

Untersuchungen zur Wechselwirkung von Interleukin-10 mit Glykosaminoglykanen mittels NMR-Spektroskopie

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
M.Sc. (Biochemie) Georg Künze
geboren am 7. September 1985 in Hoyerswerda

Dekan: Prof. Dr. Erich Schröger
Gutachter: Prof. Dr. Daniel Huster
Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger
Prof. Dr. Thomas Peters

Tag der Verteidigung: 04. August 2015

“Of the three main activities involved in scientific research, thinking, talking and doing, I much prefer the last and am probably best at it. I am all right at the thinking, but not much good at the talking.”

(Frederick Sanger, Nobelpreisträger für Chemie 1958 und 1980)

Bibliographische Darstellung

Georg Künze

Untersuchungen zur Wechselwirkung von Interleukin-10 mit Glykosaminoglykanen mittels NMR-Spektroskopie

Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

Universität Leipzig

Dissertation

225 Seiten, 297 Literaturangaben, 74 Abbildungen, 23 Tabellen

Das Zytokin Interleukin-10 (IL-10) ist ein Schlüsselspieler in der Regulation des Immunsystems mit pro- und anti-inflammatorischen Funktionen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Terminierung und Unterdrückung einer Entzündungsantwort, die ansonsten zu einer bleibenden Schädigung des Gewebes führen kann. Eine Dysregulation von IL-10 ist mit verschiedenen Krankheitsbildern wie chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und Krebs assoziiert. IL-10 wird von einem breiten Spektrum von Zelltypen, darunter hauptsächlich hämatopoetische Zellen, aber auch epitheliale und mesenchymale Zellen, gebildet und in den extrazellulären Raum freigesetzt, wo es mit Komponenten der extrazellulären Matrix in Kontakt kommt. Es ist bekannt, dass IL-10 an Glykosaminoglykane (GAGs) binden kann und dass diese Interaktion seine biologische Aktivität beeinflusst. GAGs sind eine Klasse linearer Polysaccharide der extrazellulären Matrix. Sie bestehen aus wiederholenden Disaccharideinheiten und haben einen hoch negativ geladenen Charakter, welcher durch einen hohen Grad an Sulfatierung in der Zuckerkette zustandekommt. Sie binden eine Vielzahl an Signalproteinen und regulieren deren biologische Funktionen, etwa indem sie Einfluss auf die Rezeptorbindung oder die räumliche Verteilung des Proteins im Gewebe nehmen. Die molekularen Mechanismen, wodurch GAGs die biologische Aktivität von IL-10 beeinflussen, sind bisher unbekannt. Insbesondere ist nichts über die strukturellen Grundlagen der Interaktion bekannt, die Voraussetzung für ihr funktionelles Verständnis sind. In dieser Arbeit wurden daher die Bindungseigenschaften von IL-10 und GAGs sowie der strukturelle Aufbau ihres molekularen Komplexes unter Verwendung von NMR-Spektroskopie in Lösung charakterisiert. Es wurde eine definierte GAG-Bindungsstelle in IL-10 identifiziert und die Bindungsepitope und Bindungsaffinitäten von GAGs bestimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine wichtige Rolle, die GAGs in der Biologie von IL-10 spielen können, hin – etwa für seine Speicherung im Gewebe oder für die IL-10-Rezeptorbindung.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Zusammenfassung	1
Summary	5
1 Einleitung und Zielstellung der Arbeit	9
2 Grundlagen	13
2.1 Molekulare Grundlagen der Protein-Glykosaminoglykan-Wechselwirkung . .	13
2.1.1 Extrazelluläre Matrix - Aufbau und Funktion	13
2.1.2 Glykosaminoglykane - Struktur und Funktion	15
2.2 Interleukin-10	19
2.2.1 Biologische Funktionen	19
2.2.2 Verwandtschaftsbeziehungen	20
2.2.3 Struktur und Rezeptorbindung	21
2.3 Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen mit NMR-Spektro-	
skopie	27
2.3.1 Ligand-detektierte NMR-Experimente	28
2.3.2 Protein-detektierte NMR-Experimente	32
3 Methoden	39
3.1 Chemikalien	39
3.1.1 Bakterienstämme	40
3.2 Biochemische Herstellung von murinem IL-10	40
3.2.1 Präparation aus Einschlusskörpern von <i>E. coli</i>	40
3.2.2 Präparation als lösliches Fusionsprotein mit MBP	46
3.2.3 Herstellung von isotoopenmarkiertem IL-10	48
3.2.4 Herstellung von IL-10-Varianten für die Röntgenkristallographie . .	48
3.3 Zuordnung der NMR-chemischen Verschiebungen von GAGs und IL-10 . . .	51
3.3.1 ¹ H-NMR-Experimente	51
3.3.2 ¹ H/ ¹³ C-NMR-Experimente	52
3.3.3 ¹ H/ ¹⁵ N-NMR-Experimente	54
3.3.4 Tripelresonanzexperimente	56

3.4	STD-NMR-Spektroskopie	61
3.4.1	Bestimmung von Bindungs epitopen mittels STD-NMR	61
3.4.2	Bestimmung der Bindungsaffinität mittels STD-NMR	63
3.5	Strukturbestimmung von freiem und IL-10-gebundenem Heparin mit NMR und MD	64
3.5.1	NOESY/ROESY-NMR-Spektroskopie	64
3.5.2	NOE-unterstützte MD-Berechnungen	64
3.6	Bestimmung der Kristallstruktur von murinem IL-10 durch Röntgenbeu- gungsanalyse	66
3.6.1	Kristallisation der IL-10-Variante N Δ 8, C149Y	66
3.6.2	Kristallisation der IL-10-Variante N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y	66
3.6.3	Röntgenmessungen, Strukturbestimmung und Verfeinerung	67
3.7	Bestimmung der GAG-Bindungsstelle von murinem IL-10 durch NMR	67
3.7.1	Messung der NH-chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats	67
3.7.2	Bestimmung der GAG-Bindungsstelle mit PCSs	68
3.7.2.1	Modifizierung von IL-10 mit einem <i>Lanthanide Binding</i> <i>Tag</i> (LBT)	68
3.7.2.2	Messung der Lanthanoidionenbindung durch Fluoreszenz- spektroskopie	70
3.7.2.3	Detektion von PCSs und Bestimmung des $\Delta\chi$ -Tensors	70
3.7.2.4	PCS-basierte Strukturberechnung des IL-10-Heparin-Kom- plexes mit Xplor-NIH	72
3.7.3	Detektion der GAG-Bindungsstelle mit einem spinmarkierten GAG	73
3.7.3.1	Synthese und Charakterisierung des EDTA-markierten, persulfatierten HA-Tetrasaccharids	73
3.7.3.2	Messung der Amidprotonen- R_2 -Relaxationsrate	73
3.7.3.3	Berechnung der Metallionenbindungsstelle aus PRE-Daten mit Xplor-NIH	75
4	Ergebnisse	79
4.1	Biochemische Herstellung von murinem IL-10	79
4.1.1	Präparation aus Einschlusskörpern von <i>E. coli</i>	79
4.1.2	Präparation als lösliches Fusionsprotein mit MBP	84
4.2	STD-NMR-Experimente	87
4.2.1	Bestimmung von GAG-Bindungs epitopen für IL-10 durch STD	87
4.2.2	Bestimmung von GAG-Bindungsaffinitäten für IL-10 durch STD	91
4.3	Strukturbestimmung von freiem und IL-10-gebundenem Heparin	94
4.4	Zuordnung der NMR-chemischen Verschiebungen von murinem IL-10	102
4.5	Bestimmung der Kristallstruktur von murinem IL-10	106
4.6	Bestimmung der GAG-Bindungsstelle von murinem IL-10 durch NMR	112
4.6.1	Analyse der GAG-Bindungsstelle mit NH-chemischen Verschiebun- gen von IL-10	113
4.6.2	Analyse der GAG-Bindungsstelle mit PRE-Daten	114
4.6.2.1	NMR-Charakterisierung eines EDTA-markierten, persulfa- tierten HA-Tetrasaccharids	115

4.6.2.2	Messung der transversalen, paramagnetischen Relaxationsrate der Amidprotonen in IL-10	118
4.6.2.3	Berechnung der Metallionenbindungsstelle aus PRE-Daten zur Vorhersage der GAG-Bindungsregion	120
4.6.3	Analyse der GAG-Bindungsstelle mit PCS-Daten	122
4.6.3.1	Immobilisierung von Lanthanoidionen an IL-10	122
4.6.3.2	PCS-Messung und $\Delta\chi$ -Tensorbestimmung	124
4.6.3.3	Berechnung der IL-10-Heparin-Komplexstruktur mit PCS-basiertem <i>Docking</i>	132
5	Diskussion	135
5.1	Präparation und Strukturuntersuchung von murinem IL-10	135
5.2	Einfluss von GAG-Sulfatierung, Größe und Struktur auf die IL-10-Bindung	138
5.3	Identifizierung der GAG-Bindungsstelle von IL-10	142
5.4	Biologische Bedeutung der IL-10-GAG-Wechselwirkung	145
A	Appendix	149
A.1	Kristallisationsbedingungen von murinem IL-10	149
A.2	^1H - und ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen von GAG-Oligosacchariden .	149
A.3	T_1 -Relaxationszeiten von GAG-Oligosacchariden	153
A.4	NMR-Zuordnung von murinem IL-10	156
A.5	Xplor-NIH-Skripte	160
	Literaturverzeichnis	175
	Symbole und Abkürzungen	199
	Danksagung	205

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Biologische Bedeutung von Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen	10
Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Proteoglykans Aggrecan	14
Abb. 2.2: Ringkonformationen von Glukosamin, sulfatierter Iduronsäure und ungesättigter ^{4,5} Δ-Uronsäure	17
Abb. 2.3: Strukturmodell eines Heparin-Dodekasaccharids	18
Abb. 2.4: Phylogramm der IL-10-Familie	21
Abb. 2.5: Aminosäuresequenzen von humanem, murinem und viralem IL-10	22
Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe der IL-10-Familie	22
Abb. 2.7: Domänenarchitektur und Struktur der Klasse-2-Zytokine	23
Abb. 2.8: Schema der IL-10-Signaltransduktion	24
Abb. 2.9: Kristallstruktur des IL-20/IL-20R1/IL-20R2-Komplexes und Homologiemodell für den IL-10/IL-10R1/IL-10R2-Komplex durch Superposition der einzelnen Bindungspartner	26
Abb. 2.10: Schematische Darstellung des STD-NMR-Experiments	30
Abb. 2.11: Schematische Darstellung des trNOESY-Experiments	31
Abb. 2.12: Schematische Darstellung des <i>Cross-Saturation</i> -Experiments	34
Abb. 2.13: Strategie zur Messung paramagnetischer NMR-Observablen für die Strukturbestimmung von Protein-Ligand-Komplexen	36
Abb. 3.1: Plasmidkarte des pET-41b(+)_IL-10-Plasmids	43
Abb. 3.2: Plasmidkarte des pMAL-c5X_IL-10-Plasmids	47
Abb. 3.3: Pulssequenzen der 2D- ¹ H/ ¹³ C-Korrelationsexperimente	53
Abb. 3.4: Pulssequenzen der verwendeten 2D- ¹ H/ ¹⁵ N-Korrelationsexperimente	55
Abb. 3.5: Pulssequenzen des (A) HNCA- und (B) HN(CO)CA-Experiments als TROSY-Version	58
Abb. 3.6: Pulssequenzen des (A) HNC(O)- und (B) HN(CA)CO-Experiments als TROSY-Version	59
Abb. 3.7: Pulssequenzen des (A) HNCACB- und (B) HN(CO)CACB-Experiments als TROSY-Version	60
Abb. 3.8: Pulssequenzen der verwendeten STD-NMR-Experimente	62
Abb. 3.9: Chemische Struktur des EDTA-markierten, persulfatierten HA-Tetrasaccharids (psHA-EDTA)	73
Abb. 3.10: Pulssequenz des verwendeten ¹ H/ ¹⁵ N-HSQC-Experiments zur Messung von H _N -T ₂ -Zeiten	74
Abb. 4.1: Aufnahmen von Agarosegelen zum Nachweis der Klonierung von IL-10-cDNA in pET-41b(+)	80

Abb. 4.2: Aufnahmen von SDS-Polyacrylamidgelen zum Nachweis der Expression von IL-10 in <i>E. coli</i> und seiner chromatographischen Reinigung aus <i>E. coli</i> -Einschlusskörpern	81
Abb. 4.3: Chromatogramme der Reinigung von IL-10	82
Abb. 4.4: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Analyse von rekombinant exprimiertem, rückgefaltetem IL-10 durch spektrometrische und spektroskopische Verfahren	83
Abb. 4.5: Aufnahmen von Agarose- und SDS-Polyacrylamidgelen zum Nachweis der Klonierung, Expression und Reinigung des MBP-IL-10-Fusionsproteins	84
Abb. 4.6: Nachweis der Spaltung des MBP-IL-10-Fusionsproteins durch Faktor-Xa	85
Abb. 4.7: 600 MHz- ^1H -NMR-Spektren von IL-10	86
Abb. 4.8: Substitutionsmuster der in den STD-Experimenten verwendeten GAG-Disaccharide	87
Abb. 4.9: ^1H -STD-NMR-Spektren von GAGs in Gegenwart von IL-10	88
Abb. 4.10: ^2D - $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -STD- und Referenz-NMR-Spektrum von Heparin-Tetrasaccharid	89
Abb. 4.11: Strukturelle Zuordnung der STD-Epitope von GAGs	90
Abb. 4.12: Bindungskurven von GAG-Disacchariden für die Interaktion mit IL-10	91
Abb. 4.13: Änderung der initialen Wachstumsrate des STD-Verstärkungsfaktors ($STD-AF_0$) mit steigender Konzentration für verschiedene Heparin-Oligosaccharid-Liganden	92
Abb. 4.14: Bindungskurven von Heparin-Oligosacchariden für die Interaktion mit IL-10	93
Abb. 4.15: trNOEs von Heparin I-S Disaccharid	95
Abb. 4.16: ^2D - $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektren von Heparin-Tetrasaccharid	96
Abb. 4.17: ^2D - $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY-NMR-Spektren von Heparin-Tetrasaccharid	97
Abb. 4.18: Aus experimentellen NOE/ROE-Daten berechnete Strukturmodelle von Heparin-Tetrasaccharid	100
Abb. 4.19: Verteilungen der Torsionswinkel der glykosidischen Bindung in den berechneten MD-Strukturmodellen von Heparin-Tetrasaccharid	101
Abb. 4.20: Verteilung der 6-O-Sulfat-Orientierung in den berechneten MD-Strukturmodellen von freiem und IL-10-gebundenem Heparin-Tetrasaccharid	101
Abb. 4.21: Optimierung der Qualität der IL-10-NMR-Spektren durch Deuterierung	103
Abb. 4.22: ^3D - $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von IL-10 C149Y	104
Abb. 4.23: ^2D - $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektrum von IL-10 C149Y bei 600 MHz, 30 °C und pH 6,2	105
Abb. 4.24: Sekundärstrukturbestimmung von IL-10 C149Y	106
Abb. 4.25: Kristallstruktur und Kristallisation von mIL-10 N Δ 8, C149Y	108
Abb. 4.26: Molekülpackung in den Kristallformen von mIL-10 (A) (PDB # 4X51) und vIL-10 (B) (PDB # 1VLK)	109
Abb. 4.27: Kristallstruktur und Kristallisation der mIL-10-Mutante N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y	111
Abb. 4.28: Vergleich der Kristallstrukturen von mIL-10, hIL-10 und vIL-10	111
Abb. 4.29: Kristallkontakte von R32 und K49 in IL-10-Kristallformen	112
Abb. 4.30: Detektion der Bindung eines Heparin-Tetrasaccharids anhand der Amid-signalverschiebungen von IL-10	113

Abb. 4.31: Amidsignalverschiebungen von IL-10 induziert durch verschiedene GAG-Klassen und Größen.	114
Abb. 4.32: Dreidimensionales <i>Cartoon</i> -Modell von IL-10 und strukturelle Interpretation der beobachteten Amidsignalverschiebungen	115
Abb. 4.33: (A) 600 MHz- ¹ H- und (B) 150 MHz- ¹³ C-NMR-Spektrum von psHA-EDTA-Tetrasaccharid in 99,8% D ₂ O, 50 mM NaCl bei einer Temperatur von 25 °C	116
Abb. 4.34: 2D- ¹ H/ ¹³ C-HSQC- und HMBC-Spektrum von psHA-EDTA-Tetrasaccharid in 99,8% D ₂ O, 50 mM NaCl bei einer Protonenresonanzfrequenz von 700 MHz und einer Temperatur von 25 °C	117
Abb. 4.35: Detektion der Bindung eines spinmarkierten psHA-Tetrasaccharids anhand der Amidsignalverschiebungen von IL-10	118
Abb. 4.36: NMR-Signalauslöschung von IL-10 induziert durch ein spinmarkiertes psHA-EDTA-Tetrasaccharid	119
Abb. 4.37: Transversale paramagnetische Relaxationsrate (Γ_2) der Amidprotonen von IL-10 induziert durch (A) Cu ²⁺ - und (B) Mn ²⁺ -beladenes psHA-EDTA-Tetrasaccharid	120
Abb. 4.38: Korrelation zwischen experimentellen ($\Gamma_{2,obs}$) und aus dem Strukturmodell berechneten ($\Gamma_{2,calc}$) PREs der Amidprotonen von IL-10	121
Abb. 4.39: Strukturmodell der Metallionenposition von psHA-EDTA im Komplex mit IL-10 berechnet aus PRE-Daten	121
Abb. 4.40: Induktion von RDCs durch IL-10-immobilisierte Lanthanoidionen	122
Abb. 4.41: Vergleich des ¹ H/ ¹⁵ N-TROSY-HSQC-Spektrums von unmodifiziertem IL-10 mit dem ¹ H/ ¹⁵ N-HSQC-Spektrum von LBT-modifiziertem IL-10.	123
Abb. 4.42: Detektion der Lanthanoidionenbindung an IL-10 durch Fluoreszenzspektroskopie	124
Abb. 4.43: Detektion von PCSs für IL-10 und seinen Heparinligand	125
Abb. 4.44: Korrelation zwischen experimentellen und berechneten PCS-Werten der Amidprotonen von "gemischtem" LBT-IL-10	129
Abb. 4.45: Lanthanoidionenpositionen und $\Delta\chi$ -Tensorrepräsentation für LBT-IL-10	130
Abb. 4.46: Korrelation zwischen experimentellen und aus dem Strukturmodell berechneten ¹ H-PCS-Werten für den IL-10-Heparin-Komplex	132
Abb. 4.47: Strukturmodell des IL-10-Heparin-Komplexes erhalten aus PCS-basierten <i>Rigid Body Docking</i> -Berechnungen mit Xplor-NIH	133
Abb. 5.1: Strukturmodell der Wechselwirkung von Heparin mit IL-10 erhalten aus NMR-Daten	143
Abb. 5.2: Proteinsequenzen für Mitglieder der IL-10-Familie	146
Abb. 5.3: Hypothetisches Modell der Inhibition der IL-10/IL-10R2-Bindung durch GAGs	148

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Klassifizierung von GAGs anhand ihrer Disaccharid-Wiederholungseinheiten	16
Tab. 3.1:	Temperaturprofil der PCR zur Vervielfältigung der IL-10-cDNA	41
Tab. 3.2:	Temperaturprofil der PCR zur Erzeugung der Punktmutation C149Y	42
Tab. 3.3:	Zusammenfassung der für die Kristallisation verwendeten IL-10-Varianten	50
Tab. 3.4:	Tripelresonanzexperimente für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen von IL-10	57
Tab. 3.5:	Reaktionsschritte und PCR-Primer zur Konstruktion einer N-terminal StrepII- und C-terminal LBT-markierten IL-10-Variante	69
Tab. 4.1:	Dissoziationskonstanten (\pm S.E.) von CS-Disacchariden, Heparin-Disacchariden und Heparin-Oligosacchariden für die Bindung an IL-10	92
Tab. 4.2:	Experimentelle ROE-abgeleitete ^1H - ^1H -Abstände für freies Heparin-Tetrasaccharid	98
Tab. 4.3:	Experimentelle NOE-abgeleitete ^1H - ^1H -Abstände für IL-10-gebundenes Heparin-Tetrasaccharid	99
Tab. 4.4:	Experimentelle Werte der 3J -Kopplungskonstante (in Hz) für vicinale Protonenpaare des internen IdoA-Rings in Heparin-Tetrasaccharid	102
Tab. 4.5:	Statistik der Röntgenbeugungsdaten für den IL-10 N Δ 8, C149Y Kristall und des daraus berechneten Strukturmodells	107
Tab. 4.6:	Statistik der Röntgenbeugungsdaten für den IL-10 N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y Kristall und des daraus berechneten Strukturmodells	110
Tab. 4.7:	Experimentelle PCS-Werte des „gemischten“ LBT-IL-10-Dimers in Gegenwart verschiedener Lanthanoidionen	126
Tab. 4.8:	$\Delta\chi$ -Tensorwerte von Lanthanoidionen, die an das „gemischte“ LBT-IL-10-Protein immobilisiert worden waren	129
Tab. 4.9:	Experimentelle, um den Anteil an gebundenem Ligand korrigierte ^1H PCS-Werte von Heparin-Tetrasaccharid	131
Tab. A.1:	^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen (in ppm) von Heparin-Disacchariden bei 25 °C in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 50 mM NaCl (99,8% D_2O)	150
Tab. A.2:	^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen (in ppm) von CS-Disacchariden bei 25 °C in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 50 mM NaCl (99,8% D_2O)	151
Tab. A.3:	^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen (in ppm) von Heparin-Tetrasaccharid bei 25 °C in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 50 mM NaCl (99,8% D_2O)	152

Tabellenverzeichnis

Tab. A.4: ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen (in ppm) von psHA-EDTA-Tetra- saccharid bei 25 °C in 99,8% D_2O	153
Tab. A.5: ^1H - T_1 -Relaxationszeiten (\pm S.E.) (in s) von Heparin-Disacchariden bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz und einer Temperatur von 25 °C	154
Tab. A.6: ^1H - T_1 -Relaxationszeiten (\pm S.E.) (in s) von CS-Disacchariden bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz und einer Temperatur von 25 °C	155
Tab. A.7: ^1H - T_1 -Relaxationszeiten (\pm S.E.) (in s) von Heparin-Tetrasaccharid bei einer Protonenresonanzfrequenz von 700 MHz und einer Temperatur von 25 °C	156
Tab. A.8: NMR-chemische Verschiebungen von murinem IL-10 C149Y mit His8- <i>Tag</i> (BMRB # 19377)	156

Zusammenfassung

Das Zytokin Interleukin-10 (IL-10) ist ein Schlüsselspieler in der Regulation des Immunsystems mit pro- und anti-inflammatorischen Funktionen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Terminierung und Unterdrückung einer Entzündungsantwort, die ansonsten zu einer bleibenden Schädigung des Gewebes führen kann. So inhibiert IL-10 die Synthese von Zytokinen mit inflammatorischer Wirkung wie IFN- γ und TNF- α und von Antigen-präsentierenden Molekülen wie den MHC-Klasse-II-Proteinen. Eine Dysregulation von IL-10 ist mit verschiedenen Krankheitsbildern wie chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und Krebs assoziiert. IL-10 wird von einem breiten Spektrum von Zelltypen, darunter hauptsächlich hämatopoetische Zellen, aber auch epitheliale und mesenchymale Zellen, gebildet und in den extrazellulären Raum freigesetzt. Auf der Zielzelle bindet es an zwei verschiedene Oberflächenrezeptoren und bildet einen ternären Rezeptorkomplex, der den intrazellulären JAK/STAT-Signalweg auslöst. Zusätzlich kann IL-10 im Gewebe mit Komponenten der extrazellulären Matrix in Kontakt treten und eine Bindung an Glykosaminoglykane (GAGs) wurde gezeigt. GAGs sind eine Klasse unverzweigter, polymerer Kohlenhydrate aus wiederholenden Disaccharideinheiten und mit einem hoch negativ geladenen Charakter, welcher durch einen hohen Grad an Sulfatierung in der Zuckerkette zustande kommt. Es existieren fünf Klassen von GAGs: Hyaluronan (HA), Chondroitinsulfat (CS), Dermatansulfat (DS), Keratansulfat (KS) und Heparansulfat (HS)/ Heparin. Sie unterscheiden sich in ihren Monomerbausteinen, der Anzahl und Position der Sulfatgruppen, der Art der glykosidischen Bindung, der Konformation der Zuckerringe und der Art des Kernproteins, an welches sie kovalent gebunden sind. Auf diese Weise entsteht eine größere strukturelle Diversität als im Fall anderer Biomoleküle wie DNA oder Proteine. GAGs binden eine Vielzahl an Signalproteinen (z. B. Wachstumsfaktoren, Chemokine) und Enzymen (z. B. Matrixmetalloproteinasen). Bisher sind weit über 100 GAG-bindende Proteine bekannt. Die Interaktion mit GAGs reguliert ihre biologischen Funktionen, etwa indem sie Einfluss auf die Rezeptorbindung oder die räumliche Verteilung des Proteins im Gewebe nimmt. Schließlich beeinflussen GAGs auch die Aktivität von IL-10. Für lösliche GAGs wurde ein inhibitorischer Effekt beobachtet, während andererseits eine Bindung an zellgebundene GAGs als Voraussetzung der IL-10-Aktivität erschien. Die molekularen Mechanismen dieser Effekte sind bisher unbekannt. Insbesondere ist nichts über die strukturellen Grundlagen der Interaktion bekannt, die Voraussetzung für ihr funktionelles Verständnis sind. In dieser Arbeit wurden daher die Bindungseigenschaften des IL-10-GAG-Systems sowie der strukturelle Aufbau des molekularen Komplexes unter Verwendung von NMR-Spektroskopie in Lösung charakterisiert. Die Untersuchungen wurden am murinen Protein (mIL-10) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit können helfen, die Bedeutung von GAGs und der extrazellulären Matrix für die biologische Wirkung von IL-10 besser zu verstehen. Sie können weiter auch bei der Entwicklung neuer Biomaterialien für die Regenerationsmedizin in Betracht gezogen werden. Bioabbaubare Gerüststrukturen

können eine künstliche extrazelluläre Matrix nachbilden und mit GAGs und regulatorischen Proteinen beladen werden, um Heilungsprozesse im Gewebe zu induzieren oder zu unterstützen.

Mit Hilfe von STD (*saturation transfer difference*)-NMR wurden die Bindungsregionen in GAG-Di- und Tetrasacchariden bestimmt. STD nutzt den intermolekularen Transfer von Magnetisierung vom Protein auf den Ligand, der sich mit ihm im schnellen Austausch relativ zur Zeitskala der NMR-chemischen Verschiebung und der NMR-Relaxation befindet. Der Magnetisierungstransfer führt zur Sättigung und Intensitätsabnahme der Ligandresonanzen in einer abstandsabhängigen Weise. Für viele Bereiche in den GAG-Molekülen wurden starke bis mittelstarke STD-Effekte beobachtet, was zeigt, dass kurze GAG-Liganden im engen Kontakt mit der Proteinoberfläche stehen. Insbesondere wiesen Protonen in der Nähe von Sulfatgruppen hohe STD-Effekte auf, was darauf hindeutet, dass die Sulfate das Ligandmolekül zum Protein hin orientieren und Kontakte mit mIL-10 eingehen. Die Bindungsaffinität wurde unter Auswertung der initialen Wachstumsrate des STD-Verstärkungsfaktors bestimmt. Kurze GAG-Liganden haben eine schwache Affinität zu mIL-10 im millimolaren bis mikromolaren K_D -Bereich, die jedoch mit dem Grad der Sulfatierung und Polymerisation (d. h. mit der Kettenlänge) weiter ansteigt. Die größte Bindungsstärke wurde für Heparin, welches den höchsten Anteil an Sulfatgruppen (drei pro Disaccharideinheit) besitzt, gefunden, während das unsulfatierte Hyaluronan keine Bindung an mIL-10 aufwies. GAGs ab einer Kettenlänge von acht Monomeren zeigen ein kooperatives Bindungsverhalten, d. h., sie können gleichzeitig beide Bindungsstellen auf gegenüberliegenden Untereinheiten des mIL-10-Dimers besetzen, was ein Hill-Koeffizient von 2 nahelegt.

Strukturinformationen über den gebundenen GAG-Liganden wurden am Beispiel eines Heparin-Tetrasaccharidfragments $\Delta\text{UA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}(1\rightarrow4)\text{IdoA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}$ mit Hilfe von *transferred* NOESY-NMR-Experimenten und Moleküldynamikberechnungen erhalten. Der NOE (Kern-Overhauser-Effekt) war im freien Zustand annähernd Null, während in Gegenwart von mIL-10 starke negative NOEs für den Ligand, aufgrund des Anstiegs seiner mittleren Rotationskorrelationszeit, beobachtet wurden. Strukturinformationen des freien Heparins wurden aus ROESY-NMR-Experimenten erhalten. Die generierten Strukturmodelle zeigen eine gebogene Konformation des Zuckerrückgrats, welche durch Bindung an mIL-10 nur wenig gestört wird. Skalare 3J -Kopplungen und charakteristische NOE-Signale zeigen weiterhin, dass das $^1\text{C}_4$ - $^2\text{S}_\text{O}$ -Konformerengleichgewicht des internen Iduronsäurerings auch in Gegenwart des Proteins erhalten bleibt. Diese Ergebnisse zeichnen das Bild eines sehr flexiblen Ligandmoleküls, das in mehreren Konformationen vom Protein erkannt wird und möglicherweise auch im mIL-10-gebundenen Zustand zwischen verschiedenen Strukturen wechseln kann.

Die Lage der GAG-Bindungsstelle in mIL-10 wurde durch eine Kombination verschiedener Protein-detektierter NMR-Methoden aufgeklärt. Zu diesem Zweck musste als Vorarbeit rekombinantes mIL-10 biochemisch in *E. coli* hergestellt, für NMR-Messungen isotonenmarkiert, seine NMR-chemischen Verschiebungen zugeordnet und seine Struktur durch Röntgenkristallographie bestimmt werden. Als ausschlaggebend für den Erfolg der Proteinpräparation, insbesondere der Rückfaltung des Proteins aus *E. coli*-Einschlusskörpern, erwies sich der Austausch des freien Cysteins an Position 149 durch Tyrosin, dem entsprechenden Aminosäurerest im humanen Protein. Diese C149Y-Mutante erreichte eine 10- bis

20-fach höhere Proteinausbeute im Vergleich zum Wildtyp, was eine zeit- und kosteneffiziente Probenherstellung für die NMR-Spektroskopie und Proteinkristallisation ermöglichte. Die NMR-chemischen Verschiebungen der Proteinrückgrat-atome (H_N , N_H , C' , C_α) und der C_β -Seitenkettenatome von mIL-10 wurden durch dreidimensionale $^1H/^{13}C/^{15}N$ -Tripelresonanzexperimente mit 91% Vollständigkeit zugeordnet. Die Arbeit stellt somit die erste NMR-Zuordnung für ein Protein der IL-10-Familie dar. Die chemischen Verschiebungen erlaubten die Bestimmung und Lokalisierung der Sekundärstrukturen in mIL-10 mit Hilfe von TALOS+ und der sekundären ^{13}C -chemischen Verschiebungen (d. h. der Differenz zum Referenzwert von *Random Coil*-Struktur). Sie waren weiterhin Voraussetzung für die Detektion der GAG-Bindungsstelle von mIL-10 auf der Grundlage von $^1H/^{15}N$ -HSQC-Spektren. Die dreidimensionale Struktur von mIL-10 wurde schließlich durch Kristallisation und Röntgenbeugungsmessung mit einer Auflösung von 2,05 Å bestimmt. Sie zeigt eine hohe Übereinstimmung mit den Kristallstrukturen des humanen und viralen IL-10, besitzt jedoch einen kleineren Öffnungswinkel zwischen beiden Dimeruntereinheiten von $\sim 70^\circ$ im Vergleich zu $\sim 90^\circ$ im Fall von hIL-10 und vIL-10, was auf die andere Kristallpackung zurückgeführt wurde. Leider konnte die Cokristallstruktur eines IL-10-GAG-Komplexes nicht bestimmt werden, wohlmöglich aufgrund der geringen Bindungsaffinität und strukturellen Flexibilität des GAG-Liganden. Diese Limitationen wurden durch Verwendung der NMR-Spektroskopie überwunden, die hochaufgelöste Strukturinformationen auch für schnell austauschende Protein-Ligand-Interaktionen liefern kann.

GAGs induzierten eine graduelle Verschiebung der NMR-Signale einzelner Aminosäurereste im $^1H/^{15}N$ -HSQC-Spektrum von mIL-10, die eine grobe Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle auf den Bereich der zentralen Furche des "V"-förmigen mIL-10-Dimers erlaubten. Bei Testung verschiedener GAG-Typen (HA, CS, DS, Heparin) und unterschiedlich langer Heparin-Fragmente (Di-, Tetra- und Hexasaccharid) wurden NMR-Signalverschiebungen für die gleiche Gruppe von Aminosäureresten gefunden, was zeigt, dass alle GAGs an die gleiche Stelle in mIL-10 binden. Höher aufgelöste Strukturinformationen wurden aus der Messung paramagnetischer NMR-Effekte – *Pseudocontact Shifts* (PCSs) und paramagnetischer Relaxationsverstärkung (PRE) – in Kombination mit Ligand-*Docking*-Berechnungen mit Xplor-NIH erhalten. Die Unzugänglichkeit des Systems für konventionelle, NOE-basierte Methoden der NMR-Strukturbestimmung, aufgrund der schnellen Ligandendissoziation und des Mangels an nicht-austauschbaren Protonen in einer Entfernung < 5 Å zur Proteinoberfläche, hatten einen neuartigen experimentellen Ansatz erforderlich gemacht. PCSs werden durch paramagnetische Ionen mit einer anisotropen magnetischen Suszeptibilität hervorgerufen und sind sowohl abhängig vom Abstand als auch von der Orientierung zwischen paramagnetischem Zentrum und Kernspin. Dagegen zeigen PREs nur eine $1/r^6$ -Abstandsabhängigkeit. PCSs wurden für mIL-10 und seinen Heparin-Tetrasaccharidligand in Gegenwart paramagnetischer Lanthanoidionen (Tb^{3+} , Tm^{3+} , Dy^{3+}), die über eine C-terminale Peptidsequenz am Protein fixiert waren, gemessen. PREs der Amidprotonen von mIL-10 wurden mittels eines spinmarkierten, sulfatierten Hyaluronan-Tetrasaccharids induziert. Hierbei waren über einen EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Chelator paramagnetische Ionen (Mn^{2+} oder Cu^{2+}) am nicht-reduzierenden Zuckerenende immobilisiert. Die aus PCS- und PRE-Daten generierten Strukturmodelle zeigen die Ligandenbindung im Bereich von mehreren kationischen Aminosäureresten am C-terminalen Ende von Helix D und dem benachbarten DE-Loop, darunter die Arginine R102,

Zusammenfassung

R104, R106, R107 und Lysine K99, K117, K119. Diese Region ist ein besonderes Merkmal von IL-10 und über Artgrenzen hinweg konserviert. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit anderen theoretischen Ansätzen wie der Berechnung des Coulomb-Potentials von IL-10.

Das Vorkommen einer bestimmten GAG-Bindungsstelle in IL-10 deutet auf eine funktionelle Rolle, die diese Interaktion für die biologische Aktivität von IL-10 spielen kann, hin. Zum Beispiel könnten GAGs dabei helfen, IL-10 im Gewebe anzureichern, um seine Wirkdauer zu verlängern. Außerdem könnte die Bindung an GAGs auf Zelloberflächen ein wichtiger Schritt für die Signaltransduktion sein oder direkt die IL-10-Rezeptorbindung beeinflussen.

Summary

The cytokine interleukin-10 (IL-10) is a key player in the regulation of the immune system with both pro- and anti-inflammatory functions. It plays an important role for termination and suppression of inflammations which otherwise can lead to a persistent tissue damage. IL-10 inhibits the synthesis of inflammatory cytokines as IFN- γ and TNF- α and of antigen presenting molecules as MHC class II proteins. A deregulation of the IL-10 level is related to several diseases e.g. chronic inflammation, autoimmune diseases and cancer. IL-10 is produced by a broad spectrum of cells, primarily by haematopoietic cells, but also by epithelial and mesenchymal cells, and is secreted to the extracellular space. On the target cell it binds to two types of cell surface receptors (i. e. receptor chain 1 and 2) to form a ternary receptor complex which triggers intracellular signaling via the JAK/STAT pathway. Furthermore, IL-10 can potentially make contacts to components of the extracellular matrix that fills the connecting tissue. Indeed, IL-10 binding to glycosaminoglycans (GAGs) was shown. GAGs are a class of unbranched, polymeric carbohydrates composed of numerous copies of a disaccharide repeating unit. They are highly negatively charged due to the high degree of modification with sulfate groups. There exist five classes of GAGs: hyaluronan (HA), chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), keratan sulfate (KS) and heparan sulfate (HS)/ heparin. They differ in their monomeric building blocks, the number and position of sulfate groups, the sugar ring conformation and in the type of the core protein to which they are covalently linked. In this way, a larger structural diversity is created than for other biomolecules such as DNA or proteins.

GAGs are known to bind a variety of signal proteins (e.g. growth factors, chemokines) and enzymes (e.g. matrix metalloproteinases) and to regulate their biological functions. Today more than 100 GAG binding proteins are known. GAGs can produce high local concentrations of the protein, regulate their spatial distribution within the tissue or directly influence receptor binding. Finally, GAGs were also shown to affect IL-10's biological activity. On the one hand soluble GAGs exhibit an inhibitory effect but on the other hand binding to cell surface bound GAGs appeared to be a prerequisite for IL-10 signaling. The molecular mechanisms of these effects still remain unclear. In particular nothing is known about the structural principles of this interaction which are however fundamental for understanding its functional role. In this study the binding properties of the IL-10-GAG system and the structure of the molecular complex were characterized using solution NMR spectroscopy. Investigations were performed on the murine protein (mIL-10). The results of this study can help to understand by which mechanisms the biological activity of IL-10 is regulated by the extracellular matrix. Furthermore, they can also be taken into account for the development of new biomaterials for regenerative medicine. Biodegradable scaffolds that mimic the extracellular matrix can be loaded with GAGs and regulatory proteins to induce and assist healing processes within the tissue.

Summary

Using STD (saturation transfer difference) NMR the binding regions in several GAG di- and tetrasaccharides were determined. STD exploits an intermolecular transfer of magnetization from the protein to the ligand molecule that exists in fast exchange between the protein bound and the soluble state relative the chemical shift and relaxation timescale. The magnetization transfer leads to the saturation and thus intensity loss of the ligand resonances in a distance dependent manner. Medium to strong STD effects were observed for many regions in GAG molecules showing that small GAG ligands are in close contact with the protein surface. The highest STD effects were detected for protons near sulfate groups which indicates that sulfates orient the ligand molecule towards the protein surface and make contacts with mIL-10. GAG binding affinities were determined using the initial growth rate approach of the STD amplification factor. Small GAG ligands have a low affinity for mIL-10 with K_D values in the μM to mM range. However, affinity is increased with the degree of sulfation and polymerization (i.e. the chain length). The highest binding strength was found for heparin, which has also the highest number of sulfate groups (three per disaccharide), whereas the unsulfated hyaluronan showed no binding. GAGs from a chain length of eight monomers exhibit a cooperative binding behavior i.e. both GAG binding sites on opposite subunits of the symmetric mIL-10 dimer are bound simultaneously by one GAG molecule as indicated by a Hill coefficient of nearly 2.

Structural information on the bound ligand were obtained using the example of a heparin tetrasaccharide fragment $\Delta\text{UA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}(1\rightarrow4)\text{IdoA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}$. Therefore, transferred NOESY NMR experiments in conjunction with molecular dynamics calculations were used. Whereas the NOE (nuclear Overhauser effect) was close to zero in the unbound case, strong negative NOEs were observed for the ligand in the presence of mIL-10 due to the increase in its average rotational correlation time. In addition, structural information on the free ligand were obtained from ROESY NMR experiments. The generated structural models show the sugar backbone in a bent conformation that is only slightly altered upon binding to mIL-10. Furthermore, 3J scalar couplings and characteristic NOE signals show that the $^1\text{C}_4\text{-}^2\text{S}_\text{O}$ conformational equilibrium of the internal iduronic acid is sustained in the presence of the protein. These results suggest that the heparin ligand is quite flexible and can be recognized by mIL-10 in multiple conformations of the iduronic acid which can probably undergo interchange also in the protein bound state.

The location of the GAG binding site in mIL-10 was studied by a combination of different protein detected NMR methods. For this purpose, recombinant mIL-10 had to be expressed in *E. coli*, refolded from inclusion body material and isotopically labeled for its use in NMR spectroscopy. Furthermore, its NMR signals had to be assigned and its structure had to be solved. Crucial for the success of the protein preparation, in particular the protein refolding step, was the replacement of the free cysteine at position 149 in mIL-10 by tyrosine, the respective amino acid residue in the human IL-10. This C149Y mutant gave a 10- to 20-fold higher protein yield compared to the wildtype which allowed a time and cost efficient sample preparation for NMR spectroscopy and the protein's crystallization. The NMR chemical shifts of the protein backbone atoms (H_N , N_H , C' , C_α) and of the C_β side chain atoms of mIL-10 were assigned with 91% completeness using a combination of multiple $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ triple resonance experiments. Therefore, this study provides the first NMR assignment for a protein of the IL-10 family. The chemical shifts

allowed the determination and localization of secondary structure elements in mIL-10 using TALOS+ and ^{13}C secondary chemical shifts (i. e. the difference to the random coil reference value). Also, the chemical shift assignment was prerequisite for the detection of mIL-10's GAG binding site on the basis of $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra. Finally, the three-dimensional structure of mIL-10 was solved with a resolution of 2.05 Å by means of x-ray crystallography. It shows a high similarity to the crystal structures of human and viral IL-10. However, the interdomain angle between the two dimer subunits of $\sim 70^\circ$ was smaller than for hIL-10 and vIL-10 ($\sim 90^\circ$) which could be attributed to the different crystal packing. Unfortunately, no cocrystal structure of a IL-10-GAG complex could be obtained probably due to the low binding affinity and high structural flexibility of the GAG ligand. These limitations were overcome by the use of NMR spectroscopy that can offer high resolution structural information even in the case of fast exchanging protein-ligand interactions.

GAG binding induced a gradual shift of the NMR signals of selected amino acid residues observed in the $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectrum of mIL-10. These chemical shift perturbations allowed to narrow down the location of the GAG binding site to the region of the central crevice that is formed by the "V"-shaped mIL-10 dimer. Testing different GAG types (HA, CS, DS, heparin) and heparin fragments with variable chain length (di-, tetra- and hexasaccharides) chemical shift perturbations were observed for the same group of amino acid residues. This shows that all GAGs bind to the same site in mIL-10. Higher resolution structural information were obtained from the measurement of paramagnetic NMR observables, namely pseudocontact shifts (PCSs) and paramagnetic relaxation enhancements (PREs), which were used in combination with ligand docking calculations in Xplor-NIH. The inaccessibility of the mIL-10-GAG system for a conventional, NOE-based NMR structure determination owing to the fast ligand dissociation and the paucity of non-exchangeable ligand protons at a distance < 5 Å to the the protein surface demanded a new experimental approach. PCSs are caused by paramagnetic ions with an anisotropic magnetic susceptibility and depend both on the distance and the orientation between the nuclear spin and the paramagnetic center. In contrast, PREs only show a $1/r^6$ distance dependence. PCSs of mIL-10 and its heparin tetrasaccharide ligand were measured in the presence of paramagnetic lanthanide ions (Tb^{3+} , Tm^{3+} , Dy^{3+}) that were fixed to the protein by means of a C-terminal peptide sequence. PREs of the protein's amide protons were induced by a spinlabeled, sulfated hyaluronan tetrasaccharide. In that case, the paramagnetic ion (Mn^{2+} or Cu^{2+}) was immobilized to the reducing sugar end via an EDTA tag. The PCS- and PRE-based structural models show ligand binding to a region of cationic amino acid residues at the C-terminal end of helix D including arginines R102, R104, R106, R107 and lysines K99, K117, K119. This region is a unique feature of IL-10 and is conserved amongst species. The results are in compliance with other theoretical approaches e. g. the calculation of the proteins Coulomb potential.

The existence of a defined GAG binding site in IL-10 suggests that this interaction plays a functional role for IL-10's biological activity. For example, GAGs could help to enrich IL-10 within in the tissue and to prolong the duration of its biological effect. Furthermore, binding of IL-10 to cell surface bound GAGs could represent an important step for signal transduction or directly influence receptor binding.

1. Einleitung und Zielstellung der Arbeit

Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens und ihrer hohen strukturellen Vielfalt spielen Kohlenhydrate eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Zellfunktionen. Sie sind die Determinante für eine Reihe biologischer Erkennungsvorgänge und vermitteln die Wechselwirkung von Zellen untereinander, mit der sie umgebenden Matrix und mit Pathogenen (Abbildung 1.1) [1]. Das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^X ermöglicht z. B. das Anheften von Leukozyten an Blutgefäßwände während einer Entzündung sowie die zielgerichtete Wanderung von Lymphozyten zu Organen des lymphatischen Systems. Auch der Kontakt zwischen der männlichen Säugetier-Samenzelle und der äußeren Schicht (*zona pellucida*) der Eizelle kommt durch diese Kohlenhydratstruktur zustande. Viele Mikroorganismen – darunter Viren (z. B. Influenza), Bakterien (z. B. *E. coli*) – und ihre Toxine (z. B. Cholera-toxin) haben die Fähigkeit entwickelt, Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche zu binden. Die Bindung ist Voraussetzung und erste Stufe ihres Infektionsprozesses. Weiterhin sind viele, vom Immunsystem erkannten Antigene Kohlenhydrate, so z. B. die AB0-Blutgruppenantigene, welche für die Unterscheidung von körpereigenen und fremden Strukturen verantwortlich sind.

Kohlenhydrate spielen auch eine wichtige Rolle bei vielen intrazellulären Prozessen wie dem Transport und der Faltung von Proteinen. Die Glykosylierung ist ein Merkmal fast aller Proteine und beeinflusst ihre physikochemischen Eigenschaften wie Löslichkeit, Hitze-stabilität, Anfälligkeit für Proteolyse und somit letztlich ihre biologischen Funktionen. Die generierten Zuckerstrukturen können dabei äußerst vielfältig sein, und ein Protein kann in der Position, Sequenz und Anzahl seiner kovalent gebundenen Zuckermoleküle variieren. Diese verschiedenen Formen eines Glykoproteins werden auch als Glykoformen bezeichnet. Eine weitere Ebene der Heterogenität besteht beim Aufbau der Kohlenhydrathülle auf der Zelloberfläche. Die Zucker liegen hier in Form von Glykokonjugaten mit Membranproteinen oder als Glykolipide vor. Die Zusammensetzung jener sog. Glykocalyx verändert sich während der Zelldifferenzierung und ist unterschiedlich zwischen gesunden und malignen Zellen.

Auch an der Wechselwirkung von Zellen mit der sie umgebenden Matrix sind Kohlenhydrate beteiligt. Sie helfen dabei, die Zellen im Gewebe zu verankern und sind außerdem integraler Bestandteil des Extrazellulär-raums selbst. Es handelt sich dabei um eine Gruppe unverzweigter, stark negativ geladener Polysaccharide, die aufgrund ihres Aufbaus aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten mit je einem Aminozucker als Glykosaminoglykane (GAGs) bezeichnet werden. Sie haben eine wichtige Aufgabe als Gerüstsubstanz für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Gewebes, wozu sie Kontakte mit anderen Matrixmolekülen wie Kollagen, Fibronectin und Thrombospondin eingehen. Außerdem können GAGs eine Vielzahl von Signalproteinen wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche von Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben werden, binden [2]. Bisher sind weit über 100 GAG-bindende Proteine bekannt [3]. Es ist die Kom-

1. Einleitung und Zielstellung der Arbeit

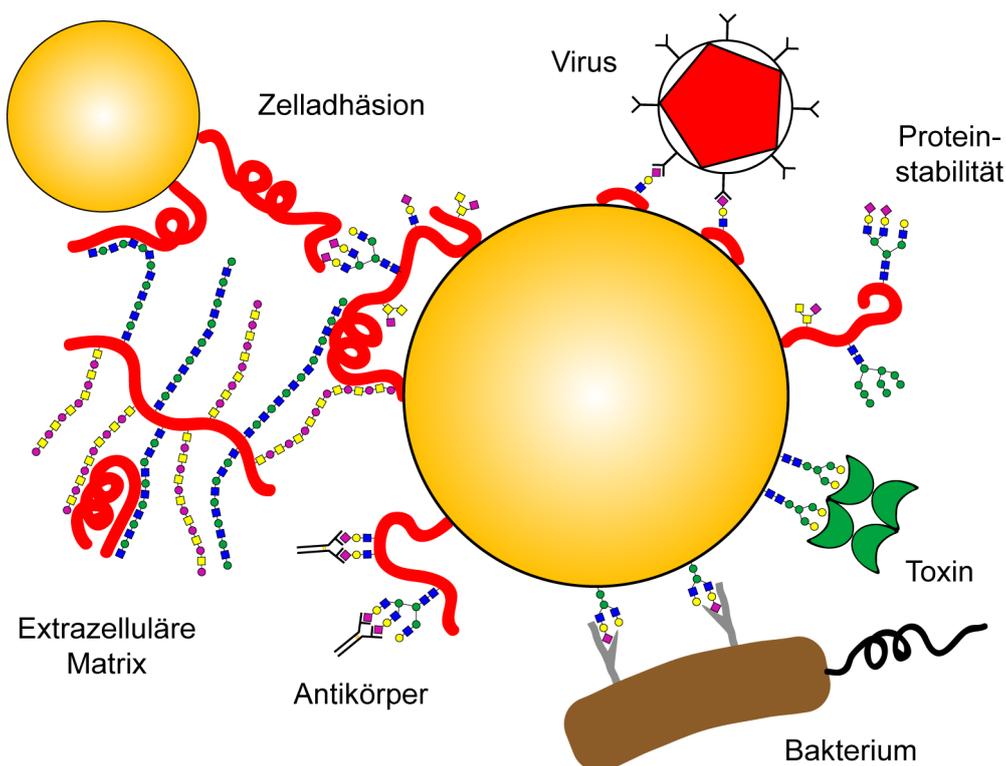


Abbildung 1.1.: Biologische Bedeutung von Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen. Kohlenhydrate vermitteln die Bindung von Pathogenen (Viren, Bakterien), bakteriellen Toxinen und Antikörpern an die Zelloberfläche. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und in der Zellkommunikation. Polysaccharide der extrazellulären Matrix verleihen dem Bindegewebe ein viskoelastisches Verhalten und können mit Zellen und Signalproteinen interagieren.

bination aus ihrem hohen negativen Ladungscharakter und ihrer chemischen Heterogenität sowie Flexibilität (z. B. hinsichtlich Zuckerringkonformation, Torsionswinkeln der glykosidischen Bindung), die es GAGs ermöglicht, mit einem breiten Spektrum verschiedener Proteine in Wechselwirkung zu treten. Diese beeinflusst entscheidend die biologische Funktion der Signalproteine und steuert komplexe zelluläre Vorgänge wie Zelldifferenzierung und Zellmigration. Sie ist z. B. Voraussetzung für die Rezeptorbindung und Oligomerisierung von Wachstumsfaktoren. Weiterhin können GAGs auf der Zelloberfläche lokal hohe Konzentrationen an Chemokinen erzeugen, die als chemische Spur der Wanderung von Zellen im Gewebe dienen [4]. Auf diese Weise locken Chemokine Leukozyten aus dem Blutssystem zum Ort einer Infektion und leiten die erste Phase einer Entzündungsreaktion ein.

Im Verlauf einer Entzündung setzen Immunzellen auch das Zytokin Interleukin-10 (IL-10) in den Extrazellulärraum frei. IL-10 ist ein pleiotropes Zytokin und spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Immunsystems. Es hat wichtige anti-inflammatorische Funktionen, die eine übermäßige Immunantwort, welche zu Zellschädigungen führen kann, verhindern. Eine IL-10-Dysregulation ist mit verschiedenen Krankheitsbildern wie chronischen Entzündungen (z. B. Morbus Chron), Autoimmunerkrankungen (z. B. systemischer Lupus erythematodes) und Krebs (z. B. B-Zell-Lymphom) verbunden. IL-10 wird von zwei Typen von Oberflächenrezeptoren erkannt, worüber es den intrazellulären JAK/STAT-

Signalweg auslöst und die Genexpression der Zielzelle steuert. Zusätzlich kann IL-10 im Gewebe mit Komponenten der extrazellulären Matrix in Wechselwirkung treten, die seine biologischen Funktionen beeinflussen. Salek-Ardakani et al. zeigten, dass IL-10 an Heparin bindet und dass lösliche GAGs (Heparin, Heparan-, Chondroitin- und Dermatansulfat) die IL-10-Aktivität, gemessen an der CD16- und CD64-Expression von Monozyten und Makrophagen, vermindern [5]. Dieser Effekt war abhängig von der Zuckersulfatierung und GAGs mit der höchsten Anzahl an Sulfatgruppen (Heparin und Heparansulfat) hatten die größte inhibitorische Wirkung. Eine Desulfatierung der löslichen GAGs hob die Inhibition der IL-10-Aktivität auf. Dagegen hatte der Verlust von Sulfatgruppen im Fall von zellgebundenen GAGs einen umgekehrten Effekt. Eine Inhibition der GAG-Sulfatierung auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen durch Natriumchlorat verringerte die Aktivität von IL-10 auf diese Zellen. Die Autoren schlussfolgerten, dass membrangebundene GAGs eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion von IL-10 spielen und im Experiment womöglich mit den löslichen GAGs um die IL-10-Bindung konkurrierten. Weitere Informationen zur Wechselwirkung von GAGs mit IL-10 liegen bisher nicht vor. Insbesondere sind die strukturellen Prinzipien, welche die Grundlage der IL-10-GAG-Interaktion bilden, unbekannt. Auch die molekularen Mechanismen, mit denen GAGs in die biologischen Funktionen von IL-10 eingreifen, sind weiter ungeklärt. Hierfür ist eine detaillierte Kenntnis über die Natur des molekularen Erkennungsprozesses Voraussetzung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Bindungseigenschaften des IL-10-GAG-Systems genauer zu charakterisieren. Insbesondere sollten dabei die folgenden Fragen untersucht werden:

- (1) Was sind die Bindungseigenschaften von GAGs hinsichtlich Affinität und Stöchiometrie der Wechselwirkung und von welchen molekularen Faktoren hängen sie ab (z. B. Anzahl und Position der Sulfatgruppen, Molekülgröße)?
- (2) Welcher Teil des GAGs interagiert mit IL-10 und wie ändert sich die GAG-Struktur durch die Proteinbindung?
- (3) Wo befindet sich die GAG-Bindungsstelle in IL-10 und welche Aminosäurereste tragen zur Bindung bei?

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten eine mechanistische Erklärung für die Interaktion von IL-10 mit GAGs liefern. Sie können helfen, die Bedeutung von GAGs für die IL-10-Biologie aufzuklären und sind Ausgangspunkt für ihre weitergehende funktionelle Untersuchung. Ähnlich zu anderen GAG-bindenden Proteinen wäre z. B. eine Funktion bei der Rezeptorbindung oder für die lokale Anreicherung des Proteins im Gewebe denkbar. Aus diesen Kenntnissen können Schlussfolgerungen abgeleitet werden, welche Rolle der extrazellulären Matrix und der lokalen Umgebung von IL-10 bei der Regulation der Proteinaktivität zukommt. Die charakterisierten Bindungseigenschaften von GAGs können weiter auch bei der Entwicklung neuer Biomaterialien für die Regenerationsmedizin in Betracht gezogen werden. Bioabbaubare Gerüststrukturen können eine künstliche extrazelluläre Matrix nachbilden und mit GAGs und regulatorischen Proteinen beladen werden. Nach Implantation werden diese lokal in kontrollierter Weise freigesetzt, um Heilungsprozesse zu induzieren. IL-10 könnte z. B. dabei helfen, Entzündungen herunterzuregulieren, umso die Gewebeneubildung zu unterstützen.

2. Grundlagen

2.1. Molekulare Grundlagen der Protein-Glykosaminoglykan-Wechselwirkung

2.1.1. Extrazelluläre Matrix - Aufbau und Funktion

Gewebe bestehen nicht nur aus Zellen. Einen erheblichen Teil ihres Volumens nimmt der extrazelluläre Raum ein, der von einem komplexen Geflecht aus Makromolekülen – der extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM) – angefüllt ist. Diese besteht aus einer Vielzahl von Strukturproteinen und Polysacchariden, die von Zellen ausgeschieden werden und mit ihnen an ihrer Oberfläche in enger Verbindung bleiben. Ein hoher Anteil an extrazellulärer Matrix findet sich im Bindegewebe, welches bei Wirbeltieren das Grundgerüst des Körpers bildet und dessen physikalische Eigenschaften maßgeblich durch die vorhandenen Matrixkomponenten bestimmt wird. Durch sie kann das Gewebe z. B. hart und fest (Knochen), durchsichtig (Hornhaut des Auges) oder seilartig und elastisch (Sehnen und Knorpel) sein. Eine Basallamina aus extrazellulärer Matrix trennt Epithelien und Muskelzellen von dem sie umgebenden Bindegewebe und hat wichtige Funktionen bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität, als mechanische Barriere und zur Filterung des Blutplasmas (Nierenglomerulus). Auch bei den in ihr eingebetteten Zellen reguliert die extrazelluläre Matrix komplexe Vorgänge, so z. B. deren Überleben, Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Zellform und Funktion [6]. Die Verankerung von Zellen mit der Matrix passiert dabei hauptsächlich durch das Protein Fibronectin welches Bindungsstellen für mehrere Zelloberflächenrezeptoren und Matrixmoleküle besitzt. Durch Vermittlerproteine (vor allem Integrine) werden außerdem Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix übertragen [7]. So treiben z. B. Actinfilamente des Zellzytoskeletts den Zusammenbau und die Organisation von Fibronectinfibrillen auf der Zelloberfläche an [8]. Umgekehrt bewirken auch Fibronectinfibrillen die Ausbildung intrazellulärer Stressfasern, die sich zu ihnen parallel ausrichten. Auf diese Weise kann die extrazelluläre Matrix ein Ordnungsprinzip auf Zellen übertragen und zur Ausbildung von Strukturen und Zellverbänden mit einer vorgegebenen Polarität führen [6].

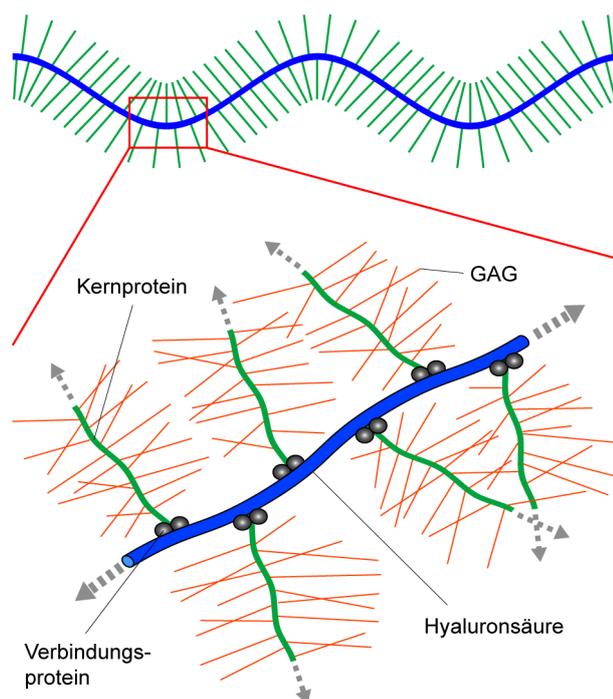
Die extrazelluläre Matrix besteht aus zwei Hauptklassen von Molekülen: faserförmigen Proteinen wie Kollagen, Elastin und Laminin sowie Polysacchariden, welche meist in einem kovalenten Komplex mit Proteinen (Proteoglykanen) vorliegen. Kollagen ist der Hauptbestandteil von Knochen und Haut und stellt mit 25% des Proteinanteils das häufigste Protein bei Säugetieren dar. Die dichte Packung des Kollagens zu einer superspiralisierten Tripelhelix und ihre Organisation zu Fibrillen können dem Gewebe eine hohe Zug- und Druckfestigkeit verleihen. Wichtige Bedeutung für die Elastizität und Dehnbarkeit des Gewebes besitzen wiederum elastische Fasern, deren Hauptbestandteil das Protein Elastin ist. Den größten Teil des Extrazellulärraums füllen schließlich lange Polysaccha-

2. Grundlagen

ricketten aus. Aufgrund ihres Aufbaus aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die stets einen Aminozucker enthalten, werden sie als Glykosaminoglykane (siehe Abschnitt 2.1.2) bezeichnet. Sie sind stark negativ geladen und ziehen große Mengen an Gegenionen und Wasser an, sodass sie die Form hydratisierter, poröser Gele annehmen. Sie verleihen dem Gewebe ein viskoelastisches Verhalten sowie besondere Quell- und Gleiteigenschaften. Aufgrund der Viskoelastizität treten Formveränderungen bei Krafteinwirkung gegenüber einem rein elastischen Verhalten deutlich zeitverzögert und mit verminderter Amplitude ein, was einer natürlichen Stoßdämpferwirkung entspricht. Ein lokales Quellen der Glykosaminoglykane wiederum kann einen Quelldruck in der extrazellulären Matrix aufbauen, der hydratisierte Zwischenräume erzeugt und dem Transport von Sauerstoff und Nährstoffen im Gewebe dient.

Glykosaminoglykane liegen als kovalenter Komplex mit Proteinen vor, der als Proteoglykan bezeichnet wird (Abbildung 2.1). Ihre Synthese erfolgt im Golgi-Lumen, wo ausgehend von einer speziellen Tetrasaccharidsequenz (GlcA-Gal-Gal-Xyl) die Zuckerreste an das Kernprotein angefügt werden und die Polysaccharidkette durch Glykosyltransferasen weiter verlängert wird [9]. Hier erfolgt auch die Epimerisierung bestimmter Zuckerreste (z. B. D-Glukuronsäure) und die Modifizierung mit Sulfatgruppen durch Sulfotransferasen [10].

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Proteoglycans Aggrecan (nach [6]). Der Komplex besteht aus etwa 100 Aggrecanmonomeren, welche jeweils aus einem Kernprotein und kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen (GAGs) bestehen. Aggrecan besitzt etwa 100 Chondroitinsulfat- und 30 Keratansulfatketten. Über Hyaluronan-bindende Proteine wird die Bindung an das Hyaluronsäure-Rückgrat vermittelt. Die molekulare Masse des Komplexes kann bis zu 10^8 Da betragen.



Proteoglykane können sehr heterogen aufgebaut sein. Aggrecanmoleküle, die Haupt-Proteoglykane des Knorpels, tragen z. B. ungefähr 100 Kohlenhydratketten und haben ein Molekulargewicht von ca. 3 MDa [11]. Sie können sich zusammen mit Hyaluronan zu noch größeren Komplexen zusammenlagern, welche die Größe eines Bakteriums annehmen können (Abbildung 2.1). Andere Proteoglykane haben dagegen nur wenige Kohlenhydratketten und sind wesentlich kleiner. Decorin trägt z. B. nur eine Kohlenhydratkette und hat eine Molekülmasse von rund 40 kDa [12]. Es bindet an Kollagenfibrillen und ist für die Ausbildung von Kollagenfasern wichtig [13].

Auch Zelloberflächen-Proteoglykane sind bekannt. Sie können entweder mit einem Teil ihres Kernproteins in der Zellmembran eingelagert (z. B. Syndecane) oder über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an der Oberfläche der Zelle verankert sein (z. B. Glypicane) [14]. Angesichts der Menge und Strukturvielfalt der Proteoglykane ist es nicht verwunderlich, dass ihre Aufgaben darüber hinausgehen, nur den Extrazellulärraum auszufüllen und das Gewebe zu stabilisieren. Sie können eine Vielzahl von Signalproteinen (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine) und Matrixmolekülen binden und ihre Aktivität regulieren [15].

2.1.2. Glykosaminoglykane - Struktur und Funktion

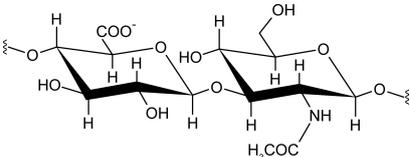
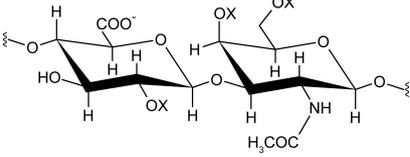
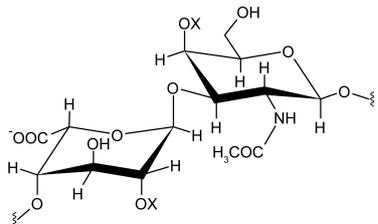
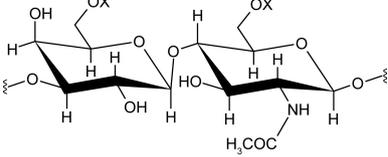
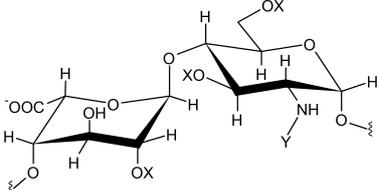
Glykosaminoglykane (GAGs) sind unverzweigte Polysaccharide, die aus wiederholenden Disaccharideinheiten, bestehend aus einer Uronsäure (D-Glukuronsäure oder L-Iduronsäure) und einem Hexosamin (D-Glukosamin oder D-Galaktosamin), aufgebaut sind. Anhand ihrer unterschiedlichen Monosaccharid-Zusammensetzung, Art der glykosidischen Bindung und der Modifizierung mit Sulfatgruppen werden GAGs in fünf Klassen unterteilt: Hyaluronan (HA), Chondroitinsulfat (CS), Dermatansulfat (DS), Keratansulfat (KS) und Heparansulfat (HS)/ Heparin. Diese sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Eine zusätzliche Diversität innerhalb der Klassen kommt durch unterschiedliche Muster und Grade der Sulfatierung zustande. Sulfatgruppen werden während der GAG-Biosynthese im Golgi-Apparat durch spezielle Sulfotransferasen eingeführt. Das Expressionsmuster dieser Enzyme (oder ihrer gewebespezifischen Isoformen) und ihre Substratspezifität sorgen für die große Sequenzdiversität innerhalb der GAG-Kette. Heparin, welches in Mastzellen gebildet wird, enthält z. B. hauptsächlich das dreifach sulfatierte Disaccharid IdoA,2S- α (1 \rightarrow 4)-GlcNS,6S- α (1 \rightarrow 4) [16]. Dagegen ist die Sequenz von HS deutlich heterogener und weist neben Regionen mit hoher Sulfatierung und vorrangig IdoA (S-Domänen) auch solche, die reich an N-Acetylglukosamin und arm an Sulfatgruppen sind (NA-Domänen) sowie Übergangszonen zwischen beiden (gemischte Domänen) auf [17, 18, 19].

Eine weitere Ebene struktureller Diversität liegt bei der Ringkonformation der Zuckerreste vor (Abbildung 2.2). Für Glukosamin- und Galaktosaminreste ist die 4C_1 -Sesselkonformation am stabilsten, weil in dieser Form die meisten Substituenten innerhalb der Ringebene liegen und so den größten Abstand zueinander haben. Unsulfatierte IdoA kann eine 4C_1 - oder 1C_4 -Konformation einnehmen, während 2-O-sulfatierte IdoA in einem Gleichgewicht zwischen 1C_4 und 2S_0 vorliegt [20]. Die Lage dieses Gleichgewicht wird entscheidend durch den Sulfatierungsgrad der benachbarten Glukosaminreste bestimmt [21, 22]. Der 1C_4 - 2S_0 -Übergang ändert die lokale Zuckerstruktur und die 2-O-Sulfatgruppe wechselt ihre Stellung relativ zur Ringebene. Dagegen wird die globale Konformation des Kohlenhydratrückgrats nicht entscheidend verändert [23], wie die Modellstruktur eines Heparin-Dodekasaccharids zeigt (Abbildung 2.3) [24]. In diesem nimmt das Heparin die Struktur einer rechtsgängigen Helix mit einer Ganghöhe von ca. 18 Å und zwei Disaccharideinheiten pro Windung ein.

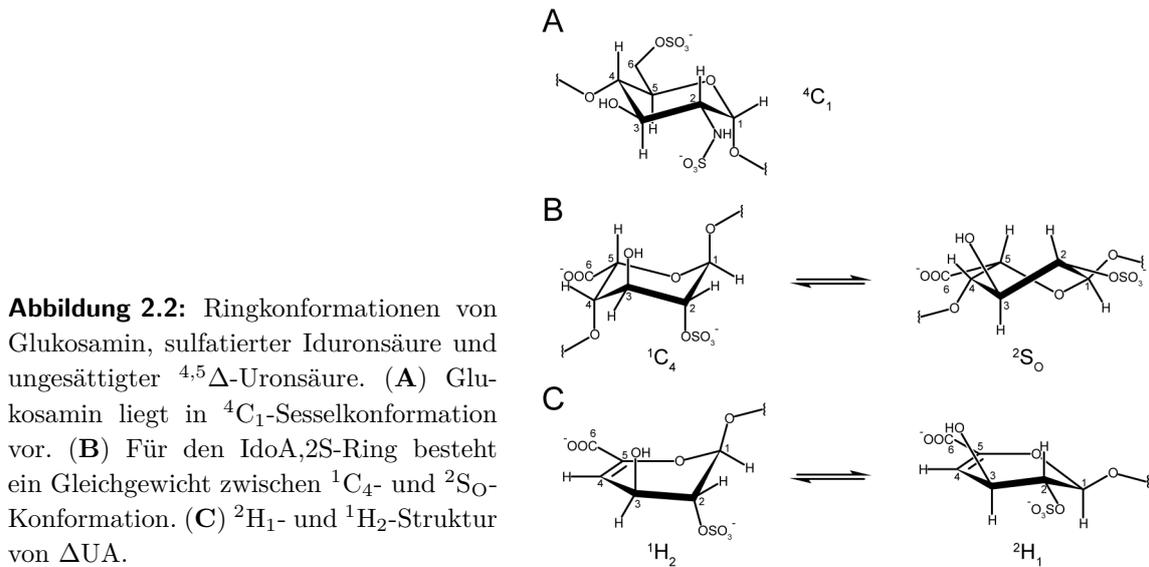
GAGs haben Funktionen als Strukturbausteine und beeinflussen, wie in Abschnitt 2.1.1 auf der vorherigen Seite beschrieben, die physikalischen Eigenschaften des sie umgebenden Gewebes. In Form hydratisierter Gele verleihen sie ihm ein viskoelastisches Verhalten. Darüber hinaus ermöglicht ihnen ihre chemische Heterogenität, hinsichtlich des Sulfatie-

2. Grundlagen

Tabelle 2.1.: Klassifizierung von GAGs anhand ihrer Disaccharid-Wiederholungseinheiten.

GAG-Klasse	Disaccharid/ Bezeichnung	Modifizierung
Hyaluronan (HA)	 GlcA- β (1 \rightarrow 3)-GlcNAc- β (1 \rightarrow 4)	-
Chondroitinsulfat (CS)	 GlcA- β (1 \rightarrow 3)-GalNAc,4S- β (1 \rightarrow 4) GlcA- β (1 \rightarrow 3)-GalNAc,6S- β (1 \rightarrow 4) GlcA,2S- β (1 \rightarrow 3)-GalNAc,6S- β (1 \rightarrow 4) GlcA- β (1 \rightarrow 3)-GalNAc,4S,6S- β (1 \rightarrow 4)	X = H oder SO ₃ ⁻ 4-O-Sulfat 6-O-Sulfat 2-O-Sulfat, 6-O-Sulfat 4-O-Sulfat, 6-O-Sulfat
Dermatansulfat (DS)	 IdoA,2S- α (1 \rightarrow 3)-GalNAc,4S- β (1 \rightarrow 4)	X = H oder SO ₃ ⁻ 2-O-Sulfat, 4-O-Sulfat
Keratansulfat (KS)	 Gal- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc,6S- β (1 \rightarrow 3) Gal,6S- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc,6S- β (1 \rightarrow 3)	X = H oder SO ₃ ⁻ 6-O-Sulfat 6-O-Sulfat, 6-O-Sulfat
Heparin (HP)/ Heparansulfat (HS)	 IdoA,2S- α (1 \rightarrow 4)-GlcNS,6S- α (1 \rightarrow 4) GlcA- α (1 \rightarrow 4)-GlcNAc- α (1 \rightarrow 4)	X = H oder SO ₃ ⁻ Y = H, SO ₃ ⁻ oder COCH ₃ X = H oder SO ₃ ⁻ Y = H, SO ₃ ⁻ oder COCH ₃
	<ul style="list-style-type: none"> • Haupt-Disaccharid HP IdoA,2S-α(1\rightarrow4)-GlcNS,6S-α(1\rightarrow4) • Haupt-Disaccharid HS GlcA-α(1\rightarrow4)-GlcNAc-α(1\rightarrow4) 	2-O-Sulfat, 2-N-Sulfat, 6-O-Sulfat -

IdoA ... α -L-Iduronsäure, GlcA ... β -D-Glukuronsäure, GlcN ... α / β -D-Glukosamin, GalN ... β -D-Galaktosamin



lungsmusters und der Struktur des Kohlenhydratrückgrats, mit einer Vielzahl von Proteinen und Molekülen in der extrazellulären Matrix in Wechselwirkung zu treten [15, 2]. Die MatrixDB-Datenbank (<http://matrixdb.ibcp.fr>) [25], welche Protein-Protein- und Protein-GAG-Interaktionen in der extrazellulären Matrix erfasst, zählt bis heute 174 GAG-bindende Proteine. Die molekularen Grundlagen ihrer Interaktionen wurden mit strukturellen, biochemischen und bioinformatischen Methoden untersucht (siehe dazu Ausführungen in Abschnitt 2.3 auf Seite 27). Eine wichtige Beobachtung ist, dass GAG-Bindungsstellen oft an ausgedehnten Oberflächen des Proteins gefunden werden und immer positiv geladene Aminosäuren (Arginine, Lysine und zu einem geringen Anteil auch Histidine) beinhalten. Es wird vermutet, dass elektrostatische Kräfte zwischen ihnen und den GAG-Sulfat- und Carboxylatgruppen einen Hauptbeitrag zur Bindungsenergie liefern. Jedoch können auch andere Interaktionen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, unter Beteiligung hydrophiler, polarer Aminosäuren (z. B. Asparagin, Glutamin), wichtige energetische Beiträge liefern [26, 27, 28], welche in einigen Fällen sogar die Wechselwirkungsenergie von geladenen Resten übertreffen können [29].

Viele Studien verwendeten kurze Oligosaccharide des Heparins, welches als Mimetikum der mehrfach sulfatierten S-Domänen von Heparansulfat dienen kann. Die hohe Anzahl an Sulfatgruppen erlaubt Heparin affine Interaktionen mit dem Protein einzugehen, und die Flexibilität in der Zuckerrückgratstruktur, aufgrund des IdoA-Konformationswechsels und der Torsion um glykosidische Bindungen, ermöglicht ihm, sich der Proteinoberfläche formgenau anzupassen. Chondroitinsulfat- und Keratansulfat-bindende Proteine sind dagegen nur wenig bekannt. Dennoch sind Interaktionen mit Chondroitinsulfat von großer biologischer Bedeutung, da es das häufigste GAG im Körper darstellt [2].

Durch ihre Wechselwirkung mit Proteinen haben GAGs eine wichtige Funktion für die chemische Signalübertragung zwischen Zellen. Sie binden sezernierte Signalmoleküle z. B. Wachstumsfaktoren und stimulieren oder inhibieren ihre Aktivität. Heparansulfat-Seitenketten von Proteoglykanen binden z. B. an Proteine der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. *fibroblast growth factor*, FGF)-Familie, die wachstumsfördernd auf eine Vielzahl von Zellen wirken und bei Entwicklungsprozessen und der Angiogenese eine wichtige Rolle

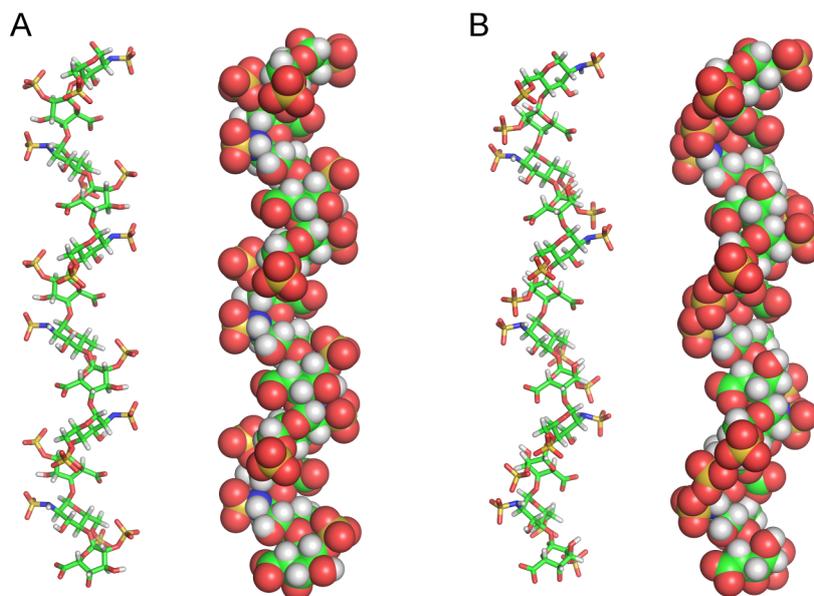


Abbildung 2.3.: Strukturmodell eines Heparin-Dodekasaccharids. Das Modell (PDB # 1HPN) wurde mit Hilfe von NMR-Daten und durch molekulare Modellierung erstellt [24]. Die Iduronsäure liegt in (A) 2S_O -Konformation oder (B) 1C_4 -Konformation vor. Die helikale Struktur der Heparinkette ist zu erkennen. Wasserstoff-, Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelatome sind weiß, grün, rot, blau bzw. gold gefärbt.

spielen [14]. Die Interaktion mit GAGs führt zur FGF-Oligomerisierung [30, 31] und unterstützt die Zusammenlagerung mit dem FGF-Rezeptor (FGFR) [32, 33, 34], der daraufhin ebenfalls oligomerisiert und somit aktiviert wird. Eine minimale Länge der GAG-Kette von acht Zuckerresten ist für die Quervernetzung zweier FGF-Moleküle und die Bildung des ternären FGF/FGFR-Komplexes notwendig [35, 36].

GAGs binden und regulieren weitere sezernierte Proteine im extrazellulären Raum z. B. Zytokine, Proteasen und Proteaseinhibitoren [2]. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie die Interaktion mit GAGs die Aktivität dieser Proteine regulieren kann:

- (1) Sie blockiert sterisch die Wechselwirkung mit anderen Bindungspartnern. So wird z. B. die Rezeptorbindung von RANK (engl. *receptor activator of NF- κ B*)-Ligand, der für die Differenzierung von Knochenzellen in Osteoklasten und den Knochenabbau eine wichtige Rolle spielt, durch GAGs gehemmt [37, 38].
- (2) Sie verändert den Proteinzustand (z. B. seine Quartärstruktur), was die Wechselwirkung mit Zelloberflächenrezeptoren begünstigt (siehe FGF-Rezeptorbindung).
- (3) Das gebundene Protein wird an seinem Freisetzungsort festgehalten und sein Wirkungsradius begrenzt oder nach und nach ins Gewebe abgegeben. Dies erfordert eine Feinregulierung der GAG-Bindungsaffinität z. B. durch GAG-Sequenzen mit unterschiedlich hohem Sulfatierungsgrad. Auf diese Weise können gewebespezifische Reservoirs an Zytokinen [39] oder Konzentrationsgradienten an Morphogenen und Chemokinen [4, 40] entstehen. Es wurde gezeigt, dass Stromazellen des Knochenmarks Zytokine (z. B. IL-3, GM-CSF) in ihrer Umgebung durch Heparansulfat-Proteoglykane anreichern und so spezifische Nischen für die Proliferation und Differenzierung von

hematopoetischen Stammzellen schaffen [41, 42, 43]. Außerdem können GAGs eine chemische Spur von Chemokinen erzeugen und so die Wanderung von Leukozyten zu Entzündungsstellen im Gewebe steuern.

- (4) Das gebundene Protein wird vor dem Abbau durch Proteasen geschützt, was seine Wirkzeit verlängert. Dies wurde z. B. für Typ-II-Kollagen [44] und Interferon- γ [45] beobachtet. Außerdem werden mehrere Mitglieder der Serinproteaseinhibitor (Serpine)-Familie durch GAGs in ihrer Aktivität stimuliert [46]. Gut untersucht ist dabei die Rolle von Heparin für die Inhibition von Thrombin und Faktor-Xa durch Antithrombin (AT)-III, welche für die gerinnungshemmende Wirkung des Heparins verantwortlich ist [47, 48, 49, 50]. Die Bindung eines spezifischen Pentasaccharid-Motivs (GlcNAc,6S- α (1 \rightarrow 4)-GlcA- β (1 \rightarrow 4)-GlcNS,3S,6S- α (1 \rightarrow 4)-IdoA,2S- α (1 \rightarrow 4)-GlcNS,6S) führt zur Strukturänderung und Freilegung eines reaktiven *Loops* von AT-III, welcher die Protease inhibiert. Für die Hemmung von Thrombin ist zusätzlich eine Quervernetzung mit AT-III durch Heparin erforderlich.

2.2. Interleukin-10

IL-10 ist ein pleiotropes Zytokin mit wichtigen Funktionen in der Regulation der Immunantwort. Es wird von nahezu allen Leukozyten des Immunsystems gebildet. Die wichtigsten zellulären Quellen sind Monozyten, Makrophagen und T-Helferzellen [51]. Als lösliches Zytokin wird es in den extrazellulären Raum abgegeben und kommt dort mit den Komponenten der extrazellulären Matrix, wie den Proteoglykanen, in Kontakt. Die Untersuchung dieser Wechselwirkung war Gegenstand der vorgelegten Arbeit. Nachfolgend sollen daher die biologischen Funktionen, die Struktur und Signalgebung von IL-10 näher beleuchtet werden.

2.2.1. Biologische Funktionen

Der Umfang des Wirkungsspektrums von IL-10 wird eindrucksvoll durch die große Anzahl von Genen (bis zu 3000), deren Expressionslevel sich auf ein IL-10-Signal hin ändert, demonstriert [52]. Eine wichtige Rolle nehmen die anti-inflammatorischen Funktionen von IL-10 ein. Seine vordergründigste Aufgabe wird in der Verhinderung und Limitierung von Überreaktionen der Immunantwort und somit in Konsequenz von Gewebeschädigungen gesehen [53]. IL-10-defiziente Mäuse entwickeln spontan Enteritis und weitere Symptome verwandt zu Morbus Crohn [54]. Sie zeigen eine erhöhte T_H1 -Zellantwort [55], Abwehr von Bakterien- und Pilzinfektionen [56, 57] und verstärkte Symptome von Asthma und Allergie [58, 59]. Die immunsupprimierende Wirkung von IL-10 ist hauptsächlich auf seine Fähigkeit, die Produktion von Zytokinen zu hemmen, zurückzuführen, wonach es ursprünglich als ein die Zytokinsynthese inhibierender Faktor (engl. *cytokine synthesis inhibitory factor*, CSIF) beschrieben wurde [60]. IL-10 inhibiert in vielen Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, T_H1 -Zellen, neutrophile Granulozyten) die Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6) und Chemokine (z. B. IL-8) [61, 62]. Weiterhin hemmt es in Makrophagen und Dendritischen Zellen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation, indem es die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und den MHC-Klasse-II-Proteinen unterdrückt [63, 64]. Gleichzeitig wird

2. Grundlagen

in diesen Zellen die Produktion und Freisetzung von anti-inflammatorischen Mediatoren (z. B. IL-1-Rezeptorantagonist, löslicher TNF- α -Rezeptor) ausgelöst [65, 66]. Zusammen mit IL-4 hemmt IL-10 die Mastzellentwicklung [67] und Expression von IgE-Antikörpern [68], die an der Entstehung von allergischen Reaktionen beteiligt sind. Neben seiner immunsupprimierenden Wirkung hat IL-10 aber auch stimulatorische Effekte auf bestimmte Immunzellen. So verhindert es die Apoptose von B-Lymphozyten und unterstützt stattdessen ihre Proliferation, Differenzierung und MHC-II-Expression [69, 70]. Außerdem stimuliert IL-10 die zytotoxische Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und induziert in ihnen die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α und GM-CSF [71].

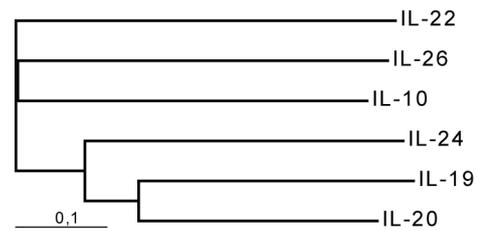
Seine immunmodulatorischen Funktionen machen IL-10 zu einem vielversprechenden Kandidaten für therapeutische Anwendungen zur Behandlung von akuten und chronischen Entzündungen (z. B. rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Psoriasis), Autoimmun- und Infektionserkrankungen [72]. Aber auch die Inhibition von IL-10 in Fällen von Überexpression (z. B. B-Zell-Lymphom, systemischer Lupus erythematodes) [73] stellt eine mögliche therapeutische Anwendung dar. Allerdings erzielte eine systemische IL-10-Applikation in verschiedenen klinischen Testszenarien nur geringe Erfolge. Als mögliche Gründe wurden Polymorphismus des IL-10-Rezeptorgens in Patienten, die begrenzte Stabilität des IL-10-Dimers vor allem bei geringen Konzentrationen sowie das facettenreiche Wirkungsspektrum von IL-10 mit pro- und anti-inflammatorischen Funktionen gesehen [72]. Roers et al. beobachteten, dass IL-10 aus verschiedenen zellulären Quellen unterschiedliche, nicht redundante Funktionen hervorrufen kann [74]. Diese Beobachtung zeigt, dass die Einstufung von IL-10 als allein immunsupprimierend zu vereinfacht ist und dass IL-10-Effekte neben der Art der Effektorzelle auch von ihrer lokalen Umgebung abhängig sind. Die gezielte Applikation von IL-10 durch Stimulation bestimmter sezernierender Zellen oder durch Freisetzung aus zellähnlichen Wirkstoffsystemen ins Gewebe könnte einen möglichen zukünftigen Therapieansatz darstellen.

