

Sonja Brockmeyer

**Einfluss der S100A12-
Oligomerisierung auf die Interaktion
und Aktivierung der Rezeptoren
RAGE und TLR-4**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

- 2015 -

Biologie

Klinik für pädiatrische Rheumatologie und Immunologie

Einfluss der S100A12- Oligomerisierung auf die Interaktion und Aktivierung der Rezeptoren RAGE und TLR-4

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Sonja Brockmeyer
aus Paderborn

- 2015 -

Dekan: Prof. Dr. M. Weber
Erster Gutachter: Prof. Dr. D. Föll
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. J. Kudla

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2016

Tag der Promotion: 13.01.2016

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
KAPITEL 1 - ZUSAMMENFASSUNG	5
KAPITEL 2 - EINLEITUNG	7
2.1. Das Immunsystem	7
2.1.1. Das angeborene Immunsystem	7
2.2. DAMPs	8
2.3. Die S100-Proteinfamilie.....	9
2.3.1. S100A12.....	10
2.3.1.1. Struktur von S100A12	10
2.3.1.2. Bindung zweiwertiger Kationen durch S100A12 und deren Einfluss auf die Proteinstruktur und -funktion	11
2.3.1.3. Funktionen von S100A12.....	15
2.4. TLRs.....	16
2.4.1. Signalleitung über TLR-4.....	18
2.5. Zielsetzung.....	22
KAPITEL 3 - MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1. Material	23
3.1.1. Allgemeine Chemikalien und Reagenzien	23
3.1.2. Puffer und Lösungen	24
3.1.3. Medien und Lösungen für die Zellkultur	26
3.1.4. Medien zu Kultivierung von Bakterien	27
3.1.5. Eukaryotische Zelllinien.....	28
3.1.6. Bakterienstämme.....	28
3.1.7. Antibiotika	28
3.1.8. Proteine und Standards.....	28
3.1.9. Antikörper	29
3.1.9.1. Primäre Antikörper	29
3.1.9.2. Sekundäre Antikörper	30
3.1.10. sonstige Detektionsreagenzien.....	30
3.1.11. Primersequenzen.....	30
3.1.12. Vektoren.....	31
3.1.13. Enzyme	33
3.1.14. Kits und Protokolle	34

3.1.15. Verbrauchsmaterialien	34
3.1.16. Laborausstattung	35
3.1.17. Software	36
3.2. Methoden	37
3.2.1. Zellkultur	37
3.2.1.1. Allgemeines	37
3.2.1.2. Kultivierung von HEK293- und HEK293/TCM-Zellen	37
3.2.1.3. Kultivierung von THP1-Zellen	37
3.2.1.4. Kryokonservierung von Zellen	38
3.2.1.5. Revitalisierung kryokonservierter Zellen	38
3.2.1.6. Zellzahlbestimmung	38
3.2.2. Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	38
3.2.2.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	38
3.2.2.2. Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	39
3.2.2.3. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	39
3.2.2.4. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	39
3.2.3. Molekularbiologische Methoden	40
3.2.3.1. Präparation plasmidischer DNA	40
3.2.3.2. Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	40
3.2.3.3. Enzymatische Behandlung von DNA	41
3.2.3.3.1. Analytische und präparative Restriktion	41
3.2.3.3.2. Ligation der mutierten S100A12-DNA in pEF-IRES	41
3.2.3.4. Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten	42
3.2.3.5. Nachweis der Genexpression	43
3.2.3.6. <i>Site-directed Mutagenesis</i>	44
3.2.3.7. Sequenzierung	45
3.2.3.8. Stabile Transfektion von HEK293-Zellen	45
3.2.4. Proteinbiochemische Methoden	46
3.2.4.1. Rekombinante Expression von Proteinen in HEK293-Zellen	46
3.2.4.2. Rekombinante Expression von Protein in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	46
3.2.4.3. Aufreinigung der in <i>E. coli</i> exprimierten Proteine	47
3.2.4.3.1. Anionenaustauschchromatographie (AEX)	47
3.2.4.3.2. Kalzium-abhängige hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	48
3.2.4.4. Aufreinigung der in HEK293-Zellen exprimierten Proteine	49
3.2.4.4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
3.2.4.5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	50
3.2.4.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	51
3.2.4.6.1. Coomassie-Färbung	52
3.2.4.7. Westernblot (WB)	52
3.2.4.8. Densitometrie	53

3.2.4.9. Stimulation von HEK293/TCM-Zellen	53
3.2.4.10. Stimulation von THP1-Zellen	53
3.2.4.11. Entfernung von LPS mittels EndoTrap	54
3.2.4.12. Bestimmung der LPS-Konzentration mittels EndoLISA.....	54
3.2.4.13. Chemische Quervernetzung von Proteinen.....	55
3.2.4.14. Größenfiltration der Proteine.....	56
3.2.5. Statistik	56
KAPITEL 4 - ERGEBNISSE	57
4.1. Isolierung einzelner S100A12-Komplexe durch Größenfiltration.....	57
Zusammenfassung Abschnitt 4.1.....	58
4.2. Herstellung von S100A12-Mutanten	59
4.2.1. <i>Site-directed Mutagenesis</i>	59
4.2.2. Proteinexpression in Säugierzellen (HEK293).....	61
4.2.3. Vergleich der Proteinexpression im Zytosol und in Einschlusskörpern von <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	62
4.2.4. Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	64
4.2.4.1. Anionenaustauschchromatographie	64
4.2.4.2. Etablierung der HIC-Aufreinigung für die S100A12-Mutanten.....	66
4.2.4.3. Entfernung von Endotoxinen.....	74
4.2.4.4. Qualitätskontrolle der aufgereinigten Proteine.....	74
Zusammenfassung Abschnitt 4.2.....	76
4.3. Bindungsverhalten mono- und polyklonaler Antikörper.....	77
Zusammenfassung Abschnitt 4.3.....	81
4.4. Analyse der Komplexbildung	81
4.4.1. Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung von wtS100A12.....	81
4.4.2. Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Kalziumbindungs-Mutanten	82
4.4.3. Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Zinkbindungs-Mutanten	84
Zusammenfassung Abschnitt 4.4.....	86
4.5. Funktionelle Analysen der S100A12-Mutanten	87
4.5.1. Das S100A12-Hexamer zeigt die effektivste Bindung an TLR-4 und RAGE.....	87
4.5.2. Analyse der Protein-TLR-4-Interaktion im ELISA.....	88
4.5.3. Analyse der Protein-RAGE-Interaktion im ELISA	90
4.5.4. TLR-4 vermittelte Stimulation von HEK293/TCM-Zellen.....	91
4.5.5. TLR-4 vermittelte Stimulation von THP1-Makrophagen.....	93
4.5.6. Stimulation von THP1-Makrophagen in Anwesenheit eines TLR-4 Antikörpers.....	96
Zusammenfassung Abschnitt 4.5.....	98
KAPITEL 5 - DISKUSSION.....	99
5.1. Darstellung verschiedener S100A12-Komplexformen	99
5.1.1. Aminosäureaustausch durch <i>Site-directed Mutagenesis</i>	99

5.1.1.1. Die Mutationen der Kalzium- und Zink-bindenden AS haben unterschiedliche Einflüsse auf die tertiäre bzw. quaternäre Proteinstruktur	101
5.2. Charakterisierung der extrazellulären S100A12-Rezeptor-Interaktion	106
5.2.1. Die Rezeptorbindung ist unter extrazellulären Bedingungen am effizientesten	106
5.2.2. Alle S100A12-Mutanten können die Rezeptoren TLR-4 und RAGE binden.....	107
5.2.3. Hexameres S100A12 ist für die Signalweiterleitung über TLR-4 essentiell.....	108
5.2.4. Stimulation der THP1-Makrophagen nach TLR-4 Blockade	111
5.3. Schlussfolgerung und Ausblick.....	112
KAPITEL 6 - LITERATURVERZEICHNIS.....	115
KAPITEL 7 - ANHANG	126
7.1. Abkürzungsverzeichnis	126
7.2. Abbildungsverzeichnis	130
7.3. Tabellenverzeichnis	131
7.4. Weitere Tabellen und Abbildungen	132
7.5. Eidesstattliche Erklärung	135
7.6. Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
DANKSAGUNG	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

KAPITEL 1

ZUSAMMENFASSUNG

Das pro-inflammatorische Kalzium-Bindeprotein S100A12 fungiert sowohl als Signalmolekül bei der über PRRs (*pattern recognition receptor*) vermittelten Expression inflammatorischer Zytokine als auch als Biomarker verschiedener (auto)inflammatorischer Erkrankungen. Es gehört zur Familie der S100-Proteine, deren Mitglieder durch zwei Kalzium-bindende EF-Hände (EF1, EF2) charakterisiert sind. In Abwesenheit der bivalenten Kationen Kalzium und Zink liegt S100A12 in der apo-Form vor und bildet ausschließlich Dimere. Die Bindung von Kalzium und/oder Zink führt zu einer Konformationsänderung und damit einhergehend zur Oligomerisierung der Proteine. So bildet S100A12, abhängig von der Ionenkonzentration, Dimere, Tetramere oder Hexamere. Es wird vermutet, dass durch die Oligomerisierung die Funktion des Proteins reguliert wird. Beispielsweise hat das Hexamer, im Gegensatz zum Dimer und Tetramer, mehr hydrophobe Bereiche, über die eine Zusammenlagerung und Aktivierung von Rezeptoren (z.B. TLR-4 (*toll-like receptor 4*) oder RAGE (*receptor for advanced glycation endpProducts*)) ermöglicht werden könnte. Dass die Aktivierung von RAGE abhängig von Hexameren ist, wurde bereits gezeigt. Für TLR-4 ist bisher noch nicht endgültig geklärt, welche S100A12-Form (Dimere, Tetramere oder Hexamere) eine Aktivierung des Rezeptors induziert.

Ziel dieser Arbeit war es unterschiedliche S100A12-Komplexe zu separieren und auf ihre TLR-4-Bindung hin zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Wildtyp Protein (wtS100A12) unter intrazellulären Bedingungen, bei denen spezifische Ionenkonzentrationen vorliegen (0,1-0,2 μM Ca und 0,2-0,4 nM Zn), vornehmlich als Dimer oder Tetramer vorliegt. Unter extrazellulären Bedingungen (1-3 mM Ca und 10-50 μM Zn) werden hingegen fast ausschließlich Tetramere und Hexamere gebildet. Zusätzlich konnte eine hohe Plastizität der Komplexbildung beobachtet werden. Die Isolation individueller Oligomere allein über die Regulation der Ionenkonzentration ist demnach ausgeschlossen.

Da die Komplexbildung von Kalzium und Zink abhängt, sind Aminosäuren (AS), die essentiell für die Bindung dieser Ionen sind, durch Alanin ersetzt worden. Die Substitution einer polaren gegen eine unpolare AS verhindert bzw. reduziert die

Ausbildung von Hexameren deutlich. Die Mutationen der Kalzium-Bindungsstellen (N63A, E72A) haben den größten Einfluss. Proteinmutanten, die hier den AS-Austausch enthalten, sind nicht mehr in der Lage, höhere Komplexe als Tetramere zu bilden. Des Weiteren ist die Anzahl an Tetrameren, im Vergleich zur Gesamtproteinmenge, deutlich geringer als bei dem wtS100A12. Die Zinkbindungs-Mutanten (H15A, D25A, H85A, H89A) hingegen sind nicht so stark in der Komplexbildung eingeschränkt, jedoch ist der Anteil höherer Komplexe (Tetramere, Hexamere) am Gesamtprotein deutlich geringer als bei dem wtS100A12. Außerdem sind hier unter extrazellulären Bedingungen zusätzlich Dimere zu detektieren, die bei dem wtS100A12 nicht vorliegen.

In funktionellen Analysen der Mutanten konnte gezeigt werden, dass alle Komplexformen des S100A12 in der Lage sind, die Rezeptoren TLR-4 und RAGE zu binden. Der Vergleich der Bindungseffizienzen unter spezifischen Ionenkonzentrationen, unter denen vorwiegend Dimere, Tetramere bzw. Hexamere vorliegen, zeigt einen sukzessiven Anstieg der Bindungseffizienz vom Dimer über das Tetramer bis hin zum Hexamer. Trotz der Unterschiede bei der Oligomerisierung konnte ebenfalls für alle Mutanten eine Interaktion mit den Rezeptoren nachgewiesen werden. Jedoch zeigen auch hier die Kalziumbindungs-Mutanten die schwächste Bindung. Die Zinkbindungs-Mutanten sind weiterhin fähig an die Rezeptoren zu binden, allerdings ist diese Bindung ebenfalls schwächer als die des wtS100A12.

Bei Analysen zur Rezeptor-Aktivierung ist hingegen deutlich geworden, dass ausschließlich hexameres S100A12 in der Lage ist, eine Signaltransduktion über TLR-4 zu initiieren. Interessanterweise weist die Zinkbindungs-Mutante D25A hierbei teilweise eine stärkere Aktivierung des TLR-4 auf als wtS100A12. Durch die eingeführte Mutation wird die Hexamer-Form dieser Zinkbindungs-Mutante stabilisiert, wodurch sich das Protein permanent in der aktiven Form befindet und daher eventuell ein stärkerer Agonist ist.

Somit ist die Annahme, dass die Proteinaktivität über den Grad der Oligomerisierung reguliert wird, bestätigt. Da das Hexamer vermehrt hydrophobe Bereiche aufweist kann mit diesen Ergebnissen ebenfalls die Theorie gestützt werden, dass die Rezeptor-Oligomerisierung zur Induktion der Signalleitung führt.

KAPITEL 2

EINLEITUNG

2.1. Das Immunsystem

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist es den Körper vor infektiösen Faktoren sowie weiteren schädlichen Einflüssen, wie Toxinen oder physikalischem Stress, zu schützen. Das komplexe Zusammenspiel unterschiedlicher Organe, Gewebe, Zellen und Botenstoffe führt hierbei zu einer effektiven und regulierten Bekämpfung von Erregern und zur Reparatur zerstörter Gewebe (Medzhitov, 2008). Die erste Barriere des Immunsystems ist eine physikalische. Sie wird durch die Haut und Schleimhäute gebildet. Als zweites Hindernis treffen Pathogene und andere schädliche Faktoren auf die mechanische Barriere, die aus Flimmerhärchen, Speichel und Schleim besteht. Wenn diese ersten Hürden überwunden wurden, übernimmt der zelluläre und humorale Teil des Immunsystems. Diese letzte Instanz ist hierarchisch aufgebaut und kann in zwei Bereiche untergliedert werden: das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Als erstes reagiert die angeborene Immunabwehr auf infiltrierende Substanzen. Sie werden beispielsweise durch Makrophagen oder dendritische Zellen (DC; *dendritic cell*) phagozytiert. Mittels dieser Zellen können dann wiederum die Effektorzellen der adaptiven Immunantwort (Lymphozyten) aktiviert werden. Das angeborene Immunsystem ist, wie die physikalische und mechanische Barriere auch, eine antigen-unabhängige Abwehr. Im Gegensatz dazu kann die Immunantwort im adaptiven System angepasst und im „immunologischen Gedächtnis“ gespeichert werden (Ahmed *et al.*, 1996). Dies erlaubt bei erneuter Infektion eine schnellere und effizientere Reaktion.

2.1.1. Das angeborene Immunsystem

Im Gegensatz zum adaptiven reagiert das angeborene Immunsystem auf jede Infektion auf die gleiche Art und Weise, unabhängig davon, wie oft sie bereits aufgetreten ist. Dies ermöglicht eine extrem schnelle Reaktion, bei der stark konservierte Strukturen infektiöser Organismen, sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*),

von speziellen Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) erkannt und als „Gefahr“ klassifiziert werden (Janeway, 1989). PRRs werden auf Zellen, die im Blut patrouillieren, exprimiert. Zu diesen Zellen zählen unter anderem professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC, *antigen presenting cell*), wie Monozyten und Makrophagen, DCs und in geringerem Ausmaß Zellen des adaptiven Immunsystems (B-Zellen) (Medzhitov *et al.*, 1997a). Die Rezeptoren können sowohl intrazellulär und membrangebunden als auch als Plasmaproteine vorliegen.

Zu den PAMPs, die an PRRs binden, zählen beispielsweise bakterielle Bestandteile, wie LPS (Lipopolysaccharid) von Gram-negativen Bakterien und Peptidoglykane Gram-positiver Bakterien sowie bakterielle und parasitäre DNA (Akira *et al.*, 2006; Gazzinelli *et al.*, 2014). Das Immunsystem kann allerdings nicht nur durch exogene Faktoren, sondern zusätzlich auch durch körpereigene Strukturen aktiviert werden (Bianchi, 2007; Foell *et al.*, 2007). Sie werden bei einer nicht-infektiösen Entzündungsreaktion freigesetzt und binden und aktivieren teilweise die gleichen Rezeptoren, wie die PAMPs. In Analogie zu den Pathogen-assoziierten Faktoren werden diese Strukturen *damage associated molecular patterns* (DAMPs) genannt.

2.2. DAMPs

DAMPs sind endogene Gefahrensignale, die bei einer sterilen Entzündungsreaktion von geschädigten Zellen im Rahmen des Zelltods (Nekrose) freigesetzt oder gezielt von Immunzellen produziert und sekretiert werden (Bianchi, 2007). Es handelt sich überwiegend um Moleküle, die unter physiologischen Bedingungen intrazelluläre Prozesse regulieren. Da sie im Normalfall extrazellulär nicht vorliegen, wird ihr Vorkommen im Extrazellulärraum als „Bedrohung“ erkannt. Durch die Bindung der DAMPs an PRRs wird dann die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen initiiert (Bianchi, 2007; Heijmans *et al.*, 2013; Lotze *et al.*, 2005; Ohashi *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2010). Zu den DAMPs gehören eine Vielzahl verschiedener zellulärer Bestandteile. Ihre Art ist stark vom Zelltyp abhängig. Neben Hitzeschockproteinen sind beispielsweise doppelsträngige DNA, ATP, Annexine oder Harnsäure (Bianchi, 2007; Ishii *et al.*, 2001; Srivastava, 2002) sowie das DNA-Bindeprotein HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*) DAMPs (Scaffidi *et al.*, 2002). Auch einige Mitglieder der S100-Familie zählen, aufgrund ihrer Bindung an PRRs sowie der Beteiligung bei frühen pro-inflammatorischen Reaktionen, zu DAMPs (Donato *et al.*, 2013; Rammes *et al.*, 1997; Viemann *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2001).

2.3. Die S100-Proteinfamilie

Die S100-Proteine gehören zu einer definierten Familie Kalzium-bindender Proteine. Sie sind bei verschiedenen zellulären Prozessen als Regulatoren, Kalzium-Sensoren und Transporter involviert (Donato *et al.*, 2013).

Im Jahr 1995 wurde das erste S100-Protein identifiziert. Die Namensgebung beruht auf der Tatsache, dass es in einer 100%-igen Ammoniumsulfatlösung löslich ist (Moore, 1965). Später wurde beschrieben, dass das S100-Protein aus zwei unterschiedlichen Proteinen, S100B und S100A1, aufgebaut ist (Isobe *et al.*, 1978). Basierend auf der Anordnung der bekannten S100-Proteine auf dem humanen Chromosom 1 wurde 1995 eine allgemein gültige Nomenklatur für alle S100-Proteine festgesetzt (Schafer *et al.*, 1995). Die Buchstaben geben hierbei an, auf welchem Chromosom das jeweilige Protein kodiert ist. So sind alle S100A-Proteine auf dem Chromosom 1 (1q21) kodiert (Marenholz *et al.*, 2006; Schafer *et al.*, 1995). Das Gen für S100B ist hingegen auf dem Chromosom 21q22 lokalisiert. Die Zahl hinter dem Buchstaben gibt die Reihenfolge der Gene auf dem jeweiligen Chromosom wieder.

Insgesamt besteht die Familie der S100-Proteine aus 21 niedermolekularen Proteinen mit einem Molekulargewicht von 9-13 kDa. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen gleiche Struktur motive. Sie sind aus zwei Kalzium-bindenden EF-Hand Helix-Loop-Helix Strukturen aufgebaut, die durch flexible Linker, den *hinge*-Regionen, verbunden sind. Dennoch sind die Aminosäuresequenzen lediglich zu 25-65% identisch (Schafer *et al.*, 1996). Die S100-Proteine kommen ausschließlich bei Wirbeltieren vor (Shang *et al.*, 2008) und weisen ein zell- und gewebspezifisches Expressionsmuster auf (Cross *et al.*, 2005; Elder *et al.*, 2002; Pedrocchi *et al.*, 1994). Die sogenannten Calgranuline (S100A8, S100A9 und S100A12) werden beispielsweise vornehmlich in Granulozyten und Monozyten exprimiert (Roth *et al.*, 2003; Vogl *et al.*, 1999a).

In der medizinischen Diagnostik dienen S100-Proteine als Biomarker für verschiedene Erkrankungen (Heizmann *et al.*, 2002). Auf intrazellulärer Ebene nehmen sie Einfluss auf Prozesse, wie den Zellzyklus, Zellmotilität, Gentranskription und Zelldifferenzierung (Schafer *et al.*, 1996). Zusätzlich spielen sie bei extrazellulären Prozessen, wie der Differenzierung und Apoptose von Neuronen sowie der Aktivierung oder Inhibierung von inflammatorischen Zellen eine Rolle (Donato *et al.*, 2013). Beispielsweise wird die Rekrutierung von Leukozyten sowie die Aktivierung von Signalwegen in weiteren Zellen des Immunsystems, durch das pro-inflammatorische Protein S100A12 induziert (Yan *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2007).

2.3.1. S100A12

Initial wurde S100A12 in porzinen Granulozyten entdeckt (Dell'Angelica *et al.*, 1994; Schleicher *et al.*, 1993). Später wurde es auch bei Kaninchen und Rindern nachgewiesen (Hitomi *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1996). Das humane S100A12-Protein besitzt 70 % Sequenzhomologie mit dem des Schweins und Kaninchens und 78% mit dem des bovinen S100A12 (Ilg *et al.*, 1996; Ravasi *et al.*, 2004). Zunächst wurde angenommen, dass es in Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten exprimiert wird (Dell'Angelica *et al.*, 1994; Guignard *et al.*, 1995). Jedoch konnte später gezeigt werden, dass es primär in Granulozyten vorkommt. Hier macht es ca. 5 % des zytosolischen Proteins aus. Zusätzlich zum intrazellulären Vorkommen konnte S100A12 im Serum nachgewiesen werden (Foell *et al.*, 2003a).

Im Laufe der Jahre sind viele Synonyme für dieses Protein entstanden. So wurde es, in Analogie zu den bereits bekannten S100 Proteinen S100A8 (Calgranulin A) und S100A9 (Calgranulin B), zunächst Calgranulin C genannt (Dell'Angelica *et al.*, 1994). Weitere Bezeichnungen waren CAAF1 (*calcium-binding protein abundant in amniotic fluid 1*; Rind) (Hitomi *et al.*, 1998), MRP6 (*myeloid related protein 6*), p6 (human) (Guignard *et al.*, 1995) oder EN-RAGE (*extracellular newly identified RAGE binding protein*; human) (Hofmann *et al.*, 1999). Basierend auf der 1995 festgesetzten Nomenklatur wurde für das humane Protein die Bezeichnung S100A12 festgelegt. Aufgrund der späteren Entdeckung wurde das humane S100A12, obwohl es auf dem Chromosom 1 zwischen S100A8 und S100A9 liegt, mit der Nummer 12 versehen (Wicki *et al.*, 1996).

2.3.1.1. Struktur von S100A12

Wie alle S100-Proteine besitzt S100A12 zwei Kalzium-bindende EF-Hand Helix-Loop-Helix Strukturen. Diese sind durch flexible Linker, den *hinge*-Regionen, verbunden (**Abb. 2.1**) (Zimmer *et al.*, 1995). Die Helices und Loop-Strukturen sind in der Reihenfolge ihres Vorkommens durchnummeriert. So befinden sich die Helices I und II sowie der Loop 1 in der EF1 und die Helices III und IV sowie der Loop 2 in der EF2. Die N-terminale EF-Hand Domäne (EF1) unterscheidet sich von einer klassischen EF-Hand und wird daher als S100-spezifische oder pseudo-EF-Hand bezeichnet. Die C-terminale Domäne (EF2) hingegen enthält das klassische EF-Hand Motiv (kanonische EF-Hand). Zwischen den einzelnen S100-Proteinen weisen die EF-Hände eine starke Sequenzhomologie auf (Moroz *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu variiert die Sequenz

der *hinge*-Regionen zwischen den Mitgliedern der Familie stark. Sie dienen vermutlich der Bindung weiterer Proteine (Bhattacharya *et al.*, 2003; Inman *et al.*, 2002; Rety *et al.*, 2000; Rety *et al.*, 1999; Rustandi *et al.*, 2000).

Alle S100-Proteine sind in der Lage, antiparallel angeordnete Dimere zu bilden (**Abb. 2.2**). Einige, wie z.B. S100A8/A9, S100A4, S100B und S100A12, können sich zusätzlich zu höheren Komplexen wie Trimeren, Tetrameren oder Hexameren zusammenlagern (Kiryushko *et al.*, 2006; Moroz *et al.*, 2009b; Ostendorp *et al.*, 2007; Teigelkamp *et al.*, 1991). Die Ausbildung von Oligomeren ist hierbei abhängig von spezifischen Ionen. Das S100A8/A9-Heterotetramer bildet sich beispielsweise nur in Anwesenheit von Kalzium aus (Strupat *et al.*, 2000; Vogl *et al.*, 1999b). S100A12 ist in der Lage sowohl Kalzium als auch Zink zu binden und in Abhängigkeit der Ionenkonzentration Dimere, Tetramere oder Hexamere zu bilden (Moroz *et al.*, 2009b).

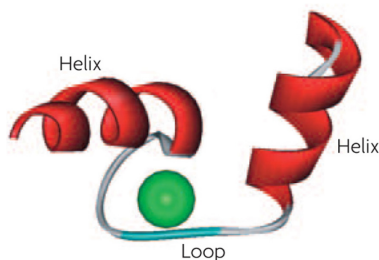


Abb. 2.1: EF-Hand Motiv

Die Abbildung zeigt das Helix-Loop-Helix Motiv einer EF-Hand mit gebundenen Kalzium (grün) (Burgoyne, 2007).

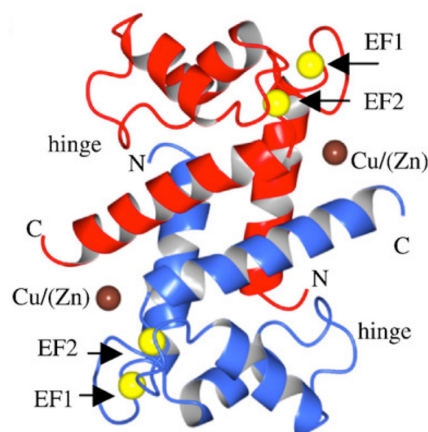


Abb. 2.2: S100A12-Dimer

Ribbon Struktur eines S100A12-Dimers, das Kalzium und Zink gebunden hat. Die Monomere sind in rot bzw. blau dargestellt. Die Ionen sind in gelb (Kalzium) und braun (Kupfer bzw. Zink) dargestellt (Moroz *et al.*, 2009a).

2.3.1.2. Bindung zweiwertiger Kationen durch S100A12 und deren Einfluss auf die Proteinstruktur und -funktion

Die Bildung verschiedener Oligomere ist bei S100A12 von den zweiwertigen Ionen Kalzium und Zink abhängig. Kalzium wird über die EF-Hand-Motive gebunden. Wie bei allen S100-Proteinen haben auch die EF-Hände von S100A12 unterschiedliche Affinitäten für die Kalzium-Bindung. Die N-terminale EF-Hand hat eine geringere Bindungsaffinität als die klassische, C-terminale EF-Hand (Moroz *et al.*, 2009a).

Koordiniert wird das Kalzium in der EF1 durch die Carbonylgruppen der AS Ser18, Lys21, His23, Thr26 und einer Carboxylatgruppe von Glu31 (**Abb. 2.3**). In der EF2 wird das Kalzium ebenfalls durch Carboxylatgruppen, diesmal der AS Asp61, Asn63, Asp65 und Glu72 sowie durch die Carbonylgruppe von Gln67 und einem Wassermolekül koordiniert (**Abb. 2.3**) (Moroz *et al.*, 2001). In der Hexamer-Form können weitere sechs interdimere Kalziumionen durch den Sauerstoff des Gln58 und Gln64 eines Dimers und die Carboxylgruppe von Glu55 eines weiteren Dimers gebunden werden (Moroz *et al.*, 2002).

Neben Kalzium kann S100A12 zusätzlich Kupfer und Zink binden (Moroz *et al.*, 2003a; Moroz *et al.*, 2009a). Diese Ionen werden tetraedrisch durch His15 und Asp25 einer UE (Untereinheit) und His85 und His89 der zweiten UE eines Dimers koordiniert (**Abb. 2.3**) (Moroz *et al.*, 2009a).

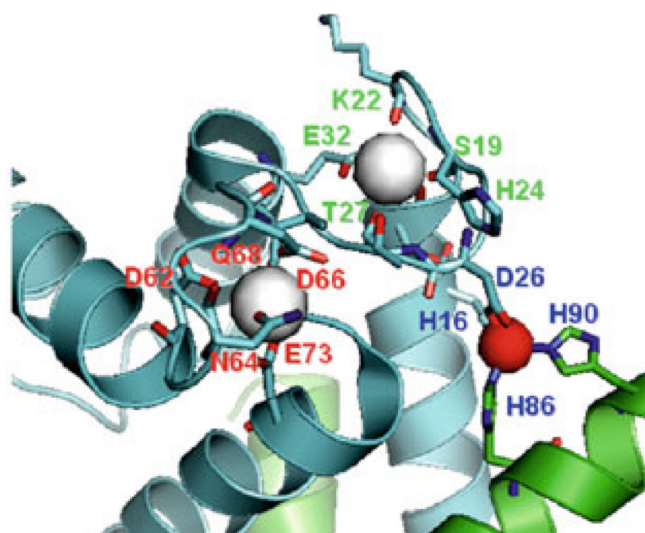


Abb. 2.3: Detaillierte Darstellung der Metall-Bindungsstellen

Stereo-Darstellung der AS, die an der Bindung von Kalzium (grau), Zink (rot) und Kupfer (rot) beteiligt sind. AS der EF-Hände sind in rot bzw. grün dargestellt. Die in blau dargestellten AS binden Zink bzw. Kupfer. Die Verschiebung der AS-Nummerierung um +1 im Vergleich zum Text resultiert aus den in den Artikeln verwendeten Primärdaten (Hung *et al.*, 2013).

Die Dimerisierung von S100A12 scheint hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen zu erfolgen (Moroz *et al.*, 2001). Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass die Bindung von Zink die Dimerstruktur von S100A12 stabilisiert (Moroz *et al.*, 2009b). Ebenfalls erhöht die Zink-Bindung die Affinität zu Kalzium um das 1500-fache (Dell'Angelica *et al.*, 1994), vermutlich da sie zu einer erhöhten Flexibilität in der EF2 führt (Moroz *et al.*, 2009a). Es wurde gezeigt, dass durch Zink eine Konformationsänderung der Helix IV induziert wird. Zusätzlich nimmt die Zink-Bindung Einfluss auf die Konformation der Helix I (Moroz *et al.*, 2009a). Auch für die Effekte von S100A12 scheint Zink eine Rolle

zu spielen. Die Bindung des Ions erhöht anscheinend die Affinität von S100A12 zu dem Rezeptor RAGE (*receptor for advanced glycation end products*). In Medium mit einer hohen Zinkkonzentration zeigt sich ein erhöhtes Signal für S100A12 an der Oberfläche von humanen Zellen, die endogenes RAGE exprimieren (Moroz *et al.*, 2009b).

Die Bindung von Kalzium führt hingegen zu einer Konformationsänderung der Helix III und der *hinge*-Region und damit zu einer Exposition einer hydrophoben Oberfläche, die möglicherweise eine Bindung zu anderen Proteinen verstärkt (Moroz *et al.*, 2009a). Zusätzlich führen geringe Konzentrationen von Kalzium zu einer erhöhten Flexibilität der N-terminalen Region. Es wird angenommen, dass die hier vorkommende Helix ebenfalls bei der Bindung von Zielmolekülen beteiligt ist (Hung *et al.*, 2013). Ferner hat Kalzium einen Einfluss auf die Verteilung von S100A12 in Neutrophilen. In Abwesenheit von Kalzium-Ionen ist S100A12 vorwiegend im Zytosol lokalisiert. Wird die Kalziumkonzentration erhöht, so wird es zur Membran und zu Zytoskelettkomponenten transloziert (Garcia *et al.*, 2013; Guignard *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2001).

Die Bildung höherer Komplexe, wie Tetramere und Hexamere, ist bei S100A12 von Kalzium und/oder Zink abhängig (**Abb. 2.4**) (Moroz *et al.*, 2009a; Moroz *et al.*, 2009b). Durch Bindung von Zink (**Abb. 2.4 b**) wird ein „*Tetramerisierungs-Interface*“ ausgebildet. Dies begünstigt die Bildung von Tetrameren (**Abb. 2.4 c**) (Moroz *et al.*, 2009a). Die Tetramerisierung ist allerdings auch durch Kalzium allein induzierbar (Moroz *et al.*, 2009b). In der Tetramer-Form stehen zusätzliche, interdimere Kalzium-Bindungsstellen zur Verfügung (**Abb. 2.4 e**). Die Bindung weiterer Kalzium-Ionen durch diese führt schließlich zur Ausbildung eines Hexamers (**Abb. 2.4 f**) (Moroz *et al.*, 2009a).

Die Kalzium- und Zinkkonzentrationen unterscheiden sich intra- und extrazellulär stark (intrazellulär 0,1-0,2 μM Ca + 0,2-0,4 nM Zn; extrazellulär: 1-3 mM Ca + 10-50 μM Zn), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass hier unterschiedliche Komplexe vorliegen. Somit könnten die einzelnen Komplexformen differentielle Funktionen haben (Moroz *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2007).

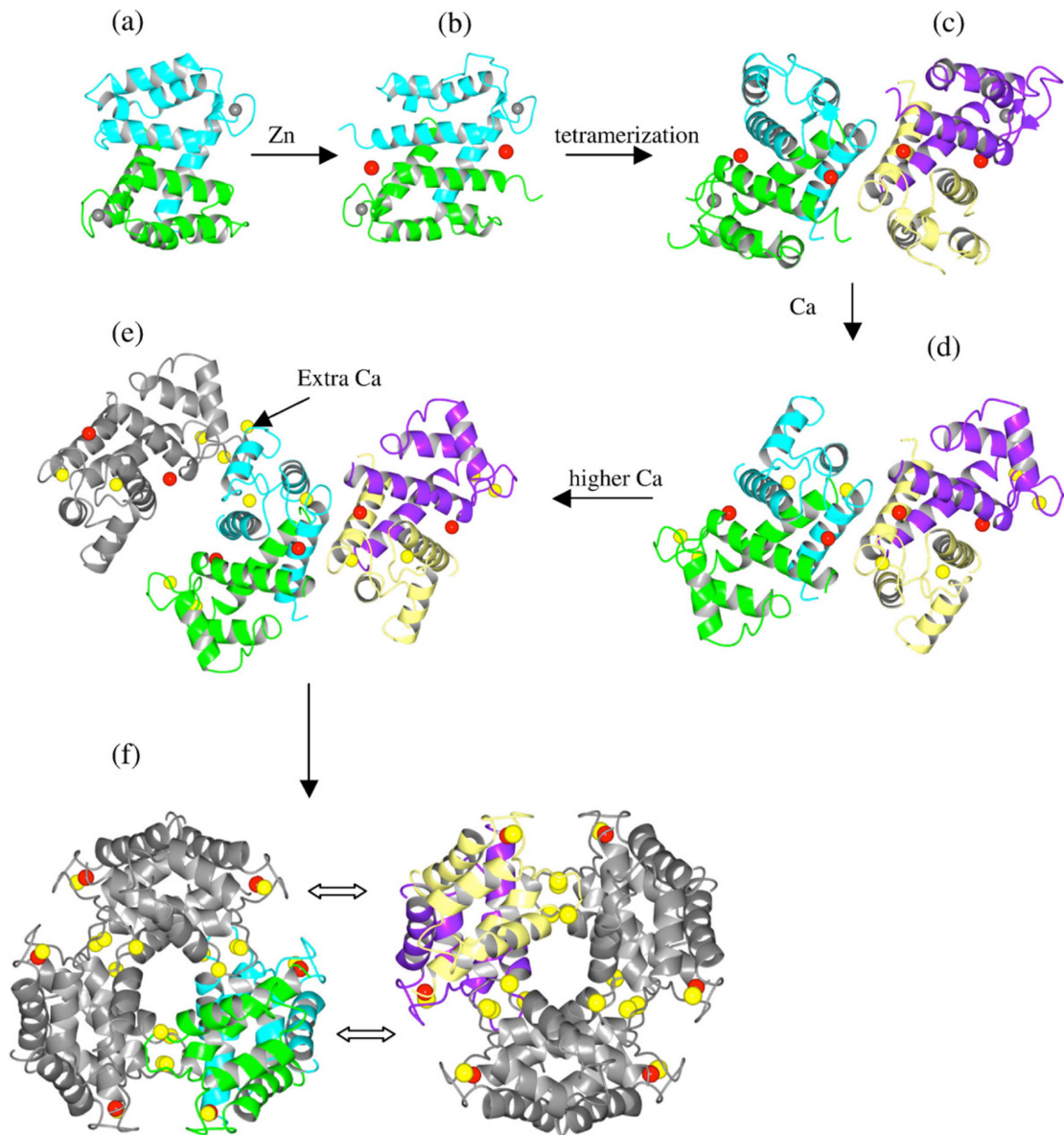


Abb. 2.4: Mögliche Übergänge zwischen der Dimer-, Tetramer- und Hexamer-Form von S100A12

In Abwesenheit von Kalzium und Zink liegt S100A12 als Dimer vor. Die Untereinheiten sind in blau bzw. grün dargestellt. Das in der apo-Form durch die EF-Hände gebundene Natrium ist in grau dargestellt (a). Durch die Bindung von Zink (rot) wird eine Konformationsänderung induziert (b). Hierdurch wird das „*Tetramerisierungs-Interface*“ stabilisiert und es bilden sich Tetramere. Die Untereinheiten des zweiten Dimers sind in rot bzw. magenta dargestellt (c). Die Bindung von Kalzium (gelb) in den EF-Händen (d) und interdimer (e, Extra Ca) führt zur Ausbildung von Hexameren (f). Die zusätzlichen Dimere sind in grau dargestellt (Moroz *et al.*, 2009a).

2.3.1.3. Funktionen von S100A12

Wie viele Kalzium-bindende Proteine hat auch S100A12 verschiedene intra- und extrazelluläre Funktionen, wobei die intrazellulären bisher noch nicht eingehend untersucht wurden. Hier könnte es u.a. eine Rolle als Kalzium- und/oder Zink-Puffer einnehmen (Donato *et al.*, 2013; Moroz *et al.*, 2009b). In verschiedenen autoimmun- und (auto)inflammatorischen Krankheiten wird S100A12 sekretiert und kann durch Bestimmung der zirkulierenden S100A12-Konzentration als Biomarker zur Analyse des Krankheitsverlaufs genutzt werden (Abe *et al.*, 2005; Bovin *et al.*, 2004; Ebihara *et al.*, 2005; Foell *et al.*, 2004a; Foell *et al.*, 2003b; Foell *et al.*, 2003c; Foell *et al.*, 2003d; Foell *et al.*, 2004b; Wilsmann-Theis *et al.*, 2015). Durch die Sekretion kann es weiterhin eine DAMP-Funktion erhalten (Donato *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2001). Ebenso wie andere DAMPs wird S100A12 bei der Nekrose (Foell *et al.*, 2013) sowie aktiv durch Sekretion freigesetzt. Da es jedoch keine Strukturelemente für eine Sekretion über den klassischen Weg (endoplasmatisches Retikulum/Golgi) besitzt (Schafer *et al.*, 1996) wird vermutet, dass die Sekretion mittels des nicht-klassischen Wegs, über den auch IL-1 β sekretiert wird, abläuft (Foell *et al.*, 2013; Rammes *et al.*, 1997; Rubartelli *et al.*, 1990; Schafer *et al.*, 1996; Vogl *et al.*, 2004).

Für S100A12 wurde bereits eine Bindung an den Rezeptor RAGE beschrieben (Srikrishna *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2007). RAGE ist ein Transmembranprotein mit drei extrazellulären, Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen (zwei C-Typ Domänen, eine V-Domäne), einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne, welche für die Signalleitung essentiell ist (Hofmann *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass hexameres S100A12, welches wahrscheinlich die V-Domäne des Rezeptors bindet, für die Rezeptor-Aktivierung benötigt wird (Xie *et al.*, 2008). Durch die Bindung wird wahrscheinlich eine Oligomerisierung des Rezeptors induziert, was die Signalleitung initiiert (Moroz *et al.*, 2009b; Moroz *et al.*, 2003b; Srikrishna *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2007). Für Bindungsanalysen wird oft die lösliche Form des Rezeptors (sRAGE; *soluble* RAGE) eingesetzt. Diese enthält neben der V-Domäne ebenfalls die extrazellulären Domänen C1 und C2, welche ebenfalls in der Lage sind mit Liganden zu interagieren (Leclerc *et al.*, 2007). Lediglich die Transmembran- und intrazelluläre Domäne fehlen (Raucci *et al.*, 2008).

Es wurde beschrieben, dass bovines S100A12 zu einer RAGE-abhängigen Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (TNF α , IL-1 β , IL-2) in humanen PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*) und mononukleären Phagozyten (Hofmann *et al.*, 1999) und humanes S100A12 in Mäusen zu einer erhöhten IL-22 Menge im Plasma führt (Chellan *et al.*, 2014). In S100A12 transgenen Mäusen konnte zusätzlich eine S100A12/RAGE-

abhängige Verkalkung von Arterien und der Aortenklappe bei chronischen Nierenerkrankungen gezeigt werden (Gawdzik *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2014). Im Allgemeinen ist jedoch zu beachten, dass Mäuse kein S100A12 exprimieren (Fuellen *et al.*, 2003) und in unterschiedlichen Studien gezeigt werden konnte, dass zwar sowohl humanes als auch bovines S100A12 eine chemotaktische Wirkung auf humane Monozyten haben, dass bovine Protein jedoch deutlich weniger Einfluss hatte als das humane (Hofmann *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). Daher scheinen cross-Spezies Experimente wenig effektiv zu sein (Moroz *et al.*, 2003b) wodurch die Gültigkeit der Ergebnisse für das humane System sehr fragwürdig ist.

Des Weiteren wurde eine Kupfer-abhängige antiparasitäre Wirkung von S100A12 (Gottsch *et al.*, 1999a; Gottsch *et al.*, 1999b; Marti *et al.*, 1996) und ein Einfluss auf die Rekrutierung von Immunzellen beschrieben (Moroz *et al.*, 2009a; Yan *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2001). Mittels S100A12 wird die Migration und Aktivität von Neutrophilen und Monozyten reguliert (Foell *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2001). Foell *et al.* konnten zeigen, dass die Stimulation humaner Monozyten mit ebenfalls humanem S100A12 die Expression der pro-inflammatorischen Gene TNF α und IL-8 aktiviert (Foell *et al.*, 2013). Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass die Produktion dieser Zytokine von dem Rezeptor TLR-4 und nicht von RAGE abhängig ist. Obwohl beide Rezeptoren von S100A12 gebunden werden, führte nur die Blockade von TLR-4 zu einer verminderten Aktivität der Monozyten.

2.4. TLRs

Toll-Proteine wurden zunächst in *Drosophila* entdeckt, wo sie u.a. eine frühe Form des Immunsystems bilden (Cherry *et al.*, 2006). Bisher sind 10 funktionell relevante, humane TLRs bekannt, TLR-1-10 (Kaisho *et al.*, 2006). Sie sind Typ I Membran-Proteine, die sich auf der Plasmamembran oder auf Endosomen und Lysosomen befinden (Akira *et al.*, 2006). TLRs gehören zu den PRRs des angeborenen Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle bei der frühen Abwehr von Pathogenen. Sie fördern nicht nur die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, sondern auch die Reifung antigen-präsentierender Zellen (Akira *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Die Rezeptoren der TLR-Familie weisen eine große Homologie auf. Sie bestehen aus einer Leucin-reichen, extrazellulären LRR (*leucine rich repeat*)-Domäne,

einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne (**Abb. 2.5**) (Medzhitov *et al.*, 1997b). Die TIR-Domäne enthält drei konservierte Bereiche (Box 1-3), die für die Signalleitung entscheidend sind.

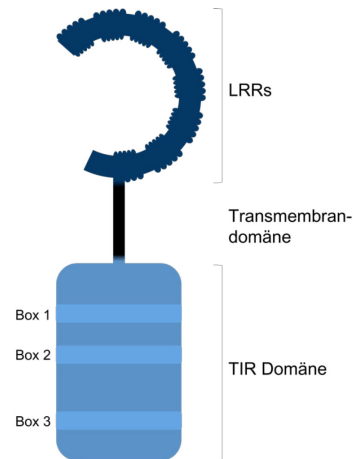


Abb. 2.5: Schematischer Aufbau eines Toll-like Rezeptors

TLRs sind aus einer extrazellulären LRR-Domäne (dunkelblau), einer Transmembrandomäne (schwarz) und einer TIR-Domäne (hellblau) aufgebaut. Die TIR-Domäne enthält drei konservierte Bereiche, die für die Signalgebung entscheidend sind (Box 1-3).

Nach der Bindung eines Liganden an die LRR-Domäne werden unterschiedliche Adapterproteine, wie TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*) und TRAM (*TIRF-related adaptor molecule*), rekrutiert. Diese initiieren eine Signalkaskade an der u.a. verschiedene Kinasen beteiligt sind. Am Ende der Signalleitung steht die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF), wie NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-anhancer of activated B cells*), AP-1 (*activator protein-1*) und IRF3 (*interferon regulatory factor 3*), die die Genexpression verschiedener Zielgene induzieren. Die Expressionsprodukte dieser sind inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1 (Interleukin-1), IL-8, IL-6, IL-10 und TNF α (Tumornekrosefaktor α), Chemokine oder die zur Virenabwehr benötigten Typ I Interferone (Medzhitov *et al.*, 1997b). Ihre Freisetzung führt zur Aktivierung und Rekrutierung weitere Zellen des Immunsystems.

TLRs binden verschiedene PAMPs, z.B. LPS und virale RNA und DNA, sowie endogene Faktoren (DAMPs), wie beispielsweise Proteine der S100-Familie (Ehrchen *et al.*, 2009; Foell *et al.*, 2013; Takeuchi *et al.*, 2010). Die TLRs 2, 3, 4, 7 und 9 sind sowohl in der Lage PAMPs als auch DAMPs zu erkennen, wobei die DAMPs meist Proteine sind (Stein *et al.*, 2010). Für die Bindung von PAMPs weisen die Rezeptoren unterschiedliche Präferenzen auf. Die TLRs 3, 7 und 8 sind in der Lage virale RNA und

DNA zu erkennen und daher für die Abwehr von Viren verantwortlich (Mogensen, 2009). TLR-9 hingegen kann sowohl bakterielle als auch virale CpG DNA binden (Takeuchi *et al.*, 2010) und die TLRs 2 und 4 sind in der Lage, virale Proteine und LPS Gram-negativer Bakterien zu erkennen (Muta *et al.*, 2001). Daher spielen diese Rezeptoren sowohl bei der Abwehr von Bakterien als auch Viren eine Rolle. Der Signalweg über TLR-4 ist besonders interessant. Aufgrund einer großen Anzahl unterschiedlicher intra- und extrazellulärer Adapterproteine ist er nicht nur äußerst komplex, sondern auch sehr variabel (Nishiya *et al.*, 2006).

