

**Der Signaltransduktor gp130: NMR-spektroskopische  
Untersuchungen zur Strukturaufklärung der  
membranproximalen Domänen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

**Michael Pachta**

Kiel  
Dezember 2004

Referentin: Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst

Korreferent: PD Dr. Joachim Grötzing

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Februar 2005

Zum Druck genehmigt: Kiel, 09. Februar 2005

Der Dekan

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Zytokine und ihre Rezeptoren . . . . .	1
1.1.1	Funktionen der Zytokine . . . . .	1
1.1.2	Hämatopoetische Zytokinrezeptoren . . . . .	2
1.1.3	Die gp130-Zytokine . . . . .	3
1.1.4	Strukturelle Aspekte und Stöchiometrie der Aktivierung von gp130 . . . . .	4
1.2	NMR-Spektroskopie . . . . .	5
1.2.1	Grundlagen der NMR-Spektroskopie . . . . .	5
1.2.2	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie . . . . .	9
1.2.3	Dreidimensionale NMR-Spektroskopie . . . . .	10
1.3	Ziele der Arbeit . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Verbrauchsmaterial . . . . .	14
2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	15
2.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	15
2.2.2	Enzymatischer Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen . . . . .	17
2.2.3	Phenol-Extraktion und DNA-Fällung . . . . .	18
2.2.4	DNA-Ligation . . . . .	19
2.2.5	Transformation kompetenter Bakterien . . . . .	20
2.2.6	Kultivierung von Bakterien . . . . .	22
2.3	Proteinchemische Methoden . . . . .	23
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	23
2.3.2	Reinigung und Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i> . . . . .	24
2.3.3	Renaturierung von Proteinen . . . . .	25
2.3.4	Aufkonzentrierung von D5D6-Lösungen . . . . .	25
2.3.5	Größenausschlusschromatographie . . . . .	25

2.3.6	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	26
2.4	Circularer Dichroismus (CD-Spektroskopie)	26
2.5	NMR-Spektroskopie	27
2.5.1	Probenvorbereitung	27
2.5.2	NMR-Experimente	27
2.6	Erstellung von Homologiemodellen der fünften und sechsten Domäne des gp130	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1	Klonierung	30
3.2	Expression von D5D6	30
3.3	Größenausschlusschromatographie	31
3.3.1	Kalibration der Säule	31
3.3.2	Reinigung von D5D6	33
3.4	Aufkonzentrieren von D5D6-Lösungen	34
3.5	Circularer Dichroismus (CD-Spektroskopie)	34
3.5.1	Temperaturstabilität	35
3.6	NMR-Spektroskopie: die sequentielle Zuordnungsstrategie	37
3.6.1	Das 3D-HNCA-Experiment	39
3.6.2	Das 3D-CBCA(CO)NH-Experiment	40
3.6.3	Das 3D-HN(CA)HA-Experiment	42
3.6.4	Das 15N-NOESY-HSQC-Experiment	43
3.7	Zuordnung der Signale im HSQC-Spektrum	44
3.8	Das molekulare Modell der fünften und sechsten Domäne des gp130	48
3.8.1	Das sequentielle <i>alignment</i>	48
3.8.2	Sekundärstruktur der molekularen Modelle	49
3.9	Die Faltblatt-Topologie der fünften und sechsten Domäne des gp130	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1	Die membranproximalen Domänen des gp130	60
4.2	Motivation	61
4.3	Darstellung von gp130D5D6	61
4.4	Die Zuordnung der Resonanzen des Proteinerückgrates	63
4.5	Die Sekundärstruktur der fünften und sechsten Domäne des gp130	64
4.6	Ausblick	69
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>

<b>6 Summary</b>	<b>71</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Zytokine und ihre Rezeptoren

### 1.1.1 Funktionen der Zytokine

Jeder Organismus benötigt zur Koordination der vielfältigen Funktionen seiner Zellen und Organe ein ausgeprägtes Kommunikationsnetzwerk. Dieses Netzwerk wird u.a. durch eine Vielzahl sezernierter humoraler Faktoren gewährleistet, die von spezifischen zellulären Oberflächenrezeptoren erkannt werden und daraufhin definierte Antworten hervorrufen.

Neben den klassischen Hormonen, die von spezialisierten Organen produziert werden und endokrin über den Blutstrom auf das Zielgewebe einwirken, gibt es eine Vielzahl von Faktoren, die parakrin und autokrin wirken. Im Unterschied zu den klassischen Hormonen werden die als Gewebshormone bezeichneten Faktoren meist von mehreren verschiedenen Gewebe- bzw. Zelltypen produziert. Zu ihnen zählen niedermolekulare Substanzen wie z.B. Prostaglandine, aber auch eine große Zahl regulatorischer Polypeptide, u.a. die sogenannten Zytokine. Unter dem Begriff Zytokine werden allgemein solche Polypeptid-Gewebshormone zusammengefasst, die auch (aber meist nicht ausschließlich) auf Zellen des Immunsystems einwirken. Zu den Funktionen der Zytokine zählen im Wesentlichen:

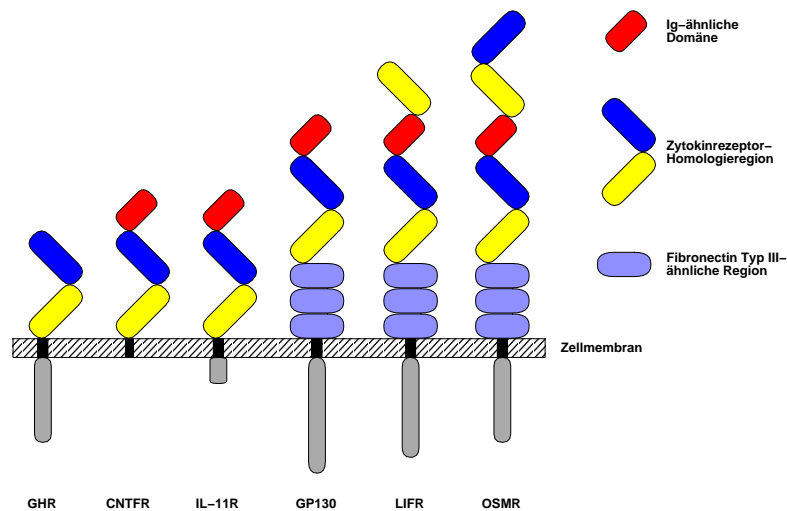
- **Hämatopoese** – Steuerung der Entwicklung und Reifung der unterschiedlichen Blutzellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen.
- **Immunregulation** – Ausbildung einer effizienten adaptiven Immunantwort auf bakterielle oder virale Infektionen durch Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von B- und T-Lymphozyten.
- **Entzündung und Akutphase-Reaktion** – Koordination von Entzündungs- und Akutphase-Reaktionen des Organismus durch Aktivierung von phagozytierenden Zellen, Synthese von Akutphase-Plasmaproteinen sowie differenzierte Permeabilisierung des Endothels.

Darüber hinaus wird Zytokinen auch eine wichtige Bedeutung als neurotrophen Faktoren zugewiesen. Ihre essentiellen Funktionen vermitteln die Zytokine über Interaktionen

mit spezifischen Oberflächenrezeptoren auf ihren Zielzellen. Die Bindung an den Rezeptor leitet eine intrazelluläre Signalkaskade ein, an deren Ende eine definierte Zellantwort steht.

### 1.1.2 Hämatopoetische Zytokinrezeptoren

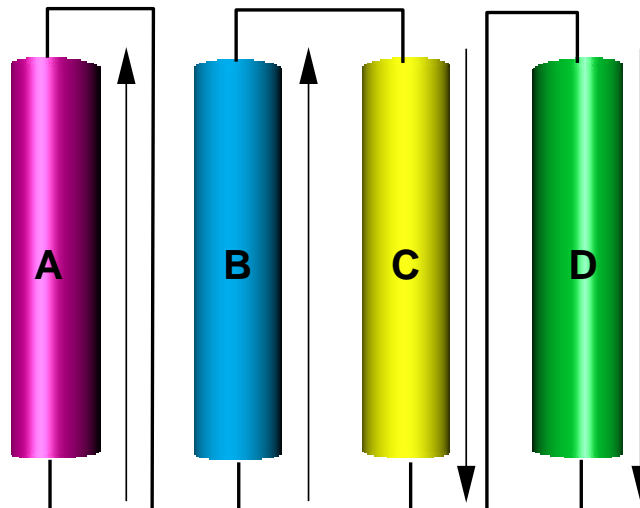
Die Familie der hämatopoetischen Zytokinrezeptoren wurde definiert aufgrund gemeinsamer struktureller Merkmale (Bazan, 1990b). Der extrazelluläre Bereich der Rezeptoren enthält mindestens ein zytokinbindendes Modul (ZBM), das aus zwei Fibronectin-Typ-III-(FN-Typ-III)-ähnlichen Domänen besteht, von denen die membran-distale, N-terminale Domäne vier konservierte Cysteinreste und die membran-proximale, C-terminale Domäne ein WSXWS-Motiv enthält. Die Mitglieder der Familie hämatopoetischer Zytokinrezeptoren sind modular aufgebaut, zeigen jedoch in ihrer Konstitution eine individuelle Anzahl und Abfolge von Domänen bzw. Domärentypen (Abbildung 1.1). Allen ist jedoch gemeinsam, dass sie keine intrinsische Kinaseaktivität in der zytoplasmatischen Region besitzen. Die Signaltransduktion erfolgt nach Rezeptoraktivierung über eine Kaskade sequentieller zytoplasmatischer Phosphorylierungsereignisse.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung einiger Vertreter der Rezeptoren der Interleukin-6-Typenfamilie: GHR (*Growth Hormone Receptor*), CNTFR (*Ciliary Neurotrophic Factor Receptor*), IL11-R (Interleukin-11 Rezeptor), gp130 (Glycoprotein 130), OSMR 1 (Oncostatin M Rezeptor 1) und LIFR (*Leukemia Inhibitory Factor Receptor*).

### 1.1.3 Die gp130-Zytokine

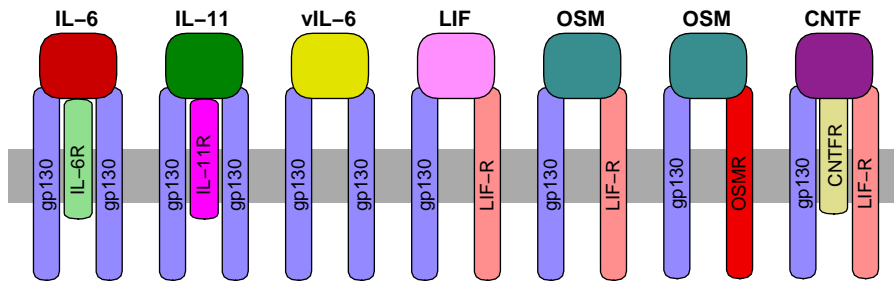
Aufgrund der gemeinsamen Nutzung des Signaltransduktors gp130 werden die zur Interleukin-6-Familie zählenden Zytokine Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), virales Interleukin-6 (vIL-6), *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), Cardiotrophin-1 (CT-1), Oncostatin M (OSM), *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), *Cardiotrophin-like cytokine* (CLC) und Neuropoietin (NPN) (Taga und Kishimoto, 1997; Derouet et al., 2004) auch als gp130-Zytokine bezeichnet (Abbildung 1.3). Strukturell zeichnen sich diese Zytokine durch ein Vier-Helix-Bündel mit einer charakteristischen *Up-Up-Down-Down*-Topologie aus (Bazan, 1990a) (Abbildung 1.2), welche bisher nur bei Zytokinen beobachtet wurde (Grötzinger, 2002). Dabei sind die beiden Helices A und B sowie die beiden Helices C und D jeweils durch einen langen *loop*, die beiden Helices B und C durch einen kurzen *loop* verbunden.



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung eines vier-Helix-Bündel-Zytokins mit *Up-Up-Down-Down*-Topologie.

Die Zytokine IL-6, IL-11, CNTF, NPN und CLC binden zunächst an einen spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor, danach erfolgt die Bildung des signaltransduzierenden Komplexes durch Bindung von zwei  $\beta$ -Rezeptoruntereinheiten an diesen Primärkomplex. Im Falle von IL-6 und IL-11 binden zwei Moleküle gp130 an den Primärkomplex, oder, wie im Fall von CTNF, NPN und CLC, die zunächst an den CTNF-Rezeptor binden, wird der signaltransduzierende Komplex durch Bildung eines Heterodimers von je einem gp130 und einem LIF-Rezeptor erzeugt (Taga und Kishimoto, 1997; Rose-John, 2001). OSM und LIF besitzen keinen  $\alpha$ -Rezeptor, sondern bilden den signaltransduzierenden Kom-





**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung verschiedener gp130-Zytokine mit ihren signaltransduzierenden Untereinheiten

plex mit je einem gp130 und einem LIFR. Das virale Interleukin-6 (vIL-6) bildet mit zwei Einheiten gp130 einen signaltransduzierenden Komplex (Hoischen et al., 2000). Garcia u. a. gelang es, diesen tetrameren Komplex zu kristallisieren und seine dreidimensionale Struktur aufzuklären (Chow et al., 2001). CT-1 bindet direkt an den LIF-Rezeptor und induziert dadurch die Bildung eines Heterodimers aus LIF-R und gp130. Es ist nicht bekannt, ob CT-1 einen spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor besitzt, aber es gibt Hinweise, dass ein spezifischer Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerter Rezeptor auf Nervenzellen existiert (Pennica et al., 1996).

Untersuchungen an Tiermodellen zeigen die besondere Bedeutung von gp130 als zentralem Mediator für Signale der gp130-Zytokine. So sind gp130-*Knock-Out*-Mäuse nicht lebensfähig; sie sterben schon während der Phase der frühen Embryonalentwicklung. *Knock-Out*-Mäuse, bei denen eine gezielte postnatale Inaktivierung von gp130 möglich ist, entwickeln nach kurzer Zeit schwere hämatopoetische, hepatische, neurologische, cardiale, immunologische und pulmonale Defekte (Betz et al., 1998; Hirota et al., 1999; Heinrich et al., 1998).

#### 1.1.4 Strukturelle Aspekte und Stöchiometrie der Aktivierung von gp130

Die funktionale Form des gp130 besteht aus 896 Aminosäureresten. Der 597 Aminosäurereste umfassende Extrazellulärteil besteht aus sechs Domänen; einer N-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domäne (D1), zwei Fibronectin-Typ-III-Domänen, welche gemeinsam das Zytokinbindende Modul (ZBM) bilden (D2 und D3) und drei weiteren Fibronectin-Typ-III-Domänen (D4, D5 und D6). Dem C-Terminus von D6 folgt die Transmembranregion mit 22 überwiegend hydrophoben Aminosäureresten und der bisher strukturell nicht charakterisierte zytoplasmatische Teil, bestehend aus 277 Aminosäureresten.

Die Bindung von Zytokinen an gp130 erfolgt über drei konservierte Rezeptor-bindende Epitope (*sites* I–III), wobei *site* III ein spezielles Merkmal der gp130-Zytokine ist (Gröt-

zinger et al., 1997). Gp130 erkennt Liganden über seine Zytokin-bindende Homologie-Region (CHR, *cytokine binding homology region*), welche auf den Domänen 2 und 3 (D2 und D3) lokalisiert ist (Bazan, 1990b; Grötzinger et al., 1997; Simpson et al., 1997; Bravo und Heath, 2000). Zusätzlich ist die Beteiligung der N-terminalen Domäne (D1) notwendig, um Zytokine zu binden (Hammacher et al., 1998; Kurth et al., 1999).

Uneinigkeit herrscht über die Stöchiometrie der signaltransduzierenden IL-6-Rezeptorkomplexe. Mittels biophysikalischer Methoden konnte ein löslicher hexamerer Rezeptorkomplex nachgewiesen werden, der aus je zwei Molekülen IL-6, IL-6R und gp130 besteht (Ward et al., 1996). Kürzlich wurde außerdem ein hexamerer Komplex aus je zwei Molekülen IL-6, IL-6R und gp130 kristallisiert (Boulanger et al., 2003). Andererseits existiert ein alternatives Aktivierungsmodell für den gp130-Rezeptorkomplex, welches auf einem tetrameren Rezeptorkomplex basiert (Grötzinger et al., 1999). Dieses Modell wird unterstützt durch mehrere Struktur-Funktionsanalysen von gp130 und gp130-Zytokinen (Kallen et al., 1999; Pflanz et al., 2000). Schließlich konnte aktuell *in vitro* gezeigt werden, dass ein dimerer Komplex von gp130 zunächst einen IL-6/IL-6R-Komplex bindet und erst bei höheren Ligandenkonzentrationen die Bindung eines zweiten IL-6/IL-6R-Komplexes erfolgt (Schroers et al., *in press*).

## 1.2 NMR-Spektroskopie

Die wichtigste Methode zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen ist - neben der Röntgenstrukturanalyse - die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) (Stryer, 1999). Im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse erlaubt die NMR-Spektroskopie die Untersuchung von Proteinen in Lösung, so dass auch dynamische Effekte unter physiologischen Bedingungen beobachtbar werden (Cavanagh et al., 1996). Bei Anwendung der NMR-Spektroskopie auf Proteine ist deren Molekularmasse ein limitierender Faktor. Heutzutage sind Proteine mit Molekülmassen bis 80 kD der Strukturaufklärung mittels der NMR-Spektroskopie zugänglich (Lottspeich und Zorbas, 1998). Wüthrich hat kürzlich gezeigt, dass diese Grenze durch Verwendung spezieller Techniken auf mehr als 100 kD verschoben werden kann (Fiaux et al., 2002; Riek et al., 2002).

### 1.2.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie beruht auf den magnetischen Eigenschaften von Atomkernen. Der Kernmagnetismus wird bestimmt durch das magnetische Moment  $\mu$  eines Atom-

## 1 Einleitung

kerns, welches definiert ist als

$$\mu = \gamma \cdot I$$

mit  $I$  als dem *Kernspin* und  $\gamma$  als dem *gyromagnetischen Verhältnis*, einer Konstanten, die für jede Kernart charakteristisch ist. Für einen  $^1\text{H}$ -Kern beträgt sie beispielsweise  $2,67519 \cdot 10^8 \text{ (T}\cdot\text{s)}^{-1}$  (Lottspeich und Zorbas, 1998). Der Kernspin  $I$  gibt den Gesamtdrehimpuls eines Atomkerns an und wird bestimmt durch die Einzelspins der Protonen und Neutronen (mit jeweils einem Spin von  $1/2$ ) sowie deren Bahndrehimpuls, der immer geradzahlig ist. Es gibt kein einfaches Modell, um Kernspins vorherzusagen, eine empirische Regel aber besagt, dass nur Kerne mit gerader Massenzahl und gerader Ordnungszahl den Kernspin von  $I = 0$  haben (Galla, 1988) (Tabelle 1.1).

Alle Kerne mit einem Kernspin  $I \neq 0$  zeigen ein magnetisches Moment und können nach den Gesetzen der Quantenmechanik in einem äußeren Magnetfeld nur diskrete Energiezustände einnehmen. Die Resonanzfrequenz eines Kerns ist gegeben, wenn zwischen dem magnetischen Moment eines Atomkerns in einem konstanten Magnetfeld und einem elektromagnetischen Hochfrequenzfeld mit einer bestimmten Frequenz und Polarisation eine Wechselwirkung erfolgt. Unter dem Einfluss des Hochfrequenzfeldes werden zwischen den verschiedenen Energiezuständen der Kerne Übergänge angeregt. Die Energiedifferenz wird als Signal registriert und als Resonanzfrequenz in einem Spektrum abgebildet. In der hochauflösenden NMR-Spektroskopie werden überwiegend Kerne mit einem Spin  $I=1/2$  untersucht. Kerne mit einem Spin von Null liefern aufgrund fehlenden magnetischen Momentes kein Resonanzsignal und sind somit nicht detektierbar. Kerne mit einem Spin von  $I > 1/2$  besitzen ein hohes elektrisches Quadrupolmoment, was zu einer starken Linienverbreiterung führt und somit keine scharfen Signale zulässt (Galla, 1988).

Kerne mit dem Spin  $1/2$  können in einem Magnetfeld  $\vec{B}_0(\uparrow)$  nur zwei Orientierungen einnehmen; entweder den parallel ausgerichteten  $\alpha$ -Zustand ( $\uparrow \uparrow$  *spin up*) oder den

**Tabelle 1.1:** Ordnungszahl, Massenzahl und Kernspin einiger ausgewählter Atome (Galla, 1988).

Kern	Ordnungszahl	Massenzahl	Kernspin $I$
$^1\text{H}$	1	1	$1/2$
$^2\text{H}$	1	2	1
$^{14}\text{N}$	7	14	1
$^{15}\text{N}$	7	15	$1/2$
$^{12}\text{C}$	6	12	0
$^{13}\text{C}$	6	13	$1/2$

## 1 Einleitung

antiparallelen  $\beta$ -Zustand ( $\uparrow\downarrow$  *spin down*). Im Grundzustand, dem thermischen Gleichgewicht, ist der  $\alpha$ -Zustand energetisch günstiger als der  $\beta$ -Zustand. Entsprechend der Boltzmann-Verteilung ist daher der  $\alpha$ -Zustand mit höherer Wahrscheinlichkeit besetzt. Diese Differenz der Besetzungszahl führt zu einer messbaren makroskopischen Gleichgewichtsmagnetisierung  $M_0$ , die sich in Richtung des angelegten Magnetfeldes ausbildet (z- oder longitudinale Magnetisierung). Dieser Gleichgewichtszustand kann durch ein hochfrequentes, elektromagnetisches Wechselfeld, das senkrecht zum äusseren Magnetfeld eingestrahlt wird, gestört werden. Danach wird die longitudinale Magnetisierung aus der Achse des Magnetfeldes  $\vec{B}_0$  ausgelenkt und in transversale (x,y)-Magnetisierung überführt (Friebolin, 1999).

Die mit der Larmor-Frequenz  $\omega$  präzedierende transversale Magnetisierung wird durch Relaxationsprozesse zurück in longitudinale Magnetisierung überführt. Die zeitabhängige Änderung der makroskopisch beobachtbaren Magnetisierung wird durch die Bloch'schen Gleichungen beschrieben (Ernst et al., 1987):

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad \frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2} \quad \frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2}$$

Die Relaxation gehorcht einem Zeitgesetz erster Ordnung; die Abnahme der Magnetisierung ist also proportional der vorhandenen Magnetisierung. Die Proportionalitätskonstanten sind die Kehrwerte der longitudinalen oder Spin-Gitter Relaxationszeit  $T_1$  sowie der transversalen oder Spin-Spin Relaxationszeit  $T_2$  (Friebolin, 1999).

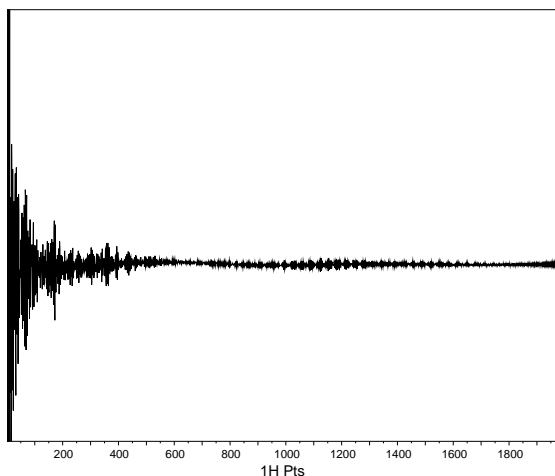
Die Präzessionsfrequenz eines Kerns ergibt sich anteilig aus dem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  und dem effektiven Feld  $B_{eff}$ . Dieses Feld wird durch die lokalen, zusätzlichen Magnetfelder benachbarter Kerne maßgeblich mitbestimmt, so dass die Resonanzfrequenz für jeden Kern unterschiedlich ist – was für die NMR-Spektroskopie von größter Bedeutung ist. Die Frequenzen werden per Konvention als Quotient aus der Differenz zur Trägerfrequenz ( $\omega_0 - \omega$ ) und der Resonanzfrequenz angeben und liegen für eine Kernsorte im Bereich nur weniger ppm (*parts per million*):

$$\delta_{ppm} = \frac{\omega - \omega_0}{\omega} \cdot 10^6$$

Die Größe  $\delta_{ppm}$  wird als *chemische Verschiebung* einer Resonanzfrequenz bezeichnet. Von ihrem Wert kann bereits auf die Zugehörigkeit zu bestimmten Molekülgruppen eines Moleküls geschlossen werden.

Bei der NMR-Spektroskopie wird als Messsignal die zeitliche Entwicklung der transversalen Magnetisierung erhalten. Es setzt sich zusammen aus einer Überlagerung von

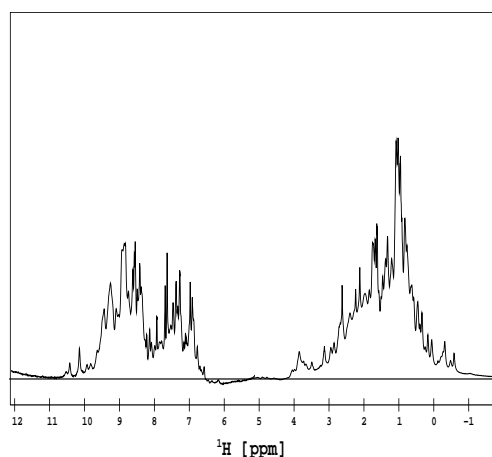
## 1 Einleitung



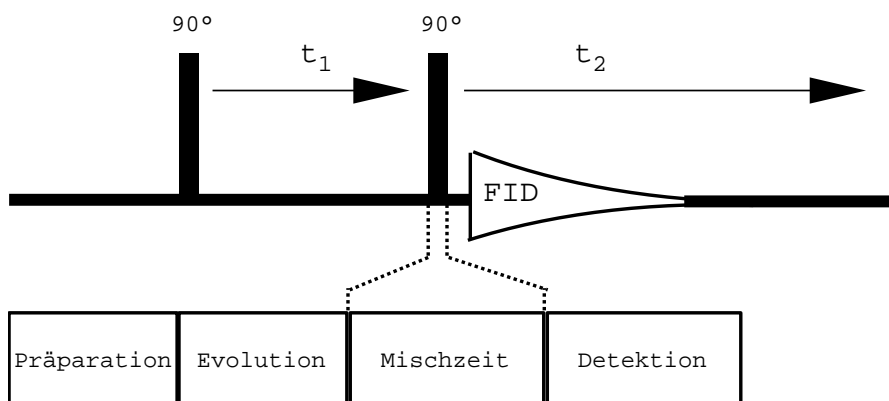
**Abbildung 1.4:** Beispiel für einen (zeitabhängigen) Freien Induktionsverfall (FID, aus einem eindimensionalen NMR-Experiment mit gp130D5D6). Dieses Signal enthält sämtliche Frequenzen aller im NMR-Experiment angeregten magnetisch äquivalenten Protonen. Diese Frequenzen werden durch Fourier-Transformation aus dem Signal extrahiert.