2.2.2. Verwandtschaftsbeziehungen

Mehrere virale und zelluläre IL-10-Homologe sind bekannt und werden zur IL-10-Familie zusammengefasst. Virale Homologe wurden in den Genomen des Epstein-Barr-Virus (EBV) [75, 76], des equinen Herpesvirus Typ-2 (EHV2) [77], des Orf-Parapoxvirus (OV) [78] und des Cytomegalievirus (CMV) [79, 80] gefunden. Mit Ausnahme von cmvIL-10 ist die Sequenzähnlichkeit zwischen viralem und zellulärem IL-10 sehr hoch (ebvIL-10: 89,8%, ehv2IL-10: 77,5%, ovIL-10: 76,6%, cmvIL-10: 26,3%) (Abbildung 2.5). Abgesehen von kleinen Unterschieden im N-terminalen Teil teilen sie die gleiche dreidimensionale Struktur mit zellulärem IL-10 [81, 82, 83], wie die Kristallstrukturen von ebvIL-10 (PDB # 1VLK) [84, 85] und cmvIL-10 (PDB # 1LQS) [86] zeigen. Sie binden an den gleichen Rezeptor wie zelluläres IL-10, jedoch im Fall von ebvIL-10 mit einer ca. 1000-fach geringeren Affinität [87]. Es ist denkbar, dass virales IL-10 eine evolutionäre Anpassung für das Virus darstellt, um sich vor dem Immunsystem des Wirts zu schützen. Jedoch sind bisher keine experimentellen Nachweise über die Rolle von viralem IL-10 *in vivo* z. B. für den viralen Lebenszyklus oder den Schutz infizierter Körperzellen vor dem Immunsystem bekannt.

Zelluläre IL-10-Homologe umfassen IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 und IFN- λ 1, IFN- λ 2 und IFN- λ 3 [90, und Referenzen darin]. Sie teilen eine deutlich geringere Se-

Abbildung 2.4: Phylogramm der IL-10-Familie. Der Aminosäuresequenzvergleich der zugehörigen humanen Proteine wurde mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) [88, 89] durchgeführt. Die Skalierung am unteren Rand gibt den phylogenetischen Abstand in Aminosäuresubstitutionen pro Position wieder.



quenzhomologie mit IL-10 und unterscheiden sich von IL-10 und voneinander in ihrer biologischen Funktion. Sie weisen die gleiche Faltung auf wie IL-10 und sind Monomere [91, 92, 93], mit Ausnahme von IL-26, welches auch ein Dimer ist [94]. Auf Grundlage von Sequenzhomologie und der Erkennung einer gemeinsamen Rezeptorkette 2 kann die IL-10-Familie in zwei weitere Subgruppen unterteilt werden (Abbildung 2.4). IL-10, IL-22 und IL-26 bilden einen Komplex mit IL-10-Rezeptor 2 (IL-10R2) während IL-19, IL-20 und IL-24 mit IL-20-Rezeptor 2 (IL-20R2) assoziieren [91, 92, 93]. Der Aufbau ihrer Signalkomplexe aus verschiedenen Kombinationen einer primären (IL-10R1, IL-20R1 und IL-22R1) und sekundären Rezeptorkette (IL-10R1 und IL-20R2) ist im Einklang mit den nicht redundanten Funktionen der Zytokine der IL-10-Familie (Abbildung 2.6).

2.2.3. Struktur und Rezeptorbindung

IL-10 ist ein dimeres 36 kDa Protein mit einer Kettenlänge von 160 Aminosäuren je Monomer. Zusammen mit allen Klasse-2-Zytokinen teilt es die gleiche Domänenarchitektur, d. h. sechs Sekundärstrukturelemente, von denen Helices A, C, D und F ein für alle helikalen Zytokine typisches linksgängiges 4-Helixbündel bilden, an welches zwei weitere Helices B und E gepackt sind (Abbildung 2.7) [91]. Geringe strukturelle Unterschiede bestehen zu den Typ-I-Interferonen. So ist ein typisches Merkmal der IL-10-Faltung ein 50°-Knick der Helix F, welche von der Aminosäurekette des AB-Loops umrundet wird. IL-10 weist weiterhin eine besondere Dimerstruktur auf, die durch Interkalation der Helices von zwei benachbarten Proteinketten zustande kommt (engl. *domain swapping*) [93]. Eine Dimeruntereinheit wird dabei aus den Helices A - D des einen Monomers und den Helices E' und F' des zweiten Monomers gebildet. Jede Untereinheit wird durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken strukturell stabilisiert und ist mit der gegenüberliegenden durch eine kurze Loop-Region verbunden. Jene erlaubt einen gewissen Grad an Bewegung beider Domänen, wie anhand des Öffnungswinkels des IL-10-Dimers in verschiedenen Kristallstrukturen als Resultat der unterschiedlichen Kristallsymmetrie und damit der Molekülpackung beobachtet werden konnte [95, 86, 85]. Der Loop zwischen Helix D und E sowie die Disulfidbrücke C62-C114 spielen auch eine entscheidende Rolle für die Dimerisierung selbst. Die Disulfidverknüpfung fixiert die Konformation des DE-Loops und verhindert, dass sich die Helices einer einzelnen Proteinkette zusammenfalten können, sondern mit denen einer zweiten Proteinkette interkalieren. Josephson et al. konnten zeigen, dass durch Insertion von sechs Aminosäuren (GGGSGG) zwischen Position N116 und K117 und dadurch Verlängerung des DE-Loops das Protein sich tatsächlich als Monomer faltet [96]. Die Kristallstruktur war sehr ähnlich zu einer einzelnen Untereinheit des IL-10-Dimers [97].

Die bisherigen Kenntnisse zu den Mechanismen der Signaltransduktion von IL-10 wurden ausführlich von Sabat et al. [53] zusammengetragen. IL-10 vermittelt seine biologischen

2. Grundlagen

	10	20	30	40	50	60																																																		
hIL-10	----	SPGQGTQSENSCTHFP	GNLPMRLDLRDAF	SRVKTFFQMKDQ	LDNMLLKE	SLEDF	56																																																	
mIL-10	----	SRGQYSREDNNC	THFPVGGSHMLLE	LRTAFSQVKTF	FQTKDQLDN	ILLTDSIMQDF	56																																																	
EBVIL-10	-----	TQCDNFPQMLRDL	RDAF	SRVKTFFQTK	DEVNMLLKE	SLEDF	44																																																	
EHV2IL-10	----	DNKYDSESGDD	CPTLPTSLPHML	HELRAAF	SRVKTFFQMKDQ	LDNMLLDG	SLEDF																																																	
OVIL-10	-EYE	SEEDKQCGSSNF	PASLPHMLREL	RAAFGRVKT	FFQMKDQ	LSMLLTSLLDDF	59																																																	
CMVIL-10	SEEAK	PATTTIKNTK	PQCRPE	DYATRLQDLR	VTFHRV	KPTLQREDDYS	VWLDG----																																																	
	70	80	90	100	110	120																																																		
hIL-10		KG	YLG	CA	LS	EM	IQFY	LEE	VMP	QAE	NQ	DP	-	IK	AH	VNS	LGE	N	L	K	T	L	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	115																					
mIL-10		KG	YLG	CA	LS	EM	IQFY	LEE	VMP	QAE	NQ	DP	-	IK	AH	VNS	LGE	N	L	K	T	L	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	115																					
EBVIL-10		KG	YLG	CA	LS	EM	IQFY	LEE	VMP	QAE	NQ	DP	-	AK	DH	VNS	LGE	N	L	K	T	L	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	103																					
EHV2IL-10		KG	YLG	CA	LS	EM	IQFY	LEE	VMP	QAE	NH	ST	D	Q	E	K	D	K	V	N	S	L	G	E	K	L	K	T	L	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	116														
OVIL-10		KG	YLG	CA	LS	EM	IQFY	LEE	VMP	QAE	NH	G	P	-	IK	AH	VNS	LGE	N	L	K	T	L	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	118																				
CMVIL-10		KGC	WGC	SV	M	D	W	L	L	R	R	Y	L	E	T	V	F	P	A	G	D	H	V	Y	P	G	-	L	K	T	E	L	H	S	M	R	S	T	L	E	S	I	Y	K	D	M	R	Q	C	P	-	I	L	G	C	114
	130	140	150	160																																																				
hIL-10		NK	S	K	A	V	E	Q	V	K	N	A	F	N	K	L	Q	E	K	G	I	Y	K	A	M	S	E	F	D	I	F	I	N	I	E	A	Y	M	T	M	K	I	R	N	160											
mIL-10		NK	S	K	A	V	E	Q	V	K	S	D	F	N	K	L	Q	D	Q	G	V	Y	K	A	M	S	E	F	D	I	F	I	N	I	E	A	Y	M	T	M	K	M	K	S	160											
EBVIL-10		NK	S	K	A	V	E	Q	V	K	I	N	A	F	N	K	L	Q	E	K	G	I	Y	K	A	M	S	E	F	D	I	F	I	N	I	E	A	Y	M	T	M	K	A	R	-	147										
EHV2IL-10		NK	S	K	A	V	E	Q	V	K	S	A	F	S	K	L	Q	E	K	G	V	Y	K	A	M	S	E	F	D	I	F	I	N	I	E	A	Y	M	T	M	K	M	N	161												
OVIL-10		NK	S	K	A	V	E	Q	V	K	R	V	F	N	M	L	Q	E	R	G	V	Y	K	A	M	S	E	F	D	I	F	I	N	I	E	S	Y	M	T	M	K	M	--	161												
CMVIL-10		D	K	S	-	V	I	S	R	L	S	Q	E	A	E	R	K	S	D	N	C	T	R	K	L	S	E	L	D	T	L	F	S	R	L	E	Y	L	H	S	R	K	--	156												

Abbildung 2.5.: Aminosäuresequenzen von humanem, murinem und viralem IL-10. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) [88, 89] durchgeführt. Die Abkürzungen bedeuten: EBV ... Epstein-Barr-Virus, EHV2 ... equines Herpesvirus Typ-2, OV ... Orf-Parapoxvirus, CMV ... Cytomegalievirus. Als Vergleichsmatrix wurde die Blossum-Matrix verwendet. Das Öffnen und Verlängern einer Lücke wurde mit einem Score-Wert von 10 bzw. 0,2 bestraft. Positionen, an denen in mindestens 50% der verglichenen Sequenzen die gleiche oder eine ähnliche Aminosäure gefunden wurde, sind dunkel- bzw. hellblau gefärbt.

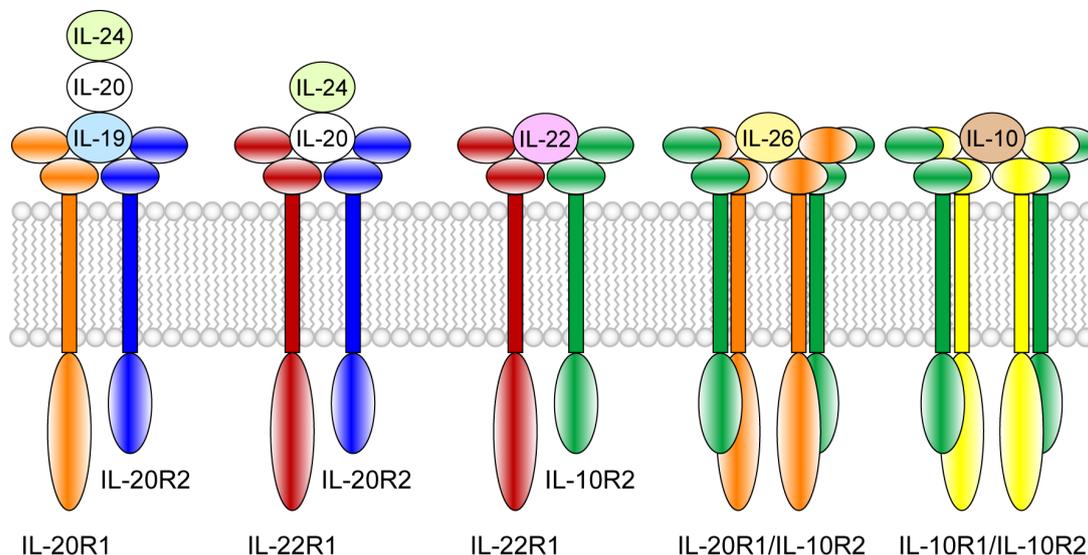


Abbildung 2.6.: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe der IL-10-Familie [91, 92, 93]. Auf Grundlage von Sequenzhomologie und Verwendung einer gemeinsamen Rezeptorkette 2 kann die IL-10-Familie in zwei Subgruppen unterteilt werden. IL-19, IL-20 und IL-24 binden an den gleichen homodimeren Rezeptorkomplex IL-20R1/IL-20R2, wobei IL-20 und IL-24 die Signalgebung aber auch mit IL-22R1 induzieren können. Dagegen erkennen IL-10, IL-22 und IL-26 nur IL-10R2 und bilden homo- oder heterodimere Signalkomplexe mit IL-10R1, IL-22R1 bzw. IL-20R1. IL-10 und IL-26 sind dimere Proteine. Ihr Rezeptorkomplex besteht wahrscheinlich aus jeweils zwei Kopien von Rezeptorkette 1 und 2.

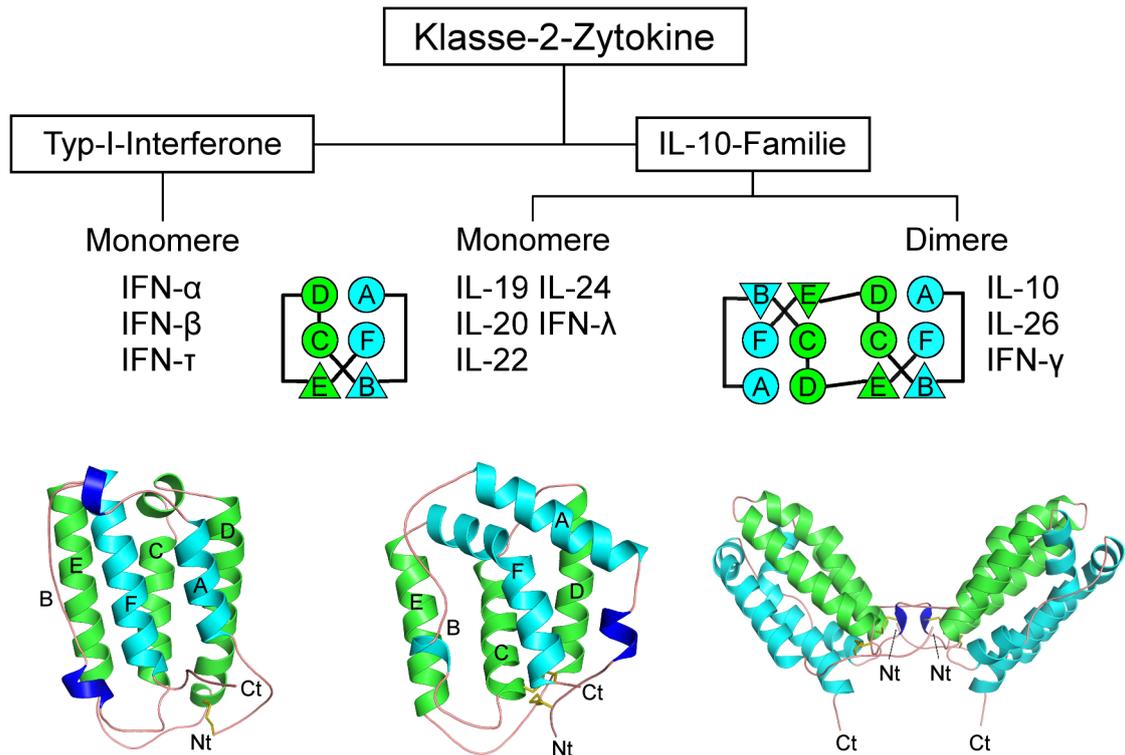


Abbildung 2.7.: Domänenarchitektur und Struktur der Klasse-2-Zytokine (nach [91]). Die Strukturen von IFN- α 2b (PDB # 1ITF), IL-22 (PDB # 1M4R) und IL-10 (PDB # 2ILK) als Beispiele für Typ-I-Interferone sowie für monomere und dimere Proteine der IL-10-Familie sind gezeigt. Helices A, B und F sind cyan, Helices C, D, und E grün und 3_{10} -Helices blau gefärbt. Die räumliche Organisation der Helices ist schematisch gezeigt. Helices A, C, D und F (Zylinder) bilden ein für alle helikalen Zytokine typisches 4-Helixbündel, das durch Helices E und B (Dreiecke) zum 6-Helixbündel komplettiert wird.

Funktionen durch Bindung an zwei Transmembranrezeptoren (IL-10R1 und IL-10R2), mit denen es einen ternären Signalkomplex bildet. Die Rekrutierung beider Rezeptoren erfolgt sequentiell. Zuerst bindet IL-10 an IL-10R1, zu dem es eine hohe Affinität ($K_D \sim 500$ pM) besitzt [98]. Geringfügige Konformationsänderungen von IL-10 ermöglichen schließlich das Binden des schwach affinen IL-10R2, welcher zum binären IL-10/IL-10R1-Komplex eine 10-fach höhere Affinität ($K_D \sim 200$ μ M) aufweist als zu IL-10 allein [99]. Beide IL-10-Rezeptoren sind an ihrer zytoplasmatischen Domäne konstitutiv mit Proteintyrosinkinasen assoziiert – IL-10R1 mit Jak1 (Januskinase 1) und IL-10R2 mit Tyk2 (Tyrosinkinase 2). Diese phosphorylieren nach Aktivierung des IL-10-Rezeptorkomplexes spezifische Tyrosinreste in der intrazellulären Domäne von IL-10R1 und erlauben so das Binden des Transkriptionsfaktor-Proteins STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription*) [100, 101]. In bestimmten Zelltypen werden auch STAT1 und STAT5 aktiviert [102]. Die STAT-Proteine werden ihrerseits durch Jak1 und Tyk2 phosphoryliert und aktiv in den Zellkern transportiert, wo sie die Expression IL-10-responsiver Gene auslösen, z. B. von SOCS-1/3 (engl. *suppressor of cytokine signalling*) [103], des IL-1-Rezeptorantagonisten [65] und des löslichen TNF- α -Rezeptors [66]. Diese vermitteln die Inhibition von Zytokinrezeptoren und damit viele der immunsupprimierenden Eigenschaften von IL-10.

2. Grundlagen

Andere Genprodukte von IL-10 sind dafür bekannt, mit der Wirkung von Komponenten der *toll-like*-Rezeptorsignalwege zu interferieren, worin Sabat et al. einen weiteren Mechanismus zur Regulation der Immunantwort durch IL-10 sehen [52, 53]. Das Protein Abin-3 inhibiert den Transport des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern und verhindert so die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6. Die Proteine Bcl-3 und IKBNS wiederum sind am Transport des inaktiven p50/p50-Homodimers von NF- κ B in den Zellkern, wo sie das Binden der aktiven p50/p65-Form des Transkriptionsfaktors blockieren, beteiligt. DUSP-1 schließlich ist ein Inhibitor der Proteinkinase p38, welche im Zusammenspiel mit weiteren Mediatorproteinen die Lebensdauer der TNF- α mRNA kontrolliert. Inhibition von p38 hat letztlich einen schnelleren mRNA-Abbau und somit eine geringere Translation von TNF- α zu Folge.

Wie in Abbildung 2.6 gezeigt, teilen die Mitglieder der IL-10-Familie die gleiche allgemeine Topologie ihres Signalkomplexes, bestehend aus zwei Rezeptorketten mit extrazellulären und zytoplasmatischen Domänen. Bis zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit

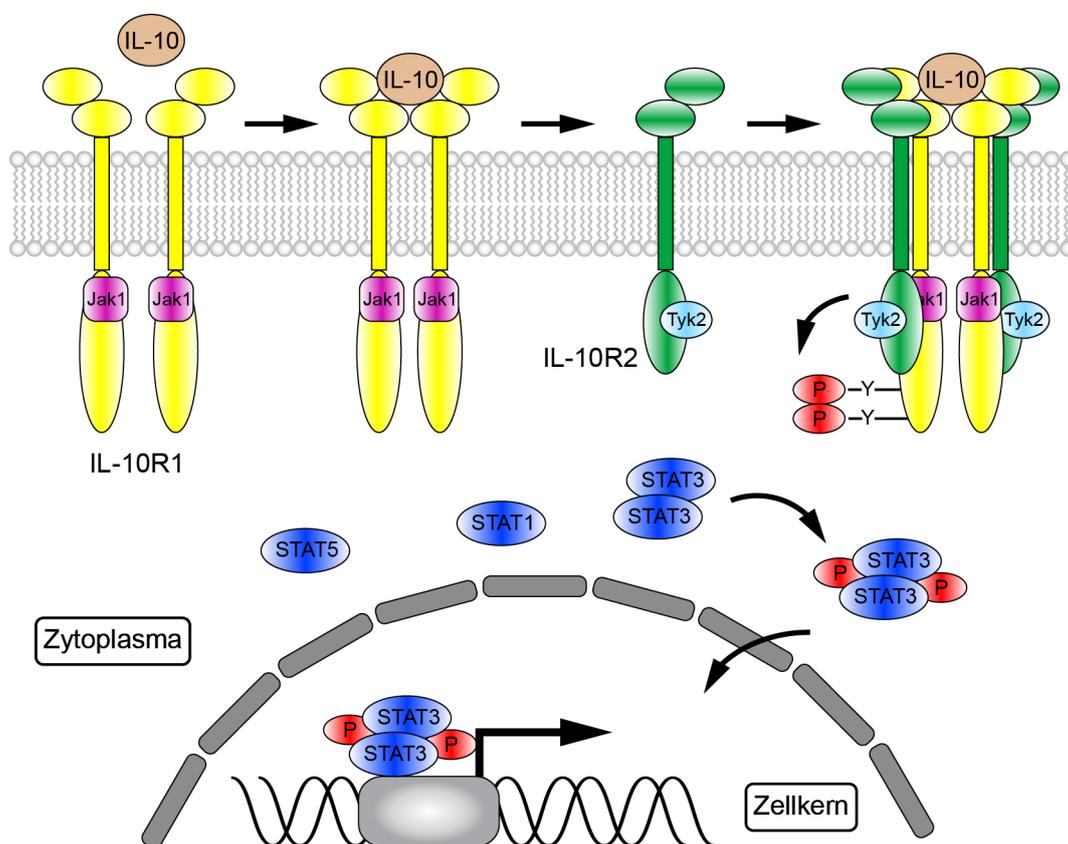


Abbildung 2.8.: Schema der IL-10-Signaltransduktion (nach [53]). IL-10 besitzt zwei Zelloberflächenrezeptoren, an die es nacheinander bindet und die konstitutiv mit Tyrosinkinasen (Jak1 und Tyk2) assoziiert sind. Nach Bildung des ternären Rezeptorkomplexes phosphorylieren diese spezifische Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne von IL-10R1, welche anschließend die Bindung von STAT-Proteinen (STAT1, STAT3 und in bestimmten Zelltypen auch STAT5) vermitteln. Rezeptorgebundene STAT-Proteine werden durch Jak1 und Tyk2 phosphoryliert und damit ihre DNA-bindende Eigenschaft aktiviert. Anschließend werden STAT-Homo- und Heterodimere aktiv in den Zellkern transportiert, wo sie an DNA-Kontrollsequenzen verschiedener Promotoren binden und die Gentranskription induzieren.

waren drei Kristallstrukturen von Zytokinrezeptorkomplexen der IL-10-Familie aufgeklärt: des binären IL-10/IL-10R1- (PDB # 1J7V und 1Y6K) [85, 95, 104] und IL-22/IL-22R1-Komplexes (PDB # 3DLQ) [105] sowie des ternären IL-20/IL-20R1/IL-20R2-Komplexes (PDB # 4DOH) [106] (Abbildung 2.9). Aufgrund der geringen Affinität von IL-10R2 konnte der ternäre IL-10-Rezeptorkomplex bisher nicht kristallisiert werden und die Frage nach seiner exakten Stöchiometrie ist weiter offen. Es ist zu vermuten, dass die Protein-Quartärstruktur auch die Rezeptor-Oligomerisierung bestimmt. So war in der Kristallstruktur ein IL-10-Dimer mit zwei Molekülen IL-10R1 assoziiert und für den ternären Rezeptorkomplex wäre ein Zustand mit jeweils zwei Kopien von IL-10R1 und IL-10R2 plausibel. Allerdings scheint auch ein Komplex mit einem einzelnen IL-10R1/IL-10R2-Rezeptorpaar in der Lage zu sein, die Signaltransduktionskaskade auszulösen. Monomeres IL-10 bildete mit IL-10R1 einen 1:1-Komplex und zeigte biologische Aktivität, wenn auch 10-fach geringer als das dimere Protein [96]. Die Affinität zum Rezeptor relativ zu der des Wildtyps war um den Faktor 60 verringert. Dimere haben sicherlich einen energetischen Vorteil gegenüber Monomeren, weil sie von zwei Rezeptormolekülen gleichzeitig gebunden werden können. Die damit theoretisch höhere Lebensdauer des Rezeptorkomplexes sowie seine Fähigkeit mehr Signalmoleküle gleichzeitig zu binden, könnten die höhere biologische Aktivität des dimeren IL-10 erklären. Die Strukturen des IL-20- und IL-22-Rezeptorsystems zeigen dagegen das Zytokin in einem 1:1-Komplex mit dem Rezeptor und legen für die monomeren Mitglieder der IL-10-Familie diese Bindungsstöchiometrie nahe.

Die Rezeptor-1-Bindungsstelle von IL-10 wurde anhand der Kristallstruktur von IL-10/IL-10R1 [95] im Detail untersucht und ist mit derjenigen der viralen IL-10-Proteine (ebvIL-10 [85] und cmvIL-10 [86]) weitgehend identisch. Die Kontaktfläche wird auf Seite des Liganden durch Helix A, den AB-Loop und Helix C gebildet. Auf Rezeptorseite tragen die Loops L2 - L4 der N-terminalen Domäne und L5 - L6 der C-terminalen Domäne zur IL-10-Bindung bei. Viele Kontakte sind elektrostatischer Natur, die ungerichtet wirken und der Annäherung beider Moleküle über größere Entfernung dienen. Zwei aromatische Reste von IL-10R1, Y43 und F143, bilden Schlüsselkontakte, die in hydrophobe Taschen von IL-10 binden und beide Moleküle miteinander verzahnen. Interessanterweise fehlt in ebvIL-10, aufgrund der veränderten Struktur des N-Terminus, die passende hydrophobe Tasche für F43, was die geringere Affinität von ebvIL-10 für den IL-10-Rezeptor erklären kann.

Verschiedene experimentelle und rechnerische Ansätze wurden verfolgt, um ein Modell des ternären IL-10/IL-10R1/IL-10R2-Rezeptorkomplexes zu erhalten [82, 99, 107]. In dieser Arbeit wurde ein Homologiemodell erstellt (Abbildung 2.9) und der Diskussion der experimentellen Ergebnisse zugrunde gelegt. Das Modell wurde durch räumliche Überlagerung der Struktur des verwandten IL-20/IL-20R1/IL-20R2-Komplexes mit der Struktur des IL-10/IL-10R1-Komplexes sowie mit derjenigen der einzelnen IL-10R2-Kette (PDB # 3LQM) [107] generiert. Die C_{α} -RMSD-Werte für die Überlagerung von IL-10 mit IL-20 und IL-10R1 mit IL-20R1 betragen: 1,53 Å bzw. 2,16 Å. Zwischen IL-10R2 und IL-20R2 bestehen dagegen größere strukturelle Unterschiede (C_{α} -RMSD = 5,80 Å), vor allem aufgrund des veränderten Winkels zwischen N- und C-terminaler Domäne. Sicherlich kann dieses Modell den natürlichen Zustand nur mit eingeschränkter Genauigkeit widerspiegeln und Interaktionen an der Kontaktfläche zwischen IL-10 und IL-10R2 werden gewiss nicht korrekt wiedergegeben. Allerdings entspricht die globale Architektur den bisherigen

2. Grundlagen

experimentellen Daten und ist in Einklang mit anderen z. B. durch molekulares *Docking* generierten Modellen [107].

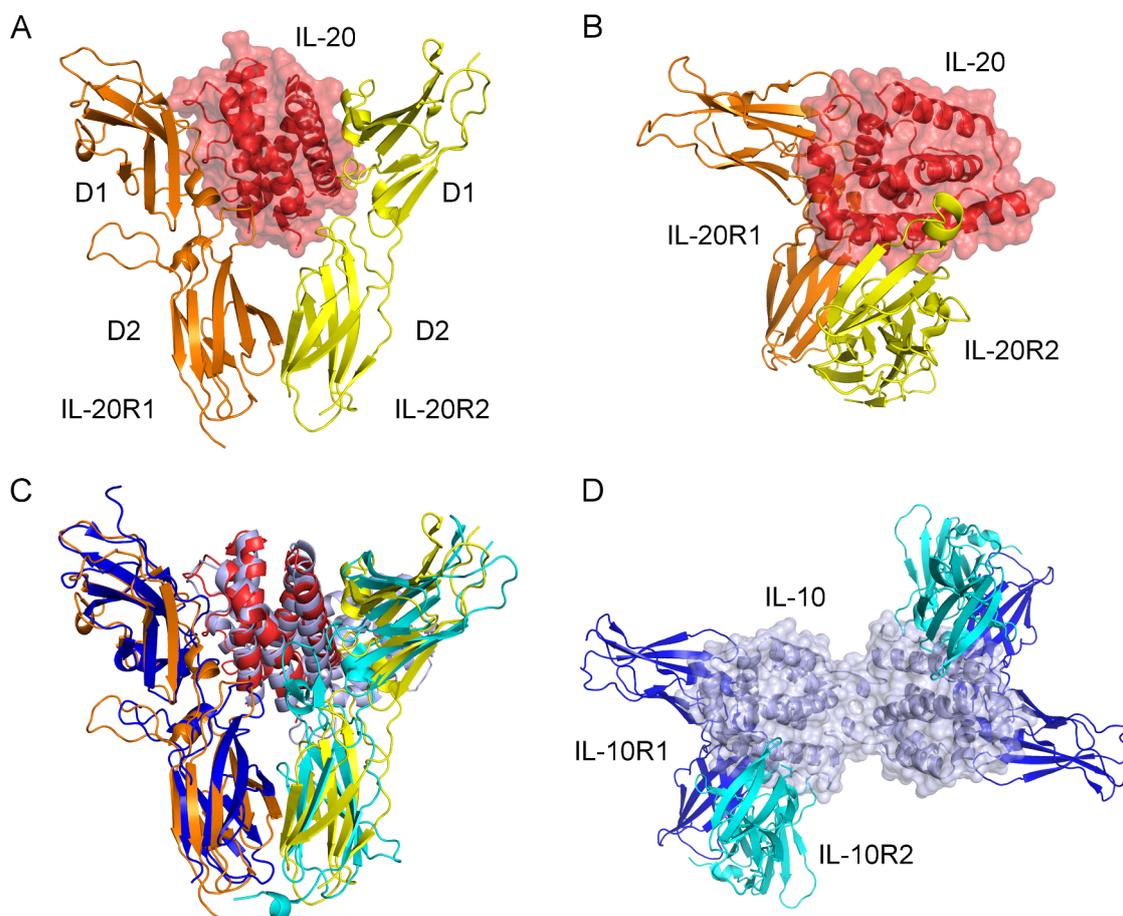


Abbildung 2.9.: Kristallstruktur des IL-20/IL-20R1/IL-20R2-Komplexes und Homologiemodell für den IL-10/IL-10R1/IL-10R2-Komplex durch Superposition der einzelnen Bindungspartner. (A) *Cartoon*-Darstellung der Struktur des ternären IL-20/IL-20R1/IL-20R2-Komplexes (PDB # 4DOH) [106]. Die Van-der-Waals-Oberfläche von IL-20 ist angedeutet. Der zytoplasmatische Teil beider Rezeptorketten besteht aus einer N- und C-terminalen Domäne (D1 bzw. D2) mit einer Fibronectin-Typ-III-Topologie und der Form eines β -Sandwichs. Der Blickwinkel ist parallel zur gedachten Ebene der Zellmembran. (B) Struktur des IL-20-Rezeptorkomplexes von senkrecht oberhalb der gedachten Membranebene aus betrachtet. (C) Räumliche Überlagerung von IL-20/IL-20R1/IL-20R2 mit der Kristallstruktur des binären IL-10/IL-10R1-Komplexes (PDB # 1Y6K) [85, 95] (dunkel- und hellblau) und der Kristallstruktur von IL-10R2 (PDB # 3LQM) [107] (cyan). Der C_{α} -RMSD-Wert für die Überlagerung beider Zytokine bzw. beider Rezeptorketten 1 und 2 betrug 1,53 Å, 2,16 Å bzw. 5,80 Å. (D) Draufsicht auf das Homologiemodell des ternären IL-10-Rezeptorkomplexes senkrecht zur gedachten Membranebene. Aufgrund seiner Dimerstruktur bildet IL-10 wahrscheinlich einen Komplex mit der Stöchiometrie 1:2:2.

2.3. Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen mit NMR-Spektroskopie

Verschiedene biophysikalische und bioinformatische Methoden werden angewendet, um die Konformation von GAGs und ihre Interaktionen mit Proteinen zu untersuchen. Hochaufgelöste Strukturinformationen können dabei mittels NMR-Spektroskopie, Röntgenkristallographie, molekularer Modellierung oder durch eine Kombination dieser Methoden erhalten werden.

Die Kristallisation von Protein-GAG-Komplexen stellt eine besondere Herausforderung dar. Bisher konnten nur wenige Cokristallstrukturen von Proteinen mit GAGs aufgeklärt werden – darunter für den basischen (bFGF) [30] und sauren Fibroblasten-Wachstumsfaktor (aFGF) [31] und ihre ternären Rezeptorkomplexe [35, 36], den von Stromazellen gebildeten Faktor 1 (engl. *stromal cell-derived factor 1*, SDF-1)[108], Antithrombin-III [47, 109, 110], Annexin V [111], Annexin A2 [112], Thrombospondin-1 [113] und die N-terminale Domäne des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF) [114]. Untersuchungen beschränkten sich dabei, aufgrund der Schwierigkeit bei der Synthese von GAGs, vor allem auf kurze Fragmente aus 2 bis 10 Zuckermomeren. Diese werden oft durch chemische oder enzymatische Depolymerisation von GAGs aus natürlichen Quellen gewonnen, können aber nur begrenzt nach Sulfatierungsmuster oder Kettenlänge gereinigt werden. Für den Erfolg der Kristallisation ist jedoch eine homogene Probenzusammensetzung entscheidend. Eine weitere Hürde bildet die Natur der Protein-GAG-Wechselwirkungen selbst. Sie umfasst vor allem elektrostatische Interaktionen, die ungerichtet wirken und mehrere gebundene Ligandkonformationen erlauben. Die bisherigen Strukturen zeigen, dass der GAG-Ligand oft an ausgedehnten Stellen auf der Proteinoberfläche statt in einer vorgeformten Tasche bindet, was ihm genug Raum für strukturelle Umorientierungen lässt. Schließlich mögen kurze GAG-Fragmente anders als ihre polymeren Ketten nur eine geringe Affinität zum Protein aufweisen und die Proteinbindungsstelle deshalb nicht vollständig besetzen. Die beschriebenen Mechanismen führen zusammen zu einem sehr heterogenen Zustand und können die Detektion der Ligandstruktur im Kristall verhindern. Nichtsdestotrotz bieten die bisher gelösten Kristallstrukturen sehr detaillierte Einsichten in die molekularen Grundlagen der GAG-Bindung und ihren Einfluss auf die Proteinstruktur.

Vorhersagen zur Bindungsstelle und Bindungsgeometrie können auch durch molekulare *Docking*-Berechnungen gemacht werden. Eine Eingrenzung der Bindungsregion kann dazu im Vorfeld z. B. durch Identifizierung stark positiv geladener Proteinbereiche anhand ihres Coulomb-Potentials [115] oder durch die Kartierung von bevorzugten Sulfatgruppenpositionen an der Proteinoberfläche gemacht werden [116]. Eine Schwierigkeit des *Dockings* besteht darin, die molekulare Flexibilität, sowohl auf Ligand- als auch auf Proteinseite, ausreichend zu berücksichtigen. Modellierung aller Aminosäure- und Zuckerseitenkettenkonformere ist rechnerisch zu aufwendig und erfordert stattdessen eine bestimmte Ebene der Abstraktion [117].

Die NMR-Spektroskopie schließlich bietet eine Fülle an experimentellen Ansätzen, um strukturelle und dynamische Eigenschaften des Protein-GAG-Systems zu studieren. So können passende NMR-Observablen für verschiedene Zeitbereiche und Affinitäten der Wechselwirkung ausgenutzt werden. Protein-GAG-Wechselwirkungen sind oft durch Bindungsstärken im mikromolaren bis millimolaren K_D -Bereich charakterisiert. Dies ist nor-

2. Grundlagen

malerweise mit einer schnellen Dissoziationsrate der entsprechenden Komplexe und so mit einem schnellen Austausch auf der Zeitskala der NMR-chemischen Verschiebung und der NMR-Relaxation verbunden. NMR-Experimente, welche Vorteil aus dem schnellen Austausch ziehen, sind deshalb besonders gut geeignet, um Protein-GAG-Wechselwirkungen zur untersuchen. Generell ist es möglich, entweder die NMR-Signale des Liganden oder des Proteins auszuwerten, wonach Ligand-detektierte von Protein-detektierten NMR-Experimenten unterschieden werden.

2.3.1. Ligand-detektierte NMR-Experimente

In diesen Experimenten ist der Ligand die beobachtete molekulare Spezies und er wird im Überschuss zum Protein titriert. Generelle Vorteile dieser Methoden sind, dass sie nur geringe Mengen an Protein (wenige nmol) und i. d. R. keine zusätzliche Isotopenmarkierung mit ^{13}C , ^{15}N oder ^2H benötigen. Klassische NMR-Parameter wie chemische Verschiebung, Linienbreite und Relaxationszeiten (T_1 , T_2) können gemessen werden und Auskunft über die Lage des Gleichgewichts zwischen gebundenem und freiem Ligand geben. Im Fall von schnellem Austausch, d. h., es wird ein gemeinsames Signal für gebundenen und freien Ligand beobachtet, ist der Wert des NMR-Parameters in Näherung nur abhängig vom molaren Anteil beider Formen und kann deshalb zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten herangezogen werden. Dagegen entsteht z. B. im Fall der Relaxationsraten ein zusätzlicher Beitrag aus dem chemischen Austausch, wenn dieser im intermediären oder langsamen Zeitregime erfolgt. Die Änderung der Relaxationszeit (bzw. Linienbreite) erfolgt dann nicht mehr proportional zum gebundenen Anteil.

Eine weitere Methode stellt die Messung des Diffusionskoeffizienten des Liganden durch NMR-Experimente mit gepulsten Feldgradienten (engl. *pulsed field gradients*, PFG) dar. Der Diffusionskoeffizient verringert sich mit Proteinbindung und ist u. a. abhängig vom K_D -Wert und dem Protein-Ligand-Verhältnis. Unterschiede in der Diffusion können als Auswahlfilter für die schnelle Testung von Wirkstoffen in der Arzneimittelforschung verwendet werden. Allerdings ist das Fenster, in dem zwischen Bindung und Nicht-Bindung diskriminiert werden kann, klein, denn der Messwert des Diffusionskoeffizienten wird vor allem durch die viel schnellere Diffusion des freien Liganden bestimmt. Andere Experimente nutzen deshalb einen intermolekularen Transfer von Magnetisierung zum Nachweis der Protein-Ligand-Wechselwirkung (z. B. STD [118], WaterLOGSY [119], NOE *pumping* [120]).

In STD (engl. *saturation transfer difference*)-NMR-Spektroskopie wird durch selektive Anregung von Proteinresonanzen Spinpolarisation erzeugt, welche sich sehr effektiv durch Kreuzrelaxation und Spindiffusion über das Protein und den gebundenen Ligand ausbreitet. Verlässt der Ligand die Bindungsstelle, so trägt er die Information über den gebundenen Zustand in Form von Spinpolarisation mit sich, die als Sättigung seines Signals im freien Zustand detektiert wird. Aufgrund des schnellen Austauschs zwischen beiden Zuständen und der langsamen Relaxation des freien Liganden ist der Sättigungstransfer sehr effizient und kann selbst bei hohem Ligandüberschuss leicht detektiert werden. Um den Effekt sichtbar zu machen, werden zwei Spektren aufgenommen: (1) das *On*-Resonanzspektrum durch selektive Anregung des Proteins (z. B. bei -1 ppm) und (2) das *Off*-Resonanzspektrum, für das der selektive Anregungspuls in einen spektralen Bereich außerhalb

der Protein- und Ligandsignale (z. B. 30 ppm) verschoben wird. Das Differenzspektrum zeigt schließlich nur für jene Ligandprotonen Signale, auf die Sättigung vom Protein übertragen wurde. STD-NMR ist anwendbar für einen breiten Bereich von Protein-Ligand-Interaktionen mit K_D -Werten von 10^{-8} M bis 10^{-3} M. Seine Verwendung erstreckt sich bis hin zur Untersuchung von komplexen molekularen Systemen wie membrangebundenen Rezeptorproteinen [121], Membranpräparationen [122], ganzen Viruskapsiden [123] und Zellen [124]. Das erlaubt auch solche Proteine zu untersuchen, die ansonsten schwer zu isolieren oder rekombinant herzustellen sind [125]. Ein Nachteil ist allerdings, dass sehr affine Protein-Ligand-Bindungen nicht detektiert werden können, da STD auf eine schnelle Dissoziationsrate des Komplexes für einen effektiven Sättigungstransfer angewiesen ist. In diesem Fall kann STD nur mit einer Abwandlung des experimentellen Ansatzes, z. B. als Konkurrenzexperiment, durchgeführt werden.

STD-NMR ermöglicht die schnelle Testung von Wirkstoffbibliotheken und die Identifizierung neuer Ligandmoleküle [126]. Aufgrund der Abstandsabhängigkeit der beobachteten STD-Effekte kann die Methode auch zur Bestimmung von Bindungs epitopen verwendet werden, was eine strukturelle Charakterisierung der Proteinbindungstasche ermöglicht [127, 128]. Allerdings ist die beobachtete STD-Intensität auch entscheidend von der T_1 -Relaxation abhängig, die unterschiedliche Werte für Protonen im selben Ligandmolekül annehmen kann. Methoden zur T_1 -Korrektur der beobachteten STD-Effekte und Ableitung von Bindungs epitopen wurden durch Jayalakshmi et al. [129], Mayer und James [130] sowie Kemper et al. [131] eingeführt. Schließlich ist STD-NMR auch für die Bestimmung von Bindungsaffinitäten anwendbar. Mayer und Meyer [118] führten dazu den sog. STD-Verstärkungsfaktor (engl. *STD amplification factor*, *STD-AF*) ein, der – in Analogie zur Enzymkinetik – der Zahl an gesättigten Ligandmolekülen pro Proteinmolekül entspricht. Eine direkte Bestimmung von K_D aus der Auftragung von *STD-AF* mit Variation der Ligandkonzentration ist jedoch aufgrund der komplexen Abhängigkeit des STD-Effektes nicht möglich. Eine Alternative stellen Konkurrenzexperimente dar, bei denen ein Inhibitor mit bekanntem K_D -Wert und ein Ligand unbekannter Affinität um die selbe Bindungsstelle konkurrieren [132]. Eine andere Methode unter Verwendung der initialen Wachstumsrate des *STD-AF* wurde durch Angulo et al. [133] eingeführt.

Eine noch höhere Sensitivität als STD-NMR-Spektroskopie besitzt das WaterLOGSY (engl. *water-ligand observed via gradient spectroscopy*)-Experiment [135], bei dem selektiv die große Menge an Wassermolekülen angeregt und die erzeugte Spinpolarisation über das Protein auf das gebundene Ligandmolekül übertragen wird [119]. Vor allem die an der Proteinoberfläche und im Zwischenraum der Bindungstasche immobilisierten Wassermoleküle vermitteln den Polarisationstransfer, welcher sowohl durch intermolekularen NOE (Kern-Overhauser-Effekt, engl. *nuclear overhauser effect*) als auch durch chemischen Austausch von labilen Wasserstoffatomen zustande kommt. Aufgrund der großen Rotationskorrelationszeit des Protein-Ligand-Komplexes erfährt der gebundene Ligand einen negativen NOE. Moleküle, die nicht an das Protein binden und nur mit dem freien Wasser interagieren zeigen dagegen einen positiven NOE. Ligand- und nicht bindende Moleküle können schließlich im WaterLOGSY-Spektrum anhand ihres umgekehrten Signalvorzeichens identifiziert werden. WaterLOGSY ist eine beliebte Methode für die schnelle Testung chemischer Bibliotheken und die Identifizierung neuer Leitstrukturen oder Strukturfragmente für die Wirkstoffentwicklung. Hochaffine Liganden können, ähnlich wie bei STD, allerdings nur

2. Grundlagen

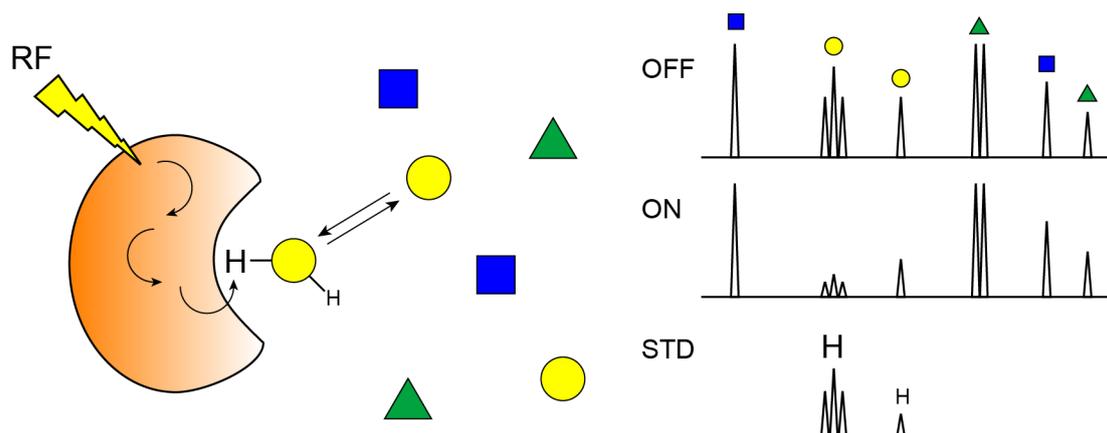


Abbildung 2.10.: Schematische Darstellung des STD-NMR-Experiments (nach [134]). Ein selektiver RF-Puls erzeugt Sättigung der Proteinprotonen, welche anschließend auf das Ligandmolekül übertragen wird. Dieses befindet sich in einem schnellen Austausch mit Molekülen in Lösung. In Abhängigkeit von der räumlichen Nähe zum Protein erfahren die Ligandprotonen unterschiedlich starke STD-Effekte (angedeutet durch unterschiedliche Schriftgrößen). Das STD-Spektrum ist dabei die Differenz aus dem *On*- und *Off*-Resonanzspektrum. STD erlaubt die Identifizierung von Liganden aus einem Gemisch von Verbindungen.

durch eine Modifizierung des experimentellen Aufbaus, z. B. als Konkurrenzexperiment in Gegenwart einer schwächer affinen Referenzverbindung, nachgewiesen werden [136, 137]. Die Verdrängung der Referenzverbindung durch den stärker bindenden Liganden kann an der Verringerung seiner Signalintensität oder Änderung seines Signalvorzeichens erkannt werden. Eine weitere interessante Anwendung von WaterLOGSY stellt die Identifizierung von Molekülregionen mit höherer Lösungsmittel-exponierter Oberfläche dar, woraus Informationen zur Ligandorientierung in der Bindungstasche erhalten werden können [138].

Zusätzlich zur Identifizierung von Liganden und Bestimmung ihrer Bindungsaffinität, wofür die beiden letztgenannten NMR-Methoden verwendet werden können, sind weitere Kenntnisse zur bioaktiven Konformation des Ligandmoleküls wichtig. Diese kann mit Hilfe von *transferred NOESY* (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*)-Experimenten (trNOESY) untersucht werden [139]. Die trNOESY-Methode beruht auf einer Änderung der Rotationskorrelationszeit des Liganden bei Bindung an das größere Proteinmolekül [140, 141]. Für kleine Moleküle, deren Korrelationszeit im Bereich von ps liegt, ist der NOE positiv oder annähernd Null. Proteinmoleküle haben dagegen Korrelationszeiten im Bereich von ns und zeigen einen starken negativen NOE. Somit ist eine Änderung im Vorzeichen des NOE-Signals ein schneller Nachweis für das Vorliegen einer Ligandenbindung und ermöglicht die Unterscheidung zwischen freier und gebundener Konformation des Liganden. Der NOE ist ein Mechanismus der Kreuzrelaxation von zwei dipolar gekoppelten Kernspins. Er ist abhängig vom Abstand zwischen beiden Atomkernen ($I_{\text{NOE}} \propto r^{-6}$) und kann deshalb zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur herangezogen werden. Voraussetzung für die Beobachtung von trNOEs ist, dass der Ligand wiederum in einem schnellen Austausch relativ zur Zeitskala der NMR-Relaxation vorliegt ($k_{\text{off}} > T_1^{-1}$). Ist die Verweildauer in der Proteinbindungstasche zu lang, klingt der NOE durch weitergeleitete Relaxation über entfernte Kernspins ab (Spindiffusion). Die Intensität des trNOEs hängt weiterhin auch vom molaren Überschuss des Liganden relativ zum Protein ab. Ein

trNOE kann nur dann beobachtet werden, wenn die Ungleichung $|N_b \times \sigma_b| \gg |N_f \times \sigma_f|$ erfüllt ist, wobei N und σ die Molekülzahl und die Kreuzrelaxationsrate im gebundenen (N_b, σ_b) bzw. freien Zustand (N_f, σ_f) sind. In vielen Fällen liegt das optimale Ligand-Protein-Verhältnis, bei dem der trNOE maximal ist, bei 10:1 bis 50:1. Die Linienform ähnelt dann jener des freien Liganden, während die Kreuzrelaxationsrate hauptsächlich durch die gebundene Form bestimmt ist.

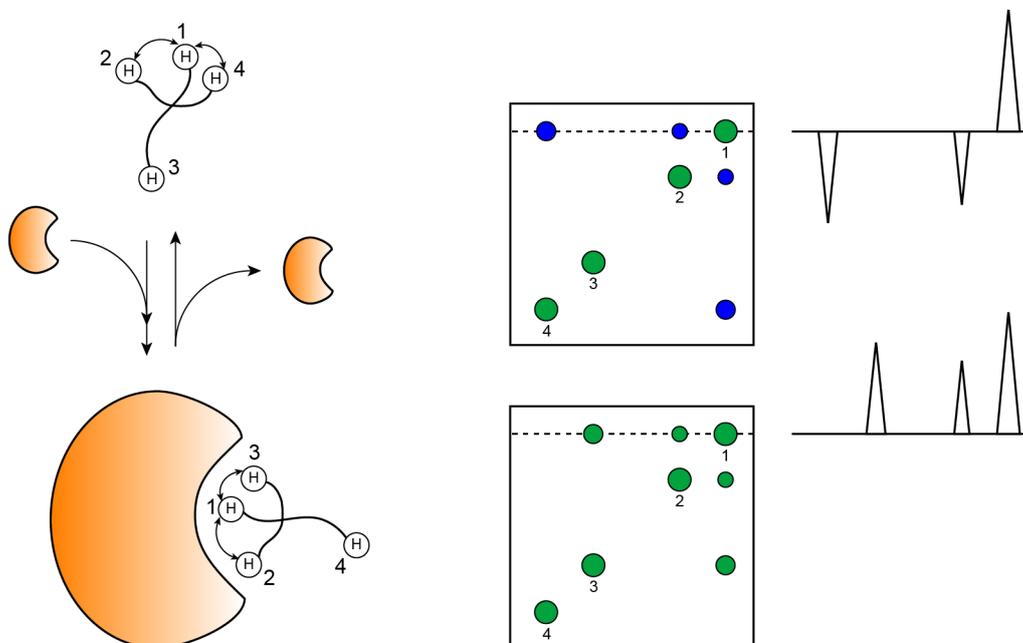


Abbildung 2.11.: Schematische Darstellung des trNOESY-Experiments (nach [134]). Im freien Zustand zeigt der Ligand eine schnelle Rotationsdiffusion und einen positiven NOE, erkennbar an einem negativen Kreuzsignal. In Gegenwart des Proteins zeigt der Ligand einen negativen NOE aufgrund der Zunahme seiner effektiven Rotationskorrelationszeit. Kreuz- und Diagonalsignale haben das gleiche Vorzeichen und sind positiv. trNOEs können am freien Liganden gemessen werden, vorausgesetzt die Dissoziation ist schnell im Vergleich zur Zeitskala der NMR-Relaxation.

trNOESY-Experimente bieten eine zielgerichtete Methode, um vom Protein induzierte konformationelle Änderungen des Liganden zu detektieren. Strukturänderungen werden bereits durch einen Vergleich des Signalmusters der trNOESY-Spektren des Liganden im isolierten Zustand und in Gegenwart des Proteins deutlich. Eine quantitative Analyse stellt die Umformung von NOE-Signalintensitäten in Protonenabstände, welche als Vorgaben in *Simulated Annealing*-Strukturberechnungen verwendet werden können, dar. Voraussetzung dafür ist, dass die NOE-Signalintensität während der initialen Phase der NOE-Aufbaukurve proportional zur Kreuzrelaxationsrate ist. Dies erfordert wiederum einen schnellen Austausch im Vergleich zur Kreuzrelaxation ($k_{\text{off}} \gg \sigma$). k_{off} kann aus dem K_D -Wert abgeschätzt werden, wenn die Assoziation allein diffusionslimitiert ist: $k_{\text{off}} \sim 10^8 \times K_D$. Eine Schätzung für die Kreuzrelaxationsrate großer Moleküle bietet $\sigma \sim -57 \times \tau_r(\text{ns})/r^6(\text{\AA})$, wobei ein Wert der Rotationskorrelationszeit (τ_r) von 1 ns pro 2,4 kDa für ein globuläres Protein näherungsweise angenommen werden kann. Für ein 40 kDa Protein und eine Protein-Ligand-Interaktion von $K_D = 10^{-3}$ M ist die Bedingung des schnellen Austauschs erfüllt ($k_{\text{off}} \sim 10000 \text{ s}^{-1}$, $\sigma \leq 15 \text{ s}^{-1}$ für Abstände $\geq 2 \text{ \AA}$). trNOESY-Experimente wurden

erfolgreich für die Strukturbestimmung von membran- und rezeptorgebundenen Peptiden [142, 143], Kohlenhydratliganden [144, 145, 146] und kleinen organischen Molekülen [147, 148] verwendet. Sie wurden weiterhin auch für die Identifizierung von Liganden aus Bibliotheken von Verbindungen und zusammen mit computergestützten Methoden für die Entwicklung von Leitstrukturen in der Arzneimittelforschung genutzt.

Für den Fall, dass kein schneller Austausch vorliegt, kann die Ligandstruktur durch alternative Methoden bestimmt werden. Canales et al. verwendeten ^{13}C -gefilterte NOESY-Experimente, um die Konformation von Heparin im Komplex mit seinem hochaffinen Bindungspartner aFGF (engl. *acidic fibroblast growth factor*) zu bestimmen [149]. Im NOESY-Spektrum sind Signale von Protonen, welche an ^{13}C gebunden waren (d. h. in aFGF), abwesend und es werden nur Kreuzsignale zwischen den Protonen des Liganden beobachtet. Isotopen-gefilterte/editierte NMR-Experimente erfordern eine selektive Isotopenmarkierung (^{13}C , ^{15}N etc.) des Liganden oder Proteins. Durch Verwendung eines X-Halbfilters können die Signale des einen Bindungspartners herausgefiltert werden, während nur die andere Komponente im Spektrum detektiert wird [150, 151].

2.3.2. Protein-detektierte NMR-Experimente

Die Bindung des Liganden resultiert oft in einer Änderung der Proteinstruktur und Dynamik, welche sich in seinen NMR-Eigenschaften (chemische Verschiebungen, Relaxationszeiten, Linienformen) manifestiert. Für kleine Proteine können spezifische Protonensignale (d. h. Reportersignale) ausreichen, um die Bindung zu verfolgen [152], während für größere Proteine i. d. R. eine zusätzliche Isotopenmarkierung mit Heterokernen unumgänglich ist. Die Detektion von Änderungen in den chemischen Verschiebungen des Proteins ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Untersuchung von Protein-Ligand-Interaktionen [153]. Die chemische Verschiebung spiegelt die elektronische Umgebung des Atomkerns wider, welche ein Gegenfeld zum äußeren Magnetfeld induziert. Sie ist u. a. abhängig von der Elektronegativität gebundener Atome und von der Molekülkonformation und kann deshalb neben der Ligandenbindung auch Aussagen zur Molekülgeometrie treffen. So verändert z. B. die Sekundärstruktur eines Proteins die chemischen Verschiebungen der Rückgratátome in einer vorhersehbaren Art und Weise. Die C_α - und C' -chemische Verschiebung erhöht sich, wenn der Aminosäurerest in einer α -Helix gefunden wird und verringert sich im Fall eines β -Strangs. Für die C_β -chemische Verschiebung ist der Trend umgekehrt. Obwohl die Sekundärstruktur nur ein Faktor ist, der die chemische Verschiebung beeinflusst, ist es möglich, die Sekundärstruktur aus der Abweichung der chemischen Verschiebung zu Referenzwerten von *Random Coil*-Struktur für verschiedene Atome (C_α , H_α , C_β etc.) vorherzusagen [154, 155].

Die Detektion der Ligandenbindung anhand chemischer Verschiebungen des Proteins stellt keinen aufwändigen experimentellen Ansatz dar. In den meisten Fällen genügt die Aufnahme einer Serie von 2D-HSQC (engl. *heteronuclear single-quantum correlation*)-NMR-Spektren für steigende Mengen an Ligand. Häufig wird das Signal der Amidgruppe von ^{15}N -markierten Proteinen ausgewertet, welche Änderungen sowohl in der Proteinerückgratstruktur als auch in der chemischen Umgebung (z. B. Wasserstoffbrückenbindungen der Amidgruppen, Stellung von Aminosäureseitenketten, funktionelle Gruppen des Ligandmoleküls) infolge der Ligandenbindung anzeigen kann. Die Isotopenmarkierung ist

wenig kostenintensiv und kann durch rekombinante Proteinexpression eingeführt werden. Des Weiteren ist die Auswertung der ^1H - und ^{15}N -chemischen Verschiebungen auf keine Seitenkettenuordnung angewiesen.

$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente können helfen, die Ligandenbindungstasche zu lokalisieren, denn die größten Signalverschiebungen werden für Aminosäuren in dem Bereich erwartet, wo der Ligand an das Protein bindet. Diese Informationen können mit molekularen *Docking*-Berechnungen kombiniert werden [156, 157, 158] - einerseits als Vorgabe, um den zu testenden Suchraum einzugrenzen und somit die Genauigkeit der Berechnung zu erhöhen [159] und andererseits als Filter, um die generierten Strukturmodelle des Protein-Ligand-Komplexes zu bewerten [160]. Das Programm HADDOCK [161] verwendet Informationen aus NMR-Signalverschiebungen und Mutagenese-Daten als Vorgaben, um eine obere Abstandsgrenze für ein Aminosäurepaar zwischen zwei interagierenden Proteinen zu erzeugen. Ein ähnlicher Ansatz wurde auch für andere *Docking*-Programme z. B. AutoDock [158, 162, 163] umgesetzt.

Weiterhin können Änderungen der chemischen Verschiebung auch zur Bestimmung der Bindungsaffinität herangezogen werden, denn die Lage des NMR-Signals spiegelt das chemische Gleichgewicht der Bindungsreaktion wider. Ist die Bedingung für einen schnellen Austausch erfüllt, wird die Dissoziationskonstante einfach aus der Signalverschiebung als Funktion der Ligandkonzentration erhalten.

Trotz der großen Popularität, die NMR-chemische Verschiebungen als Nachweismethode für Bindungsereignisse besitzen, ist bei ihrer strukturellen Interpretation zur Vorhersage der Bindungsregion Vorsicht geboten. Ein Vergleich mit anderen biophysikalischen Methoden (z. B. Röntgenkristallographie, Massenspektrometrie) zeigt oft Unterschiede in der genauen Lage der Bindungsregion auf [164]. Ein Grund ist, dass die chemische Verschiebung sehr sensitiv auf Änderungen in der Probenzusammensetzung (z. B. pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration, Lösungsmittel) und der Proteinstruktur reagiert. Als Folge des primären Bindungsereignisses kann es in einer anderen Proteinregion zu konformationellen Änderungen kommen (z. B. im Fall von Allosterie). Diese sekundären Ereignisse können fälschlicherweise als Bindungsstelle interpretiert werden. Aus diesen Gründen schlugen Takahashi et al. eine andere Methode unter Ausnutzung eines direkten Magnetisierungstransfers (*Cross-Saturation*) vor [165, 166]. Durch selektive Anregung wird eine Sättigung der Protonen im ersten Bindungspartner erzeugt. Diese wird im Folgenden durch Kreuzrelaxation und Spindiffusion über die gemeinsame Kontaktfläche auf das ^{15}N -markierte Protein übertragen. Weil das Protein zusätzlich voll deuteriert ist, bleibt der Sättigungstransfer auf die austauschbaren Amidprotonen der Kontaktfläche begrenzt und breitet sich nicht im gesamten Protein aus. Aminosäurereste in der Nähe zu Protonen des Bindungspartners werden leicht an einer Intensitätsabnahme ihres Signals im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum detektiert. *Cross-Saturation*-Experimente wurden für die Untersuchung von Proteininteraktionen mit Antikörpern [166], Membranrezeptoren [167], Kollagenfibrillen [168] und Kohlenhydratliganden [169] angewendet.

Für eine vollständige strukturelle Beschreibung eines Protein-Ligand-Komplexes sind zusätzlich zur Kenntnis der Bindungsstelle Informationen über den räumlichen Abstand und die Orientierung der Bindungspartner notwendig. Diese werden von weiteren NMR-Parametern erfasst, darunter den NOE, restliche dipolare Kopplungen (engl. *residual dipolar couplings*, RDCs) und paramagnetische Effekte wie *pseudocontact shifts* (PCSs) und

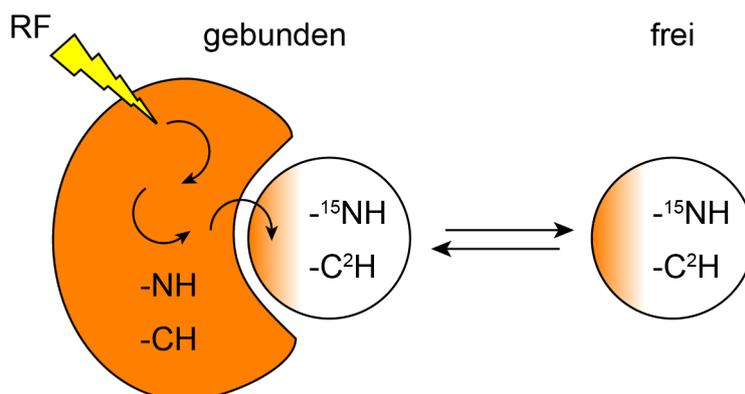


Abbildung 2.12.: Schematische Darstellung des *Cross-Saturation*-Experiments (nach [170]). Ein selektiver RF-Puls erzeugt Spinsättigung für das unmarkierte Protein, welche anschließend auf das ^{15}N -markierte Protein übertragen und als Reduktion seiner NMR-Signalintensität beobachtet wird. Das Experiment verwendet eine vollständige Deuterierung des zu detektierenden Proteins und einen hohen Anteil D_2O im Lösungsmittel, um den Magnetisierungstransfer auf die austauschbaren Amidprotonen der Kontaktfläche zu begrenzen. Bei Interaktionen im schnellen Austausch, kann der Sättigungseffekt am freien Ligand detektiert werden, welcher im Überschuss zum Rezeptorprotein vorliegt.

paramagnetische Relaxationsverstärkungen (engl. *paramagnetic relaxation enhancements*, PREs). Der traditionelle Ansatz der Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie nutzt Proton-Proton NOEs, um Abstandsinformationen für eine Vielzahl von Atomen im Molekül (i. d. R. mehrere tausend NOEs für ein Proteinmolekül) zu erhalten. NMR-Strukturen werden dabei meist als ein Ensemble aus mehreren möglichen Strukturmodellen repräsentiert, die in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten sind und je nach Vollständigkeit und Genauigkeit der NOE-Abstandsinformationen eine unterschiedlich hohe Konvergenz zueinander aufweisen. Wenn die Strukturen der einzelnen Bindungspartner bereits bekannt sind, kann die Komplexstruktur durch Analyse der intermolekularen NOEs bestimmt werden. Isotopen-gefilterte/editierte NMR-Experimente erlauben dabei die Diskriminierung zwischen intra- und intermolekularen NOEs [151]. So enthält z. B. ein ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum, welches Isotopen-gefiltert in der einen ^1H -Dimension und Isotopen-editiert in der anderen ^1H -Dimension ist, nur NOEs zwischen Protonen in gegenüberliegenden Bindungspartnern. Voraussetzungen für die Beobachtung intermolekularer NOEs ist allerdings eine hohe Bindungsaffinität des Liganden und eine ausreichende Anzahl nicht-austauschbarer Protonen in kurzer Entfernung zu Proteinprotonen. Beide Anforderungen können durch kleine Ligandmoleküle nicht immer erfüllt werden. So haben z. B. Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen oft nur eine geringe Affinität. Wenn die Lebensdauer des Komplexes zu kurz ist, kann sich kein signifikanter NOE aufbauen. In GAGs werden Interaktionen außerdem oft durch ionische Gruppen (Sulfate, Carboxylate) vermittelt, die den Abstand zwischen Ligand- und Proteinprotonen weiter vergrößern können, sodass u. U. kein NOE mehr beobachtet wird. Diese Limitationen machen paramagnetische NMR-Experimente sehr reizvoll. Aufgrund des großen magnetischen Moments ihres ungepaarten Elektrons können paramagnetische Ionen und organische Radikale weitreichende, sowohl abstands- als auch orientierungsabhängige Effekte hervorrufen. Zu den paramagnetischen Metallionen zählen die Oxidationszustände bestimmter Nebengruppenelemente wie Mn^{2+} ,

Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} und außerdem die meisten Lanthanoidionen wie Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Tm^{3+} . Als organische Radikale werden häufig Nitroxide wie 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl (TEMPO) verwendet. Die am häufigsten gemessenen paramagnetischen Effekte sind PREs, PCSs und RDCs.

Paramagnetische Verbindungen führen ausnahmslos zu einer Zunahme der Kernspinrelaxationsraten (R_1 , R_2) und damit der Linienbreite. Zwei Mechanismen tragen zum PRE-Effekt bei: der Solomon-Mechanismus und der Curie-Spin-Mechanismus. Beide zeigen eine r^{-6} -Abstandsabhängigkeit. Im Fall von Curie-Spin-Relaxation kann es allerdings zur Kreuzkorrelation mit anderen Relaxationsmechanismen wie die Anisotropie der chemischen Verschiebung (engl. *chemical shift anisotropy*, CSA) und damit zur Änderung des PRE-Effektes kommen. Paramagnetische Verbindungen mit einer langen Elektronenspinrelaxationszeit (in der Größenordnung von mehreren 10 ns) zeigen dagegen hauptsächlich den Solomon-Mechanismus und sind insensitive für Kreuzkorrelationseffekte. Dies macht Nitroxidradikale, Mn^{2+} , Gd^{3+} und Cu^{2+} zu geeigneten Reagenzien für die Abstandsmessung mittels PRE.

Paramagnetische Ionen mit einer anisotropen magnetischen Suszeptibilität, $\Delta\chi$, können zusätzlich eine Änderung des lokalen Magnetfeldes und damit eine Verschiebung der Resonanzlinie eines NMR-aktiven Kerns hervorrufen. Dieser *pseudocontact shift* (PCS), $\Delta\delta^{\text{PCS}}$, ist abhängig von der Orientierung des Kernspins relativ zum paramagnetischen Ion und proportional zum Abstand gemäß r^{-3} . Aus diesem Grund können PCSs auch für Kernspins, die weit genug vom paramagnetischen Zentrum entfernt sind, um nicht mehr vom PRE-Effekt beeinflusst zu werden, gemessen werden. Der PCS wird gewöhnlich als die Differenz der NMR-chemischen Verschiebung zwischen der para- und diamagnetischen Probe bestimmt. Werden Lanthanoidionen verwendet, können La^{3+} oder Lu^{3+} als diamagnetische Kontrolle dienen. Sie haben einen ähnlichen Ionenradius wie die paramagnetischen Lanthanoide und verursachen nur eine minimale Störung der Koordinationsgeometrie und der Molekülstruktur.

Ionen mit anisotroper magnetischer Suszeptibilität führen auch zu einer schwachen Ausrichtung des Moleküls im Magnetfeld. Als Folge können RDCs beobachtet werden. Ihre Stärke ist abhängig von der Orientierung sowie der axialen und rhombischen Komponente des $\Delta\chi$ -Tensors, aber nicht vom Abstand zum paramagnetischen Zentrum. Zusammen mit den beiden oben beschriebenen paramagnetischen NMR-Parametern bieten RDCs ein reichhaltiges Repertoire, um Strukturinformationen über die untersuchte Protein-Ligand-Wechselwirkung zu sammeln [171].

Abbildung 2.13 zeigt eine mögliche Strategie für die Strukturbestimmung eines Protein-Ligand-Komplexes aus paramagnetischen NMR-Daten. Sofern das Protein keine natürliche Metallionenbindungsstelle besitzt, wird das paramagnetische Ion über einen koordinierenden *Tag* am Protein gebunden. Im Prinzip ist eine Metallbindungsstelle für die Strukturbestimmung ausreichend, jedoch können zuverlässigere Strukturmodelle durch die Verwendung von zwei oder drei *Tag*-Positionen sowie unterschiedlichen Lanthanoidionen erhalten werden. Sie helfen auch, Uneindeutigkeit bei der strukturellen Interpretation der PCS- und RDC-Werte, die aufgrund der Symmetrie des $\Delta\chi$ -Tensors bestehen, aufzulösen.

Eine Vielzahl verschiedener *Tags* wurde entwickelt [172]. Sie können als ein Teil der Proteinsequenz exprimiert werden [173, 174] oder durch Reaktion mit Cysteinresten [175] oder genetisch modifizierten, unnatürlichen Aminosäuren [176] ortsspezifisch am Protein

2. Grundlagen

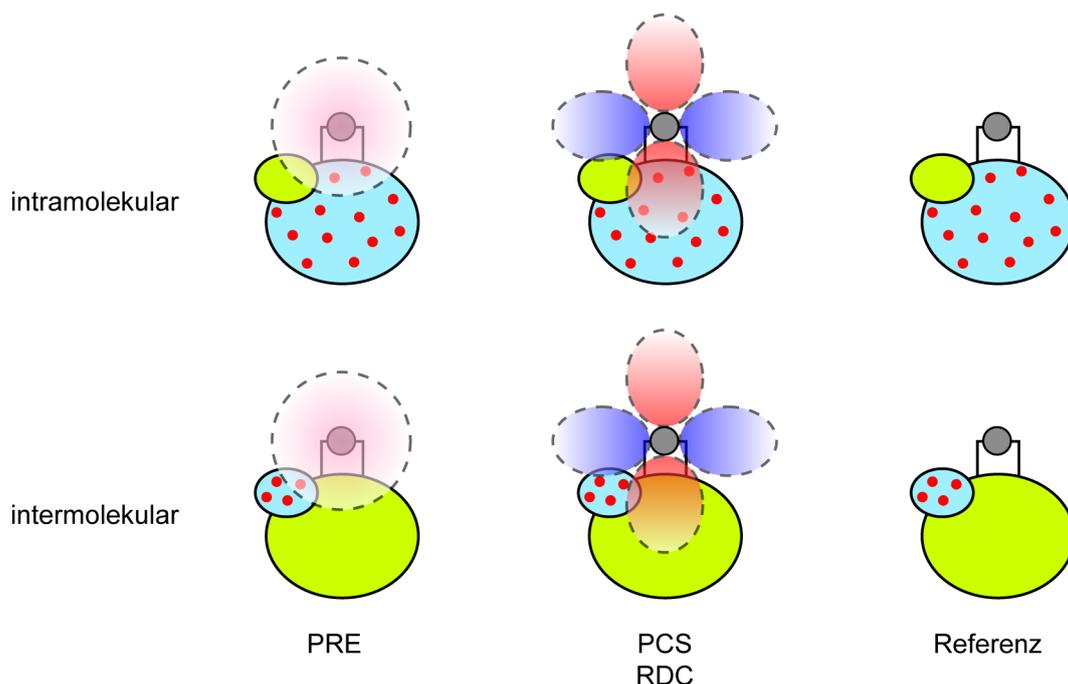


Abbildung 2.13.: Strategie zur Messung paramagnetischer NMR-Observablen für die Strukturbestimmung von Protein-Ligand-Komplexen (nach [171]). Das paramagnetische Ion wird durch Komplexbildung am Protein immobilisiert. PRE-Daten können in Gegenwart eines Ions mit einem isotropen $\Delta\chi$ -Tensor erhalten werden (z. B. Gd^{3+} , Mn^{2+}). PCS- und RDC-Messungen werden mittels Lanthanoidionen (z. B. Tb^{3+} , Tm^{3+}), die einen anisotropen $\Delta\chi$ -Tensor besitzen, durchgeführt. Als diamagnetische Referenz kann z. B. Lu^{3+} verwendet werden. Um Signalüberlappungen zu vermeiden und die Zuordnung zu erleichtern, werden intra- und intermolekulare Effekte an zwei unterschiedlichen Proben, in denen entweder das Protein oder der Ligand markiert ist (rote Punkte), gemessen.

fixiert werden. Um die Flexibilität des *Tags* einzuschränken, die ansonsten zu einer Abschwächung der beobachtbaren PCS- und RDC-Werte führt, wurden Varianten mit zwei Ankerpunkten [177, 178, 179] oder besonders sperrigen Chelatormolekülen [180, 181] entwickelt.

Sofern für den diamagnetischen Fall eine NMR-Zuordnung vorliegt, sind für die paramagnetische Probe keine zusätzlichen Zuordnungsexperimente notwendig, sondern die Signale können leicht anhand ihrer Verschiebung im HSQC-Spektrum identifiziert werden. Da der Abstand eines Protons und seines kovalent gebundenen Heterokerns zum paramagnetischen Zentrum ungefähr gleich ist, erfahren beide einen ähnlich großen PCS. Die HSQC-Signale von paramagnetischer Probe und diamagnetischer Kontrolle sind deshalb zueinander entlang paralleler Linien verschoben. Um Signalüberlappungen zu vermeiden und die Zuordnung zu erleichtern, empfiehlt es sich, PCSs bzw. RDCs separat für Protein und Ligand zu messen, indem nur einer der beiden Bindungspartner im markierten Zustand vorliegt.

Paramagnetische NMR-Observablen wurden bisher zahlreich für die Charakterisierung von Protein-Protein-Komplexen [171] und vereinzelt auch für die Bestimmung und Verfeinerung von Proteinstrukturen selbst eingesetzt [182]. In den meisten Fällen waren die Strukturen der individuellen Proteine vorher bekannt (z. B. durch Kristallisation) und der

Komplex wurde durch *Docking* der rigiden Strukturen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Algorithmen für die Analyse von paramagnetischen NMR-Daten in bekannte Programme für NMR-Strukturberechnungen z. B. Xplor-NIH [183, 184], CYANA [185, 186, 187] und HADDOCK [161, 188] implementiert. Die Analyse von kleinen Liganden und ihren Interaktionen mit Proteinen durch paramagnetische NMR wurde dagegen bisher selten in Angriff genommen. Jahnke et al. nutzten die Modifizierung von Proteinseitenketten mit einem Nitroxidradikal-*Spinlabel*, um mögliche Ligandmoleküle zu identifizieren [189]. Andere Arbeiten berichten von spinmarkierten Proteininhibitoren [190] und Kohlenhydraten [191], um ihre Proteinbindung nachzuweisen. Erst vor Kurzem wurden auch PCSs für die Strukturbestimmung von Proteinkomplexen mit Peptiden [192], Kohlenhydraten [193, 194] oder kleinen organischen Ligandmolekülen [195, 196] verwendet.

3. Methoden

3.1. Chemikalien

Sofern in den methodischen Darstellungen nicht explizit aufgeführt, wurden Chemikalien von folgenden Anbietern erhalten:

- **Sigma-Aldrich Chemie GmbH** (Deisenhofen, Deutschland): 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure (HABA), 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Hydrat (MES), Acetonitril, Ampicillin-Natriumsalz, L-Arginin, *d*-Desthiobiotin, Deuteriumoxid (D_2O), Dysprosiumchlorid ($DyCl_3$), Glycerol, Glycerolethoxylat, Hefeextrakt, Imidazol, Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Kupferchlorid-Dihydrat ($CuCl_2 \times 2 H_2O$), Lutetiumchlorid ($LuCl_3$), D-(+)-Maltose-Monohydrat, N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES), Natriumacetat, Nickelsulfat-Hexahydrat ($NiSO_4 \times 6 H_2O$), Pepton (aus Sojabohne), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 2-Propanol, Terbiumchlorid ($TbCl_3$), Thuliumchlorid ($TmCl_3$)
- **Fluka Chemie AG** (Buchs, Schweiz): 2-Mercaptoethanol, α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, 3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonphtalein (Bromphenolblau), Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2 \times 2 H_2O$), Chloramphenicol, Coomassie-Brilliantblau G250, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Magnesiumchlorid ($MgCl_2$), Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \times 7 H_2O$), Manganchlorid-Dihydrat ($MnCl_2 \times 2 H_2O$), Sinapinsäure, Trifluoressigsäure (TFA)
- **Carl Roth GmbH** (Karlsruhe, Deutschland): Agar-Agar Kobe I, Ammoniumacetat, Ammoniumchlorid (NH_4Cl), Ammoniumperoxodisulfat (APS), D-(+)-Glukose-Monohydrat, di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), 1,4-Dithiothreitol, Essigsäure, Ethanol, Glycin, Guanidin-Hydrochlorid, Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG), Kanamycinsulfat, N,N,N',N'-Tetramethylmethan-1,2-diamin (TEMED), Methanol, Natriumchlorid ($NaCl$), Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$), Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumhydroxid ($NaOH$), Natriumsulfat ($NaSO_4$), ortho-Phosphorsäure (80% (v/v)), Rotiforese Gel 30 (enthält 30% (v/v) Acrylamid, 0,8% (v/v) Bisacrylamid), Salzsäure (37% (v/v)), Thiamin-Hydrochlorid, Tris(hydroxymethyl-aminomethan) (TRIS), TRIS-Hydrochlorid, O-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenoxy]polyethoxyethanol (Triton X-100)

Weiterhin wurden in der Arbeit die folgenden GAGs verwendet: Heparin-Disaccharide I-S ($\Delta UA,2S(1\rightarrow 4)GlcNS,6S$), II-S ($\Delta UA(1\rightarrow 4)GlcNS,6S$), III-S ($\Delta UA,2S(1\rightarrow 4)GlcNS$), IV-S ($\Delta UA(1\rightarrow 4)GlcNS$), I-A ($\Delta UA,2S(1\rightarrow 4)GlcNAc,6S$), I-H ($\Delta UA,2S(1\rightarrow 4)GlcN,6S$) wurden bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland) erworben.

3. Methoden

CS-Disaccharide C2S (Δ UA,2S(1 \rightarrow 3)GalNAc), C4S (Δ UA(1 \rightarrow 3)GalNAc,4S), C6S (Δ UA(1 \rightarrow 3)GalNAc,6S), C2,4S (Δ UA,2S(1 \rightarrow 3)GalNAc,4S), C2,6S (Δ UA,2S(1 \rightarrow 3)GalNAc,6S), C4,6S (Δ UA(1 \rightarrow 3)GalNAc,4S,6S), C2,4,6S (Δ UA,2S(1 \rightarrow 3)GalNAc,4S,6S) sowie die Heparin-Oligosaccharide dp4 (Δ UA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S(1 \rightarrow 4)IdoA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S), dp6 (Δ UA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S(1 \rightarrow 4)[IdoA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S]₂), dp8 (Δ UA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S(1 \rightarrow 4)[IdoA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S]₃) und dp10 (Δ UA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S(1 \rightarrow 4)[IdoA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S]₄) wurden bei Carbosynth Limited (Compton, UK) und Iduron Ltd. (Manchester, UK) erworben.

3.1.1. Bakterienstämme

Genotypen der in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme:

- ***E. coli* NEB Express I^q**: MiniF *lacI^q* (Cam^R)/ *fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10-Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10-Tet^S) endA Δ (mcrC-mrr)114::IS10*
- ***E. coli* XL1-Blue**: *endA1 gyrA96*(Nal^R) *thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F-[:Tn10* (Tet^R) *proAB⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15] hsdR17*(r_K⁻ m_K⁺)
- ***E. coli* RosettaTM(DE3)**: pRARE (Cam^R) F⁻ *ompT hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm λ* (DE3 [*lacI lacUV5-T7 ind1 sam7 nin5*])

3.2. Biochemische Herstellung von murinem IL-10

3.2.1. Präparation aus Einschlusskörpern von *E. coli*

Für die gentechnische Herstellung von murinem IL-10 in *E. coli* wurde ein pET-41b(+)-Vektor (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die cDNA-Sequenz wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Axel Roers (Institut für Immunologie, TU Dresden) zur Verfügung gestellt und durch Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) vervielfältigt. Die DNA-Sequenzen der *Forward*- und *Reverse*-Primer betragen: 5'-GATATACATATGAGCAGGGGCCAGTACAGC-3' ($T_m = 62,5$ °C) und 5'-GTGGT-GCTCGAGGCTTTTCATTTTGATCATCATG-3' ($T_m = 65$ °C). Die Primer-Schmelztemperaturen wurden mit dem Webserver *OligoCalc* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) [197] anhand der *Nearest-Neighbour*-Methode [198, 199] berechnet. Für die Insertion in den pET-41b(+)-Vektor enthielten der *Forward*- und *Reverse*-Primer eine *NdeI*- bzw. *XhoI*-Restriktionsschnittstelle.

Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 0,5 μ M jedes Oligonukleotid-Primers, 200 μ M dNTPs, 200 ng IL-10 *Template*-DNA und 20 U/mL Phusion[®]-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland) in Phusion[®]-HF-Puffer. Tabelle 3.1 gibt das Temperaturprofil der PCR zur Vervielfältigung der IL-10-cDNA wider. Die Reinigung des PCR-Produktes erfolgte mittels einer Silikamembran nach Vorlage des kommerziellen *QIAquick PCR Purification*-Protokolls (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Für den Einbau der amplifizierten IL-10-cDNA in den pET-41b(+)-Vektor wurden beide Komponenten mit jeweils 2 U *NdeI* und *XhoI* (Fermentas/ Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) in FastDigest[®]-Puffer für 1 h bei 37 °C verdaut. Die Restriktionsenzyme

Tabelle 3.1.: Temperaturprofil der PCR zur Vervielfältigung der IL-10-cDNA.

	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	
	Initiale Denaturierung	98	3 min	
30 Zyklen	{	Denaturierung	98	30 s
		Primer-Annealing	60	45 s
		Extension	72	30 s
		Finale Extension	72	10 min

wurden anschließend durch 5 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Der linearisierte Vektor wurde durch Elektrophorese im Agarosegel (1,5% (w/v) in 40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA) bei einer Spannung von 100 V getrennt und im Anschluss aus dem Gel über eine Silikamembran und nach Vorlage des kommerziellen *QIAquick Gel Extraction*-Protokolls (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) gereinigt. Für die Ligation von pET-41b(+) mit dem IL-10-Insert wurden 100 ng lineare Plasmid-DNA und 300 ng an verdautem IL-10-PCR-Produkt verwendet und 20 U T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland) in 50 mM TRIS-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP zugesetzt. Das Gesamtvolumen der Ligationsreaktion betrug 20 µL. Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei 20 °C inkubiert und im Anschluss die T4 DNA-Ligase durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min inaktiviert.

Für die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurde die Kompetenz des jeweils verwendeten Bakterienstamms durch die Rubidiumchlorid-Methode erreicht. *E. coli*-Zellen wurden in LB-Medium (5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Pepton, 5 g/L NaCl) bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} = 0,6 kultiviert und anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 3220 g (Zentrifuge: Heraeus Megafuge® 1.0R, Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) geerntet. Die Zellen wurden auf Eis mit 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, 30 mM Kaliumacetat (pH 7,0), 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂ zweimal gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden die Zellen in 10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin aufgenommen und zu 100 µL-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurde *E. coli* XL1-Blue (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) verwendet. Zu 100 µL kompetenten Zellen wurden 100 ng an Plasmid-DNA bzw. ein 10 µL-Aliquot aus der Ligationsreaktion zugesetzt. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die *E. coli*-Zellen für 90 s auf 42 °C erhitzt und anschließend sofort mit SOC-Medium (5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Pepton, 5 g/L NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) versetzt. Danach wurde *E. coli* für 1 h bei 37 °C in SOC-Medium unter Schütteln kultiviert, bevor die Zellen in LB-Medium mit Antibiotikum – für den pET-41b(+)-Vektor 100 µg/mL Kanamycin – überführt wurden. Im Falle der Transformation mit dem Ligationsansatz wurde *E. coli* auf LB-Agarplatten (LB-Medium mit 13 g/L Agar, 100 µg/mL Kanamycin) bei 37 °C kultiviert. Zellklone von mit dem pET-41b(+)_IL-10-Plasmid transformierten *E. coli* XL1-Blue wurden ausgehend von einzelnen Bakterienkolonien auf der LB-Agarplatte isoliert und in LB-Medium mit 100 µg/mL Kanamycin weiter kultiviert. Plasmid-DNA wurde anschließend durch alkalische Lyse der Zellen und Reinigung mit einer Silikamembran anhand des kommerziellen

3. Methoden

Tabelle 3.2.: Temperaturprofil der PCR zur Erzeugung der Punktmutation C149Y.

