

Struktur- und Funktionsuntersuchungen an der
p28 Untereinheit von IL-27 und an einem
antimikrobiellen Designer-Peptid

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

von

Björn Wolfgang Herbert Spudy

Kiel

Juli 2011

Referent:

Prof. Dr. Joachim Grötzinger

Korreferent:

Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Bosch

Tag der mündlichen Prüfung:

18.10.2011

Zum Druck genehmigt:

Kiel, 18.10.2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zytokine: Signalmoleküle der Zellen	1
1.1.1	Vier-Helix-Bündel Zytokine.....	1
1.1.2	Familie der IL-6 Zytokine	2
1.1.3	Die Klasse I Zytokinrezeptoren	2
1.1.4	Aktivierung der Rezeptoren der gp130 Familie durch Zytokine der IL-6 Familie.....	3
1.1.5	Interleukin-6	4
1.1.6	Interleukin-27	5
1.1.7	Das Zytokin p28	6
1.2	Antimikrobielle Peptide: Effektoren des angeborenen Immunsystems	7
1.2.1	Die Defensine, eine bedeutende Klasse der antimikrobiellen Peptide.....	8
1.2.2	Die β -Defensine	8
1.2.3	Der Wirkmechanismus der β -Defensine	9
1.2.4	Spezielle Charakteristika der humanen β -Defensine 2 und 3	9
1.2.5	Die HBD2/HBD3 Chimären	10
1.3	NMR-Spektroskopie.....	12
1.3.1	Grundlagen der NMR-Spektroskopie	12
1.3.2	Homonukleare zweidimensionale NMR-Spektroskopie.....	16
1.4	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Das Zytokin p28	19
2.1.1	Erstellung der p28 Modelle	19
2.1.2	Das p28 Expressionskonstrukt.....	19
2.1.3	Transformation des <i>E. coli</i> Stammes BL21 (DE3).....	20
2.1.4	Rekombinante Expression des murinen p28.....	20
2.1.5	Isolierung des rekombinanten murinen p28.....	20
2.1.6	Renaturierung des rekombinanten murinen p28.....	21
2.1.7	Größenausschlusschromatographie.....	21
2.1.8	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	22
2.1.9	Coomassie-Färbung	22
2.1.10	Western Blot und Immundetektion	22

2.1.11	Test auf biologische Aktivität	23
2.2	Chimäre 3	24
2.2.1	Renaturierung von Chimäre 3	24
2.2.2	Gradienten RP-HPLC.....	24
2.2.3	Gefriertrocknung der Proben	24
2.2.4	Ellman-Reaktion	25
2.2.5	Massenspektrometrie	25
2.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	25
2.4	Circulardichroismus-Spektroskopie.....	26
2.5	NMR-Spektroskopie.....	27
2.5.1	Probenvorbereitung	27
2.5.2	Durchführung der homonuklearen TOCSY- und NOESY-Experimente.....	27
2.5.3	Das H-D-Austausch-Experiment	28
2.5.4	Die sequenzspezifische Zuordnung	28
2.5.5	Die Strukturberechnung aus NMR-Daten.....	29
2.5.6	Der chemische Verschiebungsindex.....	30
2.6	Puffer und Lösungen	31
2.7	Verwendete Antikörper.....	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Das Zytokin p28	33
3.1.1	Das Modell der Tertiärstruktur von humanen p28	33
3.1.2	Vergleich der Tertiärstrukturen von humanem p28 und humanem IL-6.....	34
3.1.3	Modell zur Interaktion von p28 und gp130.....	35
3.1.4	Expression und Isolierung von p28.....	36
3.1.5	Reinigung und Renaturierung von p28.....	37
3.1.6	Analyse der Sekundärstruktur von p28 mittels CD-Spektroskopie	39
3.1.7	Die biologische Aktivität von murinem p28	40
3.2	Chimäre 3	41
3.2.1	Renaturierung und Reinigung von Chimäre 3	41
3.2.2	Das antimikrobielle Wirkspektrum von Chimäre 3	42
3.2.3	Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie	43
3.2.4	Aufklärung der Tertiärstruktur	44

3.2.5	Sekundärstrukturvorhersage mittels des chemischen Verschiebungsindex.....	51
3.2.6	Die Sekundärstrukturelemente von Chimäre 3.....	51
3.2.7	Die Ausprägung der Tertiärstruktur	52
3.2.8	Die Disulfidbrücken	54
3.3	Die Tertiärstruktur der Chimäre 3	54
3.3.1	Vergleich der Tertiärstrukturen von Chimäre 3, HBD2 und HBD3	58
4	Diskussion.....	62
4.1	Das Zytokin p28	62
4.1.1	Das Tertiärstrukturmodell und die Interaktion mit gp130.....	62
4.1.2	Das Reinigungs- und Expressionsprotokoll.....	64
4.2	Chimäre 3	65
4.2.1	Die Probenvorbereitung	65
4.2.2	Die sequenzspezifische Zuordnung	65
4.2.3	Die Sekundärstrukturvorhersage mittels CSI-Plot.....	66
4.2.4	Die Wasserstoff- und Disulfidbrücken.....	66
4.2.5	Die Tertiärstruktur der Chimäre 3	67
4.2.6	Einfluss der Tertiärstruktur auf die antimikrobielle Aktivität der Chimäre 3.....	67
4.2.7	Der Wirkmechanismus: Porenbildung, Carpet-Modell oder intrazelluläre Ziele?	68
4.2.8	Ausblick.....	69
5	Zusammenfassung.....	70
6	Summary	71
7	Literaturverzeichnis.....	72
8	Anhang	83
8.1	Abkürzungen	83
8.2	Lebenslauf	85
8.3	Publikationen und Poster	86
8.4	Danksagung	87
8.5	Erklärung	88

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei voneinander unabhängige Teilprojekte. Der erste Abschnitt behandelt Struktur- und Funktionsanalysen des Zytokins p28, der zweite Abschnitt behandelt die Ermittlung der Tertiärstruktur eines antimikrobiellen Designer-Peptids.

1.1 Zytokine: Signalmoleküle der Zellen

Zytokine sind lösliche Mediatoren der interzellulären Kommunikation und als solche unter anderem an der Regulation der Immunantwort, der Proliferation und Differenzierung von Zellen des Immunsystems und der Blutbildung beteiligt [1]. Die Spezifität der Zytokinwirkung beruht auf der Interaktion des jeweiligen Zytokins mit den entsprechenden Rezeptorketten. Gleichzeitig beruht die Redundanz von verschiedenen Zytokinen auf der gemeinsamen Nutzung bestimmter Rezeptoren. Dies gilt insbesondere für Zytokine der IL-6-Familie, die sich über den gemeinsamen Gebrauch des Rezeptors gp130 definieren [2]. Aufgrund der Tertiärstruktur lassen sich Zytokine in verschiedene Klassen unterteilen. So besteht die Faltung der Klasse I Zytokine aus vier α -Helices (vier-Helix-Bündel Zytokine). Die Klasse II Zytokine verfügen über mehr als vier α -Helices, hierzu gehören IL-10, IL-20 und die Interferone. Die Zytokine der IL-1 Familie enthalten eine größere Anzahl von β -Faltblättern [3].

1.1.1 Vier-Helix-Bündel Zytokine

Die vier-Helix-Bündel Zytokine werden durch ein bisher nur bei Zytokinen vorgefundenes Faltungsmuster charakterisiert, das auch als „Zytokinfaltung“ bezeichnet wird. Hierbei werden vier α -Helices in der Orientierung auf-auf-ab-ab, durch drei Schleifenbereiche mit unterschiedlicher Länge, in der Abfolge lang-kurz-lang, miteinander verbunden (Abbildung 1-1) [2].

Die Familie der vier-Helix-Bündel Zytokine kann in die Untergruppen der langkettigen und der kurzkettigen Zytokine gegliedert werden [4]. Zu den kurzkettigen Zytokinen gehören beispielsweise IL-2, IL-3 und IL-4. Die Gesamtgröße der kurzkettigen Zytokine überschreitet in der Regel nicht die Anzahl von 160 Aminosäureresten, ihre α -Helices bestehen aus 8-10 Resten [5]. Zur Gruppe der langkettigen vier-Helix-Bündel Zytokine zählen sowohl das *growth hormon*, Leptin und Erythropoetin als auch die Familie der IL-6 Zytokine (Abschnitt 1.1.2). Die Zytokine dieser Gruppe bestehen aus 170 bis 250 Aminosäureresten und verfügen über α -Helices mit einer Länge von 10 bis 20 Resten [3].

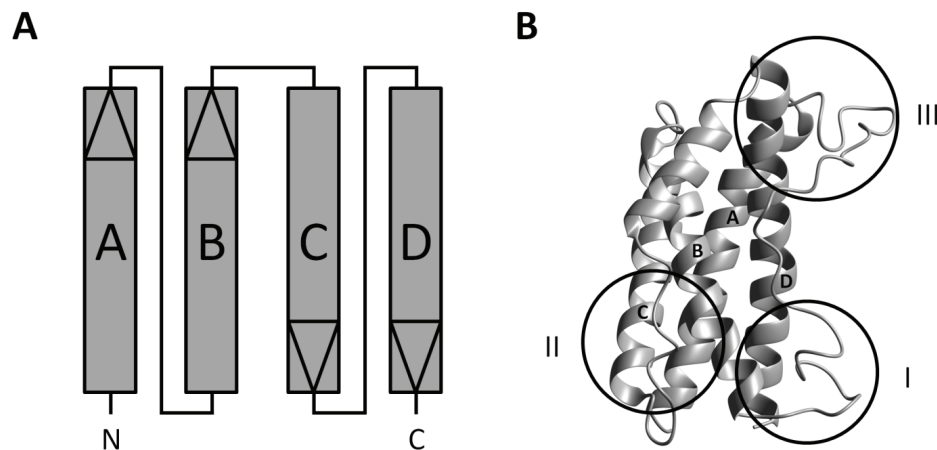


Abbildung 1-1: Charakteristische Elemente der vier-Helix-Bündel Zytokine. A) Schematische Darstellung der auf-auf-ab-ab Faltung der vier-Helix-Bündel Zytokine. B) Band-Darstellung der IL-6 Tertiärstruktur. Kreise verweisen auf die Rezeptorbindestellen. Epitop I bindet den IL-6 Rezeptor alpha, Epitop II das Zytokinbindemodul von gp130 und Epitop III die Immunglobulin-ähnliche Domäne von gp130. Die vier α -Helices werden mit A, B, C und D bezeichnet. N- und C- stehen für N- und C-Terminus. Verändert nach J. Grötzinger 2002 [2].

Vereinzelt bilden langkettige vier-Helix-Bündel Zytokine in einem der langen Schleifenbereiche weitere Strukturelemente aus, so verfügt IL-6 im Schleifenbereich zwischen der C- und der D-Helix über eine fünfte kurze α -Helix. Die vier-Helix-Bündel Zytokine binden an Klasse I und II Zytokinrezeptoren [1, 4, 6, 7].

1.1.2 Familie der IL-6 Zytokine

Die Familie der IL-6 Zytokine besteht aus langkettigen vier-Helix-Bündel Zytokinen und definiert sich über den gemeinsamen Gebrauch des Rezeptors gp130. Alle IL-6-ähnlichen Zytokine verfügen über drei Rezeptorbindestellen (Abbildung 1-1 B) [2, 8]. Die Bindestellen werden von den Mitgliedern dieser Zytokinfamilie nach folgendem Schema belegt: Das Epitop I bindet an nicht-signalisierende Rezeptorketten, das Epitop II an gp130 und das Epitop III an gp130 oder einen weiteren Rezeptor der gp130 Familie [9].

Neben dem namensgebenden IL-6 gehören zur IL-6 Zytokinfamilie unter anderem Oncostatin M (OSM), IL-11, IL-12, *leukemia inhibitory factor* (LIF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) und cardiotrophin-1 (CT-1). Eine Untergruppe der IL-6 Zytokinfamilie wird von den heterodimeren Zytokinen gebildet, hierzu zählen IL-12, IL-23 und IL-27. Diese heterodimeren Zytokine bestehen aus einem langkettigen vier-Helix-Bündel Zytokin und einem löslichen Klasse I Zytokinrezeptor-ähnlichen Molekül [1, 10].

1.1.3 Die Klasse I Zytokinrezeptoren

Zytokinrezeptoren werden aufgrund gemeinsamer Strukturmerkmale in sechs große Familien unterteilt: Klasse I Zytokinrezeptoren, Klasse II Zytokinrezeptoren, TNF Rezeptoren, IL-1 Rezeptoren,

Tyrosinkinaserzeptoren und Chemokinrezeptoren. Die größte Gruppe wird dabei von den Klasse I Zytokinrezeptoren gebildet [5]. Es handelt sich bei ihnen um Klasse I Transmembranproteine, der N-Terminus liegt somit im extrazellulären Raum und der C-Terminus im Zytoplasma. Die Klasse I Zytokinrezeptoren verfügen über eine modulare Architektur. Charakteristisch für diese Rezeptorklasse ist das zwei Domänen umfassende Zytokinbindemodul. Diese aus rund 200 Aminosäureresten bestehende Region ist evolutionär aus zwei Fibronectin III-ähnlichen (FNIII) Domänen hervorgegangen. Das N-terminale Segment der Region enthält vier konservierte Cysteinreste, im C-terminalen Bereich findet sich ein konserviertes Tryptophan-Serin-X-Serin-Tryptophan-Motiv (WSXSW-Motiv) [1, 11]. Am Aufbau von Typ I Zytokinrezeptoren können weitere Domänen beteiligt sein, so verfügt der Rezeptor gp130 im extrazellulären Bereich zusätzlich über drei FNIII sowie eine Immunglobulin-ähnliche (Ig-ähnliche) Domäne. Innerhalb der Klasse der Typ I Zytokinrezeptoren bildet die gp130 Rezeptorfamilie eine Untergruppe, zu dieser gehören Rezeptoren wie gp130, WSX-1, LIF- und der OSM-Rezeptor [2, 10]. Definiert wird diese Gruppe dadurch, dass sie die signalisierenden Rezeptorketten der IL-6 Zytokinfamilie darstellen [9].

1.1.4 Aktivierung der Rezeptoren der gp130 Familie durch Zytokine der IL-6 Familie

Die Zytokine der IL-6 Familie vermitteln unter Einsatz der Bindungsepitope II und III eine Signaltransduktion über homo- oder heterodimere Komplexe aus signalisierenden Rezeptorketten. Die Bindung des Zytokins an den dimeren Rezeptorkomplex gilt als Auslöser der intrazellulären Signaltransduktionskaskade. Die Ligandenbindung führt zu einer Neuausrichtung der Rezeptorketten, in deren Folge die intrazellulären Komponenten der Rezeptoren in enge räumliche Nähe zueinander rücken. Die zueinander orientierten intrazellulären Bereiche der Rezeptoren können durch die assoziierten Tyrosinkinasen phosphoryliert werden und bieten so Andockmöglichkeiten für weitere Moleküle der Signaltransduktionskaskade [2, 12]. Die signaltransduzierenden Rezeptorkomplexe der IL-6 Zytokinfamilie bestehen aus gp130, sowie einer zusätzlichen signalisierenden Rezeptorkette aus der Gruppe der gp130 Rezeptoren. Eine Ausnahme bildet hierbei IL-31, dessen Rezeptorkomplex aus dem OSM Rezeptor (OSMR) und dem IL-31 Rezeptor A gebildet wird [13, 14].

Die Zytokine IL-6 und IL-11 rekrutieren gp130 Homodimere, während LIF, OSM, CNTF und CT-1 an Heterodimere, bestehend aus gp130 und LIFR oder OSMR, binden (siehe Abbildung 1-2). Ferner können Spezifität-vermittelnde nicht-signalisierende Klasse I Zytokinrezeptoren, bezeichnet als Alpha-Rezeptoren ($R\alpha$), am Aufbau des signaltransduzierenden Rezeptorkomplexes beteiligt sein [9]. Für die von IL-6 und IL-11 vermittelte STAT-Phosphorylierung wird die Ig-ähnliche Domäne von gp130 benötigt, nicht jedoch für die Signaltransduktion von LIF und OSM. Letztgenannte Zytokine binden mit dem Epitop III an die Ig-ähnliche Domäne des LIF- beziehungsweise OSM-Rezeptors [15, 16].

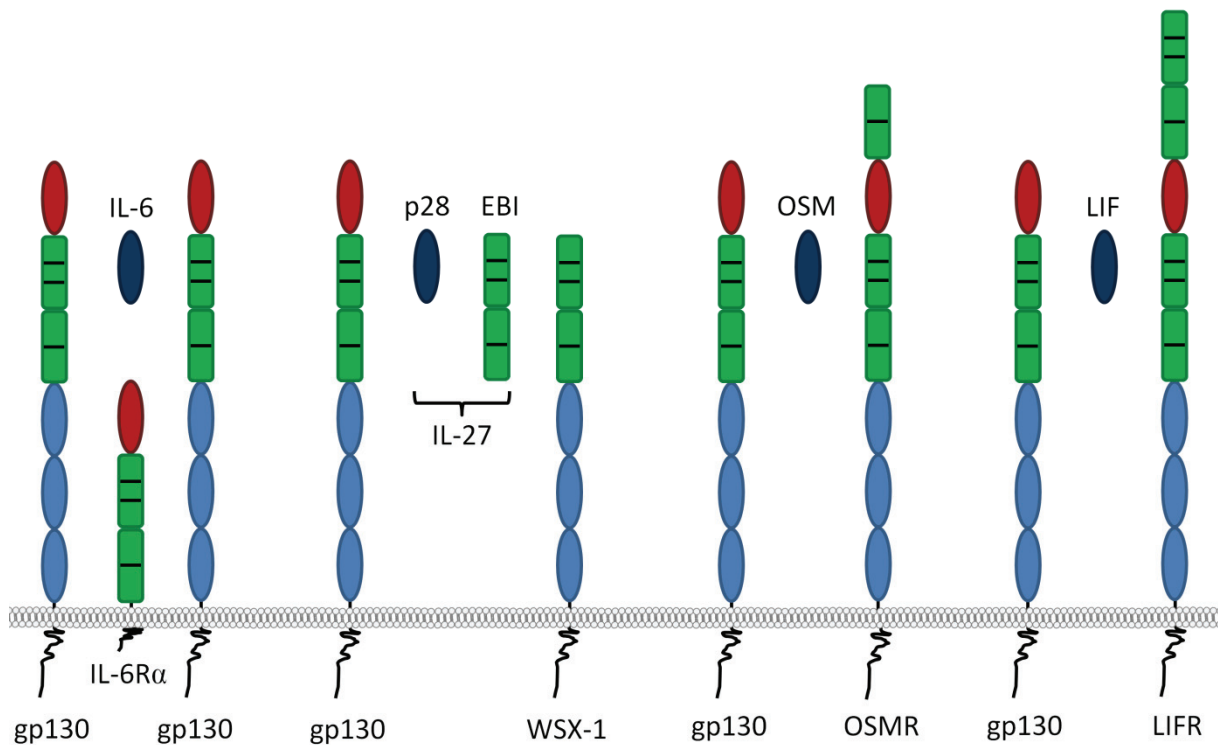


Abbildung 1-2: Aufbau und Vielfalt von Rezeptorkomplexen der IL-6 Zytokinfamilie. Klasse I Zytokinrezeptoren sind modular aufgebaut. Im Falle von IL-6 ist der tetramere Rezeptorkomplex und IL-6R α in seiner membrangebundenen Form gezeigt. Dunkelblau: Zytokin der IL-6 Zytokinfamilie. Rot: Immunglobulin-ähnliche Domäne. Grün: Zytokinbindemodul, hervorgegangen aus zwei Fibronectin III-ähnlichen Domänen. Hellblaues Oval: Fibronectin III-ähnliche Domäne.

Die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade der IL-6 Zytokine basiert hauptsächlich auf Mediatoren des Janus (Tyrosin-) Kinase (JAK) und *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Signalwegs, sowie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalwegs [17].

1.1.5 Interleukin-6

Aufgrund des Faltungsmusters gehört IL-6 zu den langkettigen vier-Helix-Bündel Zytokinen und ist das namensgebende Zytokin der IL-6 Zytokinfamilie [2]. IL-6 muss seinen Spezifität-bestimmenden Alpha-Rezeptor (IL-6R α) rekrutieren. Erst der IL-6/IL-6R α Komplex ist in der Lage, die signaltransduzierenden gp130 Rezeptorketten zu binden und über die Neuausrichtung eines gp130 Homodimers die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade auszulösen [17]. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass der finale Rezeptorkomplex von IL-6 sowohl tetramer (IL-61/IL-6R α 1/gp130 $_2$) als auch hexamer (IL-62/IL-6R α 2/gp130 $_2$) aufgebaut sein kann, jeweils in Abhängigkeit der vorliegenden IL-6 Konzentration [15, 18]. Der IL-6R α kann sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form Teil des IL-6/IL-6R α Komplexes sein [19, 20]. Ist der IL-6R α als membranständiger Rezeptor an der IL-6 Signaltransduktion beteiligt, wird vom klassischen Signalweg gesprochen, ist der IL-6R α in seiner löslichen Form am Aufbau des signaltransduzierenden Komplexes beteiligt, wird dieser Vorgang als *trans-signaling* bezeichnet [21]. Die Entstehung der löslichen Variante des IL-6R α beruht auf der

proteolytischen Spaltung des membrangebundenen IL-6R α durch die Metalloproteasen ADAM-10 (*α disintegrin and metalloprotease*) und ADAM-17 [22, 23] oder auf dem alternativen Spleißen der IL-6R α mRNA [20]. IL-6 wird von diversen Zellen, darunter B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Adipozyten exprimiert und sekretiert [24]. Das Zytokin verfügt über ein pleiotropes Wirkspektrum und vermittelt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkung [18]. Des Weiteren handelt es sich bei IL-6 um einen wichtigen Mediator der Akut-Phase-Reaktion. Das Zytokin induziert die Expression verschiedener Akut-Phase-Proteine in der Leber, unter anderem Fibrinogen und das C-reaktive Protein [25]. Neben immunregulatorischen Prozessen ist IL-6 an regenerativen, neuronalen und metabolischen Prozessen beteiligt [18].

Über das *trans-signaling* kann IL-6 auf Zellen wirken, die selbst nur die gp130 Rezeptorkette nicht aber den IL-6R α exprimieren. Die Expression des IL-6R α ist beschränkt auf Hepatozyten und bestimmte Gruppen von Leukozyten [26], während gp130 im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiert wird [27]. IL-6 *trans-signaling* ist sowohl am Ausbruch als auch an der Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen beteiligt. Beispiele hierfür sind entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Arthritis, Asthma und entzündungsinduzierter Darmkrebs [26].

Lösliches gp130 stellt einen natürlichen Inhibitor des IL-6 *trans-signaling* dar [27, 28], während der klassische Signalweg nicht beeinträchtigt wird. Außerdem kann ein Fusionsprotein aus den extrazellulären Domänen von humanem gp130 und dem Fc-Fragment eines humanen Immunglobulin G1 Antikörpers, bezeichnet als sgp130-Fc, die IL-6/sIL-6R α vermittelte Signaltransduktion effektiv unterbinden [29].

1.1.6 Interleukin-27

Das Zytokin Interleukin-27 wurde 2002 erstmals beschrieben und gehört wie IL-12, IL-23 und IL-35 zur Familie der heterodimeren Zytokine. IL-27 besteht aus den Proteinuntereinheiten p28 und dem Epstein-Barr-Virus induzierten Molekül 3 (EBI3). EBI3 ist verwandt mit den Spezifitäts-vermittelnden Rezeptoren der IL-6 Zytokinfamilie, insbesondere mit der p40 Untereinheit von IL-12 und IL-23 [30, 31]. Funktionell entspricht die Rolle von EBI3 für IL-27 der des löslichen IL-6 Alpha-Rezeptors für IL-6. Die IL-27 p28 Untereinheit gehört zur Gruppe der langkettigen vier-Helix-Bündel Zytokine, ebenso wie IL-6 oder IL-12 p35.

Der signaltransduzierende Rezeptorkomplex von IL-27 besteht aus einem Heterodimer der Zytokinrezeptoren WSX-1 und gp130. Die WSX-1 Rezeptorkette gehört zu den Klasse I Zytokinrezeptoren und verfügt über eine große strukturelle Homologie zu gp130. Keine der Rezeptorketten ist für sich alleine in der Lage das IL-27 vermittelte Signal in die Zelle zu leiten [10, 30, 32]. Inhibitionsexperimente ergaben, dass die Ig-ähnliche Domäne von gp130 für die

Signaltransduktion von IL-27 benötigt wird. Intrazellulär nutzt IL-27 den JAK/STAT Signalweg [30, 33]. Lösliches gp130-Fc, ein potenter Inhibitor des IL-6 *trans-signaling*, hemmt nicht die durch IL-27 vermittelte Signaltransduktion. IL-27 verfügt nur über geringe Affinität zu gp130 [34]. Während IL-27 an WSX-1 bindet, zeigen die Untereinheiten EBI3 und p28 einzeln keine Affinität zu WSX-1 [30].

IL-27 wird in der Frühphase nach Antigen-Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen sekretiert [30] und verfügt über pro- und antiinflammatorische Eigenschaften. Unter anderem induziert IL-27 die klonale Expansion von Antigen-spezifischen naiven CD4⁺ T-Zellen und fördert die Interferon- γ (IFN- γ) Produktion [30] und Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th₁-Zellen [35]. IL-27 inhibiert die Th₁₇-Differenzierung sowie die IL-17 und IL-2 Produktion [36], zudem wird durch das Zytokin die Produktion von IL-10 induziert und die Th₂-Immunantwort unterdrückt [37]. Diese immunsuppressiven Eigenschaften erklären, warum eine defekte IL-27 Signaltransduktion zu stärkeren Schäden durch Entzündungsreaktionen bei Parasiten- oder Tuberkuloseinfektionen in Mäusen [36, 38] und zu einer stärkeren Anfälligkeit für Asthma [39] und chronischen entzündlichen Darmerkrankungen [40, 41] beim Menschen führen. Ferner wurde für IL-27 eine antitumorale Aktivität beschrieben [42].

1.1.7 Das Zytokin p28

Das Zytokin p28 wurde durch eine Datenbankanalyse von humanen und murinen *expressed sequence tags* (ESTs) identifiziert und basierend auf seiner Homologie der IL-6 Zytokinfamilie zugeordnet [30]. Außergewöhnlich für vier-Helix-Bündel Zytokine ist die Insertion eines Stranges von geladenen Aminosäuren, bestehend aus 13 Glutamatresten, im Schleifenbereich zwischen der C- und der D-Helix (CD-Schleife). Im Falle von murinem p28 wird der Glutamatstrang durch zwei Aminosäurereste, Aspartat und Lysin, unterbrochen [30]. Da die Insertion in einer flexiblen Schleifenregion erfolgte und die CD-Schleife nicht an der Ausbildung der Rezeptorbindestellen beteiligt ist, gilt eine Beeinflussung der helikalen Topologie oder der Rezeptorbindung als unwahrscheinlich [30]. Mutagenese-Experimente deuten an, dass die Glutamatreste für den Prozess der Proteinfaltung notwendig sind [43]. Ursprünglich wurde für p28 keine biologische Aktivität festgestellt, erst in Kombination mit EBI3 als löslichen Spezifität-vermittelnden Rezeptor, konnte eine biologische Aktivität für IL-27 identifiziert werden [30]. Im Unterschied zu den Untereinheiten der heterodimeren Zytokine IL-12 und IL-23 wird zwischen EBI3 und p28 keine Disulfidbrücke ausgebildet [35]. Veröffentlichungen neueren Datums zeigen, dass reines p28 ebenfalls biologische Aktivität aufweist. So hemmt p28, wenn auch mit geringerer Effizienz als IL-27, die IL-17 Produktion von CD4⁺ T-Zellen, welche zuvor mit *transforming growth factor* β (TGF- β) und IL-6 inkubiert wurden [36]. Humanes p28 induziert die STAT1- und STAT3-Phosphorylierung und in der Folge die Proliferation von Ba/F3-Zellen über einen Rezeptorkomplex aus IL-6R α , gp130 und WSX-1 [44]. Murines p28 hemmt den synergistischen Effekt

von mIL-27 auf die $\text{IFN-}\gamma$ Produktion von IL-12 stimulierten CD4^+ Zellen und unterdrückt IL-27 vermittelte anti-Tumor Effekte *in vivo* [45]. Des Weiteren inhibiert p28 die Signaltransduktion von IL-6 , IL-27 und IL-11 über gp130. Es wird postuliert, dass p28 ein natürlicher Antagonist der gp130 vermittelten Signaltransduktion ist und insbesondere das $\text{IL-6 trans-signaling}$ inhibiert [37].

1.2 Antimikrobielle Peptide: Effektoren des angeborenen Immunsystems

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems und bilden zusammen mit der mechanischen Barrierefunktion intakter Epithelien die erste Verteidigungslinie höherer Organismen gegen eindringende Mikroorganismen [46]. Typischerweise handelt es sich bei AMPs um amphipathische Moleküle, bestehend aus 10 bis 50 Aminosäureresten, ausgestattet mit einer positiven Nettoladung [47]. AMPs lassen sich aufgrund von Strukturmerkmalen grob in vier Gruppen einteilen: 1) gestreckte lineare Peptide ohne Cysteinreste, mit ein bis zwei dominierenden Aminosäureresten; 2) lineare häufig α -helikale Peptide ohne Cysteinreste; 3) Peptide mit Schleifenstruktur und bis zu zwei Disulfidbrücken; 4) Peptide mit ausgeprägtem β -Faltblattmotiv, stabilisiert durch zwei bis vier Disulfidbrücken (Abbildung 1-3) [48-50].

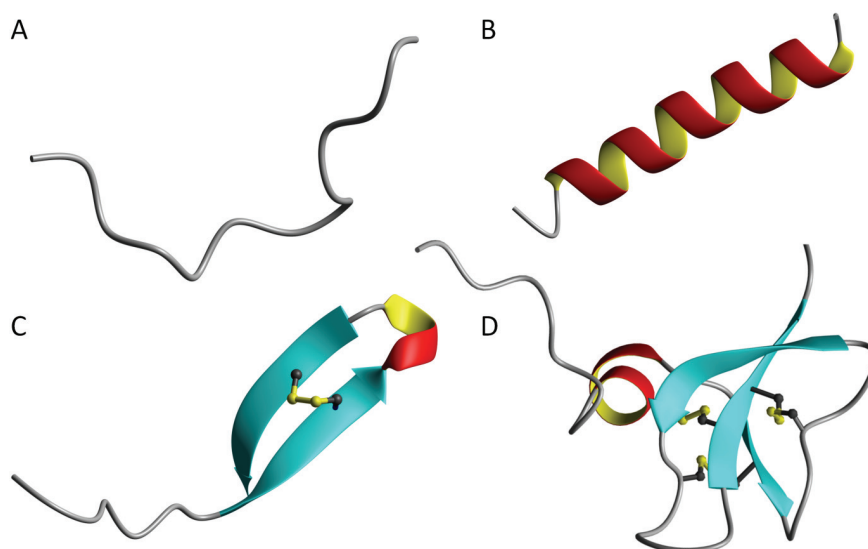


Abbildung 1-3: Strukturbasierte Klassifizierung antimikrobieller Peptide. A: Das tryptophanreiche bovine Indolicidin [51], Gruppe der linearen Peptide mit dominierenden Aminosäuren, ohne Cysteinreste. B: Magainin 2 in α -helikaler Form, aus *Xenopus laevis* [52], Gruppe der linearen, auch α -helikalen cysteinlosen Peptide. C) Thanatin aus *Podisus maculiventris* (Insecta) [53], Gruppe der schleifenförmigen Peptide mit bis zu zwei Disulfidbrücken. D) Humanes β -Defensin 3 [54], Gruppe der komplexen Peptide, verfügen über ein β -Faltblattmotiv, Struktur wird stabilisiert von zwei bis vier Disulfidbrücken, weitere Strukturelemente können vorhanden sein. Die gezeigten Tertiärstrukturen wurden mittels MR-Spektroskopie ermittelt; Indolicidin und Magainin 2 an Micellen gebunden, Thanatin und HBD3 in wässriger Lösung.

Zusätzlich zur direkten antimikrobiellen Wirkung, können AMPs über weitergehende Funktionen verfügen [47, 50, 55]. So sind antimikrobielle Peptide bekannt, die an der Wundheilung beteiligt sind,

etwa das Cathelicidin LL-37 [56] oder LPS neutralisieren können, wie das *Bactericidal/permeability increasing protein* (BIP) [57]. Einige AMPs können zudem die Genexpression beeinflussen, beispielsweise *human neutrophil peptide* (HNP) 1 bis 3 [58]. Aufgrund der vielfältigen Wirkungen der AMPs bei der Erregerabwehr spricht man auch von *host defense peptides* (sinngemäß: Peptide der Immunabwehr des Wirts) [50]. Im Menschen bilden die Defensine eine der wichtigsten Klasse an AMPs [55, 59].

1.2.1 Die Defensine, eine bedeutende Klasse der antimikrobiellen Peptide

Antimikrobielle Peptide aus der Gruppe der Defensine konnten in Vertebraten, Invertebraten, sowie höheren Pflanzen und Pilzen nachgewiesen werden [50, 60-62]. Die kationischen Peptide haben eine Größe von 3 bis 5 kDa und verfügen über drei bis vier Disulfidbrücken [63]. Die Defensine der Mammalia lassen sich in die drei Subklassen der α -, β - und θ -Defensine unterteilen [55, 59]. Die Klassifizierung in α - und β -Defensine basiert wesentlich auf den Abständen der Cysteinreste in der Primärstruktur, sowie dem Verknüpfungsmuster der Disulfidbrücken [64]. Als evolutionärer Ursprung der Defensine wird ein β -Defensin-ähnliches Molekül angenommen. Dieses Postulat beruht auf der Beobachtung, dass die Aminosäuresequenz und die Struktur der β -Defensine der Mammalia den Insektendefensinen ähnlicher sind, als den α -Defensinen der Mammalia [50, 65].

1.2.2 Die β -Defensine

Das erste beschriebene β -Defensin war das bovine Neutrophilen β -Defensin [66, 67]. In der Folge wurden weitere β -Defensine der Mammalia und Avia beschrieben [68]. Das charakteristische Disulfidbrückenmuster der β -Defensine entspricht dem Verknüpfungsmuster Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6 [68]. Die Tertiärstruktur der β -Defensine besteht, ähnlich wie die der α -Defensine, aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt [69], zusätzlich kann eine kurze N-terminale α -Helix auftreten [54, 70-72]. Die β -Defensine werden hauptsächlich von epithelialen Zellen der Haut, der Niere und des tracheal-bronchialen Systems fast aller Vertebraten exprimiert [63].

Bisher wurden die humanen β -Defensine (HBD) 1 bis 4 auf Proteinebene charakterisiert [73-76], sowie die Tertiärstrukturen von HBD1 bis 3 aufgeklärt [54, 70, 71]. Zudem sind in fünf chromosomalen Regionen des humanen Genoms weitere 28 HBD-Gene identifiziert [77] und die Expression von Epididymis-spezifischen HBDs beschrieben worden [78]. Die humanen β -Defensine verfügen über ein breites antimikrobielles Wirkspektrum [59], werden konstitutiv (HBD1) oder induzierbar exprimiert (HBD2 bis 4), unter anderem durch LPS, IL-1 β , TNF- α und INF- γ , Viren, sowie Gram-negative und Gram-positive Bakterien [75, 79, 80]. Des Weiteren wurde für HBD2 und 3 eine antivirale Wirkung beschrieben [80]. HBD1 bis 3 wirken zudem chemotaktisch auf verschiedene Zellen der Immunantwort [63, 81]. Darüber hinaus können HBD2 bis 4 die Produktion von

proinflammatorischen Zytokinen, unter anderem IL-6 und IL-10 [59], sowie von Chemokinen stimulieren [82]. Die Expression von humanen β -Defensinen erfolgt hauptsächlich in Epithelien verschiedener Organe, wie der Epidermis und der Lunge, sowie in einigen nicht-epithelialen Geweben, beispielsweise der Skelettmuskulatur, Thymus, Testis und der Placenta [74-76, 79, 83-87].

