große Spanne dynamischen Verhaltens. Die α 1- α 2-Domäne von HLA-B*27 besaß eine liganden- und subtypabhängig stark variierende Flexibilität auf der intermediären bis langsamen NMR-Zeitskala (Mikro- bis Millisekunden). In B*27:05 zeigte sich meist intermediärer Austausch in der α 1-Helix, HLA-Moleküle im Komplex mit TIS neigten zu Austausch auf langsamen Zeitskalen in beiden Subtypen. Die *model-free*-Analyse detektierte eine hohe peptidabhängige Flexibilität der α 2-Helix in B*27:09. Die Bindestelle für den CD8-Korezeptor und das Chaperon Tapasin (Reste 223-226 der α 3-Domäne) konnte als plastisch charakterisiert werden. Diffusionsmodelle zeigten, dass die α 3-Domäne peptid- und subtypabhängig vom Restkomplex dissoziieren kann. Das TIS-Peptid zeigte im Komplex subtypabhängige Unterschiede in seiner Dynamik.

Diese Erkenntnisse haben weitreichende Folgen für das Verständnis der Dynamik von MHC-Molekülen, da die Bindung an den T-Zell-Rezeptor auch entropischen Beiträgen unterworfen ist. Die differenzielle Interdomänenflexibilität rückt Korezeptoren als mögliche allosterische

Regulatoren der Bindetaschenmobilität in den Fokus. Mit der ersten vollständigen Zuordnungen der chemischen Verschiebungen von MHC Klasse-I-Molekülen legen diese Ergebnisse den Grundstein für die NMR-Analyse von HLA-B*27 und weiteren krankheitsassoziierten Klasse-I-Molekülen. Zum ersten Mal konnten an diesem bedeutenden Molekül experimentell hochauflösende strukturdynamische Informationen gewonnen werden, die mit biologisch-funktionellen Daten korreliert werden können.

Summary

The allele group HLA-B*27 is genetically associated with Ankylosing Spondylitis (AS). The disease causes inflammation and ossification of the spine, pain and loss of quality of life. AS is probably an autoimmune disease, as HLA molecules present peptide antigens to the T cells of the immune system.

Already a single-residue exchange dramatically increases the risk of contracting AS. While the subtype HLA-B*27:05 is strongly associated with the disease, HLA-B*27:09 is not. The causes remain unexplained. The two subtypes differ only by a polymorphic amino acid at position 116, which is an aspartate in B*27:05 and a histidine in B*27:09. Biophysical studies and molecular dynamics simulations detected an peptide-independent increased flexibility in the helical regions of B*27:05.

Using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, I explored the structural dynamics of the two subtypes, each complexed with one of the two self-derived peptides TIS (RRLPIFSRL) or pVIPR (RRKRRRWHL). This was done by semiquantitative line shape analysis and model-free analysis of ^{15}N relaxation.

All HLA-B*27 complexes showed a remarkable range of dynamic behaviour. Parts of the helices of the α 1- α 2-superdomain exhibited a great degree of mobility on an intermediate-to-slow timescale (micro- to milliseconds) in a ligand- and subtype-dependent fashion, which is reflected by diminishing NH signal intensities and the occurrence of multiple conformational states. HLA-B*27:05 seems to have a remarkably dynamic α 1 helix, while TIS seems to exert mobility on slow timescales to slow timescales in both subtypes. Model-free analysis detected peptide-dependent structural plasticity in the α 2 helix of B*27:09. The signals of residues 223-226 of the α 3 domain are not visible in any of the complexes, which emphasises the plasticity of the binding site for both the CD8 co-receptor and chaperone tapasin. Diffusion models suggest that the α 3 domain may dissociate from the complex in a ligand- and subtype-dependent manner. Also the peptide TIS in the complex exhibited subtype-dependent mobility differences.

These results help understand the structural dynamics of MHC molecules, since interaction with the T cell receptor also depends on entropic contributions. Based on the differential inter-domain flexibility, I propose a role for co-receptors as allosteric regulators of binding groove flexibility. The first assignments of an MHC class-I molecule's backbone pave the way for further studies on disease associated class-I molecules. For the first time, high-resolution protein dynamics information could be experimentally obtained, which may be correlated with functional data.

Literaturverzeichnis

- [1] Murphy, K. (2014). *Janeway's Immunobiology*. Garland Pub.
- [2] Blum, J. S., Wearsch, P. A. und Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annual Review of Immunology* 31 (1): 443–473.
- [3] Bowness, P., Zaccari, N., Bird, L. und Jones, E. Y. (1999). HLA-B27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. *Expert reviews in molecular medicine* 1999: 1–10.
- [4] Simone, L. C., Georgesen, C. J., Simone, P. D., Wang, X. und Solheim, J. C. (2012). Productive association between MHC class I and tapasin requires the tapasin transmembrane/cytosolic region and the tapasin C-terminal Ig-like domain. *Molecular immunology* 49 (4): 628–639.
- [5] Salter, R. D., Benjamin, R. J., Wesley, P. K., Buxton, S. E., Garrett, T. P., Clayberger, C., Krensky, A. M., Norment, A. M., Littman, D. R. und Parham, P. (1990). A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 345 (6270): 41–46.
- [6] Devine, L., Sun, J., Barr, M. R. und Kavathas, P. B. (1999). Orientation of the Ig domains of CD8 alpha beta relative to MHC class I. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 162 (2): 846–851.
- [7] Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329 (6139): 506–512.
- [8] Kumar, P., Vahedi-Faridi, A., Saenger, W., Merino, E., Lopez de Castro, J. A., Uchanska-Ziegler, B. und Ziegler, A. (2009). Structural basis for T cell alloreactivity among three HLA-B14 and HLA-B27 antigens. *The Journal of biological chemistry* 284 (43): 29784–29797.
- [9] Infantes, S., Lorente, E., Barnea, E., Beer, I., Barriga, A., Lasala, F., Jiménez, M., Admon, A. und López, D. (2013). Natural HLA-B*2705 ligands with glutamine as anchor motif: implications for HLA-B27 association to spondyloarthritis. *The Journal of biological chemistry* .
- [10] Campbell, E. C., Antoniou, A. N. und Powis, S. J. (2012). The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. *Immunology* 136 (4): 380–384.
- [11] Ljunggren, H. G., Stam, N. J., Ohlén, C., Neefjes, J. J., Höglund, P., Heemels, M. T.,

- Bastin, J., Schumacher, T. N., Townsend, A. und Kärre, K. (1990). Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 346 (6283): 476–480.
- [12] Morgan, C. S., Holton, J. M., Olafson, B. D., Bjorkman, P. J. und Mayo, S. L. (1997). Circular dichroism determination of class I MHC-peptide equilibrium dissociation constants. *Protein science : a publication of the Protein Society* 6 (8): 1771–1773.
- [13] Kurimoto, E., Kuroki, K., Yamaguchi, Y., Yagi-Utsumi, M., Igaki, T., Iguchi, T., Maenaka, K. und Kato, K. (2013). Molecular Immunology. *Molecular immunology* 55 (3-4): 393–399.
- [14] Hawse, W. F., De, S., Greenwood, A. I., Nicholson, L. K., Zajicek, J., Kovrigin, E. L., Kranz, D. M., Garcia, K. C. und Baker, B. M. (2014). TCR Scanning of Peptide/MHC through Complementary Matching of Receptor and Ligand Molecular Flexibility. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 192 (6): 2885–2891.
- [15] Baker, B. M., Scott, D. R., Blevins, S. J. und Hawse, W. F. (2012). Structural and dynamic control of T-cell receptor specificity, cross-reactivity, and binding mechanism. *Immunological reviews* 250 (1): 10–31.
- [16] Braun, J. und Sieper, J. (2007). Ankylosing spondylitis. *Lancet* 369 (9570): 1379–1390.
- [17] Feldtkeller, E., Lemmel, E.-M. und Russell, A. S. (2003). Ankylosing spondylitis in the pharaohs of ancient Egypt. *Rheumatology international* 23 (1): 1–5.
- [18] Saleem, S. N. und Hawass, Z. (2014). Brief Report: Ankylosing Spondylitis or Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis in Royal Egyptian Mummies of the 18th-20th Dynasties? Computed Tomography and Archaeology Studies. *Arthritis & Rheumatology* 66 (12): 3311–3316.
- [19] Lemmers, S. A. M., Dijkmans, B. A. C. und Janssen, M. (2015). Changing Phenotype of Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis Over Time: Comment on the Article by Saleem and Hawass. *Arthritis & Rheumatology* 67 (6): 1684–1685.
- [20] International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes, A., Hadler, J., Pointon, J. P., Robinson, P. C., Karaderi, T., Leo, P., Cremin, K., Pryce, K., Harris, J., Lee, S., Joo, K. B., Shim, S.-C., Weisman, M., Ward, M., Zhou, X., Garchon, H.-J., Chiocchia, G., Nossent, J., Lie, B. A., Førre, Ø., Tuomilehto, J., Laiho, K., Jiang, L., Liu, Y., Wu, X., Bradbury, L. A., Elewaut, D., Burgos-Vargas, R., Stebbings, S., Appleton, L., Farrah, C., Lau, J., Kenna, T. J., Haroon, N., Ferreira, M. A., Yang, J., Mulero, J., Fernandez-Sueiro, J. L., Gonzalez-Gay, M. A., Lopez-Larrea, C., Deloukas, P., Donnelly, P., Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Groupe Française d'Etude Génétique des Spondylarthrites (GFECS), Nord-Trøndelag Health Study (HUNT), Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC), Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), Bowness, P., Gafney, K., Gaston, H., Gladman, D. D., Rahman, P., Maksymowych, W. P., Xu, H., Crusius, J. B. A., van der Horst-Bruinsma, I. E., Chou, C.-T., Valle-Oñate, R., Romero-Sánchez, C., Hansen, I. M., Pimentel-Santos, F. M., Inman, R. D., Videm, V., Martin, J., Breban, M., Reveille, J. D.,

- Evans, D. M., Kim, T.-H., Wordsworth, B. P. und Brown, M. A. (2013). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nature Genetics* 45 (7): 730–738.
- [21] Braun, J. r., Bollow, M., Remlinger, G., Eggens, U., Rudwaleit, M., Distler, A. und Sieper, J. (1998). Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis & Rheumatism* 41 (1): 58–67.
- [22] Pedersen, O. B., Svendsen, A. J., Ejstrup, L., Skytthe, A., Harris, J. R. und Junker, P. (2008). Ankylosing spondylitis in Danish and Norwegian twins: occurrence and the relative importance of genetic vs. environmental effectors in disease causation. *Scandinavian journal of rheumatology* 37 (2): 120–126.
- [23] Brown, M. A., Kennedy, L. G., MacGregor, A. J., Darke, C., Duncan, E., Shatford, J. L., Taylor, A., Calin, A. und Wordsworth, P. (1997). Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis & Rheumatism* 40 (10): 1823–1828.
- [24] Brewerton, D. A., Hart, F. D., Nicholls, A., Caffrey, M., James, D. C. und Sturrock, R. D. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1 (7809): 904–907.
- [25] Schlosstein, L., Terasaki, P. I., Bluestone, R. und Pearson, C. M. (1973). High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *The New England Journal of Medicine* 288 (14): 704–706.
- [26] Sheehan, N. J. (2010). HLA-B27: what's new? *Rheumatology (Oxford, England)* 49 (4): 621–631.
- [27] Cortes, A., Pulit, S. L., Leo, P. J., Pointon, J. J., Robinson, P. C., Weisman, M. H., Ward, M., Gensler, L. S., Zhou, X., Garchon, H.-J., Chiocchia, G., Nossent, J., Lie, B. A., rre, O. y. F. o., Tuomilehto, J., Laiho, K., Bradbury, L. A., Elewaut, D., Burgos-Vargas, R., Stebbings, S., Appleton, L., Farrah, C., Lau, J., Haroon, N., Mulero, J., Blanco, F. J., Gonzalez-Gay, M. A., López-Larrea, C., Bowness, P., Gaffney, K., Gaston, H., Gladman, D. D., Rahman, P., Maksymowych, W. P., Crusius, J. B. A., van der Horst-Bruinsma, I. E., ate, R. V.-O. n., nchez, C. R.-S. a., Hansen, I. M., Pimentel-Santos, F. M., Inman, R. D., Martin, J., Breban, M., Wordsworth, B. P., Reveille, J. D., Evans, D. M., de Bakker, P. I. W. und Brown, M. A. (2015). Major histocompatibility complex associations of ankylosing spondylitis are complex and involve further epistasis with ERAP1. *Nature communications* 6: 1–8.
- [28] Taurog, J. D. (2009). Animal models of spondyloarthritis. *Advances in experimental medicine and biology* 649: 245–254.
- [29] Taurog, J. D. (2010). The Role of HLA-B27 in Spondyloarthritis. *The Journal of rheumatology* 37 (12): 2606–2616.
- [30] Bowness, P. (2015). HLA-B27. *Annual Review of Immunology* 33: 29–48.

- [31] Reveille, J. D. (2011). The genetic basis of spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 70 (Suppl 1): i44–i50.
- [32] Colbert, R. A., Tran, T. M. und Layh-Schmitt, G. (2014). Molecular Immunology. *Molecular immunology* 57 (1): 44–51.
- [33] McHugh, K. und Bowness, P. (2012). The link between HLA-B27 and SpA—new ideas on an old problem. *Rheumatology (Oxford, England)* 51 (9): 1529–1539.
- [34] Giles, J., Shaw, J., Piper, C., Wong-Baeza, I., McHugh, K., Ridley, A., Li, D., Lenart, I., Antoniou, A. N., DiGleria, K., Kuroki, K., Maenaka, K., Bowness, P. und Kollnberger, S. (2012). HLA-B27 homodimers and free H chains are stronger ligands for leukocyte Ig-like receptor B2 than classical HLA class I. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 188 (12): 6184–6193.
- [35] Rosenbaum, J. T., Lin, P., Asquith, M., Costello, M.-E., Kenna, T. J. und Brown, M. A. (2014). Does the microbiome play a causal role in spondyloarthritis? *Clinical Rheumatology* 33 (6): 763–767.
- [36] Vendelbosch, S., Heslinga, S. C., John, M., van Leeuwen, K., Geissler, J., de Boer, M., Tanck, M. W. T., van den Berg, T. K., Crusius, J. B. A., van der Horst-Bruinsma, I. E. und Kuijpers, T. W. (2015). Study on the Protective Effect of the KIR3DL1 Gene in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 67 (11): 2957–2965.
- [37] Evans, D. M., Spencer, C. C. A., Pointon, J. J., Su, Z., Harvey, D., Kochan, G., Opperman, U., Dilthey, A., Pirinen, M., Stone, M. A., Appleton, L., Moutsianis, L., Leslie, S., Wordsworth, T., Kenna, T. J., Karaderi, T., Thomas, G. P., Ward, M. M., Weisman, M. H., Farrar, C., Bradbury, L. A., Danoy, P., Inman, R. D., Maksymowych, W., Gladman, D., Rahman, P., Morgan, A., Marzo-Ortega, H., Bowness, P., Gaffney, K., Gaston, J. S. H., Smith, M., Bruges-Armas, J., Couto, A.-R., Sorrentino, R., Paladini, F., Ferreira, M. A., Xu, H., Liu, Y., Jiang, L., Lopez-Larrea, C., Díaz-Peña, R., López-Vázquez, A., Zayats, T., Band, G., Bellenguez, C., Blackburn, H., Blackwell, J. M., Bramon, E., Bumpstead, S. J., Casas, J. P., Corvin, A., Craddock, N., Deloukas, P., Dronov, S., Duncanson, A., Edkins, S., Freeman, C., Gillman, M., Gray, E., Gwilliam, R., Hammond, N., Hunt, S. E., Jankowski, J., Jayakumar, A., Langford, C., Liddle, J., Markus, H. S., Mathew, C. G., McCann, O. T., McCarthy, M. I., Palmer, C. N. A., Peltonen, L., Plomin, R., Potter, S. C., Rautanen, A., Ravindrarajah, R., Ricketts, M., Samani, N., Sawcer, S. J., Strange, A., Trembath, R. C., Viswanathan, A. C., Waller, M., Weston, P., Whittaker, P., Widaa, S., Wood, N. W., McVean, G., Reveille, J. D., Wordsworth, B. P., Brown, M. A. und Donnelly, P. (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature Genetics* .
- [38] Sorrentino, R., Böckmann, R. A. und Fiorillo, M. T. (2014). HLA-B27 and antigen presentation: at the crossroads between immune defense and autoimmunity. *Molecular immunology* 57 (1): 22–27.
- [39] Ziegler, A., Müller, C. A., Böckmann, R. A. und Uchanska-Ziegler, B. (2009). Low-affinity

- peptides and T-cell selection. *Trends in immunology* 30 (2): 53–60.
- [40] Dervović, D. und Zúñiga-Pflücker, J. C. (2010). Positive selection of T cells, an in vitro view. *Seminars in immunology* 22 (5): 276–286.
- [41] Paladini, F., Taccari, E., Fiorillo, M. T., Cauli, A., Passiu, G., Mathieu, A., Punzi, L., Lapadula, G., Scarpa, R. und Sorrentino, R. (2005). Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis & Rheumatism* 52 (10): 3319–3321.
- [42] Reche, P. A. und Reinherz, E. L. (2003). Sequence Variability Analysis of Human Class I and Class II MHC Molecules: Functional and Structural Correlates of Amino Acid Polymorphisms. *Journal of Molecular Biology* 331 (3): 623–641.
- [43] D’Amato, M., Fiorillo, M. T., Carcassi, C., Mathieu, A., Zuccarelli, A., Bitti, P. P., Tosi, R. und Sorrentino, R. (1995). Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *European journal of immunology* 25 (11): 3199–3201.
- [44] Olivieri, I., Ciancio, G., Padula, A., Gaudio, C., Masciandaro, S., Moro, L., Durante, E., Pozzi, S. und Ferrara, G. B. (2002). The HLA-B*2709 subtype confers susceptibility to spondylarthropathy. *Arthritis & Rheumatism* 46 (2): 553–554.
- [45] Mathieu, A. und Sorrentino, R. (2003). HLA-B*2709 and spondylarthropathies: comment on the concise communication by Olivieri et al. *Arthritis & Rheumatism* 48 (3): 866–7– author reply 867–8.
- [46] Ziegler, A., Loll, B., Misselwitz, R. und Uchanska-Ziegler, B. (2009). Implications of structural and thermodynamic studies of HLA-B27 subtypes exhibiting differential association with ankylosing spondylitis. *Advances in experimental medicine and biology* 649: 177–195.
- [47] Uchanska-Ziegler, B., Loll, B., Fabian, H., Hee, C. S., Saenger, W. und Ziegler, A. (2012). HLA class I-associated diseases with a suspected autoimmune etiology: HLA-B27 subtypes as a model system. *European journal of cell biology* 91 (4): 274–286.
- [48] Abualrous, E. T., Fritzsche, S., Hein, Z., Al-Balushi, M. S., Reinink, P., Boyle, L. H., Wellbrock, U., Antoniou, A. N. und Springer, S. (2015). F pocket flexibility influences the tapasin dependence of two differentially disease-associated MHC Class I proteins. *European journal of immunology* 45 (4): 1248–1257.
- [49] Narzi, D., Becker, C. M., Fiorillo, M. T., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. und Böckmann, R. A. (2012). Dynamical characterization of two differentially disease associated MHC class I proteins in complex with viral and self-peptides. *Journal of Molecular Biology* 415 (2): 429–442.
- [50] Hülsmeier, M., Fiorillo, M. T., Bettosini, F., Sorrentino, R., Saenger, W., Ziegler, A. und

- Uchanska-Ziegler, B. (2004). Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide. *The Journal of experimental medicine* 199 (2): 271–281.
- [51] Fabian, H., Huser, H., Narzi, D., Misselwitz, R., Loll, B., Ziegler, A., Böckmann, R. A., Uchanska-Ziegler, B. und Naumann, D. (2008). HLA-B27 subtypes differentially associated with disease exhibit conformational differences in solution. *Journal of Molecular Biology* 376 (3): 798–810.
- [52] Fabian, H., Huser, H., Loll, B., Ziegler, A., Naumann, D. und Uchanska-Ziegler, B. (2010). HLA-B27 heavy chains distinguished by a micropolymorphism exhibit differential flexibility. *Arthritis & Rheumatism* 62 (4): 978–987.
- [53] Fabian, H., Loll, B., Huser, H., Naumann, D., Uchanska-Ziegler, B. und Ziegler, A. (2011). Influence of inflammation-related changes on conformational characteristics of HLA-B27 subtypes as detected by IR spectroscopy. *The FEBS journal* 278 (10): 1713–1727.
- [54] Nurzia, E., Narzi, D., Cauli, A., Mathieu, A., Tedeschi, V., Caristi, S., Sorrentino, R., Böckmann, R. A. und Fiorillo, M. T. (2012). Interaction Pattern of Arg 62 in the A-Pocket of Differentially Disease-Associated HLA-B27 Subtypes Suggests Distinct TCR Binding Modes. *PLoS one* 7 (3): e32865.
- [55] Hülsmeier, M., Welfle, K., Pöhlmann, T., Misselwitz, R., Alexiev, U., Welfle, H., Saenger, W., Uchanska-Ziegler, B. und Ziegler, A. (2005). Thermodynamic and structural equivalence of two HLA-B27 subtypes complexed with a self-peptide. *Journal of Molecular Biology* 346 (5): 1367–1379.
- [56] Rückert, C., Fiorillo, M. T., Loll, B., Moretti, R., Biesiadka, J., Saenger, W., Ziegler, A., Sorrentino, R. und Uchanska-Ziegler, B. (2006). Conformational dimorphism of self-peptides and molecular mimicry in a disease-associated HLA-B27 subtype. *The Journal of biological chemistry* 281 (4): 2306–2316.
- [57] Fiorillo, M. T., Rückert, C., Hülsmeier, M., Sorrentino, R., Saenger, W., Ziegler, A. und Uchanska-Ziegler, B. (2005). Allele-dependent similarity between viral and self-peptide presentation by HLA-B27 subtypes. *The Journal of biological chemistry* 280 (4): 2962–2971.
- [58] Hülsmeier, M., Hillig, R. C., Volz, A., Rühl, M., Schröder, W., Saenger, W., Ziegler, A. und Uchanska-Ziegler, B. (2002). HLA-B27 subtypes differentially associated with disease exhibit subtle structural alterations. *The Journal of biological chemistry* 277 (49): 47844–47853.
- [59] Hillig, R. C., Hülsmeier, M., Saenger, W., Welfle, K., Misselwitz, R., Welfle, H., Kozerski, C., Volz, A., Uchanska-Ziegler, B. und Ziegler, A. (2004). Thermodynamic and structural analysis of peptide- and allele-dependent properties of two HLA-B27 subtypes exhibiting differential disease association. *The Journal of biological chemistry* 279 (1): 652–663.
- [60] Pöhlmann, T., Böckmann, R. A., Grubmüller, H., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. und

- Alexiev, U. (2004). Differential peptide dynamics is linked to major histocompatibility complex polymorphism. *The Journal of biological chemistry* 279 (27): 28197–28201.
- [61] Winkler, K., Winter, A., Rueckert, C., Uchanska-Ziegler, B. und Alexiev, U. (2007). Natural MHC class I polymorphism controls the pathway of peptide dissociation from HLA-B27 complexes. *Biophysical journal* 93 (8): 2743–2755.
- [62] Beltrami, A., Rossmann, M., Fiorillo, M. T., Paladini, F., Sorrentino, R., Saenger, W., Kumar, P., Ziegler, A. und Uchanska-Ziegler, B. (2008). Citrullination-dependent differential presentation of a self-peptide by HLA-B27 subtypes. *The Journal of biological chemistry* 283 (40): 27189–27199.
- [63] Loll, B., Rückert, C., Hee, C. S., Saenger, W., Uchanska-Ziegler, B. und Ziegler, A. (2011). Loss of recognition by cross-reactive T cells and its relation to a C-terminus-induced conformational reorientation of an HLA-B*2705-bound peptide. *Protein science : a publication of the Protein Society* 20 (2): 278–290.
- [64] Stewart-Jones, G. B. E., di Gleria, K., Kollnberger, S., McMichael, A. J., Jones, E. Y. und Bowness, P. (2005). Crystal structures and KIR3DL1 recognition of three immunodominant viral peptides complexed to HLA-B*2705. *European journal of immunology* 35 (2): 341–351.
- [65] Fiorillo, M. T., Maragno, M., Butler, R., Dupuis, M. L. und Sorrentino, R. (2000). CD8(+) T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *The Journal of clinical investigation* 106 (1): 47–53.
- [66] Hee, C. S., Fabian, H., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. und Loll, B. (2012). Comparative biophysical characterization of chicken β 2-microglobulin. *Biophysical chemistry* 167: 26–35.
- [67] Hee, C. S., Gao, S., Loll, B., Miller, M. M., Uchanska-Ziegler, B., Daumke, O. und Ziegler, A. (2010). Structure of a classical MHC class I molecule that binds non-classical ligands. *PLoS biology* 8 (12): e1000557.
- [68] Hee, C. S., Beerbaum, M., Loll, B., Ballaschk, M., Schmieder, P., Uchanska-Ziegler, B. und Ziegler, A. (2013). Dynamics of free versus complexed β (2)-microglobulin and the evolution of interfaces in MHC class I molecules. *Immunogenetics* 65 (3): 157–172.
- [69] Okon, M., Bray, P. und Vucelic, D. (1992). Proton NMR assignments and secondary structure of human β 2-microglobulin in solution. *Biochemistry* 31 (37): 8906–8915.
- [70] Bloch, F., Hansen, W. W. und Packard, M. (1946). The Nuclear Induction Experiment. *Physical Review* 70 (7-8): 474–485.
- [71] Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. und Ernst, R. R. (1979). Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *The Journal of chemical physics* 71 (11): 4546.