2.4.1. Signalleitung über TLR-4

Am besten erforscht ist wohl der LPS-induzierte Signalweg. Hierbei bindet LPS zunächst an das frei im Blut zirkulierende LPS-Bindeprotein (LBP) und CD14 (*cluster of differentiation 14*), einem von Phagozyten exprimierten Protein (Wright *et al.*, 1990). Dieser Komplex wird wiederum von MD-2 (*myeloid differentiation factor 2*), einem sekretorischen Glykoprotein, das mit der extrazellulären Domäne von TLR-4 assoziiert ist, gebunden (Shimazu *et al.*, 1999). Die dadurch induzierte Dimerisierung von zwei TLR-4/MD-2 Komplexen führt zu einer räumlichen Nähe der TIR-Domänen (Kim *et al.*, 2007). Dies wiederum führt zur Rekrutierung der Adapterproteine MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) oder TRIF und induziert, in Abhängigkeit dieser, zwei unterschiedlicher Signalwege (MyD88-abhängig oder MyD88-unabhängig) (**Abb. 2.6**).

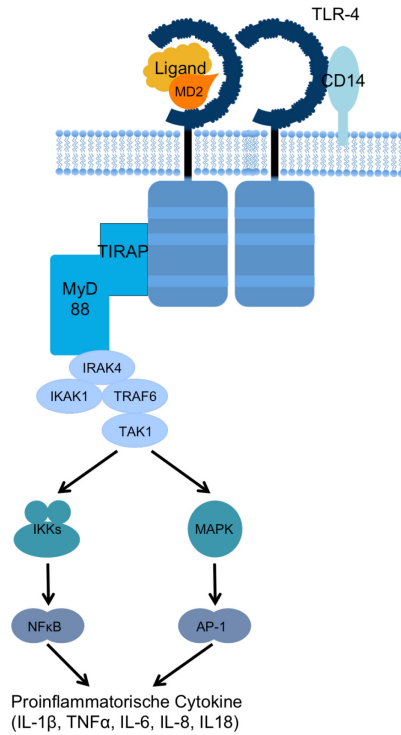
Allerdings spielt TLR-4 nicht nur eine essentielle Rolle bei der Erkennung von PAMPs. Auch DAMPs sind in der Lage diesen Rezeptor zu binden und zu aktivieren. Bei den DAMPs handelt es sich beispielsweise um verschiedene Hitzeschockproteine (HSP, *heat shock protein*), HMGB1 und die S100-Proteine S100A8/A9 und S100A12 (Asea *et al.*, 2002; Foell *et al.*, 2013; Moroz *et al.*, 2009b; Ohashi *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004; Roelofs *et al.*, 2006). Am Ende der Signalwege nach der HMGB1- oder S100A8/A9-Bindung steht ebenfalls die Aktivierung von NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-activator of activated B cells*) (**Abb. 2.6**). HMGB1 initiiert, wie LPS, die Akkumulation von CD14, MD-2 und TLR-4 (Kim *et al.*, 2013), wobei das Signal durch die Oligomerisierung des Liganden verstärkt wird (Lee *et al.*, 2014). Da für HMGB1 bekannt ist, dass die TLR-4 vermittelte Signalleitung in Mäusen von MyD88 und TRIF abhängt (Wang *et al.*, 2015), kann davon ausgegangen werden, dass die weitere Signalleitung analog zu der LPS-vermittelten Aktivierung verläuft.

Bei dem LPS-vermittelten MyD88-abhängigem Signalweg wird die Bildung der TF NF κ B und AP-1 und daraus folgend die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine induziert (**Abb. 2.6 a**) (Kawai *et al.*, 1999). Nach seiner Aktivierung wird zunächst TIRAP zur Plasmamembran rekrutiert, was die Interaktion zwischen MyD88 und TLR-4 ermöglicht (Kagan *et al.*, 2006). Über die sogenannten *death*-Domänen von MyD88 wird die Rekrutierung von IRAK-4 (*Interleukin receptor associated kinase*) induziert. Durch IRAK-4 wird im folgenden IRAK-1 rekrutiert und phosphoryliert (Lye *et al.*, 2004), was zur Aktivierung von IRAK-1 führt. Dies induziert die Dissoziation der TIR-Domänen und die Bindung von TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) wird ermöglicht. TRAF6 bildet einen Komplex mit verschiedenen Ubiquitin-konjugierten Enzymen und aktiviert TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase-1*) (Gohda *et al.*, 2004). TAK1 wiederum kann entweder den IKK (I κ B Kinase)- oder MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg induzieren. Fungiert TAK1 als MEKK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) wird die MAPK aktiviert (Sato *et al.*, 2005). Dies führt zur Aktivierung des TF AP-1 (Chang *et al.*, 2001) und zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine. Führt hingegen TAK1 zur Phosphorylierung und Aktivierung der I κ B-Kinase, so wird I κ B phosphoryliert. Dies wird durch ein Ubiquitin-Protease System degradiert, wodurch NF κ B freigesetzt und die Expression pro-inflammatorischer Zytokine aktiviert wird (Ghosh *et al.*, 2002).

Der MyD88-unabhängige TRIF-Signalweg führt ebenfalls zur Produktion der TF NF κ B und AP-1 sowie IRF3 und so zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine als auch zur Produktion von Typ I Interferonen. Diese wiederum ermöglichen u.a. die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (**Abb. 2.6 b**) (Chang *et al.*, 2007; Honda *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2001). Der Signalweg wird durch die Internalisierung des TLR-4 in frühe Endosomen und der damit einhergehenden Ablösung des TIRAP-MyD88-Komplexes induziert (Aksoy *et al.*, 2012; Kagan *et al.*, 2008). Im Anschluss an die Rekrutierung der Adapterproteine TRAM und TRIF können erneut zwei Signalwege differenziert werden: über RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) oder über TRAF3. Das in der C-terminalen Region von TRIF enthaltene Rip *homotypic interaction motif* (RHIM) vermittelt die Bindung der Serin/Threonin Kinase RIP1. Wie TAK1 ist RIP1 in der Lage sowohl den IKK- als auch MAPK-Signalweg zu induzieren, was erneut zur Aktivierung der TF AP-1 und NF κ B führt (Meylan *et al.*, 2004). Durch die Rekrutierung von TRAF3 hingegen werden TANK (*TRAF family-member-associated NF κ B activator*), TBK1 (*TANK binding kinase 1*) und IKK gebunden, was zur Dimerisierung

und Translokation von IRF3 führt (Fitzgerald *et al.*, 2003). IRF3 induziert im Kern die Expression von Typ I Interferonen, wie IFN- α und IFN- β (Honda *et al.*, 2006). Diese führen wiederum zur Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10.

a



b

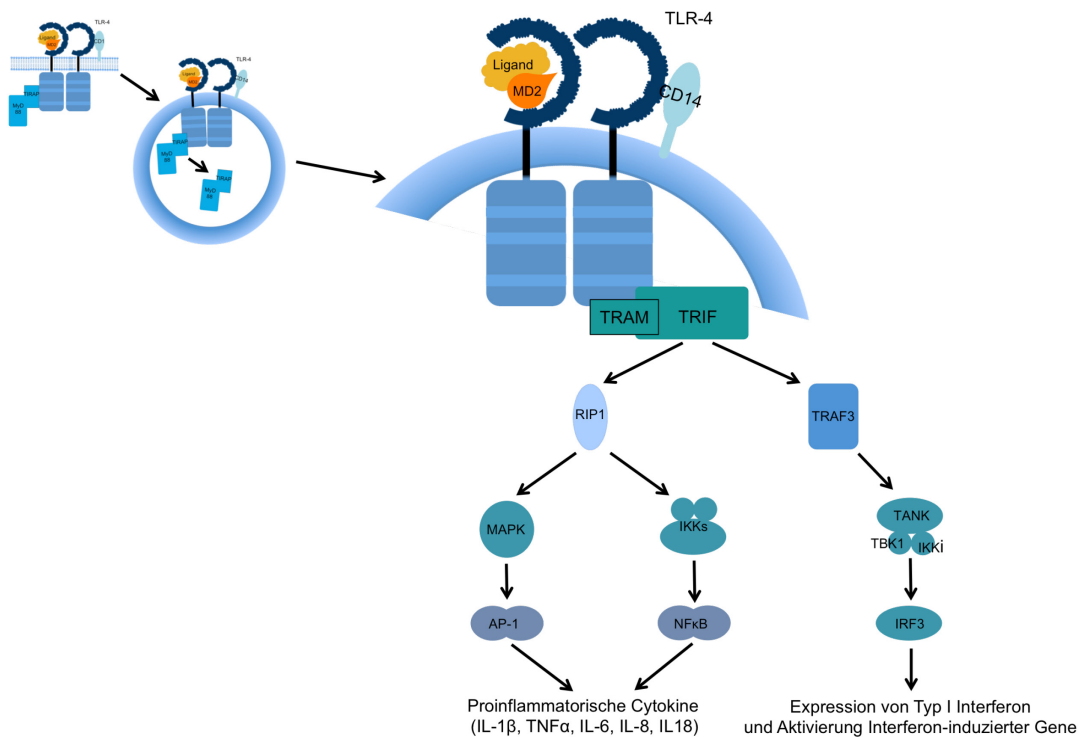


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der TLR-4 Signalwege.

Nach Bindung des Liganden-MD-2/CD14-Komplexes und Dimerisierung von TLR-4 kann der MyD88-anhängige (a) oder -unabhängige Signalweg (b) induziert werden. Der MyD88-abhängige Signalweg wird durch die Proteine IRAK, TRAF und TAK1 vermittelt. Am Ende des MyD88-Wegs steht die Produktion der TF NF κ B und AP-1 und die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-18). Der Signalweg über TRIF induziert, nach Internalisierung des Rezeptorkomplexes in frühe Endosomen und Ablösung des MyD88-TIRAP-Komplexes, die Aktivierung von IRF3. Dies induziert wiederum die Expression von Typ I Interferonen und Interferon-induzierbarer Gene. Ein zusätzlicher Signalweg über die MAPK und AP-1 bzw. IKKs und NF κ B führt zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine.

Auch bei S100A8 und S100A9 ist die Aktivierung von TLR-4 sowohl von den Adapterproteinen CD14 und MD-2 als auch von einer Oligomerisierung des Liganden abhängig (Vogl *et al.*, 2012). Zur Aktivierung der Signalkaskade wird mindestens das S100A8/S100A9 Homo- oder Heterodimer benötigt.

Für S100A12 konnte ebenfalls eine Bindung und Aktivierung von TLR-4 gezeigt werden, die CD14-abhängig zu sein scheint (Foell *et al.*, 2013; Kessel *et al.*, 2015). Welche Auswirkungen diese jedoch auf die Rezeptor-Oligomerisierung und die induzierte Signalkaskade hat, ist noch unbekannt. Da die Rezeptor-Oligomerisierung schon bei der Aktivierung von RAGE eine essentielle Rolle zu spielen scheint, wird dieses Modell ebenfalls für die Aktivierung von TLR-4 über S100A12 angenommen (Moroz *et al.*, 2003b; Srikrishna *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2007). Dass ebenfalls bei der LPS-vermittelten Aktivierung von TLR-4 eine Oligomerisierung vorliegt, unterstützt diese Annahme weiter (Saitoh *et al.*, 2004; Visintin *et al.*, 2003). Auch für weitere TLR-4 Liganden wurde bereits eine Abhängigkeit der Rezeptor-Aktivierung von dem Oligomerisierungsgrad des Liganden bzw. Rezeptors beschrieben (Ehrchen *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2006). Jedoch ist für S100A12 noch nicht klar, welches Oligomer diese induzieren kann und ob eine Rezeptor-Dimerisierung oder eine andere Oligomerisierung zur weiteren Signalleitung nötig ist. Die Rezeptor-Oligomerisierung durch hexameres S100A12 scheint sehr wahrscheinlich, da mögliche Rezeptor-Interaktionsstellen im Hexamer auf entgegengesetzten Seiten liegen und so eine Zusammenlagerung mehrerer Rezeptoren ermöglicht werden können (Moroz *et al.*, 2003b)

2.5. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte das komplexabhängige Bindungs- und Aktivierungsverhalten von S100A12 bezüglich der Rezeptoren TLR-4 und RAGE analysiert werden. Hierzu ist zunächst die Komplexbildung mittels verschiedener Ionenkonzentrationen beeinflusst worden. Ausgebildete Komplexe sollten dann anhand ihrer Größe separiert werden. Des Weiteren sollten mittels *Site-directed Mutagenesis* spezielle S100A12-Mutanten erzeugt werden, um die Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung zu inhibieren. Für diese Mutanten sowie wtS100A12 ist die Abhängigkeit der Komplexbildung von Kalzium und Zink mittels semi-nativer PAGE genauer betrachtet worden. Anhand dieser Daten sollte im Anschluss die Fähigkeit der Proteine, die Rezeptoren TLR-4 und RAGE zu binden, in einem Sandwich-ELISA analysiert werden. Schließlich zielten die Arbeiten darauf ab, die Wirkung der S100A12-Komplexe auf die TLR-4-vermittelte Signaltransduktion mittels Stimulation von HEK293/TCM-Zellen und THP1-Zellen zu analysieren.

KAPITEL 3

MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Standard-Chemikalien und -Reagenzien wurden von den Herstellern Roth, Sigma-Aldrich und Merck im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen.

Reagenz	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30 %/0,8 %)	Roth
Agar	AppliChem
Agarose	Biozym
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Roth
BS ³ Crosslinker, No-Weight Format	Pierce
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth
dNTP Mix 10 mM	Thermo Scientific (Kit: Reverse Transkriptase)
SignalFire™ ECL (Enhanced Chemiluminescence) Reagenz	NEB
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
L-Glutamin 200 mM	Biochrom
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Biochrom
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
NZ Amine (<i>casein hydrolysate</i>)	Roth
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Biochrom
pH-Pufferlösung pH 4,01	Mettler-Toledo
pH-Pufferlösung pH 7,00	Mettler-Toledo
pH-Pufferlösung pH 9,21	Mettler-Toledo
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen
Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP)	Thermo Scientific
KAPA SYBR FAST Universal	Peqlab

Reagenz	Hersteller
T4-Ligasepuffer	Fermentas
Tango/Y ⁺ Puffer	Fermentas
TMB Substrate Reagent Set	BD Bioscience
Trypanblau, 0,4 % Lösung	Life Technologies
Tryptone/Peptone	Roth
Tween 20	Diagonal

3.1.2. Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in ddH₂O angesetzt und bei RT gelagert.

Puffer / Lösung	Inhalt	Endkonzentration
AIEX-Puffer A	Tris	20 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
AIEX-Puffer B	Tris	20 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	pH auf 8,5 einstellen	
Blockpuffer für WB	Milchpulver	5 %
	TBST	
	frisch ansetzen	
Blockpuffer für ELISA	10 % BSA	1 %
	PBST	
	frisch ansetzen	
Blotpuffer	Tris	25 mM
	Glycine	192 mM
	Methanol	10 %
	pH 8,2-8,4 (nicht einstellen)	
	Lagerung bei 4 °C, ½ Jahr haltbar	
Carbonatpuffer	Natriumcarbonat	0,1 M
	Natriumhydrogencarbonat	0,1 M
	Natriumcarbonat-Lsg. mit	
	Natriumhydrogencarbonat-Lsg. auf	
	pH 9,5 einstellen Lagerung bei 4 °C	
Coomassie-Entfärber	Essigsäure	7 %
	Ethanol (96 %)	10 %
	ddH ₂ O	
Coomassie-Färbelösung	Brilliant Blau R250	0,275 %
	Ethanol (100 %)	25 %
	Essigsäure	10 %
	ddH ₂ O	
	Lösung filtrieren	

Puffer / Lösung	Inhalt	Endkonzentration
Cytosol-Lysepuffer	Tris pH 8,0 NaCl EDTA pH 8,0	50 mM 50 mM 1 mM
Elutionspuffer (EP)	Glycin NaCl Auf pH 2,7 einstellen und steril filtrieren (0,22 µm)	100 mM 500 mM
HBS	HEPES NaCl pH auf 7,2 einstellen	20 mM 140 µM
IB-Lysepuffer	Tris pH 8,0 NaCl EDTA Urea	50 mM 50 mM 1 mM 8 M
Probenpuffer (4x) (PP)	10 % SDS 1 M Tris-HCl, pH 6,8 Glycerin (100 %) β-Mercaptoethanol Bromphenolblau aliquotiert, Lagerung bei -20 °C	8 % 125 mM 50% 0,05 %
PBS* E72A	PBS, pH 7,6 CaCl ₂	1 mM
PBS* H15A	PBS, pH 7,6 ZnCl ₂	6,5 µM
PBS* H89A	PBS, pH 7,6 ZnCl ₂	6,5 µM
PBST (1x)	PBS (10x) Tween 20	1x 0,04 %
Sammelgelpuffer für SDS-Gele	Tris-HCl pH 8,8 SDS	0,5 M 0,4 %
1x SDS-Laufpuffer	Tris Glycin SDS	100 mM 100 mM 4 mM
TAE-Puffer (50x)	Tris EDTA Essigsäure (100 %)	2 M 50 mM 60 %
TBS (10x)	Tris NaCl mit HCl auf pH 7,6 einstellen	500 mM 1,5 M
TBS* D25A	TBS CaCl ₂	10 mM
TBS* E72A	TBS CaCl ₂	200 mM
TBS* H15A	TBS CaCl ₂	5 mM

Puffer / Lösung	Inhalt	Endkonzentration
TBS* H85A	TBS CaCl ₂	25 mM
TBS* H89A	TBS CaCl ₂	25 mM
TBS* N63A	TBS CaCl ₂	100 mM
TBS* N63/E72A	TBS CaCl ₂	300 mM
TBST (1x)	TBS (10x) Tween 20	1x 0,1 %
TE-Puffer	Tris-HCl pH 7,5 EDTA	10 mM 1 mM
Trenngelpuffer für SDS-Gele	Tris-HCl pH 6,8 SDS	1,5 M 0,4 %
Tris-HCl	Tris pH mit HCL einstellen	

3.1.3. Medien und Lösungen für die Zellkultur

Zur Herstellung der Kulturmedien für eukaryotische Zellen wurden folgende Medien, Lösungen und Reagenzien verwendet.

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
DMEM, <i>high Glucose</i> (4,5 g/L)	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom
DMSO	Dimethylsulfoxid	Roth
FCS	Fetales Kälberserum	Gibco
MEM NEA (100x)	Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma Aldrich
RPMI 1640 mit Phenolrot	Roswell Park Memorial Institute	Biochrom

Medium	Inhalt	Endkonzentration
Einfriermedium für HEK293-Zellen	FCS	90 %
	DMSO	10 %
Einfriermedium für THP1-Zellen	THP1 Medium	70 %
	FCS	20 %
	DMSO	10 %
HEK293-Medium	DMEM (4,5 g Glucose)	
	FCS	10 %
	Glutamin	2 %
	P/S	1 %

Medium	Inhalt	Endkonzentration
THP1-Medium	RPMI	
	FCS	10 %
	L-Glutamin	2 %
	Pen/Strep	1 %
	NEA	1 %

3.1.4. Medien zu Kultivierung von Bakterien

Medium	Inhalt	Endkonzentration
Einfriermedium	Zellsuspension	
	50 % Glycerin	15 %
Luria-Bertani (LB)- Lennox-Medium	NaCl	200 mM
	Tryptone/Peptone	1 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	Mit 5 N NaOH auf pH 7.4 einstellen und autoklavieren	
LB ⁺	LB-Medium	
	MgSO ₄	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
LB-Ampicillin Agar	NaCl	200 mM
	Tryptone/Peptone	1 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	Agar	2 %
	Mit 5 N NaOH auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren, abkühlen lassen und mit 0,01 % Ampicillin versetzen	
NZY ⁺ Broth Medium	NZ Amine (casein hydrolysate)	1 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	0,5 %
	Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren	
	Folgende Bestandteile kurz vor der Verwendung zugeben	
	MgCl ₂	12,5 mM
	MgSO ₄	12,5 mM
	20 % (w/v) Glucose	0,4 %
SOC-Medium	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Trypton	2 % (w/v)
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	Mit ddH ₂ O auffüllen und autoklavieren	
	MgCl	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glucose	20 mM

3.1.5. Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells, monolayer, adherent, transfiziert mit dem Adenovirus 5 Gen</i>	CLS (cell lines service)
HEK293/TCM	HEK293 Zellen, stabil transfiziert mit humanen TLR-4a-MD2 und CD14 Genen	Invivogen
THP1	Etabliert aus dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen mit akuter Monozytenleukämie, 1978	DSMZ ACC 16

3.1.6. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- M_K^+$) <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 (F80d <i>lacZ</i> Δ M15)	Hanahan <i>et al.</i> , 1991
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , <i>ompT</i> , (λ DE3)	Studier und Moffatt, 1986
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^fZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Agilent Technologies Publication Part Number: 200236-11

3.1.7. Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Roth
Blasticidin	Invitrogen
Hygromycin B Gold	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (100x)	Biochrome
Puromycin	Thermo Fisher

3.1.8. Proteine und Standards

Protein	Beschreibung	Herkunftsort
D25A	S100A12 mit AS Austausch an Position 25	diese Arbeit
E72A	S100A12 mit AS Austausch an Position 72	diese Arbeit
Gen Ruler 100bp	DNA-Größenstandard	Fermentas
H15A	S100A12 mit AS Austausch an Position 15	diese Arbeit
H85A	S100A12 mit AS Austausch an Position 85	diese Arbeit
H89A	S100A12 mit AS Austausch an Position 89	diese Arbeit
N63A	S100A12 mit AS Austausch an Position 63	diese Arbeit
PageRuler	Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific

Protein	Beschreibung	Herkunftsort
pWhitescript 4,5-kb	Kontrollplasmid für Transfektion	Agilent Technologies
S100A12 Gold Standard	S100A12 mit bekannter Konzentration als Standard für ELISA (rhA12 vom 22.03.06)	Föll <i>et al.</i>
S100A12 Hexamer	p32.2	Föll <i>et al.</i>
sRAGE	Löslicher Teil des RAGE	Föll <i>et al.</i>
TLR-4/MD2	Rekombinanter humaner TLR-4/MD2 Komplex	R&D Systems
wtS100A12	Wildtyp S100A12	Föll <i>et al.</i>

3.1.9. Antikörper

3.1.9.1. Primäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Eigenschaften	Eingesetzte Verdünnung	Referenz
α -His	Histidin	Maus IgG ₁ , κ , monoklonal	1:1000	Invitrogen
α -TLR-4	hTLR-4	Maus IgG, neutralisieren von humanem TLR-4	10 μ g/mL	Invivogen
AK E	S100A12	Maus, IgG monoklonal	1:1920	CisBio (MTA) (16S)
AK H	S100A12	Maus, IgG monoklonal	1:2320	CisBio (MTA) (C23)
AK K	S100A12	Maus, IgG monoklonal	1:2370	CisBio (MTA) (C28)
α -A12	S100A12	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Föll, Roth <i>et al.</i>
α -A12-bio	S100A12	Kaninchen, polyklonal, Biotin gekoppelt	1:1000	Föll, Roth <i>et al.</i>

Die monoklonalen Antikörper wurden auf ihr Bindungsverhalten an verschiedene S100A12-Peptidsequenzen getestet.

Die Peptidsequenzen, die von den monoklonalen AK erkannt werden, befinden sich in folgenden Regionen:

	AS 1-27 (EF1)	AS 41-68 (EF2)	AS 68-88 (<i>hinge</i> -Region)
AK E	☐	☐	☐
AK H	-	-	☐
AK K	☐	-	☐

3.1.9.2. Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Spezies	Kopplung	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
α -Maus	mouse-IgG	Kaninchen	HRP	1:2000	DakoCytomation
α -Kaninchen	rabbit-IgG	Ziege	HRP	1:4000	CellSignaling
3G1D5-bio	S100A12	Ratte	Biotin	1:1087	Föll <i>et al.</i>

3.1.10. sonstige Detektionsreagenzien

Bezeichnung	Kopplung	Hersteller
Streptavidin	HRP	BioLegend

3.1.11. Primersequenzen

Primer	Sequenz (5' → 3')	Referenz
BgIII Fw XbaI Rev	GCGCGAAGATCTACAAACTTGAAGAGCATCTGG GCGCGATCTAGACTACTCTTTGTGGGTGTGG → Primerpaar zum Einfügen der Schnittstellen <i>BgIII</i> und <i>XbaI</i>	Diese Arbeit
D25A Fw D25A Rev	GGAAGGGGCATTTTGCCACCCTCTCTAAGG CCTTAGAGAGGGTGGCAAATGCCCTTCC → Primerpaar für die <i>Site-directed Mutagenesis</i> zum Austausch von Asparat gegen Alanin an Position 25	Diese Arbeit
E72A Fw E72A Rev	GAACAGGTCGACTTTCAAGCATTTCATATCCCTGGTAGC GCTACCAGGGATATGAATGCTTGAAAGTCGACCTGTTC → Primerpaar für die <i>Site-directed Mutagenesis</i> zum Austausch von Glutamat gegen Alanin an Position 72	Diese Arbeit
H15A Fw H15A Rev	GGAATTGTCAATATCTTCCGCCAATACTCAGTTCGGAAGG CCTTCCGAAGTGAAGTATTGGCGGAAGATATTGACAATTCCC → Primerpaar für die <i>Site-directed Mutagenesis</i> zum Austausch von Histidin gegen Alanin an Position 15	Diese Arbeit
H85A Fw H85A Rev	CATTGCGCTGAAGGCTGCCGCTTACCACACCCACAAAGAG CTCTTTGTGGGTGTGGTAAGCGGCAGCCTTCAGCGCAATG → Primerpaar für die <i>Site-directed Mutagenesis</i> zum Austausch von Histidin gegen Alanin an Position 85	Diese Arbeit
H89A Fw H89A Rev	GCCATTACCACACCGCCAAAGAGTAGGGATCC GGATCCCTACTCTTTGGCGGTGTGGTAATGGGC → Primerpaar für die <i>Site-directed Mutagenesis</i> zum Austausch von Histidin gegen Alanin an Position 89	Diese Arbeit
IL8 Fw IL8 Rev	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC AACCTCTGCACCCAGTTTTTC	VBC Biotech
N63A Fw N63A Rev	CCAAGGCCTGGATGCTGCTCAAGATGAACAGGTTCG CGACCTGTTTCATCTTGAGCAGCATCCAGGCCTTGG → Primerpaar für die <i>Site-directed Mutagenesis</i> zum Austausch von Asparagin gegen Alanin an Position 63	Diese Arbeit

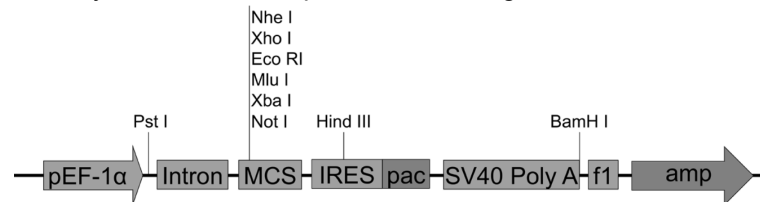
Primer	Sequenz (5' → 3')	Referenz
Oligo(dT) ₁₈	d(TTTTTTTTTTTTTTTTTT)	Thermo Scientific
pEF-IRESp Seq	ACTCCCAGTTCAATTACAG	Kessel <i>et al.</i> , 2009
RPL 13A 277 Fw	AGGTATGCTGCCCCACAAAAC	VBC Biotech
RPL 13A 418 Rev	TGTAGGCTTCAGACGCACGAC	
T7 Fw	TAATACGACTCACTATAGGG	Eurogentec
RevT7Term	GCGACTCGTTATTGATC	VbC Biotech
XbaI Rev H89A	GCGCGACTCAGACTACTCTTTGGCGGTGTGG	Diese Arbeit

→ Primer zum Einfügen der Xba Schnittstelle in die H89A Mutante

3.1.12. Vektoren

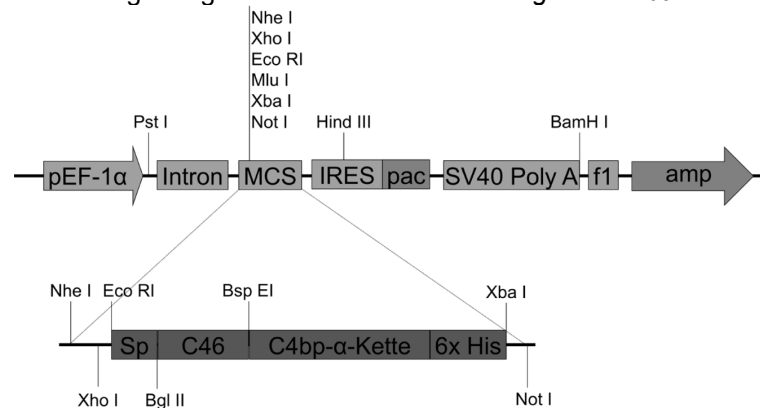
Bezeichnung	Beschreibung / Verwendungszweck	Referenz
pET11b	pET-Expressionsvektoren kommen bei der rekombinanten Proteinproduktion in <i>E. coli</i> zum Einsatz. Das Plasmid steht unter Kontrolle der Bakteriophagen T7 Transkription. pET11b besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Klonierung erfolgt über <i>Nde</i> I und <i>Bam</i> HI	Novagen
<p>lacIq: <i>lac</i> repressor ; P T7: T7 Promotor ; lacO: <i>lac</i> Operator ; <i>Nde</i>I: Schnittstelle; <i>Bam</i>HI: Schnittstelle; T T7: T7 Terminator; amp: Ampicillin-Resistenzgen; pBR322 ori: Replikationsstart</p>		
pET11b-S100A12	Zur Expression von S100A12 wurde die DNA in den Vektor pET11b kloniert. pET11b-S100A12 diente als Ausgang für die <i>Site-directed Mutagenesis</i> .	Föll <i>et al.</i>
pET11b-S100A12 D25A	Zur Expression der S100A12 Mutante D25A wurden Nukleotide in der S100A12-DNA in pET11b-S100A12 ausgetauscht.	Diese Arbeit
pET11b-S100A12 E72A	Zur Expression der S100A12 Mutante E72A wurden Nukleotide in der S100A12-DNA in pET11b-S100A12 ausgetauscht.	Diese Arbeit
pET11b-S100A12 H15A	Zur Expression der S100A12 Mutante H15A wurden Nukleotide in der S100A12-DNA in pET11b-S100A12 ausgetauscht.	Diese Arbeit

Bezeichnung	Beschreibung / Verwendungszweck	Referenz
pET11b-S100A12 H85A	Zur Expression der S100A12 Mutante H85A wurden Nukleotide in der S100A12-DNA in pET11b-S100A12 ausgetauscht.	Diese Arbeit
pET11b-S100A12 H89A	Zur Expression der S100A12 Mutante H89A wurden Nukleotide in der S100A12-DNA in pET11b-S100A12 ausgetauscht.	Diese Arbeit
pET11b-S100A12 N63A	Zur Expression der S100A12 Mutante N63A wurden Nukleotide in der S100A12-DNA in pET11b-S100A12 ausgetauscht.	Diese Arbeit
pET11b-S100A12 N63/E72A	Zur Expression der S100A12 Mutante N63/E72A wurden Nukleotide in der S100A12-DNA in pET11b-S100A12 ausgetauscht	Diese Arbeit
pEF-IRES	pEF-IRES wird zur stabilen Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen genutzt. Der Vektor enthält sowohl ein Puromycin- als auch Ampicillin-Resistenzgen.	Hobbs <i>et al.</i> , 1998



pEF-1 α : humaner Elongationsfaktor 1 α ; Intron: chimäres Intron; MCS: multiple Klonierungsstelle; IRES: internal ribosomal entry site; pac: Puromycin Resistenzgen; SV40 Poly A: SV40 Terminations- und Polyadenylierungs-Signal; f1: Phage f1 Ursprung; amp: Ampicillin Resistenzgen

364H	Der pEF-IRES-Vektor mit der Information für C46 sowie die C-terminale Multimerisationsdomäne der α -Kette des humanen C4-Bindeproteins (C4bp) wurde als Ausgang für die Klonierung von S100A12 genutzt. Aufgrund des kodierten Signalpeptids LNGFR werden exprimierte Proteine von Zellen sekretiert. Die Klonierung erfolgte über die Schnittstellen <i>Bgl</i> II und <i>Xba</i> I.	Dervillez <i>et al.</i> , 2006
------	--	--------------------------------



Sp: Signalpeptid von LNGFR (*low-affinity nerve growth factor*); 6x His: Hexa-Histidin-Markierung

Bezeichnung	Beschreibung / Verwendungszweck	Referenz
pEF-IRES-S100A12	pEF-IRES mit S100A12 als Insert zur stabilen Expression des rekombinanten Proteins in Säugerzellen.	Diese Arbeit
pEF-IRES-S100A12 D25A	Zur stabilen Expression der S100A12 Mutante D25A in Säugerzellen wurden das Insert aus pET11b-S100A12 D25A in 364H umklontiert	Diese Arbeit
pEF-IRES-S100A12 E72A	Zur stabilen Expression der S100A12 Mutante E72A in Säugerzellen wurden das Insert aus pET11b-S100A12 E72A in 364H umklontiert.	Diese Arbeit
pEF-IRES-S100A12 H15A	Zur stabilen Expression der S100A12 Mutante H15A in Säugerzellen wurden das Insert aus pET11b-S100A12 H15A in 364H umklontiert.	Diese Arbeit
pEF-IRES-S100A12 H85A	Zur stabilen Expression der S100A12 Mutante H85A in Säugerzellen wurden das Insert aus pET11b-S100A12 H85A in 364H umklontiert	Diese Arbeit
pEF-IRES-S100A12 H89A	Zur stabilen Expression der S100A12 Mutante H89A in Säugerzellen wurden das Insert aus pET11b-S100A12 H89A in 364H umklontiert.	Diese Arbeit
pEF-IRES-S100A12 N63A	Zur stabilen Expression der S100A12 Mutante N63A in Säugerzellen wurden das Insert aus pET11b-S100A12 N63A in 364H umklontiert.	Diese Arbeit
pEF-IRES-S100A12 N63/E72A	Zur stabilen Expression der S100A12 Mutante N63/E72A in Säugerzellen wurden das Insert aus pET11b-S100A12 N63/E72A in 364H umklontiert.	Diese Arbeit

3.1.13. Enzyme

Enzym	Beschreibung	Hersteller
<i>Bam</i> HI	Restriktionsenzym 5'...G ^A GATCC... ³ 3'...CCTAG ^A G... ⁵	Fermentas
<i>Bgl</i> II	Restriktionsenzym 5'...A ^A GATCT... ³ 3'...TCTAG ^A A... ⁵	Fermentas
<i>Dpn</i> I	Endonuklease, Verdau parentaler methylierter und hemimethylierter DNA	Agilent Technologies
<i>Nde</i> I	Restriktionsenzym 5'...CA ^A TATG... ³ 3'...GTAT ^A AC... ⁵	Fermentas
PfuUltra HF DNA Polymerase		Agilent Technologies
ReverAid H Minus	Reverse Transkriptase	Thermo Scientific
T4-Ligase		Fermentas

Enzym	Beschreibung	Hersteller
XbaI	Restriktionsenzym 5'...T [^] CTAGA... ['] 3 3'...AGATC [^] T... ['] 5	Fermentas

3.1.14. Kits und Protokolle

Bezeichnung		Hersteller
DSS and BS ³ Crosslinkers	Instructions 0418.9	Thermo Scientific
EndoLISA	Package Insert V1.5/2014 (606168)	Hyglos GmbH
EndoTrap	Standard Application Protocol V06/2012	Hyglos GmbH
GoTaq Flexi DNA-Polymerase Kit	Part# 9PIM829, 3/12	Promega
HiTrap NHS-activated HP	Instructions 71-700600 AW, 02/2011	GE Healthcare
IL-8 ELISA	Technical Data Sheet 2654K_5552444, 2015	BD Bioscience
JetStar 2.0 Plasmid Purification Kits	Quick Reference Card, 2011	Genomed
JetQuick Plasmid DNA Purification Kits	Quick Reference Card, 2011	Genomed
Nucleo Spin RNA	User Manuel May, 2014 Rev. 16	Macherey-Nagel
Phase Lock Gel TM	User Manuel, 2007	5Prime
Quick Change II <i>Site-directed Mutagenesis</i> Kit	Instruction Manual 20523-12	Agilent Technologies
Reverse Transkription	RevertAid H Minus Reverse Transcriptase Product Information (2003)	Thermo Scientific

3.1.15. Verbrauchsmaterialien

Neben den laborüblichen Verbrauchsmaterialien wurden noch folgende benutzt:

Artikel	Hersteller
Dialyseschlauch	Roth
Kryoröhrchen	Greiner Bio One
HisPur TM Ni-NTA Resin	Thermo Scientific
MaxiSorp (Nunc 442404)	Thermo Scientific
Nitrozellulose Membran	Thermo Scientific
Phenyl Sepharose High Performance (GE 17-1082-01)	GE Healthcare
Q Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
ReaktionsgefäÙe/Polypropylen 14 mL round bottom	BD Falcon
Stericup & Steritop TM 0,22 µm 250 mL und 500 mL	Merck Millipore
Ultra-Zentrifugenfilter, Amicon 3kDa, 10kDa, 30kDa, 50kDa, 100kDa; 500µL, 15mL	Merck Millipore

Artikel	Hersteller
Whatman® Papier GB005, 1,2 mm	Sartorius Stedim biotech
XK 26/20 column (28-9889-48)	GE Healthcare
Zellkulturflasche T25 Cellstar	Grainer Bio One
Zellkulturflasche T75 Cellstar	Grainer Bio One
Zellkulturflasche T175 Cellstar	Grainer Bio One
Zellkulturflasche CellSTACK	Corning

3.1.16. Laborausstattung

Neben den laborüblichen Geräten wurden zusätzlich folgende verwendet:

Mikroskope	Hersteller
Inversmikroskop Axiovert A1	Zeiss

Zentrifugen	Hersteller
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5424R	Eppendorf

Proteinbiochemie	Hersteller
ÄKTA Kùhlschrank	UniEQUIP
ÄKTApurifier UPC 10	GE Healthcare
Chemidoc	Bio-Rad
DSX	Dynex Tec.
Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad
Power Pac Basic	Bio-Rad
Sonifier	Bandelin
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad

Sonstige	Hersteller
Biorad CFX 384 Real-Time System	Bio-Rad
Nonophotometer p330	Implen
pH-Meter 765	Knick
Real-Time System CFX384	Bio-Rad
Sterilbank Safe 2020	Thermo Scientific
T Professional Thermocycler	Biometra
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zellkulturinkubator HERAcell 150i	Thermo Scientific
Zellzählkammer Neubauer Improved	Assistent

3.1.17. Software

Software	Hersteller
BioEdit	Ibis Bioscience
Endnote X7.1	Thomson Reuters
ImageLab 5.2.1 build 11	Bio-Rad Laboratories
Prism 5 für Mac	GraphPad Software, Inc
Office für Mac 2011	Microsoft
PrimerX	Bioinformatics Organization, Inc. http://www.bioinformatics.org/primerx/
Bio-Rad CFX Manager	Bio-Rad
Software Unicorn 5.20 (Build 500), strategy version 4.11	GE Healthcare

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Allgemeines

Das zur Kultivierung der Zellen eingesetzte fötale Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor Gebrauch für 30 min auf 56 °C erhitzt, anschließend steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 10 min bei 350 g (HEK293-, HEK293/TCM-Zellen) bzw. 300 g (THP1-Zellen) und RT. Für die Zellkulturarbeiten verwendete Medien wurden vor ihrem Gebrauch auf 37 °C vorgewärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂). Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.2.1.2. Kultivierung von HEK293- und HEK293/TCM-Zellen

Die adhärenenten HEK293- bzw. HEK393/TCM-Zellen wurden alle 3-4 Tage (85-95 % Konfluenz) expandiert oder 1:3 gesplittet.

Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und durch PBS ersetzt. Durch leichtes Klopfen an das Zellkulturgefäß wurde die Vereinzelnung der Zellen begünstigt. Anschließend wurden sie mit einer 10 mL Pipette abgespült, in ein 50 mL Tube überführt und zentrifugiert (**3.2.1.1**). Entsprechend des gewünschten Verdünnungsgrades wurden die Zellen in neuem Kulturmedium aufgenommen, auf Kulturgefäße aufgeteilt und unter Standardbedingungen (**3.2.1.1**) kultiviert.

3.2.1.3. Kultivierung von THP1-Zellen

Zur Kultivierung wurden die Suspensionszellen nach Bedarf mit frischem Medium versetzt und zusätzlich 1x pro Woche passagiert. Hierzu wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, 1:3 oder 1:5 (je nach Wachstumsgeschwindigkeit) mit frischem Medium verdünnt und neu ausgesät.

3.2.1.4. Kryokonservierung von Zellen

Adhärenz wachsende Zellen wurden zunächst, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, von der Platte gelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde entsprechend des gewünschten Verdünnungsfaktors (drei Kryotubes pro T75-Zellkulturflasche) in Einfriermedium aufgenommen, in einen mit Isopropanol gefüllten Behälter gestellt und bei -80 °C eingefroren. Nach einer Nacht wurden die Zellen bei -150 °C gelagert.

3.2.1.5. Revitalisierung kryokonservierter Zellen

Eingefrorene Zellen wurden möglichst schnell in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut, in vorgewärmtes Kulturmedium überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 5 mL frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer T25-Zellkulturflasche kultiviert.

3.2.1.6. Zellzahlbestimmung

Um die Konzentration lebender Zellen in einer Suspension zu ermitteln wurden 10 µL Zellsuspension mit 90 µL Trypanblau-Lösung versetzt (Verdünnungsfaktor df). Die Anzahl lebender Zellen in 10 µL wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Es wurde der Mittelwert aus vier Großquadraten gebildet (\bar{x}). Die Zellkonzentration wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} \cdot df \cdot 10000 = \text{Zellen/mL}$$

3.2.2. Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

3.2.2.1. Kultivierung von *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Zur kurzfristigen Lagerung und Stammhaltung wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausgestrichen, bei 37 °C ü.N. kultiviert und anschließend bei 4 °C gelagert. Zur Anreicherung wurde hingegen eine Flüssigkultur aus LB-Medium mit einem Bakterienklon angeimpft und ü.N. bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Durch Zugabe eines Antibiotikums erfolgte die Selektion transformierter Bakterien.

3.2.2.2. Kryokonservierung von *E. coli*

Die Kryokonservierung dient der langfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen. Hierzu wurde ein Bakterienstamm zunächst, wie in **3.2.2.1** beschrieben, auf einer LB-Agarplatte ausplattiert und anschließend ein Klon in einer Flüssigkultur kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert (2500 g, 20 min, RT), in Einfriermedium resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.3. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Zunächst wurde eine Flüssigkultur von *E. coli* DH5 α in LB⁺ angesetzt (**3.2.2.1**). Am darauffolgenden Tag wurde frisches LB⁺-Medium mit der ü.N. Kultur inokuliert (OD₆₀₀=0,08-0,1). Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀=0,25-0,4 bei 37 °C im Schüttler inkubiert, 10 min auf Eis gestellt, um das Bakterienwachstum zu stoppen und anschließend zentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in 20 mL (pro 100 mL Zellpellet) eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 2000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet in 3 mL 0,1 M CaCl₂ + 20 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 100 μ L Aliquots bei -80°C gelagert.

Zur Kontrolle der Kompetenz wurde eine Transformation mit pWHitescript 4,5-kb *control* Plasmid durchgeführt (**3.2.2.4**).

3.2.2.4. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die kryokonservierten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 50 μ L in ein vorgekühltes 14 mL Falcon *round bottom* gegeben. 5 μ L der ligierten DNA bzw. Kontrollplasmid (pWhitescript 4,5-kb) wurden zugegeben, leicht geschwenkt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C und eine erneute Inkubation auf Eis (2 min). Nach Zugabe von 250 μ L vorgewärmten SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend auf LB-Amp Platten ausplattiert und ü.N. bei 37°C kultiviert.

Von einem Klon wurde eine ü.N. Flüssigkultur (**3.2.2.1**) und anschließend ein Kryostock (**3.2.2.2**) angefertigt.

3.2.3. Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1. Präparation plasmidischer DNA

Die Aufreinigung plasmidischer DNA aus einer Übernachtskultur von *E. coli* bzw. nach Ligation erfolgte mit dem *JetStar Midi Plasmid Purification Kit* (Genomed, 2011). Für eine anschließende Sequenzierung musste die Reinheit der DNA noch weiter erhöht werden, weshalb noch eine Phenol-Chloroform Fällung (Phase Lock Gel, 5Prime, 2007) und eine weitere Aufreinigung (JetQuick Plasmid DNA Purification Spin Kit, Genomed, 2011) angeschlossen wurden.

3.2.3.2. Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA oder DNA wurde die Absorption (A) aufgenommen. Nach Gallagher *et al.* wird bei doppelsträngiger DNA für eine Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 1 eine Konzentration von 50 µg/mL DNA zugrunde gelegt (Gallagher *et al.*, 2008). Damit ergibt sich für die Berechnung der DNA-Konzentration folgende Formel:

$$\text{DNA-Konzentration} = \text{Verdünnung} \cdot A_{260} \cdot 50\mu\text{g/mL}$$

Aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} lässt sich die Reinheit der Probe ablesen. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Höhere Werte weisen auf eine RNA Kontamination hin. Niedrigere Werte können durch Proteine oder Phenole verursacht werden.

Für RNA gilt analog für eine $A_{260} = 1$ eine Konzentration von 40 µg/mL. Damit ergibt sich für die Berechnung der RNA-Konzentration folgende Formel:

$$\text{RNA-Konzentration} = \text{Verdünnung} \cdot A_{260} \cdot 40\mu\text{g/mL}$$

Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte hier bei 2,0 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung durch genomische DNA, Proteine oder aromatische Substanzen hin.

3.2.3.3. Enzymatische Behandlung von DNA

3.2.3.3.1. Analytische und präparative Restriktion

Die Restriktion plasmidischer DNA kann sowohl zur Überprüfung einer zuvor durchgeführten Ligation (analytische Restriktion) als auch zur weiteren Verwendung der DNA bei einer Umklonierung (präparative Restriktion), genutzt werden.

Die Restriktion lief in folgendem Reaktionsansatz ü.N. bei 37 °C ab:

Tab. 3.1: Reaktionsansatz für die Restriktion.

pEF-IRES		pET11b	
Komponente	Endkonzentration	Komponente	Endkonzentration
Template	3 µg	Template	5 µg
<i>Bgl</i> II	10 u	<i>Bam</i> HI	10 u
<i>Xba</i> I	10 u	<i>Nde</i> I	10 u
10x Tango/Y ⁺	1x	10x Tango/Y ⁺	1x

3.2.3.3.2. Ligation der mutierten S100A12-DNA in pEF-IRES

Als erstes musste die mutierte dsDNA (3.1.12) aus dem Vektor pET11b herausgeschnitten werden (3.2.3.3.1). Da für die Ligation in pEF-IRES andere Schnittstellen benötigt wurden, mussten diese zunächst in einer PCR (GoTaq Flexi DNA-Polymerase Kit) mit den entsprechenden Primern (3.1.11) eingefügt werden (Tab. 3.2 und Tab.3.3).

Tab. 3.2: PCR-Ansatz zum Einfügen der *Xba*I und *Bgl*II Schnittstellen in die mutierte S100A12-DNA.

Komponente	Endkonzentration
GoTaq Flexi-Puffer	1x
MgCl	4 mM
dNTP-Mix	0,2 mM jedes dNTP
5' Primer	2 µM
3' Primer	2 µM
Taq DNA Polymerase	1,25 u
Template	1 µg/mL

Tab. 3.3: Temperaturprofil der PCR zum Einfügen der *Xba*I und *Bgl*II Schnittstellen in die mutierte S100A12-DNA.