Sinusschwingungen aller Präzessionsfrequenzen einer Kernsorte. Der zu beobachtende „Verfall“ (engl. *decay*) der Amplituden dieses Signals wird bezeichnet als „Freier Induktionsverfall“ (FID, engl. *free induction decay*) (Abbildung 1.4).

Ein Verschwinden des Signals (d.h. der vollständige Verfall) ist erreicht, wenn das System, das zur Resonanz angeregt wurde, wieder den Gleichgewichtszustand eingenommen hat. Mit Hilfe einer mathematischen Methode, der *diskreten Fourier-Transformation* (DFT oder kurz FT), können anschließend die Messdaten aus der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne überführt werden, um somit ein (eindimensionales) Spektrum zu erhalten (Hoch und Stern, 1996) (Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5:** Das Spektrum, das durch Fourier-Transformation des FID in Abbildung 1.4 entsteht. Im Bereich von 0–3 ppm finden sich die Signale der Seitenkettenprotonen (ausgenommen  $\alpha$ -Protonen, deren Resonanzen um die 4 ppm liegen; sie werden vom Signal des Wassers, das hier nicht dargestellt ist, überlagert), im Bereich von 7–10 ppm die Signale der Amidprotonen.



**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung eines 2D-NMR-Experiments am Beispiel der Pulssequenz des COSY-Experiments, nach (Lottspeich und Zorbas, 1998).

### 1.2.2 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Um nun die eindimensionale NMR-Spektroskopie auf mehrere Dimensionen zu erweitern, werden zusätzliche Frequenzachsen eingeführt (Ernst et al., 1987). Die Zeitdimension der Datenaufnahme ist durch die  $t_2$ -Zeit festgelegt; weitere Zeitdomänen werden durch die Anordnung der Wartezeiten und der Pulssequenz erzeugt. Die FIDs aus den Zeitdomänen werden gesammelt und nacheinander durch eine Fourier-Transformation in die Frequenzdomäne überführt. Jeder Zeitdomäne entspricht daher im Spektrum einer Frequenzachse, auf der dann die entsprechenden Signale abgebildet werden.

Der zeitliche Verlauf eines 2D-Experiments lässt sich in vier Perioden einteilen: Präparation - Evolution( $t_1$ ) - Mischung - Detektion( $t_2$ ) (Abbildung 1.6). Die Spins können nach der Präparation während einer festen Zeit  $t_1$  frei präzedieren. Die Magnetisierung wird während  $t_1$  gleichsam mit der chemischen Verschiebung des ersten Kerns „markiert“. Durch die Mischsequenz wird anschließend der Zustand der Magnetisierung am Ende von  $t_1$  abgefragt, sowie Magnetisierung vom ersten Kern auf einen anderen übertragen. Den Abschluss des Experiments bildet die Datenakquisition ( $t_2$ -Zeit), in der die Magnetisierung mit der chemischen Verschiebung des zweiten Kerns markiert wird. Nach Fourier-Transformation in der  $t_2$ -Richtung erhält man somit ein gewöhnliches eindimensionales Spektrum. In weiteren Einzelexperimenten wird jeweils nur die Zeit  $t_1$  um einen festen Betrag erhöht, so dass eine Abfolge von Einzelaufnahmen entsteht. Durch eine weitere Fourier-Transformation entlang der  $t_1$ -Richtung entsteht das endgültige 2D-Spektrum (Lottspeich und Zorbas, 1998).

### 1.2.3 Dreidimensionale NMR-Spektroskopie

Die Einführung einer weiteren Dimension schließlich führt zur 3D-NMR-Spektroskopie. Ein 3D-Experiment kann aus einem 2D-Experiment dadurch konstruiert werden, indem nach der ersten Mischperiode statt der Akquisition eine weitere indirekte Evolutionszeit, gefolgt von einer zweiten Mischperiode, eingefügt wird. Am Ende folgt wiederum die Datenakquisition (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Im Falle der homonuklearen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie ist die Technik jedoch nicht ausreichend zur Strukturaufklärung von größeren Proteinen. Einerseits wächst mit der Größe des Proteins die Anzahl der Wasserstoffkerne so stark an, dass die Zahl der Signalüberlagerungen selbst in 3D-Spektren inakzeptabel wird. Andererseits wächst mit dem Molekulargewicht eines Moleküls auch die Linienbreite der Signale. Die Lebensdauer der Kohärenzen ( $T_2$ -Relaxationszeiten) ist umgekehrt proportional zur Linienbreite und nimmt daher mit steigendem Molekulargewicht rapide ab. Als Lösung bietet sich an, die zu untersuchenden Proteine vollständig mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  zu markieren, d.h. alle  $^{12}\text{C}$ -Atome (natürliche Häufigkeit 98,9%) und  $^{14}\text{N}$ -Atome (natürliche Häufigkeit 99,6%) im untersuchten Protein werden durch die schwereren Isotope ersetzt. Über diese NMR-aktiven Isotope (Kernspin  $I = 1/2$ ) lassen sich Kohärenzen transferieren, wobei der entscheidende Vorteil dieser Kerne in der großen Kopplungskonstanten zwischen C und H bzw. N und H liegt (Cavanagh et al., 1996). NMR-Experimente, bei denen Kohärenzen über drei verschiedene Kernsorten transferiert werden, heißen *Tripelresonanzexperimente*.

Der wichtigste Anwendungsfall der Tripelresonanzexperimente ist die Korrelation von Amidprotonen der Peptidbindung mit dem kovalent gebundenen Amidstickstoff und schließlich mit den kovalent gebunden Kohlenstoffatomen der zugehörigen Seitenkette. Anschließend folgt die Detektion, so dass, je nach Experiment, Informationen über die Zahl der Kohlenstoffatome der Seitenketten bzw. über ihre Position innerhalb der Seitenketten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  usw.) erhalten werden. Damit aber die *sequentielle Zuordnung*, also die Zuordnung der Resonanzsignale im Spektrum zum entsprechenden Aminosäurerest innerhalb der Aminosäuresequenz des untersuchten Proteins möglich ist, müssen die Experimente auch Informationen über sogenannte *sequentielle Konnektivitäten* liefern, d.h. Informationen nicht nur über den Aminosäurerest, dessen Amidgruppe im Experiment korreliert wurde, sondern auch über einen kovalent gebundenen, benachbarten Aminosäurerest. Die Bedeutung solcher Experimente für die Strukturaufklärung von Proteinen lässt sich an der Vielzahl der Veröffentlichungen ermessen, die seit der Einführung durch Bax im Jahr 1990 erschienen sind (Bax et al., 1990).

Für die Nomenklatur von Tripelresonanzexperimenten hat sich die folgende Systematik durchgesetzt: die Kerne, deren Frequenzen sich während einer Evolutions- oder

## 1 Einleitung

**Tabelle 1.2:** Übersicht der Korrelationen einiger ausgewählter Tripelresonanzexperimente. Die umrandeten Atomsymbole kennzeichnen das Atom, vom dem aus der Kohärenztransfer beginnt; die Pfeile zeigen die Richtung des Kohärenztransfers an.

Tripelresonanz- experiment	Korrelationen
HNCA	$C_{\alpha}^{i-1} \leftarrow (CO)^{i-1} \leftarrow N^i \leftarrow \boxed{H_N^i} \rightarrow N^i \rightarrow C_{\alpha}^i$
CA(CO)NH <sup>a</sup>	$\boxed{H_{\alpha}^{i-1}} \rightarrow C_{\alpha}^{i-1} \rightarrow (CO)^{i-1} \rightarrow N^i \rightarrow H_N^i$
HNCACB	$C_{\beta}^{i-1}, C_{\alpha}^{i-1} \leftarrow (CO)^{i-1} \leftarrow N^i \leftarrow \boxed{H_N^i} \rightarrow N^i \rightarrow C_{\alpha}^i, C_{\beta}^i$
CBCA(CO)NH <sup>b</sup>	$\boxed{H_{\alpha}^{i-1}, H_{\beta}^{i-1}} \rightarrow C_{\beta}^{i-1}, C_{\alpha}^{i-1} \rightarrow (CO)^{i-1} \rightarrow N^i \rightarrow H_N^i$
HNCO	$O=C^{i-1} \leftarrow N^i \leftarrow \boxed{H_N^i}$
C(CO)NH	$\dots C_{\gamma}^{i-1}, C_{\beta}^{i-1}, C_{\alpha}^{i-1} \leftarrow (CO)^{i-1} \leftarrow N^i \leftarrow \boxed{H_N^i}$

<sup>a</sup>Kurzform für (HA)CA(CO)NH

<sup>b</sup>Kurzform für (HBHA)CBCA(CO)NH

Akquisitionszeit entwickeln, werden mit HA, HB, CA, CB, NH, N und CO bezeichnet und stehen stellvertretend für die  $^1H_{\alpha}$ -,  $^1H_{\beta}$ -,  $^{13}C_{\alpha}$ -,  $^{13}C_{\beta}$ -,  $^1H_N$ -,  $^{15}N$ - und  $^{13}CO$ -Kerne. Kerne, über die lediglich Kohärenzen transferiert werden, deren Frequenzen sich jedoch in keiner der Evolutions- oder Akquisitionszeiten entwickeln, werden in Klammern angegeben (Tabelle 1.2).

Eines der wichtigsten NMR-Experimente zur Durchführung der sequentiellen Zuordnung ist das HNCACB-Experiment, welches das Amidproton ( $H_N$ ) einer Aminosäure  $i$  mit dem Amidstickstoff korreliert und dann die Kohärenzen weitertransferiert auf das  $^{13}C_{\alpha}$ - und das  $^{13}C_{\beta}$ -Atom der Seitenkette der Aminosäurereste  $i$  und  $i - 1$ , also in Richtung des N-Terminus. Detektiert werden neben den Resonanzsignalen des  $H_N$  und des Amidstickstoffs die vier Signale der o.g. Seitenketten-Kohlenstoffatome. Beim ebenfalls wichtigen HNCA-Experiment werden nur die beiden  $^{13}C_{\alpha}$ -Atome der korrelierten Aminosäurereste detektiert und somit weniger Informationen erhalten als beim HNCACB-Experiment. Allerdings ist bei der Wahl der Experimente in der Praxis zu berücksichtigen, dass verschiedene Experimente verschiedene Empfindlichkeiten (Qualität des Signal/Rausch-Verhältnisses) bezüglich der Resonanzsignalstärken besitzen (Tabelle 1.3). Ein unempfindliches Experiment liefert gegenüber einem empfindlicheren Experiment bei gleicher Messdauer weniger beobachtbare Resonanzsignale, da die schwächeren Signale nicht mehr vom stets vorhandenen thermischen Rauschen zu unterscheiden sind.

So ist das wichtige HNCACB-Experiment relativ unempfindlich, so dass eine Ver-



## 1 Einleitung

**Tabelle 1.3:** Übersicht der relativen Empfindlichkeiten (bezogen auf das Signal/Rausch-Verhältnis) von Tripelresonanzexperimenten. Das relativ empfindliche - also hohe Signalintensitäten liefernde - HNCO-Experiment wird gleich 100% gesetzt (Sattler et al., 1999).

NMR-Experiment	relative Empfindlichkeit [%]	
HNCO	100	$(C_o^{i-1})$
HNCA	50/15	$(C_\alpha^i / C_\alpha^{i-1})$
CA(CO)NH	71	$(C_\alpha^{i-1})$
CBCA(CO)NH	13/9	$(C_\alpha^{i-1} / C_\beta^{i-1})$
HNCACB	4/1,7	$(C_\alpha^i / C_\beta^i)$
	1,3/0,5	$(C_\alpha^{i-1} / C_\beta^{i-1})$

besserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wünschenswert ist. Diese lässt sich z.B. erzielen durch eine Erhöhung der Konzentration des Proteins, durch eine Verlängerung der Messdauer oder durch Erhöhung der Messtemperatur. Diese Methoden setzen allerdings eine hohe Stabilität des zu messenden Proteins voraus. Ein neuerer Ansatz zur erheblichen Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses ist die Verwendung eines sogenannten *CryoProbe*<sup>TM</sup> (Moskau et al., 2001). Durch kryogenische Kühlung (bei der Temperatur flüssigen Heliums) der dann supraleitenden Empfängerspulen im Probenkopf wird thermisches Rauschen im System auf ein Minimum reduziert. Dadurch kann die Empfindlichkeit aller NMR-Experimente um den Faktor 4 gesteigert werden, wobei sich die Messzeit, welche umgekehrt quadratisch von der Empfindlichkeit abhängt, auf 1/16 reduziert.

Zur erfolgreichen Durchführung einer sequentiellen Zuordnung von Resonanzsignalen gehört also ein ganzer Satz an NMR-Experimenten mit möglichst vollständigen Informationen. Informationsverluste, also die Abweichung der Zahl der gemessenen Resonanzsignale von der erwarteten Zahl, verursacht durch geringe Empfindlichkeit eines Experimentes, können durch andere Experimente ausgeglichen werden. Hier ist Redundanz daher wünschenswert und sinnvoll.

Das Ziel einer NMR-spektroskopischen Untersuchung eines Proteins ist meistens die Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur. Die bisher angeführten NMR-Experimente liefern jedoch nur Informationen über die Primärstruktur eines Proteins, nicht jedoch die zur Strukturaufklärung notwendigen Sekundär- und Tertiärstrukturinformationen. Bax und andere führten das NOESY-Experiment ein (Marion et al., 1989; Grzesiek und Bax, 1993). Bei einem Spezialfall dieses Experimentes, dem <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Experiment, werden Kohärenzen von Amidprotonen auf den kovalent gebundenen Amid-

## 1 Einleitung

stickstoff transferiert und anschließend auf alle räumlich benachbarten Protonen, deren Abstand kleiner als  $5\text{\AA}$  ist. Der Kohärenztransfer auf die Protonen findet also nicht über kovalente Bindungen statt (skalare Kopplung) sondern durch den Raum (dipolare Kopplung). Die Intensität der so erhaltenen Resonanzsignale ist der sechsten Potenz des Abstandes umgekehrt proportional ( $I \propto r^{-6}$ ); aus den Signalintensitäten lassen sich also Atomabstände errechnen. Aus einer Vielzahl von Abstandsinformationen innerhalb eines Proteins lassen sich mittels spezieller Verfahren ([Gunthert et al., 1997](#); [Nilges et al., 1997](#); [Linge et al., 2003](#)) Strukturinformationen ermitteln. Dazu muss die sequentielle Zuordnung insbesondere der Wasserstoffatome des untersuchten Proteins möglichst vollständig erfolgt sein.

### 1.3 Ziele der Arbeit

Zunächst sollte die Klonierung und Expression der gekoppelten fünften und sechsten Domäne des Signaltransduktors gp130 durchgeführt werden. Daran anschließen sollten sich mehrdimensionale, heteronukleare NMR-Experimente. Nach Durchführung der sequentiellen Zuordnung der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzsignale sollte schließlich die Aufklärung der Sekundärstruktur erfolgen.

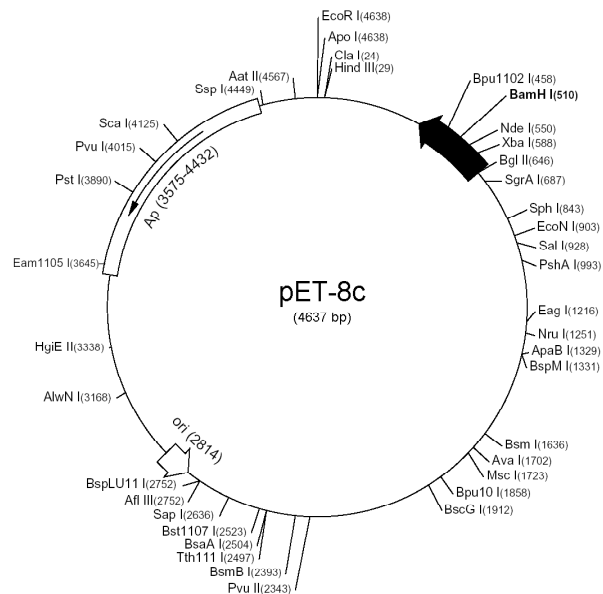
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterial

Alle eingesetzten Chemikalien waren in *pro analysis*-Qualität. Die Bezugsquellen der verwendeten Enzyme wurden an der Stelle ihrer Erwähnung notiert. Wässrige Lösungen wurden - wenn nicht anders erwähnt - mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

Die Isotopen-markierten Chemikalien ( $\alpha$ -D-Glucose- $^{13}\text{C}_6$  und  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid) wurden von *Campro Scientific*, Berlin, Deutschland, bezogen.

Der in dieser Arbeit verwendete Transfektionsvektor war der *pet8c*-Vektor ([Studier et al., 1990](#)), vertrieben von *Invitrogen*, Karlsruhe. Dieser Vektor ist ein bakterieller Expressionsvektor und enthält einen T7-Promotor sowie eine Ampicillin<sup>TM</sup>-Resistenz.



**Abbildung 2.1:** Plasmid-Karte des bakteriellen Expressionsvektors pET-8c (Invitrogen, Karlsruhe, jetzt vertrieben von *Merck Biosciences*, Großbritannien, unter dem Namen *pET-3d*). Er besitzt eine N-terminale T7-Tag-Sequenz und eine Bam HI *cloning site*.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### Vorbereitung

Die lyophilisiert gelieferten Primer (*MWG Biotech*, Ebersberg, Deutschland) (Tabelle 2.1) wurden in hochreinem Wasser (*Ultrapur*<sup>TM</sup>, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst und zu Lösungen mit einer Konzentration von jeweils 20 pmol/μl aliquotiert.

**Tabelle 2.1:** Nucleotidsequenz der verwendeten Primer

D5D6-s	5'-CAA ACA CCA TGG ACT TTC AAG CTA CTC ACC-3'
D5D6-as	5'-CAA ACA GGA TCC TTA GGC TTC AAT TTC TCC TTG-3'

Die gp130 codierende c-DNA (zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Pflanz, Institut für Biochemie, RWTH Aachen, Deutschland; ursprünglich von Dr. T. Taga und Dr. T. Kishimoto, Osaka, Japan) lag in einer Konzentration von 0,9 μg/μl in hochreinem Wasser vor. Folgender Ansatz wurde in 0,5 ml-Eppendorfgefäßen durchgeführt:

- 1,1 μl DNA-Templatelösung (entspricht 0,25 μg DNA-Template)
- 10 μl 10x *ThermoPol*-Puffer
- 5 μl dNTP-Mix
- 1 μl *sense*-Primer-Lösung (entspr. 20 pmol)
- 1 μl *antisense*-Primer-Lösung (entspr. 20 pmol)
- 0,75 μl vent-Polymerase (*New England Biolabs*, USA, 2000 units/ml)
- 10 μl DMSO
- 71 μl hochreines Wasser (Merck *Ultrapur*<sup>TM</sup>)

#### 10x-ThermoPol-Puffer

---

100 mM KCl
200 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25 °C)
100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20 mM MgSO <sub>4</sub>
1 Vol-% <i>Triton X-100</i>

Nach kurzem Durchmischen (*Vortex*<sup>TM</sup>) und Zentrifugieren wurden die Lösungen in den Eppendorfgefäßen noch jeweils mit 100 μl Mineralöl überschichtet.

### Durchführung

Zur Durchführung der PCR wurden die Reaktionsgefäße in einen PCR-Thermocycler (Eigenbau der Werkstatt des Klinikums der RWTH Aachen) gegeben. Die Annealingtemperatur  $T_A$  wurde aus der Sequenz der Primer nach folgender Regel errechnet: je  $4^\circ\text{C}$  für  $G$  und  $C$  sowie jeweils  $2^\circ\text{C}$  für  $A$  und  $T$ . Von dem so errechneten Wert werden noch 10% abgezogen. Für D5D6-s und D5D6-as ergab sich jeweils eine  $T_A$  von  $47^\circ\text{C}$ . Es wurden 30 Zyklen des Thermocycler-Programms (Tabelle 2.2) durchgeführt. Nach der PCR wurde zur Analyse ein 1,5%-iges, qualitatives Agarosegel angefertigt. Dazu wurden die Restriktionsansätze mit gleichem Volumen 2x DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein Agarosegel (1% SeaKem-LE-Agarose, Biozym) geladen. Der Agarose wurden  $0,1\ \mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid, ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, zugesetzt, wodurch die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar wurden und eine Abschätzung der DNA-Mengen aufgrund der Fluoreszenzintensitäten der Banden erfolgen konnte (Pflanz, 1999).

2x DNA-Probenpuffer	
(Sambrook et al., 1989)	
20%	<i>Ficoll 400</i> <sup>TM</sup>
1,0%	SDS
0,4%	TAE
0,1%	Bromphenolblau

**Tabelle 2.2:** PCR-Programm (ein Zyklus) für den Thermocycler

	Temperatur	Dauer
Erste Denaturierungstemperatur	93 °C	120 s
Annealingtemperatur	50 °C	120 s
Extensionstemperatur	72 °C	120 s
Denaturierungstemperatur	93 °C	60 s
Letzte Extensionstemperatur	72 °C	420 s

### Reinigung und Extraktion der PCR-Produkte

Nach qualitativer Verifizierung der PCR wurden die Produkte durch ein quantitatives Gel aus den Ansätzen isoliert. Die unter UV-Licht lokalisierten DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und unter Verwendung eines *QIAquick Gel Extraction Kits* (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellervorschrift extrahiert.

### 2.2.2 Enzymatischer Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Vorschrift für Restriktionsverdau (Sambrook et al., 1989):

#### DNA-Fragmente

- 25  $\mu$ l PCR-Produkt
- 3  $\mu$ l Enzym Bam HI
- 3  $\mu$ l Enzym Nco I
- 5  $\mu$ l 10x Restriktionspuffer (*medium salt*)
- ad 50  $\mu$ l mit hochreinem Wasser (Merck *Ultrapur*<sup>TM</sup>)

#### pet8c-Vektor (Erster Schnitt)

- 2  $\mu$ g Vektor (Konz. wurde zuvor bestimmt)
- 2  $\mu$ l Enzym Bam HI
- 3  $\mu$ l 10x Restriktionspuffer (*medium salt*)
- ad 30  $\mu$ l mit hochreinem Wasser (Merck *Ultrapur*<sup>TM</sup>)

Die Proben kamen anschließend über Nacht bei 37°C in den Brutschrank. Zur Reinigung des einmal geschnittenen pet8c-Vektors wird dieser einem quantitativem Gel unterworfen. Die Bande, die den Vektor (4600 kb) enthielt, wurde ausgeschnitten und unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* gemäß Herstellervorschrift extrahiert.

#### pet8c-Vektor (Zweiter Schnitt)

Nach Extraktion des Vektors aus dem quantitativen Agarose-Gel wurde dieser ein zweites Mal geschnitten. Der Vektor lag in wässriger Lösung in einem Volumen von ca. 50  $\mu$ l vor.

- 25  $\mu$ l gelöster Vektor
- 2  $\mu$ l Enzym Nco I
- 4  $\mu$ l 10x Restriktionspuffer (*medium salt*)
- ad 40  $\mu$ l mit hochreinem Wasser (Merck *Ultrapur*<sup>TM</sup>)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

10x Restriktionspuffer (*medium salt*)

(Davis et al., 1980)

---

1 Teil	5 M NaCl
1 Teil	1 M Tris (pH 7,4)
1 Teil	1 M MgSO <sub>4</sub>
1 Teil	0,01 M Dithiothreitol
6 Teile	hochreines Wasser (Merck <i>Ultrapur</i> <sup>TM</sup> )

### 2.2.3 Phenol-Extraktion und DNA-Fällung

#### Phenolextraktion

Nach Beendigung des Restriktionsverdaus wurden die DNA-Fragmente bzw. der zum zweiten Mal geschnittene Vektor mittels Phenolextraktion aus den Ansätzen isoliert und von den Restriktionsenzymen befreit. Die in 1 ml-Eppendorfgefäßen vorliegenden Ansätze wurden zunächst mit hochreinem Wasser auf 400 µl aufgefüllt und wie folgt verfahren:

- Zugabe von 20 µl 2 M Tris-Base
- 400 µl Phenol (H<sub>2</sub>O-gesättigt)
- gut durchmischen (*Vortex*<sup>TM</sup>)
- 2 min bei 14.000 rpm zentrifugieren
- die obere, wässrige Phase (400 µl) abnehmen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen, phenolische Phase verwerfen

- 
- Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform (1:1 V/V)
  - gut durchmischen (*Vortex*<sup>TM</sup>)
  - 2 min bei 14.000 rpm zentrifugieren
  - die obere, wässrige Phase (400 µl) abnehmen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen, Chloroform/Phenolphase verwerfen
-

- Zugabe von 400  $\mu$ l Chloroform
- gut durchmischen (*Vortex*<sup>TM</sup>)
- 2 min bei 14.000 rpm zentrifugieren
- die obere, wässrige Phase (400  $\mu$ l) abnehmen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen, Chloroformphase verwerfen

### DNA-Fällung

Die wässrige Phase (400  $\mu$ l), die nach Ende der Phenolextraktion vorliegt, wird einer LiCl-Fällung nach folgender Vorschrift unterworfen:

- Zugabe von 1  $\mu$ l Glycogen (als DNA-Carrier bei DNA-Mengen unter 2  $\mu$ g)
- Zugabe von 10  $\mu$ l 8 M LiCl
- Zugabe von 400  $\mu$ l kaltem ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) Isopropanol
- gut durchmischen (*Vortex*<sup>TM</sup>)
- mindestens 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  stehen lassen
- 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig und möglichst vollständig abpipettieren
- das zurückbleibende *Pellet* zwei Mal mit 500  $\mu$ l kaltem ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) 70%-igem Ethanol waschen; mehrmals sanft umschütteln und anschließend 2 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14.000 rpm zentrifugieren
- Ethanol jeweils vorsichtig und möglichst vollständig abpipettieren
- schließlich das *Pellet* bei RT trocknen, danach in 20  $\mu$ l hochreinem Wasser aufnehmen

### 2.2.4 DNA-Ligation

Die Ligation doppelsträngiger DNA erfolgte durch die DNA-T4-Ligase. 10–20 ng des linearisierten Vektors wurden mit einem zwei- bis zehnfachen molaren Überschuss des Inserts versetzt und für 2–16h bei  $20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden kompetente Bakterien mit den Ligationsprodukten transformiert.