- [72] Kumar, A., Ernst, R. R. und Wüthrich, K. (1980). A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 95 (1): 1–6.
- [73] Keeler, J. (2011). *Understanding NMR Spectroscopy*. John Wiley & Sons.
- [74] Abragam, A. (1961). *The Principles of Nuclear Magnetism*. Oxford University Press.
- [75] Lipari, G. und Szabo, A. (1982). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *Journal of the American Chemical Society* 104 (17): 4546–4559.
- [76] Lipari, G. und Szabo, A. (1982). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *Journal of the American Chemical Society* 104 (17): 4559–4570.
- [77] Morin, S. (2011). A practical guide to protein dynamics from ^{15}N spin relaxation in solution. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* 59 (3): 245–262.
- [78] Clore, G., Szabo, A., Bax, A., Kay, L. E., Driscoll, P.C. und Gronenborn, A. (1990). Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins. *Journal of the American Chemical Society* 112 (12): 4989–4991.
- [79] Mandel, A. M., Akke, M. und Palmer, A. G. (1995). Backbone dynamics of Escherichia coli ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme. *Journal of Molecular Biology* 246 (1): 144–163.
- [80] Fushman, D., Cahill, S. und Cowburn, D. (1997). The main-chain dynamics of the dynamin pleckstrin homology (PH) domain in solution: analysis of ^{15}N relaxation with monomer/dimer equilibration. *Journal of Molecular Biology* 266 (1): 173–194.
- [81] Orekhov, V. Y., Korzhnev, D. M., Diercks, T., Kessler, H. und Arseniev, A. S. (1999). ^1H - ^{15}N NMR dynamic study of an isolated α -helical peptide (1–36)- bacteriorhodopsin reveals the equilibrium helix-coil transitions - Springer. *Journal of biomolecular NMR* 14 (4): 345–356.
- [82] Korzhnev, D. M., Billeter, M., Arseniev, A. S. und Orekhov, V. Y. (2001). NMR studies of Brownian tumbling and internal motions in proteins. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* 38 (3): 197–266.
- [83] Zhuravleva, A. V., Korzhnev, D. M., Kupce, E., Arseniev, A. S., Billeter, M. und Orekhov, V. Y. (2004). Gated electron transfers and electron pathways in azurin: a NMR dynamic study at multiple fields and temperatures. *Journal of Molecular Biology* 342 (5): 1599–1611.
- [84] Palmer, A. G. (2004). NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules.

Chem Rev 104 (8): 3623–3640.

- [85] d’Auvergne, E. J. und Gooley, P. R. (2007). Optimisation of NMR dynamic models I. Minimisation algorithms and their performance within the model-free and Brownian rotational diffusion spaces. *Journal of biomolecular NMR* 40 (2): 107–119.
- [86] d’Auvergne, E. J. und Gooley, P. R. (2007). Optimisation of NMR dynamic models II. A new methodology for the dual optimisation of the model-free parameters and the Brownian rotational diffusion tensor. *Journal of biomolecular NMR* 40 (2): 121–133.
- [87] Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification* 41 (1): 207–234.
- [88] Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. und Bax, A. (1995). NMR-Pipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of biomolecular NMR* 6 (3): 277–293.
- [89] Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J. und Laue, E. D. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59 (4): 687–696.
- [90] Goddard, T. D. und Kneller, D. G. (2004). SPARKY 3, University of California San Francisco.
- [91] R Development Core Team (2008). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- [92] Wickham, H. (2009). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer New York.
- [93] Wickham, H. (2007). Reshaping data with the reshape package. *Journal of Statistical Software* 21 (12).
- [94] Wickham, H. (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software* 40 (1): 1–29.
- [95] B.J.Grant, A.P.C. Rodrigues, K.M. ElSawy, McCammon, J. und L.S.D. Caves (2006). Bio3D: An R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* 22: 2695–2696.
- [96] Nychka, D., Furrer, R., Paige, J. und Sain, S. (2006). *fields: Tools for Spatial Data*. National Center for Atmospheric Research, Boulder, CO. R package version 8.3-5.
- [97] d’Auvergne, E. J. (2006). *Protein dynamics. A study of the model-free analysis of NMR relaxation data*. Dissertation, University of Melbourne.
- [98] Word, J. M., Lovell, S. C., Richardson, J. S. und Richardson, D. C. (1999). Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation. *Journal of Molecular Biology* 285 (4): 1735–1747.

- [99] Garcia de la Torre, J., Huertas, M. L. und Carrasco, B. (2000). HYDRONMR: Prediction of NMR Relaxation of Globular Proteins from Atomic-Level Structures and Hydrodynamic Calculations. *Journal of Magnetic Resonance* 147 (1): 138–146.
- [100] T.M. Laue, B.D. Shah, T.M. Ridgeway und S.L. Pelletier (1992). *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Royal Society of Chemistry.
- [101] Beerbaum, M., Ballaschk, M., Erdmann, N., Schnick, C., Diehl, A., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. und Schmieder, P. (2013). NMR spectroscopy reveals unexpected structural variation at the protein–protein interface in MHC class I molecules. *Journal of biomolecular NMR* 57 (2): 167–178.
- [102] Garboczi, D. N., Hung, D. T. und Wiley, D. C. (1992). HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8): 3429–3433.
- [103] Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D. und Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 112: 531–552.
- [104] Insaiddoo, F. K., Zajicek, J. und Baker, B. M. (2009). A general and efficient approach for NMR studies of peptide dynamics in class I MHC peptide binding grooves. *Biochemistry* 48 (41): 9708–9710.
- [105] Kohno, T., Kusunoki, H., Sato, K. und Wakamatsu, K. (1998). A new general method for the biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system: an application to the production of mastoparan-X uniformly enriched with ^{15}N and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. *Journal of biomolecular NMR* 12 (1): 109–121.
- [106] Yu, H.-A., Kim, S.-G., Kim, E.-J., Lee, W.-J., Kim, D.-O., Park, K., Park, Y.-C. und Seo, J.-H. (2007). Characterization of ubiquitin C-terminal hydrolase 1 (YUH1) from *Saccharomyces cerevisiae* expressed in recombinant *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* 56 (1): 20–26.
- [107] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680–685.
- [108] Viles, J. H., Duggan, B. M., Zaborowski, E., Schwarzingler, S., Huntley, J. J., Kroon, G. J., Dyson, H. J. und Wright, P. E. (2001). Potential bias in NMR relaxation data introduced by peak intensity analysis and curve fitting methods. *Journal of biomolecular NMR* 21 (1): 1–9.
- [109] Gabriel, E., Fagg, G. E., Bosilca, G., Angskun, T., Dongarra, J. J., Squyres, J. M., Sahay, V., Kambadur, P., Barrett, B., Lumsdaine, A., Castain, R. H., Daniel, D. J., Graham, R. L. und Woodall, T. S. (2004). Open MPI: Goals, Concept, and Design of a Next Generation MPI Implementation. In *Proceedings, 11th European PVM/MPI Users' Group Meeting*, 97–104.

Budapest, Hungary.

- [110] Morin, S. (2010). *Motions, Order and Consistency – A Story Based on the Study of the Dynamics of the Class A β -Lactamase PSE-4 by NMR*. Dissertation, Université Laval Québec.
- [111] d’Auvergne, E. J. und Gooley, P. R. (2006). Model-free model elimination: A new step in the model-free dynamic analysis of NMR relaxation data. *Journal of biomolecular NMR* 35 (2): 117–135.
- [112] d’Auvergne, E. J. und Gooley, P. R. (2003). The use of model selection in the model-free analysis of protein dynamics. *Journal of biomolecular NMR* 25 (1): 25–39.
- [113] Horne, J., d’Auvergne, E. J., Coles, M., Velkov, T., Chin, Y., Charman, W. N., Prankerd, R., Gooley, P. R. und Scanlon, M. J. (2007). Probing the Flexibility of the DsbA Oxidoreductase from *Vibrio cholerae*—a ^{15}N - ^1H Heteronuclear NMR Relaxation Analysis of Oxidized and Reduced Forms of DsbA. *Journal of Molecular Biology* 371 (3): 703–716.
- [114] Chae, Y., Lee, H. und Lee, W.-J. (2007). Ubiquitin Fusion System for Recombinant Peptide Expression and Purification: Application to the Cytoplasmic Domain of Syndecan-4. *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY* 28 (9): 1549.
- [115] Moon, W. J., Hwang, D. K., Park, E. J., Kim, Y. M. und Chae, Y. K. (2007). Recombinant expression, isotope labeling, refolding, and purification of an antimicrobial peptide, piscidin. *Protein expression and purification* 51 (2): 141–146.
- [116] Schanda, P., Kupce, E. und Brutscher, B. (2005). SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds. *Journal of biomolecular NMR* 33 (4): 199–211.
- [117] Piotto, M., Saudek, V. und Sklenár, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of biomolecular NMR* 2 (6): 661–665.
- [118] Chen, K. und Tjandra, N. (2011). Water proton spin saturation affects measured protein backbone ^{15}N spin relaxation rates. *Journal of Magnetic Resonance* 213 (1): 151–157.
- [119] Geen, H. und Freeman, R. (1991). Band-selective radiofrequency pulses. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 93 (1): 93–141.
- [120] Lakomek, N.-A., Ying, J. und Bax, A. (2012). Measurement of ^{15}N relaxation rates in perdeuterated proteins by TROSY-based methods. *Journal of biomolecular NMR* 53 (3): 209–221.
- [121] Ferrage, F., Reichel, A., Battacharya, S., Cowburn, D. und Ghose, R. (2010). On the measurement of ^{15}N – ^1H nuclear Overhauser effects. 2. Effects of the saturation scheme and water signal suppression. *Journal of Magnetic Resonance* 207 (2): 294–303.

- [122] Gong, Q. und Ishima, R. (2007). ^{15}N - ^1H NOE experiment at high magnetic field strengths. *Journal of biomolecular NMR* 37 (2): 147–157.
- [123] Ferrage, F., Piserchio, A., Cowburn, D. und Ghose, R. (2008). On the measurement of ^{15}N - ^1H nuclear Overhauser effects. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif : 1997)* 192 (2): 302–313.
- [124] Findeisen, M., Brand, T. und Berger, S. (2007). ^1H -NMR thermometer suitable for cryoprobes. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* 45 (2): 175–178.
- [125] Ikura, M., Kay, L. E. und Bax, A. (1990). A novel approach for sequential assignment of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry* 29 (19): 4659–4667.
- [126] Grzesiek, S. und Bax, A. (1992). Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 96 (2): 432–440.
- [127] Yamazaki, T., Lee, W., Arrowsmith, C. H., Muhandiram, D. R. und Kay, L. E. (1994). A Suite of Triple Resonance NMR Experiments for the Backbone Assignment of ^{15}N , ^{13}C , ^2H Labeled Proteins with High Sensitivity. *Journal of the American Chemical Society* 116 (26): 11655–11666.
- [128] Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. und Wüthrich, K. (1997). Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (23): 12366–12371.
- [129] Bodenhausen, G. und Ruben, D. J. (1980). Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 69 (1): 185–189.
- [130] Tugarinov, V. und Kay, L. E. (2003). Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods. *Journal of the American Chemical Society* 125 (45): 13868–13878.
- [131] Tugarinov, V. und Kay, L. E. (2005). Methyl groups as probes of structure and dynamics in NMR studies of high-molecular-weight proteins. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 6 (9): 1567–1577.
- [132] Bailey, A., Dalchau, N., Carter, R., Emmott, S., Phillips, A., Werner, J. M. und Elliott, T. (2015). Selector function of MHC I molecules is determined by protein plasticity. *Scientific reports* 5: 14928.
- [133] Bailey, A., van Hateren, A., Elliott, T. und Werner, J. M. (2014). Two polymorphisms facilitate differences in plasticity between two chicken major histocompatibility complex class I proteins. *PloS one* 9 (2): e89657.
- [134] Hawse, W. F., Champion, M. M., Joyce, M. V., Hellman, L. M., Hossain, M., Ryan, V.,

- Pierce, B. G., Weng, Z. und Baker, B. M. (2012). Cutting Edge: Evidence for a Dynamically Driven T Cell Signaling Mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 188 (12): 5819–5823.
- [135] Shi, Y., Qi, J., Iwamoto, A. und Gao, G. F. (2011). Plasticity of human CD8 $\alpha\alpha$ binding to peptide-HLA-A*2402. *Molecular immunology* 48 (15-16): 2198–2202.
- [136] Wearsch, P. A. und Cresswell, P. (2008). The quality control of MHC class I peptide loading. *Current Opinion in Cell Biology* 20 (6): 624–631.
- [137] Lewis, J. W., Neisig, A., Neefjes, J. und Elliott, T. (1996). Point mutations in the alpha 2 domain of HLA-A2.1 define a functionally relevant interaction with TAP. *Current Biology* 6 (7): 873–883.
- [138] Dong, G., Wearsch, P. A., Peaper, D. R., Cresswell, P. und Reinisch, K. M. (2009). Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity* 30 (1): 21–32.
- [139] Adams, J. J., Narayanan, S., Birnbaum, M. E., Sidhu, S. S., Blevins, S. J., Gee, M. H., Sibener, L. V., Baker, B. M., Kranz, D. M. und Garcia, K. C. (2016). Structural interplay between germline interactions and adaptive recognition determines the bandwidth of TCR-peptide-MHC cross-reactivity. *Nature immunology* 17 (1): 87–94.
- [140] Borbulevych, O. Y., Piepenbrink, K. H. und Baker, B. M. (2011). Conformational melding permits a conserved binding geometry in TCR recognition of foreign and self molecular mimics. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186 (5): 2950–2958.
- [141] Piepenbrink, K. H., Blevins, S. J., Scott, D. R. und Baker, B. M. (2013). The basis for limited specificity and MHC restriction in a T cell receptor interface. *Nature communications* 4: 1948.
- [142] Staley, J. P. und Kim, P. S. (1994). Formation of a native-like subdomain in a partially folded intermediate of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Protein science : a publication of the Protein Society* 3 (10): 1822–1832.
- [143] Satakarni, M. und Curtis, R. (2011). Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. *Protein expression and purification* 78 (2): 113–119.
- [144] Borbulevych, O. Y., Baxter, T. K., Yu, Z., Restifo, N. P. und Baker, B. M. (2005). Increased immunogenicity of an anchor-modified tumor-associated antigen is due to the enhanced stability of the peptide/MHC complex: implications for vaccine design. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 174 (8): 4812–4820.

Anhang

1 Intensitäten der HN-TROSY-Spektren



Abb. 1: Intensitäten von ^{15}N - ^1H -TROSY-Spektren der schweren Ketten der HLA-Komplexe, aufgetragen gegen die Aminosäurezahl. Nur nicht-überlappende Signale wurden berücksichtigt.

2 Chemische Verschiebungen der schweren Ketten

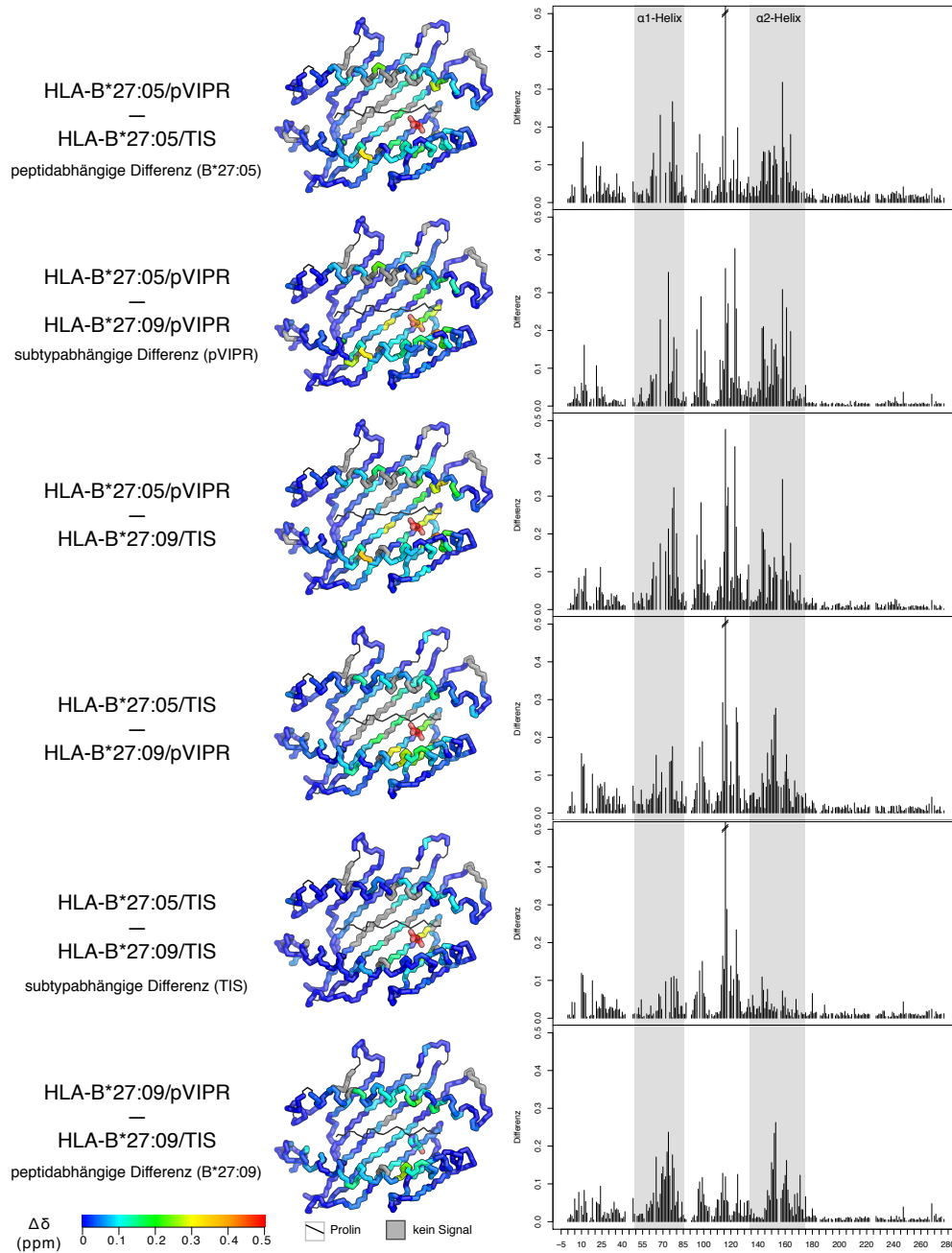


Abb. 2: Mappings und Diagramme der Differenzen der chemischen HN-Verschiebungen der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domänen der schweren Ketten HLA-B*27:05 oder HLA-B*27:09 mit pVIPR oder TIS. Farben der Strukturen wie in Abb. 3.10, Helices im Diagramm schattiert.

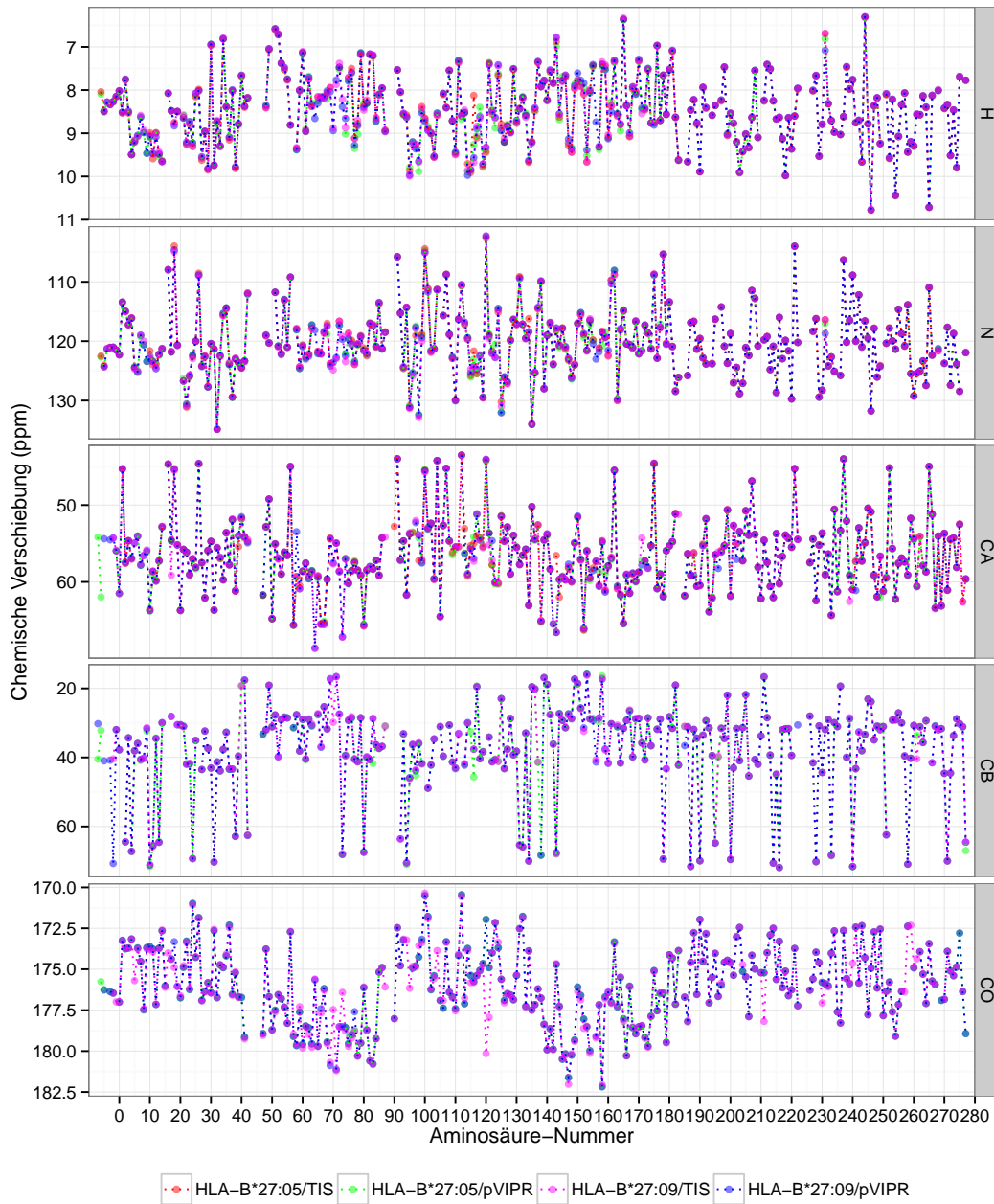


Abb. 3: Chemische Verschiebungen der schweren Ketten von HLA-B*27:05 oder HLA-B*27:09 mit pVIPR oder TIS. Die meisten Verschiebungen sind identisch, vor allem in Regionen der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Domäne ergeben sich Unterschiede. Chemische Verschiebungen von H, N, C_{α} , C_{β} und C_{γ} sind in ppm angegeben. Für HLA-B*27:05/TIS sind nur die Verschiebungen von H, N und C_{α} angegeben. Die zugrundeliegenden Werte finden sich in der BMRB-Datenbank unter den IDs, die in Tabelle 3.3 angegeben sind.