	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	
	Initiale Denaturierung	98	3 min	
30 Zyklen	{	Denaturierung	98	30 s
		Primer-Annealing	50	45 s
		Extension	72	5 min
		Finale Extension	72	10 min

QIAprep Spin Miniprep-Protokolls (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) präpariert. Die Korrektheit der IL-10-Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung, die von der Firma SRD (Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt wurde, überprüft. Eine Plasmidkarte des pET-41b(+)_IL-10-Plasmids ist in Abbildung 3.1 gezeigt. Durch die Wahl der *NdeI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen wurde das *il-10*-Gen 3'-terminal zu einer T7-Promotorsequenz eingefügt und für Zwecke der Proteinreinigung mit der Sequenz für einen C-terminalen Okta-Histidin (His8)-*Tag* versehen. Neben dieser Modifikation wurde eine weitere Änderung der Proteinsequenz im Verlauf dieser Arbeit vorgenommen. Es wurde entschieden, den freien Cystein-Rest an Position 149 gegen Tyrosin auszutauschen – dem entsprechenden Aminosäurerest im humanen IL-10. Zwar ist der Cys149-Rest im murinen IL-10 in keiner Disulfidbrücke beteiligt, kann aber während der Proteinrückfaltung eine kovalente Bindung mit einem anderen Cystein-Rest eingehen und damit zu nicht-nativen Proteinstrukturen führen. Die C149Y-Mutation wurde durch Oligonukleotid-Primer eingeführt. Die DNA-Sequenzen der *Forward*- und *Reverse*-Primer betragen: 5'-CTTCATCAACTACATAGAAGC-3' ($T_m = 48$ °C) und 5'-GCTTCTATGTAGTTGATGAAG-3' ($T_m = 48$ °C). Ansatz der PCR und Reinigung des PCR-Produktes erfolgten wie auf Seite 40 beschrieben. Tabelle 3.2 gibt das Temperaturprofil der PCR zur Einführung der C149Y-Mutation wieder. Um unmodifizierte Plasmid-DNA, die als *Template* in der PCR eingesetzt wurde, vom PCR-Produkt zu entfernen, wurde ein Verdau mit *DpnI* (Fermentas/Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) durchgeführt. *DpnI* schneidet die DNA-Sequenz 5'-GATC-3', wobei der Adenyl-Rest N6-methyliert vorliegen muss. Dadurch wird die in *E. coli* vermehrte *Template*-DNA abgebaut, während die durch PCR amplifizierte DNA nicht als Substrat von *DpnI* erkannt wird. Die Zirkularisierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend durch Transformation von *E. coli* XL1-Blue.

Für die Expression des IL-10-Proteins wurde *E. coli* RosettaTM(DE3) (Merck Millipore, Billerica, USA) verwendet. Diese Zellen besitzen ein zusätzliches Chloramphenicol-resistentes Plasmid, das tRNA-Gene für folgende, von *E. coli* selten verwendete Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA zur Verfügung stellt. Die Transformation der Zellen mit dem pET-41b(+)_IL-10-Plasmid erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode und durch Hitzeschock – wie im vorherigen Absatz für *E. coli* XL1-Blue beschrieben. Die Proteinexpression erfolgte in Mineralsalzmedium (9,29 g/L NaSO₄, 29,2 g/L K₂HPO₄, 8,14 g/L NaH₂PO₄ × 2 H₂O, 1,2 g/L MgSO₄, 12,5 g/L Glukose, 4,92 g/L NH₄SO₄, 1 g/L NH₄Cl, 100 µg/mL Thiamin, 100 µg/mL Kanamycin und 34 µg/mL Chloramphenicol) oder LB-Medium bei einer Temperatur von 37 °C und wurde bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} = 4 - 6 mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) induziert.

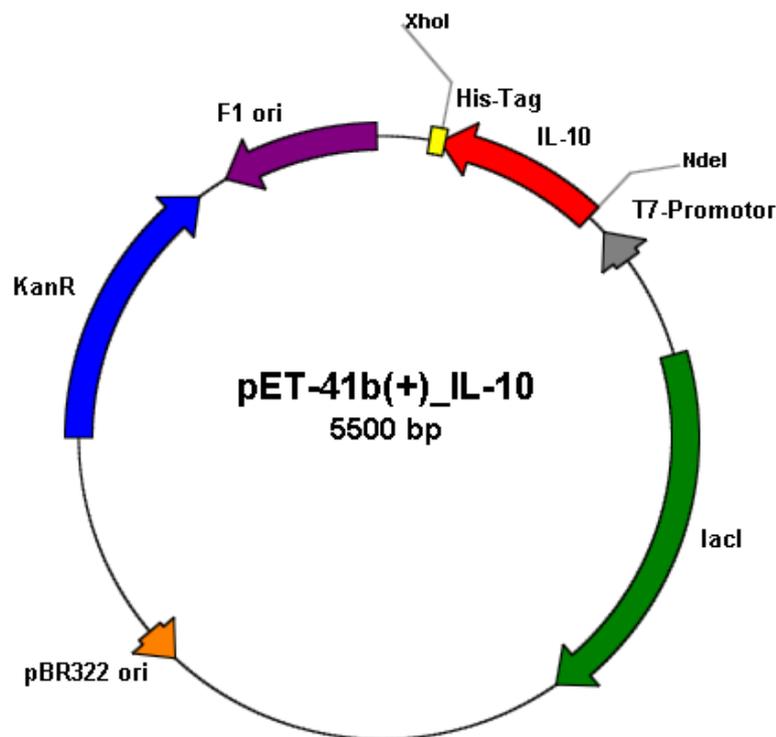


Abbildung 3.1.: Plasmidkarte des pET-41b(+)_IL-10-Plasmids. Das *il-10*-Gen stand unter Kontrolle eines T7-Promotors und hatte eine Oktahistidin-Sequenz angehängt. Für eine verbesserte Kontrolle des Expressionsstarts trug das Plasmid eine zusätzliche Kopie des für den lac-Repressor kodierenden *lacI*-Gens. Weiterhin bedeuten: KanR ... Kanamycinresistenz-kodierende Region, pBR322 ... Replikationsursprung des pBR322-Plasmids, F1 ... Replikationsursprung des Bakteriophagen F1.

Die Expression von unmarkiertem IL-10 erfolgte in Schüttelkolbenkulturen, während für die Herstellung von isotopenmarkiertem IL-10 eine Hochzelldichte-Fermentation (Fermenter: BIOSTAT®B plus, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) durchgeführt wurde. Diese bot den Vorteil die Konstanz des pH-Wertes durch Zugabe von 10% (w/v) NaOH bzw. 10% (v/v) Phosphorsäure und die Sauerstoffsättigung des Nährmediums (minimal 30% O₂-Partialdruck) durch Regulation der Rührgeschwindigkeit und der Presslufteinleitung zu überwachen. Weiterhin wurde das Zellwachstum durch Messung der optischen Dichte OD_{600nm} und die Glukosekonzentration im Medium regelmäßig kontrolliert. Nach IPTG-Zugabe wurde die Proteinexpression für 4 h durchgeführt und anschließend die Zellen durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 7500 g (Zentrifuge: Avanti® J-26 XP, Beckman, München, Deutschland) geerntet. Das Zellpellet wurde in 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF (100 mL je 10 g Biofeuchtmasse) suspendiert und die Zellen durch Zugabe von 0,3 mg/mL Lysozym (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) und mit Hilfe einer *French-Press* (APV-2000, APV Manufacturing, Bydgoszcz, Polen) bei einem Druck von 600 bar aufgeschlossen. Die Einschlusskörper wurden durch Abtrennung des unlöslichen Rückstands vom Zelllysate durch Zentrifugation für 45 min bei 10 °C und 38400 g (Zentrifuge: Avanti® J-26 XP, Beckman, München, Deutschland) erhalten. Sie wurden dreimal mit 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4),

3. Methoden

1 M NaCl, 5% (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA und abschließend einmal mit 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA gewaschen. Schließlich wurden die Einschlusskörper mit 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 6 M Guanidin-Hydrochlorid, 200 mM DTT, 1 mM EDTA aufgelöst und vor der Proteinrückfaltung dreimal je 5 h gegen 100 mM TRIS-HCl (pH 9,0), 100 mM NaCl, 6 M Guanidin-Hydrochlorid dialysiert. Unlösliche Rückstände wurden erneut durch Zentrifugation für 60 min bei 4 °C und 48400 g (Zentrifuge: Avanti® J-26 XP, Beckman, München, Deutschland) sowie durch Filtration mit einer Zellulosenitrat-Membran mit 0,45 µm Porengröße (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) abgetrennt. Die Rückfaltung des IL-10-Proteins wurde durch tropfenweise Zugabe der solubilisierten Einschlusskörper-Fraktion (100 µg/mL Proteinkonzentration) mit einer Flussrate von ~5 mL/h und schnelle Verdünnung in 2 L 100 mM TRIS-HCl (pH 9,0), 100 mM NaCl, 1 M L-Arginin, 5 mM reduziertes Glutathion, 1 mM oxidiertes Glutathion, 1 mM EDTA bei 4 °C und über 10 h ausgelöst. Im Anschluss wurden unlösliche Aggregate durch Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 38400 g (Zentrifuge: Avanti® J-26 XP, Beckman, München, Deutschland) sowie durch Filtration mit einer Zellulosemischer-Membran mit 0,45 µm Porengröße (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) abgetrennt. Der Rückfaltungsansatz wurde für zwei weitere Tage bei 4 °C belassen.

IL-10 wurde durch Metallionenaffinitätschromatographie (engl. *immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC) mit Hilfe einer Ni-NTA-Agarose-Säule (Machery Nagel GmbH, Düren, Deutschland) gereinigt. IL-10 wurde in 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7,4), 50 mM NaCl auf die Säule aufgetragen und diese anschließend mit 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7,4), 200 mM NaCl, 50 mM Imidazol gewaschen. Die Proteinelution wurde schließlich mit 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7,4), 50 mM NaCl, 600 mM Imidazol ausgeführt. Die Trennung des nativen IL-10-Dimers vom monomeren Protein erfolgte durch Größenausschlusschromatographie mit einer Sephacryl-S-200-HR-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) mit 500 mL Säulenvolumen. Hierzu wurde die Säule in 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7,4), 50 mM NaCl äquilibriert und 10 mL Probe im selben Puffer unter einer Flussrate von 1,5 mL/min aufgetragen. Die Identifikation der Dimer- und Monomer-Fraktion erfolgte durch Kalibrierung der Säule mit einem kommerziellen Proteinstandard (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Die Proteinreinheit wurde durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Verfahren von Laemmli [200] überprüft. Dabei hatten Sammel- bzw. Trenngel die Zusammensetzung: 125 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 3,5 mM SDS, 6% (w/v) Acrylamid bzw. 375 mM TRIS-HCl (pH 8,8), 3,5 mM SDS, 12,5% (w/v) Acrylamid. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 35 mA und mit 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS als Laufpuffer durchgeführt. Proteine wurden anschließend mit Coomassie-Färbelösung (4 g/L Coomassie, 45% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) angefärbt und das Gel danach mit einem Methanol/Essigsäure/Wasser-Gemisch (40%/10%/50% (v/v/v)) entfärbt.

Die Identität des IL-10-Proteins wurde weiterhin durch Detektion der molekularen Masse mittels MALDI-TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*)-Massenspektrometrie und durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz durch Edman-Abbau verifiziert. Proben für die Massenspektrometrie wurden durch Mischen von 1 µL Matrixsubstanz (10 mg/mL Sinapinsäure oder α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure in 50% (v/v) Acetonitril, 49,7% (v/v) Wasser, 0,3% (v/v) Trifluoressigsäure) mit eben-

falls 1 μL IL-10 im Konzentrationsbereich 1 - 0,01 mg/mL vorbereitet und auf eine mit Gold beschichtete Trägerplatte aufgetragen. Messungen wurden an einem Autoflex-Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Deutschland) im Positiv-Ionen-Modus durchgeführt und Massenspektren mit dem Programm flexAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Deutschland) ausgewertet. Die N-terminale Sequenzierung erfolgte durch Edman-Abbau und wurde von der Firma Proteome Factory AG (Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Die Ausbildung von Disulfidbrücken ist ein wichtiger Schritt während der Proteinfaltung [201] und ist notwendig für den Erhalt der strukturellen Integrität und biologischen Aktivität von IL-10 [202]. Der Nachweis, dass alle Cysteinreste in IL-10 in Disulfidbrücken beteiligt waren und dass keine freien Thiolgruppen mehr vorlagen, erfolgte mit dem Ellman-Test [203, 204]. Um Cysteine, die im Inneren des Proteins liegen, für das Ellman-Reagenz (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), DNTP) (Uptima Interchim, Montlucon Cedex, Frankreich) zugänglich zu machen, wurde der Test unter denaturierenden Bedingungen in Solubilisierungspuffer (100 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 6 M Guanidin-Hydrochlorid) durchgeführt. Zu 840 μL Solubilisierungspuffer wurden 50 μL DTNB-Stammlösung (2 mM DTNB, 50 mM Natriumacetat) und 10 μL H₂O (für Referenzmessung) oder 10 μL Probe (reduziertes Glutathion oder IL-10) gegeben und die Lösungen gemischt. Nach Inkubation für 5 min bei 37 °C wurde die Absorption im Bereich von 300 - 500 nm gemessen (UV-Vis Spektrophotometer: Cary 50 Bio von Varian GmbH, Darmstadt, Deutschland). Im Fall von freien Thiolgruppen wird DTNB gespalten und das freie 2-Nitro-5-Thiobenzoat Dianion, das eine gelbe Farbe und ein Absorptionsmaximum bei 412 nm aufweist, gebildet.

Als Nachweis, dass das rückgefaltete IL-10 eine definierte Sekundär- und Tertiärstruktur ausbildete, wurde 1D-¹H-NMR- (vgl. Abschnitt 3.3.1) und CD-Spektroskopie durchgeführt. Letztere Methode wurde an einem Jasco J-715 CD-Spektrometer mit einer Peltier-Temperatureinheit Jasco PTC-348 WI (Jasco Analytical Instruments Inc., Easton, USA) durchgeführt. 5 μM Protein wurden in Phosphatpuffer (10 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 10 mM NaCl) vorbereitet und CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 250 nm mit einer Scan-Rate von 50 nm/min, einem Inkrement von 1 nm und einer Integrationszeit von 1 s bei 37 °C aufgenommen. Es wurden sechs Spektren gemittelt und um das Referenzsignal (d. h. Phosphatpuffer) korrigiert. Der Sekundärstrukturanteil von IL-10 wurde durch Dekonvolution der Spektren mit drei verschiedenen Algorithmen (CONTIN [205], CDSSTR [206], SELCON3 [207]) und auf Grundlage einer Datenbank mit 43 löslichen und 13 Membranproteinen [208] analysiert.

Die biologische Aktivität von IL-10 wurde in Zusammenarbeit mit Sebastian Lanvermann (Institut für Immunologie, TU Dresden) bestimmt. Dazu wurde ein Ba/F3-Zellproliferationstest verwendet [209, 210]. Ba/F3-Zellen waren stabil mit der cDNA des IL-10-Rezeptors transfiziert und wurden mit IL-10-Mengen zwischen 0,003 ng/mL bis 100 ng/mL stimuliert. Die Zellproliferation wurde anhand der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität mit dem Farbstoff 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid quantifiziert. Durch Reduktion entsteht das blaue Formazan, dessen Absorption bei 570 nm gemessen wird.

3.2.2. Präparation als lösliches Fusionsprotein mit MBP

Als Alternative zur Präparation von IL-10 aus *E. coli*-Einschlusskörpern wurde die Expression als lösliches Protein durch Fusion mit dem Maltose-Bindungsprotein (engl. *maltose-binding protein*, MBP) von *E. coli* probiert. Hierfür wurde als Expressionsvektor das Plasmid pMAL-c5X (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland) [211, 212, 213] verwendet und die IL-10-kodierende Sequenz 3'-terminal hinter das *malE*-Gen eingefügt (vgl. Abbildung 3.2). Dabei trennte eine 20 Aminosäuren lange Region mit einer Faktor-Xa-Proteaseschnittstelle das *malE*- und *il-10*-Gen voneinander und ermöglichte die Abspaltung des IL-10-Proteins nach der Expression [214, 215].

Mit Hilfe von PCR (vgl. Abschnitt 3.2.1 und Tabelle 3.1) wurde die IL-10-cDNA vervielfältigt. Sowohl die Wildtyp- als auch die C149Y-Sequenz wurden verwendet. *Forward*- und *Reverse*-Primer waren: 5'-AGCAGGGGCCAGTACAGCCGG-3' ($T_m = 62,0$ °C) bzw. 5'-ATATCCTGCAGGGCTTTTCATTTTGATCATC-3' ($T_m = 61,0$ °C). Der *Reverse*-Primer enthielt dabei die Erkennungssequenz für eine *SbfI*-Restriktionsschnittstelle. 2 µg pMAL-c5X-Vektor wurde mit jeweils 10 U *XmnI* und *SbfI* (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland) in 50 mM Kaliumacetat, 20 mM TRIS-Acetate, 10 mM Magnesiumacetat (pH 7,9), 1 mM DTT bei 37 °C für 2 h verdaut. *XmnI* erzeugt DNA-Enden ohne Einzelstrangüberhang, weshalb das IL-10-PCR-Produkt keine 5'-terminale Restriktionsschnittstelle aufzuweisen brauchte und nur mit *SbfI* unter gleichen Bedingungen wie die Plasmid-DNA verdaut wurde. Die Ligationsreaktion wurde mit T4 DNA-Ligase durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.1 auf Seite 41). Anschließend wurde *E. coli* XL1-Blue mit einem 10 µL-Aliquot des Ligationsansatzes transformiert (vgl. Abschnitt 3.2.1 auf Seite 41) und auf LB-Agar (LB-Medium mit 13 g/L Agar, 100 µg/mL Ampicillin) kultiviert. Ausgehend von einzelnen Bakterienkolonien auf der Agarplatte wurden Zellklone des pMAL-c5X_IL-10-Vektors isoliert und in LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin weiter vermehrt. Plasmid-DNA wurde, wie in Abschnitt 3.2.1 auf Seite 42 beschrieben, präpariert. Die Korrektheit der IL-10-Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung, die von der Firma SRD (Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt wurde, überprüft.

Das MBP-IL-10-Fusionsprotein wurde in *E. coli* NEB Express *I^q* (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland) in Mineralsalzmedium (9,29 g/L NaSO₄, 29,2 g/L K₂HPO₄, 8,14 g/L NaH₂PO₄ × 2 H₂O, 1,2 g/L MgSO₄, 12,5 g/L Glukose, 4,92 g/L NH₄SO₄, 1 g/L NH₄Cl, 100 µg/mL Thiamin, 100 µg/mL Ampicillin) oder in LB-Medium (5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Pepton, 5 g/L NaCl, 100 µg/mL Ampicillin) exprimiert. Zunächst wurden *E. coli*-Zellen bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelkolben kultiviert. Eine Stunde vor Induktion der Proteinexpression wurde die Temperatur jedoch auf 23 °C verringert. Die Expression wurde schließlich mit 0,2 mM IPTG induziert und für 8 h bei 23 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 7500 *g* (Zentrifuge: Avanti[®] J-26 XP, Beckman, München, Deutschland) geerntet. Das Zellpellet wurde in 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl (100 mL je 10 g Biofeuchtmasse) auf Eis suspendiert und eine Tablette SIGMAFAST[™] Protease-Inhibitor-Mix (100 mL enthalten: 2 mM AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid), 0,3 µM Aprotinin, 130 µM Bestatin, 1 µM Leupeptin, 14 µM E-64, 1 mM EDTA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) zugesetzt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 0,3 mg/mL Lysozym (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) und mit

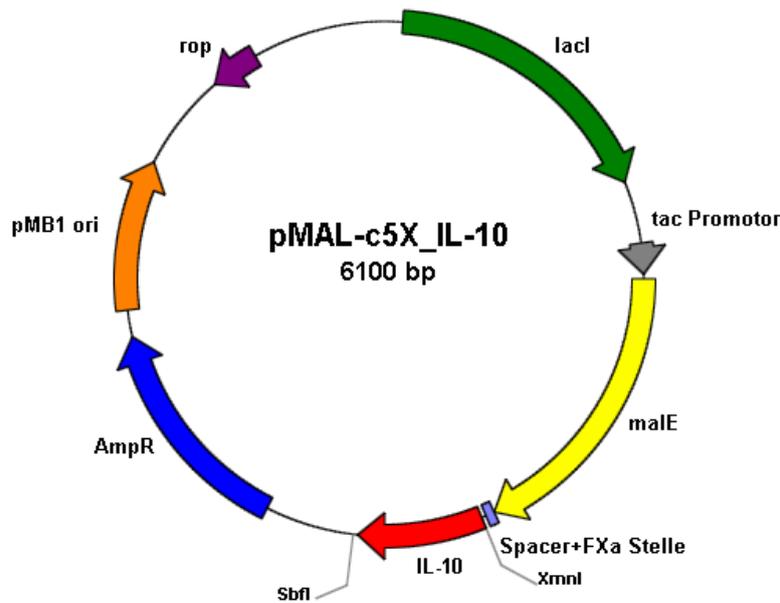


Abbildung 3.2.: Plasmidkarte des pMAL-c5X_IL-10-Plasmids. Die IL-10-kodierende Sequenz wurde hinter das *malE*-Gen sowie eine *Spacer*-Region mit interner FaktorXa-Schnittstelle eingefügt. Für den Transkriptionsstart wurde ein *tac*-Promotor verwendet. Für eine verbesserte Kontrolle des Expressionsstarts trug das Plasmid eine zusätzliche Kopie des für den *lac*-Repressor kodierenden *lacI*-Gens. Weiterhin bedeuten: AmpR ... Ampicillinresistenz-kodierende Region, pMB1 ori ... Replikationsursprung des pMB1-Plasmids, *rop* ... *rop* (*repressor of primer*)-Gen.

Hilfe einer *French-Press* (APV-2000, APV Manufacturing, Bydgoszcz, Polen) bei einem Druck von 600 bar aufgeschlossen. Der lösliche Überstand wurde durch Zentrifugation für 45 min bei 10 °C und 38400 *g* (Zentrifuge: Avanti® J-26 XP, Beckman, München, Deutschland) von unlöslichen Rückständen abgetrennt und nach Filtration durch eine Zellulosenitrat-Membran mit 0,45 µm Porengröße (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) auf eine Affinitätschromatographie-Säule aus einer Amylose-Agarose-Matrix (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland) mit 30 mL Säulenvolumen aufgetragen. Nach Waschen mit fünf Säulenvolumina an 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl bei einer Flussrate von 5 mL/min wurde das MBP-IL-10-Fusionsprotein in dem gleichem Puffer mit zusätzlich 10 mM Maltose eluiert. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Für die Abspaltung von IL-10 vom MBP-*Tag* wurde 0,5 - 1% (w/w) Faktor-Xa (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland) zum Fusionsprotein im Elutionspuffer zugesetzt und für ein bis zwei Tage bei 4 °C inkubiert. Der Verlauf der Proteolyse-Reaktion wurde durch SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS (Durchführung vgl. Abschnitt 3.2.1 auf Seite 44) überprüft. Das Molekulargewicht von MBP (inkl. *Spacer*-Peptid und Faktor-Xa-Schnittstelle) betrug 42510 Da und von IL-10 (inkl. C-terminales GN-Dipeptid als Resultat der *SbfI*-Schnittstelle) 18985 Da. Nach vollständiger Abspaltung wurde die Reaktion durch irreversible Inhibition von Faktor-Xa mit 1,5-Dansyl- α -Glutamyl-Glycyl-Arginyl-Chlormethylketon-dihydrochlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) beendet.

Zur Trennung von MBP und IL-10 wurde eine Heparin-Agarose-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) verwendet, die im Hinblick auf IL-10 sowohl als Kationenaustauscher als auch im Sinne einer Ligandenaffinitätschromatographie-Säule

3. Methoden

fungierte. Die Proteinprobe wurde dreimal gegen 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6,8) dialysiert und mit einer Flussrate von 2 mL/min auf die mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Das MBP-Protein wies unter den gegebenen Bedingungen eine negative Nettoladung auf (theoretischer pI = 5.1) und befand sich im Durchfluss. IL-10 wurde durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten von anfänglich 0 M auf final 1 M NaCl in 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6,8) eluiert. Als letzter Reinigungsschritt erfolgte die Trennung des nativen IL-10-Dimers vom monomeren Protein sowie von IL-10-Aggregaten durch Größenausschlusschromatographie mit einer Sephacryl-S-200-HR- Säule (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland). Hierzu wurde die Säule in 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7,4), 50 mM NaCl äquilibriert und 10 mL Probe im gleichen Puffer unter einer Flussrate von 1,5 mL/min aufgetragen. Die Identifikation der Dimer- und Monomer-Fraktion erfolgte durch Kalibrierung der Säule mit einem kommerziellen Proteinstandard (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Reinheit und Identität des IL-10-Proteins wurden durch SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS, wie in Abschnitt 3.2.1 auf Seite 44 beschrieben, überprüft.

3.2.3. Herstellung von isotopenmarkiertem IL-10

Für die Zuordnung der NMR-chemischen Verschiebungen zu den Rückgrat- und Seitenkettenatomen von IL-10 (Abschnitt 3.3) und für zweidimensionale ¹H/¹⁵N-Korrelationsexperimente zur Bestimmung der GAG-Bindungsstelle (Abschnitt 3.7) wurde ¹⁵N-markiertes sowie wahlweise zusätzlich ¹³C-markiertes IL-10 hergestellt. Dazu wurde das Protein in Mineralsalzmedium (Zusammensetzung vgl. Abschnitt 3.2.1), das 75% (v/v) D₂O, 10 g/L [U-¹³C]Glukose (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, USA), 4,92 g/L ¹⁵NH₄SO₄ (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, USA) und 1 g/L ¹⁵NH₄Cl (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, USA) enthielt, durch Hochzelllichtfermentation bei 37 °C für 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG exprimiert. Rückfaltung und Reinigung von ²H, ¹⁵N- bzw. ²H, ¹⁵N, ¹³C-markiertem IL-10 aus *E. coli*-Einschlusskörpern erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Abschließend wurde IL-10 gegen ein für das jeweilige NMR-Experiment geeignetes Puffersystem in 90%/10% (v/v) H₂O/D₂O dialysiert: 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 6,2), 50 mM NaCl für Experimente zur Zuordnung von IL-10 und Titrationsen mit GAGs (Abschnitte 3.3 und 3.7.1), 10 mM HEPES (pH 7,2), 50 mM NaCl für PCS-Messungen von IL-10 in Gegenwart von Lanthanoidionen (Abschnitt 3.7.2) sowie 15 mM MES (pH 6,2), 50 mM NaCl für PRE-Messungen von IL-10 in Gegenwart des EDTA-markierten HA-Tetrasaccharids (3.7.3). Durch Ultrafiltration mit Hilfe einer Amicon®-Rührzelle (Amicon Inc., Beverly, USA) und unter Verwendung von Filtermembranen aus regenerierter Zellulose mit einer nominalen Molekulargewichtsgrenze (NMGG) von 10000 Da (Merck Millipore, Billerica, USA) wurde die NMR-Probe von IL-10 bis zu einer Konzentration von 1 - 2 mM eingengt.

3.2.4. Herstellung von IL-10-Varianten für die Röntgenkristallographie

Für die Herstellung von Proteinkristallen als Voraussetzung der Strukturbestimmung von murinem IL-10 durch Röntgenbeugungsexperimente (Abschnitt 3.6), wurden verschiedene IL-10-Varianten gentechnisch durch PCR erzeugt. Tabelle 3.3 fasst die eingeführten Modifikationen bzw. Mutationen und die dafür verwendeten PCR-Primer zusammen. Als

Template-DNA wurde das pET-41b(+)_IL-10-Plasmid (mit C149Y-Mutation) verwendet. Die erzeugten IL-10-Varianten wurden also im Folgenden jeweils durch Rückfaltung aus *E. coli*-Einschlusskörpern präpariert (vgl. Abschnitt 3.2.1). Zum Einfügen von Punktmutationen wurde eine PCR-Elongationszeit der Phusion[®]-DNA-Polymerase (Umsatzrate ca. 1 kb je 30 s) von 5 min gewählt, um das gesamte Plasmid zu vervielfältigen (siehe auch PCR-Protokoll in 3.2). Die Primer-Hybridisierungstemperatur lag 3 °C über der jeweiligen Schmelztemperatur. Das amplifizierte lineare Plasmid wurde anschließend durch *DpnI*-Verdau von *Template*-DNA getrennt und nach Transformation von *E. coli* XL1-Blue in den Bakterienzellen zirkularisiert. Im Falle der N- und C-terminalen Deletionen (NΔ8 und CΔHis8) wurde nur die IL-10-kodierende Region durch PCR amplifiziert und das entsprechende PCR-Produkt nach *NdeI/XhoI*-Restriktionsverdau durch Ligation mit T4 DNA-Ligase in pET-41b(+) inseriert (vgl. Abschnitt 3.2.1 auf Seite 41). Für eine Deletion der ersten acht Aminosäurenreste (NΔ8), wurde die Sequenz des *Forward*-Primers so gewählt, dass nur der Bereich ab dem neunten Basentriplett in IL-10 flankiert wurde. Um außerdem eine Expression des C-terminalen His8-*Tags*, der auf dem pET-41b(+)-Plasmid kodiert ist, zu verhindern, wurde das Stop-Codon TAA vor die *XhoI*-Schnittstelle im revers-komplementären Primer eingefügt. Die PCR-Elongationszeit für die beiden letztgenannten Synthesestrategien betrug je 30 s und die Temperatur des Hybridisierungsschrittes lag wiederum 3 °C über der Schmelztemperatur der Primer. Es wurden ähnliche PCR-Protokolle verwendet wie in Tabelle 3.1 angegeben.

Alle hier beschriebenen IL-10-Varianten wurden in *E. coli* Rosetta[™](DE3) in Mineralsalzmedium bei 37 °C, 150 rpm und nach Induktion mit 1 mM IPTG exprimiert (Abschnitt 3.2.1 auf Seite 42). Varianten mit C-terminalen His8-*Tag* (umfasst nur NΔ8) wurden mittels IMAC und wie in Abschnitt 3.2.1 auf Seite 44 beschrieben, gereinigt. Im Gegensatz dazu wurden solche Varianten, die ohne His8-*Tag* exprimiert wurden (umfasst: NΔ8, E81S/K82S/K88S/E89S-Mutante, Q32R/T49K-Doppelmutante), mit Hilfe einer Heparin-Agarose-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) gereinigt. Die Proteinprobe wurde dreimal gegen 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6,5) dialysiert und bei mit einer Flussrate von 2 mL/min auf die mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten von anfänglich 0 M auf final 1 M NaCl in 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6,5) über 100 mL wurde die Proteinelution ausgeführt. IL-10-Fraktionen wurden dabei hauptsächlich zwischen 400 - 600 mM NaCl gesammelt und vereinigt. Im letzten Reinigungsschritt wurde das dimere Protein wiederum durch Gelfiltration (vgl. Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2) vom IL-10-Monomer und von Proteinaggregaten abgetrennt.

Abschließend wurden alle IL-10-Varianten mehrfach gegen das 100-fache Volumen an 20 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl dialysiert und durch Ultrafiltration mit Hilfe einer Amicon[®]-Rührzelle (Amicon Inc., Beverly, USA) und unter Verwendung von Filtermembranen aus regenerierter Zellulose mit einer nominalen Molekulargewichtsgrenze (NMGG) von 10000 Da (Merck Millipore, Billerica, USA) auf 20 - 40 mg/mL konzentriert.

Tabelle 3.3.: Zusammenfassung der für die Kristallisation verwendeten IL-10-Varianten. Die Primer-Oligonukleotidsequenzen für die Erzeugung der Modifikationen bzw. Mutationen sowie die Größe der PCR-Produkte sind angegeben. Alle Proteinvarianten trugen zusätzlich die C149Y-Mutation.

Bezeichnung IL-10-Variante	Modifikation/ Mutation	Primersequenz	Typ	T_m (°C)	Größe PCR- Produkt (bp)
NΔ8	Deletion Aa-Rest 1 - 8	5'-GATATACATATGGACAATAACTGCACCCACT-TCC-3'	<i>for</i> ^a	61	480
CΔHis8	Deletion His8- <i>Tag</i> durch Insertion Stop-Codon	5'-ATATACTCGAGTTAGCTTTTCATTTTGATCA-TCATGTATGC-3'	<i>rev</i> ^b	64	506
Q32R	Punktmutation Q32R	5'-GCCTTCAGCCGGGTGAAGAC-3' 5'-GTCCTTCACCCGGCTGAAGGC-3'	<i>for</i> <i>rev</i>	57 57	5500
T49K	Punktmutation T49K	5'-CAACATACTGCTAAAGGACTCCTTAATGC-3' 5'-GCATTAAGGAGTCCTTTAGCAGTATGTTG-3'	<i>for</i> <i>rev</i>	59 59	5500
E81S	Punktmutation E81S	5'-CCCCAGGCATCGAAGCATGG-3' 5'-CCATGCTTCGATGCCTGGGG-3'	<i>for</i> <i>rev</i>	58 58	5500
K82S	Punktmutation K82S	5'-CCAGGCATCGTCGCATGGCCC-3' 5'-GGGCCATGCGACGATGCCTGG-3'	<i>for</i> <i>rev</i>	62 62	5500
K88S	Punktmutation K88S	5'-GGCCCAGAAATCTCGGAGCATTTGAATTC-3' 5'-GAATTCAAATGCTCCGAGATTTCTGGGCC-3'	<i>for</i> <i>rev</i>	62 62	5500
E89S	Punktmutation E89S	5'-CCCAGAAATCTCGTCGCATTTGAATTC-3' 5'-GGGAATTCAAATGCGACGAGATTTCTGGG-3'	<i>for</i> <i>rev</i>	62 62	5500

^aforward; ^breverse

3.3. Zuordnung der NMR-chemischen Verschiebungen von GAGs und IL-10

NMR-Experimente wurden an einem Bruker Avance III 600 MHz-Spektrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Deutschland), ausgerüstet mit einem 5 mm inversen Tripelresonanz-TXI-Probenkopf mit z-Gradient, an einem Bruker Avance II 700 MHz-Spektrometer mit einem 5 mm Tripelresonanz-TCI-Cryoprobenkopf mit z-Gradient sowie an einem Bruker Avance III 800 MHz-Spektrometer mit einem 5 mm 4-Kanal-TCI-Cryoprobenkopf mit z-Gradient durchgeführt. Die Software TopspinTM 2.1. (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) wurde für die Datenaufnahme und Spektrenprozessierung verwendet. Die ¹H- und ¹³C-chemischen Verschiebungen der in der Arbeit verwendeten GAG-Oligosaccharide wurden durch 1D-¹H- sowie zweidimensionale 2D-¹H/¹H- bzw. ¹H/¹³C-NMR-Experimente zugeordnet. Die ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-chemischen Verschiebungen von IL-10 wurden mit ¹H/¹⁵N- und ¹H/¹³C/¹⁵N-Korrelationsexperimenten bestimmt.

¹H-chemische Verschiebungen wurde mit Hilfe des externen Standards 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, USA) referenziert, während ¹³C- und ¹⁵N-chemische Verschiebungen indirekt anhand eines Verhältnisses von ¹H- und ¹³C- bzw. ¹⁵N-chemischer Verschiebung für DSS von 0,251449530 und 0,101329118 (Quelle: BMRB-Datenbank [216]: http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/cshift.html) kalibriert wurden.

3.3.1. ¹H-NMR-Experimente

Für 1D-¹H-Spektren von GAGs wurden ¹H-NMR-Experimente mit Wasserunterdrückung mit Hilfe von CW (engl. *continuous wave*)-Vorsättigung (Bruker-Pulsprogramm: zgpr) oder mittels einer WATERGATE (engl. *water suppression by gradient-tailored excitation*)-Sequenz (Bruker-Pulsprogramm: zgpgpwg) aufgenommen. Diese bestand aus zwei sinusförmigen Gradientenpulsen mit 1 ms Dauer, die einen nicht-selektiven 180°-Puls und zwei für Wasser selektive 90°-Pulse (Länge 4 ms) flankierten. Der Effekt der WATERGATE-Sequenz ist, dass nicht-resonante Protonen durch die beiden Gradienten und mit Hilfe des 180°-Pulses refokussiert werden (Gradientenecho), während Wasserprotonen durch beide Gradienten dephasiert werden [217, 218]. Die Zuordnung der ¹H-chemischen Verschiebungen zu den Protonen der einzelnen GAG-Monosaccharideinheiten erfolgte mit Hilfe von ¹H/¹H-COSY (engl. *correlation spectroscopy*)- und ¹H/¹H-TOCSY (engl. *total correlation spectroscopy*)-Spektren, in denen Korrelationen zwischen benachbarten vicinalen Protonen bzw. zwischen allen Protonen eines Spinsystems (d. h. ein Zuckerring) beobachtet werden. Hierfür wurden COSY- und TOCSY-Experimente mit wenigstens 8 Scans, 16k komplexen Punkten in der direkten Dimension und 512 Inkrementen in der indirekten Dimension aufgenommen. Die Wasserunterdrückung erfolgte mit Hilfe einer 3-9-19-Sequenz (Bruker-Pulsprogramme: cosydfgpph19 und mlevgpph19). Diese stellt einen zusammengesetzten Puls nach dem Schema $3\alpha - \tau - 9\alpha - \tau - 19\alpha - \tau - 19\alpha - \tau - 9\alpha - \tau - 3\alpha$ dar, wobei 62α einem 180°-Puls entspricht. Der Effekt ist, dass nicht-resonante Protonen einen 180°-Puls erfahren, während Wasserprotonen nicht angeregt werden. Die Entwicklungszeit τ betrug 175 μ s (für CS-Disaccharide) bzw. 320 μ s (für Heparine), d. h., die nächste Region im Spektrum, in der keine Anregung erfolgte, lag 2857 Hz (4,76 ppm bei $B_0 = 600$ MHz) bzw.

3. Methoden

1562 Hz (2,60 ppm bei $B_0 = 600$ MHz) von der Trägerfrequenz, die auf das Wassersignal eingestellt wurde, entfernt. Damit wurde sichergestellt, dass alle Protonen im Bereich von 0 - 9,5 ppm (für CS-Disaccharide) bzw. 2,1 - 7,3 ppm (für Heparine) angeregt wurden. Die ^1H -90°-Pulslänge in COSY- und TOCSY-Experimenten betrug typischerweise 9 μs . Als *Spinlock* wurde eine MLEV-17-Sequenz [219] mit 90 ms Länge und einer Feldstärke von 9,6 kHz verwendet. Ein Phasensensitives Spektrum wurde durch Quadraturdetektion in der indirekten Dimension mittels States-TPPI erhalten. Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs in der direkten Dimension mit einer Exponentialfunktion mit 1 Hz Linienverbreiterung und in der indirekten Dimension mit einer um $\pi/4$ verschobenen quadratischen Sinusfunktion multipliziert.

Die Konnektivität der Monosaccharideinheiten im Heparin-Tetrasaccharid wurde anhand von Korrelationen in $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY- und $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY (engl. *rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy*)-Spektren hergestellt. Diese wurden mit 32 Scans, 16k Punkten in der direkten Dimension und mit 256 - 512 Inkrementen in der indirekten Dimension aufgenommen. Die spektrale Breite in beiden Dimensionen betrug 4 ppm. Die Experimente (Bruker-Pulsprogramme: noesygpwh5 und roesygpwh19) waren phasensensitiv durch States-TPPI-Quadraturdetektion und enthielten zur Wasserunterdrückung eine W5-WATERGATE-Sequenz [220], die einer doppelten 3-9-19-Pulsfolge entspricht. Typische NOESY-Mischzeiten lagen zwischen 100 - 800 ms und die Mischzeit des ROESY-CW-*Spinlocks* betrug 150 bzw. 300 ms bei einer Feldstärke von 2,5 kHz.

Eindimensionale ^1H -Spektren von IL-10 wurden mit einem ^1H -NMR-Experiment mit W5-WATERGATE-Wasserunterdrückung (Bruker-Pulsprogramm: zggpw5) aufgenommen. Die Entwicklungszeit τ innerhalb der 3-9-19-Pulsfolge betrug 75 μs . Bei zusätzlich ^{15}N -markierten Proben erfolgte GARP-Entkopplung während der Aufnahme. Spektren wurden typischerweise mit 128 bis 512 Scans und 16k komplexen Punkten (4k bei ^{15}N -Entkopplung) aufgenommen und mit einer Exponentialfunktion mit 5 Hz Linienverbreiterung prozessiert.

3.3.2. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR-Experimente

Für die Identifizierung der zu einer GAG-Monosaccharideinheit gehörenden NMR-Signale wurden zusätzlich zu $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY- und TOCSY-Experimenten auch $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Korrelationsexperimente durchgeführt – nämlich HSQC (engl. *heteronuclear single-quantum correlation*)- und HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*)-Experimente. Dafür wurde die natürliche ^{13}C -Häufigkeit ausgenutzt. Weil die genannten Experimente nur einfach ^{13}C -markierte Isotopomere detektieren (ca. 1% natürliche Häufigkeit), konnten Experimente in einem angemessenen Zeitrahmen zwischen 2 bis 10 h durchgeführt werden. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren wurden mit einem, in der Sensitivität gesteigerten HSQC-Experiment (Bruker-Pulsprogramm: hsqcetgpsi2) aufgenommen (siehe Abbildung 3.3). Durch einen doppelten INEPT-Refokussierungsschritt im Anschluss an die t_1 -Evolutionsperiode wird die ansonsten nicht detektierbare Doppelquantenmagnetisierung $2H_y C_x$ in Inphase-Magnetisierung I_x umgewandelt und dadurch zurückgewonnen. Spektren wurden mit 32 bis 256 Scans, 3k Punkten in der direkten Dimension und 256 bis 512 Inkrementen in der indirekten Dimension aufgenommen. Die spektrale Breite betrug in der ^1H -Dimension 16 ppm und in der ^{13}C -Dimension 100 ppm. Die ^1H - und ^{13}C -Trägerfrequenz wurde je-

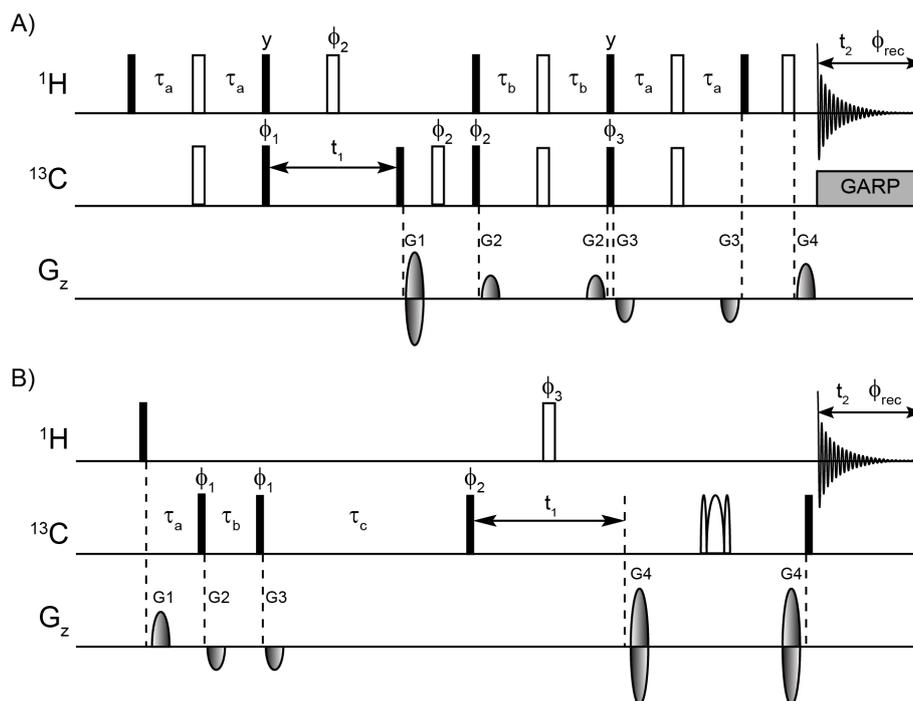


Abbildung 3.3.: Pulssequenzen der $2\text{D-}^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Korrelationsexperimente: **(A)** HSQC und **(B)** HMBC (Bruker-Pulsprogramme: hsqcetgpsi2 und hmbcetgpl2nd). Schwarze schmale Balken entsprechen 90° -Hartpulsen, weiße breite Balken 180° -Hartpulsen und graue Rechtecke Pulszügen, CW-Pulsen bzw. Trim-Pulsen. Parabelflächen stellen geformte Pulse oder Gradienten dar. Die Trägerfrequenz für ^1H und ^{13}C wurde auf 4,7 ppm bzw. 65 ppm gesetzt. Der selektive ^{13}C - 180° -Puls im HMBC-Experiment war ein adiabatischer Chirp-Puls mit 2 s Dauer und 60 kHz Anregungsbreite. Gradientenpulse hatten eine Dauer von 1 ms bzw. Gradient G2 im HSQC-Experiment von 500 μs . Das Verhältnis der Gradientenstärke G1:G2:G3:G4 war in **(A)**: 80:11:-5:20,1 und in **(B)** 15:-10:-5:80. Die Zeiten wurden festgelegt auf $\tau_a = 1/4J_{\text{CH}} = 1,72$ ms und $\tau_b = 1/8J_{\text{CH}} = 862$ μs in **(A)** und auf $\tau_a = 1/2 \cdot J_{\text{CH,max}} = 2,86$ ms, $\tau_b = 1/2 \cdot J_{\text{CH,min}} = 3,57$ ms und $\tau_c = 1/2 \cdot J_{\text{CH,long range}} = 83,33$ ms in **(B)**. Im HSQC-Experiment wurde während der Aufnahme GARP-Entkopplung mit einer Entkopplerstärke von 3570 Hz verwendet, während im HMBC-Experiment darauf verzichtet wurde, um Signale von direkt aneinander gebundenen CH-Paaren anhand restlicher 1J -Satellitensignale im Spektrum identifizieren zu können. Der Phasenzzyklus war in **(A)**: $\phi_1 = \{x, -x\}$, $\phi_2 = \{2(x), 2(-x)\}$, $\phi_3 = \{2(y), 2(-y)\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{x, -x, -x, x\}$ und in **(B)** $\phi_1 = \{2(x), 2(-x)\}$, $\phi_2 = \{x, -x\}$, $\phi_3 = \{4(x), 4(-x)\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{x, -x, x, -x, x, -x, x, -x\}$. Alle anderen Pulse hatten entweder die Phase x oder eine andere über dem Puls angegebene Phase. Quadraturdetektion in der indirekten Dimension erfolgte mit der Echo/Antiecho-TPPI-Methode. Pro t_1 -Schritt wurde ein zweiter FID aufgenommen – in **(A)** mit Inversion der Gradienten G1 und Änderung der Phase ϕ_3 um π und in **(B)** mit umgekehrten Vorzeichen für beide Gradienten G4. Weiterhin wurde in beiden Experimenten in jedem t_1 -Inkrement die Phase des ^{13}C - 90° -Pulses zu Beginn der ^{13}C -Evolutionsperiode sowie die Receiverphase um π verschoben.

weils in die Mitte des Spektrums gesetzt. Typische ^1H - und ^{13}C - 90° -Pulslängen betragen 9 μs und 12,3 μs . Das Experiment wurde mit ^{13}C -Entkopplung durch GARP während der Aufnahme mit einer Entkopplerstärke von 3570 Hz und mit Quadraturdetektion in der ^{13}C -Dimension durch Echo/Antiecho-TPPI aufgenommen. Spektren wurden in der direkten Dimension mit einer Exponentialfunktion mit 5 Hz Linienverbreiterung und in

3. Methoden

der indirekten Dimension mit einer um $\pi/4$ verschobenen quadratischen Sinusfunktion prozessiert.

Die Konnektivität zwischen einzelnen Monosaccharidringen wurde zusätzlich zu Informationen aus $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY- und ROESY-Spektren auch mit Hilfe eines $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC-Experiments ermittelt. Mit diesem werden weitreichende ^1H - ^{13}C -Korrelationen über zwei bis drei Bindungen, z. B. zwischen H4 von Ring i und C1 von Ring $i - 1$ im Falle einer (1 \rightarrow 4)-glykosidischen Bindung, beobachtet. Es wurde das in Abbildung 3.3 gezeigte Experiment (Bruker-Pulsprogramm: hmbcetgpl2nd) verwendet. Dieses beinhaltet einen doppelten J -Tiefpass-Filter mit Gradientenselektion, der Korrelationen aufgrund von $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen unterdrückt. Zwei ^{13}C -90°-Pulse im Anschluss an eine Periode $\tau_a = 1/2 \cdot ^1J_{\text{CH,max}}$ bzw. $\tau_b = 1/2 \cdot ^1J_{\text{CH,min}}$ nach ^1H -Anregung erzeugen Doppelquantenkohärenz für direkt gebundene ^1H - ^{13}C -Kerne. Nach einer langen Zeit $\tau_c = 1/2 \cdot ^nJ_{\text{CH,long range}}$ erzeugt ein weiterer ^{13}C -90°-Puls wieder Einquantenkohärenz $2H_xC_z$, die keine ^{13}C -chemische Verschiebung während der folgenden t_1 -Evolutionsperiode entwickeln kann, weswegen 1J -gekoppelte CH-Paare nicht zum HMBC-Spektrum beitragen. Dagegen entwickelt sich Kohärenz zwischen über mehrere Bindungen, schwach gekoppelten ^1H - ^{13}C -Kernen langsamer und wird am Ende von τ_c durch einen 90°-Puls in Doppelquantenkohärenz $-2H_xC_y$ umgewandelt, die während der t_1 -Zeit ^{13}C -chemische Verschiebung evolviert. Der finale ^{13}C -90°-Puls erzeugt schließlich wieder beobachtbare Einquantenkohärenz. Um restliche Signale, die von $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen herrühren, im Spektrum identifizieren zu können, wurde während der Aufnahme keine GARP-Entkopplung verwendet. Direkt aneinander gebundene CH-Gruppen können somit im Spektrum als Satellitensignale mit einer deutlichen Aufspaltung von der Größe 1J in der ^1H -Dimension vorgefunden werden.

3.3.3. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NMR-Experimente

2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren von IL-10 wurden mit einem Fast-HSQC-Experiment [221] oder mit einem TROSY (engl. *transverse relaxation optimized spectroscopy*)-HSQC-Experiment (Abbildung 3.4) aufgenommen. Ersteres liefert eine sehr gute Wasserunterdrückung und erlaubt kurze Wartezeiten zwischen Experimenten, was zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis führt. Zwei symmetrisch um die ^{15}N -Evolutionszeit angeordnete Gradienten G2 bewirken zusammen mit einem ^1H -180°-Puls eine Refokussierung der Wassermagnetisierung während dieser Zeit, die anschließend durch den ^1H -90°-Puls mit der Phase -x entlang der +z-Achse ausgerichtet wird. Dadurch, dass also die Wassermagnetisierung am Ende des Experimentes nicht transversal ist, kommt es zu keiner Sättigung der H_N -Protonen, die sich im Austausch mit dem Lösungsmittel befinden, und lange Wartezeiten zwischen Experimenten zur Herstellung des Besetzungsunterschieds der Kernspins und damit der maximalen Signalintensität sind nicht nötig.

Das TROSY-Experiment liefert eine verbesserte Auflösung und erhöhte Sensitivität speziell für Proteine mit großem Molekulargewicht und damit kurzer transversaler Relaxationszeit bei hohen B_0 -Feldstärken [222]. Dabei wird der Umstand ausgenutzt, dass sich bei einem gekoppelten Heterokern die Kernspinrelaxation durch dipolare Kopplung und durch Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA) gegenseitig aufheben können. Eine vollständige Kompensation beider Mechanismen wird bei einem HN-Spinpaar theoretisch bei einer Feldstärke von ca. 1050 MHz erreicht. Bei einem HSQC mit TROSY als Detek-

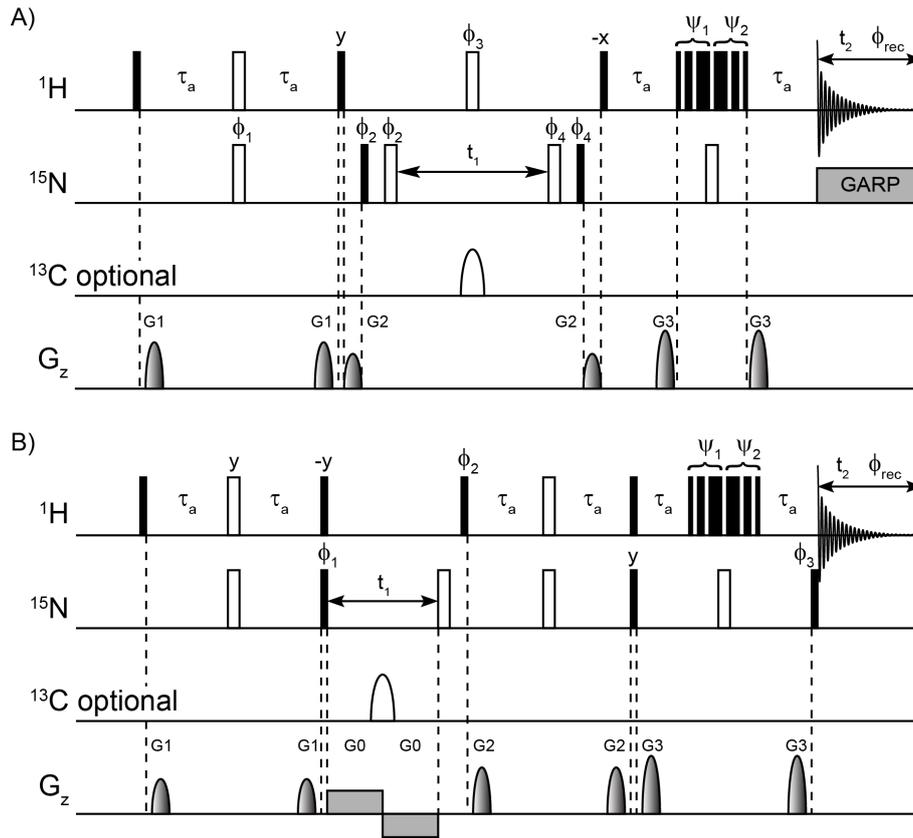


Abbildung 3.4.: Pulssequenzen der verwendeten 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperimente: **(A)** Fast-HSQC und **(B)** TROSY-HSQC (Bruker-Pulsprogramme: fhsqcf3gpqh und trosyf3gpqpsi19.2). Schwarze schmale Balken entsprechen 90° -Hartpulsen, weiße breite Balken 180° -Hartpulsen und graue Rechtecke Pulszügen, CW-Pulsen bzw. Trim-Pulsen. Parabelflächen stellen geformte Pulse oder Gradienten dar. Die Trägerfrequenz der ^1H -, ^{15}N - und ^{13}C -RF-Pulse lag bei 4,7 ppm, 116 ppm und 100 ppm. Wenn Proteinproben zusätzlich ^{13}C -markiert waren, wurde ein 180° adiabatischer Chirp-Puls mit 500 μs Länge und 60 kHz Anregungsbreite verwendet, um während der ^{15}N -Evolutionszeit die Entwicklung der ^{15}N - ^{13}C -Kopplung zu verhindern. Die Transferzeit des INEPT-Schrittes wurde auf $\tau_a = 1/4J_{\text{NH}} = 2,78$ ms festgelegt. Zur Wasserunterdrückung wurde eine W5-WATERGATE-Sequenz mit der Phase der einzelnen Hartpulse von $\psi_1 = \{x\}$ bzw. $\psi_2 = \{-x\}$ und einer Zeit zwischen den Pulsen von 75 μs verwendet. Im Fast-HSQC erfolgte während der Aufnahme ^{15}N -Entkopplung durch GARP mit einer Entkopplerstärke von 1470 Hz. Feldgradienten hatten eine halbe Sinusform und eine Länge von 1 ms. Das Gradienten-Verhältnis war in **(A)** 50:80:30 für G_1 : G_2 : G_3 und in **(B)** 3:30:45:30 für G_0 : G_1 : G_2 : G_3 . Der Phasenzklus war in **(A)**: $\phi_1 = \{x\}$, $\phi_2 = \{x, -x\}$, $\phi_3 = \{2(x), 2(-x)\}$, $\phi_4 = \{4(x), 4(-x)\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{x, -x, x, -x, -x, x, -x, x\}$ und in **(B)**: $\phi_1 = \{y, -y, -x, x\}$, $\phi_2 = \{-y\}$, $\phi_3 = \{-x\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{x, -x, -y, y\}$. Alle anderen Pulse hatten entweder die Phase x oder eine andere über dem Puls angegebene Phase. In **(A)** erfolgte Quadraturdetektion in der indirekten Dimension mittels der States-TPPI-Methode, wobei in jedem t_1 -Schritt zwei FIDs mit um $\pi/2$ verschobenen Phasen ϕ_1 und ϕ_3 aufgenommen wurden und in aufeinanderfolgenden t_1 -Inkrementen die Phasen ϕ_1 und ϕ_3 jeweils um π geändert wurden. Quadraturdetektion in t_1 erfolgte in **(B)** mit der Echo/Antiecho-TPPI-Methode. Pro t_1 -Schritt wurde ein zweites Experiment mit den Phasen $\phi_1 = \{-y, y, -x, x\}$, $\phi_2 = \{y\}$, $\phi_3 = \{x\}$ aufgenommen und zwischen den t_1 -Inkrementen die Phasen ϕ_1 und ϕ_{rec} jeweils um π erhöht.

tionsprinzip wird während t_1 und t_2 keine ^1H - bzw. ^{15}N -Entkopplung durchgeführt, wodurch die vier Energieübergänge eines HN-Spinpaares nicht miteinander gemischt werden.

3. Methoden

Stattdessen wird nur der Kohärenzweg ausgewählt, der mit den beiden am langsamsten relaxierenden Übergängen während der ^{15}N - bzw. ^1H -Evolution assoziiert ist. Die anderen drei Kohärenzwege werden durch den Phasenzklus des Experiments unterdrückt. Zwar wird dabei nur ein Viertel der theoretisch möglichen Magnetisierung detektiert, trotzdem ist das Signal-Rausch-Verhältnis für große Proteine (Molekulargewicht ≥ 50 kDa) oft besser als in einem HSQC-Spektrum, aufgrund der deutlich schmalen Linienbreite des beobachteten Signals und weil nur der am langsamsten relaxierende Übergang für den Polarisationstransfer ausgewählt wird. Der letzte Punkt ist umso mehr für längere 3D-Experimente relevant, da dort Magnetisierung nacheinander über mehrere Heterokerne übertragen werden muss (vgl. Abschnitt 3.3.4).

Typische 90° - ^1H - und ^{15}N -Pulsängen in beiden Experimenten waren $12\ \mu\text{s}$ und $37\ \mu\text{s}$. Spektren wurden mit 32 bis 128 Scans und 64 bis 128 Inkrementen in der indirekten Dimension aufgenommen. Im Fast-HSQC-Experiment erfolgte während der Detektion ^{15}N -Entkopplung mittels GARP bei einer Entkopplerstärke von 1470 Hz. Quadraturdetektion in der ^{15}N -Dimension erfolgte durch States-TPPI (Fast-HSQC) oder durch die Echo/Antiecho-TPPI-Methode (TROSY-HSQC). Spektren wurden in der direkten Dimension mit einer Gauß-Funktion mit 20 Hz Linienverschmälerung und in der indirekten Dimension mit einer um $\pi/4$ verschobenen quadratischen Sinusfunktion prozessiert.

3.3.4. Tripelresonanzexperimente

Für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen von IL-10 zu den H_N -, N_H -, C' - und C_α -Atomen des Proteinerückgrats sowie zu den C_β -Atomen der Aminosäureseitenkette wurden dreidimensionale Tripelresonanzexperimente verwendet. Die starke skalare Kopplung zwischen dem Amidstickstoffatom und den C_α -Atomen (11 Hz zu Rest i und 7 - 14 Hz zu Rest $i - 1$) und zum C' -Atom (15 Hz) erlaubt es, Spinkohärenzen entlang der Proteinhauptkette herzustellen. Außerdem erlaubt die starke $^1J_{\text{CC}}$ -Kopplung von ca. 35 Hz den Kohärenz- und Polarisationstransfer auch in die Aminosäureseitenkette. Die hier beschriebenen Experimente stellen Korrelationen zwischen der Amidgruppe und den C_α -, C' - und C_β -Atomen im eigenen Rest i und zum vorhergehenden Rest $i - 1$ her. Durch Auffinden einer übereinstimmenden ^{13}C -chemischen Verschiebung für zwei ^1H - ^{15}N - ^{13}C -Korrelationen können Konnektivitäten zwischen einzelnen Aminosäureresten hergestellt werden. Bei Uneindeutigkeiten in der Übereinstimmung des ^{13}C -Signals sowie an Positionen von Prolinresten, die kein H_N -Atom besitzen, bricht die Kettenverlängerung ab. Bei bekannter Primärstruktur des Proteins können allerdings die entstehenden Segmente der Aminosäuresequenz zugeordnet werden. Dieser Prozeß wird entscheidend durch das Vorhandensein charakteristischer ^{13}C -chemischer Verschiebungen innerhalb der Sequenz erleichtert. So haben z. B. Glycin und Alanin ein sehr hochfeldverschobenes C_α - bzw. C_β -Signal von ca. 45 ppm bzw. 20 ppm. Serin- und Threoninreste weisen wiederum ein zu tiefem Feld verschobenes C_β -Signal bei > 60 ppm auf.

Die verwendeten Tripelresonanzexperimente und die in ihnen genutzten Wege des Magnetisierungstransfers sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Ihre Pulssequenzen sind in den Abbildungen 3.5 bis 3.7 dargestellt. Experimentelle Parameter sind in den entsprechenden Abbildungsunterschriften aufgeführt. Zusammengefasst wurden alle Experimente als TROSY-Version ausgeführt. Spektren wurden bei einer Temperatur von $30\ ^\circ\text{C}$ und

einem pH-Wert von 6.2 aufgenommen. Der Magnetisierungstransfer erfolgte mit Hilfe von INEPT-Schritten mit einer typischen Transferzeit von $< 1/2J$, um Intensitätsverluste durch transversale Relaxation zu verringern. Die Evolution der ^{15}N -chemischen Verschiebung während t_2 erfolgte durch gleichzeitige Verschiebung der 180° -Pulse für ^{15}N und ^{13}C in einer konstanten Zeitperiode (engl. *constant time*, CT). Während dieser ist auch J -Kopplung aktiv und es kann gleichzeitig Anti-Phase-Magnetisierung zwischen ^{15}N und ^{13}C hergestellt werden. Wasserunterdrückung wurde durch eine WATERGATE-Sequenz im letzten INEPT-Schritt sowie mit Hilfe von selektiven Sinc-Pulsen, die die Magnetisierung der Wasserprotonen entlang der $+z$ -Achse ausgerichtet halten (Wasser-*flip-back*-Pulse), erreicht. Feldgradienten wurden zur Unterdrückung von Artefakten aufgrund von Imperfektionen von 180° -Pulsen sowie innerhalb der WATERGATE-Sequenz verwendet. Selektive ^{13}C -Pulse hatten die Form einer Gauß-Kaskade und eine Länge von $333 \mu\text{s}$ (90° -Puls) bzw. $256 \mu\text{s}$ (180° -Puls).

Tabelle 3.4.: Tripelresonanzexperimente für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen von IL-10. Die beobachteten Korrelationen und der Weg des Magnetisierungstransfers sind gezeigt. Atome, die mit einem durchgehenden Kreis markiert sind, werden mit ihrer chemischen Verschiebung detektiert. Atome mit einem gepunkteten Kreis dienen nur der Weiterleitung der Magnetisierung, ohne dass ihre chemische Verschiebung detektiert wird. Pfeile zeigen die Richtung des Magnetisierungstransfers an. Alle Experimente stellen sog. *In-and-Out*-Experimente dar, die mit Anregung des H_N -Atoms beginnen und auch mit Detektion der H_N -Magnetisierung enden.

Experiment	Bruker-Pulsprogramm	Korrelationen	Magnetisierungstransfer
HNCA	trhncagp3d2	$\text{H}_\text{N}-\text{N}_\text{H}-\text{C}_\alpha^i$; $\text{H}_\text{N}-\text{N}_\text{H}-\text{C}_\alpha^{i-1}$	
HN(CO)CA	trhncocagp3d	$\text{H}_\text{N}-\text{N}_\text{H}-\text{C}_\alpha^{i-1}$	
HNCO	trhncoetgp3d	$\text{H}_\text{N}-\text{N}_\text{H}-\text{CO}^{i-1}$	
HN(CA)CO	trhncacogp3d	$\text{H}_\text{N}-\text{N}_\text{H}-\text{CO}^i$; $\text{H}_\text{N}-\text{N}_\text{H}-\text{CO}^{i-1}$	
HNCACB	trhncacbgp3d	$\text{H}_\text{N}-\text{N}_\text{H}-\text{C}_{\text{ali}}^i$; $\text{H}_\text{N}-\text{N}_\text{H}-\text{C}_{\text{ali}}^{i-1}$	
HN(CO)CACB	trhncocacbgp3d	$\text{H}_\text{N}-\text{N}_\text{H}-\text{C}_{\text{ali}}^{i-1}$	

3. Methoden

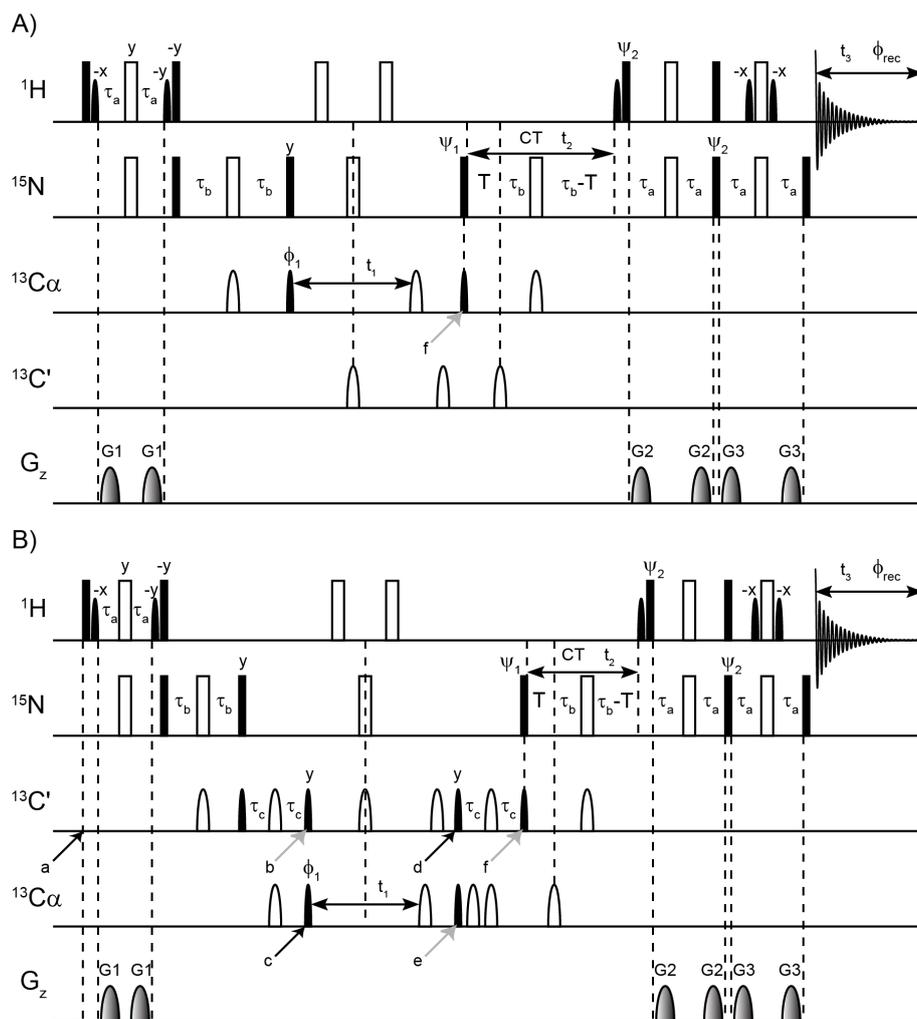


Abbildung 3.5.: Pulssequenzen des (A) HNCA- und (B) HN(CO)CA-Experiments als TROSY-Version. Schwarze schmale Balken entsprechen 90° -Hartpulsen, weiße breite Balken 180° -Hartpulsen und Parabelflächen geformte Pulse oder Gradienten. Die Trägerfrequenz der ^1H -, ^{15}N -, $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}'$ -RF-Pulse lag bei 4,7 ppm, 116 ppm, 53,5 ppm und 175 ppm. Wasserunterdrückung wurde durch für Wasser selektive 1 ms lange Sinc-Pulse innerhalb der ersten INEPT-Sequenz und nach der ^{15}N -Evolutionperiode, welche die Magnetisierung der Wasserprotonen entlang der $+z$ -Achse ausgerichtet halten, sowie durch eine WATERGATE-Sequenz erreicht. Selektive Pulse für $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}'$ waren 90° -Gauß.Q5- und 180° -Gauß.Q3-Pulse. Die 90° -Pulse zu den Zeitpunkten b , e und f (graue Pfeile) waren Gauß.Q5-Pulse mit in der Zeit umgekehrter Phase und Amplitude. Gradientenpulse hatten eine halbe Sinusform und eine Länge von 1 ms. Das Verhältnis der Gradientenstärke für $G1:G2:G3$ war 30:18:44. Im HN(CO)CA-Experiment wurde zu den Zeitpunkten a und d die Trägerfrequenz auf die $^{13}\text{C}'$ -Frequenz von 175 ppm und zum Zeitpunkt c auf die $^{13}\text{C}_\alpha$ -Frequenz von 53,5 ppm gesetzt. Die Transferzeiten wurden festgelegt auf $\tau_a = 2,3$ ms, $\tau_b = 12$ ms und $\tau_c = 4$ ms. Die Evolution der ^{15}N -chemischen Verschiebung während t_2 erfolgte in einer CT-Periode. Der Phasenzyklus war in (A) und (B): $\phi_1 = \{4(x), 4(-x)\}$, $\psi_1 = \{y, -y, x, -x\}$, $\psi_2 = \{-y\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{y, -y, -x, x, -y, y, x, -x\}$. Alle anderen Pulse hatten entweder die Phase x oder eine andere über dem Puls angegebene Phase. Quadraturdetektion in der ^{13}C -Dimension erfolgte durch States-TPPI, indem pro t_1 -Schritt zwei FIDs mit um $\pi/2$ verschobener Phase ϕ_1 aufgenommen wurden und in aufeinanderfolgenden t_1 -Inkrementen sich die Phase ϕ_1 um π unterschied. Zur Quadraturdetektion in der ^{15}N -Dimension wurde die Echo/Antiecho-Methode verwendet, wobei für jedes t_2 -Inkrement ein zweiter FID mit $\psi_1 = \{y, -y, -x, y\}$ und $\psi_2 = \{y\}$ aufgenommen wurde.

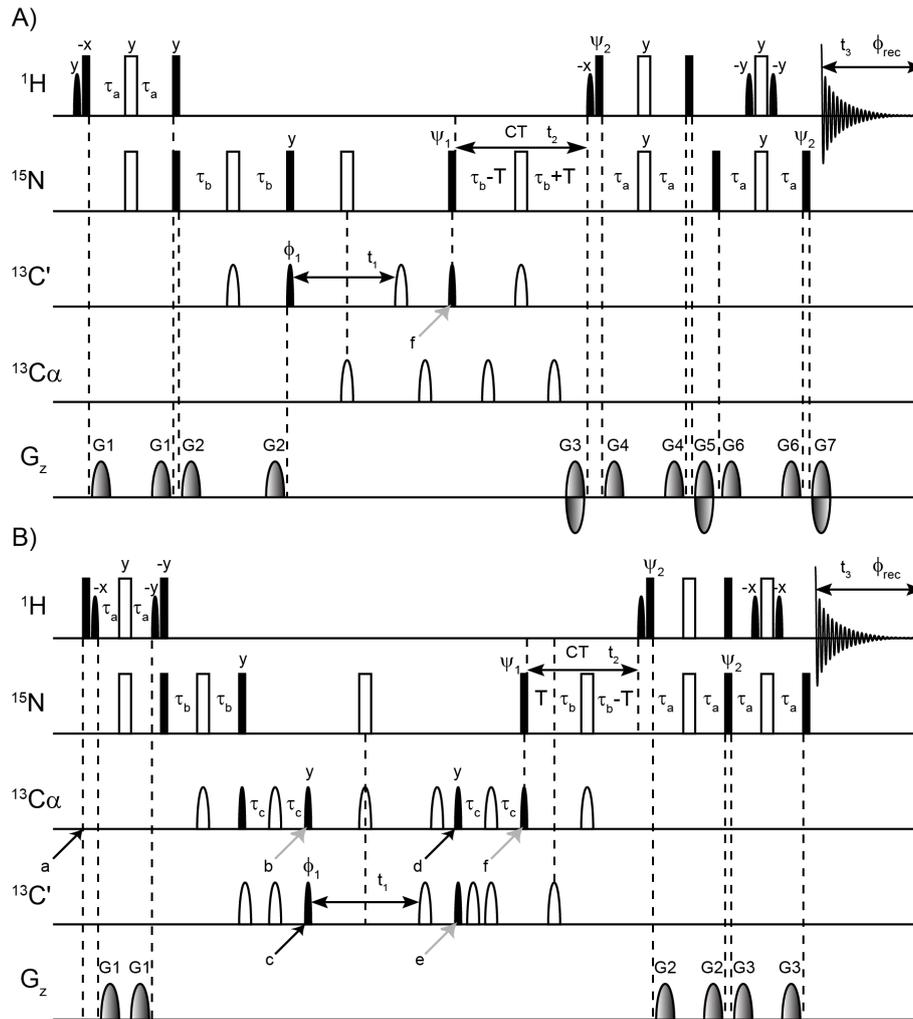


Abbildung 3.6.: Pulssequenzen des (A) HNCO- und (B) HN(CA)CO-Experiments als TROSY-Version. Schwarze schmale Balken entsprechen 90° -Hartpulsen, weiße breite Balken 180° -Hartpulsen und Parabelflächen geformten Pulsen oder Gradienten. Die Trägerfrequenz der ^1H -, ^{15}N -, $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}'$ -RF-Pulse lag bei 4,7 ppm, 116 ppm, 53,5 ppm und 175 ppm. Wasserunterdrückung wurde durch selektive 1 ms lange Sinc-Pulse am Anfang der ersten INEPT-Sequenz und nach der ^{15}N -Evolutionenperiode sowie durch eine WATERGATE-Sequenz erreicht. Selektive Pulse für $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}'$ waren 90° -Gauß.Q5- und 180° -Gauß.Q3-Pulse. Die 90° -Pulse zu den Zeitpunkten b , e und f (graue Pfeile) waren Gauß.Q5-Pulse mit in der Zeit umgekehrter Phase und Amplitude. Im HN(CA)CO-Experiment wurde zu den Zeitpunkten a und d die Trägerfrequenz auf die $^{13}\text{C}_\alpha$ -Frequenz von 53,5 ppm und zum Zeitpunkt c auf die $^{13}\text{C}'$ -Frequenz von 175 ppm gesetzt. Die Transferzeiten wurden festgelegt auf $\tau_a = 2,3$ ms, $\tau_b = 12$ ms und $\tau_c = 4$ ms. Die Evolution der ^{15}N -chemischen Verschiebung während t_2 erfolgte in einer CT-Periode. Der Phasenzyklus war in (A): $\phi_1 = \{2(x), 2(-x)\}$, $\psi_1 = \{x, -x\}$, $\psi_2 = \{-y\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{x, -x, -x, x\}$ und in (B): $\phi_1 = \{4(x), 4(-x)\}$, $\psi_1 = \{y, -y, x, -x\}$, $\psi_2 = \{-y\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{y, -y, -x, x, -y, y, x, -x\}$. Alle anderen Pulse hatten entweder die Phase x oder eine andere über dem Puls angegebene Phase. Quadraturdetektion in der ^{13}C -Dimension erfolgte durch States-TPPI, indem pro t_1 -Schritt zwei FIDs mit um $\pi/2$ verschobener Phase ϕ_1 aufgenommen wurden und in aufeinanderfolgenden t_1 -Inkrementen sich die Phase ϕ_1 um π unterschied. Zur Quadraturdetektion in der ^{15}N -Dimension wurde im HN(CA)CO-Experiment die Echo/Antiecho-Methode verwendet, wobei für jedes t_2 -Inkrement ein zweiter FID mit $\psi_1 = \{y, -y, -x, y\}$ und $\psi_2 = \{y\}$ aufgenommen wurde. Im HNCO-Experiment erfolgte die Quadraturdetektion in der t_2 -Dimension durch Echo/Antiecho-TPPI. Pro t_2 -Schritt wurden zwei FIDs mit einer um π verschiedenen Phase ψ_2 und geänderter Intensität der Gradienten G3, G5 und G7 aufgenommen. Im darauffolgenden t_2 -Inkrement wurden jeweils die Phasen ψ_1 und ϕ_{rec} um π geändert.

3. Methoden

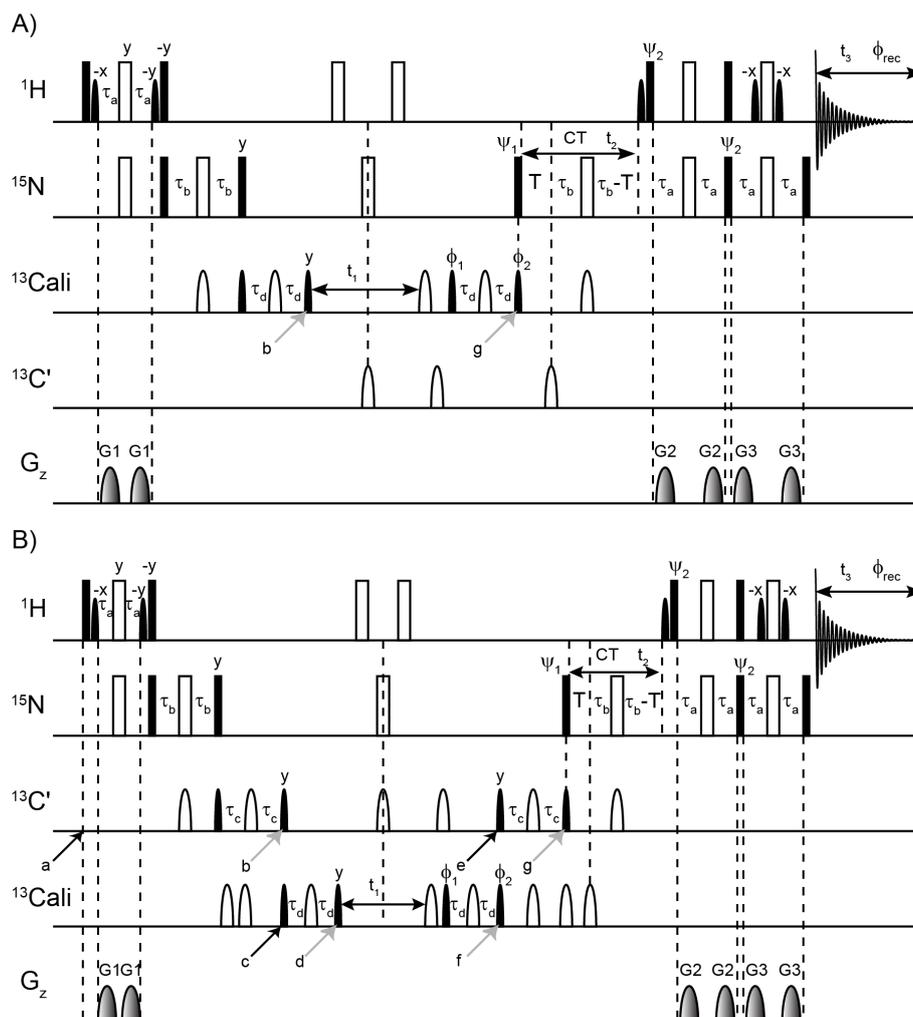


Abbildung 3.7.: Pulssequenzen des (A) HNCACB- und (B) HN(CO)CACB-Experiments als TROSY-Version. Schwarze schmale Balken entsprechen 90° -Hartpulsen, weiße breite Balken 180° -Hartpulsen und Parabelflächen geformten Pulsen oder Gradienten. Die Trägerfrequenzen der RF-Pulse zur Anregung von ^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}'$ und aliphatischen ^{13}C -Kernen der Aminosäureseitenkette ($^{13}\text{C}_{\text{ali}}$) lagen bei 4,7 ppm, 116 ppm, 175 ppm und 40 ppm. Die Übertragung der Magnetisierung vom C_α - auf das C_β -Atom, die beide während t_1 evolvieren, erfolgte durch einen COSY-ähnlichen Transfer während $2\tau_d$. Wasserunterdrückung wurde durch selektive 1 ms lange Sinc-Pulse innerhalb der ersten INEPT-Sequenz und nach der ^{15}N -Evolutionsperiode sowie durch eine WATERGATE-Sequenz erreicht. Selektive Pulse für $^{13}\text{C}_{\text{ali}}$ und $^{13}\text{C}'$ waren 90° -Gauß.Q5- und 180° -Gauß.Q3-Pulse. Die 90° -Pulse zu den Zeitpunkten b , d , f und g (graue Pfeile) waren Gauß.Q5-Pulse mit in der Zeit umgekehrter Phase und Amplitude. Gradientenpulse hatten eine halbe Sinusform und eine Länge von 1 ms. Im HN(CO)CACB-Experiment wurde zu den Zeitpunkten a und e die Trägerfrequenz auf die $^{13}\text{C}'$ -Frequenz bei 175 ppm und zum Zeitpunkt c auf die $^{13}\text{C}_{\text{ali}}$ -Frequenz von 40 ppm gesetzt. Die Transferzeiten wurden auf $\tau_a = 2,3$ ms, $\tau_b = 12$ ms, $\tau_c = 4$ ms und $\tau_d = 3,6$ ms festgelegt. Die Evolution der ^{15}N -chemischen Verschiebung während t_2 erfolgte in einer CT-Periode. Der Phasenzyklus war in (A) und (B): $\phi_1 = \{4(-y), 4(y)\}$, $\phi_2 = \{4(x), 4(-x)\}$, $\psi_1 = \{y, -y, x, -x\}$, $\psi_2 = \{-y\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{y, -y, -x, x, -y, y, x, -x\}$. Alle anderen Pulse hatten entweder die Phase x oder eine andere über dem Puls angegebene Phase. Quadraturdetektion in der ^{13}C -Dimension erfolgte durch States-TPPI, indem pro t_1 -Schritt zwei FIDs mit um $\pi/2$ verschobenen Phasen ϕ_1 und ϕ_2 aufgenommen und in aufeinanderfolgenden t_1 -Inkrementen dieselben Phasen um π geändert wurden. Zur Quadraturdetektion in der ^{15}N -Dimension wurde die Echo/Antiecho-Methode verwendet, wobei für jedes t_2 -Inkrement ein zweiter FID mit $\psi_1 = \{y, -y, -x, y\}$ und $\psi_2 = \{y\}$ aufgenommen wurde.

3.4. STD-NMR-Spektroskopie

3.4.1. Bestimmung von Bindungsepitopen mittels STD-NMR

STD-NMR-Experimente wurden an einem Bruker Avance III 600 MHz-Spektrometer oder an einem Bruker Avance II 700 MHz-Spektrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt. Für die Bestimmung von Bindungsepitopen enthielten Proben 40 μM IL-10 und einen 50- bis 100-fachen molaren Überschuss an Ligand in 99,8% D_2O mit 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,0), 50 mM NaCl. Um den Sättigungstransfer von Protein- auf Ligandprotonen, der durch Kreuzrelaxation erfolgt, zu verbessern, wurden alle Messungen bei 10 °C durchgeführt. Für die ineinander verschachtelte Aufnahme von *On*- und *Off*-Resonanzspektrum wurde eine Pseudo-2D-Version des STD-NMR-Experiments verwendet (siehe Abbildung 3.8). Zur selektiven Sättigung der Proteinprotonen wurde ein Pulszug aus 50 E-Burp2-geformten 90°-Pulsen mit jeweils 50 ms Länge und einer Dauer zwischen den Pulsen von 1 ms verwendet. Die *On*-Resonanzfrequenz wurde auf 0,202 ppm eingestellt, während im Falle des *Off*-Resonanzspektrums die Anregungsfrequenz des E-Burp2-Pulses auf 30 ppm gesetzt wurde. Im Anschluss an den E-Burp2-Pulszug und den ersten 90°-Hartpuls, der alle Protonen in die transversale Ebene auslenkt, wurde ein TOCSY-*Spinlock* von 50 ms Dauer und einer Feldstärke von 5,6 kHz gesetzt. Dieser Schritt dient der Unterdrückung ungewollter Proteinsignale, denn diese besitzen eine schnellere T_2 -Relaxation als Protonen des Liganden und verlieren somit transversale Magnetisierung während dieser Zeit. Eine Unterdrückung des restlichen Wassersignals wurde durch eine zweifache WATERGATE-Sequenz erreicht. STD-Spektren wurden typischerweise mit einer Sättigungszeit von 4 s, mit 256 Scans und einer FID-Größe von 16k Punkten aufgenommen. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID mit einer Exponentialfunktion mit 1 Hz Linienverbreiterung multipliziert. Im Falle des Heparin-Tetrasaccharids wurde das STD-Spektrum mit Hilfe eines STD- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Experiments gemessen (siehe Abbildung 3.8). Das Spektrum wurde mit einer Sättigungszeit von 3 s, mit 3072 Scans sowie 4k Punkten und 64 Inkrementen in der direkten und indirekten Dimension aufgenommen. Zur selektiven Sättigung der Proteinprotonen wurde wiederum eine Folge von E-Burp2-Pulsen mit 50 ms Länge und 1 ms Wartezeit zwischen den Pulsen verwendet. Typische ^1H - und ^{13}C -Pulsängen waren 9 μs und 12,3 μs . Das Experiment enthielt ferner sinusförmige z-Gradienten mit 1 ms Dauer zur Kohärenzselektion sowie GARP-Entkopplung während der Aufnahme. Zur Prozessierung des Spektrums wurde der FID in der direkten Dimension mit einer Exponentialfunktion mit 10 Hz Linienverbreiterung und in der indirekten Dimension mit einer um $\pi/4$ verschobenen quadratischen Sinusfunktion multipliziert.