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiales Denaturieren	95 °C	3 min	1
Denaturieren	95 °C	30 sec	30
Annealing	70 °C	30 sec	
Polymerisation	72 °C	30 sec	
Finale Polymerisation	72 °C	2 min	1
	4 °C	∞	

Nach erneuter Restriktion (**3.2.3.3.1**, **Tab. 3.1**; pEF-IRES) erfolgte die Ligation in den Säugervektor pEF-IRES (**Tab. 3.4** und **Tab. 3.5**).

Tab. 3.4: Ligationsansatz.

Komponente	Eingesetzte Menge pro Ansatz
Vektor	50 ng
Insert	10 ng
T4-Ligase Puffer	2 µL
T4-Ligase	1 µL
ddH ₂ O	auf 20 µL auffüllen

Tab. 3.5: Temperaturprofil der Ligation.

Zeit	Temperatur
2 h	22 °C
10 min	65 °C
∞	4 °C

Die Ligationsansätze wurden, wie unter **3.2.3.1** beschrieben, aufgereinigt und zur Durchführung einer Sequenzierung (**3.2.3.7**) in *E. coli* transformiert (**3.2.2.4**).

3.2.3.4. Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1%-iges Agarose-Gel hergestellt und ca. 1:30000 mit EtBr versetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden in *GoTaq Flexi Buffer* aufgenommen und zusammen mit einem Größenstandard in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 60 min. Zur Detektion der Banden wurde ein UV-Transilluminator mit einer CCD-Kamera verwendet.

3.2.3.5. Nachweis der Genexpression

Um die Expression bestimmter Gene nach einer Stimulation zu quantifizieren, wurden die Zellen lysiert und die RNA aufgereinigt (Total RNA Isolation NucleoSpin RNA II Kit, Macherey-Nagel, 2012). Nach Bestimmung der Konzentration (3.2.3.2) wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription PCR, RT-PCR). In einer qPCR wurde mit Hilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green) die Zunahme der PCR-Produkte in Echtzeit verfolgt. Eine relative Quantifizierung erfolgte mit der ΔC_t -Methode, über einen Vergleich der Genexpression des Zielgens zu der Expression eines nicht regulierten Gens, einem sogenannten *housekeeping* Gen (RPL).

Tab. 3.6: Reaktionsansatz RT-PCR.

Komponente	Eingesetzte Menge pro Ansatz
5x Reaktionspuffer	10 μ L
Oligo(dT)18	1 μ L
dNTPs	1 μ L
RNA	1 μ μ g
Reverse Transkriptase	0,2 μ L
ddH ₂ O	Endvolumen: 50 μ L

Tab. 3.7: Temperaturprofil der PCR.

Zeit	Temperatur
90 min	42 °C
10 min	70 °C
∞	10 °C

Tab. 3.8: Reaktionsansatz qPCR.

Komponente	Eingesetzte Menge pro Ansatz
2x SYBR Green	5 μ L
Primermix	0,2 μ L
RNase freies H ₂ O	2,3 μ L

Tab. 3.9: Primermix qPCR.

Komponente	Endkonzentration
Fw Primer	10 μ M
Rev Primer	10 μ M
RNase freies H ₂ O	

Tab. 3.10: Temperaturprofil der qPCR.

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
	50 °C	2 min	1
Denaturieren	95 °C	3 min	1
Denaturieren	95 °C	15 sec	39
Annealing + Polymerisation	60 °C	1 min	
	95 °C	15 sec	1
	60 °C	5 sec	1
	95 °C	50 sec	1

3.2.3.6. Site-directed Mutagenesis

Mittels der *Site-directed Mutagenesis* können u.a. Struktur-Funktions-Beziehungen analysiert werden (Braman *et al.*, 1996). Die hier gewählte Methode der *QuickChange Site-directed Mutagenesis* ermöglicht es, Mutationen in doppelsträngige DNA einzufügen. Viele andere bekannte Methoden sind deutlich aufwendiger und setzen das Vorhandensein einzelsträngiger DNA voraus (Kunkel, 1985; Sugimoto *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1985; Vandeyar *et al.*, 1988).

Hier wurde die *Site-directed Mutagenesis* genutzt, um gezielt AS des Kalziumbindepoteins S100A12 zu substituieren. Sie wurde mit dem *QuickChange II Site-directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) durchgeführt. Das Primerdesign erfolgte anhand der Angaben des *QuickChange* Protokolls (**Tab. 3.11**) mit dem Programm *PrimerX*.

Der *Site-directed Mutagenesis* liegt die Amplifikation eines doppelsträngigen DNA Vektors zugrunde, der das zu mutierende Insert enthält. Zum Einfügen der Mutationen wurden zwei synthetische, zueinander komplementäre Oligonukleotid-Primer verwendet, die in ihrer Mitte den gewünschten Nukleotidaustausch aufweisen. In einer PCR (**Tab. 3.13**) wurden die Primer mittels der *PfuUltra* HF DNA-Polymerase entsprechend des ursprünglichen Plasmids verlängert. Parentale, methylierte DNA wurde durch die Endonuklease *DpnI*, die spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA ist, verdaut. Zuletzt wurden *E. coli* XL1-blue superkompetente Zellen mit dem mutierten Plasmid transformiert.

Der korrekte Einbau des mutierten Inserts wurde mittels einer Sequenzierung (**3.2.3.7**) bestätigt.

Tab. 3.11: Auswahlkriterien für das Primerdesign.

Länge	25-45 Basen
Schmelztemperatur	≥78 °C
GC Gehalt	mind. 40 %
Sollte in einer oder mehreren G oder C Basen enden	
Die Mutation sollte auf beiden Seiten von 10-15 korrekten Basen umgeben sein	

Tab. 3.12: Reaktionsansatz für die PCR der *Site-directed Mutagenesis*.

Komponente	Eingesetzte Menge pro Reaktionsansatz
10x Reaktionspuffer	5 µL
dsDNA Template	50 ng
Oligonukleotid Primer Fw	125 ng
Oligonukleotid Primer Rev	125 ng
dNTP Mix	1 µL
ddH ₂ O	Endvolumen: 50 µL
PfuUltra HF DNA Polymerase (2,5 U/µL)	1 µL

Tab. 3.13: Temperaturprofil für die PCR der *Site-directed Mutagenesis*.

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	30 sec	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	16
Annealing	55 °C	1 min	
Polymerisierung	68 °C	7 min	
Polymerisierung	68 °C	4 min	1
Pause	4 °C	∞	

3.2.3.7. Sequenzierung

Zur Durchführung der Sequenzierung wurde die DNA zunächst aufgereinigt (3.2.3.1). Die Sequenzanalyse nach der *Site-directed Mutagenesis* in dem Vektor pET11b wurde mit dem T7 Primer durchgeführt. Zur Sequenzanalyse nach Umklonierung in pEF-IRES, wurde der pEF-IRES Seq Primer benutzt. Die Sequenzierung wurde von *SeqLab Sequence Laboratories*, Göttingen durchgeführt und mit dem Programm BioEdit ausgewertet.

Tab. 3.14: Sequenzierungsansatz.

Komponente	Menge
DNA	mind. 110 ng
Primer	~30 µM

3.2.3.8. Stabile Transfektion von HEK293-Zellen

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 6×10^5 Zellen/Well in einer 6-Well Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40-80 % kultiviert. Die DNA (pEF-IRES mit dem entsprechenden Insert) wurde aus den zuvor transformierten *E. coli* Zellen aufgereinigt (3.2.3.1). 2 µg DNA in 100 µL DMEM wurden mit 20 µL *PolyFect Transfection Reagent* vermischt und für 10-15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 3 ml frischem Medium versehen, das Transfektionsreagenz mit 600 µL Medium versetzt und zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 24 h weiter kultiviert, bevor die Selektion erfolgte. Hierzu wurde das Kulturmedium zusätzlich mit 20 µg/mL Puromycin versetzt und die Zellen weitere 17 Tage kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Zur Expansion wurde jeweils ein Klon gepickt und in eine 12-Well Platte transferiert. Beim Erreichen einer ausreichenden Dichte wurden die Zellen expandiert. Zuletzt wurde von den Zellen ein Kryo-Stock angelegt (3.2.2.2).

3.2.4. Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1. Rekombinante Expression von Proteinen in HEK293-Zellen

Säugerzellen haben, gegenüber Bakterien, den Vorteil, dass eventuelle posttranslationale Modifizierungen vorgenommen werden können und die Proteine frei von LPS sind. Nachteile sind u.a. die geringere Expressionseffizienz und der deutlich größere Zeitaufwand.

Nach der Expression der Proteine in HEK293 Zellen werden sie, aufgrund der vorhandenen Signalsequenz (LNGFR), sekretiert und befinden sich im Zellkultur-Überstand.

Zur Kultivierung zuvor transfizierter HEK293-Zellen (**3.2.3.8**) für die Proteinexpression wurde der Inhalt einer konfluent bewachsenen T175 Zellkulturflasche, wie unter **3.2.1.2** beschrieben, zur Expansion in 500 mL Kulturmedium für eine Woche in *CellStack Culture Chambers* kultiviert.

Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen, steril filtriert, mit 0,01% NaN_3 versetzt und bis zur Aufreinigung der Proteine (**3.2.4.4**) bei 4 °C gelagert.

3.2.4.2. Rekombinante Expression von Protein in *E. coli* BL21(DE3)

Für die Proteinproduktion wurde die plasmidische DNA zunächst in chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) transformiert (**3.2.2.4**). In diesen Zellen ist die Herstellung der Proteine durch IPTG induzierbar. Die Expression des in dem pET11b Vektor kodierten Gens erfolgt unter der Kontrolle des T7/*lac*-Promotors. Hierbei liegt hinter dem T7-Promotor ein *lac*-Operator, der durch den *lacI*-Repressor blockiert wird. Durch Zugabe von IPTG wird der *lacI*-Repressor vom Operator gelöst, sodass die Translation des Zielgens stattfinden kann (Studier *et al.*, 1986). Die Transformation wurde auf Selektionsmedium überprüft. Jeweils ein Klon wurde für Kryo-Stocks verwendet. Für die Proteinaufreinigung (**3.2.4.3**) wurde aus einem Kryo-Stock eine Vorkultur (VK) inokuliert und ü.N. bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Am Folgetag wurde aus der VK eine Hauptkultur (HK), mit einer Start- OD_{600} von 0,1, angesetzt und bei 37 °C im Schüttler kultiviert bis eine OD_{600} von 0,5 erreicht war (logarithmische Wachstumsphase). Zu diesem Zeitpunkt wurde die HK mit IPTG (Endkonzentration 1mM) versetzt und für 4 h weiter kultiviert. Nach der Zentrifugation (2500 g, 20 min)

wurde das Pellet aus 200 mL HK in 10 mL Cytosol-Lysepuffer (LP) resuspendiert, 5x 30 sec auf Eis sonifiziert und erneut zentrifugiert (15000 g, 30 min, 4 °C). Das Protein befand sich im Überstand (ÜS).

Um ebenfalls Protein zu isolieren, das sich in Einschlusskörpern (*Inclusion bodies*, IB) befand, wurde das bei der zytosolischen Aufreinigung erhaltene Pellet 2x mit 10 mL Zytosol-LP + 0,5 % Tween 20 (v/v) gewaschen. Hierzu wurde es resuspendiert, 10 min bei RT inkubiert und anschließend pelletiert (15000 g, 10 min, 4 °C). Nach den Waschsritten wurde das Pellet in 10 mL IB-LP resuspendiert und ü.N. bei 4 °C und Rotation inkubiert. Da am Folgetag noch kein vollständiger Aufschluss erreicht worden war wurde eine weitere Sonifizierung und Zentrifugation (15000 g, 4 °C, 20 min) durchgeführt. Das Protein befand sich auch hier im ÜS.

3.2.4.3. Aufreinigung der in *E. coli* exprimierten Proteine

Sowohl für die ALEX als auch für die HIC wurden alle Puffer vor Gebrauch filtriert (0,45 µm) und für 10-20 min entgast.

3.2.4.3.1. Anionenaustauschchromatographie (AEX)

Die Ionenaustauschchromatographie dient der Separierung von Proteinen anhand ihrer Ladung. Sie kann sowohl über eine Säule oder im „Batch-Verfahren“ durchgeführt werden. Ausgehend von der Nettoladung des Proteins wird eine Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Ionisierung der Oberflächen Aminosäure von Proteinen variiert in Abhängigkeit des pH-Werts. Liegt der pH unter dem Wert des Isoelektrischen Punkts (pI), an dem das Protein eine neutrale Gesamtladung hat, so ist das Protein positiv geladen. Ist der pH jedoch höher als der pI, so ist das Protein negativ geladen (Bollag, 1994). Unter den hier verwendeten Bedingungen liegen die zu separierenden Proteine mit einer negativen Gesamtladung vor. Daher wurde die Anionenaustauschchromatographie verwendet. Diese kann wiederum in „stark“ und „schwach“ untergliedert werden, abhängig von der verwendeten stationären Phase. Bei starken Ionen-Austauschern ist die Ionisierung der funktionellen Gruppen der stationären Phase über einen weiten pH-Bereich stabil. Bei einer schwachen stationären Phase variiert die Ionisierung in Abhängigkeit des pH. Proteine werden generell bei einer schwachen Ionenstärke geladen und können über Änderung des pH-Werts oder der Salzkonzentration eluiert werden.

In dieser Arbeit wurde ein starker Anionenaustauscher genutzt und gebundenes Protein mit einer ansteigenden Salzkonzentration durch Verdrängung gelöst.

Die exprimierten Proteine (**3.2.4.2**) wurden zunächst in ALEX-Puffer A dialysiert (4 h, 4 °C) und steril filtriert (0,22 µm). Nachdem die Säule mit ALEX-Puffer A äquilibriert wurde, wurde die Probe geladen (Flussrate: 2 mL/min). Die Elution erfolgte mit einem Salzgradienten (Puffer A → Puffer B). Es wurden 2 mL Fraktionen genommen. Nach dem Erreichen von 100 % Puffer B wurde die Säule noch mit 1 CV (*column volume*) ALEX-Puffer B gespült und anschließend in einem Gradienten mit sinkender Salzkonzentration (Puffer B → Puffer A) und zusätzlichen 1 CV Puffer A Re-äquilibriert. Die Fraktionen wurden auf ihre Absorption bei 280 nm hin analysiert, um solche zu identifizieren, die Protein enthielten. Diese wurden dann auf eine denaturierende PAGE (**3.2.4.6**) aufgetragen und Fraktionen, die S100A12 enthielten (Laufhöhe ~10 kDa), wurden für die HIC (**3.2.4.3.2**) vereint.

3.2.4.3.2. Kalzium-abhängige hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Zur vollständigen Entfernung unerwünschter Proteine wurden die bei der ALEX vereinten Fraktionen zusätzlich über eine Kalzium-abhängige hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) aufgereinigt. Aufgrund der Wechselwirkung hydrophober Bereiche, die durch eine Kalzium-vermittelte Strukturänderung der Proteine exponiert werden, mit einer ebenfalls hydrophoben Matrix, wird speziell die Aufreinigung Kalzium-bindender Proteine erreicht. Diese Interaktion wird durch hohe Salzkonzentrationen verbessert. Eine Verringerung der Salzkonzentration führt dazu, dass sich die Verbindungen wieder lösen. Abhängig von ihrer Hydrophobizität binden und eluieren die Proteine bei unterschiedlichen Ionenkonzentrationen.

Die nach der ALEX (**3.2.4.3.1**) vereinten Fraktionen wurden in TBS dialysiert (ü.N., 4 °C) und anschließend auf eine spezifische Kalziumkonzentration eingestellt (TBS*) (vgl. **3.1.2**). Die Säule wurde mit TBS* äquilibriert und das Protein wurde geladen. Ungebundenes Protein wurde mit TBS* abgewaschen (=> Durchlauf). Mittels eines Gradienten wurde die EDTA-Konzentration in der Säule erhöht, was zu einem Entzug von Kalzium und damit zu einer Änderung der Hydrophobizität der Proteine führt und so die Elution induziert. Von den Fraktionen wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und anschließend eine denaturierende PAGE der Protein-enthaltenden Fraktionen angefertigt (**3.2.4.6**).

Fraktionen, die ausschließlich S100A12 enthielten (Laufhöhe ~10 kDa) wurden vereint, in HBS dialysiert und anschließend über 3 kDa *Amicon Ultra Centrifugal Filters* aufkonzentriert. Das LPS wurde mittels EndoTrap (3.2.4.11) entfernt und die Proteinkonzentration wurde durch eine Absorptionsmessung bestimmt (3.2.4.4.1).

3.2.4.4. Aufreinigung der in HEK293-Zellen exprimierten Proteine

Zur Aufreinigung der in HEK293-Zellen exprimierten Proteine (3.2.4.1) wurde eine Affinitätschromatographie mit einem S100A12-spezifischen Antikörper (α -A12) verwendet. Hierzu wurde zunächst α -A12 an das Säulenmaterial gekoppelt (HiTrap NHS-activated HP Instructions 71-700600 AW, 02/2011). Die Säule wurde mit PBS äquilibriert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mit PBS, pH 7,6 bzw. PBS* (vgl. 3.1.2) versetzt, maximal 24 CV bei einer Flussrate von 0,5-1 mL/min auf die Säule aufgetragen und ungebundenes Protein mit 3 CV PBS* abgewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 CV Elutionspuffer (EP). Der geringe pH-Wert des EP wurde direkt durch Zugabe von Tris-HCl pH 9,1 neutralisiert. Die Flussrate betrug maximal 1 mL/min. Es wurden 1 mL Fraktionen genommen die im ELISA auf ihren S100A12-Gehalt hin überprüft wurden. Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereint, in HBS dialysiert und über 3 kDa *Amicon Ultra Centrifugal Filter* aufkonzentriert. Anschließend wurde die Säule mit 5 CV WP für die nächste Aufreinigung re-äquilibriert.

3.2.4.4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Analog zur Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration (3.2.3.2) kann auch die Proteinkonzentration photometrisch ermittelt werden. Proteine absorbieren aufgrund der enthaltenen Tryptophane und Tyrosine, und im geringen Maße auch Cysteine, bei einer Wellenlänge zwischen 275-280 nm (Stoscheck, 1990). Aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl dieser Aminosäuren hat jedes Protein einen spezifischen Extinktionskoeffizienten (ϵ). Zur Bestimmung der Absorption bei 280 nm wurde in dieser Arbeit die Nanodrop-Funktion des Implen Photometers genutzt. Die Proteinkonzentration wurde automatisch von dem Gerät berechnet. Die Berechnung beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz [1]. S100A12 hat einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 0,282$.

Durch Aufnahme eines Spektrums von 250-330 nm konnte die Reinheit der Proteine ermittelt werden. Eine hohe Absorption im Bereich von 260 nm spricht für eine Verunreinigung durch Nukleinsäuren, wohingegen andere organische Substanzen (z.B. Salze, Phenole) zu einer erhöhten Absorption um 230 nm und >280 nm führen können.

Abb. 3.1 zeigt typische Spektren für Proteine, DNA und eine Mischung aus beidem.

[1]

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot d$$

A: Absorption

ε : Extinktionskoeffizienten

C: Konzentration

d: optische Schichtdicke (meist =1)

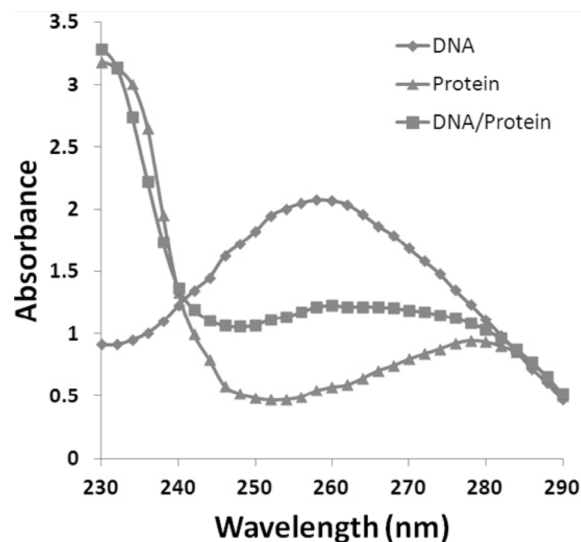


Abb. 3.1: Absorptionsverlauf von DNA und Proteinen.

Dargestellt sind die charakteristischen Absorptionsspektren von DNA (♦), Proteinen (▲) und einer Mischung aus DNA und Protein (■) (Brescia *et al.*, 2012).

3.2.4.5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde zur Bestimmung der S100A12-Proteine nach Größenfiltration (**Tab. 3.15 a**), die AK-Bindungsstudien (**Tab. 3.15 b**), die Rezeptor-Interaktionsanalysen (**Tab. 3.15 c**) bzw. der IL-8-Konzentrationsbestimmung genutzt. Für jede Versuchsdurchführung waren unterschiedliche Aufbauten und Reagenzien nötig. Das Prinzip war jedoch immer das Gleiche und auch die Standard-Reagenzien (Waschpuffer, Puffer zum Immobilisieren, TMB) waren gleich.

Zunächst wurde das gewünschte Protein oder der Antikörper in 50 μ L Carbonatpuffer \ddot{u} .N. bei 4 $^{\circ}$ C oder 1 h bei 37 $^{\circ}$ C auf einer Nunc MaxiSorp 96-Well Platte immobilisiert

(**Tab. 3.15 ①**). Nach dreimaligem waschen mit je 300 μL PBST wurden übriggebliebene Bindungsstellen für 1-4 h bei RT mit Blockpuffer blockiert. Die Inkubation mit den Proben (je 50 μL) erfolgte für 1-2 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C (**Tab. 3.15 ②**). Anschließend wurden die Wells erneut dreimal mit je 300 μL PBST gewaschen. Zur Detektion wurden die Wells entweder mit einem Primärantikörper für 1 h bei RT inkubiert, die Platten gewaschen und im Anschluss mit einem Sekundärantikörper (30 min, 37 °C) inkubiert, oder ein biotinylierter AK und Streptavidin wurden für mind. 10 min in PBST vorinkubiert, dann zu den Wells gegeben und ebenfalls für 30 min bei 37 °C inkubiert (**Tab. 3.15 ③**). Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Detektion mit 100 μL TMB. Dieses wird durch die am Sekundärantikörper bzw. an Streptavidin gekoppelte HRP in einer Farbreaktion umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μL H_2SO_4 nach 5-10 min gestoppt. Die Konzentrationsänderung des enzymatisch umgesetzten Farbstoffes ist proportional zur Menge an gebundenem AK/Streptavidin und wurde photometrisch bei 450 nm bestimmt.

Tab. 3.15: Auflistung der Ansätze für die verschiedenen ELISA-Anwendungen.

Anwendung Schritt	a	b	c
①	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -A12	0,1-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ S100A12	2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TLR-4 bzw. sRAGE
②	50 μL Retentat	entfällt	0,5-7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ S100A12 in PBS
③	4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -A12-bio + Streptavidin-HRP	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -A12 + α - Kaninchen bzw. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mono-AK + α -Maus	4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -A12-bio + Streptavidin-HRP

3.2.4.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zu unterscheiden sind hier die semi-native und denaturierende PAGE. Bei der semi-nativen PAGE wurden die Proteine, nachdem sie mit Probenpuffer (PP) ohne SDS und β -Mercaptoethanol versetzt wurden, nicht aufgekocht, um die Proteinstruktur zu erhalten. Bei der denaturierenden PAGE wurden die Proteine hingegen mit PP versetzt, der SDS und β -Mercaptoethanol enthielt, und vor dem Auftrag auf das Gel für 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Auftrennung beruht in beiden Fällen auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen großen Proteine im

elektrischen Feld. Um eine bessere Auftrennung der Proteine zu erreichen, wurde die Gelelektrophorese mit einem kombinierten Gel aus Sammelgel und Trenngel (**Tab. 3.16**) in 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt. Das Sammelgel wies eine geringere Polyacrylamid-Konzentration auf, sodass die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel konzentriert wurden. Das in dem PP enthaltene Glycerin erhöhte die Dichte der Proben, sodass sie in die Geltaschen sinken konnten. Die Elektrophorese wurde für 15 min bei 120 V und anschließend ca. 50 min bei 200 V durchgeführt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Tab. 3.16: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.

Die Angaben entsprechen jeweils der Menge für ein Gel.

Gel	Volumen	Reagenz
Sammelgel (5 %)	0,5 mL	Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid
	1,75 mL	ddH ₂ O
	0,75 mL	Sammelgelpuffer
	12 µL	TEMED
	12 µL	APS (10%)
Trenngel (15 %)	3 mL	Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid
	0,5 mL	ddH ₂ O
	1 mL	Glycerin 70 %
	1,5 mL	Sammelgelpuffer
	12 µL	TEMED
	12 µL	APS (10%)

3.2.4.6.1. Coomassie-Färbung

Proteine können in den Gelen mittels Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde das Gel zunächst in Coomassie-Färbelösung inkubiert, bis es eine gesättigte blaue Farbe aufwies. Anschließend wurde das Gel soweit mit Coomassie-Entfärbler entfärbt, bis nur noch die Protein-Banden zu erkennen waren. Die Ergebnisse wurden mittels ChemiDoc dokumentiert und in ImageLab ausgewertet.

3.2.4.7. Westernblot (WB)

Mittels eines Westernblots können Proteine mit einem Antikörper detektiert werden. Hierzu wurden im Polyacrylamid-Gel aufgetrennte Proteinbanden mittels der Technik des semi-dry Blottings (Trans-Blot[®] Turbo[™] StandardSD Protokoll) auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran für 1 h, RT in TBST + 5% Milchpulver blockiert. Anschließend

erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. einem biotinyliertem AK ü.N. bei 4 °C. Zur Detektion wurde die Membran zunächst mit TBST gewaschen und im Falle des Primär-AKs zusätzlich mit einem Sek-AK inkubiert. Bei vorheriger Inkubation mit dem biotinylierten AK wurde die Membran gewaschen und mit Streptavidin-HRP inkubiert (jeweils 1 h, RT). Die Membran wurde erneut gewaschen und für 1 min in ECL inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mit dem ChemiDoc aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageLab.

3.2.4.8. Densitometrie

Zur Bestimmung der Intensität von Proteinbanden in Coomassie-Gelen wurde das Programm ImageLab genutzt. Es wurden jeweils der mittlere Intensitätswert (*Mean value (int)*) der Banden sowie ein Background bestimmt. Der Background wurde von den ermittelten Bandenintensitäten abgezogen. Zum Vergleich der Intensitäten von einzelnen Komplexen wurden zunächst die Werte für alle Komplexformen addiert und anschließend der prozentuale Anteil der einzelnen Komplexe am Gesamtprotein bestimmt.

3.2.4.9. Stimulation von HEK293/TCM-Zellen

Zwei Tage vor der Stimulation wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Well in einer beschichteten 24-Well Platte ausgesät und unter Standardbedingungen (**3.2.1.1**) kultiviert. Am Tag der Stimulation wurde das Medium vorsichtig abgenommen und durch 500 µL Medium, welches je 5 µg/mL der rekombinanten Proteine bzw. 100 pg/mL LPS enthielt, ersetzt. Die Stimulation erfolgte für 4 h bei 5 % CO₂ und 37 °C. Anschließend wurde der Überstand für die Bestimmung der IL-8 Proteinkonzentration (IL-8 ELISA; *Technical Data Sheet 2654K_5552444*, 2015) abgenommen und zur Bestimmung der IL-8 Transkription mit den Zellen, wie unter **3.2.3.5**, beschrieben weiter verfahren.

3.2.4.10. Stimulation von THP1-Zellen

THP1 Monozyten wurden vor ihrer Stimulation zu THP1-Makrophagen differenziert. Hierzu wurden 500 µL Zellsuspension mit einer Dichte von $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL in unbeschichtete Wells einer 24-Well Platte ausgesät und mit 10 ng/mL PMA versetzt.

Nach einer Kultivierungszeit von 48 h wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht. Nach weiteren 48 h erfolgte die Stimulation der Zellen mit 20 µg/mL rekombinantem Protein bzw. 100 pg/mL LPS für 4 h in frischem Medium. Zur Analyse der Transkription von TNF α , IL-8, IL-6 und IL-1 β wurden die Zellen wie unter **3.2.3.5** beschrieben lysiert.

3.2.4.11. Entfernung von LPS mittels EndoTrap

Das Prinzip der EndoTrap ist ähnlich zu dem anderer Chromatographie-Systeme. Die Matrix ist eine 4 %-ige Sepharose, an die ein Protein zur LPS-Bindung gekoppelt ist (Hyglos, *Short Introduction into the EndoTrap-family*, V11/2013). So wurde das LPS aus den jeweiligen Proteinlösung entfernt und die aufzureinigenden Proteine direkt im Durchlauf aufgefangen. Um den Proteinverlust so gering wie möglich zu halten, wurde die Säule mit Äquilibriumspuffer nachgespült. Nach Reaktivierung der Säule wurde die Prozedur für jede Proteinmutante zweimal wiederholt. Die endgültige LPS Konzentration wurde mit einem EndoLISA bestimmt.

Die Entfernung von LPS aus den Proben der aufgereinigten Protein-Mutanten erfolgte anhand des *Standard Application Protocols* der EndoTrap (V06/2012). Es wurden jeweils drei Zyklen durchgeführt. Die genaue LPS-Konzentration wurde anschließend mittels EndoLISA (**3.2.4.12**) ermittelt.

Da eine weitere Aufreinigung mit einem zusätzlichen Verlust an Protein verbunden gewesen wäre, wurde zunächst mit den hier erhaltenen Ergebnissen weiter gearbeitet.

3.2.4.12. Bestimmung der LPS-Konzentration mittels EndoLISA

Der EndoLISA wurde wie im *Package Insert* V1.5/2014 (606168) beschrieben, durchgeführt. Die Detektion beruht hier auf dem gleichen Prinzip wie bei einem ELISA (**3.2.4.5**). Ein Bakteriophagen Protein, dass LPS bindet, ist immobilisiert und wurde mit den Proben inkubiert. Anschließend wurde der Faktor C (ein Vorläufer einer Protease, die durch LPS aktiviert wird), der in dem Assay-Reagenz enthalten ist, durch LPS aktiviert. Dieser setzt wiederum ein synthetisches Substrat um, wodurch es zu einer Fluoreszenz kommt, welche proportional zu gebundenen LPS ist. Sie konnte photometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm quantifiziert werden. Die Emission lagt bei 440 nm.

3.2.4.13. Chemische Quervernetzung von Proteinen

Die S100A12-Komplexbildung ist stark von der Kalzium- und Zinkkonzentration abhängig. Um Proteinkomplexe zu stabilisieren wurden sie mit einem *Crosslinker* chemisch quervernetzt. Es wurde der sulfo NHS Ester BS³ genutzt. Dieser hat, gegenüber anderen NHS Estern den Vorteil, dass er wasserlöslich ist. Die Verbrückung von Proteinen erfolgt durch Reaktion zweier primärer Amine miteinander und daraus resultierende Ausbildung einer Amid-Bindung.

Die chemische Quervernetzung wurde anhand der *Instructions DSS and BS³ Crosslinkers* (0418.9) durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst mind. 30 min unter den gewünschten Bedingungen mit verschiedenen Kalzium- und Zinkkonzentrationen (**Tab. 3.17**) inkubiert und dann mit einem 50-fach molaren Überschuss an *Crosslinker* versetzt. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit Tris-HCL, pH 7,5 (Endkonz. 50 mM), wurden die chemisch quervernetzten Komplexe für die weiteren Versuche eingesetzt.

Tab. 3.17: Für die chemische Quervernetzung verwendete Kalzium- und Zinkkonzentrationen.

Kalzium [mM]	Zink [μ M]	
0,00015	/	
1	/	
/	0,001	
	0,001	→ Intrazelluläre Bedingung
	0,01	
0,0002	0,1	
	10	
	30	
	70	
	0,01	
	0,1	
	1	
1,8	6,5	
	30	→ Extrazelluläre Bedingung
	70	
	100	
	500	

3.2.4.14. Größenfiltration der Proteine

In dieser Arbeit wurden die Komplexe zunächst mittels *Amicon Ultra Centrifugal Filters* separiert. Diese Methode zeichnet sich durch ein schnelles Verfahren und eine hohe Proben-Rückgewinnung aus. Das wtS100A12 wurde zunächst in HEK293-Medium inkubiert und anschließend über einen Filter mit 50 kDa Ausschlussgröße filtriert. Das Retentat wurde im ELISA weiter analysiert (3.2.4.5). Der Durchlauf wurde als Auftrag für den nächst kleineren Filter (30 kDa) genutzt. Analog dazu wurde für die 10 kDa Filtration vorgegangen.

3.2.5. Statistik

Zur statistischen Auswertung und Anfertigung der Graphen wurde das Programm GraphPad Prism genutzt. Es wurde jeweils ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt. p-Werte ab 0,05 wurden als signifikant erachtet. Die Signifikanzniveaus sind wie folgt definiert: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

KAPITEL 4

ERGEBNISSE

4.1. Isolierung einzelner S100A12-Komplexe durch Größenfiltration

Die Isolierung einzelner S100A12-Komplexe ist essentiell für die Analyse ihrer Rezeptorinteraktion und -aktivierung. Bisher konnte gezeigt werden, dass S100A12 in Abhängigkeit der Kalzium- und Zinkkonzentration Dimere, Tetramere und Hexamere bildet (Moroz *et al.*, 2009a; Moroz *et al.*, 2009b). Jedoch wurden die einzelnen Komplexe noch nicht gezielt auf ihre Funktionalität hin analysiert.

Zu Beginn dieser Arbeit ist versucht worden, die unterschiedlichen Protein-Komplexe durch Größenfiltration zu isolieren. Je nach Komplexform hat S100A12 ein Molekulargewicht von ca. 63 kDa (Hexamer), 42 kDa (Tetramer), 21 kDa (Dimer) und 10,5 kDa (Monomer) und lässt sich über Filter mit unterschiedlichen Porengrößen separieren.

Mittels eines ELISA konnte Protein in den Proben >50 kDa, >30 kDa und >10 kDa detektiert werden, jedoch nicht in denen kleiner 10 kDa (**Abb. 4.1**). Aufgetragen ist die gemessene Absorption (A_{450}) gegen die Verdünnung der Retentate.

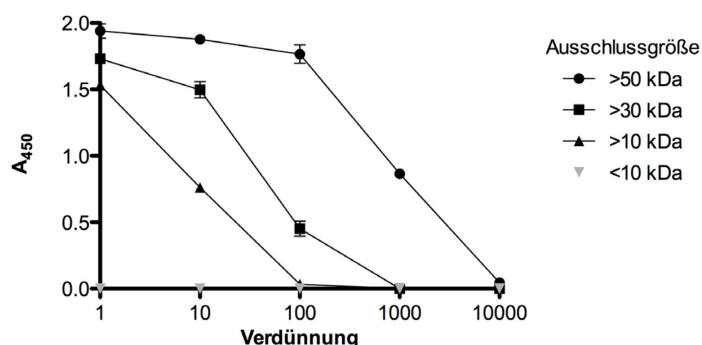


Abb. 4.1: Größenfiltration des wtS100A12.

Die Proteine sind in DMEM inkubiert und anschließend über Filter verschiedener Porengrößen mittels Ultrazentrifugation separiert worden. Die Durchläufe sind jeweils als Auftrag für den nächst kleineren Filter genutzt worden. Im ELISA konnten Proteine detektiert werden, die größer sind als 50 kDa (●), 30 kDa (■) und 10 kDa (▲), jedoch keine die kleiner als 10 kDa (▼) sind. Aufgetragen ist die gemessene Absorption bei 450 nm gegen die Verdünnung der Retentate.

Sind die separierten S100A12-Komplexe erneut in DMEM inkubiert und anschließend der Größe nach aufgetrennt worden, so sind in jedem Retentat (Ausschlussgröße >50 kDa, >30 kDa, und >10 kDa) wieder Proteine und somit alle Komplexformen zu detektieren (**Abb. 4.2**).

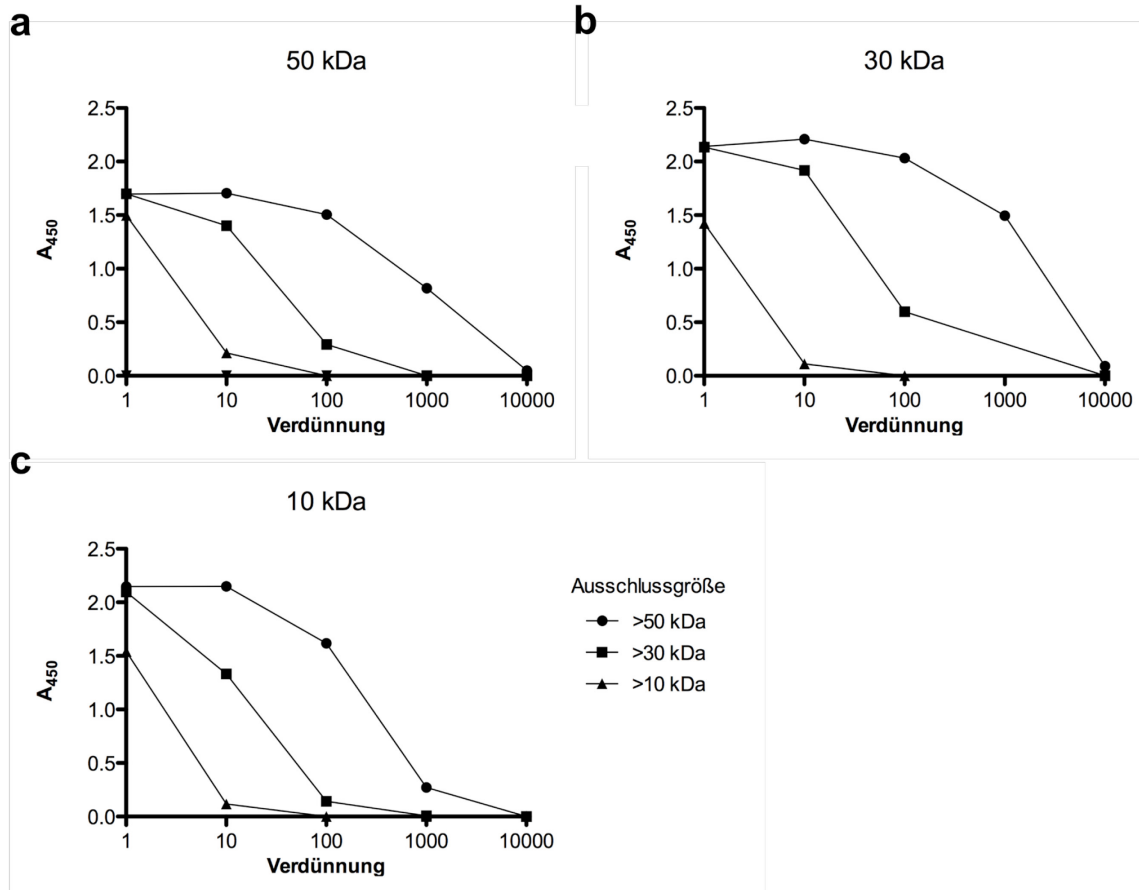


Abb. 4.2: Zweite Größenfiltration der zuvor erhaltenen Retentate.

Die zuvor erhaltenen Retentate (**Abb. 4.1**) sind erneut in DMEM inkubiert und anschließend über Filter mit unterschiedlicher Porengröße aufgetrennt worden. Der Durchlauf ist jeweils als Auftrag für den nächst kleineren Filter verwendet worden. Nach Durchführung eines ELISAs ist die Absorption bei 450 nm der neu erhaltenen Retentate gegen die Verdünnung aufgetragen worden. Bei den vorherigen Proben >50 kDa (a), >30 kDa (b) als auch >10 kDa (c) konnten wieder alle Komplexformen (Ausschlussgröße >50 kDa (•), >30 kDa (■) und >10 kDa (▲)) detektiert werden.

Zusammenfassung 4.1:

S100A12 zeigt eine große Plastizität bezüglich der Komplexbildung. In DMEM ist eine Umwandlung zwischen allen Komplexen möglich. Den größten Anteil machen jeweils die Hexamere aus, gefolgt von Tetrameren und Dimeren. Um dennoch eine Separierung der verschiedenen Komplexe zu ermöglichen sind daher die an der Kalzium- und Zink-Bindung beteiligten AS mittels *Site-directed Mutagenesis* substituiert worden.

4.2. Herstellung von S100A12-Mutanten

Zur Inhibition der Komplexbildung von S100A12 sind die an der Kalzium- und Zink-Bindung beteiligten polaren AS mittels *Site-directed Mutagenesis* gegen die unpolare AS Alanin substituiert worden. Diese Methode wurde ebenfalls für die Analyse der Komplexbildung von S100A8 und S100A9 eingesetzt (Leukert *et al.*, 2006). Durch Sequenzvergleich (**Abb. 4.3**) mit den bei S100A9 eingefügten Mutationen sowie mit dem S100-Protein S100A10, das nicht in der Lage ist Kalzium zu binden (Rety *et al.*, 1999), konnten die AS N63 und E72 als erfolgversprechendste Ziele zur Beeinflussung der Kalzium-Bindung bestimmt werden. Mithilfe der Angaben in der Literatur (Moroz *et al.*, 2002; Moroz *et al.*, 2003a; Moroz *et al.*, 2001; Moroz *et al.*, 2009a; Rety *et al.*, 1999) konnten die AS H15, D25, H85 und H89 als essentiell für die Zink-Bindung identifiziert werden.

		EF - 1									
S100A12	1	TKLeEHLeGI	VNI	EHQYSVR	KGH	HTLSKG	ELKQLLTKEL	ANTI.KNIKD			
S100A9	6	SQLeRNLeTI	INTE	HQYSVK	LGHE	HTLNQG	EFKELVRKDL	QNFLKKNKN			
S100A10	3	SQMeHMeTM	MFTE	HKEAGD	KGY	.LTKE	DLRVLMEKEF	PGFLENQKDP			

		EF - 2									
S100A12	50	KAVIDEIFQ.	...GLDANQD	EQVDFQEFIS	LVAIALKAAH	YHTHKE~~~~					
S100A9	56	EKVIEHIME.	...DLIDINAD	KQLSFEEFIM	LMARLTWASH	EKMHEGDEGP					
S100A10	50	LA.VDKIMK.	...DLDQORD	GRVGFQSFIS	LIAGLTIACN	DYFMVHMKQK					

Abb. 4.3: Sequenzvergleich von S100A9, S100A10 und S100A12.

In der Abbildung werden die AS-Sequenzen der EF-Hände von S100A9, S100A10 und S100A12 verglichen. Die rot markierten AS von S100A9 konnten bereits in einer vorangegangenen Arbeit als essentiell für die Kalzium-Bindung identifiziert werden. Da S100A10 kein Kalzium binden kann, dient der Vergleich der AS dieses Proteins zusätzlich zur Identifizierung von AS, die an der Kalzium-Bindung beteiligt sind (rot). AS, die für die Zink-Bindung erforderlich sind, konnten durch Literaturrecherche ermittelt werden (vgl. 2.3.1.2) und sind grün hervorgehoben (modifiziert nach (Moroz *et al.*, 2003a)).

4.2.1. Site-directed Mutagenesis

In der *Site-directed Mutagenesis* sind mit spezifischen Primern in einer PCR (Polymerase-Kettenreaktion) Mutationen in dsDNA eingefügt worden. Als dsDNA ist der Vektor pET11b verwendet worden, der als Insert das wtS100A12 Gen enthält (vgl. 3.1.12). Nach der *Site-directed Mutagenesis* sind die Inserts mittels Sequenzierung auf die eingeführten Mutationen hin analysiert worden. Mit der *Site-directed Mutagenesis* konnten die für die Kalzium- bzw. Zink-Bindung nötigen AS durch Alanin substituiert werden (**Abb. 4.4**).

wtS100A12	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
S100A12 H15A	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
wtS100A12	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
S100A12 H15A	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
wtS100A12	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
S100A12 D25A	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
wtS100A12	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
S100A12 D25A	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
wtS100A12	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
S100A12 N63A	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
wtS100A12	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
S100A12 N63A	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
wtS100A12	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
S100A12 E72A	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
wtS100A12	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
S100A12 E72A	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
wtS100A12	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
S100A12 H85A	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
wtS100A12	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
S100A12 H85A	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
wtS100A12	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
S100A12 H89A	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
wtS100A12	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
S100A12 H89A	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
wtS100A12	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
S100A12 N63/E72A	1	TKLEEHLLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSKSELKQLLTKELANTIKNIKDK	50
wtS100A12	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91
S100A12 N63/E72A	51	AVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHHTHKE	91

Abb. 4.4: Alignment der AS-Sequenz des wtS100A12 und der jeweiligen Mutanten.

Dargestellt sind die Alignments der AS-Sequenzen von wtS100A12 und den Mutanten (H15A, D25A, N63A, E72A, H85A, H89A). Nach der *Site-directed Mutagenesis* des in pET11b klonierten wtS100A12 Gens ist der Vektor in *E. coli* XL1-blue transformiert worden. Mit 8 Klonen pro Mutation ist eine Flüssigkultur angeimpft und die DNA aufgereinigt worden. Diese ist für die Sequenzanalyse (Seqlab; *Sequence Laboratories*, Göttingen) mit einem T7 Primer eingesetzt worden. Mit dem Programm BioEdit sind die Nukleotidsequenzen in AS-Sequenzen umgeschrieben und jeweils mit dem wtS100A12 verglichen worden. Für alle gewünschten Substitutionen konnten entsprechende Klone identifiziert werden. In rot sind die AS-Substitutionen der Kalzium-Bindungsstellen und in grün der Zink-Bindungsstellen hervorgehoben.

4.2.2. Proteinexpression in Säugerzellen (HEK293)

Um eine stabile Expression und anschließende Sekretion der Proteine in Säugerzellen zu ermöglichen ist eine Umklonierung der mutierten S100A12-dsDNA in den Vektor pEF-IRES durchgeführt worden. Das Alignment der AS-Sequenzen zeigt auch hier, dass alle gewünschten Mutationen vorhanden sind und sonst keine weiteren vorliegen (Abb. 4.5).

wtS100A12	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
S100A12 H15A	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
wtS100A12	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
S100A12 H15A	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
<hr/>						
wtS100A12	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
S100A12 D25A	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
wtS100A12	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
S100A12 D25A	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
<hr/>						
wtS100A12	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
S100A12 N63A	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
wtS100A12	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
S100A12 N63A	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
<hr/>						
wtS100A12	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
S100A12 E72A	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
wtS100A12	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
S100A12 E72A	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
<hr/>						
wtS100A12	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
S100A12 H85A	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
wtS100A12	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
S100A12 H85A	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
<hr/>						
wtS100A12	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
S100A12 H89A	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
wtS100A12	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
S100A12 H89A	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
<hr/>						
wtS100A12	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
S100A12 N63/E72	1	RAMDGPRLLLLLLLGVS	LG	GGARSTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFHDTLSK	GELKQL	58
wtS100A12	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114
S100A12 N63/E72	59	LTKELANTIKNIKDKAVIDE	IFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHYHTHKE			114

Abb. 4.5: Alignment der AS-Sequenz des wtS100A12 und der jeweiligen Mutanten in pEF-IRES.

Zur stabilen Expression der Proteine in Säugerzellen ist eine Umklonierung in den Säugerzell-Vektor pEF-IRES vorgenommen worden. Um den Erfolg dieser zu überprüfen, ist erneut eine Sequenzierung durchgeführt worden. Die Übersetzung der erhaltenen Nukleotidsequenz in die AS-Sequenz und das Alignment ist mit dem Programm BioEdit durchgeführt worden. Die Sequenzen stimmen, bis auf die jeweils eingeführte Mutation, mit denen des wtS100A12 überein. Die Mutationen in den Kalzium-Bindungsstellen (N63, E72) sind rot, die der Zinkbindenden AS (H15, D25, H85, H89) grün hervorgehoben. In grau ist eine Teilsequenz des Vektors dargestellt.