3 Chemische Verschiebungen von β_2 -Mikroglobulin aus dem Huhn

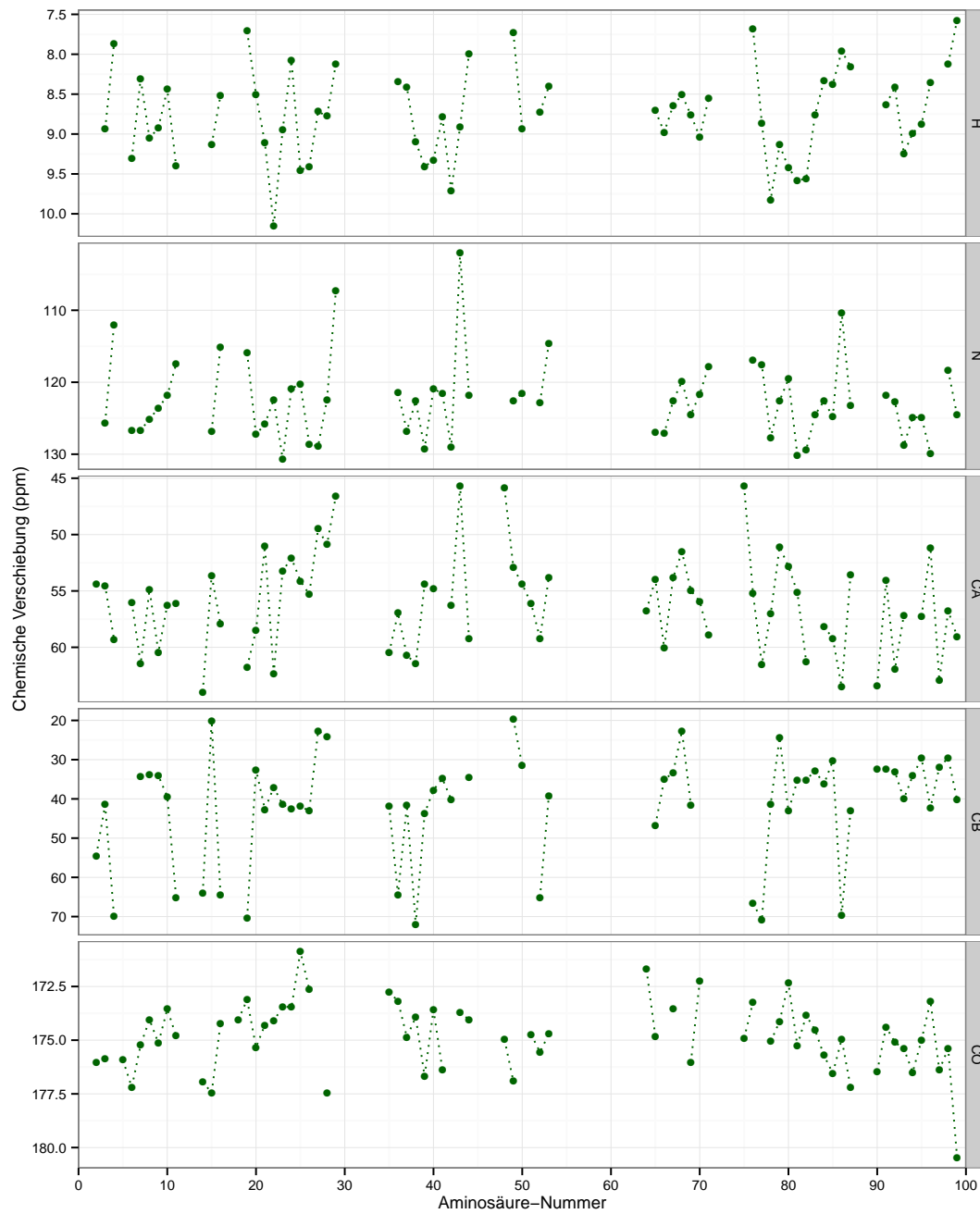


Abb. 4: Chemische Verschiebungen von β_2m aus *Gallus gallus*.

4 Relaxationsdaten der HLA-Komplexe

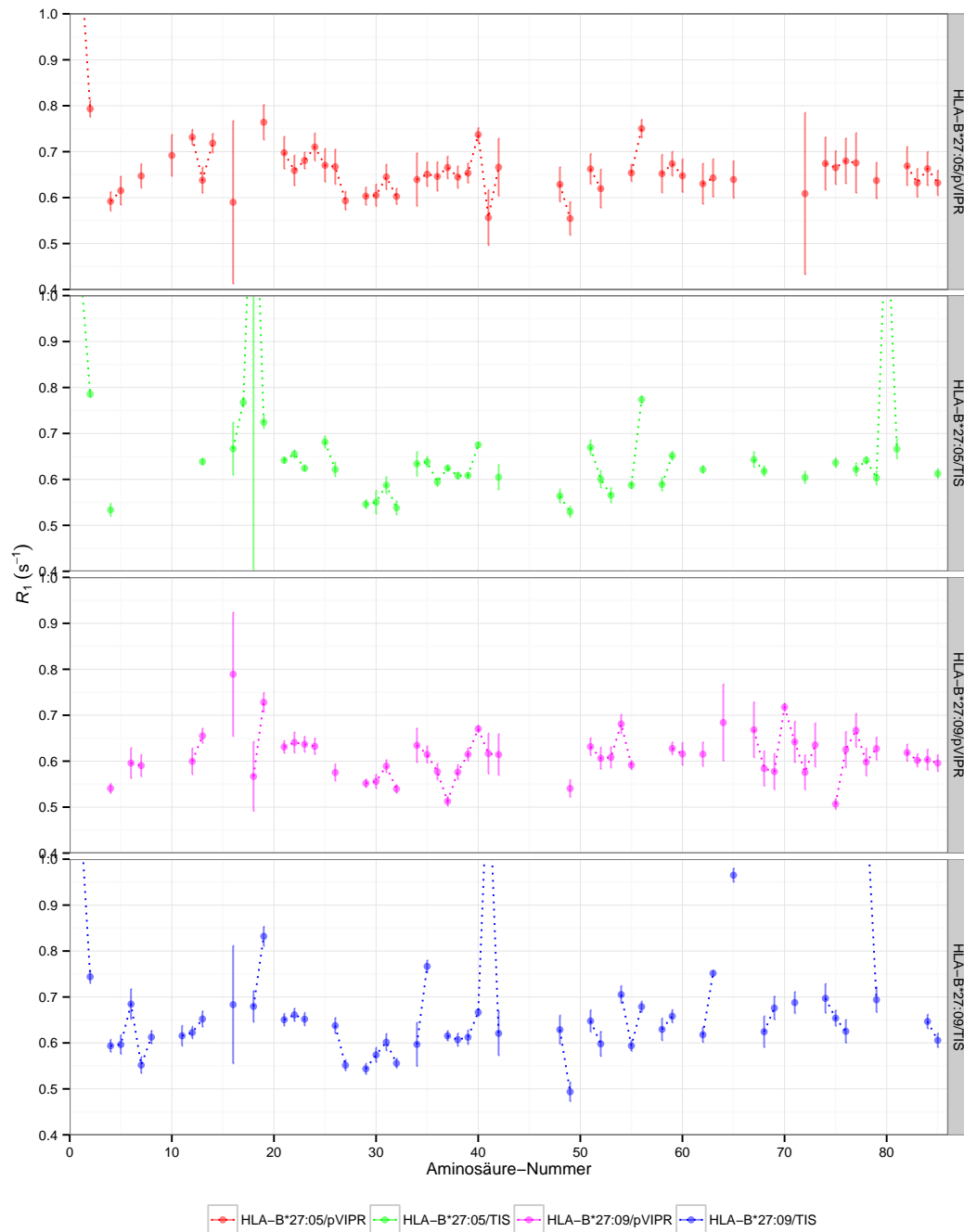


Abb. 5: Sequentielle Auftragung der longitudinalen Relaxationsrate (R_1) der $\alpha 1$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

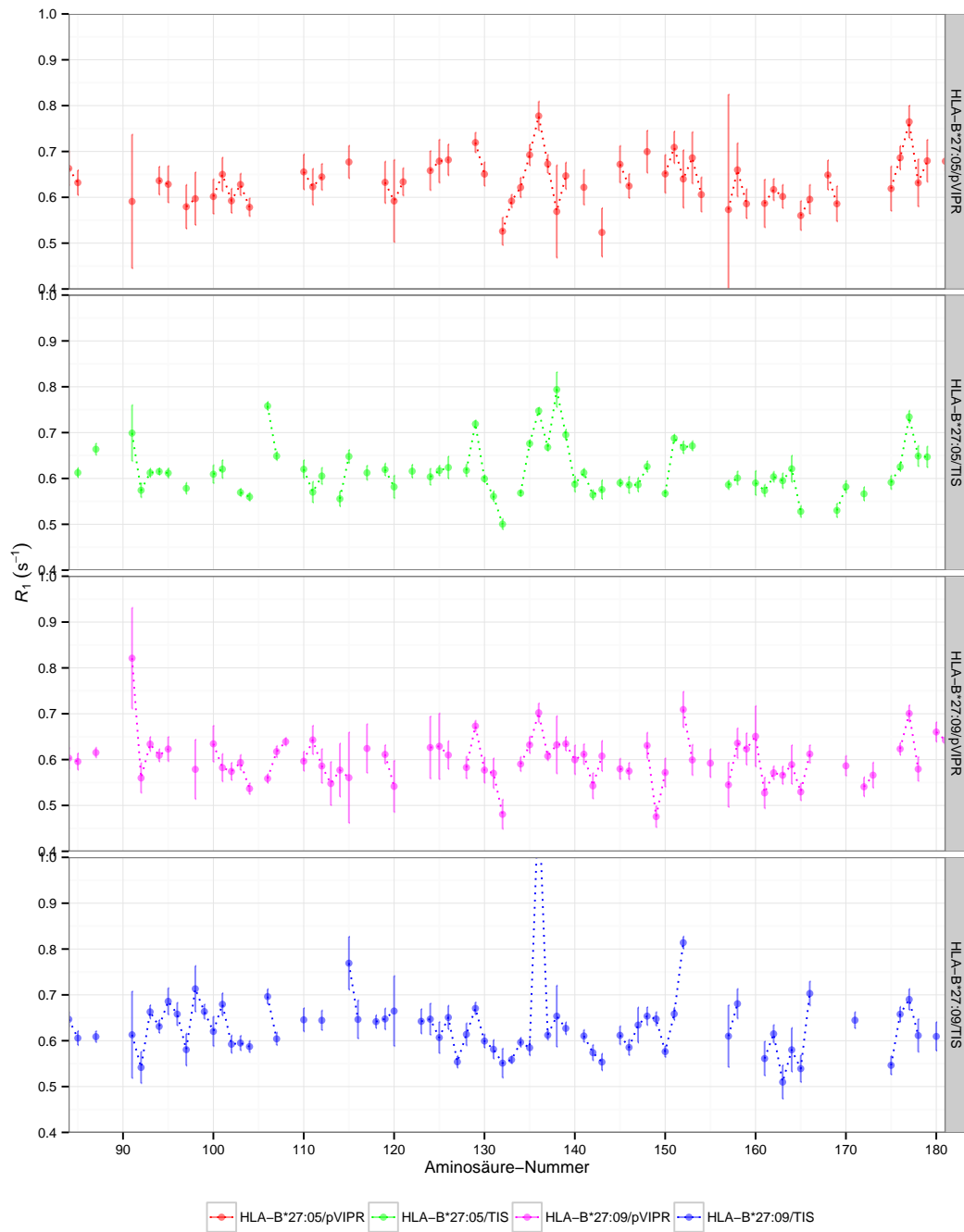


Abb. 6: Sequentielle Auftragung der longitudinalen Relaxationsrate (R_1) der $\alpha 2$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

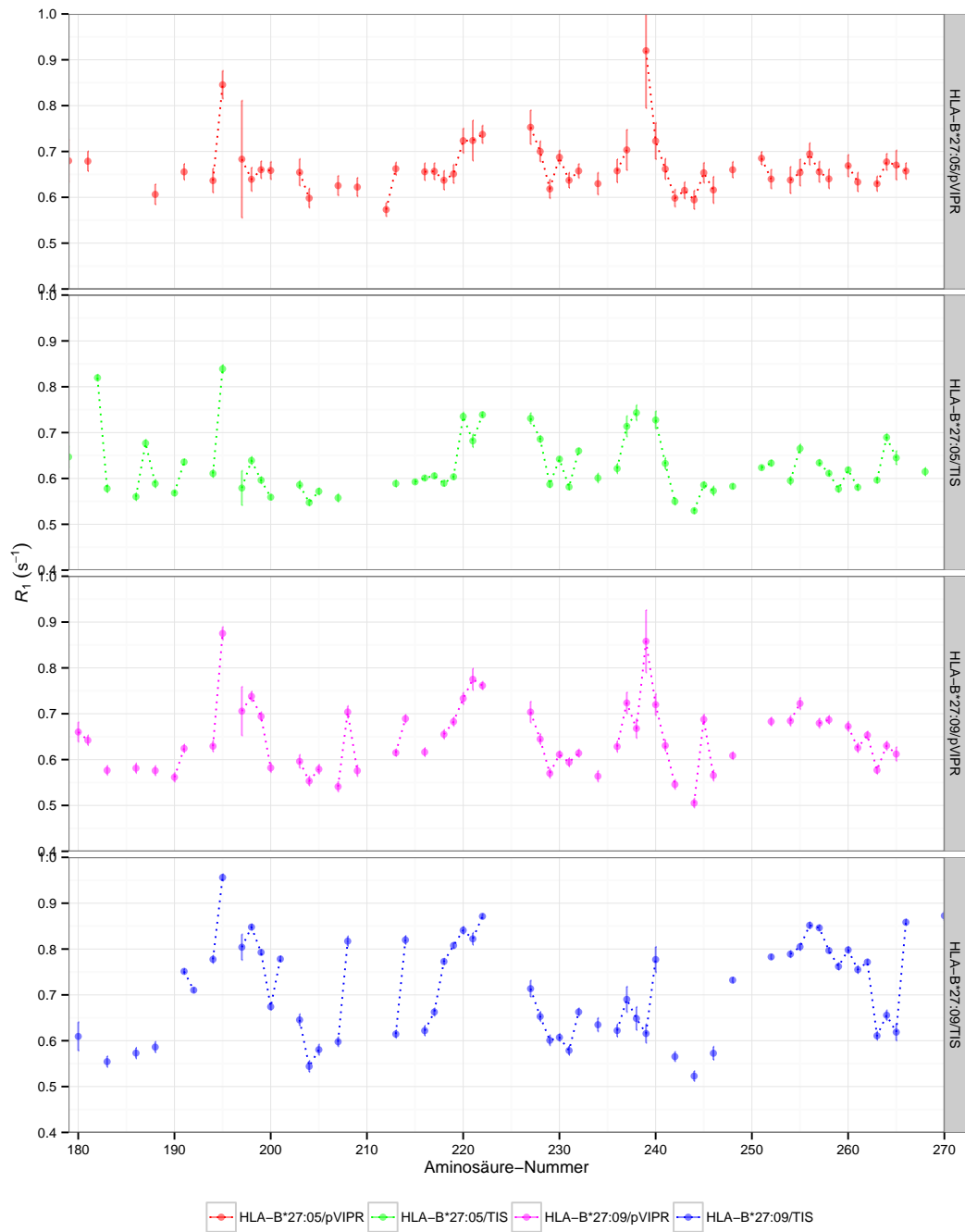


Abb. 7: Sequentielle Auftragung der longitudinalen Relaxationsrate (R_1) der $\alpha 3$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

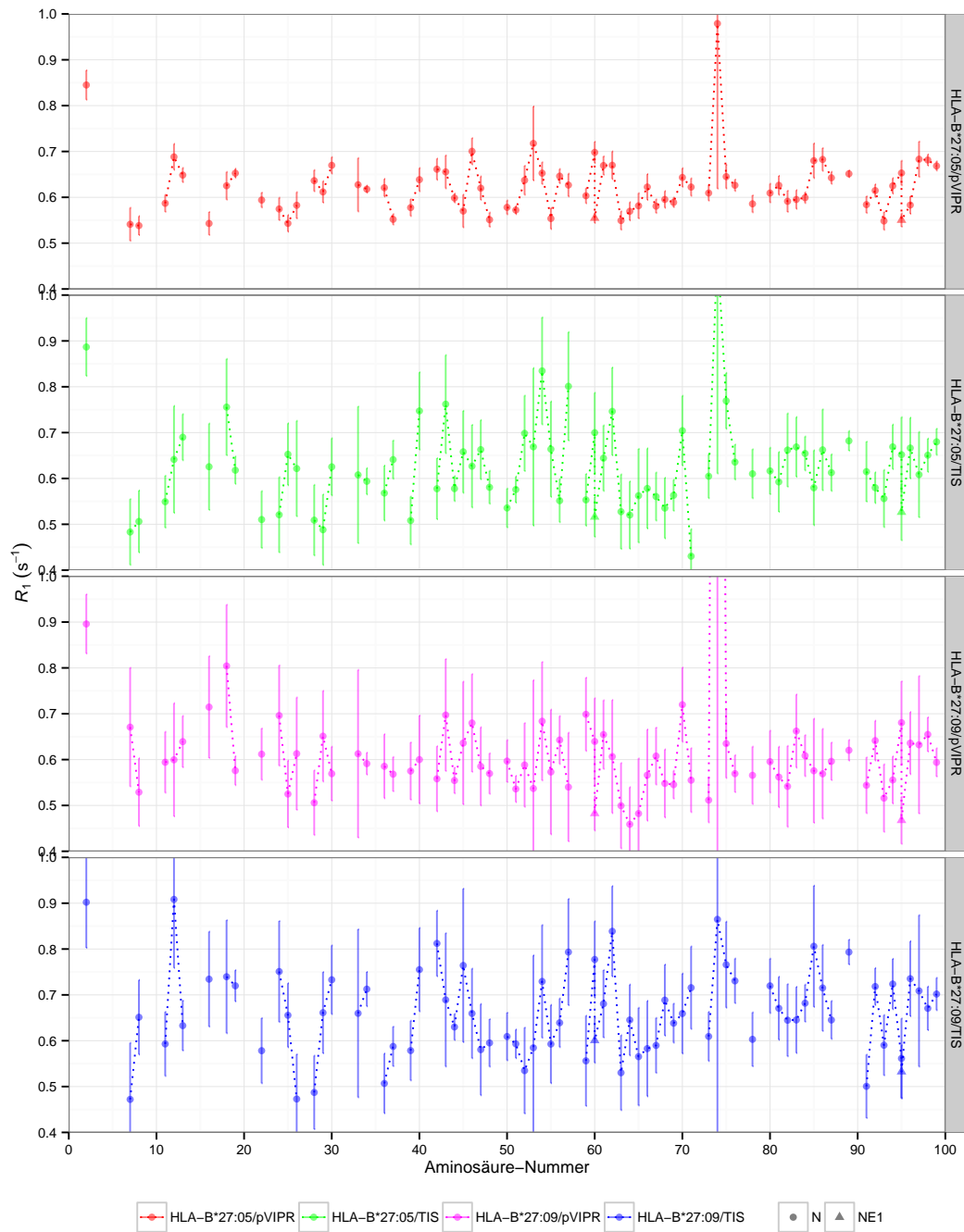


Abb. 8: Sequentielle Auftragung der longitudinalen Relaxationsrate (R_1) des β_2m im Komplex mit HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

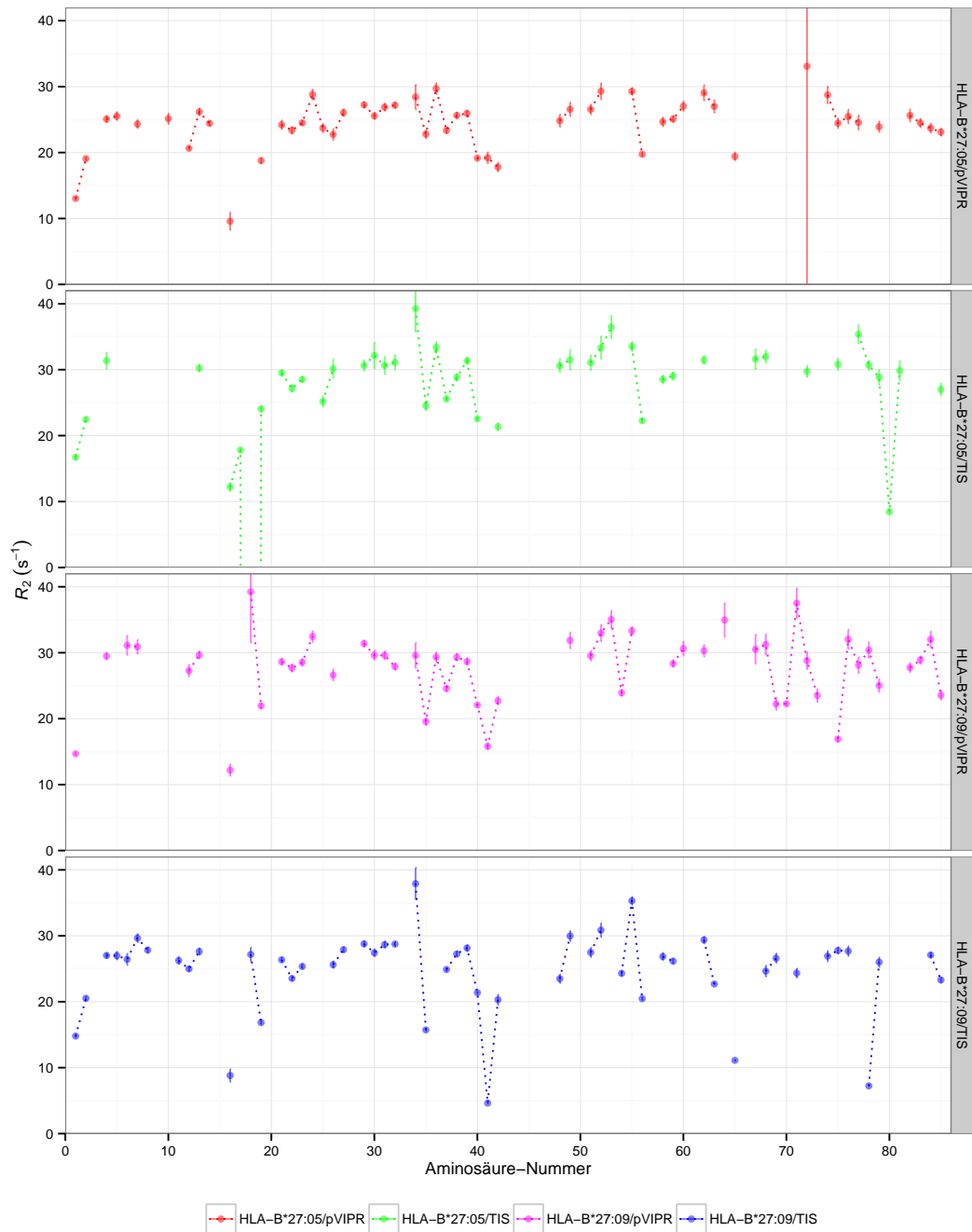


Abb. 9: Sequentielle Auftragung der transversalen Relaxationsrate (R_2) der $\alpha 1$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