1.2.3 Der Wirkmechanismus der β -Defensine

Die antimikrobielle Aktivität von kationischen Peptiden wie der β -Defensine basiert auf der Fähigkeit, an polyanionische Strukturen der bakteriellen Membran mittels elektrostatischer Wechselwirkungen zu binden [68, 88, 89]. Auf dieses Initiationsereignis folgt die Membraninsertion der Peptide basierend auf hydrophoben Wechselwirkungen [90]. Die antimikrobielle Aktivität der β -Defensine beruht des Weiteren auf dem Verlust der Integrität der bakteriellen Membranen [60, 72, 82], dem Austreten von zellulären Material [75, 91], sowie der Interaktion mit intrazellulären Zielen, wie dem für den Aufbau der Zellwand von *Staphylococcus aureus* essentiellen Lipid II Block [91, 92].

Der Wirkmechanismus der β -Defensine im Detail gilt als unbekannt. Effekte wie die Gram-Spezifität, die Stammspezifität, sowie die unterschiedliche Aktivität gegen bestimmte Viren und niedere Pilze und Hefen sind nicht abschließend geklärt. Als wesentlich gelten jedoch Strukturparameter wie die Primärstruktur, die Oberflächenladung, die Hydrophobizität und die Tertiärstruktur der Peptide [68].

1.2.4 Spezielle Charakteristika der humanen β -Defensine 2 und 3

Bei HBD2 und 3 handelt es sich um die bisher am besten untersuchten humanen β -Defensine. Sowohl HBD2 als auch HBD3 wurden erstmals aus Keratinozyten von Psoriasis Patienten isoliert [74-75]. Beide Peptide wirken bakterizid gegen Gram-negative Bakterien, unter anderem gegen *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, sowie gegen den Hefepilz *Candida albicans* [91, 95].

HBD2 wirkt bakteriostatisch gegen das Gram-positive Bakterium *S. aureus* [91], während HBD3 über eine starke bakterizide Wirkung gegen Gram-positive Bakterien, beispielsweise gegen *S. aureus* und *Streptococcus pyogenes* verfügt. Zudem zeigt HBD3 antibakterielle Aktivität gegen multiresistente *S. aureus*, Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* und gegen *Burkholderia cepacia* [79]. Es wurde zudem gezeigt, dass HBD3 sowohl Zellwände von *S. aureus* perforiert, als auch die Zellwandbiosynthese durch Bindung des Lipid II Blocks inhibiert [75, 91, 92].

HBD2 wirkt in nanomolarer Konzentration chemotaktisch als Lockstoff auf ein breites Spektrum von Leukozyten. Die Wirkung umfasst dabei unreife dendritische Zellen, Gedächtnis-T-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Die Chemotaxis wird vermittelt durch die Rezeptoren CCR2 und CCR6 [63, 81]. HBD3 induziert die Migration von Monozyten über den Chemokinrezeptor CCR2 [79, 81]. Sowohl die Chemotaxis als auch die antimikrobielle Aktivität von HBD2 ist sensitiv gegenüber physiologischer

Natriumchloridkonzentration [74, 85, 93] während HBD3 auch unter diesen Bedingungen bakterizid wirkt, bei gleichzeitig nicht-signifikanter hämolytischer Aktivität [75].

1.2.5 Die HBD2/HBD3 Chimären

Die humanen β -Defensine HBD2 und HBD3 zeigen deutliche Unterschiede in ihren antimikrobiellen Wirkspektren, zudem wird die Aktivität der Moleküle im unterschiedlichen Maße von physiologisch relevanter Salzkonzentration beeinflusst [74, 75, 85, 94]. Gleichzeitig verfügen beide Peptide über eine hohe strukturelle Ähnlichkeit [54, 70, 72]. Obwohl es als sicher gilt, dass die kationische Nettoladung und die Tertiärstruktur der Peptide wesentlich für die beobachteten Eigenschaften der β -Defensine sind, ist der Wirkmechanismus im Detail nicht entschlüsselt [70, 71, 90, 94-98].

Die Primärstrukturen von HBD2 und HBD3 enthalten, neben den für humane Defensine charakteristischen sechs konservierten Cysteinresten, zwei konservierte Glycinreste. Diese Glycinreste unterteilen die Aminosäuresequenz beider Peptide in jeweils drei Segmente gleicher Länge. Die drei Primärstruktursegmente vermitteln die Ausbildung von vier Oberflächenepitopen.

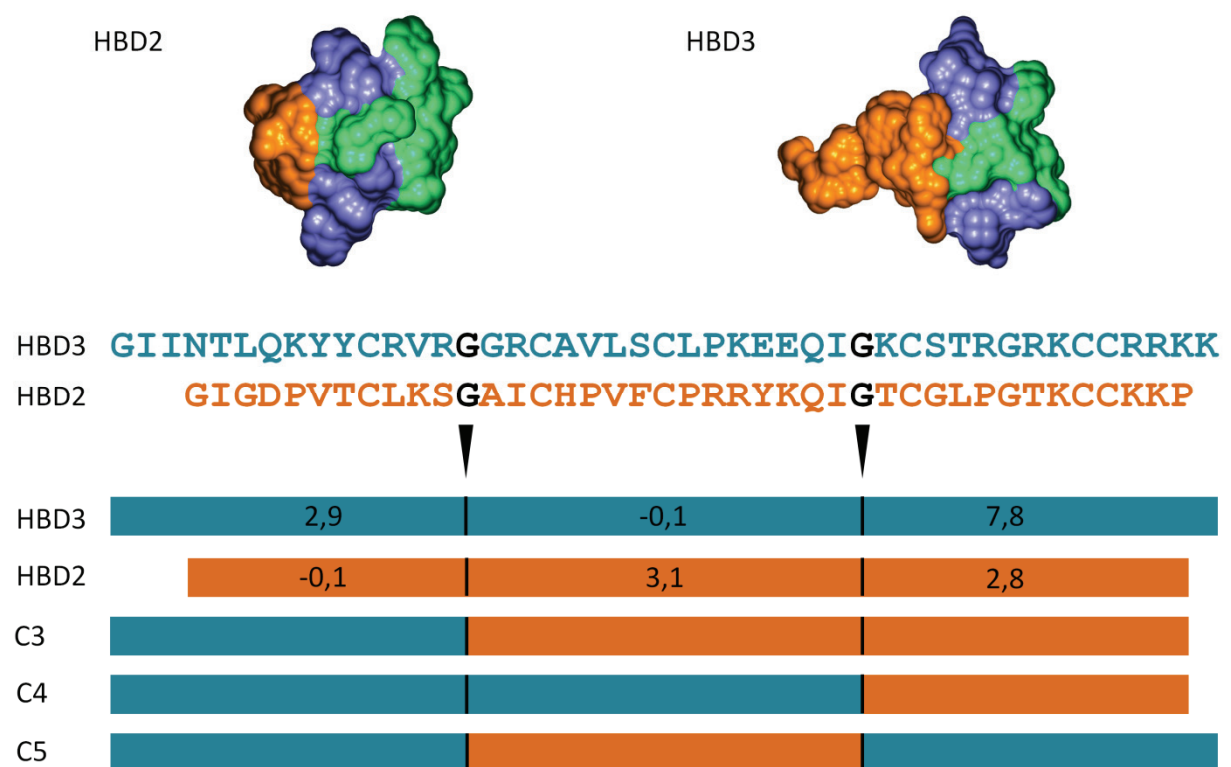


Abbildung 1-4: Konstruktionsschema der HBD2/3 Chimären. Oben: Moleküloberflächen von HBD2 und 3. Zwei konservierte Glycinreste in den Primärstrukturen begrenzen drei Segmente, die die Ausbildung von vier Oberflächensegmenten bewirken. Orange: N-terminales Segment. Grün: Mittleres Segment. Blau: C-terminales Segment. Mitte: Primärstrukturen von HBD2 und 3. Die Segmentgrenzen werden durch konserviert Glycinreste definiert (schwarz hervorgehoben). Unten: Schematische Darstellung der Primärstruktursegmente von HBD2 und 3, sowie der Chimären 3 bis 5 (C3 bis C5). Für die Primärstruktursegmente von HBD2 und 3 ist die Nettoladung angegeben.

Das N-terminale und das mittlere Segment bilden jeweils ein Oberflächenepitop aus, während das C-terminale Segment den Kernbereich des Peptids durchquert und für die Ausbildung von zwei Oberflächenepitopen auf gegenüberliegenden Seiten des Moleküls verantwortlich ist [94]. Da die Ladungsverteilung an der Moleküloberfläche entscheidend für die initiale Interaktion zwischen antimikrobiellen Peptiden und der bakteriellen Membran ist [99], wurden die Glycin-definierten Primärstruktursegmente für die Konstruktion von verschiedenen HBD2/HBD3 Chimären genutzt (Abbildung 1-4) [94].

Die Chimären wurden hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität getestet. Zwei der Designer-Peptide, die Chimären 3 und 5, verfügen im Vergleich zu den Ursprungsmolekülen über eine erhöhte antimikrobielle Aktivität. Zudem wirken die Peptide bakterizid gegen verschiedene multiresistente potentiell humanpathogene Erreger. Für Chimäre 3 wurde zudem eine schwache Aktivität gegen den Hefepilz *Candida albicans* beobachtet [94]. Aus der Aktivität der Chimären lässt sich der Einfluss der drei Primärstruktursegmente auf die antimikrobielle Aktivität der Ursprungspeptide und der Chimären ableiten. So ist das N-terminale Segment von HBD3 ausschlaggebend für die Aktivität gegen *S. aureus* (Gram-positiv) und *E. coli* (Gram-negativ). Selbiges gilt für das mittlere Segment von HBD2. Die C-terminalen Segmente von HBD2 und HBD3 verfügen über keinen unmittelbaren Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der Peptide [94]. Die Chimären 3 und 5 vereinigen die aktivitätstragenden Segmente von HBD2 und HBD3. Beide Chimären verfügen im Gegensatz zu den Ursprungsmolekülen HBD2 und HBD3 über keine anionisch geladenen Seitenketten, was in einer erhöhten positiven Nettoladung resultiert. Unterschiede in der Aktivität der untersuchten Peptide deuten daraufhin, dass die Verteilung der Oberflächenladung bedeutsamer sein könnte als die bloße Nettoladung. So zeigen HBD2 und die Chimäre 4 eine ähnlich hohe Nettoladung (+6,0 und +5,7), unterscheiden sich dennoch deutlich in ihrer Aktivität [94]. Die Salztoleranz von HBD2 und 3 sowie der Chimären korreliert mit der Nettoladung des C-Terminus, eine höhere Nettoladung resultiert in einer erhöhten Salztoleranz [94]. Zudem wurde für HBD1/HBD3 Chimären ein strukturbasierter Einfluss auf die Salztoleranz beschrieben. Hier bewirkte eine kompakte Molekülform, neben einer hohen Nettoladung, eine erhöhte Salztoleranz [95]. Weitere Studien zeigen für HBD3-Derivate, dass die Verteilung von hydrophoben und geladenen Seitenketten an der Moleküloberfläche die antimikrobielle Aktivität beeinflusst [90, 96]. Die Ladungsverteilung an der Moleküloberfläche ergibt sich aus der Tertiärstruktur eines Moleküls. Der Einfluss der Segmentrekombination auf die Tertiärstruktur, sowie deren Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der HBD2/HBD3-Chimären, lässt sich ohne Kenntnis der Tertiärstruktur nicht zweifelsfrei bestimmen.

1.3 NMR-Spektroskopie

Bereits 1938 wurde das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz (NMR, *nuclear magnetic resonance*) im Molekülstrahl beobachtet [100]. Acht Jahre später wurden die ersten erfolgreichen NMR-Experimente im Festkörper und in wässriger Lösung veröffentlicht [101, 102]. Weitreichende Fortentwicklungen der kernmagnetischen Resonanz waren in der Folge die gepulste Fourier-Transformations-Spektroskopie [103] sowie die mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie und ihre Anwendung auf Proteine [104]. Heute ist die NMR-Spektroskopie neben der Röntgenstrukturanalyse die einzige Methode, mit der die Struktur von Proteinen und Nukleinsäuren auf atomarer Ebene aufgeklärt werden kann [105]. Im Regelfall wird die NMR-Spektroskopie zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen mit einer Masse von bis zu 30 kDa genutzt. Im Einzelfall wurden bereits Spektren von Proteinen in der Größenordnung von 70 bis 80 kDa oder von Untereinheiten von Proteinkomplexen mit bis zu 900 kDa aufgenommen [105-108].

1.3.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Der NMR-Spektroskopie liegt als Prinzip zugrunde, dass sich das magnetische Moment der Atomkerne in einem homogenen Magnetfeld in Energieniveaus mit unterschiedlichen Orientierungen aufspaltet. Eine eingestrahlte elektromagnetische Welle mit einer Frequenz, die dem Energieunterschied der Orientierungen entspricht, kann einen Übergang zwischen den Energieniveaus induzieren. Dieser Übergang stellt die kernmagnetische Resonanz eines Atomkerns dar. Wird die Anordnung um eine Detektionsspule zum indirekten Beobachten des Wechsels im Energieniveau über einen in der Spule induzierten Strom erweitert, ergibt sich daraus, stark vereinfacht, ein NMR-Spektrometer [109].

Der Kernspin eines Atoms ist eine rein quantenmechanische Eigenschaft und kann mit den Eigenschaften der makroskopischen Welt bestenfalls umschrieben werden. Aus dem Kernspin eines Atoms ergibt sich das magnetische Moment μ des Atomkerns. Magnetische Atomkerne verfügen über einen quantenmechanischen Spin mit einer Kernspinquantenzahl I ungleich 0. Der Spin des Atomkerns ergibt sich aus den Spins seiner Protonen und Neutronen, die jeweils Spin $\frac{1}{2}$ haben. Da die Spins der Protonen, und ebenso der Neutronen, sich bevorzugt in Paaren antiparallel zu einander orientieren, können sich ihre Spins komplett aufheben (Kernspinquantenzahl I gleich 0). Atomkerne mit einer Kernspinquantenzahl I gleich 0 verfügen über kein magnetisches Moment μ und können mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nicht detektiert werden [105, 109].

In einem homogenen Magnetfeld B_0 kommt es zur Aufspaltung des magnetischen Moments μ auf Energieniveaus mit unterschiedlicher Orientierung. Diese Aufspaltung bedeutet für Wasserstoffkerne mit Spin $\frac{1}{2}$, dass sie sich in einem magnetischen Hauptfeld B_0 entweder parallel (α -Zustand, $+\frac{1}{2}$) oder antiparallel (β -Zustand, $-\frac{1}{2}$) zu B_0 anordnen. Die beiden Zustände unterscheiden sich leicht in ihrem

Energieniveau. Die Differenz ΔE zwischen den Energieniveaus ist abhängig von der Art des betrachteten Kerns und von der Stärke des Magnetfeldes B_0 (Abbildung 1-5).

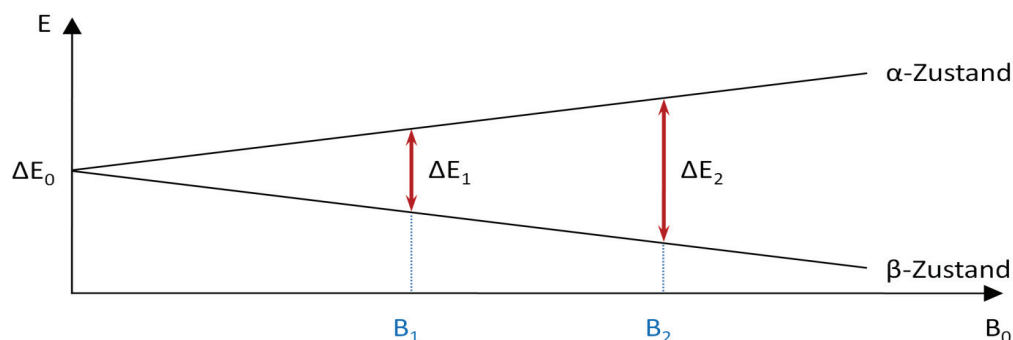


Abbildung 1-5: Beziehung des Energieunterschieds ΔE zur Magnetfeldstärke B_0 . Die Differenz zwischen dem parallelen α -Zustand und dem antiparallelen β -Zustand des Energieniveaus ist abhängig von der Stärke des Magnetfeldes B_0 (verändert nach Lottspeich 1998).

Das magnetische Moment μ der Atomkerne rotiert in einer Präzessionsbewegung um die Richtung des angelegten homogenen Magnetfeldes B_0 . Die Präzessionsfrequenz der magnetischen Momente wird als Larmor-Frequenz bezeichnet und entspricht der Resonanz-Frequenz der Atomkerne. Eine eingestrahlte Radiowelle kann einen Übergang zwischen den Energiezuständen der Kerne induzieren, wenn die Frequenz der Radiowelle der Larmor-Frequenz des untersuchten Kerns entspricht. Die Larmor-Frequenz ist für jede Kernsorte verschieden und abhängig von der Stärke des homogenen Magnetfeldes B_0 und des gyromagnetischen Verhältnisses γ eines gegebenen Atomkerns. Das gyromagnetische Verhältnis γ ist für jede Kernsorte eine Konstante [105].

Der wichtigste Atomkern für die NMR-Spektroskopie ist das Proton (^1H). Ebenfalls von besonderer Bedeutung für die Proteinstrukturaufklärung sind die magnetischen Kerne ^{13}C und ^{15}N . Letztere verfügen bezogen auf ^1H allerdings über eine geringere natürliche Häufigkeit und über ein schwächeres gyromagnetisches Verhältnis [104, 109].

Die Resonanzfrequenz wird nicht ausschließlich über die Stärke des Magnetfeldes B_0 und die Kernsorte, sondern auch in geringem Umfang von der lokalen Elektronenverteilung in der Umgebung des betrachteten Atomkerns beeinflusst. Dieser Effekt wird als chemische Verschiebung bezeichnet. Der Grund für die chemische Verschiebung der Resonanzfrequenz ist, dass das äußere Magnetfeld B_0 geringfügig durch die chemische Umgebung des betrachteten Atomkerns eines Moleküls beeinflusst wird. Das äußere homogene Magnetfeld B_0 kann, bezogen auf einen distinkten Atomkern in einem Molekül, durch dessen chemische Umgebung entweder verstärkt oder abgeschwächt werden. In einem Molekül können somit Atomkerne derselben Kernsorte unterschiedlich starken Magnetfeldern ausgesetzt sein ($B_0 \neq B_{\text{eff}}$) und somit eine Verschiebung in der Resonanzfrequenz erfahren. Dieser Effekt bewirkt, dass sich im eindimensionalen NMR-Spektrum aus der Gesamtmenge aller Protonen eines Peptides eine Vielzahl von separat detektierbaren Signalen ergeben und nicht bloß ein

einzelnes Signal [109]. Im Falle von Peptiden und Proteinen ist die Strukturierung der Aminosäurekette durch das Ausbilden von Sekundär- und Tertiärstruktur einer der wesentlichen Faktoren für das Auftreten von chemischen Verschiebungen.

Bringt man eine NMR-Probe in ein homogenes Magnetfeld ein, teilen sich die Kernspins ihrer Atome entsprechend der von ihnen besetzbaren Energieniveaus auf. Der energieärmere α -Zustand wird dabei favorisiert. Da die Energieunterschiede der Niveaus unterhalb der Größenordnung der thermischen Bewegung liegen, ist der Unterschied in der Besetzung der Niveaus äußerst gering (ungefähr 1 zu 10^4 bis 10^6). Löst ein eingestrahelter Radiofrequenzpuls einen Wechsel der Energiezustände aus, so geschieht der Übergang mit derselben Wahrscheinlichkeit für einen Wechsel vom tieferen zum höheren Energiezustand, wie auch vom höheren zum tieferen Energiezustand. Die Netto-Änderung in der Besetzung der Energieniveaus ist deswegen abhängig vom Unterschied in der Besetzung der Energieniveaus. Hieraus resultiert die vergleichsweise geringe Stärke der zu detektierenden NMR-Signale [105, 109].

Kerne mit einer Kernspinquantenzahl von I gleich $\frac{1}{2}$ wie ^1H lassen sich anschaulich als Vektormodell darstellen. Die magnetischen Momente der einzelnen Kernspins einer Probe lassen sich zu einer Gesamtmagnetisierung M_0 addieren. Die Größe der Gesamtmagnetisierung wird beeinflusst von der Feldstärke B_0 der Anzahl der Spins und der Temperatur der untersuchten Probe. Im thermodynamischen Gleichgewicht existiert nur eine Magnetisierung M_0 entlang der Hauptachse B_0 des homogenen Magnetfelds. Im NMR-Spektrometer wird die Veränderung der makroskopischen Magnetisierung M_0 über die Zeit gemessen. Die Komponenten der magnetischen Momente in der xy -Ebene sind ungerichtet, sie heben sich deshalb auf (Abbildung 1-6, links).

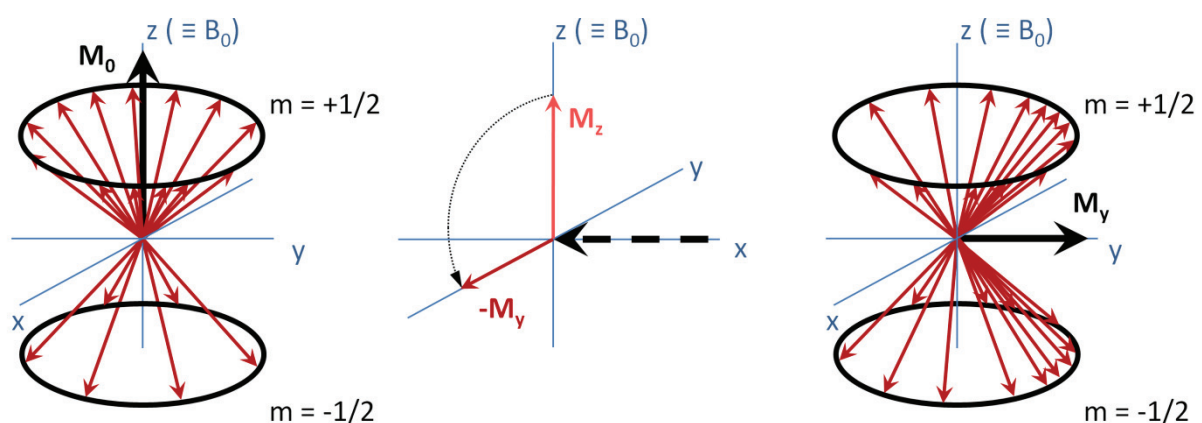


Abbildung 1-6: Die Einstrahlung eines 90° -Pulses verändert die makroskopische Magnetisierung von M_0 zu M_y . Links: Die makroskopische M_0 -Magnetisierung im thermodynamischen Gleichgewicht. Aufgrund eines geringen Besetzungsunterschiedes summiert sich die Magnetisierung zu M_0 auf. Mitte: Ein Radiofrequenzpuls entsprechender Stärke rotiert die Magnetisierung um die Einstrahlungsachse in die xy -Ebene. Rechts: Nach dem 90° -Puls sind beide Energieniveaus gleich dem 90° -Puls besetzt. Kernspins präzedieren gebündelt um die Richtung des homogenen Magnetfeldes B_0 , die Magnetisierung summiert sich makroskopisch zu M_y auf (verändert nach Lottspeich 2006).

Wird ein Radiowellenpuls entlang der x-Achse im 90° Winkel zu B_0 eingestrahlt, induziert dieser ein transversales Magnetfeld B_1 in der xy-Ebene. Entspricht die Frequenz des eingestrahlten Pulses der Resonanz-Frequenz der Kerne, so folgt eine Rotation der Magnetisierung M_0 um die Einstrahlungsachse in die xy-Ebene (Abbildung 1-6, Mitte). Mit einer entsprechenden Wahl des Frequenzpulses kann die M_0 Magnetisierung komplett in eine M_y Magnetisierung umgewandelt werden. Ein solcher Puls wird als 90° -Puls bezeichnet. Die Entstehung der M_y Magnetisierung erklärt sich wie folgt: Da M_0 nun gleich null ist, folgt, dass die beiden Energieniveaus gleich besetzt sind. Zudem sind die Magnetisierungsdipole nicht mehr gleichmäßig um die z-Achse verteilt, sondern präzedieren leicht gebündelt um die z-Achse. Dadurch summiert sich makroskopisch die M_y Magnetisierung auf (Abbildung 1-6, rechts) [105, 109]. Die Änderung in der Gesamtmagnetisierung in Folge des eingestrahlten Radiowellenpulses führt zur elektromagnetischen Induktion eines elektrischen Stroms in der Detektionsspule des NMR-Spektrometers.

Bei der Magnetisierung nach dem Radiofrequenzpuls handelt es sich um einen vorübergehenden Effekt. Nach der Änderung des Magnetisierungszustandes von M_0 zu M_y ist das System bestrebt, in seinen ursprünglichen thermodynamischen Gleichgewichtszustand M_0 entlang des nach wie vor vorhandenen Magnetfelds B_0 zu gelangen. Dieser Effekt wird als Relaxation bezeichnet und ist durch die longitudinale Relaxationszeit T_1 und die transversale Relaxationszeit T_2 gekennzeichnet. Ursachen für die Relaxation sind die Interaktionen der Spins mit ihrer Umgebung (T_1) und die Wechselwirkungen der Spins untereinander (T_2). Die T_1 -Relaxation (eine bis mehrere Sekunden) beeinflusst die Schnelligkeit mit der Experimente hintereinander an einer Probe ausgeführt werden können. Die T_2 -Relaxation wird beeinflusst von der Molekülgröße. Im Falle von kleinen Molekülen entspricht T_2 ungefähr T_1 , für große Peptide ist T_2 deutlich kleiner T_1 . Die T_2 -Relaxation wirkt limitierend auf die Lebensdauer des NMR-Signals. Aufgrund der T_2 -Relaxation wird das NMR-Signal als gedämpfte Schwingung, bezeichnet als FID (freier Induktionszerfall, *free induction decay*), gemessen. Zudem führt eine verringerte Relaxationszeit T_2 zu einer größeren Linienbreite der Resonanzsignale, die Auflösung und die Empfindlichkeit der Spektren verringert sich. Dieser Umstand erklärt die Größenbeschränkung der NMR-Spektroskopie auf in der Regel unter 50 kDa [105, 106].

Die einfachste Form der NMR-Spektroskopie stellt das eindimensionale (1D-) Experiment dar. Die gepulste 1D-Fourier-Transformations-Spektroskopie besteht aus zwei Phasen, der Präparation und der Detektion. Im einfachsten Falle besteht die Präparationsphase aus einem einzelnen 90° Puls der die Gesamtmagnetisierung M_0 von der z-Achse in die xy-Ebene dreht. Während der Detektionsphase wird durch die nun in der xy-Ebene präzedierenden Kerne eine Spannung in der Detektionsspule induziert, die aufgrund der Relaxationszeit T_2 abnimmt. Diese Spannung wird aufgezeichnet und der entsprechende Datensatz als FID bezeichnet. Durch eine Fourier-Transformation werden die Zeitdaten (FID) in die Frequenzdomäne (Spektrum) übersetzt [105].

1.3.2 Homonukleare zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Die wesentlichen Vorzüge der 2D-Spektroskopie gegenüber der 1D-Spektroskopie sind die bessere Auflösung der Spektren, die Signale verteilen sich in einem 2D-Spektrum über eine Fläche, anstelle über eine kurvenförmige Linie. Zum anderen ermöglichen 2D-NMR-Experimente die Darstellung von Signalen aufgrund von Magnetisierungstransfers, was Rückschlüsse auf die räumliche Nähe der beteiligten Kerne erlaubt.

Für das homonukleare zweidimensionale NMR-Experiment wird die Abfolge von Präparation und Detektion um die Phasen Evolutionszeit und Mischsequenz erweitert (siehe Abbildung 1-7). Homonuklear bedeutet, dass ein Magnetisierungstransfer zwischen Kernen gleicher Art (^1H) hervorgerufen wird. Nach dem 90° Puls der Präparationsphase können die Kerne während der Evolutionszeit präzedieren. Im Zuge der Mischphase wird die Magnetisierung der Kerne am Ende der Evolutionszeit abgefragt und die Magnetisierung der angeregten Kerne, so fern möglich, übertragen. In der Detektionsphase wird die Magnetisierung der in der Mischphase angeregten Kerne aufgezeichnet. Entsprechend dem 1D-Spektrum wird der gemessene FID über die Fourier-Transformation in ein Spektrum übersetzt. Durch Wiederholungen des Experiments mit jeweils um einen festen Betrag erhöhten Evolutionszeiten, erhält man eine Reihe von 1D-Spektren, in denen schrittweise eine Veränderung der Magnetisierung während der Evolutionsphase detektiert wird.

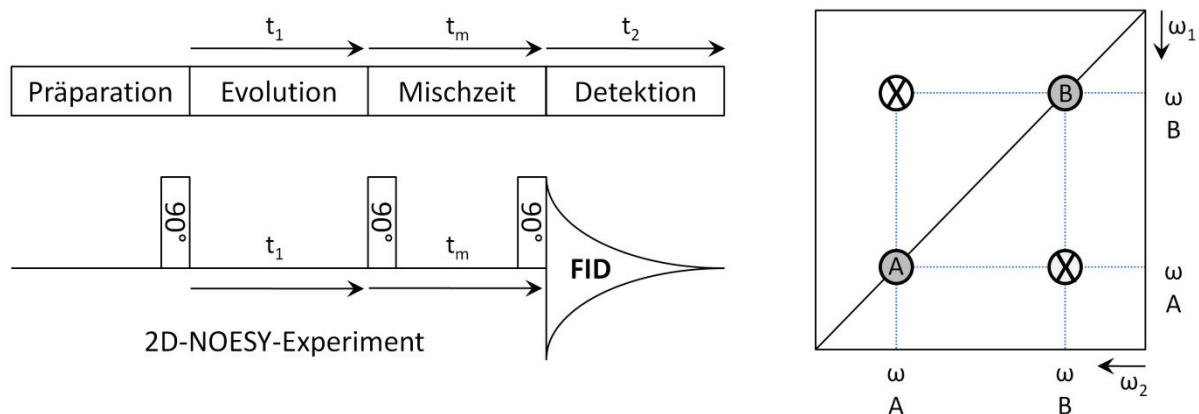


Abbildung 1-7: 2D-Experiment Schemata und schematische Darstellung von Kreuz- und Diagonalsignalen. Links oben: Allgemeine Schemazeichnung eines 2D-NMR Experiments bestehend aus vier Blöcken. Links unten: Schematische Darstellung des 2D-NOESY-Experiments. Insgesamt werden drei 90° Pulse eingestrahlt. Während der Detektionsphase wird der FID aufgezeichnet. Rechts: Schematische Darstellung von Diagonalsignalen und Kreuzsignalen. Wenn zwei Kerne in einem 2D-Experiment korrelieren (A und B), wird am Schnittpunkt ihrer horizontalen und vertikalen Frequenzachsen ein Kreuzsignal (X) detektiert (verändert nach Wüthrich 1986).

Hierdurch ergibt sich ein weiterer FID in Richtung der zunehmenden Evolutionszeit. Durch eine weitere Fourier-Transformation in dieser Richtung entsteht das endgültige 2D-Spektrum [105].

Die für die homonukleare Strukturaufklärung wesentlichen Experimente sind das TOCSY- (vollständige Korrelationspektroskopie, *total correlation spectroscopy*) und das NOESY-

(Spektroskopie mit Kern-Overhauser-Effekt und Austausch, *nuclear overhauser and exchange spectroscopy*) Experiment. Im homonuklearen zweidimensionalen TOCSY-Experiment werden ^1H Kerne über skalare Kopplungen korreliert. Die beiden Frequenzachsen eines homonuklearen TOCSY-Spektrums geben die chemische Verschiebung der gleichen Kernsorte an, die der ^1H Kerne. Findet zwischen zwei Kernen ein Magnetisierungstransfer statt, so resultiert daraus ein Kreuzsignal. In beiden Dimensionen kommt es zu unterschiedlichen chemischen Verschiebungen. Wird keine Magnetisierung zwischen zwei Kernen übertragen, entsprechen sich die chemischen Verschiebungen auf der x- und y-Achse und es ergibt sich ein Signal auf der durch das Spektrum laufenden Diagonalen (Abbildung 1-7) [105]. Das TOCSY-Spektrum ermöglicht im Idealfall die Identifizierung einer gegebenen Aminosäure, da sich hier die Magnetisierung stufenweise von einem Startproton aufgrund der skalaren Kopplung über das gesamte Spinsystem einer Aminosäure verteilt. So kann eine Korrelation zwischen dem Startproton und der Abfolge aller über bis zu drei Atombindungen jeweils untereinander, somit auch indirekt mit dem Startkern, verbundenen Protonen einer Aminosäure beobachtet werden. Man spricht in diesem Falle von einem Spinsystem. Die gewählte Mischzeit beeinflusst dabei die Anzahl der beobachteten Signale eines Spinsystems. Eine Verbindung zwischen zwei benachbarten Aminosäuren kann nicht detektiert werden, da ein Magnetisierungstransfer über die Peptidbindung nicht auftreten kann. Da jedoch die Spinsysteme der Aminosäuren nicht alle über ein einmaliges Signalmuster verfügen, können anhand des TOCSY-Spektrums nur die Aminosäuren mit einem eindeutigen Muster, und auch nur dann, wenn sie im Peptid nicht mehrfach vorhanden sind, eindeutig einer Sequenzposition zugeordnet werden [104]. Im NOESY-Experiment (Abbildung 1-7) beruht der Magnetisierungstransfer auf dem Kern-Overhauser-Effekt (NOE, *nuclear overhauser effect*). Hierbei wird die Magnetisierung durch den Raum aufgrund der dipolaren Wechselwirkung der Kernspins übertragen. Man spricht von dipolarer Kopplung. Dipolare Kopplungen können beobachtet werden, wenn die koppelnden Kerne räumlich nicht weiter als 5 Å auseinander liegen sind, da die Intensität der dipolaren Kopplung näherungsweise umgekehrt proportional zur sechsten Potenz der zwischen den Kernen liegenden Distanz ist.

Die homonukleare 2D-NMR-Spektroskopie eignet sich nur bedingt für die Strukturaufklärung von Peptiden mit einer Masse von mehr als 10 kDa, insbesondere da die Anzahl an detektierbaren Signalen so groß wird, dass in einem 2D-Spektrum mit einer Vielzahl von Überlagerungen zu rechnen ist. Diese Problematik kann durch den Einsatz höher dimensionaler, sowie heteronuklearer NMR-Experimente kompensiert werden. Bei den zusätzlichen magnetischen Kernen der heteronuklearen Experimente handelt es sich in der Regel um die Kernsorten ^{13}C und ^{15}N . Man spricht in diesem Zusammenhang von Heterokernen. Heteronukleare Experimente können sowohl zweidimensional als auch höher dimensional angelegt sein [105].

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Es wurde beobachtet, dass p28 die Bindung des löslichen IL-6/IL-6-Rezeptor Komplexes an gp130 kompetitiv blocken kann [37]. Da die Tertiärstruktur von p28 nicht aufgeklärt ist, ergab sich die Frage, ob sich die Grundlage dieser kompetitiven Hemmung modellhaft erklären ließe. Ein Ziel war deswegen, *in silico* ein Modell der Tertiärstruktur von p28 und der Bindung von p28 an gp130 zu erstellen. Parallel dazu sollte ein Expressions- und Reinigungsprotokoll für p28 etabliert werden, um die Voraussetzung zur NMR-spektroskopischen Aufklärung der Tertiärstruktur zu schaffen.