10x Ligationspuffer	
440 mM	Tris/HCl pH 8,0
220 mM	Tris/HCl pH 7,4
100 mM	DTT
100 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	ATP
5 µg/ml	BSA

## 2.2.5 Transformation kompetenter Bakterien

### Transformation von JM-83-Zellen

Vorgehensweise für die schonende Transformation:

- 100 µl kompetente JM-83-Zellen
- 5 µl Ligationsprodukt zugeben
- 30 min auf Eis
- 1 min bei 42°C im Heizblock
- 2 min auf Eis
- 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) zugeben
- 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubieren
- 30 s bei 14.000 rpm zentrifugieren
- 1 ml vom Überstand abpipettieren und verwerfen
- Bakterienpellet in den verbleibenden 100 µl resuspendieren
- Bakteriensuspension auf Ampicillin-haltige LB-Nährböden ausplattieren (Ampicillin-Konzentration im Nährboden: 0,1 mg/l)
- über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubieren (die Petrischalen mit den Nährböden dabei kopfüber legen)

Nach der Inkubation der Agarplatten wurden einzelne Kolonien gepickt und in verschließbaren 50 ml-Probenröhrchen mit 2 ml LB-Medium und 4 µl Ampicillin-Stocklösung (Konzentration der Stocklösung: 50 mg/ml) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden

## 2 Material und Methoden

1,5 ml entnommen und die Plasmid-DNA mittels des *QIAquick Spin Extraction Kits* (Mini-Prep) extrahiert.

LB-Medium	
<u>(Qbiogene, Heidelberg)</u>	
10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl
(in VE-Wasser)	

### Transformation von BL-21-Zellen

Chloramphenicolresistente BL-21-Bakterien wurden mit dem aus JM-83-Zellen extrahierten Plasmid transformiert. Dazu wurden BL-21-Zellen aus dem Gefrierstock in 2 ml LB-Medium, dem 4  $\mu$ l Chloramphenicol-Lösung (30 mg/ml in Ethanol) zugesetzt waren, 6–8 Stunden bei 37°C inkubiert. Aus dieser Kultur wurden 0,8 ml entnommen und in ein Eppendorfggefäß gegeben. Dann wurde wie folgt verfahren:

- Reaktionsgefäße 15 min bei 5000 U/min zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellets in 200  $\mu$ l TFB-Puffer resuspendieren
- 10 min auf Eis, dann ca. 20  $\mu$ l DNA-Lösung aus Präparation zufügen (DNA-Menge: 10–200 ng)
- vorsichtig invertieren, dann 10 min auf Eis
- 90 s bei 42°C inkubieren
- wieder auf Eis stellen
- 50  $\mu$ l entnehmen und auf Agar/Chloramphenicol/Ampicillin-Platten ausplattieren (Antibiotika jeweils 50 mg/l)
- 12–16 h bei 37°C inkubieren
- Picken und über Nacht kultivieren (Vorkultur)
- Stock anlegen (1,0 ml Kultursuspension + 0,21 ml Glycerin, in flüssigem Stickstoff schockfrostern, lagern bei –80°C)

## 2 Material und Methoden

TFB-Puffer	
100 mM	RbCl
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
30 mM	CH <sub>3</sub> COOK
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
15 Vol-%	Glycerin

pH 5,8 einstellen mit 0,2 M Essigsäure

### 2.2.6 Kultivierung von Bakterien

Zur Produktion von einfach-markiertem (<sup>15</sup>N) bzw. doppelt-markiertem (<sup>15</sup>N und <sup>13</sup>C) Protein wurde die Kultivierung der *E.coli*-Bakterien in Minimalmedium unter Zugabe von Antibiotika (Chloramphenicol, 30 mg/l und Ampicillin, 50 mg/l) in einem thermostatisiertem Schüttelinkubator bei 200 U/min und 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 durchgeführt. Als Quelle für <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N wurden  $\alpha$ -D-Glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> und <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid zugesetzt. Bei der Herstellung von einfach-markiertem Protein (<sup>15</sup>N) wurde gewöhnliche  $\alpha$ -D-Glucose-<sup>12</sup>C<sub>6</sub> als Kohlenstoffquelle verwendet.

Zur Kontrolle des Bakterienwachstums wurden in regelmäßigen Abständen Proben aus dem Medium entnommen und in Polystyrol-Einwegküvetten (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) in einem UV-Spektrophotometer (U-2001, Hitachi, Japan) gemessen. Nach Erreichen der gewünschten OD<sub>600</sub> wurde mittels Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 1,0 mM) die Proteinexpression induziert und 6 Stunden weiter inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien geerntet und vom Medium durch Zentrifugation getrennt. Zur Abschätzung der Expressionsausbeute wurden der Kultur während der Expressionsphase in Abständen von 60 min Proben von jeweils 1 ml entnommen und später einer Gelelektrophorese unterworfen.

Minimalmedium (in VE-Wasser)	
2,0 g/l	$\alpha$ -D-Glucose- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>
1,0 g/l	<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid
7,5 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O
3,0 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,0 g/l	NaCl
0,5 g/l	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese (Laemmli, 1970) in einer vertikalen Flachbettkammer (*Mini-Protean Electrophoresis System*, Biorad, USA) angewendet. Die zu analysierenden Proben wurden in zweifach-konzentriertem, reduzierendem oder nichtreduzierendem Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (15 s, 14.000 U/min) abgetrennt, der Überstand wurde auf das Gel aufgetragen (Tabelle 2.3); als Marker wurde der *Protein Molecular Weight Marker* von *Fermentas*, St. Leon-Rot, Deutschland, verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 200 V bei 20 °C.

2x Probenpuffer (nach Laemmli)
20% Glycerin
4% SDS (w/v)
1,25 mM Tris/HCl
0,002% Bromphenolblau
<i>unter reduzierenden Bedingungen zusätzlich:</i>
10% Mercaptoethanol

Die Gele wurden anschließend 2 h in *Coomassie*-Lösung gefärbt und danach mehrere Stunden bis über Nacht in Entfärbelösung entfärbt.

<i>Coomassie</i> -Lösung:	25% Methanol	Entfärbelösung:	10% Methanol
	10% Eisessig		10% Eisessig
	0,1% Brillant-Blau		

(beide Lösungen wurden jeweils mit VE-Wasser auf 100% aufgefüllt)

**Tabelle 2.3:** Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel, jeweils für ein Minigel

Sammelgel (7,5% Acrylamid)	
H <sub>2</sub> O	1,23 ml
Acrylamid (30%-ig)	0,63 ml
0,5M Tris pH 8,8	0,63 ml
SDS-Lösung (10%-ig)	25 µl
Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS), 10%-ig	25 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2,5 µl
Trenngel (15% Acrylamid)	
H <sub>2</sub> O	1,38 ml
Acrylamid (30%-ig)	3,0 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,5 ml
SDS-Lösung (10%-ig)	60 µl
Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS), 10%-ig	60 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	3 µl

### 2.3.2 Reinigung und Solubilisierung von *inclusion bodies*

Nach Beendigung der Proteinexpression wurden die durch Zentrifugation sedimentierten Bakterien in PBS (*phosphate buffered saline*), welchem als Detergens zur Solubilisierung von lipophilen Membranbestandteilen 0,5 Vol% *Triton X-100* (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) zugesetzt waren, resuspendiert. Zur Isolierung der *inclusion bodies* wurde die Bakteriensuspension durch eine Sequenz von 4 bis 5 Ultraschallbehandlungen (Sonopuls HD2200, Bandelin electronic GmbH, Berlin) homogenisiert. Die unerwünschten löslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Der Rückstand wurde mit frischem PBS/*Triton X-100* aufgenommen und einer erneuten Ultraschallbehandlung unterzogen. Zur Entfernung des Detergens wurde dieser Vorgang abschließend mit detergensfreiem PBS wiederholt, eine Kontrolle der Reinheit erfolgte durch SDS-PAGE.

#### PBS (*phosphate buffered saline*)

8,0 g/l	NaCl
2,0 g/l	KCl
14,4 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
2,0 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Die so gewonnenen *inclusion bodies* wurden im 10-fachen Volumen an Solubilisierungslösung (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Dithiothreitol) aufgenommen und eine Stunde lang auf dem Magnetprüher gerührt. Danach wurden unlösliche Bestandteile mittels

Zentrifugation abgetrennt und die solubilisierten *inclusion bodies* bis zur Weiterverwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.3.3 Renaturierung von Proteinen

Um das in Guanidiniumhydrochlorid-Lösung denaturiert vorliegende Protein zu renaturieren, wurde die Methode des *rapid dilution* (Rudolph und Lilie, 1996) angewendet. Dazu wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen je 20 µl Proteinlösung vorgelegt und durch schnelles Hinzugeben von 1000 µl Renaturierungspuffer (4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 16 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6) mit einer Pipette verdünnt. Danach wurden die Lösungen ca. eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend vereinigt und vom Präzipitat durch Zentrifugation getrennt. Zur Maximierung der Ausbeute wurde das Präzipitat in Solubilisierungspuffer aufgenommen und erneut gemäß der Renaturierungsvorschrift behandelt. Als Schutz vor Bakterienbefall erfolgte schließlich noch die Zugabe von NaN<sub>3</sub> zu einer Konzentration von 0,1%.

### 2.3.4 Aufkonzentrierung von D5D6-Lösungen

Verdünnte Lösungen von D5D6 wurden stets unter Stickstoff-Überdruck aufkonzentriert, wobei Ultrafiltrationsrührzellen verschiedener Größe (Amicon, USA) eingesetzt wurden. Die verwendeten Membranen waren Ultrafiltrationsmembranen aus regenerierter Cellulose (Millipore, USA). Stark verdünnte Lösungen, welche zu mäßigen Konzentrationen gebracht werden sollten (unter 0,1 mM), wurden bei Raumtemperatur aufkonzentriert. Sollten kleinere Volumina (20 ml oder weniger) auf hohe Konzentration gebracht werden, so wurde bei 4 °C aufkonzentriert. Zur Vertreibung des gelösten Stickstoffs wurde abschließend bei Normaldruck (im offenen Gefäß) 10 min weitergerührt.

### 2.3.5 Größenausschlusschromatographie

Die nach der Renaturierung (Abschnitt 2.3.3) anfallenden Lösungen von D5D6 wurden zunächst auf das ca. 100-fache aufkonzentriert. Nach Abzentrifugation von eventuell anfallenden Aggregaten wurde eine Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer *Hi-Prep Sephadex 75 16/60* Chromatographiesäule (Amersham Pharmacia, USA) auf einem *Äkta* FPLC-System (Amersham-Pharmacia, USA) durchgeführt. Die Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereinigt und die Proteinkonzentration bestimmt. Zur Kalibration der Säule wurde zuvor eine Chromatographie mit Proteinen definierten Molekulargewichts (*HMW Calibration Kit*, Amersham-Pharmacia, USA) (Tabelle 2.4) durchgeführt.

**Tabelle 2.4:** Die für die Kalibration der Chromatographiesäule *HiPrep Superdex 75 16/60* verwendeten Proteine (*HMW Calibration Kit*, Amersham-Pharmacia, USA), ihr Molekulargewicht und das gemessene Retentionsvolumen

Protein	Molekulargewicht [kD]	Retentionsvolumen [ml]
Albumin	67,0	50,3
Ovalbumin	43,0	56,9
Chymotrypsinogen A	25,0	67,6
Ribonuclease A	13,7	78,0

### 2.3.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte durch Messung in einem Zweistrahlenspektrophotometer (U-2001, Hitachi, Japan) gegen den jeweiligen Puffer als Referenz. Die gemessene Extinktion bei 280 nm ( $E_{280}$ ) wurde zur Berechnung der Konzentration unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes mit Einbeziehung des berechneten Extinktionskoeffizienten herangezogen (Gill und von Hippel, 1989):

$$\text{Massenkonzentration } c_m = \frac{E_{280} \cdot M_r}{\epsilon_{280} \cdot d}$$

$E_{280}$ : Extinktion bei 280 nm  
 $M_r$ : Molekularmasse in g/mol  
 $d$ : Schichtdicke in cm  
 $\epsilon_{280}$ : molarer Extinktionskoeff.

Der molare Extinktionskoeffizient von gp130D5D6 wurde errechnet zu  $\epsilon_{280} = 43350 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Aus der Massenkonzentration  $c_m$  wird die molare Konzentration erhalten durch Division durch die Molekularmasse  $M_r$ .

## 2.4 Circularer Dichroismus (CD-Spektroskopie)

Nach erfolgter Größenausschlusschromatographie wurde die Hauptfraktion CD-spektrometrisch untersucht. Zum Einen lässt sich so relativ einfach feststellen, ob das Protein renaturiert vorliegt, zum Anderen lassen sich über eine schrittweise Steigerung der Temperatur während der Messung Aussagen über die Temperaturstabilität des Proteins treffen. Gemessen wurde auf einem *Jasco J-720*-Spektrometer (Jasco, Japan), welches eine temperierbare Küvettenhalterung besitzt. Das CD-Spektrometer wurde mit einer 0,1%-igen wässrigen (1S)-(+)-Camphersulfonsäurelösung nach Chen und Yang kalibriert (Chen und Yang, 1977). Gemessen wurde in Küvetten aus Quarzglas (Hellma GmbH, Müllheim, Deutschland) verschiedener Schichtdicken; die spektralen Bandbreiten lagen bei 1 nm. Die gemessene Elliptizität  $\Theta_\lambda$  wurde auf die mittlere Molmasse der Amino-

säurereste des Proteins, die Schichtdicke der Lösung und die Konzentration bezogen ( $\Theta_{\lambda}^{\text{MRW}}$ ); es gilt:

$$\Theta_{\lambda}^{\text{MRW}} = \frac{\text{MRW} \cdot \Theta_{\lambda}}{d \cdot c}$$

- MRW: *mean residue weight*, mittlere Molekularmasse der Aminosäurereste des Proteins in g/mol  
 $\Theta_{\lambda}$ : gemessene Elliptizität in Grad  
d: Schichtdicke der Lösung in cm  
c: Konzentration der Probe in g/cm<sup>3</sup>

## 2.5 NMR-Spektroskopie

### 2.5.1 Probenvorbereitung

Die vereinigten Hauptfraktionen aus der Größenausschlusschromatographie wurden unter Verwendung von Ultrafiltrationszellen (Amicon, USA) mit Ultrafiltrationsmembranen aus regenerierter Cellulose (Millipore, USA) unter Stickstoff-Überdruck bei 5 °C auf ein Volumen von zunächst 3 ml aufkonzentriert. Zu der Lösung wurden nun 330 µl D<sub>2</sub>O zugefügt, so dass die Lösung 10%-ig an D<sub>2</sub>O war. Anschließend wurde auf das Endvolumen von 700 µl und auf eine Konzentration von ca. 1 mM aufkonzentriert. Anfallendes Präzipitat wurde durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde die Probe in ein NMR-Glasröhrchen überführt.

### 2.5.2 NMR-Experimente

#### 2D-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-NMR-Spektren

Bevor gp130D5D6 als doppelt-markiertes Protein (gp130D5D6-<sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C) hergestellt wurde, wurde zunächst einfach markiertes Protein (D5D6-<sup>15</sup>N) exprimiert. Von diesem wurde ein 2D-<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC (*Hetero Single Quantum Correlation*)-Spektrum aufgenommen. Bei diesem Experiment werden die <sup>1</sup>H<sub>N</sub>-Spins mit den Resonanzen der kovalent verknüpften <sup>15</sup>N-Kerne korreliert. Das 2D-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum wurde mit 512 (<sup>1</sup>H) × 100 (<sup>15</sup>N) Datenpunkten bei 25 °C auf einem DMX 600-Spektrometer der Bruker GmbH (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Da dieses NMR-Experiment erfolgreich verlief, wurde nun <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C-markiertes Protein hergestellt.



## 2 Material und Methoden

**Tabelle 2.5:** Liste der heteronuklearen dreidimensionalen NMR-Experimente, die an der gekoppelten fünften und sechsten Domäne von gp130 durchgeführt wurden. Sämtliche Experimente wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Konzentration des Proteins war im Falle des  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC 1 mM, in allen anderen Fällen 0,1 mM. Der Hersteller der verwendeten Spektrometer ist die Bruker GmbH, Rheinstetten, Deutschland.

Experiment	Komplexe Punkte der Datenmatrix (Kern)			Spektrale Breite (Hz)			Spektrometer
	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$F_1$	$F_2$	$F_3$	
HNCA (Grzesiek und Bax, 1992b)	512 ( $^1\text{H}$ )	46 ( $^{13}\text{C}$ )	39 ( $^{15}\text{N}$ )	9259	4167	1667	DMX 600
CBCA(CO)NH (Grzesiek und Bax, 1992a)	512 ( $^1\text{H}$ )	57 ( $^{13}\text{C}$ )	38 ( $^{15}\text{N}$ )	9259	8446	1458	DMX 600
HNCO (Grzesiek und Bax, 1992a)	512 ( $^1\text{H}$ )	43 ( $^{13}\text{C}$ )	45 ( $^{15}\text{N}$ )	9259	1429	1667	DMX 600
HN(CA)HA (Montelione und Wagner, 1990)	512 ( $^1\text{H}$ )	25 ( $^1\text{H}$ )	39 ( $^{15}\text{N}$ )	9259	2500	1667	DMX 600
$^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC (Marion et al., 1989)	384 ( $^1\text{H}$ )	200 ( $^1\text{H}$ )	48 ( $^{15}\text{N}$ )	3754	9747	2660	Avance 750

### 3D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren

Die an gp130D5D6 durchgeführten heteronuklearen 3D-Experimente sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst und wurden auf Spektrometern der Bruker GmbH (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Die relevanten Parameter der Experimente und die verwendeten Spektrometer sind ebenfalls dort angegeben. Das Prozessieren der Rohdaten erfolgte mit dem Software-Paket *NMRPipe* (Delaglio et al., 1995). Die nachfolgende Analyse der Spektren wurde mit dem Programm *NMRView* durchgeführt (Johnson und Blevins, 1994).

## 2.6 Erstellung von Homologiemodellen der fünften und sechsten Domäne des gp130

Zur Unterstützung der Auswertung des 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrums mit dem Ziel, die Sekundärstruktur der fünften und sechsten Domäne des gp130 aufzuklären, wurde jeweils ein molekulares Modell dieser beiden Domänen erstellt. Zu Beginn der Modellerstellung stand das Auffinden von strukturhomologen Proteinen (sogenannten Templaten, engl. *templates*). Dabei musste darauf geachtet werden, dass die auszuwählenden Template eine möglichst hohe Identität und Homologie in ihrer Aminosäuresequenz im

Vergleich zur fünften und sechsten Domäne des gp130 aufweisen. Unter homologen Aminosäuren versteht man hierbei, dass bei Vergleich von nicht identischen Aminosäureresten diese Übereinstimmungen in der Hydrophobizität, Polarität und Acidität zeigen. Zur Auffindung dieser Template wurde das Programmpaket *ProHit* (ProCeryon GmbH, Salzburg, Österreich) verwendet (Koppensteiner et al., 2000). Mit diesem Programmpaket wird nach Eingabe einer Aminosäuresequenz in einer Datenbank von Proteinen mit bekannter Struktur nach Templaten gesucht, die die oben geforderte möglichst hohe Übereinstimmung von Identität und Homologie aufweisen.

Mit den so gefundenen Templaten wurde ein sequentielles *alignment* durchgeführt, d.h. die Aminosäuresequenzen des Templates und der jeweiligen Domäne des gp130 wurden unter Berücksichtigung von Identitäten und Homologien passend aufeinander ausgerichtet. Notwendige Insertionen und Deletionen von Aminosäureresten in den Templaten wurden dabei datenbankgestützt unter Verwendung des Programms *What If* (Vriend, 1990) modelliert. Um Strukturen mit möglichst geringer Energie zu erhalten wurden diese einer Energieminimierung unterzogen (van Gunsteren, 1987).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierung

Die Klonierungsstrategie der gekoppelten fünften und sechsten Extrazellulärdomänen stammt von Dr. Stefan Pflanz (Institut für Biochemie der RWTH Aachen). Dabei wurden die von Hibi (Hibi et al., 1990) vorgeschlagenen Domänengrenzen verwendet. Alle Konstrukte wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) hergestellt, wobei die cDNA des humanen gp130 als Vorlage diente. Zur Subklonierung in den Expressionsvektor pET8c (Studier et al., 1990) wurden über die gewählten Oligonukleotide jeweils am 5'-Ende des kodierenden Strangs eine Nco I- und am 3'-Ende eine Bam HI-Schnittstelle eingefügt. Nach erfolgter Klonierung wurden die Amplifikate durch DNA-Sequenzierung überprüft und die Expressionsplasmide zur Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien BL21DEpLysS eingesetzt (Pflanz, 1999).

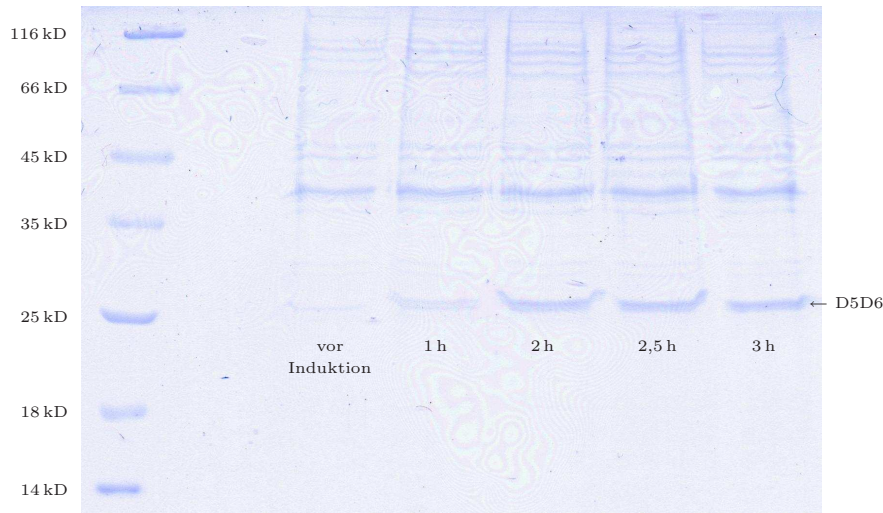
### 3.2 Expression von D5D6

Die Expression des Proteins in *E.coli*-Bakterien BL21DEpLysS stieg mit fortwährender Dauer an und erreichte ein Maximum nach ca. 3 Stunden (Abbildung 3.1). Eine Verlängerung der Expressionsdauer bis hin zur Übernachtskultur brachte keine Steigerung der Ausbeute. Eine quantitative Bestimmung der Expressionsausbeute wurde in diesem Stadium der Präparation von gp130D5D6 nicht durchgeführt. Erst nach Renaturierung und Reinigung durch Größenausschlusschromatographie wurde durch UV-spektrometrische Konzentrationsmessung die Gesamtausbeute an Protein bestimmt.

Das bei der Renaturierung anfallende Präzipitat (Abschnitt 2.3.3) wurde erneut in Solubilisierungspuffer gelöst, renaturiert und per Größenausschlusschromatographie gereinigt. Durch diese Maßnahme konnte die Ausbeute an renaturiertem D5D6 um 10–15% gesteigert werden.

Das Ergebnis der Reinigung der *inclusion bodies* (Abschnitt 2.3.2) wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3.2). Die gereinigten *inclusion bodies* enthielten nahezu ausschließlich D5D6 (neben sehr geringen Mengen anderer Proteine). Der gelöste Über-

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.1:** Ein SDS-Gel von Proben der gp130D5D6-<sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C-exprimierenden *E.coli*-Bakterien, entnommen zu bestimmten Zeiten nach der Induktion. Der verwendete Marker ist der *Protein Molecular Weight Marker* von *Fermentas*, St. Leon-Rot, Deutschland.

stand hingegen enthielt - soweit erkennbar - kein D5D6, so dass durch die angewandte Reinigungsmethode keine Verluste an Expressionsprodukt auftraten.

## 3.3 Größenausschlusschromatographie

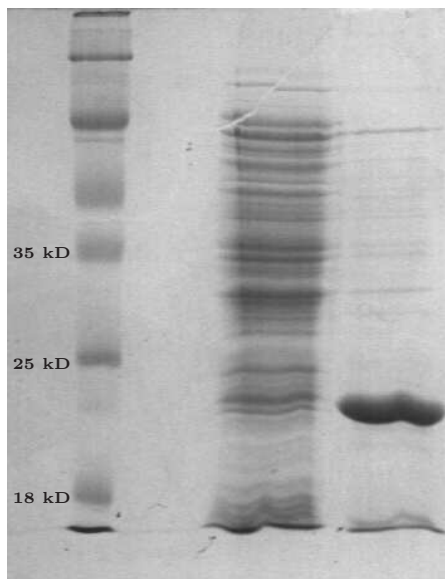
### 3.3.1 Kalibration der Säule

Die zur Reinigung von gp130D5D6 verwendete Chromatographiesäule (*Amersham-Pharmacia Superdex 75 16/60*) wurde zunächst mit einem definierten Gemisch verschiedener Proteine kalibriert (Abschnitt 2.3.5). Die gemessenen Elutionsvolumina der einzelnen Proteine wurden gegen den dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts aufgetragen; anschließend wurde eine Ausgleichsgerade durch lineare Regression ermittelt (Abbildung 3.3). Die so erhaltene Geradengleichung

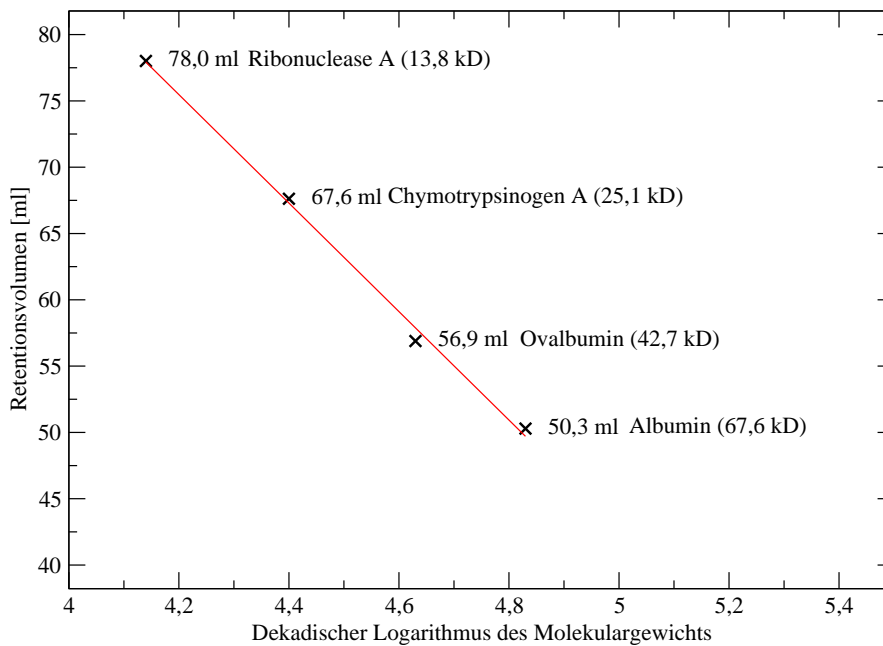
$$f(x) = 40,8x + 246,9,$$

wobei  $f(x)$  das gemessene Elutionsvolumen eines Proteins und  $x$  den dekadischen Logarithmus seines Molekulargewichts darstellt, wurde zur Berechnung der Molekularmassen der in folgenden Chromatographieläufen eluierten Proteine herangezogen.