Bei der Berechnung von STD-Effekten zur Bestimmung von GAG-Bindungsepitopen wurde die T_1 -Relaxation des Liganden berücksichtigt, da Relaxationsprozesse einen erheblichen Einfluss auf die Stärke des beobachteten STD-Effektes haben. So wird durch T_1 -Relaxation das nach dem Sättigungstransfer eingestellte Verteilungsgleichgewicht der Kernspinniveaus wieder rückgängig gemacht. Da T_1 -Zeiten für verschiedene Protonen desselben Ligandmoleküls z. T. erheblich variieren, kann es zu einer falschen Interpretation der STD-Effekte kommen. Kemper et al. [131] zeigten, dass STD-Effekte näherungsweise mit Hilfe der T_1 -Relaxationszeit des freien Liganden korrigiert werden können und dass

3. Methoden

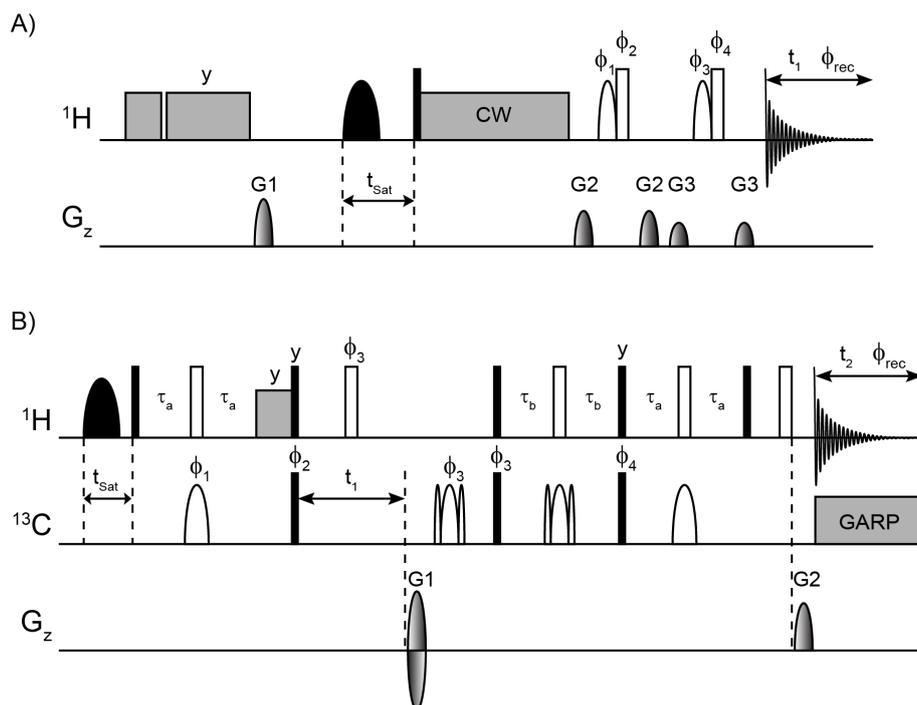


Abbildung 3.8.: Pulssequenzen der verwendeten STD-NMR-Experimente: **(A)** 1D- ^1H und **(B)** 2D- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC (Bruker-Pulsprogramme: stddiffesg.p.3 und stdhsqcetgpcsp). Schwarze schmale Balken entsprechen 90° -Hartpulsen, weiße breite Balken 180° -Hartpulsen und graue Rechtecke Pulszügen, CW-Pulsen bzw. Trim-Pulsen. Parabelflächen stellen geformte Pulse oder Gradienten dar. Die Trägerfrequenz der ^1H - und ^{13}C -RF-Pulse lag bei 4,7 bzw. 65 ppm. Selektive Pulse auf dem ^1H -Kanal waren 180° -Sinc-Pulse mit 3 ms Dauer zur Wasserunterdrückung (WATERGATE) sowie eine Folge von 90° -E-Burp2-Pulsen mit je 50 ms Länge zur Sättigung der Proteinresonanzen. Geformte 180° -Pulse auf dem ^{13}C -Kanal waren adiabatische Chirp-Pulse mit 500 μs Dauer und einer Anregungsbreite von 60 kHz sowie zusammengesetzte Chirp-Pulse mit 2 ms Dauer. Die Zeiten waren $t_{\text{Sat}} = 1 - 5 \text{ s}$, $\tau_a = 1/4 J_{\text{CH}} = 1,72 \text{ ms}$, $\tau_b = 1/8 J_{\text{CH}} = 862 \mu\text{s}$. Feldgradienten hatten eine Dauer von 1 ms bzw. Gradient G1 im 1D-STD-Experiment von 3 ms. Der Phasenzyklus war in **(A)**: $\phi_1 = \{2(x), 2(y)\}$, $\phi_2 = \{2(-x), 2(-y)\}$, $\phi_3 = \{4(x), 4(y)\}$, $\phi_4 = \{4(-x), 4(-y)\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{x, -x, -x, x, -x, x, x, -x\}$ und in **(B)**: $\phi_1 = \{x\}$, $\phi_2 = \{2(x), 2(-x)\}$, $\phi_3 = \{4(x), 4(-x)\}$, $\phi_4 = \{4(y), 4(-y)\}$, $\phi_{\text{rec}} = \{x, -x, -x, x\}$. Alle anderen Pulse hatten entweder die Phase x oder eine andere über dem Puls angegebene Phase. In **(B)** erfolgte Quadraturdetektion in der indirekten Dimension durch Echo/Antiecho-TPPI. Dabei wurden pro t_1 -Inkrement zwei FIDs aufgenommen, wobei beim zweiten Experiment die Phase ϕ_4 um π auf $\{4(-y), 4(y)\}$ und außerdem das Vorzeichen von Gradient G1 geändert wurden. Zur Unterdrückung von axialen Peaks durch TPPI wurde in jedem nachfolgenden t_1 -Inkrement die Phasen ϕ_1 , ϕ_2 und ϕ_{rec} um π geändert. Weiterhin erfolgten in **(B)** ein doppelter INEPT-Schritt zur Rückgewinnung von Doppelquanten-Magnetisierung, Kohärenzselektion mit Hilfe von Feldgradienten mit dem Intensitätsverhältnis $G_1/G_2 = \gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}}$ und ^{13}C -Entkopplung durch GARP während der Aufnahme mit einer Entkopplerstärke von 3570 Hz.

diese Annahme für Bedingungen gültig ist, die gewöhnlich im STD-Experiment erfüllt werden:

- (1) STD-Effekte werden unter Gleichgewichtsbedingungen des Sättigungstransfers (d. h. nach ausreichend langer Sättigungszeit des Proteins) gemessen.
- (2) Der Ligand ist im Überschuss vorhanden.

- (3) Die Rate der Liganddissoziation ist schneller als seine Relaxationsrate im gebundenen Zustand.

T_1 -Relaxationszeiten der freien GAG-Liganden wurden mit einem Pseudo-2D-*inversion-recovery*-Experiment ohne Wasserunterdrückung (Bruker-Pulsprogramm: t1ir) bei 600 MHz (Disaccharide) bzw. 700 MHz (Heparin-Tetrasaccharid) und mit einer Wartezeit zwischen aufeinanderfolgenden Scans von 30 s gemessen.

3.4.2. Bestimmung der Bindungsaffinität mittels STD-NMR

Zur Aufnahme von Bindungskurven wurde die initiale Wachstumsrate des STD-Verstärkungsfaktors ($STD-AF$) für aufsteigende IL-10-GAG-Verhältnisse bestimmt. $STD-AF$ ist definiert als das Produkt aus der Intensität des STD-Signals und dem Konzentrationsüberschuss an Ligand ($\varepsilon = [L] / [P]$) [118]:

$$STD-AF = \varepsilon \times \frac{(I_0 - I_{Sat})}{I_0} = \varepsilon \times \eta_{STD} \quad (3.1)$$

wobei I_0 die Intensität des Referenzspektrums und I_{Sat} die Intensität des On -Resonanzspektrums ist. Eine Bestimmung von K_D -Werten allein aus der Änderung des $STD-AF$ mit ansteigenden Protein-Ligand-Verhältnissen ist nicht sinnvoll, aufgrund der komplexen Abhängigkeit der STD-Intensität von verschiedenen experimentellen Größen wie Sättigungszeit, longitudinaler Relaxation der Ligandsignale und Lebensdauer des Protein-Ligand-Komplexes. Falls der Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand schnell ist, was für oftmals schwach bindende Kohlenhydratliganden zutrifft, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass gesättigte Ligandmoleküle mehrmals an die Bindungsstelle binden. Der Betrag an übertragener Sättigung ist dann geringer als bei noch ungesättigten Ligandmolekülen. Aus diesem Grund spiegelt der $STD-AF$ den Anteil an gebundenem Ligand nicht exakt wider. Der Effekt der wiederholten Ligandenbindung ist besonders bei geringen Ligand-Protein-Verhältnissen entscheidend und führt in NMR-Titrationsexperimenten zu Fehlern bei der Bestimmung der Bindungsaffinität. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit die initiale Wachstumsrate des $STD-AF$ zur Aufnahme von Bindungskurven verwendet. Für jedes IL-10-GAG-Verhältnis wurden STD-Spektren bei Sättigungszeiten von 1, 2, 3, und 5 s aufgenommen und die initiale Wachstumsrate des $STD-AF$ ($STD-AF_0$) aus der STD-Aufbaukurve durch Anpassung an eine Exponentialfunktion erhalten:

$$STD-AF(t) = a(1 - \exp(-bt)) \quad (3.2)$$

$STD-AF_0$ ist das Produkt aus beiden Koeffizienten a und b . Die Dissoziationskonstante der Bindung (K_D) wurde durch Anpassung der $STD-AF_0$ -Werte als Funktion der Ligandkonzentration an ein 1:1-Bindungsmodell erhalten:

$$STD-AF_0([L]) = \frac{[P] + [L] + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{[P] + [L] + K_D}{2}\right)^2 - [P] \times [L]} \quad (3.3)$$

3. Methoden

wobei [P] und [L] die Protein- bzw. Ligandkonzentration sind. Außerdem wurde die Bindung hinsichtlich Kooperativität und Stöchiometrie mit Hilfe der Hill-Gleichung untersucht:

$$STD-AF_0([L]) = \frac{STD-AF_{\max} \times [L]^n}{K_D + [L]^n} \quad (3.4)$$

Der Exponent n ist dabei der Hill-Koeffizient. Für die nicht-lineare Regression und Berechnung der Ausgleichskurven wurde Origin[®] 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) verwendet.

3.5. Strukturbestimmung von freiem und IL-10-gebundenem Heparin mit NMR und MD

3.5.1. NOESY/ROESY-NMR-Spektroskopie

Intramolekulare Abstandsinformationen zu freiem und IL-10-gebundenem Heparin-Tetrasaccharid (Δ UA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S(1 \rightarrow 4)IdoA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S) wurden aus $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY- und NOESY-Spektren erhalten. NMR-Experimente wurden, wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Für die Bestimmung der proteingebundenen Heparinstruktur enthielten Proben 100 μM IL-10 und einen 20-fachen Überschuss an Heparin in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,0), 50 mM NaCl, 99,9% (v/v) D_2O . Es wurden kurze Mischzeiten (bis maximal 150 ms) gewählt, bei denen die NOE-Aufbaukurve noch einen linearen Bereich aufweist und der Einfluss von Spindiffusion als gering eingeschätzt wird. ^1H - ^1H -Abstände wurden aus ROE- und NOE-Kreuzpeakintensitäten unter Annahme einer $1/r^6$ -Abhängigkeit zwischen zwei interagierenden Protonen berechnet. Intensitäten wurden dabei anhand des bekannten Abstands von 2,55 Å zwischen den Protonenpaaren H2-H4 oder H3-H5 des Glukosamin-Rings in der $^4\text{C}_1$ -Sesselkonformation kalibriert. Ein Toleranzintervall von $\pm 0,3$, $\pm 0,6$ und ± 1 Å wurde für Abstandswerte von $< 2,0$, $2,0 - 4,0$ und $> 4,0$ Å festgelegt.

3.5.2. NOE-unterstützte MD-Berechnungen

Die Struktur von freiem und IL-10-gebundenem Heparin-Tetrasaccharid Δ UA,2S(1 \rightarrow 4)-GlcNS,6S(1 \rightarrow 4)IdoA,2S(1 \rightarrow 4)GlcNS,6S wurde durch MD-Simulationen unter Zuhilfenahme der experimentell bestimmten NOE-Abstandsinformationen berechnet. Berechnungen wurden mit Hilfe von Amber 12 [223] unter Verwendung des GLYCAM 06g Kraftfeldes [224] von Jan-Philip Gehrcke (BIOTEC, TU Dresden) durchgeführt. Partialladungen der Sulfatgruppen wurden durch RESP (engl. *restrained electrostatic potential*)-Berechnungen [225] für Methylsulfat erhalten. Die erste Stufe der Strukturberechnung umfasste ein *Simulated Annealing* (SA)-Protokoll mit einem impliziten Lösungsmittelmodell und einer $1/r$ -Abstandsabhängigkeit des elektrostatischen Potentials. Die Zeit pro MD-Schritt betrug 1 fs. Außerhalb des Toleranzintervalls wurde jeder NOE-Abstand als ein harmonisches Potential mit einer Kraftkonstante von 20 kcal mol $^{-1}$ Å $^{-1}$ in der Strukturberechnung implementiert. Da das GLYCAM-Kraftfeld keine Parameter für einen 4,5-ungesättigten Uronsäurerest bereitstellt, wurden die Abstandswerte aller H-Atome von Ring A außer H1 nicht in der Berechnung verwendet. Das Protokoll enthielt die folgenden Schritte:

- (1) *Steepest Descent*- und *Conjugate Gradient*-Minimierung mit NOE-Abständen
- (2) 100 ps MD mit Kopplung an ein 600 K-Wärmebad und graduelle Zunahme der Wichtung von NOE-Abständen
- (3) 300 ps MD mit NOE-Abständen und graduelle Verringerung der Temperatur von 600 K auf 10 K
- (4) kurze MD mit gradueller Verringerung der Temperatur von 10 K auf 0 K

Die zweite Phase der Strukturberechnung wurde mit periodischen Randbedingungen, einem explizitem TIP3P-Wassermodell, mit Na⁺ als Gegenionen zur Neutralisierung des Systems (unter Verwendung von SHAKE [226]) und einem MD-Zeitintervall von 2 fs durchgeführt. Die folgenden Schritte wurden ausgeführt:

- (1) Minimierung des Lösungsmittels
- (2) 20 ps MD und Erhöhung der Temperatur auf 300 K im kanonischen Ensemble (NVT) mit starker Beschränkung der Heparin-Atompositionen
- (3) 200 ps MD zur Äquilibration im isotherm-isobaren Ensemble (NPT) mit schwacher Beschränkung der Heparin-Atompositionen und Verwendung von NOE-Abständen
- (4) 200 ps MD im isotherm-isobaren Ensemble (NPT) mit NOE-Abständen und graduelle Kühlung auf 250 K
- (5) 400 ps MD im isotherm-isobaren Ensemble (NPT) mit NOE-Abständen und graduelle Kühlung auf 0 K

Die beiden Schritte der Strukturberechnung wurden 100-mal in unabhängigen Simulationen mit unterschiedlichen Startwerten wiederholt und die Atomkoordinaten der einzelnen Modelle aufeinander zur Deckung gebracht. Bei dieser Ausrichtung wurden nur die Ringatome der Monosaccharidreste B, C und D sowie die O4-Atome der glykosidischen Bindung berücksichtigt. Weiter wurde die mittlere quadratische Abweichung zwischen diesen Atomen berechnet – als Maß für den strukturellen Unterschied zwischen zwei Strukturen. Der Mittelwert der paarweisen strukturellen Abweichung über alle Strukturen wurde als Maß für die Diversität des Ensembles herangezogen. Als repräsentatives Modell wurde die Struktur mit der geringsten paarweisen strukturellen Abweichung zu allen anderen Strukturen im Ensemble ausgewählt. Als weiteres Maß für die strukturelle Diversität wurde die Verteilung von verschiedenen Diederwinkeln erfasst. Zur Analyse der GAG-Rückgratstruktur wurden die Torsionswinkel der glykosidischen Bindung ausgewertet: ϕ und ψ für die Atomgruppen H1-C1-O4-C4 bzw. C1-O4-C4-H4 in Richtung zum reduzierenden Zuckerende. Die Orientierung der Sulfatseitenketten wurde anhand der Diederwinkel H2-C2-O-S für 2-O-Sulfat, H2-C2-N-H für 2-N-Sulfat und O5-C5-C6-O6 für 6-O-Sulfat ausgewertet.

3.6. Bestimmung der Kristallstruktur von murinem IL-10 durch Röntgenbeugungsanalyse

3.6.1. Kristallisation der IL-10-Variante N Δ 8, C149Y

IL-10 N Δ 8, C149Y wurde in 20 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl mit Konzentrationen von 10 - 30 mg/mL vorbereitet (vgl. Abschnitt 3.2.4). Kristallisationsbedingungen wurden mit der *Sitting Drop*-Methode mit einem Tropfenvolumen von 0,2 μ L und einem Reservoirvolumen von 90 μ L getestet. Dabei wurden gleiche Volumina an Protein und Kristallisationspuffer miteinander gemischt. Erste Kristalle wuchsen mit 30% (v/v) Glycerolethoxylat, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M MES (pH 6,5) bei 19 °C. Ausgehend von dieser Bedingung wurde die Zusammensetzung des Kristallisationspuffers weiter modifiziert und größere Kristalle mit der *Hanging Drop*-Methode gezüchtet. Glycerolethoxylat wurde in Konzentrationen zwischen 20 - 30% (v/v) verwendet und der pH-Wert zwischen 6,0 - 7,0 variiert. Das Tropfenvolumen betrug 2 μ L und das Reservoirvolumen 500 μ L. Die Proteinkonzentration im Kristallisationstropfen betrug 5 - 10 mg/mL. Kristalle erschienen nach ein bis zwei Tagen und erreichten ihre volle Größe mit 200 - 600 μ m entlang der längsten Kristallkante nach drei bis vier Tagen.

Für Röntgenmessungen bei Tieftemperatur (100 K) wurden die Kristalle mit 10% (v/v) Glycerol als Gefrierschutzmittel versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Kristalle nacheinander in 2 μ L Tropfen, welche die Mutterlauge und aufsteigende Konzentrationen an Glycerol enthielten, transferiert. Weiter wurden Kristalle auch mit verschiedenen GAG-Liganden (Konzentration im Tropfen: 1 - 10 mM) versetzt und für wenige Stunden bis mehrere Tage und Wochen darin getränkt, um die Cokristallstruktur für einen IL-10-GAG-Komplex zu erhalten. Auch Kristallisationsansätze, bei denen der GAG-Ligand bereits von Anfang an zur Mutterlauge gegeben worden war, wurden ausprobiert.

3.6.2. Kristallisation der IL-10-Variante N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y

Die IL-10-Variante mit der Deletion N Δ 8, den drei Mutationen Q32R, T49K, C149Y und ohne den C-terminalen His8-*Tag* wurde, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, vorbereitet und Kristallisationsbedingungen mit der *Sitting Drop*-Methode bei 19 °C getestet. Erste Kristalle wurden unter einer Vielzahl von Bedingungen erhalten (siehe im Anhang Abschnitt A.1) und davon ausgehend Kristallisationsansätze mit den folgenden Zusammensetzungen der Mutterlauge hergestellt: 18 - 24% (w/v) PEG 3350 oder 17 - 21% (v/v) Glycerolethoxylat als Fällungsmittel, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,2 M Natriumformiat oder 0,1 M Magnesiumformiat als Additiv und 0,1 M HEPES oder 0,1 M TRIS-HCl als Puffer im pH-Bereich von 7,2 - 7,8 bzw. 8,3 - 8,7. Kristalle wurden mit der *Hanging Drop*-Methode gezüchtet. Das Tropfenvolumen betrug 2 μ L und das Reservoirvolumen 500 μ L. Die Proteinkonzentration im Kristallisationstropfen betrug 5 - 10 mg/mL. Kristalle erschienen bei 19 °C nach drei bis vier Tagen und erreichten ihre volle Größe von ca. 400 μ m entlang der längsten Kristallkante nach einer Woche. Da die Kristalle mechanisch instabil waren und beim Montieren auf die Goniometeröse zerbrachen, wurden sie vorher mit Glutaraldehyd, das mit den primären Aminogruppen von Lysin unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagiert, quervernetzt [227]. Dazu wurden 5 μ L einer 10%igen, wässrigen Glutaraldehyd-Lösung bei pH 3,0 (verdünnt mit 1 mM HCl) auf ein Polystyrol-

Microbridge-Gefäß platziert und das Reservoir mit 500 μL der Kristallisationsmutterlauge gefüllt. Ein oder mehrere Kristalle wurden in einen 2 μL -Tropfen der Mutterlauge auf einem Glasplättchen platziert und damit das Reservoir luftdicht verschlossen, um die Quervernetzungsreaktion zu starten. Verschiedene Reaktionszeiten zwischen 15 min bis 1 h wurden getestet, wobei 30 min genug waren, um eine ausreichende mechanische Stabilität der Kristalle zu erreichen, sodass sie der Montierung auf die Goniometeröse sowie der Cryoprotektion standhielten. Die Reaktion wurde beendet, indem die Reaktionskammer geöffnet wurde und die Kristalle mehrere Male mit frischer Kristallisationsmutterlauge gewaschen wurden. Als Gefrierschutzmittel für Röntgenmessungen bei 100 K wurde 10% (v/v) Glycerol verwendet, das in aufsteigenden Mengen der Mutterlauge zugesetzt wurde. Weiter wurden Kristalle auch mit verschiedenen GAG-Liganden (1 - 10 mM), entweder vor oder nach der Quervernetzung, versetzt und für wenige Stunden bis mehrere Tage und Wochen darin getränkt, um die Cokristallstruktur eines IL-10-GAG-Komplexes zu erhalten.

3.6.3. Röntgenmessungen, Strukturbestimmung und Verfeinerung

Röntgenbeugungsdaten wurden mit Synchrotronstrahlung bei einer Wellenlänge von 0.91841 Å und bei einer Temperatur von 100 K an der Strahllinie (engl. *beamline*) BL14.1 der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) gemessen. Für den Kristall der IL-10-Variante N Δ 8, C149Y wurden 180 Beugungsbilder bei einem Oszillationswinkel von 1° mit einem MarMosaic225-CCD-Detektor (Rayonix, Evanston, USA) aufgenommen. Dagegen wurden für Kristalle der IL-10-Variante N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y 1900 Beugungsbilder bei einem Oszillationswinkel von 0,1° mit einem PILATUS6M-Detektor (Dectris Ltd., Baden, Schweiz) aufgenommen. Die Datenintegration, Skalierung der Reflexintensitäten und Umwandlung in Strukturfaktoramplituden erfolgten mit dem Programmen iMOSFLM [228, 229], XDS [230, 231] und SCALA [232]. Bestimmung der Strukturfaktorphasen und Lösung der Kristallstruktur erfolgte für beide IL-10-Kristallformen durch molekularen Ersatz unter Verwendung des Programms MOLREP [233]. Als Suchmodell wurde die Struktur eines künstlich veränderten, humanen IL-10-Monomers (PDB # 1LK3) verwendet [96, 97]. Ausgehend davon wurde das Strukturmodell von IL-10 mit dem Programm COOT [234] gebaut und mit REFMAC5 [235] oder mit BUSTER [236, 237, 238] sukzessiv verfeinert.

3.7. Bestimmung der GAG-Bindungsstelle von murinem IL-10 durch NMR

3.7.1. Messung der NH-chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats

Die Position der GAG-Bindungsstelle und die Affinität der GAG-Bindung wurden anhand der Änderung der NH-chemischen Verschiebungen von IL-10 detektiert. Zu 0,5 - 1 mM 75% deuteriertem, vollständig ^{15}N -markiertem IL-10 in 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 6,2), 50 mM NaCl, 90%/10% (v/v) $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ wurden aufsteigende Mengen von GAGs im selben Puffer titriert. Für jeden Titrationsschritt wurde ein $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationspektrum (siehe Abschnitt 3.3.3) bei 30 °C aufgenommen. Die mittlere Änderung der chemischen

3. Methoden

Verschiebung der Amidgruppe wurde aus der Änderung des H_N - ($\Delta\delta_H$) und N_H -Signals ($\Delta\delta_N$) berechnet [239]:

$$\Delta\delta_{NH} = \sqrt{(\Delta\delta_H)^2 + (0,2 \times \Delta\delta_N)^2} \quad (3.5)$$

Die Wichtung von $\Delta\delta_N$ mit dem Faktor 0,2 ist empirisch und wird auf die Beobachtung zurückgeführt, dass die Signaldispersion in der ^{15}N -Dimension für die NH-Signale der Peptidgruppe etwa fünfmal größer ist als in der 1H -Dimension.

3.7.2. Bestimmung der GAG-Bindungsstelle mit PCSs

3.7.2.1. Modifizierung von IL-10 mit einem *Lanthanide Binding Tag* (LBT)

Lanthanoidionen wurden mit Hilfe eines 17 Aminosäuren langen Peptid-*Tags* (*lanthanide binding tag*, LBT) an den C-Terminus von IL-10 immobilisiert. Die LBT-Aminosäuresequenz betrug: YIDTNNDGWYEGDELLA und leitete sich von einem EF-Hand-Motiv des Proteins Troponin C ab [174]. Es wurden keine zusätzlichen *Linker*-Aminosäuren hinter die IL-10-Sequenz eingefügt, um eine Erhöhung der Flexibilität des LBT-Peptids, die zur Ausmittlung der beobachteten paramagnetischen NMR-Effekte (PCSs, RDCs) führen könnte, zu verhindern. Aufgrund der geringen Größe des LBT-Peptids wurde nur eine minimale Störung auf die Struktur von IL-10 erwartet. Um den C-Terminus des Proteins nicht weiter zu verlängern, wurde zum Zweck der Proteinreinigung mittels Liganden-Affinitätschromatographie stattdessen ein N-terminaler StrepII-*Tag* verwendet. Dieser hatte eine minimale Länge von acht Aminosäuren (WSHPQFEK).

Durch drei aufeinanderfolgende PCR-Runden wurden die für den StrepII- und LBT-*Tag* kodierenden DNA-Sequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende des PCR-Produktes schrittweise verlängert und somit in das *il-10*-Gen eingebaut. Tabelle 3.5 fasst die dafür verwendeten Oligonukleotid-Primer zusammen. Zusammensetzung und Temperaturprofil der PCR entsprachen derjenigen zur Amplifizierung von Wildtyp IL-10-cDNA (vgl. Abschnitt 3.2.1). Allerdings wurde als Temperatur für den Hybridisierungsschritt der Mittelwert aus den Schmelztemperaturen von *Forward*- und *Reverse*-Primer des jeweiligen PCR-Schrittes verwendet. Die Primer, die im letzten Schritt benutzt wurden, enthielten wiederum entweder eine *NdeI*- oder *XhoI*-Schnittstelle, mit deren Hilfe das PCR-Produkt in einen pET-41b(+)-Vektor eingefügt wurde. Primer 3 LBT enthielt zusätzlich ein Stop-Codon, um die Expression des vektoreigenen His8-*Tags* zu verhindern. Expression von StrepII/LBT-IL-10 in *E. coli* RosettaTM(DE3) und Rückfaltung des Proteins aus *E. coli*-Einschlusskörpern erfolgten wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Die Reinigung des Proteins wurde mit Hilfe einer StrepTactin-Sepharose-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Das Protein wurde dreimal gegen das 100-fache Volumen an 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA dialysiert und unter einer Flussrate von 2 mL/min auf die im gleichen Puffer äquilibrierte StrepTactin-Säule aufgetragen. Elution von StrepII/LBT-IL-10 erfolgte mit 2,5 mM *d*-Desthiobiotin im Bindungspuffer. Da die Bindungskapazität der StrepTactin-Säule nur ca. 6 mg Protein je 1 mL Säulenvolumen beträgt, musste das Protein mehrfach aufgetragen und nach jeder Reinigung die Säule mit 1 mM 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure (HABA) regeneriert werden. Die Abtrennung des dimeren Proteins vom Monomer oder Aggregaten, die während der Proteinrückfaltung entstehen, erfolgte durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe einer Sephacryl-S-

Tabelle 3.5.: Reaktionsschritte und PCR-Primer zur Konstruktion einer N-terminal StrepII- und C-terminal LBT-markierten IL-10-Variante. Die IL-10-cDNA trug zusätzlich die C149Y-Mutation.

Schritt	Bezeichnung	Sequenz	Typ	T_m (°C)
PCR 1	Primer 1 StrepII	5'-GTGGAGCCACCCGCAGTTCG- AAAAAAGCAGGGGCCAGTACA- GCCG-3'	<i>for</i> ^a	73
	Primer 1 LBT	5'-CAGCCATCGTTGTTGGTATC- AATATAGCTTTTCATTTTGATC- ATCATGTATGC-3'	<i>rev</i> ^b	69
PCR 2	Primer 2 StrepII	5'-GATATACATATGTGGAGCCA- CCCGCAGTTCG-3'	<i>for</i>	63
	Primer 2 LBT	5'-CGCCAGCAGTTCATCGCCTT- CATACCAGCCATCGTTGTTGGT- ATCAATATAGC-3'	<i>rev</i>	74
PCR 3	Primer 2 StrepII	5'-GATATACATATGTGGAGCCA- CCCGCAGTTCG-3'	<i>for</i>	63
	Primer 3 LBT	5'-ATATACTCGAGTTACGCCAG- CAGTTCATCGCCTTC-3'	<i>rev</i>	68

^aforward; ^breverse

200-HR-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) (vgl. Abschnitt 3.2.1).

Zur Vereinfachung der Analyse der vom Lanthanoidion hervorgerufenen Effekte wurde eine IL-10-Dimer-Variante mit nur einer Lanthanoidionenbindungsstelle hergestellt. Dieses "gemischte" Dimer bestand aus einem Monomer mit StrepII- und LBT-*Tag* und einem zweiten Monomer mit C-terminalem His8-*Tag*, aber ohne LBT. Durch Mischen von beiden, aus *E. coli*-Einschlusskörpern solubilisierten IL-10-Varianten im äquimolaren Verhältnis und anschließender Rückfaltung in wässrigem Puffer (vgl. Abschnitt 3.2.1 auf Seite 44) wurde die Bildung des "gemischten" Dimers induziert. Da die Dimerbildung durch Interkalation beider monomeren Proteine ein statistischer Prozess ist, entstehen daneben zu je einem Viertel Varianten mit zwei gleichen Untereinheiten - entweder ohne oder mit zwei Lanthanoidionenbindungsstellen (LBT-Peptiden). Diese konnten allerdings durch eine anschließende duale Reinigungsstrategie mit (1) Ni²⁺-Affinitätschromatographie (IMAC) (Durchführung vgl. Abschnitt 3.2.1 auf Seite 44) und (2) StrepII-StrepTactin-Affinitätschromatographie abgetrennt werden, da nur das "gemischte" Dimer sowohl einen His8- als auch einen StrepII-*Tag* trug.

Für NMR-Experimente wurde ²H/¹⁵N-markiertes IL-10 hergestellt (Abschnitt 3.2.3). Das "gemischte" IL-10-Dimer bestand aus ²H-markiertem StrepII/LBT-IL-10 und ²H/¹⁵N-markiertem IL-10 mit His8-*Tag*. IL-10-Proben wurden für NMR-Messungen in 10 mM HEPES (pH 7,2), 50 mM NaCl, 90%/10% (v/v) H₂O/D₂O vorbereitet und durch Ultrafiltration mit Hilfe einer Amicon[®]-Rührzelle (Amicon Inc., Beverly, USA) und unter

3. Methoden

Verwendung einer Filtermembran aus regenerierter Zellulose (NMGG = 10 kDa) (Merck Millipore, Billerica, USA) auf eine Konzentration von 1 - 2 mM eingengt.

3.7.2.2. Messung der Lanthanoidionenbindung durch Fluoreszenzspektroskopie

Die Bindungsaffinität des LBT-Peptids für Tb³⁺-Ionen wurde mittels fluoreszenzspektroskopischer Methoden und unter Verwendung eines FluoroMax-2-Spektrometers (ISA Jobin Yvon SPEX, Edison, USA) untersucht. Hierzu wurde ein Tryptophan-Rest im LBT-Peptid genutzt. Der Anteil an gebundenem Tb³⁺ konnte durch zwei Vorgehensweisen bestimmt werden: (1) unter Ausnutzung des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET) zwischen Tryptophan und Tb³⁺ durch Messung der Fluoreszenzemission von Tb³⁺ bei einer Wellenlänge von 543 nm und (2) durch Messung der Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums von Tryptophan in Gegenwart von Tb³⁺.

Zu 1 µM LBT-IL-10-Dimer (entspricht einer Monomer-Konzentration von 2 µM) in 10 mM HEPES (pH 7,2), 50 mM NaCl wurde Tb³⁺ im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 20 µM titriert. Nach Anregung der Tryptophan-Fluoreszenz bei 280 nm wurden Emissionsspektren bei einer Temperatur von 25 °C im Bereich von 300 bis 470 nm und von 500 bis 560 nm mit einem Inkrement von 1 nm, einer Scan-Rate von 60 nm/min und einer Integrationszeit von 0,3 s aufgenommen. Es wurden jeweils drei Spektren gemittelt und um das Hintergrundsignal (Tb³⁺ in Puffer ohne Protein) korrigiert. Im Tb³⁺-Emissionsspektrum wurden die Signalhöhe bei 543 nm sowie das Integral des Fluoreszenzsignals in den Grenzen von 536 bis 555 nm ausgewertet. Zur genauen Bestimmung des Fluoreszenzmaximums im Tryptophan-Spektrum wurde dieses an eine logarithmische Normalverteilung angepasst:

$$I(\lambda) = I_{\max} \exp \left[-\frac{\ln 2}{\ln^2 p} \ln^2 \left(1 + \frac{(\lambda - \lambda_{\max})(p^2 - 1)}{p\Gamma} \right) \right] \quad (3.6)$$

Hierbei bedeuten I_{\max} die maximale Intensität bei der Wellenlänge λ_{\max} , Γ die spektrale Breite bei halber Höhe und p eine Asymmetrieparameter. Die Dissoziationskonstante der Tb³⁺-Bindung wurde durch Auftragung der Tb³⁺-Fluoreszenzintensität bei 543 nm oder des Tryptophan-Fluoreszenzmaximums λ_{\max} gegen die Tb³⁺-Konzentration und Anpassung der Messwerte an ein 1:1-Bindungsmodell (Gleichung (3.3)) erhalten.

3.7.2.3. Detektion von PCSs und Bestimmung des $\Delta\chi$ -Tensors

Um sicherzustellen, dass das LBT-Peptid die Struktur von IL-10 nicht signifikant veränderte, wurden ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren der "gemischten" Dimer-Variante von IL-10 sowie von LBT-IL-10 mit zwei Lanthanoidionenbindungsstellen aber in Abwesenheit von Lanthanoidionen aufgenommen. Da NMR-Spektren des LBT-markierten IL-10 aus Stabilitätsgründen bei einem pH-Wert von 7,2 gemessen wurden, die Zuordnung der IL-10-Signale allerdings bei pH 6,2 erfolgte, wurde eine Titration von ²H/¹⁵N-markiertem IL-10 ohne LBT in diesem pH-Bereich in Schritten von 0,2 durchgeführt. Signalverschiebungen wurden dabei nur für wenige Aminosäurereste am N- und C-Terminus beobachtet, die allerdings anhand des Titrationsverlaufs leicht im Spektrum bei pH 7,2 identifiziert werden konnten. Keine Signalzuordnung erfolgte für die Aminosäurereste des StrepII- und LBT-*Tags*, die deshalb bei der Analyse der PCS-Daten nicht verwendet wurden. Außerdem wurden in Gegenwart von paramagnetischen Lanthanoidionen die Signale des LBT-Peptids (und

teilweise auch des StrepII-*Tags*) durch paramagnetische Relaxationsverstärkung (PRE) bis unterhalb der Detektionsgrenze verbreitert und waren im Spektrum nicht mehr vorhanden – so erkennbar z. B. an zwei Tryptophan-Indol-Signalen, die Teil der StrepII- und LBT-Aminosäuresequenz waren.

Für PCS-Messungen wurden Proben durch die schrittweise Zugabe von insgesamt 10 Aliquots an Lanthanoidionen zu IL-10 im selben Puffer (10 mM HEPES (pH 7,2), 50 mM NaCl, 90%/10% (v/v) H₂O/D₂O) unter Rühren bis zu einem finalen Verhältnis von 1:1 vorbereitet. ¹H/¹⁵N-Spektren wurden mit einem HSQC-Experiment (vgl. Abschnitt 3.3.3) mit 128 - 256 Scans pro Experiment und 128 Inkrementen in der indirekten Dimension bei 30 °C aufgenommen. PCS-Werte für Lanthanoidionen Tb³⁺, Tm³⁺ und Dy³⁺ wurden aus der Verschiebung der Amidsignale entlang diagonaler Linien im ¹H/¹⁵N-Spektrum bestimmt. Als diamagnetische Referenz wurde Lu³⁺ verwendet, da es einen ähnlichen Ionenradius wie die anderen Lanthanoidionen aufweist und daher keine strukturellen Unterschiede der Metallionenbindungsstelle, insbesondere in der Position der koordinierenden Aminosäuren, erwartet wurden. Die Position der Lanthanoidionen und ihre $\Delta\chi$ -Tensoren wurden aus den PCS-Werten und den Atomkoordinaten der H_N- und N_H-Rückgratotope von IL-10 mit dem Programm Numbat [240] auf Grundlage folgender Gleichung:

$$\Delta\delta^{\text{PCS}} = \frac{1}{12\pi r^3} \left[\Delta\chi_{\text{ax}} (3 \cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{2} \Delta\chi_{\text{rh}} \sin^2 \theta \cos 2\varphi \right] \quad (3.7)$$

bestimmt. Dabei ist $\Delta\delta^{\text{PCS}}$ der *Pseudocontact Shift*. r , θ und φ sind die Polarkoordinaten des ¹H_N bzw. ¹⁵N_H-Kerns im Hauptachsensystem des anisotropen magnetischen Suszeptibilitätstensors des Lanthanoidions und $\Delta\chi_{\text{ax}}$ und $\Delta\chi_{\text{rh}}$ sind die axiale und rhombische Tensorkomponente. Die Atomkoordinaten der Röntgenkristallstruktur von murinem IL-10 NΔ8, C149Y (PDB # 4X51) wurden für die Tensorbestimmung verwendet: im Fall von “gemischtem” LBT-IL-10 nur das Modell einer Proteinkette und im Fall von “symmetrischem” LBT-IL-10 mit zwei Lanthanoidionenbindungsstellen das Modell mit beiden Monomeren. Im zweiten Fall wurde das Dimer als Ensemble aus zwei Strukturen betrachtet und der $\Delta\chi$ -Tensor für ein paramagnetisches Zentrum durch Mittelung über beide Strukturen bestimmt.

Die Position und der Bindungsmodus des GAG-Liganden wurde am Beispiel von Heparin untersucht und PCS-Werte wurden für das Heparin-Tetrasaccharid ($\Delta\text{UA}, 2\text{S}(1\rightarrow4)\text{-GlcNS}, 6\text{S}(1\rightarrow4)\text{IdoA}, 2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS}, 6\text{S}$) gemessen. Seine geringe Affinität ($K_{\text{D}} = 298 \pm 42 \mu\text{M}$; siehe Abschnitt 4.2.2) weist auf einen schnellen Austausch hin und die gemessenen PCS-Werte stellen somit ein Mittel über den freien und gebundenen Zustand dar. Gegen die Messung bei einem geringen Ligand-Protein-Verhältnis, bei dem der Ligand im zeitlichen Mittel dauerhaft gebunden wäre, sprach die geringe Sensitivität der Ligandensignale unter diesen Bedingungen, da keine zusätzliche Isotopenmarkierung vorlag und der Ligand nicht von Proteinsignalen hätte unterschieden werden können. Aufgrund der guten Signaldispersion im ¹H/¹³C-Korrelationsspektrum von Heparin, das eine einfachere Signalzuordnung im Vergleich zu ¹H-Spektren erlaubte, wurden HSQC-Experimente (vgl. Abschnitt 3.3.2) für die Messung von PCS-Werten verwendet. Proben wurden in 99,8% D₂O mit 10 mM vollständig ²H-markiertem HEPES (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, USA) (pH 7,2) und 50 mM NaCl vorbereitet. Es wurde ein Ligand-Protein-Verhältnis von 4:1 gewählt, bei dem die Störung durch Hintergrundsignale des Proteins

3. Methoden

(z. B. durch langsam relaxierende Methylgruppen) noch gering war. Der dabei gemessene PCS-Wert, $\Delta\delta^{\text{PCS}}$, wurde um den Anteil an gebundenem Ligand korrigiert und der PCS bei vollständiger Bindung extrapoliert:

$$\text{PCS}_{\text{gebunden}} = \Delta\delta^{\text{PCS}} \times \left(\frac{2 [\text{L}]}{[\text{L}] + [\text{P}] + K_{\text{D}} - \sqrt{([\text{L}] + [\text{P}] + K_{\text{D}})^2 - 4 [\text{L}] [\text{P}]}} \right) \quad (3.8)$$

Dabei sind $[\text{P}]$ und $[\text{L}]$ die molaren Konzentrationen von IL-10 und Heparin und K_{D} ist die Dissoziationskonstante des Komplexes.

3.7.2.4. PCS-basierte Strukturberechnung des IL-10-Heparin-Komplexes mit Xplor-NIH

Auf Grundlage der PCS-Informationen wurden *Docking*-Berechnungen mit dem Programm Xplor-NIH [183, 241] durchgeführt, um ein Modell für den IL-10-Heparin-Komplex zu erzeugen. Aus der Bestimmung des $\Delta\chi$ -Tensors wurden die Positionen der Lanthanoiden erhalten und ihr gemeinsamer Schwerpunkt als Metallbindungsstelle im Molekülkoordinatensystem von IL-10 innerhalb der Berechnungen fixiert. Weiterhin waren die Proteinkoordinaten unverändert, während der Heparinligand als rigider Körper frei verschiebbar und rotierbar war. Die glykosidischen Bindungen zwischen den einzelnen Monosaccharidringen wurden ebenfalls frei rotierbar gehalten. Die Berechnungen umfassten ein *Simulated Annealing*-Protokoll mit einer MD-Simulation im Torsionswinkelraum. Nach einem initialen MD-Schritt bei 3500 K für 1 ns erfolgte eine simulierte Abkühlung auf 25 K in 12,5 K Schritten mit je 2 ps Länge und eine finale Powell-Minimierung mit internen und kartesischen Koordinaten. Die Orientierung sowie die axiale und rhombische Komponente des $\Delta\chi$ -Tensors wurden mit dem RDC-Modul von Xplor-NIH neu berechnet und bei jedem Temperaturschritt evaluiert. Skalierungsfaktoren für das PCS-Potential sowie für Potentialterme der Molekülgeometrie (Bindungslänge, Bindungs- und Diederwinkel) wurden während des *Annealing*-Schrittes linear gesteigert. Für die Berechnung nicht kovalenter Interaktionen wurden eine verkürzte Van-der-Waals-Funktion mit einer Grenze bei 8.5 Å und eine verschobene Coulomb-Funktion mit einer relativen Dielektrizitätskonstante für Wasser von 73 verwendet. Heparin-Startstrukturen wurden aus der NMR/MD-Struktur eines Heparin-Dodekasaccharids (PDB # 1HPN) [24] erzeugt und dabei der interne Iduronsäurering entweder in der ${}^1\text{C}_4$ - oder ${}^2\text{S}_\text{O}$ -Konformation gebaut. Molekülgeometrie- und Kraftfeldparameter für das Heparin-Tetrasaccharid wurden mit dem HIC-Up (engl. *hetero compound information centre Uppsala*)-Server (http://xray.bmc.uu.se/cgi-bin/gerard/hicup_server.pl) [242] erzeugt. Pro *Docking*-Berechnung wurden 100 Modelle des IL-10-Heparin-Komplexes erzeugt und anhand der PCS-Energie und der Anzahl an Messwertverletzungen außerhalb eines Toleranzintervalls von $\pm 0,1$ ppm evaluiert. Da die Korrektur des gemessenen $\Delta\delta^{\text{PCS}}$ -Wertes um den Anteil an gebundenem Ligand eine Fehlerquelle darstellte, wurden Berechnungen auch mit anderen hypothetischen Ligand-Protein-Verhältnissen von 3:1 bis 5:1 ausprobiert, mit aber nur geringem Einfluss auf die Positionierung des Liganden, wie die $1/r^3$ -Abstandsabhängigkeit des PCS nahelegt. Das Xplor-NIH-Eingabeprotokoll für die Berechnung mit PCSs ist im Anhang (Abschnitt A.5) enthalten. Die Übereinstimmung zwischen den expe-

rimentellen (PCS_{obs}) und den aus dem Strukturmodell berechneten PCS-Werten (PCS_{calc}) wurde mit dem PCS-Q-Faktor bewertet:

$$Q_{\text{PCS}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (PCS_{\text{obs},i} - PCS_{\text{calc},i})^2}{\sum_{i=1}^N (PCS_{\text{obs},i})^2}} \quad (3.9)$$

3.7.3. Detektion der GAG-Bindungsstelle mit einem spinmarkierten GAG

Die Lage der GAG-Bindungsstelle in IL-10 wurde mit Hilfe einer Metallionenmarkierung des GAGs (d. h. einem *Spinlabel*) und anhand der induzierten PRE-Effekte untersucht.

3.7.3.1. Synthese und Charakterisierung des EDTA-markierten, persulfatierten HA-Tetrasaccharids

Das EDTA-markierte, persulfatierte HA-Tetrasaccharid (psHA-EDTA) wurde von Sebastian Köhling (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jörg Rademann, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin) hergestellt und ist in Abbildung 3.9 gezeigt. Der EDTA-Chelator war dabei über einen Triazol-Amid-*Linker* an das reduzierende Zuckerende gebunden.

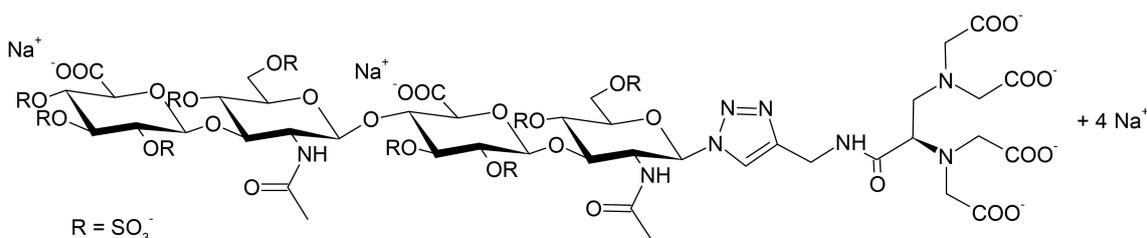


Abbildung 3.9.: Chemische Struktur des EDTA-markierten, persulfatierten HA-Tetrasaccharids (psHA-EDTA).

Die ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen von psHA-EDTA wurden mit Hilfe von 1D- ^1H - und ^{13}C -Experimenten, 2D-COSY, TOCSY, HSQC- und HMBC-Experimenten (vgl. Abschnitt 3.3) sowie mit einem 3D-HSQC-TOCSY-Experiment partiell zugeordnet. Die Metallionenbindungskapazität wurde mit einem Eisen(III)-Thiocyanat-Test überprüft. Da die Stabilitätskonstante des Fe(III)-EDTA-Komplexes ($1,3 \times 10^{25} \text{ L mol}^{-1}$ für voll deprotoniertes EDTA bei $\text{pH} \geq 13$ bzw. $6,3 \times 10^{21} \text{ L mol}^{-1}$ bei $\text{pH} = 7$ [243]) größer ist als jene von $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ ($1,1 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ [244]) wird Eisen(III) in Gegenwart von EDTA aus dem roten $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ -Komplex verdrängt und eine Abnahme der Absorption bei 455 nm ist zu beobachten.

3.7.3.2. Messung der Amidprotonen- R_2 -Relaxationsrate

Um den psHA-EDTA-Ligand vollständig mit dem paramagnetischen bzw. diamagnetischen Ion zu besetzen, wurden 1,1 Äquivalente an MnCl_2 oder CuCl_2 bzw. an CaCl_2 in 10 mM MES (pH 6,2), 50 mM NaCl zugesetzt. Freie Metallionen wurden durch Dialyse gegen einen Puffer mit hoher Ionenstärke (10 mM MES (pH 6,2), 500 mM NaCl) und anschließend gegen 10 mM MES (pH 6,2), 50 mM NaCl wieder entfernt. Dafür wurde eine Zellulosemischester-Membran mit einer Molekulargewichtsgrenze von 1000 Da (Spectrum

3. Methoden

Laboratories Inc., Los Angeles, USA) verwendet. Um sicherzustellen, dass der EDTA-*Spinlabel* die IL-10-GAG-Bindung nicht störte, wurde psHA-EDTA zu ^2H , ^{15}N -markiertem IL-10 titriert und schrittweise $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des Proteins aufgenommen (vgl. Abschnitt 3.7.1). Da Änderungen der $^1\text{H}_\text{N}$ - und $^{15}\text{N}_\text{H}$ -chemischen Verschiebungen an gleichen Positionen in der IL-10-Sequenz wie für andere GAGs erfolgten und ihr Sättigungsbereich in einem ähnlichen Konzentrationsbereich lag, wurde geschlussfolgert, dass der EDTA-*Spinlabel* keinen störenden Einfluss auf die GAG-Bindung hatte und der spin-markierte Zucker die gleiche Bindungsstelle besetzte.

NMR-Experimente zur Messung der T_2 -Relaxationszeit der H_N -Protonen von IL-10 wurden mit der in Abbildung 3.10 gezeigten Pulssequenz bei 30 °C und einer Magnetfeldstärke von 600 MHz durchgeführt. Die Spinecho-Sequenz zur Bestimmung von T_2

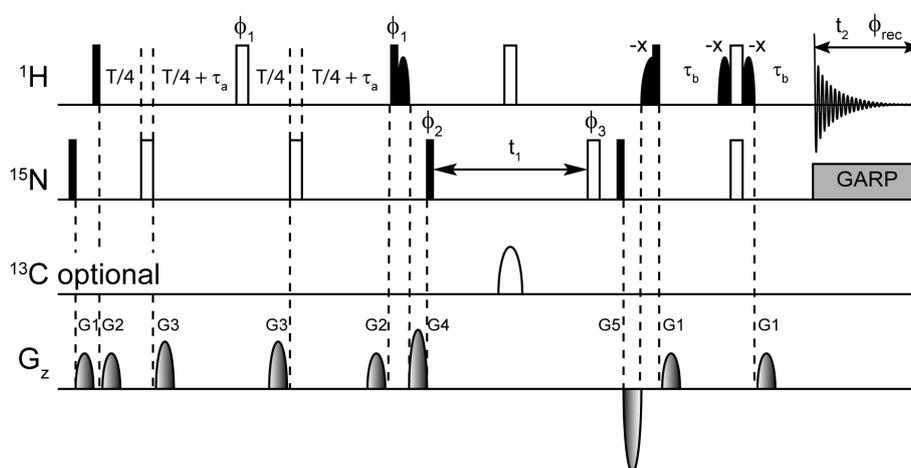


Abbildung 3.10.: Pulssequenz des verwendeten $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiments zur Messung von H_N - T_2 -Zeiten nach [245]. Spektren wurden ineinander verschachtelt aufgenommen mit Spinecho-Zeiten T von 0 bis 25 ms. Schwarze schmale Balken entsprechen 90° -Hartpulsen, weiße breite Balken 180° -Hartpulsen und graue Rechtecke Pulszügen. Parabelflächen stellen geformte Pulse oder Gradienten dar. Die Trägerfrequenz der ^1H -, ^{15}N - und ^{13}C -RF-Pulse lag bei 4,7 ppm, 116 ppm und 100 ppm. Wenn Proteinproben zusätzlich ^{13}C -markiert waren, wurde ein 180° adiabatischer Chirp-Puls mit 500 μs Länge und 60 kHz Anregungsbreite verwendet, um während der ^{15}N -Evolutionszeit die Entwicklung der ^{15}N - ^{13}C -Kopplung zu verhindern. Gradientenpulse hatten die Länge 450 μs (G1), 400 μs (G2 und G3), 2,5 ms (G4) und 1 ms (G5). Die Transferzeit des INEPT-Schrittes wurde auf $\tau_a = 2,72$ ms bzw. $\tau_b = 2,25$ ms festgelegt. Die Spinecho-Periode wurde in den ersten INEPT-Schritt integriert. Während der Transferzeit $T + 2\tau_a$ tauschen ^{15}N - 180° -Pulse die langsam und schnell relaxierende Komponente der transversalen Magnetisierung (repräsentiert durch die Operatoren $H_y - 2H_yN_z$ und $H_y + 2H_yN_z$), sodass ihre Beiträge zur gemessenen transversalen Relaxationszeit gleich sind. Wasserunterdrückung wurde durch eine WATERGATE-Sequenz sowie mit Hilfe von selektiven 1 ms langen Sinc- und Halbgauß-Pulsen am Ende des ersten bzw. zu Beginn des zweiten INEPT-Schrittes, welche die Magnetisierung der Wasserprotonen entlang der $+z$ -Achse ausgerichtet halten, erreicht. Der Phasenzyklus war $\phi_1 = \{2(y), 2(-y)\}$, $\phi_2 = \{x, -x\}$, $\phi_3 = \{x, x, -x, -x, y, y, -y, -y\}$ und $\phi_{\text{rec}} = \{x, -x, -x, x, -x, x, x, -x\}$. Alle anderen Pulse hatten entweder die Phase x oder eine andere über dem Puls angegebene Phase. Quadraturdetektion in der indirekten Dimension erfolgte mittels States-TPPI, wobei pro t_1 -Schritt zwei Experimente mit um $\pi/2$ verschobener Phase ϕ_2 aufgenommen wurden und in jedem neuen t_1 -Inkrement die Phasen ϕ_2 und ϕ_{rec} um π verändert wurden. Während der Aufnahme erfolgte ^{15}N -Entkopplung mittels GARP bei einer Entkopplerstärke von 1040 Hz.

war dabei in die erste INEPT-Periode integriert. Zwei ^{15}N -180°-Pulse tauschen dort die langsam und schnell relaxierende Komponente der transversalen Protonenmagnetisierung (repräsentiert durch die Operatoren $H_y - 2H_y N_z$ und $H_y + 2H_y N_z$), sodass ihre Beiträge zur gemessenen transversalen Relaxationszeit gleich sind. Das Experiment wurde als Pseudo-3D-Version ausgeführt und einzelne HSQC-Spektren ineinander verschachtelt aufgenommen, um auszuschließen, dass Probenveränderungen während des Experimentes Einfluss auf die Signalintensität nehmen. Diese wurden anhand der Peakintegrale ausgewertet. Bei wenigen überlappenden Peaks wurde eine Linienformanalyse durchgeführt, um das Integral zu bestimmen. Wenn mehrere Peaks miteinander überlappten, konnten die einzelnen Integrale dagegen nicht mehr genau bestimmt werden und diese Signale wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die T_2 -Zeit wurde durch Anpassung des Signalabfalls an eine Exponentialfunktion bestimmt:

$$S(t) = a + b \times \exp(-t/T_{2,\text{obs}}) \quad (3.10)$$

Im Fall von Mn^{2+} wurden T_2 -Messungen in Gegenwart von nur 7 mol% *Spinlabel* durchgeführt, da bei höherer Ligandkonzentration Proteinsignale gelöscht wurden und ab 50 mol% kein Spektrum mehr aufgenommen werden konnte. Die paramagnetische R_2 -Relaxationsrate für den gebundenen Zustand wurde daher aus Kenntnis des Anteils an ligandgebundenem Protein extrapoliert. Im Fall einer schnellen Dissoziation des Liganden gilt nämlich für die transversale R_2 -Relaxationsrate näherungsweise [246, 247]:

$$R_{2,\text{obs}} = (1/T_{2,\text{obs}}) = (1 - p_b) \times R_{2,\text{frei}} + p_b \times R_{2,\text{gebunden}} + p_b \times R_{2,\text{para}} + R_{2,\text{ex}} \quad (3.11)$$

wobei $R_{2,\text{frei}}$ und $R_{2,\text{gebunden}}$ die transversale Relaxationsrate im freien und ligandgebundenem Zustand sind. $R_{2,\text{para}}$ (bzw. Γ_2) ist die paramagnetische Relaxationsverstärkung und $R_{2,\text{ex}}$ berücksichtigt den Beitrag des chemischen Austauschs. Jener ist jedoch im Fall eines schnellen Austauschs, wie für das IL-10-GAG-System, klein und kann deshalb vernachlässigt werden. Der gebundene Anteil p_b kann auf Grundlage eines 1:1-Bindungsmodells aus der Kenntnis der Dissoziationskonstante und der totalen Protein- und Ligandkonzentration abgeschätzt werden:

$$p_b = \frac{[\text{L}] + [\text{P}] + K_D - \sqrt{([\text{L}] + [\text{P}] + K_D)^2 - 4[\text{L}][\text{P}]}}{2[\text{P}]} \quad (3.12)$$

Im Fall von Cu^{2+} war die paramagnetische Relaxationsverstärkung geringer als für Mn^{2+} und T_2 -Messungen wurden bei einem zweifachen Überschuss des Liganden durchgeführt. Unter diesen Bedingungen betrug der ligandgebundene Proteinanteil trotzdem nur ~50% und Γ_2 -Raten mussten ebenfalls darum korrigiert werden.

3.7.3.3. Berechnung der Metallionenbindungsstelle aus PRE-Daten mit Xplor-NIH

Anhand der für die H_N -Protonen bestimmten paramagnetischen R_2 -Relaxationsraten (Γ_2) wurde die Position des Metallions im pSHA-EDTA-Ligand mit dem Programm Xplor-NIH [183, 241] berechnet. Hierfür wurde das PRE-Modul von Xplor-NIH [248, 249] verwen-

3. Methoden

det, dem die Solomon-Bloembergen-Gleichungen [250] zugrunde liegen. Demnach ist der paramagnetische Beitrag zur T_2 -Relaxation:

$$\Gamma_2 = \frac{1}{T_{2,p}} = \frac{1}{15} \frac{S(S+1)\gamma^2 \cdot g^2 \cdot \beta^2}{r^6} \left(4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \cdot \tau_c^2} + \frac{13\tau_c}{1 + \omega_S^2 \cdot \tau_c^2} \right) \quad (3.13)$$

wobei S die Spinquantenzahl des Elektrons, g der elektronische g-Faktor, β das Bohrsche Magneton, ω_I und ω_S die Lamorfrequenz des Kern- bzw. Elektronenspins, r der Abstand zwischen Kern und freiem Elektron und τ_c die Korrelationszeit der dipolaren Wechselwirkung zwischen beiden ist. Letztere ist gegeben durch die Rotationskorrelationszeit τ_r des molekularen Komplexes und der Elektronenspinrelaxationszeit τ_S :

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_S} \quad (3.14)$$

Die Rotationskorrelationszeit des molekularen Komplexes wurde vereinfacht aus der Molekülmasse abgeschätzt, wonach 2,6 kDa ungefähr 1 ns entsprechen. Demnach betrug τ_r für IL-10 und psHA-EDTA ca. 18 ns. Im Fall von paramagnetischen Metallionen liefert τ_S auch einen entscheidenden Beitrag zur Korrelationszeit. Aus diesem Grund wurde τ_c während der Berechnung innerhalb der Grenzen zwischen 10 bis 36 ns optimiert. Beide PRE-Datensätze (Mn^{2+} und Cu^{2+}) wurden in einer Berechnung kombiniert. Die Spinquantenzahl für Mn^{2+} und Cu^{2+} betrug 5/2 bzw. 1/2 und ihr elektronischer g-Faktor 1,993 bzw. 2,20.

Es wurde eine *Simulated Annealing*-Berechnung durchgeführt. Jene bestand aus einem MD-Schritt für 800 ps bei 3000 K, einer simulierten Abkühlung auf 25 K in 12,5 K Intervallen mit je 2 ps Länge und aus einer finalen Powell-Minimierung mit internen und kartesischen Koordinaten. Skalierungsfaktoren für das PRE-Potential sowie für Potentialterme der Molekülgeometrie (Bindungslänge, Bindungs- und Diederwinkel) wurden während des *Annealing*-Schrittes linear gesteigert. Es wurden zwei Metallionen innerhalb der Berechnung vorgegeben, weil IL-10 ein rotationssymmetrisches Dimer ist und zwei gleiche Ligandenbindungsstellen aufweist. Γ_2 -Raten wurden als Summe über beide Metallionpositionen berechnet. Die Proteinkoordinaten, mit Ausnahme der Aminosäurereste am N- und C-Terminus, wurden in der Berechnung fixiert, während beide Metallionen frei translaterbar waren. Aminosäurereste 3 - 18 und 159 - 163, die in der Kristallstruktur von murinem IL-10 nicht vorhanden waren, aber für die eine NMR-Zuordnung und entsprechende Γ_2 -Messwerte vorlagen, wurden mit COOT (<http://www.yasbl.york.ac.uk/~emsley/coot>) [234] manuell an die Struktur angefügt. Diese Regionen waren während des MD-Schrittes, bis auf eine vorgegebene und festgesetzte Disulfidbrücke zwischen C12 und C108, frei beweglich. TALOS+-Ordnungsparameter hatten eine hohe Mobilität der Termini vorhergesagt und die fehlende Elektronendichte im Proteinkristall legte nahe, dass dieser Teil unstrukturiert ist. Um beide Eigenschaften, also die unbekannt Struktur und die hohe Beweglichkeit, die einen hohen Einfluss auf den Γ_2 -Wert nehmen, annähernd zu repräsentieren, bestanden N- und C-Terminus aus einem Ensemble von je fünf Strukturen. Eine Ensemblemittelung von Γ_2 wurde durchgeführt. Jede einzelne Struktur war unabhängig von den anderen und es wurden keine Kräfte zwischen ihnen berechnet. Weiter wurde als nicht-kovalente Interaktion nur ein repulsives Potential, das zwischen den Proteinrückgrat-

atomen und dem Metallion bestand, verwendet. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Bestimmung der Metallionenposition nur aufgrund der experimentellen Daten erfolgte und nicht durch z. B. elektrostatische Interaktionen mit dem Protein beeinflusst wurde. Das Xplor-NIH-Eingabeprotokoll für die PRE-Berechnung ist im Anhang (Abschnitt A.5) enthalten. Die Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Γ_2 -Werten wurde mit dem PRE-Q-Faktor bewertet:

$$Q_{\text{PRE}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\Gamma_{\text{obs},i} - \Gamma_{\text{calc},i})^2}{\sum_{i=1}^N (\Gamma_{\text{obs},i})^2}} \quad (3.15)$$

4. Ergebnisse

4.1. Biochemische Herstellung von murinem IL-10

Voraussetzung für die strukturbiologischen Untersuchungen von IL-10 und seiner Wechselwirkungen mit GAGs war die Herstellung ausreichender Mengen an reinem Protein homogener Zusammensetzung sowohl hinsichtlich Sequenz als auch Struktur. Dafür wurden in dieser Arbeit zwei Herstellungsmethoden verwendet: (1) Expression von IL-10 in *E. coli* als unlösliches Protein und seine anschließende Rückfaltung aus Einschlusskörpern von *E. coli* und (2) Expression von IL-10 als lösliches Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) in *E. coli* und anschließende Freisetzung von IL-10 durch proteolytische Spaltung mit Faktor-Xa.

4.1.1. Präparation aus Einschlusskörpern von *E. coli*

Für die Expression in *E. coli* wurde ein pET-41b(+)-Vektor verwendet, in welchen das *il-10*-Gen eingebaut und vervielfältigt wurde. Abbildung 4.1 zeigt ausgewählte Ergebnisse der molekularbiologischen Arbeitsschritte. Durch PCR wurde die IL-10-cDNA amplifiziert und für die geplanten Anwendungen des IL-10-Proteins entsprechend modifiziert. So wurde zum Zweck der Proteinkristallisation der N-Terminus um acht Aminosäuren verkürzt und ein C-terminales Stop-Codon eingefügt, das die Expression des His8-*Tags*, welcher sich an die Klonierungsstelle im pET-41b(+)-Vektor anschließt, verhinderte. Weiter wurde durch PCR die cDNA für das LBT-IL-10-Protein, das in den PCS-Messungen zur Anwendung kam, hergestellt. Durch drei aufeinanderfolgende PCR-Runden mit verschiedenen Oligonukleotid-Primern (siehe Abschnitt 3.7.2.1) wurden der N- und C-Terminus um die Sequenz eines StrepII-*Tags* (WSHPQFEK) bzw. des LBT-Peptids (YIDTNNDGWYEG-DELLA) verlängert. Schließlich diente die PCR auch zum Einfügen von Punktmutationen innerhalb der regulären IL-10-Sequenz – zur Verbesserung der Proteinrückfaltung und Erhöhung der Proteinstabilität (C149Y-Mutation) oder zur Bildung bevorzugter Proteinkontakte für die Proteinkristallisation (Q32R- und T49K-Mutationen). Hierbei wurde mit PCR das gesamte Plasmid amplifiziert und DNA-Basensubstitutionen mit Hilfe definierter Oligonukleotid-Primer eingefügt. Die Korrektheit aller hergestellten IL-10-Konstrukte wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

IL-10 wurde in *E. coli* RosettaTM (DE3) durch Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C exprimiert. Unter diesen Bedingungen wurde das Protein nach Zellaufschluss ausschließlich in Einschlusskörpern und nicht in der löslichen Proteinfraction vorgefunden (Abbildung 4.2 **A** und **B**). Neben IL-10 wurden weitere Proteine mit höherem Molekulargewicht (zwischen 30 und 45 kDa) in der Einschlusskörper-Fraction gefunden, von denen es durch Rückfaltung und chromatographische Reinigung getrennt werden konnte. Abbildung 4.2 **C** und **D** sowie Abbildung 4.3 zeigen typische SDS-Polyacrylamidgele und Chromatogramme der Reinigung von IL-10. Je nach vorliegender Modifizierung und geplanter Verwen-

4. Ergebnisse

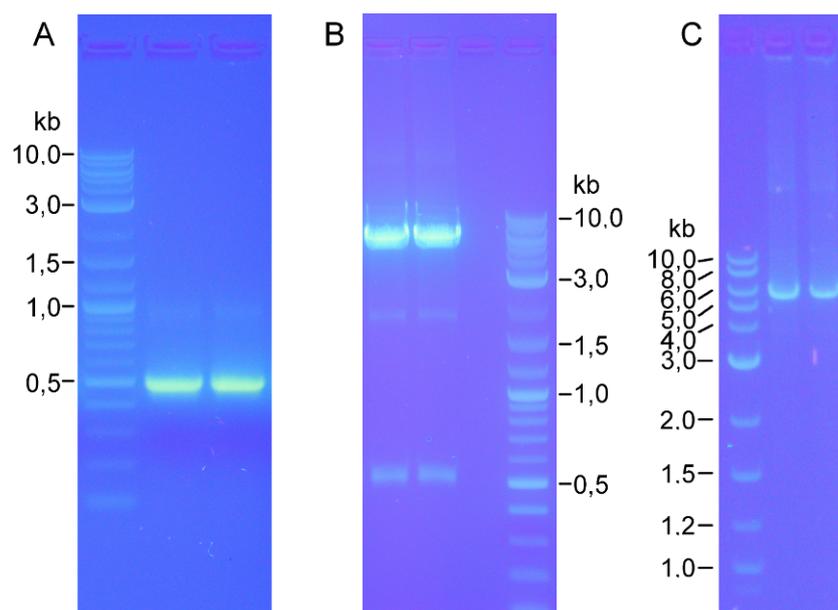


Abbildung 4.1.: Aufnahmen von Agarosegelen zum Nachweis der Klonierung von IL-10-cDNA in pET-41b(+). Agarosegelelektrophorese diente als Kontrolle der einzelnen molekularbiologischen Arbeitsschritte: **(A)** PCR zur Vervielfältigung von IL-10-cDNA und Insertion von *Nde*I- und *Xho*I-Restriktionsschnittstellen. Die Größe des IL-10-PCR-Produktes betrug 504 bp. **(B)** Restriktionsverdau des pET-41b(+)_IL-10-Plasmids als Nachweis der DNA-Ligation und Transformation in *E. coli*. **(C)** PCR zur Einführung der C149Y-Mutation. Dabei wurde das gesamte Plasmid (5,5 kb) mit Phusion[®]-DNA-Polymerase amplifiziert.

dung des Proteins kamen unterschiedliche Chromatographiemethoden zur Anwendung: (a) IMAC für die Reinigung von IL-10 mit His8-Tag, (b) Ionenaustauschchromatographie für die Reinigung von IL-10 ohne Affinitäts-Tag und (c) Ligandenaffinitätschromatographie für die Reinigung von IL-10 mit StrepII-Tag. Mit allen drei Verfahren wurde eine hohe Reinheit des Proteins erzielt. Weiterhin konnten mit Hilfe eines präparativen Chromatographiesystems große Volumina, die sich aufgrund der Probenverdünnung während der Proteinrückfaltung ergaben, gereinigt und die Proteinprobe somit für weitere Arbeitsschritte konzentriert werden. Als finaler Reinigungsschritt wurde immer eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, um Proteinaggregate und monomeres Protein vom nativen dimeren IL-10 abzutrennen. Dieser Schritt war essentiell, um eine Homogenität der Probe zu gewährleisten und konnte durch keine andere der erwähnten Chromatographiemethoden erreicht werden. Außerdem bot die Größenausschlusschromatographie auch eine Möglichkeit, den Erfolg der Proteinrückfaltung, z. B. anhand des Anteils an Aggregaten, Dimer und Monomer, zu bewerten. So fielen bei der Rückfaltung des murinen Wildtyp-Proteins von IL-10 hauptsächlich Aggregate an (Abbildung 4.3 D). Ihr Molekulargewicht wurde mit Gelfiltration auf ca. 300 kDa bestimmt. Die Ausbeute an nativem IL-10-Dimer betrug für den Wildtyp nur ca. 0,5 mg je 1 g Biofeuchtmasse. Eine Modifizierung der Bedingungen für die Proteinrückfaltung (Temperatur, initiale Proteinkonzentration, Pufferzusammensetzung) konnte keine Verbesserung der Ausbeute erbringen. Dagegen wurde durch Austausch des freien Cysteins 149 durch ein Tyrosin (C149Y-Mutation) der Anteil an Aggregaten deutlich zugunsten des Dimers reduziert (Abbildung 4.3 D). Für die IL-10

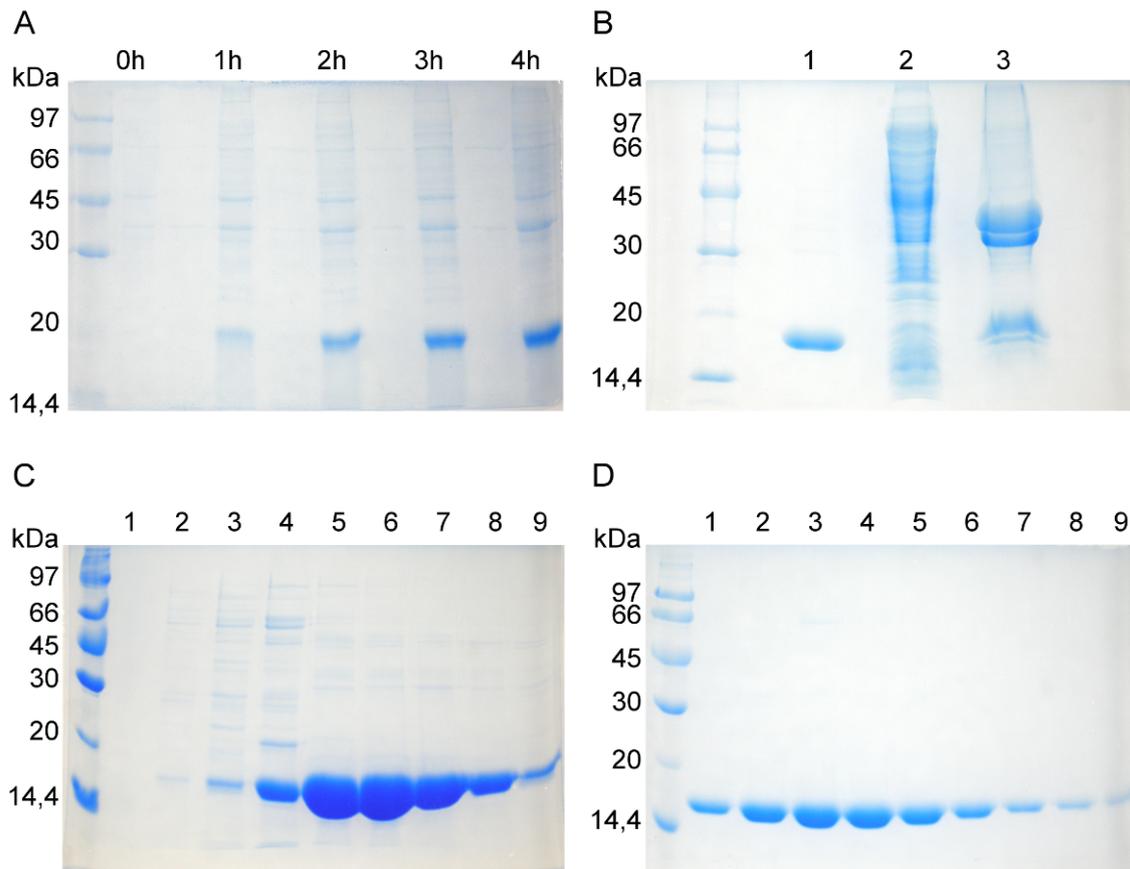


Abbildung 4.2.: Aufnahmen von SDS-Polyacrylamidgelen zum Nachweis der Expression von IL-10 in *E. coli* und seiner chromatographischen Reinigung aus *E. coli*-Einschlusskörpern. (A) Zeitlicher Verlauf der Expression von IL-10 in *E. coli* RosettaTM (DE3) in LB-Medium bei 37 °C. Das Gel zeigt Proteine der gesamten Zellfraktion zum Zeitpunkt 0 - 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG. (B) Vergleich der Proteinfractionen aus dem löslichen Überstand (2) und aus Einschlusskörpern (3) nach Zellaufschluss. IL-10 wurde hauptsächlich in Einschlusskörpern vorgefunden. Als Referenz wurde eine reine IL-10-Probe aufgetragen (1). (C) Reinigung von IL-10 mit einer Heparin-Agarose-Säule. Durchfluss- (1), Waschschrift- (2) und Eluatfraktionen (3 - 9) wurden aufgetragen. Fraktionen, die nur einen geringen Anteil an Kontaminationen enthielten (5 - 9), wurden vereinigt und für nachfolgende Reinigungsschritte verwendet. (D) Gelfiltration von IL-10 als letzter Reinigungsschritt. Der Eluatpeak, der dem dimeren Protein entsprach, wurde gesammelt und ist hier gezeigt.

C149Y-Mutante wurde eine 10- bis 20-fache Steigerung der Ausbeute (entspricht ca. 5 - 10 mg je 1 g Biofeuchtmasse) erreicht. Dagegen hatte die C149Y-Mutation keinen Einfluss auf die biologische Aktivität und es wurde ein ähnlicher EC_{50} -Wert (0,91 ng/mL) bestimmt wie für das Wildtyp-Protein (0,47 ng/mL). Die hohe Ausbeute der IL-10 C149Y-Mutante erlaubte schließlich in allen nachfolgenden Arbeiten eine zeit- und kosteneffiziente Probenpräparation, was insbesondere für die Herstellung von isotopenmarkiertem Protein von Bedeutung war.

Neben der Reinheit und Homogenität, welche durch SDS-PAGE und Gelfiltration verifiziert wurden, wurde das IL-10-Protein hier auch durch weitere spektrometrische und spektroskopische Methoden geringer Auflösung strukturell charakterisiert (Abbildung 4.4).

4. Ergebnisse

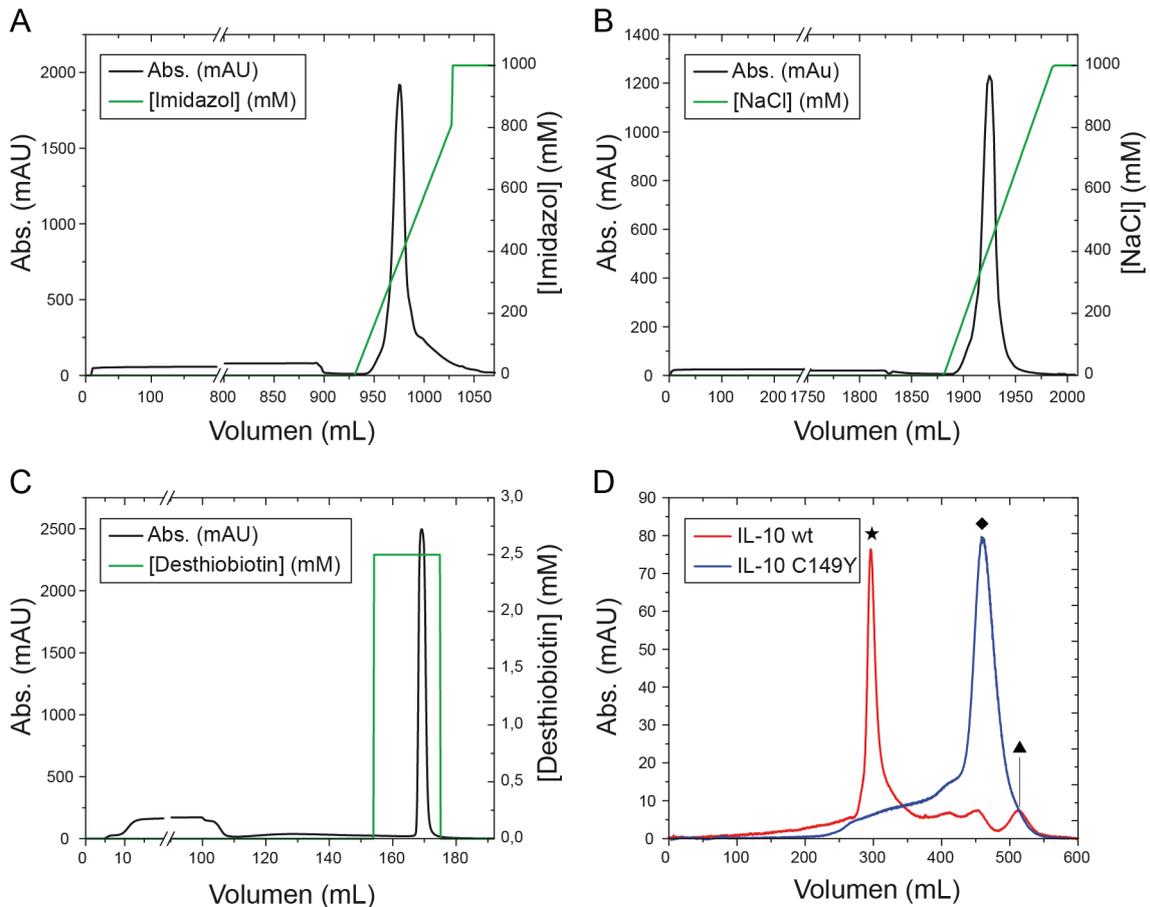


Abbildung 4.3.: Chromatogramme der Reinigung von IL-10. Je nach vorliegender Modifizierung und geplanter Verwendung von IL-10 wurden verschiedene Chromatographiemethoden eingesetzt: **(A)** Metallionenaffinitätschromatographie mit einer Ni²⁺-NTA-Säule für die Reinigung von IL-10 mit His8-Tag. **(B)** Ionenaustauschchromatographie mit einer Heparin-Agarose-Säule für die Reinigung von IL-10 ohne Affinitäts-Tag. **(C)** Ligandenaffinitätschromatographie mit einer Streptactin-Säule für die Reinigung von LBT- und StrepII-modifiziertem IL-10 für PCS-Messungen. **(D)** Gelfiltration zur Trennung des nativen IL-10-Dimers (◆) vom monomeren Protein (▲) und Proteinaggregaten (★). Die Ausbeute des Dimers wurde durch Einführung der C149Y-Mutation bedeutend erhöht bei gleichzeitiger Reduktion des Anteils an Proteinaggregaten, die sich als Folge der Proteinerückfaltung bilden.

Mittels MALDI-TOF-MS wurde die Identität des IL-10-Proteins nachgewiesen. Das experimentell bestimmte Molekulargewicht von 20123 Da entsprach sehr gut dem theoretischen Wert von 20153 Da (für IL-10 C149Y ohne N-terminalem Methionin und mit C-terminalem His8-Tag).

Die Wichtigkeit von Disulfidbrücken für die Struktur und Funktion von IL-10 ist bekannt [202] und ihre Relevanz für die Proteinfaltung wurde hier am Beispiel der C149Y-Mutation gezeigt. Der Nachweis, dass alle restlichen Cysteine der C149Y-Mutante in Disulfidbrücken beteiligt waren, wurde durch den Ellman-Test erbracht. Das Experiment wurde unter denaturierenden Bedingungen in Guanidin-Hydrochlorid durchgeführt, um alle Bereiche des Proteins für das Ellman-Reagenz zugänglich zu machen. Der Ellman-Test ergab

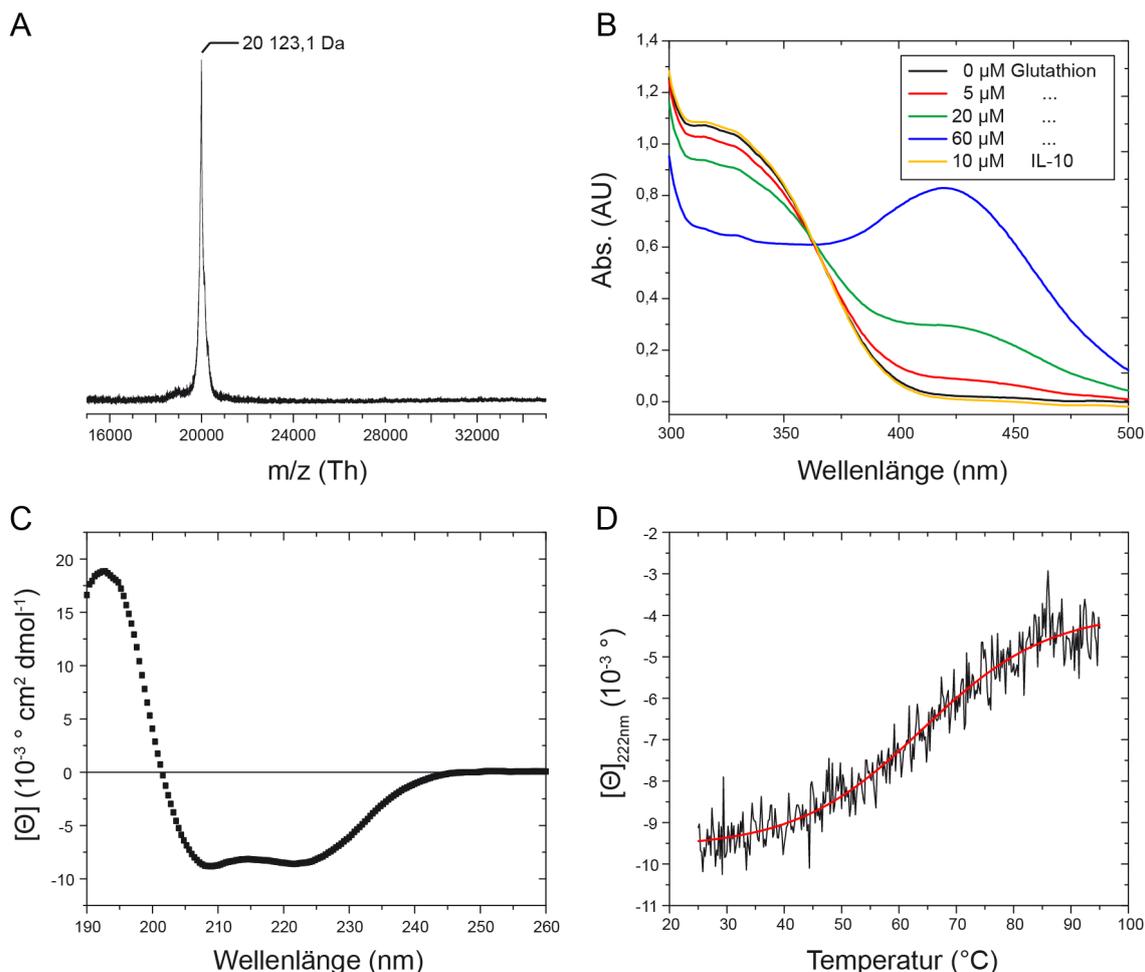


Abbildung 4.4.: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Analyse von rekombinant exprimiertem, rückgefaltetem IL-10 durch spektrometrische und spektroskopische Verfahren. **(A)** MALDI-TOF-Massenspektrum von IL-10 als Nachweis der Identität des Proteins und der korrekten molekularen Zusammensetzung. Das theoretische Molekulargewicht bei natürlichem Isotopenverhältnis betrug 20153 Da. **(B)** UV-Vis-Absorptionsspektrum von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman-Reagenz) als Nachweismittel für freie Thiolgruppen (bzw. Cysteine) in Proteinen. Durch Reduktion von DTNB entsteht 2-Nitro-5-Thiobenzoat mit einer Absorption bei 420 nm. Als Positivkontrolle diente Glutathion. Dagegen wurden für IL-10 keine freien Thiolgruppen nachgewiesen, was nahelegt, dass alle Cysteine in Disulfidbrücken vorlagen. **(C)** CD-Spektrum von 5 µM IL-10 bei 25 °C zur Bestimmung der Proteinsekundärstruktur. Durch Dekonvolution des Spektrums wurde ein helikaler Anteil von 68% bestimmt. **(D)** CD-Schmelzkurve von IL-10 zur Untersuchung der thermischen Stabilität des Proteins. Die Elliptizität bei 222 nm als Signal für α -Helixstruktur wurde im Bereich von 25 - 95 °C gemessen. Der Wendepunkt der Schmelzkurve lag bei 64 °C.

keine freien Cysteine in IL-10 C149Y (Abbildung 4.4 **B**), was den Schluss nahelegt, dass sie stattdessen als Disulfide vorlagen.