Die experimentellen Daten zur antimikrobiellen und immunregulatorischen Aktivität der HBD2/3 Chimären deuten einen Einfluss der Tertiärstruktur an [104]. Obwohl die Chimäre 3 aus Segmenten der Ursprungsmoleküle HBD2 und HBD3 aufgebaut ist, lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Tertiärstrukturen der Peptide nicht ausschließen. Im zweiten Teil der Arbeit sollte deswegen die Tertiärstruktur der Chimäre 3 in Lösung aufgeklärt werden. Dies ermöglichte den Vergleich der Tertiärstrukturen und der Oberflächenladungsverteilung von Chimäre 3 und den Ursprungsmolekülen HBD2 und HBD3.

2 Material und Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die eingesetzten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Fluka Chemie GmbH, Buchs; Campro Scientific GmbH, Berlin. Der Aufbau und Betrieb von Apparaturen sowie der Einsatz von Kits erfolgte entsprechend der Angaben des jeweiligen Herstellers.

2.1 Das Zytokin p28

2.1.1 Erstellung der p28 Modelle

Auf Grundlage der Tertiärstruktur des humanen IL-6 (Protein DataBank Zugangscode 1alu) [6] wurde mittels eines Algorithmus zur Erkennung des Faltungsmusters aus dem ProHit Programmpaket (ProCeryon Biosciences GmbH, Salzburg, Österreich) ein strukturbasiertes *alignment* des humanen IL-6, humanen p28 und murinen p28 erstellt. Basierend auf diesem *alignment* wurde das Tertiärstrukturmodell des humanen p28 generiert. Dafür wurden die Aminosäurereste der Matrize (IL-6) gegen die Aminosäurereste von p28 ausgetauscht. Insertionen und Deletionen in der Primärstruktur von p28 wurden mittels eines Datenbank-Suchverfahrens der WHATIF Software [110] modelliert. Die Darstellungen der Tertiärstrukturen von p28 und IL-6 erfolgte mittels der Software MOLMOL-2K.2 [111]. Die Röntgenkristallstruktur des humanen IL-6/IL-6R α /gp130 Komplex (Protein DataBank Zugangscode 1p9m) [112] diente als Grundlage für das Modell der Interaktion von p28 und gp130. Mittels der Modellierfunktion der Software WHATIF wurden IL-6 und der IL-R α aus dem Tertiärstruktur-Ensemble entfernt und das Tertiärstrukturmodell von humanem p28 eingepasst. Die Grafiken zur Interaktion von p28 und gp130 wurden mit dem Programm Ribbons [113] erstellt.

2.1.2 Das p28 Expressionskonstrukt

Murines p28 im bakteriellen Expressionsvektor pET28a (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) wurde von Agnes Nolting (Arbeitsgruppe Professor Dr. Grötzinger des Biochemischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt. Das rekombinant exprimierte mp28 besteht aus 217 Aminosäureresten und verfügt N-terminal über einen His-Tag, sowie eine Thrombin-Schnittstelle (Abbildung 2-1).

```

MGSSHHHHHH SSSLVPRGSH MGFPTDPLSL QELRREFTVS LYLARKLLSE VQGYVHSFAE 60
SRLPGVNLDL LPLGYHLPNV SLTFQAWHHL SDSERLCFLA TTLRPFPAML GGLGTQGTWT 120
SSEREQLWAM RLDLRDLHRH LRFQVLAAGF KCSKEEEDKE EEEEEEEEEK KLPLGALGGP 180
NQVSSQVSWP QLLYTYQLLH SLELVLSRAV RDLILLS 217

```

Abbildung 2-1: Die Primärstruktur des rekombinanten murinen p28. Rot: His-Tag. Grün: Thrombin-Schnittstelle. Grau: Aminosäurereste des Vektors, Verbindungsstücke. Schwarz: Murines p28.

2.1.3 Transformation des *E. coli* Stammes BL21 (DE3)

Murines p28 im Expressionsvektor pET28a wurde mittels Hitzeschock in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. 50 µl einer chemisch-kompetenten Bakteriensuspension wurden auf Eis aufgetaut, mit 100 ng des Expressionskonstrukts gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte durch eine Inkubation bei 42 °C im Thermomixer Compact (Eppendorf AG, Hamburg), gefolgt von einer Inkubation auf Eis für 1 min. Im Anschluss wurde zu den transformierten Bakterien 1 ml *lysogeny broth*-Medium (LB-Medium) [114, 115] gegeben und die Bakterien im Thermomixer bei 37 °C und 600 upm inkubiert. Nach 1 h wurde die Bakteriensuspension bei 1500 g und 4 °C in einer Eppendorf 5417 Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 120 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine 1,5 % (w/v) Agar-LB-Platte mit 50 µg/ml Kanamycin überführt. Diese Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.4 Rekombinante Expression des murinen p28

Rekombinantes mp28 wurde in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert, sämtliches LB-Medium enthielt 50 µg/ml Kanamycin. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37 °C und 220 upm. Von der Agar-LB-Platte des Transformationsansatzes wurde eine Kolonie in 2 ml LB-Medium überführt, dieser Ansatz für 8 h inkubiert, anschließend in 50 ml LB-Medium überführt und weitere 12 h inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde die Expressionskultur angesetzt. 2 ml der Vorkultur wurden dafür in 250 ml frisches LB-Medium überführt. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch über die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension bestimmt, hierfür wurde die Extinktion bei 600 nm (OD₆₀₀) im UV-Spektrometer U-2001 (Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld) gemessen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, ≥ 99 %, für die Biochemie) induziert und die Kultur für weitere 5 h inkubiert. Nachfolgend wurde die Expressionskultur in der Zentrifuge Sorvall RC-5B RSC (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) bei 2988 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment bei -20 °C gelagert.

2.1.5 Isolierung des rekombinanten murinen p28

Die Sedimente der Expressionskultur wurden aufgetaut und in 50 mM TRIS, 0,1 % Tween 20, pH 8,0 resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels des Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD2200 und der Sonotrode SH213G mit einem TT13-Titanteller (Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin) bei einer Leistung von 30 %, einer Beschallungsdauer von 1 min und einem Pulsintervall von 60 %. Die Probe wurde dabei auf Eis gelagert und dreimal eine Minute mit obigen Einstellungen beschallt, dazwischen lag jeweils eine Kühlpause von einer Minute. Anschließend wurde die Suspension in der Zentrifuge Sorvall RC-5B RSC (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) bei 47808 g und 4 °C für 20 min

zentrifugiert. Die Zellaufschluss- und Sedimentierschritte wurden jeweils dreimal mit 50 mM TRIS, 0,1 % Tween 20, pH 8,0, sowie dreimal mit 50 mM TRIS, pH 8,0 durchgeführt. Nach dem letzten Zentrifugieren wurden die isolierten Einschlusskörper bei -20 °C gelagert.

2.1.6 Renaturierung des rekombinanten murinen p28

Die gewaschenen mp28 Einschlusskörper wurden in 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM TRIS, pH 8,0 über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rollmixer gelöst. Anschließend wurde die Suspension in der Zentrifuge Sorvall RC-5B RSC (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) bei 47808 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, das unlösliche Sediment verworfen und der Überstand mittels Dialyse renaturiert. Hierfür wurde die Proteinkonzentration der Ausgangslösung mit 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM TRIS, pH 8,0 auf 0,1 mg/ml eingestellt und danach in einen Dialyseschlauch (ZelluTrans) mit einem Ausschlussvolumen von 4000 bis 6000 Da überführt. Die Dialyse erfolgte gegen das Fünffache des Probenvolumens an 50 mM Essigsäure/Actetat, 300 mM NaCl, pH 4,0 für 12 h. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Im Anschluss wurde die dialysierte Probe bei 47808 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, das Sediment verworfen, der Überstand mittels eines Spritzenvorsatzfilters mit 0,20 µm Porengröße (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) gefiltert. Das Filtrat wurde mit einer Amicon® Filterzelle (Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.), versehen mit einer regenerierten Zellulosemembran, Ausschlussvolumen 10000 Da (Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.), eingeeengt. Zur Gewinnung des monomeren Proteins erfolgte eine Größenausschlusschromatographie.

2.1.7 Größenausschlusschromatographie

Die konzentrierte Proteinlösung wurde mittels einer HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Größenausschluss säule (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) und einem Äkta-Explorer Chromatographiesystem (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) aufgetrennt. Der Laufpuffer entsprach dem Probenpuffer (50 mM Essigsäure/Actetat, 300 mM NaCl, pH 4,0). Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min und 4 °C. Das Elutionsprofil wurde bei 280 nm aufgezeichnet, das Eluat in 1 ml Fraktionen gesammelt. Eine Größenabschätzung konnte mittels der Größenstandards des Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) vorgenommen werden. Die mp28 Fraktionen wurden entsprechend des Elutionsprofils gesammelt. Die Einengung des Probenvolumens erfolgte mittels Vivaspin 20 PES Konzentratoren mit einem Ausschlussvolumen von 10000 Da (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen), bei 4000 g und 4 °C in einer Sigma 4-16K Zentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode).

2.1.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mit einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, mittels Sammel- und Trenngel, nach Laemmli [116] aufgetrennt. Die Tabelle 2-1 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Gele. Für die Elektrophorese wurde das Mini-Protean® 3 Elektrophorese Set der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München) eingesetzt. Die Proteinproben wurden 1:1 mit zweifach konzentriertem Laemmli-Puffer gemischt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben in die Lauftaschen des Sammelgels eingebracht, der Puffertank der Gelkammer mit 350 ml SDS-Laufpuffer gefüllt. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Spannung von 200 V. Als Molekulargewichtsstandard wurden die Proteinstandards #SM0431 Unstained Protein Marker und #SM0441 Prestained Protein Marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) eingesetzt.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der diskontinuierlichen Gelelektrophorese

	Sammelgel (7,5 %)	Trenngel (15 %)
30 % Acrylamid : 0,8 % Bisacrylamid (37,5 : 1)	1,25 ml	6 ml
0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8	1,25 ml	-
1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8	-	3 ml
ddH ₂ O	2,45 ml	2,75 ml
10 % (w/v) SDS	50 µl	120 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	120 µl
TEMED	5 µl	6 µl

2.1.9 Coomassie-Färbung

Nach der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteinbanden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Hierfür wurden die Gele für 30 min bei Raumtemperatur in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Gele in eine Entfärbelösung überführt und bei Raumtemperatur bis zum gewünschten Grad der Entfärbung geschwenkt.

2.1.10 Western Blot und Immundetektion

Die Proteine wurden nach der diskontinuierlichen Gelelektrophorese mittels einer Transblot® SD Apparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH) im *semi dry* Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Transfermembran (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) übertragen. Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch 3 min mit Methanol aktiviert, danach für 3 min mit ddH₂O gespült. Nachfolgend

wurden sowohl die Membran als auch Whatman®-Papier Zuschnitte in Transferpuffer eingeweicht. Der Aufbau der Blot-Apparatur geschah nach den Angaben des Herstellers, der Proteintransfer erfolgte bei einer Spannung von 20 V, angelegt für 60 bis 90 min. Nach dem erfolgten Transfer wurde die Membran mit 6 % (w/v) Milchpulver, gelöst in TBS, blockiert. Die geblockte Membran wurde mit dem jeweiligen primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Membran jeweils dreimal mit TBS-T und TBS gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit den Lösungen des ECL Plus® Kits (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) inkubiert und die resultierende Chemolumineszenz mit dem CCD Kamera System FluorChemQ® (AlphaInnotech Corp., CA, USA) aufgezeichnet.

2.1.11 Test auf biologische Aktivität

Murines p28 wurde von Dr. Christoph Garbers aus der Arbeitsgruppe Professor Dr. Stefan Rose-John/ Professor Dr. Jürgen Scheller des Biochemischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf biologische Aktivität getestet. Hierfür wurden Vitalitätsversuche an murinen IL-3 abhängigen Ba/F3-Zellen (Immunex Corp., WA, USA), durchgeführt. Die Zellen wurden stabil mit der komplementären DNA, kodierend für humanes gp130 und murinen IL-6R α , intrazellulär gekoppelt an GFP, transfiziert. Für das Vitalitätsexperiment wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in DMEM-Medium (PAA Laboratories GmbH, Cölbe), ergänzt mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum sowie 60 μ g/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin, zu jeweils 5000 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte resuspendiert. In einem finalen Volumen von 100 μ l wurden die Zellen für zwei Tage mit verschiedenen Zytokinkonzentrationen bei 37 °C mit 5 % CO₂ in einem Inkubator mit Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Ansätze ohne Zytokin dienten als Negativkontrolle. Mittels des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kits (Promega GmbH, Mannheim) wurde die Proliferation entsprechend der Angaben des Herstellers bestimmt. Das Auslesen des Tests geschah mittels eines Lambda Fluoro 320 Fluorimeters (BioTek Inc., VT, USA) und der Datenaufnahme- und Analysesoftware KC4 (BioTek Inc., VT, USA) bei einer Extinktion von 560 nm und einer Emission von 590 nm. Für die Berechnung der normalisierten Fluoreszenzintensität wurde von der relativen Fluoreszenzintensität der Probe nach 60 min der jeweilige Nullwert, die relative Fluoreszenzintensität zum Startzeitpunkt des Experiments, abgezogen. Alle Werte wurden als Triplets gemessen.

2.2 Chimäre 3

2.2.1 Renaturierung von Chimäre 3

Synthetisches Chimäre 3 Peptid wurde von der Biosyntan GmbH (Berlin) bezogen. Das Peptid wurde in 10 mM HCl gelöst, die Konzentration dabei auf 1 mg/ml eingestellt. Zur Renaturierung erfolgte ein 1:40 Verdünnungsschritt des bereits gelösten Peptids mit Renaturierungspuffer, in diesem wurde das Peptid für 24 h bei 37 °C inkubiert. Um das Guanidiniumhydrochlorid und das Glutathion des Renaturierungspuffers im Anschluss aus der Probe zu entfernen, wurde die Peptidlösung in eine Slide-A-Lyzer Dialysekassette (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) mit einem Ausschlussvolumen von 2000 Da überführt und bei 4 °C auf einem RTC Basic Magnetrührer (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen) unter konstantem Rühren gegen 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6,0 dialysiert. Jeweils 20 ml Probe wurden dabei gegen 5 l Dialysepuffer dialysiert, der Puffer insgesamt vier Mal nach jeweils 8 h ausgetauscht. Abschließend wurde die Proteinlösung aus der Dialysekammer entnommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Gradienten RP-HPLC

Die Gradienten RP-HPLC (*reverse phase-high performance liquid chromatography*, Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) wurde mittels einer Grace Vydac 218TP510 Protein und Peptid C₁₈-Säule (W.R. Grace & Co., MD, USA) und einem Jasco 880-PU HPLC-Pumpensystem (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt) durchgeführt. Die Flussrate betrug dabei 2,0 ml/min, die Trennsäule wurde mit 100 % HPLC-Puffer A für 5 min äquilibriert. Jeweils 1 ml des Chimäre 3 Dialyseansatzes wurde mit 4 µl Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt, die Probe für 10 min bei 20000 g und 4 °C in einer Eppendorf 5417 Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert und der Überstand auf die Trennsäule gegeben. Es folgte die Etablierung eines Acetonitrilgradienten auf der Säule. Hierfür wurde innerhalb von 22 min die Konzentration des HPLC-Lösungsmittels A von 100 % auf 0 % gesenkt, während gleichzeitig die Konzentration des HPLC-Lösungsmittels B von 0 % auf 100 % erhöht wurde. Abschließend wurde die Säule mit 100 % HPLC-Lösungsmittel B gespült, um noch bindende hydrophobe Bestandteile zu lösen und die Säule erneut mit 100 % HPLC-Lösungsmittel A äquilibriert. Die Detektion des Elutionsprofils erfolgte mittels eines Jasco 875-UV Detektors (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt) bei 214 nm, die gewünschten Fraktionen wurden gesammelt und bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Gefriertrocknung der Proben

Die mittels RP-HPLC erhaltenen Fraktionen wurden bei -80 °C eingefroren. Die Gefriertrocknung der Proben erfolgte in einer Alpha 2-4 LSC Gefriertrocknungsanlage (Christ GmbH, Osterode), versehen

mit einer RC6 Chemie-Hybrid Pumpe (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim). Die Temperatur der Kühlfalle betrug dabei -85 °C, der Druck 0,025 mbar. Die lyophilisierten Proben wurden luftdicht verschlossen bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Ellman-Reaktion

Die Ellman-Reaktion kann zum Nachweis freier Thiolgruppen in einer Proteinprobe eingesetzt werden [117]. Die Methode beruht auf der Reaktion von DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) mit einer freien Thiolgruppe zum Anion TNB (5-Thio-2-nitrobenzoat). Das Vorhandensein von TNB wurde photometrisch bei 412 bestimmt. Zur Überprüfung der Chimäre 3 Präparation auf freie Thiolgruppen wurden 50 µl DTNB-Lösung, 100 µl 1 M TRIS-HCl, pH 8.0, 840 µl ddH₂O und 10 µl Chimäre 3 Sublimat, gelöst in ddH₂O, gemischt. Als Kontrolle wurden Ansätze mit entsprechenden β-Mercaptoethanol-Konzentrationen vorbereitet. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Absorption wurde bei 412 nm im Zweistrahlphotometer U-2001 (Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan) gegen den Nullwert, (ddH₂O anstelle von Chimäre 3 Lösung im Reaktionsansatz) gemessen.

2.2.5 Massenspektrometrie

Die durchschnittliche Masse von Chimäre 3 wurde mittels der Software ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) berechnet und beträgt für Chimäre 3 mit drei geschlossenen Disulfidbrücken 4967,1 Da. Die zu untersuchende Chimäre 3 Probe wurde direkt der RP-HPLC Fraktion entnommen. Die Lösungsmittelkonzentration betrug ungefähr 40 % Acetonitril in H₂O, sowie 0,1 % Trifluoressigsäure. Die MALDI-TOF- (*matrix-assisted laser-desorption ionization-time of flight*) Massenspektrometrie wurde von Dr. Christoph Gelhaus (Arbeitsgruppe Professor Dr. Matthias Leippe am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) durchgeführt. Hierfür wurden 0,5 µl Probe mit 0,5 µl einer α-Cyano-4-Hydroxymethylsäurematrix auf eine MTP 384 Trägerplatte *ground steel* T F (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) aufgetragen. Die Analyse der Proben geschah mit einem 4700 Proteomics Analyser-Massenspektrometer (Applied Biosystems, MA, USA). Mittels eines Laserpulses im Vakuum wurde die Matrix verdampft, die eingebetteten Moleküle dabei ionisiert. Die ionisierten Moleküle wurden in Abhängigkeit ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Nach der Passage eines Spaltes durchquerten die Moleküle eine feldfreie Flugröhre in unterschiedlicher Zeit. Die Flugzeit der Moleküle wurde detektiert.

2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen erfolgte photometrisch bei 280 nm in einem U-2001 Zweistrahlphotometer (Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan) oder am

Spektrometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Nach dem Gesetz von Lambert-Beer gilt für verdünnte Lösungen, dass der spezifische Extinktionskoeffizient eines Proteins ϵ_{280} , über die Extinktion E_{280} der Proteinlösung, mit der Konzentration c dieser Lösung korreliert.

$$c = \frac{E_{280}}{d \cdot \epsilon_{280}}$$

Die Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} der Proteine wurden mit der Software ProteinCalculator v3.3 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>) nach der Methode von Gill und von Hippel [118] berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} von Chimäre 3 entsprach $0,8847 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, der von mp28 betrug $1,1857 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Schichtdicke d entsprach 1 cm.

2.4 Circulardichroismus-Spektroskopie

Die Circulardichroismus- (CD-) Spektroskopie an Proteinen beruht auf der Messung der unterschiedlichen Absorption links- und rechtszirkular polarisierten Lichts an den Peptidbindungen des Proteinrückgrats. Mittels CD-Spektroskopie wurden die renaturierten Proteine auf die Ausprägung einer Sekundärstruktur und ihre Temperaturstabilität untersucht. Die Messungen erfolgten in Quarzglas-Küvetten unterschiedlicher Schichtdicke (Helma GmbH & Co. KG, Mühlheim), abhängig von der jeweiligen Proteinkonzentration, mittels eines Jasco J-720 CD Spektropolarimeters (Jasco Corp., Tokyo, Japan). Die Spektren wurden bei Raumtemperatur, einer spektralen Bandbreite von 2 nm und, sofern nicht anders erwähnt, in einem Wellenlängenbereich von 184 nm bis 250 nm aufgenommen. Die Elliptizität der jeweiligen Probenpuffer wurde aus den Probenspektren herausgerechnet. Die Spektren wurden, wenn angegeben, mit der Datenaufnahme- und Analysesoftware Spectra Manger (Jasco Corp., Tokyo, Japan) rechnerisch (Methode: binominal) geglättet. Die Untersuchung der Temperaturstabilität erfolgte im Bereich von 20 °C bis 90 °C, die Temperaturänderung betrug 1 °C pro Minute, das Signal bei 230 nm wurde aufgezeichnet. Die Kalibration des CD-Spektropolarimeters erfolgte nach der Methode von Chen und Yang [119]. Die gemessene Elliptizität (θ_λ in mgrad) wurde auf die mittlere molare Masse aller im Protein enthaltenen Aminosäurereste (MRW, *mean residue weight*, in g/mol), auf die Schichtdicke der Küvette (d in dm) und die Konzentration der Probe (c in g/cm^3) bezogen.

$$\theta_\lambda^{\text{MRW}} = \frac{\text{MRW} \times \theta_\lambda}{100 \times d \times c}$$

Die mittlere Molekülmasse aller Aminosäurereste von Chimäre 3 betrug $110,38 \text{ g/mol}$, die mittlere Molekülmasse aller Aminosäurereste von mp28 entsprach $113,78 \text{ g/mol}$.

2.5 NMR-Spektroskopie

2.5.1 Probenvorbereitung

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurde lyophilisiertes Chimäre 3 Peptid in 320 μ l NMR-Probenpuffer aufgenommen, die Konzentration an Peptid betrug 0,53 mM. Die Probe wurde mit einer Ultrafree-MC Filtereinheit (Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.) bei 12000 g und Raumtemperatur in einer Eppendorf 5417 Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Im Anschluss wurde die gefilterte Probe in ein Shigemi-Röhrchen (Shigemi Co. LTD., Tokyo, Japan) überführt.

2.5.2 Durchführung der homonuklearen TOCSY- und NOESY-Experimente

Alle zur Ermittlung der Tertiärstruktur eingesetzten NMR-Spektren (Tabelle 2-2) wurden von Professor Dr. Frank Sönnichsen (Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) aufgezeichnet. Die NMR-Experimente wurden mittels eines Bruker Avance 600 MHz (Bruker Corp., MA, USA) ausgestattet mit einer aktiv abgeschirmten *Z-gradient triple resonance cryoprobe*, durchgeführt.

Tabelle 2-2: Verwendete NMR-Experimente.

Experimentelle Bedingungen			Komplexe Punkte der Datenmatrix		Spektrale Breite (Hz)	
pH-Wert	Temperatur (K)	Mischzeit (ms)	t ₁	t ₂	F ₁	F ₂
2D- ¹ H-TOCSY [120-122] (Peptidkonzentration: 0,53 mM)						
5,7	298	60	4096	512	7211	7211
4,6	308	60	4096	512	7211	7211
4,6	278	60	4096	512	7211	7211
4,6	298	60	2048	256	6009	6009
4,6	298	60	4096	512	7211	7211
4,6	298	85, 120	2048	256	6602	6602
2D- ¹ H-NOESY [122-124] (Peptidkonzentration: 0,53 mM)						
5,7	298	100, 200	4096	512	7211	7211
4,6	298	80, 120, 160, 200	4096	512	7211	7211
2D- ¹ H-TOCSY [120-122] (Peptidkonzentration: 0,66 mM)						
4,6	298	60	4096	512	7211	7211
2D- ¹ H-NOESY [122-124] (Peptidkonzentration: 0,66 mM)						
4,6	298	150, 200	4096	512	7211	7211

Die Tabelle 2-2 listet neben den durchgeführten NMR-Experimenten die gewählten experimentellen Bedingungen auf. Zusätzlich sind die komplexen Datenpunkte und die spektrale Bandbreite der aufgenommenen Spektren erfasst. Als Referenz für die chemischen Verschiebungen der Protonen diente das interne Wassersignal. Die Spektren wurden mit dem NMRPipe [125] Programmpaket prozessiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Software NMRView [126].

2.5.3 Das H-D-Austausch-Experiment

Das H-D Austausch-Experiment ermöglicht die Identifizierung von Wasserstoffbrückendonatoren in Proteinen. Das Experiment basiert auf dem Austausch von Protonen zwischen dem Molekül und dem Lösungsmittel, sowie auf der Tatsache, dass das Wasserstoff Isotop ^2H , im Gegensatz zum Isotop ^1H , NMR-spektroskopisch nicht detektiert wird. Zur Herstellung des D_2O -NMR-Probenpuffers wurden 5 ml NMR-Puffer (20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 5,8, mit DCl auf pH 4,6 eingestellt) lyophilisiert. Das Sublimat wurde im Anschluss in 5 ml 99,98 % D_2O aufgenommen und erneut lyophilisiert, um möglichst alle Protonen des Puffers gegen Deuteronen auszutauschen. Das finale Sublimat wurde ebenfalls in 99,98 % D_2O gelöst, der pH-Wert überprüft und der so erhaltene deuterierte Phosphatpuffer zum Lösen von Chimäre 3 Sublimat eingesetzt. Die Konzentration der Chimäre 3 Probe im deuterierten Puffer betrug 0,66 mM. Hiervon wurden 300 μl in ein Shigemi-Röhrchen (Shigemi Co. LTD., Tokyo, Japan) überführt. Die D_2O -NMR-Spektren wurden von Professor Dr. Frank Sönnichsen (Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) aufgenommen (Tabelle 2-2). Durch den Vergleich von D_2O - und H_2O -Spektren von Chimäre 3 ließen sich die an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligten Amidprotonen bestimmen.

2.5.4 Die sequenzspezifische Zuordnung

Ziel der von Kurt Wüthrich entwickelten sequenzspezifischen Zuordnung [104] ist es, jedem im Spektrum detektierten Signal ein Proton des Proteins zuzuordnen. Vorausgesetzt wird dabei, dass die Aminosäuresequenz des untersuchten Proteins bekannt ist. Die sequenzspezifische Zuordnung basiert im Wesentlichen darauf, dass der Abstand des Amidprotons H^{N} einer gegebenen Aminosäure i fast immer kleiner als 5 Å zu den H^{α} , H^{β} und H^{γ} Protonen der Vorläuferaminosäure $i-1$ ist [104]. Im Idealfall werden die Aminosäuren im TOCSY-Spektrum aufgrund ihres charakteristischen Spinsystems identifiziert. Durch einen Abgleich von TOCSY- und NOESY-Spektrum können die intraresidualen Signale des NOESY-Spektrums ermittelt werden. Aus den interresidualen Signalen des NOESY-Spektrums ist es möglich die Verknüpfung benachbarter Aminosäuren abzuleiten. So sollten jeweils auf der Resonanzfrequenz eines Amidprotons $\text{H}^{\text{N}}(i)$ interresiduale Kreuzsignale aus der Seitenkette der benachbarten Aminosäure ($i-1$) beobachtet werden. Nach diesem Prinzip wurden für Chimäre 3 Ketten von benachbarten Aminosäuren gebildet. Dafür wurden von jeder im TOCSY-Spektrum

identifizierten Aminosäure im NOESY-Spektrum die benachbarten Aminosäuren ermittelt. Sich ergebende Dipeptide wurden in der Folge zu Oligopeptiden erweitert. Die Identifikation von Aminosäuren anhand ihres Spinsystems erfolgte im Wesentlichen mittels des 120 ms TOCSY-Spektrums, gemessen bei pH 4,61 und einer Temperatur von 298 K. Weitere TOCSY-Spektren wurden zur Verifizierung der Spinsysteme oder einzelner Protonen herangezogen. Die Identifizierung benachbarter Aminosäuren geschah mittels des 120 ms NOESY-Spektrums, gemessen bei pH 4,61 und einer Temperatur von 298 K. Resonanzsignale wurden gegebenenfalls anhand weiterer NOESY-Spektren überprüft.

2.5.5 Die Strukturberechnung aus NMR-Daten

Die homonukleare 2D-NMR-Spektroskopie ermöglicht es, sowohl Daten aufgrund chemischer Verschiebungen einzelner Kerne, als auch Informationen zum Abstand zwischen den Kernen zu erhalten. Die zugeordneten Resonanzsignale der NOESY-Spektren wurden mittels des Programms NMRView [126] in Protonenabstände umgerechnet. Die Distanz der Protonen zueinander wurde über die Signalstärke der intraresidualen Kreuzsignale vermittelt. Der kleinste mögliche Abstand entsprach dabei dem van-der-Waals Radius der Protonen von 1,8 Å. Der größte mögliche Abstand betrug 5,0 Å und entsprach der maximalen Distanz, über die sich der Kern-Overhauser Effekt beobachten lässt. Die ermittelten Abstände wurden mittels einer r^6 Funktion kalibriert, dabei wurde die mittlere Intensität aller NOEs einer Distanz von 2,7 Å gleichgesetzt, die Toleranz betrug das 0,125 fache des jeweiligen Abstandes zum Quadrat. Die Intensität der Methylgruppen wurde halbiert. Die Abstandsinformationen wurden zur Berechnung der Struktur in das Programm CYANA 2.1 [127] eingelesen. Für die drei Disulfidbrücken des Peptids wurden 18 zusätzliche Abstände eingefügt, für die jeweilige Brücke galt

$$2,0 \leq d(S_i^\gamma, S_j^\gamma) \leq 2,1 \text{ \AA}; 3,0 \leq d(C_i^\beta, S_j^\gamma) \leq 3,1 \text{ \AA}; 3,0 \leq d(S_i^\gamma, C_j^\beta) \leq 3,1 \text{ \AA}.$$

Zehn weitere Abstände wurden für die identifizierten Wasserstoffbrücken berücksichtigt, der Abstand zwischen Akzeptorsauerstoffatom und Donatorwasserstoffatom betrug 1,8 bis 2,0 Å, der Abstand zwischen dem kovalent an den Donatorwasserstoff gebundenen Stickstoffatom und dem Akzeptorsauerstoffatom 2,7 bis 3,0 Å. In der Folge wurden mit dem Programm CYANA 200 Strukturen berechnet. Redundante und bedeutungslose Abstände wurden nicht berücksichtigt, sowie Abstände zu nicht stereospezifisch zugeordneten Atomen als Abstände zu Pseudoatomen behandelt. Aus den berechneten 200 Strukturen wurden die 20 Strukturen mit der niedrigsten Zielfunktion ausgewählt. Dieses Ensemble war die Grundlage für die Berechnung der mittleren Struktur mit dem Programm WHATIF [110]. Die mittlere Struktur wurde mit dem Programm GROMOS [128] energieminiert. Zur graphischen Darstellung der Struktur wurde das Programm MOLMOL-2K.2 [111] eingesetzt. Die Analyse der Diederwinkelpaare des Proteinrückgrats und die Erstellung des Ramachandran-

Diagramms [129] erfolgte mit dem Programm CYANA 2.1. Die Analyse der Struktur der Chimäre 3 erfolgte mittels des Programms PROCHECK [130]. Die Oberflächendarstellungen wurden mit dem Programm GRASP2 [131] generiert.

2.5.6 Der chemische Verschiebungsindex

Der chemischen Verschiebungsindex (CSI, *chemical shift index*) [132] ist eine Methode zur Vorhersage von Sekundärstrukturelementen in Proteinen. Der CSI basiert auf der Beobachtung, dass die Lage eines Aminosäurerestes in einem Sekundärstrukturelement eine charakteristische chemische Verschiebung des Resonanzsignals ihres H^α -Protons bewirkt. Das Resonanzsignal des H^α -Protons einer Aminosäure ist in einer α -Helix hochfeldverschoben und in einem β -Faltblatt tieffeldverschoben. Das Auftreten der Verschiebungen ist dabei weitestgehend unabhängig von den gewählten Lösungsmittelbedingungen. Eine Liste der chemischen Verschiebungen aller zugeordneten Aminosäuren der Chimäre 3 wurde mit dem Programm NMRView [126] erstellt. Die Resonanzfrequenzen der H^α -Protonen wurden festgehalten, alle weiteren in der Liste enthaltenen Resonanzfrequenzen verworfen. Für die zugeordneten Glycine wurde der Mittelwert aus den beiden H^α -Protonensignalen gebildet. Es folgte ein Abgleich der gemessenen H^α -Protonen-Resonanzfrequenzen von Chimäre 3 mit den mittleren Resonanzfrequenzen der entsprechenden H^α -Protonen von Aminosäureresten in ungeordneten Proteinbereichen. Diese von Wishart *et al.* empirisch ermittelten Frequenzspannen wurden der Originalarbeit entnommen [132]. Die gemessene Frequenz des jeweiligen H^α -Protons kann in dieser Spanne (0), darunter (-1) oder darüber (+1) liegen. Die Auswertung geschah nach folgendem Muster: Eine Gruppe von vier oder mehr -1 Aminosäuren, nicht unterbrochen von +1 Aminosäuren, entspricht einer α -Helix. Eine Gruppe von mindestens drei +1 Aminosäuren, nicht unterbrochen von einer -1 Aminosäure, definiert einen β -Strang. Alle weiteren Kombinationen von 0, -1 und +1 stehen für ungeordnete Proteinbereiche. Die lokale Dichte an nicht-0 Aminosäuren musste dabei 70 % übersteigen um eine α - oder β -Region zu definieren, betrachtet über jeweils vier bis fünf Aminosäuren. Ein Minimum von drei +1 definiert einen β -Strang, ein Minimum von vier, nicht notwendigerweise aufeinander folgenden, -1 eine α -Helix. Die beidseitigen Endpunkte eines Strukturelements werden durch das erstmalige Auftreten einer Aminosäure mit gegenteiligen Wert oder zwei aufeinanderfolgenden 0-Aminosäuren angezeigt. Der Abgleich der detektierten Resonanzfrequenzen mit einer Frequenzspanne, anstelle eines absoluten Wertes, soll Schwankungen in den Verschiebungen aufgrund unterschiedlich gewählter Messbedingungen (Temperatur, pH und Kalibrationsvariationen) ausgleichen [132].