### 3 Ergebnisse

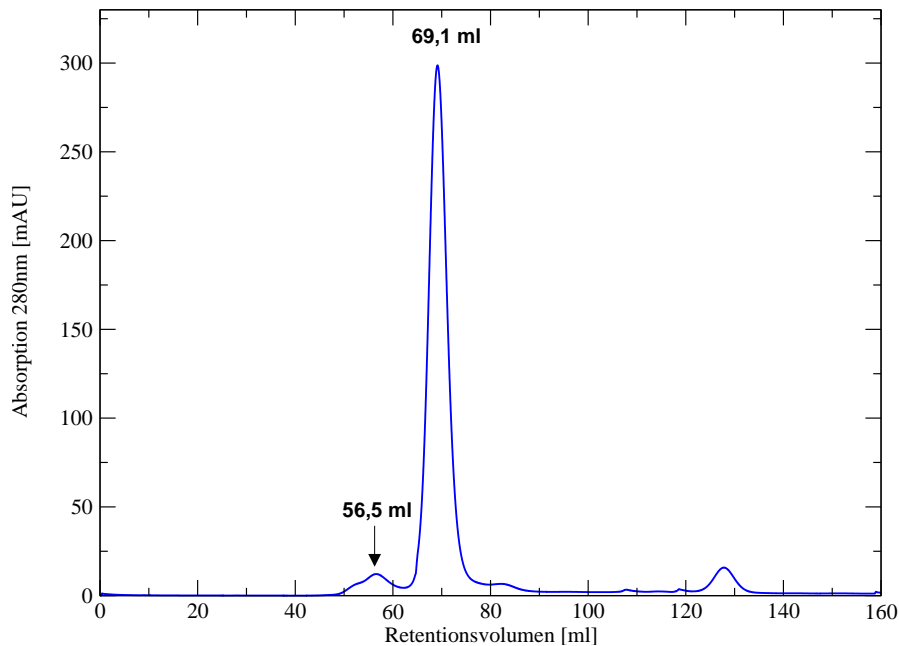


**Abbildung 3.2:** Zur Kontrolle des Ergebnisses der Reinigungsprozedur wurden die *inclusion bodies* einer SDS-PAGE unterzogen. Ganz rechts wurden die gereinigten *inclusion bodies* aufgetragen, in der Mitte der gelöste Überstand nach der ersten Sonifikation. Links befindet sich der Marker; einige ausgewählte Banden wurden entsprechend bezeichnet.



**Abbildung 3.3:** Kalibration der *HiPrep Superdex 75 16/60* unter Verwendung des *HMW Calibration Kits* (*Amersham-Pharmacia*). Aufgetragen wurden das gemessene Elutionsvolumen gegen den dekadischen Logarithmus der Molekularmasse. Durch die Messwerte wurde eine Ausgleichsgerade gelegt, die durch lineare Regression ermittelt wurde. Ihre Gleichung lautet:  $f(x) = 40,8x + 246,9$  mit  $f(x)$  als dem Retentionsvolumen und  $x$  als dem dekadischen Logarithmus der Molekularmasse.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.4:** Elutionsprofil von einfach-markiertem D5D6 (gp130D5D6-<sup>15</sup>N). Der verwendete Elutionspuffer ist identisch mit dem Rückfaltungspuffer (16 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6). Die beiden größten *Peaks* innerhalb des Trennbereichs für Proteine (40–100 ml) sind beschriftet mit dem zugehörigen Elutionsvolumen.

#### 3.3.2 Reinigung von D5D6

Nach Aufkonzentrieren der Lösung des renaturierten D5D6 um den Faktor 100 erfolgte die Reinigung durch Größenausschlusschromatographie. Aus dem Elutionsprofil von einfach-markiertem D5D6 (<sup>15</sup>N) (Abbildung 3.4) ist ersichtlich, dass vorwiegend ein Produkt eluiert wurde. Den im Elutionsprofil erhaltenen *Peaks* wurden die zugehörigen Molekularmassen unter Verwendung der Geradengleichung aus Abschnitt 3.3.1 zugewiesen (Tabelle 3.1). Bei einem Elutionsvolumen von 69,1 ml wurde ein Protein mit der Molekularmasse von 22,8 kD eluiert, was exakt der Molekularmasse von <sup>15</sup>N-markiertem gp130D5D6 ( $M_r=22,80$  kD) entspricht. Ein weiterer, deutlich kleinerer *Peak* wurde bei 58,5 ml erhalten, dem eine Molekularmasse von 46,4 kD zugewiesen werden konnte. Diese Molekularmasse entspricht sehr gut der zweifachen Molekularmasse von gp130D5D6-<sup>15</sup>N ( $2 \cdot M_r = 45,60$  kD) – es wurde also dimeres D5D6 eluiert.

Durch Vergleich der Flächen unter den *Peaks*, erhalten durch Integration der Kurven im Chromatogramm, lässt sich das Mengenverhältnis von monomerem zu dimerem Protein abschätzen. Es ergab sich ein Anteil von 95% Monomer und 5% Dimer, das Monomer war demnach in fast 20-fachem Überschuss vorhanden (Tabelle 3.1).

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.1:** Anhand der bei der Kalibration der Chromatographiesäule erhaltenen Regressionsgeraden (Abbildung 3.3) konnten den *Peaks* im Chromatogramm (Abbildung 3.4) Molekularmassen zugewiesen werden. Die beiden *Peaks* entsprechen 95% monomerem und 5% dimerem gp130D5D6. Diese beiden Werte wurden ermittelt von der Steuer- und Auswertesoftware der Äkta FPLC-Anlage, *UNICORN* V4.00.16, von Amersham Pharmacia Biotech.

Retentionsvolumen	Molekularmasse (gemäß Kalibration)	Anteil (errechnet aus Peakflächenverhältnis)
69,1 ml	22,8 kDa ( $\hat{=} 1 \cdot M_r(\text{D5D6-}^{15}\text{N})$ )	95%
58,5 ml	46,4 kDa ( $\hat{=} 2 \cdot M_r(\text{D5D6-}^{15}\text{N})$ )	5%

Je Chromatographielauf wurden 2 ml auf die Säule aufgetragen. Die Hauptfraktionen wurden gesammelt und die Konzentration durch UV-Spektroskopie bestimmt. Die durchschnittliche Ausbeute an renaturiertem und gereinigten gp130D5D6 betrug ca. 5 mg Protein pro Liter Bakterienkultur.

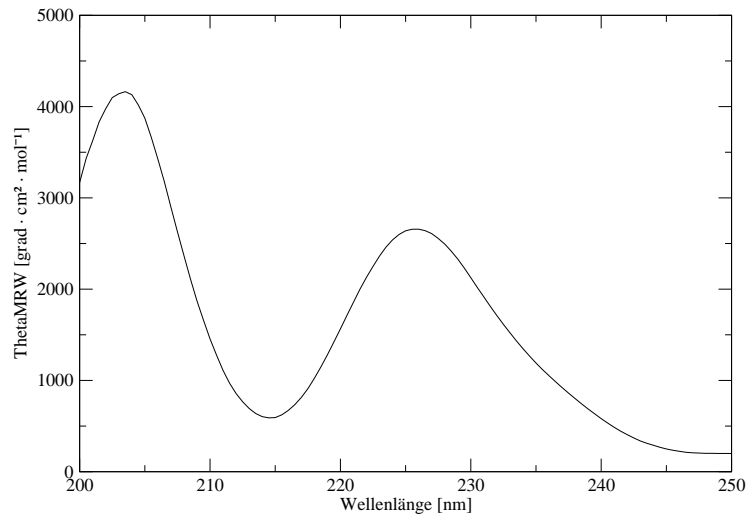
#### 3.4 Aufkonzentrieren von D5D6-Lösungen

Das Aufkonzentrieren von gelöstem gp130D5D6 erfolgte unter Stickstoffüberdruck unter Verwendung von Ultrafiltrationszellen (Amicon, USA) (Abschnitt 2.3.5). Größere Volumina, wie sie nach dem Renaturieren oder der Größenausschlusschromatographie anfielen, wurden bei Raumtemperatur aufkonzentriert. Kleinere Mengen (20 ml oder weniger), mit dem Ziel, eine konzentrierte Proteinlösung herzustellen (1 mM oder höher) wurden bei 4°C aufkonzentriert. Es wurde beobachtet, dass die Gegenwart von NaCl im Puffer die Stabilität von D5D6 herabsetzte. Bei höheren Konzentrationen (insbesondere solcher, wie sie für die NMR-Spektroskopie notwendig sind) erfolgte Präzipitation des Proteins. Daher wurde sowohl beim Renaturierungs- als auch beim Elutionspuffer für die Größenausschlusschromatographie auf Zusatz von NaCl verzichtet. Dadurch wurde die Neigung zur Präzipitation beim Aufkonzentrieren stark verringert.

#### 3.5 Circularer Dichroismus (CD-Spektroskopie)

Die Überprüfung des Renaturierungserfolgs erfolgte durch die CD-Spektroskopie. Das gereinigte gp130D5D6 aus den Hauptfraktionen der Größenausschlusschromatographie wurde dazu in einem *Jasco* J-720 CD-Spektrometer gemessen (Abschnitt 2.4); anschließend wurde der Puffer gemessen und dessen Spektrum vom zuvor erhaltenen Protein-Puffer-Spektrum subtrahiert, um das eigentliche Proteinspektrum zu erhalten. Die bei der Wellenlänge  $\lambda$  gemessene absolute Elliptizität  $\Theta_\lambda$  wurde bezogen auf die Schichtdi-

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.5:** CD-Spektrum der gekoppelten fünften und sechsten Domäne von gp130 (20 °C, pH 6)

cke der Lösung, die Konzentration und die mittlere Molekularmasse der Aminosäurereste des Proteins. Das mittlere Molekulargewicht von gp130D5D6 je Aminosäurerest beträgt 112,7 g/mol für unmarkiertes, 114,0 g/mol für einfach-markiertes ( $^{15}\text{N}$ ) und 119,1 g/mol für doppelt-markiertes ( $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ ) Protein.

Das CD-Spektrum von gp130D5D6 (Abbildung 3.5) ist charakterisiert durch ein Maximum bei 226 nm, ein Minimum bei 215 nm und ein weiteres Maximum bei 204 nm. Das Minimum sowie das Maximum bei 226 nm sind typisch für ein Fibronectin-Typ-III-Protein (Kishore et al., 1997). Das Maximum bei 204 nm fällt relativ niedrig aus, was allgemein typisch ist für  $\beta$ -Faltblattproteine (Wollmer, 1982). Ungewöhnlich hingegen ist, dass das Spektrum im gemessenen Wellenlängenbereich überall eine positive Elliptizität aufweist.

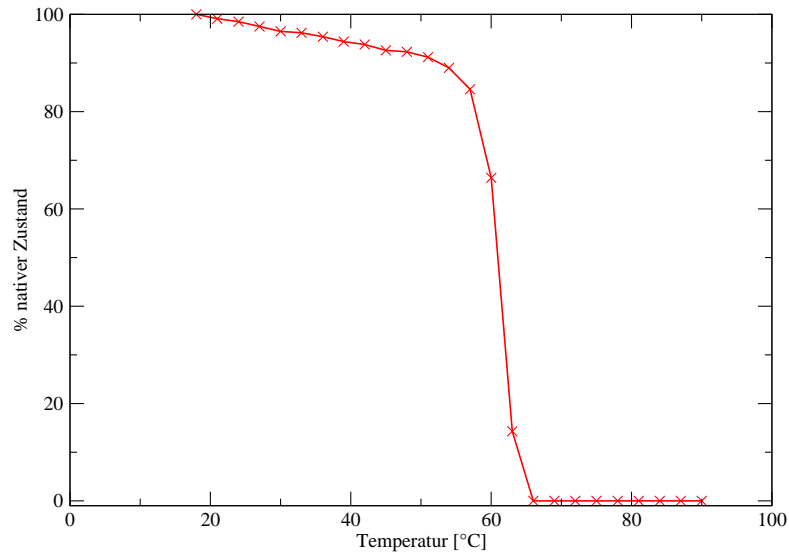
#### 3.5.1 Temperaturstabilität

Bei einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur während einer CD-spektroskopischen Messung konnte beobachtet werden, dass das Maximum bei 226 nm immer weiter abnahm und dass das gesamte Spektrum sich dem Spektrum eines denaturierten Proteins annäherte. Es lag daher nahe, die gemessene Elliptizität bei 226 nm als Maß für den Grad der Denaturierung in Abhängigkeit von der Temperatur zu wählen. Dazu wurde gp130D5D6 in der temperierbaren Küvettenhalterung des Spektrometers bei schrittweiser Steigerung der Temperatur von 20 °C bis 90 °C gemessen. Die Elliptizität bei Raumtemperatur wurde gleich 100%, die Elliptizität bei 90 °C wurde gleich 0% nativem Zu-



### 3 Ergebnisse

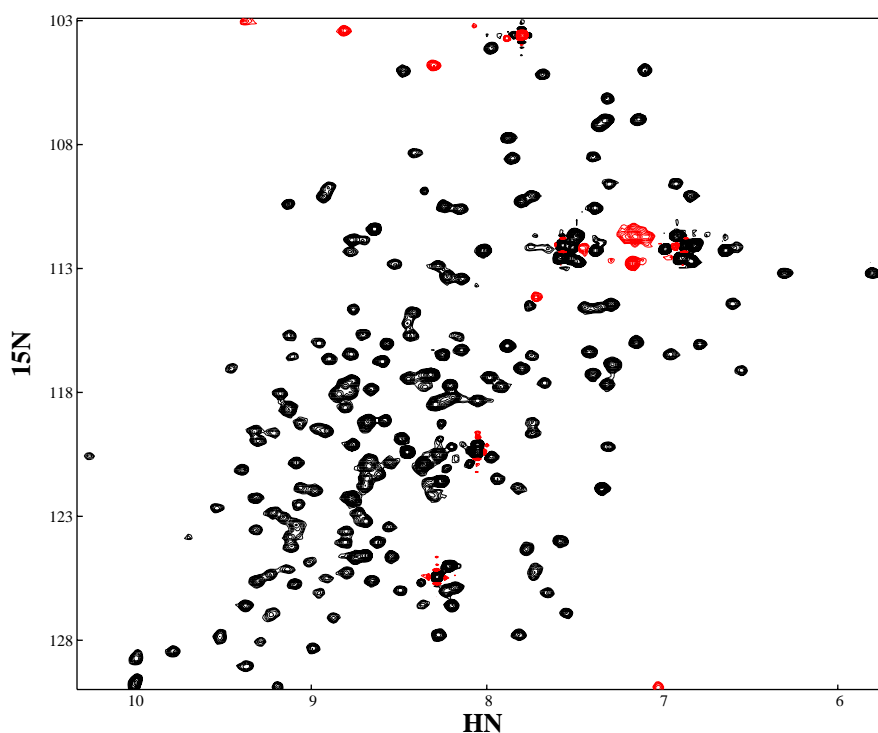
stand gesetzt. Nach Auftragen dieser Werte gegen die Temperatur wurde so eine Schmelzkurve erhalten (Abbildung 3.6). Der Wendepunkt dieser Kurve ist der Schmelzpunkt des Proteins. Er liegt bei 60 °C, was eine relativ hohe thermische Stabilität bedeutet.



**Abbildung 3.6:** Temperaturverhalten von g130D5D6 bei pH 6: es wurde die Elliptizität bei einer Wellenlänge von 226 nm bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Dabei wurde die Messung bei Raumtemperatur begonnen, anschließend erfolgte eine Temperatursteigerung in Schritten von 5 °C bis zur Endtemperatur von 90 °C.

### 3.6 NMR-Spektroskopie: die sequentielle Zuordnungsstrategie

Abbildung 3.7 zeigt das 2D- $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der fünften und sechsten Domäne von gp130. Die große Dispersion im Bereich der  $^1\text{H}_\text{N}$  und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzfrequenzen zeigt, dass das Protein in nativem Zustand vorlag. Resonanzfrequenzen, die außerhalb der bei diesem Experiment gewählten und dargestellten spektralen Breite lagen, wurden in diesen Bereich hineingefaltet und erscheinen im Spektrum in roter Farbe.



**Abbildung 3.7:** 2D- $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der fünften und sechsten Domäne von gp130. Das Spektrum wurde mit  $512 (^1\text{H}) \times 100 (^{15}\text{N})$  Datenpunkten bei  $25^\circ\text{C}$  aufgenommen.

Die gekoppelte fünfte und sechste Extrazellulärdomäne von gp130 besteht aus 200 Aminosäureresten (Tabellen 3.2 und 3.3); im 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum werden hauptsächlich Signale von den Amidprotonen des Proteinrückgrates (*backbone*-Amidprotonen) erwartet. Zusätzliche Signale können – je nach pH-Wert und Lösemittlexposition – die Amidprotonen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin sowie die NH-Protonen des Indolrestes von Tryptophan und des Imidazolrestes von Histidin ergeben. Keine Signale hingegen liefern aufgrund ihrer Struktur die 13 Prolinreste (kein NH-Proton) sowie der N-Terminus, dessen NH-Protonen sehr schnell mit dem Lösemittel austauschen. Von den *backbone*-Amidprotonen wurden daher 186 Resonanzsignale erwartet; von den

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.2:** Die Aminosäuresequenz von gp130D5D6.

```

1 MQATHPVMDL KAFPKDNMLW VEWTTPRESV KKYILEWCVL SDKAPCITDW
51 QQEDGTVHRT YLRGNLAESK CYLITVTPVY ADGPGSPESI KAYLKQAPPS
101 KGPTVRTKKV GKNEAVLEWD QLPVDVQNGF IRNYTIFYRT IIGNETAVNV
151 DSSHTEYTLS SLTSDTLYMV RMAAYTDEGG KDGPEFTFTT PKFAQGEIEA

```

Amidgruppen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin, welche jeweils sieben Mal in gp130D5D6 vorkommen, wurden maximal 28 Signale erwartet. Von den HN-Gruppen der Tryptophane wurden maximal 5, von den NH-Gruppen der Histidine maximal 3 Signale erwartet. Insgesamt gezählt wurden im HSQC-Spektrum 214 Resonanzen, was in sehr guter Übereinstimmung mit den theoretisch maximal zu erwartenden 222 Resonanzsignalen ist.

Allerdings ist es mittels des HSQC-Experiments nicht möglich, den im Spektrum gefundenen Signalen eindeutig die signalgebende Aminosäure innerhalb der Sequenz des Proteins zuzuordnen. Dazu bedarf es weiterer Experimente, welche Informationen über den Typ der Aminosäure liefern. Da in der Regel jede der möglichen Aminosäuren mehrfach in einem Protein vorhanden ist, reicht diese Typinformation alleine nicht aus. Es bedarf zusätzlicher Informationen über sogenannte sequentielle Konnektivitäten, d.h. Informationen über den Aminosäurerest, der der signalgebenden Aminosäure benachbart ist. Durch Kombinieren solcher Sequenzinformationen lassen sich Signalketten (zunächst Paare, daraus Tripel, dann Quadrupel usw.) bilden, welche sich bei genügender Länge - gepaart mit der Typinformation - eindeutig auf eine Sequenz von Aminosäuren im Protein abbilden lassen.

Den in dieser Arbeit verwendeten Spektren liegen NMR-Experimente zugrunde, welche den Aminosäurerest  $i$  mit dem Aminosäurerest  $i - 1$  korrelieren, d.h. eine mit „sequentiell benachbart“ bezeichnete Aminosäure bezeichnet in Zusammenhang mit sequentiellen Konnektivitäten stets den Nachbarn in Richtung des N-Terminus. Das 3D-

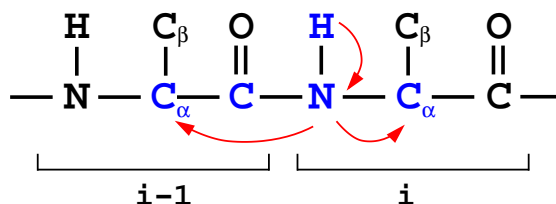
**Tabelle 3.3:** Die Aminosäurezusammensetzung von gp130D5D6.

Aminosäure	Anzahl	Aminosäure	Anzahl	Aminosäure	Anzahl
Ala	13	Gly	12	Pro	13
Arg	7	His	3	Ser	11
Asn	7	Ile	9	Thr	21
Asp	12	Leu	13	Trp	5
Cys	3	Lys	14	Tyr	10
Gln	7	Met	5	Val	15
Glu	14	Phe	6		

HNCA-Spektrum wurde primär zum Auffinden sequentieller Konnektivitäten verwendet und sekundär zur Typbestimmung. Die Verifikation dieser Zuordnungen erfolgte - sofern möglich - mittels der 3D-CBCA(CO)NH-, 3D-HN(CA)HA- und  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektren. Voraussetzung für die parallele Auswertung der Spektren war, dass diese korrekt aufeinander referenziert sind. In allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-Experimenten erfolgten die Korrelationen der Resonanzen über kovalent verknüpfte HN-Gruppen, so dass ein beobachtetes Resonanzsignal in allen Spektren stets bei identischer  $^1\text{H}_\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Frequenz zu finden sein sollte. Damit dieses sichergestellt war, wurden alle dreidimensionalen NMR-Spektren auf das 2D- $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum referenziert.

### 3.6.1 Das 3D-HNCA-Experiment

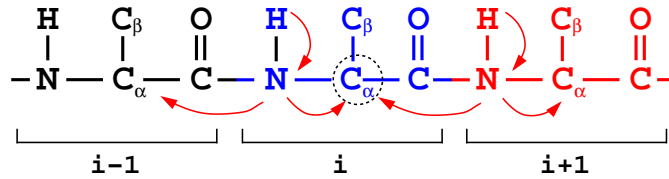
Das 3D-HNCA-Experiment ist ein Tripelresonanzexperiment, das als Ausgangspunkt für die sequentielle Zuordnung der  $^{13}\text{C}_\alpha$ -,  $^1\text{H}_\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzen genutzt wurde. Bei diesem Experiment werden die  $^1\text{H}_\text{N}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Kerne eines Aminosäurerestes  $i$  mit dem  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Kern der sequentiell benachbarten Aminosäure  $i-1$  (Abbildung 3.8) korreliert.



**Abbildung 3.8:** Schematische Darstellung der intra- und interresidualen Korrelation beim 3D-HNCA-Experiment

Somit findet man im 3D-HNCA-Spektrum vom  $\text{C}_\alpha$ -Atom einer gegebenen Aminosäure zwei Signale mit im Idealfall gleicher  $^{13}\text{C}$ -Frequenz: eines durch Korrelation mit dem  $^1\text{H}_\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Atom seines eigenen Aminosäurerestes (Aminosäure  $i$ ) und eines durch Korrelation mit den entsprechenden Atomen des in der Aminosäuresequenz folgenden Aminosäurerestes  $i+1$  (Abbildung 3.9).

Einige Aminosäuren sind im 3D-HNCA-Spektrum durch die  $^{13}\text{C}$ -Frequenzen ihrer  $\text{C}_\alpha$ -Atome relativ leicht zu identifizieren, da ihre Resonanzsignale in einem Frequenzbereich liegen, welcher sich mit dem Frequenzbereich keiner oder nur einer anderen Aminosäure überschneidet (Glycin 45–48 ppm, Alanin 50–53 ppm, Serin 60–64 ppm, Threonin 62–66 ppm); die  $\text{C}_\alpha$ -Atome der übrigen Aminosäurereste geben beim 3D-HNCA-Experiment meistens jedoch Signale im Bereich von 54–58 ppm (Abbildung 3.10), so dass eine eindeutige Zuordnung des betrachteten Signals zur entsprechenden Aminosäure auf Grundlage



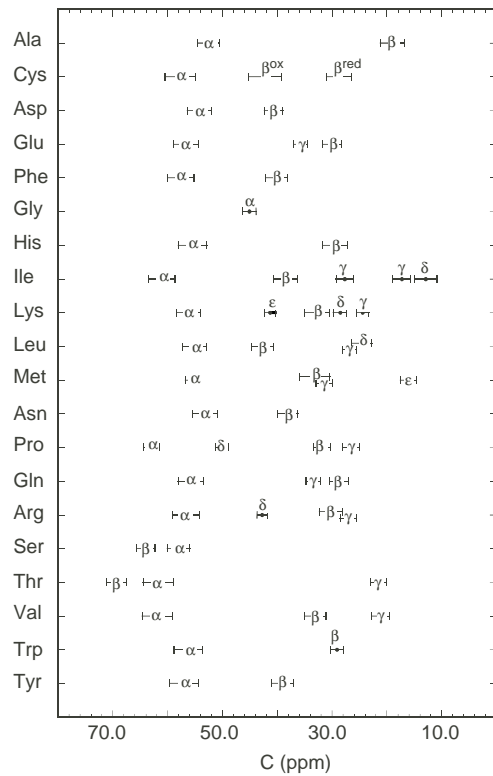
**Abbildung 3.9:** Beim 3D-HNCA-Experiment werden von einem gegebenen  $C_\alpha$ -Atom durch intra- und interresiduale Korrelation insgesamt zwei Resonanzsignale erhalten.

der Daten aus dem 3D-HNCA-Spektrum in der Regel nicht möglich ist. Daher beginnt man bei der sequentiellen Zuordnung zunächst mit einem  $^{13}C_\alpha$ -Resonanzsignalpaar, dessen intraresiduale  $C_\alpha$ -Resonanz eindeutig einem bestimmten Aminosäuretyp zuzuordnen ist. Ausgehend vom interresidualen  $^{13}C_\alpha$ -Resonanzsignal sucht man dann im Spektrum durch Vergleich der Resonanzfrequenzen das intraresiduale  $^{13}C_\alpha$ -Resonanzsignal des sequentiell benachbarten Aminosäurerestes. Nachdem dieses gefunden wurde, wird der Suchvorgang analog fortgesetzt und bildet so eine Kette von zusammenhängenden Signalen, welche sich eindeutig auf eine Aminosäuresequenz im Protein abbilden lässt (Abbildung 3.11). Oft ergeben sich jedoch mehrere Möglichkeiten, eine auf diese Weise im Spektrum gefundene Kette fortzusetzen, so dass eine eindeutige Zuordnung unter alleiniger Verwendung des 3D-HNCA-Spektrums bei größeren Proteinen nicht ausreichend ist und Spektren mit zusätzlichen Informationen herangezogen werden müssen.