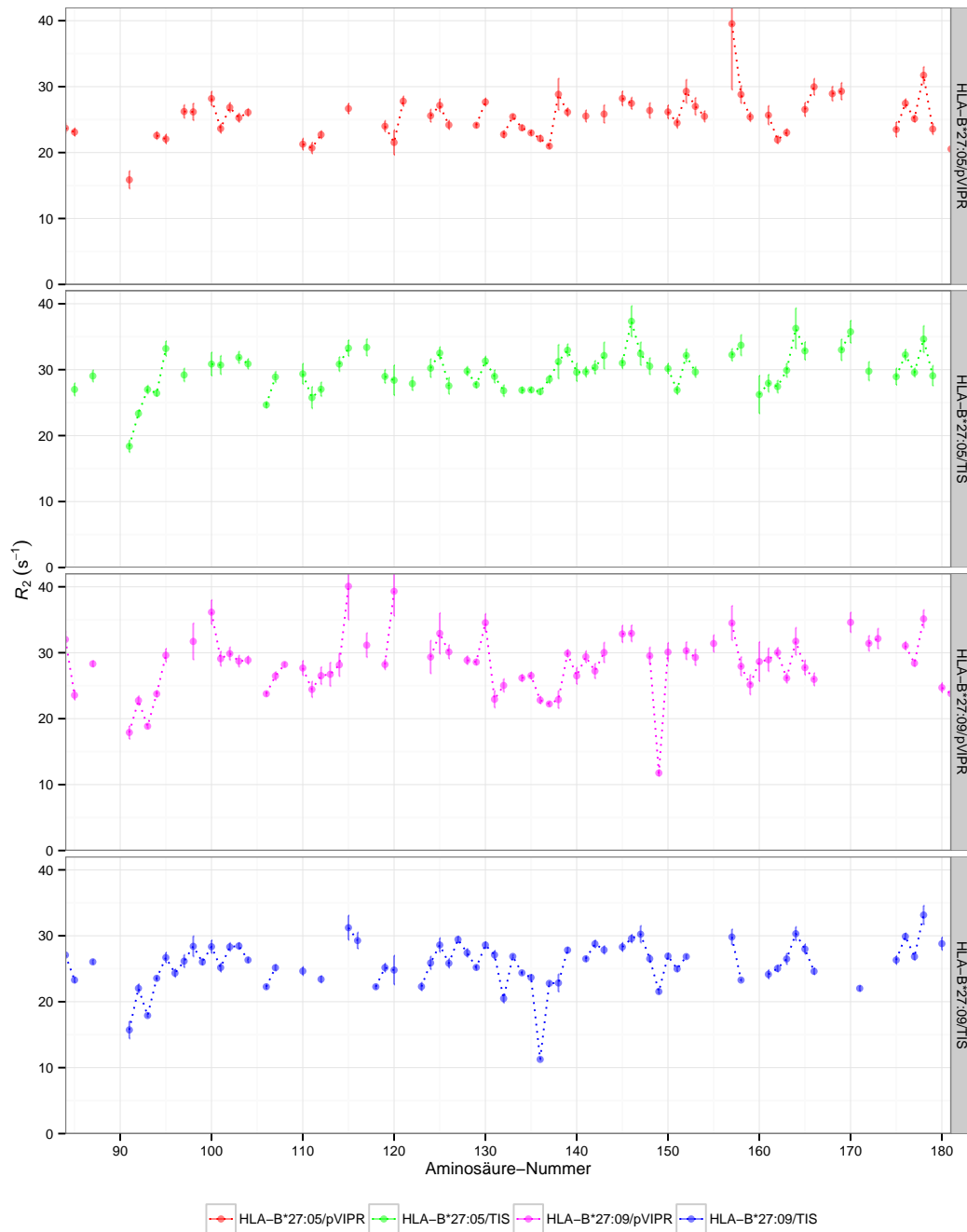


Abb. 10: Sequentielle Auftragung der transversalen Relaxationsrate (R_2) der α_2 -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

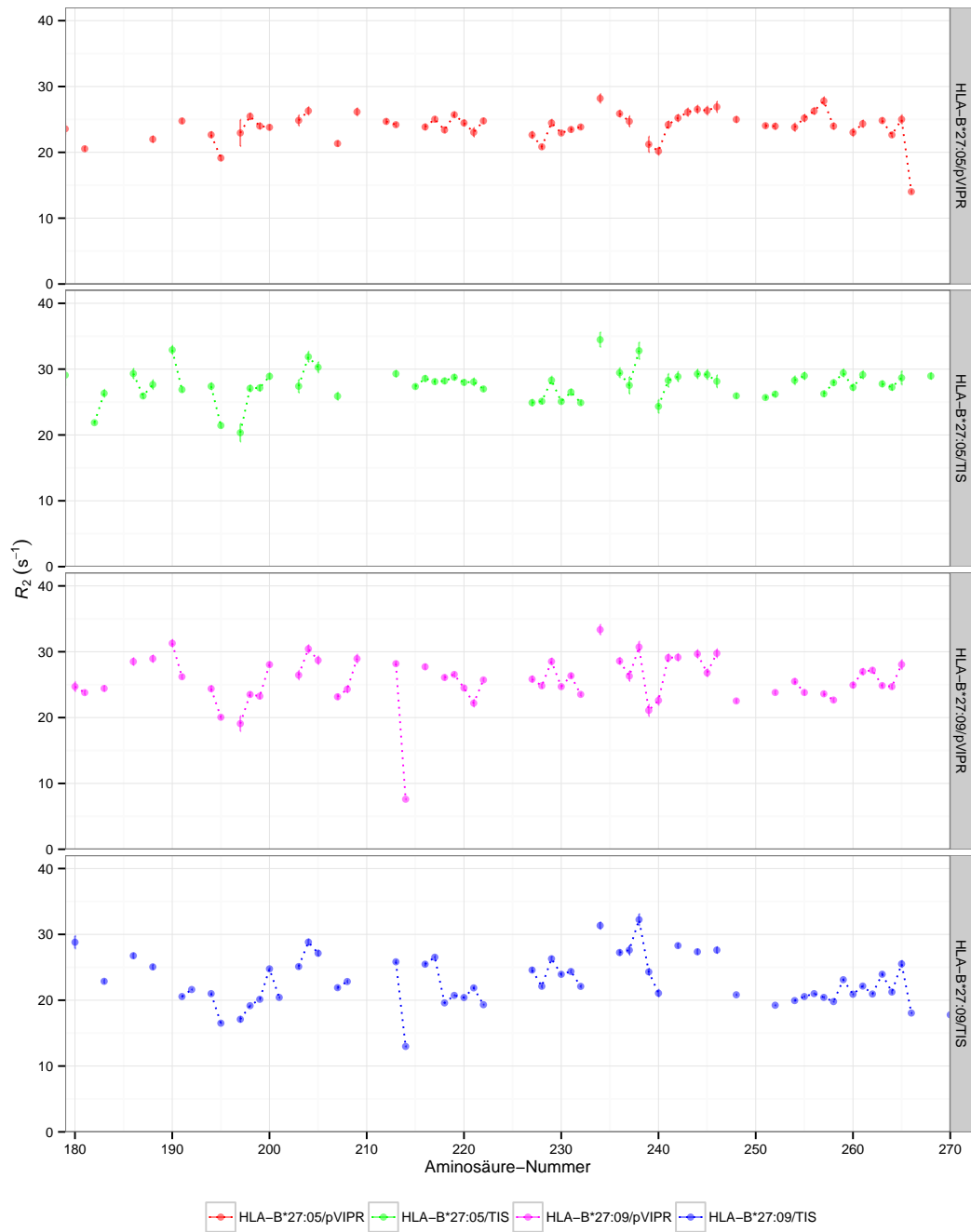


Abb. 11: Sequentielle Auftragung der transversalen Relaxationsrate (R_2) der α_3 -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

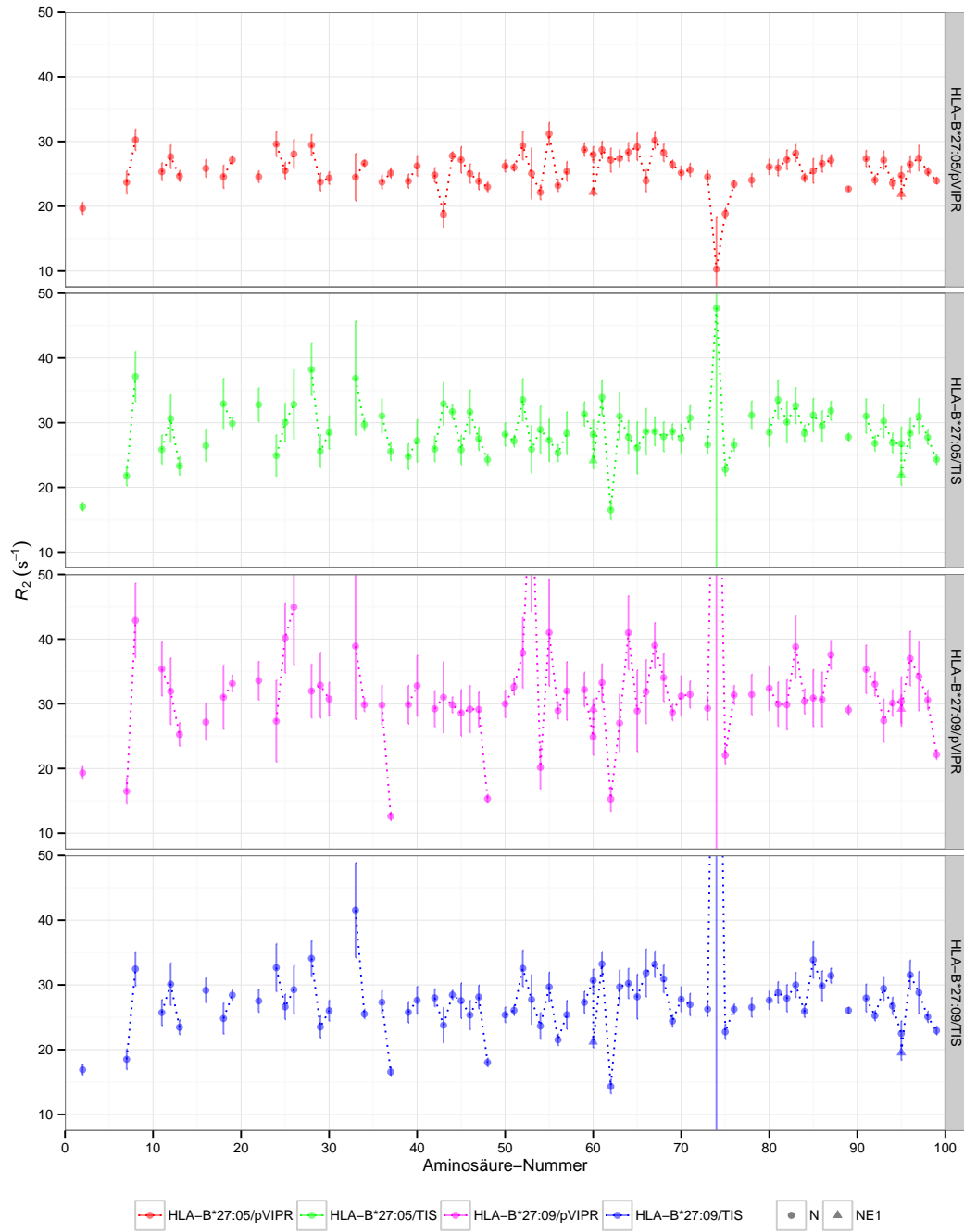


Abb. 12: Sequentielle Auftragung der transversalen Relaxationsrate (R_2) des β_2m im Komplex mit HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

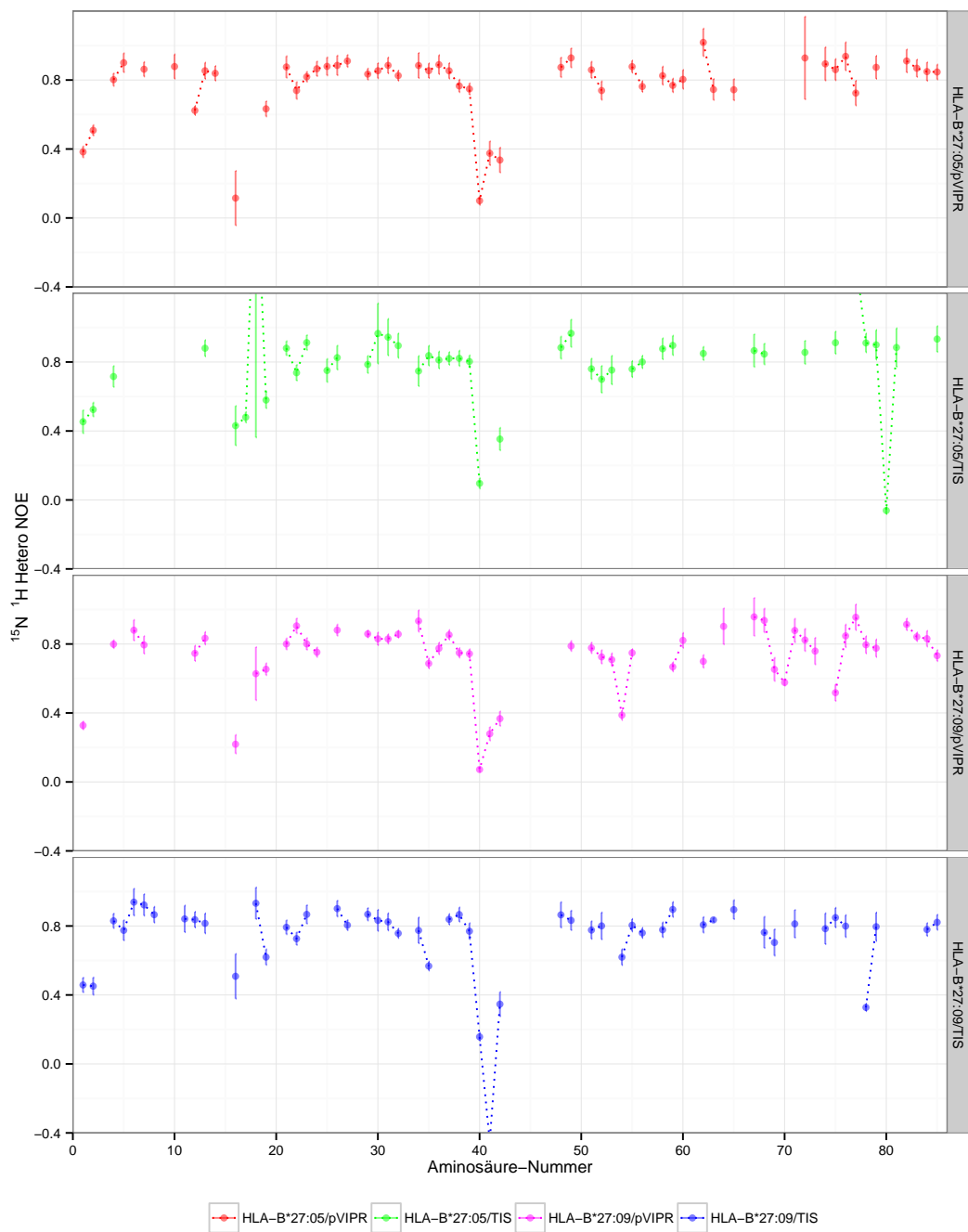


Abb. 13: Sequentielle Auftragung des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE der $\alpha 1$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

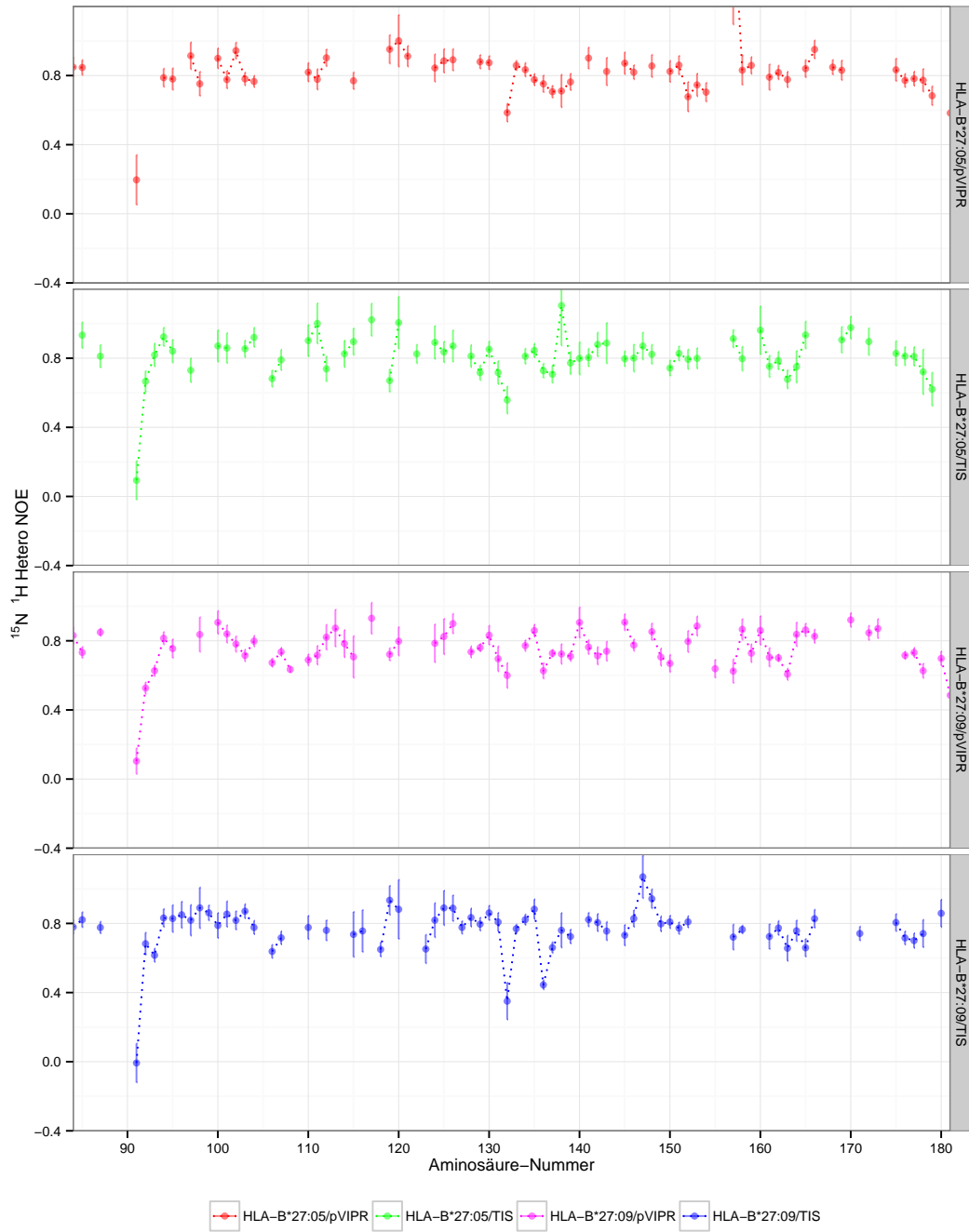


Abb. 14: Sequentielle Auftragung des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE der α 2-Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

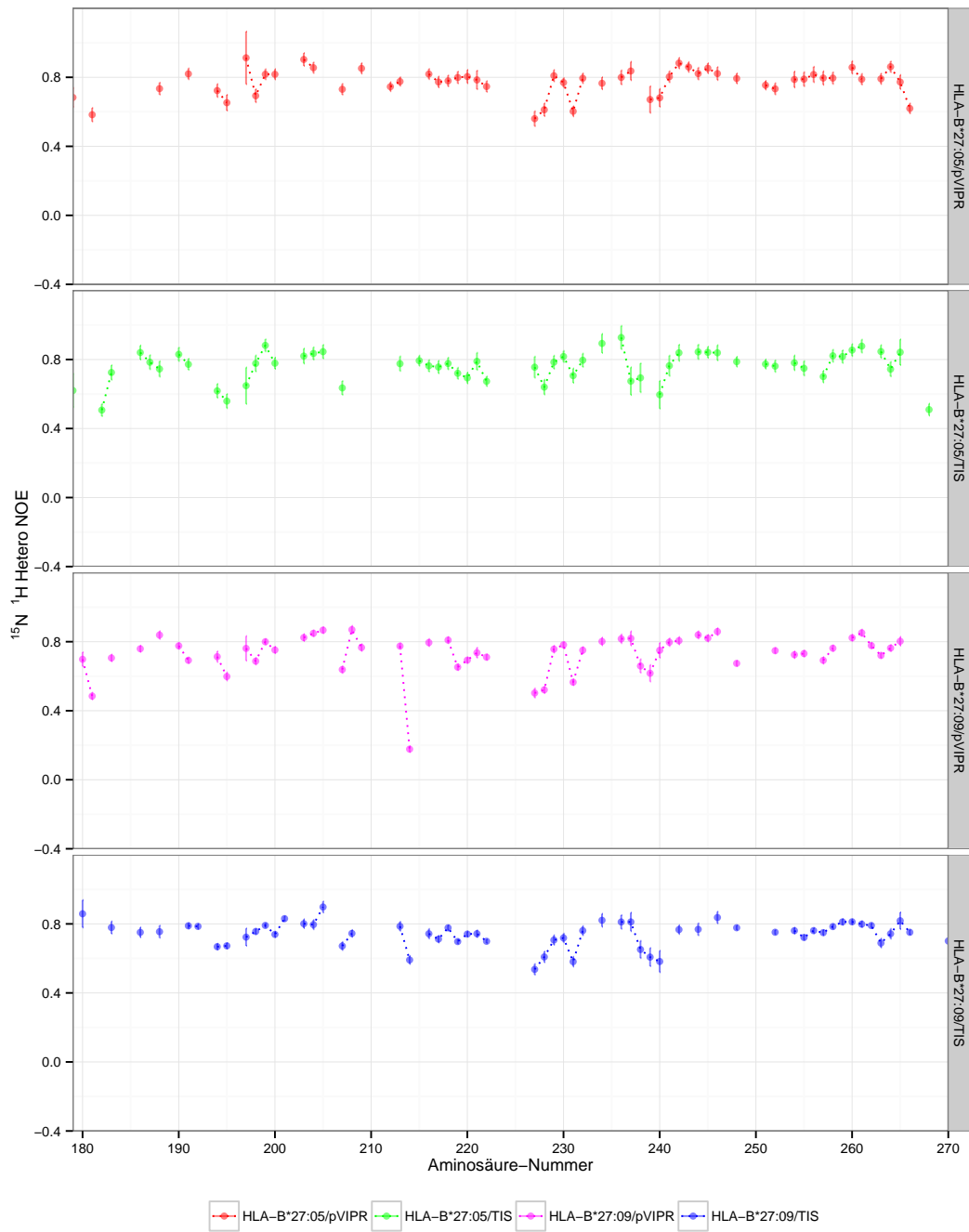


Abb. 15: Sequentielle Auftragung des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE der α 3-Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

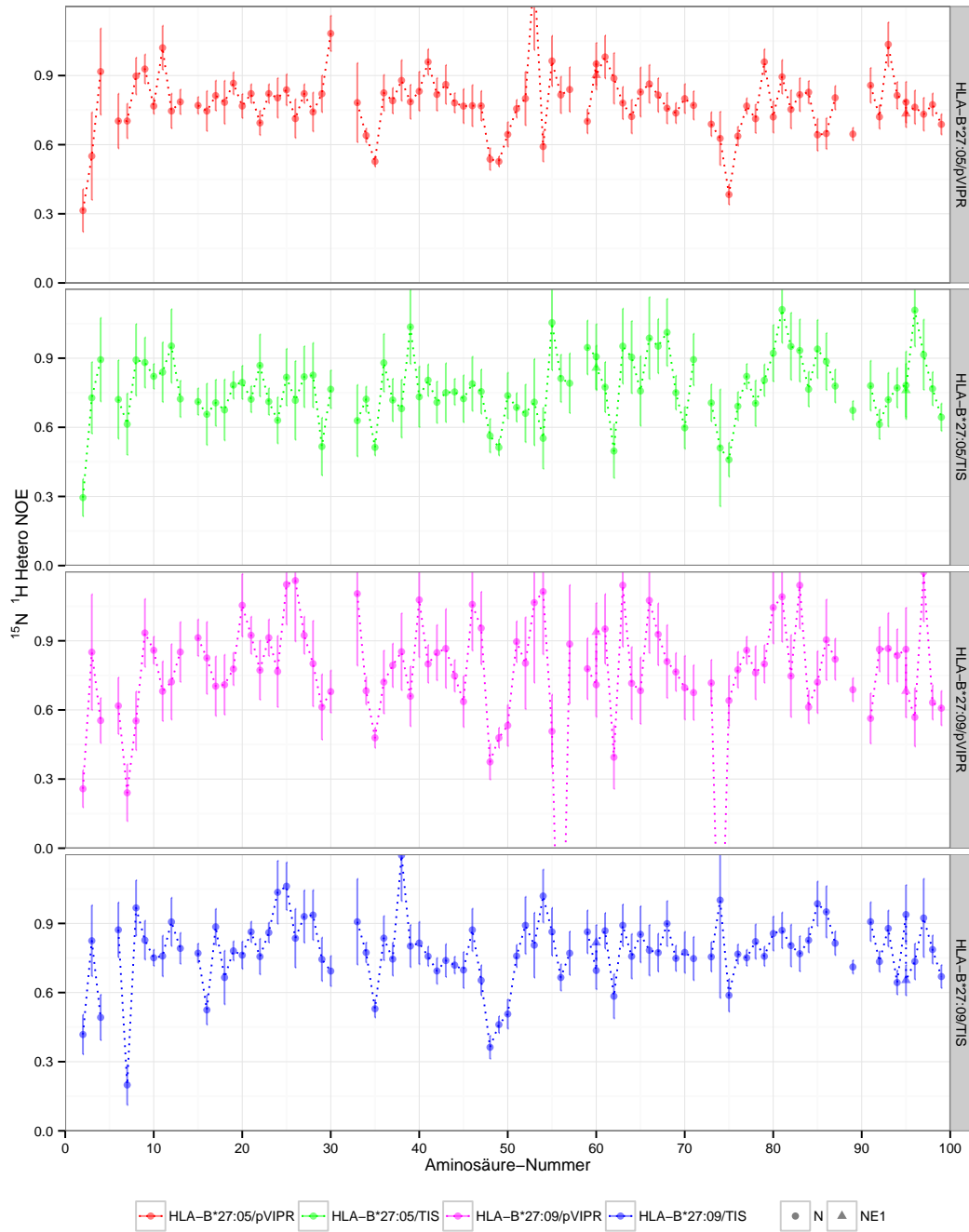


Abb. 16: Sequentielle Auftragung des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE des $\beta_2\text{m}$ im Komplex mit HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 600 MHz.