2.6 Puffer und Lösungen

Antikörper-Puffer	1 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
Blockier-Puffer	6 % (w/v) Milchpulver in TBS
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, in ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	25 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau G250, in ddH ₂ O
DTNB-Lösung	50 mM Natriumacetat x 3 H ₂ O, 2 mM DNTB, in ddH ₂ O
LB-Medium	25 <i>lysogeny broth</i> -Medium Kapseln (MP-Biomedicals, LLC, Illkirch, Frankreich) ad 1000 ml ddH ₂ O, autoklaviert
HPLC-Lösungsmittel A	2 % (v/v) Acetonitril/H ₂ O, 0,1 % Trifluoressigsäure
HPLC-Lösungsmittel B	95 % (v/v) Acetonitril/H ₂ O, 0,1 % Trifluoressigsäure
2x Laemmli-Puffer, reduzierend	2 ml Glycerin, 4 ml 10 % (w/v) SDS, 2,5 ml 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8, 2,5 ml β -Mercaptoethanol, 0,5 ml ddH ₂ O, 0,002 mg Bromphenolblau, in ddH ₂ O
NMR-Probenpuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 7 % (v/v) D ₂ O, in ddH ₂ O, pH 5,8 (mit DCl auf pH 4,6 eingestellt)
D ₂ O-NMR-Probenpuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 7 % (v/v) D ₂ O, in ddH ₂ O pH 5,8 (mit DCl auf pH 4,6 eingestellt) – sublimiert und in 99,98 % D ₂ O aufgenommen
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,6
Renaturierungspuffer Chimäre 3	1 M Guanidiniumchlorid, 50 mM TRIS-HCl, 4 mM reduziertes Glutathion, 0,4 mM oxidiertes Glutathion, in ddH ₂ O, auf pH 8,5 eingestellt mit 5 M NaOH
SDS-Gel-Laufpuffer	3,03 g TRIS, 14,4 g Glycin, 1 g SDS, pH 8,3, ad 1000 ml ddH ₂ O
TBS(-T)	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, (0,1 % (v/v) Tween 20), in ddH ₂ O, pH 7,5
Transferpuffer	3,03 g TRIS, 14,4 g Glycin, 20 % (v/v) Methanol, ad 1000 ml ddH ₂ O

2.7 Verwendete Antikörper

- His-Tag-spezifischer, Spezies-unspezifischer monoklonaler IgG1 aus der Maus (Cell Signaling Technology Inc., MA, USA), als primären Antikörper im Western Blot 1:2000 verdünnt eingesetzt.
- Murines IL-27 p28-spezifischer biotinylierter IgG aus der Ziege (R&D Systems Inc., MN, USA), als primären Antikörper im Western Blot 1:500 verdünnt eingesetzt.
- ImmunoPure® Peroxidase konjugierter Ziege-spezifischer IgG aus dem Hasen (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA), als sekundären Antikörper im Western Blot 1:2000 verdünnt eingesetzt.
- ImmunoPure® Peroxidase konjugierter Maus-spezifischer IgG aus der Ziege (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA), als sekundären Antikörper im Western Blot 1:2000 verdünnt eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Das Zytokin p28

Das vier-Helix-Bündel Zytokin p28 wurde ursprünglich als Zytokinuntereinheit des heterodimeren IL-27 beschrieben [30]. Aktuelle Publikationen diskutieren eine biologische Funktion des monomeren p28 [36, 37, 44, 45]. In der vorliegenden Arbeit wird ein Modell der Tertiärstruktur von p28 erstellt, um die Bindung von p28 an gp130 [37] zu untersuchen. Des Weiteren wird ein Reinigungs- und Renaturierungsprotokoll für rekombinant in *Escherichia coli* exprimiertes p28 etabliert.

3.1.1 Das Modell der Tertiärstruktur von humanen p28

Basierend auf der bekannten Tertiärstruktur des humanen Interleukin-6 (IL-6), konnte mittels eines Algorithmus zur Erkennung der Proteinfaltung (ProHit Software-Paket, ProCeryon Biosciences) ein Sequenz-*alignment* der Primärstrukturen des humanen IL-6, humanen p28 und murinen p28 erstellt werden (Abbildung 3-1).

```

IL6 human      001----- ---MAPVPPG EDSKDVAAP- --HRQP---- ---LTSSERI027
P28 murin      001MGQVTGDLGW RLSLLLLPLL LVQAGSWG- --PTDP-LSL QELRREFTVS046
P28 human      001MGQTAGDLGW RLSLLLLPLL LVQAGVWGFP RPPGRPQLSL QELRREFTVS050

IL6 human      028DKQIRYILDG ISALRKETCN KSNMCESSKE ALAENNLNLP KMAEKDGCFO077
P28 murin      047LYLARKLLSE VQGYVHSFAE SRLPGVNLD- -LLPLGYHLP NVSLTFQAWH094
P28 human      051LHLARKLLSE VRGQAHFAE SHLPGVNLY- -LLPLGEQLP DVSLTFQAWR098

IL6 human      078SGFNEETCLV KIITGLLEFE VYLEYLQNR- ESSEEQARAV QMSTKVLIQF127
P28 murin      095HL-SDSERLC FLATTLRPF- AMLGGLGTQG TWTSSEREQL WAMRLDLRDL143
P28 human      099RL-SDPERLC FISTTLQPFH ALLGGLGTQG RWTNMQMQL WAMRLDLRDL147

IL6 human      128LQKK-AKNLD AITTP----- DPTTNASLLT KLQAQN-----157
P28 murin      146HRHLRFQVLA AGFKCSKEEE DKEEEEEEEE EEKKLPLGAL GGPNQVSSQV194
P28 human      148QRHLRFQVLA AGF--NLPEE EEEEEEEEEEE ERKGLLPGAL GSALQGPAQV195

IL6 human      158QWLQDMTTHL ILRSFKEFLQ SSLRALRQM- -----186
P28 murin      195SWPQLLYTYQ LLHSLELVLS RAVRDLLLLS LPRRPGSAWD S-----234
P28 human      196SWPQLLSTYR LLHSLELVLS RAVRELLLLS -KAGHSVWPL GFPTLSPQP243

```

Abbildung 3-1: Alignment der Primärstrukturen von hIL-6, mp28 und hp28. Das *alignment* basiert auf der bekannten Tertiärstruktur von humanem IL-6. Die an der Ausbildung der A, B, C und D-Helix beteiligten Bereiche der Primärstruktur sind grau unterlegt.

Das *alignment* des humanen IL-6 und p28 diente als Grundlage für die Erstellung des Modells der Tertiärstruktur des humanen p28. Basierend auf der bekannten Tertiärstruktur von IL-6 wurde das Modell der p28 Tertiärstruktur generiert. Notwendige Sequenzinsertionen und Sequenzdeletionen zur Generierung des p28 Modells wurden mittels eines Datenbank-gestützten Prozesses der Whatif

Software [110] modelliert. Die modellierte Tertiärstruktur des humanen p28 entsprach der eines globulären Proteins und verfügte über die für langkettige vier-Helix-Bündel Zytokine charakteristische Abfolge von vier langen α -Helices. Die Ausrichtung der α -Helices folgte dem Muster auf-auf-ab-ab. Eine kurze α -Helix wurde zudem im CD-Schleifenbereich ausgebildet.

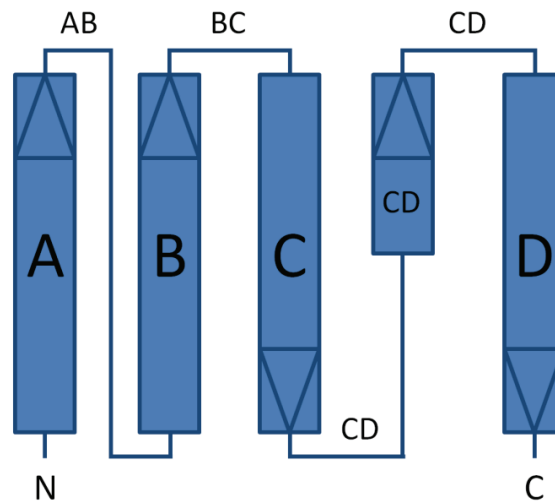


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von p28. Humanes p28 besteht aus einer Abfolge von vier großen α -Helices (A - D). Eine kurze α -Helix wird im CD-Schleifenbereich ausgebildet. Pfeile deuten die Orientierung der Helices an. Schleifenbereiche unterschiedlicher Länge (AB, BC, CD) verbinden die Helices. C und N stehen für C- und N-Terminus.

In der Abbildung 3-2 ist eine schematische Abfolge der Sekundärstrukturelemente von p28 sowie die Bezeichnung der α -Helices und Schleifenbereiche dargestellt.

3.1.2 Vergleich der Tertiärstrukturen von humanem p28 und humanem IL-6

Die Abbildung 3-3 A zeigt die Tertiärstruktur des Strukturmodells von humanem p28. Die durch Einsatz der Röntgenkristallographie ermittelte Tertiärstruktur von humanem IL-6 ist in Abbildung 3-3 B gezeigt. Diese Struktur diente als Matrize für die Erstellung des Modells von p28. Sowohl IL-6 als auch p28 weisen eine globuläre Struktur auf, die durch eine enge Gruppierung von vier langen α -Helices gebildet wird. Im Unterschied zur Tertiärstruktur von IL-6 verfügt das Modell von p28 nicht über ein zusätzliches α -helikales Segment im Bereich der AB-Schleife und die zweite α -Helix (B Helix) ist nicht mittig unterbrochen.

Abbildung 3-3 C zeigt eine Superposition von p28 und IL-6. Die Überlagerung zeigt, dass sich die Anzahl und Ausprägung der Sekundärstrukturelemente beider Moleküle im Wesentlichen entsprechen. Zusätzlich zu den oben genannten Unterschieden wurden geringe Abweichungen in der Ausrichtung der Sekundärstrukturelemente beobachtet.

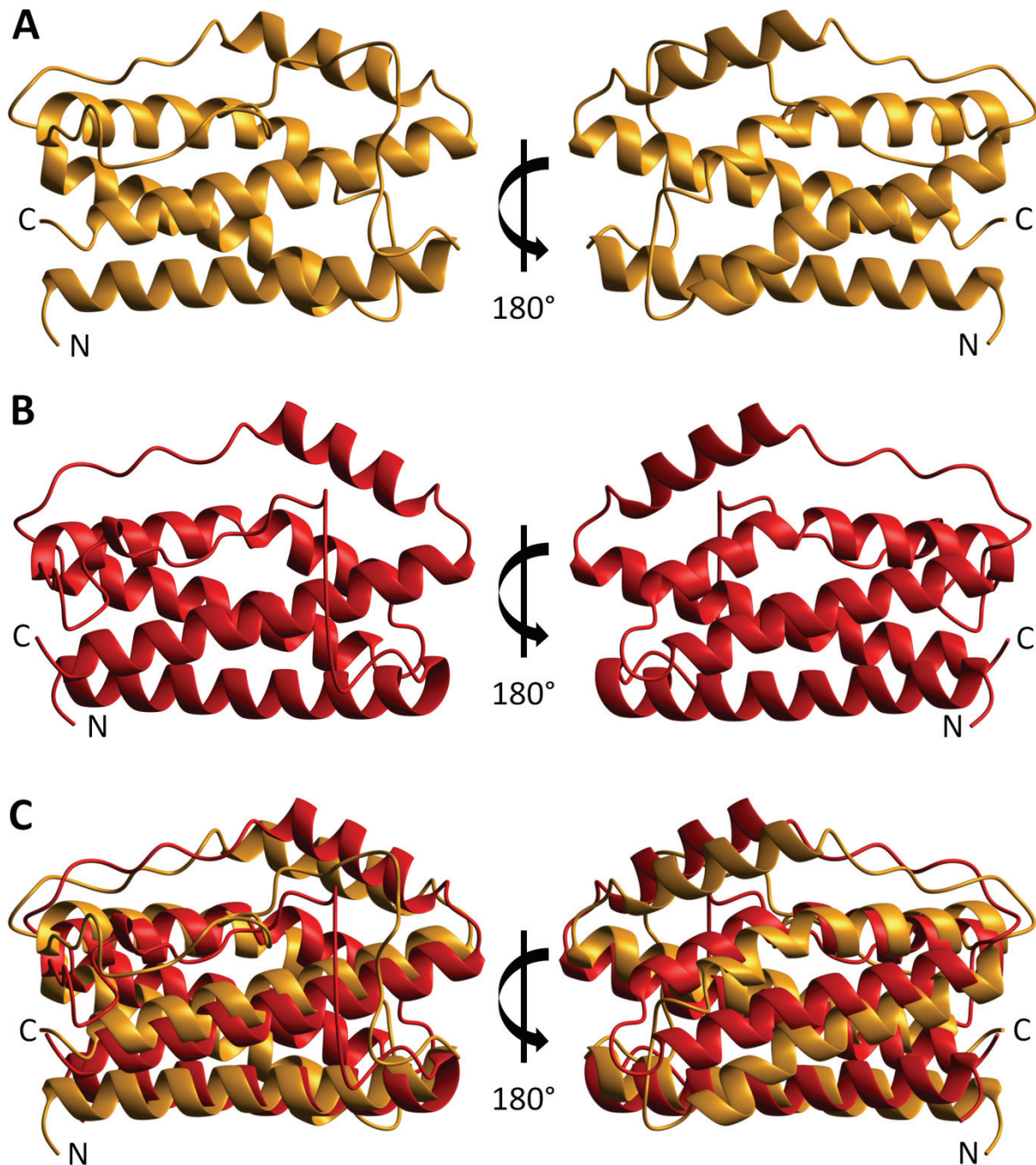


Abbildung 3-3: Band-Darstellung des Modells von humanem p28 und der Röntgenkristallstruktur von humanem IL-6. Die Moleküle sind in derselben Orientierung dargestellt. A) Band-Modell von p28 (orange). B) Band-Modell von IL-6 (rot). C) Überlagerung der Band-Modelle von p28 (orange) und IL-6 (rot). N und C stehen für N- und C-Terminus.

3.1.3 Modell zur Interaktion von p28 und gp130

Basierend auf der Röntgenkristallstruktur des Komplexes von gp130, IL-6 und des löslichen IL-6 α -Rezeptors, sowie dem Modell von p28, konnte ein Modell der Bindung von p28 an gp130 erstellt werden. Laut Modell kann p28, wie auch der IL-6/sIL-6R α -Komplex, an die Ig-ähnliche Domäne von gp130 binden. Das Modell legte nahe, dass eine Bindung von p28 unabhängig von EBI3 an gp130, mit höherer Affinität als der von IL-6 ohne IL-6R α , erfolgen könnte.

Laut Modell beruht die Affinität von p28 zu gp130 auf der Interaktion der Seitenketten der Aminosäurereste Leucin 81 und Glutamat 85 der AB-Schleife von p28 mit dem N-Terminus und der Seitenkette des Aminosäurerestes Leucin 3 von gp130 (Abbildung 3-4). Zwischen dem Leucinrest 81 von p28 und dem Leucinrest 3 von gp130 würde es zu einer hydrophoben Interaktion kommen, die stärker ist als die Interaktion von gp130 mit dem IL-6R α -freien IL-6, das an vergleichbarer Position der Primärstruktur über einen Alaninrest verfügt. Zwischen der negativen Ladung des Glutamatrestes 85 von p28 und der positiven Ladung des N-Terminus von gp130 könnte zudem eine Salzbrücke ausgebildet werden. An entsprechender Position im IL-6 findet sich ein Leucinrest, die Ausbildung einer Salzbrücke ist deswegen nicht möglich.

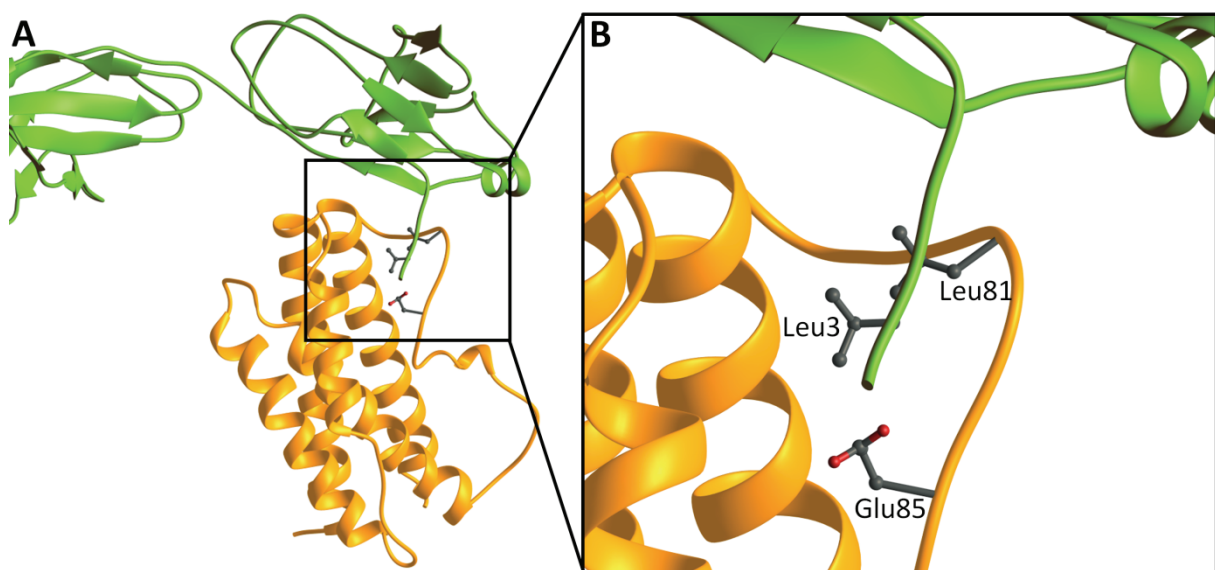


Abbildung 3-4: Modell der Interaktion zwischen gp130 und p28. A) Bindestelle von p28 (orange) und der Immunglobulin-ähnlichen Domäne von gp130 (grün). B) Ausschnittsvergrößerung. Die Affinität des monomeren p28 zu gp130 könnte auf der hydrophoben Interaktion der Seitenketten des Leucinrestes 81 (p28) und des Leucinrestes 3 (gp130), sowie auf der Ausbildung einer Ionenbindung zwischen dem Glutamatrest 85 (p28) und dem N-Terminus von gp130 basieren.

Der oben beschriebene Interaktionsmechanismus beruht auf der Interpretation eines Modells. Es kann deswegen nicht ausgeschlossen werden, dass in der Realität die Affinität von p28 zu gp130 auf einem anderen Mechanismus beruht. Um den Mechanismus der Bindung von p28 und gp130 experimentell zu untersuchen, wird die Ermittlung der Tertiärstruktur von p28 angestrebt.

3.1.4 Expression und Isolierung von p28

Sowohl murines als auch humanes p28 konnte rekombinant in Bakterien exprimiert werden. Da die Renaturierung des murinen p28 im Gegensatz zum humanem p28 erfolgreich war, behandeln die folgenden Abschnitte die Aufarbeitung von murinem p28 (mp28).

Die Expression des murinen p28 erfolgte in dem *Escherichia coli* Stamm BL21 DE3. Die Abbildung 3-5 A zeigt das Ergebnis der gelelektrophoretische Auftrennung von Proben, die der

Expressionskultur zu unterschiedlichen Zeiten entnommen wurden. Bereits eine Stunde nach Induktion lässt sich mp28 (24,7 kDa) als deutliche Proteinbande im Bakterienlysats nachweisen.

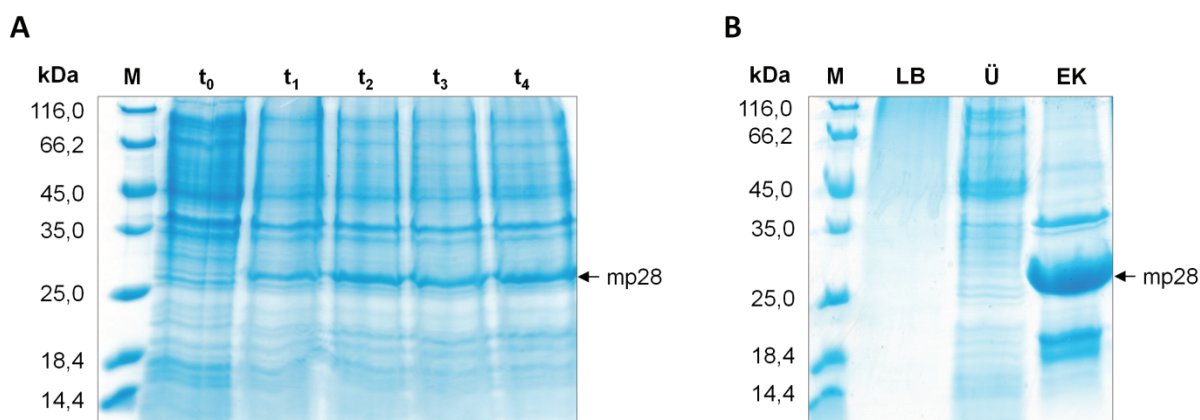


Abbildung 3-5: Murines p28 wird von *E. coli* BL21 DE3 exprimiert und liegt aggregiert in Einschlusskörpern vor. A) Gelelektrophoretische Trennung von Aliquots der Expressionskultur, entnommen vor der Induktion (t₀), sowie eine bis vier Stunden nach Induktion (t₁ bis t₄). Murines p28 lässt sich bereits eine Stunde nach Induktion als deutliche Proteinbande detektieren. B) Murines p28 liegt in Einschlusskörpern vor (EK). Im Kulturüberstand (LB) und in der löslichen Fraktion des Bakterienlysats (Ü) wurde kein mp28 detektiert. M steht für Protein-Molekulargewichtstandard. Die berechnete Masse des p28 Konstrukts beträgt 24,7 kDa.

Während der ersten vier Stunden nach der Induktion nahm die Kulturdichte kontinuierlich zu, danach war die Plateauphase der Wachstumskurve erreicht (Daten nicht gezeigt). Während der vier Stunden blieb die Expression des mp28 unverändert hoch. Da die Zelldichte der elektrophoretisch analysierten Proben angeglichen wurde, lässt sich die Ertragssteigerung im SDS-Gel nicht beobachten. Die Proteinmenge erscheint zu den entnommenen Zeitpunkten jeweils unverändert hoch. Eine Verlängerung der Expression über vier Stunden hinaus führte zu keiner Steigerung der Ausbeute. Murines p28 wurde von den Bakterien als ungefaltetes Protein exprimiert und aggregierte in Einschlusskörpern (Abbildung 3-5 B).

3.1.5 Reinigung und Renaturierung von p28

Die Einschlusskörper wurden isoliert, sechs Mal durch Ultraschallbehandlung gereinigt und das Vorhandensein von mp28 in der finalen Fraktion durch eine Western Blot Analyse bestätigt (Abbildung 3-6). Die gereinigten Einschlusskörper wurden unter denaturierenden Bedingungen gelöst, das Protein konnte per Dialyse renaturiert werden.

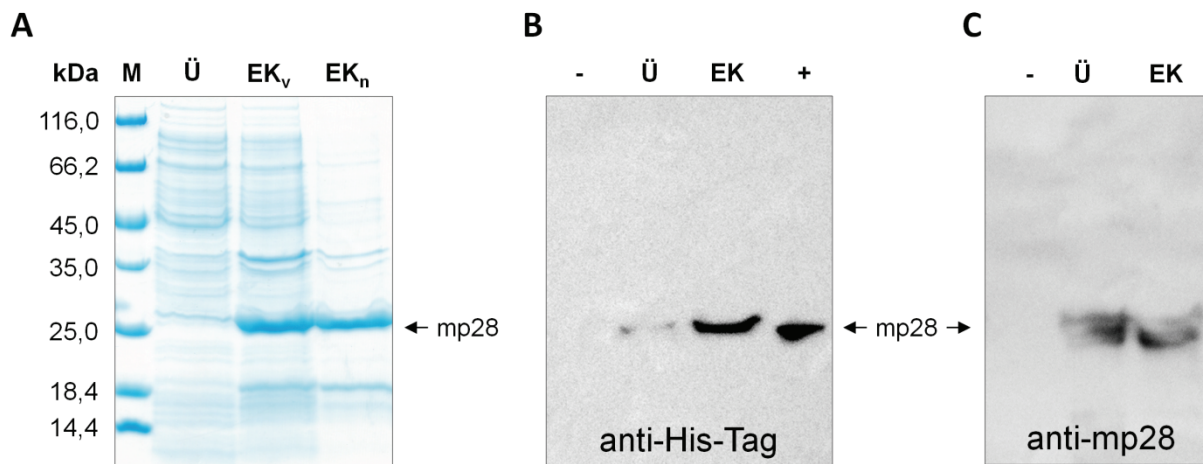


Abbildung 3-6: Gereinigte Einschlusskörper enthalten murines p28. A) Gelelektrophoretische Trennung von Aliquots der Einschlusskörperreinigung. Nur minimale Mengen des zu reinigenden mp28 finden sich im Überstand (Ü) des ersten Waschschritts. Die Einschlusskörperfraktion enthält im ungewaschenen Zustand (EK_v) große Mengen von unerwünschten Proteinen. Reinheitsgrad der Einschlusskörperfraktion nach erfolgter Reinigung (EK_n). B) Western Blot mit einem anti-His-Tag Antikörper. Signale werden im Überstand des ersten Waschschritts (Ü), in der gereinigten Einschlusskörperfraktion (EK) und in der Positivkontrolle (+, humanes CLC mit His-Tag) detektiert. C) Western Blot mit einem spezifisch gegen mp28 gerichteten Antikörper. Signale werden im Überstand des ersten Waschschritts (Ü) und in der gereinigten Einschlusskörperfraktion (EK) detektiert. M, Marker; +, Positivkontrolle; -, Negativkontrolle.

Um den Oligomerisierungszustand des renaturierten Proteins nach der Dialyse zu bestimmen und gleichzeitig möglicherweise vorhandene Verunreinigungen abzutrennen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die Abbildung 3-7 A zeigt das Elutionsprofil.

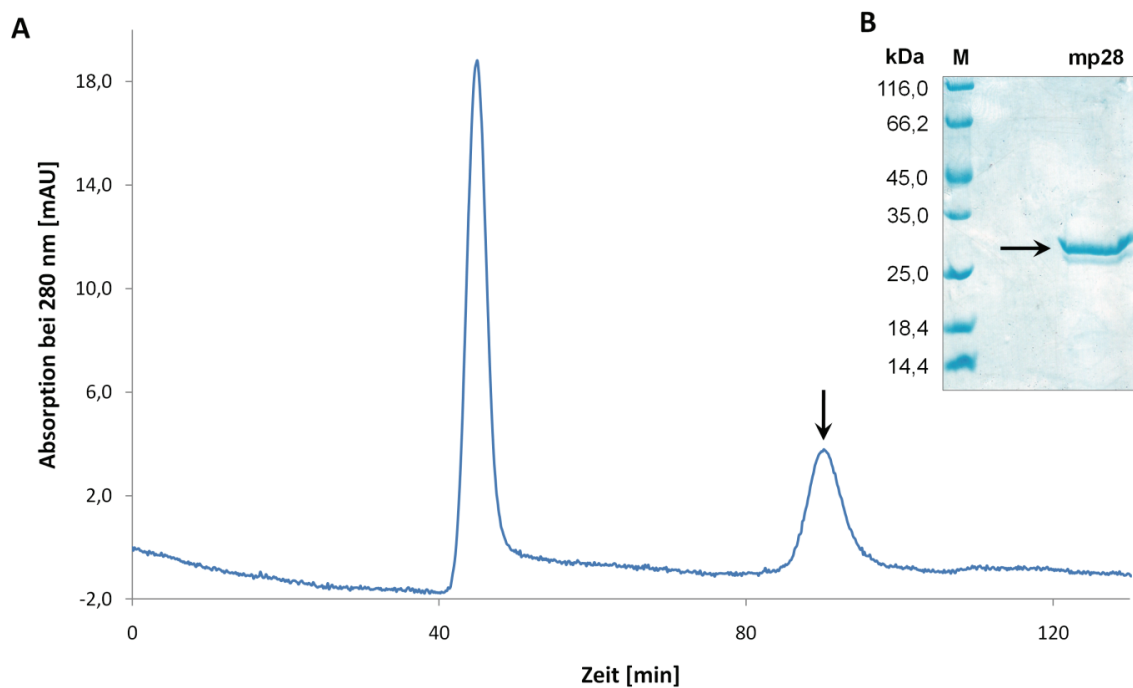


Abbildung 3-7: Fraktionierung des renaturierten mp28 durch Größenausschlusschromatographie. A) Elutionschromatogramm der Größenausschlusschromatographie des renaturierten mp28. Monomeres mp28 eluiert mit einer Retentionszeit von 91 min. B) Konzentrierte mp28 Elutionsfraktion elektrophoretisch aufgetrennt. Murines p28 liegt in zwei Banden vor, die schwächere untere Bande enthält mutmaßlich degradiertes mp28. Schwarze Pfeile weisen auf die mp28 Fraktionen.

Die auf die Säule gebrachten Proteine wurden in Fraktionen aufgetrennt, mit Retentionszeiten von 45 min und 91 min. Da die minimale Durchflusszeit der Säule 45 min beträgt und die Säule bis zu einer Molekülgröße von 600 kDa trennt, enthält der bei einer Retentionszeit von 45 min detektierte Peak Aggregate mit einer Masse von mehr als 600 kDa. Der bei 91 min eluierende Peak enthält das monomere mp28. Das monomere mp28 wurde konzentriert, der Reinheitsgrad anschließend gelelektrophoretisch überprüft (Abbildung 3-7 B). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Probe resultierte in zwei Proteinbanden, die stärkere obere Bande enthielt mp28 mit His-Tag, die schwächere untere Bande deutet auf das Vorhandensein einer His-Tag freien mp28 Variante an. Diese Vermutung wurde durch die Western Blot Analysen der Einschlusskörper-Fraktionen gestützt. Mittels anti-His-Tag Antikörper wurde nur eine Bande, mit einem spezifischen mp28 Antikörper jedoch ebenfalls zwei Banden detektiert (Abbildung 3-6). Dass mp28 in monomerer Form vorlag, konnte anhand dynamischer Lichtstreuung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.6 Analyse der Sekundärstruktur von p28 mittels CD-Spektroskopie

Eine Analyse der Sekundärstruktur des renaturierten murinen p28 erfolgte mittels der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie). Die Abbildung 3-8 zeigt das typische CD-Spektrum des renaturierten mp28. Der Kurvenverlauf entspricht dem eines rein α -helikalen Proteins. Charakteristisch hierfür sind die beiden Minima bei 220 und 208 nm, gefolgt von einem steilen Anstieg bei 205 nm.

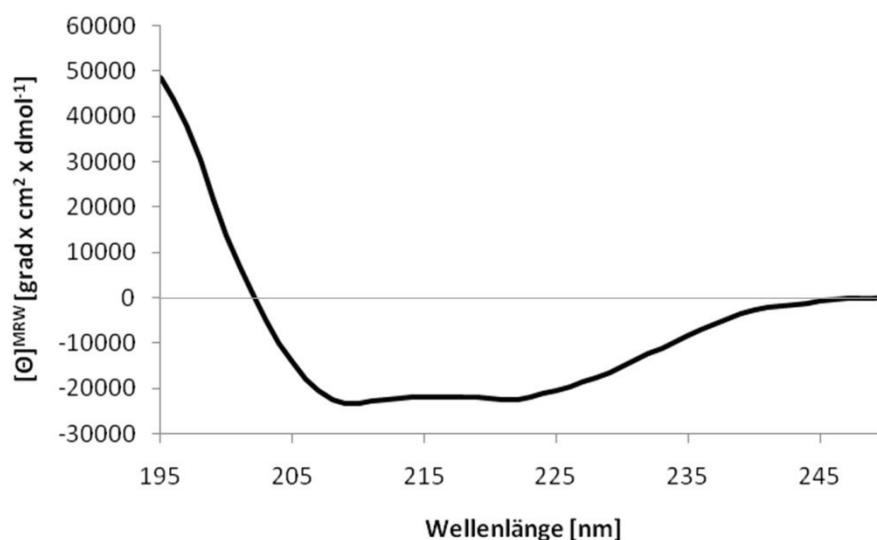


Abbildung 3-8: CD-Spektrum des renaturierten mp28. Das Spektrum zeigt die gemittelte Kurve aus vier aufeinander folgenden Messungen in 25 mM Essigsäure-Acetat, 125 mM NaCl, pH 4,0 bei 20 °C. Der Kurvenverlauf entspricht dem eines α -helikalen Proteins.

3.1.7 Die biologische Aktivität von murinem p28

Das gereinigte monomere mp28 wurde von Dr. Christoph Garbers aus der Arbeitsgruppe von Professor Dr. S. Rose-John/Professor Dr. J. Scheller des Biochemischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf biologische Aktivität getestet. Hierfür wurden Proliferationsuntersuchungen mit murinen Ba/F3-Zellen durchgeführt. Die Ba/F3-Zellen waren aufgrund der rekombinanten Expression der Rezeptoren gp130 und IL-6R α , gebunden an GFP, und der endogenen Expression des Rezeptors WSX-1 für murines p28 ansprechbar. Die Abbildung 3-9 zeigt, dass murines p28 die Proliferation der Test-Zelllinie auslösen konnte. Der beobachtete Effekt erwies sich als konzentrationsabhängig: 100 ng/ml Protein entsprach der mittleren Proliferation induzierenden Konzentration. Sowohl die Wirkung des Zytokins als auch die eingesetzten Konzentrationen entsprachen den Literaturangaben [44].

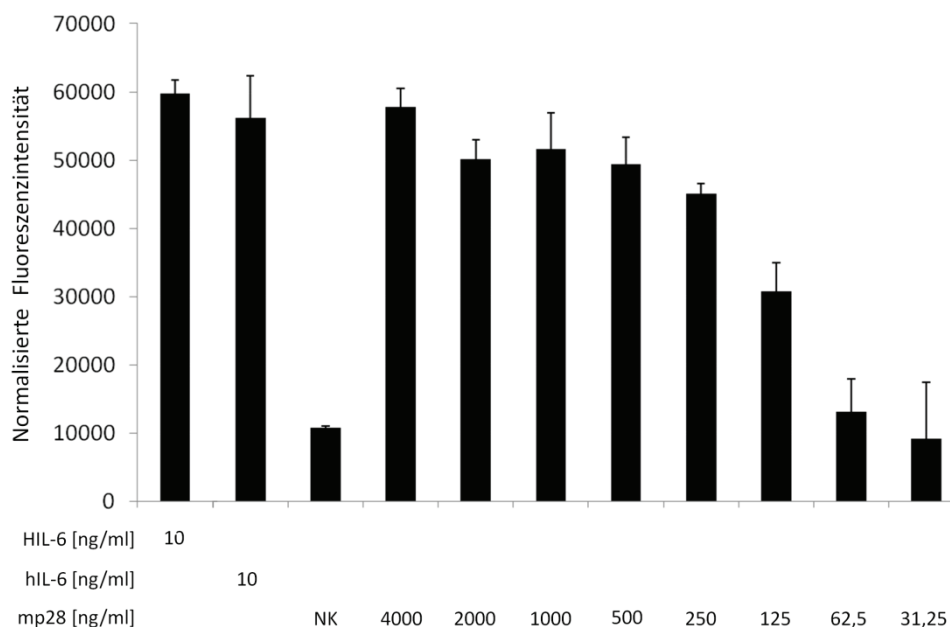


Abbildung 3-9: Proliferationstest mit rekombinantem murinem p28. Murine Ba/F3-gp130-mIL-6R α Zellen wurden mit Hyper-IL-6 (HIL-6), humanem IL-6 (hIL-6) und murinem p28 (mp28) inkubiert, die resultierende Proliferation der Zellen bestimmt und als normalisierte Fluoreszenzintensität angegeben. NK: Negativ-Kontrolle (kein Zytokin). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von in Triplets gemessenen Werten. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zweien (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Christoph Garbers).

3.2 Chimäre 3

Chimäre 3 ist ein Designerpeptid bestehend aus Segmenten der humanen β -Defensine 2 und 3. Die Chimäre 3 verfügt über eine im Vergleich zu den Ursprungspeptiden gesteigerte antimikrobielle Aktivität. In der vorliegenden Arbeit sollte die Tertiärstruktur der Chimäre 3 mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

3.2.1 Renaturierung und Reinigung von Chimäre 3

Lyophilisiertes Chimäre 3 Peptid wurde in 10 mM HCl gelöst und mittels Inkubation in Renaturierungspuffer rückgefaltet. Um eine Kontamination der Affinitätschromatographiesäule mit Guanidiniumchlorid zu vermeiden, wurde vor der Reinigung des Peptids der Renaturierungspuffer durch Dialyse gegen einen geeigneten Laufpuffer getauscht. Die Reinigung und Auftrennung der Peptidlösung erfolgte mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC, *reversed phase-high performance liquid chromatography*). Hierbei wurden verschiedene Fraktionen detektiert (Abbildung 3-10).