Als schnelle Methoden, um eine Aussage zur Struktur des rückgefalteten IL-10-Proteins treffen zu können, wurden CD- und $1D$ - 1H -NMR-Spektroskopie durchgeführt. Abbildung 4.4 **C** zeigt das CD-Spektrum von IL-10. Die charakteristischen Elliptizitätsminima für eine α -Helix bei 208 und 220 nm sind zu erkennen. Durch Dekonvolution des Spektrums wurde ein α -Helixanteil von ca. 68% bestimmt, was gut mit der Kristallstruktur

4. Ergebnisse

(vgl. Abschnitt 4.5) und der Sekundärstrukturanalyse anhand der C_{α} - und C_{β} -chemischen Verschiebungen (vgl. 4.4) übereinstimmt. Die thermische Stabilität von IL-10 wurde durch Aufnahme von CD-Spektren und Messung der Elliptizität bei 222 nm über einen Temperaturbereich von 25 - 95 °C untersucht. Der Wendepunkt der CD-Schmelzkurve, der dem Zustand mit 50% Verlust an α -Helixstruktur entspricht, wurde bei 64 °C gefunden (Abbildung 4.4 D). Abbildung 4.7 A zeigt das 1D- ^1H -NMR-Spektrum von rückgefaltetem IL-10. Auffällig waren drei Methyl-Signale unterhalb von 0 ppm, die auf eine stark elektronegative Abschirmung hinwiesen, wie sie durch Ringstromeffekte aromatischer Aminosäuren verursacht werden kann. Derartige Signale sind oft ein Indikator für eine kompakte Proteinfaltung, denn eine räumlich enge Packung von aromatischen und aliphatischen Aminosäureresten wird i. d. R. nur im Proteininneren beobachtet. Als zweite Beobachtung fiel die geringe Dispersion der H_N -Region von 9,5 - 6,0 ppm auf. Dies kann mit der Sekundärstrukturabhängigkeit der H_N -chemischen Verschiebung erklärt werden, wodurch sich für IL-10 als rein α -helikales Protein eine geringe Auffächerung der Amidprotonensignale ergab.

4.1.2. Präparation als lösliches Fusionsprotein mit MBP

Weil anfänglich die Proteinausbeuten bei der Rückfaltung von IL-10 ohne die oben beschriebene C149Y-Mutation sehr gering waren, wurde nach einer Alternative für die Präparation aus Einschlusskörpern gesucht und eine Methode für die lösliche Expression von IL-10 in *E. coli* entwickelt. Dazu wurde an den N-Terminus von IL-10 das Maltose-Bindungsprotein von *E. coli*, das ähnlich wie Thioredoxin oder Glutathion-S-Transferase die

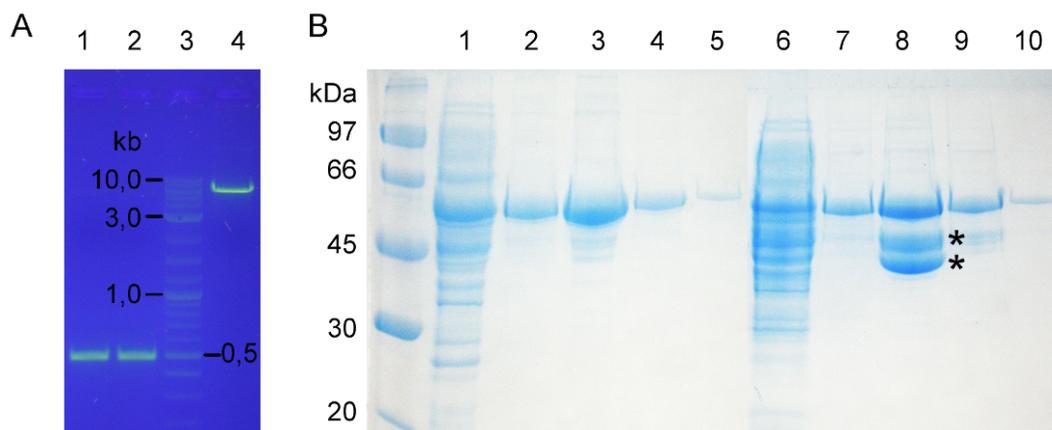


Abbildung 4.5.: Aufnahmen von Agarose- und SDS-Polyacrylamidgelen zum Nachweis der Klonierung, Expression und Reinigung des MBP-IL-10-Fusionsproteins. (A) Spalten 1 und 2 des Agarosegels zeigen das IL-10-PCR-Produkt mit einer Größe von 492 bp. Es wurde eine *SbfI*-Restriktionsschnittstelle an das DNA-Ende, das dem destinierten Protein-C-Terminus entsprach, angefügt. In Spalte 4 ist der mit *XmnI* und *SbfI* linearisierte pMAL-c5X-Vektor gezeigt, in den das PCR-Produkt eingebaut wurde. (B) Das SDS-Polyacrylamidgel zeigt die Reinigung von MBP-IL-10 mittels Amylose-Affinitätschromatographie nach Expression in *E. coli* NEB Express *I*^q und Zellaufschluss. Die Spalten 1 - 5 bzw. 6 -10 zeigen die Rohextrakt- und Eluatfraktionen nach Proteinexpression bei 23 °C bzw. 30 °C. Bei der höheren Temperatur wurde ein Abbau des Fusionsproteins (*) und damit ein Verlust des IL-10-Proteins beobachtet.

Löslichkeit seines Fusionspartners erhöhen kann [251], gehängt. Mittels einer *Xmn*I- und *Sbf*I-Restriktionsschnittstelle wurde die IL-10-cDNA in die MCS des pMAL-c5X-Vektors 3'-terminal vom *malE*-Gen eingefügt. Sowohl die IL-10-Sequenz mit als auch ohne der C149Y-Mutation wurden getestet. Abbildung 4.5 **A** zeigt das PCR-Produkt und den Restriktionsverdau des Vektors. Das MBP-IL-10-Protein wurde in *E. coli* NEB Express *I*^q exprimiert, weil das pMAL-c5X-Plasmid statt dem T7-Promotor einen tac-Promotor trug, welcher von der *E. coli*-eigenen RNA-Polymerase als Transkriptionsstart erkannt wird. Der Erfolg der Expression war entscheidend von der verwendeten Temperatur abhängig. Bei 30 °C und 37 °C wurde ein Abbau des MBP-IL-10-Fusionsproteins, vermutlich durch stressinduzierte Chaperon-Proteasen [252], beobachtet (Abbildung 4.5 **B**). Wurde die Temperatur jedoch eine Stunde vor Expressionsstart auf 23 °C reduziert, war keine Spaltung des Fusionsproteins mehr zu beobachten. Eine mögliche Erklärung kann die Verminderung der Transkriptions- und Proteinbiosyntheserate bei niedriger Temperatur sein. Das führt zu einer geringeren Menge an Proteinfaltungsintermediaten bzw. nicht nativ gefalteten Proteinen mit einer Zellstress-induzierenden Wirkung und Disposition für proteolytische Spaltung.

Das Fusionsprotein konnte durch Amylose-Affinitätschromatographie mit hoher Reinheit aus dem Zellextrakt isoliert werden. Durch Zugabe von 0,5 - 1% (w/w) Faktor-Xa wurde das Fusionsprotein gespalten und IL-10 freigesetzt. Abbildung 4.6 zeigt den zeitlichen Verlauf der Faktor-Xa-Spaltung und den Nachweis der Reaktionsprodukte durch MALDI-TOF-MS. Die Proteolyse war nach 24 h nahezu vollständig abgelaufen und wurde durch den spezifischen Faktor-Xa-Inhibitor 1,5-Dansyl- α -Glutamyl-Glycyl-Arginyl-Chloromethylketon-dihydrochlorid beendet. Zur Trennung von IL-10 von MBP wurde Ionenaustauschchromatographie mit einer Heparin-Agarose-Säule verwendet. Als letzter Reini-

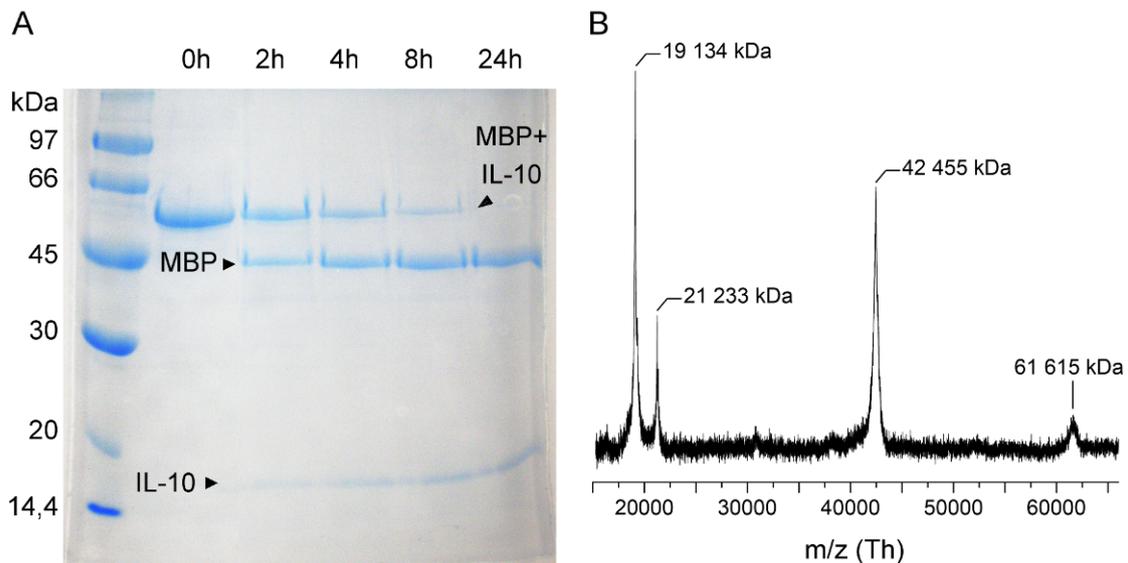


Abbildung 4.6.: Nachweis der Spaltung des MBP-IL-10-Fusionsproteins durch Faktor-Xa. (**A**) SDS-Polyacrylamidgel zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Spaltung von MBP-IL-10 mit Faktor-Xa. Es wurden 0,5 % (w/w) des Enzyms verwendet. (**B**) MALDI-TOF-MS-Spektrum zum Nachweis der Faktor-Xa-Spaltung. Die detektierten Massen und ihre Zuordnung zu den Reaktionsteilnehmern ist angegeben.

4. Ergebnisse

gungsschritt wurde schließlich Größenausschlusschromatographie durchgeführt – zur Trennung von IL-10 nach dem Zustand seiner Quartärstruktur sowie, um die Ausbeute an nativem dimerem Protein zu evaluieren. Leider zeigte sich, dass wiederum ein großer Teil an IL-10 in Form von Aggregaten (Molekulargewicht ca. 300 kDa) vorlag, sowohl bei der Präparation des Wildtyp-Proteins als auch der C149Y-Mutante. Es ist möglich, dass diese Aggregate bereits während der Expression in *E. coli* gebildet, aber durch MBP im löslichen Zustand gehalten worden waren. Die Ausbeute an IL-10-Dimer war vergleichbar mit derjenigen bei Rückfaltung des Wildtyp-Proteins von IL-10 und wurde auf ca. 0,5 mg je 1 g Biofeuchtmasse bestimmt.

Als Nachweis, dass auch das löslich exprimierte IL-10-Protein eine kompakte Proteinfaltung aufwies und, um seine Struktur mit der des rückgefalteten Proteins zu vergleichen, wurde 1D- ^1H -NMR-Spektroskopie durchgeführt. Abbildung 4.7 **B** zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des löslich exprimierten Proteins. Es war eine hohe Ähnlichkeit mit dem Spek-

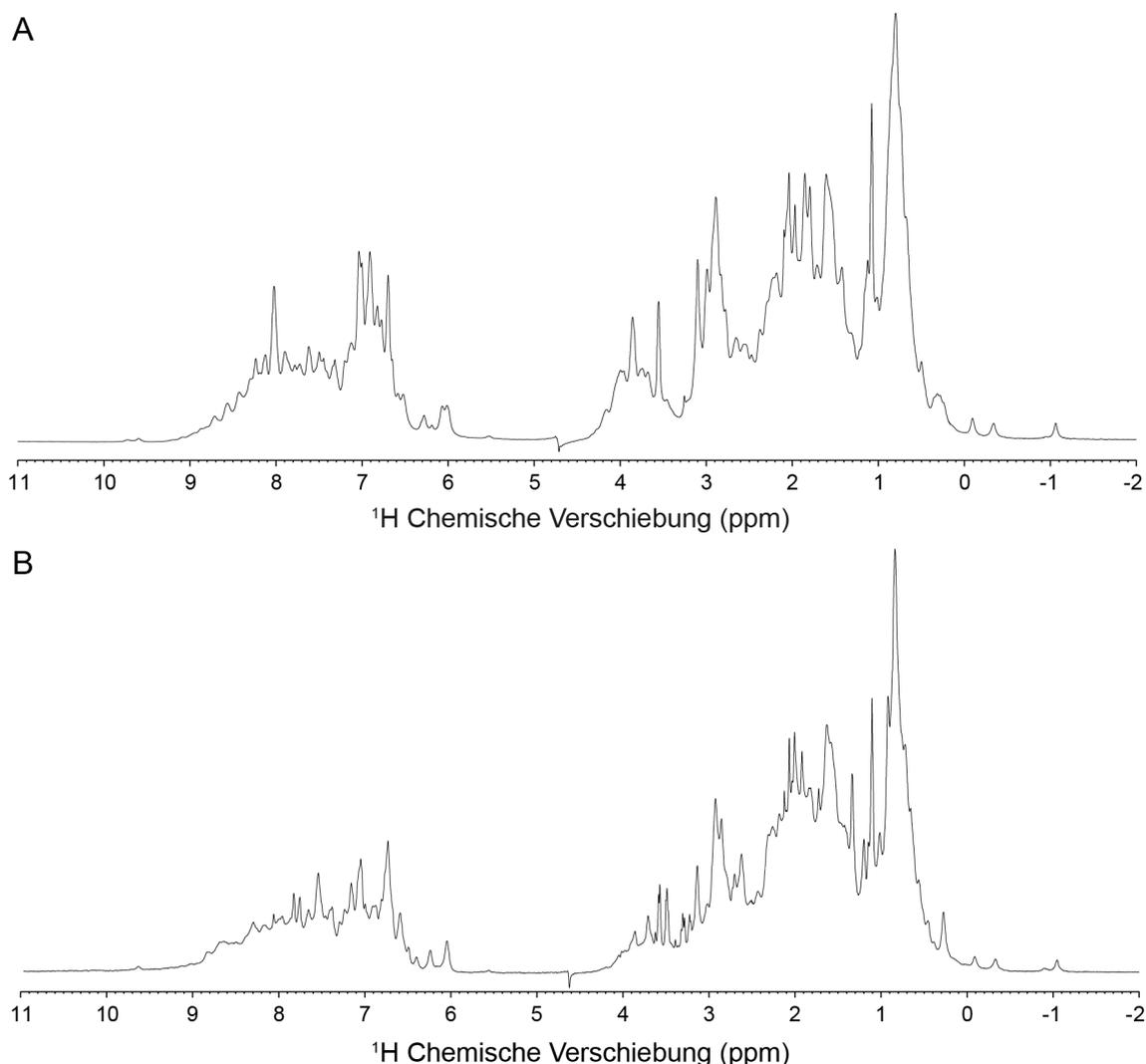


Abbildung 4.7.: 600 MHz-1D- ^1H -NMR-Spektren von IL-10. (**A**) Aus Einschlusskörpern präpariertes und rückgefaltetes IL-10. (**B**) Mit MBP löslich exprimiertes IL-10. Die Temperatur betrug 30 °C.

trum des aus Einschlusskörpern präparierten IL-10 zu erkennen. Der gleiche ppm-Bereich der Amidprotonen mit einem einzelnen, aufgelösten H_N -Signal bei $\sim 9,5$ ppm sowie die drei charakteristischen Methyl-Signale unterhalb von 0 ppm als Indikator für eine kompakte Proteinfaltung wurden beobachtet.

4.2. STD-NMR-Experimente

4.2.1. Bestimmung von GAG-Bindungsepitopen für IL-10 durch STD

Die GAG-Bindungsstellen von verschiedenen GAG-Disacchariden und einem Heparin-Tetrasaccharid für IL-10 wurden mit Hilfe von ein- und zweidimensionalen STD-NMR-Experimenten (vgl. Abschnitt 3.4.1) bestimmt. Abbildung 4.8 zeigt die verwendeten GAG-Disaccharide, ihre chemische Struktur, Monosaccharid-Zusammensetzung und das Sulfatgruppen-Substitutionsmuster. Die Uronsäure besaß aufgrund der Präparation durch enzymatischen Verdau eine Doppelbindung zwischen C4 und C5 und dadurch eine ungewöhnliche 1H_2 -Halbsessel-Konformation. Trotz dieser nicht nativen Struktur und der geringen Kettenlänge, boten Di- und Tetrasaccharide entscheidende Vorteile:

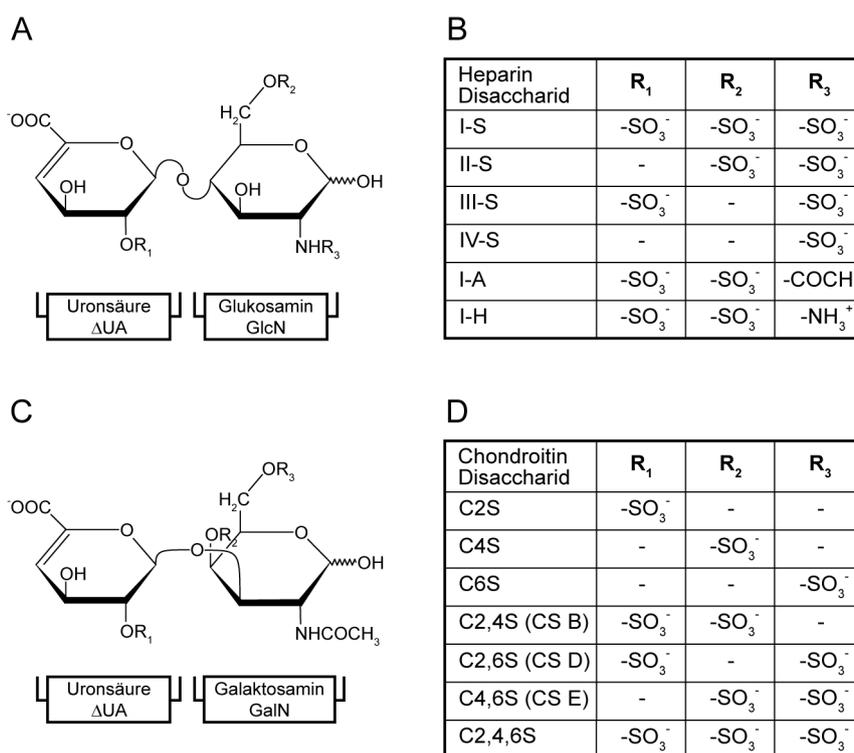


Abbildung 4.8.: Substitutionsmuster der in den STD-Experimenten verwendeten GAG-Disaccharide. Infolge der Präparation durch Lyase-Verdau liegt ein 4,5-ungesättigter Uronsäure-Ring (ΔUA) vor, der $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidisch an Glukosamin (GlcN) im Fall von Heparin-Disacchariden (**A**) oder $\beta(1\rightarrow3)$ -glykosidisch an Galaktosamin (GalN) im Fall von CS-Disacchariden (**C**) gebunden ist. Die Carboxylatgruppe in ΔUA liegt innerhalb der Ringebene, wie angedeutet in der chemischen Strukturformel durch eine schräge Stellung der Bindung. Substitutionen in Heparin (**B**) können am O2-Atom in ΔUA sowie am N2- und O6-Atom in GlcN erfolgen. In CS (**D**) sind das O2-Atom in ΔUA und das O4- und O6-Atom in GalN Sulfatierungspositionen.

4. Ergebnisse

- (1) Sie waren im Gegensatz zu langkettigen GAGs als reine Verbindungen mit einem definierten Sulfatierungsgrad und Sulfatierungsmuster erhältlich, was die Interpretation der experimentellen Ergebnisse erleichterte.
- (2) Die begrenzte Zahl an NMR-Signalen ermöglichte eine eindeutige Signalzuordnung und Quantifizierung von STD-Effekten.
- (3) Die Beobachtung, dass Disaccharide die gleiche Bindungsstelle in IL-10 besetzten wie längere GAGs, was anhand der Änderungen der chemischen Verschiebungen von IL-10 gezeigt wurde (Abschnitt 4.6.1), rechtfertigte ihre Verwendung als Modellsubstanz, um Prinzipien der IL-10-GAG-Wechselwirkung zu untersuchen.

Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10 zeigen die Referenz- und STD-NMR-Spektren von C2,4,6S-Disaccharid, HA-Hexasaccharid und Heparin-Tetrasaccharid. Für alle sulfatierten GAGs waren deutliche STD-Effekte für eine Vielzahl von Protonen zu beobachten, was zeigt, dass sie mit IL-10 interagierten. Für HA wurden dagegen nur sehr schwache STD-

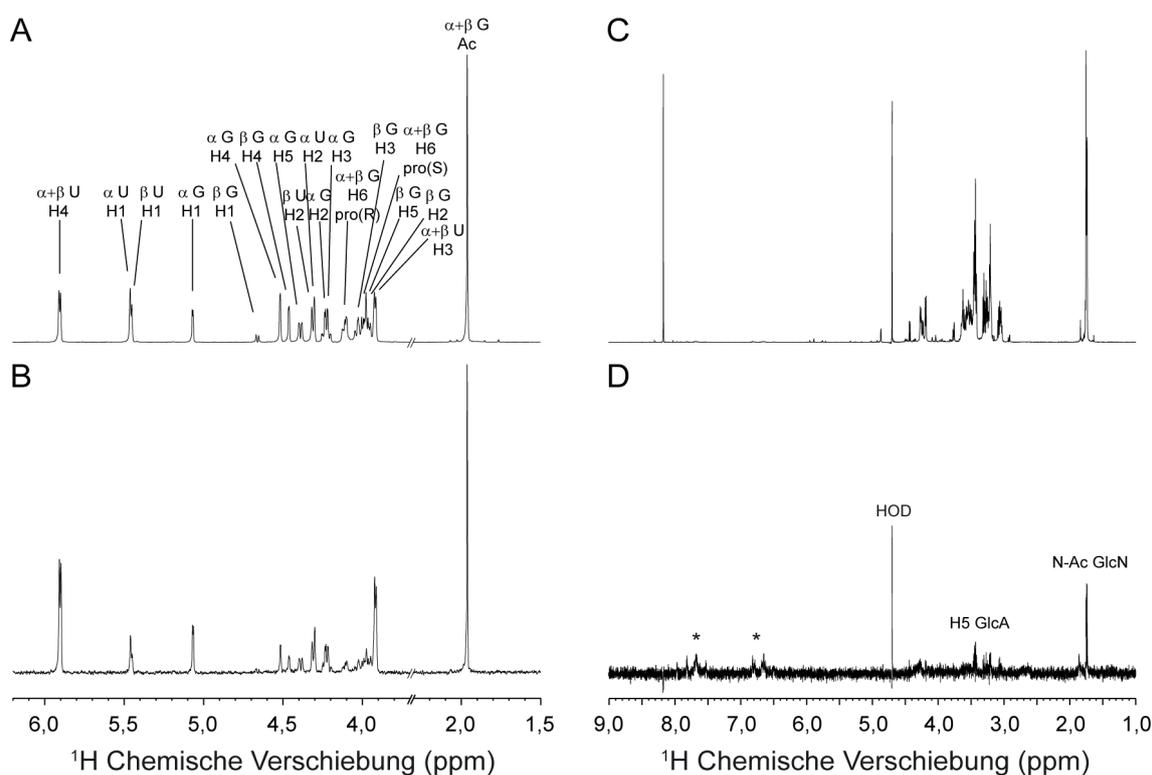


Abbildung 4.9.: 1D- ^1H -STD-NMR-Spektren von GAGs in Gegenwart von IL-10. Das (A) 1D- ^1H -Referenz- und (B) STD-NMR-Spektrum (6-fache Vergrößerung) von C2,4,6S ($\Delta\text{UA}, 2\text{S}(1\rightarrow3)\text{-GalNAc}, 4\text{S}, 6\text{S}$) bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz sind gezeigt. Signale des ΔUA - und GalN-Rings sind mit "U" bzw. "G" bezeichnet und α oder β gibt die entsprechende anomere Form an. In (B) und (D) sind das 600 MHz- ^1H -Referenz- und STD-NMR-Spektrum (16-fache Vergrößerung) von HA-Hexasaccharid, das keine signifikante Bindung an IL-10 aufwies, gezeigt. Es wurden nur sehr schwache STD-Signale für das H5-Proton des Glukuronsäure-Rings (GlcA) und für die N-Acetylgruppe von N-Acetylglukosamin (GlcNAc) beobachtet. Beide Experimente wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt: bei einer Temperatur von 10 °C, einer Sättigungszeit von 4 s und einem Protein-Ligand-Verhältnis von 1:100.

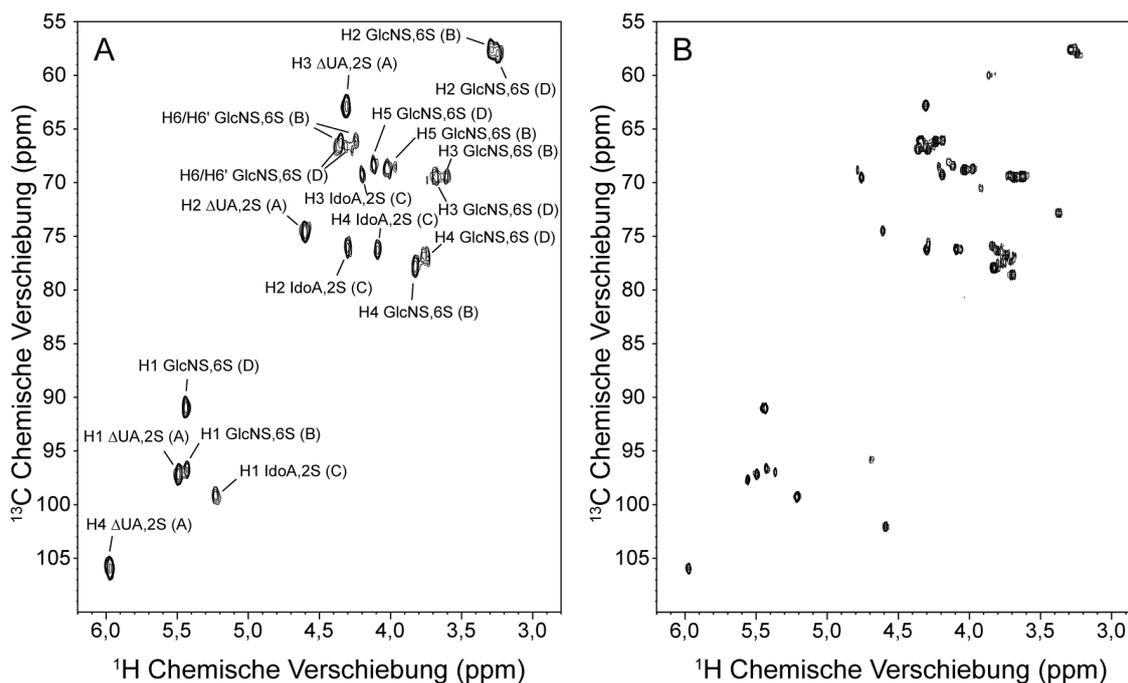


Abbildung 4.10.: (A) 2D- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -STD- und (B) Referenz-NMR-Spektrum von Heparin-Tetrasaccharid ($\Delta\text{UA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}(1\rightarrow4)\text{IdoA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}$) bei 700 MHz, 10 °C, einer Sättigungszeit von 3 s und einem 50-fachen Überschuss an Ligand. Protonensignale sind mit ihrem zugehörigen Monosaccharidring bezeichnet: 4,5-ungesättigte 2-O-Sulfo-Glukuronsäure ($\Delta\text{UA},2\text{S}$), 2-O-Sulfo-Iduronsäure (IdoA,2S) und 2-N,6-O-Disulfo-Glukosamin (GlcNS,6S). Die Zuckerringe sind beginnend am nicht-reduzierenden Ende fortgehend mit (A) - (D) benannt.

Effekte für das H5-Proton von GlcA und für die N-Acetylgruppe von GlcNAc gefunden. HA besitzt nur eine Carboxylatgruppe und damit eine negative Ladung pro Disaccharideinheit, aber keine Sulfatgruppen.

Um ein Maß für die relative Nähe, der einzelnen Ligandprotonen zur Proteinoberfläche, zu erhalten, wurden die STD-Signale integriert und ihre Intensität um die T_1 -Relaxationszeit des freien Liganden korrigiert (siehe dazu Ausführungen in Abschnitt 3.4.1). T_1 -Relaxationszeiten unterschieden sich um einen Faktor von bis zu sechs, wobei die H6-Protonen des GlcN- bzw. GalN-Rings die schnellste Relaxation zeigten ($T_1 \sim 0,5$ s) und das H4-Proton des ΔUA -Rings die langsamste Relaxation ($T_1 \sim 3 - 3,5$ s) aufwies. Relaxationszeiten und die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen aller GAGs sind im Anhang (Abschnitte A.2 und A.3) aufgelistet. Abbildung 4.11 fasst die beobachteten und um T_1 korrigierten STD-Effekte zusammen und zeigt ihre strukturelle Einordnung. Die stärksten STD-Effekte wurden für Protonen in der Nähe von Sulfatgruppen gefunden, nämlich für H2, H4, H5, H6pro(R) und H6pro(S) von GlcN bzw. GalN und für H1 und H2 von IdoA bzw. ΔUA . Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Sulfatgruppen wichtige Interaktionspunkte sind und ist in Übereinstimmung mit anderen bekannten Protein-GAG-Wechselwirkungen, wo die Bindung hauptsächlich durch elektrostatische Interaktionen zwischen positiv geladenen Proteinresten und negativ geladenen Sulfatgruppen zustande kommt [3]. Weitere starke STD-Effekte wurden für Protonen H3 und H4 benachbart zur Carboxylatgruppe des ΔUA -Rings und für die Methylprotonen der N-Acetylgruppe in GlcNAc bzw. GalNAc gefunden.

4. Ergebnisse

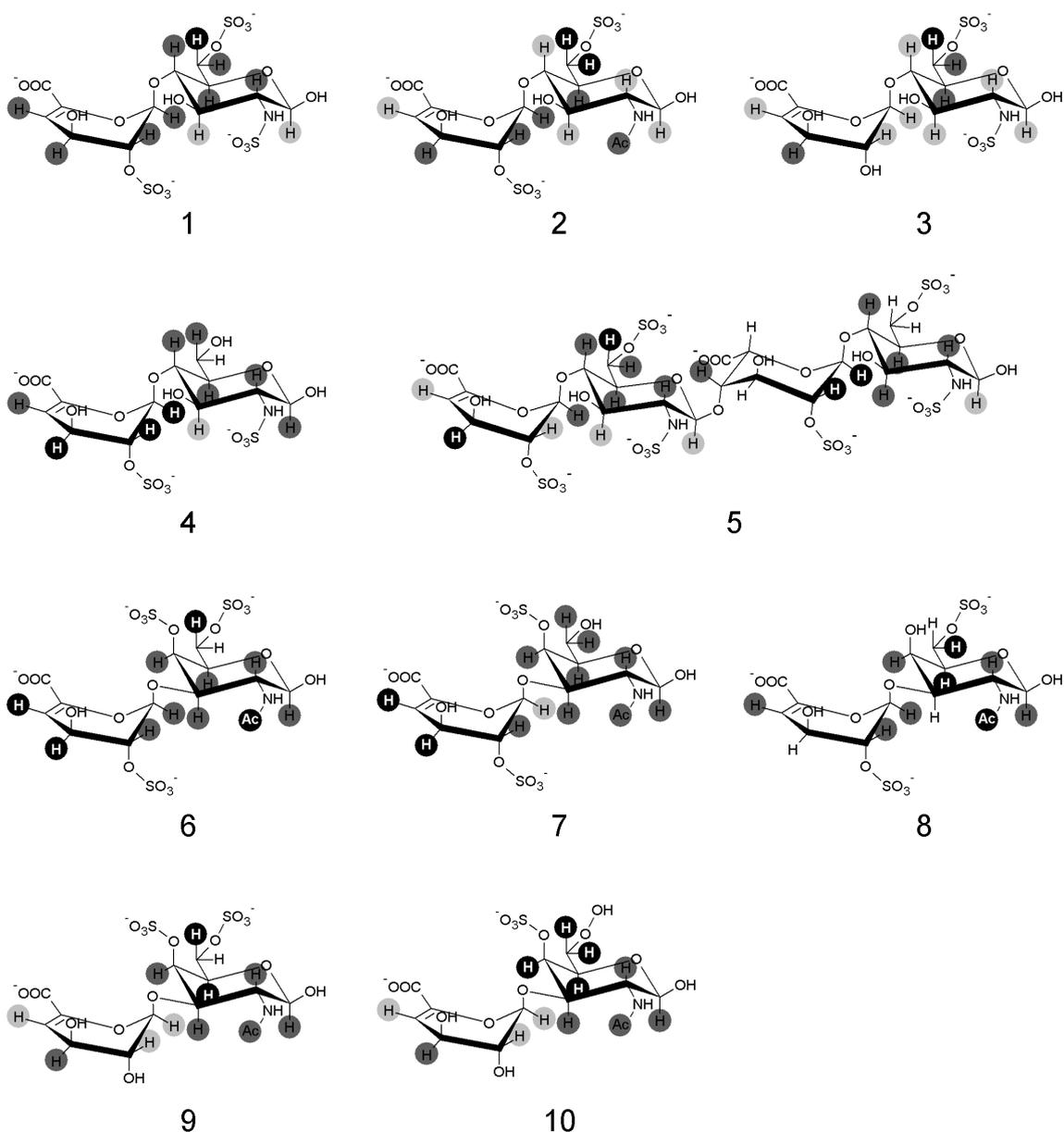
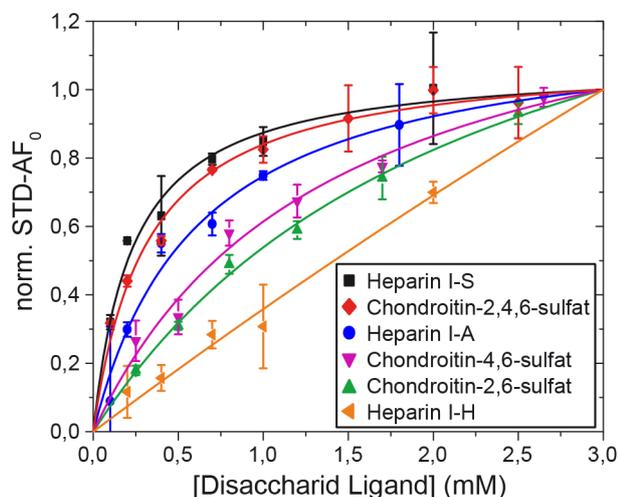


Abbildung 4.11.: Strukturelle Zuordnung der STD-Epitope von GAGs. Die räumliche Position der beobachteten STD-Effekte ist anhand der chemischen Strukturformeln dargestellt: Heparin I-S (1), I-A (2), II-S (3), III-S (4), Heparin-Tetrasaccharid (5), C2,4,6S (6), C2,4S (7), C2,6S (8), C4,6S (9) und C4S (10). Die STD-Effekte wurden bei einem Protein-Ligand-Verhältnis von 1:50 für alle Heparin-Oligosaccharide, von 1:300 für C4S und von 1:100 für alle anderen Chondroitinsulfat-Disaccharide gemessen. Für jeden Liganden wurden die STD-Effekte relativ zum höchsten Signal normalisiert. Dunkel, mittel und leicht graue Kreise bedeuten starke (>75%), mittelstarke (75-40%) und schwache (<40%) STD-Effekte. Protonen, für welche kein STD-Effekt angegeben ist, konnten nicht ausgewertet werden, weil sie mit anderen Signalen überlappten oder nicht detektiert werden konnten (z. B. durch Austausch mit D₂O).

4.2.2. Bestimmung von GAG-Bindungsaffinitäten für IL-10 durch STD

Der Einfluss des GAG-Sulfatierungsgrades auf die IL-10-Bindung wurde durch Messung der Bindungsaffinität von verschiedenen sulfatierten Heparin- und CS-Disacchariden untersucht. Des Weiteren wurde auch der Einfluss der GAG-Kettenlänge unter Verwendung verschieden langer Heparine analysiert. Eine direkte Bestimmung der Bindungskurve aus der Änderung des STD-Verstärkungsfaktors mit ansteigenden Ligandkonzentrationen ist, aufgrund der komplexen Abhängigkeit des STD-Effektes von experimentellen Parametern wie Sättigungszeit, longitudinaler Relaxation des Liganden und Lebensdauer des Protein-Ligand-Komplexes, nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die initiale Wachstumsrate des STD-Verstärkungsfaktors ($STD-AF_0$), die aus Messung des STD-Effektes mit verschiedenen Sättigungszeiten t_{Sat} und Extrapolation zum Zeitpunkt $t_{\text{Sat}} = 0$ erhalten wurde, als Parameter der Bindung benutzt. Unter diesen Bedingungen ist eine wiederholte Bindung von bereits gesättigtem Ligand, welche ansonsten das STD-Signal beeinflusst, faktisch ausgeschlossen. Abbildung 4.12 zeigt Bindungskurven von ausgewählten GAG-Disacchariden und Tabelle 4.1 fasst die daraus bestimmten K_D -Werte zusammen. Da IL-10 ein homodimeres, symmetrisches Protein ist, wurde die Annahme getroffen, dass es auch zwei zueinander symmetrische und strukturell äquivalente GAG-Bindungsstellen besitzt. Weiter konnten unter Anwendung der Hill-Gleichung keine Hinweise für eine Kooperativität der Bindung im Fall von GAG-Disacchariden gefunden werden. Daraus wurde geschlossen, dass beide Bindungsstellen unabhängig voneinander besetzt werden und dass K_D -Werte von Disacchariden unter Anwendung eines 1:1-Bindungsmodells (d. h. ein GAG-Molekül und ein IL-10-Monomer) bestimmt werden können.

Abbildung 4.12: Bindungskurven von GAG-Disacchariden für die Interaktion mit IL-10. Kurven wurden durch Auswertung der initialen Wachstumsrate des STD-Verstärkungsfaktors ($STD-AF_0$) erhalten und an ein Bindungsmodell mit einer Bindungsstelle (siehe Gleichung (3.3)) angepasst. Es wurde jeweils das STD-Signal des H4-Protons des Δ UA-Rings ausgewertet. Die zugehörigen Dissoziationskonstanten (K_D) sind in Tabelle 4.1 angegeben.



Unter den Heparin-Disacchariden zeigte das am stärksten sulfatierte Heparin I-S die höchste Affinität ($K_D = 0,2 \text{ mM}$). Ein Verlust der 2-O- (Heparin II-S) und 6-O-Sulfatgruppe (Heparin III-S) führte zu einer nur geringen Abnahme der Bindungsaffinität und K_D -Werten von $0,7 \text{ mM}$ bzw. $1,8 \text{ mM}$ (Tabelle 4.1). Dagegen war für N-desulfatiertes Heparin (d. h. Heparin I-H) eine starke Abnahme der Affinität, erkennbar an einer deutlichen Rechtsverschiebung der Bindungskurve (Abbildung 4.12), zu beobachten. Ein K_D -Wert konnte nicht mehr bestimmt werden, weil keine Sättigung des Proteins im vorhandenen Konzentrationsbereich von Heparin I-H eintrat. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Bildung einer primären Aminogruppe in Heparin I-H, die unter physiologischen Bedingungen

4. Ergebnisse

Tabelle 4.1.: Dissoziationskonstanten (\pm S.E.) von CS-Disacchariden, Heparin-Disacchariden und Heparin-Oligosacchariden für die Bindung an IL-10. K_D -Werte wurden mit Hilfe der initialen Wachstumsrate des STD-Verstärkungsfaktors bei 10 °C in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,0), 50 mM NaCl (99,8% D_2O) bestimmt.

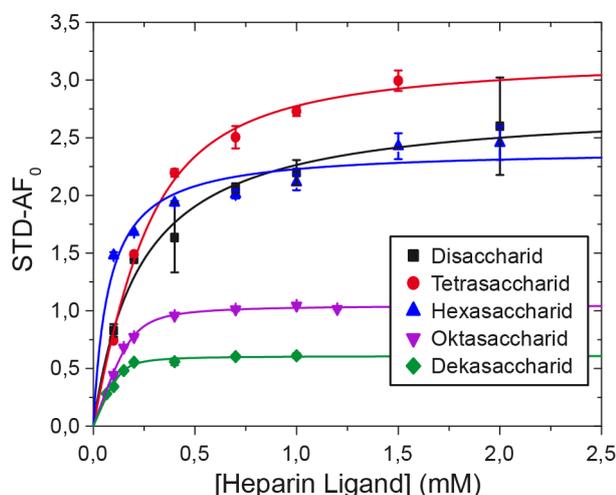
CS-Disaccharide		Heparin-Disaccharide		Heparin-Oligosaccharide	
$K_D \pm$ S.E. (mM)		$K_D \pm$ S.E. (mM)		$K_D \pm$ S.E. (μM)	
C2S	$4,7 \pm 3,4$	I-S	$0,2 \pm 0,0$	Di	233 ± 40
C4S	$5,3 \pm 1,8$	II-S	$0,7 \pm 0,4$	Tetra	298 ± 42
C6S	$12,4 \pm 4,6$	III-S	$1,8 \pm 0,2$	Hexa	77 ± 19
C2,4S	$3,2 \pm 1,1$	I-A	$0,6 \pm 0,1$	Okta	20 ± 9
C2,6S	$2,3 \pm 0,3$	I-H	n.b. ^a	Deka	11 ± 7
C4,6S	$1,4 \pm 0,3$				
C2,4,6S	$0,3 \pm 0,1$				

^an.b.: Wert nicht bestimmt.

positiv geladen ist, zurückzuführen. Zwar kann hier keine endgültige Entscheidung darüber getroffen werden, ob die lokale positive Ladung oder die fehlende Sulfatgruppe für die Abnahme der Bindungsaffinität verantwortlich ist, aber diese Beobachtung weist auf die entscheidende Rolle, die elektrisch geladenen Gruppen bei der Protein-GAG-Wechselwirkung zukommt, hin. Interessanterweise führte eine Acetylierung der Aminogruppe (Heparin I-A) zu einer Wiederherstellung der IL-10-Bindung und einer vergleichbaren Affinität ($K_D = 0,6 \pm 0,1$ mM) wie für das dreifach sulfatierte Heparin I-S. In der N2-Position wurden also auch andere funktionelle Gruppen als Sulfate von IL-10 toleriert.

Innerhalb der CS-Disaccharide war ebenfalls ein deutlicher Zusammenhang zwischen der IL-10-Bindungsstärke und dem Sulfatierungsgrad zu erkennen. Das dreifach sulfatierte C2,4,6S hatte den geringsten K_D -Wert ($0,3 \pm 0,1$ mM). Der Verlust einer Sulfatgruppe führte zu einer Abnahme der Affinität und einem Anstieg des K_D -Wertes in der Reihenfolge: 2-O-Desulfatierung (C4,6S mit $K_D = 1,4 \pm 0,3$ mM), 4-O-Desulfatierung (C2,6S mit $K_D = 2,3 \pm 0,3$ mM) und 6-O-Desulfatierung (C2,4S mit $K_D = 3,2 \pm 1,1$ mM). Dennoch

Abbildung 4.13: Änderung der initialen Wachstumsrate des STD-Verstärkungsfaktors ($STD-AF_0$) mit steigender Konzentration für verschiedene Heparin-Oligosaccharid-Liganden. Es wurde jeweils das STD-Signal des H4-Protons des terminalen ΔUA -Rings ausgewertet. Mit steigender Heparin-Kettenlänge wurde eine Abnahme des maximalen $STD-AF_0$ -Wertes, der bei Sättigung der Protein-Liganden-Bindung erreicht wird, beobachtet.



waren die Unterschiede in der Bindungsaffinität zwischen diesen Disacchariden sehr gering und es konnte keine Schlüsselrolle einer bestimmten Sulfatposition ausgemacht werden. Für die einfach sulfatierten CS-Disaccharide war eine weitere Abnahme der Wechselwirkungsstärke gegenüber zwei- und dreifach sulfatiertem CS festzustellen. C2S und C4S hatten eine ähnliche Affinität ($K_D = 4,7 \pm 3,4$ mM und $K_D = 5,3 \pm 1,8$ mM), während C6S eine leicht geringere Bindungsstärke ($K_D = 12,4 \pm 4,6$ mM) aufwies. Diese Beobachtung könnte auf eine geringere Bedeutung der 6-O-Sulfatgruppe gegenüber der 2-O- oder 4-O-Sulfatgruppe hindeuten und ist in Übereinstimmung mit dem beobachteten geringeren inhibitorischen Effekt von C6S auf die gemessene IL-10-Signalaktivität in Zellkulturexperimenten [5]. Allerdings sind die experimentellen Fehler im Fall von C2S und C6S recht hoch, vor allem weil keine vollständige Sättigung im verfügbaren Konzentrationsbereich von 4 mM und 15 mM erreicht werden konnte. Weiter sind die K_D -Wertunterschiede sehr gering. Eine Verdopplung des K_D -Wertes entspricht einer Erhöhung der freien Bindungsenergie bei 25 °C von nur 1,72 kJ mol⁻¹. Zum Vergleich: Die thermische Energie der Moleküle bei 25 °C entspricht bereits 3,72 kJ mol⁻¹. Aus diesen Gründen konnte keine dominierende Rolle einer spezifischen Sulfatgruppe festgestellt werden. Eher wurde wieder der Sulfatierungsgrad, wie auch schon für die Heparin-Disaccharide, als wichtigster Faktor der GAG-Bindung ausgemacht.

Als weiterer Parameter wurde schließlich auch der Einfluss der GAG-Kettenlänge auf die IL-10-Bindung untersucht. Natürlich vorkommende GAGs sind polymere Kohlenhydratketten mit mehreren Disacchariduntereinheiten, die gleichzeitig an mehrere Stellen des Proteins binden und somit zu einer Erhöhung der Interaktionsstärke führen können. Dieses Prinzip, bei dem sich die Beiträge der einzelnen Bindungsstellen zur Bindungsener-

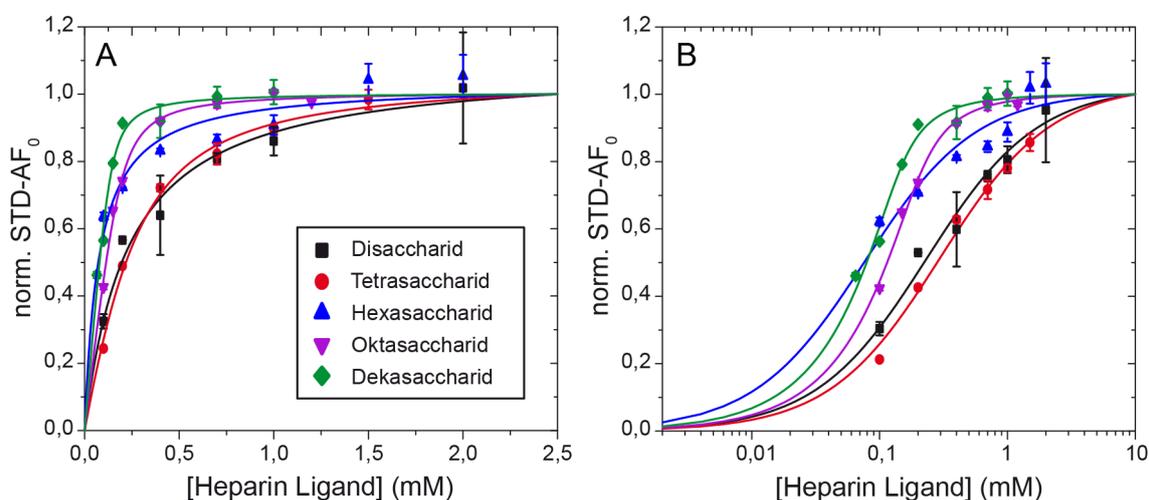


Abbildung 4.14.: Bindungskurven von Heparin-Oligosacchariden für die Interaktion mit IL-10. (A) Kurven wurden durch Auswertung der initialen Wachstumsrate des STD-Verstärkungsfaktors ($STD-AF_0$) erhalten und an die Hill-Gleichung (Gleichung (3.4)) angepasst. Es wurde jeweils das STD-Signal des H4-Protons des terminalen Δ UA-Rings ausgewertet. Die zugehörigen Dissoziationskonstanten (K_D) sind in Tabelle 4.1 angegeben. (B) Halb-logarithmische Darstellung der Bindungskurven. Für das Okta- und Dekasaccharid wurde ein Hill-Koeffizient von 2,0 bzw. 1,8 bestimmt, was auf eine gleichzeitige Besetzung beider GAG-Bindungsstellen im IL-10-Dimer hinweist.

gie akkumulieren, ist als Avidität bekannt. In der Tat wurde für ein Heparinmolekül größer als ein Tetramer eine deutliche Linksverschiebung der Bindungskurve (Abbildung 4.14) beobachtet. Für das Hexa-, Okta- und Dekasaccharid von Heparin wurden K_D -Werte von $77 \pm 19 \mu\text{M}$, $20 \pm 9 \mu\text{M}$ und $11 \pm 7 \mu\text{M}$ bestimmt. Außerdem wurde eine Abnahme der maximalen Wachstumsrate des STD-Verstärkungsfaktors (Abbildung 4.13) mit zunehmender Kettenlänge beobachtet. Dies kann mit der Zunahme der Affinität und somit Verringerung der Austauschrate, die zu einer geringeren Anzahl von gesättigten Ligandmolekülen pro Zeiteinheit führt, erklärt werden. Weiterhin war in der halb-logarithmischen Darstellung der Bindungskurven für das Heparin-Okta- und Dekasaccharid ein deutlich steilerer Anstieg als für die anderen Kettenlängen zu beobachten, was auf eine positive Kooperativität der Bindung hinwies. Es wurde ein Hill-Koeffizient für das Okta- und Dekasaccharid von 2,0 bzw. 1,8 bestimmt. Diese Ergebnisse können mit einer gleichzeitigen Bindung des Heparinmoleküls an beide IL-10-Untereinheiten erklärt werden. Falls die Bindung an die zweite Untereinheit schnell erfolgt, z. B. weil der Ligand räumlich fixiert ist, so existiert das Protein nur in zwei Zuständen – ungebunden und mit beiden Bindungsstellen besetzt. Der Hill-Koeffizient entspricht dann der Anzahl an Bindungsstellen.

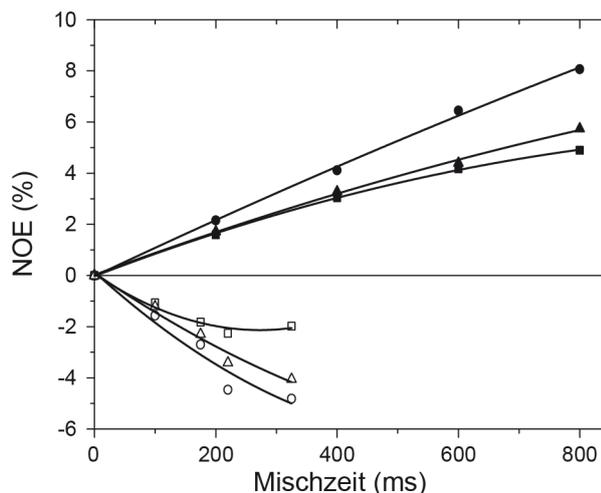
4.3. Strukturbestimmung von freiem und IL-10-gebundenem Heparin

Die Struktur eines Heparin-Tetrasaccharidfragments ($\Delta\text{UA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}(1\rightarrow4)\text{IdoA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}$) wurde aus ^1H - ^1H -Abstandsinformationen, die mit trNOESY- und ROESY-Experimenten erhalten wurden, durch *Simulated Annealing*-MD-Simulationen berechnet. Der trNOE-Effekt war an einer Änderung des Signalvorzeichens in Gegenwart des Proteins zu beobachten (Abbildung 4.15 und Abbildung 4.16).

Die Strukturen von längeren Heparinmolekülen mit mehr als vier Zuckerringen konnten mit dieser Vorgehensweise nicht mehr untersucht werden. Zum einen führt der Aufbau des Heparins aus sich immer wiederholenden, identischen Disaccharideinheiten zu einer starken Überlappung von Signalen und verhindert die eindeutige Zuordnung und Quantifizierung von NOEs für einzelne Zuckerringe. Zum anderen zeigen dann sowohl der freie als auch der proteingebundene Ligand einen negativen NOE. Bei schwacher Bindung (bzw. schnellem Austausch) ist das Spektrum somit eine Überlagerung aus beiden Zuständen und der NOE kann keinem einzelnen Zustand eindeutig zugeordnet werden.

Abbildung 4.16 zeigt das 700 MHz-NOESY-Spektrum von Heparin-Tetrasaccharid in Abwesenheit und in Gegenwart von IL-10 bei einer Mischzeit von 150 ms und einer Temperatur von 25 °C. Unter diesen Bedingungen war der NOE von freiem Heparin annähernd null. Einige wenige positive NOEs waren zu beobachten: zwischen H2 und H3 sowie H4 und H5 des GlcNS,6S-Rings B und zwischen H4 und H5 von GlcNS,6S-Ring D; außerdem ein geringer negativer NOE zwischen H3 und H4 von IdoA,2S-Ring C, zwischen H3 und H4 von GlcNS,6S-Ring B und zwischen den H6-Protonen beider Glukosamin-Ringe. In Gegenwart von 5 mol% von IL-10 wurde dagegen eine Vielzahl von NOEs mit negativem Vorzeichen beobachtet. Dieses Ergebnis weist, zusammen mit den STD-Experimenten, eindeutig auf eine Interaktion zwischen IL-10 und Heparin hin, welche zu einer Erhöhung der mittleren Rotationskorrelationszeit des Liganden und damit zu einem negativen NOE-Ef-

Abbildung 4.15: trNOEs von Heparin I-S Disaccharid. NOEs von freiem (ausgefüllte Symbole) und von IL-10-gebundenem (offene Symbole) Heparin I-S wurden als Funktion der NOESY-Mischzeit bei 600 MHz und 25 °C gemessen. Der NOE entspricht hierbei dem Verhältnis aus Kreuzpeak- und Diagonalpeakintensität. Kreise, Dreiecke und Quadrate geben den NOE zwischen den Protonenpaaren H1 (Δ UA,2S) – H4 (GlcNS,6S), H1(GlcNS,6S) – H2 (GlcNS,6S) und H4 (Δ UA,2S) – H3 (Δ UA,2S) an.



fekt führt. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für das Heparin-Disaccharid gemacht. Hier änderte sich das Vorzeichen des NOEs von positiv im freien Zustand zu negativ in Gegenwart von IL-10 (Abbildung 4.15).

Um ^1H - ^1H -Abstandsdaten auch für das ungebundene Heparin-Tetrasaccharid zu erhalten und um auf mögliche Signale, die durch Spindiffusion zustande kamen, zu testen, wurden ROESY-Spektren in Abwesenheit und in Gegenwart von IL-10 aufgenommen (Abbildung 4.17). Ein Vergleich des ROESY-Spektrums von freiem Heparin (Abbildung 4.17 A) mit dem NOESY-Spektrum von gebundenem Heparin (Abbildung 4.16 B) fand Kreuzsignale, die ausschließlich in letzterem Spektrum vorkamen, nämlich zwischen H2 von GlcNS,6S-Ring B bzw. Ring D und H1 von Δ UA,2S bzw. IdoA,2S, zwischen H2 von GlcNS,6S-Ring B und H3 und H4 von IdoA,2S-Ring C und schließlich zwischen H5 von IdoA,2S und H1 im selben Ring bzw. H1 im vorhergehenden GlcNS,6S-Ring B. Prinzipiell konnten diese Signale neue intramolekulare Kontakte der gebundenen Form von Heparin widerspiegeln. Jedoch wurden sie auch im ROESY-Spektrum in Gegenwart von IL-10 (Abbildung 4.17 B) vorgefunden, dort allerdings, anders als reguläre ROE-Signale, mit einem negativen Vorzeichen, d. h. mit dem gleichen Vorzeichen wie Diagonalsignale. Dies war ein Hinweis darauf, dass diese Signale nicht durch einen direkten NOE (bzw. ROE) zwischen zugehörigen Protonenpaaren zustande kamen, sondern das Ergebnis einer Spindiffusion über mehrere dazwischenliegende Protonen waren. Sie wurden deshalb nicht als Abstandsdaten in der nachfolgenden Strukturberechnung verwendet.

NOE- und ROE-Intensitäten wurden in Protonenpaarabstände umgerechnet (vgl. Abschnitt 3.5.1) und als Information für die Strukturberechnung durch MD-Simulationen verwendet. Für das freie Heparin wurden 42 ^1H - ^1H -Abstände gesammelt (Tabelle 4.2). Davon zeigten insgesamt 20 Abstände bei den generierten Strukturmodellen eine Abweichung vom Toleranzintervall von $< 0,2 \text{ \AA}$. Das Strukturensamble hatte eine strukturelle Diversität von $0,37 \text{ \AA}$. Für IL-10-gebundenes Heparin wurden 41 Protonenpaarabstände gesammelt (Tabelle 4.3). Insgesamt acht Abstände zeigten eine Abweichung vom Toleranzintervall von $< 0,1 \text{ \AA}$. Das generierte Strukturensamble hatte eine strukturelle Diversität von $0,43 \text{ \AA}$. Abbildung 4.18 zeigt die berechneten MD-Strukturmodelle und die repräsentative Struktur aus beiden Ensembles. Als solche wurde das MD-Modell ausgewählt, das den kleinsten mittleren RMSD zu allen anderen Strukturen aufwies.

4. Ergebnisse

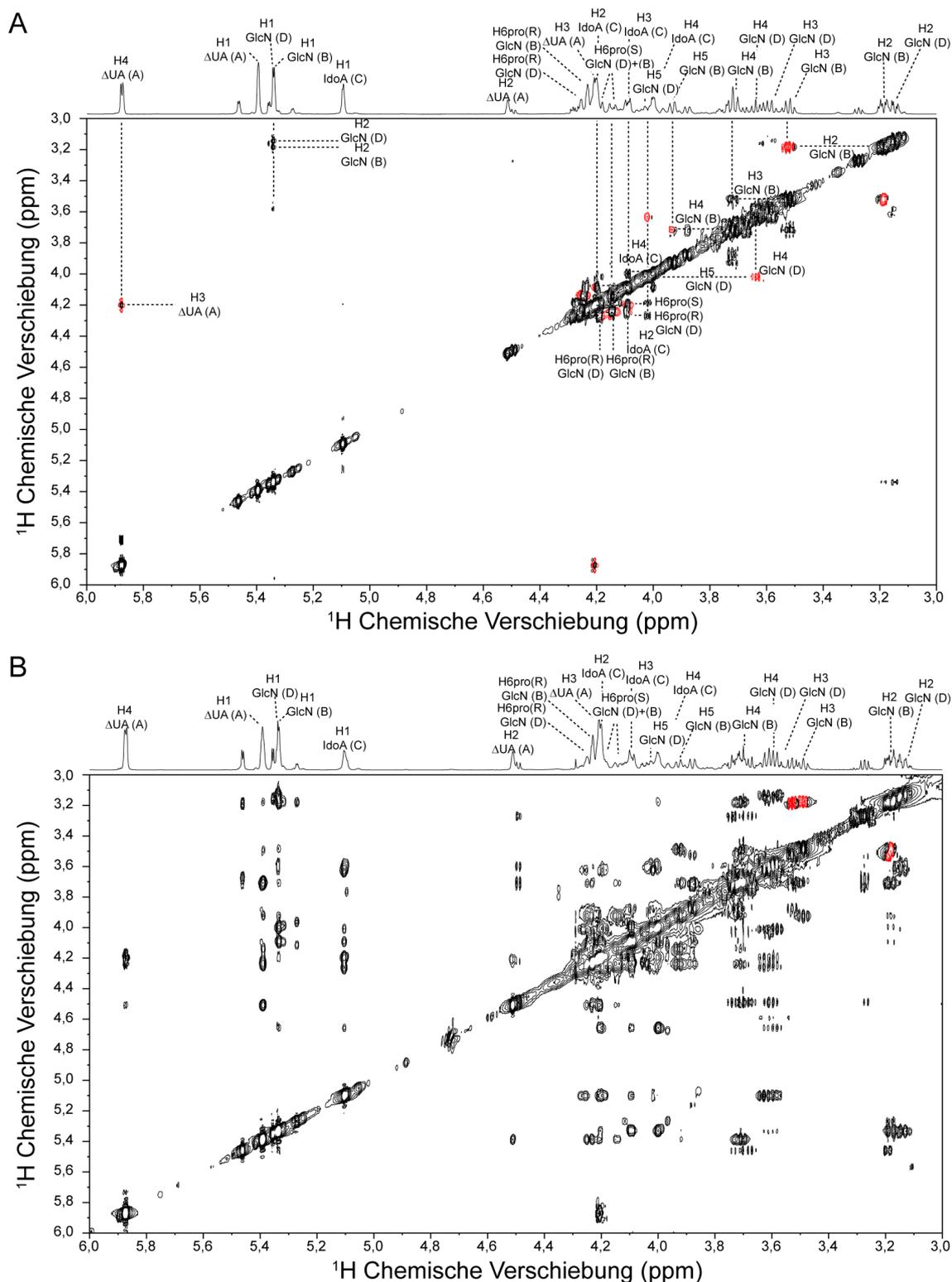


Abbildung 4.16.: 2D- $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektren von Heparin-Tetrasaccharid: (A) in Abwesenheit und (B) in Gegenwart von IL-10. In beiden Experimenten wurden gleiche Bedingungen verwendet: 700 MHz Protonenresonanzfrequenz, 25 °C, 150 ms NOESY-Mischzeit und ein Protein-Ligand-Verhältnis von 1:20. Für freies Heparin wurden nur wenige NOEs beobachtet (beschriftet in (A) und beschrieben im Text). Ein positiver NOE (bzw. negatives NMR-Signal) ist rot und ein negativer NOE (bzw. positives NMR-Signal) schwarz gezeichnet.

4.3. Strukturbestimmung von freiem und IL-10-gebundenem Heparin

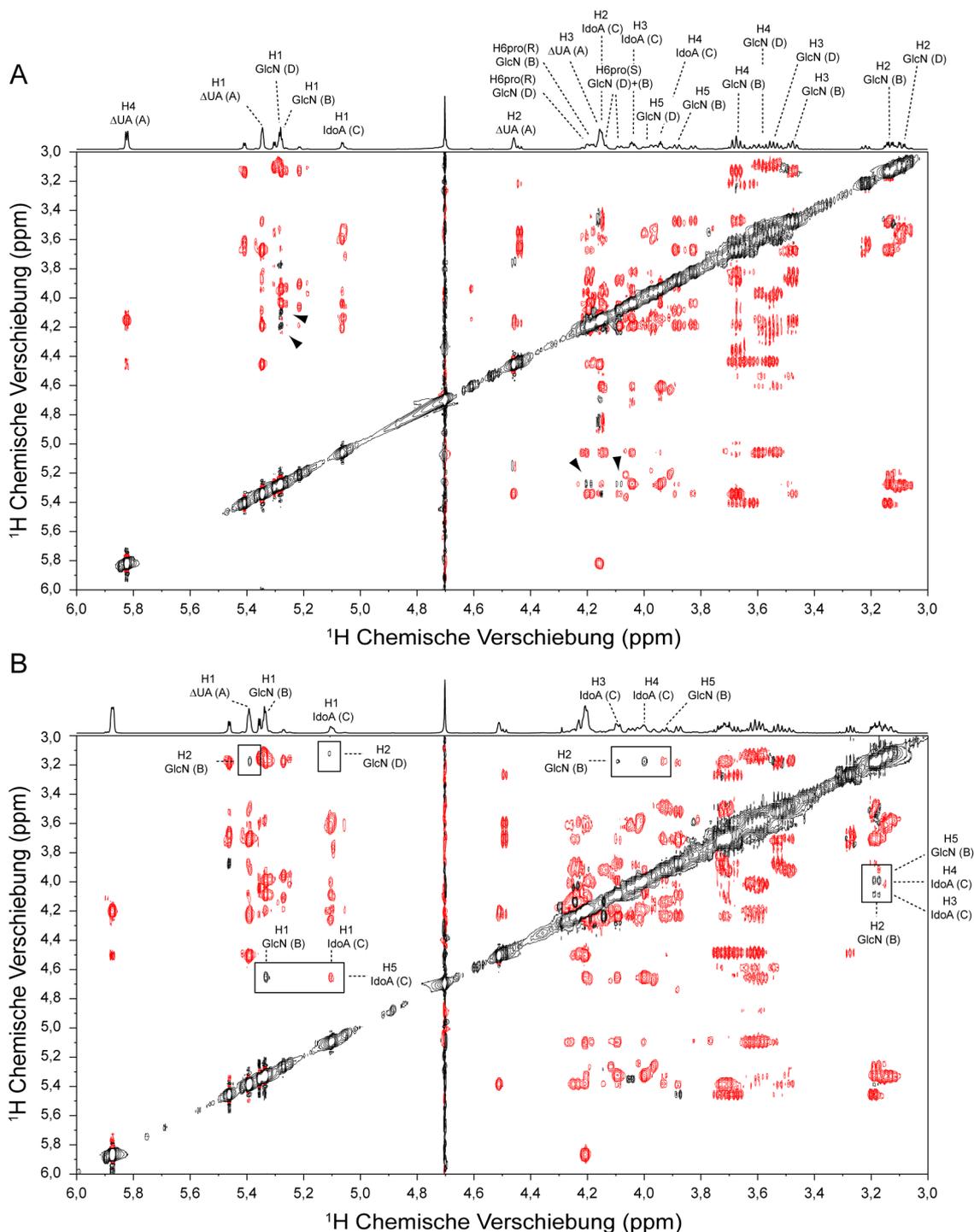


Abbildung 4.17.: 2D- $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY-NMR-Spektren von Heparin-Tetrasaccharid: (A) in Abwesenheit und (B) in Gegenwart von IL-10. Experimente wurden bei einer Protonenresonanzfrequenz von 700 MHz, einer Temperatur von 25 °C, einer Feldstärke des ROESY-CW-Spinlocks von 2,5 kHz und einer ROESY-Mischzeit von (A) 300 ms bzw. (B) 150 ms durchgeführt. Das Protein-Ligand-Verhältnis in (B) betrug 1:20. ROE-Signale, die durch Spindiffusion, also durch Kreuzrelaxation über dazwischenliegende Protonen entstehen und nicht den direkten räumlichen Abstand widerspiegeln, zeigen das gleiche Vorzeichen wie Diagonalepeaks (rot). Dies wurde in (A) nur für den ROE zwischen H2 und H6 des GlcN-Rings B beobachtet (Pfeile). In Gegenwart des Proteins (B) wurden neue ROE-Signale (eingerahmte Regionen) detektiert, von denen einige ein negatives Vorzeichen (schwarz) aufwiesen, also das Ergebnis von Spindiffusion waren.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.2.: Experimentelle ROE-abgeleitete ^1H - ^1H -Abstände für freies Heparin-Tetrasaccharid.

Proton	Zuckerrest	Ring	Proton	Zuckerrest	Ring	Abstand (Å)	Toleranz (±Å)
H1	ΔUA,2S	A	H2	ΔUA,2S	A	2,61	0,30
H1	ΔUA,2S	A	H6	GlcNS,6S	B	2,79	0,30
H1	ΔUA,2S	A	H3	ΔUA,2S	A	4,21	1,00
H1	ΔUA,2S	A	H6pro(S)	GlcNS,6S	B	3,71	0,60
H1	ΔUA,2S	A	H5	GlcNS,6S	B	3,73	0,60
H1	ΔUA,2S	A	H4	GlcNS,6S	B	2,31	0,30
H1	ΔUA,2S	A	H3	GlcNS,6S	B	3,35	0,60
H2	ΔUA,2S	A	H3	ΔUA,2S	A	2,68	0,30
H2	ΔUA,2S	A	H6pro(S)	GlcNS,6S	B	3,79	0,60
H4	ΔUA,2S	A	H3	ΔUA,2S	A	2,56	0,30
H1	GlcNS,6S	B	H3	IdoA,2S	C	2,56	0,30
H1	GlcNS,6S	B	H4	IdoA,2S	C	2,33	0,30
H1	GlcNS,6S	B	H2	GlcNS,6S	B	2,37	0,30
H1	GlcNS,6S	B	H3	GlcNS,6S	B	3,80	0,60
H1	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	3,87	0,60
H1	GlcNS,6S	B	H5	GlcNS,6S	B	3,70	0,60
H2	GlcNS,6S	B	H3	GlcNS,6S	B	2,86	0,30
H2	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	2,54	0,30
H3	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	2,86	0,30
H3	GlcNS,6S	B	H5	GlcNS,6S	B	2,56	0,30
H5	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	2,80	0,30
H5	GlcNS,6S	B	H6pro(S)	GlcNS,6S	B	2,64	0,30
H5	GlcNS,6S	B	H6pro(R)	GlcNS,6S	B	2,57	0,30
H6pro(S)	GlcNS,6S	B	H6pro(R)	GlcNS,6S	B	1,99	0,30
H6pro(S)	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	3,32	0,60
H6pro(R)	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	2,69	0,30
H1	IdoA,2S	C	H5	IdoA,2S	C	3,81	0,60
H1	IdoA,2S	C	H6pro(R)	GlcNS,6S	D	2,81	0,30
H1	IdoA,2S	C	H2	IdoA,2S	C	2,60	0,30
H1	IdoA,2S	C	H3	IdoA,2S	C	3,01	0,60
H1	IdoA,2S	C	H5	GlcNS,6S	D	3,79	0,60
H1	IdoA,2S	C	H4	GlcNS,6S	D	2,36	0,30
H2	IdoA,2S	C	H5	IdoA,2S	C	2,52	0,30
H3	IdoA,2S	C	H5	IdoA,2S	C	3,01	0,60
H4	IdoA,2S	C	H3	IdoA,2S	C	2,54	0,30
H4	IdoA,2S	C	H2	IdoA,2S	C	2,73	0,30
H4	IdoA,2S	C	H5	IdoA,2S	C	2,22	0,30
H1	GlcNS,6S	D	H2	GlcNS,6S	D	2,35	0,30
H1	GlcNS,6S	D	H3	GlcNS,6S	D	3,66	0,60
H1	GlcNS,6S	D	H6pro(S)	GlcNS,6S	D	3,70	0,60
H2	GlcNS,6S	D	H3	GlcNS,6S	D	2,88	0,30
H2	GlcNS,6S	D	H4	GlcNS,6S	D	2,71	0,30
H5	GlcNS,6S	D	H4	GlcNS,6S	D	2,81	0,30
H5	GlcNS,6S	D	H3	GlcNS,6S	D	2,79	0,30
H5	GlcNS,6S	D	H6pro(S)	GlcNS,6S	D	2,91	0,30
H5	GlcNS,6S	D	H6pro(R)	GlcNS,6S	D	2,99	0,30
H6pro(R)	GlcNS,6S	D	H4	GlcNS,6S	D	2,78	0,30

Tabelle 4.3.: Experimentelle NOE-abgeleitete ^1H - ^1H -Abstände für IL-10-gebundenes Heparin-Tetrasccharid.

Proton	Zuckerrest	Ring	Proton	Zuckerrest	Ring	Abstand (Å)	Toleranz (±Å)
H1	ΔUA,2S	A	H2	ΔUA,2S	A	2,72	0,60
H1	ΔUA,2S	A	H6pro(R)	GlcNS,6S	B	2,81	0,60
H1	ΔUA,2S	A	H3	ΔUA,2S	A	3,10	0,60
H1	ΔUA,2S	A	H6pro(S)	GlcNS,6S	B	3,25	0,60
H1	ΔUA,2S	A	H5	GlcNS,6S	B	3,76	0,60
H1	ΔUA,2S	A	H4	GlcNS,6S	B	2,42	0,60
H1	ΔUA,2S	A	H3	GlcNS,6S	B	3,72	0,60
H2	ΔUA,2S	A	H6pro(R)	GlcNS,6S	B	3,45	0,60
H2	ΔUA,2S	A	H3	ΔUA,2S	A	2,95	0,60
H2	ΔUA,2S	A	H6pro(S)	GlcNS,6S	B	3,70	0,60
H4	ΔUA,2S	A	H2	ΔUA,2S	A	4,08	1,00
H4	ΔUA,2S	A	H3	ΔUA,2S	A	2,64	0,60
H1	GlcNS,6S	B	H2	IdoA,2S	C	3,65	0,60
H1	GlcNS,6S	B	H3	IdoA,2S	C	2,52	0,60
H1	GlcNS,6S	B	H4	IdoA,2S	C	2,39	0,60
H1	GlcNS,6S	B	H5	GlcNS,6S	B	3,66	0,60
H1	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	3,80	0,60
H1	GlcNS,6S	B	H3	GlcNS,6S	B	4,09	1,00
H1	GlcNS,6S	B	H2	GlcNS,6S	B	2,52	0,60
H2	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	2,72	0,60
H5	GlcNS,6S	B	H6pro(S)	GlcNS,6S	B	2,35	0,60
H5	GlcNS,6S	B	H6pro(R)	GlcNS,6S	B	2,37	0,60
H5	GlcNS,6S	B	H3	GlcNS,6S	B	2,53	0,60
H5	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	3,13	0,60
H6pro(S)	GlcNS,6S	B	H6pro(R)	GlcNS,6S	B	1,87	0,30
H6pro(S)	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	3,28	0,60
H6pro(R)	GlcNS,6S	B	H4	GlcNS,6S	B	3,03	0,60
H1	IdoA,2S	C	H5	IdoA,2S	C	3,49	0,60
H1	IdoA,2S	C	H6pro(R)	GlcNS,6S	D	2,62	0,60
H1	IdoA,2S	C	H2	IdoA,2S	C	2,49	0,60
H1	IdoA,2S	C	H3	IdoA,2S	C	2,98	0,60
H1	IdoA,2S	C	H4	GlcNS,6S	D	2,33	0,60
H1	IdoA,2S	C	H3	GlcNS,6S	D	3,19	0,60
H2	IdoA,2S	C	H5	IdoA,2S	C	2,61	0,60
H2	IdoA,2S	C	H4	IdoA,2S	C	2,78	0,60
H4	IdoA,2S	C	H5	IdoA,2S	C	2,07	0,60
H1	GlcNS,6S	D	H4	GlcNS,6S	D	3,76	0,60
H1	GlcNS,6S	D	H3	GlcNS,6S	D	3,61	0,60
H1	GlcNS,6S	D	H2	GlcNS,6S	D	2,34	0,60
H2	GlcNS,6S	D	H3	GlcNS,6S	D	2,60	0,60
H2	GlcNS,6S	D	H4	GlcNS,6S	D	2,86	0,60
H2	GlcNS,6S	D	H5	GlcNS,6S	D	4,03	1,00
H5	GlcNS,6S	D	H3	GlcNS,6S	D	2,80	0,60
H5	GlcNS,6S	D	H4	GlcNS,6S	D	3,18	0,60
H5	GlcNS,6S	D	H6pro(R)	GlcNS,6S	D	2,47	0,60
H5	GlcNS,6S	D	H6pro(S)	GlcNS,6S	D	2,48	0,60
H6pro(R)	GlcNS,6S	D	H6pro(S)	GlcNS,6S	D	1,79	0,30
H6pro(R)	GlcNS,6S	D	H4	GlcNS,6S	D	2,75	0,60

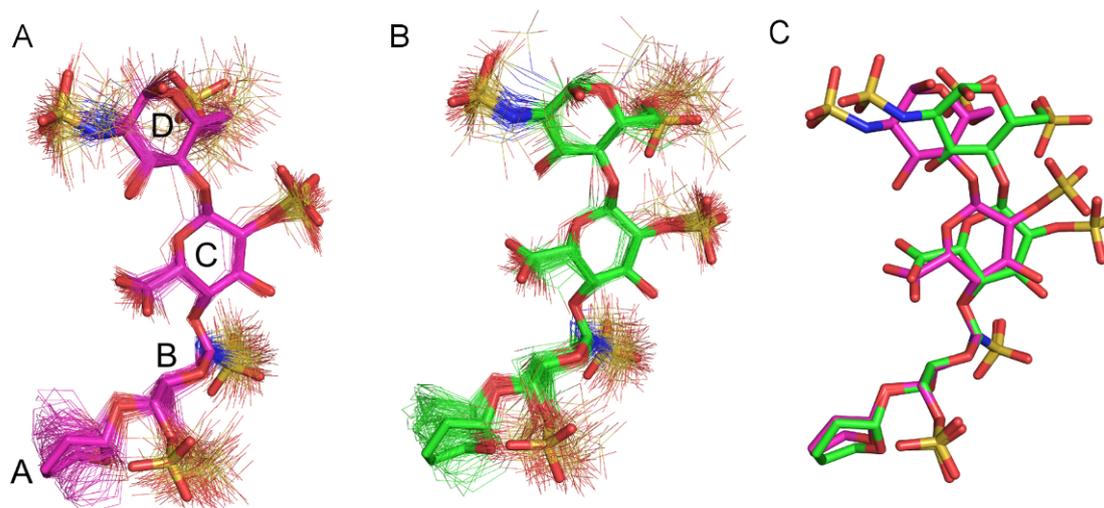


Abbildung 4.18.: Aus experimentellen NOE/ROE-Daten berechnete Strukturmodelle von Heparin-Tetrasaccharid. Ein Ensemble aus 100 MD-Strukturmodellen ist jeweils gezeigt für (A) freies und (B) IL-10-gebundenes Heparin. (C) Representative Strukturen aus beiden Ensembles sind gezeigt. Die Monosaccharid-Ringe sind, beginnend beim 4,5-ungesättigten Δ UA-Ring, mit Großbuchstaben von A bis D bezeichnet. Funktionelle Gruppe von Ring A sind nicht gezeigt, da dessen NOE-Daten infolge fehlender Kraftfeldparametrisierung nicht in der MD-Berechnung verwendet wurden (siehe dazu Abschnitt 3.5.2). Die Anfärbung des Strukturmodells spiegelt den Atomtyp wider: Kohlenstoff: violett bzw. grün, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Schwefel: gold.

Der Unterschied in der Rückgratstruktur zwischen freiem und gebundenem Heparin wurde anhand der Verteilung der Torsionswinkel der glykosidischen Bindung für beide Strukturensamble evaluiert. Für die Bindung zwischen Ring B und C war eine geringe Änderung in der Verteilung des ψ -Winkels festzustellen. Für die Bindung zwischen Ring A und B sowie zwischen C und D wurde eine signifikante Verschiebung in der Verteilung des ϕ -Winkels beobachtet (Abbildung 4.19). Weiter wurde die Orientierung der O-Sulfatgruppen analysiert. Unter den sechs O-Sulfatgruppen des Tetrasaccharids war nur die Orientierung der 6-O-Sulfatgruppe des GlcNS,6S-Rings B und D durch IL-10 beeinflusst. Das 6-O-Sulfat des Rings B zeigte eine Verschiebung in der Rotamerverteilung und eine Abweichung um $+10^\circ$ vom idealen Wert des *gauche-gauche* Rotamers (-60°) (Abbildung 4.20). Für das 6-O-Sulfat des Rings D wurde auch ein Anteil an *gauche-trans* Rotamer ($+60^\circ$) in Gegenwart von IL-10 beobachtet. Informationen zur Konformation der 6-O-Sulfatgruppe konnten auch aus dem Wert der 3J -Kopplungskonstante für die H5-H6-Kopplung erhalten werden, allerdings nicht für das gebundene Heparin-Tetrasaccharid, weil in diesem Fall die Signale zu breit waren. Für das freie Tetrasaccharid wurden folgende Kopplungskonstanten gemessen: $^3J_{\text{H5-H6pro(R)}} = 4,3 \text{ Hz}$ und $^3J_{\text{H5-H6pro(S)}} = 1,9 \text{ Hz}$ für Ring B sowie $^3J_{\text{H5-H6pro(R)}} = 4,6 \text{ Hz}$ und $^3J_{\text{H5-H6pro(S)}} = 1,9 \text{ Hz}$ für Ring D. Unter Verwendung einer Karplus-Gleichung für Glukopyranosen [253] wurde der Anteil an *gauche-gauche* und *gauche-trans* Konformation der C5-C6-Bindung für beide GlcNS,6S-Ringe B und D jeweils zu 70% und 30% bestimmt. Ähnliche Verhältnisse wurden auch für andere Glukopyranosen beobachtet [254].

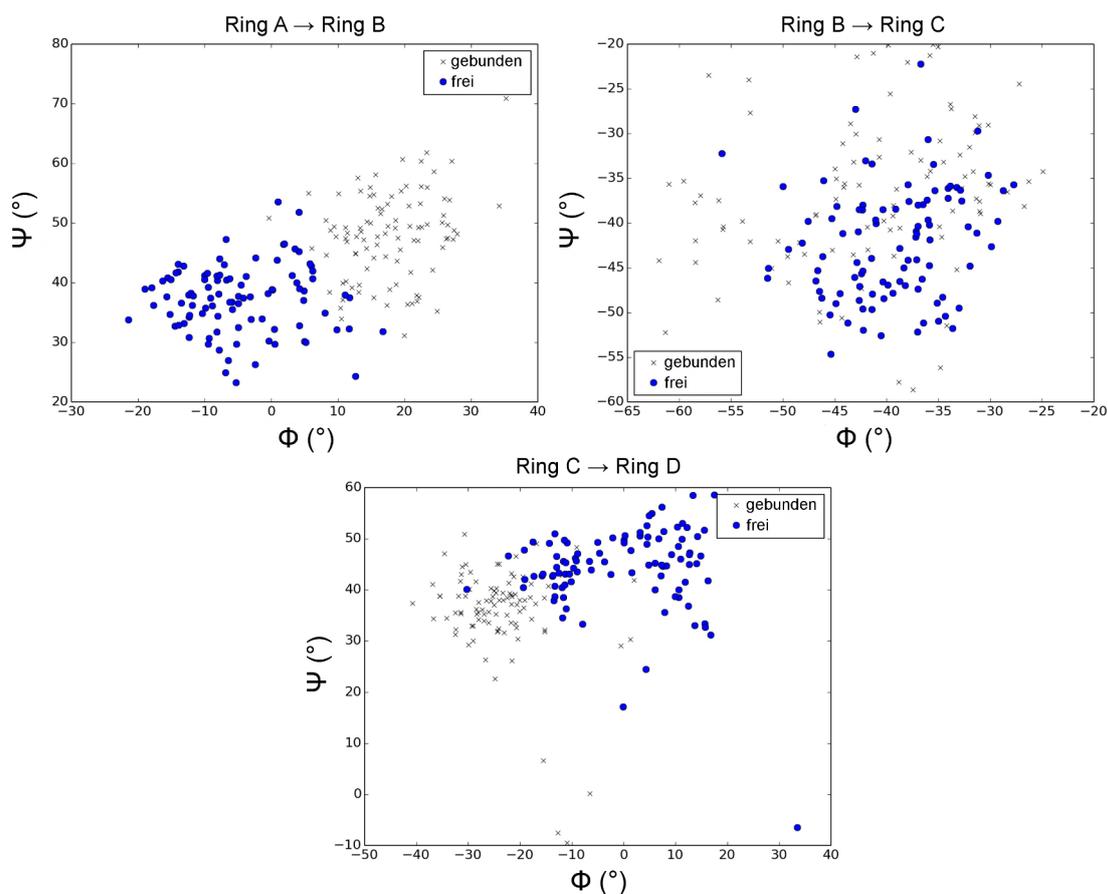


Abbildung 4.19.: Verteilungen der Torsionswinkel der glykosidischen Bindung in den berechneten MD-Strukturmodellen von Heparin-Tetrasaccharid. Eine Verteilung ist individuell für den freien und IL-10-gebundenen Fall sowie für jede glykosidische Bindung gezeigt. Die Torsionswinkel ϕ und ψ sind definiert für die Atomgruppen H1-C1-O4-C4 bzw. C1-O4-C4-H4.