4.2.3. Vergleich der Proteinexpression im Zytosol und in Einschlusskörpern von *E. coli* BL21(DE3)

Proteine können nach ihrer Expression in *E. coli* sowohl frei im Zytosol als auch als Einschlusskörper (IB, *inclusion bodies*) vorliegen. IBs werden häufig bei einer Überexpression rekombinanter Proteine durch Aggregation dieser gebildet. Um die Proteinaufreinigung so effizient wie möglich zu gestalten ist daher zu Anfang der Proteingehalt im Zytosol und in IBs analysiert worden (**Abb. 4.6**).

Die Kalziumbindungs-Mutanten N63A, E72A und N63/E72A liegen in gleicher Menge sowohl im Zytosol als auch in IBs vor (**Abb. 4.6 a-f**). Für die Zinkbindungs-Mutante H15A ist die Proteinkonzentration in IBs jedoch deutlich geringer als im Zytosol (**Abb. 4.6 g, h**). Aus diesem Grund ist beschlossen worden, ausschließlich zytosolisches Protein für die weiteren Versuche zu verwenden. Daher ist für die Zinkbindungs-Mutanten D25A, H85A und H89A keine Aufreinigung der IBs mehr durchgeführt worden. Beim Vergleich der zytosolischen Proteinmengen aller Mutanten miteinander (**Abb. 4.6 a, c, e, g, i-k**) ist kein Unterschied auszumachen.

Da nicht alle Proteine Einschlusskörper bilden und die Proteinkonzentrationen im Zytosol gleich sind, ist lediglich das zytosolische Protein weiter aufgereinigt worden.

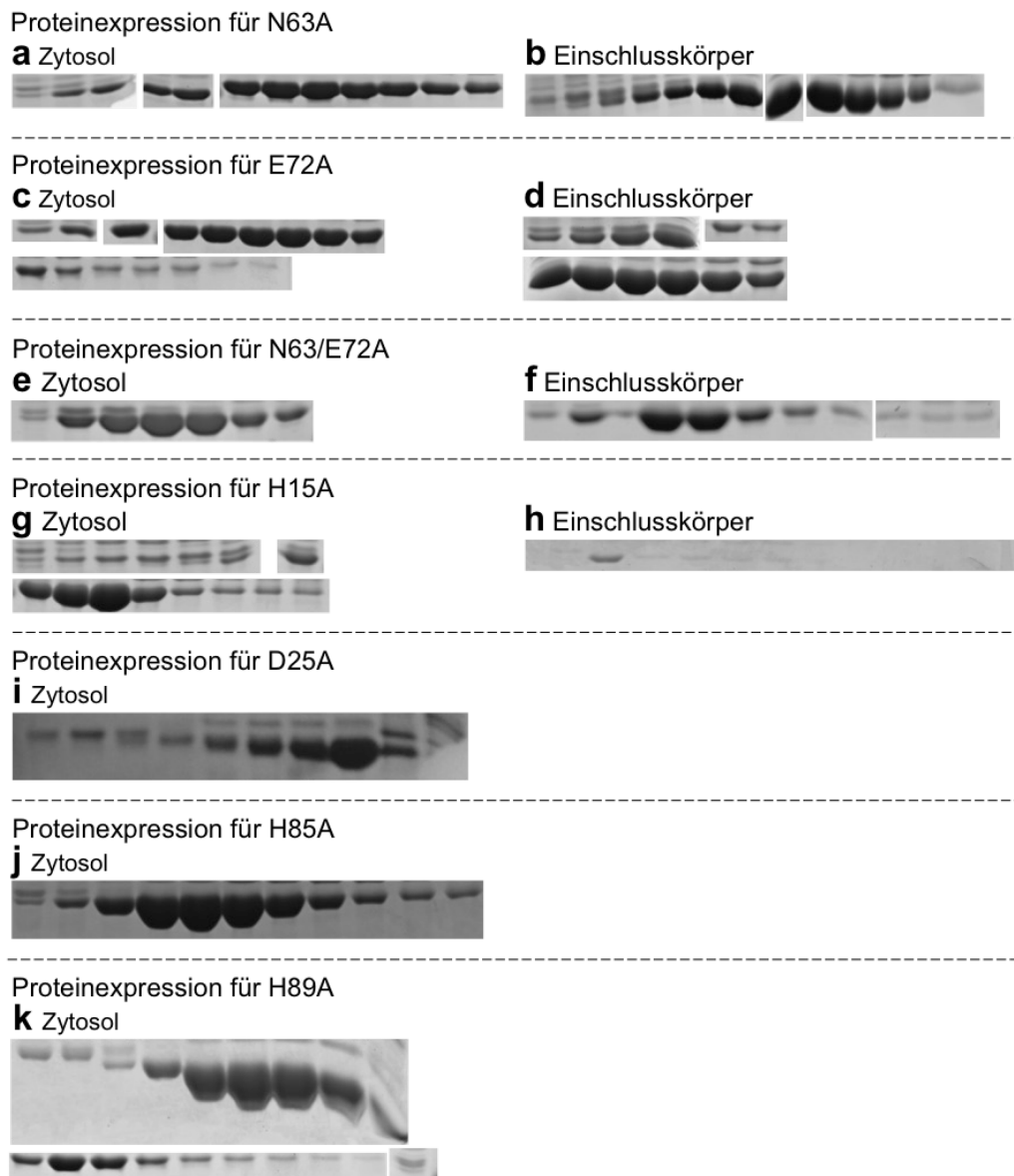


Abb. 4.6: Vergleich der Proteinmengen von S100A12-Mutanten im Zytosol und in Einschlusskörpern.

Die einzelnen Mutanten sind aus dem Zytosol bzw. Einschlusskörpern der Bakterien isoliert und auf eine AIEX-Säule gegeben worden. Für Fraktionen, die im Chromatogramm einen Peak aufwiesen, ist eine denaturierende PAGE und anschließend eine Coomassie-Färbung angefertigt worden. Hier sind ausschließlich die Bereiche dargestellt, die S100A12 repräsentieren. (a) Zytosolisches Protein der Kalziumbindungs-Mutante N63A. (b) Isoliertes Protein der Kalziumbindungs-Mutante N63A aus Einschlusskörpern. (c) Zytosolisches Protein der Kalziumbindungs-Mutante E72A. (d) Isoliertes Protein der Kalziumbindungs-Mutante E72A aus Einschlusskörpern. (e) Zytosolisches Protein der Kalzium-Doppelmutante N63/E72A. (f) Isoliertes Protein der Kalzium-Doppelmutante N63/E72A aus Einschlusskörpern. (g) Zytosolisches Protein der Zinkbindungs-Mutante H15A. (h) Isoliertes Protein der Zinkbindungs-Mutante H15A aus Einschlusskörpern. (i) Zytosolisches Protein der Zinkbindungs-Mutante D25A. (j) Zytosolisches Protein der Zinkbindungs-Mutante H85A. (k) Zytosolisches Protein der Zinkbindungs-Mutante H89A.

4.2.4. Proteinaufreinigung aus *E. coli* BL21(DE3)

4.2.4.1. Anionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie dient der Separierung von Proteinen anhand ihrer Ladung. In dieser Arbeit ist sie als erster Schritt der Proteinaufreinigung eingesetzt worden. Es ist ein ähnliches UV-Spektrum für alle Mutanten zu erkennen (**Abb. 4.7** und **Abb. 4.8**).

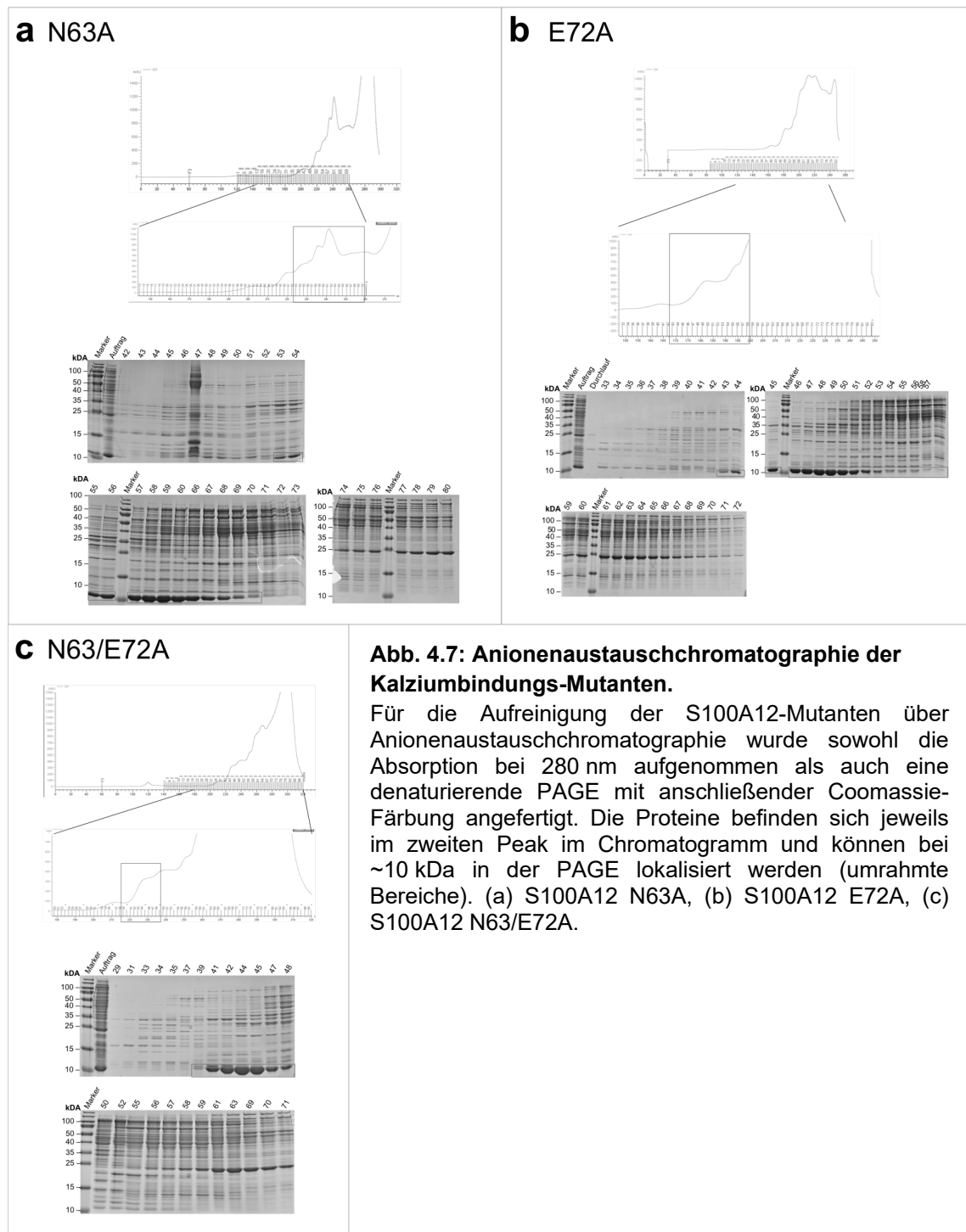


Abb. 4.7: Anionenaustauschchromatographie der Kalziumbindungs-Mutanten.

Für die Aufreinigung der S100A12-Mutanten über Anionenaustauschchromatographie wurde sowohl die Absorption bei 280 nm aufgenommen als auch eine denaturierende PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung angefertigt. Die Proteine befinden sich jeweils im zweiten Peak im Chromatogramm und können bei ~10 kDa in der PAGE lokalisiert werden (umrahmte Bereiche). (a) S100A12 N63A, (b) S100A12 E72A, (c) S100A12 N63/E72A.

Anschließend sind Proben der Fraktionen zur genaueren Analyse auf eine denaturierende PAGE geladen und mit Coomassie angefärbt worden (**Abb. 4.7 und Abb. 4.8**). S100A12 kann jeweils bei einer molekularen Masse von ~10 kDa in den Gelen detektiert werden. Durch Vergleich der Proteingele und der Chromatogramme können die S100A12-Proteine in dem zweiten Peak lokalisiert werden, was ungefähr den Fraktionen 40-60 entspricht. Die Fraktionen, die S100A12 enthalten (**Abb. 4.7 und Abb. 4.8**; umrahmte Bereiche), sind für die weiteren Schritte vereint worden.

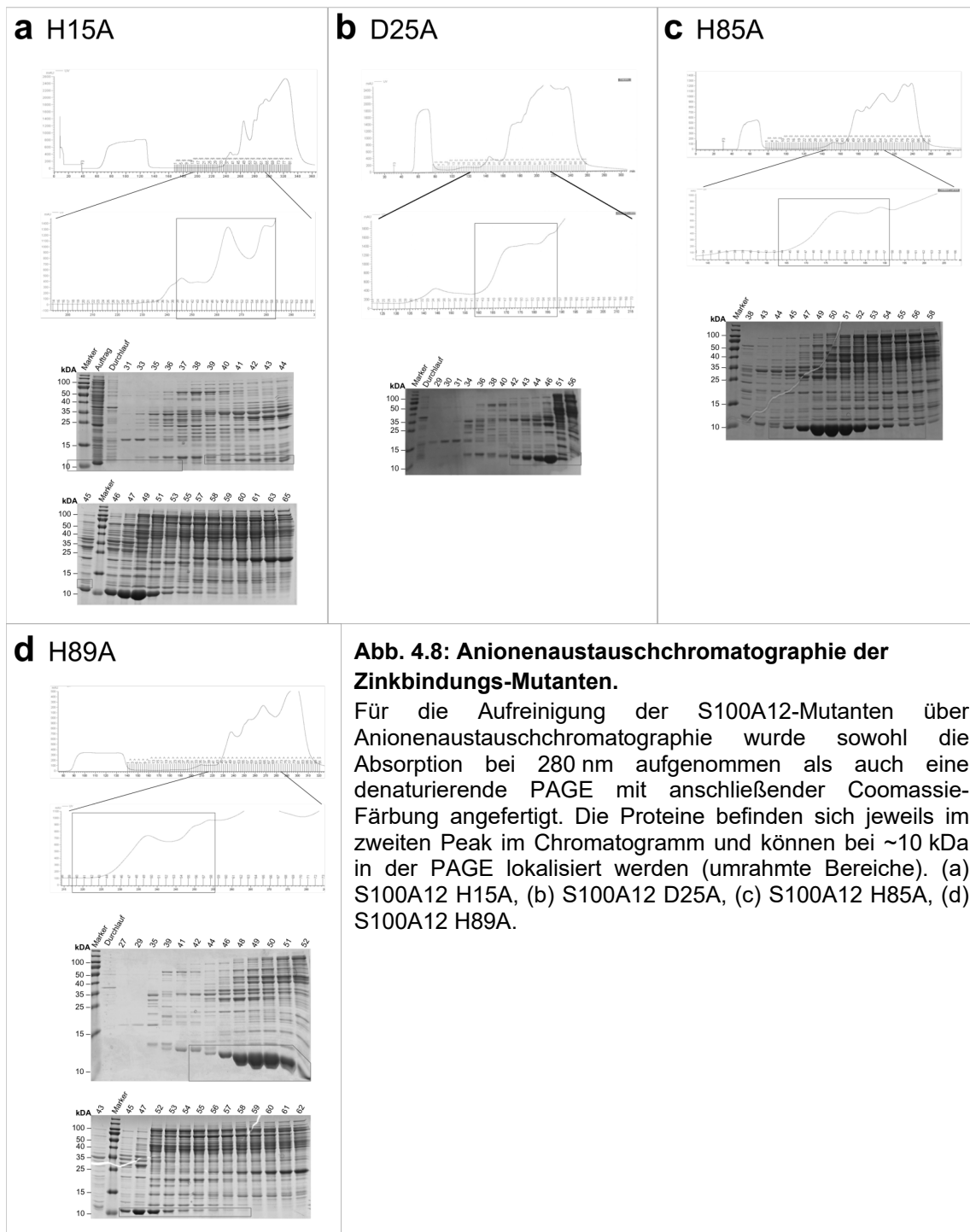


Abb. 4.8: Anionenaustauschchromatographie der Zinkbindungs-Mutanten.

Für die Aufreinigung der S100A12-Mutanten über Anionenaustauschchromatographie wurde sowohl die Absorption bei 280 nm aufgenommen als auch eine denaturierende PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung angefertigt. Die Proteine befinden sich jeweils im zweiten Peak im Chromatogramm und können bei ~10 kDa in der PAGE lokalisiert werden (umrahmte Bereiche). (a) S100A12 H15A, (b) S100A12 D25A, (c) S100A12 H85A, (d) S100A12 H89A.

4.2.4.2. Etablierung der HIC-Aufreinigung für die S100A12-Mutanten

Zur weiteren Aufreinigung ist von den vereinten Fraktionen zusätzlich eine HIC gemacht worden.

Das wtS100A12 weist die effektivste Bindung bei einer Kalziumkonzentration von 25 mM auf (Föll *et al.*). Daher ist diese ebenfalls als Anfangskonzentration für die Aufreinigung der ersten Mutante (N63A) verwendet worden. Jedoch konnte hier nicht die gewünschte Bindungseffizienz erzielt werden. Für die Kalziumbindungs-Mutante N63A befindet sich unter diesen Bedingungen das gesamte Protein im Durchlauf (Daten nicht gezeigt). Daher ist die Bindungseffizienz durch Erhöhung der Salzkonzentration angepasst worden. Auch bei einer Kalziumkonzentration von 50 mM wird noch ein starkes Signal für den Durchlauf erhalten (**Abb. 4.9 a**; Pfeil), was für einen hohen Proteingehalt spricht. Zusätzlich können zwei Peaks detektiert werden, die beide das Zielprotein enthalten (**Abb. 4.9 a, b**; umrahmte Bereiche). Dennoch ist die Konzentration für den nächsten Lauf auf 100 mM erhöht worden. Auch hier befindet sich noch Protein im Durchlauf (**Abb. 4.9 c**; Pfeil), jedoch können ebenfalls große Mengen des Zielproteins ohne weitere Verunreinigungen eluiert werden (**Abb. 4.9 d**; umrahmte Bereich). Für die weiteren Arbeiten sind die umrahmten Fraktionen vereint worden (**Abb. 4.9** und **Abb. 7.2 a**).

Als nächstes ist die Kalziumbindungs-Mutante E72A aufgereinigt worden. Da bereits bei der Kalziumbindungs-Mutante N63A eine deutlich höhere Ionenkonzentration für die Bindung an die HIC-Säule benötigt worden ist als für das wtS100A12, ist hier direkt mit einer Konzentration von 100 mM Kalzium begonnen worden. Unter dieser Bedingung befindet sich das Zielprotein zum größten Teil im Durchlauf (**Abb. 4.10 a**; Pfeil) und den ersten Fraktionen. Jedoch können in diesen, neben dem Zielprotein bei ~10 kDa, noch weitere Proteine detektiert werden (**Abb. 4.10 b**). Daher sind der Durchlauf und die Fraktionen 1-10 vereint und die Kalziumkonzentration auf 200 mM eingestellt worden. Auch hier ist noch ein Signal für den Durchlauf zu detektieren (**Abb. 4.10 c**; Pfeil). Das Zielprotein eluiert, ohne weitere Verunreinigungen, in den Fraktionen 11-29 (**Abb. 4.10 d**). Für die weiteren Schritte sind die umrahmten Fraktionen vereint worden (**Abb. 4.10** und **Abb. 7.2 b**).

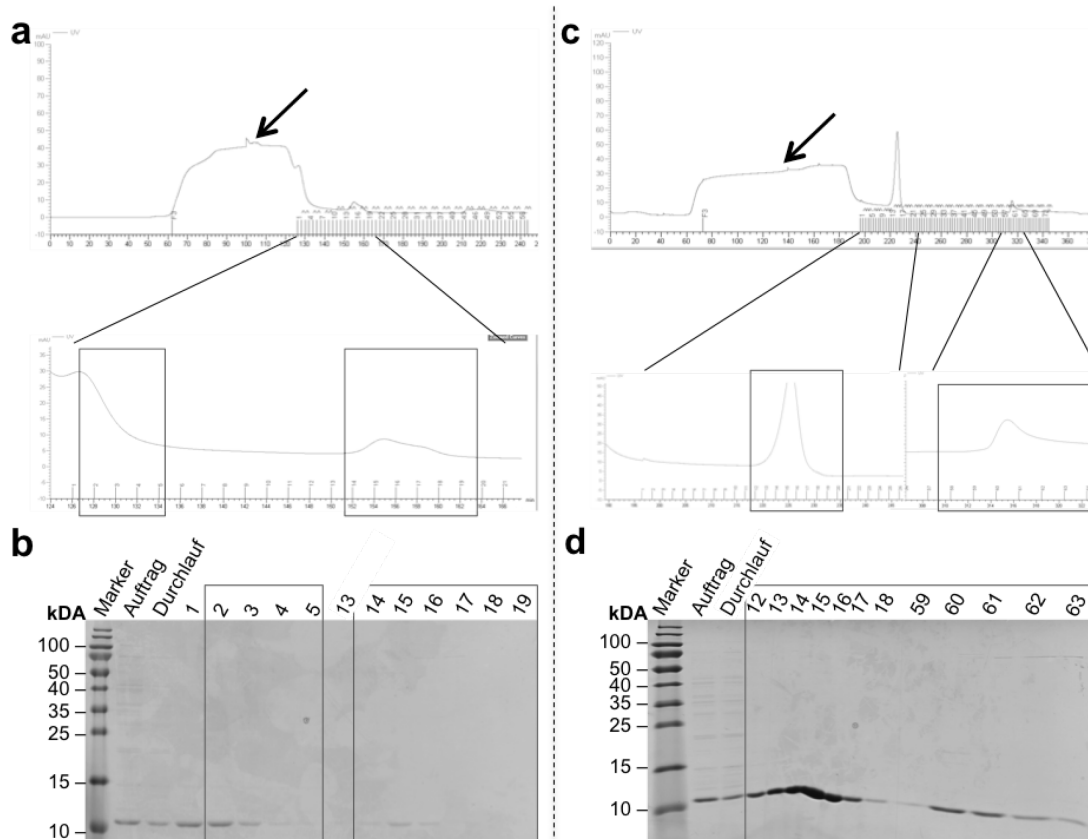


Abb. 4.9: HIC-Aufreinigung der Kalziumbindungs-Mutante N63A.

Gezeigt sind die Chromatogramme der HIC-Aufreinigung für die Kalziumbindungs-Mutante N63A bei einer Kalziumkonzentration von 50 mM (a) und 100 mM (c) sowie die zugehörigen Coomassie-Färbungen der denaturierenden PAGEs der angegebenen Fraktionen (50 mM (b); 100 mM (d)). S100A12 kann auf einer Laufhöhe von ~10 kDa detektiert werden. Die Pfeile markieren jeweils den Durchlauf. Die Fraktionen, die ausschließlich das Zielprotein enthalten, sind umrahmt.

Für die Kalziumbindungs-Doppelmutante N63/E72A ist ebenfalls mit einer Kalziumkonzentration von 100 mM begonnen worden. Das gesamte Protein befindet sich bei dieser Bedingung im Durchlauf (**Abb. 4.11 a**; Pfeil) und den ersten Fraktionen. Da diese jedoch nicht ausschließlich das Zielprotein enthalten (Daten nicht gezeigt), sind der Durchlauf und die Fraktionen 1-30 vereint, auf eine Kalziumkonzentration von 200 mM eingestellt und erneut auf die Säule geladen worden. Bei dieser Bedingung ist das gesamte Protein im Durchlauf zu detektieren (**Abb. 4.11 b**; Pfeil). Daher ist die Kalziumkonzentration weiter erhöht worden, diesmal auf 300 mM. Auch bei dieser hohen Salzkonzentration bindet die Doppelmutante nicht an die Säule und befindet sich komplett im Durchlauf (**Abb. 4.11 c**; Pfeil).

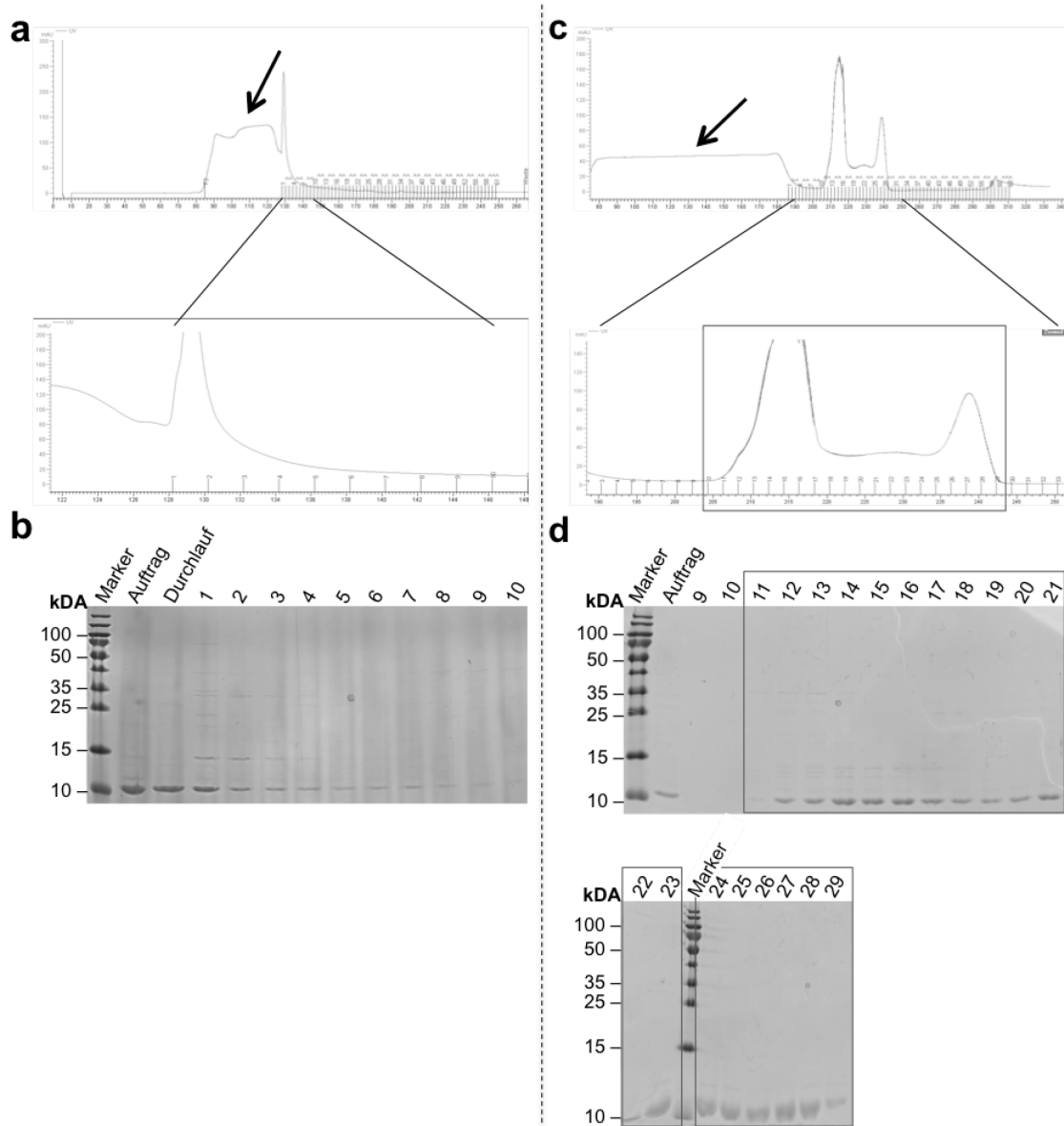


Abb. 4.10: HIC-Aufreinigung der Kalziumbindungs-Mutante E72A.

Dargestellt sind die Chromatogramme für die Aufreinigung der Kalziumbindungs-Mutante E72A bei einer Kalziumkonzentration von 100 mM (a) und 200 mM (c) und die zugehörigen Coomassie-Färbungen der denaturierenden PAGEs der angegebenen Fraktionen (100 mM (b), 200 mM (c)). S100A12 kann auf einer Laufhöhe von ~10 kDa detektiert werden. Die Pfeile markieren jeweils den Durchlauf. Fraktionen, die für die weiteren Versuche vereint worden sind, sind umrahmt.

Da für die Zinkbindungs-Mutanten ein anderes Bindungsverhalten angenommen worden ist als für die Kalziumbindungs-Mutanten, ist für das Protein H15A erneut mit einer Kalziumkonzentration von 25 mM begonnen worden. Das Protein fällt hier jedoch aus, weshalb im nächsten Schritt nur 5 mM Kalzium eingesetzt worden ist. Hier kann das Zielprotein erfolgreich eluiert werden (**Abb. 4.12**). Für den Durchlauf ist nur ein schwaches Signal in dem Chromatogramm zu erkennen (**Abb. 4.12 a**; Pfeil), was auf eine geringe Proteinkonzentration schließen lässt. Das Zielprotein befindet sich in den

Fraktionen zwischen dem ersten und zweiten Peak (~9-26) und in denen des zweiten und dritten Peaks (27-38) (**Abb. 4.12 b**; Banden bei ~10 kDa). Mit einer ausreichenden Reinheit liegt es jedoch nur in dem zweiten und dritten Peak vor. Alle Fraktionen, die ausschließlich S100A12 enthalten (**Abb. 4.12** und **Abb. 7.2 c**; umrahmte Bereiche) sind vereint und für die weiteren Schritte genutzt worden.

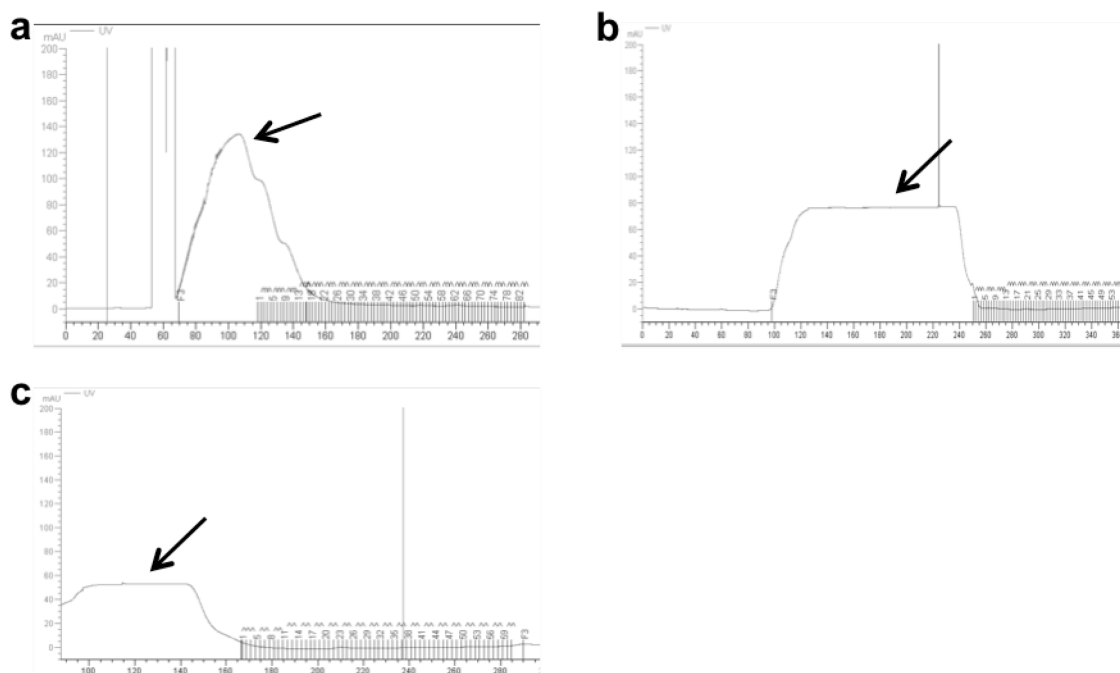


Abb. 4.11: HIC-Aufreinigung der Kalziumbindungs-Doppelmutante N63/E72A.

Dargestellt sind die Chromatogramme für die HIC-Aufreinigung der Kalziumbindungs-Doppelmutante N63/E72A bei einer Kalziumkonzentration von 100 mM (a), 200 mM (b) und 300 mM (c). Die Pfeile markieren jeweils den Durchlauf.

Für die Zinkbindungs-Mutante D25A ist mit einer Kalziumkonzentration von 5 mM gestartet worden. Das Zielprotein kann in dem einzigen Peak, der ungefähr den Fraktionen 1-25 entsprach, eluiert werden (**Abb. 4.13 a+b**; Bande bei ~10 kDa). Die Auftragung auf die denaturierende PAGE zeigt jedoch, dass hier auch noch andere Proteine vorhanden sind (**Abb. 4.13 b**). Der Durchlauf weist ebenfalls noch ein starkes Signal im Chromatogramm auf (**Abb. 4.13 a**; Pfeil), was auf eine hohe Proteinkonzentration zurückzuführen ist. Daher sind die Fraktionen und der Durchlauf vereint und auf eine Kalziumkonzentration von 10 mM eingestellt worden. Auch hier ist ein starkes Signal für den Durchlauf vorhanden (**Abb. 4.13 c**; Pfeil). Das Zielproteine kann allerdings bei dieser Bedingung in den Fraktionen 1-40 (**Abb. 4.13 d**) eluiert werden. Die umrahmten Fraktionen (**Abb. 4.13** und **Abb. 7.2 d**) sind für die weiteren Schritte vereint worden.

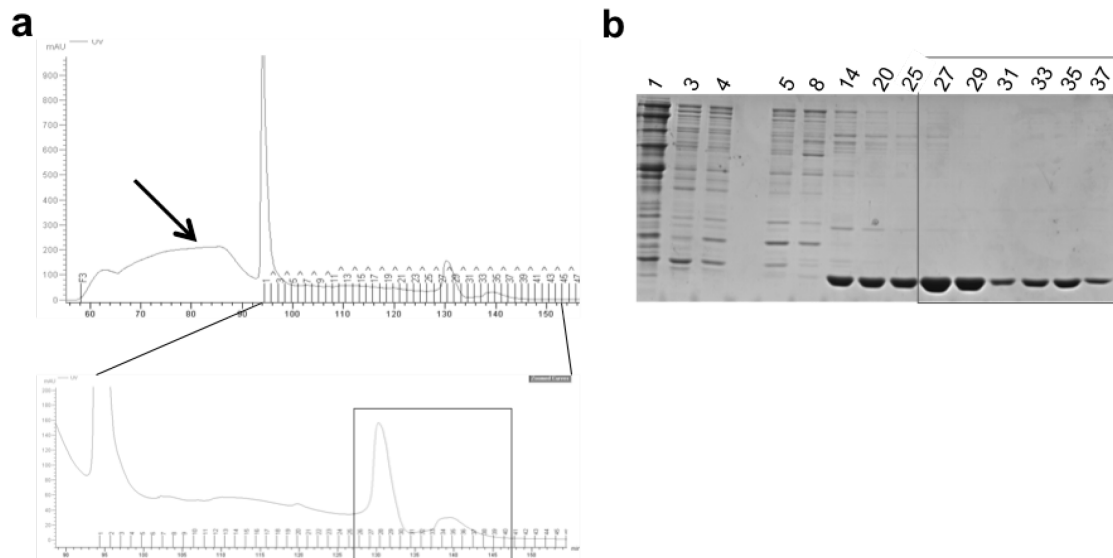


Abb. 4.12: HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante H15A.

Darstellung des Chromatogramms (a) und der zugehörigen Coomassie-Färbung einer denaturierenden PAGE der angegebenen Fraktionen (b) der Zinkbindungs-Mutante H15A. S100A12 kann bei einer Laufrhöhe von ~10 kDa detektiert werden. Der Pfeil markiert den Durchlauf. Die umrahmten Bereiche enthalten ausschließlich das Zielprotein.

Für die Kalziumbindungs-Mutante H85A ist mit der für D25A evaluierten Kalziumkonzentration von 10 mM begonnen worden. Hier konnte das Protein ohne weitere Verunreinigungen eluiert werden (**Abb. 14 a**). Da sich jedoch auch viel Protein im Durchlauf befindet (Daten nicht gezeigt) ist die Salzkonzentration auf 25 mM Kalzium angepasst worden. Das Chromatogramm zeigt weiterhin, dass auch Protein im Durchlauf vorhanden ist (**Abb. 4.14 c**; Pfeil), jedoch so wenig, dass es im Gel kaum sichtbar ist (**Abb. 4.14 c**). Zusätzlich ist im Chromatogramm ein Peak für die frühen Fraktionen (3-29) sowie ein Doppelpeak für die späteren Fraktionen (40-47) zu sehen (**Abb. 4.14 b**). In beiden kann das Zielprotein bei ~10 kDa detektiert werden (**Abb. 4.14 c**). Die umrahmten Fraktionen sind frei von anderen Proteinen und sind für die weiteren Arbeiten vereint worden.

Für die Zinkbindungs-Mutante H89A zeigt sich im Chromatogramm der HIC-Aufreinigung bei einer Kalziumkonzentration von 10 mM ein starkes Signal für den Durchlauf (**Abb. 4.15 a**; Pfeil), was für eine hohe Proteinkonzentration spricht, und ein Doppelpeak (**Abb. 4.15 a**). Die Fraktionen 25-35 des Doppelpeaks enthalten das Zielprotein ohne weitere Verunreinigungen durch andere Proteine (**Abb. 4.15 b**; umrahmte Bereiche).

Bei einer Kalziumkonzentration von 25 mM ist ebenfalls ein Doppelpeak im

Chromatogramm zu sehen (**Abb. 4.15 c**), in dem das Zielprotein detektiert werden konnte (**Abb. 4.15 d**). Für den Durchlauf ist kein Signal mehr zu detektieren (**Abb. 4.15 c**). Die umrahten Fraktionen sind für die weiteren Schritte vereint worden.

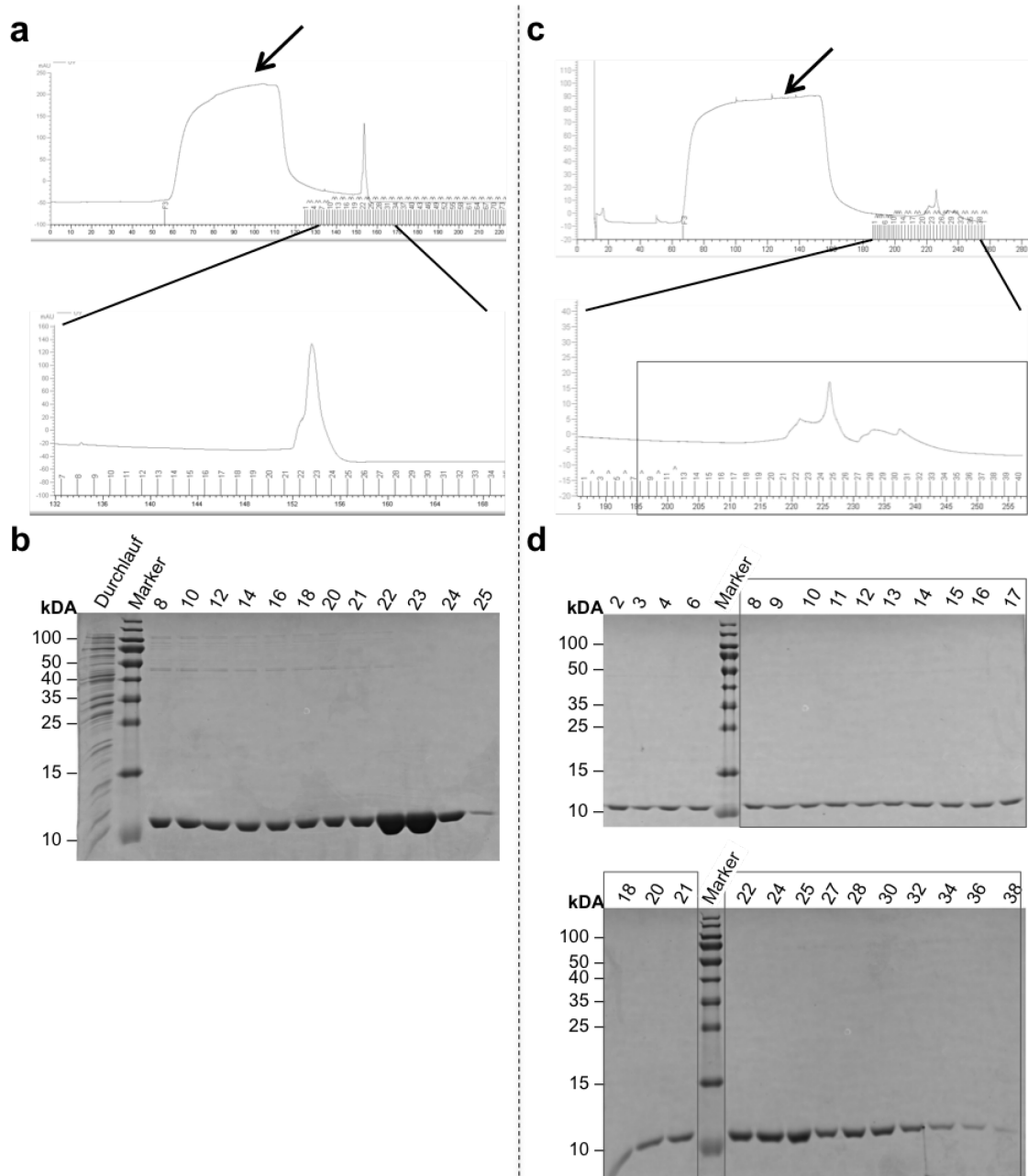


Abb. 4.13: HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante D25A.

Dargestellt sind die Chromatogramme für die HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante D25A bei 5 mM (a) und 10 mM Kalzium (c) sowie die zugehörigen Coomassie-Färbungen der denaturierenden PAGEs (5 mM (b), 10 mM (d)). S100A12 befindet sich auf einer Laufhöhe von ~10 kDa. Die Pfeile markieren jeweils den Durchlauf. Fraktionen, die keine Verunreinigungen durch andere Proteine enthalten, sind umraht.

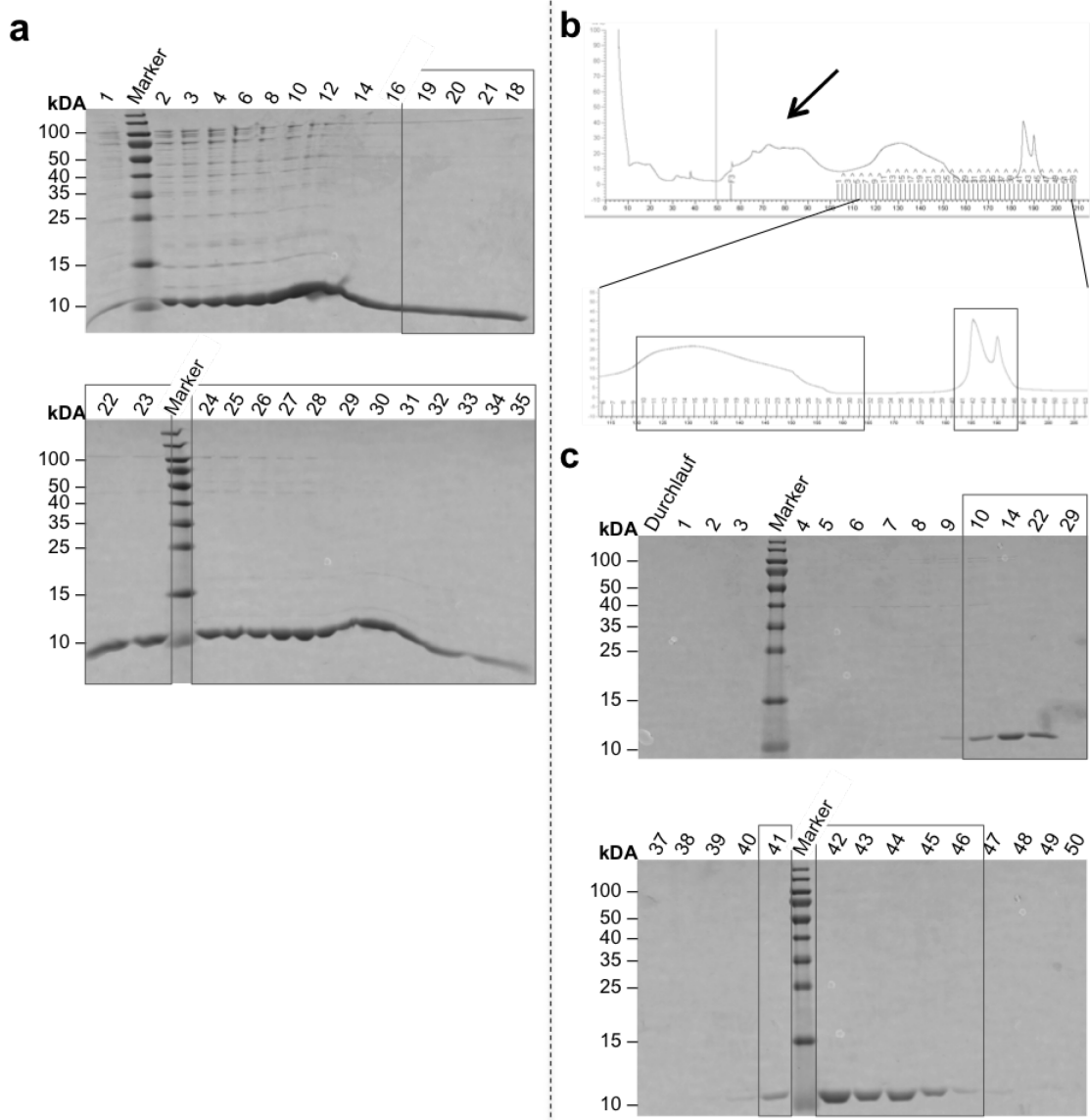


Abb. 4.14: HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante H85A.

Dargestellt sind die Coomassie-Färbungen von den denaturierenden PAGEs der HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante H85A bei einer Kalziumkonzentration von 10 mM (a) sowie das Chromatogramm (b) und die zugehörigen Coomassie-Färbungen der denaturierenden PAGEs der angegebenen Fraktionen für die Aufreinigung mit 25 mM Kalzium (c). S100A12 befindet sich auf einer Laufhöhe von ~10 kDa. Die Pfeile markieren jeweils den Durchlauf. Die umrahmten Fraktionen enthalten ausschließlich das Zielprotein und sind für die weiteren Schritte vereint worden.