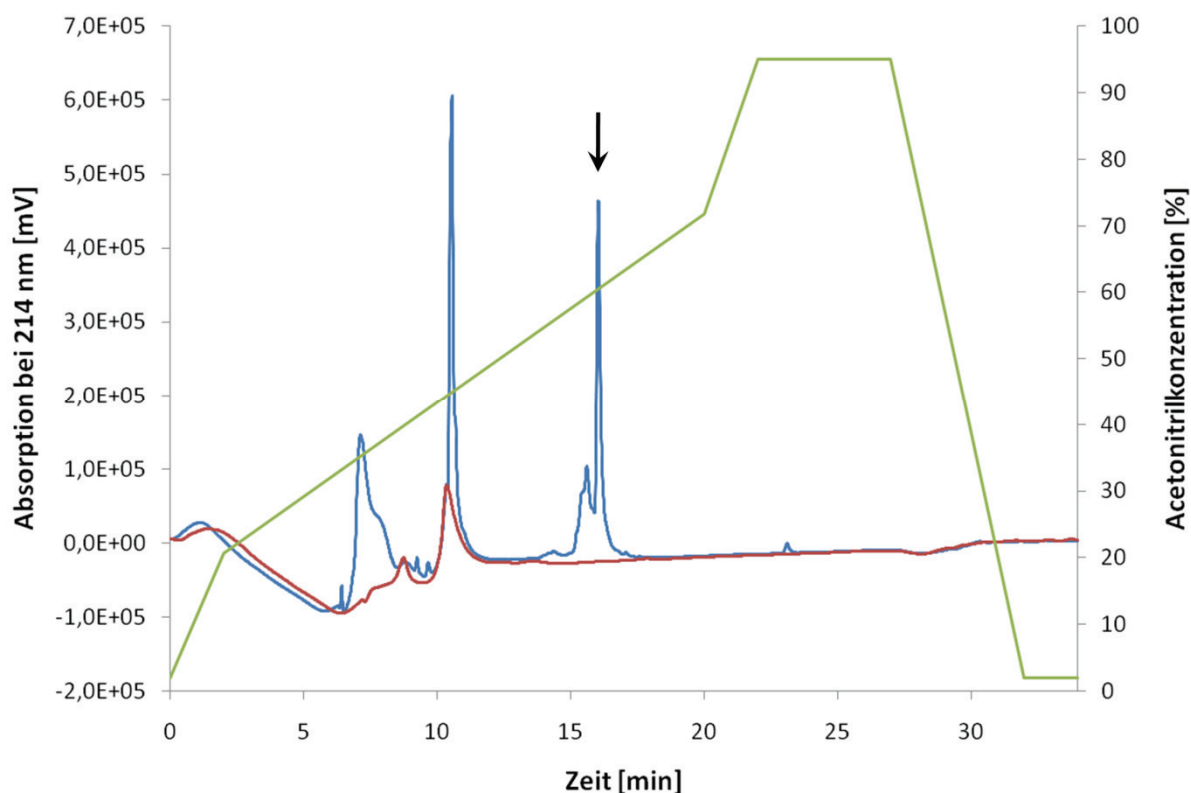


Abbildung 3-10: RP-HPLC Chromatogramm des Chimäre 3 Reinigungslaufs. Grün: Acetonitrilkonzentration (v/v) am Säuleneingang. Rot: Basislinie, Laufpuffer ohne Injektion. Blau: Chromatogramm der zu reinigenden Proteinprobe. Mit einer Retentionszeit zwischen 5 und 10 min eluieren die in der Probe enthaltenen Salze. Pfeil: HPLC-Peak, massenspektrometrisch auf die Masse von Chimäre 3 hin überprüft.

Die Masse von Chimäre 3 mit drei geschlossenen Disulfidbrücken beträgt 4967,1 Da. Mittels Massenspektrometrie wurde diese Masse in einem RP-HPLC Peak nachgewiesen der mit einer Retentionszeit von 16 min eluierte (Abbildung 3-11).

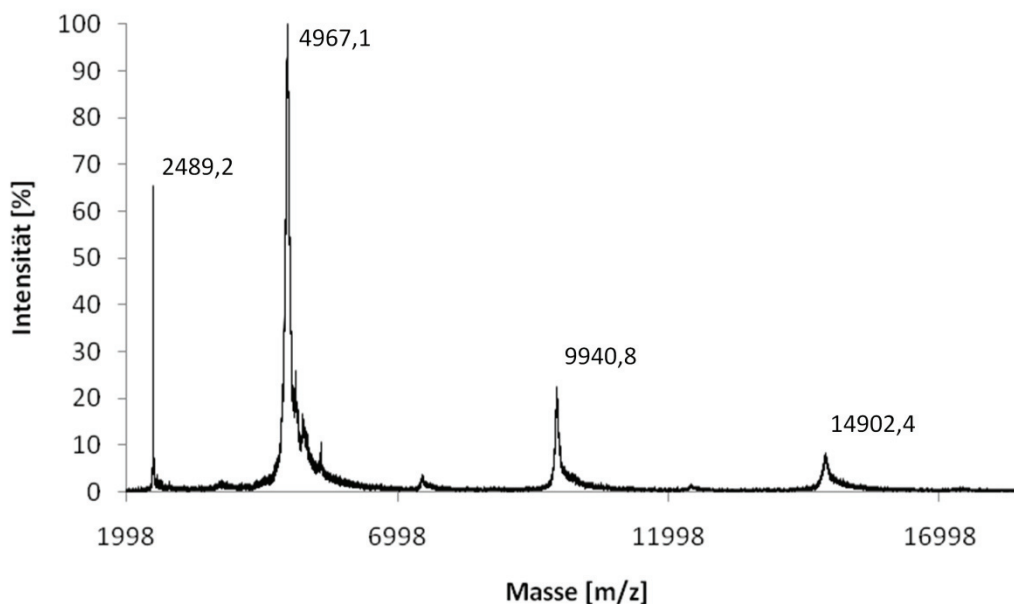


Abbildung 3-11: MALDI-TOF Massenspektrum des HPLC-Peaks bei 16 min. Die Masse von Chimäre 3 (4967,1 Da) lässt sich mittels Massenspektrometrie im 16 min HPLC-Peak nachweisen. m/z steht für Masse/Ladungs-Verhältnis.

Das Vorhandensein von ausschließlich geschlossenen Disulfidbrücken wurde mittels der Ellman-Reaktion bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Reaktion ergab, dass keine freien Thiolgruppen in der Probe vorhanden waren. Demnach waren alle Disulfidbrücken des Peptids geschlossen.

3.2.2 Das antimikrobielle Wirkspektrum von Chimäre 3

Die Untersuchung des gereinigten Peptids auf antimikrobielle Aktivität wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Rainer Podschun am Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt. Es zeigte sich, dass das gereinigte Peptid in mikro- bis nanomolarer Konzentration gegen verschiedene Mikroorganismen aktiv ist. Das Wirkspektrum umfasste dabei verschiedene, teils multiresistente, humanpathogene Erreger. Unter den Chimäre 3 sensitiven Pathogenen befanden sich Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*, Gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, anaerobe Bakterien wie *Clostridium perfringens* und der Pilz *Candida albicans* [94].

3.2.3 Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie

Eine erste Untersuchung der Sekundärstrukturelemente des renaturierten und antimikrobiell aktiven Peptids geschah unter Zuhilfenahme der CD-Spektroskopie.

Abbildung 3-12 zeigt den charakteristischen Kurvenverlauf eines CD-Spektrums für Chimäre 3. Die Verlaufsform der Kurve deutete auf das Vorhandensein eines β -Faltblatts hin. Typische Elemente waren dabei das Maximum bei 230 nm, gefolgt von einem Minimum bei 200 nm sowie einen darauffolgenden deutlichen Anstieg.

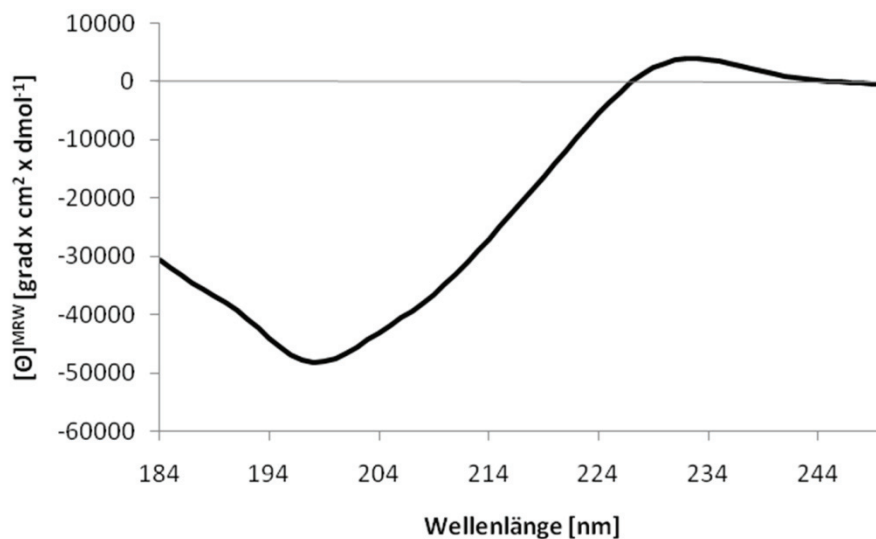


Abbildung 3-12: CD-Spektrum von Chimäre 3. Der Kurvenverlauf entspricht dem geglätteten gemittelten Spektrum aus vier aufeinander folgenden Messungen in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 4,6 bei 20 °C. Das Spektrum deutet auf eine β -Faltblatt Konformation des Peptids hin.

Mittels CD-Spektroskopie wurde die Temperaturstabilität der Chimäre 3 untersucht (Abbildung 3-13).

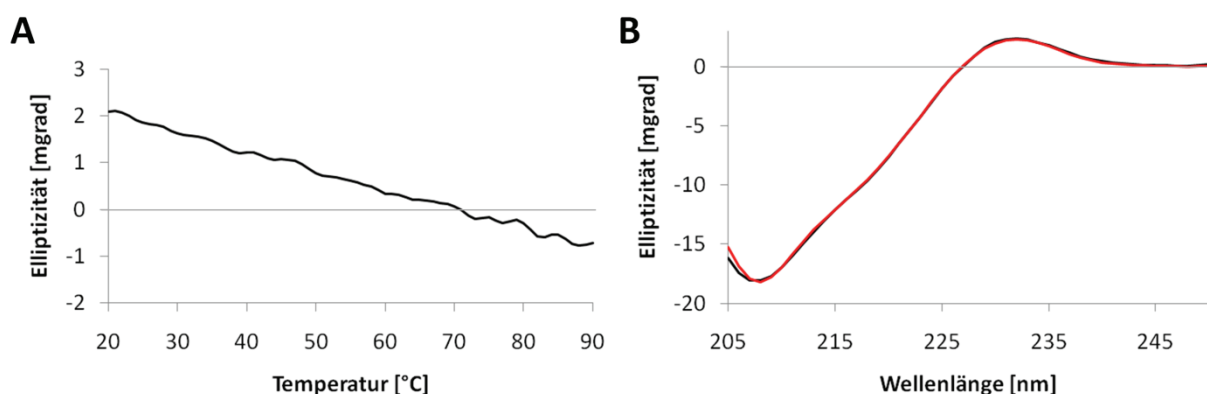


Abbildung 3-13: Temperaturstabilität der Chimäre 3. A) Das CD-Spektrum zeigt die Elliptizität der Chimäre 3 bei 230 nm in Abhängigkeit zur Temperatur in einem Bereich von 20 °C bis 90 °C. Das Spektrum wurde ein Mal geglättet. B) Im CD-Spektrum ist der Kurvenverlauf der Chimäre 3 vor dem Erhitzen (schwarzer Graph) und nach dem Abkühlung (roter Graph) gezeigt. Die Kurven wurden aus zwei Messungen in 20 mM Phosphatpuffer (pH 4,6) bei 20 °C gemittelt und geglättet.

Die Elliptizität, gemessen bei 230 nm, nahm kontinuierlich mit steigender Temperatur ab. Eine sprunghafte Abnahme der Elliptizität, was einem Aufschmelzen der Sekundärstruktur entsprochen hätte, wurde nicht detektiert. Sowohl vor dem Erhitzen auf 90 °C als auch nach dem Abkühlen auf 20 °C wurden CD-Spektren aufgenommen. Nach Einfügen eines Korrekturfaktors der den Verlust an Lösungsmittel durch Verdampfen ausglich, ließen sich die Spektren vollständig in Deckung bringen. Aus den Beobachtungen ließ sich eine hohe Temperaturstabilität für Chimäre 3 ableiten.

3.2.4 Aufklärung der Tertiärstruktur

Für die Strukturaufklärung standen homonukleare TOCSY- und NOESY-Spektren zur Verfügung, die bei unterschiedlichen pH-Werten, verschiedenen Temperaturen und mit unterschiedlichen Mischzeiten aufgenommen wurden. Aufgrund eines günstigen Signal-zu-Rauschen Verhältnisses und einer hohen Anzahl von detektierten Signalen wurde die Strukturaufklärung mit Spektren, die bei einem pH-Wert von 4,6 und einer Temperatur von 298 K aufgenommen wurden, durchgeführt.

3.2.4.1 Das homonukleare 2D-TOCSY-Experiment

Im homonuklearen zweidimensionalen TOCSY-Experiment korrelieren die ^1H Kerne über skalare Kopplungen. Die Signale des TOCSY-Spektrums ermöglicht im Idealfall die Identifikation einer gegebenen Aminosäure, anhand ihres charakteristischen Spinsystems. Da im TOCSY-Spektrum ausschließlich intraresiduale Signale beobachtet werden, wurden TOCSY-Spektren sowohl zur Identifizierung von einzelnen Aminosäuren als auch zur Unterscheidung von interresidualen von intraresidualen Signalen im NOESY-Spektrum herangezogen (Abschnitt 3.2.4.3).

Die Abbildung 3-14 zeigt ein TOCSY-Spektrum der Chimäre 3 mit einer Mischzeit von 120 ms. Die parallel angeordneten vertikalen Signalreihen stellen die aus den detektierten Kreuzsignalen bestehenden Spinsysteme der Aminosäuren des Peptids dar. Die Spinsysteme haben ihren Ausgang jeweils in einem Startsignal auf der diagonalen Linie. Die auf skalaren Kopplungsnetzwerken beruhenden Spinsysteme sind aufgrund der intrinsischen chemischen Verschiebungen der beteiligten Protonen für die jeweilige Aminosäure charakteristisch, jedoch nicht in allen Fällen einmalig. Eine eindeutige Identifizierung aufgrund des beobachteten Spinsystems ist nur für die Aminosäuren Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Threonin und Valin möglich. Alle weiteren Aminosäuren müssen anhand zusätzlicher Informationen identifiziert werden [104].

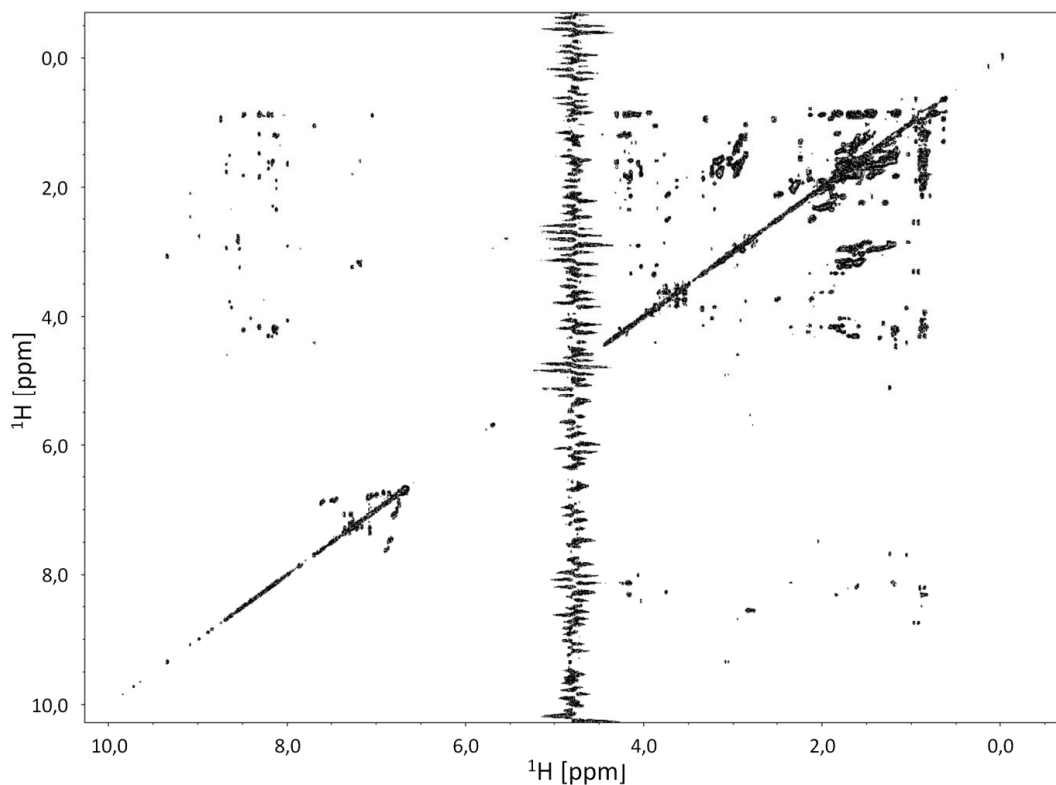


Abbildung 3-14: Homonukleares 2D-TOCSY-Spektrum. Das Spektrum von Chimäre 3 wurde mit einer Mischzeit von 120 ms aufgenommen. Die sichtbaren Kreuzsignale sind das Resultat skalar koppelnder Protonen. Die detektierten Spinsysteme ermöglichen anhand ihrer Muster die Identifizierung einzelner Aminosäuren.

Ein Beispiel für ein eindeutiges Signalmuster zeigt die Abbildung 3-15 anhand von Threonin 38 auf.

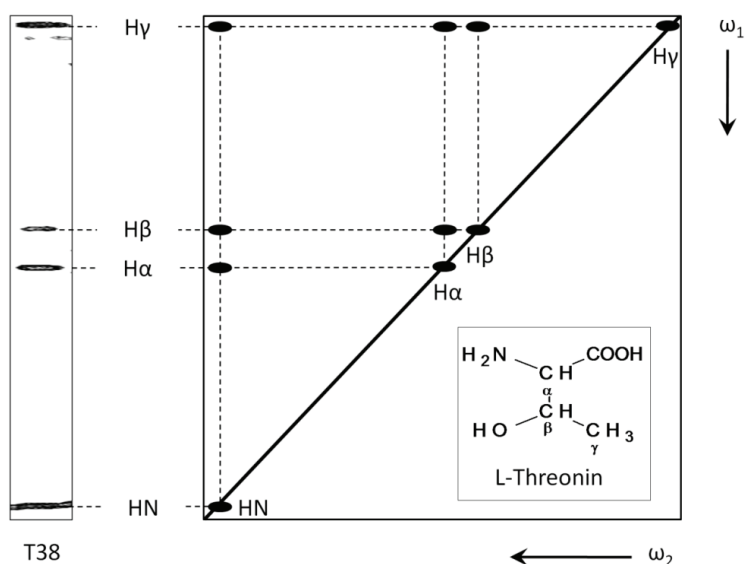


Abbildung 3-15: Das typische Kreuzsignalmuster des Spinsystems der Aminosäure Threonin. In der Grafik sind die unterhalb der Diagonalen liegenden Kreuzsignale aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt. Links: Ausschnitt aus dem 120 ms TOCSY-Spektrum von Chimäre 3. Gezeigt wird das charakteristische Spinsystem von Threonin am Beispiel von Threonin 38. Rechts unten: Strukturformel von L-Threonin.

Das gezeigte Spinsystem wurde dem 120 ms TOCSY-Spektrum von Chimäre 3, gemessen bei pH 4,6 und 298 K, entnommen. Das Signalmuster auf der Frequenz des Amidprotons gibt die Beziehung zwischen den Protonenpaaren $H^{\alpha}(i)-H^N(i)$, $H^{\beta}(i)-H^N(i)$, $H^{\gamma}(i)-H^N(i)$ wieder und basiert auf den chemischen Verschiebungen des α - und β -Protons, sowie der γ -Protonen der Methylgruppe.

Abgesehen von Alanin waren alle Aminosäuren mit einmaligem Spinsystem mehrfach in der Primärstruktur von Chimäre 3 vertreten. Das Spinsystem für Alanin war mit den vorliegenden TOCSY-Spektren nicht zweifelsfrei zu identifizieren. Es war deshalb nicht möglich, nur anhand der TOCSY-Spektren Spinsysteme eindeutig einer Position in der Primärstruktur von Chimäre 3 zuzuordnen.

3.2.4.2 Das homonukleare 2D-NOESY-Experiment

Für die sequentielle Zuordnung der Aminosäuren wurde das homonukleare zweidimensionale NOESY-Experiment mit einer Mischzeit von 120 ms genutzt. Zusätzlich zu den schon im TOCSY detektierten intraresidualen Kreuzsignalen finden sich im NOESY-Spektrum (Abbildung 3-16) auch interresiduale Signale, da hier alle Protonen mit einem Abstand kleiner oder gleich 5 Å miteinander koppeln.

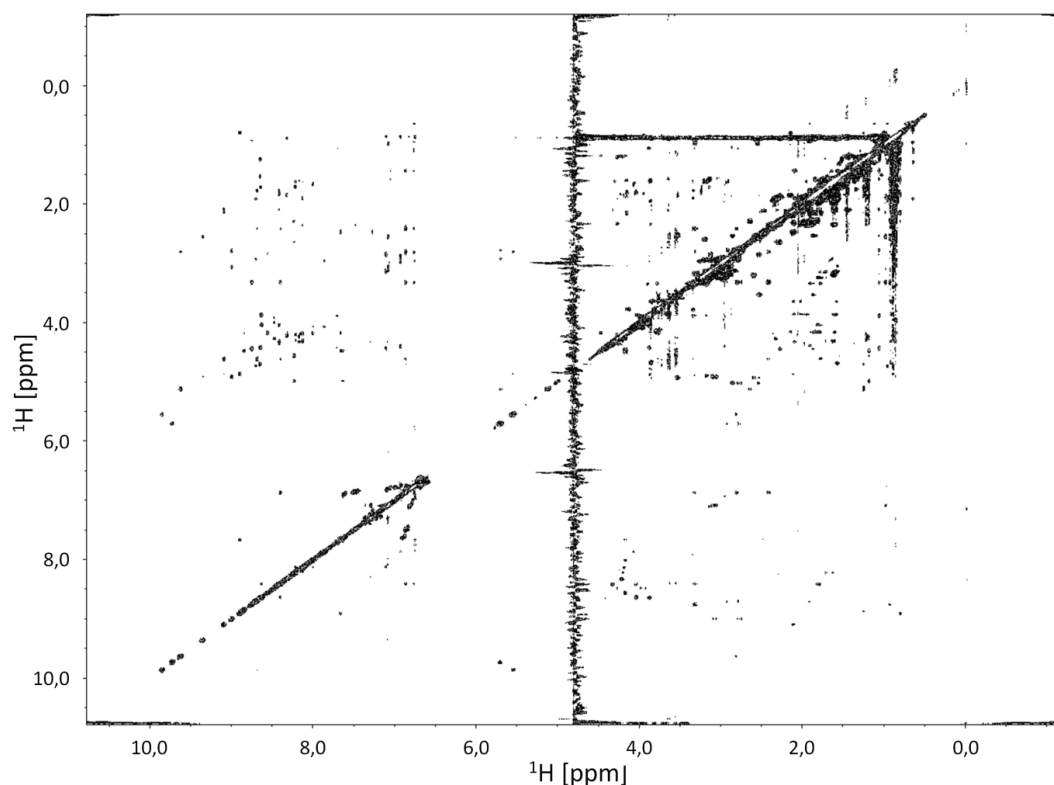


Abbildung 3-16: Homonukleares 2D-NOESY Spektrum der Chimäre 3. Das Spektrum wurde bei einer Mischzeit von 120 ms aufgenommen. Detektierte Kreuzsignale beruhen auf der dipolaren Wechselwirkung koppelnder Protonen, die weniger als 5 Å auseinander liegen.

Die räumliche Nähe der Protonen entsteht zum einen durch die direkte Nachbarschaft zweier Aminosäuren, zum anderen durch die dreidimensionale Faltung des Peptids. Zu erkennen ist das Vorhandensein von interresidualen Signalen an der erhöhten Zahl von Kreuzsignalen, die im NOESY-Spektrum (Abbildung 3-16) im Vergleich zum TOCSY-Spektrum (Abbildung 3-14) vorliegen.

Die Auswertung der vorliegenden NOESY-Spektren ergab, dass sich mindestens 32, jedoch nicht alle der Spinsysteme der insgesamt 44 Aminosäuren von Chimäre 3 in den NOESY-Spektren wiederfinden ließen. Die genaue Anzahl der beobachteten Spinsysteme ließ sich nicht präzise bestimmen, da in einigen Fällen eine Überlagerung der Signale oder das Auftreten von Artefakten anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden konnte. Aus dem Umstand, dass über die gesamte Breite des Spektrums Signale detektiert werden, lässt sich ableiten, dass das Peptid in der Probe über eine definierte Tertiärstruktur verfügt. Eine Überlagerung eines TOCSY- und NOESY-Spektrums einer Probe ermöglicht die Unterscheidung zwischen interresidualen und intraresidualen Kreuzsignalen.

3.2.4.3 Die sequenzspezifische Zuordnung

Der erste Schritt der sequentiellen Zuordnung war das Identifizieren von Aminosäuren aufgrund ihres Signalmusters. Sofern eine identifizierte Aminosäure in der Primärstruktur des Peptids nicht einmalig war, mussten für die Zuordnung der Aminosäure zu ihrer Position weitere Informationen herangezogen werden. Dafür wurden durch das Überlagern des TOCSY- und NOESY-Spektrums die intraresidualen und interresidualen Signale des NOESY-Spektrums identifiziert (Abbildung 3-17).

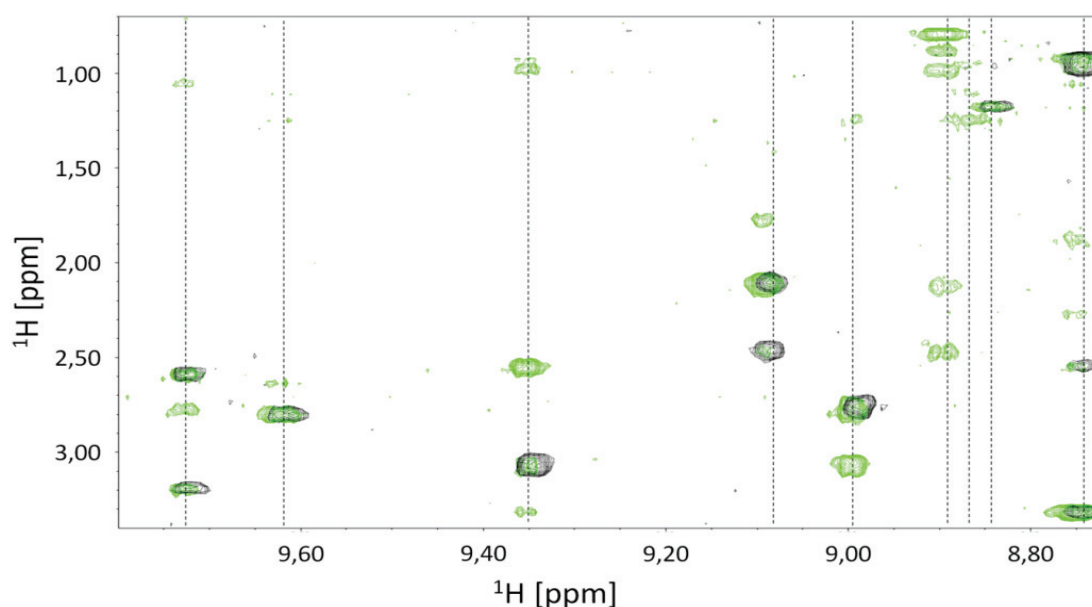


Abbildung 3-17: Überlagerung von TOCSY- und NOESY-Spektrum. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Überlagerung der 120 ms NOESY- und TOCSY-Spektren. Grüne Signale: Detektierte NOEs des NOESY-Spektrums. Schwarze Signale: Kreuzsignale des TOCSY-Spektrums. Gestrichelte Linien: Amidprotonenfrequenzen, auf denen im Ausschnitt Teile der Spinsysteme beobachtet werden. Intraresiduale Signale sind deutlich an den überlagernden Peaks zu erkennen. Rein grüne Peaks: Interresiduale Signale des NOESY-Spektrums.

Die Kenntnis der interresidualen Resonanzsignale des NOESY-Spektrums erlaubte die Identifizierung von benachbarten Aminosäuren. Die sequenzspezifische Zuordnung beruht darauf, dass im NOESY-Spektrum interresiduale Signale aufgrund von dipolar wechselwirkenden Protonen detektiert werden. Ein Resonanzsignal wird nur beobachtet, wenn die korrelierenden Protonen nicht weiter als 5 Å räumlich voneinander getrennt sind. Ermöglicht wird dies durch die Tertiärstruktur des Peptids, aber auch durch die direkte Nachbarschaft der Aminosäuren (i) und (i+1), da der Abstand zwischen dem Amidproton von (i+1) und den $H^N(i)$, $H^\alpha(i)$, $H^\beta(i)$ und $H^\gamma(i)$ Protonen der Aminosäure (i) fast immer kleiner als 5 Å ist. Auf der vertikalen Frequenzachse einer gegebenen Aminosäure (i+1) finden sich deswegen neben den intraresidualen Signalen interresiduale Kreuzsignale der Aminosäure (i). In Abbildung 3-18 ist am Beispiel der Aminosäuren Prolin 20 bis Cystein 23 das Prinzip der Identifizierung benachbarter Aminosäuren, aufgrund von interresidualen Kreuzsignalen im NOESY-Spektrum, verdeutlicht.

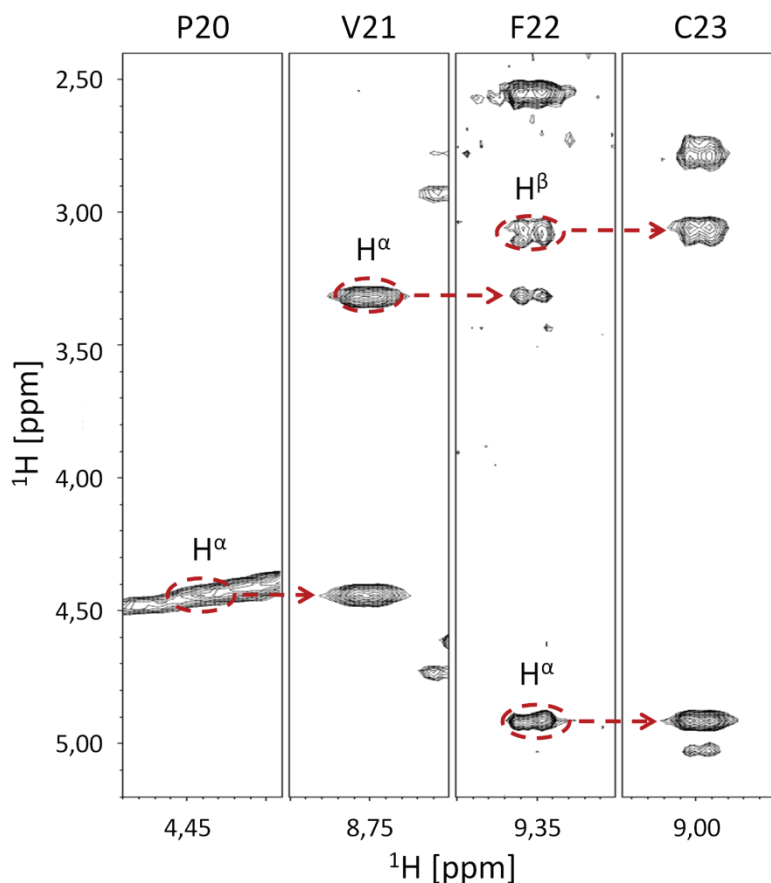


Abbildung 3-18: Identifizierung sequentiell benachbarter Aminosäuren anhand des NOESY-Spektrums. Die Darstellung basiert auf dem 120 ms NOESY-Spektrum der Chimäre 3. Die vier Ausschnitte zeigen Auszüge aus den Spinsystemen der Aminosäuren von Prolin 20 bis Cystein 23. Die Frequenzen der jeweiligen Startprotonen finden sich auf der Ordinatenachse, auf der Abszisse finden sich die Frequenzen der mit ihnen korrelierenden Protonen. Rot umrandete Signale entsprechen intraresidualen Signalen einer gegebenen Aminosäure, Pfeile deuten auf das sich daraus ergebende interresiduale Kreuzsignal auf der Resonanzfrequenz der benachbarten Aminosäure.

Die sequenzspezifische Zuordnung ermöglichte die Identifizierung und Primärstrukturzuordnung von 31 der 32 eindeutig im NOESY-Spektrum detektierbaren Aminosäurespinsysteme von Chimäre 3 (Abbildung 3-19).

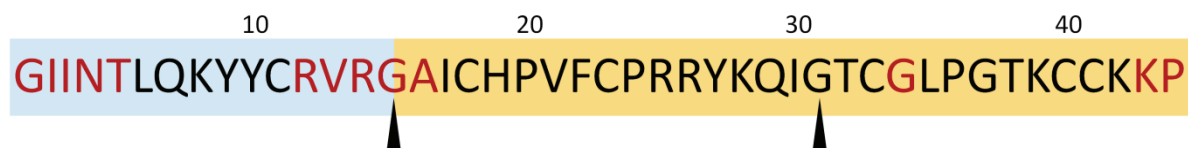


Abbildung 3-19: Übersicht der mittels sequentieller Zuordnung identifizierten Aminosäuren der Chimäre 3. Blaugrauer Hintergrund: Segment aus HBD3. Oranger Hintergrund: Segment aus HBD2. Schwarze Pfeile: Glycine, die als Segmentgrenzen bei der Generierung der Chimären dienen. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstabenkode angegeben. Schwarz: Zugeordnete Aminosäuren. Rot: In den Spektren nicht detektierte oder nicht identifizierte Aminosäuren.

Die nicht detektierbaren Aminosäuren lagen dabei im Wesentlichen in drei Abschnitten der Primärstruktur, was auf eine erhöhte Flexibilität des Moleküls in diesen Bereichen hinwies. Es handelt sich dabei um den N-terminalen Bereich, von Glycin 1 bis Threonin 5, einen Bereich im Übergang zwischen den Segmenten eins und zwei, bestehend aus den Aminosäuren Arginin 12 bis Alanin 16, sowie die beiden C-terminalen Aminosäuren Lysin 43 und Prolin 44. Glycin 34 ist die einzige Aminosäure, die außerhalb der genannten Abschnitte liegt und nicht identifiziert werden konnte.

3.2.4.4 Das D₂O-NOESY-Spektrum (H-D-Austausch-Experiment)

Die Abbildung 3-20 zeigt das 200 ms D₂O-NOESY-Spektrum. Da die meisten der Protonen der Probe mit den Deuteronen des Lösungsmittel austauschten, wies das 99,98 % D₂O NOESY-Spektrum deutlich weniger Resonanzsignale auf als ein vergleichbares 7 % D₂O NOESY-Spektrum (Abbildung 3-16). Das 200 ms D₂O-NOESY-Spektrum wurde zur Identifizierung der Wasserstoffbrücken-Donatoren von Chimäre 3 genutzt. Da die Spinsysteme und die dazugehörigen Frequenzachsen aufgrund der durchgeführten sequentiellen Zuordnung bekannt waren, bestand die Möglichkeit die im D₂O-Spektrum nur unvollständigen Spinsysteme den jeweiligen Aminosäuren zuzuordnen.