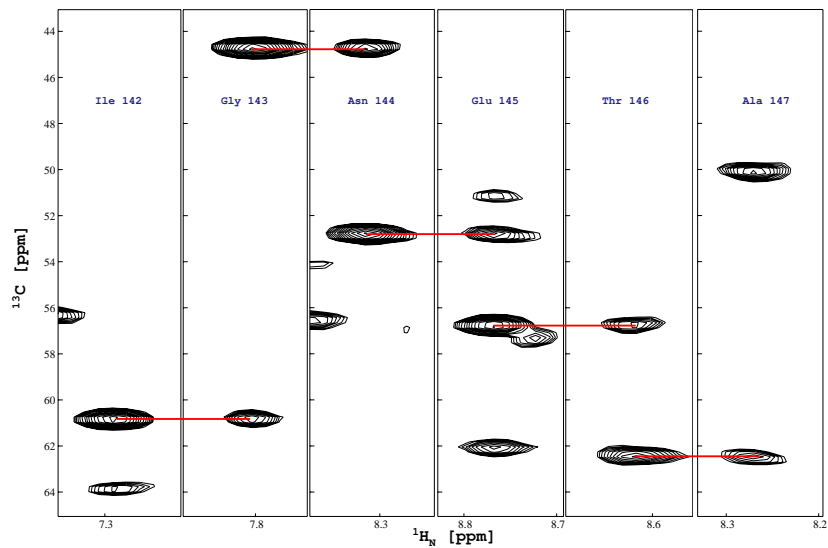
### 3.6.2 Das 3D-CBCA(CO)NH-Experiment

Beim 3D-CBCA(CO)NH-Experiment wird das  $^1H$ -Amidproton mit dem  $^{15}N$ -Amidstickstoff des Aminosäurerestes  $i$  und dem  $C_\alpha$ - und  $C_\beta$ -Atom der sequentiell benachbarten Aminosäure  $i - 1$  (Abbildung 3.12) korreliert. Ergänzend zum 3D-HNCA-Spektrum erhält man so eine zusätzliche Information über das  $C_\beta$ -Atom des mit Aminosäure  $i$  korrelierten Aminosäurerestes  $i - 1$  (Abbildung 3.13). Diese Zusatzinformation erleichtert erheblich die Zuordnung zu der entsprechenden Aminosäure. Allerdings ist die Empfindlichkeit des 3D-CBCA(CO)NH-Experiments geringer als die des 3D-HNCA-Experiments (Empfindlichkeitsverhältnis HNCA zu CBCA(CO)NH  $\approx$  4:1). So wurde bei der Auswertung des 3D-CBCA(CO)NH-Spektrums statt der im Idealfall zu erwartenden Zahl von 174 Signalpaaren (186 signalgebende Aminosäuren abzüglich der 12 Glycine, die kein  $\beta$ -C-Atom besitzen) nur 63 Signalpaare gefunden. Weiterhin wurden 94 Resonanzsignale gefunden, bei denen ein Signal vom  $^{13}C_\beta$ -Atom nicht auftrat bzw. aufgrund zu schwacher Intensität nicht identifiziert werden konnte. Bei diesen Resonanzsignalen war demnach kein Informationsgewinn gegenüber dem 3D-HNCA-Spektrum zu verzeichnen.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.10:** Darstellung der  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen aller aliphatischen Aminosäureseitenketten. Der Abbildung zugrunde liegend sind NMR-spektroskopische Messungen von 13 Proteinen (Kraulis, 1994). Die mit griechischen Buchstaben beschrifteten Balken geben die Standardabweichungen von den Mittelwerten der in den Experimenten gemessenen  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen für das entsprechende Seitenketten- $^{13}\text{C}$ -Atom einer Aminosäure wieder. Abbildung aus Cavanagh et al. (1996).



**Abbildung 3.11:** Sequentielle Zuordnung der  $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}_\text{N}$ -Resonanzen im 3D-HNCA-Spektrum am Beispiel des Peptidsegments Isoleucin 142 bis Alanin 147. Die roten Striche verbinden - von rechts nach links gesehen - ein interresiduales  $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -Resonanzsignal mit einem intraresidualen Signal von gleicher  $^{13}\text{C}$ -Frequenz und somit zwei Signale von jeweils ein und demselben  $\text{C}_{\alpha}$ -Atom.

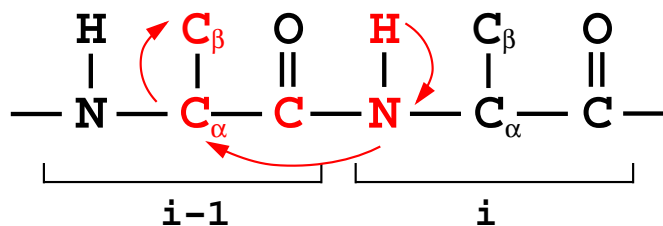


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Korrelationen beim CBCA(CO)NH-Experiment

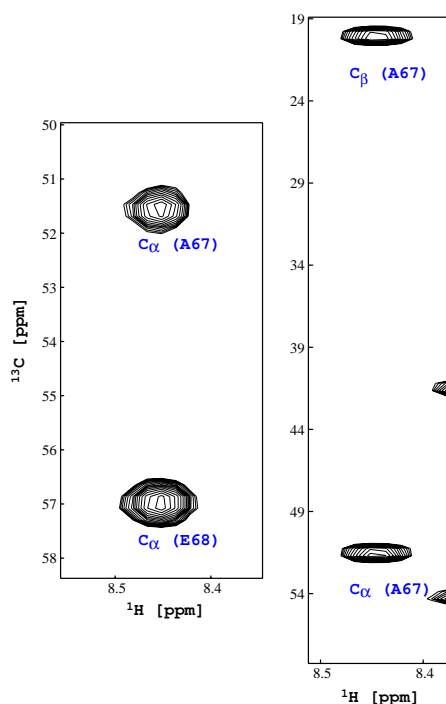
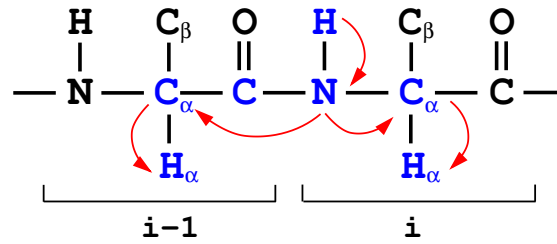


Abbildung 3.13: Vergleich von 3D-HNCA- und 3D-CBCA(CO)NH-Spektrum. Die linke Abbildung zeigt die  $^{13}\text{C}$ -Resonanzsignale von Glu68 im 3D-HNCA-Experiment. Das untere Signal stammt vom  $\text{C}_\alpha$ -Atom von Glu68, das obere vom  $\text{C}_\alpha$ -Atom des sequentiell benachbarten Ala67. Zum Vergleich rechts daneben die  $^{13}\text{C}$ -Resonanzsignale der  $\text{C}_\alpha$ - und  $\text{C}_\beta$ -Kerne von Ala67, erzeugt durch Korrelation mit Glu68 im 3D-CBCA(CO)NH-Experiment. Die Frequenzen der abgebildeten  $\text{C}_\alpha$ - und  $\text{C}_\beta$ -Resonanzsignale sind - zusammen genommen - charakteristisch für ein Alanin.

### 3.6.3 Das 3D-HN(CA)HA-Experiment

Im 3D-HN(CA)HA-Experiment werden die Amidprotonen eines Aminosäurerestes  $i$  mit den kovalent verknüpften  $^{15}\text{N}$ -Kernen und den intraresidualen  $\text{H}_\alpha$ -Atomen sowie den  $\text{H}_\alpha$ -Atomen der sequentiell benachbarten Aminosäure korreliert (Abbildung 3.14). Dadurch werden im HN(CA)HA-Spektrum Informationen über sequentielle Konnektivitäten erhalten, welche die mittels des 3D-HNCA-Spektrums gefundene Zuordnung bestätigen können. Weiterhin lassen sich durch dieses Spektrum im 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum (Abschnitt 3.6.4) die Resonanzen der intraresidualen  $\text{H}_\alpha$ -Atome zuordnen. Von den theoretisch maximal zu erwartenden 186 Resonanzsignalpaaren wurden allerdings nur 33 Signalpaare im HN(CA)HA-Spektrum gefunden. Zusätzlich wurden 82 intraresiduale Einzelresonanzen gefunden, d.h. das Signal des  $\text{H}_\alpha$ -Atoms der sequentiell

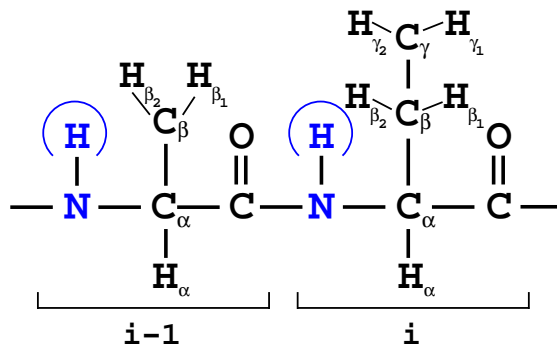


**Abbildung 3.14:** Schematische Darstellung der Korrelationen beim HN(CA)HA- Experiment

benachbarten Aminosäure fehlte bzw. war aufgrund zu schwacher Intensität nicht zu identifizieren.

### 3.6.4 Das $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Experiment

Im  $3\text{D-}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Experiment werden die Amidprotonen eines Aminosäurerestes  $i$  mit den kovalent verknüpften  $^{15}\text{N}$ -Kernen und allen räumlich benachbarten Protonen korreliert, deren Abstand kleiner als  $5 \text{ \AA}$  vom Amidproton ist (Abbildung 3.15).

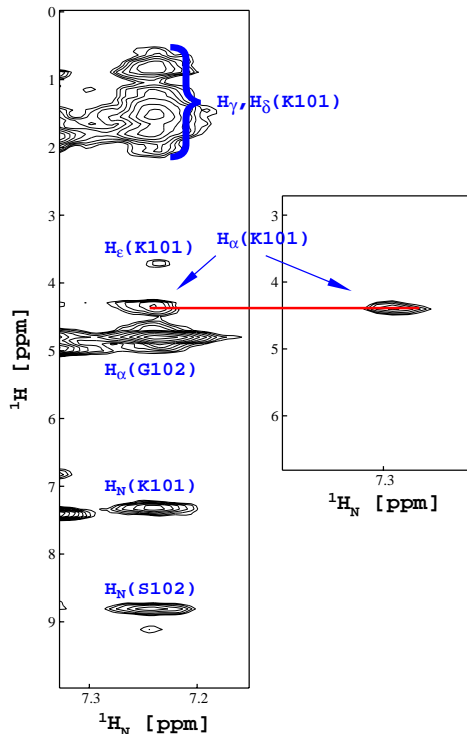


**Abbildung 3.15:** Schematische Darstellung der Korrelationen im  $3\text{D-}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Experiment. In diesem Experiment werden Korrelationen zwischen den  $^1\text{H}_\text{N}$ -Atomen mit den kovalent verbundenen  $^{15}\text{N}$ -Kernen und allen räumlich benachbarten Protonen erzeugt, deren Abstand vom Amidproton kleiner als  $5 \text{ \AA}$  ist.

Es werden also Resonanzsignale erhalten von intra- als auch von interresidualen Protonen. Für die sequentielle Zuordnung ist dieses Experiment nur eingeschränkt nutzbar, da sich bei den einzelnen Signalen nicht eindeutig entscheiden lässt, ob es von einem intra- oder interresidualen H-Atom stammt. Im Falle der interresidualen Resonanzen ist zusätzlich noch zu entscheiden, ob das beobachtete Resonanzsignal vom sequentiell benachbarten Aminosäurerest stammt oder nicht. Unter Verwendung des  $3\text{D-HN(CA)HA}$ -Spektrums (Abschnitt 3.6.3) lässt sich aber im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum das vom intraresidualen  $\text{H}_\alpha$ -Atom stammende Signal zuordnen. Für die eindeutige Zuordnung der intraresidualen Resonanzen der  $\text{H}_\beta$ -,  $\text{H}_\gamma$ -,  $\text{H}_\delta$ - und  $\text{H}_\epsilon$ -Atome werden gewöhnlich TOCSY-Experimente ( $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC und  $^{13}\text{C}$ -HCCH-TOCSY) durchgeführt. Diese Spektren liegen noch nicht vor. Die Resonanzen sowohl beim  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-



### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.16:** Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Resonanzen von Lysin 101. Durch Vergleich von  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum (links) und HN(CA)HA-Spektrum (rechts) lässt sich in der Spur der NOESY-Signale das Signal des intraresidualen  $\text{H}_\alpha$ -Atoms zuordnen. Die Zuordnung der Resonanzen der übrigen intraresidualen Protonen erfolgte anhand einer Tabelle von Resonanzfrequenzen (Wüthrich, 1986) von  $^1\text{H}$ -Atomen, die durch NMR-spektroskopische Untersuchungen von Oligopeptiden ermittelt wurden (Bundi und Wüthrich, 1979).

Experiment als auch beim 3D-HNCA-Spektrum sind korreliert über die intraresiduale Amidgruppe eines Aminosäurerestes. Daher ist zu erwarten, dass jedem Resonanzsignal im 3D-HNCA-Spektrum bei korrekter Referenzierung der Spektren ein Resonanzsignal im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum zuzuordnen ist. Diese Übereinstimmung war in vielen - jedoch nicht in allen - Fällen gegeben. Zu einigen Resonanzsignalen im 3D-HNCA-Spektrum wurden keine eindeutigen Entsprechungen im 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum gefunden und umgekehrt.

### 3.7 Zuordnung der Signale im HSQC-Spektrum

Die Resonanzsignale, welche beim 2D- $^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment erhalten werden, resultieren durch Korrelation von kovalent verbundenen  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Atomen. Im 2D- $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum werden diese Signale dargestellt. Sie resultieren in der Mehrzahl von den NH-Gruppen des Proteinrückgrates. Daneben lassen sich aber auch Signale von anderen NH-Gruppen beobachten, so von den Amidgruppen in den Seitenketten von Asparagin und von Glutamin. Auch die NH-Gruppe im Indolrest des Tryptophans kann beobachtet werden.

### 3 Ergebnisse

In Abbildung 3.17 sind alle Resonanzsignale, die zugeordnet werden konnten, mit dem Ein-Buchstaben-Symbol sowie der Nummer der entsprechenden Aminosäure bezeichnet, welche ihre Position innerhalb der Aminosäuresequenz von gp130D5D6 wiedergibt. Die Zählung beginnt dabei beim N-Terminus. Insgesamt konnten 122 von den 186 Aminosäuren des Proteinrückgrates, welche beobachtbar sind, zugeordnet werden. Dies entspricht einem Anteil von 66%.



#### Zuordnung der mit den Seitenkettenamidgruppen der Asparagine und Glutamine korrelierten Resonanzen

Von den maximal zu erwartenden 28 Signalen der Seitenkettenamidprotonen der jeweils sieben Asparagine und Glutamine in der Aminosäuresequenz der gekoppelten fünften und sechsten Domäne des gp130 wurden insgesamt 16 gefunden, ohne sie zunächst sequentiell zuzuordnen. Diese erste Resonanzsignalzuordnung geschah auf folgenden Grundlagen:

- die Frequenzen der Amidstickstoffatome und der Amidprotonen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin befinden sich gewöhnlich in einem eingeschränkten Bereich (N: 107–117 ppm, H: 5.0–7.5 ppm)
- die Resonanzfrequenzen der beiden Seitenketten-Amidprotonen von Asparagin und Glutamin unterscheiden sich um 0,5 bis 1 ppm, sind allerdings mit demselben Stickstoffatom korreliert, so dass sich ihre Resonanzsignale im 2D-<sup>15</sup>N-HSQC- und im 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Spektrum paarweise bei derselben <sup>15</sup>N-Frequenz finden lassen

Die allgemeine Zuordnung zu einem Asparagin oder zu einem Glutamin erfolgt dann unter Verwendung des HNCA- und des CBCA(CO)NH-Spektrums. Im HNCA-Spektrum werden die Resonanzsignale des C<sub>β</sub>-Atoms des Asparagins (im Bereich von 36–40 ppm) und des C<sub>γ</sub>-Atoms des Glutamins (im Bereich von 26–31 ppm) erwartet. Im CBCA(CO)-NH-Spektrum werden zusätzlich die Resonanzsignale des C<sub>α</sub>-Atoms des Asparagins (im Bereich von 50–55 ppm) und des C<sub>β</sub>-Atoms des Glutamins (im Bereich von 27–31 ppm) erwartet. Die spezielle Zuordnung zum entsprechenden Aminosäurerest in der Sequenz des Proteins gelingt dann schließlich dadurch, dass das Resonanzsignal des C<sub>α</sub>-Atoms des Asparagins bzw. des C<sub>β</sub>-Atoms des Glutamins im CBCA(CO)NH-Spektrum noch ein zweites Mal auftritt, bedingt durch die Korrelation mit dem Aminosäurerest, der dem entsprechenden Asparagin bzw. Glutamin benachbart ist (siehe Beschreibung des CBCA(CO)NH-Experiments, Abschnitt 3.6.2). Von den o.g. 16 Resonanzsignalen konnten im HSQC-Spektrum auf diese Weise drei Signalpaare sequentiell zugeordnet werden (N65, Q121 und Q195), da die entsprechenden Resonanzsignale im HNCA- bzw. CBCA(CO)NH-Spektrum gefunden wurden. Die Resonanzsignale der mit den Seitenkettenamidgruppen korrelierten C-Atome der übrigen Asparagine und Glutamine waren im HNCA- und CBCA(CO)NH-Spektrum aufgrund zu schwacher Signalintensität nicht zu identifizieren.

### Zuordnung der mit den Seitenkettenaminogruppen der Tryptophane korrelierten Resonanzen

Die allgemeine Zuordnung eines Resonanzsignals im  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum zu einem Tryptophan gelingt gewöhnlich durch

- den erfahrungsgemäß eng begrenzten Resonanzfrequenzbereich des Aminstickstoffs ( $\geq 125$  ppm) und des Aminprotons ( $\geq 8,5$  ppm)
- das Fehlen von Resonanzsignalen bei der Frequenz des Aminstickstoffs und des Aminprotons im HNCA-Spektrum
- die Resonanzsignale der Protonen des Indolrestes im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum, welche in räumlicher Nähe der Aminogruppe liegen (H-2 und H-4–H-7, jeweils bei 7–8 ppm)

Auf diese Weise konnten die Resonanzsignale von drei der insgesamt fünf Tryptophane des gp130D5D6 im HSQC-Spektrum zunächst allgemein zugeordnet werden; die Resonanzsignale der verbliebenen zwei Tryptophane konnten nicht lokalisiert werden, weder im 2D- $^{15}\text{N}$ -HSQC- noch im 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum. Die spezielle Zuordnung der Tryptophane gelingt dann dadurch, dass im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum die Resonanzsignale der Protonen des Indolringes ein zweites Mal auftreten, diesmal durch Korrelation mit der Amidgruppe desselben Tryptophanrestes. Dieses gelang in zwei Fällen (W20 und W37).

## 3.8 Das molekulare Modell der fünften und sechsten Domäne des gp130

### 3.8.1 Das sequentielle *alignment*

Zur Unterstützung der Auswertung des 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrums wurden je ein molekulares Modell der fünften und sechsten Domäne des gp130 erstellt. Diese Modelle entstanden auf Grundlage von bekannten Strukturen strukturhomologer Proteine, welche unter Verwendung des Programmpakets *ProHit* (ProCeryon Biosciences GmbH, Salzburg, Österreich) ausgewählt wurden. Für das Modell der fünften Domäne wurde als Vorlage die Struktur des *Fibronectin Cell-Adhesion Module Type III-10* (PDB-Code 1FNA), für die sechste Domäne wurde ein Fragment des humanen Fibronectin (PDB-Code 1FNF, Aminosäurereste 271–368) verwendet. Zunächst wurde jeweils ein sequentielles *alignment* der beiden Domänen des gp130 und der ausgewählten Proteine

### 3 Ergebnisse

(A)					
	1				
D5	MQATHPVMDL	KAFPKDNMLW	VEWTTTPRESV	KKYILEWCVL	SDKAPC.ITD
pdblfnfna	...GSLEVV	AATP..TSLL	ISWDAPAVTV	RYRITYGET	GGNSPVQEF*
		. * * *	. * * *	. * * *	. * *
	50				96
D5	WQQEDGTVHR	TYLRGNLAES	KCYLITVTPV	YADGPGSPES	IKAYLKQ..
pdblfnfna	VPGSKSTATI	SGLKPGV.DY	TITVYAVTGR	G.DSPASSKP	ISINYRTEI
	*	. * . . .	. . **	* * * .	* . . .
(B)					
	94				
D6	LKQAPPSKGP	TVRTKKVGKN	EAVLEWDQLP	VDVQNGFIRN	YTIFYRTIIG
pdblfnf	QQSTVSDVPR	DLEVVAATPT	LLISWDAPA	VT....VRY	YRITYGETGG
	. . .	. . . . .	. . . * . . *	. * *	* * * . *
	144				
D6	NETAVNVDSS	..HTEYTLSS	LTSDTLYMVR	MAAYTDEGGK	DGPEFTFTTP
pdblfnf	NSPVQEFVTP	GSKSTATISG	LKPGVDYTIT	VYAVTG....	RGDSPASSKP
	* . . .	. . . * . *	* . * .	. . * . *	* . . . *
	192				
D6	KFAQGEIEA				
pdblfnf	ISINYRTEI				
	. .				

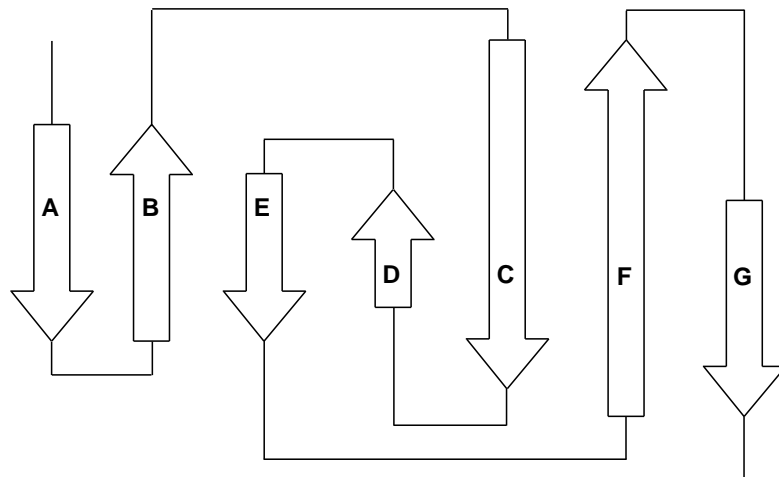
**Abbildung 3.18:** Sequentielles *alignment* (A) der fünften Domäne des gp130 mit dem *Fibronectin Cell-Adhesion Module Type III-10* (PDB-Code 1FNA) und (B) der sechsten Domäne des gp130 mit einem Fragment des humanen Fibronectin (PDB-Code 1FNF, Aminosäurereste 271–368). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern, homologe Aminosäuren durch einen Punkt gekennzeichnet.

angefertigt. Dabei wurde sowohl auf eine möglichst hohe Sequenzhomologie als auch auf eine Übereinstimmung der hydrophoben Aminosäuren, die am Aufbau des hydrophoben Kernbereichs beteiligt sind, geachtet. Das so erhaltene sequentielle *alignment* (Abbildung 3.18) bildete die Basis für den molekularen Modellbau. Bei der fünften Domäne wurde eine Homologie von 22% und eine Identität von 15% zur Vorlage bestimmt. Bei der sechsten Domäne wurde eine Homologie von 28% und eine Identität von 17% bestimmt.

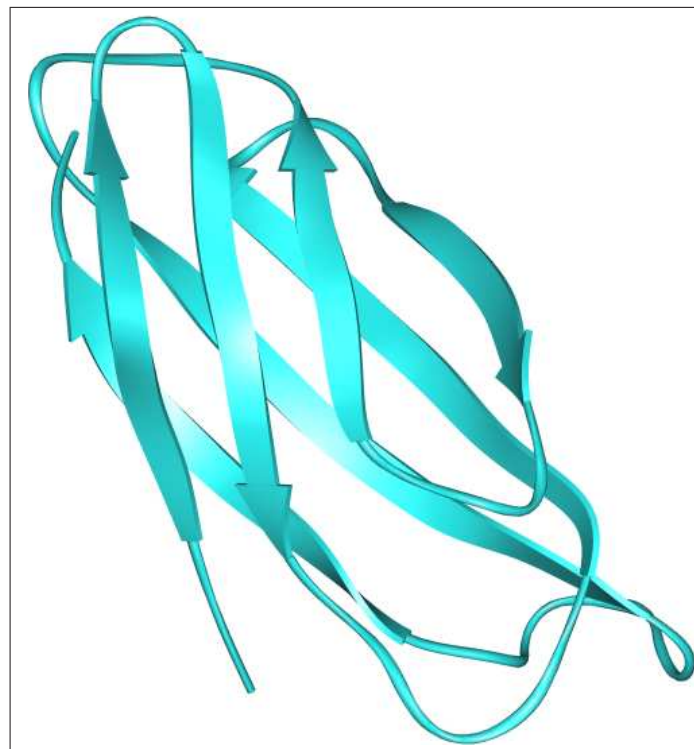
#### 3.8.2 Sekundärstruktur der molekularen Modelle

Die fünfte und sechste Domäne des gp130 sind Domänen vom Fibronectin-Typ-III (Bazan, 1990a). Domänen dieses Typs zeichnen sich allgemein aus durch eine bestimmte Sekundärstruktur: sie besitzen sieben  $\beta$ -Faltblattstränge, die sich in zwei antiparallelen  $\beta$ -sheets anordnen (Abbildung 3.19). Die beiden Strukturen, welche als Ergebnis des molekularen Modellbaus erhalten wurden, entsprechen sehr gut diesem Postulat (Abbildungen 3.20 und 3.21).