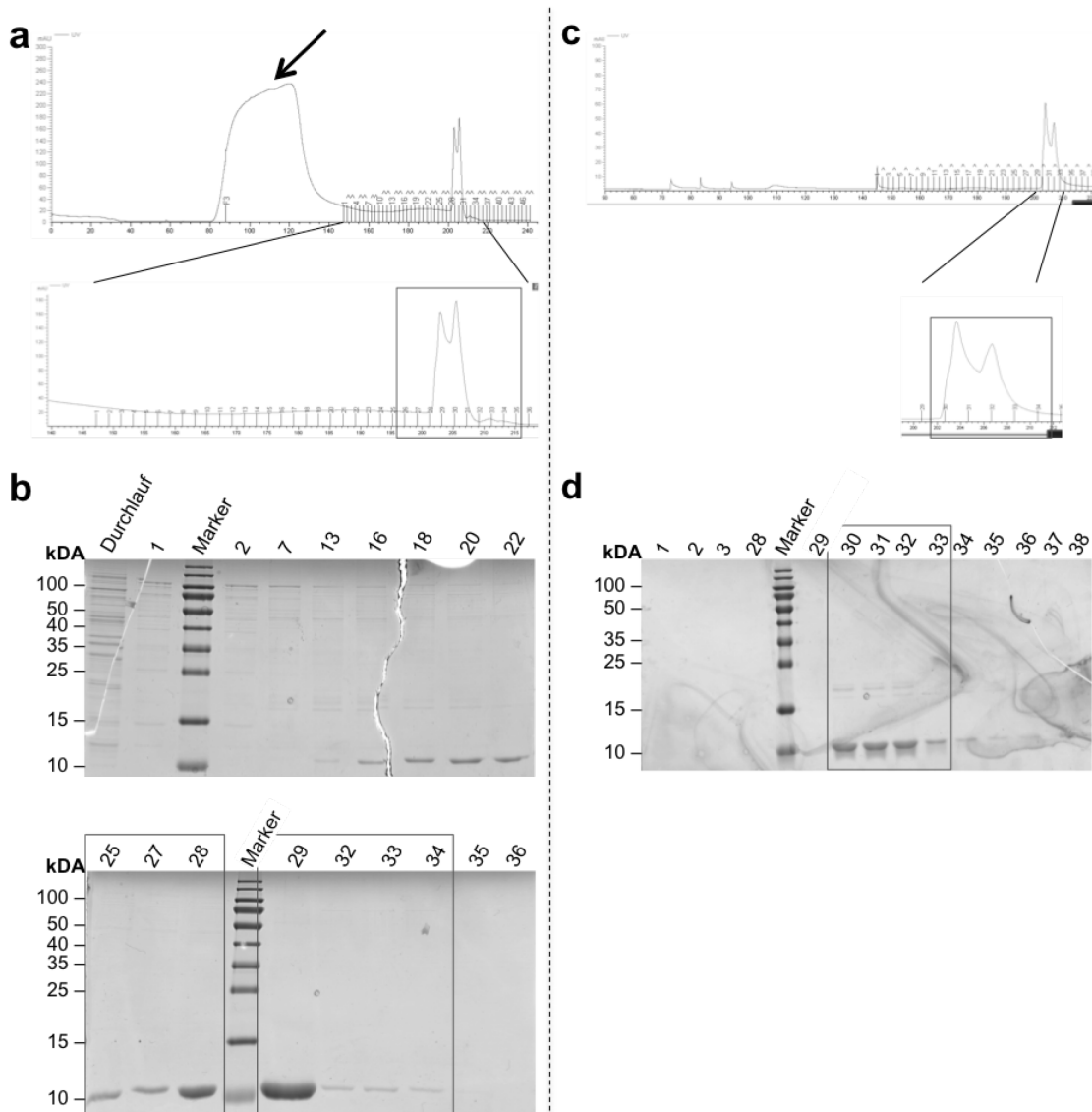


Abb. 4.15: HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante H89A.

Dargestellt sind die Chromatogramme der Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante H89A bei einer Kalziumkonzentration von 10 mM (a) sowie 25 mM (c) und die zugehörigen Coomassie-Färbungen der denaturierenden PAGEs (10 mM (b), 25 mM (d)). S100A12 befindet sich auf einer Laufhöhe von ~10 kDa. Der Pfeil markiert den Durchlauf. Fraktionen, die keine Verunreinigungen durch andere Proteine enthalten, sind umrahmt.

Um die Ausbeute zu erhöhen ist für alle Mutanten bei der jeweils effizientesten Kalziumkonzentration eine zweite Aufreinigung des Durchlaufs und eventuell noch verunreinigter Fraktionen durchgeführt worden (**Abb. 7.2**).

4.2.4.3. Entfernung von Endotoxinen

Wie andere Gram-negative Bakterien auch, enthält die Membran des hier genutzten *E. coli* Stamms LPS. Dieses fungiert in eukaryotischen Zellen als PAMP und aktiviert PRRs. Um für die Funktionsanalysen der hier aufgereinigten S100A12-Mutanten falsch positive Ergebnisse, die durch eine LPS-Kontamination verursacht werden können, möglichst auszuschließen, ist dieses mittels des Systems der EndoTrap entfernt worden. Anhand einer Standardkurve ist die LPS Kontamination der Proben in EU (*Endotoxin Unit*; 1 EU \equiv 0,1 ng LPS) ermittelt worden (**Tab. 4.1**). Die LPS-Konzentration lag vor der Aufreinigung Durchschnittlich bei 1280 EU/mL. Durch die EndoTrap konnte der LPS-Gehalt signifikant verringert werden.

Tab. 4.1: Auflistung der LPS-Konzentrationen der aufgereinigten S100A12-Mutanten nach der Entfernung des Endotoxins mittels EndoTrap.

S100A12	EU/mL	pg LPS / μ g Protein
H15A	63	6
D25A	109	11
N63A	13	1,3
E72A	29	5
H85A	17	1,7
H89A	130	13

4.2.4.4. Qualitätskontrolle der aufgereinigten Proteine

Nach Abschluss der Aufreinigung sind die Proteine in HBS dialysiert und mit *Amicon Ultra Centrifugal Filters* aufkonzentriert worden. Zur Bestätigung der Reinheit ist eine denaturierende PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung angefertigt (**Abb. 4.16 a**) und zusätzlich ein Westernblot (WB) mit einem S100A12-Antikörper gemacht worden (**Abb. 4.16 b**). Der Vergleich der durch Coomassie-Färbung und WB erhaltenen Banden bestätigt die Reinheit der Proteine. Es sind lediglich Banden bei ~10 und ~20 kDa zu detektieren, die S100A12- Monomere bzw. -Dimere repräsentieren.

Durch Vergleich der Banden von *E. coli* exprimierten Protein und solchem aus HEK293-Zellen zeigt sich, dass die Proteine in ihrer Fähigkeit, Komplexe zu bilden, identisch sind (**Abb. 4.17**).

Da davon ausgegangen wird, dass S100A12 keine posttranslationalen Modifizierungen aufweist und kein Unterschied in der Komplexbildung der unterschiedlich exprimierten Proteine gezeigt werden konnte (**Abb. 4.17**) und aufgrund eines besseren Kosten-Ausbeute-Verhältnisses, ist das bakterielle Expressionssystem bevorzugt worden.

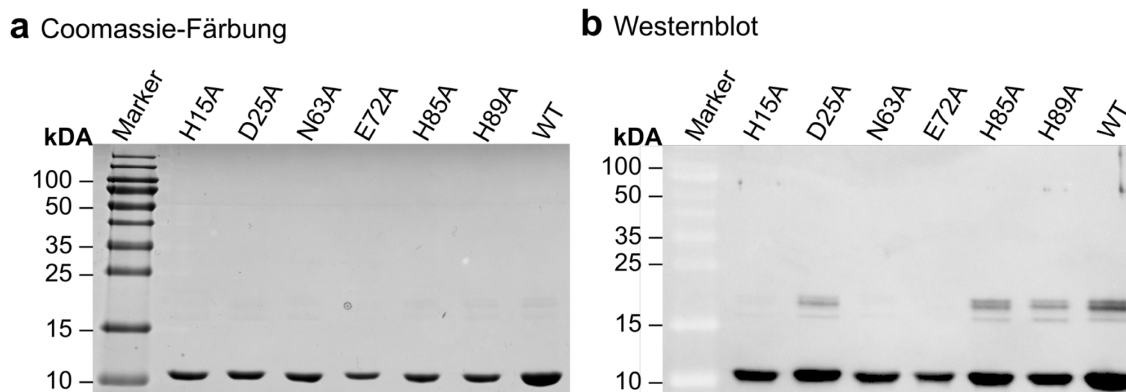


Abb. 4.16: Bestätigung der Reinheit der aufgereinigten Proteine.

Von den aufgereinigten Mutanten (H15A, D25A, N63A, E72A, H85A, H89A) und dem wtS100A12 (WT) ist eine denaturierende PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (a) bzw. ein WB mit α -A12 (b) angefertigt worden. Die S100A12-Proteine können jeweils bei etwa 10 kDa (Monomer) und 20 kDa (Dimer) detektiert werden.

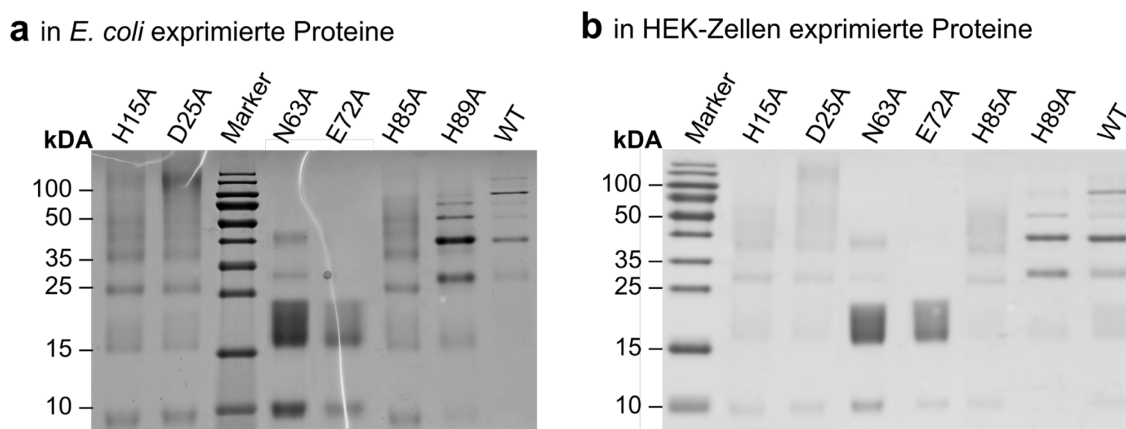


Abb. 4.17: Vergleich der Komplexmuster der S100A12-Proteine aus *E. coli* bzw. HEK293-Zellen.

Die aufgereinigten Mutanten (H15A, D25A, N63A, E72A, H85A, H89A) und das wtS100A12 (WT) sind unter extrazellulären Bedingungen (1,8 mM Ca + 30 μ M Zn) chemisch quervernetzt und auf eine semi-native PAGE aufgetragen worden. Anschließend ist von den in *E. coli* exprimierten Proteinen eine Coomassie-Färbung (a) und von den in HEK-Zellen exprimierten Proteinen ein WB (b) angefertigt worden. Die Gele zeigen identische Bandenmuster.

Für jedes Protein ist die Konzentration mittels Nanodrop bestimmt worden. Zusätzlich ist ein Spektrum zwischen 250 und 330 nm aufgenommen worden (**Abb. 4.18**). Proteine absorbieren bei einer Wellenlänge von 280 nm. Verunreinigungen durch Salze oder andere organische Stoffe zeigen sich in einem Wellenlängenbereich <260 nm oder >300 nm.

Die Kalziumbindungs-Mutante N63A (**Abb. 4.18 a**) zeigt ein typisches Absorptionsspektrum für Proteine mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm (vgl. **Abb. 3.1**). Für die zweite Kalziumbindungs-Mutante, E72A (**Abb. 4.18 b**), kann

ebenfalls ein für Proteine typisches Spektrum erhalten werden, jedoch kann eine leicht erhöhte Absorption <260 nm und >300 nm detektiert werden. Die Zinkbindungs-Mutanten H15A (**Abb. 4.18 c**), D25A (**Abb. 4.18 d**), H85A (**Abb. 4.18 e**) und H89A (**Abb. 4.18 f**) weisen alle ein für Proteine typisches Absorptionsspektrum auf.

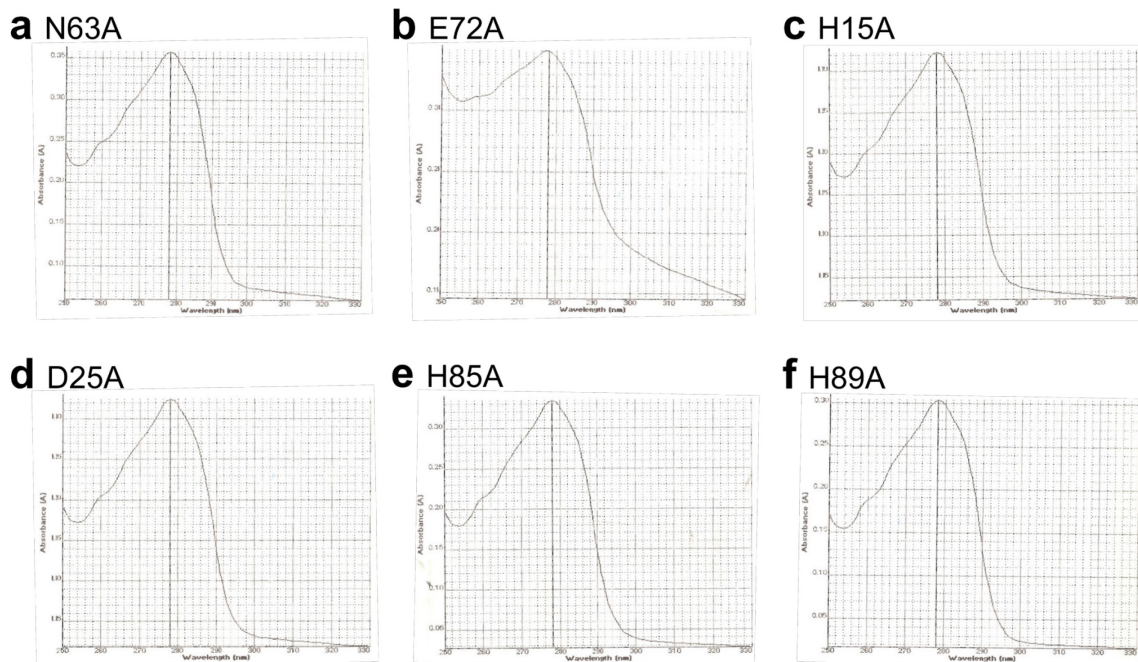


Abb. 4.18: UV-Spektren der S100A12-Mutanten.

Dargestellt sind die UV-Spektren zwischen 250 und 330 nm der aufgereinigten Kalziumbindungs-Mutanten N63A (a) und E72A (b) sowie die der Zinkbindungs-Mutanten H15A (c), D25A (d), H85A (e) und H89A (f).

Zusammenfassung Abschnitt 4.2:

Bei dem S100A12-Protein konnten jeweils die für die Kalzium- und Zink-Bindung erforderlichen AS durch Alanin substituiert werden. Die HIC-Aufreinigung der Proteine ist für jede Mutante einzeln angepasst worden, wobei sich die Kalziumbindungs-Doppelmutante unter keiner hier getesteten Bedingung aufreinigen ließ. Nach allen durchgeführten Aufreinigungsschritten sind die Proteine frei von Verunreinigungen und auch die LPS-Konzentration konnte signifikant verringert werden. Ein Vergleich der in *E. coli* bzw. HEK293-Zellen exprimierten Proteine zeigt keinen Unterschied in ihrer Fähigkeit, verschiedene Komplexe auszubilden.

4.3. Bindungsverhalten mono- und polyklonaler Antikörper

Ein Indiz für eine Veränderung der Proteinstruktur der S100A12-Mutanten ist das Bindungsverhalten verschiedener mono- und polyklonaler Antikörper (AK). Ändert sich die Konformation des Proteins durch die eingefügten Mutationen, können Peptidsequenzen, die von einem Wildtyp-spezifischen AK gebunden werden, partiell verdeckt oder verändert sein.

Es sind drei monoklonale und ein polyklonaler AK bezüglich ihres Bindungsverhaltens analysiert worden. Die monoklonalen AK sind spezifisch für die Erkennung spezieller Peptide des S100A12 Wildtyp-Proteins. In Vorversuchen wurden die AK auf ihre Bindung an einzelne Peptide des wtS100A12 getestet. Es zeigte sich, dass die AK Peptide in der EF1, EF2 und der *hinge*-Region binden (vgl. 3.1.9.1). In dieser Arbeit sind alle AK auf ihre Bindungseffizienz bezüglich des wtS100A12 und der Mutanten unter intrazellulären Bedingungen (0,2 μ M Ca + 1 nM Zn) (**Abb. 4.19**) und extrazellulären Bedingungen (1,8 mM Ca + 30 μ M Zn) (**Abb. 4.20**) überprüft worden. Hierzu sind die Proteine unter den spezifischen Ionenkonzentrationen chemisch quervernetzt worden, um sie auch während der Waschschrte stabil zu halten.

Die Titrationskurven für alle Proteine zeigen einen stetigen Abfall der Bindungseffizienz bei Verringerung der Proteinkonzentration. Allerdings kann ein großer Unterschied in der Bindungseffizienz der AK für die verschiedenen Mutanten gezeigt werden. Der polyklonale AK bindet das wtS100A12 unter intrazellulären Bedingungen am effektivsten (**Abb. 4.19 a+b**). Auch die Zinkbindungs-Mutante H89A wird von diesem AK noch gut erkannt (**Abb. 4.19 b**). Eine schwächere Bindung zeigt sich für die Zinkbindungs-Mutante D25A und die Kalziumbindungs-Mutanten N63A und E72A (**Abb. 4.19 a+b**). Am schwächsten wird die Zinkbindungs-Mutante H15A von dem polyklonalen AK gebunden (**Abb. 4.19 b**).

Der monoklonale AK E bindet bei einer Proteinkonzentration von 5 μ g/mL alle S100A12-Varianten in etwa gleich gut (**Abb. 4.19 c+d**). Dies ändert sich jedoch bei Verringerung der Proteinkonzentration. Hier werden die Zinkbindungs-Mutanten ähnlich gut gebunden wie das wtS100A12 (**Abb. 4.19 d**), die Kalziumbindungs-Mutanten jedoch deutlich schwächer (**Abb. 4.19 c**).

Für den monoklonalen AK H kann fast ausschließlich eine Bindung an das wtS100A12 und in geringem Maße an die Zinkbindungs-Mutante H89A detektiert werden (**Abb. 4.19 e+f**). Alle anderen Mutanten werden fast nicht gebunden.

Unter intrazellulären Bedingungen bindet der monoklonale AK K sowohl das wtS100A12 als auch die Kalziumbindungs-Mutanten (**Abb. 4.19 g**). Die Zinkbindungs-Mutante H89A wird ebenfalls gebunden, jedoch deutlich weniger effektiv (**Abb. 4.19 h**). Für alle anderen Mutanten (H15A, D25A, H85A) ist fast kein Signal zu detektieren.

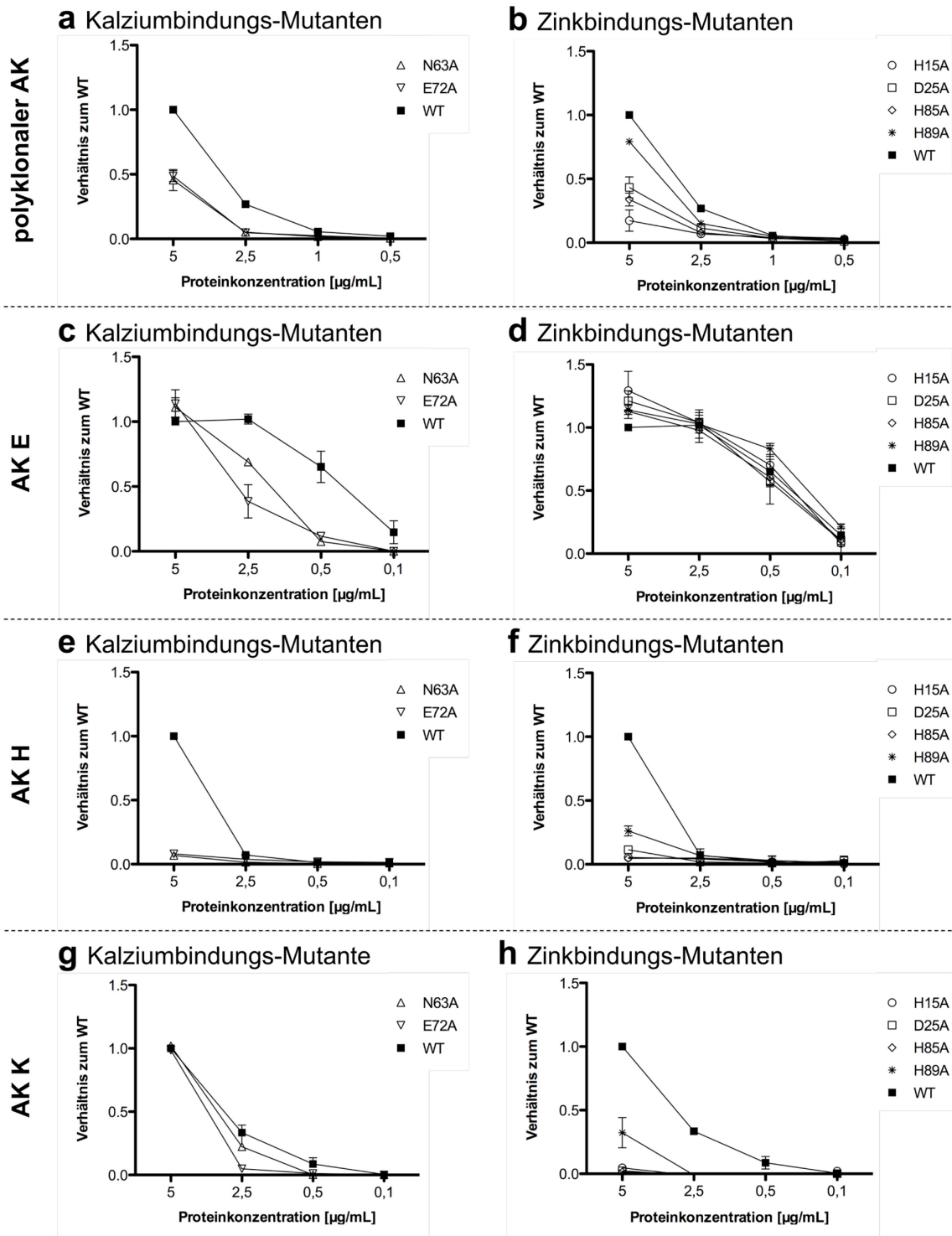


Abb. 4.19: Titrationskurven der Antikörperbindung an die S100A12-Proteine unter intrazellulären Bedingungen.

Dargestellt sind die Titrationskurven der Bindungseffizienzen unterschiedlicher AK. Die S100A12 Kalziumbindungs-Mutanten (a, c, e, g), Zinkbindungs-Mutanten (b, d, f, h) und das wtS100A12 (WT) sind unter intrazellulären Bedingungen chemisch quervernetzt worden, um die Komplexe während des ELISAs stabil zu halten. Die Bindungseffizienzen des polyklonalen S100A12-AK α -A12 (a+b) bzw. der monoklonalen AK E (c+d), H (e+f) und K (g+h) sind analysiert worden. Dargestellt ist die Bindungseffizienz in Abhängigkeit der Proteinkonzentration und im Vergleich zum wtS100A12. Die Bindungseffizienz der AK ist jeweils für den wtS100A12 bei einer Proteinkonzentration von 5 μ g/mL auf 1 gesetzt worden.

Unter Bedingungen, die bei dem wtS100A12 zu einer Hexamerisierung führen (1,8 mM Ca + 30 μ M Zn) bindet der polyklonale AK die Zinkbindungs-Mutanten D25A, H85A und H89A gleich gut wie das wtS100A12 (**Abb. 4.20 b**). Die Zinkbindungs-Mutante H15A und die Kalziumbindungs-Mutante E72A werden ebenfalls noch gut erkannt, jedoch schlechter als das wtS100A12 (**Abb. 4.20 a+b**). Anders als unter Dimer-Bedingungen wird die Kalziumbindungs-Mutante N63A am schlechtesten gebunden (**Abb. 4.20 a**). Für die Zinkbindungs-Mutanten D25A und H85A ist trotz gleich guter Bindung bei 5 μ g/mL Protein ein deutlich stärkerer Abfall der Titrationskurve mit abnehmender Proteinkonzentration zu sehen als bei dem wtS100A12.

Der AK E zeigt bereits bei einer Proteinkonzentration von 5 μ g/mL ein anderes Bindungsverhalten als unter intrazellulären Bedingungen (**Abb. 4.20 c+d**). Die Zinkbindungs-Mutanten H85A und H89A werden weiterhin annähernd gleich gut gebunden wie wtS100A12. Für die Zinkbindungs-Mutanten D25A und H15A zeigt sich eine etwas schlechtere Bindung (**Abb. 4.20 d**). Der Abfall der Titrationskurve ist jedoch erneut deutlich steiler als bei dem wtS100A12. Wie unter intrazellulären Bedingungen auch, werden die Kalziumbindungs-Mutanten am schlechtesten gebunden (**Abb. 4.20 c**).

Für den AK H zeigt sich, dass dieser unter extrazellulären Bedingungen die Zinkbindungs-Mutanten D25A und H89A sowie wtS100A12 am besten bindet (**Abb. 4.20 f**). Die Zinkbindungs-Mutanten H15A und H85A werden nur in etwa halb so gut gebunden. Die Bindung der Kalziumbindungs-Mutanten N63A und E72A ist kaum zu detektieren (**Abb. 4.20 e**).

Der AK K bindet alle Proteine gleich gut (**Abb. 4.20 g+h**), bis auf die Kalziumbindungs-Mutante N63A und die Zinkbindungs-Mutante H85A. Die Kalziumbindungs-Mutante wird nur halb so gut gebunden und die Zinkbindungs-Mutante wird fast gar nicht mehr gebunden.

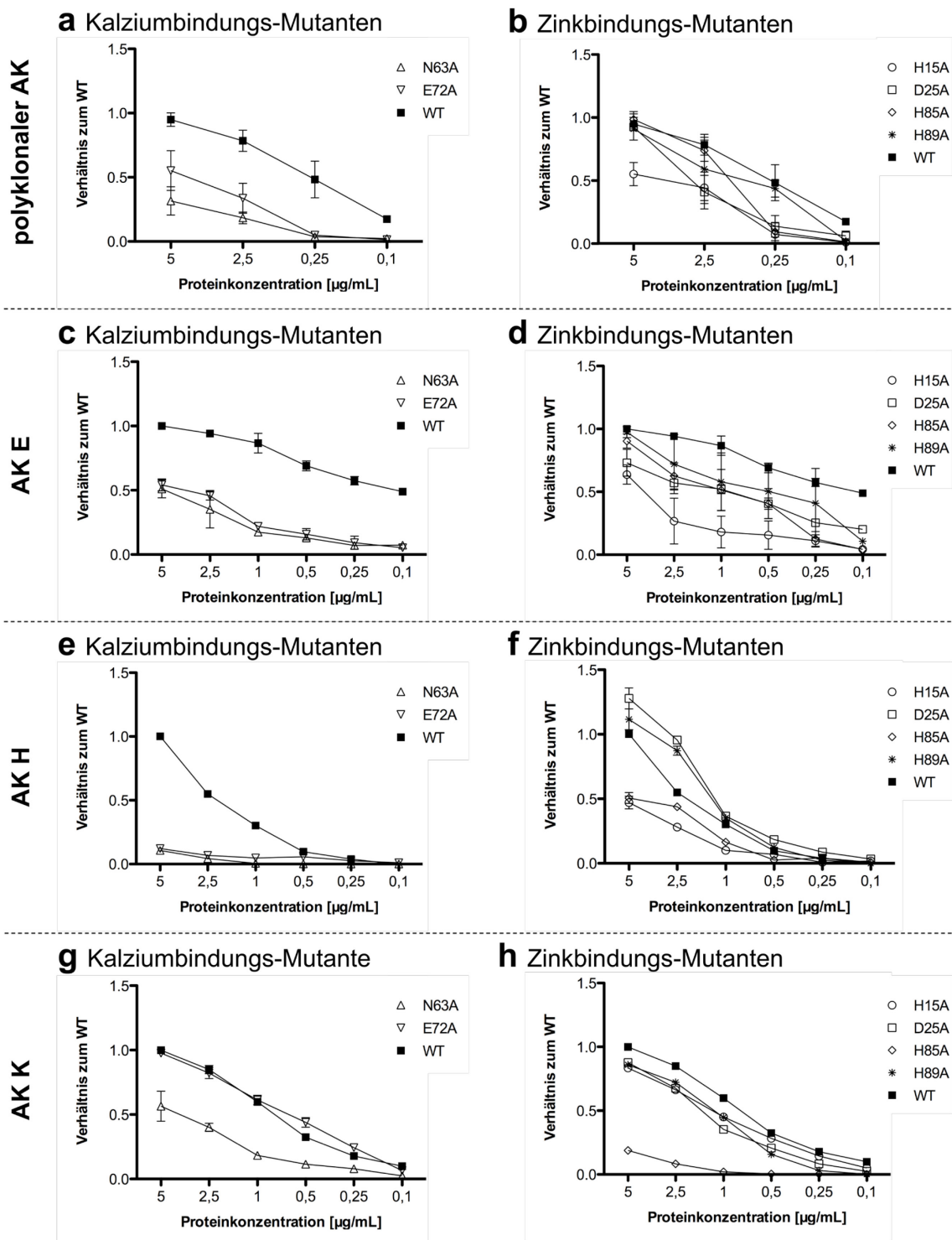


Abb. 4.20: Titrationskurven der Antikörperbindung an die S100A12-Proteine unter extrazellulären Bedingungen.

Die Bindung verschiedener AK an die S100A12 Kalziumbindungs-Mutanten (a, c, e, g) und Zinkbindungs-Mutanten (b, d, f, h) ist in Relation zum wtS100A12 (WT) im ELISA analysiert worden. Die Proteine sind unter extrazellulären Bedingungen (1,8 mM Ca + 30 µM Zn) chemisch quervernetzt worden, um die Komplexe während des ELISAs zu stabilisieren. Gezeigt sind die Titrationskurven mit abfallender Proteinkonzentration für den polyklonaler AK α-A12 (a+b) sowie den monoklonaler AK E (c+d), den monoklonalen AK H (e+f) und den monoklonalen AK K (g+h). Die Bindungseffizienz ist jeweils für wtS100A12 bei einer Proteinkonzentration von 5 µg/mL auf 1 gesetzt worden.

Zusammenfassung Abschnitt 4.3:

Anhand der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten können Rückschlüsse auf die Proteinstruktur gezogen werden. Sind die AK nicht mehr oder nur noch in geringerem Maße in der Lage, die Proteine zu binden, deutet dies auf eine veränderte Struktur hin, in der Epitope verändert oder verdeckt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Kalziumbindungs-Mutanten am stärksten von dem wtS100A12 unterscheiden. Sie werden unter allen Bedingungen am schlechtesten von den hier getesteten monoklonalen AK gebunden. Allerdings haben auch die Mutationen der Zink-Bindungsstellen einen Einfluss auf die AK-Bindung.

4.4. Analyse der Komplexbildung

Um den Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Komplexbildung der Proteine zu untersuchen, ist eine semi-native PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung gemacht worden. Da eine Abhängigkeit der Komplexbildung von Kalzium und Zink bereits bekannt ist, sind zur Analyse unterschiedliche Konzentrationen eines oder beider Ionen verwendet worden. Es sind sowohl physiologisch relevante Konzentration als auch solche, die einen größeren Konzentrationsbereich abdecken, genutzt worden. Unter physiologischen Bedingungen herrscht intrazellulär eine Kalziumkonzentration zwischen 0,1 und 0,2 μM und extrazellulär zwischen 1 und 3 mM sowie eine Zinkkonzentration von 0,2 bis 0,4 nM (intrazellulär) und 10 bis 50 μM (extrazellulär).

4.4.1. Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung von wtS100A12

Das wtS100A12 liegt bei allen Ionenkombinationen, außer bei 1,8 mM Ca + 1 μM , 6,5 μM bzw. 30 μM Zn, als Monomer, Dimer und Tetramer vor, jedoch mit jeweils unterschiedlichen Signalstärken (**Abb. 4.21**). Die Ionenkonzentrationen, bei denen keine Monomere und nur kaum bzw. keine Dimere auftreten (1,8 mM Ca + 100 nM, 1 μM , 6,5 μM bzw. 30 μM Zn), weisen eine zusätzliche Bande auf Höhe des Hexamers (~60 kDa) auf. Bei einer Ionenkonzentration von 70 μM Zn in Kombination mit 0,2 μM bzw. 1,8 mM Kalzium ist eine leichte Verschiebung in Richtung Hexamer zu erkennen. Für die physiologisch relevanten Bedingungen ist ein Densitogramm angefertigt worden. Dies zeigt für die intrazelluläre Ca- und Zn-Bedingung (schwarze Säulen) ein

Signal sowohl für das Monomer als auch Dimer. Unter extrazellulären Bedingungen (weiße Säulen) können hingegen keine Monomere und Dimere, dafür aber etwa gleich viele Tetramere und Hexamere detektiert werden.

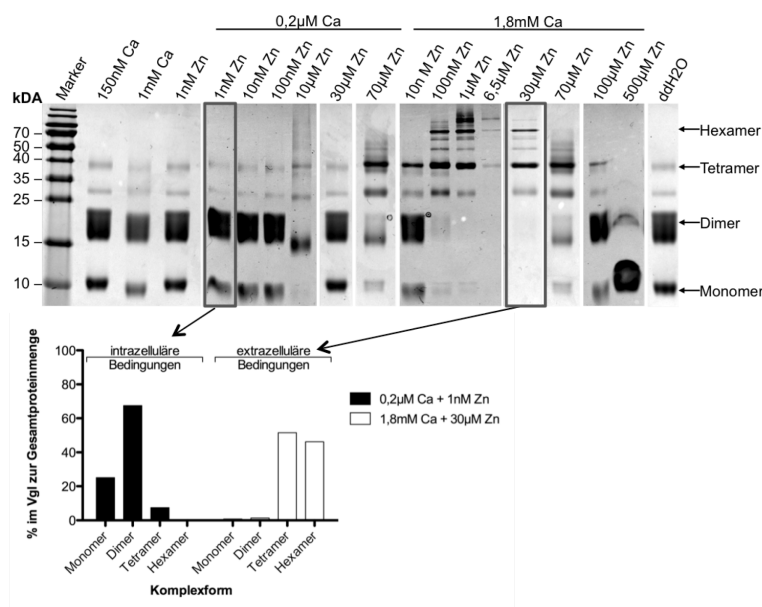


Abb. 4.21: Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung des wtS100A12.

Dargestellt ist sowohl die Coomassie-Färbung einer semi-nativen PAGE als auch das Densitogramm für wtS100A12 bei ausgewählten Kalzium- und Zinkkonzentrationen. Zur Stabilisierung der Komplexformen sind die Proteine vor dem Beladen des Gels unter den verschiedenen Ionenkonzentrationen chemisch quervernetzt worden. Die Komplexformen sind am Rand markiert. Das Densitogramm ist für eine intrazelluläre Ca- und Zn-Konzentration (schwarze Säulen) und extrazelluläre Bedingung (weiße Säulen) mit dem Programm ImageLab angefertigt worden. Dargestellt ist der Anteil der Monomere, Dimere, Tetramere und Hexamere an der gesamten Proteinmenge.

4.4.2. Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Kalziumbindungs-Mutanten

Das Einfügen der Mutationen in den Kalzium-Bindungsstellen führt zu einer deutlichen Verminderung der Tetra- und Hexamerisierung der Proteine (**Abb. 4.22**).

Die Kalziumbindungs-Mutante N63A (**Abb. 4.22 a**) weist bei jeder Ionenkombination sowohl das Monomer als auch Dimer auf. Einige Ionenkombinationen führen ebenfalls zu einer Tetramerisierung (0,2 μM Ca + 10 nM, 100 nM, 10 μM Zn bzw. alle Kombinationen mit 1,8 mM Ca). Bei 0,2 μM Ca + 100 nM Zn bzw. 10 μM und 1,8 mM Ca + 10 nM, 100 nM bzw. 1 μM Zn ist eine Verschiebung in Richtung Hexamer zu sehen. Das Densitogramm für intrazelluläre Ca- und Zn-Bedingungen (schwarze

Säulen) zeigt, dass hier nur Monomere und Dimere vorliegen. Unter extrazellulären Bedingungen (weiße Säulen) sind ebenfalls wenige Tetramere zu detektieren (~3 %) (vgl. **Tab. 7.2**). Hexamere liegen in beiden Fällen nicht vor.

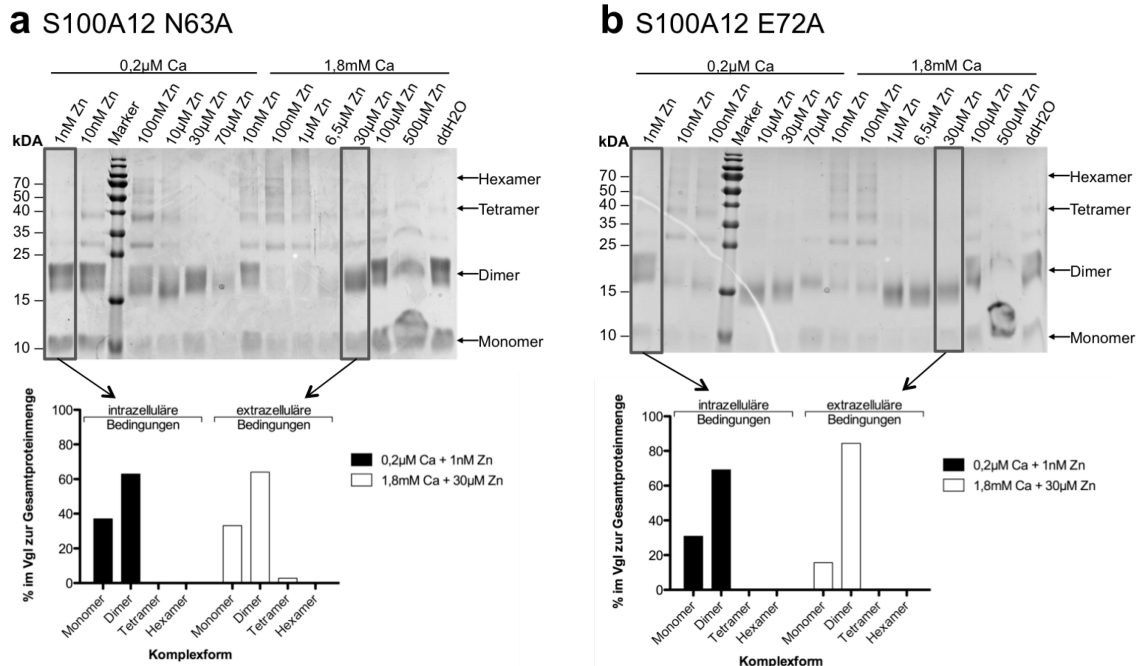


Abb. 4.22: Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Kalziumbindungs-Mutanten.

Dargestellt sind Coomassie-Färbungen semi-nativer PAGEs für die Kalziumbindungs-Mutanten N63A (a) und E72A (b) bei verschiedenen Ca- und Zn-Konzentrationen sowie die jeweiligen Densitogramme für intrazelluläre (schwarze Säulen) und extrazelluläre (weiße Säulen) Ionenkonzentrationen. Vor dem Beladen der Gele sind die Proteine, zur Stabilisierung der Komplexformen, unter den verschiedenen Ionenkonzentrationen chemisch quervernetzt worden. Die jeweiligen Komplexformen sind am Rand der Gele beschriftet. Die Densitogramme zeigen den Anteil der Monomere, Dimere, Tetramere und Hexamere an der Gesamtproteinmenge. Sie sind mit dem Programm ImageLab angefertigt worden.

Bei der Kalziumbindungs-Mutante E72A ist für die meisten Bedingungen lediglich das Monomer und Dimer sowie teilweise eine sehr geringe Menge Tetramer zu detektieren (**Abb. 4.22 b**). Für die Bedingungen mit 0,2 μM + 100 nM sowie bei 1,8 mM Ca + 10 nM und 100 nM Zn kann ebenfalls ein Übergang in Richtung Hexamer gezeigt werden. Das Densitogramm zeigt, dass unter intrazellulären Bedingungen (schwarze Säulen) ausschließlich Monomere und Dimere vorliegen. Unter extrazellulären Bedingungen (weiße Säulen) ist die Konzentration der Dimere deutlich höher als die der Monomere. Tetramere liegen ebenfalls nicht vor. Auch Hexamere können unter keiner der beiden Bedingungen detektiert werden.

4.4.3. Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Zinkbindungs-Mutanten

Die Mutante H15A ist weiterhin in der Lage Monomere und Dimere sowie teilweise auch Tetramere und Hexamere auszubilden, jedoch mit unterschiedlichen Anteilen (**Abb. 4.23 a**). Tetramere können nur unter Bedingungen mit 0,2 μM Ca + 100 nM Zn, 10 μM Zn und 30 μM Zn sowie 1,8 mM Ca + 10 nM, 100 nM, 1 μM , 6,5 μM und 30 μM Zn detektiert werden. Unter diesen Bedingungen ist ebenfalls eine Verschiebung Richtung Hexamer bzw. bei 1,8 mM Ca + 30 μM Zn eine Hexamerisierung zu erkennen. Die Komplexformen unter intrazellulären (schwarze Säulen) und extrazellulären (weiße Säulen) Bedingungen sind in dem Densitogramm detaillierter dargestellt. Unter intrazellulären Bindungen können hier Monomere und eine große Menge Dimere nachgewiesen werden. Tetramere und Hexamere liegen hingegen nicht vor. Unter extrazellulären Bedingungen sind alle Komplexformen vorhanden. Den größten Anteil machen hier jedoch auch die Monomere aus.

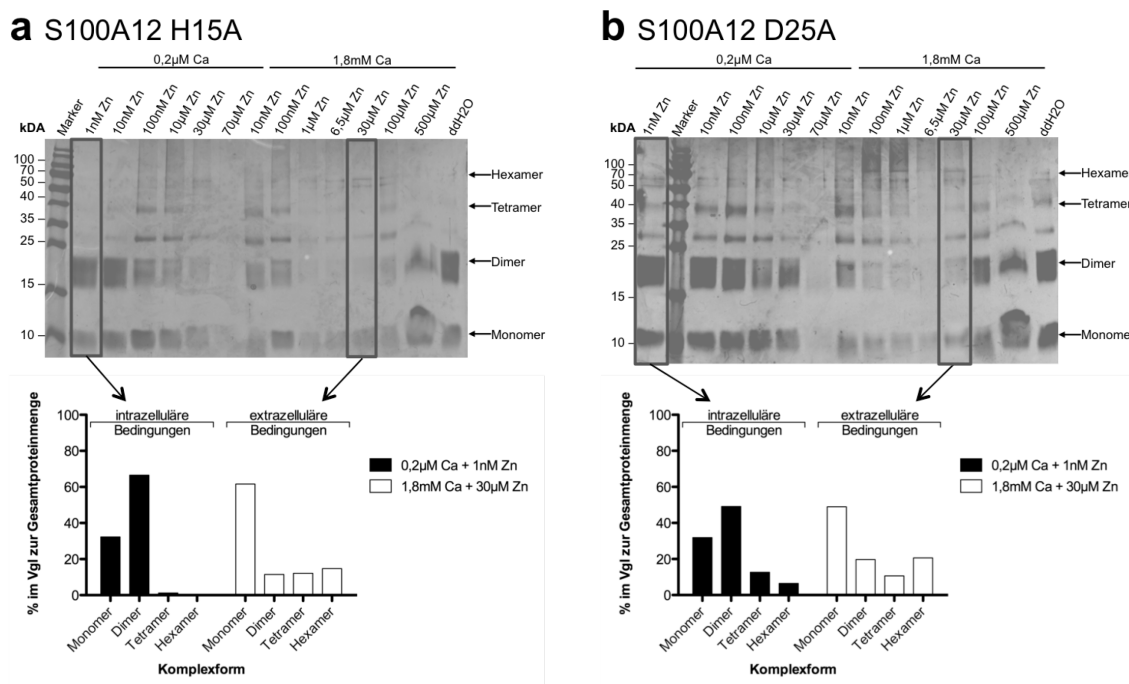


Abb. 4.23: Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Zinkbindungs-Mutanten H15A und D25A.

Die Komplexformen der Zinkbindungs-Mutanten H15A (a) und D25A (b) bei verschiedenen Kalzium- und Zinkkonzentrationen sind mittels Coomassie-Färbung einer semi-nativen PAGE und eines Densitogramms visualisiert worden. Zur Stabilisierung der Komplexe sind die Proteine unter den Ionenkonzentrationen chemisch quervernetzt worden. Die Laufhöhe der unterschiedlichen Komplexe ist am Rand angegeben. Die Densitogramme zeigen jeweils den Anteil der Komplexformen verglichen mit der Gesamtproteinmenge für intrazelluläre (schwarze Säulen) und extrazelluläre (weiße Säulen) Ca- und Zn-Bedingungen. Die Densitogramme sind mit dem Programm ImageLab angefertigt worden.

Für die Mutante D25A sind unter allen Bedingungen sowohl Monomere als auch Dimere und Tetramere zu detektieren (**Abb. 4.23 b**). Zusätzlich kann für fast alle Bedingungen das Hexamer oder ein Übergang in Richtung Hexamer gezeigt werden. Dies bestätigt sich ebenfalls in den Densitogrammen für die intrazellulären (schwarze Säulen) und extrazellulären (weiße Säulen) Ca- und Zn-Bedingungen. Für intrazelluläre Bedingungen sind jedoch deutlich mehr Monomere und Dimere als Tetramere und Hexamere zu detektieren. Hexamere sind am wenigsten vorhanden. Unter extrazellulären Bedingungen liegen ungefähr gleich viele Dimere und Hexamere vor. Tetramere sind etwa halb so viele vorhanden. Den größten Anteil haben hier jedoch weiterhin die Monomere.

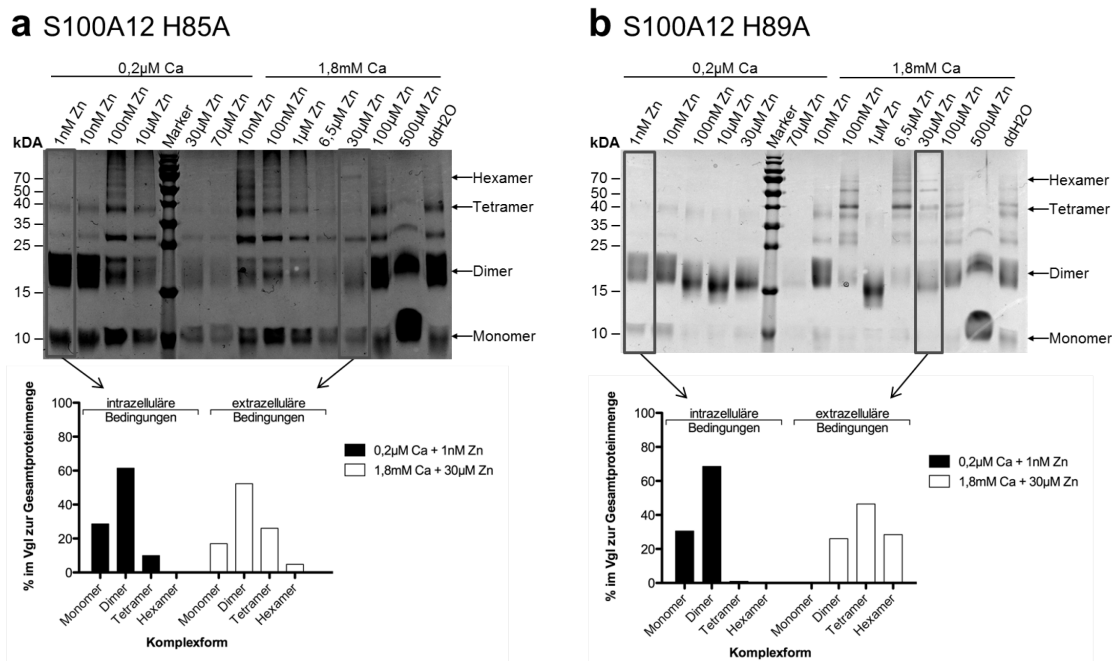


Abb. 4.24: Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Zinkbindungs-Mutanten H85A und H89A.