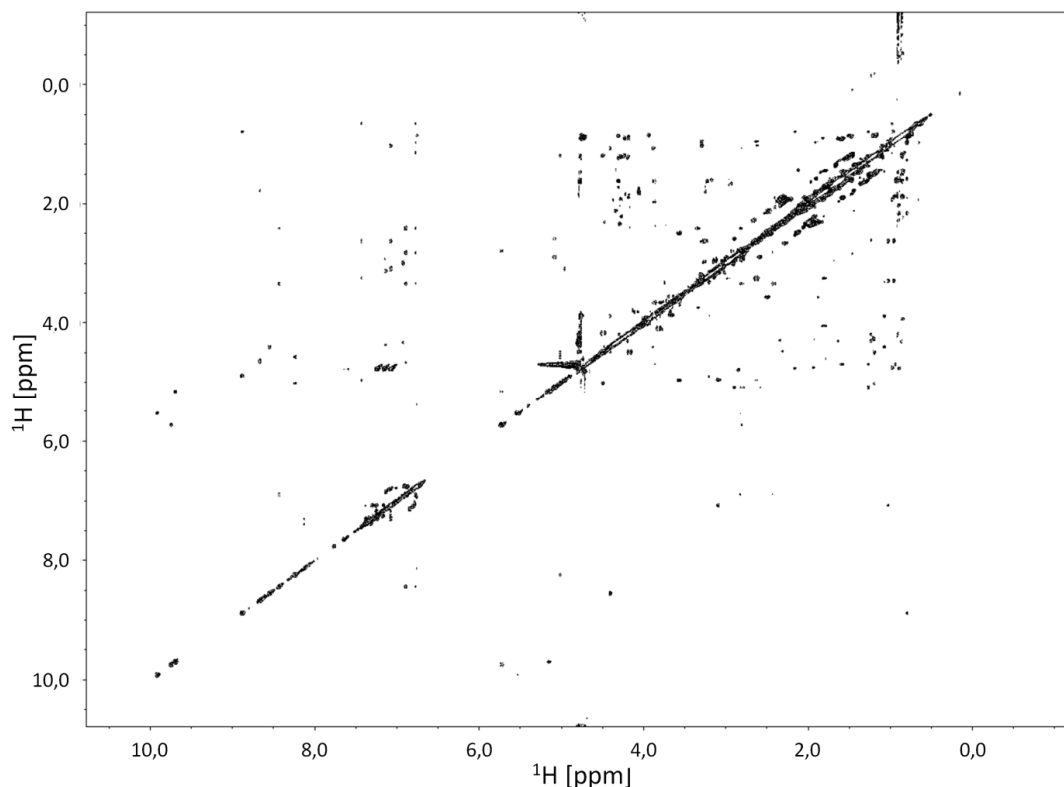


Abbildung 3-20: 200 ms D₂O-NOESY-Spektrum von Chimäre 3. Die im Spektrum detektierten Resonanzsignale stellen langsam austauschende Protonen dar.

Die Auswertung des Spektrums resultierte in sechs Wasserstoffbrückendonator-Protonen, denen jeweils ein Akzeptor-Sauerstoffatom zugeordnet werden konnte. Die identifizierten Wasserstoffbrücken wurden als Abstände in der Strukturberechnung berücksichtigt. Die Tabelle 3-1 listet die an den Wasserstoffbrücken von Chimäre 3 beteiligten Aminosäuren auf.

Tabelle 3-1: Identifizierte Wasserstoffbrücken in Chimäre 3. Die Tabelle führt die funktionellen Gruppen und die an der Ausbildung der Wasserstoffbrücken beteiligten Aminosäuren auf.

Wasserstoffbrücken-Donator	Wasserstoffbrücken-Akzeptor
H ^N Histidin 19	O ^{Carbonyl} Lysin 39
H ^N Tyrosin 27	O ^{Carbonyl} Arginin 25
H ^N Isoleucin 30	O ^{Carbonyl} Cystein 40
H ^N Cystein 33	O ^{Carbonyl} Threonin 38
H ^N Threonin 38	O ^{Carbonyl} Leucin 35
H ^N Cystein 40	O ^{Carbonyl} Isoleucin 30

3.2.5 Sekundärstrukturvorhersage mittels des chemischen Verschiebungsindex

Die Identifizierung der Spinsysteme mittels sequentieller Zuordnung ermöglichte es, die chemischen Verschiebungen der H^α -Protonen aller 31 zugeordneten Aminosäuren zu erfassen. Die ermittelten Verschiebungen wurden entsprechend des chemischen Verschiebungsindex [132] in drei Gruppen eingeordnet und in Abbildung 3-21 graphisch dargestellt.

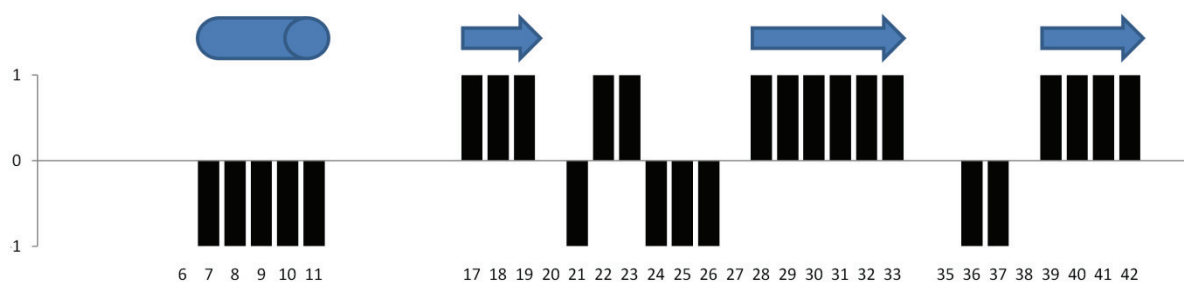


Abbildung 3-21: Graphische Darstellung des chemischen Verschiebungsindex von Chimäre 3. Schwarze Balken: Die chemische Verschiebung der 31 identifizierten H^α -Protonen wurde nach Abgleich mit einem Referenzwert als 0, 1 und -1 erfasst. Zahlen unterhalb der Grafik stellen die Aminosäurepositionen der erfassten Protonen dar. Fehlenden Zahlen im Bereich von 1 bis 44 weisen auf nicht identifizierte H^α -Protonen hin, selbige wurden bei der Erstellung des Index nicht berücksichtigt. Blaue Symbole geben die Lage und Art der vorhergesagten Strukturelemente an. Röhre: α -Helix. Pfeil: β -Faltblattstrang.

Die chemische Verschiebung eines H^α -Protons wurde mit 1, -1 oder 0 bewertet, abhängig davon ob die detektierte Verschiebung größer, kleiner oder gleich der Verschiebung eines Referenzwertes für das H^α -Proton der jeweiligen Aminosäure war. Eine Gruppe von mindestens vier -1 Werten, nicht unterbrochen durch eine +1, definiert eine α -Helix. Eine Reihe von mindestens drei +1 Werten in Folge entsprach einem β -Faltblattstrang. Der chemische Verschiebungsindex schlug für Chimäre 3 eine α -Helix von Leucin 6 bis Cystein 11 vor, sowie drei β -Faltblattstränge, Strang eins von Isoleucin 17 bis Histidin 19, Strang zwei von Lysin 28 bis Cystein 33 und Strang drei von Lysin 39 bis Lysin 42. Für 13 Aminosäuren konnte kein H^α -Proton identifiziert werden (Abschnitt 3.2.4.3). Diese Aminosäuren wurden bei der Erstellung des chemischen Verschiebungsindex für Chimäre 3 nicht berücksichtigt.

3.2.6 Die Sekundärstrukturelemente von Chimäre 3

Die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen basiert auf dem Vorhandensein von charakteristischen Kontakten, entweder zwischen den Protonen benachbarter Aminosäuren (*short range contacts*) oder über eine mittlere Distanz von bis zu vier Aminosäuren (*medium range contacts*). Die Auswertung des 120 ms NOESY-Spektrums, bezüglich der charakteristischen Kontaktmuster der an der Ausbildung der Sekundärstrukturelemente beteiligten Aminosäuren, ist in Abbildung 3-22 dargestellt. Beobachtet wurden die für β -Faltblätter typischen sequentiellen

Kontakte sowohl zwischen den Amidprotonen $H^N(i)-H^N(i+1)$ als auch zwischen den $H^\alpha(i)-H^N(i+1)$ -Protonen benachbarter Aminosäuren. Die für α -Helices charakteristischen Kontakte über mittlere Distanz, $H^\alpha(i)-H^N(i+3)$, $H^\beta(i)-H^N(i+3)$ und $H^\alpha(i)-H^N(i+4)$, wurden nicht vorgefunden.

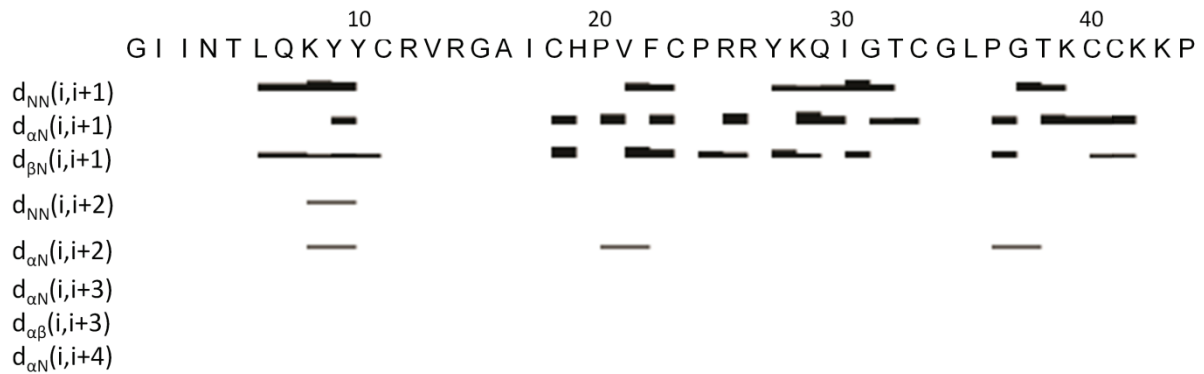


Abbildung 3-22: Sequenzplot der Chimäre 3 definierenden Kontakte. Dargestellt sind die Kontakte über kurze und mittlere Distanz, die die Sekundärstrukturelemente der Chimäre 3 definieren. Die Stärke der Balken unterhalb der Primärstruktur korreliert mit der Intensität der detektierten Signale. Vorhanden waren die für β -Faltblätter charakteristischen sequentiellen $H^N(i)-H^N(i+1)$ - und $H^\alpha(i)-H^N(i+1)$ -Kontakte. Kontakte über mittlere Entfernung wurden nicht vorgefunden.

3.2.7 Die Ausprägung der Tertiärstruktur

Während die Entstehung von Sekundärstrukturelementen auf sequentielle Kontakte und Kontakte über mittlere Distanz zurückgeht (Abschnitt 3.2.6), sind für die Ausprägung der Tertiärstruktur Kontakte über große Distanz (*long range contacts*) ausschlaggebend.

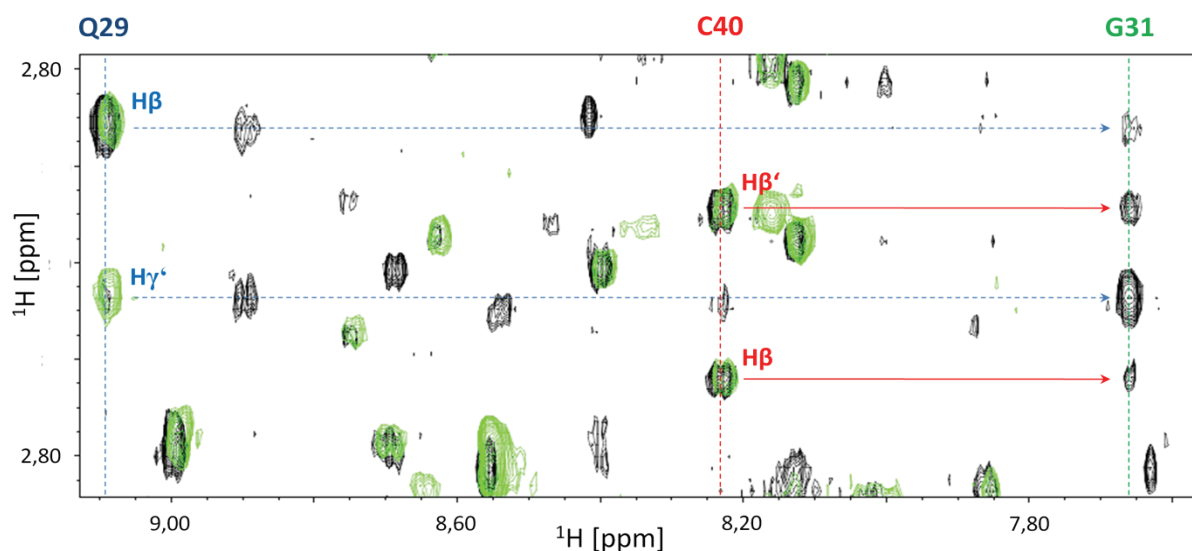


Abbildung 3-23: Kontakte über große Distanz und sequentielle Kontakte im NOESY-Spektrum. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Überlagerung des 120 ms NOESY- (schwarz) und TOCSY-Spektrums (grün) von Chimäre 3. Vertikale Linien: Frequenzachsen der Aminosäuren Glutamin 29 (blau), Cystein 40 (rot) und Glycin 31 (grün). Auf der Frequenzachse von Glycin 31 (G31) sind die interresidualen Resonanzsignale der β -Protonen von Cystein 40 (C40, rote Pfeile) und des β - und γ -Protonen von Glutamin 29 (Q29, blaue Pfeile) detektiert. Bei dem Kontakt zwischen C40 und G31 handelt es sich um einen Kontakt über große Distanz, der Kontakt zwischen Q29 und G31 entspricht einem Kontakt über mittlere Distanz.

Als Kontakte über große Distanz werden Kontakte zwischen Protonen definiert, die mindestens fünf Aminosäuren in der Primärstruktur eines Proteins auseinander liegen. In Abbildung 3-23 wurde beispielhaft die Kopplung von Glutamin 29 β - und γ -Protonen (Kontakt zwischen Aminosäuren über mittlere Distanz) und der β -Protonen von Cystein 40 (Kontakt über große Distanz) mit dem Amidproton von Glycin 31 dargestellt. Über große Distanz konnte eine Wechselwirkung zwischen Protonen nur beobachtet werden, wenn die beteiligten Protonen aufgrund der Tertiärstruktur des Peptids einen Abstand von maximal 5 Å zueinander einnahmen. Die Kontakte über große Distanz wurden mittels des 120 ms NOESY-Spektrum identifiziert.

Abbildung 3-24 zeigt die Anzahl der für die Berechnung der Struktur von Chimäre 3 eingesetzten Abstandsbeschränkungen. Die Abstandsbeschränkungen wurden hierfür in vier Gruppen zusammengefasst und für jede Aminosäure schematisch dargestellt.

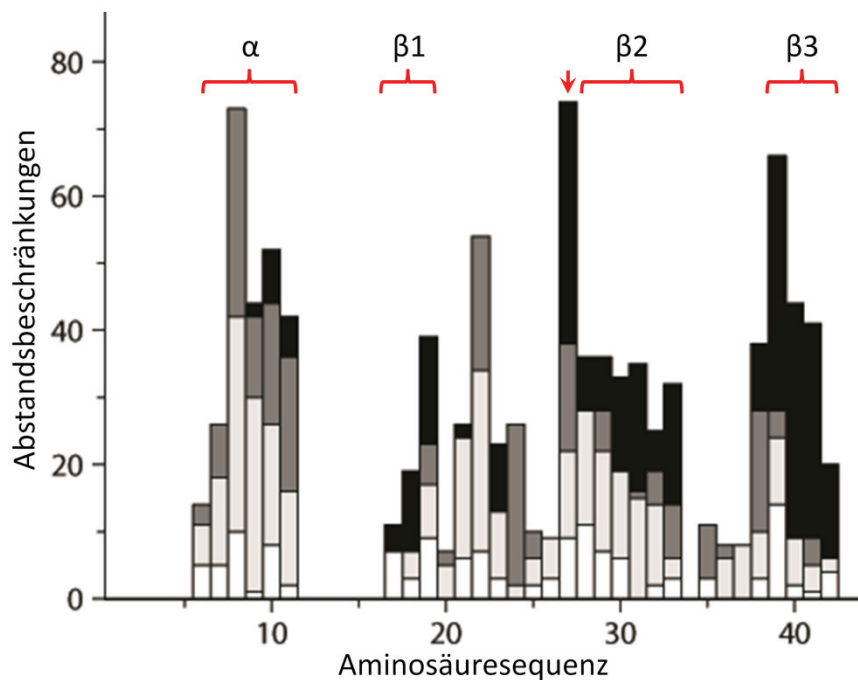


Abbildung 3-24: Verteilung von Abstandsbeschränkungen über die Primärstruktur der Chimäre 3. Die ermittelten Abstandsbeschränkungen wurden in Gruppen zusammengefasst und als Balken über den einzelnen Aminosäuren der Primärstruktur dargestellt. Die Einteilung in Gruppen geschah aufgrund der Klassifizierung von Kontakten als intraresidual (weiß), sequentiell (hellgrau), über mittlere Distanz (grau) und über große Distanz (schwarz). Geschweifte Klammern zeigen die Lage der Sekundärstrukturelemente entsprechend der CSI Vorhersage. Ein Pfeil markiert die Aminosäure Tyrosin 27. Die größte Anzahl von *long range* Kontakten weisen die Aminosäuren des c-terminalen β -Faltblattstranges und das Tyrosin an Position 27 der Primärstruktur auf. α : α -helikales Segment. β 1-3: β -Faltblattstränge.

Die Einteilung in Gruppen basierte auf der Distanz der jeweiligen Kontakte zueinander, die Gruppen umfassten die intraresidualen, sequentiellen, *medium range* und *long range* Kontakte. Über die meisten *long range* Kontakte verfügten die Aminosäuren des C-terminalen β -Faltblattstrangs, die den Kernbereich des Peptids ausmachen, sowie das an Position 27 der Primärstruktur gelegene Tyrosin, dessen Seitenkette ebenfalls zum Inneren des Peptids orientiert ist.

3.2.8 Die Disulfidbrücken

Da in der NMR-Probe alle Cysteine in oxidiert Form vorlagen (Abschnitt 3.2.1), konnte davon ausgegangen werden, dass drei Disulfidbrücken ausgebildet wurden. Zudem ergab die Bestimmung der Masse des gereinigten Peptids eine Differenz von 6 Da zwischen der berechneten (4973,1 Da) und der detektierten Masse (4967,1 Da). Die Differenz resultiert aus der Ausbildung von drei Disulfidbrücken. Aufgrund der räumlichen Lage und der Ausrichtung der Seitenketten der Cysteine 23 und 41 in der Tertiärstruktur von Chimäre 3 konnte angenommen werden, dass diese beiden Cysteine eine Brücke ausbilden. Die Tertiärstruktur legte des Weiteren nahe, dass die Cysteine 18 und 33 sowie 11 und 40 je eine Brücke ausbilden. Um diese Beobachtungen zu stützen, wurden die möglichen Kombinationen als Abstandsvorgaben in die Strukturberechnung eingefügt. Die resultierenden Ensembles der 20 besten Strukturen wurden miteinander verglichen. Als Kriterium für die richtige Konformation diente die energetisch favorisierte Struktur. Berücksichtigt wurden die Anzahl der Strukturverletzungen, die *r.m.s.d.* (*root mean square deviation*, mittlere quadratische Abweichung) und das Ergebnis der Ramachandran-Darstellung, berechnet wurden jeweils 200 Strukturen (Tabelle 3-2). Die energetisch favorisierte Struktur bestätigt die erwarteten Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 11 und 40, 18 und 33, 23 und 41. Es lagen keine Strukturverletzungen größer 0,5 Å vor, die *r.m.s.d.* betrug 1,71 Å. Die Ramachandran-Darstellung dieser Struktur wies die günstigste energetische Verteilung auf.

Tabelle 3-2: Cystein-Kombinationen zur Ermittlung des energetisch favorisierten Verbrückungsmusters. ¹ *r.m.s.d.* = mittlere quadratische Abweichung in Å. ² Anzahl der Verletzungen der vorgegebenen Abstandsbeschränkungen größer als 0,5 Å. ³ Ramachandran-Darstellung der 20 Konformere. Angaben in Prozent der Torsionswinkel. Reihenfolge: Bevorzugte| ergänzend erlaubte| großzügig erlaubte| nicht erlaubte Bereiche.

Disulfidbrücken	<i>r.m.s.d.</i> (Å) ¹	Verletzungen (> 0,5 Å) ²	Ramachandran ³
C23-C41,C11-C40, C18-C33	1,71 (± 0,27)	0	38,4 39,9 14,9 6,9
C23-C41,C11-C18, C40-C33	2,44 (± 1,02)	11	34,4 41,6 15,0 8,0
C23-C41,C11-C33, C18-C40	2,41 (± 0,99)	10	37,9 38,0 15,6 8,6
Keine Brücken vorgegeben	2,47 (± 0,61)	0	35,6 45,1 13,6 5,7

3.3 Die Tertiärstruktur der Chimäre 3

Die Berechnung der Tertiärstruktur der Chimäre 3 erfolgte mit dem Programm CYANA 2.1. Hierfür wurden die in den Spektren identifizierten Resonanzsignale mittels des Programms NMRView in Abstandsbeschränkungen umgeschrieben. Für die Strukturberechnung wurden 559 Abstandsbeschränkungen berücksichtigt, darin enthalten sind 24 Abstandsbeschränkungen für die identifizierten Wasserstoffbrücken und 18 Beschränkungen für die drei Disulfidbrücken. Auf der Grundlage dieser

Daten erfolgte die Berechnung von 200 Strukturen. Aus den berechneten 200 Strukturen wurden die 20 Strukturen mit der niedrigsten Zielfunktion ausgewählt. Sämtliche bei der Berechnung der 20 Konformere aufgetretenen Abweichungen von den vorgegebenen Abstandsbeschränkungen lagen unter 0,50 Å. Die Tabelle 3-3 listet die wesentlichen Parameter der CYANA Strukturberechnung, sowie das Ergebnis der Analyse der ϕ - und ψ -Torsionswinkelpaare des Proteinerückgrates der Struktur mit der niedrigsten Zielfunktion auf.

Tabelle 3-3: Parameter der Strukturberechnung und Analyse der Torsionswinkelpaare von Chimäre 3. Bei der Berechnung der Struktur aufgetretene Verletzungen der vorgegebenen Abstandsbeschränkungen lagen sämtlich unter 0,50 Å. *r.m.s.d.* = *root mean square deviation*, mittlere quadratische Abweichung, angegeben in Å.

Abstandsvorgaben	Anzahl
Intraresidual ($ i-j = 0$)	274
Sequentiell ($ i-j = 1$)	164
Mittlere Distanz ($2 \leq i-j \leq 4$)	91
Große Distanz ($ i-j \geq 5$)	126
Wasserstoffbrücken	24
Disulfidbrücken	18
Insgesamt	559
Paarweise <i>r.m.s.d.</i> für die AS 1 - 44	
Mittlere <i>r.m.s.d.</i> des Proteinerückgrats	1,71 ± 0,27 Å
Mittlere <i>r.m.s.d.</i> der schweren Atome	2,28 ± 0,30 Å
Paarweise <i>r.m.s.d.</i> für die AS 6 - 11 und 17 - 42	
Mittlere <i>r.m.s.d.</i> des Proteinerückgrats	0,62 ± 0,13 Å
Mittlere <i>r.m.s.d.</i> der schweren Atome	1,07 ± 0,12 Å
Ramachandran-Darstellung der Struktur mit der niedrigsten Zielfunktion [%]	
Bevorzugte Bereiche	37,1
Ergänzend erlaubte Bereiche	48,6
Großzügig erlaubte Bereiche	8,6
Nicht erlaubte Bereiche	5,7

Die Abbildung 3-25 zeigt das Ramachandran-Diagramm der Chimäre 3 Struktur mit der niedrigsten Zielfunktion. Für die Erstellung des Diagramms wurden den Torsionswinkelpaaren Phi (ϕ) und Psi (ψ) jeder Aminosäure Bereiche potentieller Energie zugeordnet. Die Flächen mit niedrigster Energie sind die bevorzugten Bereiche (dunkelblau), in diesen Bereichen liegen 37,1 % der Torsionswinkelpaare

von Chimäre 3. In den ergänzend erlaubten Bereichen (hellblau) finden sich 48,6 %, in den großzügig erlaubten Bereichen (grau) 8,6 % der Torsionswinkelpaare des Peptids. 5,7 % der Winkelpaare liegen in nicht erlaubten Bereichen mit hoher potentieller Energie. Bei den entsprechenden Aminosäuren handelt es sich um Arginin 12 und Valin 21. Während Arginin 12 in einem flexiblen Bereich des Proteins liegt, befindet sich Valin am Mittelpunkt eines engen Bogens, dessen Ausbildung durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Die Mehrzahl der Aminosäuren verfügte über Winkelpaare bestehend aus einem ψ -Winkel von 45° bis 180° und einem ϕ -Winkel von -180° bis -45° . Die ϕ - und ψ -Torsionswinkelpaare im entsprechenden Konformationsraum sind charakteristisch für β -Faltblätter.

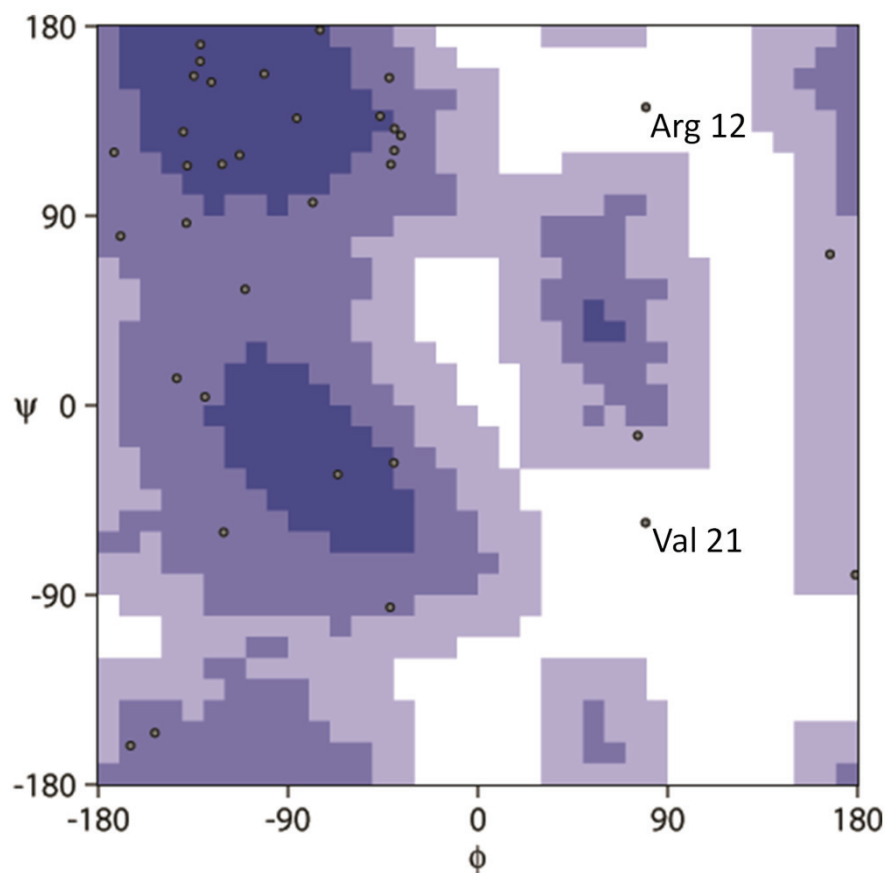


Abbildung 3-25: Ramachandran-Diagramm der Chimäre 3 Struktur mit der niedrigsten Zielfunktion. Die Psi- und Phi-Torsionswinkelpaare der Aminosäuren wurden Bereiche mit unterschiedlicher potentieller Energie zugeordnet. Dunkelblau: Bevorzugte Bereiche mit niedrigster Energie. Hellblau: Ergänzend erlaubte Bereiche. Grau: Großzügig erlaubte Bereiche. Weiß: nicht erlaubte Bereiche mit hoher Energie. Mehr als 94 % der Aminosäuren von Chimäre 3 liegen in erlaubten Bereichen. Bei den Aminosäuren im nicht erlaubten Bereich handelt es sich um Arginin 12 und Valin 21 (im Diagramm angegeben).

Das Ensemble der 20 Strukturen mit den niedrigsten Zielfunktionen ist in Abbildung 3-26 A als Spaghetti-Modell dargestellt. In drei Bereichen wurde ein starkes Abweichen der 20 Strukturen vom gemeinsamen Verlauf beobachtet. Dieses Abweichen charakterisiert Molekülregionen mit hoher Flexibilität.

Bei den hoch flexiblen Bereichen handelt es sich um den N- und den C-Terminus des Peptids und um einen Bereich, der sich unmittelbar an das kurze N-terminale α -helikale Segment anschließt. Ein weiterer jedoch weniger flexibler Bereich liegt in der β -Haarnadelschleife (β -*hairpin*) zwischen den beiden β -Faltblattsträngen.

Aus dem Ensemble der 20 Strukturen mit der niedrigsten Zielfunktion wurde in der Folge die mittlere Struktur berechnet und nachfolgend energieminiert. Die energieminierte mittlere Struktur ist in Abbildung 3-26 B dargestellt.

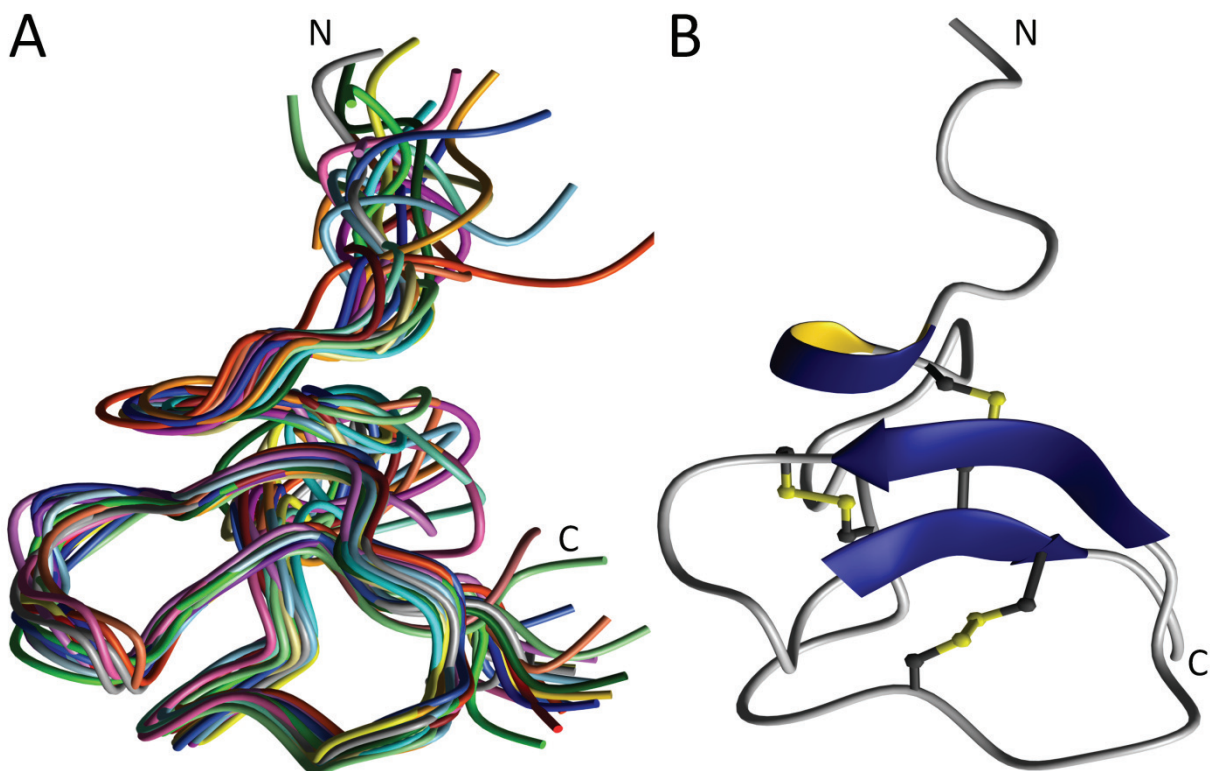


Abbildung 3-26: Die Tertiärstruktur von Chimäre 3. A) Spaghetti-Darstellung des Ensembles der 20 Strukturen mit niedrigster Zielfunktion. B) Band-Darstellung der energieminierten mittleren Struktur. Disulfidbrücken sind als schwarzgelbe Querverbindungen, das α -helikale Segment als blaugoldene Schlaufe und die β -Faltblattstränge sind als blaue Pfeile dargestellt. N und C stehen für N- und C-Terminus.

Der N-Terminus von Chimäre 3 besteht aus einem flexiblen und unstrukturierten Bereich von sechs Aminosäuren, gefolgt von einem kurzen α -helikalen Segment. Eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an Position 11 und 40 der Primärstruktur bringt das α -helikale Segment in die Nähe des Kernbereichs des Peptids. Dem α -helikalen Segment folgt ein hoch flexibler unstrukturierter Bereich, der in eine Abfolge von vier β - und drei γ -Kurven (β -, γ -*turns*) übergeht. Dieser Abschnitt reicht von Arginin 14 bis Tyrosin 27 und wird durch Disulfidbrücken, sowohl zwischen den Cysteinen 18 und 33 als auch zwischen den Cysteinen 23 und 40, an den Kernbereich von Chimäre 3 fixiert. Direkt auf diesen Abschnitt folgt ein antiparalleles β -Faltblatt, bestehend aus zwei Faltblattsträngen und verbunden durch eine β -Haarnadelschleife. Der erste β -Faltblattstrang bildet an seinem N-terminalen

Ende eine β -Ausbuchtung (β -*bulge*), der zweite β -Faltblattstrang entspricht dem Kernbereich des Peptids. Der C-Terminus der Chimäre 3 ist flexibel und wird von den beiden letzten Aminosäuren der Primärstruktur ausgebildet.

Für die energieminierte mittlere Struktur wurde das elektrostatische Oberflächenpotential berechnet und in Abbildung 3-27 dargestellt.

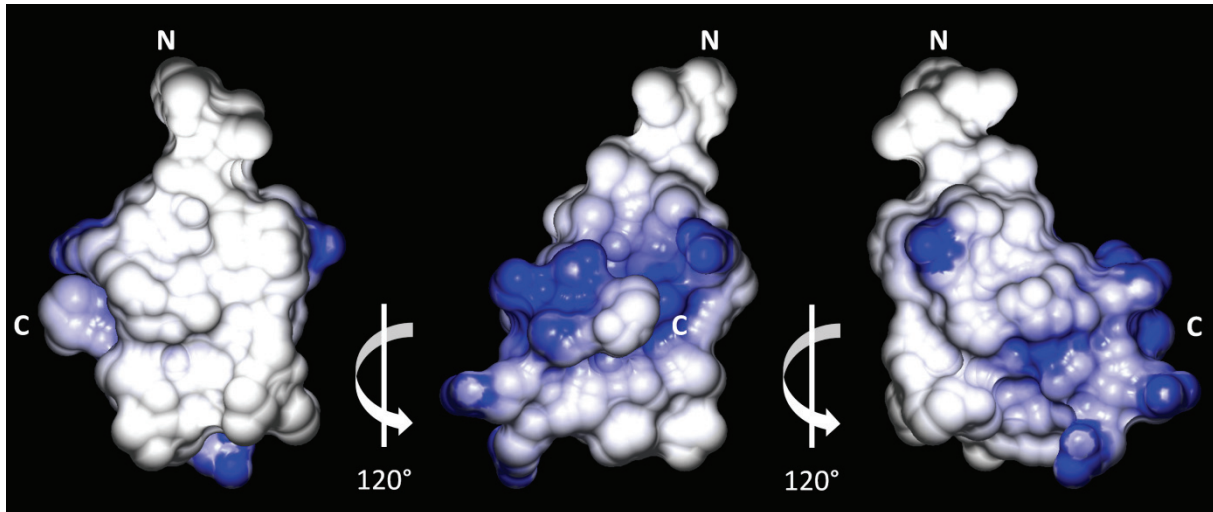


Abbildung 3-27: Die molekulare Oberfläche und das elektrostatische Oberflächenladungspotential der Chimäre 3. Gezeigt ist die Oberfläche des Moleküls. Kationische Areale der Oberfläche sind in Blau, Areale mit neutraler Ladung sind in Weiß dargestellt. N und C stehen für N- und C-Terminus.