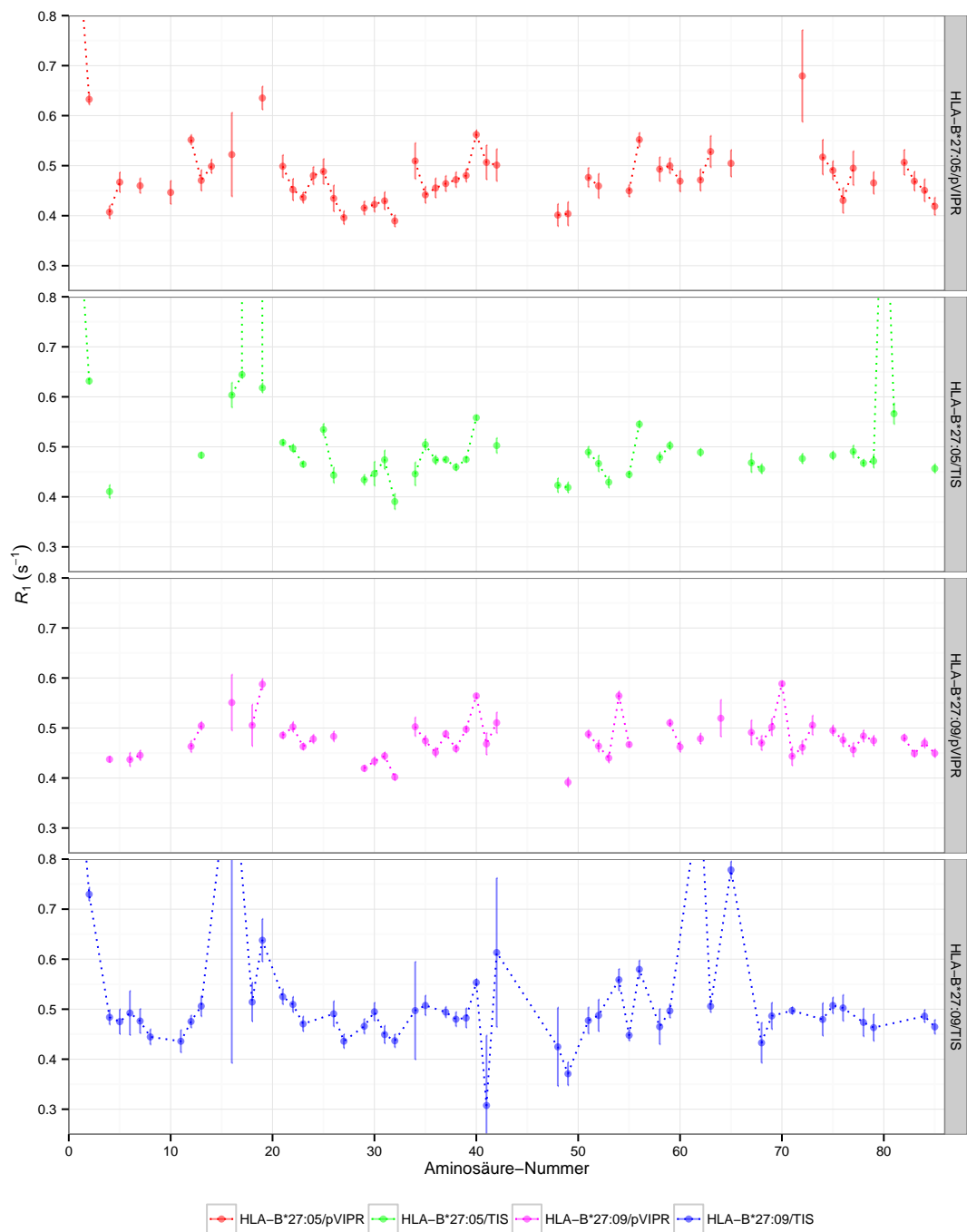


Abb. 17: Sequentielle Auftragung der longitudinalen Relaxationsrate (R_1) der α 1-Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

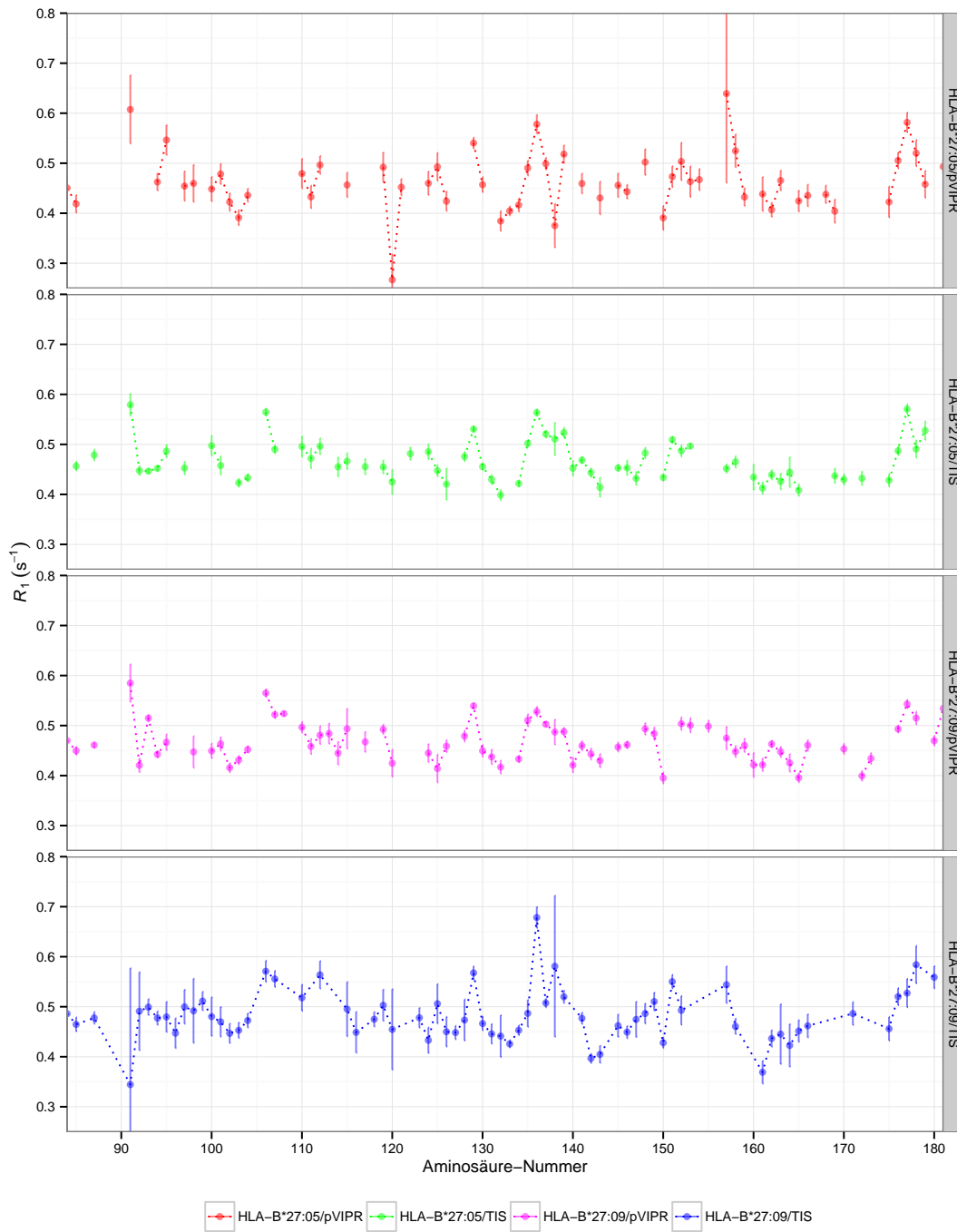


Abb. 18: Sequentielle Auftragung der longitudinalen Relaxationsrate (R_1) der $\alpha 2$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

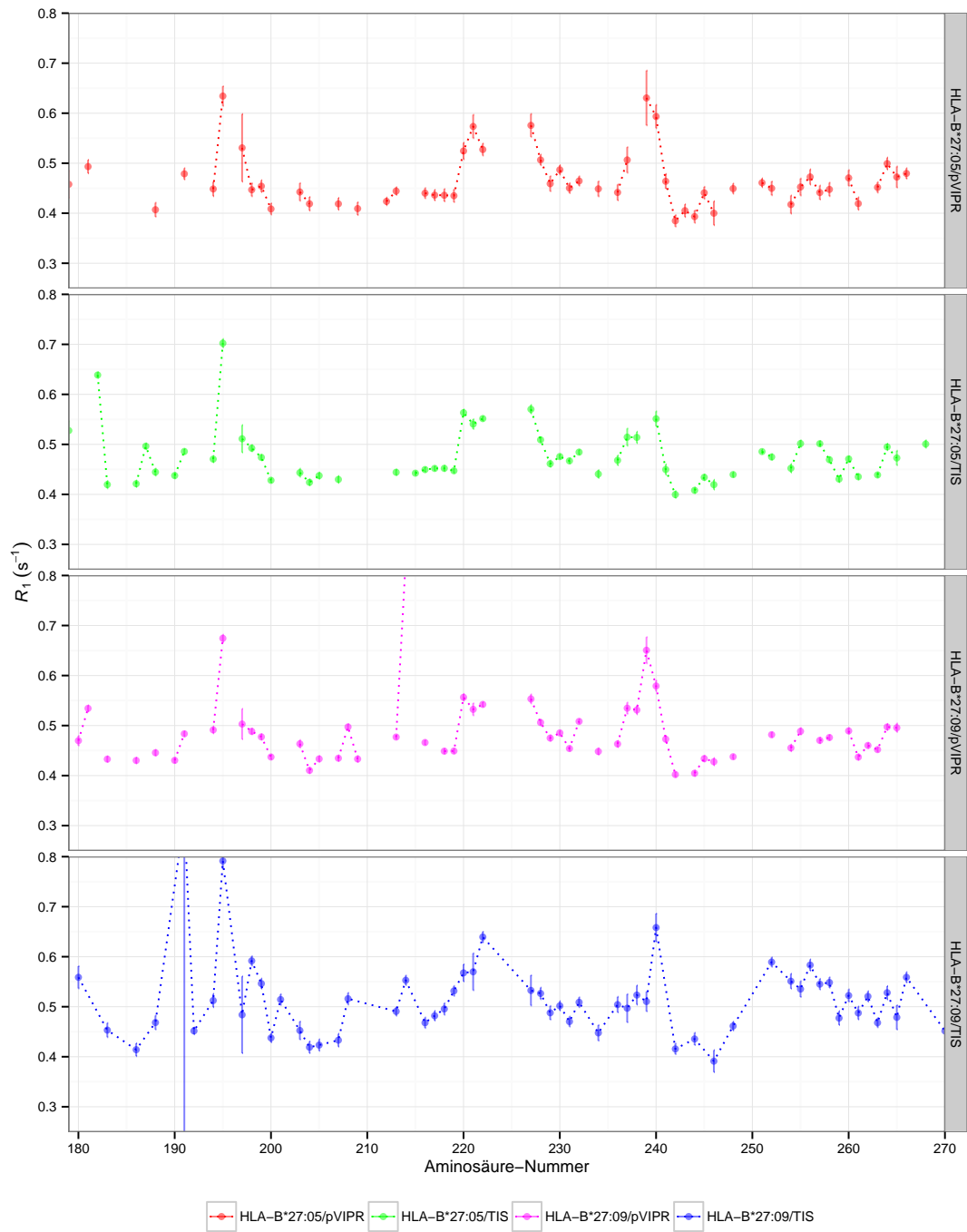


Abb. 19: Sequentielle Auftragung der longitudinalen Relaxationsrate (R_1) der $\alpha 3$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

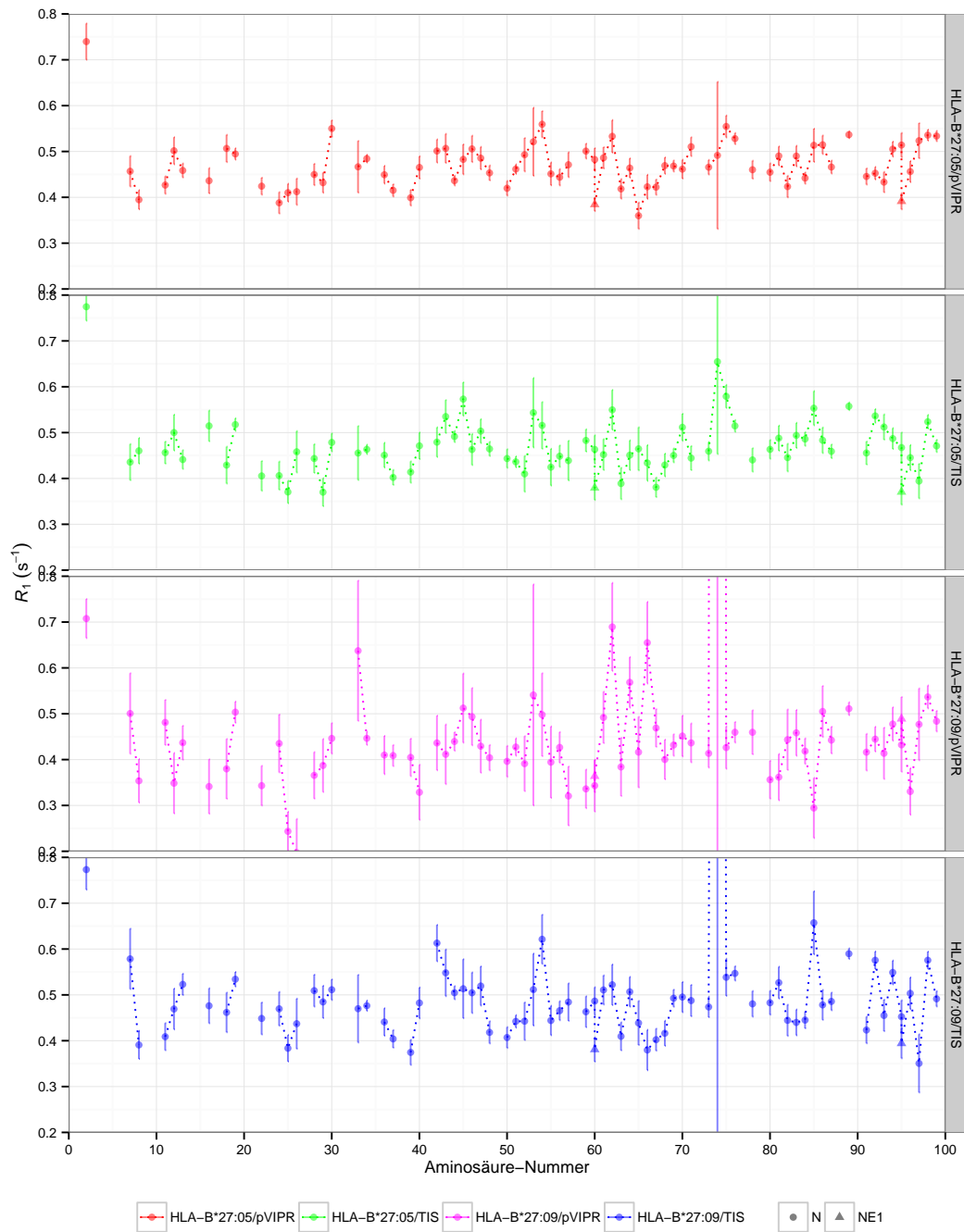


Abb. 20: Sequentielle Auftragung der longitudinalen Relaxationsrate (R_1) des β_2m im Komplex mit HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

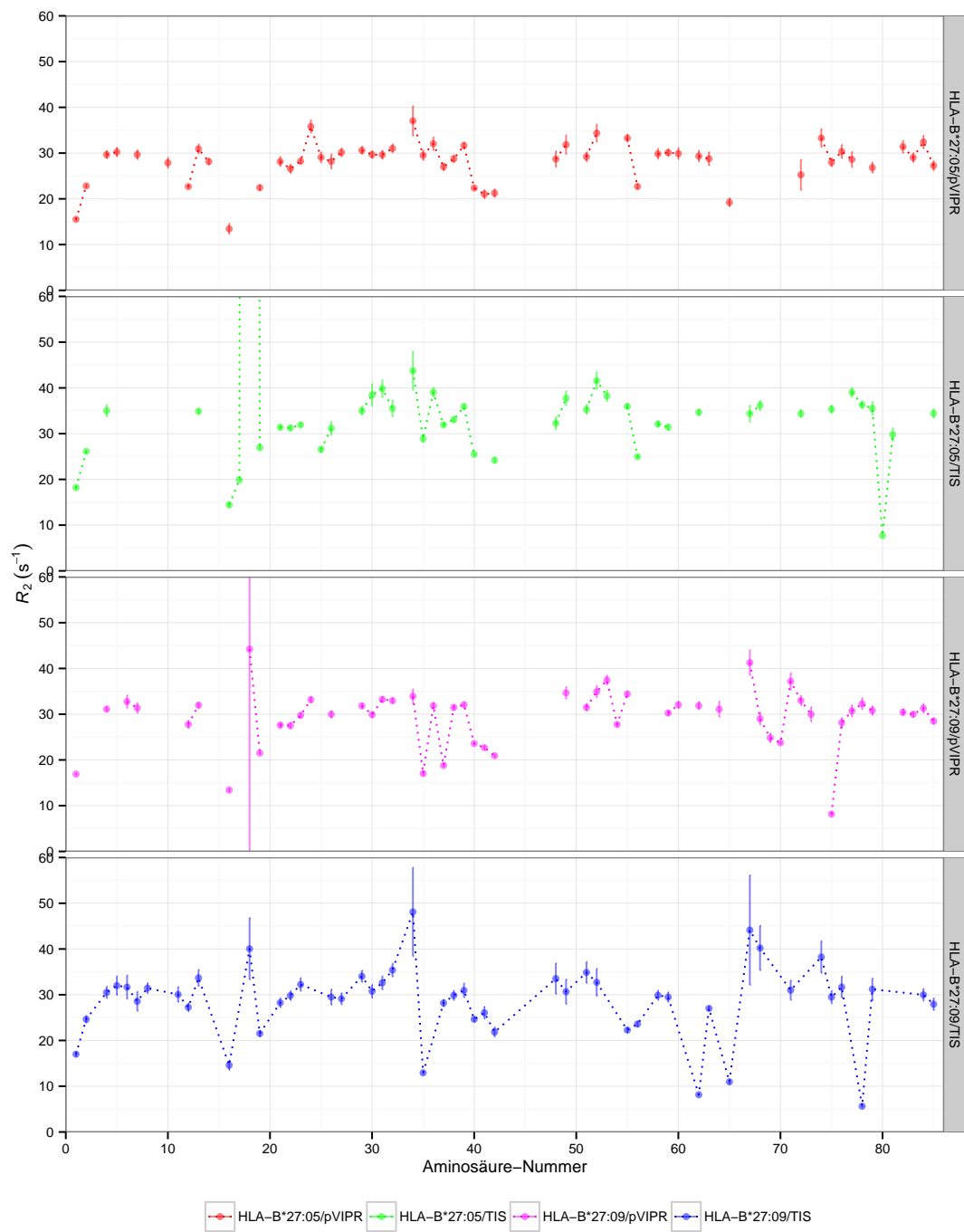


Abb. 21: Sequentielle Auftragung der transversalen Relaxationsrate (R_2) der $\alpha 1$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

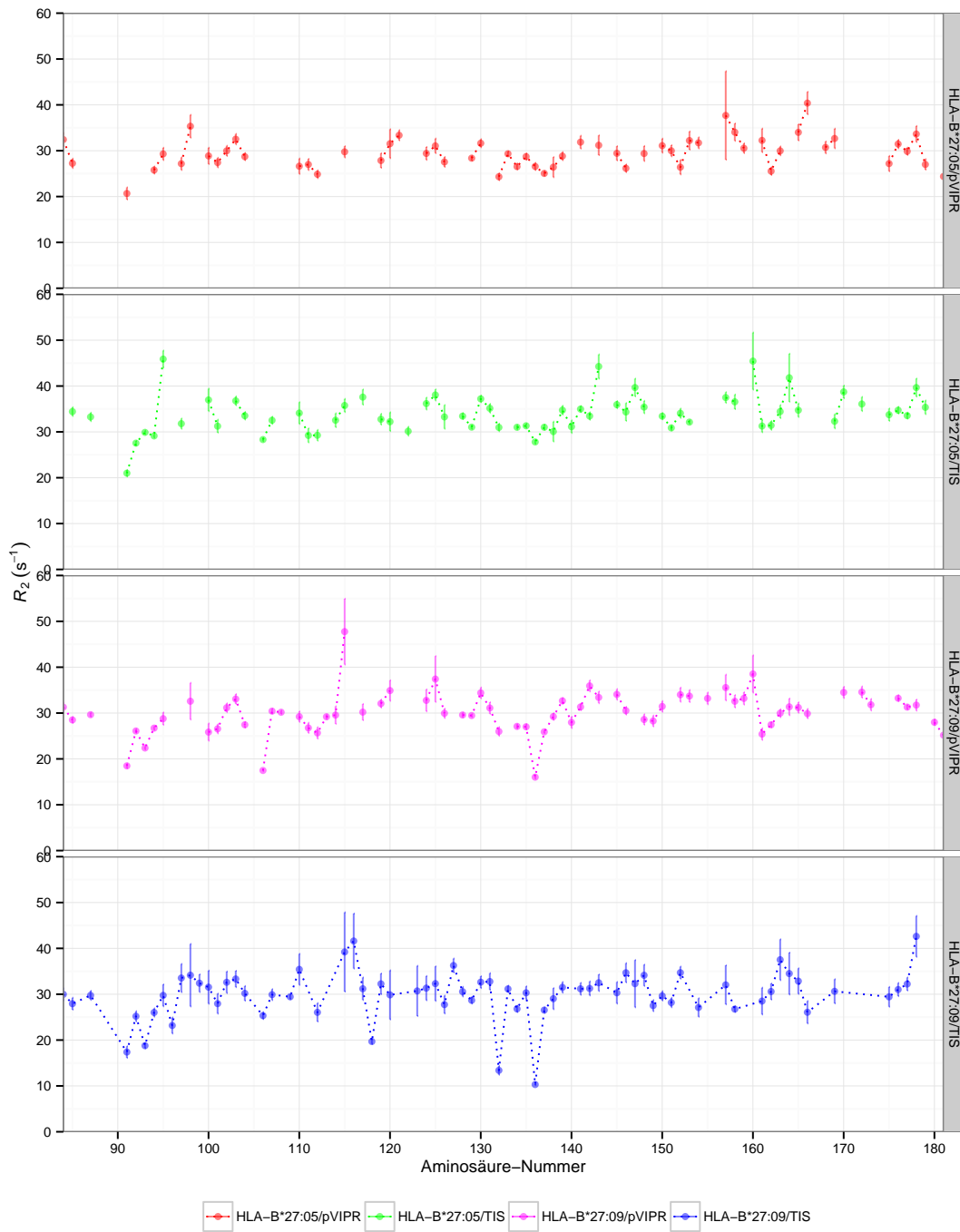


Abb. 22: Sequentielle Auftragung der transversalen Relaxationsrate (R_2) der α_2 -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