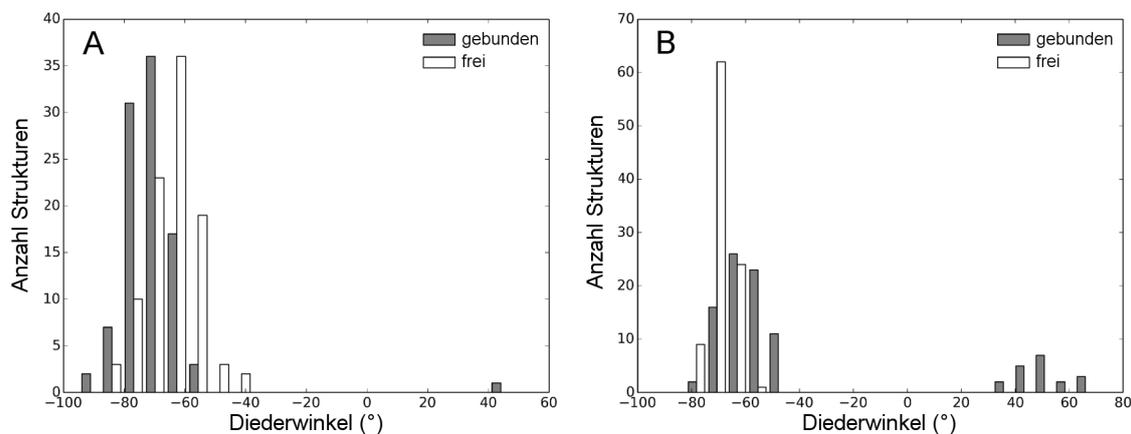


Abbildung 4.20.: Verteilung der 6-O-Sulfat-Orientierung in den berechneten MD-Strukturmodellen von freiem und IL-10-gebundenem Heparin-Tetrasaccharid: (A) GlcN-Ring B und (B) GlcN-Ring D. Die Orientierung wurde anhand des Diederwinkels für die Atomgruppe O5-C5-C6-O6 erfasst.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.4.: Experimentelle Werte der 3J -Kopplungskonstante (in Hz) für vicinale Protonenpaare des internen IdoA-Rings in Heparin-Tetrasaccharid. Zum Vergleich sind berechnete Werte für die 1C_4 und 2S_O -Konformation von IdoA in einem GlcN,6S-IdoA,2S-OMe Disaccharid angegeben [255].

Protonenpaar	Experiment		Referenz	
	frei	IL-10-gebunden	1C_4	2S_O
H1 - H2	3,14	3,03	1,61	5,41
H2 - H3	6,48	5,78	2,60	11,15
H3 - H4	3,95	3,55	2,54	4,87
H4 - H5	3,29	4,01	2,72	5,09

Als weiteres wichtiges Merkmal des Heparins wurde die Konformation der Iduronsäure, welche zwischen 1C_4 -Sesselform und 2S_O -*skew-boat*-Form wechseln kann, untersucht. Sowohl für das freie als auch für das gebundene Heparin-Tetrasaccharid wurde ein NOE/ROE-Signal zwischen H2 und H5 des IdoA,2S Rings C beobachtet. Dieser NOE (bzw. ROE) tritt ausschließlich beim 2S_O -Konformer auf und ist unvereinbar mit dem 1C_4 -Konformer aufgrund des größeren Abstands zwischen beiden Protonen in dieser Form (1C_4 : 4,0 Å, 2S_O : 2,4 Å). Das 2S_O -Konformer konnte hier also im freien und im gebundenen Zustand nachgewiesen werden. Eine quantitative Aussage zum 1C_4 : 2S_O -Gleichgewicht wurde schließlich aus Messung der 3J -Kopplungskonstanten für den IdoA,2S-Ring und Vergleich mit berechneten 3J -Werten für ein GlcN,6S-IdoA-OMe Disaccharid erhalten (Tabelle 4.4). Danach betrug das 1C_4 : 2S_O -Verhältnis der Iduronsäure im Heparin-Tetrasaccharid 59(\pm 8)% : 41(\pm 8)% im freien Zustand und 33(\pm 4)% : 67(\pm 4)% im IL-10-gebundenen Zustand.

4.4. Zuordnung der NMR-chemischen Verschiebungen von murinem IL-10

Eine Zuordnung der chemischen Verschiebungen von IL-10 zu den H_N -, N_H -, C' - und C_α -Atomen des Proteinrückgrats sowie zu den C_β -Atomen der Aminosäureseitenkette wurde durch dreidimensionale Tripelresonanzexperimente erreicht. Die experimentellen Parameter sind in Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Zur Erhöhung der Sensitivität der NMR-Experimente und Verbesserung der Spektrenqualität mussten die Beschaffenheit der Proteinprobe sowie Temperatur und pH-Wert optimiert werden. Abbildung 4.21 zeigt den Effekt von Temperaturerhöhung und Deuterierung der IL-10-Probe auf die Spektrenqualität anhand eines $^1H/^{15}N$ -HSQC-Experiments. Bei 20 °C konnten von der undeuterten Probe nur wenige Signale detektiert werden, mit z. T. großen Unterschieden in ihrer Intensität. Eine Temperaturerhöhung auf 30 °C führte zu einer deutlichen Verbesserung der Qualität des Spektrums. Es konnten ähnlich viele Signale beobachtet werden wie für eine Probe mit Deuterierung und wie anhand der Aminosäureanzahl des IL-10-Proteins zu erwarten war. Allerdings waren die Signale noch sehr breit und aufgrund mehrfacher Überlappung z. T. schwer voneinander zu unterscheiden. Eine weitere deutliche Verbesserung des Spektrums wurde durch eine 75%ige Deuterierung des Proteins, zur Verringerung der 1H - 1H dipo-

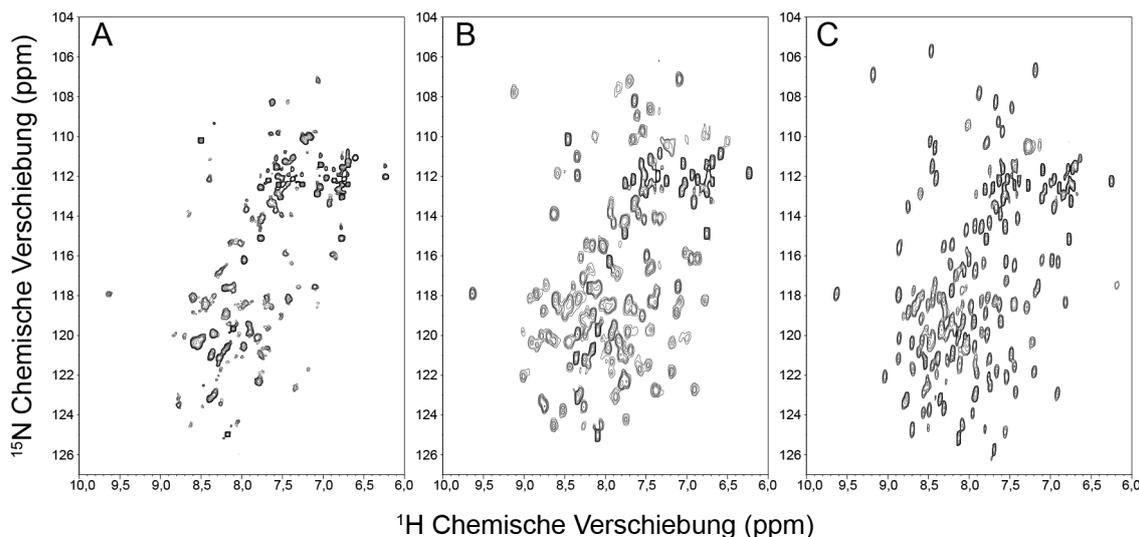


Abbildung 4.21.: Optimierung der Qualität der IL-10-NMR-Spektren durch Deuterierung. Es sind $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren aus Probenpräparationen mit und ohne Deuterierung sowie in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt: (A) nur ^{15}N -markiertes IL-10 gemessen bei 20 °C, (B) nur ^{15}N -markiertes IL-10 gemessen bei 30 °C, (C) 75% deuteriertes und vollständig ^{15}N -markiertes IL-10 gemessen bei 30 °C.

laren Kopplung als wichtigsten Relaxationsmechanismus der Amidprotonen, erreicht. Die Signalbreite in der ^1H -Dimension war deutlich reduziert im Spektrum des deuterierten Proteins und Signale waren besser separiert. Keine zusätzliche Verringerung der Linienbreite aufgrund der Deuterierung war allerdings in der ^{15}N -Dimension zu beobachten, was wahrscheinlich auf den Deuterium-Isotopeneffekt aufgrund der unvollständigen Markierung des Proteins mit ^2H zurückzuführen ist (siehe weitere Ausführungen dazu in Abschnitt 5.1). Schließlich wurde mit Deuterierung auch eine zusätzliche Sensitivitätssteigerung erreicht und so konnten 2D-Experimente auch bei geringeren Temperaturen (z. B. 20 °C) aufgenommen werden. Für einige 3D-Experimente mit geringer Sensitivität (z. B. das HN(CA)CO-Experiment) war dagegen weiterhin eine hohe Temperatur (d. h. 30 °C) notwendig, um eine ausreichende Signalstärke zu erzielen.

Abbildung 4.22 zeigt die 3D-NMR-Spektren, die für die Zuordnung von IL-10 verwendet wurden. Alle Experimente stellten sog. *In-and-Out*-Experimente dar, die mit Anregung des $^1\text{H}_\text{N}$ -Atoms beginnen, Magnetisierung auf ^{15}N und ^{13}C in der Proteinhaupt- bzw. Seitenkette übertragen, die ^{15}N - und ^{13}C -chemische Verschiebung evolvieren und mit der Detektion der $^1\text{H}_\text{N}$ -Magnetisierung enden. Um Konnektivitäten zwischen aufeinanderfolgenden Aminosäureresten herzustellen, wurde nach übereinstimmenden Signalen für C' , C_α oder C_β in den detektierten ^1H - ^{15}N - ^{13}C -Korrelationen gesucht. Die Richtung der Aminosäurekette wurde eindeutig bestimmt, indem für jeden C-Atomtyp jeweils zwei Experimente durchgeführt wurden – ein erstes zur Detektion des Vorgängers und der eigenen Aminosäure (HN(CA)CO, HNCA, HNCACB) und ein zweites zur Detektion nur des Vorgängers (HNCO, HN(CO)CA, HN(CO)CACB).

Die Aminosäurezuordnung zu den $^1\text{H}_\text{N}$ - $^{15}\text{N}_\text{H}$ -Korrelationen im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von IL-10 ist in Abbildung 4.23 gezeigt. Unter den angegebenen experimentellen Bedingungen wurden 151 Signale von Rückgrat-Amidgruppen im Spektrum detek-

4. Ergebnisse

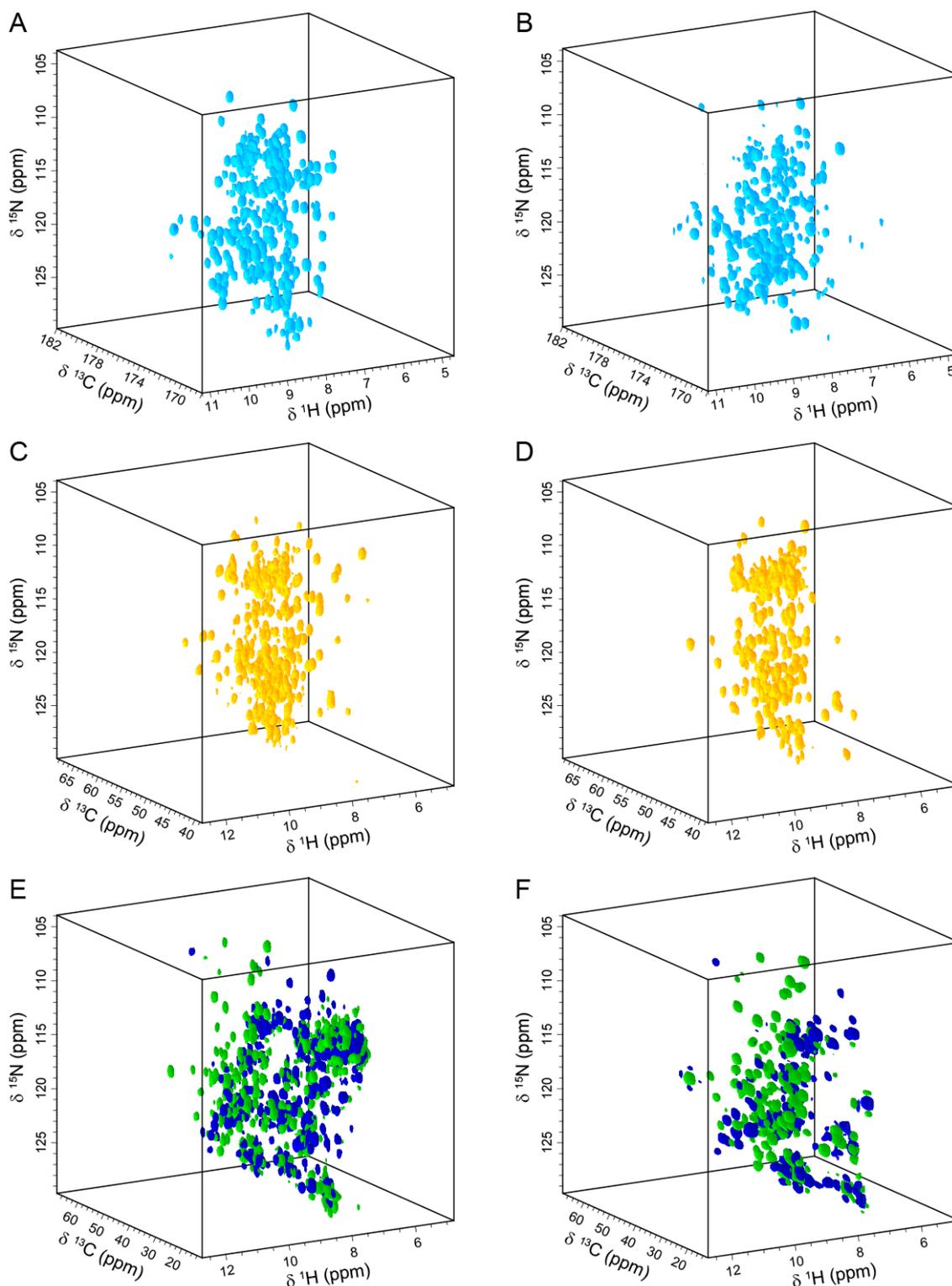


Abbildung 4.22.: 3D- $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von IL-10 C149Y. Die Spektren wurden bei einer Protonenresonanzfrequenz von 800 MHz (Spektren A und B) bzw. 700 MHz (Spektren C - F), 30 °C, pH 6,2 und mit den folgenden Experimenten aufgenommen: (A) HNC0, (B) HN(CA)CO, (C) HNCA, (D) HN(CO)CA, (E) HNCACB, (F) HN(CO)CACB.

4. Ergebnisse

chemischer Verschiebung und Sekundärstruktur. Die Lage der Sekundärstrukturelemente in IL-10 wurde anhand der sekundären ^{13}C -chemischen Verschiebungen (d. h. der Differenz zum Referenzwert der *Random Coil*-Struktur) [154, 256, 155] und mit Hilfe von TALOS+ [257] bestimmt (Abbildung 4.24). Dabei wurde eine gute Übereinstimmung mit den α -Helixregionen, die in der Kristallstruktur gefunden wurden, beobachtet. Weiter wurde von TALOS+ auch ein Ordnungsparameter S^2 für das Proteinrückgrat vorhergesagt. Dieser beruht auf einem empirischen Zusammenhang zwischen sekundären chemischen Verschiebungen und der Amplitude von strukturellen Fluktuationen im Proteinrückgrat [258]. Der Ordnungsparameter ist für weite Bereiche in IL-10 hoch ($S^2 \sim 0,9$), d. h., das Proteinrückgrat ist sehr rigide. Geringe Ordnungsparameter ($S^2 \sim 0,6$) wurden für *Loop*-Regionen (vor allem den *AB-Loop*), die ersten 20 Aminosäuren und den C-Terminus vorhergesagt.

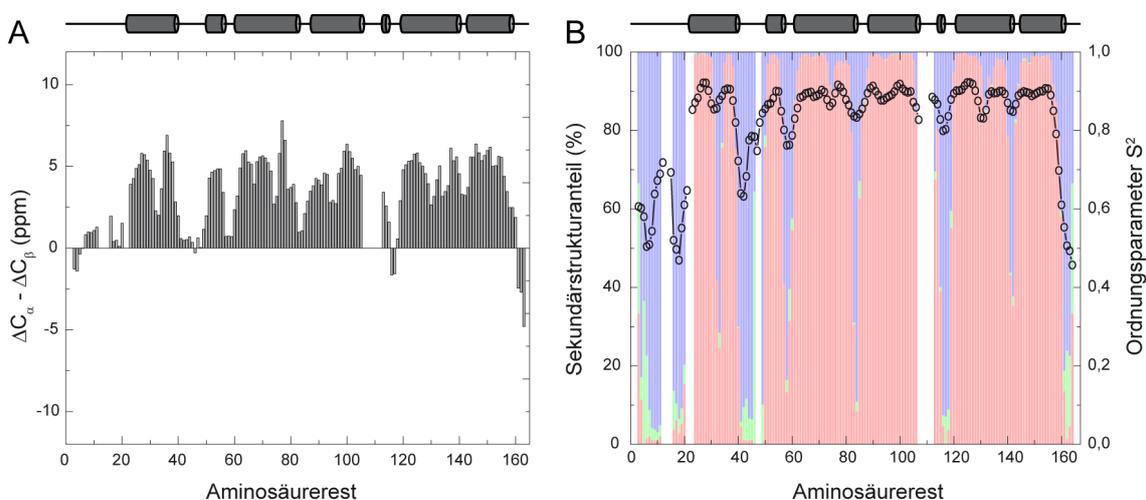


Abbildung 4.24.: Sekundärstrukturbestimmung von IL-10 C149Y. (A) Der Unterschied zwischen der $^{13}\text{C}_{\alpha}$ - und $^{13}\text{C}_{\beta}$ -chemischen Verschiebung relativ zum Referenzwert von *Random Coil*-Struktur ($\Delta C_\alpha - \Delta C_\beta$) ist dargestellt. Der Wert von $\Delta C_\alpha - \Delta C_\beta$ für eine bestimmte Aminosäure i stellt den Mittelwert für drei aufeinanderfolgende Positionen $i - 1$, i und $i + 1$ dar. Positive Werte geben eine α -Helix an, während Aminosäuren in einem β -Faltblatt negative Werte ergeben. (B) Vorhersage des Sekundärstrukturanteils (α -Helix: rot, β -Faltblatt: grün, *Loop*: blau) und eines Ordnungsparameters für das Proteinrückgrat (schwarze Kreise) auf Grundlage der $^1\text{H}_\text{N}$ -, $^{15}\text{N}_\text{H}$ -, $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -, $^{13}\text{C}_{\beta}$ - und $^{13}\text{C}'$ -chemischen Verschiebungen mittels TALOS+ [257, 258]. Als Vergleich ist jeweils die Lage der α -Helixregionen in der Kristallstruktur von IL-10 (repräsentiert als graue Zylinder) gezeigt.

4.5. Bestimmung der Kristallstruktur von murinem IL-10

Die räumliche Struktur von murinem IL-10, in diesem Abschnitt mit mIL-10 abgekürzt, wurde durch Kristallisation und Röntgenbeugungsmessungen bestimmt. Da das Wildtyp-Protein nicht kristallisiert werden konnte, wurden verschiedene Proteinmodifikationen ausprobiert. Eine erste Maßnahme war die Verkürzung des N-Terminus um acht Aminosäurereste. Aus der Sekundärstrukturanalyse durch NMR-Spektroskopie war bekannt, dass die ersten 20 Aminosäuren in mIL-10 unstrukturiert sind und TALOS+-Ordnungsparameter hatten eine hohe Mobilität des Proteinrückgrats in diesem Bereich vorhergesagt. Beide

Tabelle 4.5.: Statistik der Röntgenbeugungsdaten für den IL-10 N Δ 8, C149Y Kristall und des daraus berechneten Strukturmodells.

Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Parameter Elementarzelle (\AA , $^\circ$)	$a = 39,77$; $b = 80,92$; $c = 84,32$; $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Auflösung (\AA)*	42,15 - 2,05 (2,16 - 2,05)
Anzahl nicht redundanter Reflexe*	17734 (2526)
Multiplizität	4,8
Vollständigkeit (%)*	100 (99,9)
$\overline{I}/\sigma(I)$ *	12,3 (2,9)
R_{sym} (R_{merge}) (%)*	8,3 (55,6)
Mosaizität ($^\circ$)	0,66
Lösungsmittelanteil (%)	30,58
Matthews-Koeffizient	1,77
Anzahl Moleküle pro asymmetrischer Einheit	2
R_{work} (%)	18,9
R_{free} (%)	24,6
Anzahl Aminosäurereste	283
Anzahl Wassermoleküle	57
mittlerer B-Faktor Protein (\AA^2)	30,8
mittlerer B-Faktor Wasser (\AA^2)	64,8
RMSD Bindungslänge (\AA)	0,014
RMSD Bindungswinkel ($^\circ$)	1,548
Ramachandran-Diagramm (%)	
Aminosäurereste in bevorzugten Regionen	97,2
Aminosäurereste in zusätzlich erlaubten Regionen	2,8

*Werte in Klammern beziehen sich auf die Reflexzone mit der höchsten Auflösung.

Faktoren wurden als ungünstig für die Proteinkristallisation bewertet. Der Protein-N-Terminus wurde allerdings nicht weiter als bis zu D9 verkürzt, um die Disulfidbrücke zwischen C12 und C108, die wichtig für die Ausbildung der nativen Proteinstruktur ist, nicht zu zerstören. Ein kurzer Überhang von drei Aminosäuren vor der Disulfidbrücke wurde ebenfalls belassen. Diese mIL-10-Variante (N Δ 8, C149Y) konnte mit 30% (v/v) Glycerolethoxylat, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M MES (pH 6.5) bei 19 $^\circ\text{C}$ und einer Proteinkonzentration von 5 - 10 mg/mL kristallisiert werden. Kristalle gehörten zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$. Ein Röntgenbeugungsdatensatz mit einer Auflösung von 2,05 \AA konnte aufgenommen werden. Tabelle 4.5 fasst die Ergebnisse der Datensammlung zusammen und gibt Angaben zum daraus berechneten und verfeinerten Strukturmodell. Die Kristallstruktur von mIL-10 N Δ 8, C149Y wurde in der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>) unter der Nummer 4X51 hinterlegt. Abbildung 4.25 zeigt ein *Cartoon*-Modell der Kristallstruktur von mIL-10 N Δ 8, C149Y. Interessanterweise enthielt der Kristall in der asymmetrischen Einheit statt dem Monomer das mIL-10-Dimer. Kleine Unterschiede in der Position der N- und C-terminalen Reste führten dazu, dass beide Untereinheiten nicht vollständig rotationssymmetrisch waren und somit die Dimerachse nicht mit einer Kris-

4. Ergebnisse

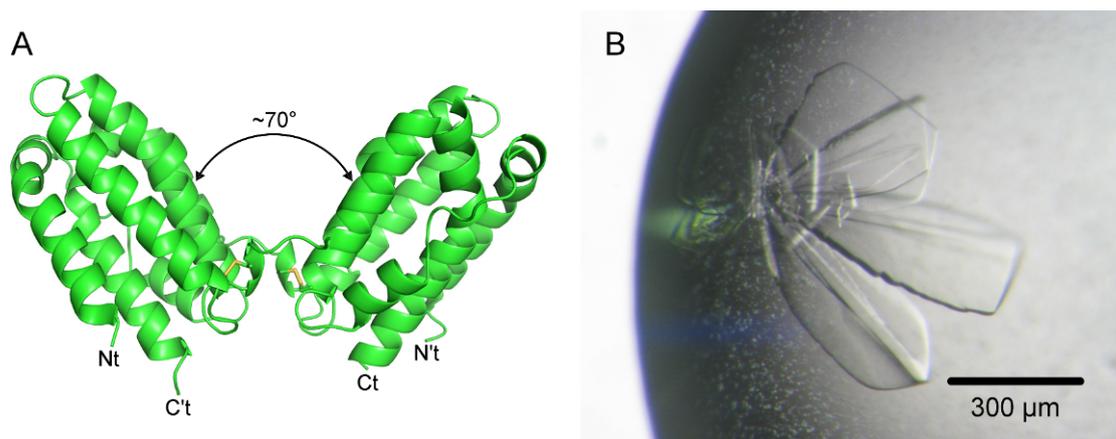


Abbildung 4.25.: Kristallstruktur und Kristallisation von mIL-10 N Δ 8, C149Y. (A) *Cartoon-*Modell von mIL-10 N Δ 8, C149Y. Die Lage der N- und C-Termini beider Dimeruntereinheiten und der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C62 und C114 ist gezeigt. Der Öffnungswinkel des Proteindimers betrug ca. 70°. (B) Kristalle hatten ein plättchenförmiges Aussehen und gehörten zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$.

tallachse zusammenfiel. Das verfeinerte Strukturmodell umfasste also zwei Ketten A und B mit den Aminosäuren G18 - K159 bzw. G18 - M158. Für die ersten neun Reste (D9 - V17) sowie für den His8-*Tag* konnte dagegen keine Elektronendichte im Kristall gefunden werden. Diese Beobachtung ist in Einklang mit den niedrigen Ordnungsparametern, die mit TALOS+ für die ersten 20 Aminosäuren vorhergesagt wurden. Auch C12 und die Disulfidbrücke zu C108 konnten im Kristall nicht gefunden werden. Ein möglicher Grund könnte die Strahlenschädigung und Radikalbildung im Kristall (durch den photoelektrischen Effekt), die zum Bruch kovalenter Bindungen (Disulfidbrücken, Decarboxylierung von Glutamat und Aspartat) führt, gewesen sein.

Um die Cokristallstruktur eines IL-10-GAG-Komplexes zu erhalten, wurden Kristalle von mIL-10 N Δ 8, C149Y mit verschiedenen GAG-Liganden getränkt oder von Beginn an in Gegenwart von GAG-Ligand in der Mutterlauge gezüchtet. Es wurden hohe Ligandkonzentrationen (bis 10 mM) eingesetzt, um die Proteinbindung möglichst zu sättigen. Leider konnte in keiner Kristallstruktur die Elektronendichte des Liganden aufgefunden werden. Als möglicher Grund wurde die dichte Molekülpackung im Kristall von mIL-10 N Δ 8, C149Y in Betracht gezogen. Die potentielle GAG-Bindungsregion in der Furche zwischen beiden Dimeruntereinheiten war hier durch ein benachbartes Proteinmolekül im Kristall besetzt und hätte die GAG-Bindung sterisch blockieren können. Aus diesem Grund wurde versucht, eine andere Kristallform von mIL-10 zu erzeugen. Für das virale (vIL-10, PDB # 1VLK) und humane IL-10-Protein (hIL-10, PDB # 2H24) sind Strukturen mit einer tetragonalen Kristallform bekannt. Eine Analyse ihrer Molekülpackung ergab eine deutlich geringere Packungsdichte und dass die potentielle GAG-Bindungsregion frei zugänglich war (Abbildung 4.26). Zwei Ansätze wurden ausprobiert, um eine neue mIL-10-Kristallform zu erzeugen. Einmal wurden die Aminosäurereste E81, K82, K88 und E89 jeweils durch ein Serin ersetzt. Diese Methode sollte den Entropieverlust bei Kristallisation, zum dem besonders Aminosäurereste mit langer Seitenkette an der Proteinoberfläche beitragen [259, 260, 261], verringern und zusätzlich einen Cluster an Serin-Resten als neu-

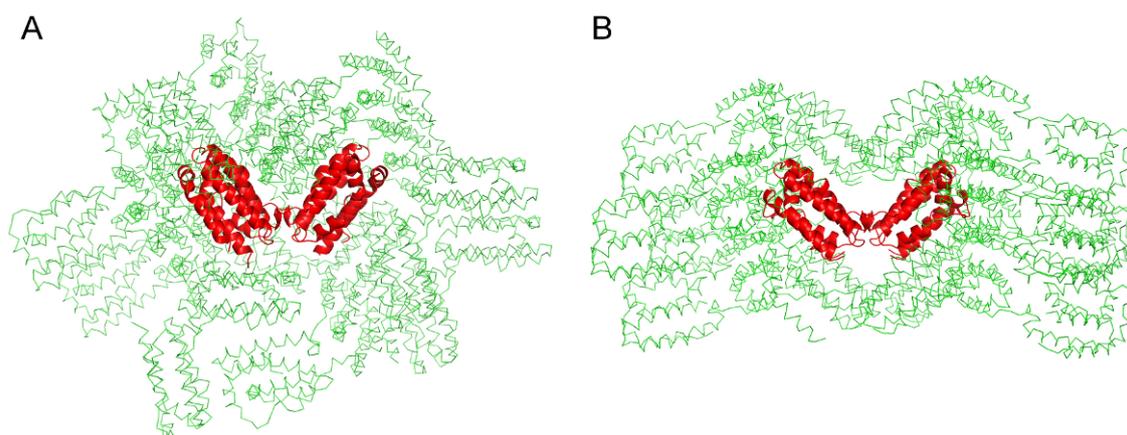


Abbildung 4.26.: Molekülpackung in den Kristallformen von mIL-10 (A) (PDB # 4X51) und vIL-10 (B) (PDB # 1VLK). Es sind alle benachbarten Proteinmoleküle im Abstand von 12 Å zum Protein im Zentrum (rot) gezeigt. Der Kristall von mIL-10 wies eine dichtere Molekülpackung auf – erkennbar auch am geringen Lösungsmittelanteil von 31% im Vergleich zu einem Wert von 42% im vIL-10-Kristall. Der Bereich zwischen beiden Dimeruntereinheiten wurde in der mIL-10-Kristallform durch ein benachbartes Proteinmolekül besetzt, während er im Kristall von vIL-10 frei zugänglich blieb.

en Kristallkontaktpunkt schaffen. Zwar wurden auch von dieser Proteinvariante Kristalle erhalten, allerdings in der gleichen orthorhombischen Raumgruppe wie zuvor. In einem zweiten Ansatz wurde dagegen versucht, die Kristallform von vIL-10 und hIL-10 durch Identifikation von Schlüsselkontakten und Einführung dieser in die Sequenz von mIL-10 zu reproduzieren. Die Sequenzunterschiede zwischen vIL-10 (bzw. hIL-10) und mIL-10 wurden analysiert und unter diesen Resten nach wichtigen Kristallkontakten gesucht. R32 und K49 wurden als Schlüsselstellen in den Kristallstrukturen von vIL-10 und hIL-10, in denen sie Salzbrücken zu benachbarten Proteinmolekülen ausbilden, identifiziert. mIL-10 besitzt dagegen an diesen Stellen ein Glutamin bzw. Threonin. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die beiden Reste R32 und K49 zur Ausbildung einer neuen Kristallform führen, wurden zusätzlich zu den bereits vorhandenen Proteinmodifikationen (NΔ8, C149Y) die beiden Punktmutationen Q32R und T49K eingeführt. Außerdem wurde auch der His8-*Tag* durch Insertion eines Stop-Codons im Anschluss an die mIL-10-Sequenz entfernt.

mIL-10 NΔ8, Q32R, T49K, C149Y konnte unter einer Vielzahl von Bedingungen (siehe Abschnitte 3.6.2 und A.1) bei 19 °C und bei einer Proteinkonzentration von 5 - 10 mg/mL kristallisiert werden. Kristalle gehörten zur tetragonalen Raumgruppe $P4_32_12$ und hatten ähnliche Elementarzellenparameter wie die Kristallstrukturen von vIL-10 und hIL-10. Es konnte ein Röntgenbeugungsdatensatz mit einer Auflösung von 2,25 Å aufgenommen werden. Tabelle 4.6 fasst die Ergebnisse der Datensammlung zusammen und gibt Angaben zum daraus berechneten und verfeinerten Strukturmodell. Abbildung 4.27 zeigt ein *Cartoon*-Modell der Kristallstruktur von mIL-10 NΔ8, Q32R, T49K, C149Y. Im Gegensatz zum orthorhombischen mIL-10-Kristall war in der asymmetrischen Einheit nur ein Monomer enthalten und das mIL-10-Dimer wurde durch die Kristallsymmetrie gebildet. Wiederum wurden die ersten N-terminalen Reste sowie die Disulfidbrücke zwischen C12 und

4. Ergebnisse

Tabelle 4.6.: Statistik der Röntgenbeugungsdaten für den IL-10 N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y Kristall und des daraus berechneten Strukturmodells.

Raumgruppe	$P4_32_12$
Parameter Elementarzelle (\AA , $^\circ$)	$a = b = 36,41$; $c = 213,85$; $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Auflösung (\AA)*	42,77 - 2,25 (2,37 - 2,25)
Anzahl nicht redundanter Reflexe*	7586 (1044)
Multiplizität	12,7
Vollständigkeit (%)*	100 (100)
$\overline{I}/\sigma(I)$ *	28,0 (5,6)
R_{sym} (R_{merge}) (%)*	4,2 (49,7)
Mosaizität ($^\circ$)	0,00
Lösungsmittelanteil (%)	38,50
Anzahl Moleküle pro asymmetrischer Einheit	1
Matthews-Koeffizient	2,00
R_{work} (%)	22,2
R_{free} (%)	25,4
Anzahl Aminosäurereste	141
Anzahl Ligandmoleküle (Carbonat)	2
Anzahl Wassermoleküle	10
mittlerer B-Faktor Protein (\AA^2)	73,73
mittlerer B-Faktor Wasser (\AA^2)	74,41
RMSD Bindungslänge (\AA)	0,010
RMSD Bindungswinkel ($^\circ$)	0,990
Ramachandran-Diagramm (%)	
Aminosäurereste in bevorzugten Regionen	95,2
Aminosäurereste in zusätzlich erlaubten Regionen	4,8

*Werte in Klammern beziehen sich auf die Reflexzone mit der höchsten Auflösung.

C108 nicht in der Elektronendichte des Kristalls gefunden. Das verfeinerte Strukturmodell umfasste die Aminosäurereste S20 - S160. Leider wurde auch in dieser Kristallstruktur kein GAG-Ligand gefunden, obwohl die Region zwischen den Dimeruntereinheiten frei zugänglich war. Andere Gründe, welcher der Detektion eines GAG-Liganden durch Kristallisation bisher im Wege standen, mögen ihre geringe Affinität zu IL-10 und hohe Flexibilität (z. B. der Konformationswechsel von Iduronsäure) gewesen sein.

Die beiden Kristallstrukturen von mIL-10 wurden mit den vorhandenen Strukturen von vIL-10 (PDB # 1VLK) und hIL-10 (PDB # 2ILK) verglichen. Es fiel auf, dass der Öffnungswinkel zwischen den beiden Dimeruntereinheiten in der Struktur von mIL-10 N Δ 8, C149Y geringer ist als in allen anderen Kristallstrukturen, was wahrscheinlich durch die andere Kristallpackung zustande kam. Die beiden Untereinheiten spannen hier einen Winkel von $\sim 70^\circ$ auf, während er in der zweiten mIL-10-Struktur und in der Struktur von viralem und humanem IL-10 $\sim 90^\circ$ beträgt. Der strukturelle Unterschied wurde weiter anhand der C_α -RMSD-Werte zwischen den IL-10-Dimerstrukturen nach Überlagerung quantifiziert (Abbildung 4.28). Zwischen mIL-10 N Δ 8, C149Y und der zweiten mIL-10-Kristallstruk-

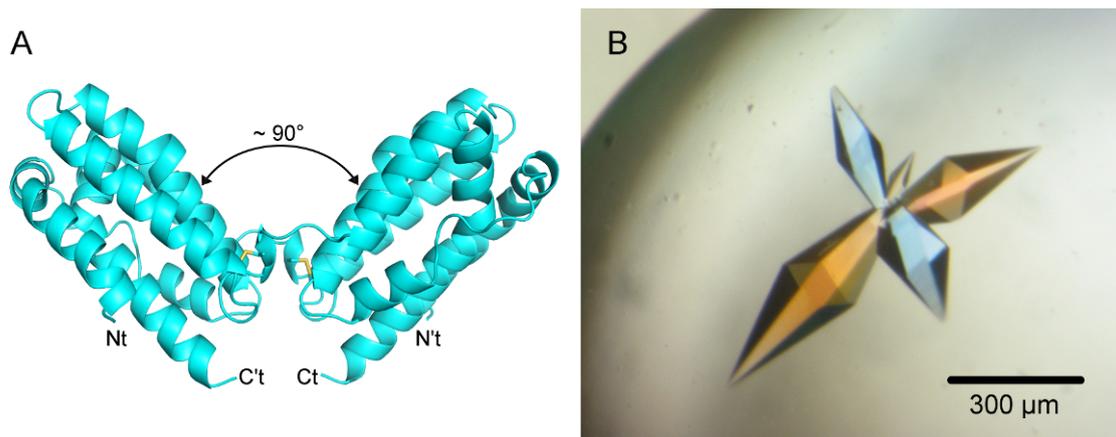


Abbildung 4.27.: Kristallstruktur und Kristallisation der mIL-10-Mutante N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y. (A) *Cartoon*-Modell von mIL-10 N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y. Die Lage der N- und C-Termini beider Dimeruntereinheiten und der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C62 und C114 ist gezeigt. Der Öffnungswinkel des Proteindimers betrug ca. 90°. (B) Kristalle hatten ein oktaederförmiges Aussehen und gehörten zur tetragonalen Raumgruppe $P4_32_12$.

tur beträgt der C_α -RMSD 1,95 Å. Zu hIL-10 und vIL-10 ist er 1,96 Å und 2,32 Å. Der C_α -RMSD von mIL-10 N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y zu hIL-10 und vIL-10 ist 0,89 Å und 0,83 Å. Das bedeutet: die strukturelle Ähnlichkeit bezüglich des Verlaufs des Proteinerückgrats ist größer zwischen mIL-10 N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y und hIL-10 bzw. vIL-10 als zwischen den beiden Kristallstrukturen von mIL-10 selbst. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Kristallpackung einen bedeutenden Einfluss auf die Anordnung von Proteinuntereinheiten, d. h. die Quartärstruktur, nehmen kann. Weiterhin erwähnenswert ist ein deutlicher Unterschied bei der Konformation des *AB-Loops* (Aminosäurereste 36 - 49) in der Struktur von vIL-10 im Vergleich zu den anderen Kristallstrukturen. Für die

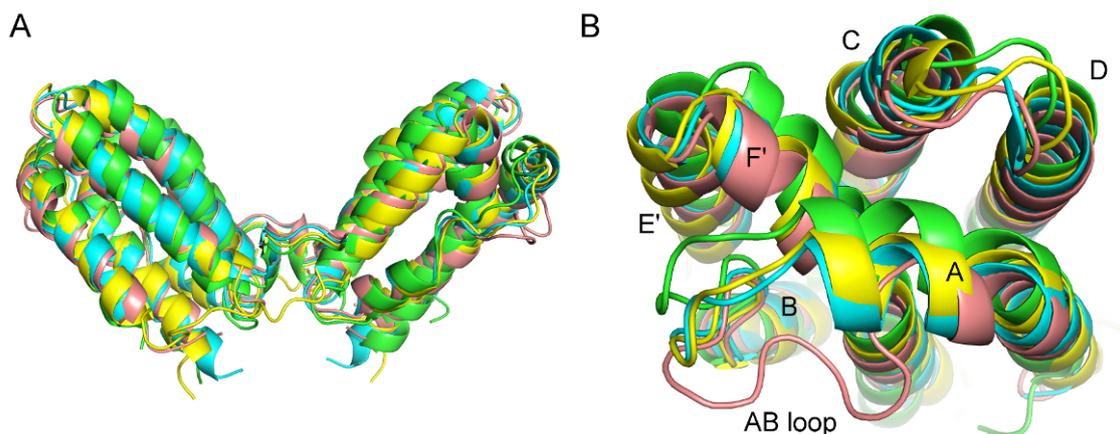


Abbildung 4.28.: Vergleich der Kristallstrukturen von mIL-10, hIL-10 und vIL-10. (A) Räumliche Überlagerung von mIL-10 N Δ 8, C149Y (grün; PDB # 4X51), mIL-10 N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y (cyan), hIL-10 (gelb; PDB # 2ILK) und vIL-10 (rosa; PDB # 1VLK). (B) Draufsicht auf eine Dimeruntereinheit entlang der langen Achse des 6-Helixbündels. Während die Position der Helices sehr ähnlich ist, zeigt der *AB-Loop* eine deutlich unterschiedliche Lage in der Kristallstruktur von vIL-10.

4. Ergebnisse

sen Bereich beträgt der C_{α} -RMSD von vIL-10 relativ zu hIL-10, mIL-10 N Δ 8, C149Y und mIL-10 N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y: 5,07 Å, 5,87 Å und 4,76 Å. Dagegen ist er zwischen den beiden mIL-10-Kristallstrukturen 1,84 Å und zwischen hIL-10 und mIL-10 N Δ 8, C149Y bzw. mIL-10 N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y 1,90 Å bzw. 0,81 Å.

Die Kristallisation von mIL-10 in der vorhergesagten tetragonalen Raumgruppe $P4_32_12$ durch Einführung der Mutationen Q32R und T49K bestätigte, dass R32 und K49 für IL-10 Schlüsselkontakte darstellen, um die Proteinkristallisation auszulösen und die Proteinmoleküle in einer definierten Kristallsymmetrie zu orientieren. In den untersuchten Kristallstrukturen bilden sie gleiche intermolekulare Interaktionen aus (Abbildung 4.29). In der Struktur von vIL-10 bildet R32 eine Salzbrücke zu D144 in einem Nachbarmolekül und in hIL-10 eine Wasserstoffbrücke zur Rückgrat-Carbonylgruppe von D44. Interessanterweise nimmt R32 in der Kristallstruktur von mIL-10 zwei alternative Konformationen ein – in der ersten bildet R32 eine Salzbrücke zu D144 in einem benachbarten IL-10-Molekül aus, in der zweiten interagiert R32 mit D44 in einem anderen Nachbarprotein. An der zweiten Kontaktstelle interagiert K49 in einer Salzbrücke mit E133 (in vIL-10 und hIL-10) bzw. D133 (mIL-10).

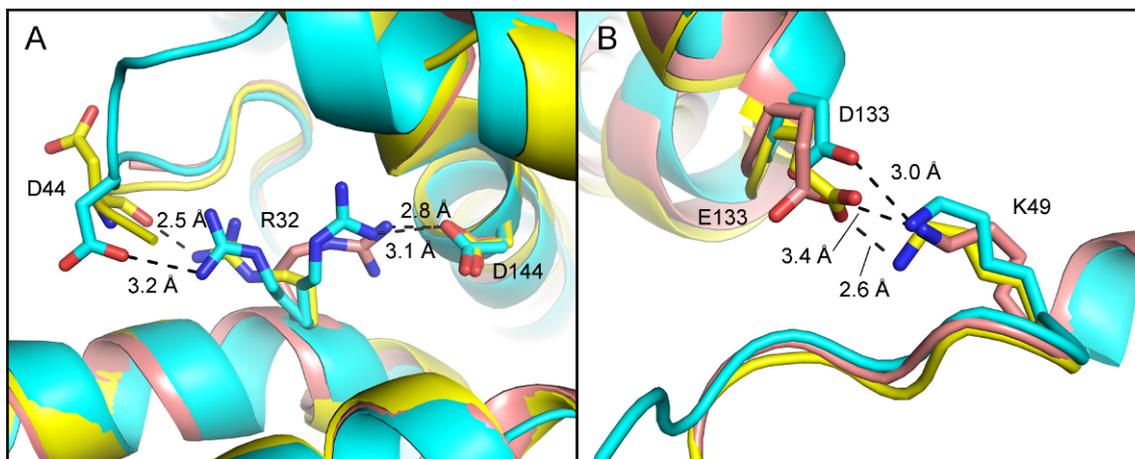


Abbildung 4.29.: Kristallkontakte von R32 und K49 in IL-10-Kristallformen. (A) In der Kristallstruktur von vIL-10 (rosa; PDB # 1VLK) bildet R32 eine Salzbrücke mit D144 und in hIL-10 (gelb; PDB # 2H24) eine Wasserstoffbrücke mit der Rückgrat-Carbonylgruppe von D44. In der Struktur von mIL-10 (cyan) wurde R32 in zwei Konformationen beobachtet – die erste beteiligt in einer Salzbrücke zu D144 und die zweite in einer Salzbrücke zu D44. (B) Kristallkontakt zwischen K49 und D133 im Fall von mIL-10 (cyan) bzw. E133 im Fall von hIL-10 (gelb) und vIL-10 (rosa). Aminosäureseitenketten sind als Stäbe dargestellt und entsprechend dem Atomtyp gefärbt: Kohlenstoff: cyan, rosa oder gelb; Sauerstoff: rot; Stickstoff: blau. Abstände zwischen Atomen sind als gestrichelte Linien eingezeichnet und ihre Werte in Å angegeben.

4.6. Bestimmung der GAG-Bindungsstelle von murinem IL-10 durch NMR

Die Position der GAG-Bindungsstelle in IL-10 wurde mit drei verschiedenen NMR-Methoden mit einander ergänzendem Informationsgehalt untersucht. Die Analyse von Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Amidgruppen und von Relaxationsverstärkun-

gen der Proteinsignale in Gegenwart eines paramagnetischen GAG-*Spinlabels* dienten dazu, die GAG-Bindungsregion in IL-10 näher einzugrenzen. Ein höher aufgelöstes Strukturmodell des IL-10-GAG-Komplexes wurde schließlich aus PCS-Daten, die durch Fixierung von Lanthanoidionen an IL-10 gesammelt wurden, erhalten.

4.6.1. Analyse der GAG-Bindungsstelle mit NH-chemischen Verschiebungen von IL-10

Änderungen in den $^1\text{H}_\text{N}$ - und $^{15}\text{N}_\text{H}$ -chemischen Verschiebungen der Polypeptidkette von IL-10 dienten als Indikator, um die IL-10-GAG-Bindung zu verfolgen. Im Verlauf der Titration mit GAGs wurden die NH-Signale graduell verschoben (Abbildung 4.30), was darauf hinwies, dass sich der Ligand im schnellen Austausch im Sinne der NMR-Zeitskala (d. h. $k_{\text{ex}} \gg \Delta\delta$) zwischen dem gebundenen Zustand und dem freien Zustand in Lösung befand. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der geringen Affinität der GAG-Liganden und den millimolaren bis mikromolaren K_D -Werten, die in den STD-Experimenten bestimmt wurden (Abschnitt 4.2.2). Für das Heparin-Tetrasaccharid (Abbildung 4.30) wurden die größten Änderungen der NH-chemischen Verschiebung ($\Delta\delta_{\text{NH}} > 0,07$ ppm bei einem Protein-Ligand-Verhältnis von 1:2) für die Aminosäurereste Q54, G59, L60, G61, die Teil des BC-*Loops* sind, und für C114 und E115 im DE-*Loop*, der beide Dimerun-

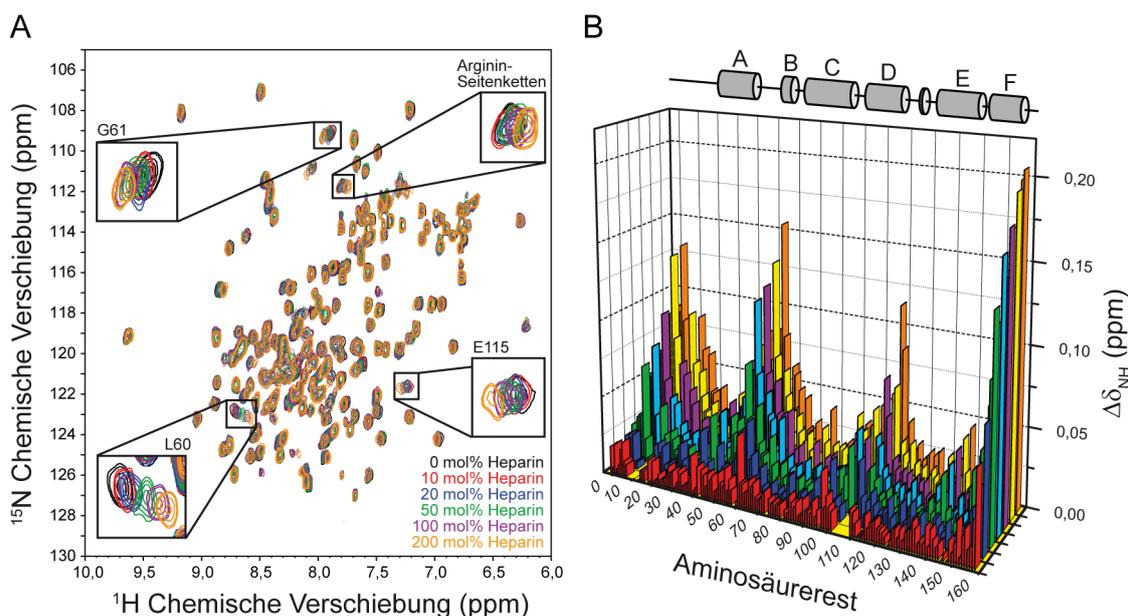


Abbildung 4.30.: Detektion der Bindung eines Heparin-Tetrasaccharids anhand der Amidsignalverschiebungen von IL-10. (A) Abfolge von $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren von IL-10 bei 600 MHz, 30 °C und pH 6,2 während einer Titration mit Heparin-Tetrasaccharid ($\Delta\text{UA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}(1\rightarrow4)\text{IdoA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}$). Ausgewählte Signale sind eingrahmt und hervorgehoben. (B) Gewichtete Änderungen der NH-chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{NH}}$) entlang der IL-10-Sequenz im Verlauf der Titration mit Heparin-Tetrasaccharid. Zum Vergleich der Lage der $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Werte mit der IL-10-Struktur ist die Proteinsekundärstruktur, d. h. die Position der α -Helices entlang der Aminosäuresequenz, oberhalb der Grafik angegeben. Histogramme entsprechen steigenden Heparinkonzentrationen: 10 mol% (rot), 20 mol% (blau), 50 mol% (grün), 75 mol% (hellblau), 100 mol% (lila), 150 mol% (gelb), 200 mol% (orange).

4. Ergebnisse

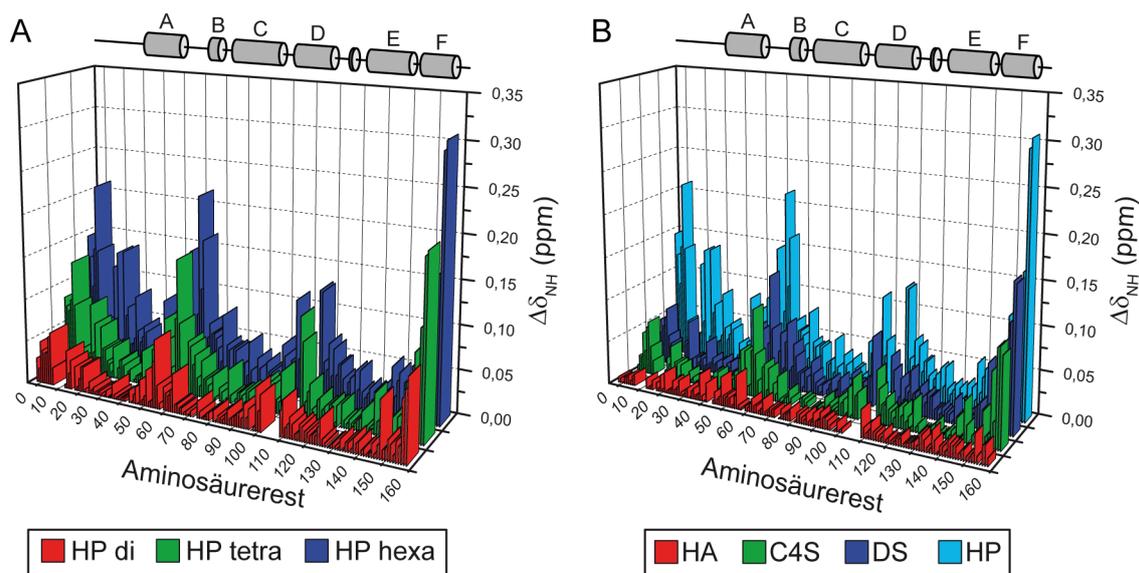


Abbildung 4.31.: Amidsignalverschiebungen von IL-10 induziert durch verschiedene GAG-Klassen und Größen. Gewichtete Änderung der NH-chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{NH}}$) entlang der IL-10-Sequenz für (A) verschiedene Heparin-Kettenlängen (zwei, vier und sechs Monosaccharid-Einheiten) und (B) verschiedene GAG-Hexasaccharide. Das Protein-Ligand-Verhältnis betrug für jeden Datensatz 1:2. Zum Vergleich der Lage der $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Werte mit der IL-10-Struktur ist jeweils die Proteinsekundärstruktur, d. h. die Position der α -Helices entlang der Aminosäuresequenz, oberhalb der Grafik angegeben. Abkürzungen bedeuten: HA: Hyaluronan, C4S: Chondroitin-4-sulfat; DS: Dermatan-sulfat, HP: Heparin.

tereinheiten verbindet, gefunden (Abbildung 4.32). Außerdem wurden hohe $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Werte für Reste des Protein-N- (Y5, S6, R7, E8, D9, N10, G18) und C-terminus (K159, L161, E162, H163) gefunden. Keine $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Werte konnten dagegen für die Aminosäurereste 12 - 16 und 107 - 113 bestimmt werden, da für diese keine NMR-Signalzuordnung vorlag. Ein Vergleich der $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Werte von verschiedenen GAG-Typen sowie verschiedenen langen Heparinmolekülen ergab für alle ein ähnliches $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Profil entlang der IL-10-Aminosäuresequenz (Abbildung 4.31). Diese Beobachtung legt die Schlussfolgerung nahe, dass alle GAGs, unabhängig von Art und Kettenlänge, an die gleiche Region in IL-10 binden. Allerdings stieg $\Delta\delta_{\text{NH}}$ bei gleichem Protein-Ligand-Verhältnis mit der Zahl der Disaccharideinheiten ($\Delta\delta_{\text{NH,di}} < \Delta\delta_{\text{NH,tetra}} < \Delta\delta_{\text{NH,hexa}}$) und mit dem GAG-Sulfatierungsgrad ($\Delta\delta_{\text{NH,C4S}} \leq \Delta\delta_{\text{NH,DS}} < \Delta\delta_{\text{NH,Heparin}}$) an, was eine Zunahme des gebundenen Anteils und der Bindungsstärke in dieser Reihenfolge widerspiegelte. Im Gegensatz dazu wurden für ein HA-Hexasaccharid keine signifikanten $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Werte gefunden, was darauf hinweist, dass HA bis zu dieser Molekülgröße nicht an IL-10 bindet.

4.6.2. Analyse der GAG-Bindungsstelle mit PRE-Daten

Eine weitere Eingrenzung der GAG-Bindungsregion gelang mit Hilfe von PRE-Daten. Ein paramagnetisches Ion (Mn^{2+} , Cu^{2+}) wurde über ein EDTA-markiertes HA-Tetrasaccharid in den IL-10-GAG-Komplex eingebracht und sein PRE-Effekt auf benachbarte Proteinreste gemessen. Die transversale Relaxationsrate der Amidprotonen wurde mit einem, um eine

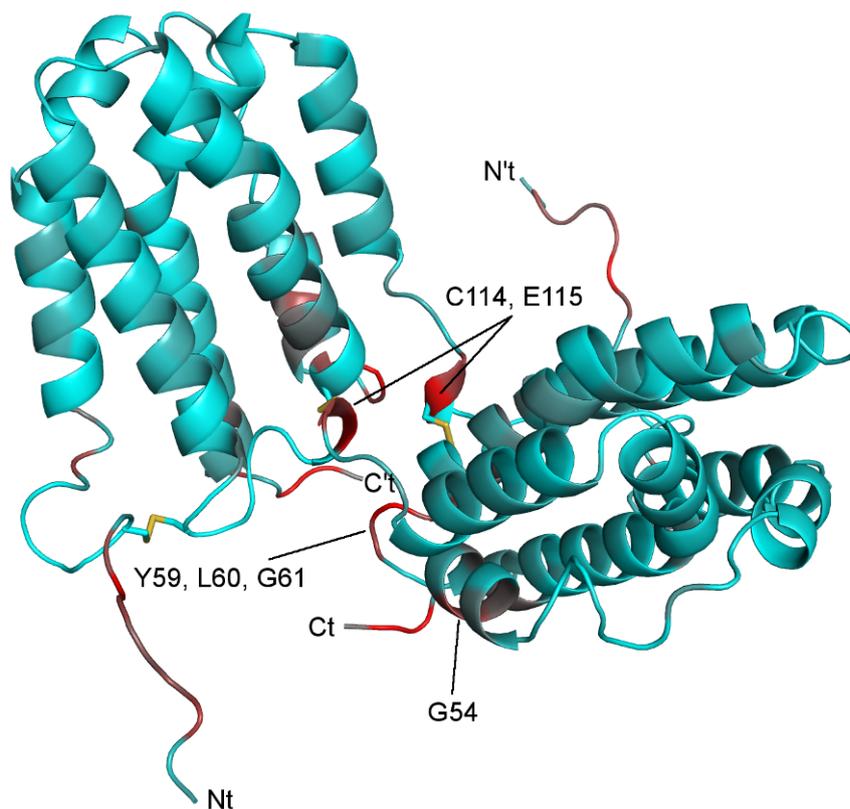


Abbildung 4.32.: Dreidimensionales *Cartoon*-Modell von IL-10 und strukturelle Interpretation der beobachteten Amidsignalverschiebungen. Aminosäurereste sind entsprechend ihres $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Wertes relativ zu dem von L60 (mit dem höchsten $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Wert) von cyan (0%) bis rot (100%) eingefärbt. Zur Visualisierung der $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Werte der N-terminalen Reste 3-17 und der C-terminalen Reste 159-162, welche nicht in der Kristallstruktur von IL-10 (PDB # 4X51) aufgelöst waren, wurde hier ein hypothetisches Modell für den Verlauf dieser Regionen an die Proteinstruktur angefügt.

Spinecho-Sequenz erweiterten HSQC-Experiment gemessen und ihr paramagnetischer Beitrag (Γ_2) bestimmt. Die Metallionenposition wurde als Indikator für die Lage der GAG-Bindungsregion aus den Γ_2 -Raten mit Hilfe einer *Simulated Annealing*-Berechnung mit Xplor-NIH bestimmt.

4.6.2.1. NMR-Charakterisierung eines EDTA-markierten, persulfatierten HA-Tetrasaccharids

Das EDTA-markierte, persulfatierte HA-Tetrasaccharid (psHA-EDTA) wurde von Sebastian Köhling aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Rademann (Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin) hergestellt (vgl. Abschnitt 3.7.3.1). Die Metallionenbindungskapazität wurde mit einem Eisen(III)-Thiocyanat-Test überprüft. Bei eingesetzten äquimolaren Mengen an psHA-EDTA und Fe^{3+} wurden zwischen 80% (Probe aus der 2. Synthese) bis 100% (Probe aus der 1. Synthese) des Metallions durch psHA-EDTA gebunden.

Die chemische Struktur der Verbindung konnte weitestgehend durch NMR-Spektroskopie verifiziert werden. Abbildung 4.33 und Abbildung 4.34 zeigen das 1D- ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum sowie das 2D- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum von psHA-EDTA. Eine partielle Signalzuordnung ist angegeben. Alle Signale der Zuckerringprotonen des HA-

4. Ergebnisse

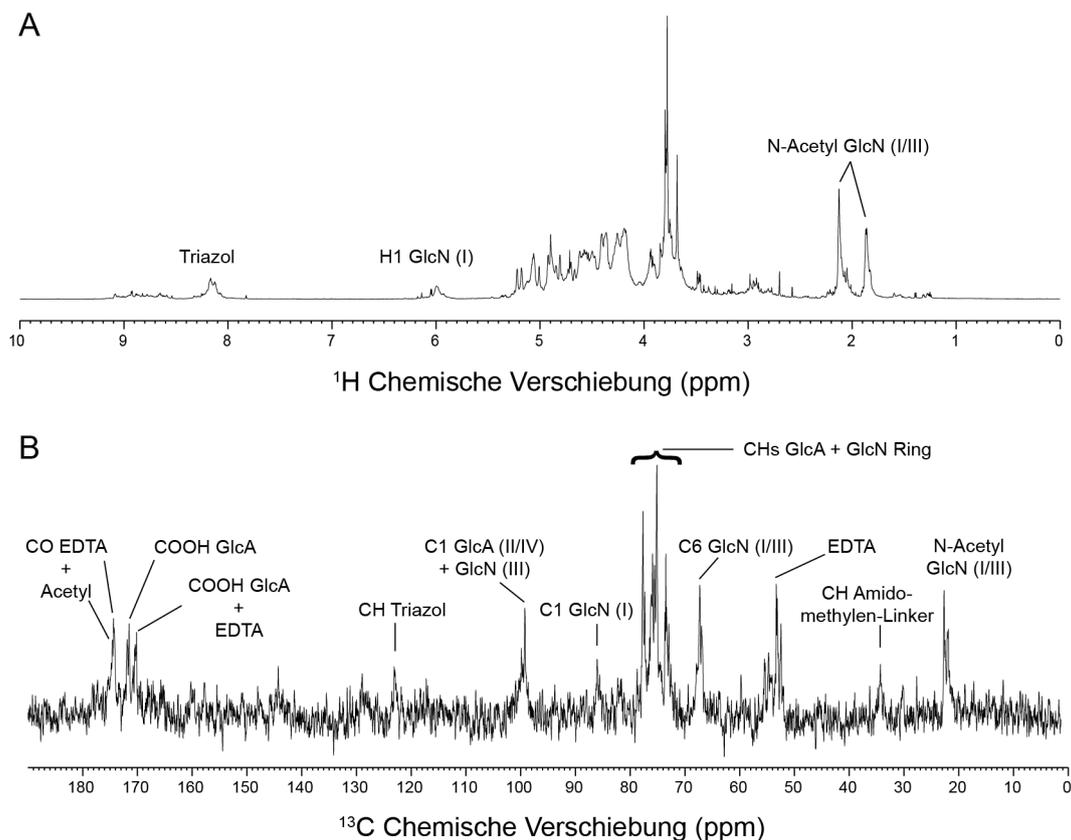


Abbildung 4.33.: (A) 600 MHz- ^1H - und (B) 150 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum von psHA-EDTA-Tetrasaccharid in 99,8% D_2O , 50 mM NaCl bei einer Temperatur von 25 °C. Eine partielle Signalzuordnung ist angegeben. Signale sind mit dem entsprechenden Zuckerring (GlcA: Glukuronsäure; GlcN: Glukosamin) oder nach ihrer Zugehörigkeit zu Gruppen im EDTA-*Linker* bezeichnet. Zuckerringe sind beginnend am nicht-reduzierenden Ende mit römischen Ziffern beschriftet. Eine eindeutige Zuordnung der beiden N-Acetylgruppen zu entweder GlcN-Ring I oder III sowie eine Unterscheidung der beiden GlcA-Positionen (Ring II oder IV) war nicht möglich.

Tetrasaccharids sowie der Protonen im Triazolring und im Amidomethylen-*Linker* konnten gefunden und nahezu vollständig zugeordnet werden (siehe auch Anhang Abschnitt A.2). Allerdings gelang keine eindeutige Zuordnung der beiden N-Acetylgruppen zu einem der beiden GlcN-Ringe sowie keine eindeutige Festlegung der Reihenfolge der GlcA-Ringe innerhalb der Tetrasaccharid-Sequenz (Ring II oder IV). Eine weitere Uneindeutigkeit bestand bei der Zuordnung der Protonen H3, H4 und H5 des GlcN-Rings III. Hierfür wurden keine Konnektivitäten im HSQC- und HMBC-Spektrum gefunden und die Festlegung ihrer Reihenfolge stützte sich ausschließlich auf ein zusätzliches $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum. Schließlich war auch die Zuordnung der Protonen der Carboxy- und Aminomethylen-gruppe im EDTA-Teil nicht eindeutig. Zum einen wurden für sie H-CO-Kreuzpeaks im $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum gefunden, was zeigt, dass sie zu einem benachbarten CO-Atom (Carboxyl- oder Carbonylgruppe) koppeln. Gegen ihre Zuordnung sprach allerdings, dass ihre Signale im ^{13}C -DEPT-Spektrum kein negatives Vorzeichen aufwiesen, was aber für eine CH_2 -Gruppe zu erwarten gewesen wäre.

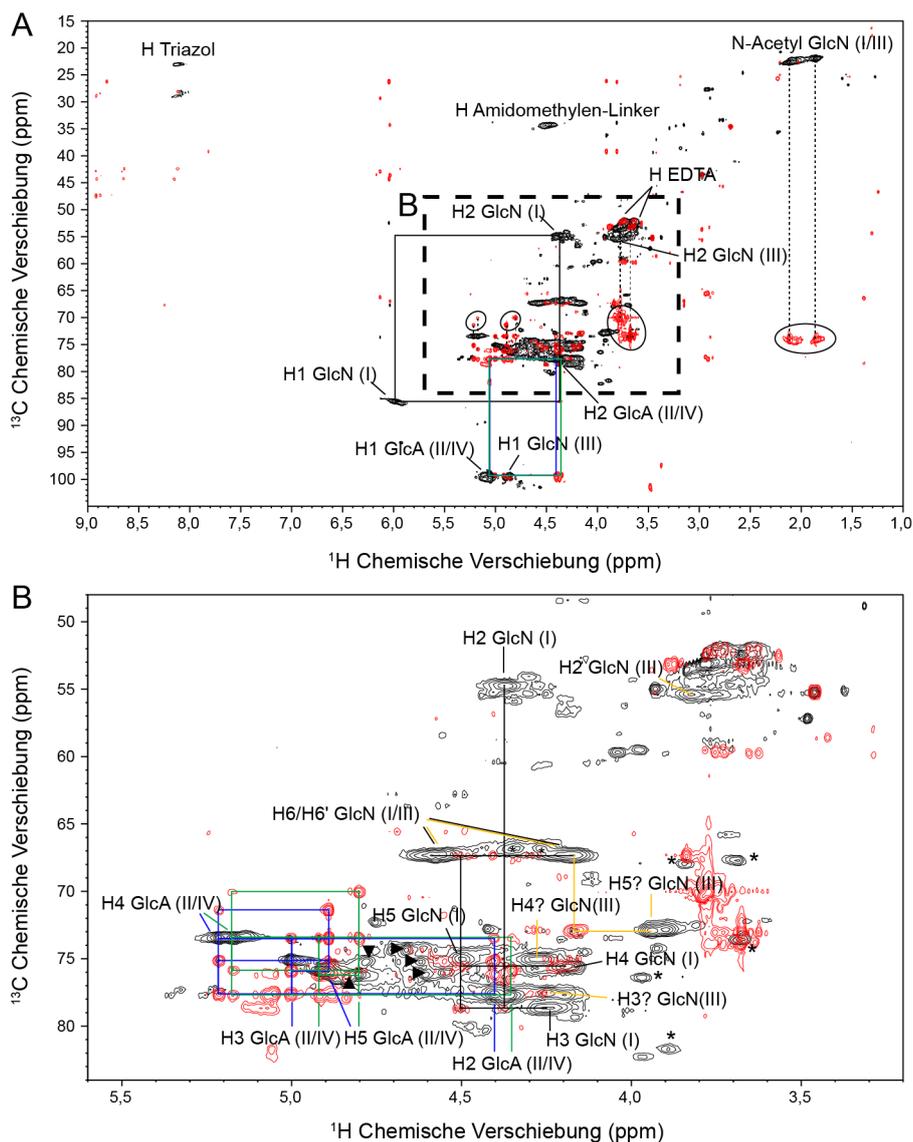


Abbildung 4.34.: 2D- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC- und HMBC-Spektrum von psHA-EDTA-Tetrasaccharid in 99,8% D_2O , 50 mM NaCl bei einer Protonenresonanzfrequenz von 700 MHz und einer Temperatur von 25 °C. (A) Überlagerung von $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC- (schwarz) und HMBC-Spektrum (rot). (B) Ein Ausschnitt aus dem oberen Spektrum (breiter, gestrichelter Rahmen) zeigt die Signale der Zuckerringe (außer H1). Korrelationen zwischen Signalen innerhalb eines Zuckerrings sind mit farbigen Linien angedeutet: GlcN (I): schwarz, GlcN (III): gelb, GlcA (II oder IV): blau und grün. Konnektivitäten zwischen HSQC- und HMBC-Spektrum (vertikale, gestrichelte Linien) und eingekreiste Regionen, zeigen HMBC-Signale, die durch H-CO-Kopplungen zustande kamen. In beiden Spektren (A) und (B) ist eine partielle Signalzuordnung angegeben. Signale sind mit dem entsprechenden Zuckerring (GlcA: Glukuronsäure; GlcN: Glukosamin) oder nach ihrer Zugehörigkeit zu Gruppen im EDTA-Linker bezeichnet. Zuckerringe sind beginnend am nicht-reduzierenden Ende mit römischen Ziffern beschriftet. Eine eindeutige Zuordnung der beiden N-Acetylgruppen zu entweder GlcN-Ring I oder III sowie eine Unterscheidung der beiden GlcA-Positionen (Ring II oder IV) war nicht möglich. Eine weitere Uneindeutigkeit bestand bei der Zuordnung der Protonen H3, H4 und H5 des GlcN-Rings III. Hierfür wurden keine Konnektivitäten im HSQC- und HMBC-Spektrum gefunden und die Festlegung über ihre Reihenfolge stützte sich ausschließlich auf ein $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum. Weiter wurden im HSQC-Spektrum zusätzliche Signale (▲ und *) geringerer Intensität detektiert, die je ein Spinsystem bilden und möglicherweise eine geringe Verunreinigung mit einem anderen Zucker darstellen.

4. Ergebnisse

4.6.2.2. Messung der transversalen, paramagnetischen Relaxationsrate der Amidprotonen in IL-10

Um sicherzustellen, dass die EDTA-Modifizierung die Ligandenbindung nicht wesentlich beeinträchtigte und dass psHA-EDTA von IL-10 gebunden wurde, wurden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren von IL-10 im Verlauf einer Titration mit psHA-EDTA, das mit diamagnetischem Ca^{2+} beladen war, gemessen. Die größten Signalverschiebungen traten dabei für die gleichen Aminosäuren in IL-10 auf wie auch im Fall von anderen GAG-Oligosacchariden. Die Änderungen der NH-chemischen Verschiebung entlang der IL-10-Sequenz sowie der K_D -Wert waren vergleichbar groß wie solche in Anwesenheit von Heparin-Tetrasaccharid (Abbildung 4.35), das einen ähnlichen Sulfatierungsgrad wie das persulfatierte HA-Tetrasaccharid aufwies. Daraus wurde geschlossen, dass der EDTA-Teil die Ligandenbindung nicht wesentlich störte und dass psHA-EDTA in der gleichen Bindungsregion von IL-10 band wie auch andere GAGs.

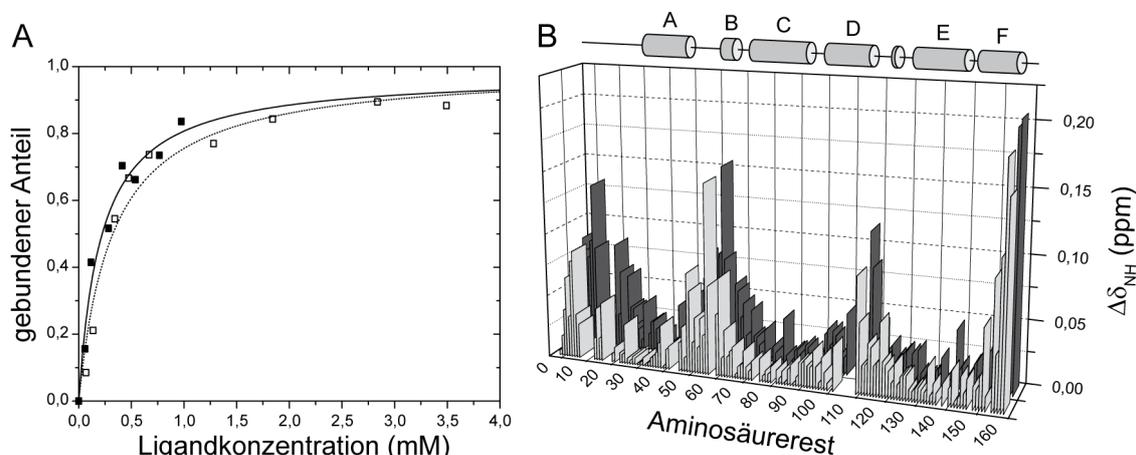


Abbildung 4.35.: Detektion der Bindung eines spinmarkierten psHA-Tetrasaccharids anhand der Amidsignalverschiebungen von IL-10: (A) Bindungskurven von Heparin-Tetrasaccharid (ausgefüllte Symbole und durchgehende Kurve) und psHA-EDTA-Tetrasaccharid (offene Symbole und gepunktete Kurve). Der gebundene Anteil entspricht dem normalisierten Wert von $\Delta\delta_{\text{NH}}$. Es wurde jeweils das Signal von G61 ausgewertet. K_D -Werte wurden durch Anpassung an ein 1:1-Bindungsmodell bestimmt: $0,32 \pm 0,06$ mM (psHA-EDTA) und $0,21 \pm 0,05$ mM (Heparin). (B) Position der Amidsignalverschiebungen ($\Delta\delta_{\text{NH}}$) entlang der IL-10-Sequenz für psHA-EDTA- (hellgrau) und Heparin-Tetrasaccharid (dunkelgrau) für ein Protein-Ligand-Verhältnis von 1:2. Die Lage der α -Helixregionen in IL-10 ist oberhalb der Grafik gezeigt.

Bei der Titration mit psHA-EDTA, das mit paramagnetischen Ionen beladen war, wurde neben einer Verschiebung der Amidsignale auch eine deutliche Reduktion ihrer Signalintensität als Folge der paramagnetischen Relaxationsverstärkung beobachtet. Im Fall von Mn^{2+} wurden bereits bei einem Anteil von 7 mol% Ligand in der Probe, was einem gebundenem Anteil von ca. 5% entsprach, einzelne Signale gelöscht (Abbildung 4.36), darunter G3, N10, N11, G58, L60, G61, C114, K159, S160, L161 und E162. Außerdem war die Intensität von Q4, Y5, R7, E8, D9, G18, S20, L24, E25, K119, I156, K157 deutlich reduziert. Ein Vergleich mit den Messungen der Amidsignalverschiebungen zeigt, dass die Positionen, für die die größten $\Delta\delta_{\text{NH}}$ - und PRE-Werte beobachtet wurden, identisch sind. Diese liegen im Bereich des Protein-N- und C-Terminus sowie des BC- und DE-Loops (Abbildung 4.32

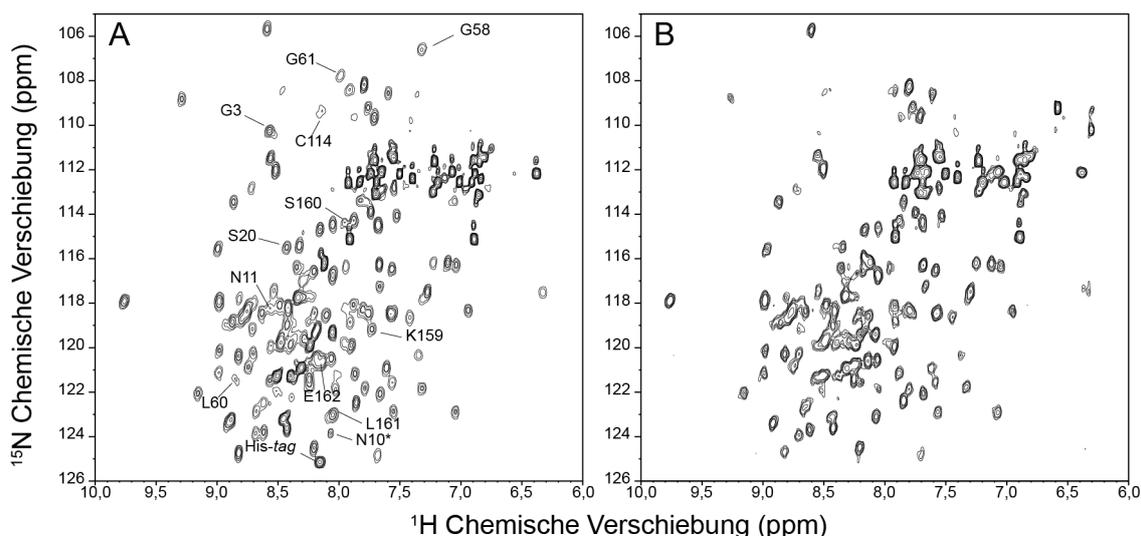


Abbildung 4.36.: NMR-Signalauslöschung von IL-10 induziert durch ein spinmarkiertes psHA-EDTA-Tetrasaccharid. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von IL-10 in Gegenwart von (A) mit Ca^{2+} - und (B) mit Mn^{2+} -beladenem psHA-EDTA bei einer Ligandkonzentration von 7 mol%, einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz und einer Temperatur von 30 °C. Amidsignale, die durch das *Spinlabel* gelöscht wurden, sind im linken Spektrum mit dem zugehörigen Aminosäurerest bezeichnet.

und Abbildung 4.35). Bei höheren Ligandkonzentrationen wurde die Spektrenqualität zunehmend verschlechtert und über 50 mol% konnte kein Spektrum mehr aufgenommen werden. Die Beobachtung, dass selbst bei substöchiometrischen Verhältnissen und unvollständiger Ligandenbindung, die Signalintensität vollständig gelöscht wurde, könnte durch die schnelle Dynamik der Ligandenassoziation und Dissoziation erklärt werden, wodurch ein Ligandmolekül während der Dauer eines NMR-Experiments mit mehreren Proteinmolekülen in Kontakt kommt und dort zur Relaxationsverstärkung führt. Im Fall von Cu^{2+} war die Relaxationsverstärkung deutlich niedriger, wie anhand der geringeren Spinquanzenzahl von 1/2, im Vergleich zu 5/2 von Mn^{2+} , erwartet wurde. Ein zweifacher Überschuss an *Spinlabel* konnte eingesetzt werden, ohne dass Signale gelöscht wurden.

Weitere Informationen über die Position des paramagnetischen *Spinlabels* und damit über die GAG-Bindungsregion von IL-10 wurden aus Messungen der Relaxationsrate der Amidprotonen gewonnen. Der Beitrag des paramagnetischen Ions zur transversalen Relaxationsrate (Γ_2) wurde dabei aus der Differenz der Relaxationsrate der diamagnetischen (Ca^{2+}) und paramagnetischen Probe (Mn^{2+} , Cu^{2+}) gebildet und um den Anteil des ligandgebundenen Proteins korrigiert. Abbildung 4.37 zeigt die für Cu^{2+} - und Mn^{2+} -beladenes psHA-EDTA bestimmten Werte für Γ_2 entlang der IL-10-Sequenz. Für beide Metallionen war ein ähnliches Verteilungsprofil von Γ_2 zu beobachten. Jenes spiegelt die oben gemachten Aussagen zur Signallöschung benachbarter Proteinreste wider. Gemäß den Solomon-Bloembergen-Gleichungen ist Γ_2 proportional zum Abstand zwischen dem ungepaarten Elektron und dem wechselwirkenden Atomkern entsprechend $1/r^6$. Mit Hilfe der Werte für Γ_2 konnte somit in einer *Simulated Annealing*-Strukturberechnung anschließend die Metallionenposition bestimmt werden. Insgesamt wurden jeweils 125 Γ_2 -Werte für den Cu^{2+} - und Mn^{2+} -Datensatz verwendet.

4. Ergebnisse

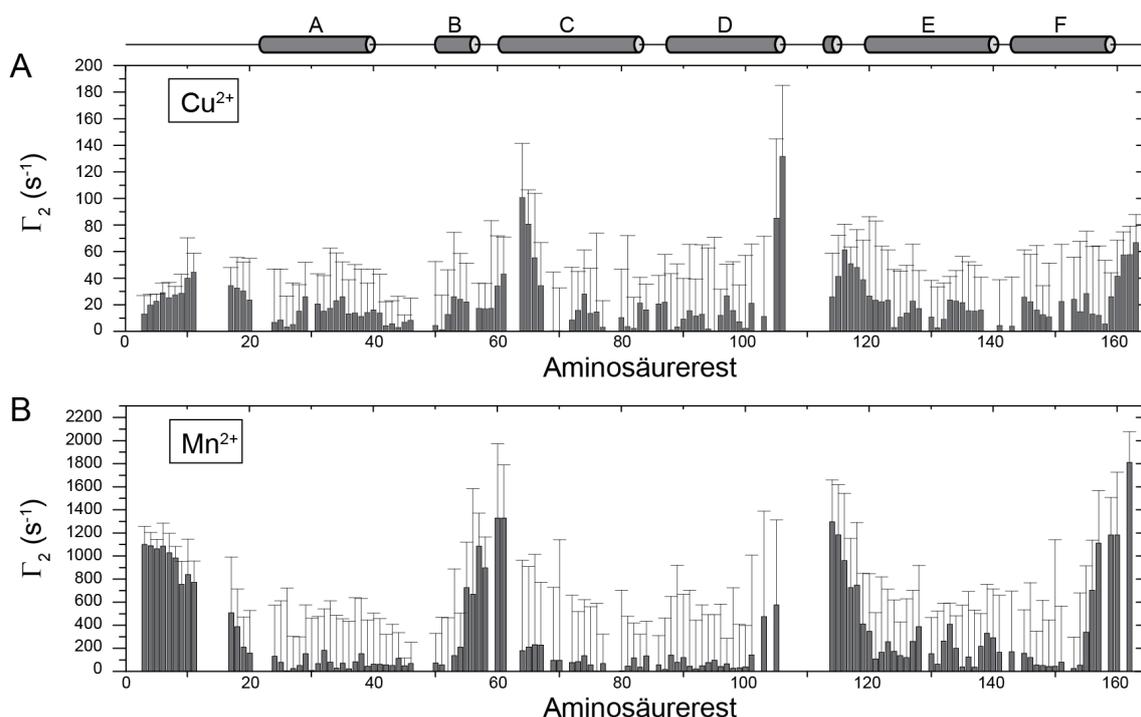


Abbildung 4.37.: Transversale paramagnetische Relaxationsrate (Γ_2) der Amidprotonen von IL-10 induziert durch (A) Cu^{2+} - und (B) Mn^{2+} -beladenes psHA-EDTA-Tetrasaccharid. Fehler von Γ_2 wurden aus der Fortpflanzung der experimentellen Fehler von R_2 der diamagnetischen und paramagnetischen Probe und der Korrektur um den ligandgebundenen Anteil des Proteins erhalten. Zur strukturellen Einordnung der beobachteten Γ_2 -Werte ist die Proteinsekundärstruktur, d. h. die Position der α -Helices (als graue Zylinder) entlang der Aminosäuresequenz, oberhalb der Grafik angegeben.

4.6.2.3. Berechnung der Metallionenbindungsstelle aus PRE-Daten zur Vorhersage der GAG-Bindungsregion

100 *Simulated Annealing*-Berechnungen wurden mit dem Programm Xplor-NIH durchgeführt. Effektive Elektron-Amidproton-Abstände wurden aus den Γ_2 -Werten mit dem PRE-Modul [248, 249] von Xplor-NIH berechnet. Die Korrelationszeit der Dipol-Dipol-Wechselwirkung τ_c wurde während der Berechnung innerhalb der Grenzen zwischen 10 ns bis 36 ns optimiert und Werte von 10,4 ns und 30 ns für Cu^{2+} bzw. Mn^{2+} wurden gefunden. Aminosäureregionen 3 - 18 sowie 159 - 163, für welche die Kristallstruktur von IL-10 und die sekundären NMR-chemischen Verschiebungen eine fehlende Sekundärstruktur gezeigt hatten, waren, bis auf Festsetzung der Disulfidbrücke zwischen C12 und C108, während der Simulation frei rotierbar und translätierbar. Sie wurden durch ein Ensemble aus je fünf Strukturen repräsentiert und Mittelung des PRE-Effektes über diese wurde durchgeführt. Dies führte zu einer besseren Repräsentation der PRE-Daten, erkennbar an einer Reduktion des PRE-Q-Faktors. Ein finaler Wert von 0,43 wurde für den Mn^{2+} -Datensatz bestimmt. Dagegen war die Korrelation zwischen experimentellen und berechneten Γ_2 -Werten für Cu^{2+} deutlich schlechter (Abbildung 4.38) und der Q-Faktor betrug hier nur 0,85. Abbildung 4.39 A zeigt die generierten Strukturmodelle der Metallionenbindungsstelle in IL-10. Obwohl in allen Modellen zusammen die Polypeptidkette an den

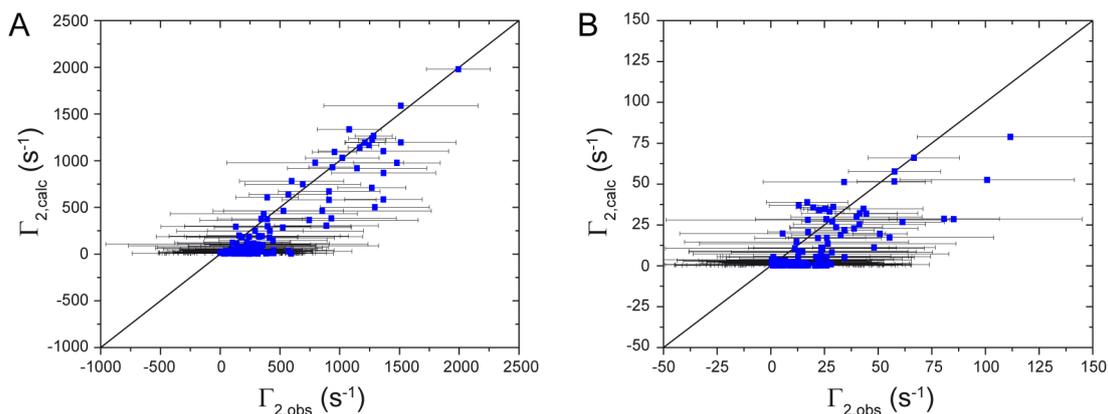


Abbildung 4.38.: Korrelation zwischen experimentellen ($\Gamma_{2,obs}$) und aus dem Strukturmodell berechneten ($\Gamma_{2,calc}$) PREs der Amidprotonen von IL-10. Die Abbildungen zeigen die Γ_2 -Werte des (A) Mn^{2+} - und (B) Cu^{2+} -Datensatzes.