Die Oberfläche der Chimäre 3 nimmt eine grob keilförmige Struktur an. Zwei von drei Seiten des Moleküls weisen großflächige Bereiche mit positiver Oberflächenladung auf (blau), die dritte Seite verfügt über keinerlei Oberflächenladung (weiß). An der Moleküloberfläche befinden sich keine negativen Ladungen.

3.3.1 Vergleich der Tertiärstrukturen von Chimäre 3, HBD2 und HBD3

Die Chimäre 3 besteht aus dem N-terminalen Segment von HBD3 sowie aus dem mittleren und dem C-terminalen Segment von HBD2 (Abbildung 3-19). Die Tertiärstrukturen von HBD2 [70] und HBD3 [54] weisen große Ähnlichkeit auf, sie entsprechen einander in der Ausrichtung und Anzahl der Disulfidbrücken und Sekundärstrukturelemente. Die Abbildung 3-28 zeigt die aus NMR-Daten errechneten Tertiärstrukturen von Chimäre 3 (A), HBD3 (B) und HBD2 (C).

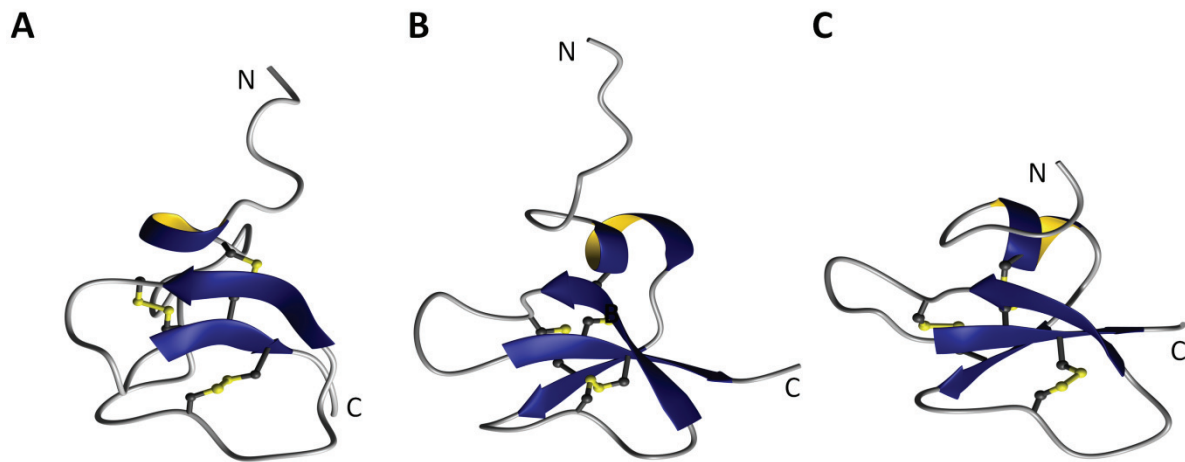


Abbildung 3-28: Band-Modelle der Tertiärstrukturen von Chimäre 3, HBD3 und HBD2. Alle Strukturen zeigen annähernd dieselbe Orientierung. A: Chimäre 3. B: HBD3. C: HBD2. Pfeile symbolisieren β -Faltblattstränge, Spiralen α -Helices. Disulfidbrücken sind in anthrazit und gelb dargestellt. N und C stehen für N- und C-Terminus.

Chimäre 3 verfügt wie HBD3 über einen langen ungeordneten N-terminalen Bereich. Direkt im Anschluss wird von der Chimäre 3 ein kurzes α -helikales Segment ausgebildet. An dieser Position findet sich in den Strukturen von HBD3 und HBD2 ebenfalls eine kurze α -Helix.

HBD3 und HBD2 verfügen jeweils über ein β -Faltblattmotiv, bestehen aus je drei antiparallel angeordneten β -Faltblattsträngen. Chimäre 3 bildet ebenfalls ein β -Faltblattmotiv aus. Im Unterschied zu den Ursprungsmolekülen besteht dieses jedoch aus zwei antiparallelen β -Faltblattsträngen, der β -Faltblattstrang am Übergang von Segment eins (HBD3) zu Segment zwei (HBD2) wird nicht ausgebildet. Während der Winkel zwischen den β -Faltblattsträngen eins und zwei bei den Ursprungsmolekülen kleiner als 35° ist, stehen die entsprechenden Molekülbereiche der Chimäre 3 annähernd senkrecht zueinander. Die ausgebildeten β -Faltblattstränge der Chimäre 3 entsprechen den Faltblattsträngen zwei und drei der Ursprungsmoleküle, sowohl in der Größe als auch in der Ausrichtung. Eine β -Ausbuchtung im zweiten β -Faltblattstrang unter Beteiligung des zweiten Segmentgrenzen-Glycins wird von allen drei Peptiden ausgebildet. Die Ausrichtung und der Umfang der Schleifenbereiche, sowie der β -Faltblattstränge, von Chimäre 3 und HBD2 sind sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch in den Details. So liegen die β -Faltblattstränge der Chimäre 3 eher nebeneinander, während sie sich im Falle von HBD2 leicht kreuzen. Des Weiteren ist die β -Haarnadelschleife von Chimäre 3 weniger stark gestreckt als die Schleife in entsprechender Position von HBD2. In allen drei Molekülen bildet der C-terminale β -Faltblattstrang den Kernbereich des Moleküls aus. Der C-Terminus aller drei Moleküle besteht aus einem kurzen ungeordneten Abschnitt. Die Anzahl und die Ausrichtung der Disulfidbrücken von Chimäre 3 entspricht der von HBD2 und HBD3.

Abbildung 3-29 zeigt die Verteilung der elektrostatischen Oberflächenladungspotentiale auf den molekularen Oberflächen von Chimäre 3 (A), HBD3 (B) und HBD2 (C).

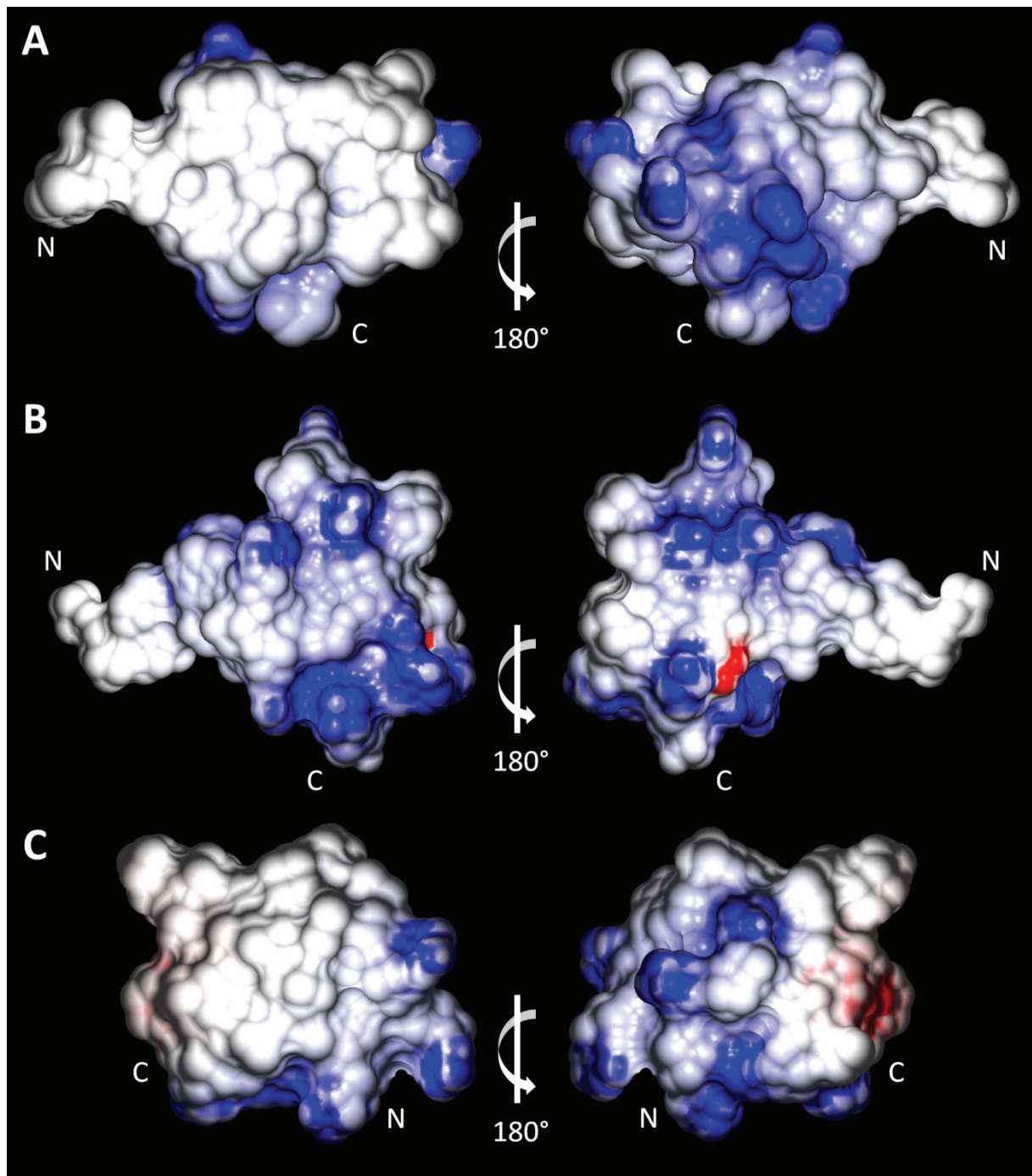


Abbildung 3-29: Die molekularen Oberflächen von Chimäre 3, HBD3 und HBD2. Gezeigt ist das elektrostatische Oberflächenladungspotential von Chimäre 3 (A), HBD3 (B) und HBD2 (C). Die Moleküle weisen annähernd eine identische Orientierung auf. Anionische Bereiche sind rot, kationische Bereiche blau und ungeladene Bereiche sind weiß dargestellt. N und C stehen für N- und C-Terminus.

Die Gestalt der Oberfläche von HBD2 entspricht der eines globulären Proteins. HBD3 verfügt über einen globulären Kernbereich und über einen durch den N-Terminus gebildeten Ausläufer. Die Oberflächenausprägung von Chimäre 3 ähnelt stark der von HBD3. Chimäre 3 verfügt ebenfalls über

einen globulären Kernbereich und einen durch den N-Terminus geformten Ausläufer. Die molekulare Oberfläche ist jedoch insgesamt kompakter als die von HBD3. Chimäre 3 verfügt, im Unterschied zu HBD2 und HBD3, über keine Bereiche mit anionischer Ladung an der Moleküloberfläche. Die beiden letzteren Moleküle bilden nahe des C-Terminus Oberflächenareale mit negativer Ladung aus. Alle drei Peptide verfügen über große Areale mit kationischer Oberflächenladung. Bei HBD3 sind die geladenen Bereiche auf beide Seiten des Moleküls verteilt, getrennt jeweils durch einen schmalen Bereich mit neutraler Oberflächenladung. HBD2 verfügt über eine Seite mit sowohl anionischer als auch kationischer Ladung, die zweite Seite weist auf zwei Dritteln der Fläche keine Ladungen auf. Chimäre 3 trägt in dieser Darstellung die Mehrzahl der kationischen Ladungen auf einer Seite der Moleküloberfläche. Die zweite Seite des Moleküls wird weitgehend durch ungeladene Seitenketten ausgebildet.

4 Diskussion

4.1 Das Zytokin p28

Die p28 Untereinheit von IL-27 wurde aufgrund von Sequenzhomologien der IL-6-Zytokinfamilie zugeordnet [30]. Interleukin-6 gehört zur Gruppe der langkettigen vier-Helix-Bündel Zytokine und ist das namensgebende Molekül der IL-6 Zytokinfamilie.

4.1.1 Das Tertiärstrukturmodell und die Interaktion mit gp130

Das Modell der Tertiärstruktur von p28 basiert auf der bekannten Tertiärstruktur von humanem IL-6 [6, 7] und verfügt wie dieses über vier α -Helices in einer auf-auf-ab-ab Orientierung, sowie über eine kurze Helix in der BC-Schleife. Die hohe Ähnlichkeit der Tertiärstrukturen von IL-6 (eingesetzt als Matrize) und dem Modell von p28 ist methodisch bedingt und ergibt sich zwangsläufig. Gestützt wird das Modell von p28 als vier-Helix-Bündel Zytokin durch das aufgenommene CD-Spektrum, das auf das ausschließliche Vorhandensein von α -Helices hindeutet.

Eine alternative Matrize zur Erstellung des p28 Modells böte die bekannte Tertiärstruktur von CNTF. CNTF verfügt über eine höhere Homologie zu p28 als IL-6 und wurde bereits für die Erstellung eines Modells von EBI3 und p28 eingesetzt. Allerdings musste hierbei zum Modellieren der Rezeptorbindestelle III auf die Tertiärstruktur von IL-6 zurückgegriffen werden, da in dieser die AB-Schleife besser aufgelöst ist [43]. Für die vorliegende Arbeit wurde IL-6 als Matrize gewählt, da das Bindungsepitop III als das entscheidende Element der vorliegenden Problemstellung galt. Zudem wurde für die Untersuchung der Interaktion von p28 und gp130 die Kristallstruktur des löslichen IL-6/IL-6R α Komplex, gebunden an gp130, eingesetzt.

Zur Identifikation des Bindungsepitops III von p28 ist die Erstellung eines dreidimensionalen Modells nicht zwingend notwendig. Dies kann ebenfalls über das Tertiärstruktur-basierte *alignment* von IL-6 und p28 geschehen (Abbildung 3-1). Das Modell von p28 ermöglichte jedoch die Darstellung von p28 gebunden an gp130 und somit die Identifizierung des putativen Bindemechanismus von p28 an die Immunglobulin-ähnliche Domäne von gp130. Zudem gestattet die modellhafte Darstellung einen einfachen und direkten Vergleich der an der Rezeptor/Ligand-Interaktion beteiligten Aminosäuren von IL-6 und p28. Dass das Epitop III von p28 für die Bindung an die Ig-ähnliche Domäne von gp130 verantwortlich ist, konnte bereits mittels Mutagenesestudien gezeigt werden [43].

Der Aufgabenstellung lag die Beobachtung zugrunde, dass rekombinantes p28 in dosis abhängiger Weise die IL6/sIL-6R α , IL-27 und IL-11 vermittelte Signaltransduktion durch gp130 inhibiert. Begründet wurde dies mit einer möglichen niedrig affinen Bindung von p28 an gp130 [36].

Das Modell des Komplexes von p28 und gp130 stützt diese Annahme. Laut Modell beruht die Bindung auf einer hydrophoben Interaktion zwischen p28 und gp130, die bei p28 stärker ausgeprägt

ist, als es an entsprechender Stelle bei IL-6 der Fall ist. Des Weiteren bildet p28 in der Rezeptorbindestelle III eine Salzbrücke zum N-Terminus von gp130 aus, die von IL-6 nicht ausgebildet wird.

Die Bindung von p28 an die Ig-ähnliche Domäne von gp130 ist als niedrig affine Bindung beschrieben worden, der inhibitorische Effekt von p28 auf die Signaltransduktion des IL-6/sIL-6 α ist nur schwach ausgeprägt [37]. Andererseits sind die im Modell identifizierten Interaktionsmechanismen zwischen p28 und der Ig-ähnlichen Domäne von gp130 stärker ausgeprägt als die von IL-6 zur Ig-ähnlichen Domäne von gp130. Diese Beobachtungen erklären sich aus dem Umstand, dass die mit der Ig-ähnlichen Domäne interagierenden Aminosäuren der beiden Zytokine in einer hochflexiblen Schleifenregion liegen. IL-6 muss an den Spezifitäts-vermittelnden IL-6R α binden, bevor eine Bindung von gp130 möglich wird [133]. Die Bindung des IL-6R α scheint die AB-Schleifenregion von IL-6 zu stabilisieren und ermöglicht in der Folge die effektive Bindung des IL-6/sIL-6R α Komplexes an die Ig-ähnlichen Domäne von gp130 [112, 134]. Im Falle von p28 ermöglicht die höhere Affinität von Ligand und Rezeptor die Bindung, trotz der Flexibilität der AB-Schleifenregion und ohne Beteiligung des stabilisierenden p28 spezifischen Alpha-Rezeptors EBI3. Gleichzeitig führt die Flexibilität der Schleifenregion dazu, dass nur eine niedrig affine Bindung zwischen p28 und der Ig-ähnlichen Domäne von gp130 ausgebildet wird.

Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass weitere p28 Molekülbereiche, außerhalb der Bindestelle III, an der Interaktion von p28 mit der Ig-ähnlichen Domäne von gp130 beteiligt sind. Diese Möglichkeit wird jedoch durch das vorgestellte Modell der Bindung von p28 an gp130 nicht unterstützt. Dass p28 an die Ig-ähnliche Domäne und nicht an das Zytokinbindemodul von gp130 bindet, wird durch die Beobachtung bestätigt, dass p28 eine IL-6/sIL-6R α , IL-27 oder IL-11 vermittelte STAT3 Phosphorylierung hemmt [37]. Diese Zytokine binden mit ihrer jeweiligen Bindestelle III an die Ig-ähnliche Domäne von gp130. Nicht gehemmt wird jedoch die OSM vermittelte STAT3 Phosphorylierung. Das Zytokin OSM bindet an das Zytokinbindemodul von gp130, nicht aber an die Ig-ähnliche Domäne [16, 37].

Das erstellte Modell bietet eine Erklärung für die beobachtete Bindung von p28 an die Ig-ähnliche Domäne gp130. Dennoch handelt es sich um ein Modell der Interaktion und somit um eine, wenn auch fundierte, *in silico* Vorhersage. Um die beschriebenen Interaktionsmechanismen zu bestätigen, bedarf es entweder einer experimentellen Überprüfung, beispielsweise durch Mutagenese-Experimente, oder der genauen Kenntnis der Tertiärstruktur von p28. Des Weiteren können durch NMR-spektroskopische Messungen von markiertem p28, gebunden an den nicht markierten Rezeptor gp130, die an der Bindung beteiligten Aminosäuren von p28 identifiziert werden. Hierfür müssen die Spektren von an gp130 gebundenen und ungebundenen p28 verglichen werden, die beobachteten Verschiebungen erlauben die Identifizierung der an der Bindung beteiligten Aminosäurereste.

4.1.2 Das Reinigungs- und Expressionsprotokoll

Um die Grundlage für die Strukturaufklärung von p28 mittels der NMR-Spektroskopie zu schaffen, sollte in der vorliegenden Arbeit ein Expressions- und Reinigungsprotokoll für p28 etabliert werden.

In zwei parallelen Ansätzen wurde die Reinigung von murinem und humanem p28 angestrebt. Da die Renaturierung des murinem p28 im Gegensatz zum humanem p28 erfolgreich war, wurde in der Folge mit murinem p28 gearbeitet. Das Modell der Interaktion der Bindestelle III von humanem p28 und der Ig-ähnliche Domäne von humanem gp130 lässt sich nicht vollständig auf murines p28 übertragen. Zwar beträgt die Sequenzidentität zwischen humanem und murinem p28 73 % [30], die Bindestelle III ist zudem weitestgehend konserviert, dennoch kann die im humanem p28/gp130 Modell identifizierte Salzbrücke von murinem p28 nicht ausgebildet werden. Das an entsprechender Position gelegene hydrophile Tyrosin verfügt, im Gegensatz zum Glutamat im humanem p28, über keine negative Ladung in der Seitenkette. Die Ausbildung einer Salzbrücke an entsprechender Position zwischen murinem p28 und humanem gp130 ist somit nicht möglich. Die hydrophobe Leucin-Leucin Interaktion kann auch zwischen mp28 und hgp130 ausgebildet werden. Dass eine Bindung von murinem p28 an humanes gp130 trotzdem möglich ist, konnte anhand von Proliferationsversuchen mit murinem IL-27 gezeigt werden [34]. Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Test auf biologische Aktivität für rekombinantes murines p28 bestätigt (Abschnitt 3.1.7). In diesem Experiment bindet p28 an den IL-6R α , der so entstandene Komplex bindet gp130 und verfügt über biologische Aktivität [44]. Des Weiteren bestätigen Plasmonresonanzexperimente das Binden des rekombinanten mp28 an humanes gp130 (persönliche Kommunikation Dr. Inken Lorenzen). Trotz der Unterschiede in der Primärstruktur zu hp28 ist das Ausweichen auf murines p28 deshalb ein vielversprechender Ansatz.

Um den Interaktionsmechanismus von p28 und gp130 zweifelsfrei zu klären, müsste sich an die vorliegende Arbeit die Aufklärung der Tertiärstruktur von p28 anschließen. Die Grundlage zur NMR-spektroskopischen Ermittlung der Tertiärstruktur ist mit der erfolgreichen Etablierung eines Reinigungs- und Renaturierungsprotokolls vorhanden. Um die Vermutung zu überprüfen, dass es sich bei dem im Zuge der Proteinreinigung detektierten Fragment (Abbildung 3-7) um eine His-Tag freie Variante von mp28 handelt und um die Probe weiter zu reinigen, könnte eine zusätzliche Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Das Vorhandensein einer His-Tag freien mp28 Variante könnte auf Degradationsprozesse durch Proteasen während der Reinigung und Renaturierung des Proteins beruhen. Als Alternativen zur Nickel-Affinitätschromatographie böten sich entweder eine Ionenaustausch- oder eine Hydrophobizitätschromatographie an, letztere Verfahren verfügen, in Abhängigkeit des gewählten Gradienten, über eine höhere „Trennschärfe“.

Aufgrund der Größe des Moleküls von 24,6 kDa und der daraus resultierenden hohen Anzahl von Signalen in den NMR-Spektren, müssten für die Aufklärung der Tertiärstruktur Tripelresonanz-

Spektren aufgenommen werden. Hierfür müsste das Protein mit dem Kohlenstoffisotop ^{13}C und dem Stickstoffisotop ^{15}N markiert werden. Vorversuche zur entsprechenden Markierung von p28 wurden erfolgreich durchgeführt, markiertes murines p28 konnte in *E. coli* BL21 DE3 exprimiert werden (persönliche Kommunikation Agnes Nolting).

Das vorgeschlagene Modell für die Bindung von p28 an gp130 stützt die experimentellen Daten von Stumhofer *et al.* Das Modell könnte anhand einer experimentell ermittelten Tertiärstruktur von p28 auf seine Konsistenz überprüft werden. Die Grundlagen für die Ermittlung der Tertiärstruktur mittels NMR-Spektroskopie sind mit dem in dieser Arbeit etablierten Expressions-, Reinigungs- und Renaturierungsprotokoll vorhanden.

4.2 Chimäre 3

4.2.1 Die Probenvorbereitung

Synthetisches Chimäre 3 Peptid wurde renaturiert und mittels RP-HPLC gereinigt. Das gereinigte Peptid wurde auf seine antimikrobielle Aktivität getestet. Die beobachtete Aktivität gegen verschiedene humanpathogene Erreger stützt die Annahme, dass das Peptid in gefalteter Form vorliegt. Die Analyse der Sekundärstruktur der Chimäre 3 mittels CD-Spektroskopie weist auf das Vorhandensein eines β -Faltblattmotives hin. Die beobachtete Temperaturstabilität spricht für eine Stabilisierung der Struktur, die über das Ausbilden von Wasserstoff- und Salzbrücken hinausgeht. Diese Stabilisierung kann mit der Ausbildung der drei Disulfidbrücken in Verbindung gebracht werden, da den β -Defensinen ein strukturstabilisierender hydrophober Kern fehlt [98, 135].

4.2.2 Die sequenzspezifische Zuordnung

Chimäre 3 besteht aus 44 Aminosäureresten. Im Idealfall können davon 43, alle bis auf die erste N-terminale Aminosäure, sowohl im TOCSY- als auch im NOESY-Spektrum identifiziert werden. Während die aufgenommen TOCSY-Spektren eine entsprechende Anzahl an Spinsystemen beinhalten, konnten in den NOESY-Spektren nur 32 Spinsysteme identifiziert und insgesamt 31 Aminosäuren zugeordnet werden. Die Diskrepanz zwischen der Anzahl der detektierten Spinsysteme in den TOCSY- und NOESY-Spektren deutet auf eine hohe Flexibilität der entsprechenden Molekülbereiche hin. Es handelt sich dabei um den N- und den C-Terminus, sowie einen Schleifenbereich des C-terminalen HBD2-Segments. Diese Bereiche sind für HBD2 und HBD3 ebenfalls als flexibel beschrieben worden [55, 81]. Ein weiterer hochflexibler Molekülbereich reicht vom Argininrest 12 bis zum Alaninrest 16 und erstreckt sich somit über die Segmentgrenze des N-terminal gelegenen HBD3- und des mittleren HBD2-Segments. Diese Molekülregion weist in den Ursprungsmolekülen HBD2 und HBD3 eine deutlich geringere Flexibilität auf [54, 70].

4.2.3 Die Sekundärstrukturvorhersage mittels CSI-Plot

Die Vorhersage der Sekundärstrukturelemente beruht auf den gemessenen chemischen Verschiebungen der H^α -Protonen, die Auswertung erfolgte nach dem Protokoll von Wishart *et al.* [132]. Laut Vorhersage verfügt die Chimäre 3 über das β -Defensin-typische $CS\alpha\beta\beta\beta$ -Strukturmotiv, bestehend aus einer N-terminalen α -Helix und einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt, stabilisiert durch drei Disulfidbrücken [50]. Der vorhergesagte N-terminale β_1 -Faltblattstrang, besteht aus drei Aminosäureresten und erfüllt damit die Minimalanforderungen zur Ausprägung eines β -Faltblattstranges. Auch die aus fünf Aminosäureresten bestehende α -Helix stellt ein sehr kurzes Sekundärstrukturelement dar. Eine durchschnittliche Helixwindung umfasst 3,6 Aminosäurereste. Die Vorhersagewahrscheinlichkeit dieser Methode beträgt etwa 90 % [132]. Der CSI-Plot ermöglicht einen schnellen Überblick über die Sekundärstrukturelemente eines Proteins, was durchaus hilfreich für den Prozess der Strukturaufklärung ist. Diese Methode kann jedoch die experimentelle Bestimmung der Sekundärstrukturelemente nicht ersetzen.

4.2.4 Die Wasserstoff- und Disulfidbrücken

Die Identifizierung der für die Berechnung der Tertiärstruktur berücksichtigten Wasserstoffbrücken der Chimäre 3 basiert auf der Identifizierung von potentiellen Donator-Protonen in den D_2O -NOESY-Spektren, sowie der Lage von Donator-Proton und Akzeptor-Sauerstoffatom in der Tertiärstruktur. Die in der Strukturberechnung von Chimäre 3 berücksichtigten Wasserstoffbrücken werden alle zwischen Atomen der HBD2-Segmente ausgebildet. Die Existenz dieser Brücken wird von Sawai *et al.* für HBD2 bestätigt [70].

Das Ergebnis der Ellman-Reaktion, der Massenbestimmung des gereinigten Peptids, sowie der Untersuchung zur Temperaturstabilität, weisen auf das Vorhandensein von Disulfidbrücken hin. Entsprechend des konservierten Brückenmusters der β -Defensine sollten die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten Cys11 und Cys40, Cys18 und Cys33, sowie Cys23 und Cys41 ausgebildet werden. Die Positionierung der Cysteinseitenketten Cys23 und Cys41 in der Tertiärstruktur legt die Ausbildung dieser Brücke nahe. Die Tertiärstruktur der Chimäre 3 ermöglicht zudem die Ausbildung der Disulfidbrücken Cys11 und Cys40, sowie Cys18 und Cys33. Strukturrechnungen mit unterschiedlich gepaarten Cysteinresten ergaben, dass die energetisch günstigste Kombination der Disulfidbrücken dem konservierten Brückenmuster der β -Defensine entspricht.

Um die Disulfidbrücken experimentell zu bestätigen, müsste die renaturierte Chimäre 3 mittels Proteasen verdaut werden. Die sich ergebenden Fragmente könnten in der Folge massenspektrometrisch oder mittels Edman-Abbau identifiziert werden und würden Rückschlüsse auf die ausgebildeten Disulfidbrücken ermöglichen.

4.2.5 Die Tertiärstruktur der Chimäre 3

Anhand der vorliegenden NMR-Spektren konnte die Tertiärstruktur der Chimäre 3 erfolgreich aufgeklärt werden. Chimäre 3 verfügt N-terminal über ein kurzes α -helikales Segment und ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt. Die Tertiärstruktur der Chimäre 3 weicht somit vom $CS\alpha\beta\beta$ -Strukturmotiv der β -Defensine ab [50]. Der bei den humanen β -Defensinen vorhandene β_1 -Faltblattstrang wird in der Tertiärstruktur von Chimäre 3 nicht ausgebildet. Die chemischen Verschiebungen der H^α -Protonen der Aminosäureseitenketten von Isoleucin 17, Cystein 18 und Histidin 19 weisen auf das Vorhandensein eines β -Faltblattstranges hin. Das Peptidrückgrat dieser Aminosäurereste liegt jedoch nicht längs, sondern steht in einem Winkel von annähernd 90° zu den vorhandenen β -Faltblattsträngen. In Folge dessen wird der β_1 -Faltblattstrang nicht ausgebildet. Die beiden Faltblattstränge der Chimäre 3 entsprechen in ihrer Ausbildung den Strängen β_2 und β_3 der humanen β -Defensine. Eine im N-terminalen β -Faltblattstrang ausgebildete β -Ausbuchtung ist in allen bekannten β -Defensinstrukturen konserviert [54, 70-72]. Die Funktion dieser β -Ausbuchtung gilt als unbekannt [71]. Das N-terminale α -helikale Segment von Chimäre 3 ist nur schwach ausgeprägt, es umfasst eine einzelne Helixwindung. Es ist jedoch bekannt, dass die Länge und Regelmäßigkeit der N-terminalen α -Helix durch die gewählten experimentellen Bedingungen beeinflusst wird. So wurde beobachtet, dass die α -Helix in Röntgenkristallstrukturen deutlicher ausgeprägt ist als in NMR-Strukturen [68].

Trotz der Unterschiede in der Tertiärstruktur bildet die Chimäre 3 ebenso wie die Ursprungsmoleküle HBD2 und 3 eine amphipathische Tertiärstruktur aus. Im Gegensatz zu HBD2 und 3 verfügt Chimäre 3 über keine anionischen Ladungen an der Moleküloberfläche, die kationischen Ladungen treten gehäuft auf zwei von drei Oberflächendritteln auf. Ein Drittel der Oberfläche sowie der gesamte N-Terminus tragen keine Ladungen.

4.2.6 Einfluss der Tertiärstruktur auf die antimikrobielle Aktivität der Chimäre 3

Die beobachtete hohe antimikrobielle Aktivität der Chimäre 3 kann auf der hohen Nettoladung (+9), verbunden mit einer hohen Ladungsdichte auf der Moleküloberfläche, sowie auf der hohen Flexibilität des Moleküls, beruhen. Die Ladungsdichte und die Verteilung ungeladener Aminosäurereste an der Moleküloberfläche werden durch die Tertiärstruktur vermittelt und gelten als wesentlich für die Aktivität der Defensine. So wurde festgestellt, dass die Tertiärstrukturvermittelten Ladungsdichten von HBD3-Derivaten mit deren antimikrobiellen Aktivität korrelieren [90], [96]. Ergänzend wurde beschrieben, dass HBD3 Derivate, die durch das Ersetzen der Cysteinreste linearisiert wurden, über eine stärkere antimikrobielle Aktivität verfügen als die Wildtyp Form. Als Ursache wird die erhöhte Flexibilität der linearisierten Form angenommen [136]. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Mechanismus auch für Chimäre 3 gültig ist. Diese verfügt über

eine im Vergleich zu den Ursprungsmolekülen deutlich erhöhte Flexibilität. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die beschriebenen linearisierten Formen sowohl in wässriger Lösung als auch in Kontakt mit anionischen Micellen Sekundärstrukturelemente ausbilden, also nicht völlig ohne Faltung vorlagen [90, 136]. Im Gegensatz zu HBD3 verliert reduziertes HBD2 die Fähigkeit anionische Vesikel zu permeabilisieren [72]. Die elektrostatische Interaktion ist für HBD2 essentiell, ein zunehmender Anteil von neutralen Lipiden an der Vesikelzusammensetzung führt zu einer drastischen Reduktion der Permeabilisierung [72]. Für Chimäre 3 ließe sich daraus ableiten, dass eine höhere Flexibilität im N-terminalen HBD3-Segment, als auch eine ausgeprägte Struktur mit hoher Ladungsdichte, wie sie in den beiden HBD2-Segmenten auftritt, für die Aktivität förderlich sein könnte. Möglicherweise wird die hohe Aktivität der Chimäre 3 erst durch die Kombination dieser Mechanismen vermittelt.

Zu diesen Vermutungen passt die Hypothese, dass der Kontakt mit der bakteriellen Zellmembran die Ausprägung der Tertiärstruktur der Defensine beeinflusst [95]. Beobachtet wurde dies bereits für die N-terminale α -Helix von HBD3 [136]. Der genaue Einfluss der α -Helix Membraninsertion auf den Wirkmechanismus der humanen β -Defensine ist jedoch nicht geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass nach der elektrostatischen Attraktion der Defensine an die Membran das Eintauchen in selbige erfolgen muss. Aufgrund der amphipathischen Struktur des N-Terminus der β -Defensine, wird angenommen, dass diese Region für die Membraninsertion zuständig ist [70, 137]. Somit kann vermutet werden, dass die N-terminale α -Helix von Chimäre 3 hierbei eine zentrale Funktion inne hat. Insbesondere da für HBD3 bereits beschrieben wurde, dass die α -Helix durch Lipidkontakt stabilisiert wird [136]. Der flexible Bereich, bestehend aus hydrophoben Aminosäureresten, der der α -Helix von HBD3 vorangeht, gilt als bedeutend für hydrophobe Interaktionen [90]. Selbiges wäre auch für die entsprechenden Aminosäurereste von Chimäre 3 anzunehmen, da das N-terminale Segment aus der HBD3-Primärstruktur stammt.

4.2.7 Der Wirkmechanismus: Porenbildung, Carpet-Modell oder intrazelluläre Ziele?

HBD3 bildet in Lösung Dimere [54], HBD2 liegt auch in hohen Konzentrationen als Monomer vor [54, 70]. Im Kristall kann HBD2 jedoch als massives Oktamer vorliegen [72]. Die Ausbildung einer Pore oder eines Ionenkanals ist durch das HBD2-Oktamer ohne signifikante Bewegung der einzelnen Moleküle nicht möglich. Die Ladungsverteilung der Moleküle verhindert zudem das Ausbilden einer Lipiddoppelschicht-durchspannenden Pore [72]. Für Chimäre 3 ist bisher weder eine Dimerbildung, noch die Ausbildung einer Pore beobachtet worden.

Für die humanen β -Defensine wird angenommen, dass die antimikrobielle Aktivität über einen ladungsbasierten Effekt vermittelt wird, der zur Permeabilisierung der bakteriellen Membran führt [54, 68, 70-72]. Dieser Effekt kann, wie für HBD3 beobachtet, zur Lyse der bakteriellen Membran führen [75, 91]. Die Ausbildung einer stabilen Pore gilt für HBD1 bis 3 als unwahrscheinlich

[71, 72, 92]. Zudem wird angenommen, dass eine antimikrobielle Wirkung durch die Bindung an extra- oder intrazelluläre bakterielle Ziele auftritt [70, 92]. Häufig stehen diese Ziele im Zusammenhang mit Proteinkomponenten der bakteriellen Plasmamembran oder Zellwandbiosynthese. So kann HBD3 den Lipid II Block binden und damit die Zellwandsynthese von *S. aureus* inhibieren [91].