### 3 Ergebnisse

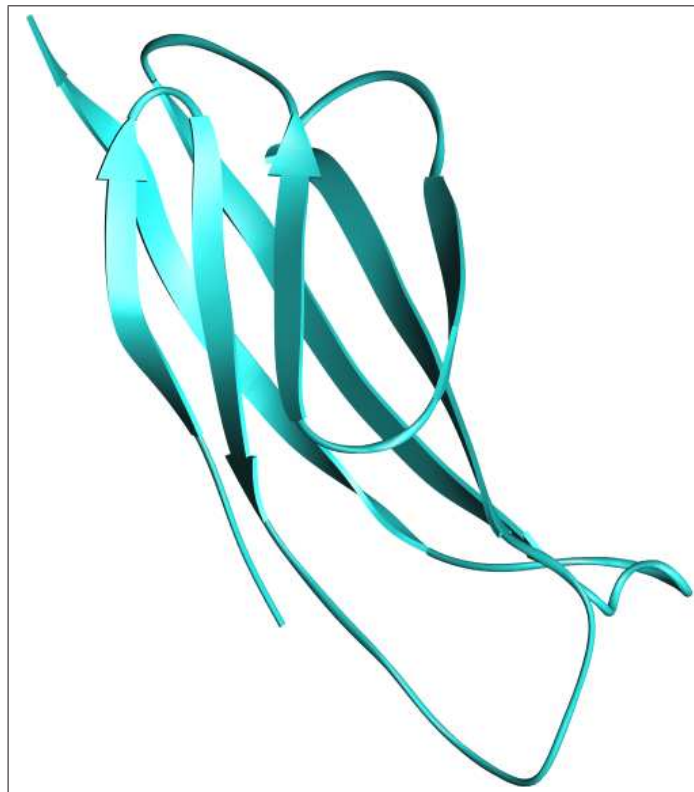


**Abbildung 3.19:** Schematische Darstellung der  $\beta$ -Faltblatt-Topologie einer FN-Typ-III-Domäne. Die sieben  $\beta$ -Faltblattstränge ordnen sich in zwei antiparallele  $\beta$ -sheets (ABE und DCFG) an.



**Abbildung 3.20:** Das molekulare Modell der fünften Domäne des gp130 in *ribbon*-Darstellung. Faltblattstränge sind als Pfeile dargestellt. Im Vordergrund (von links nach rechts) befinden sich die Faltblattstränge A,B und E, im Hintergrund (von links nach rechts) die Faltblattstränge D,E,B und A.

### 3 Ergebnisse

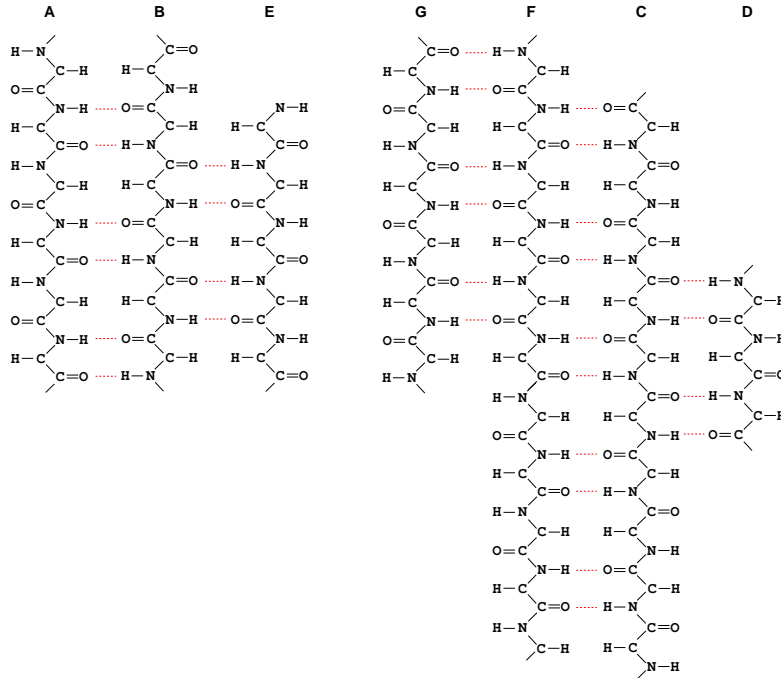


**Abbildung 3.21:** Das molekulare Modell der sechsten Domäne des gp130 in *ribbon*-Darstellung. Faltblattstränge sind als Pfeile dargestellt. Im Vordergrund (von links nach rechts) befinden sich die Faltblattstränge A,B und E, im Hintergrund (von links nach rechts) die Faltblattstränge D,E,B und A.



### 3 Ergebnisse

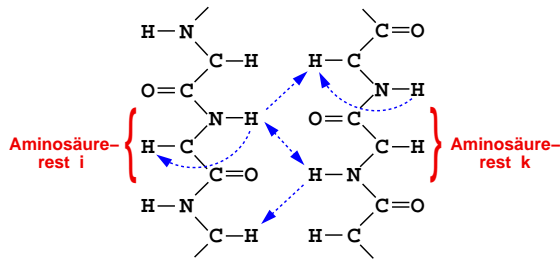
Die  $\beta$ -Faltblattstrukturen lassen sich vereinfacht als zweidimensionales Netzwerk des Proteinrückgrates darstellen, wobei die einzelnen Faltblattstränge unter Berücksichtigung von Wasserstoffbrückenbindungen ( $\text{N-H} \cdots \text{O=C}$ ) gegeneinander angeordnet sind (Abbildung 3.22). Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass sich N-H-Gruppen aus ei-



**Abbildung 3.22:** Darstellung der  $\beta$ -Faltblattstränge eines Proteins vom Fibronectin-Typ-III als zweidimensionales Netzwerk. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen N-H- und O=C-Gruppen sind durch rot gepunktete Linien dargestellt.

nem Faltblattstrang in räumlicher Nähe zu N-H- und H-C $_{\alpha}$ -Gruppen eines assoziierten Strangs befinden. Im 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Experiment werden daher insbesondere Resonanzsignale (sogenannte NOEs) erwartet durch interchenare Korrelation von Amidgruppen in Faltblattsträngen mit N-H- und H-C $_{\alpha}$ -Gruppen des jeweils assoziierten Faltblattstrangs. Im Einzelnen wird je ein NOE-Signal durch Korrelation des Amidprotons von Aminosäurerest  $i$  mit dem Amidproton von Aminosäurerest  $k$  und umgekehrt erhalten (sogenannte Kreuzsignale, engl. *crosspeaks*, Abbildung 3.23), angedeutet durch den blauen Doppelpfeil in der Abbildung. Weiterhin werden zusätzliche interchenare Resonanzsignale erhalten von H $_{\alpha}$ -Protonen aus dem der Aminosäure  $i$  gegenüberliegenden Faltblattstrang. Nach Analyse der Sekundärstruktur der molekularen Modelle wurden die dabei gefundenen Informationen als zweidimensionales Netzwerk dargestellt (Abbildungen 3.24, 3.25, 3.26 und 3.27). In den Abbildungen sind die interchenaren Korrelationen, welche im 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Experiment zu erwarten sind, durch

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.23:** Darstellung von interresidualen NOE-Kontakten bei einem  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HS-QC-Experiment im zweidimensional dargestellten  $\beta$ -Faltblattnetzwerk (blau gestrichelt dargestellt), welche durch Korrelation von Amidgruppen mit räumlich benachbarten N-H- und H-C $_{\alpha}$ -Protonen auftreten.

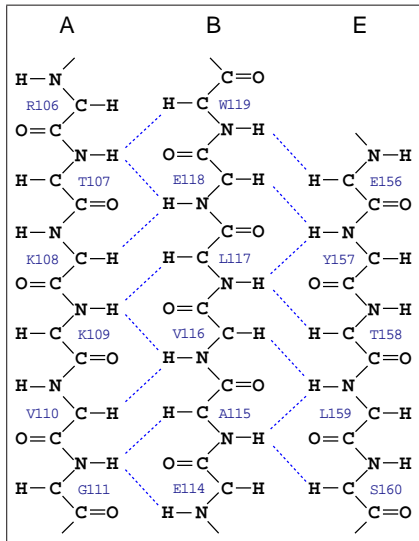
gestrichelte Linien bezeichnet. Tabelle 3.4 fasst die von den Modellen vorhergesagte Verteilung der Aminosäurereste der fünften und sechsten Domäne auf die entsprechenden Sekundärstrukturelemente zusammen.

**Tabelle 3.4:** Die nach den molekularen Modellen ermittelte Verteilung der Aminosäurereste der fünften und sechsten Domäne des gp130 auf die einzelnen Faltblattstränge.

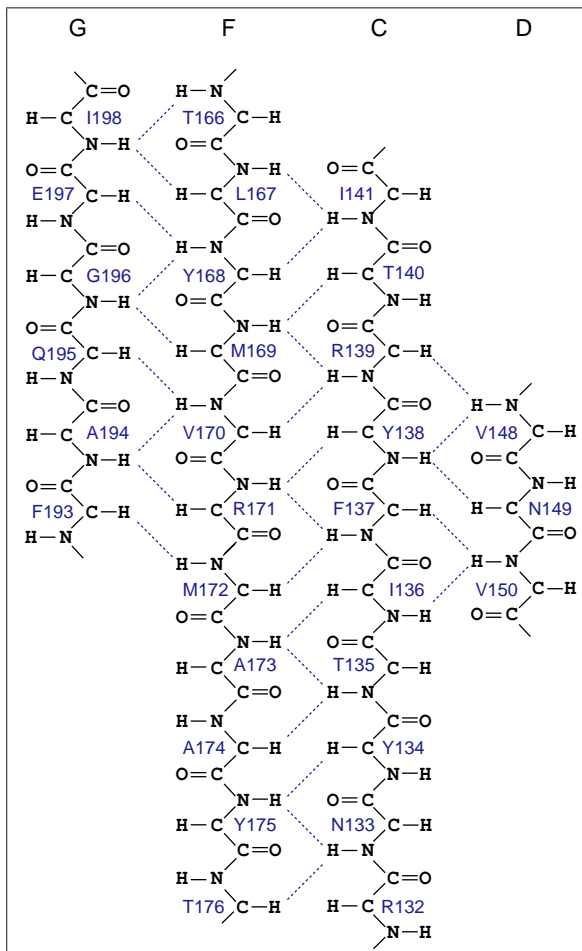
Bereich	Domäne	Faltblattstrang	Bereich	Domäne	Faltblattstrang
V7-F13	D5	A	R106-G111	D6	A
N17-W23	D5	B	E114-W119	D6	B
T56-T60	D5	E	E156-S160	D6	E
S89-L94	D5	G	F193-I198	D6	G
S69-T77	D5	F	T166-T176	D6	F
K31-V39	D5	C	I141-R132	D6	C
T48-W50	D5	D	V148-V150	D6	D



### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.26:** Das  $\beta$ -Faltblattnetzwerk der Faltblattstränge A, B und E der sechsten Domäne des gp130 gemäß dem molekularen Modell. Die erwarteten NOE-Kontakte sind durch gestrichelte Linien dargestellt, die Aminosäurereste wurden entsprechend beschriftet.



**Abbildung 3.27:** Das  $\beta$ -Faltblattnetzwerk der Faltblattstränge G, F, C und D der sechsten Domäne des gp130 gemäß dem molekularen Modell. Die im NOESY-Experiment erwarteten NOE-Kontakte sind durch gestrichelte Linien dargestellt, die Aminosäurereste wurden entsprechend beschriftet.

### 3.9 Die Faltblatt-Topologie der fünften und sechsten Domäne des gp130

Durch Analyse des 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrums von gp130D5D6 sollten die Sekundärstrukturinformationen extrahiert und die Vorhersagen der Modelle überprüft werden. Zwingende Voraussetzung dafür ist eine möglichst vollständige sequentielle Zuordnung der NH- und der  $\text{C}_\alpha$ -H-Atome. Diese war nicht gegeben. Folgende Probleme behinderten die Auswertung des NOESY-Spektrums:

- bei den beobachteten Resonanzsignalen war häufig nicht eindeutig, ob diese von intra- oder interresidualen Protonen stammten
- das HN(CA)HA-Spektrum, welches ausschließlich Resonanzsignale von  $\text{H}_\alpha$ -Protonen liefert, enthielt nur ca. 60% der erwarteten Information (bezogen auf die Resonanzsignale von *intra*residualen  $\text{H}_\alpha$ -Atomen)
- nicht zu jedem Signal im HSQC konnte ein assoziiertes NOESY-Signal gefunden werden und umgekehrt
- bedingt durch Signalüberlagerungen konnten interchenar korrelierte Resonanzen gelegentlich nicht eindeutig zugeordnet werden

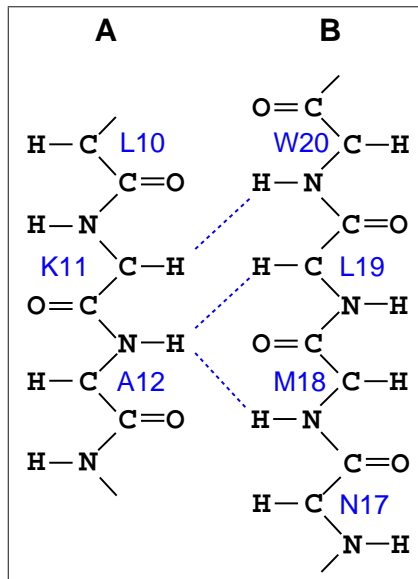
#### Fünfte Domäne, Faltblattstränge A B E

Für die fünfte Domäne des gp130 konnten innerhalb der Faltblattstränge A, B und E nur sieben Aminosäurereste eindeutig als zum Faltblattnetzwerk zugehörig identifiziert werden (Abbildung 3.28).

Die gegenüber dem molekularen Modell fehlenden Aminosäurereste V7–D9 und F13 aus Faltblatt A, W23–V21 aus Faltblatt B sowie H58–T60 aus Faltblatt E konnten bei der Durchführung der sequentiellen Zuordnung nicht identifiziert werden und waren somit nicht im 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum lokalisierbar. Die Aminosäurereste T56 und V57, laut Modell in Faltblatt E lokalisiert, konnten zwar sequentiell zugeordnet werden, es wurden jedoch keine eindeutigen interchenaren H–H-Kontakte identifiziert, so dass eine Einordnung dieser beiden Aminosäuren in den vom molekularen Modell postulierten Faltblattstrang nicht möglich war.

#### Fünfte Domäne, Faltblattstränge G F C D

Von den vom molekularen Modell vorhergesagten, in den Faltblattsträngen G,F,C und D lokalisierten Aminosäuren, konnten bei der sequentiellen Zuordnung nur die Amino-



**Abbildung 3.28:** Das auf Basis des 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Spektrums teilweise identifizierte  $\beta$ -Faltblattnetzwerk der Faltblattstränge A und B der fünften Domäne des gp130. Die identifizierten H–H-Kontakte sind durch gestrichelte Linien dargestellt, die Aminosäurereste wurden entsprechend beschriftet.

säurereste W37–K31 (postuliert im Faltblattstrang C) identifiziert werden. Es wurden keine eindeutigen H–H-Kontakte zu den benachbarten Strängen F und D identifiziert, so dass eine Verifikation der vom Modell postulierten Einordnung dieser Aminosäurereste in Faltblattstrang C nicht möglich war.

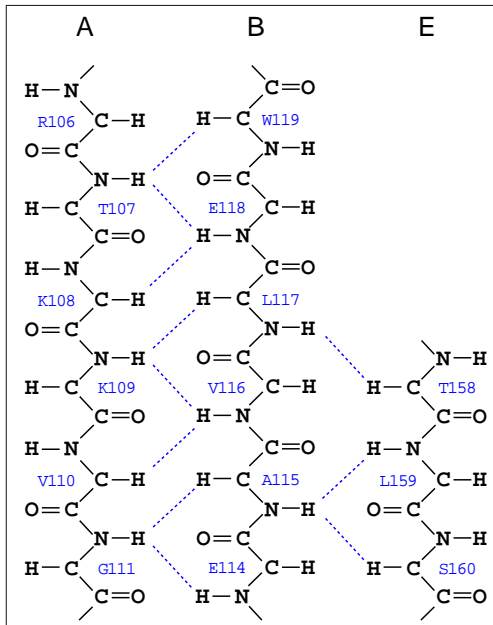
#### Sechste Domäne, Faltblattstränge A B E

Die vom molekularen Modell der sechsten Domäne postulierten Aminosäurereste der Faltblattstränge A, B und E konnten nahezu vollständig bestätigt werden (Abbildung 3.29). Ausgenommen die Aminosäurereste E156 und Y156 konnten nicht sequentiell zugeordnet und somit auch nicht im 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Spektrum lokalisiert werden.

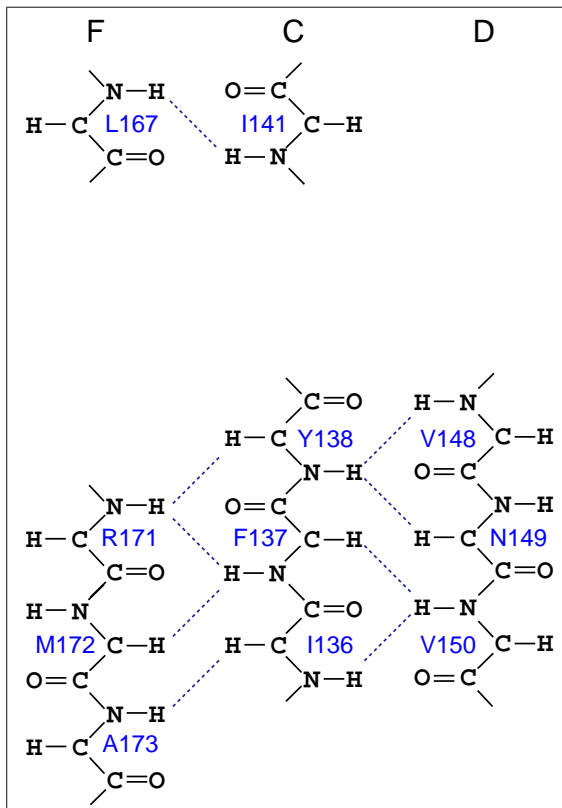
#### Sechste Domäne, Faltblattstränge G F C D

Das vom molekularen Modell der sechsten Domäne des gp130 Faltblattnetzwerk der Faltblätter G, F, C und D konnte nur teilweise bestätigt werden. Die gemäß dem Modell dem Strang G zugeordneten Aminosäurereste I198–F193 konnten zwar sequentiell eindeutig zugeordnet werden, jedoch wurden keine H–H-Kontakte zum Strang F gefunden. Die Resonanzsignale der nahe dem C-Terminus befindlichen Aminosäurereste I198–F193 waren, verglichen mit den Resonanzsignalen der übrigen Aminosäuren, in allen Spektren extrem intensiv, was darauf schließen lässt, dass dieser Bereich sehr flexibel ist. Daher kann angenommen werden, dass sich der Strang G nicht ausgebildet hat. Die fehlenden Aminosäurereste in den Faltblattsträngen F (T166, Y168–V170 und Y175) und C

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.29:** Das auf der Basis des 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Spektrums identifizierte  $\beta$ -Faltblattnetzwerk der Faltblattstränge A, B und E der sechsten Domäne des gp130. Die identifizierten H-H-Kontakte sind durch gestrichelte Linien dargestellt, die Aminosäurereste wurden entsprechend beschriftet.



**Abbildung 3.30:** Das auf Basis des 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Spektrums teilweise identifizierte  $\beta$ -Faltblattnetzwerk der drei Faltblattstränge F, C und D der sechsten Domäne des gp130. Die identifizierten H-H-Kontakte sind durch gestrichelte Linien dargestellt, die Aminosäurereste wurden entsprechend beschriftet.

### 3 Ergebnisse

(R139 und T140 sowie R132–T135) konnten nicht sequentiell zugeordnet und somit im 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum nicht lokalisiert werden.

Folgende Aufstellung gibt eine Zusammenfassung der Sekundärstrukturermittlung:

vom Modell in Faltblatt- strängen vorhergesagt	davon sequentiell zugeordnet	davon verifiziert
93	48	33

Insgesamt konnten also 48 ( $\hat{=}$  52%) der vom Modell in den Faltblattsträngen vorhergesagten 93 Aminosäureresten sequentiell zugeordnet werden, jedoch konnten davon nur 33 ( $\hat{=}$  35%) tatsächlich verifiziert werden, d.h. 15 sequentiell zugeordnete Aminosäurereste konnten aufgrund nicht identifizierter H–H-Kreuzsignale nicht verifiziert werden.



## 4 Diskussion

Gp130 ist der signaltransduzierende Rezeptor einer Familie von Zytokinen, die daher auch als gp130-Zytokine bezeichnet werden. Strukturvorhersagen auf der Basis der Primärstruktur (Hibi et al., 1990) und Untersuchungen an entsprechenden Proteinsegmenten (Pflanz et al., 2001) zeigen übereinstimmend, dass der Extrazellulärteil des Signaltransduktors aus sechs Domänen besteht: eine N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne (D1); zwei Fibronectin-Typ-III-Domänen, die gemeinsam das zytokinbindende Modul (ZBM) konstituieren (D2-D3) und drei weiteren FN-Typ-III-Domänen (D4, D5 und D6).

### 4.1 Die membranproximalen Domänen des gp130

Es wurde gezeigt, dass alle drei membranproximalen Domänen des gp130 (gp130D4–D6) an der Signaltransduktion beteiligt sind (Kurth et al., 2000); entsprechende Deletionsmutanten (gp130 $\Delta$ 4, - $\Delta$ 5 bzw. - $\Delta$ 6), auf Zelloberflächen exprimiert, konnten einen löslichen Zytokin/Zytokinrezeptorkomplex zwar binden, eine Signaltransduktion erfolgte jedoch nicht mehr. Die Deletion der vierten bzw. der sechsten Domäne verringerte außerdem die Affinität von gp130 zum primären Rezeptorkomplex, was teilweise als Erklärung für die ausbleibende Aktivierung dienen kann. Die als löslich exprimierten Deletionsmutanten hingegen zeigten diese Affinitätsverringering nicht, was darauf hinweist, dass diese Domänen für die räumliche Orientierung von gp130 auf der Zelloberfläche relevant sind, wenn die Bindung des Zytokin/Zytokin-Rezeptorkomplexes und die nachfolgende gp130-Dimerisierung erfolgt. Die Deletionsmutante gp130 $\Delta$ 5 zeigte auf Zelloberflächen zwar keine Einschränkung der Affinität, dennoch blieb die Signaltransduktion aus. Versuche mit agonistischen Antikörpern, welche eine ligandenfreie Dimerisierung von gp130 erzwingen, konnten die Deletionsmutanten gp130 $\Delta$ 4 und - $\Delta$ 6 zur Signaltransduktion anregen, nicht jedoch die Deletionsmutante gp130 $\Delta$ 5. Ein chimäres Protein, bei dem die fünfte Domäne des gp130 durch die fünfte Domäne des homologen GCSF-R (*Granulocyte Colony Stimulating Factor Receptor*) ersetzt wurde, zeigte hingegen ligandenunabhängig die Aktivierung des Jak/Stat-Signaltransduktionsweges (Kurth et al., 2000).

## 4.2 Motivation

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass den membranproximalen Domänen des gp130 bei der Rezeptoraktivierung eine essentielle Rolle zukommt. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur dieser Domänen zum Zwecke tiefgehender Struktur/Funktionsuntersuchungen ist daher geeignet, das Verständnis dieser Vorgänge zu vertiefen. Die NMR-Spektroskopie ist dafür das geeignete Mittel, da durch sie hochaufgelöste Proteinstrukturen in Lösung erhalten werden – im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse, welche mit Proteinkristallen durchgeführt wird, die *in vivo* nicht auftreten. Zusätzlich erlaubt die NMR-Spektroskopie weiterführende Untersuchungen dynamischer Phänomene, wie sie insbesondere bei Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zu beobachten sind. Solche Phänomene sind durch Kenntnis der Struktur allein nicht immer vollständig zu verstehen.

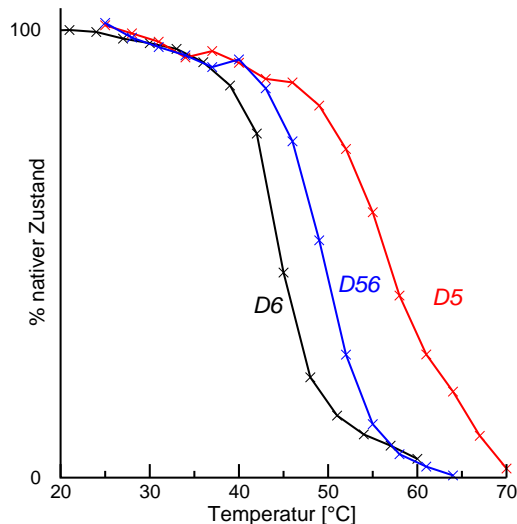
## 4.3 Darstellung von gp130D5D6

Zu Beginn einer NMR-spektroskopischen Strukturuntersuchung steht idealerweise die Darstellung des zu untersuchenden Proteins als rekombinant überexprimiertes Protein, gefolgt von Renaturierung, Reinigung und schließlich dem Vorlegen von konzentrierten Lösungen, die für die NMR-Spektroskopie geeignet sind. Zur Strukturuntersuchung der membranproximalen Domänen des gp130 ist es konsequent, die zu untersuchenden Domänen zunächst einzeln darzustellen und ihre Strukturen unabhängig voneinander aufzulösen. Das reduziert die zu erwartende Datenmenge und verringert zugleich den Aufwand, der zur Lösung der Struktur führt. Proteindomänen sind per definitionem unabhängig voneinander faltende Polypeptidsequenzen innerhalb eines Proteins. Erst die Gesamtheit aller Domänen eines Proteins unter Ausbildung der Quartärstruktur bildet dann die funktionelle Einheit. Das Gelingen der Darstellung von einzelnen Domänen in nativem Zustand ist im Übrigen ein Beweis für die Richtigkeit der angenommenen Domänengrenzen; fälschlich angenommene Domänengrenzen führen zur Ausbildung ungefalteter Polypeptidketten.