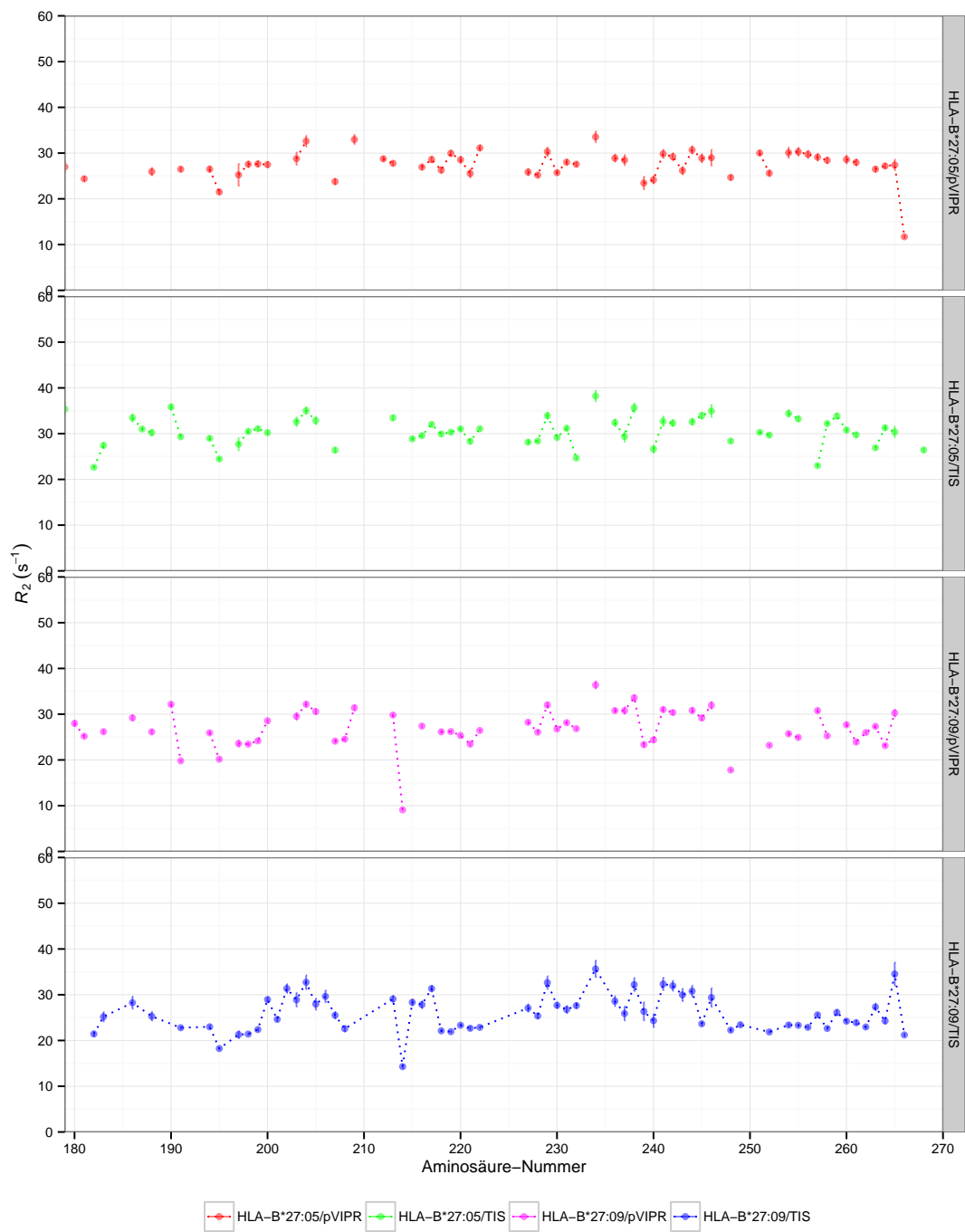


Abb. 23: Sequentielle Auftragung der transversalen Relaxationsrate (R_2) der α_3 -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

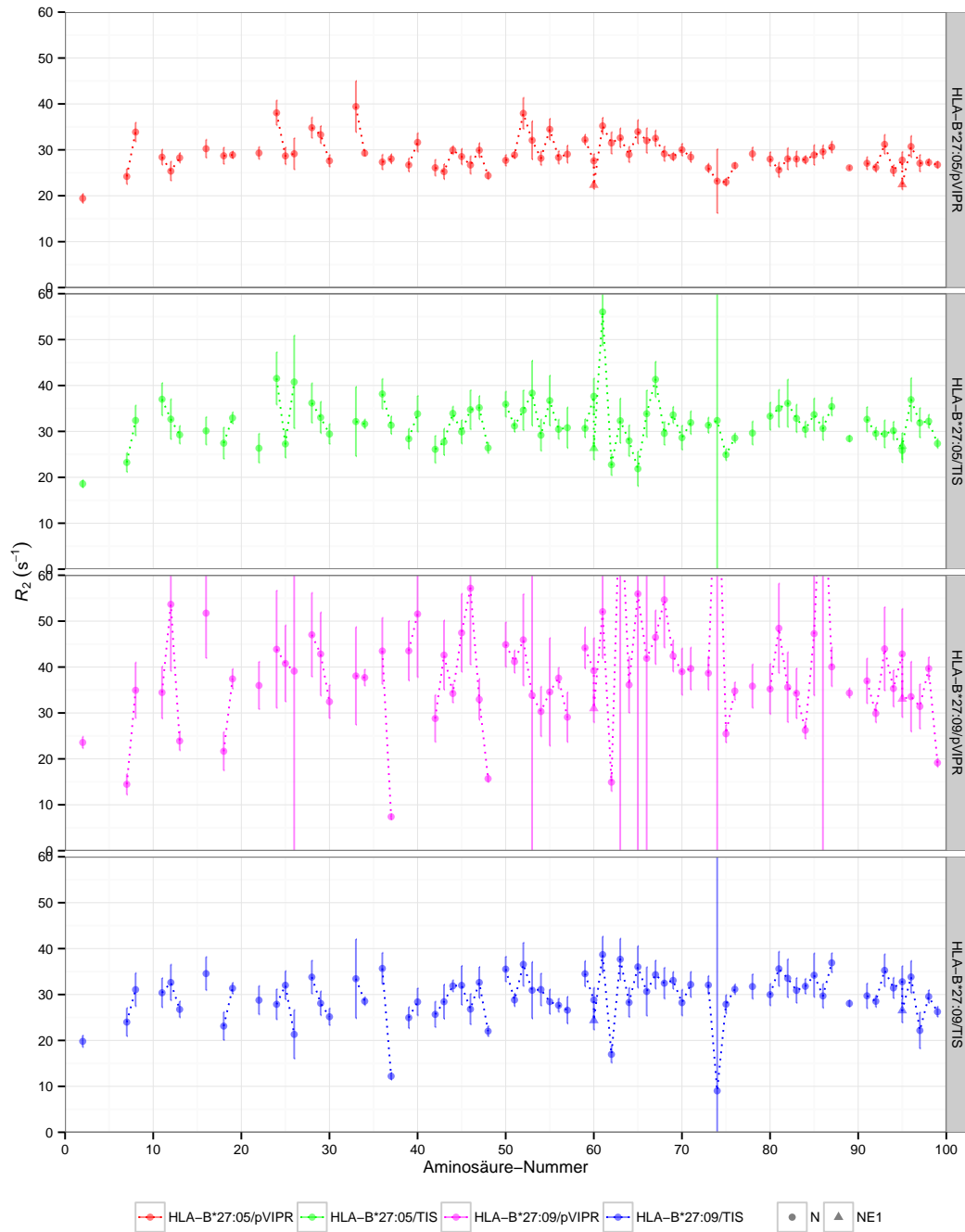


Abb. 24: Sequentielle Auftragung der transversalen Relaxationsrate (R_2) des β_2m im Komplex mit HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

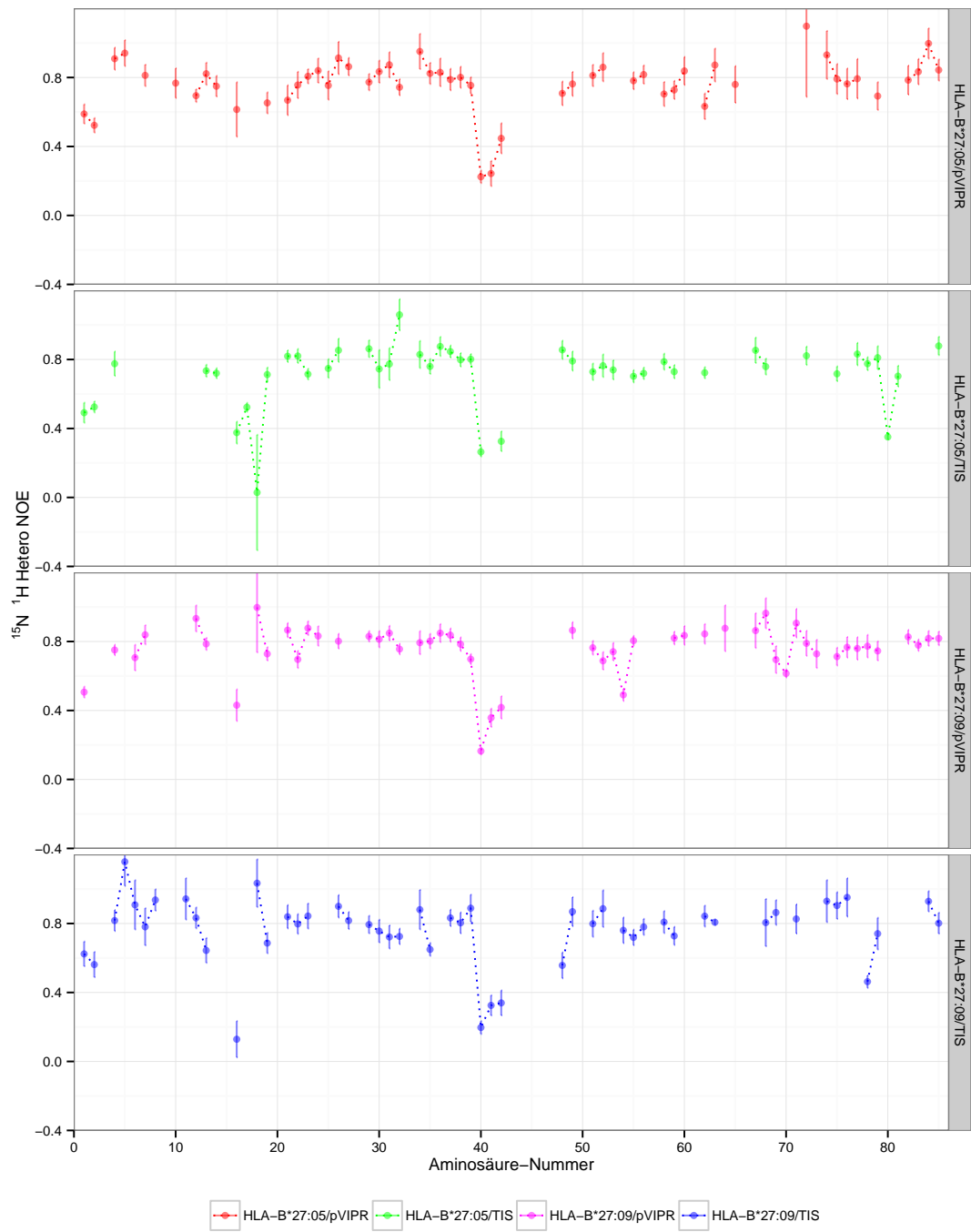


Abb. 25: Sequentielle Auftragung des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE der $\alpha 1$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

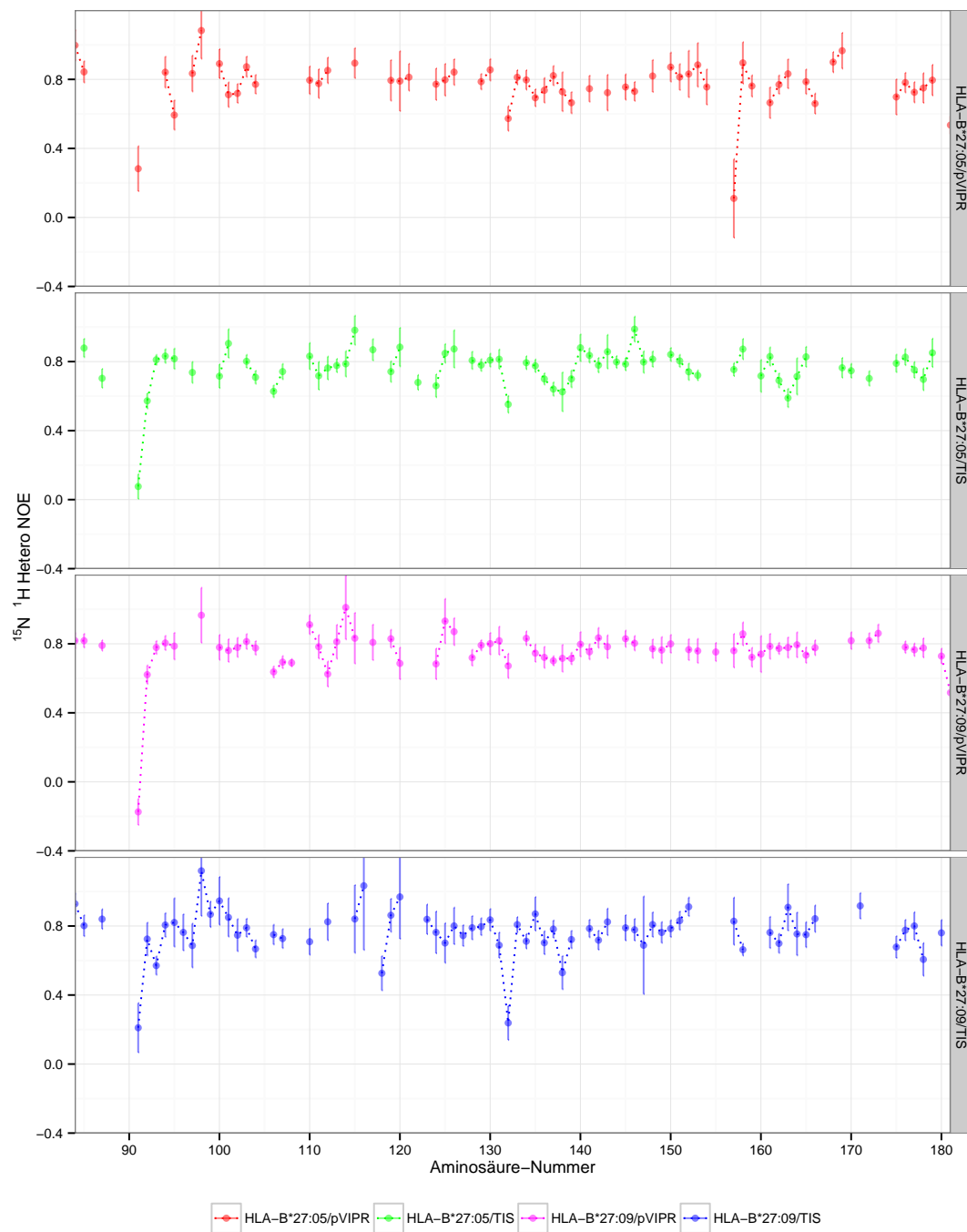


Abb. 26: Sequentielle Auftragung des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE der $\alpha 2$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

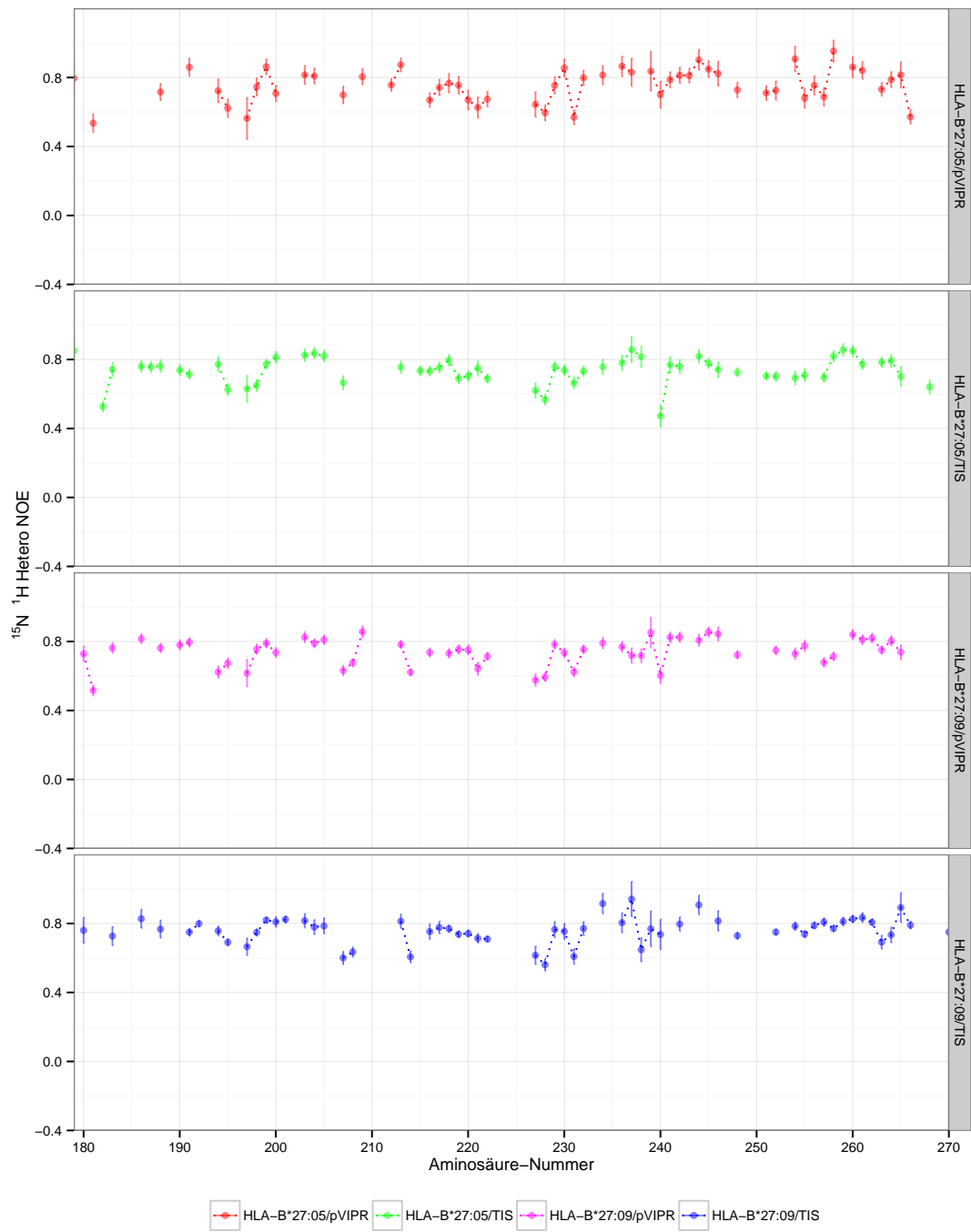


Abb. 27: Sequentielle Auftragung des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE der $\alpha 3$ -Domänen von HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

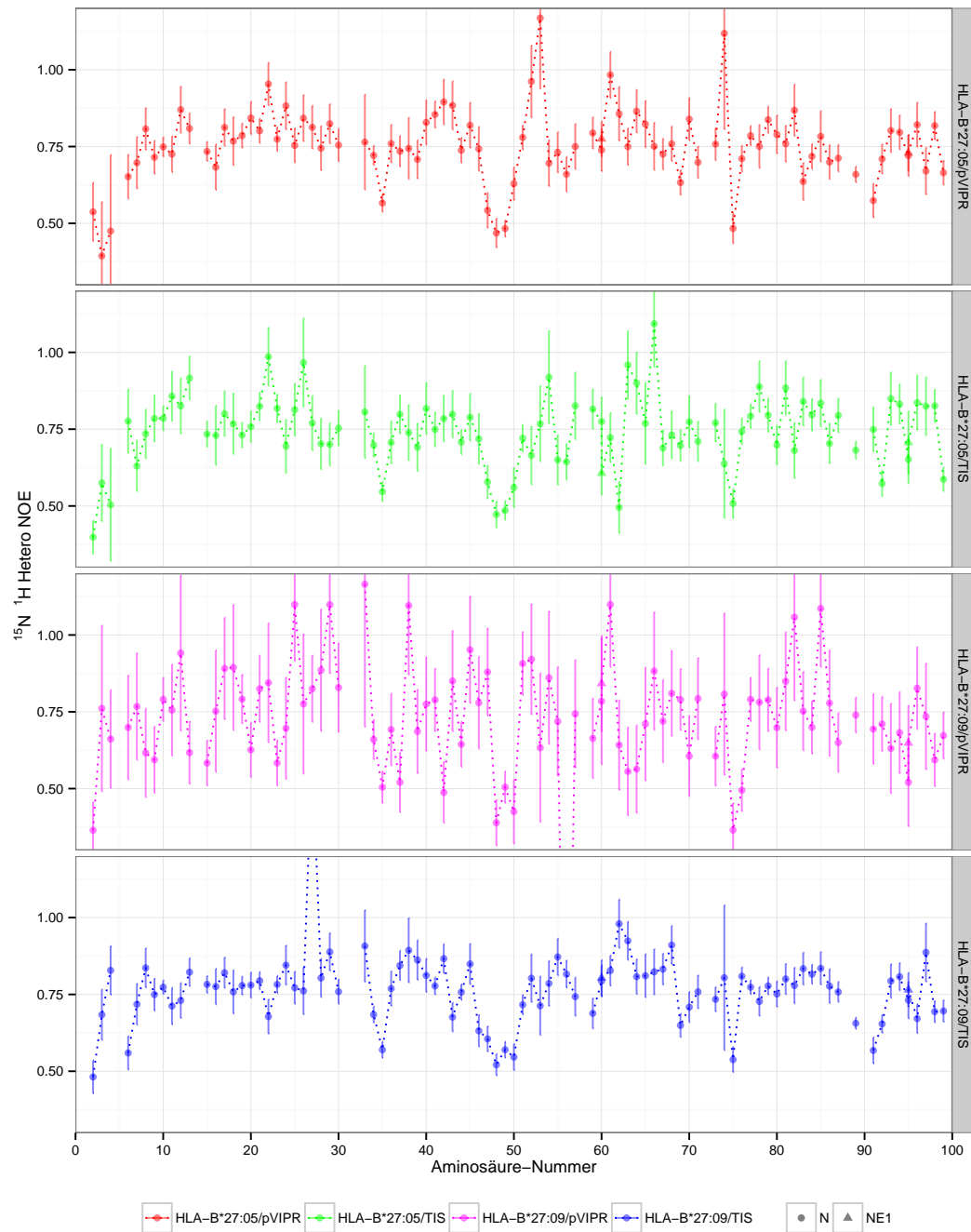


Abb. 28: Sequentielle Auftragung des $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuklearen *steady-state* NOE des $\beta_2\text{m}$ im Komplex mit HLA-B*27:05 oder B*27:09 mit pVIPR oder TIS bei 750 MHz.