Der Wirkmechanismus für Chimäre 3 lässt sich im Detail aus der ermittelten Tertiärstruktur nicht bestimmen. Die hohe Ähnlichkeit der Strukturen von HBD2, HBD3 und Chimäre 3 legt allerdings nahe, dass die Mechanismen der Moleküle sich ähneln, möglicherweise sogar entsprechen.

4.2.8 Ausblick

Seit dem ersten Einsatz von Penicillin 1941 wurde mit zunehmender Häufigkeit die Resistenz von humanpathogenen Erregern gegenüber Antibiotika, sowie das Auftreten von multiresistenten Erregern beobachtet [138]. Eine aktuelle Studie beschreibt *S. aureus* Stämme, die Resistenzen gegenüber bis zu neun Antibiotika zeigen [139]. AMPs gelten als vielversprechende Kandidaten für eine neue Gruppe von Antibiotika, da eine Resistenzentwicklung seitens der Bakterien wegen des meist wenig spezifischen Wirkmechanismus als schwierig gilt und ebenso wegen des breiten Wirkspektrums, das auch multiresistente Erreger umfasst [59, 140].

Die Optimierung und die Kenntnis der Wirkmechanismen von AMPs sind in Hinblick auf einen möglichen pharmazeutischen Einsatz von großer Bedeutung. Die vorgestellte Tertiärstruktur der Chimäre 3 trägt zum besseren Verständnis des Wirkmechanismus der β -Defensine, einer bedeutenden Klasse der humanen AMPs, bei.

5 Zusammenfassung

IL-27 ist ein heterodimeres Zytokin aus der Familie der IL-6-ähnlichen Zytokine. Es besteht aus dem löslichen Zytokinrezeptor-ähnlichen Molekül EBI3 und dem langkettigen vier-Helix-Bündel Zytokin p28. IL-27 kann durch die Bindung zweier Rezeptoren der gp130 Rezeptorfamilie, WSX-1 und gp130, eine Signaltransduktion in der Zielzelle auslösen. Kürzlich wurde beschrieben, dass die p28 Untereinheit auch ohne ihren löslichen α -Rezeptor EBI3 über eine biologische Aktivität verfügt. Beobachtet wurde eine Inhibierung der gp130-vermittelten Signaltransduktion, wobei als Mechanismus die Bindung von p28 an den Rezeptor gp130 vorgeschlagen wurde. Da die Tertiärstruktur von p28 nicht aufgeklärt ist, sollte ein Modell entwickelt werden, um diese Hypothese zu überprüfen. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde deswegen *in silico* ein Tertiärstrukturmodell des humanen p28, sowie ein Modell der Interaktion von p28 und gp130 erstellt. Das vorgestellte Modell stützt die Hypothese zur Interaktion von p28 und gp130. Demnach beruht die Interaktion auf einer im Vergleich zu IL-6 erhöhten Affinität zwischen den Aminosäureresten der AB-Schleife von p28 und dem N-Terminus von gp130. Um eine Grundlage für die NMR-spektroskopische Strukturaufklärung von p28 zu schaffen und um die Möglichkeit zu erhalten, das vorgeschlagene Modell experimentell zu überprüfen, wurde zudem ein Expressions-, Reinigungs- und Renaturierungsprotokoll für murines p28 etabliert.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit behandelt die Tertiärstruktur eines Designer-Peptids, bestehend aus drei rekombinierten Primärstruktursegmenten der humanen β -Defensin 2 und 3. Das als Chimäre 3 bezeichnete Peptid verfügt über eine im Vergleich zu den Ursprungsmolekülen erhöhte antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* und *E. coli*. Das Wirkspektrum des Peptids umfasst zudem multiresistente Gram-positive und Gram-negative Bakterien.

Um den Wirkmechanismus des Designer-Peptids näher zu bestimmen, sollte die Tertiärstruktur der Chimäre 3 mittels zweidimensionaler homonuklearer NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Renaturierungsprotokoll für Chimäre 3 etabliert. Von dem gereinigten und renaturierten Peptid wurden 2D-NMR-Spektren aufgenommen. Die ermittelte Tertiärstruktur der Chimäre 3 entspricht einem durch Disulfidbrücken stabilisierten α -Helix/ β -Faltblattmotiv und weist eine hohe strukturelle Verwandtschaft zu den β -Defensinen auf. Im Vergleich zu den humanen β -Defensin Tertiärstrukturen zeichnet sich die Struktur von Chimäre 3 durch eine erhöhte Flexibilität aus. Zudem verfügt Chimäre 3 an der Moleküloberfläche über eine hohe kationische Ladungsdichte. Sowohl die Flexibilität als auch die hohe Dichte an kationischen Ladungen können eine Ursache für die starke antimikrobielle Aktivität der Chimäre 3 darstellen.

6 Summary

IL-27 is a heterodimeric cytokine which belongs to the IL-6 type family of cytokines. The heterodimer consists of the soluble cytokine receptor-like molecule EBI3 and the long chain four-helix-bundle cytokine p28. IL-27 induces signal transduction via binding of two receptors of the gp130 receptor family, namely WSX-1 and gp130. Recently it was shown that the p28 subunit by itself has a biological activity without binding to the soluble α -receptor-like subunit EBI3. An inhibition of the gp130 mediated signaling was observed whereupon the binding of p28 to the receptor gp130 was suggested as a possible mechanism. As the tertiary structure of p28 is still not known, a model for testing this hypothesis was intended to be developed. In the first part of this thesis an *in silico* model of the three-dimensional structure of the human p28 and of the interaction between p28 and gp130 was developed. The presented model corroborates the hypothesis of an interaction of p28 and gp130. This interaction seems to be based on a higher affinity mediated by residues of the AB-loop of p28 and the N-terminus of gp130, if compared to IL-6. As a basis for the structure determination of p28 by NMR spectroscopy an expression-, purification- and refolding protocol was established. The purified protein also provides the possibility to verify the proposed model in further studies.

The second part of this thesis describes the tertiary structure determination of an antimicrobial designer-peptide consisting of three recombined primary structure segments of the human β -defensins 2 and 3. The peptide, named Chimera 3, shows a higher antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* compared to its parent molecules. The peptide's spectrum of activity includes multi-drug resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria.

To define the mode of action of the designer-peptide the tertiary structure of Chimera 3 was determined by two-dimensional homonuclear NMR-spectroscopy. A refolding protocol for Chimera 3 was established and NMR spectra of the purified and refolded peptide were recorded. The determined tertiary structure forms a cysteine-stabilized α -helix/ β -sheet motif showing a high structural homology to β -defensins. Compared to the structure of human β -defensins the Chimera 3 exhibits a higher flexibility and furthermore has a high density of cationic charges at the molecule surface. Both, flexibility and charge density can be regarded as the basis for the high antimicrobial activity of Chimera 3.

7 Literaturverzeichnis

- [1] J.-L. Boulay, J. J. O'Shea, and W. E. Paul, "Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors," *Immunity*, vol. 19, no. 2, pp. 159-163, Aug. 2003.
- [2] J. Grötzinger, "Molecular mechanisms of cytokine receptor activation," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1592, no. 3, pp. 215-223, Nov. 2002.
- [3] M. O. Huising, C. P. Kruiswijk, and G. Flik, "Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines," *The Journal of Endocrinology*, vol. 189, no. 1, pp. 1-25, Apr. 2006.
- [4] D. R. Davies and A. Wlodawer, "Cytokines and their receptor complexes," *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 9, no. 1, pp. 50-56, Jan. 1995.
- [5] X. Wang, P. Lupardus, S. L. Laporte, and K. C. Garcia, "Structural biology of shared cytokine receptors," *Annual Review of Immunology*, vol. 27, pp. 29-60, 2009.
- [6] W. Somers, M. Stahl, and J. S. Seehra, "1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling," *The EMBO Journal*, vol. 16, no. 5, pp. 989-997, Mar. 1997.
- [7] G. Y. Xu et al., "Solution structure of recombinant human interleukin-6," *Journal of Molecular Biology*, vol. 268, no. 2, pp. 468-481, May. 1997.
- [8] K. J. Kallen et al., "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," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 17, pp. 11859-11867, Apr. 1999.
- [9] J. Bravo and J. K. Heath, "Receptor recognition by gp130 cytokines," *The EMBO Journal*, vol. 19, no. 11, pp. 2399-2411, Jun. 2000.
- [10] S. Pflanz et al., "WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 172, no. 4, pp. 2225-2231, Feb. 2004.
- [11] J. F. Bazan, "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 18, pp. 6934-6938, Sep. 1990.
- [12] S. Tenhumberg et al., "gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 346, no. 3, pp. 649-657, Aug. 2006.
- [13] T. Taga and T. Kishimoto, "Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines," *Annual Review of Immunology*, vol. 15, pp. 797-819, 1997.
- [14] S. R. Dillon et al., "Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis

- in mice," *Nature Immunology*, vol. 5, no. 7, pp. 752-760, Jul. 2004.
- [15] J. Grötzinger, T. Kernebeck, K. J. Kallen, and S. Rose-John, "IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?," *Biological Chemistry*, vol. 380, no. 7-8, pp. 803-813, Aug. 1999.
- [16] A. Timmermann et al., "Different epitopes are required for gp130 activation by interleukin-6, oncostatin M and leukemia inhibitory factor," *FEBS Letters*, vol. 468, no. 2-3, pp. 120-124, Feb. 2000.
- [17] P. C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Müller-Newen, and F. Schaper, "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation," *The Biochemical Journal*, vol. 374, no. 1, pp. 1-20, Aug. 2003.
- [18] J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John, "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1813, no. 5, pp. 878-888, May. 2011.
- [19] A. Mackiewicz, H. Schooltink, P. C. Heinrich, and S. Rose-John, "Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 149, no. 6, pp. 2021-2027, Sep. 1992.
- [20] G. Müller-Newen et al., "Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing," *European Journal of Biochemistry / FEBS*, vol. 236, no. 3, pp. 837-842, Mar. 1996.
- [21] S. Rose-John and P. C. Heinrich, "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function," *The Biochemical Journal*, vol. 300 (Pt 2), pp. 281-290, Jun. 1994.
- [22] V. Matthews et al., "Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 40, pp. 38829-38839, Oct. 2003.
- [23] C. Garbers et al., "Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 17, pp. 14804-14811, Apr. 2011.
- [24] T. Kishimoto, S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga, "Interleukin-6 family of cytokines and gp130," *Blood*, vol. 86, no. 4, pp. 1243-1254, Aug. 1995.
- [25] J. Gauldie, C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp, and H. Baumann, "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 20, pp. 7251-7255, Oct. 1987.

- [26] A. Chalaris, C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John, and J. Scheller, "The soluble Interleukin 6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer," *European Journal of Cell Biology*, vol. 90, no. 6-7, pp. 484-494, Jul. 2011.
- [27] M. Tanaka et al., "Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, no. 1, pp. 137-144, Jul. 2000.
- [28] M. Narazaki et al., "Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130," *Blood*, vol. 82, no. 4, pp. 1120-1126, Aug. 1993.
- [29] T. Jostock et al., "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses," *European Journal of Biochemistry / FEBS*, vol. 268, no. 1, pp. 160-167, Jan. 2001.
- [30] S. Pflanz et al., "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells," *Immunity*, vol. 16, no. 6, pp. 779-790, Jun. 2002.
- [31] O. Devergne et al., "A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes," *Journal of Virology*, vol. 70, no. 2, pp. 1143-1153, Feb. 1996.
- [32] C. A. Sprecher et al., "Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 246, no. 1, pp. 82-90, May. 1998.
- [33] S. Lucas, N. Ghilardi, J. Li, and F. J. de Sauvage, "IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 25, pp. 15047-15052, Dec. 2003.
- [34] J. Scheller, B. Schuster, C. Hölscher, T. Yoshimoto, and S. Rose-John, "No inhibition of IL-27 signaling by soluble gp130," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 326, no. 4, pp. 724-728, Jan. 2005.
- [35] M. Batten and N. Ghilardi, "The biology and therapeutic potential of interleukin 27," *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, vol. 85, no. 7, pp. 661-672, Jul. 2007.
- [36] J. S. Stumhofer et al., "Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system," *Nature Immunology*, vol. 7, no. 9, pp. 937-945, Sep. 2006.
- [37] J. S. Stumhofer et al., "A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 12, pp. 1119-1126, Dec. 2010.
- [38] H. Yoshida, M. Nakaya, and Y. Miyazaki, "Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 86, no. 6, pp. 1295-1303, Dec. 2009.
- [39] S.-C. Chae et al., "Identification of polymorphisms in human interleukin-27 and their

- association with asthma in a Korean population," *Journal of Human Genetics*, vol. 52, no. 4, pp. 355-361, 2007.
- [40] C.-S. Li et al., "Interleukin-27 polymorphisms are associated with inflammatory bowel diseases in a Korean population," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 24, no. 10, pp. 1692-1696, Oct. 2009.
- [41] M. Imielinski et al., "Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease," *Nature Genetics*, vol. 41, no. 12, pp. 1335-1340, Dec. 2009.
- [42] M. Hisada et al., "Potent antitumor activity of interleukin-27," *Cancer Research*, vol. 64, no. 3, pp. 1152-1156, Feb. 2004.
- [43] F. Rousseau, L. Basset, J. Froger, N. Dinguirard, S. Chevalier, and H. Gascan, "IL-27 structural analysis demonstrates similarities with ciliary neurotrophic factor (CNTF) and leads to the identification of antagonistic variants," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 45, pp. 19420-19425, Nov. 2010.
- [44] S. Crabé et al., "The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 183, no. 12, pp. 7692-7702, Dec. 2009.
- [45] O. Shimozato et al., "The secreted form of p28 subunit of interleukin (IL)-27 inhibits biological functions of IL-27 and suppresses anti-allogeneic immune responses," *Immunology*, vol. 128, no. 1, pp. e816-825, Sep. 2009.
- [46] R. E. Hancock and G. Diamond, "The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences," *Trends in Microbiology*, vol. 8, no. 9, pp. 402-410, Sep. 2000.
- [47] K. L. Brown and R. E. W. Hancock, "Cationic host defense (antimicrobial) peptides," *Current Opinion in Immunology*, vol. 18, no. 1, pp. 24-30, Feb. 2006.
- [48] M. Zasloff, "Antimicrobial peptides of multicellular organisms," *Nature*, vol. 415, no. 6870, pp. 389-395, Jan. 2002.
- [49] H. Jensen, P. Hamill, and R. E. W. Hancock, "Peptide antimicrobial agents," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 19, no. 3, pp. 491-511, Jul. 2006.
- [50] M. Wilmes, B. P. A. Cammue, H.-G. Sahl, and K. Thevissen, "Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation," *Natural Product Reports*, May. 2011.
- [51] A. Rozek, C. L. Friedrich, and R. E. Hancock, "Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles," *Biochemistry*, vol. 39, no. 51, pp. 15765-15774, Dec. 2000.
- [52] J. Gesell, M. Zasloff, and S. J. Opella, "Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles,

- sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution," *Journal of Biomolecular NMR*, vol. 9, no. 2, pp. 127-135, Feb. 1997.
- [53] N. Mandard et al., "Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data," *European Journal of Biochemistry / FEBS*, vol. 256, no. 2, pp. 404-410, Sep. 1998.
- [54] D. J. Schibli et al., "The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 10, pp. 8279-8289, Mar. 2002.
- [55] M. E. Selsted and A. J. Ouellette, "Mammalian defensins in the antimicrobial immune response," *Nature Immunology*, vol. 6, no. 6, pp. 551-557, Jun. 2005.
- [56] J. D. Heilborn et al., "The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 120, no. 3, pp. 379-389, Mar. 2003.
- [57] M. N. Marra, C. G. Wilde, J. E. Griffith, J. L. Snable, and R. W. Scott, "Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 144, no. 2, pp. 662-666, Jan. 1990.
- [58] J. Aarbiou et al., "Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 30, no. 2, pp. 193-201, Feb. 2004.
- [59] J. Harder, R. Gläser, and J.-M. Schröder, "Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity," *Journal of Endotoxin Research*, vol. 13, no. 6, pp. 317-338, 2007.
- [60] J. H. Wong, L. Xia, and T. B. Ng, "A review of defensins of diverse origins," *Current Protein & Peptide Science*, vol. 8, no. 5, pp. 446-459, Oct. 2007.
- [61] P. H. Mygind et al., "Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus," *Nature*, vol. 437, no. 7061, pp. 975-980, Oct. 2005.
- [62] S. Zhu, "Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CSalphabeta defensins," *Molecular Immunology*, vol. 45, no. 3, pp. 828-838, Feb. 2008.
- [63] D. Yang et al., "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 286, no. 5439, pp. 525-528, Oct. 1999.
- [64] M. Pazgier, D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu, and J. Lubkowski, "Human beta-defensins," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 63, no. 11, pp. 1294-1313, Jun. 2006.
- [65] A. L. Hughes, "Evolutionary diversification of the mammalian defensins," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 56, no. 1-2, pp. 94-103, Oct. 1999.
- [66] M. E. Selsted et al., "Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-

- defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 9, pp. 6641-6648, Mar. 1993.
- [67] M. E. Selsted et al., "Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 27, p. 16430, Jul. 1996.
- [68] E. Klüver, K. Adermann, and A. Schulz, "Synthesis and structure-activity relationship of beta-defensins, multi-functional peptides of the immune system," *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, vol. 12, no. 4, pp. 243-257, Apr. 2006.
- [69] G. R. Zimmermann, P. Legault, M. E. Selsted, and A. Pardi, "Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins," *Biochemistry*, vol. 34, no. 41, pp. 13663-13671, Oct. 1995.
- [70] M. V. Sawai et al., "The NMR structure of human beta-defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment," *Biochemistry*, vol. 40, no. 13, pp. 3810-3816, Apr. 2001.
- [71] D. M. Hoover, O. Chertov, and J. Lubkowski, "The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 42, pp. 39021-39026, Oct. 2001.
- [72] D. M. Hoover et al., "The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 42, pp. 32911-32918, Oct. 2000.
- [73] K. W. Bensch, M. Raida, H. J. Mägert, P. Schulz-Knappe, and W. G. Forssmann, "hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma," *FEBS Letters*, vol. 368, no. 2, pp. 331-335, Jul. 1995.
- [74] J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schröder, "A peptide antibiotic from human skin," *Nature*, vol. 387, no. 6636, p. 861, Jun. 1997.
- [75] J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder, "Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 8, pp. 5707-5713, Feb. 2001.
- [76] J. R. García et al., "Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity," *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 15, no. 10, pp. 1819-1821, Aug. 2001.
- [77] B. C. Schutte et al., "Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 4, pp. 2129-2133, Feb. 2002.
- [78] Y. Yamaguchi et al., "Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 169, no. 5,

- pp. 2516-2523, Sep. 2002.
- [79] J. R. García et al., "Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction," *Cell and Tissue Research*, vol. 306, no. 2, pp. 257-264, Nov. 2001.
- [80] M. E. Quiñones-Mateu et al., "Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication," *AIDS (London, England)*, vol. 17, no. 16, pp. F39-48, Nov. 2003.
- [81] J. Röhrli, D. Yang, J. J. Oppenheim, and T. Hehlhans, "Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 184, no. 12, pp. 6688-6694, Jun. 2010.
- [82] L. Hazlett and M. Wu, "Defensins in innate immunity," *Cell and Tissue Research*, vol. 343, no. 1, pp. 175-188, Jan. 2011.
- [83] C. Fulton, G. M. Anderson, M. Zasloff, R. Bull, and A. G. Quinn, "Expression of natural peptide antibiotics in human skin," *Lancet*, vol. 350, no. 9093, pp. 1750-1751, Dec. 1997.
- [84] P. K. Singh et al., "Production of beta-defensins by human airway epithelia," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 25, pp. 14961-14966, Dec. 1998.
- [85] R. Bals et al., "Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 102, no. 5, pp. 874-880, Sep. 1998.
- [86] A. Y. Liu et al., "Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 118, no. 2, pp. 275-281, Feb. 2002.
- [87] J. Harder, U. Meyer-Hoffert, K. Wehkamp, L. Schwichtenberg, and J.-M. Schröder, "Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 123, no. 3, pp. 522-529, Sep. 2004.
- [88] G. Fujii, M. E. Selsted, and D. Eisenberg, "Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes," *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, vol. 2, no. 8, pp. 1301-1312, Aug. 1993.
- [89] Y. Shai, "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides," *Biopolymers*, vol. 66, no. 4, pp. 236-248, 2002.
- [90] E. Klüver, S. Schulz-Maronde, S. Scheid, B. Meyer, W.-G. Forssmann, and K. Adermann, "Structure-activity relation of human beta-defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity," *Biochemistry*, vol. 44, no. 28, pp. 9804-9816, Jul. 2005.

- [91] V. Sass et al., "Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci," *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 6, pp. 2793-2800, Jun. 2010.
- [92] V. Sass, U. Pag, A. Tossi, G. Bierbaum, and H.-G. Sahl, "Mode of action of human beta-defensin 3 against Staphylococcus aureus and transcriptional analysis of responses to defensin challenge," *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, vol. 298, no. 7-8, pp. 619-633, Oct. 2008.
- [93] T. Tomita et al., "Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2," *Microbiology and Immunology*, vol. 44, no. 9, pp. 749-754, 2000.
- [94] S. Jung et al., "Human beta-defensin 2 and beta-defensin 3 chimeric peptides reveal the structural basis of the pathogen specificity of their parent molecules," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 3, pp. 954-960, Mar. 2011.
- [95] O. Scudiero et al., "Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 54, no. 6, pp. 2312-2322, Jun. 2010.
- [96] Y. Bai et al., "Structure-dependent charge density as a determinant of antimicrobial activity of peptide analogues of defensin," *Biochemistry*, vol. 48, no. 30, pp. 7229-7239, Aug. 2009.
- [97] D. M. Hoover, Z. Wu, K. Tucker, W. Lu, and J. Lubkowski, "Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 47, no. 9, pp. 2804-2809, Sep. 2003.
- [98] F. Bauer et al., "Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity," *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, vol. 10, no. 12, pp. 2470-2479, Dec. 2001.
- [99] K. Matsuzaki, "Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1462, no. 1-2, pp. 1-10, Dec. 1999.
- [100] I. Rabi, J. Zacharias, S. Millman, and P. Kusch, "A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment," *Physical Review*, vol. 53, no. 4, pp. 318-318, Feb. 1938.
- [101] E. Purcell, H. Torrey, and R. Pound, "Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid," *Physical Review*, vol. 69, no. 1-2, pp. 37-38, Jan. 1946.
- [102] F. Bloch, W. Hansen, and M. Packard, "Nuclear Induction," *Physical Review*, vol. 69, no. 3-4, pp. 127-127, Feb. 1946.
- [103] R. R. Ernst, "Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance," *Review of Scientific Instruments*, vol. 37, no. 1, p. 93, 1966.
- [104] K. Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*. New York: Wiley, 1986.
- [105] F. Lottspeich, *Bioanalytik*, 2nd ed. München ;;Heidelberg: Spektrum, 2006.

- [106] V. Tugarinov, W.-Y. Choy, V. Y. Orekhov, and L. E. Kay, "Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 3, pp. 622-627, Jan. 2005.
- [107] J. Fiaux, E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, and K. Wüthrich, "NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex," *Nature*, vol. 418, no. 6894, pp. 207-211, Jul. 2002.
- [108] M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, and K. Wüthrich, "NMR Assignment and Secondary Structure Determination of an Octameric 110 kDa Protein Using TROSY in Triple Resonance Experiments," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 122, no. 31, pp. 7543-7548, Aug. 2000.
- [109] P. Hore, *Nuclear magnetic resonance*. Oxford ;;New York: Oxford University Press, 1995.
- [110] G. Vriend, "WHAT IF: a molecular modeling and drug design program," *Journal of Molecular Graphics*, vol. 8, no. 1, pp. 52-56, 29, Mar. 1990.
- [111] R. Koradi, "MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures," *Journal of Molecular Graphics*, vol. 14, no. 1, pp. 51-55, Feb. 1996.
- [112] M. J. Boulanger, D.-chone Chow, E. E. Brevnova, and K. C. Garcia, "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, no. 5628, pp. 2101-2104, Jun. 2003.
- [113] M. Carson, "Ribbons," *Methods in Enzymology*, vol. 277, pp. 493-505, 1997.
- [114] G. BERTANI, "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, vol. 62, no. 3, pp. 293-300, Sep. 1951.
- [115] G. Bertani, "Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems," *Journal of Bacteriology*, vol. 186, no. 3, pp. 595-600, Jan. 2004.
- [116] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680-685, Aug. 1970.
- [117] G. L. ELLMAN, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70-77, May. 1959.
- [118] S. C. Gill and P. H. von Hippel, "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data," *Analytical Biochemistry*, vol. 182, no. 2, pp. 319-326, Nov. 1989.
- [119] G. C. Chen and J. T. Yang, "Two-Point Calibration of Circular Dichrometer with d-10-Camphorsulfonic Acid," *Analytical Letters*, vol. 10, no. 14, pp. 1195-1207, Jul. 2011.
- [120] L. Braunschweiler, "Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy," *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, vol. 53, no. 3, pp. 521-528, Jul. 1983.
- [121] A. Shaka, C. Lee, and A. Pines, "Iterative schemes for bilinear operators; application to spin decoupling," *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, vol. 77, no. 2, pp. 274-293, Apr. 1988.
- [122] T. Hwang, "Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms

- and Pulsed-Field Gradients," *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, vol. 112, no. 2, pp. 275-279, Feb. 1995.
- [123] J. Noggle, *The nuclear Overhauser effect chemical applications*. New York: Academic Press, 1971.
- [124] D. Neuhaus, *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*. New York N.Y.: VCH, 1989.
- [125] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax, "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes," *Journal of Biomolecular NMR*, vol. 6, no. 3, pp. 277-293, Nov. 1995.
- [126] B. A. Johnson, "Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules," *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 278, pp. 313-352, 2004.
- [127] P. Güntert, C. Mumenthaler, and K. Wüthrich, "Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA," *Journal of Molecular Biology*, vol. 273, no. 1, pp. 283-298, Oct. 1997.
- [128] W. F. van Gunsteren et al., "Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide," *vdv Hochschulverlag AG an der ETH Zürich and BIOMOS b.v.: Zürich, Groningen*, 1996.
- [129] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan, "Stereochemistry of polypeptide chain configurations," *Journal of Molecular Biology*, vol. 7, pp. 95-99, Jul. 1963.
- [130] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, and J. M. Thornton, "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 26, no. 2, pp. 283-291, Apr. 1993.
- [131] D. Petrey and B. Honig, "GRASP2: visualization, surface properties, and electrostatics of macromolecular structures and sequences," *Methods in Enzymology*, vol. 374, pp. 492-509, 2003.
- [132] D. S. Wishart, B. D. Sykes, and F. M. Richards, "The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy," *Biochemistry*, vol. 31, no. 6, pp. 1647-1651, Feb. 1992.
- [133] M. Hibi, M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130," *Cell*, vol. 63, no. 6, pp. 1149-1157, Dec. 1990.
- [134] D. Chow, X. He, A. L. Snow, S. Rose-John, and K. C. Garcia, "Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 291, no. 5511, pp. 2150-2155, Mar. 2001.
- [135] K. Julenius, E. Thulin, S. Linse, and B. E. Finn, "Hydrophobic core substitutions in calbindin D9k: effects on stability and structure," *Biochemistry*, vol. 37, no. 25, pp. 8915-8925, Jun. 1998.

-
- [136] S. Liu et al., "Linear analogues of human beta-defensin 3: concepts for design of antimicrobial peptides with reduced cytotoxicity to mammalian cells," *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, vol. 9, no. 6, pp. 964-973, Apr. 2008.
- [137] K. Taylor et al., "Analysis and separation of residues important for the chemoattractant and antimicrobial activities of beta-defensin 3," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 11, pp. 6631-6639, Mar. 2008.
- [138] L. A. Mitscher, "Coevolution: mankind and microbes," *Journal of Natural Products*, vol. 71, no. 3, pp. 497-509, Mar. 2008.
- [139] A. E. Waters et al., "Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 52, no. 10, pp. 1227-1230, Apr. 2011.
- [140] L. T. Nguyen, E. F. Haney, and H. J. Vogel, "The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action," *Trends in Biotechnology*, Jun. 2011.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
AMP	Antimikrobielles Peptid, <i>antimicrobial peptide</i>
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokin</i>
CD	Circulardichroismus
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CSI	chemischer Verschiebungsindex, <i>chemical shift index</i>
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
EBI3	Ebstein-Barr-Virus induziertes Gen 3
<i>et al.</i>	und andere, <i>et alii</i>
FNIII Domäne	Fibronectin III-ähnliche Domäne
FID	freier Induktionszerfall, <i>free induction decay</i>
Glu	Glutamat
gp130	<i>glycoprotein 130 kDa</i>
HBD	humanes β -Defensin
HDP	sinngemäß: Peptid der Infektabwehr des Wirts, <i>host defense peptide</i>
h(p28)	humanes (p28)
Ig-ähnliche Domäne	Immunglobulin-ähnliche Domäne
IgG	Immunglobulin G, Gammaglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
JAK	Janus (Tyrosin-) Kinase
(k)Da	(Kilo-)Dalton, gebräuchliche Masseinheit für Proteine
LB	<i>lysogeny broth</i>
Leu	Leucin
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
m(p28)	murines (p28)

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, <i>messenger ribonucleic acid</i>
MRW	mittlere molare Masse der Aminosäurereste, <i>mean residue weight</i>
NOESY	Spektroskopie mit Kern-Overhauser Effekt und Austausch, <i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
NOE	Kern-Overhauser Effekt, <i>nuclear overhauser effect</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
OSM	Oncostatin M
ppm	Teile pro Million, <i>parts per million</i>
PVDF	Polyvenylidenfluorid
R	Rezeptor
R α	Alpha-Rezeptor
r.m.s.d.	mittlere quadratische Abweichung, <i>root mean square deviation</i>
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>reversed phase-high performance liquid chromatography</i>
sIL-6R α	löslicher IL-6 Alpha-Rezeptor
SDS	Natrium-Dodecylsulfat, <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TOCSY	vollständige Korrelationspektroskopie, <i>total correlation spectroscopy</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZBM	Zytokinbindemodul

8.2 Lebenslauf

Name	Björn Wolfgang Herbert Spudy
Geburtsdatum	17. 7.1978
Geburtsort	Neumünster
Staatsangehörigkeit	deutsch

02/2007 – 07/2011: **Wissenschaftlicher Angestellter mit der Zielsetzung Promotion**
in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J. Grötzinger im
Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

03/2006 – 11/2006: **Diplomarbeit im Hauptfach Zellbiologie**
angefertigt in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. T. C. G.
Bosch am Zoologisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu
Kiel

09/2002 – 02/2006 **Studium der Biologie**
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

08/2000 – 07/2002 **Ausbildung zum Bankkaufmann**, Landesbank Schleswig-Holstein, Kiel

07/1999 – 04/2000 **Grundwehrdienst**, Marine

07/1999 **Abitur**, Gymnasium Jungmannschule, Eckernförde

8.3 Publikationen und Poster

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

Stumhofer, J.S., Tait, E.D., Quinn W.J. 3rd, Hosken, N., **Spudy, B.**, Goenka, R., Fielding, R.A., O'Hara, A.C., Chen, Y., Jones M.L., Saris, C.J., Rose-John, S., Cua, D.J., Jones, S.A., Elloso, M.M., Grötzinger, J., Cancro, M.P., Levin S.D., Hunter, C.A., "A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling," *Nature Immunology*. 2010 Dec; 11 (12): 1119-26.

Jung, S., Mysliwy, J., **Spudy, B.**, Lorenzen, I., Reiss, K., Gelhaus, C., Podschun, R., Leippe, M., Grötzinger, J., "Human beta-defensin 2 und beta-defensin 3 chimeric peptides reveal the structural basis of the pathogen specificity of their parent molecules," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011 Mar; 55 (3): 954-60.

Weitere Publikationen:

Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Jungnickel, S., Hemmrich, G., **Spudy, B.**, Podschun, R., Bosch, T.C.G., "Activity of the novel peptide arminin against multiresistant human pathogens shows the considerable potential of phylogenetically ancient organisms as drug source," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Dec; 53 (12): 5245-50.

Poster:

Pawlak, V., Lorenzen, I., **Spudy, B.**, Mohr, M., Shomali, M., Sönnichsen, F., Grötzinger, J., "The disintegrin and EGF-like domain of ADAM17," *Fourth International Symposium of the SFB 415 „Signal Transduction Research – Basic Principles and clinical Perspectives“*, Hamburg, Germany, August 10-12, 2009

Pawlak, V., Lorenzen, I., **Spudy, B.**, Mohr, M., Shomali, M., Sönnichsen, F., Grötzinger, J., "The disintegrin and EGF-like domain of ADAM17", *First International Symposium on Structural Systems Biology*, Hamburg, Germany, September 24-25, 2009

Jung, S., Mysliwy, J., **Spudy, B.**, Lorenzen, I., Gelhaus, C., Podschun, R., Leippe, M., Grötzinger, J., „Designer antimicrobial proteins: HBD2 und HBD3 chimeric proteins reveal the structural basis of the pathogen specificity of their parent molecules“, *14th Joint Meeting „Signal Transduction – Receptors, Mediators and Genes“*, Leonardo Hotel Weimar, Germany, October 18-20, 2010

8.4 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger dafür, dass er mir diese spannenden Projekte anvertraute und für seine engagierte Betreuung. Ich bedanke mich sehr für seine Anregungen und Kritik, die fachlichen Diskussionen, sowie für die stätige Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stefan-Rose John für die Aufnahme am Biochemischen Institut, die konstruktiven Diskussionen und seine Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Frank Sönnichsen für das Aufnehmen der NMR-Spektren, sowie für die kritischen Diskussionen, hilfreichen Ratschläge und die großzügig gewährte Unterstützung in vielfältiger Form.

Bei Herrn Dr. Christoph Gelhaus bedanke ich mich für die Durchführung der Massenspektrometrie.

Ich bedanke mich bei allen aktuellen wie ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Grötzinger die in den letzten viereinhalb Jahren mit mir zusammengearbeitet haben. Danke für das offene und motivierende Arbeitsklima, die fachlichen Anregungen und die freundschaftliche Atmosphäre. Insbesondere möchte ich Dr. Inken Lorenzen und Dr. Sascha Jung für ihre ständige Unterstützung und für die geführten kritischen Diskussionen danken.

Dr. Christoph Garbers danke ich für die Durchführung der p28 Vitalitätsversuche. Ich danke Dr. Kristian Sell, Dr. Nina Adam und Dr. Felix Sommer für das zügige und gründliche Korrekturlesen. Ich danke Euch allen für die freundschaftliche Unterstützung in den letzten Jahren.

Mein Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und meiner Oma für die Unterstützung und den Rückhalt in all den Jahren, sowie für das Verständnis das Ihr für mich aufgebracht habt.

Ich danke Dr. Nathalie Jänner für die vielen kritischen Diskussionen und Anregungen, sowie Ihre unermüdliche Unterstützung. Ich danke Euch, Nathalie und Per, für die Geduld die Ihr für mich aufgebracht habt, sowie Eure Aufmunterungen wenn es nötig war.

8.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Björn W. H. Spudy, dass ich die vorliegende Dissertation nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis und abgesehen von der wissenschaftlichen Betreuung durch meinen Doktorvater Prof. Dr. J. Grötzinger, selbstständig verfasst habe. Zudem habe ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

Die Dissertation wurde weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ich habe bisher keinen weiteren Promotionsversuch unternommen.

Kiel, 25.07.11

Björn Spudy