Die Strategie der einzeln dargestellten Domänen war im Falle des gp130 zunächst erfolgreich (Pflanz et al., 2001). Die Lösungsstruktur der dritten Extrazellulärdomäne konnte so mit Hilfe der heteronuklearen multidimensionalen NMR-Spektroskopie ermittelt werden (Kerneck et al., 1999). Die Darstellung der renaturierten vierten bis sechsten Domäne des gp130 gelang in akzeptablen Ausbeuten, jedoch war es nicht möglich, sie in Konzentrationsbereichen zu stabilisieren, die für die Strukturaufklärung mit-

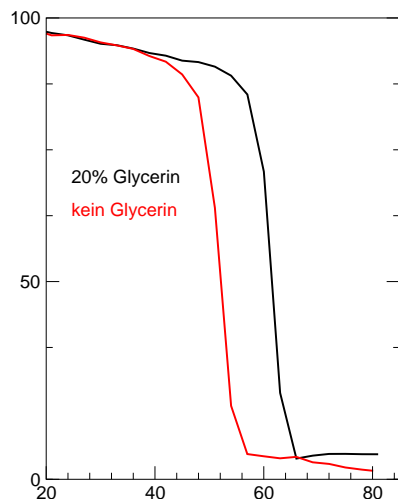
tels NMR-Spektroskopie nötig sind (Pflanz, 1999; Pachta-Nick, 1998). Daher erschien es angebracht, statt der Expression der einzelnen membranproximalen Domänen eine Klonierung und Expression von gekoppelten Domänen durchzuführen (D3D4, D4D5 und D5D6). Diese Konstrukte würden Molekularmassen aufweisen, welche der NMR-Spektroskopie durchaus noch zugänglich wären. Hinzu kommt, dass nach den Ergebnissen von Kurth et al. (2000) die relative Orientierung der membranproximalen Domänen zueinander eine besondere Rolle spielt bei der Dimerisierung von gp130, welche der Signalauslösung vorangeht. Diese Orientierungen – und insbesondere Orientierungsänderungen *in situ* – ließen sich an diesen gekoppelten Domänen mit NMR-spektroskopischen Methoden untersuchen.

Es gelang, die miteinander verbundenen Domänen 5 und 6 des gp130 zu klonieren (D5D6), zu exprimieren und zu reinigen. Es zeigte sich, dass die thermische Stabilität dieses Proteins zwischen denen der Einzeldomänen (Abbildung 4.1) lag. Das Erzeugen von konzentrierten Lösungen von gp130D5D6 gestaltete sich zunächst schwierig, da wie bei den Einzeldomänen zunächst Präzipitation bei höheren Konzentrationen beobachtet wurde. Es wurden verschiedene Puffersysteme untersucht. So zeigte der Zusatz von Glycerin zu einem Phosphatpuffer mit pH 6 bei CD-spektroskopischen Temperaturexperimenten eine erhöhte thermische Stabilität (Abbildung 4.2) und auch ließ sich die Proteinkonzentration in Gegenwart von Glycerin problemlos steigern.



**Abbildung 4.1:** Temperaturstabilitäten der Einzeldomänen (D5 und D6) im Vergleich mit der gekoppelten fünften und sechsten Domäne (D56) auf der Grundlage CD-spektroskopischer Messungen. Gemessen wurden die Elliptizitäten bei einer Wellenlänge von 226 nm, beginnend bei 20 °C bis 70 °C mit schrittweisen Temperatursteigerungen. Die Elliptizität bei 20 °C wurde gleich 100%, die Elliptizität bei 70 °C wurde gleich 0% gesetzt.

Allerdings war zu erwarten, dass bei den durchzuführenden NMR-Experimenten die Gegenwart von Glycerin zu starken unerwünschten Resonanzsignalen führen würde. Daher wurde auf Glycerinzusatz verzichtet. Schließlich gelang es, in Phosphatpuffer bei

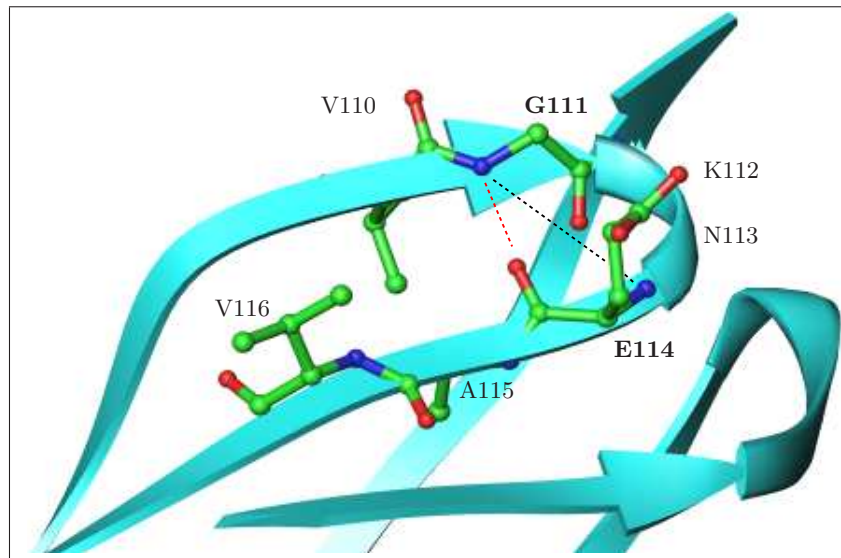


**Abbildung 4.2:** Auf der Grundlage CD-spektroskopischer Messungen ermittelte Temperaturstabilitäten von gp130-D5D6 in Phosphatpuffer, pH 6, mit Zusatz von Glycerin (schwarze Kurve) und ohne Zusatz von Glycerin (rote Kurve). Gemessen wurden die Elliptizitäten bei einer Wellenlänge von 226 nm, beginnend bei 20 °C bis 80 °C mit schrittweisen Temperatursteigerungen. Die Elliptizität bei 20 °C wurde gleich 100%, die Elliptizität bei 80 °C wurde gleich 0% gesetzt.

pH 6 ohne jeglichen Zusatz eine stabile konzentrierte Lösung von D5D6 vorzulegen, die die Durchführung von NMR-Experimenten erlaubte.

#### 4.4 Die Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrates

Das 2D- $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von gp130D5D6, in dem hauptsächlich Resonanzsignale der Amidgruppen des Proteinrückgrates – neben den Resonanzen der NH-Gruppen von Seitenketten - zu sehen sind, war von der Anzahl der Signale im Bereich dessen, was zu erwarten war: es wurden 222 Signale im HSQC-Spektrum erwartet, gezählt wurden 214. Von den 186 erwarteten Resonanzsignalen des Proteinrückgrates wurden 122 identifiziert und zugeordnet. 49 Signale wurden zwar als zum Rückgrat zugehörig identifiziert, konnten aber nicht einem bestimmten Aminosäurerest innerhalb der Proteinsequenz zugeordnet werden; 15 Signale wurden gar nicht gefunden. Die meisten der nicht zuzuordnenden  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen lagen in einem Frequenzbereich von 54–58 ppm. In diesem Bereich fallen die Resonanzfrequenzen der  $\text{C}_\alpha$ -Atome von 14 Aminosäuren. Eine Zuordnung gelingt dann über die Resonanzfrequenz des  $\text{C}_\beta$ -Atoms (aus dem CBCA(CO)NH-Spektrum) der benachbarten Aminosäure. Fehlt diese Resonanz, so ist eine sichere Zuordnung erschwert. Eine Zuordnung gelingt dann dennoch über das Auffinden von sequentiellen Konnektivitäten im HNCA-Spektrum. Im Falle der nicht zuzuordnenden  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen konnten meistens keine Konnektivitäten ausgemacht werden - entweder fehlte das entsprechende Resonanzsignal vollständig oder konnte aufgrund mehrerer Möglichkeiten mit ähnlichen Resonanzfrequenzen nicht eindeutig bestimmt werden. Das Problem der nicht zuzuordnenden  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen wäre bei Vorliegen eines HNCACB-Spektrums deutlich geringer gewesen. Ein solches Experiment wurde zwar durchgeführt, jedoch ist dieses Experiment



**Abbildung 4.3:** Die Zuordnung von NH  $\cdots$  HN-Kontakten am Beispiel von G111 und E114. Die Amidgruppen (blau) von G111 und E114 sind in relativer räumlicher Nähe zueinander (schwarz gestrichelt), so dass im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Experiment Resonanzsignale durch Korrelation ihrer Amidprotonen erwartet werden. Rot gestrichelt ist die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der NH-Gruppe des G111 und der Carbonylgruppe (rot) des E114.

sehr unempfindlich (siehe Tabelle 1.3, Abschnitt 1.2.3). Entsprechend dieser Unempfindlichkeit war die gefundene Anzahl der Resonanzsignale im HNCACB-Spektrum gering und trug nur wenig zur sequentiellen Zuordnung bei.

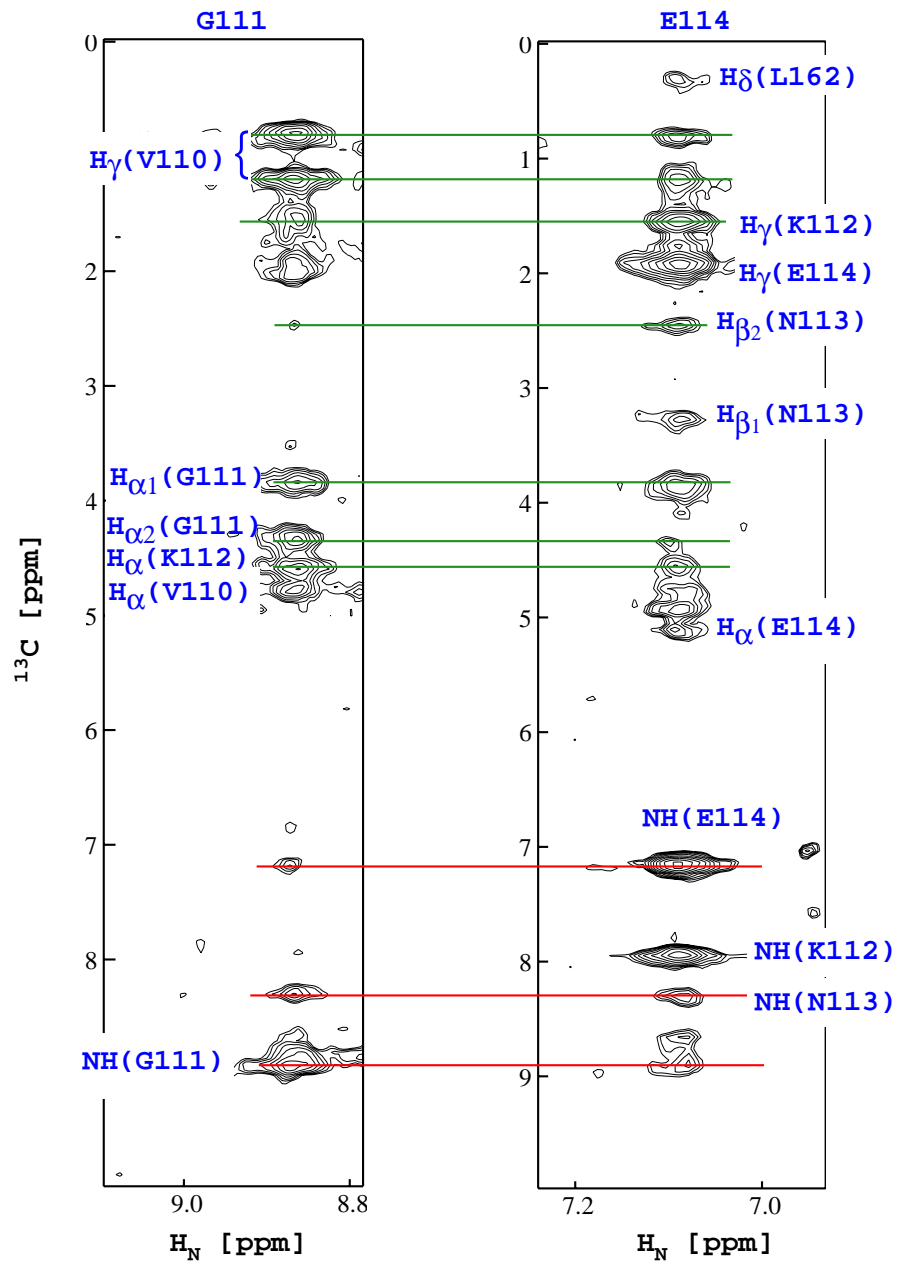
## 4.5 Die Sekundärstruktur der fünften und sechsten Domäne des gp130

Die fünfte und sechste Domäne des gp130 sind beschrieben worden als Domäne vom Fibronectin-Typ-III (Bazan, 1990b). Diese zeichnen sich durch eine besondere Sekundärstruktur aus, bei denen sich sieben Falblattstränge in zwei antiparallele  $\beta$ -sheets anordnen. Die molekularen Modelle, welche auf der Basis von Homologien erstellt wurden, stellen diesen Sachverhalt dar. Eine Überprüfung der Modelle erfolgte dann anhand des  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrums. Zugeordnete  $^1\text{H}$ -Resonanzen konnten am Modell gezeigt werden. Gleichzeitig konnten mit den Modellen als Vorlage nicht zugeordnete  $^1\text{H}$ -Resonanzsignale plausibel zugeordnet werden.

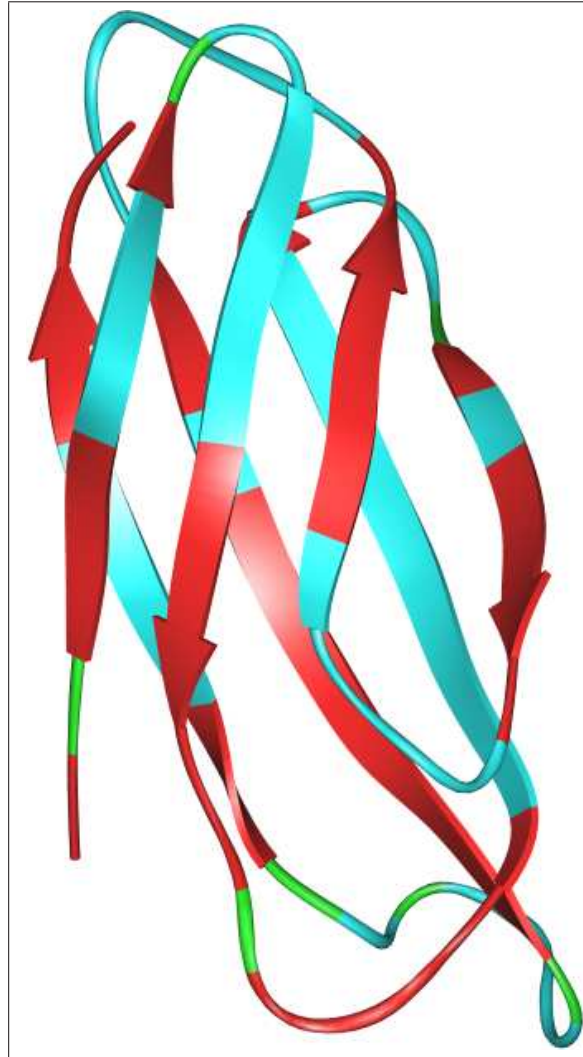
So sagte das molekulare Modell der sechsten Domäne des gp130 voraus, dass sich die NH-Gruppen von Glycin 111 in Falblattstrang A und Glutaminsäure 114 in Falblattstrang B in räumlicher Nähe zueinander befänden (Abbildung 4.3). Im NOESY-

HSQC-Spektrum wäre dieses dadurch nachzuweisen, dass beide Aminosäurereste jeweils das Kreuzsignal des im Faltblattstrang gegenüberliegenden Amidprotons zeigen. Da der *loop* (bestehend aus Lysin 112 und Asparagin 113) außerdem sehr eng ist, werden zusätzliche NOE-Kontakte von Aminosäureresten der nächsten Umgebung erwartet. Die Vorhersagen des Modells wurden mit den Daten aus dem  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum überprüft. Abbildung 4.4 zeigt als Beispiel die NOESY-Resonanzsignale von Glycin 111 und Glutaminsäure 114 im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum nebeneinander im Vergleich. Die entsprechenden Amidprotonkreuzsignale der beiden Reste sind in beiden Spuren auszumachen. Die zusätzlichen Kreuzsignale in Abbildung 4.4 von den benachbarten Aminosäuren Valin 110, Lysin 112 und Asparagin 113 und wurden größtenteils anhand des Modells plausibel identifiziert. Außerdem konnte ein sogenannter *long range*-Kontakt, stammend vom Leucin 162, welches sich im *loop* zwischen den Strängen E und F befindet, identifiziert werden. Da jedoch ein TOCSY-Spektrum nicht zur Verfügung stand, verbleibt eine gewisse Unsicherheit. Dieses Beispiel zeigt dennoch, auf welche Weise die Verifikation der Zuordnung von Resonanzsignalen im NOESY-Spektrum gelingt.

Die Zuordnung der Resonanzsignale in den heteronuklearen Spektren gelang allerdings nicht vollständig, da es Lücken in der Zuordnung der Seitenketten-Kohlenstoffatome gab. Somit konnten auch die zugehörigen Resonanzsignale der Protonen der entsprechenden Seitenketten nicht identifiziert werden. Die Abbildungen 4.5 und 4.6 veranschaulichen anhand der molekularen Modelle der fünften und sechsten Domäne des gp130 die Bereiche des Proteinrückgrates, welche nicht zugeordnet werden konnten.

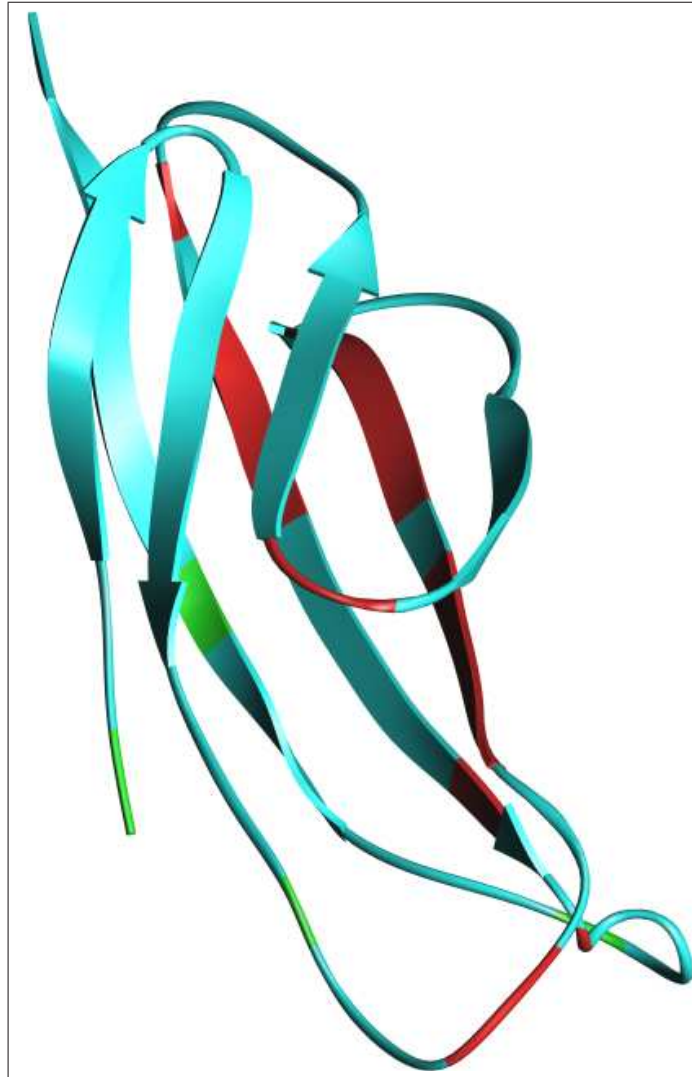


**Abbildung 4.4:** Zwei Ausschnitte aus dem  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum. Die linke Abbildung zeigt die Spur des Glycins 111, die rechte die Spur der Glutaminsäure 114. Die Kreuzsignale, welche durch die gegenseitige Korrelation der Amidgruppen des Proteinrückgrates erhalten werden (NH ... HN-Kontakte), sind durch rote Linien verbunden und entsprechend bezeichnet. Die grünen Linien verbinden identifizierte NH ... HC-Kontakte, welche in beiden Spuren erscheinen.



**Abbildung 4.5:** Molekulares Modell der fünften Domäne in *ribbon*-Darstellung. In der dargestellten Struktur des Proteinrückgrates sind die Bereiche, deren  $C_{\alpha}$ -Atome nicht entsprechenden Resonanzsignalen zugeordnet werden konnten rot markiert, türkis die Bereiche, die zugeordnet wurden. Die Positionen der Proline, welche in den amidgruppenkorrelierten NMR-Experimenten keine Resonanzsignale liefern, sind grün markiert.





**Abbildung 4.6:** Molekulares Modell der sechsten Domäne in *ribbon*-Darstellung. In der dargestellten Struktur des Proteinrückgrates sind die Bereiche, deren  $C_{\alpha}$ -Atome nicht entsprechenden Resonanzsignalen zugeordnet werden konnten rot markiert, türkis die Bereiche, die zugeordnet wurden. Die Positionen der Proline, welche in den amidgruppenkorrelierten NMR-Experimenten keine Resonanzsignale liefern, sind grün markiert.

## 4.6 Ausblick

Die Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen, dass die Sekundärstrukturvorhersage der molekularen Modelle in weiten Teilen bestätigt werden konnte. Die Bereiche der Modelle, welche sich der Verifikation entzogen, waren auf Lücken in der sequentiellen Zuordnung oder auf zu geringe Signalintensitäten im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum zurückzuführen. So würde das Durchführen eines C(CO)NH-Experimentes die Lücken bei der sequentiellen Zuordnung beheben. Ein erneut aufgenommenes  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC unter Verwendung eines *cryo probes* würde die Signalintensitäten deutlich steigern. Ebenso würde ein  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC-Experiment weitere Informationen liefern, die die Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Resonanzen erleichtern. Danach käme schließlich die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der beiden membranproximalen Domänen des gp130. Die vorliegende Arbeit hat dafür die Grundlagen geschaffen.

## 5 Zusammenfassung

Gp130 ist die gemeinsame signaltransduzierende Rezeptorkomponente aller Zytokine der IL-6-Familie. Der aktivierte Rezeptorkomplex besteht im Falle des IL-6 aus dem IL-6/IL-6R-Primärkomplex und mindestens zwei Molekülen gp130. Strukturvorhersagen und -untersuchungen zeigen übereinstimmend, dass der Extrazellulärteil des Signaltransduktors aus sechs Domänen besteht: eine N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne (D1) und fünf FN-Typ-III-Domänen (D2-D6). Funktionsuntersuchungen zeigten, dass die membranproximalen Domänen für die Signaltransduktion essentiell sind: entsprechende Deletionsmutanten binden zwar den IL-6/IL-6R-Primärkomplex, zeigen jedoch keinerlei Signalaktivität mehr.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden membranproximalen Domänen D5 und D6 des gp130 rekombinant als  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -markiertes Protein in *E.coli*-Bakterien als *inclusion bodies* in hoher Ausbeute exprimiert, renaturiert und monomer zu einer Reinheit von nahezu 100% vorgelegt. Es wurden Proteinlösungen in millimolaren Konzentrationen hergestellt, welche zur Durchführung von mehrdimensionalen heteronuklearen kernmagnetischen Resonanzexperimenten (NMR-Experimenten) genutzt wurden.

Folgende Erkenntnisse konnten erzielt werden:

- In dieser Arbeit wurden die  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen der beiden membranproximalen Domänen des gp130 mittels heteronuklearer mehrdimensionaler  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -NMR-Experimente zugeordnet.
- Die Sekundärstruktur der beiden membranproximalen Domänen des gp130 wurde anhand charakteristischer NOEs unter Verwendung eines molekularen Modells untersucht. Demzufolge bestehen beide Domänen aus sieben  $\beta$ -Faltblattsträngen, die sich in zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern anordnen. Die Abfolge und Anordnung der Sekundärstrukturelemente entspricht in beiden Fällen der Fibronectin-Typ-III-Topologie.
- Durch die Zuordnung der  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen der beiden membranproximalen Domänen des gp130 wurde die Grundlage zur Aufklärung ihrer dreidimensionalen Struktur geschaffen.

## 6 Summary

Gp130 is the common signal transducing receptor subunit of the cytokines of the IL-6 family. In the case of IL-6 the signalling receptor complex consists of the primary IL-6/IL-6R complex and two molecules of gp130. Structural predictions and analyses both demonstrated that the extracellular part of the signal transducer consists of six domains: an N-terminal immunoglobuline-like domain (D1) and five FN Type-III domains (D2–D6). Functional studies revealed that the three membrane proximal domains are crucial for signal transduction: the respective deletion mutants do bind the primary IL-6/IL-6R complex, but do not exhibit any signalling activity.

In this work the two membrane proximal domains D5 and D6 of gp130 were expressed as  $^{15}\text{N}$ - and  $^{13}\text{C}$ -labeled protein in *E.coli* as inclusion bodies. The protein was refolded and provided in monomer state with a high purity. Protein solutions in a millimolar concentration scale were prepared and subjected to heteronuclear multidimensional nuclear magnetic resonance experiments.