5 Ergebnisse der *model-free*-Analyse der HLA-Komplexe

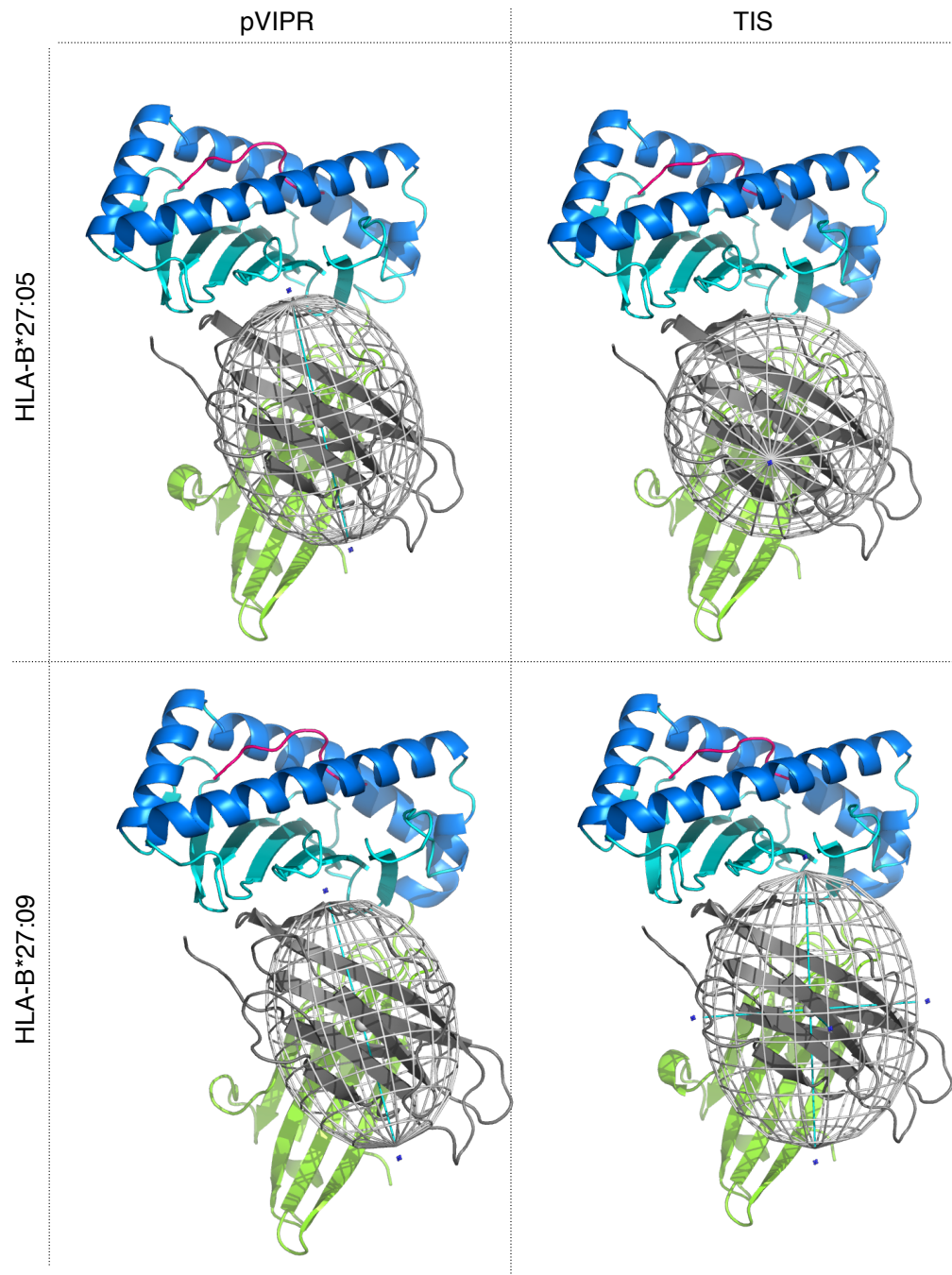


Abb. 29: Visuelle Repräsentation der Diffusionstensoren von β_2m in Komplex mit HLA-B*27:05 oder :09 und pVIPR oder TIS. Darstellung gegenüber Abbildung 3.23 um etwa 180° horizontal gedreht, ansonsten gleich.

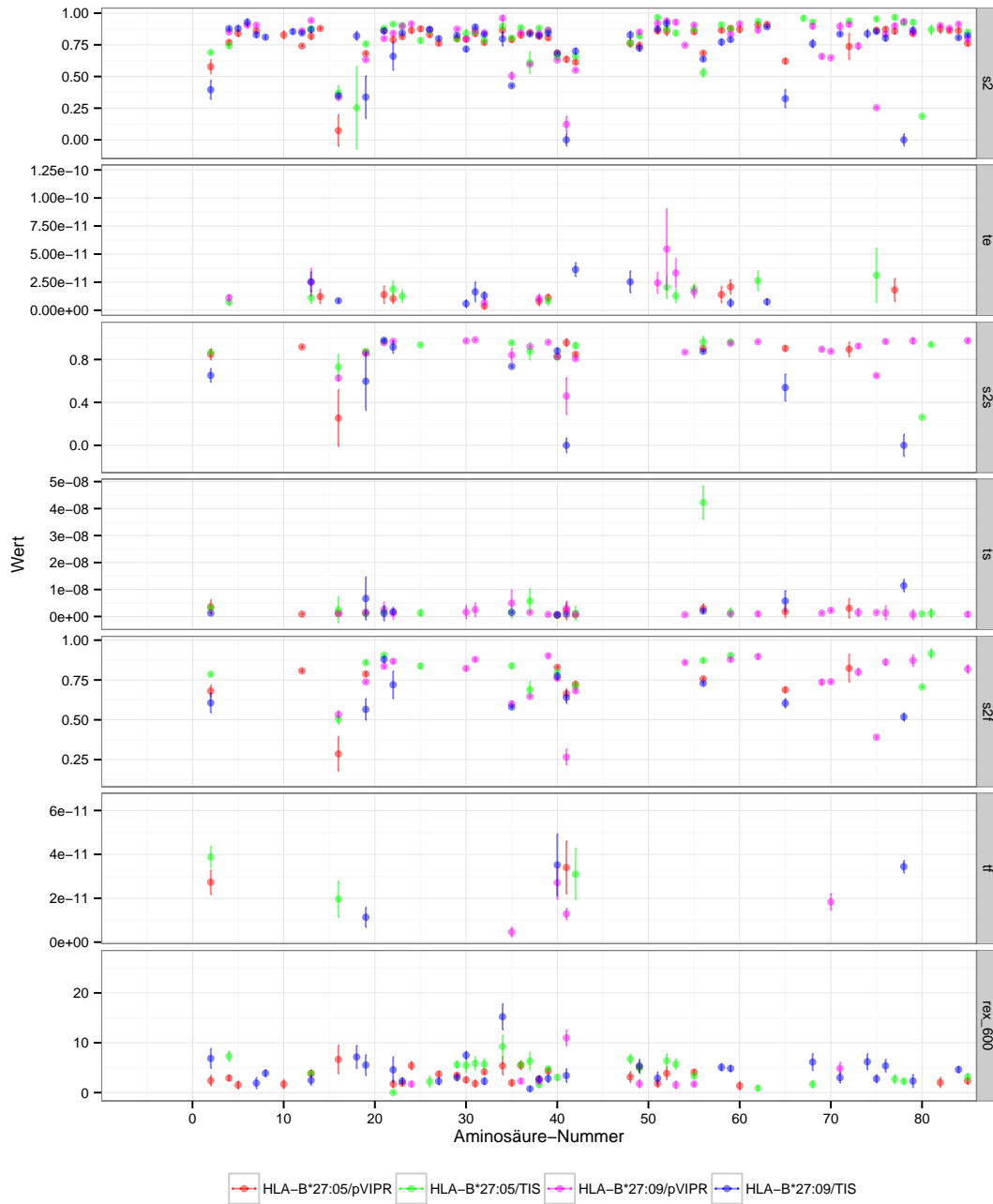


Abb. 30: *Model-free*-Parameter aus der *model-free*-Analyse der ¹⁵N-Relaxation der α1-Domäne von HLA-B*27:05/pVIPR, HLA-B*27:05/TIS, HLA-B*27:09/pVIPR und HLA-B*27:09/TIS. Es sind S², τ_e, S²_s, τ_s, S²_f, τ_f und R_{ex} dargestellt. τ_e-Werte mit einem Fehler > 4 · 10⁻¹¹ sind nicht dargestellt.

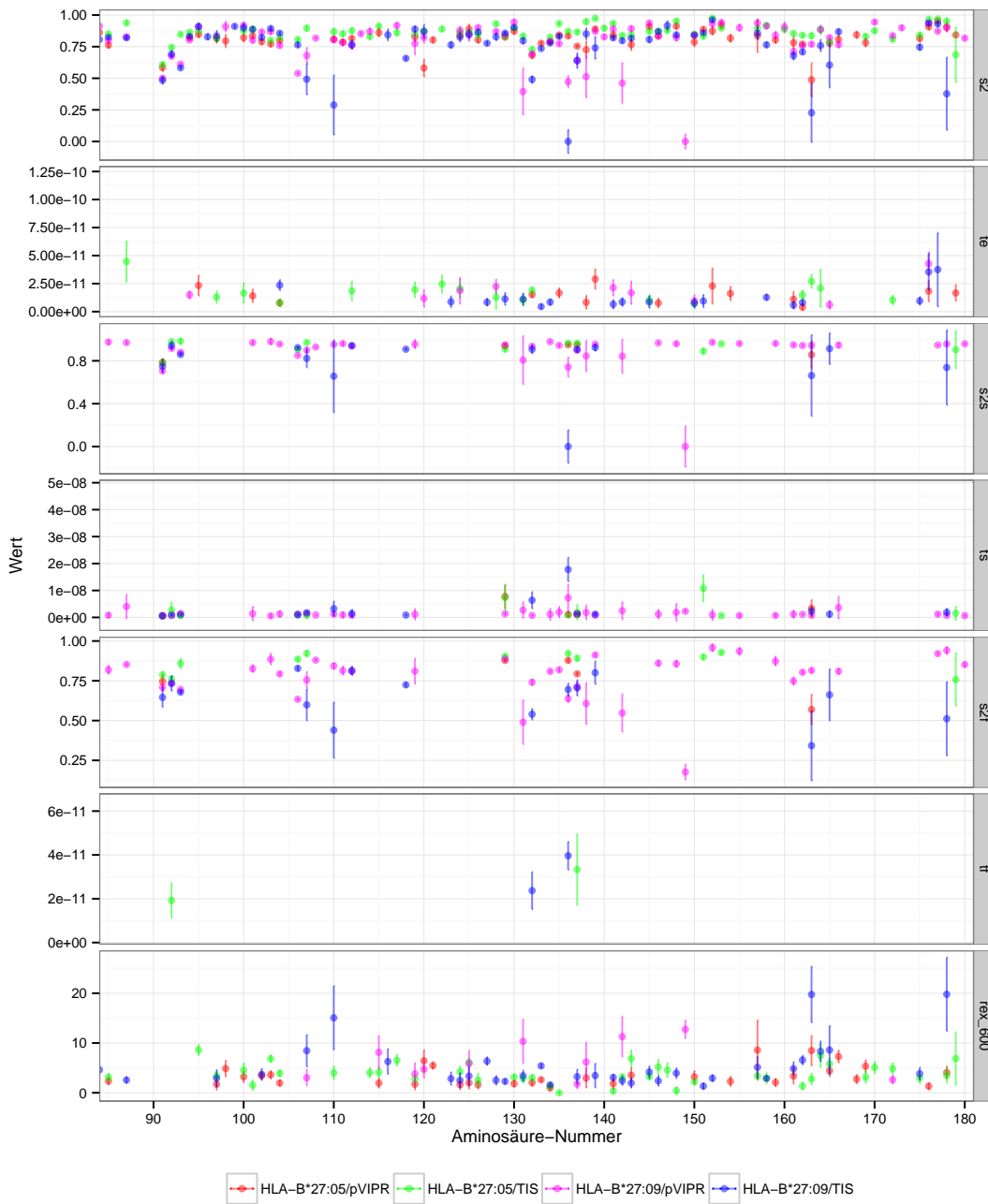


Abb. 31: Model-free-Parameter aus der model-free-Analyse der ¹⁵N-Relaxation der α2-Domäne von HLA-B*27:05/pVIPR, HLA-B*27:05/TIS, HLA-B*27:09/pVIPR und HLA-B*27:09/TIS. Es sind S², τ_e, S²_s, τ_s, S²_f, τ_f und R_{ex} dargestellt. τ_e-Werte mit einem Fehler > 4 · 10⁻¹¹ sind nicht dargestellt.

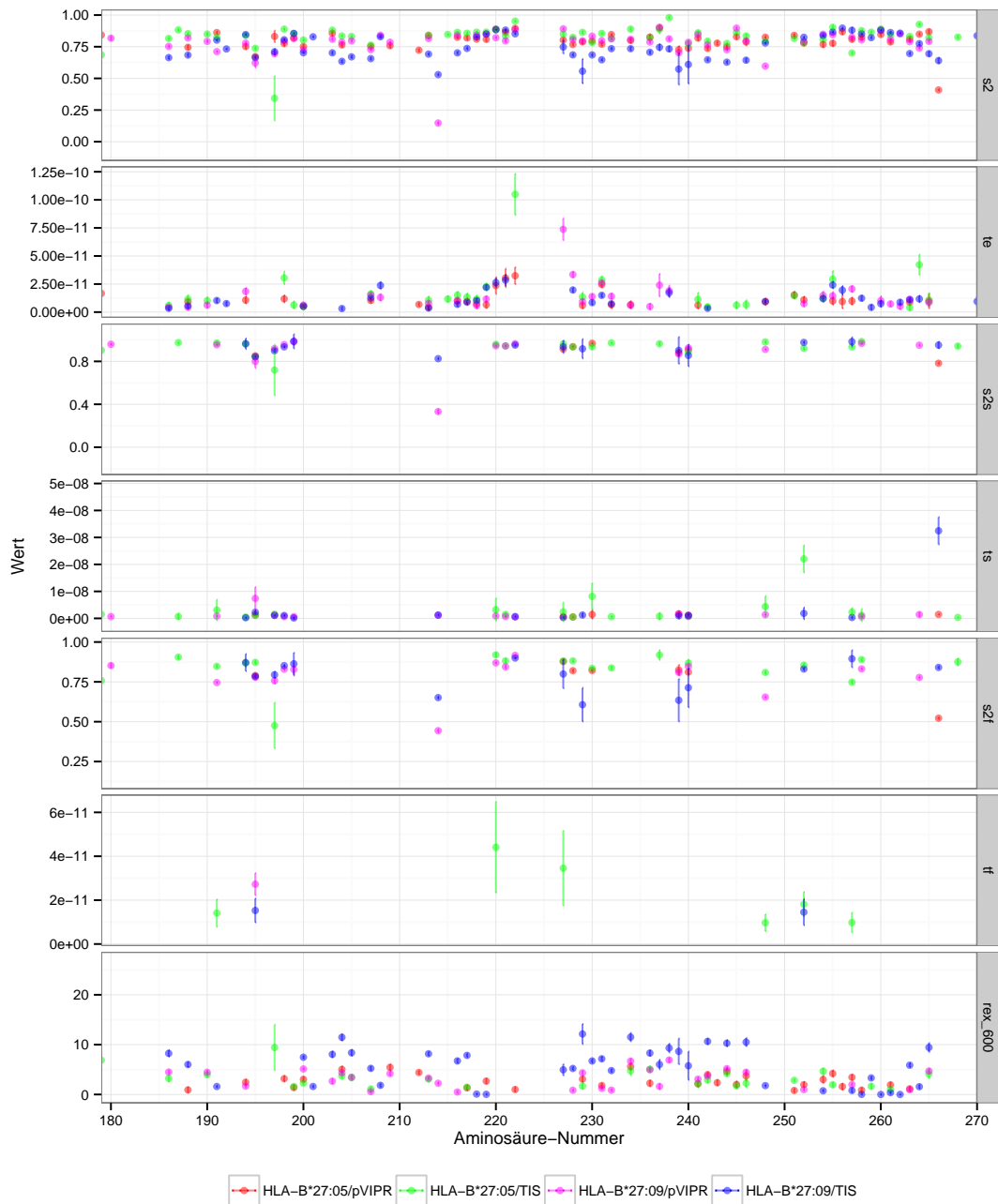


Abb. 32: *Model-free*-Parameter aus der *model-free*-Analyse der ^{15}N -Relaxation der $\alpha 3$ -Domäne von HLA-B*27:05/pVIPR, HLA-B*27:05/TIS, HLA-B*27:09/pVIPR und HLA-B*27:09/TIS. Es sind S^2 , τ_e , S^2_s , τ_s , S^2_f , τ_f und R_{ex} dargestellt. τ_e -Werte mit einem Fehler $> 4 \cdot 10^{-11}$ sind nicht dargestellt.

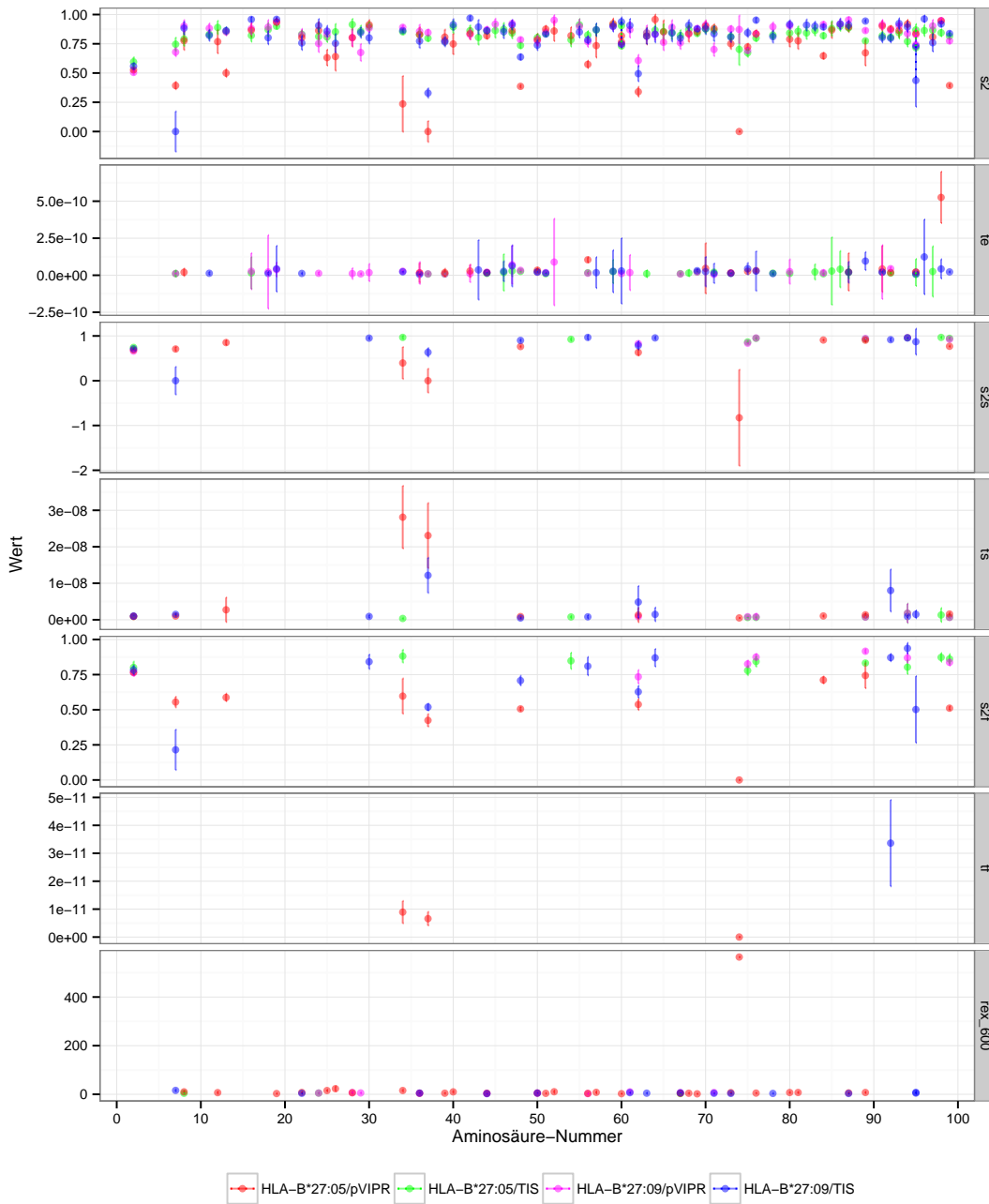


Abb. 33: Model-free-Parameter aus der model-free-Analyse der ^{15}N -Relaxation des $\beta_2\text{m}$ in Komplex mit HLA-B*27:05/pVIPR, HLA-B*27:05/TIS, HLA-B*27:09/pVIPR und HLA-B*27:09/TIS. Es sind S^2 , τ_e , S_s^2 , τ_s , S_f^2 , τ_f und R_{ex} dargestellt. τ_e -Werte mit einem Fehler $> 3 \cdot 10^{-10}$ sind nicht dargestellt.