Zur Analyse der Komplexformen sind Coomassie-Färbungen von semi-nativen PAGEs der Zinkbindungs-Mutante H85A (a) und H89A (b) sowie zugehörige Densitogramme angefertigt worden. Die Proteine sind vor dem Auftrag auf das Gel unter den angegebenen Ca- und Zn-Konzentrationen chemisch quervernetzt worden, um die Komplexe während der Versuchsdurchführung zu stabilisieren. Die verschiedenen Komplexformen der Proteine sind am Rand angegeben. Die Densitogramme zeigen die Bandenintensitäten bei intrazellulären (schwarze Säulen) und extrazellulären (weiße Säulen) Ca- und Zn-Konzentrationen als Anteil der Gesamtproteinmenge. Sie sind mit dem Programm ImageLab angefertigt worden.

Die Zinkbindungs-Mutante H85A ist unter fast allen Bedingungen weiterhin in der Lage sowohl Dimere als auch Tetramere zu bilden (**Abb. 4.24 a**). Eine Verschiebung Richtung Hexamere ist bei den Bedingungen mit 0,2 μM Ca + 100 nM bzw. 10 μM Zn

und 1,8 mM Ca + 10 nM, 100 nM, 1 μ M und 6,5 μ M Zn zu erkennen. Das Densitogramm für die intrazellulären (schwarze Säulen) und extrazellulären (weiße Säulen) Kalzium- und Zink-Bedingungen stellt dar, dass die Komplexbildung ähnlich dem wtS100A12 ist und unter intrazellulären Bedingungen nur wenige Tetramere und keine Hexamere vorkommen. Unter extrazellulären Bedingungen können jedoch alle S100A12-Formen detektiert werden. Der Hauptanteil besteht hier, im Gegensatz zum wtS100A12, aus Dimeren gefolgt von Tetrameren und Monomeren. Hexamere liegen nur zu einem sehr geringen Anteil vor.

Die Coomassie-Färbung für die Zinkbindungs-Mutante H89A (**Abb. 4.24 b**) zeigt, dass diese Mutante überwiegend Dimere und nur wenige Monomere, Tetramere oder Hexamere ausbildet. Bei Konzentrationen von 1,8 mM Ca + 100 nM Zn, 6,5 μ M Zn und 30 μ M Zn liegen kaum noch Dimere, dafür aber Tetramere und Hexamere vor. In dem Densitogramm für diese Mutante ist zu erkennen, dass unter intrazellulären Bedingungen (schwarze Säulen) keine Tetramere oder Hexamere vorliegen. Den Hauptanteil machen die Dimere aus. Unter extrazellulären Bedingungen (weiße Säulen) sind sowohl Dimere, Tetramere als auch Hexamere, aber keine Monomere zu detektieren. Das Muster ist hier, bis auf das Vorkommen von Dimeren, dem des wtS100A12 am ähnlichsten.

Zusammenfassung Abschnitt 4.4:

Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Kalzium- und Zink-bindenden AS unterschiedliche Einflüsse auf die Komplexbildung der Mutanten hat. Eine Substitution der Kalzium-bindenden AS inhibiert die Ausbildung von Tetrameren und Hexameren unter physiologisch relevanten Bedingungen. Die Dimerisierung kann jedoch auch in Abwesenheit von Kalzium und Zink stattfinden. Zur Ausbildung höherer Komplexe ist jedoch die Bindung von Kalzium essentiell. Ein anderes Bild zeigt sich für die Bindung von Zink. Der Ersatz Zink-bindender AS führt zwar zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Dimere, die Ausbildung von Tetrameren und Hexameren bleibt aber dennoch möglich. Der Einfluss der Zink-Bindung scheint demnach geringer zu sein und die Ausbildung höherer Komplexe ist auch nach Substitution einer der beteiligten AS weiterhin möglich. Die Mutante D25A liegt sogar unter intrazellulären Bedingungen

als Hexamer vor, was bei keiner anderen Mutante oder dem wtS100A12 der Fall ist.

Die Analyse der Komplexbildung von wtS100A12 zeigt, dass Hexamere nur in Anwesenheit beider Ionen ausgebildet werden.

4.5. Funktionelle Analysen der S100A12-Mutanten

Über die Kalzium- und Zink-abhängige Komplexbildung der S100-Proteine scheint eine Aktivierung verschiedener Rezeptoren reguliert zu werden (Moroz *et al.*, 2002; Novitskaya *et al.*, 2000; Ostendorp *et al.*, 2007). Für S100A12 wird dies ebenfalls angenommen (Moroz *et al.*, 2002). In dieser Arbeit ist zunächst das Bindungsverhalten des wtS100A12 an die Rezeptoren TLR-4 und RAGE unter verschiedenen Kalzium- und Zinkkonzentrationen und damit von verschiedenen S100A12-Komplexen untersucht worden. Anschließend sind Bindungsanalysen mit den mutierten S100A12-Proteinen durchgeführt worden. Zusätzlich ist die Fähigkeit der Mutanten, HEK293/TCM- und THP1-Zellen zu stimulieren, analysiert worden.

4.5.1. Das S100A12-Hexamer zeigt die effektivste Bindung an TLR-4 und RAGE

Bisher ist nicht abschließend geklärt, welche S100A12-Komplexform an TLR-4 bindet und die Signaltransduktion initiiert. Durch spezifische Ionenbedingungen sind daher zunächst verschiedene Komplexformen des wtS100A12 auf ihre Interaktion mit TLR-4 hin getestet worden (**Abb. 4.25 a**). Die Bindung an RAGE ist zusätzlich als Kontrolle analysiert worden (**Abb. 4.25 b**). Hier wird angenommen, dass Hexamere für die Bindung benötigt werden (Srikrishna *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2007). Zur Analyse der RAGE-Bindung ist die lösliche Form des Rezeptors (sRAGE) genutzt worden. Die für die Bindung von Liganden essentiellen Bereiche sind hier ebenso vorhanden, wie bei dem membrangebundenen Rezeptor (Leclerc *et al.*, 2007; Raucci *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2008). Lediglich die Membrandomäne und der intrazelluläre Teil fehlen (Raucci *et al.*, 2008). Es sind Kalzium- und Zinkkonzentrationen ausgewählt worden, unter denen das Protein vorwiegend als Dimer (0,2 μM Ca + 1 nM Zn), Tetramer (0,2 μM Ca + 70 μM Zn) oder Hexamer vorliegt (1,8 mM Ca + 30 μM Zn). Unter diesen Bedingungen ist wtS100A12 inkubiert und zur Stabilisierung chemisch quervernetzt worden.

Die Bindung an TLR-4 und sRAGE ist für das Hexamer am besten (**Abb. 4.25; 1,8 mM Ca + 30 μM Zn**). Allerdings kann ebenfalls eine Bindung von Dimeren (**Abb. 4.25; 0,2 μM Ca + 70 μM Zn**) und Tetrameren (**Abb. 4.25; 0,2 μM Ca + 1 nM Zn**) an die Rezeptoren nachgewiesen werden. Es zeigt sich eine ansteigende Bindungseffizienz je höher der Grad der Oligomerisierung ist.

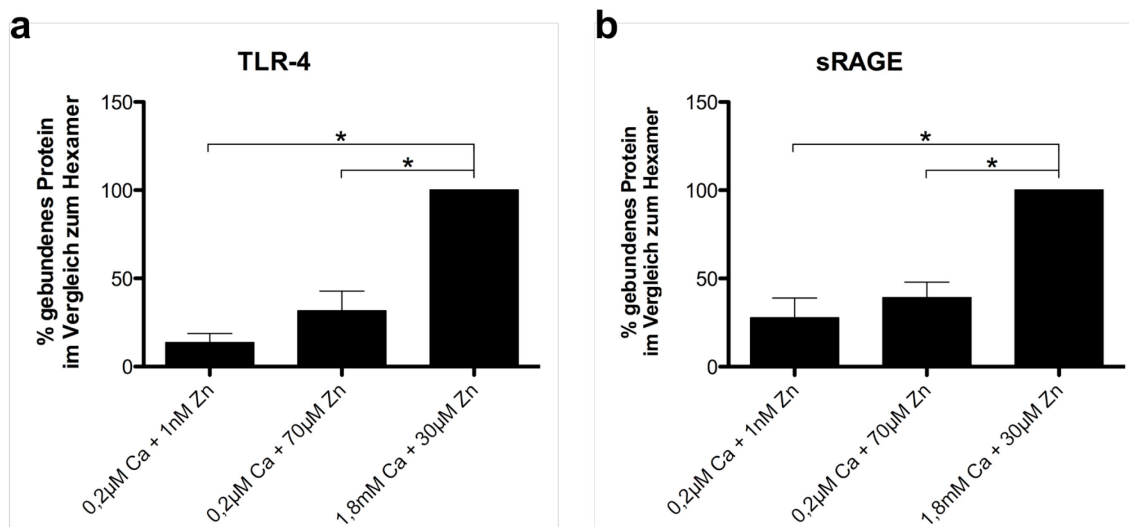


Abb. 4.25: Rezeptorbindung von wtS100A12 unter verschiedenen Ionen-Bedingungen.

Zur Analyse der Bindungseffizienz unterschiedlicher Komplexformen des wtS100A12 ist dies zunächst unter Bedingungen, unter denen vornehmlich Dimere (0,2 μM Ca + 1 nM Zn), Tetramere (0,2 μM Ca + 70 μM Zn) bzw. Hexamere (1,8 mM Ca + 30 μM Zn) vorliegen, inkubiert und chemisch quervernetzt worden. Anschließend ist es zu zuvor auf einer ELISA Platte immobilisierten TLR-4 (a) bzw. sRAGE (b) gegeben und mittels des AKs α-A12-bio detektiert worden. Aufgetragen ist das Verhältnis an gebundenem Protein im Vergleich zum Hexamer.

* = $p \leq 0,05$

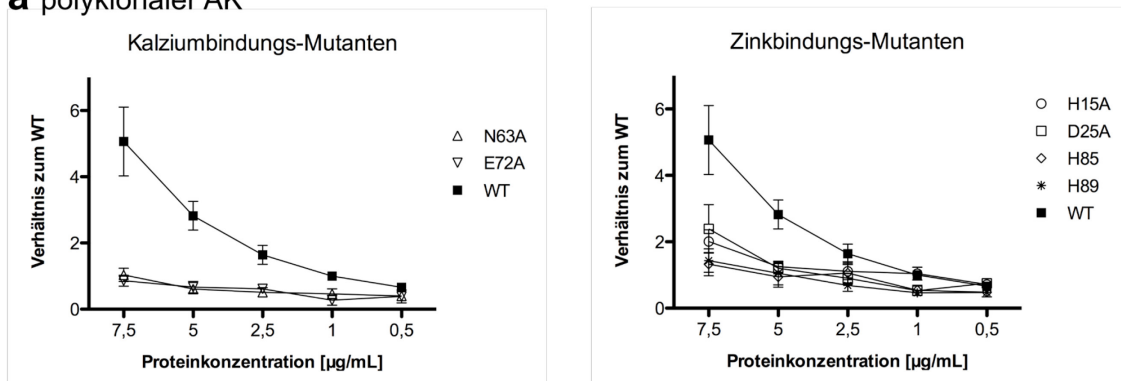
4.5.2. Analyse der Protein-TLR-4-Interaktion im ELISA

Nachdem bekannt war, dass wtS100A12 die stärkste Interaktion mit den Rezeptoren unter extrazellulären Bedingungen (1,8 mM Ca + 30 μM Zn) aufweist, sind diese ebenfalls für die Analyse der Protein-Rezeptor-Interaktion der Mutanten genutzt worden. Gebundenes Protein ist sowohl mit dem polyklonalen (**Abb. 4.26 a**) als auch mit zwei monoklonalen AK (AK E, AK 3G1D5-bio) detektiert worden. Um einen Effekt der Bindungseffizienz der AK auszuschließen, sind zum einem Titrations mit sinkender Proteinkonzentration angefertigt (**Abb. 4.26 a**) und zum anderen die erhaltenen Ergebnisse aller AK gemittelt worden (**Abb. 4.26 b**).

Die Titrationskurven fallen kontinuierlich mit sinkender Proteinkonzentration ab. Weiterhin zeigen die Daten, dass wtS100A12 die stärkste Interaktion aufweist (**Abb. 4.26 a+b**). Die Bindung der Zinkbindungs-Mutanten ist sowohl bei der Analyse mit dem polyklonalen AK (**Abb. 4.26 a**) als auch der Mittelung aller AK (**Abb. 4.26 b**) besser als die Bindung der Kalziumbindungs-Mutanten. Diese werden nur sehr schlecht gebunden, weisen aber dennoch einen leichten Titrations-Effekt auf.

Die Mittelung der erhaltenen Ergebnisse für die unterschiedlichen AK (**Abb. 4.26 b**), zeigt das gleiche Bild wie die Analyse mit dem polyklonalen AK. Die Bindung der Zinkbindungs-Mutanten ist generell besser als die der Kalziumbindungs-Mutanten. Insgesamt sind die Bindungen aller Mutanten signifikant schlechter als die des wtS100A12.

a polyklonaler AK



b mono- + polyklonaler AK

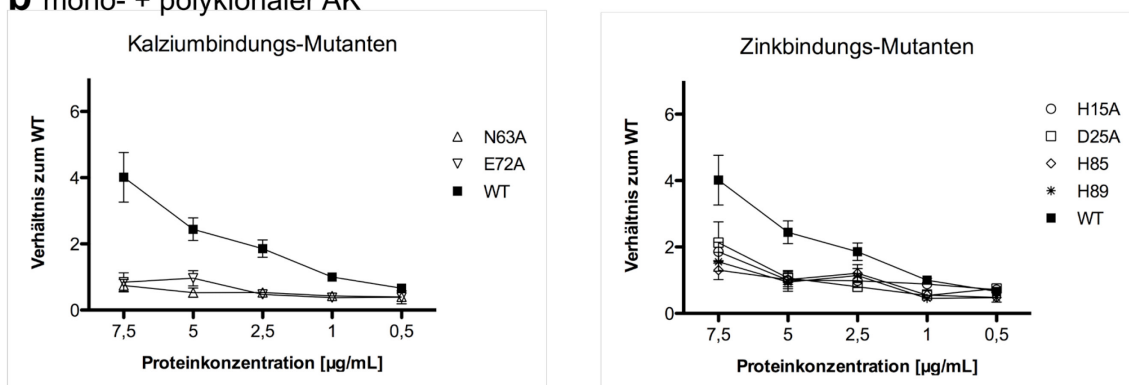


Abb. 4.26: Analyse der TLR-4-Bindung verschiedener S100A12-Proteine.

Mittels eines ELISA ist die Bindung der S100A12 Zinkbindungs-Mutanten (H15A, D25A, H85A, H89A), Kalziumbindungs-Mutanten (N63A, E72A) und des wtS100A12 (WT) an TLR-4 analysiert worden. Die Proteine sind unter extrazellulären Bedingungen (1,8 mM Ca + 30 µM Zn) chemisch quervernetzt worden, um ihre Stabilität während der weiterführenden Versuche zu garantieren, und anschließend zu dem zuvor immobilisierten Rezeptor gegeben worden. Die Detektion erfolgte mit dem AK α -A12-bio (a). Des Weiteren sind ELISA mit dem monoklonalen AK E und dem AK 3G1D5-bio durchgeführt worden. Die Ergebnisse aller AK sind gemittelt worden und sind in (b) dargestellt. Die Bindungseffizienz des wtS100A12 ist bei einer Proteinkonzentration von 1 µg/mL auf 1 gesetzt worden.

4.5.3. Analyse der Protein-RAGE-Interaktion im ELISA

Ebenso wie die Rezeptorbindung der einzelnen Proteine für TLR-4 getestet worden ist, ist auch für RAGE verfahren worden. Wie bei den vorangegangenen Analysen bezüglich der RAGE-Bindung ist auch hier sRAGE genutzt worden. Die Ergebnisse der Protein-Rezeptor-Bindung mit dem polyklonalen AK zeigen die stärkste Bindung für das wtS100A12 und die Zinkbindungs-Mutante D25A (**Abb. 4.27 a**).

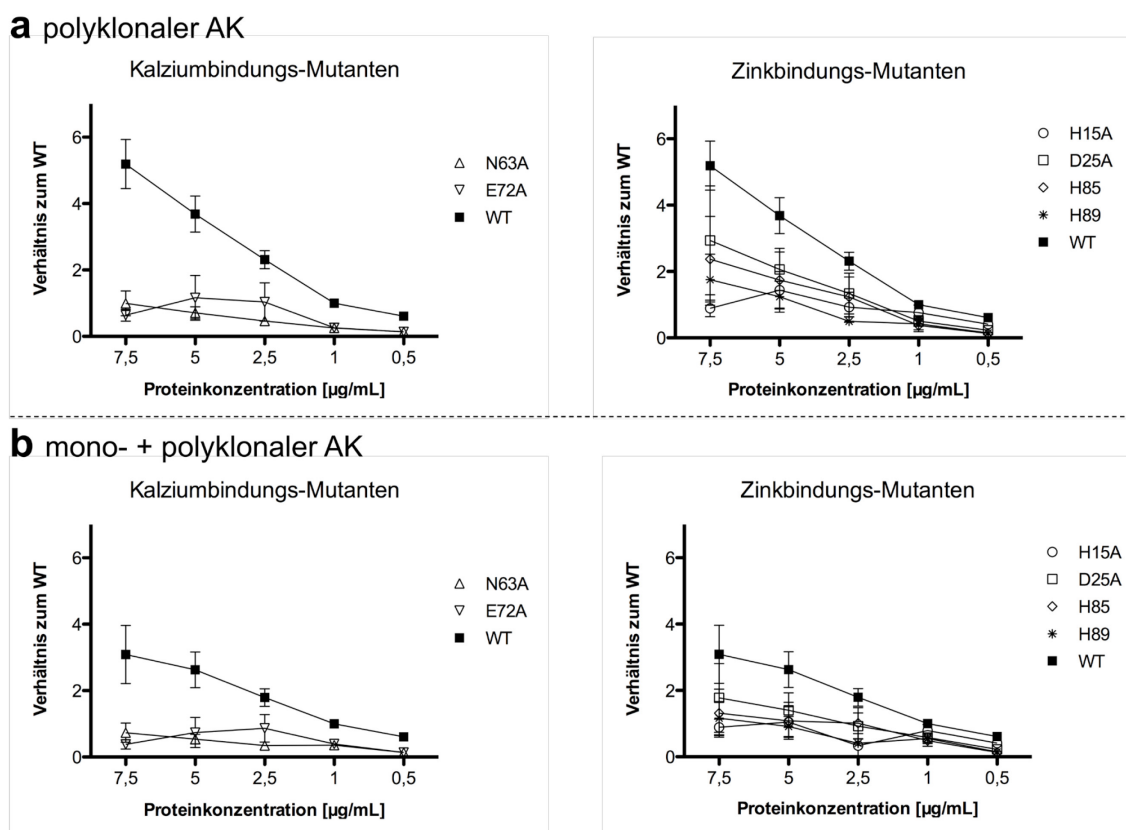


Abb. 4.27: Analyse der sRAGE-Bindung verschiedener S100A12-Proteine.

Mittels eines ELISA ist die Bindung der S100A12 Zinkbindungs-Mutanten (H15A, D25A, H85A, H89A), Kalziumbindungs-Mutanten (N63A, E72A) und des wtS100A12 (WT) an sRAGE analysiert worden. Die Proteine sind unter extrazellulären Bedingungen (1,8 mM Ca + 30 µM Zn) chemisch quervernetzt und anschließend zu dem zuvor immobilisierten Rezeptor gegeben worden. Die Detektion erfolgte mit dem polyklonalen AK α -A12-bio (a) bzw. den monoklonalen AK E und AK 3G1D5-bio. Die Ergebnisse aller AK sind gemittelt worden und sind in (b) dargestellt. Die Bindungseffizienz des wtS100A12 ist bei einer Proteinkonzentration von 1 µg/mL auf 1 gesetzt worden.

Auch die Zinkbindungs-Mutanten H15A, H85A und H89A binden den Rezeptor, jedoch schwächer. Am schwächsten ist erneut die Bindung der Kalziumbindungs-Mutanten N63A und E72A. Die Titrationskurven zeigen für alle Proteine einen Abfall bei sinkender Proteinkonzentration.

Bei der Mittelung über die verschiedenen AK fällt auf, dass die Signale für wtS100A12 und die Zinkbindungs-Mutanten deutlich schwächer sind, als bei dem polyklonalen AK (**Abb. 4.27 b**). Allerdings ist weiterhin die Tendenz zu erkennen, dass die Zinkbindungs-Mutanten besser binden als die Kalziumbindungs-Mutanten.

4.5.4. TLR-4 vermittelte Stimulation von HEK293/TCM-Zellen

Zur Funktionsanalyse der S100A12-Mutanten sind HEK293/TCM-Zellen stimuliert und die Regulation der IL-8 Produktion ist betrachtet worden. HEK293/TCM-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen (HEK293) die TLR-4, CD14 und MD2 exprimieren. Normal exprimieren HEK293-Zellen endogen ausschließlich TLR-1, TLR-3, TLR-5, und TLR-6. Die Signalgebung verläuft bei diesen Rezeptoren, ebenso wie bei TLR-4, über TIRAP und MyD88. Deshalb ist eine Weiterleitung des Signalwegs über TLR-4 ebenfalls möglich.

Nach der Stimulation mit der Zinkbindungs-Mutante D25A zeigt sich sowohl eine erhöhte IL-8 mRNA-Menge (**Abb. 4.28 a**; schwarze Säulen) als auch eine vermehrte IL-8 Proteinproduktion (**Abb. 4.28 b**). Die Signalstärke ist vergleichbar mit der nach Stimulation mit 100 pg/mL LPS und unterscheidet sich signifikant zur Negativkontrolle, bei der die Zellen lediglich mit HEK293-Medium kultiviert worden sind. Die mRNA-Menge ist ansonsten bei allen Stimulationen mit den Zinkbindungs-Mutanten und mit dem wtS100A12 erhöht. Die Menge an mRNA nach Stimulation mit den Kalziumbindungs-Mutanten N63A und E72A hingegen unterscheidet sich nicht von der Negativkontrolle und ist signifikant geringer als die nach Stimulation mit dem wtS100A12. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die Stimulation durch restliches LPS beeinflusst worden ist, sind die Proben zusätzlich auf 95 °C erhitzt worden, bevor sie zu den Zellen gegeben worden sind. Dies zerstört die Proteine, LPS bleibt jedoch funktionsfähig. Für alle Mutanten, für die eine Stimulation der HEK293/TCM-Zellen zu detektieren ist (H15A, D25A, H85A, H89A) ist die Stimulation nach Erhitzen der Proben signifikant geringer und auf dem Level der Negativkontrolle (**Abb. 4.28 a**; graue Säulen). Lediglich bei der Mutante D25A ist ein schwaches Signal für die auf 95 °C erhitzte Probe zu detektiert. Dies ist jedoch ebenfalls signifikant geringer als für das intakte Protein und zusätzlich signifikant geringer als nach LPS-Stimulation.

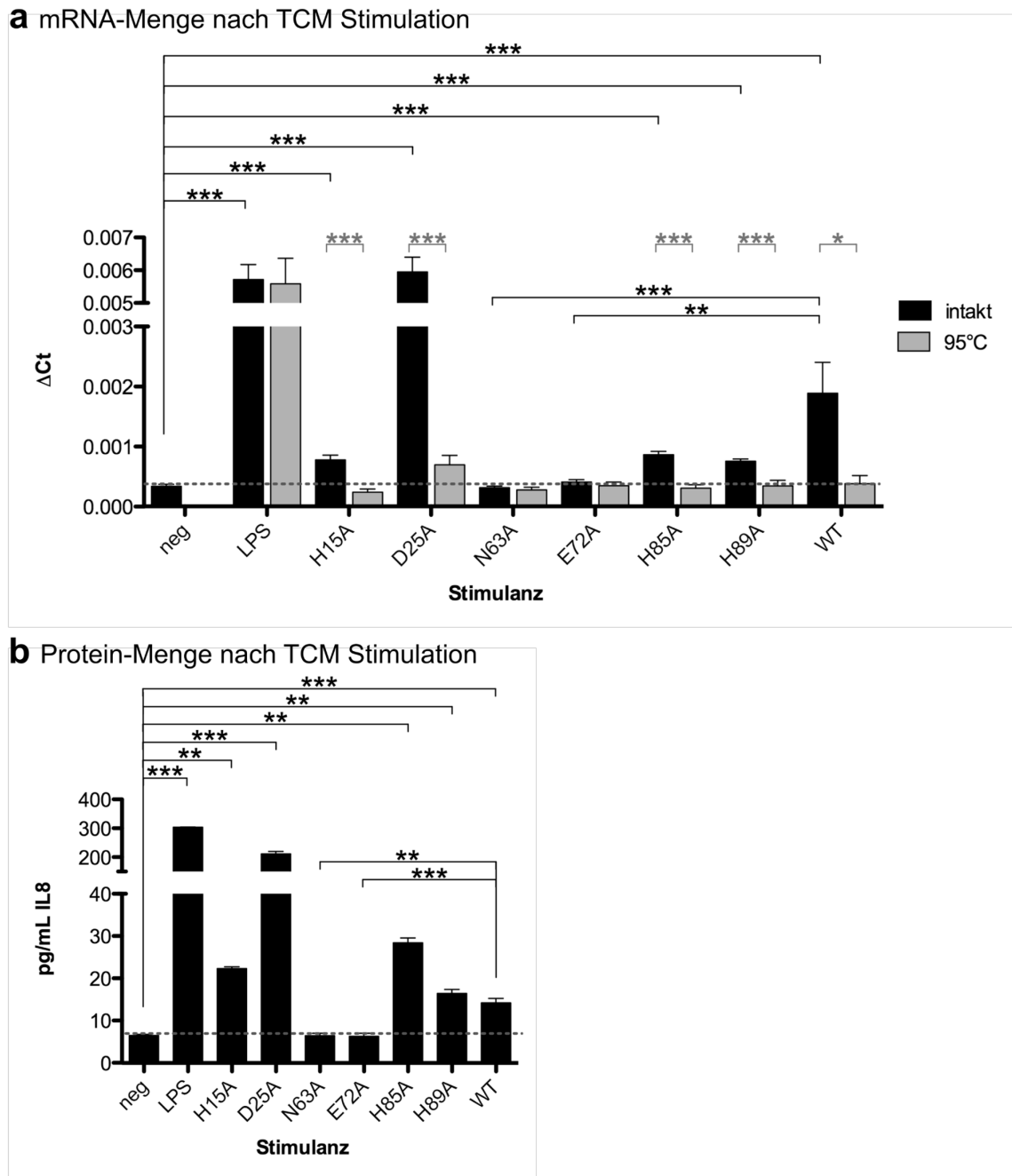


Abb. 4.28: Stimulation von HEK293/TCM-Zellen mit den S100A12-Mutanten und wtS100A12.

HEK293/TCM-Zellen sind für 4 h mit je 5 µg/mL der Zinkbindungs-Mutanten (H15A, D25A, H85A, H89A), der Kalziumbindungs-Mutanten (N63A, E72A) und des wtS100A12 (WT) sowie 100 pg/mL LPS stimuliert worden. Anschließend sind die Zellen lysiert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und die Transkriptionsrate mittels qPCR bestimmt worden (a; schwarze Säulen). Zusätzlich sind die Zellkulturüberstände bezüglich der Menge an produziertem Protein analysiert worden (b). Um einen Effekt des in den Proben enthaltenen LPS auszuschließen, sind die Proben vor der Stimulation auf 95°C erhitzt worden (a; graue Säulen). Die gestrichelte Linie stellt den Grundwert von nicht stimulierten Zellen (neg; Negativkontrolle) dar. Angegeben ist die mRNA-Menge im Vergleich zu dem *housekeeping* Gen RPL (Δ Ct) (a) bzw. die Proteinkonzentration (b).

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

Auf Proteinebene (**Abb. 4.28 b**) ist eine signifikant erhöhte Expression von IL-8 bei der Stimulation mit den Zinkbindungs-Mutanten (H15A, D25A, H85A, H89A) und dem wtS100A12 zu detektieren. Für die Kalziumbindungs-Mutanten N63A und E72A kann erneut keine Auswirkung der Stimulation auf die Produktion von IL-8 gezeigt werden. Die Proteinmenge unterscheidet sich für diese Mutanten jedoch erneut signifikant im Vergleich zu der nach der Stimulation mit dem wtS100A12.

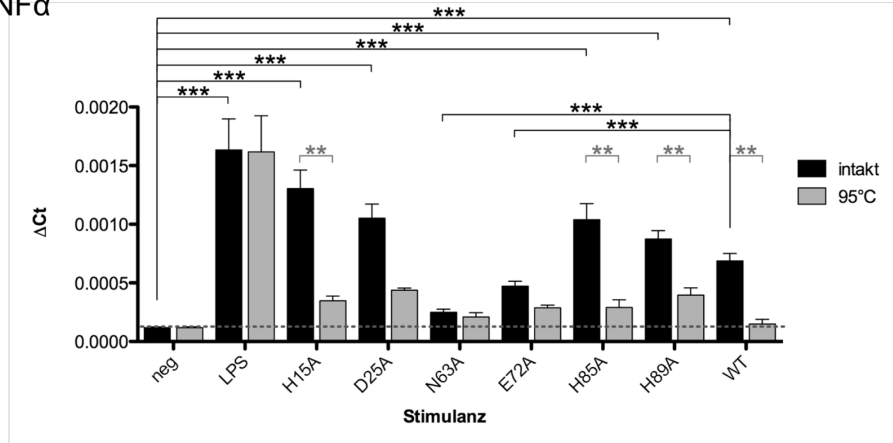
4.5.5. TLR-4 vermittelte Stimulation von THP1-Makrophagen

Ein weniger artifizielles System als das der HEK293/TCM-Zellen zur Analyse der Funktionsfähigkeit der hergestellten S100A12-Proteine ist die Stimulation von THP1-Zellen. Dies ist eine humane, monozytäre Zelllinie, die aus peripherem Blut eines einjährigen Leukämie-Patienten isoliert wurde. Die Zellen exprimieren, neben Monozyt-spezifischen Markern, ebenfalls TLR-4, CD14 und MD-2 (Ishihara *et al.*, 2004; Mittat, 2011; Tsuchiya *et al.*, 1980). Aus Vorversuchen ging hervor, dass eine bestmögliche Stimulation mit THP1-Makrophagen erreicht werden konnte. Daher sind die Zellen auch in dieser Arbeit vor der Stimulation zu Makrophagen differenziert worden.

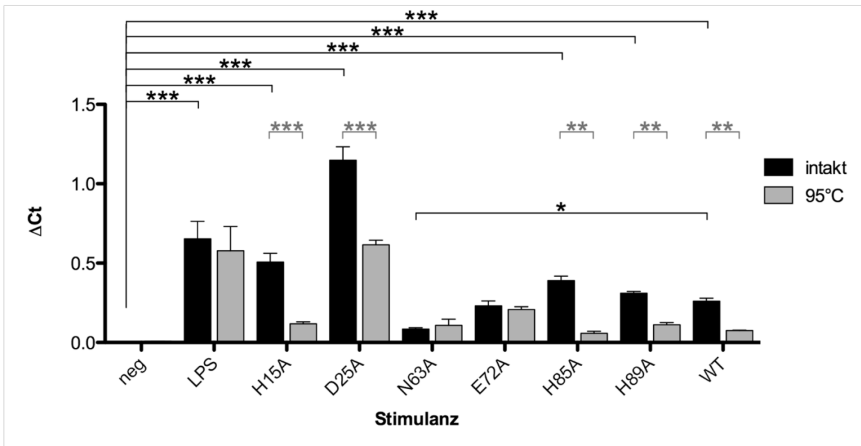
Die Menge an TNF α mRNA ist sowohl für wtS100A12 als auch für die Zinkbindungs-Mutanten (H15A, D25A, H85A, H89A) signifikant erhöht (**Abb. 4.29 a**; schwarze Säulen). Für die Kalziumbindungs-Mutanten (N63A, E72A) konnte eine erhöhte mRNA Menge im Vergleich zu der Negativkontrolle gemessen werden, dies ist jedoch nicht signifikant. Verglichen mit dem wtS100A12 war die mRNA-Menge hier jedoch signifikant geringer.

Für IL-8 ist ein ähnliches Bild zu erkennen (**Abb. 4.29 b**). Sowohl die Stimulation mit den Zinkbindungs-Mutanten als auch mit dem wtS100A12 führt zu einer signifikanten Hochregulation der Transkription. Die Stimulation mit D25A zeigt die stärkste Regulation. Für die Kalziumbindungs-Mutanten ist eine leicht erhöhte mRNA-Menge zu detektieren, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant. Im Vergleich zum wtS100A12 ist diesmal nur bei der Stimulation mit der Kalziumbindungs-Mutante N63A signifikant weniger mRNA transkribiert.

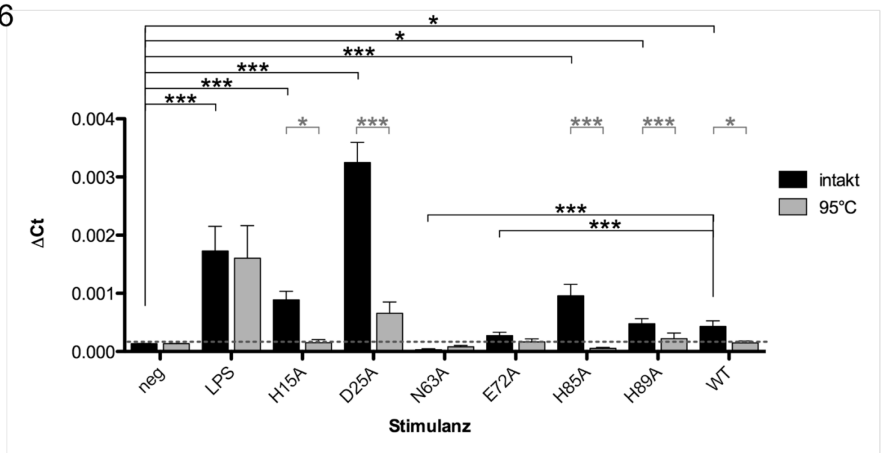
a TNF α



b IL-8



c IL-6



d IL-1 β

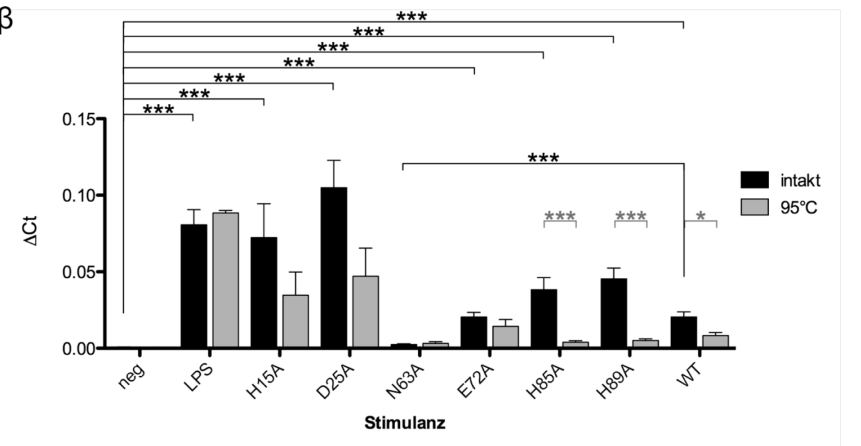


Abb. 4.29: Stimulation von THP1-Makrophagen mit den S100A12-Proteinen.

Die monozytären THP1-Zellen sind zunächst für 48 h mit PMA inkubiert worden, um eine Differenzierung zu Makrophagen zu induzieren. Nachdem die Zellen weitere 48 h in Medium kultiviert worden sind, sind sie für 4 h mit je 20 µg/mL der Zinkbindungs-Mutanten (H15A, D25A, H85A, H89A), der Kalziumbindungs-Mutanten (N63A, E72A) sowie des wtS100A12 (WT) und 100 pg/mL LPS stimuliert worden. Als Kontrolle sind alle Proben zusätzlich auf 95 °C erhitzt und danach für die Stimulation eingesetzt worden (graue Säulen). Anschließend ist die erhaltene mRNA der Zytokine TNF α (a), IL-8 (b), IL-6 (c) und IL-1 β (d) mittels qPCR bestimmt worden. Angegeben ist die Menge an transkribierter mRNA im Vergleich zu dem *housekeeping* Gen RPL (Δ Ct).

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

Die mRNA von IL-6 ist ebenfalls nach Stimulation mit den Zinkbindungs-Mutanten und dem wtS100A12 signifikant erhöht (**Abb. 4.29 c**). Die Stimulation mit D25A zeigt die stärkste Regulation. Auch die Stimulationen mit den Mutanten H15A und H85A weisen mehr mRNA auf, als die Stimulation mit dem wtS100A12. Die Stimulation mit der Kalziumbindungs-Mutante E72A weist eine leicht erhöhte Menge an IL-6 mRNA auf, jedoch liegt weiterhin ein signifikanter Unterschied zu der wtS100A12-Stimulation vor. Bei der Kalziumbindungs-Mutante N63A zeigt sich erneut kein Unterschied zu der Negativkontrolle und abermals ein signifikanter Unterschied zum wtS100A12.

Die Transkription des IL-1 β Gens ist, nach der Stimulation mit den Zinkbindungs-Mutanten, der Kalziumbindungs-Mutante E72A und dem wtS100A12 signifikant erhöht (**Abb. 4.29 d**). Erneut ist die mRNA-Menge nach Stimulation mit D25A am höchsten. Zusätzlich wird hier die mRNA-Menge ebenfalls durch Stimulation mit H15A, H85A und H89A stärker hochreguliert als mit dem wtS100A12. Für die Stimulation mit der Kalziumbindungs-Mutante N63A ist kein Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle zu sehen, aber wieder ein signifikanter Unterschied zum wtS100A12.

Um auch hier den Einfluss des restlichen LPS zu ermitteln, ist ebenfalls eine Versuchsreihe mit Proben, die auf 95°C erhitzt worden sind, durchgeführt worden.

Nach dem Erhitzen der Proben sind die Signale bei allen analysierten Zytokinen für das wtS100A12 und die Zinkbindungs-Mutanten H15A, D25A, H85A und H89A deutlich, in den meisten Fällen sogar signifikant schwächer (**Abb. 4.29**; graue Säulen). Lediglich die Kalziumbindungs-Mutanten weisen keinen Unterschied zwischen der Stimulation mit intaktem Protein (schwarze Säulen) und dem Erhitzen (graue Säulen) auf. Die Signale sind demnach auf die LPS-Kontamination zurückzuführen.

4.5.6. Stimulation von THP1-Makrophagen in Anwesenheit eines TLR-4 Antikörpers

Durch prä-Inkubation der THP1-Makrophagen mit einem α -TLR-4 AK sollte der Signalweg über diesen Rezeptor blockiert und eine mögliche Signaltransduktion über RAGE analysiert werden. Allerdings konnte trotz des AKs eine Stimulation mit LPS erreicht werden. Am stärksten ist der Einfluss von LPS auf die Expression von IL-8 (**Abb. 4.30 b**; graue Säule). Beim Vergleich aller Ergebnisse ($\text{TNF}\alpha$, IL-8, IL-6, IL-1 β) mit und ohne AK zeigt sich jedoch, dass die Stimulation durch LPS generell signifikant verringert werden kann, wenn die Zellen zuvor mit α -TLR-4 inkubiert worden sind.

Die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion ist nach Stimulation mit den Zinkbindungs-Mutanten H15A, H85A und H89A ohne Einsatz des TLR-4 AKs signifikant höher als mit dem Einsatz (**Abb. 4.30 a**). Ausschließlich die Zinkbindungs-Mutante D25A weist weiterhin eine starke Stimulation, auch nach prä-Inkubation mit α -TLR-4 auf. Für die Kalziumbindungs-Mutanten N63A und E72A unterscheiden sich die Ergebnisse nicht. Hier ist in beiden Fällen kaum ein Einfluss der Mutanten auf die Rezeptor-Aktivierung auszumachen.

Die IL-8 Transkription ist nur für LPS und wtS100A12 nach prä-Inkubation mit α -TLR-4 signifikant geringer (**Abb. 4.30 b**). Bei den Zinkbindungs-Mutanten ist eine leichte Reduktion der Proteinexpression nach α -TLR-4 Inkubation zu erkennen. Die Stimulationen mit den Kalziumbindungs-Mutanten unterscheiden sich erneut nicht.

Hingegen ändert sich die IL-6-Transkription nach Blockade von TLR-4 stark (**Abb. 4.30 c**). Im Gegensatz zu der Stimulation ohne α -TLR-4 ist hier keine Regulation der Transkription zu erkennen. Sogar die Stimulation mit der Mutante D25A zeigt eine deutlich geringere Regulation als üblich.

Die Produktion von IL-1 β mRNA ist ebenfalls weniger ausgeprägt, wenn die Zellen zuvor mit dem AK inkubiert worden sind (**Abb. 4.30 d**). Erneut ist für die Mutante D25A kein Unterschied zwischen beiden Versuchen zu erkennen. Für alle anderen Mutanten und wtS100A12 ist die mRNA Menge nach prä-Inkubation deutlich geringer als ohne α -TLR-4.

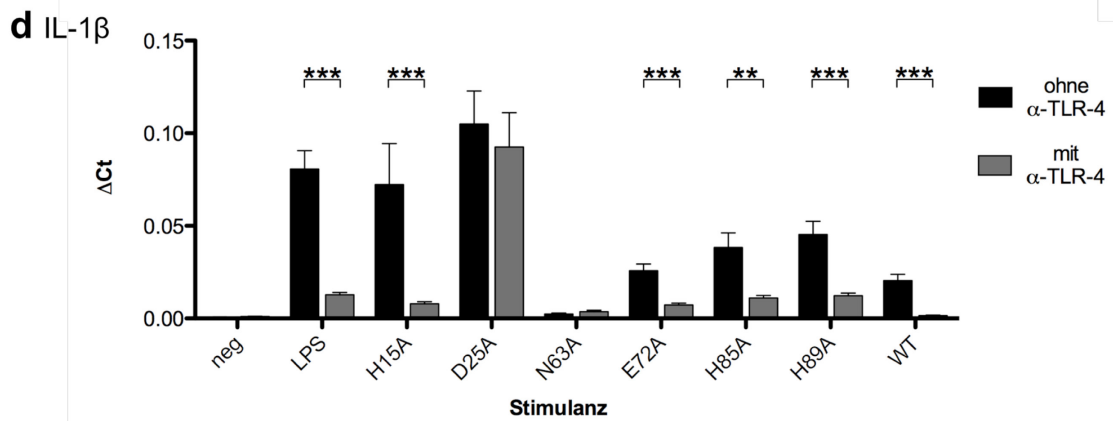
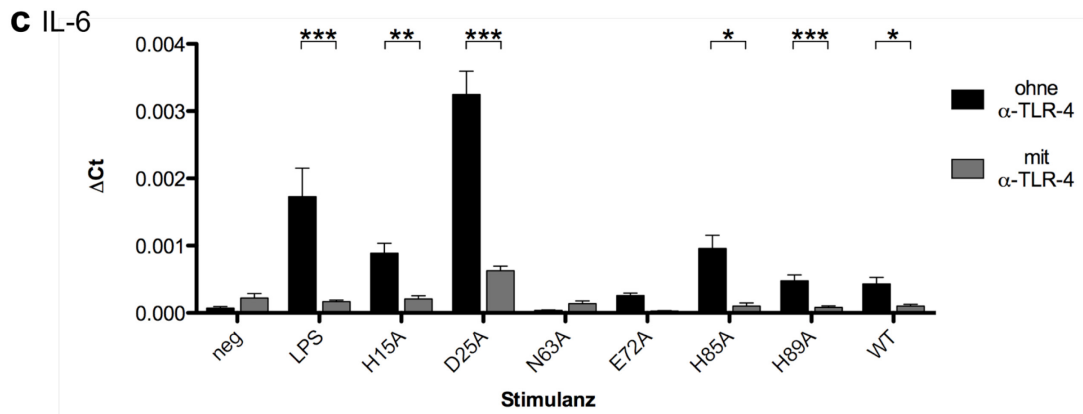
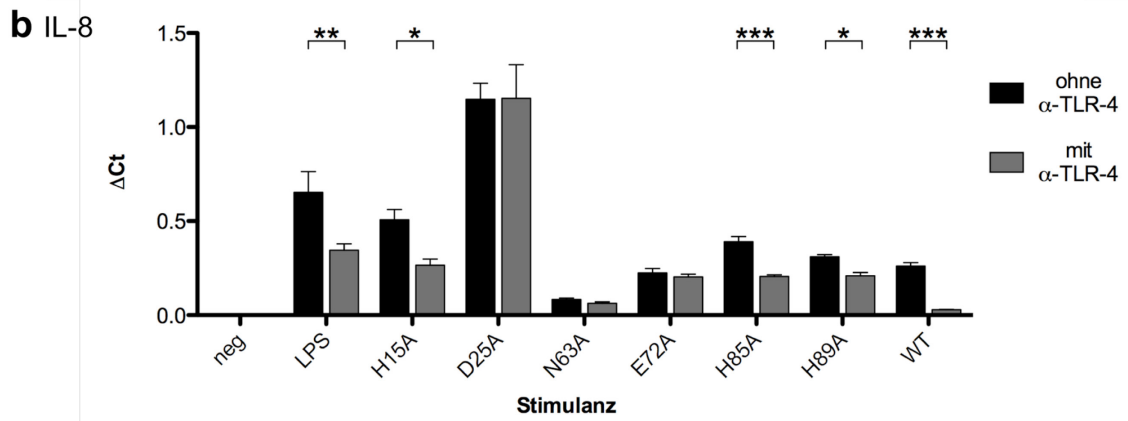
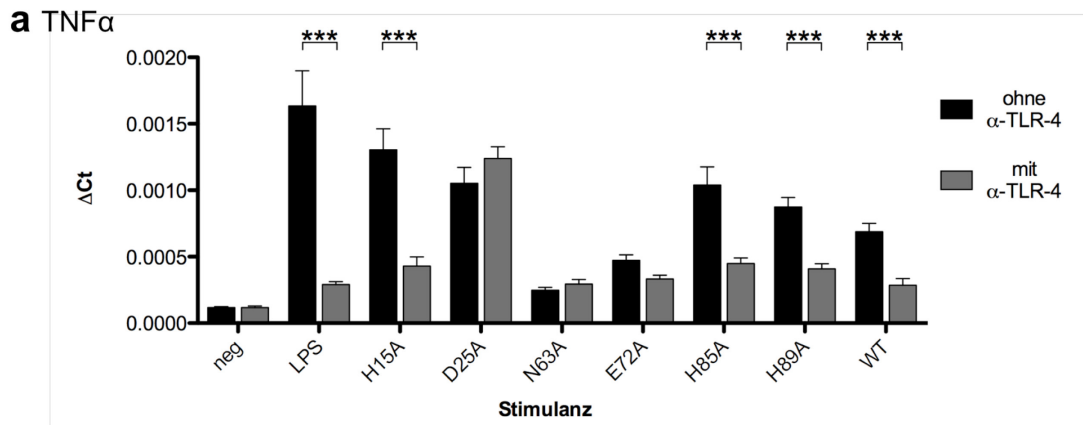


Abb. 4.30: Vergleich der THP1-Stimulationen mit und ohne α -TLR-4.

Die Ergebnisse aus **Abb. 4.28** und die Ergebnisse für die Stimulationen nach TLR-4 Blockade sind in dieser Abb. vereint worden. Dargestellt ist die Menge an transkribierter mRNA im Vergleich zu den *housekeeping* Gen RPL (Δ Ct) von TNF α (a), IL-8 (b), IL-6 (c) und IL-1 β (d). Schwarze Säulen repräsentieren die Ergebnisse der Stimulationen ohne α -TLR-4, weiße Säulen solche mit α -TLR-4 prä-Inkubation.