The following results were obtained:

- the  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - and  $^{13}\text{C}$ -resonances of the two membrane proximal domains of gp130 were assigned by means of heteronuclear multidimensional  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR experiments
- the secondary structure of the two membrane proximal domains of gp130 was investigated on the basis of characteristic NOEs, supported by a molecular model. As a result both domains consist of seven  $\beta$ -strands that are arranged in two antiparallel  $\beta$ -sheets. The sequence and arrangement of the secondary structure elements in both cases correspond to the Fibronectin type-III topology
- the assignment of the  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - and  $^{13}\text{C}$ -resonances of the two membrane proximal domains of gp130 provides the basis for solving their three-dimensional structure

## Literaturverzeichnis

- [Bax et al. 1990] BAX, A. ; CLORE, G.M. ; GRONENBORN, A.M.:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correlation via isotropic mixing of  $^{13}\text{C}$  magnetization: A new three-dimensional approach for assigning  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra of  $^{13}\text{C}$ -enriched proteins. In: *J Magn Reson* 88 (1990), S. 425–31
- [Bazan 1990a] BAZAN, J.F.: Haemopoietic receptors and helical cytokines. In: *Immunol Today* 11 (1990), S. 350–54
- [Bazan 1990b] BAZAN, J.F.: Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. In: *Proc Natl Acad Sci* 87 (1990), S. 6934–38
- [Betz et al. 1998] BETZ, U. ; BLOCH, W. ; BROEK, M. van den ; YOSHIDA, K. ; TAGA, T. ; KISHIMOTO, T. ; ADDICKS, K. ; RAJEWSKY, K. ; MÜLLER, W.: Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic and pulmonary defects. In: *J Exp Med* 188 (1998), S. 1955–65
- [Boulangier et al. 2003] BOULANGER, M.J. ; CHOW, D.C. ; BREVNOVA, E.E. ; GARCIA, K.C.: Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. In: *Science* 300 (2003), S. 2101–4. – Erratum in: *Science*. 2003 Aug 15;301(5635):918
- [Bravo und Heath 2000] BRAVO, J. ; HEATH, J.K.: Receptor recognition by gp130 cytokines. In: *EMBO J* 19 (2000), S. 2399–2411
- [Bundi und Wüthrich 1979] BUNDI, A. ; WÜTHRICH, K.:  $^1\text{H}$  NMR parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. In: *Biopolymers* 18 (1979), S. 285–98
- [Cavanagh et al. 1996] CAVANAGH, J. ; FAIRBROTHER, W.J. ; PALMER, A.G. ; SKELTON, N.J.: *Protein NMR Spectroscopy*. San Diego : Academic Press, 1996

- [Chen und Yang 1977] CHEN, G.C. ; YANG, J.T.: Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid. In: *Anal Lett* 10 (1977), S. 1195–1207
- [Chow et al. 2001] CHOW, D. ; HE, X. ; SNOW, A. ; ROSE-JOHN, S. ; GARCIA, C.: Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. In: *Science* 291 (2001), S. 2150–55
- [Davis et al. 1980] DAVIS, R.W. ; BOTSTEIN, D. ; ROTH, J.R.: *Advanced Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbour, NY : Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1980
- [Delaglio et al. 1995] DELAGLIO, F. ; GRZESIEK, S. ; VUISTER, G.W. ; ZHU, G. ; PFEIFER, J. ; BAX, A.: NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. In: *J Biomol NMR* 6 (1995), S. 277–293
- [Derouet et al. 2004] DEROUET, D. ; ROUSSEAU, F. ; ALFONSI, F. ; FROGER, J. ; HERMAN, J. ; BARBIER, F. ; PERRET, D. ; DIVEU, C. ; GUILLET, C. ; PREISSER, L. ; DUMONT, A. ; BARBADO, M. ; MOREL, A. ; DELAPEYRIÈRE, O. ; GASCAN, H. ; CHEVALIER, S.: Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004), S. 4827–32
- [Ernst et al. 1987] ERNST, R.R. ; BODENHAUSEN, G. ; WOKAUN, A.: *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Erste Auflage. Oxford University Press, 1987
- [Fiaux et al. 2002] FIAUX, J. ; BERTELSEN, E.B. ; HORWICH, A.L. ; WÜTHRICH, K.: NMR analysis of a 900K GroEL-GroES complex. In: *Nature* 418 (2002), S. 207–11
- [Friebolin 1999] FRIEBOLIN, H.: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. Wiley-VCH Verlag, 1999
- [Galla 1988] GALLA, H.J.: *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Erste Auflage. Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 1988
- [Gill und von Hippel 1989] GILL, S.C. ; HIPPEL, P.H. von: Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. In: *Anal Biochem* 182 (1989), S. 319–326
- [Grötzinger 2002] GRÖTZINGER, J.: Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. In: *Biochim Biophys Acta* 1592 (2002), S. 215–23

- [Grötzinger et al. 1999] GRÖTZINGER, J. ; KERNEBECK, T. ; KALLEN, K.-J. ; ROSE-JOHN, S.: IL-6 type Cytokine Receptor Complexes: Hexamer or Tetramer or Both? In: *Biol Chem* 380 (1999), S. 803–13
- [Grötzinger et al. 1997] GRÖTZINGER, J. ; KURAPKAT, G. ; WOLLMER, A. ; KALAI, M. ; ROSE-JOHN, S.: The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. In: *Proteins* 27 (1997), S. 96–109
- [Grzesiek und Bax 1992a] GRZESIEK, S. ; BAX, A.: Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. In: *J Am Chem Soc* 114 (1992), S. 6291–93
- [Grzesiek und Bax 1992b] GRZESIEK, S. ; BAX, A.: An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. In: *J Magn Reson* 99 (1992), S. 201–9
- [Grzesiek und Bax 1993] GRZESIEK, S. ; BAX, A.: The importance of not saturating water in protein NMR. Application to sensitivity enhancement and NOE measurements. In: *J Am Chem Soc* 115 (1993), S. 2593–4
- [Gunthert et al. 1997] GUNTHERT, P. ; MUMENTHALER, C. ; WÜTHRICH, K.: Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. In: *J Mol Biol* 273 (1997), S. 283–98
- [Hammacher et al. 1998] HAMMACHER, A. ; RICHARDSON, R.T. ; LAYTON, J.E. ; SMITH, D.K. ; ANGUS, L.J. ; HILTON, D.J. ; NICOLA, N.A. ; WIJDENES, J. ; SIMPSON, R.J.: The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor. In: *J Biol Chem* 273 (1998), S. 22701–7
- [Heinrich et al. 1998] HEINRICH, P.C. ; BEHRMANN, I. ; MÜLLER-NEWEN, G. ; SCHAPER, F. ; GRAEVE, L.: Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. In: *Biochem J* 334 (1998), S. 297–314
- [Hibi et al. 1990] HIBI, M. ; MURAKAMI, M. ; SAITO, M. ; HIRANO, T. ; TAGA, T. ; KISHIMOTO, T.: Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. In: *Cell* 63 (1990), S. 1149–57
- [Hirota et al. 1999] HIROTA, H. ; CHEN, J. ; BETZ, U.A. ; RAJEWSKY, K. ; GU, Y. ; JR., J. R. ; MÜLLER, W. ; CHIEN, K.R.: Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival

- pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. In: *Cell* 97 (1999), S. 189–98
- [Hoch und Stern 1996] HOCH, J.C. ; STERN, A.S.: *NMR Data Processing*. Erste Auflage. Wiley-Liss, 1996
- [Hoischen et al. 2000] HOISCHEN, S.H. ; VOLLMER, P. ; MÄRZ, P. ; ÖZBEK, S. ; GOTZE, K.S. ; PESCHEL, C. ; JOSTOCK, T. ; GEIB, T. ; MÜLLBERG, J. ; MECHTERSHEIMER, S. ; FISCHER, M. ; GRÖTZINGER, J. ; GALLE, P.R. ; ROSE-JOHN, S.: Human herpes virus 8 interleukin-6 homologue triggers gp130 on neuronal and hematopoietic cells. In: *Eur J Biochem* 267 (2000), S. 3604–12
- [Johnson und Blevins 1994] JOHNSON, B.A. ; BLEVINS, R.A.: NMRVIEW: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. In: *J Biomol NMR* 4 (1994), S. 603–614
- [Kallen et al. 1999] KALLEN, K.J. ; GRÖTZINGER, J. ; LELIEVRE, E. ; VOLLMER, P. ; AASLAND, D. ; C. RENNE, J. M. ; MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.H. ; GASCAN, H. ; ROSE-JOHN, S.: Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable modules. Transfer of the leukemia inhibitory factor receptor-binding site from ciliary neurotrophic factor to interleukin-6. In: *J Biol Chem* 274 (1999), S. 11859–67
- [Kernebeck et al. 1999] KERNEBECK, T. ; PFLANZ, S. ; MÜLLER-NEWEN, G. ; KURAPKAT, G. ; SCHEEK, R.M. ; DIJKSTRA, K. ; HEINRICH, P.C. ; WOLLMER, A. ; GRZESIEK, S. ; GRÖTZINGER, J.: The signal transducer gp130: solution structure of the carboxy-terminal domain of the cytokine receptor homology region. In: *Protein Sci* 1 (1999), S. 5–12
- [Kishore et al. 1997] KISHORE, R. ; SAMUEL, M. ; KHAN, M.Y. ; HAND, J. ; FRENZ, D.A. ; NEWMAN, S.A.: Interaction of the NH<sub>2</sub>-terminal domain of Fibronectin with Heparin. In: *J Biol Chem* 272 (1997), S. 17078–85
- [Koppensteiner et al. 2000] KOPPENSTEINER, W.A. ; LACKNER, P. ; WIEDERSTEIN, M. ; SIPPL, M.J.: Characterization of novel proteins based on known protein structures. In: *J Mol Biol* 296 (2000), S. 1139–52
- [Kraulis 1994] KRAULIS, P.J.: Protein three-dimensional structure determination and sequence-specific assignment of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N-separated NOE data. A novel real-space ab initio approach. In: *J Mol Biol* 243 (1994), S. 696–718



- [Kurth et al. 1999] KURTH, I. ; HORSTEN, U. ; PFLANZ, S. ; DAHMEN, H. ; KÜSTER, A. ; GRÖTZINGER, J. ; HEINRICH, P.C. ; MÜLLER-NEWEN, G.: Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. In: *J Immunol* 162 (1999), S. 1480–87
- [Kurth et al. 2000] KURTH, I. ; HORSTEN, U. ; PFLANZ, S. ; TIMMERMANN, A. ; KÜSTER, A. ; DAHMEN, H. ; TACKEN, I. ; HEINRICH, P.C. ; MÜLLER-NEWEN, G.: Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. In: *J Immunol* 164 (2000), S. 273–82
- [Laemmli 1970] LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), S. 680–85
- [Linge et al. 2003] LINGE, J.P. ; HABECK, M. ; RIEPING, W. ; NILGES, M.: ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. In: *Bioinformatics* 2 (2003), S. 315–6
- [Lottspeich und Zorbas 1998] LOTTSPPEICH, F. (Hrsg.) ; ZORBAS, H. (Hrsg.): *Bioanalytik*. Erste Auflage. Heidelberg Berlin : Spektrum Akad Verl, 1998
- [Marion et al. 1989] MARION, D. ; DRISCOLL, P.C. ; KAY, L.E. ; WINGFIELD, P.T. ; BAX, A. ; GRONENBORN, A.M. ; CLORE, G.M.: Overcoming the overlap problem in the assignment of  $^1\text{H}$  NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1 beta. In: *Biochemistry* 20 (1989), S. 6150–56
- [Montelione und Wagner 1990] MONTELIONE, G.T. ; WAGNER, G.: Conformation-independent sequential NMR connections in isotope-enriched polypeptides by  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  triple-resonance experiments. In: *J Magn Reson* 83 (1990), S. 183–88
- [Moskau et al. 2001] MOSKAU, D. ; RICHTER, C. ; KOVACS, H. ; SALZMANN, M. ; BASELGIA, L. ; MAREK, D. ; SCHETT, O.: Highest Sensitivity for Cutting-Edge NMR Applications: 600 MHz CryoProbes™. In: *Bruker Report* 149 (2001), S. 19–21
- [Nilges et al. 1997] NILGES, M. ; MACIAS, M.J. ; O'DONOGHUE, S.I. ; OSCHKINAT, H.: Automated NOESY interpretation with ambiguous distance restraints: the refined NMR solution structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin. In: *J Biol Mol* 269 (1997), S. 408–22

## Literaturverzeichnis

- [Pachta-Nick 1998] PACHTA-NICK, M.: *Expression, Reinigung und strukturelle Charakterisierung der fünften extrazellulären Domäne des Signaltransduktors gp130*, RWTH Aachen, Diplomarbeit, November 1998
- [Pennica et al. 1996] PENNICA, D. ; ARCE, V. ; SWANSON, T.A. ; VEJSADA, R. ; POLLOCK, R.A. ; ARMANINI, M. ; DUDLEY, K. ; PHILLIPS, H.S. ; ROSENTHAL, A. ; KATO, A.C. ; HENDERSON, C.E.: Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. In: *Neuron* 17 (1996), S. 63–74
- [Pflanz 1999] PFLANZ, S.: *Struktur- und Funktionsanalysen der Extrazellulärregion des Signaltransduktors gp130: Mechanismus der Interleukin-6-induzierten Rezeptoraktivierung*, RWTH Aachen, Dissertation, 1999
- [Pflanz et al. 2001] PFLANZ, S. ; KERNEBECK, T. ; GIESE, B. ; HERRMANN, A. ; PACHTA-NICK, M. ; STAHL, J. ; WOLLMER, A. ; HEINRICH, P.C. ; MÜLLER-NEWEN, G. ; GRÖTZINGER, J.: Signal transducer gp130: biochemical characterization of the three membrane-proximal extracellular domains and evaluation of their oligomerization potential. In: *Biochem J* 356 (2001), S. 605–12
- [Pflanz et al. 2000] PFLANZ, S. ; KURTH, I. ; GRÖTZINGER, J. ; HEINRICH, P.C. ; MÜLLER-NEWEN, G.: Two different epitopes of the signal transducer gp130 sequentially cooperate on IL-6-induced receptor activation. In: *J Immunol* 165 (2000), S. 7042–49
- [Riek et al. 2002] RIEK, R. ; FIAUX, J. ; BERTELSEN, E.B. ; HORWICH, A.L. ; WÜTHRICH, K.: Solution NMR techniques for large molecular and supramolecular structures. In: *J Am Chem Soc* 124 (2002), S. 12144–53
- [Rose-John 2001] ROSE-JOHN, S.: Coordination of Interleukin-6 biology by membrane bound and soluble receptors. In: *Adv Exp Med Biol* 495 (2001), S. 145–151
- [Rudolph und Lilie 1996] RUDOLPH, R. ; LILIE, H.: In vitro Folding of Inclusion Body Proteins. In: *FASEB J* 10 (1996), S. 49–56
- [Sambrook et al. 1989] SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E.F. ; MANIATIS, T.: *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour, NY : Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
- [Sattler et al. 1999] SATTLER, M. ; SCHLEUCHER, J. ; GRIESINGER, C.: Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in

## Literaturverzeichnis

- solution employed using pulsed field gradients. In: *Prog Nucl Mag Res Sp* 34 (1999), S. 93–158
- [Schroers et al. in press] SCHROERS, A. ; HECHT, O. ; KALLEN, K.-J. ; PACHTA, M. ; ROSE-JOHN, S. ; GRÖTZINGER, J.: Dynamics of the gp130 Cytokine Complex: A Model for Assembly on the Cellular Membrane. In: *Prot Sci* (in press)
- [Simpson et al. 1997] SIMPSON, R.J. ; HAMMACHER, A. ; SMITH, D.K. ; MATTHEWS, J.M. ; WARD, L.D.: Interleukin-6: structure-function relationships. In: *Protein Sci* 6 (1997), S. 929–55
- [Stryer 1999] STRYER, L.: *Biochemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford : Spektrum Akademischer Verlag, 1999
- [Studier et al. 1990] STUDIER, F.W. ; ROSENBERG, A.H. ; DUNN, J.J. ; DUBENDORFF, J.W.: Use of T7 RNA polymerase to direct expressions of cloned genes. In: *Meth Enzymol* 185 (1990), S. 60–89
- [Taga und Kishimoto 1997] TAGA, T. ; KISHIMOTO, T.: gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. In: *Annu Rev Immunol* 15 (1997), S. 797–819
- [van Gunsteren 1987] VAN GUNSTEREN, W.F.: Distributed by BIOMOS biomolecular software b.v. 1987. – Laboratory of Physical Chemistry, University of Groningen, The Netherlands
- [Vriend 1990] VRIEND, G.: WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. In: *J Mol Graph* 8 (1990), S. 52–56
- [Ward et al. 1996] WARD, L.D. ; HAMMACHER, A. ; HOWLETT, G.J. ; MATTHEWS, J.M. ; FABRI, L. ; MORITZ, R.L. ; NICE, E.C. ; WEINSTOCKA, J. ; SIMPSON, R.J.: Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6-receptor complex. In: *J Biol Chem* 33 (1996), S. 20138–44
- [Wollmer 1982] WOLLMER, A.: ORD- und CD-Spektroskopie. In: HOPPE, W. (Hrsg.) ; LOHMANN, W. (Hrsg.) ; MARKL, H. (Hrsg.) ; ZIEGLER, H. (Hrsg.): *Biophysik*. Zweite Auflage. Berlin Heidelberg New York : Springer Verlag, 1982, Kap. 3.8.2, S. 152–59
- [Wüthrich 1986] WÜTHRICH, K.: *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. New York Chichester Brisbane Toronto Singapore : John Wiley & Sons, Inc, 1986

# Abkürzungsverzeichnis

A (Aminosäure)	Alanin
A (DNA)	Adenin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
as (Primer)	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C (Aminosäure)	Cystein
C (DNA)	Cytosin
CD	Circulardichroismus
CHR	<i>cytokine binding homology region</i>
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
CNTFR	<i>Ciliary neurotrophic factor receptor</i>
D (Aminosäure)	Asparaginsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E (Aminosäure)	Glutaminsäure

## Abkürzungsverzeichnis

E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F (Aminosäure)	Phenylalanin
FID	<i>free induction decay</i>
FN	Fibronectin
G (Aminosäure)	Glycin
G (DNA)	Guanin
GHR	<i>Growth hormone receptor</i>
gp130	Glycoprotein 130
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
H (Aminosäure)	Histidin
HMW	<i>high molecular weight</i>
HSQC	<i>hetero single quantum correlation</i>
I (Aminosäure)	Isoleucin
IL-11	Interleukin 11
IL-11R	Interleukin-11-Rezeptor
IL-6	Interleukin 6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
K (Aminosäure)	Lysin
kb	<i>kilo base pairs</i>
L (Aminosäure)	Leucin
LB	<i>Luria-Bertani</i>

## Abkürzungsverzeichnis

LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LIFR	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>
M (Aminosäure)	Methionin
MRW	<i>mean residue weight</i>
N (Aminosäure)	Asparagin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i>
NPN	Neuropoietin
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin-M-Rezeptor
P (Aminosäure)	Prolin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ppm	<i>parts per million</i>
Q (Aminosäure)	Glutamin
R (Aminosäure)	Arginin
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S (Aminosäure)	Serin
s (Primer)	<i>sense</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

## Abkürzungsverzeichnis

T (Aminosäure)	Threonin
T (DNA)	Thymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFB	<i>transformation buffer</i>
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V (Aminosäure)	Valin
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser, einfach dest.
vIL-6	virales Interleukin-6
W (Aminosäure)	Tryptophan
Y (Aminosäure)	Tyrosin
ZBM	Zytokinbindendes Modul

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank ausdrücken:

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Joachim Grötzinger für die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine fachliche Beratung und insbesondere für das kollegiale Verhältnis, welches die Durchführung dieser Arbeit sehr erleichterte.

Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und dafür, dass ich seine Laboreinrichtungen nutzen durfte.

Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst für die freundliche Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. Stephan Grzesiek für die NMR-spektroskopischen Messungen, die er persönlich am Biozentrum der Universität Basel vorgenommen hat.

Herrn Dr. Rainer Wechselberger und Mijnheer Dr. Nico van Nuland vom Bijvoet Center an der Universität Utrecht für die NMR-spektroskopischen Messungen und die freundliche Aufnahme und Unterstützung, die sie mir während meiner Zeit dort gewährten. Ebenso danke ich den anderen wissenschaftlichen Mitarbeitern am Bijvoet Center für die freundliche Aufnahme, insbesondere Monsieur Julien Dubuc.

Herrn Dr. Andrew Dingley für das allererste NMR-Spektrum, das überhaupt von „meinem“ Protein aufgenommen wurde (ein  $^{15}\text{N}$ -HSQC, aufgenommen an der Forschungsanstalt in Jülich).

Herrn Dr. Oliver „The Sir“ Hecht und Herrn Dr. Andreas „Anjin Sawa“ Schwanter für ihre Freundschaft, ihren Humor und natürlich für die fachlichen Gespräche, welche großen Einfluss auf den Fortschritt dieser Arbeit hatten.

Herrn Dr. Björn „Björn 01“ Schuster als immertreuen Begleiter bei den Mensagängen (Stichwort *shawshank*).



Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen aus unserem Arbeitskreis, namentlich Herrn Cord „Neo“ Gudegast, Frau Britta „Brittany“ Hansen, Frau Sonja Hollmer, Herrn Philip „Marc“ Kraft, Frau Inken „Inken 1“ Lorenzen und Frau Justyna Myśliwy für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre. Wir hatten viel zu lachen. . .

Ebenso danke ich herzlich allen meinen übrigen Kolleginnen und Kollegen des Biochemischen Instituts, namentlich Herrn Ingo „Bingo“ Bußmeyer, Frau Cathrin Claussen, Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Karl-Josef „KaJo“ Kallen, Frau Maike Kanter, Frau Dr. Marina Kovaleva (angeblich ausgesprochen wie *Kawaljowa*), Frau Dr. Sigrid Lang, Herrn Prof. Dr. Hilmar „Skipper“ Lemke, Herrn Dr. Andreas Ludwig, Herrn Dr. Krzysztof „dobrze dobrze“ Paliga, Herrn Björn „Björn 2“ Rabe (Harter Hip Hop), Frau Dr. Petra Regenhard, Herrn Dr. Jürgen „Spiderman“ Scheller, Frau Brigitte Schneider, Herrn Alexander Schulte (insbesondere für das Korrekturlesen meiner Arbeit!), Herrn Dr. Radek Sedlaček, Frau Katharina „Kaddi“ Stiebeling und Frau Petra S. Voß. Alle zusammen habt ihr mir die Zeit am Institut bereichert!

Aus meiner Aachener Zeit möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Axel Wollmer für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und dafür, dass ich seine Laboreinrichtungen nutzen durfte. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Heinrich dafür, dass ich die Einrichtungen seines S1-Labors nutzen durfte. Außerdem gilt mein Dank

Herrn Dr. Stefan Pflanz für die Klonierungsstrategie der fünften und sechsten Domäne des gp130, ohne die ich mit dieser Arbeit gar nicht erst hätte anfangen können.

Frau Konstanze Thiemann und Herrn Jürgen Stahl für die Durchführung von CD-spektroskopischen Messungen.

Herrn Dr. Thomas Kernebeck, Herrn Dr. Thomas Mülders, Frau Dr. Karin Schleinkofer, Herrn Dr. Wolfgang Swegat und Frau Angelika Szameit für die angenehme kollegiale Atmosphäre im Oecher Arbeitskreis.

Aus den Oecher Studentenzeiten gilt mein Dank an dieser Stelle auch Frau Dipl. Chem. Dr. Jutta Maria Quadflieg (geb. Bussmann) und Herrn Dipl. Chem. Dr. Joachim Quadflieg.

Ganz herzlich danke ich auch Frau Barbara Nick, die mich in den letzten Semestern meines Studiums und darüber hinaus immer unterstützt hat. Ebenso danke ich ihren Eltern Margret und Manfred Nick für ihre Unterstützung.

Und schließlich und vor allem meinen Eltern Hannelore und Günter Pachta, die mir all das erst ermöglicht haben.

## Sonstiges

Dieses Dokument wurde gesetzt mit L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X unter Verwendung von KOMA-Script von Frank Neukam, Markus Kohm und Axel Kielhorn (<http://komascript.de/>) sowie den Erweiterungspaketen *bibgerm*, *booktabs*, *fontenc*, *graphicx*, *inputenc*, *lmodern*, *multirow*, *ngerman*, *nomencl*, *overpic*, *setspace*, *textcomp*, *upgreek*, *currvita*, *hyperref* und *url*. Das Literaturverzeichnis wurde erstellt mit BibT<sub>E</sub>X und den Erweiterungen *natbib* und *dinat*.

### Zu den Abbildungen:

- Das Gel in Abbildung 3.1 wurde von Frau Sonja Hollmer, Biochemisches Institut an der CAU Kiel, angefertigt und in elektronische Form überführt (*eingescannt*).
- Die Abbildungen 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 4.1 und 4.2 wurden erstellt mit dem Programm *Grace* (früher *xmgr* bzw. *xmgrace*) von Paul J Turner und dem *Grace Development Team* (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>).
- Die Abbildungen 1.1, 1.2, 1.3, 1.6, 3.8, 3.9, 3.12, 3.14, 3.15, 3.18, 3.19, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29 und 3.30 wurden auf einer SGI O2 bzw. einer SGI Indy erstellt mit dem Programm *IRIS Showcase* von *Silicon Graphics Incorporation*. Mit diesem Programm erfolgte auch das Einfügen von Beschriftungen, Linien usw. in verschiedene Abbildungen.
- Die Abbildungen 1.4 und 1.5 wurden erstellt mit dem Programm *NMRDraw* aus dem Programmpaket *NMRPipe* von Frank Delaglio (<http://spin.niddk.nih.gov/bax/software/NMRPipe/>).
- Die Abbildungen 3.7, 3.11, 3.13, 3.16, 3.17 und 4.4 wurden erstellt mit dem Programm *NMRVIEW* von Bruce A. Johnson (<http://www.onemoonscientific.com/nmrview/>).
- Die Abbildungen 3.20, 3.21, 4.3, 4.5 und 4.6 wurden erstellt mit dem Programm *RIBBONS* von Mike Carson (<http://sgce.cbse.uab.edu/ribbons/>).

- Die Abbildung 2.1 stammt aus dem Datenblatt zu den pET3a-d Transfektionsvektoren (<http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB026.pdf>).

## **Lebenslauf**

### **Michael Pachta**

10. März 1967 geboren in Homberg, jetzt Duisburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung**

1973–1976 Besuch der Grundschule St. Anna in Rheinberg

1977–1986 Besuch des Amplonius Gymnasiums in Rheinberg

11.06.1986 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### **Studium**

10/1986 – 02/1987 Studium der Chemie an der Universität Düsseldorf

10/1987 – 11/1998 Studium der Chemie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule zu Aachen

06/1998 – 11/1998 Diplomarbeit am Institut für Biochemie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule zu Aachen

30.11.1998 Diplom in Chemie

01.01.1999 Beginn der Dissertation am Institut für Biochemie der RWTH Aachen

seit 01.07.2002 Fortsetzung der Dissertation am Biochemischen Institut an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Kiel, 14. Dezember 2004

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, Michael Pachta, die vorliegende Dissertation, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater, selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Auch wurde die Dissertation bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Desweiteren erkläre ich, bisher kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Kiel, 15.12.2004

Michael Pachta