Termini einen großen Konformationsraum einnimmt, ist die Position des Metallions scharf eingegrenzt. Die Streuung der Metallionenposition um den gemeinsamen Schwerpunkt betrug nur 1,00 Å. Die beste Erfüllung der experimentellen PRE-Daten wurde mit zwei Metallionen, die an gegenüberliegenden Untereinheiten des IL-10-Dimers lokalisiert sind, gefunden. Diese besitzen nahezu die gleiche zweizählige Rotationssymmetrie wie das IL-10-Protein. Abbildung 4.39 B zeigt die Metallionenbindungsstelle für eine Untereinheit. Hier befindet sich das Metallion in der Nähe der vorhergesagten GAG-Bindungsregion um die Reste K99, R102, R104, R106, R107, K117 und K119.

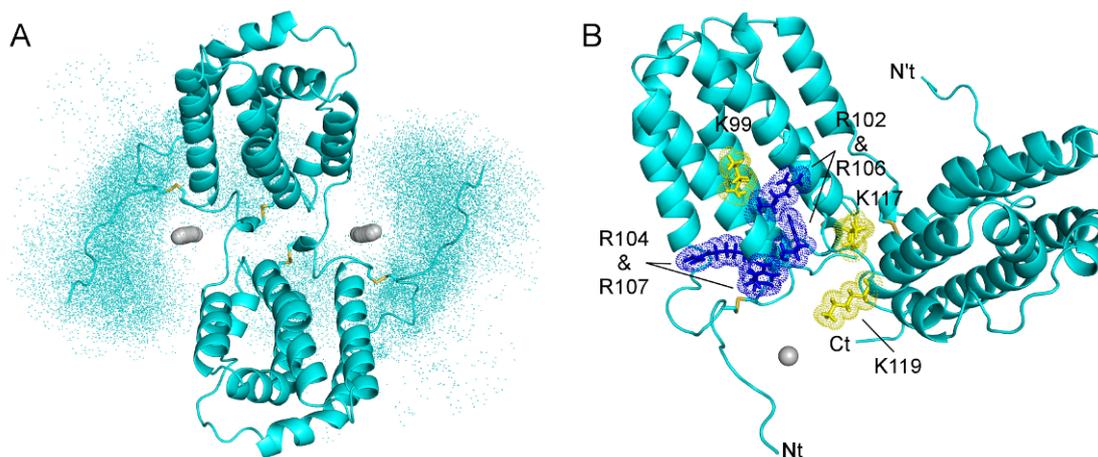


Abbildung 4.39.: Strukturmodell der Metallionenposition von psHA-EDTA im Komplex mit IL-10 berechnet aus PRE-Daten. (A) Draufsicht auf das IL-10-Dimer mit zwei Metallionenbindungsstellen. Das Metallion ist als graue Kugel gezeichnet und seine Lage in 100 berechneten Strukturmodellen ist gezeigt. Die Proteinstruktur ist als *Cartoon*-Darstellung repräsentiert. Protein-N- und C-Terminus wurden während der Berechnung durch ein Ensemble aus je fünf alternativen Strukturen modelliert. Den Konformationsraum, den sie innerhalb der 100 Strukturmodelle einnehmen, ist anhand der Lage der C_α -Rückgratotope, repräsentiert als Punkte, gezeigt. (B) Lage des psHA-EDTA-*Spinlabels* in der Nähe der potentiellen GAG-Bindungsstelle. Aminosäuren sind als Stabmodell gezeichnet und mit ihrem Einbuchstabencode und ihrer Sequenznummer bezeichnet. Arginine sind blau, Lysine gelb und Disulfide gold gefärbt.

4.6.3. Analyse der GAG-Bindungsstelle mit PCS-Daten

4.6.3.1. Immobilisierung von Lanthanoidionen an IL-10

Paramagnetische Lanthanoidionen wurden mit einem 17 Aminosäuren langen Peptid (LBT) C-terminal an die IL-10-Sequenz angefügt. Keine zusätzlichen *Linker*-Aminosäuren wurden verwendet, um die Beweglichkeit zwischen LBT und IL-10 möglichst gering zu halten, welche ansonsten zur Ausmittlung der gewünschten paramagnetischen Effekte geführt hätte. Schließlich sprach die Beobachtung von großen PCS- (Abbildung 4.43) und RDC-Werten (Abbildung 4.40) (RDCs bis zu ± 14 Hz bei 600 MHz) dafür, dass das Protein durch das Lanthanoidion im Magnetfeld orientiert wurde und dass das LBT-Peptid ausreichend rigide war. Um sicherzustellen, dass die Modifizierung von IL-10 mit dem LBT-Peptid die Struktur des Proteins nicht signifikant störte, wurden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von "gemischtem" LBT-IL-10 (mit einer Lanthanoidionenbindungsstelle) und von "symmetrischem" LBT-IL-10 (mit zwei Lanthanoidionenbindungsstellen) aufgenommen und mit dem Spektrum des unmodifizierten Proteins verglichen. Die HSQC-Spektren waren jeweils sehr ähnlich (Abbildung 4.41). Im Fall des "gemischten" LBT-IL-10 wurden allerdings kleine Verschiebungen für die Signale C114, E115, S118, E122 sowie I156, K159, S160, L161 gefunden. Die erste Gruppe von Resten ist Teil des *DE-Loops*, die zweite des Protein-C-Terminus. Beide Bereiche sind mehr als 20 Å vom gegenüberliegenden C-Terminus – der LBT-Modifizierungsstelle – entfernt. Es ist jedoch denkbar, dass das LBT-Peptid durch seine restliche Beweglichkeit auch räumlich entfernte Proteinbereiche beeinflussen konnte. Auch geringe Unterschiede in der Pufferzusammensetzung, z. B. des pH-Wertes, könnten die Änderungen der chemischen Verschiebung verursacht haben, denn

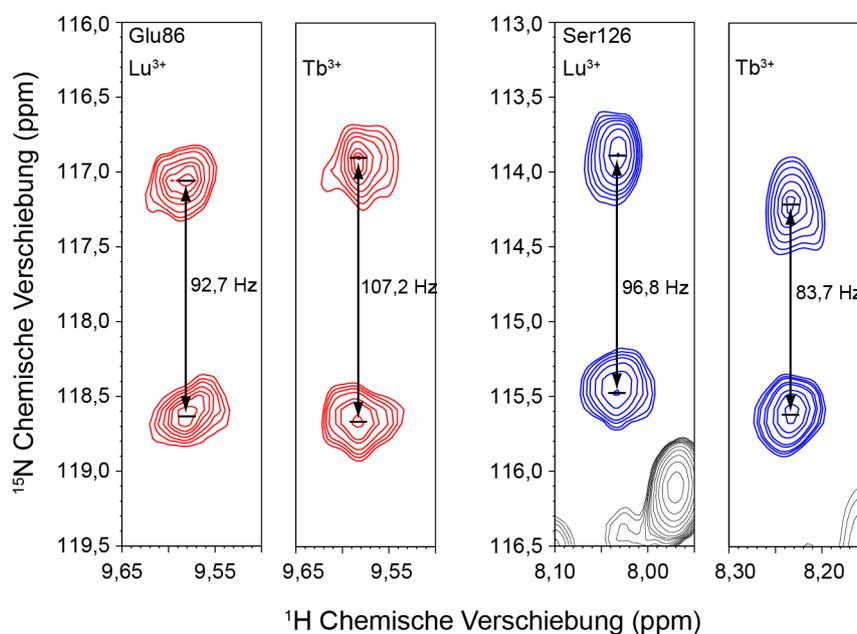


Abbildung 4.40.: Induktion von RDCs durch IL-10-immobilisierte Lanthanoidionen. ^1H - ^{15}N -RDCs wurden in Gegenwart von einem Äquivalent Tb^{3+} bei 600 MHz Protonenresonanzfrequenz gemessen und sind hier für die Aminosäurereste E86 und S126 von IL-10 gezeigt. Lu^{3+} diente als diamagnetische Referenz.

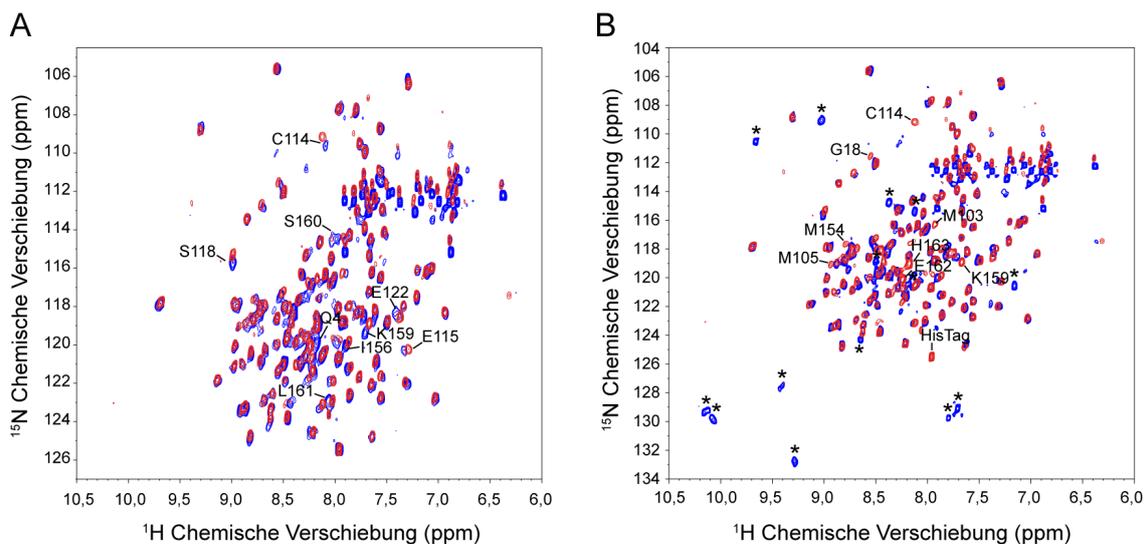


Abbildung 4.41.: Vergleich des $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrums von unmodifiziertem IL-10 mit dem $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von LBT-modifiziertem IL-10. **(A)** Vergleich für "gemischtes" LBT-IL-10 mit nur einer LBT-Untereinheit und einer zweiten ^{15}N -markierten Untereinheit. **(B)** Vergleich für vollständig ^{15}N -markiertes "symmetrisches" LBT-IL-10 mit zwei Lanthanoidionenbindungsstellen. Spektren wurden bei 600 MHz, 30 °C und pH 7,2 gemessen. Die NH_2 -Signale der Asn- und Gln-Seitenketten sind im TROSY-Spektrum stark reduziert als Folge des NMR-Experimentes und nicht des Probenzustands. In **(A)** wurden Änderungen der NH-chemischen Verschiebung für einzelne Reste des Protein-C-Terminus und des DE-*Loops* beobachtet. Im Spektrum des "symmetrischen" LBT-IL-10 **(B)** wurden mehrere neue Signale (*), vermutlich des LBT-Peptids und StrepII-*Tags*, beobachtet. Gleichzeitig war ein Verschwinden einzelner Signale von Aminosäureresten des Protein-C-Terminus und am Ende der D-Helix zu beobachten.

LBT-modifiziertes und unmodifiziertes Protein stammten aus unterschiedlichen Expressionen und Probenpräparationen. Im Spektrum des "symmetrischen" LBT-IL-10 wurden neue Signale, welche im Fall des unmodifizierten Proteins nicht vorhanden waren und wahrscheinlich zum LBT-Peptid und StrepII-*Tag* gehörten, beobachtet. So wurden z. B. zwei Tryptophan-Indol-Signale gefunden, eins als Teil des LBT-Peptids und das andere als Teil des StrepII-*Tags*. Andere Signale wurden dagegen beobachtet, aus dem Spektrum von LBT-IL-10 zu verschwinden, darunter Signale des His8-*Tags*, der durch LBT ersetzt worden war, aber auch Reste der regulären IL-10-Sequenz (z. B. G18, M103, M105, C114, M154, K159). Ein möglicher Grund könnte ein schneller Austausch mit Protonen des Lösungsmittels gewesen sein, denn diese Reste sind in der IL-10-Struktur hauptsächlich in Wasser exponierten *Loop*-Regionen lokalisiert und hatten bereits im Spektrum des unmodifizierten IL-10 eine geringe Signalintensität.

Die Bindungsaffinität von LBT für Lanthanoidionen wurde am Beispiel von Tb^{3+} mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität von Tb^{3+} bei 543 nm, die durch FRET von einem benachbarten Tryptophan-Rest in LBT resultierte, gemessen. Alternativ konnte auch die Blauverschiebung des Tryptophan-Fluoreszenzmaximums im Verlauf der Titration mit Tb^{3+} zur Quantifizierung der Bindung verwendet werden. Erstaunlicherweise wurde dabei ein sehr großer Wert der Blauverschiebung von mehr als 5 nm beobachtet. Mit beiden Methoden wurde eine hohe Affinität von LBT gefunden und ähnliche K_D -Werte von 35 ± 2 nM (Tb^{3+} -Fluoreszenzintensität) und 45 ± 2 nM

4. Ergebnisse

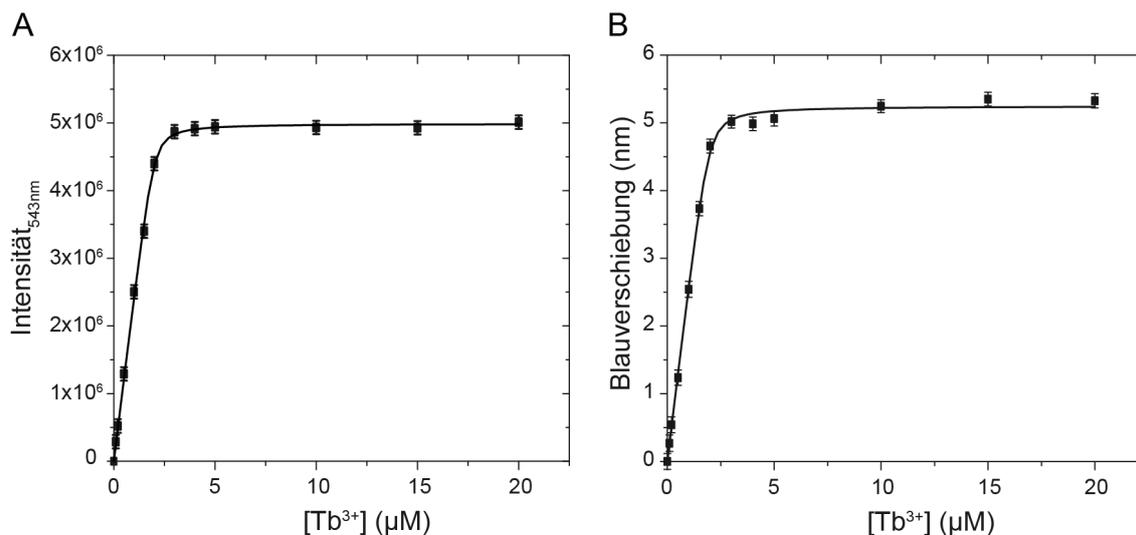


Abbildung 4.42.: Detektion der Lanthanoidionenbindung an IL-10 durch Fluoreszenzspektroskopie. Eine Tb³⁺-Bindungskurve von LBT-IL-10 konnte (A) anhand der Tb³⁺-Fluoreszenzintensität bei 543 nm unter Ausnutzung von FRET von einem benachbarten Tryptophan-Rest in LBT und (B) aus der Blauverschiebung des Tryptophan-Fluoreszenzmaximums aufgenommen werden. Die Bindungskurve erreicht den Sättigungsbereich bei ca. 2 µM, was der verwendeten Proteinkonzentration entspricht. In beiden Experimenten wurden ähnliche K_D -Werte bestimmt: (A) 35 ± 2 nM und (B) 45 ± 2 nM.

(Tryptophan-Blauverschiebung) wurden bestimmt. Außerdem folgte die LBT-Tb³⁺-Bindung einer klaren 1:1-Stöchiometrie. Dies ist am Punkt der größten Krümmung, an dem die Bindungskurve in den Sättigungsbereich übergeht und der äquimolaren Mengen von Protein und Tb³⁺ entspricht, erkennbar (Abbildung 4.42).

4.6.3.2. PCS-Messung und $\Delta\chi$ -Tensorbestimmung

NMR-Messungen in Gegenwart von Lanthanoidionen (Tb³⁺, Tm³⁺ und Dy³⁺), die mit Hilfe von LBT an IL-10 immobilisiert worden waren, erlaubten die Bestimmung von PCS-Werten für IL-10 und Heparin-Tetrasaccharid. PCS-Werte des Proteins wurden mit der "gemischten" LBT-IL-10-Variante, mit einer ¹⁵N-markierten Untereinheit zur PCS-Detektion und mit einer unmarkierten Untereinheit, die das LBT-Peptid trug, gemessen. Die Möglichkeit der Dissoziation des Dimers und Entmischung beider Untereinheiten wurde als gering eingeschätzt, da die Dimerisierung in IL-10 durch eine stabile Interkalation von Helices E und F in das gegenüberliegende 4-Helixbündel und nicht durch Interaktionen an der Proteinoberfläche zustande kommt. Außerdem wurde das IL-10-Dimer als stabil über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten beobachtet und Gelfiltration und NMR-Spektroskopie bestätigten seine korrekte Struktur. PCS-Werte wurden anhand der Verschiebung der HSQC-Signale entlang diagonaler Linien im Spektrum zugeordnet. Insgesamt wurden 172, 182 und 186 PCS-Werte für zusammen ¹H und ¹⁵N in Gegenwart von Tb³⁺, Tm³⁺ bzw. Dy³⁺ gesammelt (Tabelle 4.7).

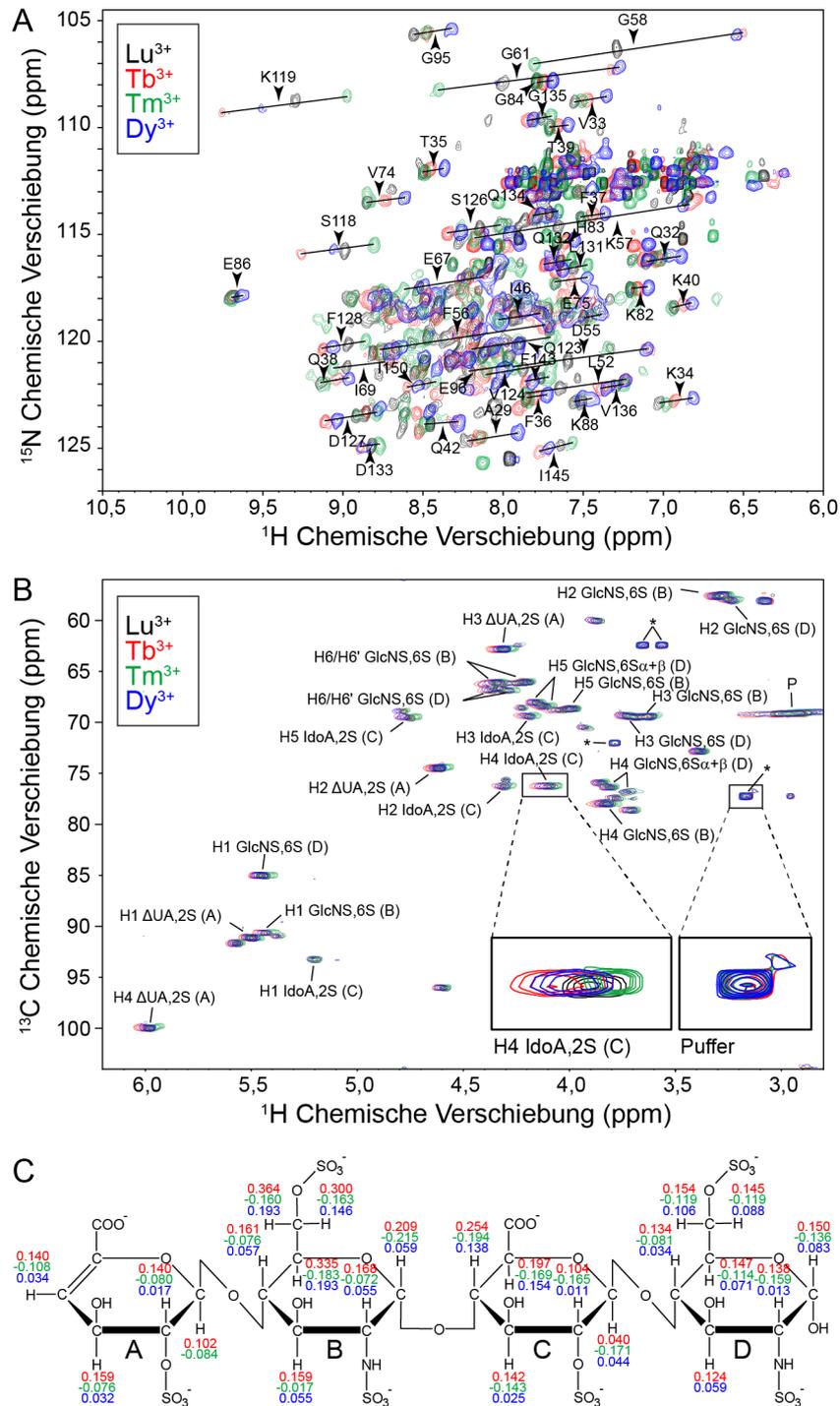


Abbildung 4.43.: Detektion von PCSs für IL-10 und seinen Heparinligand. (A) $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von "gemischtem" LBT-IL-10 in Gegenwart von je einem Äquivalent an Lu^{3+} (schwarz), Tb^{3+} (rot), Tm^{3+} (grün) und Dy^{3+} (blau) bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz, 30 °C und pH 7,2. Der PCS wurde aus der Verschiebung des HSQC-Kreuzpeaks zwischen diamagnetischem und paramagnetischem Spektrum bestimmt. (B) $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren von Heparin-Tetrasaccharid in Gegenwart von mit Lu^{3+} (schwarz), Tb^{3+} (rot), Tm^{3+} (grün) oder Dy^{3+} (blau) komplexiertem LBT-IL-10 bei einem Protein-Ligand-Verhältnis von 1:4. HSQC-Signale sind mit den zugehörigen Protonen und Zuckerringen von Heparin bezeichnet. Signale von restlichem, nicht deuteriertem HEPES-Puffer und von Protein sind mit "*" bzw. "P" gekennzeichnet. Puffersignale können als interne Referenz dienen, da sie im Gegensatz zu den Signalen von Heparin keinen PCS zeigen. (C) Chemische Struktur des Heparin-Tetrasaccharids und Markierung der gemessenen PCS-Werte. Farben bedeuten die gleichen Lanthanoidionen wie in (A) und (B).

4. Ergebnisse

Tabelle 4.7.: Experimentelle PCS-Werte des “gemischten” LBT-IL-10-Dimers in Gegenwart verschiedener Lanthanoidionen.

Rest-Nr.	Tb ³⁺		Tm ³⁺		Dy ³⁺	
	¹ H	¹⁵ N	¹ H	¹⁵ N	¹ H	¹⁵ N
24	- ^a	-	-0,403	-0,372	-	-
27	-0,225	-0,241	-0,097	-0,117	-0,584	-0,590
29	-0,074	-0,103	-0,089	-0,114	-0,312	-0,380
30	-0,133	-0,118	-	-	-0,308	-0,273
31	-	-	-	-	-0,320	-0,354
32	-0,068	-0,084	-0,084	-0,107	-0,219	-0,272
33	-0,087	-0,161	-0,045	-0,030	-0,202	-0,281
34	-0,090	-0,100	-0,043	0,082	-0,210	-0,201
35	-0,041	-0,104	-0,010	0,084	-0,130	-0,161
36	-0,051	-0,093	-0,010	0,001	-0,130	-0,185
37	-0,080	-0,128	-0,010	0,054	-0,159	-0,179
38	-0,095	-0,136	-0,027	0,044	-0,181	-0,210
39	-0,052	-0,086	0,001	0,044	-0,113	-0,094
40	-0,074	-0,110	0,014	0,064	-0,110	-0,141
41	-0,081	-0,135	0,017	0,088	-0,141	-0,198
42	-	-	0,035	0,005	-0,175	-0,086
43	-	-	0,048	0,069	-	-
44	-0,100	-0,146	0,051	0,115	-0,086	-0,231
45	-	-	0,065	0,092	-	-
46	-0,162	-0,187	0,097	0,101	-0,169	-0,183
50	-	-	-	-	-0,366	-0,362
52	-0,408	-0,356	0,218	0,277	-0,408	-0,357
53	-	-	0,424	0,464	-	-
55	-0,505	-0,556	0,341	0,324	-0,494	-0,574
56	-0,617	-0,669	0,413	0,471	-0,645	-0,655
57	-0,822	-0,992	0,618	0,671	-0,785	-0,975
58	-0,789	-0,655	0,511	0,787	-0,750	-0,650
60	-	-	0,365	0,387	-	-
61	-0,689	-0,661	0,399	0,286	-0,737	-0,755
62	-	-	0,349	0,430	-0,709	-0,781
64	-0,438	-0,382	0,214	0,241	-0,559	-0,480
65	-0,491	-0,583	0,294	0,287	-0,646	-0,633
66	-	-	0,164	0,173	-0,581	-0,479
67	-0,287	-0,294	0,097	0,118	-0,403	-0,391
68	-0,276	-0,292	0,119	0,163	-0,435	-0,421
69	-0,318	-0,286	0,087	0,099	-	-
70	-0,255	-0,230	-	-	-0,429	-0,387

^a-.: Wert nicht bestimmt

wird fortgesetzt

4.6. Bestimmung der GAG-Bindungsstelle von murinem IL-10 durch NMR

Fortsetzung von Tabelle 4.7

Rest-Nr.	Tb ³⁺		Tm ³⁺		Dy ³⁺	
	¹ H	¹⁵ N	¹ H	¹⁵ N	¹ H	¹⁵ N
72	-0,169	-0,169	0,056	0,007	-0,317	-0,304
73	-0,139	-0,093	0,004	-0,004	-0,290	-0,185
74	-0,120	-0,097	-0,021	-0,014	-0,243	-0,193
75	-0,094	-0,175	0,017	-0,040	-0,195	-0,274
76	-0,159	-0,104	-0,012	-0,007	-0,235	-0,195
77	-0,109	-0,125	0,001	0,003	-0,204	-0,236
79	-0,071	-0,046	-0,003	-0,008	-0,157	-0,100
80	-0,083	-0,085	-0,006	-0,044	-0,162	-0,150
81	-0,056	-0,054	-0,010	0,001	-0,139	-0,136
82	-0,046	-0,085	-0,010	-0,003	-0,113	-0,102
83	-0,048	-0,046	-0,002	-0,039	-0,109	-0,136
84	-0,045	0,013	-0,011	0,001	-0,106	0,001
86	-0,006	-0,004	-0,001	0,085	-0,055	-0,012
87	-0,032	-0,007	-0,020	-0,003	-0,089	-0,102
88	-0,043	-0,003	-0,037	-0,039	-0,105	-0,186
89	-	-	-0,044	-0,048	-	-
90	-0,039	-0,064	-0,042	-0,085	-0,113	-0,184
91	-0,035	-0,036	-0,038	-0,037	-0,136	-0,127
92	-0,040	-0,043	-0,051	-0,048	-0,142	-0,117
93	-0,049	-0,054	-0,071	-0,086	-0,158	-0,189
94	-0,058	-0,049	-0,072	-0,062	-0,210	-0,201
95	-0,085	-0,084	-0,080	-0,121	-0,232	-0,292
96	-	-	-0,110	-0,094	-0,213	-0,179
97	-0,012	-0,023	-0,063	-0,085	-0,231	-0,296
99	-	-	-0,133	-0,189	-	-
102	-	-	-	-	-0,571	-0,590
106	-0,086	-0,097	-	-	-	-
115	-	-	0,016	0,008	-	-
116	0,130	0,288	-	-	-0,235	-0,194
117	0,295	0,430	-0,235	-0,238	0,018	0,026
118	0,276	0,197	-0,181	-0,276	0,086	0,001
119	0,460	0,485	-0,323	-0,195	0,218	0,378
120	0,379	0,534	-	-	0,174	0,313
121	0,295	0,342	-	-	0,167	0,180
122	0,266	0,302	-	-	-	-
123	0,304	0,366	-0,193	-0,194	0,172	0,183
124	0,239	0,275	-0,175	-0,198	0,130	0,159
125	0,185	0,183	-0,136	-0,184	0,105	0,096
126	0,200	0,277	-0,137	-0,103	0,112	0,187

^a -: Wert nicht bestimmt

wird fortgesetzt

4. Ergebnisse

Fortsetzung von Tabelle 4.7

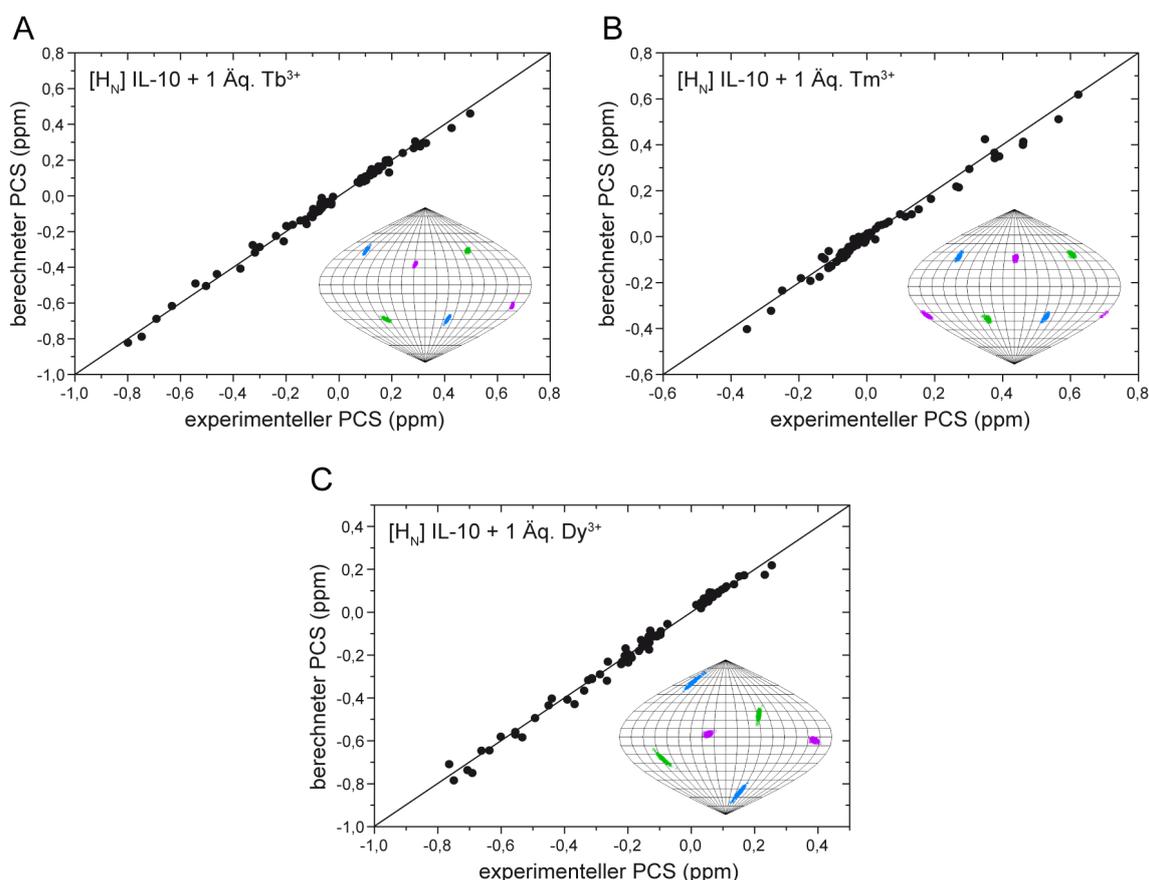
Rest-Nr.	Tb ³⁺		Tm ³⁺		Dy ³⁺	
	¹ H	¹⁵ N	¹ H	¹⁵ N	¹ H	¹⁵ N
127	0,198	0,242	-0,129	-0,172	0,120	0,202
128	0,164	0,201	-0,108	-0,179	0,094	0,103
129	0,149	0,195	-0,079	-0,061	0,086	0,125
130	0,139	0,195	-0,095	-0,112	0,087	0,113
131	0,112	0,185	-0,092	-0,158	0,070	0,099
132	0,099	0,101	-0,066	-0,094	0,064	0,099
133	0,076	0,025	-0,048	-0,077	0,064	0,030
134	0,091	0,151	-0,056	-0,042	0,056	0,092
135	0,094	0,113	-0,064	-0,094	0,059	0,089
136	0,098	0,113	-0,054	-0,085	0,059	0,096
137	0,071	0,068	-0,045	-0,056	0,038	0,041
138	0,080	0,087	-0,063	-0,095	0,053	0,060
139	0,108	0,095	-0,063	-0,047	0,056	0,055
140	0,096	0,175	-0,059	-0,066	0,049	0,098
142	0,086	0,135	-0,067	-0,098	0,049	0,084
143	0,100	0,194	-0,047	-0,082	0,052	0,098
145	0,132	0,268	-0,072	-0,119	0,076	0,163
146	0,133	0,208	-0,068	-0,108	0,077	0,131
147	0,092	0,108	-0,053	-0,064	0,042	0,046
148	0,114	0,170	-0,063	-0,021	0,069	0,088
149	0,153	0,202	-0,069	-0,095	0,091	0,100
150	0,123	0,161	-0,062	-0,041	0,047	0,071
151	0,111	0,193	-0,048	-0,049	0,044	0,090
152	0,141	0,194	-0,077	-0,098	0,092	0,136
153	0,165	0,303	-	-	0,067	0,139
155	-	-	-	-	0,037	0,031
156	-	-	-0,070	-0,077	0,075	0,086
157	-	-	-	-	0,034	0,041

^a -: Wert nicht bestimmt

Mit Hilfe des Programms Numbat [240] wurden die $\Delta\chi$ -Tensorwerte für jedes Lanthanoidion bestimmt (Tabelle 4.8). Dabei wurde eine gute Korrelation zwischen den experimentellen und berechneten PCS-Werten gefunden (Abbildung 4.44). Abbildung 4.45 zeigt die berechnete Position der Lanthanoidionen und die Darstellung ihres $\Delta\chi$ -Tensors als PCS-Isoflächen. Das Lanthanoidion befand sich ca. 13 Å entfernt vom Protein-C-Terminus und nur eine geringfügig andere Position wurde für Tm³⁺ als für Tb³⁺ und Dy³⁺ gefunden. Außerdem besaßen alle drei Ionen ähnliche $\Delta\chi$ -Tensororientierungen mit Ausnahme der z-Achse von Dy³⁺, die eine 30°-Abweichung im Vergleich zu der Orientierung von Tb³⁺ und Tm³⁺ aufwies.

Tabelle 4.8.: $\Delta\chi$ -Tensorwerte von Lanthanoidionen, die an das „gemischte“ LBT-IL-10-Protein immobilisiert worden waren.

	Tb³⁺	Tm³⁺	Dy³⁺
$\Delta\chi_{ax}$ (10^{-32} m ³)	24,6 ± 2,0	-18,8 ± 2,3	24,6 ± 1,6
$\Delta\chi_{rh}$ (10^{-32} m ³)	20,1 ± 1,3	-17,6 ± 1,6	21,3 ± 1,5
x (Å)	-26,4 ± 0,5	-26,6 ± 0,7	-27,5 ± 0,6
y (Å)	-4 ± 0,7	-8,7 ± 1,0	-3,5 ± 0,7
z (Å)	57,3 ± 0,4	58,7 ± 0,7	58,5 ± 0,5
α (°)	50 ± 3	66 ± 2	53 ± 4
β (°)	310 ± 3	305 ± 3	334 ± 4
γ (°)	33 ± 1	42 ± 2	9 ± 4

**Abbildung 4.44.:** Korrelation zwischen experimentellen und berechneten PCS-Werten der Amidprotonen von „gemischtem“ LBT-IL-10. PCS-Datensätze wurden in Gegenwart von je einem Äquivalent an Tb³⁺ (A), Tm³⁺ (B) und Dy³⁺ (C) aufgenommen. Die eingefügten Abbildungen zeigen die Orientierung des $\Delta\chi$ -Tensors in einer Sanston-Flamsteed-Projektion. Punkte, an denen die x-, y- und z-Achse die Kugeloberfläche durchstoßen, sind grün, blau bzw. magenta gefärbt. Es sind jeweils 100 Orientierungen gezeigt, die das Ergebnis einer Monte-Carlo-Fehleranalyse sind, in der 30% der Daten zufällig weggelassen wurden.

4. Ergebnisse

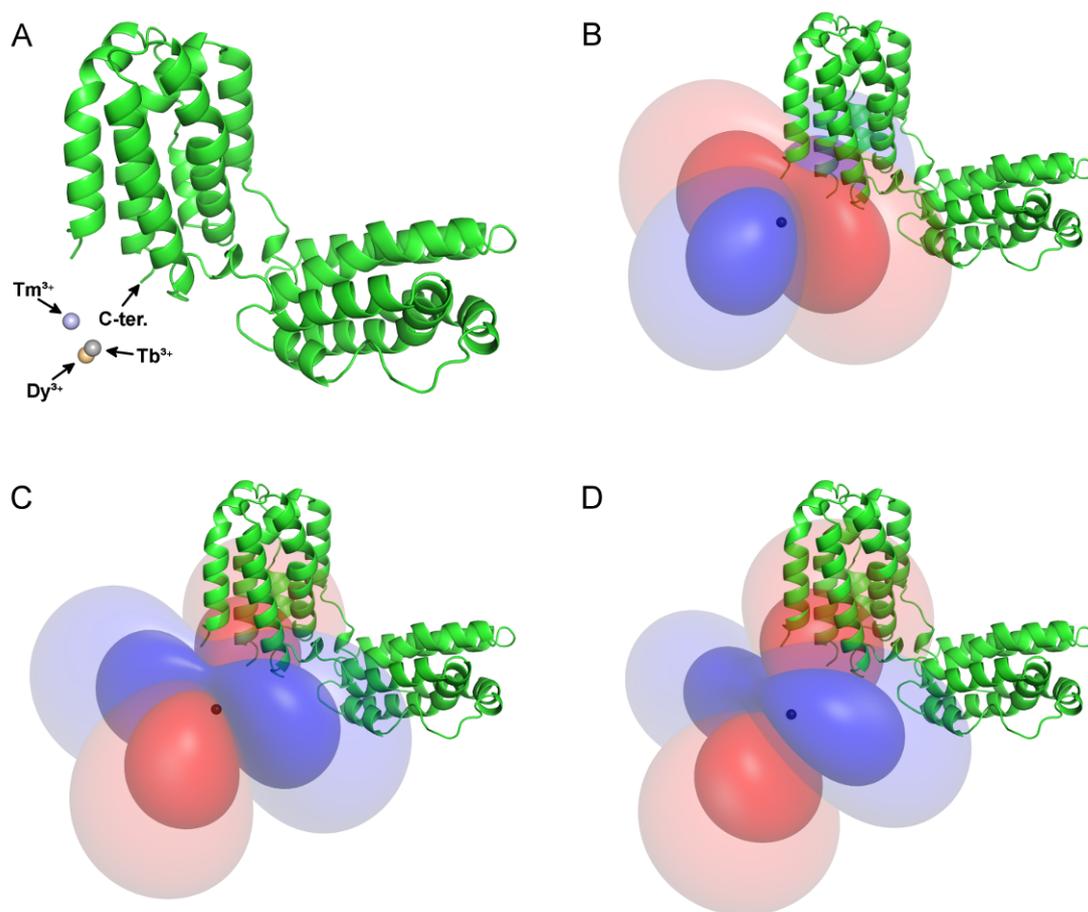


Abbildung 4.45.: Lanthanoidionenpositionen und $\Delta\chi$ -Tensorrepräsentation für LBT-IL-10. (A) *Cartoon*-Darstellung des Proteinrückgrats von IL-10 (PDB # 4X51). Die Lanthanoidionen sind in der Nähe des Protein-C-Terminus, an den das LBT-Peptid gebunden war, positioniert. Ihr Ort wurde durch Berechnung des $\Delta\chi$ -Tensors mit Numbat bestimmt. Darstellung des $\Delta\chi$ -Tensors von (B) Tm^{3+} , (C) Tb^{3+} und (D) Dy^{3+} im Molekülkoordinatensystem von IL-10 als PCS-Isosflächen. Innere, blaue und rote Isosflächen entsprechen PCS-Werten von +0,75 ppm und -0,75 ppm. Äußere, blaue und rote Isosflächen entsprechen PCS-Werten von +0,2 ppm und -0,2 ppm.

PCS-Werte des Heparin-Tetrasaccharids wurden in Gegenwart von “symmetrischem” LBT-IL-10 bei einem Protein-Ligand-Verhältnis von 1:4 gemessen. Es wurde erwartet, dass der PCS-Wert des Liganden in diesem Fall größer ist als bei der Verwendung von LBT-IL-10 mit nur einer Lanthanoidionenbindungsstelle. Wie durch STD-Experimente gezeigt wurde (Abschnitt 4.2.2) und wie anhand der hoch symmetrischen Struktur des IL-10-Dimers abgeleitet werden kann, binden zwei Heparin-Tetrasaccharidmoleküle an gegenüberliegende Untereinheiten von IL-10. Im “symmetrischen” LBT-IL-10 besitzt jedes Ligandmolekül somit ein gleich weit entferntes Lanthanoidion, während im “gemischten” LBT-IL-10 ein Ligandmolekül weiter vom LBT-Peptid entfernt ist als das zweite und dann evt. keinen PCS mehr erfährt. Die Folge wäre, dass der PCS-Wert aufgrund des schnellen Austauschs über alle drei Zustände (frei, gebunden und naher bzw. weiter Abstand zu LBT) gemittelt würde.

Tabelle 4.9.: Experimentelle, um den Anteil an gebundenem Ligand korrigierte ^1H PCS-Werte von Heparin-Tetrasaccharid. PCS-Werte wurden in Gegenwart von "symmetrischem" LBT-IL-10, das mit verschiedenen Lanthanoidionen beladen war, gemessen. Das Ligand-Protein-Verhältnis betrug 4:1.

Zuckerring	Proton	Tb ³⁺	Tm ³⁺	Dy ³⁺
$\Delta\text{UA},2\text{S}$ (A)	H1	0,102	-0,084	- ^a
	H2	0,140	-0,080	0,017
	H3	0,159	-0,076	0,032
	H4	0,140	-0,108	0,034
GlcNS,6S (B)	H1	0,209	-0,215	0,059
	H2	0,168	-0,072	0,055
	H3	0,159	-0,017	0,055
	H4	0,161	-0,076	0,057
	H5	0,335	-0,183	0,193
	H6pro(R)	0,364	-0,160	0,193
	H6pro(S)	0,300	-0,163	0,146
IdoA,2S (C)	H1	0,040	-0,171	0,044
	H2	0,104	-0,165	0,011
	H3	0,142	-0,143	0,025
	H4	0,254	-0,194	0,138
	H5	0,197	-0,169	0,154
GlcNS,6S (D)	H1	0,150	-0,136	0,083
	H2	0,138	-0,159	0,013
	H3	0,124	-	0,059
	H4	0,134	-0,081	0,034
	H5	0,147	-0,114	0,071
	H6pro(R)	0,154	-0,119	0,106
	H6pro(S)	0,145	-0,119	0,088

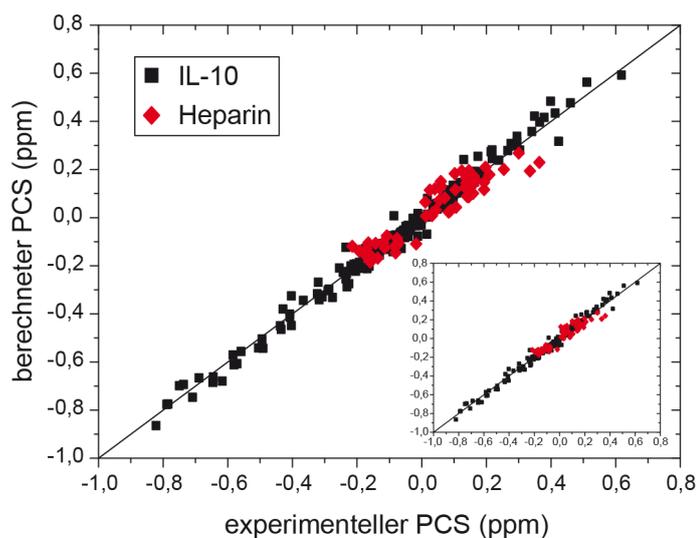
^a:- Wert nicht bestimmt

Zur eindeutigen Zuordnung der PCS-Werte des Heparinliganden wurden $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren aufgenommen (Abbildung 4.43). Weil kein ^{13}C -markierter Ligand zur Verfügung stand, wurde Heparin im leichten Überschuss eingesetzt, um die Ligandsignale vom Proteinhintergrund unterscheiden zu können. Unter diesen Bedingungen waren die PCS-Werte des Liganden stark um den Anteil im freien Zustand gewichtet. Um den Wert des gebundenen Zustands zu erhalten, wurde der PCS-Wert um den Anteil an gebundenem Ligand, der aus dem K_D -Wert und den totalen Protein- und Ligandkonzentrationen berechnet werden kann, korrigiert. Es wurden insgesamt 23, 22 und 22 PCS-Werte für Tb³⁺, Tm³⁺ bzw. Dy³⁺ gesammelt (Tabelle 4.9). Dabei war ein klarer Trend der PCS-Werte zu erkennen: sie waren positiv für Tb³⁺ und Dy³⁺ und negativ im Fall von Tm³⁺. Ausgehend vom Verlauf der PCS-Isoflächen (Abbildung 4.45) kamen nur zwei Regionen in Frage, welche die experimentellen PCS-Werte erfüllen konnten – eine Region im Bereich der zentralen Furche des IL-10-Dimers und eine zweite Region weggerichtet vom Protein, ohne die Möglichkeit intermolekulare Kontakte auszubilden.

4.6.3.3. Berechnung der IL-10-Heparin-Komplexstruktur mit PCS-basiertem *Docking*

Strukturmodelle des IL-10-Heparin-Komplexes wurden durch *Rigid Body Docking*-Berechnungen mit dem Programm Xplor-NIH und unter Verwendung der experimentellen PCS-Werte von Protein und Ligand generiert. Für die PCS-Berechnung wurde das RDC-Modul von Xplor-NIH verwendet, da es die Möglichkeit bot, den PCS für mehrere Lanthanoidionen gleichzeitig zu berechnen. RDCs und PCSs teilen die gleiche Form des magnetischen Suszeptibilitätstensors und nur eine $1/r^3$ -Abstandsabhängigkeit und Definition des Vektors zwischen Lanthanoidion und dem zugehörigen ^1H - oder ^{15}N -Kern mussten eingeführt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Definition des Orientierungstensors in Xplor-NIH und Numbat wurden die axiale (Da) und rhombische (Dr) Komponente mit Xplor-NIH neu berechnet und während der Simulation weiter optimiert. Startwerte von Da und Dr waren: Tb^{3+} (Da = 7979,28 Hz, Dr = 0,650), Tm^{3+} (Da = 6556,45 Hz, Dr = 0,337), Dy^{3+} (Da = -6870,54 Hz, Dr = 0,517). Zwei unabhängige Berechnungen, in denen die Iduronsäure der Heparin-Startstruktur entweder in $^1\text{C}_4$ - oder $^2\text{S}_\text{O}$ -Konformation vorlag, wurden durchgeführt und jeweils 100 Strukturmodelle erzeugt. Abbildung 4.47 zeigt die 20 Strukturmodelle niedrigster Energie für den IL-10-Heparin-Komplex. In diesem Modell befindet sich die Heparin-Bindungsstelle in der Nähe der Reste K99, R102, R104, R106, R107, K117 und K119. Es wurde eine gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und aus dem Modell zurückgerechneten PCS-Werten gefunden (siehe Abbildung 4.46). Für das Strukturmodell niedrigster Energie war die Anzahl an Abweichungen außerhalb des Toleranzintervalls von $\pm 0,1$ ppm: 24 PCSs von insgesamt 540 für IL-10 und 2 PCSs von insgesamt 67 für Heparin. Der PCS-Q-Faktor betrug für alle PCS-Werte zusammen 0,19. Die strukturelle Diversität der Ligandstrukturen wurde durch Berechnung des RMSD-Wertes für die 20 Strukturmodelle niedrigster Energie bewertet. Der RMSD wurde zwischen allen Paaren von Strukturen ohne Transformation berechnet und betrug im Mittel 1,47 Å ($^1\text{C}_4$ -Heparin) bzw. 1,45 Å ($^2\text{S}_\text{O}$ -Heparin) für alle Atome und 1,28 Å ($^1\text{C}_4$ -Heparin) bzw. 1,01 Å ($^2\text{S}_\text{O}$ -Heparin) für die C- und O-Atome des Zuckerrückgrats.

Abbildung 4.46: Korrelation zwischen experimentellen und aus dem Strukturmodell berechneten ^1H -PCS-Werten für den IL-10-Heparin-Komplex. Es sind die PCS-Werte für das Strukturmodell niedrigster Energie und mit der $^1\text{C}_4$ -Form des Liganden gezeigt. Die eingefügte Abbildung zeigt die PCS-Korrelation für das entsprechende Strukturmodell von $^2\text{S}_\text{O}$ -Heparin.



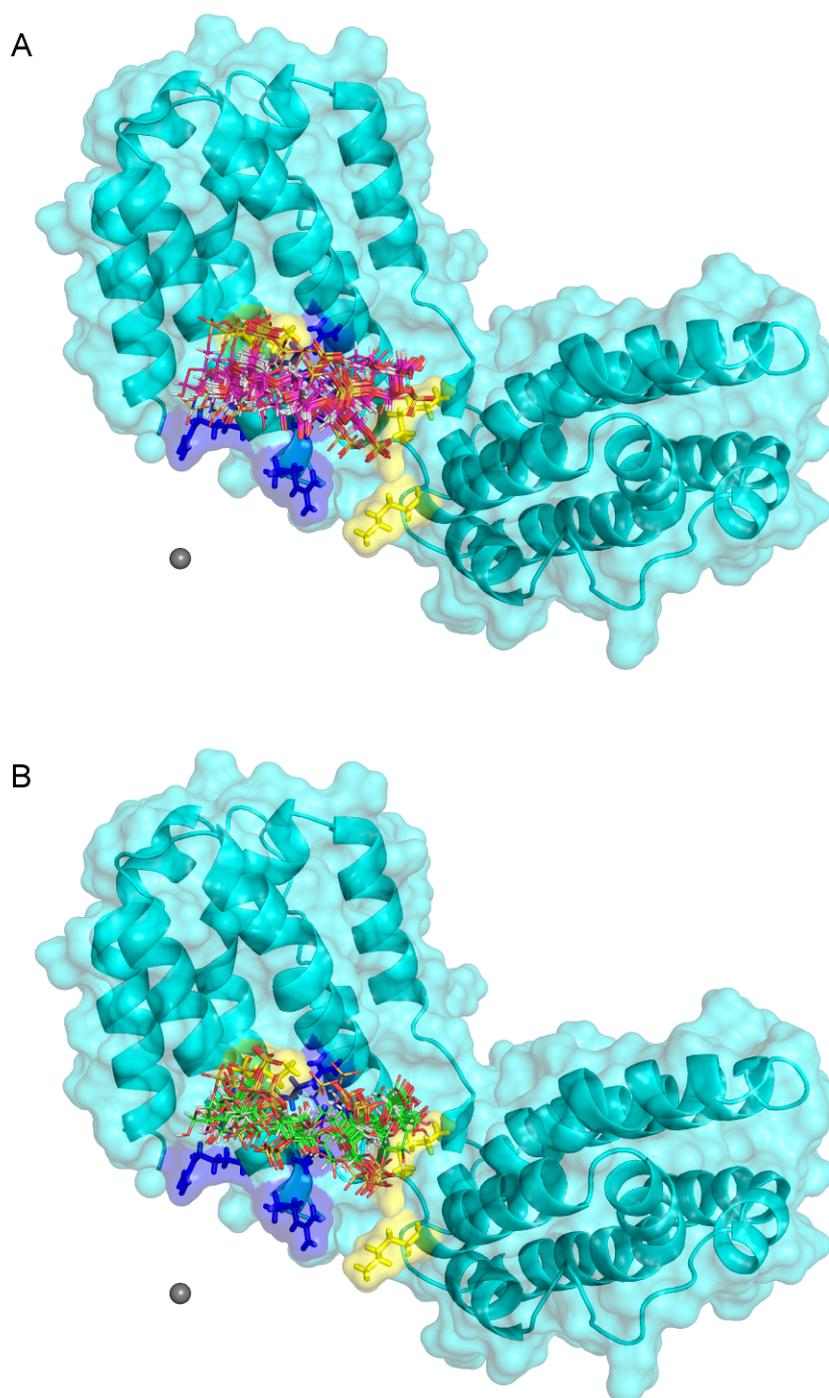


Abbildung 4.47.: Strukturmodell des IL-10-Heparin-Komplexes erhalten aus PCS-basierten *Rigid Body Docking*-Berechnungen mit Xplor-NIH. Die 20 Strukturen mit dem geringsten Energiewert sind gezeigt. (A) Komplexstruktur mit $^1\text{C}_4$ -Heparin. (B) Komplexstruktur mit $^2\text{S}_0$ -Heparin. Der Ligand ist als Stabmodell gezeichnet und entsprechend dem Atomtyp gefärbt: Kohlenstoff: magenta oder grün, Wasserstoff: weiß, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Schwefel: gold. Das Lanthanoidion ist als graue Kugel gezeichnet. Potentielle Bindungspartner in der GAG-Bindungsstelle sind positiv geladene Aminosäuren. Die Argininreste R102, R104, R106 und R107 sind blau gefärbt und die Lysinreste K99, K117 und K119 gelb.

5. Diskussion

5.1. Präparation und Strukturuntersuchung von murinem IL-10

Voraussetzung für die Kristallisation und NMR-spektroskopische Charakterisierung von murinem IL-10 war die Präparation großer Mengen an reinem und homogenem Protein. So betrug der Bedarf für eine einzelne NMR-Probe 5 - 10 mg, im Fall von Tripelresonanzexperimenten sogar 15 - 20 mg. Dies konnte nur durch eine zeitlich effektive Herstellungsmethode mit hoher Ausbeute erreicht werden. In dieser Arbeit wurden zwei Synthesestrategien verfolgt: (1) Die Expression als unlösliches Protein in *E. coli*, was die Rückfaltung aus Einschlusskörpern erforderte, und (2) die Expression als lösliches Fusionsprotein mit MBP in *E. coli*, aus dem IL-10 anschließend durch FaktorXa-Spaltung freigesetzt wurde. Für das Wildtyp-Protein war die Ausbeute mit beiden Methoden vergleichbar und es konnten ca. 0,5 mg Protein je 1 g Biofeuchtmasse erhalten werden. Eine merkliche Verbesserung der Ausbeute um einen Faktor 10 bis 20 wurde für die Proteinerückfaltung durch Verwendung der C149Y-Mutante von IL-10 erreicht. Die Mutation des freien Cysteins 149 verringert die Anzahl der Cysteinreste im IL-10-Dimer von 10 auf 8 und somit die Zahl möglicher Kombinationen an Disulfiden von 945 auf 105 (entsprechend $(n - 1) \times (n - 3) \times (n - 5) \times \dots \times 3 \times 1$ mit n als der Anzahl an Cysteinen). Mit anderen Worten, die relative Häufigkeit der nativen IL-10-Dimervariante mit der korrekten Geometrie an Disulfidverknüpfungen wird verzehnfacht, was den Anstieg der Proteinausbeute um den gleichen Faktor erklären kann. Im Fall des löslich exprimierten IL-10 konnte die C149Y-Mutation die Ausbeute dagegen nicht erhöhen. Das kann darauf hindeuten, dass in *E. coli* weitere Mechanismen als allein die Disulfidverbrückung limitierend für die Proteinfaltung im Fall von IL-10 sind. Es ist z. B. denkbar, dass die Insertion der Helices E und F in das benachbarte Monomer und die Ausbildung der Dimerstruktur zeitlich limitierende Schritte darstellen. Bei IL-10 müssen die Bildung der Tertiär- und Quartärstruktur gleichzeitig einhergehen. Solange Helices dem Wasser exponiert vorliegen, könnten hydrophobe Bereiche die Aggregation zwischen mehreren IL-10-Molekülen auslösen, vor allem im Fall hoher lokaler Proteinkonzentrationen, die bei der Überexpression im *E. coli*-Zytoplasma anfallen.

Mit beiden Synthesestrategien wurde IL-10 in hoher Reinheit und mit korrekter Struktur hergestellt. CD-Spektroskopie ergab einen α -Helixanteil von 68%, welcher gut mit der Kristallstruktur und der NMR-Sekundärstrukturanalyse von IL-10 übereinstimmt. Das Vorliegen einer kompakten Proteinfaltung zeigten charakteristische, hochfeldverschobene Methylsignale unterhalb von 0 ppm im 1D- ^1H -NMR-Spektrum an. Beeindruckend ist der hohe Grad an Übereinstimmung zwischen den NMR-Spektren des löslich exprimierten und rückgefalteten IL-10 (Abbildung 4.7) z. B. in der Lage der Methylsignale oder der Dispersion der H_N -Region. Die C149Y-Mutation hatte keinen negativen Einfluss auf die biologische Aktivität und rekombinant hergestelltes IL-10 wies eine ähnliche Aktivität

5. Diskussion

auf ($EC_{50} = 0,91$ ng/mL) wie das Wildtyp-Protein ($EC_{50} = 0,47$ ng/mL). Der korrekte Oligomerzustand wurde schließlich durch Größenausschlusschromatographie verifiziert.

Um IL-10 für eine Anwendung in Kristallisations- und NMR-Experimenten zugänglich zu machen, wurden weitere Änderungen an seiner Aminosäuresequenz bzw. an der Probenzusammensetzung vorgenommen. Eine Verbesserung der ^1H -Linienbreite und Signalintensität in 2D- und 3D-NMR-Experimenten wurde durch eine partielle (75%) Deuterierung des Proteins erreicht. Diese verbessert die Relaxationseigenschaften von Protonen und Heteroatomen durch Verringerung der dipolaren Kopplung. Außerdem verhindert die Deuterierung die Signalaufspaltung von Amidprotonen infolge der $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ -Kopplung in Experimenten mit TROSY als Detektionsprinzip. In HSQC-Spektren von IL-10 (Abbildung 4.21) war neben der gewünschten Verringerung der ^1H -Linienbreite aber keine zusätzliche Signalverschmälerung in der ^{15}N -Dimension zu beobachten. Dies könnte auf einen ^2H -Isotopeneffekt zurückgeführt werden. Deuterium induziert eine Änderung der chemischen Verschiebung im Vergleich zur ^1H . Für ^{15}N beträgt der Effekt im Fall eines über zwei Bindungen entfernten, also z. B. an C_α gebundenen ^2H -Kerns $-0,05$ ppm bis $-0,10$ ppm [262]. Bei partieller Deuterierung, also gleichzeitigem Vorkommen von ^1H und ^2H , werden Signale bei zwei verschiedenen ^{15}N -chemischen Verschiebungen erwartet, die bei geringer Auflösung ein gemeinsames breites Signal ergeben. Der ^2H -Isotopeneffekt sollte auch bei der Vorhersage von Rückgrat-Torsionswinkeln und Proteinsekundärstrukturen [154, 256] berücksichtigt werden, denn die *Random Coil*-Referenzwerte, mit denen die beobachteten chemischen Verschiebungen verglichen werden, wurden i. d. R. für nicht deuterierte Proteine erhalten [155]. Eine Möglichkeit stellt die Auswertung der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen C_α und C_β dar, weil für beide Atome ein ähnlich starker ^2H -Isotopeneffekt beobachtet wird.

Die chemischen Verschiebungen der Rückgrat ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Atome sowie die $^{13}\text{C}_\beta$ -Atome von IL-10 wurden mittels $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Tripelresonanzexperimenten mit 91% Vollständigkeit zugeordnet. Diese Arbeit stellt somit die erste NMR-Zuordnung für ein Protein der IL-10-Familie und nach IFN- γ [263] und IFN- $\alpha 2a$ [264] die dritte Zuordnung für ein Klasse-2-Zytokin dar. Längere Sequenzbereiche, die in der Zuordnung fehlen, umfassen C12 - F15 und R107 - L112. Zwar blieben von den 151 NH-Signalen im HSQC-Spektrum drei unbestimmt und es ist möglich, dass sie den fehlenden Bereichen zugewiesen werden können. Andere mögen dagegen unter den angegebenen experimentellen Bedingungen nicht detektiert worden sein. Einen möglichen Grund stellt die Kinetik des chemischen Austauschs zwischen Amidprotonen und den Protonen des Lösungsmittels dar. Die nicht zugeordneten Aminosäurereste sind in Lösungsmittel-zugänglichen *Loop*-Regionen lokalisiert und ihre Amidprotonen besitzen daher wahrscheinlich eine hohe Austauschrate. Für den Fall, dass jene größer ist als die Differenz der Resonanzfrequenz zwischen Amid- und Wasserprotonen (d. h., es liegt ein schneller Austausch vor), wird nur ein Signal beobachtet, dessen Lage durch die Konzentration gewichtet ist. Es liegt unterhalb des intensiveren Wassersignals und wird deshalb nicht im Spektrum detektiert.

Aus den beobachteten chemischen Verschiebungen wurde die Sekundärstruktur von IL-10 bestimmt und ihre Lage innerhalb der Aminosäuresequenz lokalisiert (Abbildung 4.24). Als Kriterium der Strukturbestimmung wurde die Differenz der sekundären $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -chemischen Verschiebungen ($\Delta\text{C}_\alpha - \Delta\text{C}_\beta$) verwendet [256], da sie unabhängig von einer korrekten ^{13}C -Referenzierung ist. Es wurde ausschließlich α -helikale

Struktur bestimmt. Ihre Lage entspricht sehr genau den Helixregionen der Kristallstruktur. Sogar die kurze 3_{10} -Helix zwischen den Aminosäuren C114 bis S116 wurde korrekt von der NMR-Sekundärstrukturanalyse erfasst.

Die dreidimensionale Struktur von IL-10 wurde durch Kristallisation und Röntgenbeugung an den erhaltenden Einkristallen bestimmt. Auch hierfür waren umfangreiche Modifikationen der Proteinprobe erforderlich. Das Protein mit vollständiger Länge konnte nicht kristallisiert werden. Die wahrscheinlichste Ursache stellte die hohe Mobilität und fehlende Struktur des Protein-N-Terminus dar, denn eine Verkürzung seiner Sequenz um die ersten acht Aminosäuren erlaubte schließlich die Kristallisation von IL-10 und die Bestimmung seiner Kristallstruktur mit 2,05 Å Auflösung. Sie ist in Übereinstimmung zu den bekannten Strukturen von humanem und viralem IL-10, welche ausführlich in Abschnitt 2.2.3 vorgestellt wurden. Außerdem gelang durch Einführung von zwei einzelnen Punktmutationen (Q32R und T49K) die Erzeugung einer neuen IL-10-Variante mit verbesserten Kristallisationseigenschaften und einer gewünschten Kristallsymmetrie. Kristalle der IL-10-Mutante NΔ8, Q32R, T49K, C149Y wurden unter einer Vielzahl von Bedingungen erhalten und besaßen eine tetragonale $P4_32_12$ -Symmetrie. Die Lösung ihrer Kristallstruktur mit 2,25 Å Auflösung und Analyse der Seitenkettenpositionen von R32 und K49 bestätigte, dass die eingeführten Aminosäurereste Kontakte zu benachbarten Proteinmolekülen im Kristall ausbilden und die für das humane und virale Protein beobachtete Kristallform reproduzieren können.

Unter den molekularen Faktoren, welche zur Proteinkristallisation beitragen, spielt ohne Zweifel die Beschaffenheit der Proteinoberfläche eine wichtige Rolle. Lagern sich Proteine zusammen, wird das an ihrer Oberfläche gebundene Wasser freigesetzt und dessen Entropie erhöht, was als Haupttriebkraft für die Kristallisation angesehen wird [265, 266]. Rekombinante DNA-Technologien erlauben die gezielte Modifizierung von Proteinoberflächen mit bevorzugten Kristallisationseigenschaften [267]. In der Natur werden häufig Aminosäurereste mit langen Seitenketten (Lys, Glu, Gln), d. h. mit großem konformationellen Freiraum, an Proteinoberflächen gefunden. Durch den sich bei Zusammenlagerung von Proteinmolekülen ergebenden energetisch ungünstigen Verlust ihrer Entropie (~ 2 kcal/mol pro Aminosäurerest unter Normalbedingungen) [268] wirken sie der Proteinaggregation entgegen. Somit korreliert ein hoher Anteil an Lys- und Glu-Resten negativ mit der Wahrscheinlichkeit eines Proteins zu kristallisieren und es kann von Vorteil sein, sie durch kleinere Aminosäuren (Ala, Ser) zu ersetzen [269]. Eine weitere Möglichkeit, die Kristallisationseigenschaften zu verbessern, stellt die Förderung gezielter Molekülkontakte dar, was in dieser Arbeit umgesetzt wurde. Kleine organische Moleküle mit mehreren geladenen Gruppen, z. B. polyvalente Carbonsäure- und Aminoverbindungen, Moleküle mit Sulfat- und Phosphatgruppen, können Proteinmoleküle quervernetzen und dabei helfen, intermolekulare Kontakte auszubilden [270]. Ein häufig verwendetes Fällungsmittel in der Proteinkristallisation ist TacsimateTM (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) – eine Mischung aus polyvalenten Carbonsäuren wie Malonat, Citrat, Tatriat. Schließlich können, wie in dieser Arbeit, auch gezielte Aminosäuremodifizierungen eingeführt werden, um künstliche Kontaktflächen zwischen Proteinmolekülen zu erzeugen. Weitere Beispiele für solche Kontaktflächenmodifizierungen sind ein artifizielles Leucin-Reißverschluss-Motiv [271], eine Paarung von β -Strängen [272], Metallionkomplexe [273, 274] sowie kovalente Quervernetzungen z. B. durch Disulfidbindungen [275]. Künstliche Kontaktflächen können

symmetrische Proteinoligomere erzeugen, die eine höhere Neigung zur Kristallisation haben, weil weniger zufällig gebildete Kontakte während des Kristallwachstums durchlaufen werden müssen. Außerdem können interne Symmetrieachsen des Moleküls mit Kristallachsen zusammenfallen, wodurch sich der Raum an möglichen Kristallsymmetrien vergrößert.

5.2. Einfluss von GAG-Sulfatierung, Größe und Struktur auf die IL-10-Bindung

STD- und trNOESY-NMR-Experimente dienten als Nachweis der GAG-IL-10-Interaktion. Außerdem konnte mit ihnen der Einfluss von GAG-Sulfatierung, Größe und Struktur auf die IL-10-Bindung bestimmt werden. Die in der Arbeit untersuchten Di- und Tetrasaccharide zeigten für viele Protonen starke bis mittelstarke STD-Effekte – ein Hinweis darauf, dass alle Bereiche des GAG-Liganden in der Nähe der Proteinoberfläche positioniert sind. Die stärksten STD-Effekte wurden dabei für Protonen benachbart zu Sulfatgruppen beobachtet (siehe Abschnitt 4.2.1 und Abbildung 4.11), nämlich für H2, H4, H5, H6pro(R) und H6pro(S) des GlcN- bzw. GalN-Rings sowie für H1, H2 und H3 des ^{4,5}ΔUA- bzw. IdoA-Rings. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Sulfatgruppen zum Protein hin orientiert sind und so zur Bindung des Liganden an IL-10 beitragen. Starke STD-Effekte wurden ferner auch für die Methylprotonen der N-Acetylgruppe in Heparin I-A und in den CS-Disacchariden gefunden, die für eine Beteiligung der Acetylgruppe in Wasserstoffbrückenbindungen oder in Van-der-Waals-Wechselwirkungen sprechen könnten. Jedoch weist die hoch negativ geladene Struktur der GAGs auf eine besondere Rolle der Sulfatierung und auf Coulomb-Wechselwirkungen als wichtige Triebkraft der Interaktion hin. Gewiss mögen noch andere Mechanismen einen wichtigen Beitrag zur Bindung leisten. Die Freisetzung von Gegenionen des GAGs oder von an der Proteinoberfläche gebundenen Wassermolekülen während der Bindung können einen Gewinn an Entropie liefern, der z. B. mittels isothermer Titrationskalorimetrie bestimmt werden kann.

Die Bedeutung elektrostatischer Interaktionen wurde weiter auch anhand der Korrelation zwischen GAG-Sulfatierungsgrad und Bindungsaffinität sowie durch die Tatsache, dass unsulfatiertes HA nicht an IL-10 band, gezeigt. Im Fall der getesteten GAG-Disaccharide führte die Addition jeder zusätzlichen Sulfatgruppe stets zu einem weiteren Anstieg der Bindungsaffinität. Dagegen war die Position, an welcher die Sulfatgruppe gebunden war, nicht entscheidend und so besaßen Liganden mit der gleichen Anzahl an Sulfatgruppen, aber unterschiedlichem Modifizierungsmuster vergleichbare Affinitäten. Schließlich war auch anhand des Musters der beobachteten STD-Effekte keine Vorrangstellung einer einzelnen Sulfatgruppe zu erkennen, sondern starke STD-Effekte traten in der Nachbarschaft zu allen O- und N-Sulfatgruppen auf. Zwar führte die Abstraktion der N-Sulfatgruppe im Fall von Heparin I-H zu einem Verlust der Bindung, jedoch ist dieser Effekt wohl eher auf die Erzeugung einer positiv geladenen Aminogruppe als auf eine Schlüsselstellung der N-Sulfatgruppe selbst zurückzuführen. Schließlich hatten auch das dreifach sulfatierte Heparin I-S und CS-Disaccharid ähnlich hohe Bindungsaffinitäten, obwohl in letzterem das N-Sulfat nicht vorhanden war.

Im Unterschied zu IL-10 wurde für andere Proteine ein Einfluss des GAG-Sulfatierungsmusters auf die Bindung gefunden. So waren für die Wechselwirkung von Heparin

mit bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*) [30] und MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*) [276] die 2-O- und N-Sulfatierung wichtiger als die 6-O-Sulfatierung. Bei anderen Proteinen (IL-8 [277], SDF-1 [108], HIV-1 Tat-Protein [278]) hatten dagegen wiederum alle O- und N-Sulfatgruppen einen ähnlich starken Beitrag zur GAG-Bindung.

Der Vergleich von Heparin- und CS-Disacchariden mit gleichem Sulfatierungsgrad ergab ähnlich starke Bindungsaffinitäten für beide GAG-Typen. Die Monosaccharid-Zusammensetzung (GlcN oder GalN im Fall von Heparin bzw. CS) und die Geometrie der glykosidischen Bindung ($\beta(1\rightarrow4)$ - oder $\beta(1\rightarrow3)$ -glykosidisch im Fall von Heparin bzw. CS) hatten keinen merklichen zusätzlichen Einfluss auf die Bindungsstärke. Sondern der wichtigste Parameter der IL-10-GAG-Bindung ist die Sulfatierung. Natürlich vorkommendes CS ist jedoch schwächer sulfatiert als Heparin und trägt nur eine Sulfatgruppe pro Disaccharideinheit. Die entsprechenden C4S- und C6S-Disaccharide zeigten eine 30- bis 60-fach geringere Affinität als das Heparin I-S Disaccharid. Allerdings existieren auch hoch sulfatierte Bereiche in CS (z. B. CS-E) mit einer biologischen Bedeutung für die Wachstumsfaktorbindung [279] und Gehirnmorphogenese [280].

Die Verwendung von kurzen Disacchariden als Modell für die in natürlicher Form als Polymere vorliegenden GAGs hat Limitationen und war in dieser Arbeit, wie unter 4.2.1 beschrieben, vor allem durch ihre zweifelsfreien stofflichen Eigenschaften motiviert. Sie waren als reine Verbindungen mit definiertem Sulfatierungsgrad und Sulfatierungsmuster verfügbar, was eine eindeutige NMR-Signaluordnung und Interpretationen der STD-Ergebnisse ermöglichte. Bereits Disaccharide zeigten eine Vielzahl von STD-Signalen, die auf beträchtliche Interaktionen mit IL-10 hinwiesen. Anhand der hier gemachten Ergebnisse wurde weiterhin geschlossen, dass die für Disaccharide gefundenen Mechanismen, z. B. zum Einfluss der Sulfatierung auf die Bindungsaffinität, auch auf längere GAG-Oligosaccharide übertragbar sind. So wurden im Rahmen der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente Signalverschiebungen für die gleiche Gruppe von Aminosäureresten detektiert wie auch im Fall von längeren GAG-Molekülen (siehe Abschnitt 4.6.1), was darauf hinweist, dass GAGs ab einer Länge von einem Disaccharid die gleiche Bindungsstelle in IL-10 besetzen können. Schließlich wurden auch im Fall anderer GAG-bindender Proteine wie aFGF (engl. *acidic fibroblast growth factor*) [281] und SDF-1 [108] Disaccharide erfolgreich zum Aufspüren der Ligandenbindungsstelle eingesetzt.

Eine Verlängerung der GAG-Kette, was am Beispiel von Heparin untersucht wurde, führte zu einer stetigen Erhöhung der Bindungsaffinität. So wurde für das Heparin-Oktasaccharid ein 10- bis 20-fach geringerer K_D -Wert als für das Heparin I-S Disaccharid bestimmt. Diese Beobachtung kann mit der größeren Anzahl an Sulfatgruppen und mit der gleichzeitigen Besetzung beider GAG-Bindungsstellen im IL-10-Dimer erklärt werden. Die Analyse von IL-10 chemischen Verschiebungen sowie von PCS- und PRE-Daten weisen auf eine Gruppe aus basischen Aminosäureresten am C-terminalen Ende von Helix D und dem benachbarten DE-Loop als den Ort der GAG-Bindungsstelle hin. Aufgrund der C2-Rotationssymmetrie liegt diese Region zweimal in IL-10, in einem Abstand von 30 - 40 Å zueinander, vor. Die STD-Bindungsexperimente schlagen einen Mechanismus vor, wonach ein Heparinmolekül von der Länge eines Oktasaccharids und länger beide Bindungsstellen gleichzeitig binden kann. Für das Okta- und Dekasaccharid wurde eine Hill-Koeffizient von ~ 2 bestimmt, welcher der Anzahl an Bindungsstellen entspricht. Demnach liegt ein Fall von starker Kooperativität vor, d. h., die Besetzung beider Bindungsstellen

5. Diskussion

erfolgt zeitlich simultan und im Gleichgewicht stehen miteinander nur das unbesetzte und das vollbesetzte Protein.

Der Struktur und Flexibilität eines GAGs im Komplex mit IL-10 wurde am Beispiel des Heparin-Tetrasaccharidfragments $\Delta\text{UA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}(1\rightarrow4)\text{IdoA},2\text{S}(1\rightarrow4)\text{GlcNS},6\text{S}$ untersucht. Auch wenn die Biosynthese und das Vorkommen von Heparin vor allem auf die Granula von Mastzellen beschränkt ist, so ähnelt Heparin in seiner chemischen Struktur doch den mehrfach sulfatierten S-Domänen von HS und kann daher als Modell für GAGs der extrazellulären Matrix herangezogen werden. Außerdem war ein hoher Sulfatgruppenanteil notwendige Voraussetzung für die Wechselwirkung von GAGs mit IL-10. Die Wahl des Tetrasaccharids stellte dabei einen Kompromiss dar – zwischen einem Molekül, das einerseits kurz genug war, um es durch hochauflösende NMR-Spektroskopie charakterisieren zu können, aber andererseits auch lang genug, um Eigenschaften des nativen polymeren Heparins widerzuspiegeln. Für Heparin ab der Länge eines Hexasaccharids war der hier verwendete Ansatz zur Strukturbestimmung mittels trNOEs nicht mehr möglich, weil Signale der gebundenen und freien Form nicht unterschieden werden konnten. Einem Disaccharid wiederum fehlte der native IdoA-Ring, dessen Rolle für die Struktur von Heparin selbst, aber auch für Protein-GAG-Wechselwirkungen bekannt ist [23, 24, 149, 282].

Strukturmodelle des IL-10-gebundenen und freien Heparins wurden aus MD-Simulationen und auf Grundlage von NOE-Abstandsinformationen erhalten. In beiden Modellen haben die Zuckerringe gültige Konformationen, d. h. die GlcN-Ringe eine ${}^4\text{C}_1$ -Konformation und der IdoA-Ring eine ${}^2\text{S}_0$ -Konformation. Aufgrund fehlender Parametrisierung des GLYCAM-Kraftfeldes für den 4,5-ungesättigten ΔUA -Ring wurden NOE-Daten des terminalen Zuckerrings nicht verwendet. Der ${}^{4,5}\Delta\text{UA}$ -Ring ist das Ergebnis der Präparation des Tetrasaccharidfragments durch Lyase-Verdau und besitzt eine ungewöhnliche ${}^1\text{H}_2$ - oder ${}^2\text{H}_1$ -Konformation. Da diese aber keine Bedeutung für die native Struktur und biologische Funktion von Heparin und HS besitzt, wurde seine Struktur hier nicht weiter diskutiert. Außerdem wurde aufgrund seiner terminalen Position in der Molekülkette der Einfluss des ${}^{4,5}\Delta\text{UA}$ -Ringes auf die Heparinrückgratstruktur als gering eingeschätzt.

Ein Vergleich der Strukturmodelle von freiem und an IL-10 gebundenem Heparin zeigt, dass in letzterem das Heparinmolekül etwas weniger gekrümmt ist. Diese Änderung der Rückgratstruktur spiegelt sich auch in den Winkeln der glykosidischen Bindung wider. Der ϕ -Winkel unterscheidet sich für die Bindungen zwischen den Ringen A und B sowie C und D um ca. 10° bis 30° . Trotz dieser Unterschiede ist die Struktur in beiden Modellen weitgehend ähnlich und Ansätze einer helikalen Struktur, wie für das Heparin-Dodekasaccharid beobachtet (Abbildung 2.3), sind zu erkennen. Auch im hoch affinen Komplex zwischen bFGF und Heparin (PDB # 1BFB, #1BFC) [30, 283] mit K_D -Werten von $\sim 6 \mu\text{M}$ und $\sim 100 \text{ nM}$ für das Tetra- und Hexasaccharid [27] sind die Unterschiede in der Rückgratstruktur relativ zum ungebundenen Heparin gering und liefern keinen Hinweis über die Stärke der Wechselwirkung. Außerdem ist die Orientierung vieler Sulfatgruppen in beiden Strukturmodellen konserviert. Einzige Ausnahme stellt die 6-O-Sulfatgruppe von GlcN-Ring B und D dar. In Ring B liegt nur das *gauche-gauche* Konformer vor und sein Diederwinkel unterscheidet sich im Mittel um 10° zwischen freiem und gebundenem Zustand. Für Ring D wird zusätzlich ein geringer Anteil des *gauche-trans* Konformers im Strukturensamble in Gegenwart von IL-10 beobachtet. Dieses Ergebnis, dass in den MD-Strukturmodellen

das 6-O-Sulfat hauptsächlich in der *gauche-gauche* Orientierung vorliegt, ist im Widerspruch zur 3J -Kopplungsanalyse. Jene bestimmte in Einklang mit anderen D-Glukopyranosen [254] einen beträchtlichen Anteil des *gauche-trans* Konformers der C5-C6-Bindung in freiem Heparin von 30%. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die MD-Simulation hinsichtlich der Orientierung der Sulfatgruppen überempfindlich auf einzelne NOE-Abstandsvorgaben war und dass die Analyse der NMR-Daten Vorrang nehmen sollte. Leider konnten für den gebundenen Zustand aufgrund von Signalverbreiterung keine Werte für $^3J_{\text{H5-H6pro(R)}}$ und $^3J_{\text{H5-H6pro(S)}}$ gemessen und somit Aussagen zum Konformerengleichgewicht gemacht werden.

Als weiteres charakteristisches Merkmal der Heparinstruktur wurde das konformationelle Gleichgewicht des IdoA-Rings untersucht. In Abhängigkeit von der Spezifität der Rezeptorbindungsstelle oder der Dominanz einer bestimmten Form in Lösung, kann der IdoA-Ring im Heparin-Protein-Komplex entweder in 1C_4 , 2S_O oder im Gleichgewicht aus beiden Konformeren vorliegen. Er ermöglicht dem Heparinmolekül, sich an die Proteinstruktur anzupassen (*induced fit*), was ein Vorteil für die Bindung gegenüber anderen GAGs darstellt. In der Kristallstruktur von bFGF mit einem Heparin-Tetrasaccharid (PDB # 1BFB) [30] macht der IdoA-Ring vielzählige Interaktionen mit dem Protein (R121, K126, Q135, A137) und nimmt eine 1C_4 -Sesselform ein. Im Komplex eines Heparin-Hexasaccharids mit bFGF (PDB # 1BFC) geht der zweite IdoA-Ring deutlich weniger Interaktionen ein (K136) und existiert stattdessen in einer 2S_O -Konformation. Im Gegensatz zu bFGF wurde für aFGF berichtet, dass das Protein beide IdoA-Konformationen erkennt und dass 1C_4 und 2S_O ungefähr gleich besetzt sind [149]. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für IL-10 gemacht. Die 3J -Kopplungsanalyse von IdoA zeigte, dass sowohl im freien als auch im IL-10-gebundenen Heparin beide Formen gleichzeitig vorkommen. Ihr Verhältnis im gebundenen Zustand wurde auf ungefähr 33%:67% bestimmt. Im Gegensatz dazu zeigen die MD-Strukturmodelle den IdoA-Ring ausschließlich in der 2S_O -Form. Diese Diskrepanz wurde wahrscheinlich durch den starken NOE zwischen H2 und H5 verursacht, der aufgrund des kürzeren Abstands (2,4 Å in 2S_O und 4,0 Å in 1C_4) durch die 2S_O -Form dominiert wird. Der 1C_4 -Anteil wird deshalb unterschätzt und der Zuckerring während der Simulation in der 2S_O -Konformation gehalten. Das interessante Ergebnis, dass beide IdoA-Ringformen des Heparins in Gegenwart von IL-10 vorkommen, kann darauf hindeuten, dass entweder zwei Bindungsmodi existieren – einer mit IdoA in 1C_4 und ein anderer mit IdoA in 2S_O – oder, dass die konformationelle Flexibilität von IdoA auch im proteingebundenen Zustand bewahrt bleibt. Die Zeitdauer des 1C_4 - 2S_O -Übergangs liegt im Bereich weniger μs [284] und kann damit schnell genug sein, um während der Interaktion mit dem Protein zu erfolgen. Die Lebensdauer des gebundenen Zustands kann anhand der Affinität des Heparin-Tetrasaccharids ($K_D \sim 300 \mu\text{M}$) auf mehrere 10 μs geschätzt werden. Auch erfordert der Konformationswechsel keinen großen zusätzlichen Raum. Er hat nur einen geringen Einfluss auf die globale 3D-Struktur von Heparin [23]: die C2- und C3-Ringatome tauschen ihre Positionen ober- und unterhalb der Ringebene und die 2-O-Sulfatgruppe ändert ihre Orientierung infolgedessen. Außerdem ist es denkbar, dass auch das Protein diese lokale Dynamik toleriert. Interaktionen mit GAGs werden oftmals durch Arginine und Lysine vermittelt, deren Seitenketten flexibel genug sind, um eine gleichzeitige Bewegung zusammen mit Heparin auszuführen. Flexibilität auf Protein- und Ligandenseite mag so auch einen Mechanismus darstellen, um teilweise ihren Entropiever-

lust während der Bindung zu kompensieren. Allerdings sind auch Fälle beschrieben, in denen die konformationelle Flexibilität nicht erhalten bleibt, sondern die Selektion einer bestimmten Konformation erfolgt. So wurden in der Kristallstruktur von Annexin V zwei Heparinmoleküle beobachtet, in denen die proteingebundene IdoA die 2S_O -Form innehat, die ungebundene IdoA aber die 1C_4 -Form aufweist [111].

5.3. Identifizierung der GAG-Bindungsstelle von IL-10

Die Lage der GAG-Bindungsstelle in IL-10 wurde mit drei unabhängigen NMR-Experimenten untersucht: durch die Messung chemischer Verschiebungen sowie von PCS- und PRE-Daten. Diese NMR-Observablen sind sensitiv für unterschiedliche molekulare Parameter (elektronische Umgebung des Moleküls, Molekülabstand und Orientierung) und lieferten deshalb sich ergänzende Strukturinformationen. Ihre Ergebnisse sind miteinander vereinbar und weisen auf die Existenz einer definierten Bindungsstelle von GAGs in IL-10, am C-terminalen Ende von Helix D und dem benachbarten DE-*Loop*, hin (Abbildung 5.1).

Änderungen in den Amidsignalen des Proteinerückgrats dienten dazu, die Bindungsregion in IL-10 grob einzugrenzen und die Bindung für mehrere GAG-Liganden zu überprüfen. Für alle getesteten GAG-Klassen (Heparin, CS, DS) und verschieden langen Heparinmoleküle wurde das gleiche Muster der Amidsignalverschiebungen beobachtet (Abbildung 4.31), was zeigt, dass sie die gleiche Region in IL-10 erkennen. Eine genaue Eingrenzung der Bindungsstelle auf Grundlage der Amidsignalverschiebungen allein ist dagegen schwierig. Die größten Verschiebungen wurden für Aminosäurereste in *Loop*-Regionen und an den Enden der Polypeptidkette beobachtet. Diese tragen i. d. R. keine elektrische Ladung, obwohl elektrostatische Interaktionen als wichtig für die IL-10-GAG-Bindung gefunden wurden. Des Weiteren ist ihre Lage über größere Raumbereiche im Proteinmolekül verteilt. Im finalen Modell des IL-10-Heparin-Komplexes (Abbildung 5.1) liegen diese Reste im Umfeld der Ligandenbindungstasche. Es ist denkbar, dass sie infolge der Ligandenbindung verdrängt werden und so eine lokale Strukturänderung im Proteinerückgrat erfahren. Zu diesen sind die Proteintermini und *Loop*-Bereiche eher befähigt als z. B. starre Helixbereiche oder Reste im Proteininneren. Es besteht die Gefahr, dass, wenn keine zusätzlichen Informationen eingeholt werden, Konformationsänderungen an sekundären Stellen im Protein fälschlicherweise als Ligandenbindung interpretiert werden [169].