6 Pulsprogramme für die Relaxationsmessungen

6.1 Longitudinale Relaxationsraten (TROSY)

Das Pulsprogramm mb15nt1trosy_3d_3 zur Messung der longitudinalen Relaxationsraten in der Version für TROSY, mit Temperaturkompensation und Amidprotonenspezifischen *shape*-Pulsen während der Relaxationszeit.

```
define list<delay> vd_list=<${VDLIST}>
define delay vd_max
"in0 = inf2/2"
"p2 = 2.0*p1"
"p6 = 2.0*p5"

# ifdef cn
"d0 = (cnst0*in0 - p32 - p1)/2"
# else
"d0 = (cnst0*in0 - p1)/2"
# endif /*cn*/

"d11 = 30m"
"d12 = 20u"
"d13 = 3u"
"d14 = 20m - p22/2 - d12"
"d15 = d14 - 50u - p61 - d61"

"TAU = 2.75m"
"TAU1 = TAU - 2*d12 - 2*d13 - p18 - p60 - d60
- 50u"
"TAU2 = TAU - p61 - d61 - 1.69*d3"
"TAU3 = (d3 - p6)/2"

"DELTA1 = 2.75m - p60 - d60 - 50u"

"l1 = 1"
"l14 = 1"
"l3 = td1"

aqseq 312

1 ze
```

```
d12 p13:f3
"vd_max = 0"

3 d12
if "vd_list > vd_max"
{
d12
"vd_max = vd_list"
}

3m vd_list.inc
lo to 3 times l3

3m vd_list.res
2 d11
"l2 = (vd_max - vd_list[t1loop]) / 40m"
4 d14
d12
(p22:sp22 ph2):f1
d12
d14
lo to 4 times l2
d1
d12 p13:f3
p5:f3 ph1
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61 p11:f1
p1 ph1
d13
d12 p161:f1
(p18:sp18 ph10:r):f1
d13
d12 p11:f1
TAU1
50u
p60:gp20
d60
(center (p2 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
TAU1
50u
p60:gp20
d60
d13
d12 p161:f1
(p18:sp18 ph11:r):f1
d13
d12 p11:f1
p1 ph4
```

```

50u
p61:gp22
d61
p5:f3 ph16
DELTA1
50u
p60:gp20
d60
(center (p2 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
DELTA1
45u
p60:gp20
d60
5u BLKGRAD
p5:f3 ph17

if "vd_list[t1loop]==0" goto 7
"l14 = (vd_list[t1loop] - 40m) / 40m"

6 d14
d12 pl61:f1
(p22:sp22 ph1):f1
d12
d14 pl1:f1
lo to 6 times l14
d14
d12 pl61:f1
(p22:sp22 ph1):f1
d12
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61
d15 pl1:f1
7 d12

if "l1 %2 == 1" goto 31
p5:f3 ph5
goto 32
31 p5:f3 ph15
# ifdef cn
32 d0
(p32:sp32 ph1):f2
d0
# else
32 d0
d0
# endif /*cn*/
p1 ph6
d13

d12 pl61:f1
(p18:sp18 ph12:r):f1
d13
d12 pl1:f1
TAU1
50u
p60:gp20
d60
(center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
TAU1
50u
p60:gp20
d60
d13
d12 pl61:f1
(p18:sp18 ph13:r):f1
d13
d12 pl1:f1
(p1 ph7) (p5 ph8):f3
50u
p61:gp21
d61
TAU2
p1*0.231 ph2
d3
p1*0.692 ph2
d3
p1*1.4621 ph2
TAU3
p6:f3 ph1
TAU3
p1*1.4621 ph3
d3
p1*0.692 ph3
d3
p1*0.231 ph3
45u
p61:gp21
d61
5u BLKGRAD
TAU2
p5:f3 ph9

go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
F1QF()
F2EA(calclc(l1, 1) & calph(ph6, +180) &
calph(ph8, +180) & calph(ph12,
+180) & exec(rppall), caldel(d0, +

```

```

        in0) & calph(ph5, +180) & calph(
        ph15, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1 = 0
ph2 = 1
ph3 = 3
ph4 = 1
ph5 = 1 2 3 0
ph6 = 1
ph7 = 0
ph8 = 1
ph9 = 0
ph10 = 2
ph11 = 3
ph12 = 3
ph13 = 0
ph15 = 1 0 3 2
ph16 = 0 0 0 0 2 2 2 2
ph17 = 1
ph31 = 1 2 3 0 3 0 1 2

        "d13 = 3u"

# ifdef iburp
        "d14 = 20m - p22/2 - d12"
        "d15 = d14 - 50u - p61 - d61"
# else
        "d14 = 0.5 * (5m - p2)"
        "d15 = d14 - 50u - p61 - d61"
# endif /*iburp*/

"TAU1 = 2.25m"
"TAU2 = TAU1 - p61 - d61 - 1.69*d3"
"TAU3 = (d3 - p6)/2"

"DELTA1 = 2.75m"
"DELTA2 = DELTA1 - p2 - 2.0*d0"

"l3 = td1"
"l14 = 1"

aqseq 312

1 ze

        "vd_max = 0"

3 d12
        if "vd_list > vd_max"
        {
            d12
            "vd_max = vd_list"
        }

3m vd_list.inc
lo to 3 times l3

3m vd_list.res

2 d11 do:f3

# ifdef iburp

        "l2 = (vd_max - vd_list[t1loop]) / 40m"
4 d14
        d12
        (p22:sp22 ph2):f1
        d12
        d14

```

6.2 Longitudinale Relaxationsraten (HSQC)

Das Pulsprogramm `mb15nt1wtg_3d_10` zur Messung der longitudinalen Relaxationsraten in der Version ohne TROSY, mit Temperaturkompensation. Die ebenfalls verwendete Version `mb15nt1wtg_3d_11` verfügte nicht mehr über die nicht für die vorliegende Arbeit genutzte Option zur Verwendung eines *shape*-Pulses während der Relaxationszeit.

```

define list<delay> vd_list=<${VDLIST}>
define delay vd_max

"in0 = inf2/2"

"p2 = 2.0*p1"
"p6 = 2.0*p5"

"d0 = 3u"

"d11 = 30m"
"d12 = 20u"

```



```

lo to 4 times l2
# else

"l2 = (vd_max - vd_list[t1loop]) / 10m"
5 d14
  (p2 ph2):f1
  d14
  d14
  (p2 ph3):f1
  d14
lo to 5 times l2

# endif /*iburp*/

d1
d12 pl1:f1
d12 pl3:f3
p5:f3 ph1
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61
p1 ph1
TAU1
(center (p2 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
TAU1
p1 ph4
d13
d12 pl61:f1
(p18:sp18 ph27:r):f1
45u
p61:gp22
d61
5u BLKGRAD
d12 pl1:f1
p5:f3 ph5
DELTA1
(center (p2 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
DELTA1
p5:f3 ph6

# ifdef iburp

"l14 = (vd_list[t1loop] - 40m) / 40m"
6 d14
  d12 pl61:f1
  (p22:sp22 ph1):f1

d12
d14 pl1:f1
lo to 6 times l14

d14
d12 pl61:f1
(p22:sp22 ph1):f1
d12
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61
d15

# else

"l14 = (vd_list[t1loop] - 10m) / 10m"

d14
(p2 ph2):f1
d14

7 d14
  (p2 ph3):f1
  d14
  d14
  (p2 ph2):f1
  d14
lo to 7 times l14

d14
(p2 ph3):f1
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61
d15

# endif /*iburp*/

d12 pl1:f1
p5:f3 ph7
d0
DELTA2
(p2 ph8):f1
d0
p6:f3 ph9
DELTA1
p5:f3 ph10
50u
p61:gp23
d61
d12 pl61:f1

```

```

(p18:sp18 ph28:r):f1
d13
d12 p11:f1
p1 ph1
50u
p61:gp21
d61
TAU2
p1*0.231 ph2
d3
p1*0.692 ph2
d3
p1*1.4621 ph2
TAU3
p6:f3 ph1
TAU3
p1*1.4621 ph3
d3
p1*0.692 ph3
d3
p1*0.231 ph3
45u
p61:gp21
d61
5u BLKGRAD
TAU2 p116:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d11 do:f3 mc #0 to 2
    F1QF()
    F2PH(calph(ph7, +90), caldel(d0, +in0))
exit

ph1 = 0
ph2 = 1
ph3 = 3
ph4 = 1
ph5 = 0 2
ph6 = 1
ph7 = 1 1 3 3
ph8 = 0
ph9 = 0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph10 = 0
ph27 = 2
ph28 = 0
ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2

```

6.3 Transversale Relaxationsraten (TROSY)

Das Pulsprogramm mb15nt2trosy_3d_4 zur Messung der transversalen Relaxationsraten (TROSY-Version) mit Temperaturkompensation, mit TROSY.

```

define list<delay> vd_list=<${VDLIST}>
define delay vd_max

"in0 = inf2/2"
"p2 = 2.0*p1"
"p6 = 2.0*p5"

# ifdef cn
"d0 = (cnst0*in0 - p32 - p1)/2"
# else
"d0 = (cnst0*in0 - p1)/2"
# endif /*cn*/

"d11 = 30m"
"d12 = 20u"
"d13 = 3u"
"d15 = 1m - p6"
"d14 = 0.5*d15"

"TAU = 2.75m"
"TAU1 = TAU - 2*d12 - 2*d13 - p18 - p60 - d60
- 50u"
"TAU2 = TAU - p61 - d61 - 1.69*d3"
"TAU3 = (d3 - p6)/2"

"DELTA1 = 2.75m - p60 - d60 - 50u"

"l1 = 1"
"l3 = td1"
"l14 = 1"

aqseq 312
1 ze
    d12
    "vd_max = 0"
3 d12
    if "vd_list > vd_max"
    {
        d12
        "vd_max = vd_list"
    }

```

```

    }

3m vd_list.inc
lo to 3 times l3

3m vd_list.res
2 d11
"l2 = (vd_max - vd_list[t1loop]) / 8m"
4 d14
(p6 ph1):f3
(center(d15 p6 ph1 d15 p6 ph1 d15):f3 (p2 ph2
):f1)
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
(center(d15 p6 ph1 d15 p6 ph1 d15):f3 (p2 ph3
):f1)
(p6 ph1):f3
d14
lo to 4 times l2
d1
d12 pl3:f3
p5:f3 ph1
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61 pl1:f1
p1 ph1
d13
d12 pl61:f1
(p18:sp18 ph26:r):f1
d13
d12 pl1:f1
TAU1
50u
p60:gp20
d60
(center (p2 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
TAU1
50u
p60:gp20
d60
d13
d12 pl61:f1
(p18:sp18 ph27:r):f1
d13
d12 pl1:f1
p1 ph4
50u
p61:gp22

d61
p5:f3 ph5
DELTA1
50u
p60:gp20
d60
(center (p2 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
DELTA1
45u
p60:gp20
d60
5u BLKGRAD
"l14 = vd_list[t1loop] / 8m"
5 d14
(p6 ph1):f3
(center(d15 p6 ph1 d15 p6 ph1 d15):f3 (p2 ph2
):f1)
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
(center(d15 p6 ph1 d15 p6 ph1 d15):f3 (p2 ph3
):f1)
d14
lo to 5 times l14
p5:f3 ph6
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61 pl1:f1
if "l1 %2 == 1" goto 31
    p5:f3 ph15
goto 32
31 p5:f3 ph16
# ifdef cn
32 d0
    (p32:sp32 ph1):f2
    d0
# else
32 d0
    d0
# endif /*cn*/
p1 ph17
d13
d12 pl61:f1
(p18:sp18 ph28:r):f1
d13
d12 pl1:f1
TAU1
50u

```

```

p60:gp20
d60
(center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
TAU1
50u
p60:gp20
d60
d13
d12 p161:f1
(p18:sp18 ph24:r):f1
d13
d12 p11:f1
(p1 ph1) (p5 ph18):f3
50u
p61:gp21
d61
TAU2
p1*0.231 ph2
d3
p1*0.692 ph2
d3
p1*1.4621 ph2
TAU3
p6:f3 ph1
TAU3
p1*1.4621 ph3
d3
p1*0.692 ph3
d3
p1*0.231 ph3
45u
p61:gp21
d61
5u BLKGRAD
TAU2
p5:f3 ph1
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
    F1QF()
    F2EA(calclc(l1, 1) & calph(ph17, +180)
        & calph(ph18, +180) & calph(ph28,
            +180) & exec(rppall), caldel(d0, +
                in0) & calph(ph15, +180) & calph(
                    ph16, +180) & calph(ph31, +180))
exit

ph1 = 0
ph2 = 1
ph3 = 3

```

```

ph4 = 1
ph5 = 0 0 0 0 2 2 2 2
ph6 = 1
ph15 = 1 2 3 0
ph16 = 1 0 3 2
ph17 = 1
ph18 = 1
ph24 = 0
ph25 = 1
ph26 = 2
ph27 = 3
ph28 = 3
ph31 = 1 2 3 0 3 0 1 2

```

6.4 Transversale Relaxationsrate (HSQC)

Das Pulsprogramm mb15nt2wtg_3d_3 zur Messung der transversalen Relaxationsraten (TROSY-Version) mit Temperaturkompensation, ohne TROSY. Die BIP-Option wurde nicht genutzt.

```

define list<delay> vd_list=<$VDLIST>
define delay vd_max
"in0 = inf2/2"
"p6 = 2.0*p5"
"d0 = 3u"
"d11 = 30m"
"d12 = 20u"
"d13 = 3u"
"DELTA1 = 2.75m"
"d15 = 1m - p6"
"d14 = 0.5*d15"

# ifdef bip
"d16 = (d15 - p24)/2"
"DELTA2 = DELTA1 - p24 - 2.0*d0"
# else
"p2 = 2.0*p1"
"d16 = (d15 - p2)/2"
"DELTA2 = DELTA1 - p2 - 2.0*d0"
# endif /*bip*/

"TAU1 = 2.25m"
"TAU2 = TAU1 - p61 - d61 - 1.69*d3"
"TAU3 = (d3 - p6)/2"

```

```

"l3 = td1"
"l14 = 1"

aqseq 312

1 ze

"vd_max = 0"

3 d12
;----- search for t1 max
if "vd_list > vd_max"
{
20u
"vd_max = vd_list"
}

3m vd_list.inc
lo to 3 times l3

3m vd_list.res

2 d11 do:f3
"l2 = (vd_max - vd_list[t1loop]) / 8m"
4 d14
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
# ifdef bip
(d15) (d16 p24:sp24 ph2)
# else
(d15) (d16 p2 ph2)
# endif /*bip*/
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
# ifdef bip
(d15) (d16 p24:sp24 ph3)
# else
(d15) (d16 p2 ph3)
# endif /*bip*/
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3

d14
lo to 4 times l2
d1
d12 pl3:f3
p5:f3 ph1
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61
p1 ph1
TAU1
# ifdef bip
(center (p24:sp24 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
# else
(center (p2 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
# endif /*bip*/
TAU1 p11:f1
p1 ph4
d13
d12 pl61:f1
(p18:sp18 ph27:r):f1
45u
p61:gp22
d61
5u BLKGRAD
d12 pl1:f1
p5:f3 ph5
DELTA1
# ifdef bip
(center (p24:sp24 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
# else
(center (p2 ph1):f1 (p6 ph1):f3)
# endif /*bip*/
DELTA1
"l14 = vd_list[t1loop] / 8m"
5 d14
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
# ifdef bip
(d15) (d16 p24:sp24 ph2)
# else
(d15) (d16 p2 ph2)
# endif /*bip*/
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
d15

```

```

(p6 ph1):f3
# ifdef bip
(d15) (d16 p24:sp24 ph3)
# else
(d15) (d16 p2 ph3)
# endif /*bip*/
(p6 ph1):f3
d15
(p6 ph1):f3
d14
lo to 5 times l14
;----- end relaxation loop
p5:f3 ph6
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61
;-----
p5:f3 ph7
d0
DELTA2
# ifdef bip
(p24:sp24 ph8):f1
# else
p2 ph8
# endif /*bip*/
d0
p6:f3 ph9
DELTA1
p5:f3 ph10
p61:gp23
d61
d12 p161:f1
(p18:sp18 ph28:r):f1
d13
d12 p11:f1
p1 ph1
50u
p61:gp21
d61
TAU2
p1*0.231 ph2
d3
p1*0.692 ph2
d3
p1*1.4621 ph2
TAU3
p6:f3 ph1
TAU3
p1*1.4621 ph3

d3
p1*0.692 ph3
d3
p1*0.231 ph3
45u
p61:gp21
d61
5u BLKGRAD
TAU2 p116:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d11 do:f3 mc #0 to 2
F1QF()
F2PH(caliph(ph7, +90), caldel(d0, +in0))
exit

ph1 = 0
ph2 = 1
ph3 = 3
ph4 = 1
ph5 = 0 2
ph6 = 1
ph7 = 1 1 3 3
ph8 = 0
ph9 = 0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph10 = 0
ph27 = 2
ph28 = 0
ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2

6.5 Hetero-NOE (TROSY)

Pulsprogramm pF15nnoetrosoy_3d_3 zur Be-
stimmung des Hetero-NOE, mit TROSY.

"in0 = inf2/2"
"p2 = 2.0*p1"
"d2 = p2"
"p6 = 2.0*p5"

# ifdef cn
"d0 = (cnst0*in0 - p32 - p1)/2"
# else
"d0 = (cnst0*in0 - p1)/2"
# endif /*cn*/

"d1 = 2s - d37 - d12 - d11"

```

```

"d11 = 30m"
"d12 = 20u"
"d13 = 3u"
"d37 = 50m"
"d14 = (22m - p2)/2"
"l14 = 180"

"TAU1 = 2.25m"
"TAU2 = TAU1 - p61 - d61 - 1.69*d3"
"TAU3 = (d3-p6)/2"
"DELTA1 = 2.75m"
"DELTA2 = DELTA1 - p2 - 2.0*d0"

"l1 = 1"
"l2 = 1"

aqseq 312

1 ze
  d12 st0
2 d11 pl16:f3
  d37 cpd3:f3
  d12 do:f3
  d1
  d12 pl3:f3
  d12 fq=cnst11:f1

if "t1loop %2 == 1"
{
5 d14
  p2 ph1
  d14
  lo to 5 times l14
}
else
{
  d4
}

d12 fq=cnst10:f1
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61
p1 ph1
45u
p61:gp24
d61

5u BLKGRAD

if "l1 %2 == 1"
{
  p5:f3 ph15
}
else
{
  p5:f3 ph5
}

# ifdef cn
d0
  (p32:sp32 ph1):f2
d0
# else
d0
d0
# endif /*cn*/

p1 ph6
TAU1
(center (p2 ph1) (p6 ph1):f3)
TAU1
p1 ph7
(p5 ph8):f3
50u
p61:gp21
d61
TAU2
p1*0.231 ph2
d3
p1*0.692 ph2
d3
p1*1.4621 ph2
TAU3
p6:f3 ph1
TAU3
p1*1.4621 ph3
d3
p1*0.692 ph3
d3
p1*0.231 ph3
45u
p61:gp21
d61
5u BLKGRAD
TAU2
p5:f3 ph9

```

```

go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
  F1QF()
  F2EA(calclc(l1, 1) & calph(ph6, +180) &
    calph(ph8, +180) & exec(rppall),
    caldel(d0, +in0) & calph(ph5,
    +180) & calph(ph15, +180) & calph(
    ph31, +180))
exit

ph1 = 0
ph2 = 1
ph3 = 3
ph4 = 1
ph5 = 1 2 3 0
ph6 = 1
ph7 = 0
ph8 = 1
ph9 = 0
ph15 = 1 0 3 2
ph31 = 1 2 3 0

"DELTA1 = 2.75m"
"DELTA2 = DELTA1 - p2 - 2.0*d0"

aqseq 312
1 ze
2 d1 do:f3
  d12 pl3:f3
  d12 fq=cnst11:f1

if "t1loop %2 == 1"
{
5 d14
  (p2 ph1):f2
  d14
  lo to 5 times l14
  d13
}
else
{
d4
}

```

6.6 Hetero-NOE (HSQC)

Pulsprogramm pF15nnoewtg_3d_6 zur Bestimmung des Hetero-NOE, ohne TROSY.

```

"in0 = inf2/2"

"p2 = 2.0*p1"
"p6 = 2.0*p5"

"d0 = 3u"
"d1 = 2s"
"d11 = 30m"
"d12 = 20u"
"d13 = 3u"

"d14 = (22m - p2)/2"
"l14 = 180"

"TAU1 = 2.25m"
"TAU2 = TAU1 - p61 - d61 - 1.69*d3"
"TAU3 = (d3 - p6)/2"

d12 fq=cnst10:f1
50u UNBLKGRAD
p61:gp22
d61
p1 ph1
50u
p61:gp24
d61
p5:f3 ph7
d0
DELTA2
p2 ph8
d0
p6:f3 ph9
DELTA1
p5:f3 ph10
50u
p61:gp23
d61
p1 ph1
50u
p61:gp21
d61
TAU2

```



```

p1*0.231 ph2
d3
p1*0.692 ph2
d3
p1*1.4621 ph2
TAU3
p6:f3 ph1
TAU3
p1*1.4621 ph3
d3
p1*0.692 ph3
d3
p1*0.231 ph3
45u
p61:gp21
d61
5u BLKGRAD
TAU2 pl16:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d11 do:f3 mc #0 to 2
      F1QF()
      F2PH(calph(ph7, +90), caldel(d0, +in0))
exit

ph1 = 0
ph2 = 1
ph3 = 3
ph4 = 2
ph7 = 1 3
ph8 = 0
ph9 = 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph10 = 0 0 2 2
ph31 = 0 2 2 0 2 0 0 2

```

7 Verwendete Hilfsskripte

7.1 NMRPipe-Prozessierungsskripte

Skript `fid.com` für die Konvertierung von HSQC-basierten Experimenten in das NMRPipe-Format.

```
#!/bin/csh
bruk2pipe -in ./ser \
```

```

-bad 0.0 -aswap -DMX -decim 2000 -dspfvs 20 -
      grpdly 67.9862518310547\
-xN 1024 -yN 1600 \
-xT 512 -yT 800 \
-xMODE DQD -yMODE States-TPPI \
-xSW 10000.000 -ySW 2314.815 \
-xOBS 600.183 -yOBS 60.822 \
-xCAR 4.702 -yCAR 119.213 \
-xLAB 1H -yLAB 15N \
-ndim 2 -aq2D States \
-out ./test.fid -verb -ov

```

Skript `ft2.com` zur Prozessierung der HSQC-basierten Spektren.

```

xyz2pipe -in fid/test%03d.fid -verb \
| nmrPipe -fn SOL \
| nmrPipe -fn SP -off 0.25 -pow 2 -c 0.5 \
| nmrPipe -fn ZF -size 8192 \
| nmrPipe -fn FT \
| nmrPipe -fn PS -p0 180 -p1 0 -di \
| nmrPipe -fn TP \
| nmrPipe -fn GM -g1 12 -g2 27 -c 0.5 \
| nmrPipe -fn ZF -size 8192 \
| nmrPipe -fn FT -auto \
| nmrPipe -fn PS -p0 180 -p1 0 -di \
| nmrPipe -fn TP \
| nmrPipe -fn POLY -auto \
| nmrPipe -fn EXT -x1 11.5ppm -xn 6.0ppm -sw \
| pipe2xyz -out ft/test%03d.ft2 -ov

```

Skript `fid.com` für die Konvertierung von TROSY-basierten Experimenten in das NMRPipe-Format.

```
#!/bin/csh
bruk2pipe -in ./ser \
-bad 0.0 -aswap -DMX -decim 2000 -dspfvs 20 -
      grpdly 67.9862518310547 \
-xN 1024 -yN 2400 \
-xT 512 -yT 1200 \
-xMODE DQD -yMODE Complex \
-xSW 10000.000 -ySW 2314.815 \
-xOBS 600.182 -yOBS 60.823 \
-xCAR 4.852 -yCAR 119.213 \
-xLAB 1H -yLAB 15N \
-ndim 2 -aq2D States \
-out ./test.fid -verb -ov

```

Skript ft2.com zur Prozessierung der TROSY-basierten Spektren.

```
#!/bin/csh
xyz2pipe -in fid/test%03d.fid -x -verb \
| nmrPipe -fn SOL \
| nmrPipe -fn SP -off 0.35 -end 0.99 -pow 2 -c
    0.5 \
| nmrPipe -fn ZF -size 8192 \
| nmrPipe -fn FT \
| nmrPipe -fn PS -p0 0 -p1 0 -di \
| nmrPipe -fn TP \
| nmrPipe -fn GM -g1 10 -g2 25 -c 1.0 \
| nmrPipe -fn ZF -size 8192 \
| nmrPipe -fn FT -auto \
| nmrPipe -fn PS -p0 180 -p1 180 -di \
| nmrPipe -fn TP \
| nmrPipe -fn POLY -auto \
| nmrPipe -fn EXT -x1 11.5ppm -xn 6.0ppm -sw \
| pipe2xyz -out ft/test%03d.ft2 -ov
```

7.2 R-Hilfskripte

Das Skript `determine_unresolved.R` zur Filterung von überlappenden Signalen.

```
# v.0.1
```

```
filename = "example.list"
norm.factor = 10 # factor for N distance
  normalization
threshold = 0.05 # threshold normalized ppm
  distance
skip = 2 # skip header

# read
sparky.data <- read.table(paste0("./Lists/",
  filename), skip=skip, row.names=1)[,1:2]
colnames(sparky.data) <- c("N", "H")

# extract residue names and numbers
all.names <- unlist( strsplit(row.names(sparky
  .data), split="-" ) [c(T, F)]
resnum <- gsub( "\\D", "", all.names)

# normalize
sparky.data$N <- sparky.data$N / norm.factor

# calculate distances
library("fields")
```

```
distance.matrix <- rdist(sparky.data, sparky.
  data)
diag(distance.matrix) <- NA

# write distance matrix
write.table(
  file=paste0("distance_matrix_from_",
    filename, ".csv"),
  distance.matrix,
  sep="\t",
  quote=F
)

# determine unresolved peaks
unresolved <- !is.na( apply(distance.matrix,
  1, function(x) any(x<threshold)) )

# write a relax input file
write.table(
  file=paste0("unresolved_from_",
    filename),
  cbind( sort( as.numeric( resnum[
    unresolved] ) ), rep( "N", length(
    resnum[unresolved] ) ) ),
  sep = "\t",
  quote = F,
  col.names = F,
  row.names = F)
```