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

Zusammenfassung Abschnitt 4.5:

Zunächst konnte für die Bindung des wtS100A12 an die Rezeptoren TLR-4 und RAGE gezeigt werden, dass diese unter extrazellulären Bedingungen am stärksten ausgeprägt ist. Die Bindungsanalysen und die funktionellen Analysen zeigen ein differentielles Verhalten der Mutanten bezüglich ihrer Rezeptorbindung und -aktivierung. Generell sind die Zinkbindungs-Mutanten eher in der Lage, TLR-4 und RAGE zu binden als die Kalziumbindungs-Mutanten. Die Bindung an RAGE ist für alle Mutanten deutlich schwächer ausgeprägt als für wtS100A12, allerdings ebenfalls für die Kalziumbindungs-Mutanten am schwächsten.

Eine Aktivierung der Signaltransduktion durch S100A12 kann nur für TLR-4 gezeigt werden. Hier weisen sowohl wtS100A12 als auch die Zinkbindungs-Mutanten eine Stimulation auf. Die Stimulation mit der Kalziumbindungs-Mutanten N63A zeigt sowohl bei HEK293/TCM-Zellen als auch THP1-Makrophagen keine erhöhte Expression der analysierten Zytokine. Für die Kalziumbindungs-Mutante E72A sind die Ergebnisse der Stimulation von HEK293/TCM-Zellen und THP1-Makrophagen unterschiedlich. Jedoch ist bei den HEK293/TCM-Zellen die Stimulation nach dem Erhitzen der Probe ebenfalls erhöht, was auf die LPS-Kontamination zurückzuführen ist. Während bei HEK293/TCM-Zellen die Expression nicht induziert werden kann, kann bei THP1-Makrophagen eine leichte Regulation detektiert werden.

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass ausschließlich das S100A12-Hexamer in der Lage ist, die Signalleitung mittels TLR-4 zu induzieren. Dies stützt die Annahme, dass die Proteinaktivität über den Grad der Oligomerisierung reguliert wird und S100A12 in verschiedenen Milieus unterschiedliche Effekte haben kann.

Nach Blockade des TLR-4 lässt sich die Signalleitung über RAGE hingegen nur durch die Zinkbindungs-Mutante D25A initiieren. Da ein geringer Einfluss von TLR-4 doch auch hier nicht komplett ausgeschlossen werden kann, ist dieses Resultat vermutlich auf eine Restaktivität des TLR-4 zurückzuführen. Demnach scheint keine Komplexform des S100A12 in der Lage zu sein, eine RAGE-vermittelte Signaltransduktion zu induzieren.

KAPITEL 5

DISKUSSION

5.1. Darstellung verschiedener S100A12-Komplexformen

Viele S100-Proteine dienen intrazellulär als Regulatoren der Kalziumkonzentration und spielen extrazellulär eine Rolle in der Kalzium-vermittelten Signaltransduktion (Donato *et al.*, 2013; Moroz *et al.*, 2009b; Schafer *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*, 1995). Das ebenfalls zu der S100-Familie gehörende Protein S100A12 ist als Biomarker für verschiedene autoimmun- und (auto)inflammatorische Erkrankungen etabliert (Bovin *et al.*, 2004; Foell *et al.*, 2004a; Foell *et al.*, 2003a; Foell *et al.*, 2004b). Speziell bei der rheumatoiden Arthritis und bei anderen Formen der Arthritis korreliert die S100A12-Expression mit dem Entzündungsverlauf. Bei der juvenilen rheumatoiden Arthritis konnte gezeigt werden, dass die im Serum vorhandene Menge an S100A12 von der Aktivierung von Neutrophilen abhängt (Foell *et al.*, 2004b). Des Weiteren ist S100A12 an der Aktivierung verschiedener Signalwege über die PRRs TLR-4 und RAGE beteiligt (Foell *et al.*, 2013; Hofmann *et al.*, 1999; Moroz *et al.*, 2009b; Srikrishna *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Nach der Bindung von S100A12 endet die Signalleitung dieser Rezeptoren mit der Produktion sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Zytokine. Diese Zusammenhänge machen das Protein zu einem potentiellen Ziel für Therapien. Hierzu ist jedoch noch ein genaueres Verständnis der S100A12-Rezeptor-Interaktion erforderlich.

5.1.1. Aminosäureaustausch durch *Site-directed Mutagenesis*

Durch gezielte Substitution von AS in den Kalzium- und Zink-bindenden Proteindomänen konnte die Oligomerisierung des S100A12 beeinflusst werden. Der Austausch von Kalzium-bindenden AS inhibiert die Komplexbildung hierbei effektiver als der Austausch der Zink-bindenden AS.

In ersten Versuchen zur Separierung der Komplexe konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung des wtS100A12 eine hohe Plastizität aufweist. Nach Auftrennung der einzelnen Komplexformen mittels Größenfiltration und einer weiteren Inkubation sowie

Auftrennung der zuvor erhaltenen Oligomere können erneut alle Komplexe detektiert werden (**Abb. 4.1** und **Abb. 4.2**). Auch unter artifiziellen Bedingungen mit klar definierten Kalzium- und Zinkkonzentrationen, liegt eine Mischung aller bekannten Komplexe vor (**Abb. 4.21**). Erstmals konnte somit widerlegt werden, dass unter extrazellulären Bedingungen ausschließlich das Hexamer vorliegt, wie es zuvor beschrieben wurde (Moroz *et al.*, 2009b). Die diskrepanten Befunde könnten u.a. auf die verschiedenen Nachweismethoden zurückgeführt werden. Für S100A8 und S100A9 wurde ebenfalls gezeigt, dass die Nachweismethode bei der Analyse des Oligomerisierungsverhaltens eine große Rolle spielt (Berntzen *et al.*, 1988; Edgeworth *et al.*, 1991; Hunter *et al.*, 1998; Strupat *et al.*, 2000; Teigelkamp *et al.*, 1991; Vogl *et al.*, 1999b). Des Weiteren wurden in der Literatur keine Größenstandards mitgeführt und nur Ausschnitte der entsprechenden Gele gezeigt (Moroz *et al.*, 2009b), was die Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse erschwert. Fragwürdig bleiben insbesondere die Daten für die PAGE (Moroz *et al.*, 2009b). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ohne vorherige Quervernetzung der Proteine unter allen Bedingungen die gleichen Komplexmuster erhalten werden (**Abb. 7.3**). Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die bei der PAGE auftretende Mischung der Proben mit dem Laufpuffer und dadurch hervorgerufene Verdünnung der Ionenkonzentration. Wie bereits gezeigt werden konnte weisen die Komplexe eine hohe Plastizität auf und bilden bei geringen Ionenkonzentrationen ausschließlich Monomere, Dimere und Tetramere. Die Quervernetzung ermöglicht die Analyse stabiler Komplexe, die durch etwaige äußere Einflüsse wie Ionenkonzentrationen oder Scherkräfte nicht beeinflusst werden. Die hohe Plastizität deutet darauf hin, dass S100A12 in verschiedenen Milieus sehr unterschiedliche Formen einnehmen kann. So könnte es nicht nur differentielle intra- und extrazelluläre Eigenschaften haben, sondern auch in der Zirkulation oder im Gewebe unterschiedliche Funktionen übernehmen, die durch den Grad der Oligomerisierung reguliert werden.

Da die einzelnen Komplexe nicht allein durch Anpassung der Ionenkonzentration separiert werden können, musste für eine Trennung auf eine andere Methode zurückgegriffen werden. Die *Site-directed Mutagenesis* wurde bereits erfolgreich bei der Analyse des Dimerisierungsverhaltens von S100A8 und S100A9 eingesetzt (Leukert *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte durch den Austausch einer polaren AS gegen eine unpolare bei dem Kalzium-Bindeprotein Calbindin D_{9k} eine verringerte Proteinstabilität gezeigt werden (Wendt *et al.*, 1988).

Sowohl die Kalzium- als auch die Zink-Bindungsstellen, welche essentiell für die Induktion der Oligomerisierung sind, sind bei S100A12 bekannt (Moroz *et al.*, 2009a;

Zimmer *et al.*, 1995). Hierbei wird das Kalzium durch die EF2 effektiver gebunden als durch die EF1 (Moroz *et al.*, 2009a). Zusätzlich wird die Affinität der EF2 für Kalzium durch die Bindung von Zink noch um das 1500-fache verstärkt (Dell'Angelica *et al.*, 1994). Daher schien es am wahrscheinlichsten, dass die Substitution der Kalzium-bindenden AS in der EF2 den größten Effekt auf die Komplexbildung von S100A12 hat. Ein Austausch der Kalzium-bindenden AS der EF2 sowie der an der Zink-Bindung beteiligten polaren AS gegen unpolare sollte demnach dazu führen, dass Kalzium und Zink nicht mehr bzw. weniger effizient gebunden werden. Dies wiederum sollte einen Einfluss auf die Komplexbildung haben.

5.1.1.1. Die Mutationen der Kalzium- und Zink-bindenden AS haben unterschiedliche Einflüsse auf die tertiäre bzw. quaternäre Proteinstruktur

Obwohl davon ausgegangen wird, dass die Tetramerisierung auch durch Zink-Bindung induziert wird (Moroz *et al.*, 2009a) haben die Substitutionen der Kalzium-bindenden AS einen größeren Einfluss auf die Proteinkonformation und auch die Komplexbildung als die Mutationen der Zink-bindenden AS. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass drei Bindungsstellen für die Koordination von Zink ausreichen (Cook *et al.*, 1994), weshalb die Bildung von Tetrameren trotz Substitution einer Zink-bindenden AS weiterhin möglich sein kann. Auch die verschiedenen, durch die Ionen-Bindung induzierten, strukturellen Veränderungen legen nahe, dass der Verlust von Kalzium-Bindungsstellen einen größeren Einfluss auf die Struktur und Funktion von S100A12 hat. Die Kalzium-Bindung nimmt großen Einfluss auf die Konformation der EF2 sowie der *hinge*-Region und des N-Terminus (Hung *et al.*, 2013; Moroz *et al.*, 2009a). Diese sind vermutlich an der Interaktion mit Zielproteinen beteiligt (Hung *et al.*, 2013; Moroz *et al.*, 2009a). Die Zink-Bindung scheint jedoch eher Einfluss auf die EF-Hände und damit auf die Affinität zu Kalzium zu haben (Dell'Angelica *et al.*, 1994; Moroz *et al.*, 2009a; Moroz *et al.*, 2009b), anstatt generelle Konformationsänderungen zu induzieren.

Erste Hinweise auf eine veränderte Struktur nach Substitution der für die Ionenbindung essentiellen AS hat es bei der Aufreinigung der Proteine gegeben. Die Bedingungen der HIC-Aufreinigung mussten hier für jede Mutante angepasst werden. Die HIC ist ein spezielles Aufreinigungsverfahren für Kalzium-Bindeproteine. Diese werden unter spezifischen Kalziumkonzentrationen an eine hydrophobe Matrix gebunden. In den Proteinen werden durch die Bindung von Kalzium konformationelle Änderungen

induziert, welche die Ausbildung hydrophober Bereiche ermöglichen (Moroz *et al.*, 2009a; Xie *et al.*, 2007). Hierdurch wird die Bindung an die Matrix verbessert. Durch den Einfluss der Substitution auf die Struktur und damit die Hydrophobizität liefert das unterschiedliche Bindungsverhalten der Mutanten erste Hinweise auf eine veränderte Konformation.

Um für die Kalziumbindungs-Mutanten N63A und E72A eine Bindung an die Matrix zu erreichen musste eine 4-8-fach höhere Kalziumkonzentration eingesetzt werden als für wtS100A12. Die Kalziumbindungs-Doppelmutante N63/E72A kann selbst bei einer 12-fachen Kalziumkonzentration nicht an die Säule gebunden werden. Die bei dem wtS100A12 durch Kalzium-Bindung induzierte Strukturänderung der Helix III und der *hinge*-Region, welche die Ausbildung hydrophober Bereiche induziert (Moroz *et al.*, 2009a), findet aufgrund der Mutationen in den Kalzium-Bindungsstellen eventuell nicht mehr statt. Für das Kalzium-Bindeprotein Calbindin D_{9k} konnte beispielsweise ebenfalls gezeigt werden, dass der Austausch einer polaren gegen eine unpolare AS sowohl zur Reduktion der Kalzium-Affinität als auch zu einer verringerten Hydrophobizität des Proteins führt (Kragelund *et al.*, 1998). Dass am Ende dennoch eine Bindung erreicht werden konnte liegt vermutlich daran, dass hohe Ionenkonzentrationen generell die Hydrophobizität von Proteinen verstärken (Queiroz *et al.*, 2001).

Eine veränderte Struktur der Kalziumbindungs-Mutanten bestätigt sich weiter bei dem Vergleich der Bindungseffizienz verschiedener AK. Sowohl der polyklonale als auch alle monoklonalen AK zeigen eine deutlich schwächere Bindung der Kalziumbindungs-Mutanten im Vergleich zum wtS100A12 (**Abb. 4.19** und **Abb. 4.20**). Die Erkennungssequenzen der monoklonalen AK liegen zum Teil in Bereichen, in denen nach einer Kalzium-Bindung eine Konformationsänderung induziert wird (vgl. **3.1.9.1**) (Moroz *et al.*, 2009a). Durch das Fehlen einzelner Kalzium-Bindungsstellen scheint diese Konformationsänderung nicht mehr induzierbar zu sein. Ähnliches wurde ebenfalls bei dem S100-Protein S100P gesehen. Hier führt das Einfügen von Mutationen in den EF-Händen zu einer starken Beeinflussung der Proteinstruktur (Austermann *et al.*, 2009). Auch die Erhöhung der Ionenkonzentration kann die beim wtS100A12 vonstattengehenden Konformationsänderungen anscheinend nicht mehr induzieren. Die Bindung der AK ist bei höheren Ionenkonzentrationen ebenfalls deutlich schlechter als bei wtS100A12 (**Abb. 4.20**). Einzige Ausnahme bildet hier die Bindung des AK K an die Kalziumbindungs-Mutante E72A. Dieser AK bindet allerdings ebenfalls eine Peptidregion der EF1, deren Konformationsänderung eigentlich unabhängig von Kalzium ist. Dass die Kalziumbindungs-Mutante N63A dennoch schlechter gebunden wird könnte daran liegen, dass diese Mutation einen Einfluss auf die Peptidregion der EF1 hat, da sie näher bei dieser liegt als die Mutation an

Position 72. Solche sogenannten *long-distance* Effekte wurden bereits mehrfach beschrieben (Fulle *et al.*, 2015; Goldschen-Ohm *et al.*, 2010; Tanio *et al.*, 1999). Die in allen Fällen auftretende schwache Bindung der AK ist wahrscheinlich ebenfalls auf die Bindung anderer Peptidregionen, die nicht durch die Kalzium-Bindung beeinflusst werden, zurückzuführen.

Die anscheinend divergente Proteinkonformation der Kalziumbindungs-Mutanten wird durch die Analyse der sich bildenden Komplexe erneut bestätigt. Die Komplexbildung der Kalziumbindungs-Mutanten ist durch die Substitution der AS deutlich beeinflusst (**Abb. 4.22**). Eine Ausbildung von Hexameren ist unter keiner Bedingung zu detektieren und auch die Tetramerisierung ist deutlich beeinträchtigt. Bei Ionenkonzentration, die bei dem wtS100A12 zu einer deutlichen Hexamerisierung führen (1,8 mM Ca + 100 nM, 1 μ M, 6,5 μ M bzw. 30 μ M Zn), ist hier maximal eine leichte Verschiebung in Richtung Hexamer zu sehen. Die Bindung von Kalzium führt bei S100-Proteinen zu Konformationsänderungen, die die Oligomerisierung induzieren (Bhattacharya *et al.*, 2003; Chazin, 1995; Inman *et al.*, 2002; Moroz *et al.*, 2009a; Rety *et al.*, 2000; Rety *et al.*, 1999; Rustandi *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1998). Diese sind durch die eingefügten Mutationen wahrscheinlich nicht mehr möglich, was eine Erklärung für das Fehlen von Hexameren sein könnte. Für die auch zur S100-Familie gehörenden Proteine S100A8 und S100A9 wurde dieses Verhalten ebenfalls gezeigt. Die Substitutionen N69A und E78A, die im Sequenzvergleich den hier eingeführten Mutationen N63A und E72A entsprechen, inhibieren die Ausbildung des Heterotetramers, eine Heterodimerisierung bleibt jedoch möglich (Leukert *et al.*, 2006).

Bei den Zinkbindungs-Mutanten sind die Unterschiede zum wtS100A12 generell weniger stark ausgeprägt. Um eine effiziente Bindung bei der HIC zu induzieren werden die gleichen oder sogar geringere Kalziumkonzentrationen wie bei dem wtS100A12 benötigt. Obwohl die Bindung von Zink eine Oligomerisierung in Abwesenheit von Kalzium induzieren kann (Moroz *et al.*, 2009b), scheint hier kein Einfluss auf die Bildung der hydrophoben Interaktionsflächen vorhanden zu sein. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Zink-Bindung primär zu einer Strukturänderung der Helix I und IV führt, welche nicht direkt an der Ausbildung der hydrophoben Interaktionsflächen beteiligt sind (Moroz *et al.*, 2009a). Des Weiteren deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die Helices der EF2 unterschiedliche Einflüsse auf die Ausbildung der hydrophoben Bereiche haben. Die durch Kalzium induzierte Konformationsänderung der Helix III führt zur Ausbildung einer hydrophoben Oberfläche. Die Zink-vermittelte Rekonstruktion der Helix IV hat hierauf jedoch keinen Einfluss (Moroz *et al.*, 2009a; Xie *et al.*, 2007). Dass die Helix III scheinbar mehr

Einfluss auf die Ausbildung hydrophober Bereiche hat als die Helix IV wird ebenfalls in der Literatur impliziert (Moroz *et al.*, 2009a; Xie *et al.*, 2007).

Der generell geringere Einfluss der Zink-Mutationen auf die Proteinkonformation zeigt sich zusätzlich bei den Bindungsanalysen mit den verschiedenen AK (**Abb. 4.19** und **Abb. 4.20**). Zwar ist die Bindung des polyklonalen AKs und der monoklonalen AK H und K unter intrazellulären Bedingungen deutlich schlechter als bei dem wtS100A12, jedoch kann sie durch Erhöhung der Kalzium- und Zinkkonzentration verbessert werden. Die Bindung der Mutanten D25A und H89A durch den AK H war hier sogar stärker als die Bindung des wtS100A12. Das Fehlen einer der Zinkbindenden AS scheint demnach durch höhere Ionenkonzentrationen kompensierbar zu sein. Der AS-Austausch führt vermutlich zu einer Reduktion der Zink-Affinität, die Bindung wird aber nicht komplett inhibiert. Ähnliches konnte nicht nur für das Kalzium-Bindeprotein Calbindin D_{28K} beobachtet werden (Bauer *et al.*, 2008), sondern ebenfalls für das virale Protein C2 des *Tomato yellow leaf curl virus* China (Van Wezel *et al.*, 2003). Obwohl die Affinität für Zink in beiden Fällen nach der Mutation von Zinkbindenden AS verringert ist, blieben die Proteine weiterhin aktiv. Für das Zink-Finger Protein ADR1 aus Hefen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Proteinaktivität nach Substitution einer Zinkbindenden AS erhalten bleibt und drei AS für die Koordination von Zink ausreichen (Cook *et al.*, 1994). Interessanterweise ist die Bindung der AK an die Mutante H15A unter extrazellulären Bedingungen schlechter als die Bindung der anderen Zinkbindungs-Mutanten. Die AS-Substitution an Position 15 scheint durch Erhöhung der Ionenkonzentration nicht so gut kompensierbar zu sein wie die restlichen Mutationen. Eventuell spielen auch hier die bereits erwähnten *long-distance* Effekte eine Rolle. Dass dieses Ergebnis durch ein unterschiedliches Bindungsverhalten der AK hervorgerufen wird ist eher unwahrscheinlich. Alle AK binden ebenfalls in einer Region, in der die Mutationen H85A und H89A liegen. Diese Mutanten werden allerdings gut gebunden.

Auch die Analyse der Komplexbildung macht deutlich, dass die Mutationen der Zink-Bindungsstellen weniger Einfluss auf die Proteinkonformation zu haben scheinen. Alle Mutanten sind unter extrazellulären Bedingungen weiterhin in der Lage Hexamere zu bilden (**Abb. 4.23** und **Abb. 4.24**). Lediglich der Anteil der einzelnen Komplexformen variiert. Ähnliches zeigt sich auch bei dem S100-Protein S100A1 und dem Kalzium-Bindeprotein Calbindin D_{9K}. Die Substitution von Ionen-Bindungsstellen, die für Konformationsänderungen benötigt werden, führt zu einer veränderten Affinität der Ionenbindung, beeinträchtigt die strukturellen Veränderungen jedoch nur gering (Carlstrom *et al.*, 1993; Goch *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu allen anderen Mutanten und dem wtS100A12 weist die Mutante D25A ebenfalls bei geringen

Kalziumkonzentrationen (0,2 μM) Hexamere auf. Die Substitution hat anscheinend einen erheblichen Einfluss auf die Proteinstruktur, sodass weitestgehend unabhängig von der Kalzium- und Zinkkonzentration eine Oligomerisierung stattfinden kann. Normal wird durch die Bindung von Kalzium und Zink ein „*Tetramerisierungs Interface*“ ausgebildet. Durch die somit erfolgende Tetramerisierung stehen weitere Kalzium-Bindungsstellen zur Verfügung und die Hexamerisierung wird induziert (Moroz *et al.*, 2009a). Eventuell führt diese Mutation zu einer Stabilisierung des Proteins, sodass das *Tetramerisierungs Interface* auch ohne Kalzium und Zink vorhanden ist. Somit wäre die Ausbildung von Hexameren eventuell auch bei geringeren Kalziumkonzentrationen möglich. Die durch Mutationen hervorgerufene erhöhte Stabilität von Proteinen in bestimmten Konformationen ist bereits mehrfach beschrieben (Borgo *et al.*, 2012; Frenz, 2005; Lamazares *et al.*, 2015).

Sowohl das wtS100A12 als auch die Zinkbindungs-Mutanten weisen starke Differenzen bezüglich der Komplexbildung unter intra- und extrazellulären Bedingungen auf. Die intrazellulären Funktionen des Proteins sind weitestgehend unbekannt. Anhand der Ergebnisse lässt sich jedoch vermuten, dass sie durch das Dimer vermittelt werden. Dies könnte, wie bereits vermutet (Donato *et al.*, 2013; Moroz *et al.*, 2009b), für eine Rolle des Proteins bei der Kalziumhomöostase sprechen. Die Ausbildung weiterer, interdimerer Kalzium-Bindungsstellen während der Oligomerisierung deutet auf eine Funktion als Kalzium-Sensor hin. Im Gegensatz dazu ist die extrazelluläre Funktion des Proteins als DAMP bereits beschrieben (Donato *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2001). Da die Funktion als DAMP von der Interaktion mit PRRs abhängt, ist ein Einfluss der Komplexbildung unter extrazellulären Bedingungen auf die Funktionalität von S100A12 anzunehmen. Ist verstanden, wie die einzelnen Komplexformen auf die PRRs wirken, so kann durch Manipulation der Mengenanteile einzelner Komplexe eventuell Einfluss auf die Signaltransduktion genommen werden. Denkbar wäre hier beispielsweise der Einsatz synthetischer Proteine, die mit der aktiven Form um Bindungsstellen konkurrieren.

5.2. Charakterisierung der extrazellulären S100A12-Rezeptor-Interaktion

5.2.1. Die Rezeptorbindung ist unter extrazellulären Bedingungen am effizientesten

Unter extrazellulären Bedingungen konnte die beste S100A12-Rezeptor-Interaktion erzielt werden. Der für die S100A12-Komplexbildung relevanteste Unterschied zwischen intra- und extrazellulären Bedingungen besteht in der Konzentration der Kalzium- und Zink-Ionen. Die Menge an Kalzium ist extrazellulär um das 10^4 -fache höher als intrazellulär und die Zinkkonzentration ist 10^5 -mal so hoch.

Für S100A12 wurde bereits angenommen, dass eine RAGE-Aktivierung nur mit der hexameren Form möglich ist (Moroz *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das Hexamer ausschließlich unter extrazellulären Bedingungen vorliegt (**Abb. 4.21** und **Tab. 7.2**). Daher wird davon ausgegangen, dass diese Bedingung am ehesten für eine effiziente Bindung an die Rezeptoren in Frage kommt. Diese Hypothese konnte durch Rezeptor-Bindungsanalysen mittels ELISA und unterschiedlichen Ionenbedingungen bestätigt werden.

Sowohl die Bindung an TLR-4 als auch sRAGE ist unter extrazellulären Bedingungen (1,8 mM Ca + 30 μ M Zn) am stärksten (**Abb. 4.25**). Des Weiteren können ebenfalls Signale unter Bedingungen, unter denen in der PAGE keine Hexamer-Banden zu sehen sind (0,2 μ M Ca + 1 nM Zn bzw. 70 μ M Zn), detektiert werden. Eine Bindung von Tetrameren scheint hier jedoch effizienter zu sein als die von Dimeren. Jedoch sind die Signale in beiden Fällen signifikant schwächer als unter extrazellulären Bedingungen. Eine ansteigende Bindungseffizienz mit dem Grad der Oligomerisierung war zu erwarten. Für die Bindung von S100A12 an RAGE ist bereits bekannt, dass sie über hydrophobe Oberflächen erfolgt (Xie *et al.*, 2007). Diese werden bei den S100-Proteinen durch die Oligomerisierung ausgebildet (Bhattacharya *et al.*, 2003; Chazin, 1995; Inman *et al.*, 2002; Moroz *et al.*, 2009a; Rety *et al.*, 2000; Rety *et al.*, 1999; Rustandi *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1998). Zusätzlich konnten Moroz *et al.* eine ansteigende S100A12-RAGE-Interaktion durch Erhöhung der Ionenkonzentration beschreiben (Moroz *et al.*, 2009b). Des Weiteren wird bei S100A12 durch die Bindung von Kalzium und die damit verbundene Oligomerisierung zusätzlich die *hinge*-Region exponiert (Moroz *et al.*, 2009a), welche ebenfalls als mögliche Bindungsstelle für Zielproteine gilt (Kligman *et al.*, 1988). Ein Unterschied, hervorgerufen durch ein differentielles Bindungsverhaltens des AKs bezüglich Dimeren, Tetrameren und

Hexameren liegt wahrscheinlich nicht vor. Die AK-Bindung an die Hexamere ist etwa um das 2-fache stärker als die Bindung an Dimere (**Abb. 7.1**). Der Unterschied in der Signalintensität zwischen Dimeren und Hexameren beträgt bei den Analysen zur Rezeptorinteraktion jedoch ungefähr das 7-fache (TLR-4) bzw. 5-fache (RAGE) (**Abb. 4.25**).

5.2.2. Alle S100A12-Mutanten können die Rezeptoren TLR-4 und RAGE binden

Alle Mutanten sind in der Lage sowohl TLR-4 als auch RAGE zu binden, die Bindung von wtS100A12 ist jedoch am besten. Vermutlich können alle Mutanten binden, da sie weiterhin zumindest als Dimere vorliegen (vgl. **Tab. 7.2**) und auch das wt-Dimer die Rezeptoren bindet (**Abb. 4.25**). Bei den Kalziumbindungs-Mutanten kann die schlechtere Bindung darauf zurückgeführt werden, dass diese auch unter extrazellulären Bedingungen maximal Dimere und nur äußerst wenig Tetramere ausbilden. Die wt-Dimere binden ebenfalls schlechter als das wt-Tetramer und -Hexamer. Die Bindung der Hexamere ist am besten, da Hexamere mehr hydrophobe Bereiche exponieren, welche wiederum eine Rezeptor-Interaktion stabilisieren (Moroz *et al.*, 2009a; Xie *et al.*, 2007). Zusätzlich ist die Kalzium-Bindung für die Ausbildung hydrophober Bereiche essentiell und Moroz *et al.* konnten zeigen, dass die S100A12-RAGE-Bindung mit steigender Kalziumkonzentration verbessert wird (Moroz *et al.*, 2009b). Ferner führt die Bindung von Kalzium zu einer erhöhten Flexibilität des N-Terminus, welcher vermutlich ebenfalls an der Bindung von Zielmolekülen beteiligt ist (Hung *et al.*, 2013). Aufgrund der Mutationen findet diese jedoch möglicherweise nicht mehr oder weniger effizient statt. Ein Effekt der AK-Affinität ist hingegen unwahrscheinlich. Zum einen bindet der polyklonale AK die Mutanten H15A in den Vorversuchen geringer (**Abb. 4.20 a**), das Signal war hier jedoch deutlich zu detektieren. Zum anderen zeigt eine Mittelung über alle eingesetzten AK das gleiche Bild wie der polyklonale AK (**Abb. 4.26 b**).

Für die Zinkbindungs-Mutanten ist eine schlechtere Bindung im Vergleich zum wtS100A12 darauf zurückzuführen, dass hier ebenfalls deutlich weniger Hexamere und Tetramere vorliegen als bei dem wtS100A12 (**Tab. 7.2**), die Bindungseffizienz jedoch sehr wahrscheinlich mit dem Grad der Oligomerisierung steigt (Moroz *et al.*, 2009b). Bei den Zinkbindungs-Mutanten lässt sich zusätzlich postulieren, dass nicht nur die Komplexform einen Einfluss auf die Bindung an TLR-4 hat. Interessanterweise ist die Bindung der Zinkbindungs-Mutanten H85A und H89A schwächer als die der Mutanten

H15A und D25A. Unter extrazellulären Bedingungen liegen für H85A und H89A allerdings gleich viele bzw. mehr Hexamer und Tetramere vor, als für H15A und D25A (**Abb. 4.23** und **Abb. 4.24**). Dass dieses Ergebnis allein durch unterschiedliche AK-Affinitäten hervorgerufen wird ist auch hier weitestgehend unwahrscheinlich. Der polyklonale AK erkennt die Mutanten H85A und H89A in den Vorversuchen besser als H15A. Die Signalintensitäten sind hier jedoch entgegengesetzt. Eventuell haben die Mutationen an Position 15 und 25 einen weniger negativen Effekt auf die hydrophoben Bereiche, da sie sich in der EF1 befinden. Diese ist von der *hinge*-Region, welche hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden kann, räumlich getrennt. Die Mutationen H85A und H89A liegen hingegen in der *hinge*-Region, die vermutlich direkt an der Rezeptor-Bindung beteiligt ist (Kligman *et al.*, 1988). Dadurch ist der Einfluss dieser Mutation eventuell größer.

Im Falle des polyklonalen AKs zeigt sich für die Bindung an sRAGE ein ähnliches Bild wie für die TLR-4 Bindung. Bei der Mittelung über alle AK ist die Bindung des wtS100A12 jedoch deutlich schwächer als bei der Analyse mit dem polyklonalen AK (**Abb. 4.27**). Allerdings ist auch hier der gleiche Trend zu erkennen. Generell zeigen die Zinkbindungs-Mutanten eine deutlich bessere Bindung als die Kalziumbindungs-Mutanten, was auch hier vermutlich auf die unterschiedlichen Anteile der Komplexformen und deren unterschiedliche Bindungseffizienz zurückzuführen ist.

5.2.3. Hexameres S100A12 ist für die Signalweiterleitung über TLR-4 essentiell

Ausschließlich hexameres S100A12 führt zur Aktivierung des TLR-4 Signalwegs. Obwohl alle Mutanten sowie alle Komplexformen des wtS100A12 befähigt sind, mit den Rezeptoren TLR-4 und RAGE zu interagieren, besteht dennoch die Möglichkeit, dass eine Rezeptor-Aktivierung nur durch das Hexamer induziert wird. Xie *et al.* konnten bereits zeigen, dass das Hexamer für die Bindung an RAGE benötigt wird und Moroz *et al.* postulieren eine Hexamer-abhängige Aktivierung des Rezeptors (Moroz *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2007). Auch die Ausbildung hydrophober Bereiche durch die Protein-Oligomerisierung (Moroz *et al.*, 2009a) sowie die Restrukturierung der *hinge*-Region (Moroz *et al.*, 2009a) und das anscheinend fast ausschließliche Vorkommen von Tetrameren und Hexameren unter extrazellulären Bedingungen (**Abb. 4.21**), deuten auf eine Rezeptor-Aktivierung durch höhere Komplexe hin.

Zur genaueren Analyse der Funktionalität der S100A12-Mutanten sind zunächst Stimulationsassays mit der Zelllinie HEK293/TCM durchgeführt worden. Anhand der PAGE konnte bereits gezeigt werden, dass die Zinkbindungs-Mutanten (H15A, D25A, H85A, H89A) unter extrazellulären Bedingungen, wie sie auch in dem Stimulationsmedium vorliegen, weiterhin in der Lage sind, Hexamere auszubilden (**Abb. 4.23** und **Abb. 4.24**). Die Kalziumbindungs-Mutanten (N63A, E72A) hingegen liegen noch maximal als Tetramere vor (**Abb. 4.22**). Bei diesen beiden Mutanten unterscheidet sich die Expression an IL-8 nicht im Vergleich zur Negativkontrolle und ist zusätzlich signifikant geringer als für das wtS100A12 (**Abb. 4.28 a, b**). Durch Stimulation mit den Zinkbindungs-Mutanten und dem wtS100A12 ist hingegen eine erhöhte IL-8 Expression zu detektieren. Daher kann die Aktivierung des Rezeptors weder auf Dimere noch auf Tetramere zurückgeführt werden.

Dass die erhöhten Signale auf das Vorhandensein von LPS zurückzuführen ist konnte weitestgehend ausgeschlossen werden. Nach dem Erhitzen der Proben auf 95 °C ist kein Unterschied der IL-8 Expression im Vergleich mit der Negativkontrolle zu sehen (**Abb. 4.28 c**; graue Säulen). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass, wie bei RAGE (Moroz *et al.*, 2003b; Srikrishna *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2007), hexamerer S100A12 zur Induktion der Signaltransduktion nötig ist (Moroz *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2007).

Interessanterweise ist die Stimulation mit der Mutante D25A deutlich stärker als mit dem wtS100A12. Obwohl ein Einfluss von LPS nicht generell ausgeschlossen werden kann, erklärt die LPS-Kontamination allein das erhöhte Signal nicht. Vor allem auch, da die Mutante H89A eine höhere LPS Konzentration enthält (**Tab. 4.1**), das Signal hier aber schwächer ist. Es wäre denkbar, dass die AS-Substitution einen Effekt auf die Bindungsaffinität hat. Für die Liganden-Bindung der Protein-Tyrosin Phosphatase 1B wurde ebenfalls eine höhere Bindungsaffinität nach einer C→S Substitution gesehen (Zhang *et al.*, 2000). Für die Mutante D25A kann in den Bindungsanalysen zwar keine effizientere Bindung als für wtS100A12 gesehen werden, jedoch kann sich das Bindungsverhalten zwischen dem ELISA und den Stimulationsanalysen, da es sehr verschiedene Systeme sind, unterscheiden. Des Weiteren könnte bei dieser Mutante eine strukturelle Veränderung induziert worden sein, wodurch eine effizientere Quervernetzung der Rezeptoren stattfindet. Die Mutation einer Kalzium-Bindestelle des Kalzium-Bindeproteins Calmodulin führt ebenfalls zu einer geringeren Kalzium-Affinität, hatte jedoch auch weitreichendere Effekte (Fefeu *et al.*, 2000). Ein so genannter „*long-distance*“ Effekt, der durch einzelne Mutationen induziert werden kann (Fulle *et al.*, 2015; Goldschen-Ohm *et al.*, 2010; Tanio *et al.*, 1999), könnte ebenfalls durch die Mutation D25A auftreten. Ferner konnten für diese Mutante bereits bei der

Komplexbildung unter intrazellulären Bedingungen Hexamere detektiert werden, die bei keinem der anderen hier analysierten Proteine vorliegen. Dies lässt auf eine hohe Stabilität des Hexamers schließen, was es vermutlich weniger anfällig für äußere Einflüsse macht. Aufgrund der hohen Stabilität der Hexamere lässt sich weiterhin auf eine permanente Aktivierung des Proteins schließen. Beides könnte eine konstantere Rezeptorbindung und -aktivierung hervorrufen, wie es bereits für andere Proteine gezeigt wurde (Bos, 1989; Parnot *et al.*, 2002; Rolz *et al.*, 1999). Eventuell könnte D25A jedoch auch ein stärkerer Agonist sein. Rallabhandi *et al.* und Resman *et al.* beschrieben bereits ähnliche Beobachtungen für die Aktivierung von TLR-4 über LPS. Hier wurden zwei unterschiedliche LPS-Arten verglichen. LPS, welches als schwacher Agonist gilt, zeigt eine deutlich schwächere Induktion der Zytokinproduktion als LPS, das als starker Agonist fungiert. Ebenfalls kann der schwächere Agonist - im Gegensatz zum Stärkeren - keine Signaltransduktion über einen TLR-4 Rezeptor induzieren, bei dem durch Mutation die Hydrophobizität der Bindungsstelle verringert wurde. Der starke Agonist hingegen führt zu einer Aktivierung des Rezeptors (Rallabhandi *et al.*, 2008; Resman *et al.*, 2014).

Dass die Expression von IL-8 durch die Stimulation mit den meisten Zinkbindungs-Mutanten schwächer reguliert wird als durch wtS100A12 korrelierte mit der Menge an Hexameren, die in den Densitogrammen detektiert werden konnten.

Die Ergebnisse der TCM-Stimulation konnten zusätzlich mit einem weniger artifiziellen System bestätigt werden. Hierzu ist die monozytäre Zelllinie THP1 genutzt worden. Die Regulation der Transkription verläuft in ähnlicher Weise wie bei den TCMs. Die Stimulation mit LPS und wtS100A12 sowie mit den Zinkbindungs-Mutanten (H15A, D25A, H85A, H89A) führt bei allen Zytokinen zu einer signifikant erhöhten Transkription (**Abb. 4.29**). Die Mutante D25A zeigt, wie bei der Stimulation der TCMs zuvor auch, das stärkste Signal. Im Gegensatz zu den Stimulationen der TCMs relativiert sich diese Beobachtung hier jedoch, wenn der Einfluss der LPS-Kontamination in Betracht gezogen wird. Somit ist die Stimulation durch D25A in etwa genauso stark wie bei den restlichen Zinkbindungs-Mutanten. Dass die TNF α -Transkription durch H15A stärker reguliert wird ist eher darauf zurückzuführen, dass die verwendeten TNF α Primer eventuell unspezifisch sind. Dadurch entstanden vermutlich unerwünschte Nebenprodukte. Der Trend ist hier jedoch der gleiche wie bei den anderen Zytokinen.

Die THP1-Zellen reagieren generell sensitiver auf die Restmengen LPS. Der Einfluss von LPS kann nur bei dem wtS100A12 komplett ausgeschlossen werden, da sich dieses Signal nach Erhitzen auf 95°C auf das Niveau der negativ-Kontrolle reduzieren

lässt. Bei den Zinkbindungs-Mutanten kann das Signal ebenfalls signifikant reduziert werden, was auf einen geringen Einfluss des LPS schließen lässt. Die Stimulationen, die durch die Kalziumbindungs-Mutanten hervorgerufen werden, können hingegen komplett auf LPS zurückgeführt werden, da sich die Signalintensität nach Erhitzen der Proben auf 95 °C nicht ändert.

Alles in allem steht das hier erhaltene Ergebnis im Einklang mit den Resultaten der TCM-Stimulation und zeigt erstmals, dass die Aktivierung von TLR-4 nur durch das Hexamer induziert werden kann. Die Interaktion von hexamerem S100A12 mit RAGE war hingegen bereits bekannt (Moroz *et al.*, 2009a; Xie *et al.*, 2007).

5.2.4. Stimulation der THP1-Makrophagen nach TLR-4 Blockade

Durch Inkubation der THP1-Makrophagen vor der Stimulation mit einem α -TLR-4 AK sollte eine Aktivierung der Zytokinproduktion über RAGE anstatt über TLR-4 analysiert werden. Nach der Blockade kann ausschließlich eine signifikante Stimulation mit der Mutante D25A erreicht werden. Bei der gemessenen Menge der TNF α -mRNA wird zwar ebenfalls für die anderen Zinkbindungs-Mutanten und wtS100A12 ein signifikant erhöhtes Signal erhalten, dieses Ergebnis ist jedoch erneut mit Vorsicht zu betrachten. Allerdings zeigt sich auch hier wieder der gleiche Trend, wie bei den anderen Zytokinen.

Eine inkomplette Blockade des TLR-4 ist sehr wahrscheinlich nicht völlig auszuschließen, da auch nach der Stimulation mit LPS eine leicht erhöhte Zytokinproduktion zu detektieren ist. Beim Vergleich der Stimulationen mit und ohne AK zeigt sich jedoch, dass die Signale sowohl für LPS als auch für alle Zinkbindungs-Mutanten, außer D25A, und wtS100A12 nach der TLR-4-Blockade signifikant geringer sind (**Abb. 4.30**). Dies sogar obwohl bei der Stimulation nach der TLR-4 Blockade die 4-fache Menge an Protein eingesetzt worden ist. Die Blockade von TLR-4 scheint im Fall der D25A-Mutante nicht effizient genug gewesen zu sein. Zu beachten ist hier, dass auch diese Mutante durch Restmengen an LPS kontaminiert war. Aufgrund der höheren Proteinmenge, die eingesetzt worden ist, war auch mehr LPS während der Stimulationen vorhanden. Dennoch weist die Mutante D25A ein stärkeres Signal auf als die Mutante H89A, welche eine größere Menge an LPS enthielt. Auch bei der TCM-Stimulation ist das Signal für D25A höher als für die restlichen Mutanten und kann nicht allein auf die LPS-Kontamination zurückgeführt werden. Eventuell könnte hier die bereits vermutete hohe Stabilität und eventuell permanente Aktivität dazu führen, dass

die Restaktivität des TLR-4 größere Einflüsse hat, als es bei den anderen Mutanten der Fall ist. Eventuell führt dies zu dem stärkeren Signal im Falle der D25A Mutante. Dass auch bei der Mutante D25A eine Reduktion der IL-6 mRNA nach Blockade des TLR-4 auftritt, könnte an der Kinetik der Zytokinproduktion liegen. $\text{TNF}\alpha$ gehört beispielsweise zu den *primary response genes*, welche nach Einleitung einer Signaltransduktion schnell transkribiert werden (Fowler et al., 2011). IL-6 hingegen ist ein *secondary response gene*, weshalb es erst später verfügbar ist (Buxade et al., 2012). Die mRNA Mengen von $\text{TNF}\alpha$, IL-8 und IL-1 β erreichen ihr Maximum nach ca. 4-6 h, IL-6 hingegen erst nach 24 h (Harrison et al., 2005; Harrison et al., 2004; Mukherjee et al., 2009; Wolk et al., 2004). Daher könnte die Produktion der IL-6 mRNA anfälliger für eine TLR-4 Blockade sein.

Die gering erhöhten Signale können sehr wahrscheinlich sowohl auf die generell größere Menge Protein und damit auch höhere LPS-Konzentration als auch die Restaktivität des TLR-4 zurückgeführt werden. Bereits in den Versuchen ohne TLR-4 AK konnte ein stärkerer Einfluss des LPS auf die Stimulation von THPs, im Gegensatz zu TCMs, gesehen werden. Daher wird die S100A12-induzierte Signaltransduktion auf humanen monozytären Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch TLR-4 vermittelt und eine mögliche Signaltransduktion über RAGE ist eher unwahrscheinlich. In der Literatur (Xie et al., 2007) und auch in dieser Arbeit konnte zwar die Bindung von S100A12 an RAGE gezeigt werden, jedoch herrscht bei der S100A12-Beteiligung an der Signaltransduktion über diesen Rezeptor generell Uneinigkeit. Studien mit humanem S100A12 zeigen, dass die Blockierung von RAGE keine Auswirkungen auf die Aktivierung von Monozyten und die Expression von $\text{TNF}\alpha$ und IL-8 haben (Foell et al., 2013). Jedoch konnte für S100A12 ebenfalls eine RAGE-abhängige Produktion von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β und IL-22 gezeigt werden (Chellan et al., 2014; Hofmann et al., 1999).

5.3. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass wtS100A12 unter intrazellulären Bedingungen keine Hexamere ausbildet und unter extrazellulären Bedingungen vorwiegend als Tetramer und Hexamer vorliegt. Dies stützt die Theorie, dass die Protein-Aktivität über den Grad der Oligomerisierung reguliert wird und dass die einzelnen Komplexformen unterschiedliche Funktionen innehaben können. Da extrazellulär sowohl Tetramere als auch Hexamere vorhanden sind, aber ausschließlich die Hexamere in der Lage sind die TLR-4-vermittelte Signaltransduktion

zu induzieren, könnte durch vorhandene Tetramere eine Regulation der Signalstärke erfolgen. Tetramere sind ebenfalls in der Lage an TLR-4 zu binden, weshalb das Verhältnis von Tetrameren zu Hexameren die Aktivierung des Rezeptors beeinflussen könnte. Die Bindung von Tetrameren würde zu einer Blockade der Rezeptoren führen, wodurch weniger aktiviert werden können und das Signal somit schwächer wäre.

Durch die Mutationen von einzelnen Kalzium- und Zink-bindenden AS ist das Oligomerisierungsverhalten des Proteins beeinflusst worden. Hierbei ist der Einfluss von Mutationen in Kalzium-Bindungsstellen auf die Komplexbildung deutlich größer als die Substitution der Zink-bindenden AS. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure reicht aus, die Bildung höherer Komplexe partiell zu inhibieren, führt allerdings nicht dazu, dass die Ausbildung dieser grundsätzlich verhindert wird. Hier wäre es interessant, eine Kombination verschiedener AS zu substituieren. Für die Kalzium-Bindungsstellen konnte in dieser Arbeit eine Kalzium-Doppelmutante erzeugt werden. Jedoch konnte das Protein mit den verwendeten Methoden nicht aufgereinigt werden. Eine Alternative zu der Aufreinigung mittels HIC stellt die AK-Säule dar, die auch für die Proteinaufreinigung aus HEK293-Zellen genutzt worden ist. Dies könnte als alternatives, wenn auch aufwendigeres und teureres, Verfahren eingesetzt werden.

Durch alle hier durchgeführten Analysen kann die Theorie gestützt werden, dass hexameres S100A12 für die Aktivierung von Rezeptoren benötigt wird. Erste Hinweise darauf liefern die Komplexanalysen. Unter extrazellulären Bedingungen liegen überwiegend Tetramere und Hexamere vor. Anhand des Bindungsverhaltens des wtS100A12 an TLR-4 und RAGE konnte weiter gezeigt werden, dass die Rezeptorbindung für das Hexamer am stärksten ist und sukzessive in Richtung Dimer abnimmt. Dieses Bild bestätigt sich zusätzlich bei Betrachtung der Mutanten. Für die Kalziumbindungs-Mutanten (N63A, E72A), die nicht mehr in der Lage sind Hexamere zu bilden, sind die Signalintensitäten bei der Analyse der Rezeptorbindung deutlich schwächer. Allerdings ist das unterschiedliche Bindungsverhalten der AK an die S100A12-Proteine ein nicht zu vernachlässigendes Problem. Durch einen veränderten Versuchsaufbau, in dem nicht die Rezeptoren sondern die Proteine immobilisiert werden, könnte dieses Problem umgangen werden. Dies ist ebenfalls versucht worden und die ersten Ergebnisse zeigen eine Tendenz dahingehend, dass S100A12 sowohl TLR-4 als auch RAGE bindet. Allerdings waren die Signale sehr schwach, weshalb mit dem hier beschriebenen Versuchsaufbau weiter gearbeitet worden ist.

In den Stimulationsanalysen mit HEK293/TCM-Zellen und THP1-Makrophagen ist deutlich geworden, dass ausschließlich hexameres Protein zu einer Aktivierung von TLR-4 führt.

Bei den hier durchgeführten Analysen scheint S100A12 keine RAGE-vermittelte Signaltransduktion zu induzieren. Jedoch ist die Interpretation der Daten aufgrund der unvollständigen Blockade des TLR-4 schwierig. Daher wäre es sinnvoll die Ergebnisse mit Zellen, die ausschließlich RAGE exprimieren, zu bestätigen. Hier würden sich HEK293/RAGE-Zellen anbieten. Im Gegensatz zu HEK293/TCM-Zellen sind diese stabil mit RAGE transfiziert. Jedoch konnte in dieser Arbeit auch für die positiv Kontrollen HMGB1 und AGEs kein Signal nach Stimulation der HEK293/RAGE-Zellen detektiert werden. Im Weiteren Verlauf wäre es sinnvoll noch humane Makrophagen zum Vergleich zu nutzen, um die Ergebnisse in einem nativen System zu bestätigen.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass sowohl unter intrazellulären als auch extrazellulären Bedingungen immer eine Mischung verschiedener Komplexformen vorliegt (intrazellulär: Monomere, Dimere, Tetramere; extrazellulär: Tetramere, Hexamere) und die Kalzium-Bindung einen größeren Einfluss auf die Komplexbildung von S100A12 hat als die Bindung von Zink. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass alle Komplexformen an die Rezeptoren TLR-4 und RAGE binden, die Aktivierung humaner monozytärer Zellen jedoch ausschließlich durch hexameres S100A12 und über den PRR TLR-4 induziert wird.

Damit ist eine wesentliche Grundlage dafür gelegt, in der Zukunft die genaue Funktionalität dieses komplexen Entzündungsmediators besser zu verstehen und eventuell zu beeinflussen.

KAPITEL 6

LITERATURVERZEICHNIS

Abe, J., Jibiki, T., Noma, S. *et al.* (2005). Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease. *J. Immunol.* **174**(123): 5837-5845.

Ahmed, R. , Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**(17): 54-60.

Akira, S., Uematsu, S. , Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**(14): 783-801.

Aksoy, E., Taboubi, S., Torres, D. *et al.* (2012). The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat. Immunol.* **13**(208): 1045-1054.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E. *et al.* (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**(181): 15028-15034.

Austermann, J., Nazmi, A. R., Heil, A. *et al.* (2009). Generation and characterization of a novel, permanently active S100P mutant. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**(201): 1078-1085.

Bauer, M. C., Nilsson, H., Thulin, E. *et al.* (2008). Zn²⁺ binding to human calbindin D(28k) and the role of histidine residues. *Protein Sci.* **17**(230): 760-767.

Berntzen, H. B. , Fagerhol, M. K. (1988). L1, a major granulocyte protein: antigenic properties of its subunits. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **48**(202): 647-652.

Bhattacharya, S., Large, E., Heizmann, C. W., Hemmings, B. , Chazin, W. J. (2003). Structure of the Ca²⁺/S100B/NDR kinase peptide complex: insights into S100 target specificity and activation of the kinase. *Biochemistry* **42**(81): 14416-14426.

Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* **81**(16): 1-5.

Bollag, D. M. (1994). Ion-exchange chromatography. *Methods Mol. Biol.* **36**(132): 11-22.

Borgo, B. , Havranek, J. J. (2012). Automated selection of stabilizing mutations in designed and natural proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**(244): 1494-1499.

Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**(211): 4682-4689.

Bovin, L. F., Rieneck, K., Workman, C. *et al.* (2004). Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor. *Immunol. Lett.* **93**(122): 217-226.

Braman, J., Papworth, C. , Greener, A. (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol. Biol.* **57**(194): 31-44.

- Brescia, P., Banks, P., Voloshin, A. (2012). MULTI-VOLUME ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS USING THE EPOCH™ SPECTROPHOTOMETER SYSTEM. 241):
- Burgoyne, R. D. (2007). Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**(118): 182-193.
- Buxade, M., Lunazzi, G., Minguillon, J. *et al.* (2012). Gene expression induced by Toll-like receptors in macrophages requires the transcription factor NFAT5. *J. Exp. Med.* **209**(226): 379-393.
- Carlstrom, G., Chazin, W. J. (1993). Two-dimensional ¹H nuclear magnetic resonance studies of the half-saturated (Ca²⁺)₁ state of calbindin D9k. Further implications for the molecular basis of cooperative Ca²⁺ binding. *J. Mol. Biol.* **231**(233): 415-430.
- Chang, E. Y., Guo, B., Doyle, S. E., Cheng, G. (2007). Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J. Immunol.* **178**(207): 6705-6709.
- Chang, L., Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**(174): 37-40.
- Chazin, W. J. (1995). Releasing the calcium trigger. *Nat. Struct. Biol.* **2**(73): 707-710.
- Chellan, B., Yan, L., Sontag, T. J., Reardon, C. A., Hofmann Bowman, M. A. (2014). IL-22 is induced by S100/calgranulin and impairs cholesterol efflux in macrophages by downregulating ABCG1. *J. Lipid Res.* **55**(246): 443-454.
- Cherry, S., Silverman, N. (2006). Host-pathogen interactions in drosophila: new tricks from an old friend. *Nat. Immunol.* **7**(163): 911-917.
- Cook, W. J., Mosley, S. P., Audino, D. C. *et al.* (1994). Mutations in the zinc-finger region of the yeast regulatory protein ADR1 affect both DNA binding and transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **269**(260): 9374-9379.
- Cross, S. S., Hamdy, F. C., Deloulme, J. C., Rehman, I. (2005). Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* **46**(51): 256-269.
- Dell'Angelica, E. C., Schleicher, C. H., Santome, J. A. (1994). Primary structure and binding properties of calgranulin C, a novel S100-like calcium-binding protein from pig granulocytes. *J. Biol. Chem.* **269**(54): 28929-28936.
- Dervillez, X., Huther, A., Schuhmacher, J. *et al.* (2006). Stable expression of soluble therapeutic peptides in eukaryotic cells by multimerisation: application to the HIV-1 fusion inhibitory peptide C46. *ChemMedChem* **1**(150): 330-339.
- Donato, R., Cannon, B. R., Sorci, G. *et al.* (2013). Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**(52): 24-57.
- Ebihara, T., Endo, R., Kikuta, H. *et al.* (2005). Differential gene expression of S100 protein family in leukocytes from patients with Kawasaki disease. *Eur. J. Pediatr.* **164**(124): 427-431.
- Edgeworth, J., Gorman, M., Bennett, R., Freemont, P., Hogg, N. (1991). Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **266**(203): 7706-7713.
- Ehrchen, J. M., Sunderkotter, C., Foell, D., Vogl, T., Roth, J. (2009). The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J. Leukoc. Biol.* **86**(183): 557-566.

- Elder, J. T. , Zhao, X. (2002). Evidence for local control of gene expression in the epidermal differentiation complex. *Exp. Dermatol.* **11**(264): 406-412.
- Fefeu, S., Biekofsky, R. R., McCormick, J. E. *et al.* (2000). Calcium-induced refolding of the calmodulin V136G mutant studied by NMR spectroscopy: evidence for interaction between the two globular domains. *Biochemistry* **39**(232): 15920-15931.
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L. *et al.* (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**(177): 491-496.
- Foell, D., Hernandez-Rodriguez, J., Sanchez, M. *et al.* (2004a). Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of giant cell arteritis. *J. Pathol.* **204**(129): 311-316.
- Foell, D., Ichida, F., Vogl, T. *et al.* (2003a). S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. *Lancet* **361**(128): 1270-1272.
- Foell, D., Kane, D., Bresnihan, B. *et al.* (2003b). Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **42**(125): 1383-1389.
- Foell, D., Kucharzik, T., Kraft, M. *et al.* (2003c). Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut* **52**(127): 847-853.
- Foell, D., Seeliger, S., Vogl, T. *et al.* (2003d). Expression of S100A12 (EN-RAGE) in cystic fibrosis. *Thorax* **58**(126): 613-617.
- Foell, D., Wittkowski, H., Hammerschmidt, I. *et al.* (2004b). Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum.* **50**(130): 1286-1295.
- Foell, D., Wittkowski, H., Kessel, C. *et al.* (2013). Proinflammatory S100A12 can activate human monocytes via Toll-like receptor 4. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**(100): 1324-1334.
- Foell, D., Wittkowski, H. , Roth, J. (2007). Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **3**(142): 382-390.
- Fowler, T., Sen, R. , Roy, A. L. (2011). Regulation of primary response genes. *Mol. Cell* **44**(225): 348-360.
- Frenz, C. M. (2005). Neural network-based prediction of mutation-induced protein stability changes in Staphylococcal nuclease at 20 residue positions. *Proteins* **59**(245): 147-151.
- Fuellen, G., Foell, D., Nacken, W., Sorg, C. , Kerkhoff, C. (2003). Absence of S100A12 in mouse: implications for RAGE-S100A12 interaction. *Trends Immunol.* **24**(267): 622-624.
- Fulle, S., Saini, J. S., Homeyer, N. , Gohlke, H. (2015). Complex long-distance effects of mutations that confer linezolid resistance in the large ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.*234):
- Gallagher, S. R. , Desjardins, P. R. (2008). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.] Appendix 3*(149): Appendix 4K.
- Garcia, A. F., Lopes, J. L., Costa-Filho, A. J., Wallace, B. A. , Araujo, A. P. (2013). Membrane interactions of S100A12 (Calgranulin C). *PLoS One* **8**(192): e82555.
- Gawdzik, J., Mathew, L., Kim, G., Puri, T. S. , Hofmann Bowman, M. A. (2011). Vascular remodeling and arterial calcification are directly mediated by S100A12 (EN-RAGE) in chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* **33**(248): 250-259.

- Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., Golenbock, D. T. (2014). Innate sensing of malaria parasites. *Nat. Rev. Immunol.* **14**(104): 744-757.
- Ghosh, S., Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**(175): S81-96.
- Goch, G., Vdovenko, S., Kozłowska, H., Bierzynski, A. (2005). Affinity of S100A1 protein for calcium increases dramatically upon glutathionylation. *FEBS J.* **272**(231): 2557-2565.
- Gohda, J., Matsumura, T., Inoue, J. (2004). Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J. Immunol.* **173**(172): 2913-2917.
- Goldschen-Ohm, M. P., Wagner, D. A., Petrou, S., Jones, M. V. (2010). An epilepsy-related region in the GABA(A) receptor mediates long-distance effects on GABA and benzodiazepine binding sites. *Mol. Pharmacol.* **77**(236): 35-45.
- Gottsch, J. D., Eisinger, S. W., Liu, S. H., Scott, A. L. (1999a). Calgranulin C has filariacidal and filariastatic activity. *Infect. Immun.* **67**(256): 6631-6636.
- Gottsch, J. D., Li, Q., Ashraf, F. *et al.* (1999b). Cytokine-induced calgranulin C expression in keratocytes. *Clin. Immunol.* **91**(255): 34-40.
- Guignard, F., Mael, J., Markert, M. (1995). Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family. *Biochem. J.* **309 (Pt 2)**(60): 395-401.
- Harrison, L. M., van den Hoogen, C., van Haaften, W. C., Tesh, V. L. (2005). Chemokine expression in the monocytic cell line THP-1 in response to purified shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **73**(223): 403-412.
- Harrison, L. M., van Haaften, W. C., Tesh, V. L. (2004). Regulation of proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in the human monocytic cell line THP-1. *Infect. Immun.* **72**(222): 2618-2627.
- Heijmans, J., Buller, N. V., Hoff, E. *et al.* (2013). Rage signalling promotes intestinal tumourigenesis. *Oncogene* **32**(146): 1202-1206.
- Heizmann, C. W., Fritz, G., Schafer, B. W. (2002). S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front. Biosci.* **7**(64): d1356-1368.
- Hitomi, J., Kimura, T., Kusumi, E. *et al.* (1998). Novel S100 proteins in human esophageal epithelial cells: CAAF1 expression is associated with cell growth arrest. *Arch. Histol. Cytol.* **61**(71): 163-178.
- Hobbs, S., Jitrapakdee, S., Wallace, J. C. (1998). Development of a bicistronic vector driven by the human polypeptide chain elongation factor 1alpha promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**(151): 368-372.
- Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C. *et al.* (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97**(6): 889-901.
- Honda, K., Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **6**(178): 644-658.
- Hung, K. W., Hsu, C. C., Yu, C. (2013). Solution structure of human Ca(2+)-bound S100A12. *J. Biomol. NMR* **57**(119): 313-318.

- Hunter, M. J. , Chazin, W. J. (1998). High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. *J. Biol. Chem.* **273**(204): 12427-12435.
- Ilg, E. C., Troxler, H., Burgisser, D. M. *et al.* (1996). Amino acid sequence determination of human S100A12 (P6, calgranulin C, CGRP, CAAF1) by tandem mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**(116): 146-150.
- Inman, K. G., Yang, R., Rustandi, R. R. *et al.* (2002). Solution NMR structure of S100B bound to the high-affinity target peptide TRTK-12. *J. Mol. Biol.* **324**(80): 1003-1014.
- Ishihara, S., Rumi, M. A., Kadowaki, Y. *et al.* (2004). Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during Helicobacter pylori-associated gastritis. *J. Immunol.* **173**(242): 1406-1416.
- Ishii, K. J., Suzuki, K., Coban, C. *et al.* (2001). Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J. Immunol.* **167**(143): 2602-2607.
- Isobe, T. , Okuyama, T. (1978). The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **89**(68): 379-388.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54 Pt 1**(8): 1-13.
- Kagan, J. C. , Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**(170): 943-955.
- Kagan, J. C., Su, T., Horng, T. *et al.* (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* **9**(209): 361-368.
- Kaisho, T. , Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**(164): 979-987; quiz 988.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. , Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**(23): 115-122.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T. *et al.* (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* **167**(22): 5887-5894.
- Kessel, C., Fühner, S., Brockmeyer, S., Wittkowski, H. , Föll, D. (2015). OP0194 Hexameric S100A12 is Required for Pro-Inflammatory TLR4-Signalling. *Ann. Rheum. Dis.* **74**(252): 144-145.
- Kessel, C., Kreuz, W., Klich, K. *et al.* (2009). Multimerization of peptide mimotopes for blocking of factor VIII neutralizing antibodies. *ChemMedChem* **4**(154): 1364-1370.
- Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J. I. *et al.* (2007). Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* **130**(169): 906-917.
- Kim, S., Kim, S. Y., Pribis, J. P. *et al.* (2013). Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. *Mol. Med.* **19**(249): 88-98.
- Kiryushko, D., Novitskaya, V., Soroka, V. *et al.* (2006). Molecular mechanisms of Ca(2+) signaling in neurons induced by the S100A4 protein. *Mol. Cell. Biol.* **26**(161): 3625-3638.
- Kligman, D. , Hilt, D. C. (1988). The S100 protein family. *Trends Biochem. Sci.* **13**(47): 437-443.
- Kragelund, B. B., Jonsson, M., Bifulco, G. *et al.* (1998). Hydrophobic core substitutions in calbindin D9k: effects on Ca2+ binding and dissociation. *Biochemistry* **37**(199): 8926-8937.

- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**(195): 488-492.
- Lamazares, E., Clemente, I., Bueno, M., Velazquez-Campoy, A., Sancho, J. (2015). Rational stabilization of complex proteins: a divide and combine approach. *Sci. Rep.* **5**(243): 9129.
- Leclerc, E., Fritz, G., Weibel, M., Heizmann, C. W., Galichet, A. (2007). S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *J. Biol. Chem.* **282**(28): 31317-31331.
- Lee, H. K., Iwasaki, A. (2007). Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. *Semin. Immunol.* **19**(165): 48-55.
- Lee, S. A., Kwak, M. S., Kim, S., Shin, J. S. (2014). The role of high mobility group box 1 in innate immunity. *Yonsei Med. J.* **55**(184): 1165-1176.
- Leukert, N., Vogl, T., Strupat, K. *et al.* (2006). Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity. *J. Mol. Biol.* **359**(193): 961-972.
- Lotze, M. T., Tracey, K. J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* **5**(156): 331-342.
- Lye, E., Mirtsos, C., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W. C. (2004). The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **279**(171): 40653-40658.
- Marenholz, I., Lovering, R. C., Heizmann, C. W. (2006). An update of the S100 nomenclature. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**(57): 1282-1283.
- Marti, T., Erttmann, K. D., Gallin, M. Y. (1996). Host-parasite interaction in human onchocerciasis: identification and sequence analysis of a novel human calgranulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**(257): 454-458.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**(9): 428-435.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A., Jr. (1997a). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**(1): 295-298.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A., Jr. (1997b). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**(19): 394-397.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K. *et al.* (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* **5**(176): 503-507.
- Miranda, L. P., Tao, T., Jones, A. *et al.* (2001). Total chemical synthesis and chemotactic activity of human S100A12 (EN-RAGE). *FEBS Lett.* **488**(266): 85-90.
- Mittat, D. in *BD Bioscience Application Note* (ed R; McIntyre Paramba, C) (2011).
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**(186): 240-273, Table of Contents.
- Moore, B. W. (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**(67): 739-744.
- Moroz, O. V., Antson, A. A., Dodson, E. J. *et al.* (2002). The structure of S100A12 in a hexameric form and its proposed role in receptor signalling. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**(70): 407-413.

- Moroz, O. V., Antson, A. A., Grist, S. J. *et al.* (2003a). Structure of the human S100A12-copper complex: implications for host-parasite defence. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**(76): 859-867.
- Moroz, O. V., Antson, A. A., Murshudov, G. N. *et al.* (2001). The three-dimensional structure of human S100A12. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**(63): 20-29.
- Moroz, O. V., Blagova, E. V., Wilkinson, A. J., Wilson, K. S. , Bronstein, I. B. (2009a). The crystal structures of human S100A12 in apo form and in complex with zinc: new insights into S100A12 oligomerisation. *J. Mol. Biol.* **391**(49): 536-551.
- Moroz, O. V., Burkitt, W., Wittkowski, H. *et al.* (2009b). Both Ca²⁺ and Zn²⁺ are essential for S100A12 protein oligomerization and function. *BMC Biochem.* **10**(50): 11.
- Moroz, O. V., Dodson, G. G., Wilson, K. S., Lukanidin, E. , Bronstein, I. B. (2003b). Multiple structural states of S100A12: A key to its functional diversity. *Microsc. Res. Tech.* **60**(69): 581-592.
- Mukherjee, S., Chen, L. Y., Papadimos, T. J. *et al.* (2009). Lipopolysaccharide-driven Th2 cytokine production in macrophages is regulated by both MyD88 and TRAM. *J. Biol. Chem.* **284**(221): 29391-29398.
- Muta, T. , Takeshige, K. (2001). Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur. J. Biochem.* **268**(168): 4580-4589.
- Nishiya, T., Kajita, E. , Miwa, S. (2006). Ligand-independent oligomerization of TLR4 regulated by a short hydrophobic region adjacent to the transmembrane domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**(191): 1128-1134.
- Novitskaya, V., Grigorian, M., Kriajevska, M. *et al.* (2000). Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **275**(136): 41278-41286.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. , Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* **164**(145): 558-561.
- Ostendorp, T., Leclerc, E., Galichet, A. *et al.* (2007). Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J.* **26**(137): 3868-3878.
- Park, J. S., Svetkauskaite, D., He, Q. *et al.* (2004). Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.* **279**(179): 7370-7377.
- Parnot, C., Miserey-Lenkei, S., Bardin, S., Corvol, P. , Clauser, E. (2002). Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**(212): 336-343.
- Pedrocchi, M., Schafer, B. W., Mueller, H., Eppenberger, U. , Heizmann, C. W. (1994). Expression of Ca(2+)-binding proteins of the S100 family in malignant human breast-cancer cell lines and biopsy samples. *Int. J. Cancer* **57**(263): 684-690.
- Queiroz, J. A., Tomaz, C. T. , Cabral, J. M. (2001). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Biotechnol.* **87**(228): 143-159.
- Rallabhandi, P., Awomoyi, A., Thomas, K. E. *et al.* (2008). Differential activation of human TLR4 by Escherichia coli and Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide: combined effects of lipid A acylation state and TLR4 polymorphisms on signaling. *J. Immunol.* **180**(220): 1139-1147.

- Rammes, A., Roth, J., Goebeler, M. *et al.* (1997). Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **272**(83): 9496-9502.
- Rauci, A., Cugusi, S., Antonelli, A. *et al.* (2008). A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* **22**(33): 3716-3727.
- Ravasi, T., Hsu, K., Goyette, J. *et al.* (2004). Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. *Genomics* **84**(115): 10-22.
- Resman, N., Oblak, A., Gioannini, T. L., Weiss, J. P. , Jerala, R. (2014). Tetraacylated lipid A and paclitaxel-selective activation of TLR4/MD-2 conferred through hydrophobic interactions. *J. Immunol.* **192**(219): 1887-1895.
- Rety, S., Osterloh, D., Arie, J. P. *et al.* (2000). Structural basis of the Ca(2+)-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I. *Structure* **8**(78): 175-184.
- Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M. *et al.* (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* **6**(77): 89-95.
- Roelofs, M. F., Boelens, W. C., Joosten, L. A. *et al.* (2006). Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **176**(180): 7021-7027.
- Rolz, C., Pellegrini, M. , Mierke, D. F. (1999). Molecular characterization of the receptor-ligand complex for parathyroid hormone. *Biochemistry* **38**(213): 6397-6405.
- Roth, J., Vogl, T., Sorg, C. , Sunderkotter, C. (2003). Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol.* **24**(265): 155-158.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. , Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* **9**(121): 1503-1510.
- Rustandi, R. R., Baldisseri, D. M. , Weber, D. J. (2000). Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B(beta-beta). *Nat. Struct. Biol.* **7**(79): 570-574.
- Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T. *et al.* (2004). Ligand-dependent Toll-like receptor 4 (TLR4)-oligomerization is directly linked with TLR4-signaling. *J. Endotoxin Res.* **10**(152): 257-260.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K. *et al.* (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **6**(173): 1087-1095.
- Scaffidi, P., Misteli, T. , Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**(155): 191-195.
- Schafer, B. W. , Heizmann, C. W. (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* **21**(46): 134-140.
- Schafer, B. W., Wicki, R., Engelkamp, D., Mattei, M. G. , Heizmann, C. W. (1995). Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* **25**(58): 638-643.
- Schleicher, C. H., Dell'Angelica, E. C. , Santome, J. A. (1993). Isolation and N-terminal sequence of two low molecular weight calcium-binding proteins from pig granulocytes. *Int. J. Biochem.* **25**(53): 1251-1256.

- Shang, X., Cheng, H., Zhou, R. (2008). Chromosomal mapping, differential origin and evolution of the S100 gene family. *Genet. Sel. Evol.* **40**(262): 449-464.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H. *et al.* (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**(21): 1777-1782.
- Smith, S. P., Shaw, G. S. (1998). A change-in-hand mechanism for S100 signalling. *Biochem. Cell Biol.* **76**(74): 324-333.
- Srikrishna, G., Nayak, J., Weigle, B. *et al.* (2010). Carboxylated N-glycans on RAGE promote S100A12 binding and signaling. *J. Cell. Biochem.* **110**(162): 645-659.
- Srivastava, P. (2002). Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**(144): 185-194.
- Stein, L., Corporation, I. *Toll-like Receptors: Imgenex & Innate Immunity: the Story Toll'd ; Overview & Handbook.* (Imgenex, 2010).
- Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* **182**(239): 50.
- Strupat, K., Rogniaux, H., Van Dorsselaer, A., Roth, J., Vogl, T. (2000). Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionization-mass analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**(206): 780-788.
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**(131): 113-130.
- Sugimoto, M., Esaki, N., Tanaka, H., Soda, K. (1989). A simple and efficient method for the oligonucleotide-directed mutagenesis using plasmid DNA template and phosphorothioate-modified nucleotide. *Anal. Biochem.* **179**(198): 309-311.
- Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**(11): 805-820.
- Tanio, M., Inoue, S., Yokota, K. *et al.* (1999). Long-distance effects of site-directed mutations on backbone conformation in bacteriorhodopsin from solid state NMR of [1-¹³C]Val-labeled proteins. *Biophys. J.* **77**(235): 431-442.
- Taylor, J. W., Ott, J., Eckstein, F. (1985). The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. *Nucleic Acids Res.* **13**(197): 8765-8785.
- Teigelkamp, S., Bhardwaj, R. S., Roth, J. *et al.* (1991). Calcium-dependent complex assembly of the myeloid differentiation proteins MRP-8 and MRP-14. *J. Biol. Chem.* **266**(134): 13462-13467.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y. *et al.* (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26**(138): 171-176.
- Van Wezel, R., Liu, H., Wu, Z., Stanley, J., Hong, Y. (2003). Contribution of the zinc finger to zinc and DNA binding by a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* **77**(261): 696-700.
- Vandeyar, M. A., Weiner, M. P., Hutton, C. J., Batt, C. A. (1988). A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants. *Gene* **65**(196): 129-133.
- Viemann, D., Strey, A., Janning, A. *et al.* (2005). Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood* **105**(157): 2955-2962.

- Visintin, A., Latz, E., Monks, B. G., Espevik, T., Golenbock, D. T. (2003). Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **278**(185): 48313-48320.
- Vogl, T., Gharibyan, A. L., Morozova-Roche, L. A. (2012). Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. *International journal of molecular sciences* **13**(251): 2893-2917.
- Vogl, T., Ludwig, S., Goebeler, M. *et al.* (2004). MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood* **104**(120): 4260-4268.
- Vogl, T., Propper, C., Hartmann, M. *et al.* (1999a). S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14. *J. Biol. Chem.* **274**(82): 25291-25296.
- Vogl, T., Roth, J., Sorg, C., Hillenkamp, F., Strupat, K. (1999b). Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 detected by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**(205): 1124-1130.
- Wang, J., He, G. Z., Wang, Y. K. *et al.* (2015). TLR4-HMGB1-, MyD88- and TRIF-dependent signaling in mouse intestinal ischemia/reperfusion injury. *World J. Gastroenterol.* **21**(250): 8314-8325.
- Wendt, B., Hofmann, T., Martin, S. R. *et al.* (1988). Effect of amino acid substitutions and deletions on the thermal stability, the pH stability and unfolding by urea of bovine calbindin D9k. *Eur. J. Biochem.* **175**(200): 439-445.
- Wicki, R., Marenholz, I., Mischke, D., Schafer, B. W., Heizmann, C. W. (1996). Characterization of the human S100A12 (calgranulin C, p6, CAAF1, CGRP) gene, a new member of the S100 gene cluster on chromosome 1q21. *Cell Calcium* **20**(59): 459-464.
- Wilsmann-Theis, D., Wagenpfeil, J., Holzinger, D. *et al.* (2015). Among the S100 proteins, S100A12 is the most significant marker for psoriasis disease activity. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **25**(8): 258-262.
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E. *et al.* (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* **21**(224): 241-254.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**(259): 1431-1433.
- Xie, J., Burz, D. S., He, W. *et al.* (2007). Hexameric calgranulin C (S100A12) binds to the receptor for advanced glycated end products (RAGE) using symmetric hydrophobic target-binding patches. *J. Biol. Chem.* **282**(108): 4218-4231.
- Yamada, C., Sano, H., Shimizu, T. *et al.* (2006). Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. *J. Biol. Chem.* **281**(190): 21771-21780.
- Yan, L., Mathew, L., Chellan, B. *et al.* (2014). S100/Calgranulin-mediated inflammation accelerates left ventricular hypertrophy and aortic valve sclerosis in chronic kidney disease in a receptor for advanced glycation end products-dependent manner. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**(247): 1399-1411.
- Yan, W. X., Armishaw, C., Goyette, J. *et al.* (2008). Mast cell and monocyte recruitment by S100A12 and its hinge domain. *J. Biol. Chem.* **283**(102): 13035-13043.

- Yang, Z., deVeer, M. J., Gardiner, E. E. *et al.* (1996). Rabbit polymorphonuclear neutrophils form ³⁵S-labeled S-sulfo-calgranulin C when incubated with inorganic [³⁵S]sulfate. *J. Biol. Chem.* **271**(55): 19802-19809.
- Yang, Z., Tao, T., Raftery, M. J. *et al.* (2001). Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J. Leukoc. Biol.* **69**(84): 986-994.
- Yang, Z., Yan, W. X., Cai, H. *et al.* (2007). S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**(103): 106-114.
- Zhang, Y. L., Yao, Z. J., Sarmiento, M. *et al.* (2000). Thermodynamic study of ligand binding to protein-tyrosine phosphatase 1B and its substrate-trapping mutants. *J. Biol. Chem.* **275**(217): 34205-34212.
- Zimmer, D. B., Cornwall, E. H., Landar, A. , Song, W. (1995). The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res. Bull.* **37**(117): 417-429.

KAPITEL 7

ANHANG

7.1. Abkürzungsverzeichnis

α	anti	CAAF1	<i>Calcium-binding protein abundant in amniotic fluid 1</i>
A	Absorption	CBP	<i>Calcium binding protein</i>
A / Ala	Alanin	CCD	<i>charge-coupled device</i>
Abb.	Abbildung	CD	<i>cluster of differentiation</i>
AIEX	Anionenaustausch- chromatographie	cDNA	<i>complementary DNA</i>
AK	Antikörper	CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
Akt	Serin/Threonin Kinase	Cu	Kupfer
Amp	Ampicillin	CV	<i>column volume</i>
AP-1	Aktivator Protein 1	D / Asp	Asparaginsäure
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)	DAMP	<i>damage / danger associated molecular pattern</i>
APS	Ammoniumpersulfat	DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
AS	Aminosäure(n)	ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
bio	biotinyliert	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	DMSO	Dimethylsulfoxid
bzw.	beziehungsweise	DNA	Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius	dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'- triphosphat
C-terminal	am C-Terminus	dsDNA	doppelsträngige DNA
C-Terminus	Carboxyterminus	ε	Extinktionskoeffizient
Ca	Kalzium	E / Glu	Glutaminsäure
ca.	circa		

ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	HMGB1	<i>high mobility group box 1 protein</i>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure	HSP	<i>Heat shock protein</i>
EF1	EF-Hand 1	HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
EF2	EF-Hand 2		
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure	IB	Einschlusskörper (<i>inclusion bodies</i>)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	IFN	Interferon
EN-RAGE	<i>extracellular newly identified RAGE binding protein</i>	Ig	Immunglobulin
EP	Elutionspuffer	IgG	Immunglobulin G
<i>et al.</i>	<i>et alteri (und andere)</i>	IκB	<i>Inhibitor of κB</i>
EtBr	Ethidiumbromid	IKK	<i>IκB Kinase</i>
EU	<i>endotoxin unit</i>	IL	Interleukin
evtl.	eventuell	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
FCS	Fetales Kälberserum	IRAK	<i>Interleukin receptor associated kinase</i>
Fw	<i>forward</i>	IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
g	Gramm	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
g	mittlere Erdbeschleunigung	K / Lys	Lysin
GC	Glycin/Cystein	kb	Kilobasen
h	Stunde(n)	kDa	Kilodalton
H / His	Histidin	LB	Luria-Bertani
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>	LBP	LPS Bindeprotein
HEK293	<i>human embryonal kidney cells</i>	LP	Lysepuffer
HEK293/TCM	<i>human embryonal kidney cells TLR-4 CD14 MD2</i>	LPS	Lipopolysaccharid
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie	LRR	<i>leucin-rich repeat</i>

M	Molar	PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	PBS	<i>phosphate buffered sialin</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
MEKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>	PE	Phycoerythrin
min	Minute(n)	pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
mind.	mindestens	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
mL	Milliliter	PP	Probenpuffer
mM	millimolar	prim.	primär
MRP	<i>myeloid related protein</i>	PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>	P/S	Penicillin/Streptomycin
N / Asn	Asparagin	Q / Gln	Glutamin
N-terminal	am N-Terminus	qPCR	quantitative PCR
N-Terminus	Aminoterminus	RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
NEA	nichtessentielle Aminosäuren	Rev	<i>reverse</i>
neg	negativ	RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
ng	Nanogramm	RNA	Ribonukleinsäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid	RPL	ribosomales Protein <i>large subunit</i>
nm	Nanometer	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
nM	nanomolar	RT	Raumtemperatur
OD	optische Dichte	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
ori	Replikationsursprung	S / Ser	Serin
p.A.	pro Analysis	SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	sec	Sekunde(n)
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>	sek.	sekundär

Seq	Sequenzierung	ü.N.	über Nacht
Seqlab	<i>Sequence Laboratories, Göttingen</i>	ÜS	Überstand
sRAGE	lösliches (<i>soluble</i>) RAGE	UV	Ultraviolett
Tab.	Tabelle	V	Volt
TAE	Tris-Acetat-EDTA	v/v	Volumen pro Volumen
TAK	<i>transforming growth factor -β -activated kinase</i>	vgl.	vergleich
TANK	<i>TRAF family-member-associated NFκB activator</i>	w/v	Gewicht pro Volumen
TBK	<i>TANK binding kinase</i>	WB	Westernblot
TBS	<i>Tris buffered sialine</i>	wt	wildtyp
TE	Tris/EDTA	x	-fach / mal
TEMED	Tetramethylethylendiamine	z.B.	zum Beispiel
TF	Transkriptionsfaktor	ZK	Zellkultur
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor	Zn	Zink
TIRAP	<i>TIR-domain containing adaptor protein</i>		
TLR	<i>Toll-like receptor</i>		
TMB	Tetramethylbenzidin		
TNFα	Tumornekrosefaktor α		
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>		
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>		
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>		
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan		
U	<i>unit</i>		
u.a.	unter anderem		
UE	Untereinheit		

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: EF-Hand Motiv	11
Abb. 2.2: S100A12-Dimer.....	11
Abb. 2.3: Detaillierte Darstellung der Metall-Bindungsstellen	12
Abb. 2.4: Mögliche Übergänge zwischen der Dimer-, Tetramer- und Hexamer-Form von S100A12.....	14
Abb. 2.5: Schematischer Aufbau eines <i>Toll-like</i> Rezeptors	17
Abb. 2.6: Schematische Darstellung der TLR-4 Signalwege	21
Abb. 3.1: Absorptionsverlauf von DNA und Proteinen.	50
Abb. 4.1: Größenfiltration des wtS100A12.	57
Abb. 4.2: Zweite Größenfiltration der zuvor erhaltenen Retentate.....	58
Abb. 4.3: Sequenzvergleich von S100A9, S100A10 und S100A12.	59
Abb. 4.4: Alignment der AS-Sequenz des wtS100A12 und der jeweiligen Mutanten.....	60
Abb. 4.5: Alignment der AS-Sequenz des wtS100A12 und der jeweiligen Mutanten in pEF-IRES.	62
Abb. 4.6: Vergleich der Proteinmengen von S100A12-Mutanten im Zytosol und in Einschlusskörpern.	63
Abb. 4.9: HIC-Aufreinigung der Kalziumbindungs-Mutante N63A.	67
Abb. 4.10: HIC-Aufreinigung der Kalziumbindungs-Mutante E72A.....	68
Abb. 4.11: HIC-Aufreinigung der Kalziumbindungs-Doppelmutante N63/E72A.	69
Abb. 4.12: HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante H15A.	70
Abb. 4.13: HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante D25A.	71
Abb. 4.14: HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante H85A.	72
Abb. 4.15: HIC-Aufreinigung der Zinkbindungs-Mutante H89A.	73
Abb. 4.16: Bestätigung der Reinheit der aufgereinigten Proteine.	75
Abb. 4.17: Vergleich der Komplexmuster der S100A12-Proteine aus <i>E. coli</i> bzw. HEK293-Zellen.....	75
Abb. 4.18: UV-Spektren der S100A12-Mutanten.	76
Abb. 4.19: Titrationskurven der Antikörperbindung an die S100A12-Proteine unter intrazellulären Bedingungen.....	79
Abb. 4.20: Titrationskurven der Antikörperbindung an die S100A12-Proteine unter extrazellulären Bedingungen.....	80
Abb. 4.21: Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung des wtS100A12.....	82
Abb. 4.22: Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Kalziumbindungs-Mutanten....	83
Abb. 4.23: Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Zinkbindungs-Mutanten H15A und D25A.	84
Abb. 4.24: Kalzium- und Zink-abhängige Oligomerisierung der Zinkbindungs-Mutanten H85A und H89A.	85
Abb. 4.25: Rezeptorbindung von wtS100A12 unter verschiedenen Ionen-Bedingungen.	88
Abb. 4.26: Analyse der TLR-4-Bindung verschiedener S100A12-Proteine.	89
Abb. 4.27: Analyse der sRAGE-Bindung verschiedener S100A12-Proteine.	90
Abb. 4.28: Stimulation von HEK293/TCM-Zellen mit den S100A12-Mutanten und wtS100A12.	92
Abb. 4.29: Stimulation von THP1-Makrophagen mit den S100A12-Proteinen.	95

Abb. 4.30: Vergleich der THP1-Stimulationen mit und ohne α -TLR-4.	98
Abb. 7.1: Vergleich der Antikörperbindung unter intrazellulären- und extrazellulären Bedingungen.	133
Abb. 7.2: HIC-Aufreinigung.	133
Abb. 7.3: Ohne chemische Quervernetzung sind S100A12-Hexamere nicht stabil.	134

7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Reaktionsansatz für die Restriktion.	41
Tab. 3.2: PCR-Ansatz zum Einfügen der <i>Xba</i> I und <i>Bgl</i> II Schnittstellen in die mutierte S100A12-DNA.	41
Tab. 3.3: Temperaturprofil der PCR zum Einfügen der <i>Xba</i> I und <i>Bgl</i> II Schnittstellen in die mutierte S100A12-DNA.	42
Tab. 3.4: Ligationsansatz.	42
Tab. 3.5: Temperaturprofil der Ligation.	42
Tab. 3.6: Reaktionsansatz RT-PCR.	43
Tab. 3.7: Temperaturprofil.	43
Tab. 3.8: Reaktionsansatz qPCR.	43
Tab. 3.9: Primermix qPCR.	43
Tab. 3.10: Temperaturprofil der qPCR.	43
Tab. 3.11: Auswahlkriterien für das Primerdesign.	44
Tab. 3.12: Reaktionsansatz für die PCR der <i>Site-directed Mutagenesis</i>	44
Tab. 3.13: Temperaturprofil für die PCR der <i>Site-directed Mutagenesis</i>	45
Tab. 3.14: Sequenzierungsansatz.	45
Tab. 3.15: Auflistung der Ansätze für die verschiedenen ELISA-Anwendungen.	51
Tab. 3.16: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.	52
Tab. 3.17: Für die chemische Quervernetzung verwendete Kalzium- und Zinkkonzentrationen.	55
Tab. 4.1: Auflistung der LPS-Konzentrationen der aufgereinigten S100A12-Mutanten nach der Entfernung des Endotoxins mittels EndoTrap.	74
Tab. 7.1: Buchstabencode der für diese Arbeit wichtigen Aminosäuren.	132
Tab. 7.2: Übersicht über die Konzentration, den LPS-Gehalt und die Komplexformen der S100A12-Proteine.	132

7.4. Weitere Tabellen und Abbildungen

Tab. 7.1: Buchstabencode der für diese Arbeit wichtigen Aminosäuren.

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Histidin	His	H
Lysin	Lys	K
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T

Tab. 7.2: Übersicht über die Konzentration, den LPS-Gehalt und die Komplexformen der S100A12-Proteine.

	S100A12	Konzentration	LPS	intrazelluläre Komplexe	extrazelluläre Komplexe
	wtS100A12	1000 µg/mL	0 EU/mL	25 % Monomer 68 % Dimer 7 % Tetramer 0 % Hexamer	<1 % Monomer 1 % Dimer 52 % Tetramer 46 % Hexamer
Kalziumbindungs-Mutanten	N63A	1000 µg/mL	13 EU/mL	37 % Monomer 63 % Dimer 0 % Tetramer 0 % Hexamer	33 % Monomer 64 % Dimer 3 % Tetramer 0 % Hexamer
	E72A	600 µg/mL	29 EU/mL	31 % Monomer 69 % Dimer 0 % Tetramer 0 % Hexamer	16 % Monomer 84 % Dimer 0 % Tetramer 0 % Hexamer
	H15A	1000 µg/mL	63 EU/mL	32 % Monomer 67 % Dimer 1 % Tetramer 0 % Hexamer	22 % Monomer 23 % Dimer 32 % Tetramer 23 % Hexamer
Zinkbindungs-Mutanten	D25A	1000 µg/mL	109 EU/mL	32 % Monomer 49 % Dimer 13 % Tetramer 6 % Hexamer	43 % Monomer 15 % Dimer 26 % Tetramer 16 % Hexamer
	H85A	1000 µg/mL	17 EU/mL	22 % Monomer 78 % Dimer 0 % Tetramer 0 % Hexamer	17 % Monomer 52 % Dimer 26 % Tetramer 5 % Hexamer
	H89A	1000 µg/mL	130 EU/mL	31 % Monomer 69 % Dimer 0 % Tetramer 0 % Hexamer	0 % Monomer 26 % Dimer 46 % Tetramer 28 % Hexamer

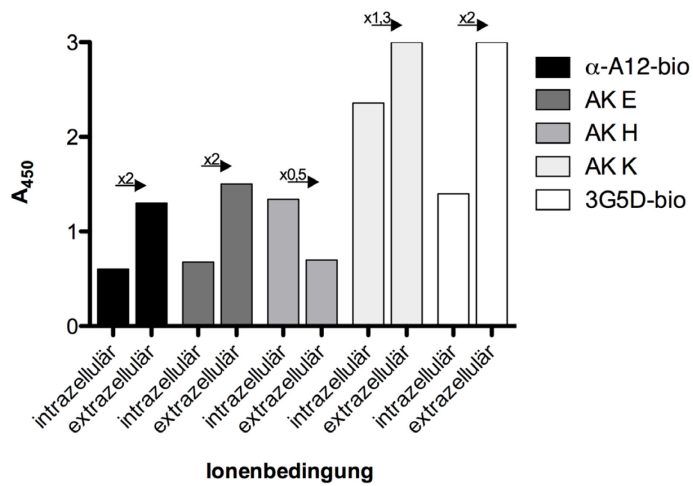


Abb. 7.1: Vergleich der Antikörperbindung unter intrazellulären- und extrazellulären Bedingungen.

Die Signalintensitäten unterscheiden sich für die einzelnen AK in Abhängigkeit der Komplexform des wtS100A12. Bis auf den AK H ist das Signal bei allen AK für das Hexamer (extrazelluläre Ionenbedingung) um das 1,3-2-fache stärker im Vergleich zum Dimer (intrazelluläre Ionenbedingung). Für den AK K ist das Ergebnis umgekehrt, hier ist das Signal für das Dimer um das 1,5-fache stärker als für das Hexamer.

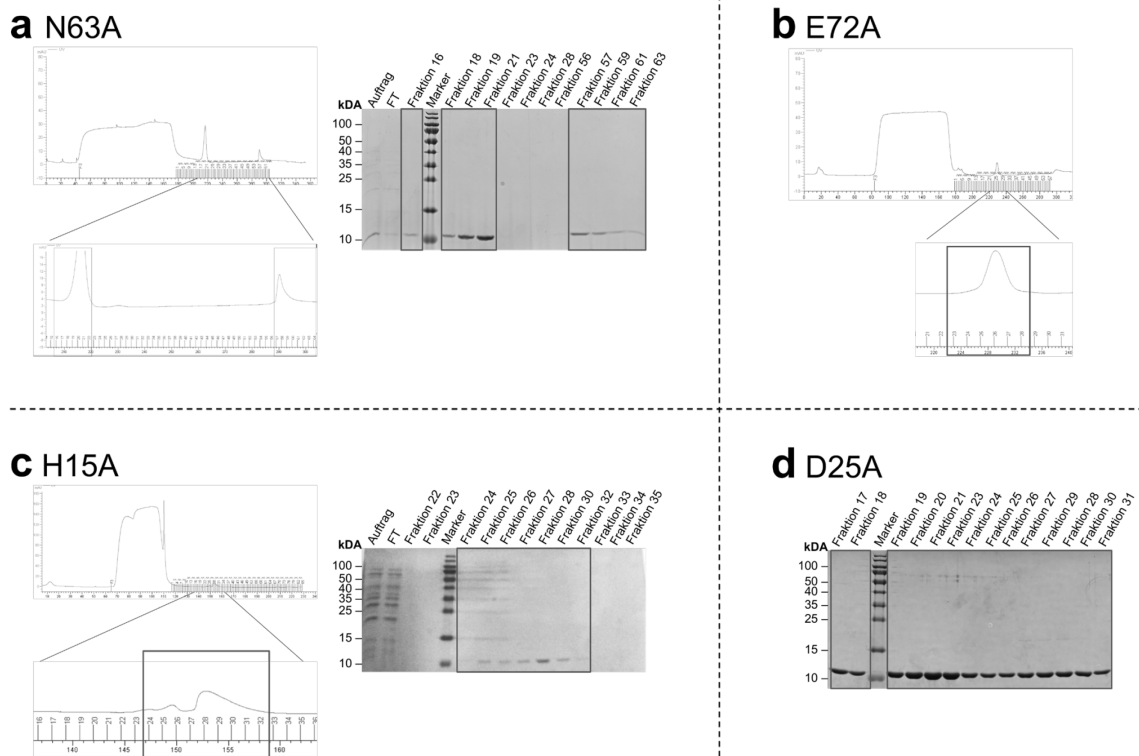


Abb. 7.2: HIC-Aufreinigung.

Dargestellt sind die Chromatogramme und/oder Coomassie-Färbung denaturierender PAGEs der jeweils letzten HIC-Aufreinigung der Mutante N63A (a), E72A (b) H15A (c) und D25A (d). Die umrahmten Bereiche enthalten ausschließlich S100A12 und sind für die weiteren Schritte eingesetzt worden.

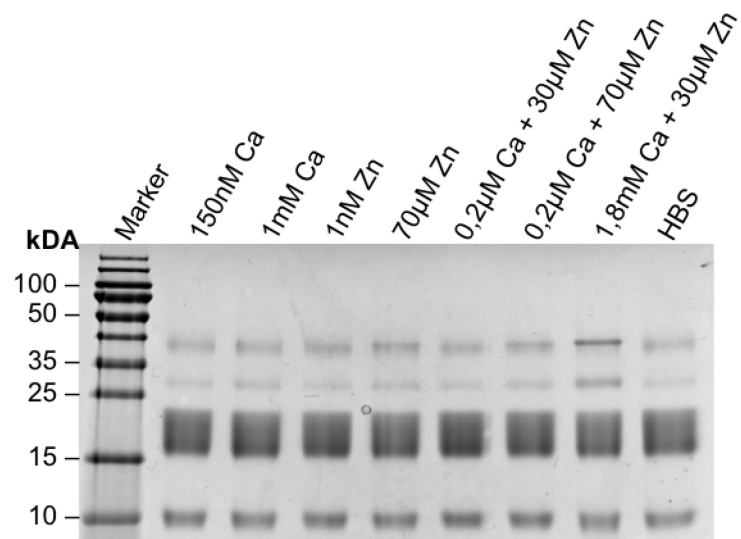


Abb. 7.3: Ohne chemische Quervernetzung sind S100A12-Hexamere nicht stabil.

Dargestellt ist die Coomassie-Färbung einer semi-nativen PAGE. wtS100A12 ist unter den angegebenen Bedingungen inkubiert und ohne Quervernetzung auf das Gel geladen worden. Für alle Ionenkonzentration sind die gleichen Bandenmuster zu erkennen.

7.5. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen worden sind, als solche kenntlich gemacht habe.

Münster,

Sonja Brockmeyer