Zusätzliche intermolekulare Abstandsinformationen für den IL-10-GAG-Komplex wurden aus der Messung von PRE- und PCS-Effekten erhalten. Diese wurden mit paramagnetischen *Spinlabeln*, die in einem Fall am Ligand und im anderen am Protein fixiert waren, gemessen. PCS-Effekte sind zusätzlich sensitiv für die Moleküllorientierung relativ zum paramagnetischen Ion und können Informationen zur Ausrichtung des Liganden in der Bindungstasche geben. Paramagnetische NMR-Experimente wurden in großem Umfang für die Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen verwendet, aber bisher nur selten für die Untersuchung ihrer Wechselwirkung mit kleinen Ligandmolekülen. Wenige Arbeiten berichten von spinmarkierten Proteininhibitoren [190] und Kohlenhydraten [191] für PRE-Messungen und *Docking*-Berechnungen oder für Untersuchungen zur Struktur und Dynamik des Liganden selbst [285]. Erst kürzlich wurde die Anwendung von PCSs auch für die Strukturbestimmung von Proteinkomplexen mit Peptiden [192], Kohlenhydraten [193, 194] oder kleinen organischen Ligandmolekülen [196] demonstriert. In der vorlie-

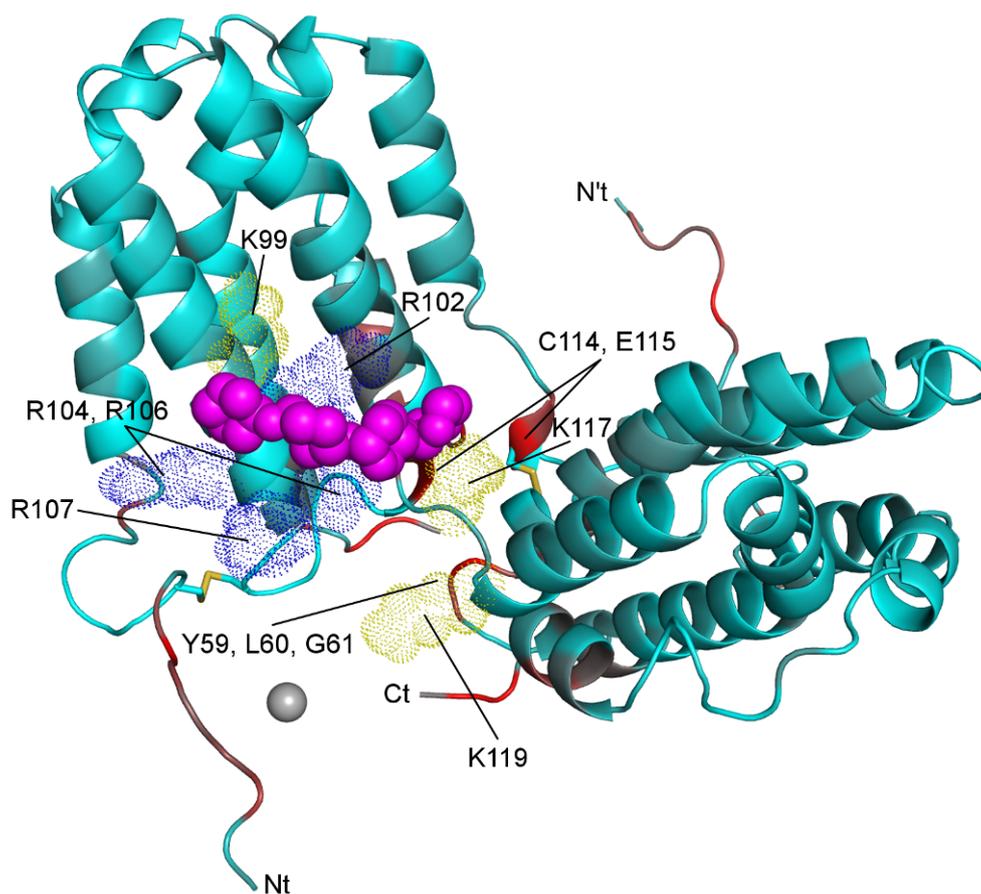


Abbildung 5.1.: Strukturmodell der Wechselwirkung von Heparin mit IL-10 erhalten aus NMR-Daten. Das Proteinrückgrat von IL-10 ist in der *Cartoon*-Darstellung gezeigt und nach dem Wert der Änderung seiner NH-chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{NH}}$) relativ zu L60 eingefärbt (cyan: 0%, rot: 100%). Hohe $\Delta\delta_{\text{NH}}$ -Werte wurden für Proteinreste des BC- und DE-*Loops* (Y59, L60, G61, C114, E115) sowie des Protein-N- und C-Terminus beobachtet. Das Zuckerrückgrat des Heparinliganden ist als Kugelmodell (magenta) dargestellt. Seine Position wurde aus PCS-Daten berechnet und befindet sich in Nachbarschaft zu kationischen Aminosäureresten von IL-10 (Arginine sind blau, Lysine gelb gefärbt). Aminosäureseitenketten sind mit ihrer Van-der-Waals-Oberfläche gepunktet dargestellt. Die Metallionenbindungsstelle des paramagnetischen psHA-EDTA-*Spinlabels* – berechnet aus PRE-Daten – ist als graue Kugel gezeigt und befindet sich ca. 24 Å unterhalb der Position des Heparinliganden im PCS-Modell.

genden Arbeit wurde zum ersten Mal paramagnetische NMR für die Untersuchung einer Protein-GAG-Interaktion angewendet. Die Unzugänglichkeit des Systems für konventionelle strukturbiologische Methoden wie Kristallisation oder NOESY-NMR-Spektroskopie hatten einen neuartigen, alternativen experimentellen Ansatz erforderlich gemacht. Mit diesem konnte die GAG-Bindungsstelle in IL-10 eindeutig identifiziert werden.

PCS-basierte *Docking*-Berechnungen unter Verwendung von insgesamt 540 bzw. 67 PCS-Werten für IL-10 und seinen Heparinligand führten zu eindeutigen Strukturlösungen mit geringer Diversität. Die Strukturmodelle sind im Einklang mit allen anderen experimentellen Ergebnissen sowie theoretischen Vorhersagen zur IL-10-GAG-Bindungsstelle, z. B. solchen anhand des Coulomb-Potentials von IL-10 (persönliche Kommunikation mit

Jan-Philip Gehrcke, BIOTEC, TU Dresden). Sie zeigen den Heparinligand gebunden in der Vertiefung zwischen beiden Dimeruntereinheiten. Er liegt inmitten einer Region aus mehreren positiv geladenen Resten, welche die Lysine K99, K117, K119 und Arginine R102, R104, R106 und R107 beinhaltet. Diese Region ist ein besonderes und einmaliges Merkmal von IL-10, das in den anderen Proteinen der IL-10-Familie nicht vorkommt (Abbildung 5.2). Der Ligand hat, in Übereinstimmung mit dem NOE-Strukturmodell von Heparin, eine leicht gebogene Form und überspannt die Reste R106 und R107. An seinem anderen Ende wird er durch K117 verkeilt. Die Reste R102 und R104 machen dagegen keine Interaktionen und weisen seitlich vom Ligand weg. Allerdings wurde auch auf Proteinseite keine Seitenkettenflexibilität in die *Docking*-Berechnung integriert und es ist sehr wahrscheinlich, dass die genannten Aminosäurereste mit Ligandenbindung eine andere Konformation einnehmen als in der Kristallstruktur. Erwähnenswert ist, dass in dieser der R107-Rest die größte Lösungsmittel-exponierte Oberflächen von 202 \AA^2 (entspricht 56% seiner Gesamtoberfläche) besitzt. Er hat deshalb ein besonders hohes Potential mit dem Heparinligand an der Proteinoberfläche zu interagieren.

Aufgrund der C2-Rotationssymmetrie von IL-10 existiert die GAG-Bindungsstelle zweimal im Protein. Bei Anwendung der Rotationssymmetrie auf das PCS-Strukturmodell wird ein zweites Heparinmolekül erzeugt, das nahe dem ersten entlang ihrer langen Molekülachse aufgereiht ist. Ein Heparin-Okta- oder Dekasaccharid kann den Platz der zwei Einzelmoleküle einnehmen und beide Bindungsstellen überbrücken. Diese Änderung der Bindungsstöchiometrie wurde auch anhand der STD-Experimente gezeigt und mag die Art sein, in der natürliche, polymere GAGs gebunden werden.

Eine weitere unabhängige Bestätigung der GAG-Bindungsstelle gelang mit einem spinmarkierten GAG-Ligand und aus der Beobachtung von PRE-Effekten. Die Ergebnisse dieses Experimentes erreichen eine höhere Auflösung und bessere Eingrenzung der Bindungsstelle, als sie durch die Amidsignalverschiebungen allein möglich war. Andererseits können über die Lage des Liganden in der Bindungsstelle, wie mit dem PCS-Modell, hier nur Vermutungen angestellt werden. Mit der Blickrichtung auf das "V"-förmige IL-10-Dimer aus betrachtet, ist die Position des paramagnetischen Metallions im spinmarkierten Ligand schräg unterhalb der genannten Region von basischen Aminosäureresten. Sein Abstand zum Heparinligand im PCS-Modell beträgt ca. 24 \AA . Es ist offensichtlich, dass der Heparinligand in Abbildung 5.1 nicht gleichzeitig die Position des Metallions erfüllen kann. Eine 90° -Drehung um die Achse senkrecht zur Bildebene wäre erforderlich, um ein Molekülende in der Nähe des Metallions zu platzieren. Die Länge des EDTA-*Linkers* bzw. der Abstand zwischen Metallion und dem Zuckerring am reduzierenden Ende beträgt ca. 13 \AA . Die Länge des vollständig gestreckten spinmarkierten Zuckers ist ca. 30 \AA . Ausgehend von der Position des Metallions ist es möglich, dass der spinmarkierte GAG-Ligand weiter nach oben in die Bindungsstelle hineinragt und dass der Zuckerteil die positiv geladene Proteinregion bindet. Es kann spekuliert werden, dass sterische Gründe diese Umorientierung relativ zum Heparinligand erforderlich machen. Der voluminöse EDTA-*Tag* nimmt den Raum zwischen GAG-Bindungsstelle und Protein-N-Terminus ein, um nicht mit anderen Proteinbereichen zu kollidieren. Somit mag der *Spinlabel* die Orientierung des Liganden in der Bindungstasche verändern, allerdings mit nur geringen Einbußen in der Bindungsaffinität ($K_D = 0,32 \pm 0,06 \text{ mM}$) relativ zum unmarkierten Heparinligand ($K_D = 0,21 \pm 0,05 \text{ mM}$). Die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der beiden ande-

ren NMR-Experimente, vor allem der PCS-Messung, zeigt, dass auch der spinmarkierte Ligand die GAG-Bindungsstelle in IL-10 eindeutig lokalisieren kann.

Das Auffinden einer definierten Bindungsstelle in IL-10, die von GAGs erkannt wird, wirft die Frage nach der Spezifität dieser Interaktion auf. Das einzige, bisher bekannte System einer wirklich spezifischen Protein-GAG-Interaktion stellt die Wechselwirkung zwischen Antithrombin-III und einem Heparin-Pentasaccharid mit einer ungewöhnlichen 3-O-Sulfatierung dar [286]. Für IL-10 treffen dagegen die Kriterien von biologischer und chemischer Spezifität, d. h., es existiert ein einzigartiger Bindungsmodus und eine einzigartige Bindungssequenz unter vielen möglichen, nicht zu und die zuvor genannten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dies. Können aber auch andere negativ geladene Moleküle als GAGs an IL-10 binden? Die Coulomb-Anziehung, welche eine Haupttriebkraft für die GAG-Bindung darstellt, wirkt ungerichtet und beeinflusst auch andere ionische Verbindungen. Allerdings existieren zwischen Arginin- und Lysin-Seitenketten des Proteins und GAG-Sulfatgruppen auch Wasserstoffbrückenbindungen, die eine definierte räumliche Geometrie erfordern. Außerdem haben Sulfate eine höhere Affinität zur Guanidinogruppe von Arginin als andere Anionen [287]. Das Zuckerrückgrat eines GAGs liefert eine Aneinanderreihung mehrerer Sulfate in regelmäßigem, räumlichen Abstand, die an benachbarte Aminosäureseitenketten binden können. Auf diese Weise kann zwischen Protein und GAG eine strukturelle Passgenauigkeit zustande kommen, die andere anionische Ligandmoleküle nicht aufweisen. Dies legt auch die Beobachtung von Konsensussequenzen in vielen Heparin-bindenden Proteinen nahe [288, 289, 290]. Ein weiterer Vorteil von GAGs mag in ihrer supramolekularen Struktur bestehen. In der extrazellulären Matrix sind sie fest an Proteinen und Zelloberflächen immobilisiert und füllen einen dichten Raum aus. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit eines molekularen Kontakts mit dem Protein und somit seine Bindung.

5.4. Biologische Bedeutung der IL-10-GAG-Wechselwirkung

Zwischen IL-10 und GAGs besteht eine schwache, aber signifikante Interaktion. Kurzkettige GAGs von der Größe eines Disaccharids binden IL-10 mit K_D -Werten im millimolaren Bereich. Ihre Affinität nimmt allerdings mit Verlängerung des Moleküls weiter zu. So wurden für das Heparin-Okta- und Dekasaccharid K_D -Werte im unteren mikromolaren Bereich gemessen. Salek-Ardakani et al. bestimmten die Affinität von polymerem Heparin mit SPR-Experimenten sogar auf 54 nM [5]. Der Grund für den Anstieg der Bindungsaffinität wird vor allem in einem anderen Bindungsmechanismus für langkettige GAGs vermutet. Jene können gleichzeitig beide GAG-Bindungsstellen des IL-10-Dimers besetzen, wodurch sich ihre energetischen Beiträge zur Bindung summieren. Für kurze GAGs konnte dagegen keine Vorzugsorientierung bzw. keine spezifischen Bindungsepitope gefunden werden, sondern die beobachteten STD-Effekte waren über das gesamte Molekül verteilt. Auch das Vorliegen des 1C_4 - 2S_0 -Konformationsgleichgewichts von IdoA im IL-10-gebundenen Zustand weist darauf hin, dass ein kurzer GAG-Ligand in mehreren Orientierungen gebunden werden kann und seine interne Flexibilität bewahrt. Trotzdem war am Beispiel des Heparin-Tetrasaccharids eine eindeutige Strukturänderung relativ zum Zustand in Lösung und als Ergebnis der Interaktion mit IL-10 festzustellen.

5. Diskussion

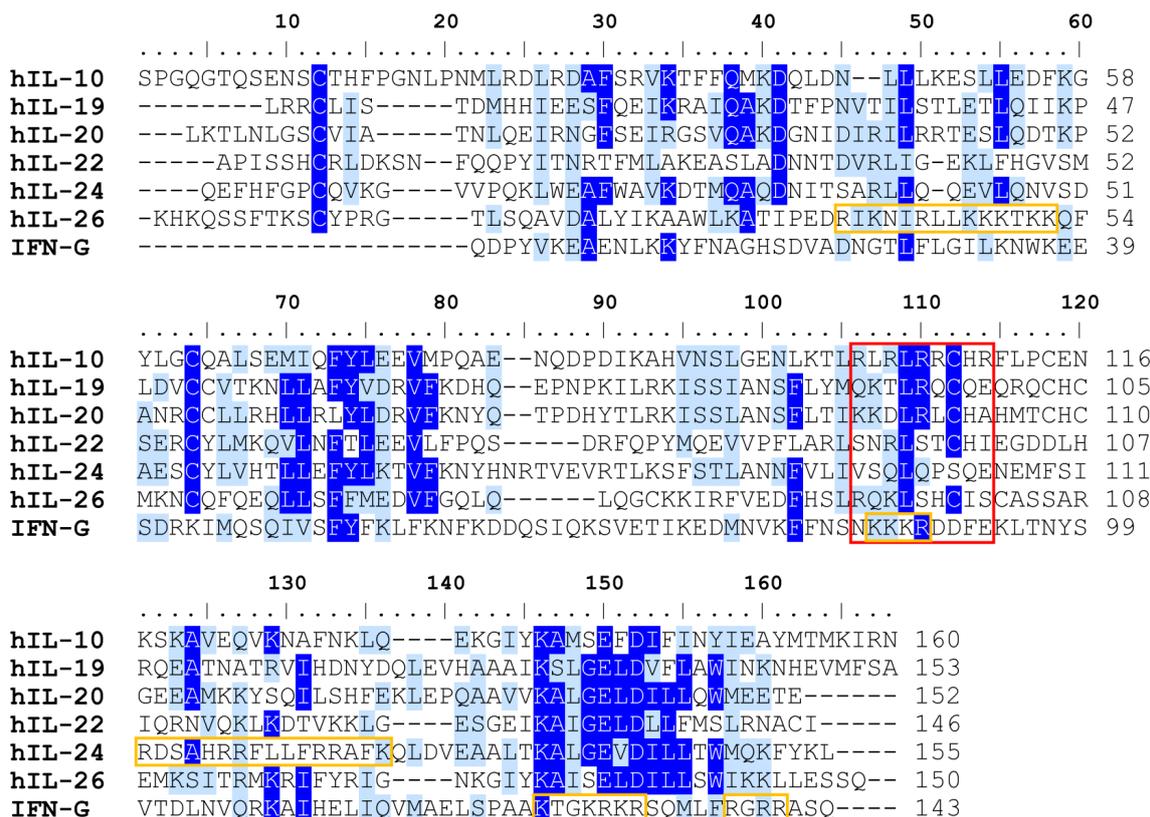


Abbildung 5.2.: Proteinsequenzen für Mitglieder der IL-10-Familie. Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) [88, 89] durchgeführt. Als Vergleichsmatrix wurde die Blossum-Matrix verwendet. Das Öffnen und Verlängern einer Lücke wurde mit einem Score-Wert von 10 bzw. 0,2 bestraft. Positionen, an denen in mindestens 50% der verglichenen Sequenzen die gleiche oder eine ähnliche Aminosäure gefunden wurde, sind dunkel- bzw. hellblau gefärbt. Die Argininreste der GAG-Bindungsstelle von IL-10 (rote Box) sind innerhalb der IL-10-Familie nicht vollständig konserviert. Nur R107^{IL-10} ist in mehr als der Hälfte der Sequenzen (IL-10, IL-19, IL-20, IFN- γ) vorzufinden. Regionen mit einem hohen Anteil an basischen Aminosäureresten (gelbe Boxen) treten auch in IL-24, IL-26 und IFN- γ auf. Bei letzterem bilden die Sequenzabschnitte ¹²⁵KTGKRKR¹³¹ und ¹³⁷RGRR¹⁴⁰ die GAG-Bindungsstelle [291, 292].

Die GAG-Bindungsstelle ist innerhalb der IL-10-Familie ein einmaliges Merkmal von IL-10 und tritt bei den anderen Zytokinen (Abbildung 5.2), die nur eine geringe Sequenzidentität mit IL-10 teilen (IL-19: 18,4%, IL-20: 24,0%, IL-22: 19,4%, IL-24: 17,7%, IL-26: 21,0%, IFN- γ : 10,4%), nicht auf. Außerdem sind sie, bis auf IL-26 und IFN- γ , Monomere. Ein Mechanismus zur Potenzierung der Bindungsaffinität unter Ausnutzung der Protein-Quartärstruktur, d. h. durch Schaffung mehrerer Kopien der GAG-Bindungsstelle, ist hier nicht möglich. Allerdings tauchen auch in den Sequenzen von IL-24, IL-26 und IFN- γ Bereiche mit einer großen Dichte an positiv geladenen Aminosäureresten auf. In der Tat wurden für IL-26 [94, 293] und IFN- γ [292, 294, 295] Interaktionen mit GAGs nachgewiesen. Beide Proteine sind Dimere und für IFN- γ konnte die GAG-Bindungsstelle identifiziert werden. Sie besteht aus zwei benachbarten kationischen Domänen (D1: ¹²⁵KTGKRKR¹³¹ und D2: ¹³⁷RGRR¹⁴⁰) des Protein-C-Terminus. Aufgrund der Dimerstruktur

von IFN- γ werden zwei Kopien der GAG-Bindungsstelle, ähnlich wie bei IL-10, räumlich nebeneinander positioniert und bilden eine langgestreckte Interaktionsfläche, die ein GAG mit der Kettenlänge von 16 Disaccharideinheiten (~ 16 nm) überspannen kann. Die Bindung von IFN- γ an GAGs beeinflusst seine lokale Konzentration im Gewebe [296], schützt das Zytokin vor Proteolyse [45] und bestimmt seine biologische Aktivität [297]. Im Fall von IL-10 sind, trotz bisher wenigen experimentellen Untersuchungen dazu, ähnliche biologische Funktionen der GAG-Wechselwirkung anzunehmen. Die an Zellmembranen und in der extrazellulären Matrix fixierten Proteoglykane könnten IL-10 binden und das Protein somit an Zelloberflächen und im Gewebe anreichern. Sie könnten weiterhin auch seine Diffusion und Verteilung im Gewebe bestimmen. In der Tat hat IL-10 *in vivo* eher parakrine Funktionen und wirkt über kurze Entfernungen zwischen Zellen. Funktionen über längere Transportwege oder über den Blutkreislauf scheinen dagegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen [90]. Roers et al. beobachteten, dass IL-10, welches von verschiedenen Immunzellen produziert wurde, unterschiedliche Wirkungen in der Empfängerzelle hervorrief [74]. Ein Mechanismus, bei dem Unterschiede im GAG-Expressionslevel und Expressionsprofil (z. B. hinsichtlich Stellung und Anzahl der Sulfatgruppen) die Menge an Zelloberflächen gebundenem IL-10 und seinen Wirkungsgrad auf Zellen bestimmen, ist denkbar.

Auch ein Einfluss der GAG-Wechselwirkung auf die IL-10-Rezeptorbindung könnte die unterschiedliche biologische Aktivität erklären. In diesem Zusammenhang wurde über eine Verringerung der IL-10-Aktivität durch lösliche GAGs berichtet [5]. Der Grund ist aber bisher unbekannt. Eine Hemmung der Zelloberflächenbindung, die z. B. über membran gebundene Proteoglykane vermittelt werden könnte und Voraussetzung für die Signalgebung ist, oder eine direkte Inhibition der IL-10-Rezeptorbindung sind denkbar. Auch für das letztgenannte Szenario kann die Bestimmung der GAG-Bindungsstelle die Hypothese für einen möglichen Funktionsmechanismus liefern. In Abbildung 5.3 ist eine Überlagerung des aus PCS-Daten berechneten Heparin-IL-10-Strukturmodells mit dem ternären IL-10/IL-10R1/IL-10R2-Modell gezeigt. Jenes wurde, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, durch Superposition von IL-10/IL-10R1 und der einzelnen IL-10R2-Kette mit der Struktur des vollständigen IL-20/IL-20R1/IL-20R2-Komplexes erzeugt. Das Rezeptormodell dient hier der Diskussion der experimentellen Ergebnisse. Es stellt nur eine Annäherung dar und kann die genaue Struktur der IL-10R2-Bindungsstelle (z. B. hinsichtlich Seitenketteninteraktionen) nicht korrekt wiedergeben. Dennoch ist anzunehmen, dass aufgrund der ähnlichen Strukturen der einzelnen Rezeptorketten und der Verwandtschaftsbeziehung zwischen beiden Zytokinen auch die globale Topologie ihrer Rezeptorkomplexe, d. h. die Lage und Orientierung der einzelnen Proteine zueinander, übereinstimmt. Das Rezeptormodell lässt den Schluss zu, dass die IL-10R2- und die GAG-Bindungsstelle teilweise überlappen könnten, wodurch der GAG-Ligand die IL-10R2-Bindung sterisch blockieren könnte. Eine Inhibition der Rezeptorbindung und der Bildung des ternären Signalkomplexes ist auch in Anbetracht der geringen Affinität von IL-10R2 (~ 2 mM für IL-10 allein, ~ 200 μ M für IL-10/IL-10R1 [99]) denkbar. Für andere Zytokinrezeptoren z. B. RANK (engl. *receptor activator of NF- κ B*) und seinen Ligand RANKL wurde ebenfalls eine inhibitorische Wirkung von GAGs beobachtet [37, 38], während sie bei anderen Wachstumsfaktorrezeptoren, z. B. FGF-Rezeptor, zur Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung beitragen [35, 36]. Zusammenfassend sind, in Anbetracht des ubiquitären Vorkommens von GAGs und je

5. Diskussion

nach zellulärem Kontext, also mehrere Mechanismen denkbar, über die GAGs auf die IL-10-Biologie Einfluss nehmen könnten.

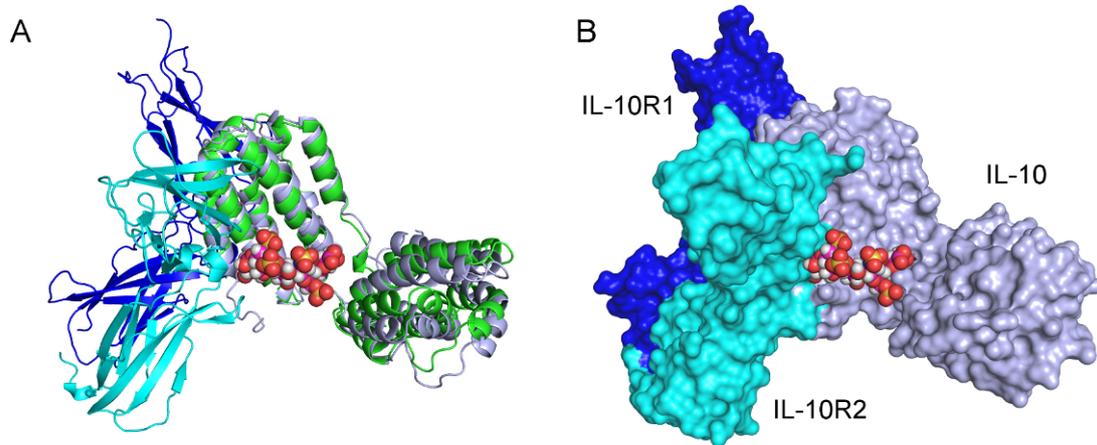


Abbildung 5.3.: Hypothetisches Modell der Inhibition der IL-10/IL-10R2-Bindung durch GAGs. (A) Das mit PCS-Daten berechnete Modell des mIL-10-Heparin-Komplexes ist mit dem Strukturmodell des humanen, ternären IL-10/IL-10R1/IL-10R2-Komplexes übereinandergelegt. Jenes wurde durch räumliche Überlagerung der Struktur des IL-10/IL-10R1-Komplexes (PDB # 1Y6K) und der IL-10R2-Kette (PDB # 3LQM) mit der Kristallstruktur des ternären IL-20/IL-20R1/IL-20R2-Komplexes (PDB # 4DOH) erzeugt (vgl. Abschnitt 2.2.3). Der Anschaulichkeit wegen ist IL-10 hier zusammen mit nur einem Paar IL-10R1/IL-10R2 gezeigt. Das Heparin-Tetrasaccharid ist als Kugelmodell dargestellt und entsprechend dem Atomtyp gefärbt: Kohlenstoff: magenta, Wasserstoff: weiß, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Schwefel: gold. Proteinketten sind in der *Cartoon*-Darstellung gezeichnet: humanes IL-10: hellblau, murines IL-10: grün, IL-10R1: blau, IL-10R2: cyan. (B) Repräsentation des IL-10-Rezeptorkomplexes mit seiner Van-der-Waals-Oberfläche. Proteinmodelle haben die gleichen Farben wie in (A). Die Rezeptorkette 2 und das Heparinmolekül kollidieren teilweise miteinander. Dies könnte auf eine Konkurrenz der IL-10R2-Bindung durch GAGs hinweisen.

A. Appendix

A.1. Kristallisationsbedingungen von murinem IL-10

- Kristallisationsbedingungen der IL-10-Variante N Δ 8, C149Y:
 - 12% (w/v) Polyvinylpyrrolidon K15, 0,1 M MES pH 5,5
 - 30% (v/v) Glycerolethoxylat, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M MES pH 6,5
- Kristallisationsbedingungen der IL-10-Variante N Δ 8, Q32R, T49K, C149Y:
 - 30% (w/v) PEG 4000, 0,2 M Natriumacetat, 0,1 M TRIS-HCl pH 8,5
 - 30% (w/v) PEG 4000, 0,2 M Ammoniumsulfat
 - 20% (w/v) PEG 4000, 10% (v/v) Isopropanol, 0,1 M HEPES pH 7,5
 - 30% (w/v) PEG 1500
 - 25% (w/v) PEG 1500
 - 25% (w/v) PEG 3350, 0,1 M HEPES pH 7,5
 - 25% (w/v) PEG 3350, 0,1 M TRIS-HCl pH 8,5
 - 25% (w/v) PEG 3350, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M HEPES pH 7,5
 - 25% (w/v) PEG 3350, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M TRIS-HCl pH 8,5
 - 20% (w/v) PEG 3350, 0,2 M Natriumformiat
 - 15% (w/v) PEG 3350, 0,1 M Magnesiumformiat
 - 20% (w/v) PEG 3350, 0,2 M Natriumfluorid
 - 20% (w/v) PEG 6000, 0,1 M HEPES pH 7,0
 - 20% (w/v) PEG 6000, 0,1 M Bicin pH 9,0
 - 30% (v/v) Pentaerythritolethoxylat (15/4 EO/OH), 6% (w/v) Polyvinylpyrrolidon K15, 0,1 M HEPES pH 7,5
 - 20% (w/v) Jeffamine[®] M2070 Polyetheramin, 20% (v/v) DMSO
 - 40% (v/v) Glycerolethoxylat
 - 30% (v/v) Glycerolethoxylat, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M MES pH 6,5
 - 20% (v/v) Glycerolethoxylat, 3% (v/v) Polyethylenimin, 0,1 M TRIS-HCl pH 8,5

A.2. ¹H- und ¹³C-NMR-chemische Verschiebungen von GAG-Oligosacchariden

Tabelle A.1.: ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen (in ppm) von Heparin-Disacchariden bei 25 °C in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 50 mM NaCl (99,8% D_2O). ^1H -chemische Verschiebungen wurden relativ zu 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) referenziert, während ^{13}C -chemische Verschiebungen indirekt kalibriert wurden.

Heparin- Anomer		Heparin I-S		Heparin I-HA		Heparin I-H		Heparin II-S		Heparin III-S		Heparin IV-S	
		α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
ΔGlcA	H1	5,509	- ^a	5,492	-	5,461	-	5,209	-	5,522	-	5,152	-
	H2	4,571	-	4,569	-	4,577	-	3,838	-	4,554	-	3,792	-
	H3	4,346	-	4,350	-	4,346	-	4,215	-	4,294	-	4,242	-
	H4	5,967	-	5,958	-	5,950	-	5,842	-	5,985	-	5,813	-
	C1	96,959	-	97,042	-	97,288	-	100,552	-	96,654	-	100,311	-
	C2	75,068	-	75,060	-	75,147	-	70,193	-	74,701	-	70,279	-
	C3	63,438	-	63,453	-	63,120	-	66,570	-	63,027	-	66,859	-
	C4	106,537	-	106,539	-	106,855	-	107,548	-	105,917	-	107,631	-
GlcN	H1	5,459	4,711	5,212	4,710	5,418	4,921	5,467	-	5,459	4,691	5,455	4,709
	H2	3,276	3,071	3,900	3,734	3,329	3,039	3,281	-	3,254	3,036	3,256	3,032
	H3	3,759	3,732	3,895	3,695	3,982	3,802	3,724	-	3,721	3,697	3,746	3,734
	H4	3,841	3,793	3,832	3,816	3,830	3,830	3,836	-	3,793	3,770	3,800	3,761
	H5	4,164	n.b. ^b	4,174	3,804	4,186	n.b.	4,149	-	3,958	3,582	3,949	3,571
	H6	4,365	4,321	4,367	4,320	4,358	4,299	4,377	-	3,836	3,899	3,854	3,904
	H6'	4,214	4,274	4,224	4,285	4,232	n.b.	4,244	-	3,836	3,796	3,831	-
	N-Ac	-	-	2,037	2,037	-	-	91,182	-	91,070	95,890	90,939	95,727
	C1	91,076	96,002	90,536	95,100	89,088	92,915	57,697	-	57,890	60,869	57,830	60,839
	C2	57,691	60,702	53,781	56,419	53,826	56,286	69,318	-	68,737	71,909	69,185	72,331
	C3	68,911	72,058	68,732	71,895	68,040	70,500	78,813	-	78,761	78,142	78,215	78,215
	C4	78,488	72,332	78,753	78,577	78,701	72,414	68,068	-	70,004	74,701	70,141	74,657
	C5	67,954	n.b.	68,200	72,422	68,040	n.b.	66,572	-	60,108	60,230	60,017	60,151
	C6	66,585	66,585	66,617	66,443	66,400	66,400	91,182	-	91,070	95,890	90,939	95,727
N-Ac	-	-	21,965	21,965	-	-	-	-	-	-	-	-	

^a -: Signal nicht beobachtet; ^b n.b.: Signal nicht bestimmt durch Peaküberlappung.

Tabelle A.2.: ¹H- und ¹³C-chemische Verschiebungen (in ppm) von CS-Disacchariden bei 25 °C in 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.0), 50 mM NaCl (99,8% D₂O). ¹H-chemische Verschiebungen wurden relativ zu 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) referenziert, während ¹³C-chemische Verschiebungen indirekt kalibriert wurden.

		CS-													
		Anomer		C2S		C4S		C6S (CSB)		C2,4S (CSB)		C2,6S (CSD)		C4,6S (CSE)	
Ring/ Atom		α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
Δ GlcA	H1	5,544	5,513	5,306	5,271	5,233	5,186	5,595	5,576	5,561	5,533	5,299	5,268	5,611	5,600
	H2	4,467	4,467	3,853	3,835	3,793	3,793	4,463	4,443	4,477	4,477	3,840	3,821	4,456	4,471
	H3	4,190	4,190	3,948	3,948	4,109	4,109	4,058	4,058	4,198	4,198	3,953	3,953	4,070	4,070
	H4	6,035	6,035	5,977	5,977	5,883	5,883	6,043	6,043	6,049	6,040	5,965	5,965	6,053	6,053
	C1	97,673	97,673	99,856	99,856	101,189	101,189	97,282	97,282	97,678	97,678	100,017	100,017	97,287	97,287
	C2	74,234	74,234	68,553	68,553	69,546	69,546	73,257	73,257	74,216	74,216	68,374	68,570	73,238	73,238
	C3	62,319	62,319	64,509	64,509	65,835	65,835	61,929	61,929	62,289	62,289	64,468	64,468	61,898	61,898
	C4	106,463	106,463	106,539	106,539	107,244	10,244	105,877	105,877	106,280	106,280	106,463	106,463	105,694	105,694
GlcN	H1	5,198	4,717	5,212	4,782	5,218	4,723	5,202	4,787	5,219	4,745	5,214	4,789	5,218	4,808
	H2	4,279	3,988	4,373	4,064	4,286	4,003	4,377	4,062	4,296	4,014	4,365	4,081	4,398	4,094
	H3	4,116	3,926	4,313	4,158	4,130	3,937	4,311	4,155	4,158	3,962	4,350	4,172	4,351	4,188
	H4	4,046	3,961	4,686	4,617	4,229	4,155	4,618	4,556	4,104	4,022	4,723	4,661	4,665	4,608
	H5	4,132	3,719	4,295	3,857	4,373	3,962	4,280	3,850	4,373	3,970	4,529	4,106	4,529	4,110
	H6	3,700	3,723	3,775	3,770	4,198	4,214	3,754	3,762	4,192	4,215	4,253	4,264	4,266	4,257
	H6'	3,672	- ^a	3,700	3,741	4,136	4,171	3,684	3,731	4,135	4,167	4,128	4,155	4,125	4,152
	N-Ac	2,077	2,077	2,088	2,088	2,046	2,046	2,100	2,100	2,089	2,089	2,081	2,081	2,112	2,112
	C1	91,227	94,938	91,239	94,755	91,227	94,940	91,227	94,743	91,226	94,938	91,227	94,744	91,226	94,549
	C2	48,841	52,358	49,736	53,078	48,843	52,162	49,624	53,139	48,800	52,318	49,623	52,944	49,582	53,100
	C3	77,163	79,900	72,950	75,588	76,772	79,702	73,257	75,991	76,758	79,688	72,671	75,406	73,238	75,780
	C4	68,374	67,593	77,170	76,115	67,984	67,398	77,164	75,992	68,155	67,568	76,969	75,797	76,757	75,798
	C5	70,523	75,015	70,312	74,531	68,375	72,672	70,327	74,429	68,352	72,651	68,276	72,279	68,340	72,263
	C6	61,147	60,952	61,167	60,991	67,984	67,593	61,147	60,950	67,960	67,565	68,179	67,984	68,155	67,959
N-Ac	22,082	22,082	21,951	21,951	21,887	21,887	22,082	22,082	22,013	22,013	21,887	21,887	22,208	22,208	

^a -: Signal nicht beobachtet.

A. Appendix

Tabelle A.3.: ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen (in ppm) von Heparin-Tetrasaccharid bei 25 °C in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.0), 50 mM NaCl (99,8% D_2O). ^1H -chemische Verschiebungen wurden relativ zu 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) referenziert, während ^{13}C -chemische Verschiebungen indirekt kalibriert wurden.

Ring/ Atom		Anomer	α		β	
ΔGlcA (A)	H1	C1	5,494	97,189	- ^b	-
	H2	C2	4,611	74,462	-	-
	H3	C3	4,307	62,782	-	-
	H4	C4	5,973	105,949	-	-
GlcN (B)	H1	C1	5,412	96,710	5,364	96,970
	H2	C2	3,277	57,575	3,277	57,575
	H3	C3	3,626	69,384	3,626	69,384
	H4	C4	3,824	77,890	3,836	75,859
	H5	C5	4,034	68,749	4,010	68,749
	H6pro(R)	C6	4,343	66,081	n.b.	n.b.
	H6pro(S)		4,237		n.b.	
IdoA (C)	H1	C1	5,214	99,347	-	-
	H2	C2	4,299	76,240	-	-
	H3	C3	4,194	69,257	-	-
	H4	C4	4,093	76,240	-	-
	H5	C5	4,758	69,511	-	-
GlcN (D)	H1	C1	5,451	90,968	5,436	90,968
	H2	C2	3,248	57,830	3,233	57,957
	H3	C3	3,704	69,384	3,680	69,511
	H4	C4	3,747	76,748	3,762	77,382
	H5	C5	4,146	68,114	4,118	68,367
	H6pro(R)	C6	4,326	66,591	4,357	66,844
	H6pro(S)		n.b. ^a		4,289	

^an.b.: Signal nicht bestimmt durch Peaküberlappung; ^b-: Signal nicht beobachtet.

Tabelle A.4.: ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen (in ppm) von psHA-EDTA-Tetrasaccharid bei 25 °C in 99,8% D_2O . ^1H -chemische Verschiebungen wurden relativ zu 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) referenziert, während ^{13}C -chemische Verschiebungen indirekt kalibriert wurden.

Ring/ Molekülteil		Atom	^1H	Atom	^{13}C
GlcA	Ring II/IV (a)*	H1	5,202	C1	99,307
		H2	4,550	C2	77,788
		H3	5,150	C3	75,272
		H4	5,362	C4	73,536
		H5	5,040	C5	76,041
		CO			171,568
GlcA	Ring II/IV (b)*	H1	5,202	C1	99,307
		H2	4,504	C2	77,848
		H3	5,065	C3	76,013
		H4	5,320	C4	73,536
		H5	4,950	C5	76,307
		CO			170,200
GlcNAc	Ring III	H1	5,009	C1	99,298
		H2	3,971	C2	55,540
		H3 [‡]	4,395	C3 [‡]	77,683
		H4 [‡]	4,419	C4 [‡]	75,122
		H5 [‡]	4,085	C5 [‡]	73,090
		H6	4,725	C6	67,453
		H6'	4,320		
GlcNAc	Ring I	H1	6,133	C1	85,658
		H2	4,517	C2	54,896
		H3	4,393	C3	78,794
		H4	4,338	C4	75,673
		H5	4,645	C5	75,161
		H6	4,725	C6	67,453
		H6'	4,320		
GlcNAc	Ac (a) [†]	H	2,268	C	22,746
				CO	174,325
GlcNAc	Ac (b) [†]	H	2,009	C	22,153
				CO	174,289
Linker	Triazol	H	8,263	C	123,134
	Amidomethylen	H	4,613	C	34,423
EDTA	Aminomethylen	H	3,824	C	52,614
				CO	173,615
	Carboxymethylen	H	3,928	C	53,273
				CO	170,216

*: Sequenznummer (II oder IV) konnte nicht festgelegt werden

[†]: Acetylgruppen konnten keinem einzelnen GlcNAc-Ring zugeordnet werden

[‡]: Uneindeutige Zuordnung, weil fehlende Korrelation im HSQC- und HMBC-Spektrum

A.3. T_1 -Relaxationszeiten von GAG-Oligosacchariden

Tabelle A.5.: ^1H - T_1 -Relaxationszeiten (\pm S.E.) (in s) von Heparin-Disacchariden bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz und einer Temperatur von 25 °C.

Heparin- Anomer		Heparin I-S		Heparin II-S		Heparin III-S		Heparin I-A	
		α	β	α	β	α	β	α	β
ΔGlcA	H1	$1,02 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,08$	$1,17 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,05$
	H2	$1,92 \pm 0,02$	$1,92 \pm 0,02$	n.b.	n.b.	$1,79 \pm 0,02$	$1,79 \pm 0,02$	$1,69 \pm 0,09$	$1,69 \pm 0,09$
	H3	$1,75 \pm 0,01$	$1,75 \pm 0,01$	$1,29 \pm 0,04$	$1,29 \pm 0,04$	$1,86 \pm 0,02$	$1,86 \pm 0,02$	$1,56 \pm 0,03$	$1,56 \pm 0,03$
	H4	$3,06 \pm 0,02$	$3,06 \pm 0,02$	$3,41 \pm 0,10$	$3,41 \pm 0,10$	$2,86 \pm 0,02$	$2,86 \pm 0,02$	$3,05 \pm 0,10$	$3,05 \pm 0,10$
GlcN	H1	$2,22 \pm 0,02$	n.b. ^a	$2,44 \pm 0,05$	- ^b	$2,22 \pm 0,02$	$1,65 \pm 0,14$	$2,11 \pm 0,09$	$1,13 \pm 0,17$
	H2	$1,47 \pm 0,01$	n.b.	$1,52 \pm 0,05$	-	$1,56 \pm 0,03$	$2,15 \pm 0,23$	$1,44 \pm 0,03$	$1,43 \pm 0,15$
	H3	$1,65 \pm 0,01$	n.b.	$1,67 \pm 0,06$	-	$1,64 \pm 0,03$	n.b.	$1,34 \pm 0,05$	$0,99 \pm 0,12$
	H4	$1,03 \pm 0,01$	n.b.	$1,03 \pm 0,02$	-	$0,92 \pm 0,02$	n.b.	$1,03 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,04$
	H5	$1,05 \pm 0,01$	n.b.	$1,05 \pm 0,03$	-	$1,13 \pm 0,02$	$0,84 \pm 0,12$	$0,86 \pm 0,08$	$0,67 \pm 0,06$
	H6	$0,46 \pm 0,01$	n.b.	$0,49 \pm 0,02$	-	$0,47 \pm 0,00$	$0,49 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,06$
	H6'	$0,49 \pm 0,01$	n.b.	$0,55 \pm 0,02$	-	$0,47 \pm 0,00$	n.b.	$0,47 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,06$
N-Ac	-	-	-	-	-	-	$1,31 \pm 0,04$	$1,31 \pm 0,04$	

^an.b.: Wert nicht bestimmt durch Peaküberlappung; ^b -: Signal nicht beobachtet.

Tabelle A.6.: ^1H - T_1 -Relaxationszeiten (\pm S.E.) (in s) von CS-Disacchariden bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz und einer Temperatur von 25 °C.

Ring/ Atom \ CS- Anomer		C4S		C2,4S (CSB)		C2,6S (CSD)		C4,6S (CSE)		C2,4,6S	
		α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
ΔGlcA	H1	$1,35 \pm 0,01$	$1,35 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,00$	$1,37 \pm 0,01$	$1,23 \pm 0,01$	$1,25 \pm 0,01$	$1,40 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,02$	$1,47 \pm 0,01$	$1,47 \pm 0,01$
	H2	n.b. ^a	$1,78 \pm 0,01$	$1,79 \pm 0,03$	$1,76 \pm 0,02$	$1,86 \pm 0,03$	$1,84 \pm 0,03$				
	H3	$1,83 \pm 0,02$	$1,83 \pm 0,02$	$1,95 \pm 0,02$	$1,95 \pm 0,02$	n.b.	n.b.	$1,87 \pm 0,01$	$1,87 \pm 0,01$	$1,96 \pm 0,02$	$1,96 \pm 0,02$
	H4	$3,07 \pm 0,02$	$3,07 \pm 0,02$	$2,81 \pm 0,04$	$2,81 \pm 0,04$	$2,92 \pm 0,03$	$2,92 \pm 0,03$	$3,14 \pm 0,03$	$3,14 \pm 0,03$	$2,94 \pm 0,08$	$2,94 \pm 0,08$
GlcN	H1	$1,98 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,03$	$1,40 \pm 0,03$	$2,11 \pm 0,03$	$1,37 \pm 0,02$	$2,04 \pm 0,02$	$1,46 \pm 0,03$	$2,26 \pm 0,08$	$1,50 \pm 0,05$
	H2	$1,61 \pm 0,02$	$2,27 \pm 0,05$	$1,53 \pm 0,04$	$1,78 \pm 0,05$	$1,65 \pm 0,03$	n.b.	$1,42 \pm 0,02$	$2,09 \pm 0,04$	$1,47 \pm 0,02$	n.b.
	H3	$1,02 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,03$	n.b.	n.b.	$1,19 \pm 0,02$	n.b.	$1,21 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,03$
	H4	$1,17 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,02$	$1,14 \pm 0,02$	$1,04 \pm 0,01$	n.b.	$1,18 \pm 0,02$	$1,15 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,02$	$1,18 \pm 0,03$
	H5	$1,02 \pm 0,02$	n.b.	$1,03 \pm 0,02$	$0,80 \pm 0,02$	$1,04 \pm 0,02$	n.b.	$1,09 \pm 0,02$	n.b.	$1,12 \pm 0,02$	n.b.
	H6	$0,49 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,00$	$0,50 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	n.b.	n.b.	$0,55 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,02$	$0,59 \pm 0,02$
	H6'	$0,54 \pm 0,01$	n.b.	$0,52 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,01$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
N-Ac	$1,20 \pm 0,04$	$1,20 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,05$	$1,24 \pm 0,05$	$1,29 \pm 0,05$	$1,29 \pm 0,05$	$1,27 \pm 0,04$	$1,27 \pm 0,04$	$1,31 \pm 0,05$	$1,47 \pm 0,01$	

^an.b.: Wert nicht bestimmt durch Peaküberlappung.

A. Appendix

Tabelle A.7.: ^1H - T_1 -Relaxationszeiten (\pm S.E.) (in s) von Heparin-Tetrasaccharid bei einer Protonenresonanzfrequenz von 700 MHz und einer Temperatur von 25 °C. Nur die ^1H -Signale des dominierenden α -Anomers wurden ausgewertet, weil nur dafür STD-Signale beobachtet worden.

Ring	Atom	$T_1 \pm \text{S.D.}$	Ring	Atom	$T_1 \pm \text{S.D.}$
ΔGlcA (A)	H1	$1,32 \pm 0,02$	GlcA (C)	H1	$1,17 \pm 0,01$
	H2	$1,94 \pm 0,06$		H2	n.b. ^a
	H3	$1,40 \pm 0,06$		H3	n.b.
	H4	$3,82 \pm 0,06$		H4	$1,35 \pm 0,01$
		H5		$1,82 \pm 0,04$	
GlcN (B)	H1	$2,03 \pm 0,03$	GlcN (D)	H1	$2,48 \pm 0,05$
	H2	$1,83 \pm 0,01$		H2	$1,94 \pm 0,02$
	H3	$1,41 \pm 0,06$		H3	$1,63 \pm 0,02$
	H4	$1,38 \pm 0,02$		H4	$1,49 \pm 0,02$
	H5	$1,17 \pm 0,01$		H5	$1,35 \pm 0,01$
	H6pro(R)	$0,68 \pm 0,02$		H6pro(R)	$0,68 \pm 0,02$
	H6pro(S)	$0,74 \pm 0,02$		H6pro(S)	n.b.

^an.b.: Wert nicht bestimmt durch Peaküberlappung.

A.4. NMR-Zuordnung von murinem IL-10

Tabelle A.8.: NMR-chemische Verschiebungen von murinem IL-10 C149Y mit His8-Tag (BMRB # 19377).

Nr.	Rest	$^1\text{H}_\text{N}$	$^{15}\text{N}_\text{H}$	$^{13}\text{C}'$	$^{13}\text{C}_\alpha$	$^{13}\text{C}_\beta$
2	Arg	-	-	176,24	57,00	30,53
3	Gly	8,50	111,49	173,51	45,53	
4	Gln	8,15	121,15	175,25	56,19	29,68
5	Tyr	8,22	122,07	175,26	57,95	41,40
6	Ser	8,24	118,93	173,94	58,42	64,25
7	Arg	8,38	124,43	176,02	56,78	30,46
8	Glu	8,41	122,41	175,81	57,00	30,11
9	Asp	8,30	122,41	176,02	54,67	41,40
10	Asn	8,39	121,04	175,09	54,43	39,05
11	Asn	8,48	119,40	175,19	54,43	39,04
16	Pro	-	-	176,46	63,59	31,89
17	Val	8,08	120,37	176,68	63,58	32,05
18	Gly	8,47	112,63	174,16	45,76	-
19	Gln	8,12	120,60	175,81	56,54	29,22
20	Ser	8,33	116,52	-	59,60	63,79
21	His	8,04	124,42	175,36	54,67	-
22	Met	8,28	120,14	173,62	53,72	-
23	Leu	8,25	124,92	177,00	55,37	41,06
24	Leu	7,50	122,82	179,30	58,89	41,40

wird fortgesetzt

Fortsetzung von Tabelle A.8

Nr.	Rest	$^1\text{H}_\text{N}$	$^{15}\text{N}_\text{H}$	$^{13}\text{C}'$	$^{13}\text{C}_\alpha$	$^{13}\text{C}_\beta$
25	Glu	8,62	120,39	179,42	60,18	29,22
26	Leu	8,11	122,88	179,42	58,65	42,49
27	Arg	8,39	119,30	179,84	61,23	30,14
28	Thr	8,91	119,13	176,79	66,86	68,59
29	Ala	8,12	125,79	180,51	55,14	18,43
30	Phe	8,70	119,95	176,88	60,76	38,59
31	Ser	8,25	116,71	175,04	62,17	62,97
32	Gln	7,03	117,44	176,46	57,25	28,74
33	Val	7,52	109,80	174,93	60,76	32,94
34	Lys	6,97	124,15	177,11	59,82	32,02
35	Thr	8,42	113,24	175,68	66,62	68,12
36	Phe	7,76	123,72	176,68	61,70	38,60
37	Phe	7,44	115,33	176,24	62,87	38,59
38	Gln	9,06	123,24	178,11	59,36	29,21
39	Thr	7,62	110,91	175,15	64,75	69,06
40	Lys	6,86	119,57	175,48	56,31	32,96
41	Asp	7,50	119,68	174,93	53,73	39,61
42	Gln	8,34	124,89	175,91	56,07	29,68
43	Leu	8,08	122,00	178,05	54,66	43,03
44	Asp	8,80	124,49	175,48	54,91	40,68
45	Asn	8,03	117,39	172,53	53,97	39,06
46	Ile	7,96	120,50	175,59	59,38	39,06
48	Leu	8,53	125,85	174,93	54,42	39,78
49	Thr	7,57	113,46	175,26	60,99	72,35
50	Asp	8,77	120,11	177,33	57,02	41,07
51	Ser	7,97	115,88	176,02	61,93	62,78
52	Leu	7,58	123,29	176,57	57,71	41,39
53	Met	6,24	118,63	177,78	56,78	30,62
54	Gln	8,09	117,81	179,19	58,89	27,34
55	Asp	7,52	122,13	179,52	57,24	40,00
56	Phe	8,31	121,12	176,46	59,12	37,66
57	Lys	7,59	115,89	176,57	57,95	33,44
58	Gly	7,23	107,86	176,55	45,06	-
59	Tyr	8,55	120,95	176,57	60,75	38,04
60	Leu	8,73	122,84	177,11	53,96	40,94
61	Gly	7,91	109,03	174,15	49,98	-
62	Cys	8,71	119,75	175,06	60,76	38,92
63	Gln	-	-	178,21	59,83	27,57
64	Ala	8,54	123,76	178,10	55,36	18,43
65	Leu	8,21	120,84	177,88	58,65	39,06

wird fortgesetzt

Fortsetzung von Tabelle A.8

Nr.	Rest	$^1\text{H}_\text{N}$	$^{15}\text{N}_\text{H}$	$^{13}\text{C}'$	$^{13}\text{C}_\alpha$	$^{13}\text{C}_\beta$
66	Ser	8,63	114,07	177,98	61,70	63,59
67	Glu	8,45	118,63	179,96	59,82	30,15
68	Met	8,38	120,75	178,54	55,84	30,16
69	Ile	8,90	122,41	177,00	67,57	37,66
70	Gln	7,82	119,36	176,46	59,35	28,74
71	Phe	8,41	121,17	177,88	60,29	39,09
72	Tyr	8,11	119,70	177,44	64,66	38,60
73	Leu	8,27	117,64	177,98	58,42	42,82
74	Val	8,78	114,70	175,90	63,81	32,53
75	Glu	7,58	118,47	176,66	57,95	30,15
76	Val	7,15	117,44	177,45	66,15	32,53
77	Met	8,89	119,22	175,15	61,94	29,69
78	Pro	-	-	179,74	66,16	-
79	Gln	6,79	114,68	178,00	58,42	29,68
80	Ala	8,60	125,10	178,42	55,59	18,23
81	Glu	8,06	117,10	177,78	59,59	29,68
82	Lys	7,19	118,73	177,55	58,66	32,03
83	His	7,60	115,67	174,05	57,48	31,08
84	Gly	7,71	109,42	170,88	46,94	-
85	Pro	-	-	178,97	65,69	31,47
86	Glu	9,66	119,09	177,55	59,12	28,75
87	Ile	7,47	114,07	176,13	60,53	38,10
88	Lys	7,47	124,11	177,23	61,23	32,50
89	Glu	8,68	119,58	179,09	59,83	28,48
90	His	7,46	119,66	179,09	58,41	31,09
91	Leu	8,48	122,69	178,59	57,94	40,94
92	Asn	8,73	121,55	177,45	57,01	38,43
93	Ser	7,79	115,55	176,13	61,23	62,97
94	Leu	7,97	121,78	177,88	58,65	41,89
95	Gly	8,51	106,93	175,48	47,86	-
96	Glu	8,16	122,61	179,52	59,82	29,21
97	Lys	8,33	120,22	179,52	59,13	31,56
98	Leu	8,52	124,95	177,32	58,17	41,26
99	Lys	8,65	122,09	179,74	61,00	32,04
100	Thr	8,60	119,20	175,58	67,10	68,59
101	Leu	7,97	124,24	177,45	58,66	40,46
102	Arg	8,32	119,75	176,68	60,65	31,55
103	Met	7,86	117,52	178,54	58,89	31,09
104	Arg	8,27	120,79	179,42	59,59	30,58
105	Leu	8,83	120,18	178,38	58,19	41,40

wird fortgesetzt

Fortsetzung von Tabelle A.8

Nr.	Rest	$^1\text{H}_\text{N}$	$^{15}\text{N}_\text{H}$	$^{13}\text{C}'$	$^{13}\text{C}_\alpha$	$^{13}\text{C}_\beta$
106	Arg	8,17	118,06	177,51	59,12	-
113	Pro	-	-	177,55	65,92	34,97
114	Cys	8,06	110,62	173,73	60,76	39,36
115	Glu	7,26	121,56	175,03	57,02	30,15
116	Asn	7,67	119,64	173,06	53,26	41,88
117	Lys	8,34	119,36	176,03	54,67	34,37
118	Ser	8,88	116,71	176,13	57,73	62,61
119	Lys	9,20	108,07	178,54	58,64	31,56
120	Ala	7,94	123,16	179,96	55,13	18,43
121	Val	7,83	120,05	176,68	66,61	31,22
122	Glu	7,33	119,86	178,75	59,82	29,21
123	Gln	7,82	121,15	176,79	58,66	28,04
124	Val	7,79	122,42	177,66	66,62	31,10
125	Lys	7,96	118,06	178,54	60,77	31,57
126	Ser	8,07	115,94	177,44	61,70	62,97
127	Asp	8,83	124,66	177,88	57,74	40,01
128	Phe	8,89	121,35	177,12	62,16	40,00
129	Asn	8,25	118,92	178,32	56,55	39,06
130	Lys	8,05	121,84	177,78	59,12	32,45
131	Leu	7,49	117,75	176,79	55,60	42,34
132	Gln	7,59	117,53	177,77	57,48	26,40
133	Asp	8,73	125,92	176,68	57,96	39,06
134	Gln	7,65	115,13	178,21	58,19	28,28
135	Gly	7,68	110,47	174,17	47,87	-
136	Val	7,24	123,05	176,57	66,85	31,08
137	Tyr	6,95	117,53	177,23	59,83	36,72
138	Lys	8,01	119,75	177,01	59,36	29,69
139	Ala	8,66	119,36	180,95	55,61	17,96
140	Met	7,74	114,67	178,10	55,13	27,81
141	Asn	8,54	119,66	175,69	56,31	39,05
142	Glu	7,65	112,64	175,58	56,31	29,19
143	Phe	7,70	123,04	175,58	61,46	39,07
144	Asp	7,57	114,29	177,55	56,31	39,06
145	Ile	7,59	126,03	176,90	64,60	36,25
146	Phe	7,23	119,06	176,46	59,59	37,17
147	Ile	7,95	117,67	176,95	65,92	37,18
148	Asn	7,71	119,52	178,75	56,08	36,95
149	Tyr	8,57	124,01	178,10	57,95	35,77
150	Ile	8,42	123,13	177,77	66,86	37,19
151	Glu	8,61	121,49	177,88	60,53	-

wird fortgesetzt

Fortsetzung von Tabelle A.8

Nr.	Rest	$^1\text{H}_\text{N}$	$^{15}\text{N}_\text{H}$	$^{13}\text{C}'$	$^{13}\text{C}_\alpha$	$^{13}\text{C}_\beta$
152	Ala	8,16	122,00	179,85	55,60	18,42
153	Tyr	8,48	121,19	176,45	61,94	38,13
154	Met	8,71	118,96	177,67	60,05	33,22
155	Met	8,21	118,28	178,87	58,89	31,10
156	Ile	7,90	121,05	178,98	64,98	37,86
157	Lys	7,88	119,43	178,65	56,54	31,46
158	Met	8,13	118,93	177,00	57,36	32,37
159	Lys	7,65	120,50	177,11	57,95	32,09
160	Ser	7,88	115,78	174,49	59,59	63,91
161	Leu	7,94	124,12	177,01	55,84	42,34
162	Glu	8,05	121,47	175,81	57,01	41,54
163	His	8,24	120,50	174,38	56,09	29,94

A.5. Xplor-NIH-Skripte

- Xplor-NIH-Skript für die PCS-basierte *Docking*-Berechnung:

```
xplor.requireVersion("2.14.4")
# (opts, args) = xplor.parseArguments(["quick"])
quick=False
for opt in opts:
    if opt[0]=="quick": #specify -quick to just test that the script runs
        quick=True
        pass
    pass
# filename for output structures. This string must contain the STRUCTURE
# literal so that each calculated structure has a unique name. The SCRIPT
# literal is replaced by this filename (or stdin if redirected using <),
# but it is optional.
# outFilename = "SCRIPT_STRUCTURE.sa.pdb"
numberOfStructures=100 #usually you want to create at least 20

if quick:
    numberOfStructures=3
    pass

# protocol module has many high-level helper functions.
#
import protocol, xplor

protocol.initRandomSeed() #set random seed - by time

command = xplor.command

# topology protocol.initTopology("protein")
protocol.initTopology("./toppar/heparin_1C4.top")
```

```
#protocol.initTopology("./toppar/heparin_2S0.top")
protocol.initTopology("ion.top")

# parameters
protocol.initParams("protein")
protocol.initParams("./toppar/heparin_1C4.par")
#protocol.initParams("./toppar/heparin_2S0.par")
protocol.initParams("ion.par")

# psf
protocol.initStruct("./psf_files/dimer_two_yb.psf", erase=0, simulation=0)
protocol.initStruct("./psf_files/tetra_1C4_min.psf", erase=0, simulation=0)
#protocol.initStruct("./psf_files/tetra_2S0_min.psf", erase=0, simulation=0)

command("""
  coor @./pdb_files/il10dimersegidABclean_2Yb_pos1.pdb
  coor @./pdb_files/tetra_1C4_min.pdb
  !coor @./pdb_files/tetra_2S0_min.pdb
  coor copy end """)

# a PotList contains a list of potential terms.
# This is used to specify which terms are active during refinement.
#
from potList import PotList
potList = PotList()
crossTerms = PotList()

# parameters to ramp up during the simulated annealing protocol
#
from simulationTools import MultRamp, StaticRamp, InitialParams

rampedParams=[]
highTempParams=[]
# PCS orientation Tensor - used with RDC term
# one for each lanthanide ion
# For each medium(=lanthanide), specify a name, initial values of Da, Rh.
#
from varTensorTools import create_VarTensor
media={}
#
#           medium  Da    rhombicity
for (medium,Da,Rh) in [ ('tb',    7979.28, 0.650),
                       ('tm',    6556.45, 0.337),
                       ('dy',   -6870.54, 0.517) ]:
    oTensor = create_VarTensor(medium)
    oTensor.setDaMax(10000)
    oTensor.setDa(Da)
    oTensor.setRh(Rh)
    media[medium] = oTensor
    pass

# set up PCS (RDC) potential
#
from rdcPotTools import create_RDCPot

rdcs = PotList('rdc')
```

A. Appendix

```
for (medium,expt,file,scale) in \  
  [('tb','pcsil10','./il10_segidA_one_Yb_tb.tbl',5),  
   ('tb','pcshep','./hep_tetra_one_segid_two_Yb_tb.tbl',5),  
   ('tm','pcsil10','./il10_segidA_one_Yb_tm.tbl',5),  
   ('tm','pcshep','./hep_tetra_one_segid_two_Yb_tm.tbl',5),  
   ('dy','pcsil10','./il10_segidA_one_Yb_dy.tbl',5),  
   ('dy','pcshep','./hep_tetra_one_segid_two_Yb_dy.tbl',5)  
  ]:  
  rdc = create_RDCPot("%s_%s"%(medium,expt),file,media[medium])  
  
  rdc.setAveType('sum')          # turn sum averaging on  
                                # for ambiguous assignments  
  rdc.setUseDistance(True)      # needed for PCS  
  rdc.setShowAllRestrains(1)   # all restraints are printed  
                                # during analysis  
  rdc.setThreshold(0.10)       # in ppm  
  
  rdc.setScale(scale)  
  rdcs.append(rdc)  
  pass  
potList.append(rdcs)  
rampedParams.append( MultRamp(10,200.0, "rdcs.setScale( VALUE )" ) )  
  
# set up NOE potential  
#  
noe=PotList('noe')  
potList.append(noe)  
from noePotTools import create_NOEPot  
for (name,scale,file) in [('all',1,"./pcs_input_table/pseudo_noe.tbl"),  
                          #add entries for additional tables  
                          ]:  
  pot = create_NOEPot(name,file)  
  pot.setPotType("soft") # if you think there may be bad NOEs  
  pot.setShowAllRestrains(1)  
  pot.setThreshold(1)  
  pot.setScale(scale)  
  noe.append(pot)  
rampedParams.append( MultRamp(0.5,5, "noe.setScale( VALUE )" ) )  
  
# set up NCS (Non-Crystallographic Symmetry) potential  
#  
from posDiffPotTools import create_PosDiffPot  
  
ncs=PotList('NCS')  
ncs.append(create_PosDiffPot("ncs1",  
                             "(segid A and (name CA or name N or name C))",  
                             "(segid B and (name CA or name N or name C))"))  
  
ncs.append(create_PosDiffPot("ncs2",  
                             "(segid B and (name CA or name N or name C))",  
                             "(segid A and (name CA or name N or name C))"))  
  
ncs.setScale(100)  
potList.append(ncs)
```

```
# Rama torsion angle database
#
protocol.initRamaDatabase('protein')
potList.append( XplorPot('RAMA') )
rampedParams.append( MultRamp(.002,1,"potList['RAMA'].setScale(VALUE)") )
#
# setup parameters for atom-atom repulsive term. (van der Waals-like term)
#
potList.append( XplorPot('VDW') )

def setParameters():
    command("""
parameters
nbonds
atom
nbxmod = 5
wmin   = 1.5
cutnb  = 8.5
ctofnb = 7.5
ctonnb = 6.5
tolerance=0.5
inhi   = 0.25
cdie
vswitch
shift
eps    = 73.0
e14fac = 0.4
rexp   = 2
irex   = 2
!repel = 1.0
!rcon  = 4.0
end
end""")

def setConstraints():
    command("""
constraints
inter = (resi 18:158) (resi 18:158)
weights * 1 end
inter = (resi 18:158) (resi 1:4)
inter = (segid D and resi 1) (segid D and resi 2)
inter = (segid D and resi 1) (segid D and resi 3)
inter = (segid D and resi 1) (segid D and resi 4)
inter = (segid D and resi 2) (segid D and resi 3)
inter = (segid D and resi 2) (segid D and resi 4)
inter = (segid D and resi 3) (segid D and resi 4)
weights * 1 vdw 1.0 end
end""")

highTempParams.append( StaticRamp("setParameters()") )
highTempParams.append( StaticRamp("setConstraints()") )

rampedParams.append( StaticRamp("setParameters()") )
rampedParams.append( StaticRamp("setConstraints()") )
```

A. Appendix

```
potList.append( XplorPot("BOND") )
potList.append( XplorPot("ANGL") )
potList['ANGL'].setThreshold( 5 )
rampedParams.append( MultRamp(0.4,1,"potList['ANGL'].setScale(VALUE)") )
potList.append( XplorPot("IMPR") )
potList['IMPR'].setThreshold( 5 )
rampedParams.append( MultRamp(0.1,1,"potList['IMPR'].setScale(VALUE)") )

# Give atoms uniform weights, except for the anisotropy axis
#
protocol.massSetup()

# IVM setup
# the IVM is used for performing dynamics and minimization
# in torsion angle space and in Cartesian space.
#
from ivm import IVM
from xplor import select
from selectTools import *
dyn = IVM()

dyn.fix(select("resi 18:158"))           # protein is fixed
dyn.fix(select("resi 400"))             # paramagnetic ion is fixed
dyn.fix(select("resi 401"))
dyn.group(select("segid D and resi 1"))  # ligand is moved as rigid body
dyn.group(select("segid D and resi 2"))  # each monosaccharide ring
dyn.group(select("segid D and resi 3"))
dyn.group(select("segid D and resi 4"))
dyn.hinge("torsion", select("resi 2 and name 04"))
dyn.hinge("torsion", select("resi 3 and name 04"))
dyn.hinge("torsion", select("resi 4 and name 04"))

# initialize ivm topology for torsion-angle dynamics
#
for m in media.values():
    m.setFreedom("fixDa, fixRh")         # fix tensor Rh, Da, vary orientation
    # m.setFreedom("varyDa, varyRh")    # vary tensor Rh, Da, vary orientation
protocol.torsionTopology(dyn)

# minc used for final cartesian minimization
#
minc = IVM() protocol.initMinimize(minc)
minc.fix(select("resi 18:158"))          # protein is fixed
minc.fix(select("resi 400"))             # paramagnetic ion is fixed
minc.fix(select("resi 401"))
minc.group(select("segid D and resi 1"))  # ligand is moved as rigid body
minc.group(select("segid D and resi 2"))  # each monosaccharide ring
minc.group(select("segid D and resi 3"))
minc.group(select("segid D and resi 4"))
minc.hinge("torsion", select("resi 2 and name 04"))
minc.hinge("torsion", select("resi 3 and name 04"))
minc.hinge("torsion", select("resi 4 and name 04"))

for m in media.values():
    m.setFreedom("varyDa, varyRh") # allow all tensor parameters float here
```

```

    pass protocol.cartesianTopology(minc)

# object which performs simulated annealing
#
from simulationTools import AnnealIVM
init_t = 3500.      # Need high temp and slow annealing to converge
cool = AnnealIVM(initTemp =init_t,
                 finalTemp=25,
                 tempStep =12.5,
                 ivm=dyn,
                 rampedParams = rampedParams)

# cart_cool is for optional cartesian-space cooling
#
cart_cool = AnnealIVM(initTemp =init_t,
                    finalTemp=25,
                    tempStep =12.5,
                    ivm=minc,
                    rampedParams = rampedParams)

def calcOneStructure(loopInfo):
    """ this function calculates a single structure,
        performs analysis on the structure,
        and then writes out a pdb file, with remarks.
    """

    # calc. initial tensor orientation
    # and set up tensor calculation during simulated annealing
    #
    from varTensorTools import calcTensorOrientation, calcTensor
    #from pcsTools import calcXTensor
    for medium in media.keys():
        #calcXTensor(media[medium])
        calcTensor(media[medium])
        calcTensorOrientation(media[medium])
        #rampedParams.append(StaticRamp("calcTensorOrientation
        #                               (media['%s']" % medium))
    pass

    # initialize parameters for high temp dynamics.
    #
    InitialParams( rampedParams )

    # high-temp dynamics setup - only need to specify parameters which
    # differ from initial values in rampedParams
    #
    InitialParams( highTempParams )

    # high temp dynamics
    #
    protocol.initDynamics(dyn,
                        potList=potList, # potential terms to use
                        bathTemp=init_t,
                        initVelocities=1,
                        finalTime=1000, # stops at 1000ps

```

A. Appendix

```
        numSteps=10000,    # or 10000 steps
        printInterval=100)# whichever comes first

dyn.setETolerance( init_t/100 ) # used to det. stepsize.
                                # default: t/1000

# perform high temp dynamics
#
dyn.run()

# initialize parameters for cooling loop
#
InitialParams( rampedParams )

# initialize integrator for simulated annealing
#
protocol.initDynamics(dyn,
                      potList=potList,
                      numSteps=100,      # at each temp: 100 steps or
                      finalTime=.2 ,     # .2ps, whichever is less
                      printInterval=100)

# perform simulated annealing
#
cool.run()

# final torsion angle minimization
#
protocol.initMinimize(dyn,
                      printInterval=50)
dyn.run()

# optional cooling in Cartesian coordinates
#
protocol.initDynamics(minc,
                      potList=potList,
                      numSteps=100,      # at each temp: 100 steps or
                      finalTime=.4 ,     # .4ps, whichever is less
                      printInterval=100)
cart_cool.run()

# final all- atom minimization
#
protocol.initMinimize(minc,
                      potList=potList,
                      dEPred=10)
minc.run()

# do analysis and write structure
#
loopInfo.writeStructure(potList)
pass

from simulationTools import StructureLoop, FinalParams
StructureLoop(numStructures=numberOfStructures ,
```

```

pdbTemplate=outFilename,
structLoopAction=calcOneStructure,
genViolationStats=1,
averageTopFraction=0.5, # report stats on best 50% of structs
averageContext=FinalParams(rampedParams),
averageCrossTerms=crossTerms,
averageSortPots=[potList['BOND'],potList['ANGL'],
                 potList['IMPR'],noe,rdcs],
averagePotList=potList).run()

```

- Xplor-NIH-Skript für die PRE-basierte Strukturberechnung:

```

# this checks for typos on the command-line.
# User-customized arguments can also be specified.
#
(opts,args) = xplor.parseArguments(["quick"])

quick=False
for opt in opts:
    if opt[0]=="quick": #specify -quick to just test the script
        quick=True
        pass
    pass

# filename for output structures. This string must contain the STRUCTURE
# literal so that each calculated structure has a unique name. The SCRIPT
# literal is replaced by this filename (or stdin if redirected using <),
# but it is optional.
#
outFilename = "SCRIPT_STRUCTURE.sa"
numberOfStructures=100 #2 if quick else 100

# protocol module has many high-level helper functions.
#
import protocol, xplor

protocol.initRandomSeed() # set random seed - by time

# parameters
protocol.initParams("protein")

# psf
protocol.initStruct("../Inputs/out2.psf")

# coords
protocol.initCoords("../Inputs/startstructure2.pdb")

import protocol
protocol.fixupCovalentGeom(useVDW=True,verbose=1,
                          angleTol=2.5)

# a PotList contains a list of potential terms. This is used
# to specify which terms are active during refinement.
#
from potList import PotList

```

A. Appendix

```
potList = PotList()
crossTerms = PotList()

# parameters to ramp up during the simulated annealing protocol
#
from simulationTools import MultRamp, StaticRamp, InitialParams

rampedParams=[]
highTempParams=[]

# PRE restraints
#
from prePotTools import create_PREPot

pre1=create_PREPot("PRE_Mn","../Inputs/g2hnMn.tbl","normal")
pre2=create_PREPot("PRE_Cu","../Inputs/g2hnCu.tbl","normal")

# Common settings

# apparent tauc tcapp=18.0

def runSBmodeforpre1():
    print 'configuring SB mode for pre1 which is Mn2+'
    from prePotTools import setupSBmode
    setupSBmode(pre1)
    pre1.setEquType("sb")
    pre1.setTcType("opt")
    pre1.setTaucAtoms(AtomSel("resid 1200 and name TCA"),
                      AtomSel("resid 1200 and name TCB"),
                      AtomSel("resid 1200 and name TCO"))
    pre1.setTauC( tcapp )
    pre1.setTcMin( tcapp )
    pre1.setTcMax( tcapp * 2.2 )
    pre1.setAveType("r-6")
    pre1.setSclType("obsig")
    pre1.setRlxType("r2dd")
    pre1.setGammaI(26.752196)
    pre1.setSqN( 2.5 ) # spin quantum number is 5/2 for Mn2+
    pre1.setFreqI (600.)
    pre1.setGfac( 1.993 ) # electronic g-factor is 1.993 for Mn2+
    pre1.setNpc( 2 ) # Number of metal binding sites in il10 dimer
    pre1.setThreshold( 100 )
    pre1.calcEnergy()
    print " setting for ", pre1.instanceName()
    return

def runSBmodeforpre2():
    print 'configuring SB mode for pre2 which is Cu2+'
    from prePotTools import setupSBmode
    setupSBmode(pre2)
    pre2.setEquType("sb")
    pre2.setTcType("opt")
    pre2.setTaucAtoms(AtomSel("resid 1201 and name TCA"),
                      AtomSel("resid 1201 and name TCB"),
                      AtomSel("resid 1201 and name TCO"))
```

```

pre2.setTauC( tcapp      )
pre2.setTcMin( tcapp * 0.5 )
pre2.setTcMax( tcapp * 1.6 )
pre2.setAveType("r-6")
pre2.setScIType("obsig")
pre2.setRlxType("r2dd")
pre2.setGammaI(26.752196)
pre2.setSqn( 0.5 ) # spin quantum number is 1/2 for Cu2+
pre2.setFreqI (600.)
pre2.setGfac( 2.2 ) # electronic g-factor is 2.2 for Cu2+
pre2.setNpc( 2 ) # Number of metal binding sites in il10 dimer
pre2.setThreshold( 20 )
pre2.calcEnergy()
print " setting for ", pre2.instanceName()
return

potList.append(pre1)
potList.append(pre2)
rampedParams.append( MultRamp(1.00,20.00, "pre1.setScale( VALUE )" ) )
rampedParams.append( MultRamp(0.20,4.00, "pre2.setScale( VALUE )" ) )
rampedParams.append( StaticRamp("runSBmodeforpre1()" ) )
rampedParams.append( StaticRamp("runSBmodeforpre2()" ) )
highTempParams.append( StaticRamp("runSBmodeforpre1()" ) )
highTempParams.append( StaticRamp("runSBmodeforpre2()" ) )

from xplorPot import XplorPot

# radius of gyration term # no flexible regions
# Rtarget=((2.2*(Nresid^0.38)-1)
#
protocol.initCollapse("resid 19:158",
                    Rtarget=22,scale=0.25)
potList.append( XplorPot('COLL') )

# Non-Crystallographic Symmetry (NCS) Potential
#
from posDiffPotTools import create_PosDiffPot
ncs=PotList("NCS")

segids=['A','B','A'] ALTS=range(10) for i in range (2):
    ncs.append(create_PosDiffPot("ncs%d" % i,
        "segid %s and (name CA or name N or name HN or name C or name O)" %
        segids[i],
        "segid %s and (name CA or name N or name HN or name C or name O)" %
        segids[i+1]))
pass

for j in range (5):
    ncs.append(create_PosDiffPot("ncs%d" % (j+2),
        "segid ALT%s and (name CA or name N or name HN or name C or name O)" %
        ALTS[j],
        "segid ALT%s and (name CA or name N or name HN or name C or name O)" %
        ALTS[j+5]))
pass

```

A. Appendix

```
ncs.setScale(100)

potList.append(ncs)

# setup parameters for atom-atom repulsive term. (van der Waals-like term)
#
from xplorPot import XplorPot
potList.append( XplorPot('VDW') )
rampedParams.append( StaticRamp("protocol.initNBond()") )
rampedParams.append( StaticRamp("setConstraints()") )
rampedParams.append( MultRamp(0.9,0.78,
                              "xplor.command('param nbonds repel VALUE end end')") )
rampedParams.append( MultRamp(.004,4,
                              "xplor.command('param nbonds rcon VALUE end end')") )
# nonbonded interaction only between (CA atoms) backbone atoms
highTempParams.append( StaticRamp("""protocol.initNBond(cutnb=100,
                                                    rcon=1,
                                                    tolerance=45,
                                                    repel=1.2,
                                                    onlyCA=1)""") )

xplor.command("""
vector identify (store1) (name CA or name N or name HN or \
name C or name O or name MN)
evaluate ($backbone=store1)
""")

def Constraints_highTemp():
    for i in range (10):
        xplor.command("""
constraints
inter = (not ($backbone) and resi 19:158) (resi 19:158)
inter = (not ($backbone) and resi 19:158) (segid "ALT%d")
inter = (not ($backbone) and segid "ALT%d") (segid "ALT%d")
weights * 1 angl 0.4 impr 0.1 vdw 0 elec 0 end
inter = ($backbone and resi 19:158)
($backbone and resi 19:158)
inter = ($backbone and resi 19:158)
($backbone and segid "ALT%d")
inter = ($backbone and segid "ALT%d")
($backbone and segid "ALT%d")
weights * 1 angl 0.4 impr 0.1 vdw 1.0 end
end"" % (i, i, i, i, i, i) )
    pass

highTempParams.append( StaticRamp( "Constraints_highTemp()" ) )

nconf=10

def setConstraints():
    #number of conformers (support up to 10 conformers)
    scaleVdw = 1.0 / float( nconf )
    xplor.command("""
constraints
inter = (segid A) (segid A)
""")
```

```

inter = (segid B) (segid B)
inter = (resi 300) (resi 300)
inter = (resi 301) (resi 301)
inter = (segid ALT0) (segid ALT0)
inter = (segid ALT1) (segid ALT1)
inter = (segid ALT2) (segid ALT2)
inter = (segid ALT3) (segid ALT3)
inter = (segid ALT4) (segid ALT4)
inter = (segid ALT5) (segid ALT5)
inter = (segid ALT6) (segid ALT6)
inter = (segid ALT7) (segid ALT7)
inter = (segid ALT8) (segid ALT8)
inter = (segid ALT9) (segid ALT9)
weights * 1 end
inter = (segid A) (segid B)
inter = (resi 19:158) (resi 300)
inter = (resi 19:158) (resi 301)
weights * 1 vdw 1.0 end
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT0)
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT1)
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT2)
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT3)
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT4)
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT5)
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT6)
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT7)
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT8)
inter = (segid A or segid B or name Mn) (segid ALT9)
weights * 1 vdw %f end
end"" % scaleVdw )
return

potList.append( XplorPot("BOND") )
potList.append( XplorPot("ANGL") )
potList['ANGL'].setThreshold( 5 )
rampedParams.append( MultRamp(0.4,1,"potList['ANGL'].setScale(VALUE)") )
potList.append( XplorPot("IMPR") )
potList['IMPR'].setThreshold( 5 )
rampedParams.append( MultRamp(0.1,1,"potList['IMPR'].setScale(VALUE)") )

# Give atoms uniform weights, except for the anisotropy axis
#
from atomAction import SetProperty
AtomSel("not resname TAU").apply( SetProperty("mass",100.) )
AtomSel("resname TAU ").apply( SetProperty("mass", 300.0) )
AtomSel("all").apply( SetProperty("fric",10.) )

# IVM setup
# the IVM is used for performing dynamics and minimization
# in torsion-angle space and in Cartesian space.
#
from ivm import IVM
dyn = IVM()

dyn.fix("resid 19:158")

```

A. Appendix

```
protocol.torsionTopology(dyn)

# minc used for final cartesian minimization
#
minc = IVM() protocol.initMinimize(minc)

minc.fix("resid 19:158")

protocol.cartesianTopology(minc)

# object which performs simulated annealing
#
from simulationTools import AnnealIVM
init_t = 3000. # Need high temp and slow annealing to converge
cool = AnnealIVM(initTemp =init_t,
                 finalTemp=25,
                 tempStep =100 if quick else 12.5,
                 ivm=dyn,
                 rampedParams = rampedParams)

def calcOneStructure(loopInfo):
    """ this function calculates a single structure,
        performs analysis on the structure,
        and then writes out a pdb file, with remarks.
    """

    # initialize parameters for high temp dynamics.
    InitialParams( rampedParams )
    # high-temp dynamics setup - only need to specify parameters
    # which differ from initial values in rampedParams
    InitialParams( highTempParams )

    # high temp dynamics
    #
    protocol.initDynamics(dyn,
                        potList=potList, # potential terms to use
                        bathTemp=init_t,
                        initVelocities=1,
                        finalTime=10, # stops at 800ps or 8000 steps
                        numSteps=5 if quick else 500, # whichever comes
                        printInterval=100) # first

    dyn.setETolerance( init_t/100 ) # used to det. stepsize
                                     # default: t/1000

    dyn.run()
    # initialize parameters for cooling loop
    InitialParams( rampedParams )

    # initialize integrator for simulated annealing
    #
    protocol.initDynamics(dyn,
                        potList=potList,
                        numSteps=100, # at each temp: 100 steps or
                        finalTime=.2 , # .2ps, whichever is less
```

```
        printInterval=100)

# perform simulated annealing
#
cool.run()

# final torsion angle minimization
#
protocol.initMinimize(dyn,
                      printInterval=50)
dyn.run()

# optional cooling in Cartesian coordinates
#
protocol.initDynamics(minc,
                     potList=potList,
                     numSteps=100,      # at each temp: 100 steps or
                     finalTime=.4,      # .2ps, whichever is less
                     printInterval=100)

protocol.initMinimize(minc,
                     potList=potList,
                     dEPred=10)
minc.run()

# do analysis and write structure
loopInfo.writeStructure(potList)
pass

from simulationTools import StructureLoop, FinalParams
StructureLoop(numStructures=numberOfStructures,
              pdbTemplate=outFilename+".pdb",
              structLoopAction=calcOneStructure,
              genViolationStats=1,
              averageTopFraction=0.5, #report stats on best 50% of structs
              averageContext=FinalParams(rampedParams),
              averageCrossTerms=crossTerms,
              averageSortPots=[potList['BOND'], potList['ANGL'],
                              potList['IMPR'], potList['PRE_Mn'],
                              potList['PRE_Cu'], potList['NCS']],
              averagePotList=potList).run()
```


Literaturverzeichnis

- [1] D. Voet, J. G. Voet & C. W. Pratt. *Lehrbuch der Biochemie*. WILEY-VCH, Weinheim, **2002**.
- [2] N. S. Gandhi & R. L. Mancera. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.*, 72(6):455–482, **2008**.
- [3] J. D. Esko & R. J. Linhardt. Proteins that bind sulfated glycosaminoglycans. In A. Varki, Hrsg., *Essentials of glycobiology*, Kapitel 35. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, **2009**.
- [4] T. M. Handel, Z. Johnson, S. E. Crown, E. K. Lau & A. E. Proudfoot. Regulation of protein function by glycosaminoglycans—as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.*, 74:385–410, **2005**.
- [5] S. Salek-Ardakani, J. R. Arrand, D. Shaw & M. Mackett. Heparin and heparan sulfate bind interleukin-10 and modulate its activity. *Blood*, 96(5):1879–1888, **2000**.
- [6] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle*. WILEY-VCH, Weinheim, 4. Aufl., **2004**.
- [7] B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov & K. M. Yamada. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(11):793–805, **2001**.
- [8] J. E. Schwarzbauer & J. L. Sechler. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11(5):622–627, **1999**.
- [9] L. Zhang. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 93:1–17, **2010**.
- [10] M. Kusche-Gullberg & L. Kjellén. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13(5):605–611, **2003**.
- [11] C. Kiani, L. Chen, Y. J. Wu, A. J. Yee & B. B. Yang. Structure and function of aggrecan. *Cell Res.*, 12(1):19–32, **2002**.
- [12] D. G. Seidler & R. Dreier. Decorin and its galactosaminoglycan chain: extracellular regulator of cellular function? *IUBMB life*, 60(11):729–733, **2008**.
- [13] R. Fleischmajer, L. W. Fisher, E. D. MacDonald, L. Jacobs, J. S. Perlish & J. D. Termine. Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *J. Struct. Biol.*, 106(1):82–90, **1991**.

- [14] M. Bernfield, M. Götte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum & M. Zako. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:729–777, **1999**.
- [15] R. V. Iozzo. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:609–652, **1998**.
- [16] H. E. Conrad. Dissection of heparin - past and future. *Pure Appl. Chem.*, 65(4): 787–791, **1993**.
- [17] J. T. Gallagher, J. E. Turnbull & M. Lyon. Heparan sulphate proteoglycans. *Biochem. Soc. Trans.*, 18(2):207–209, **1990**.
- [18] J. E. Turnbull & J. T. Gallagher. Molecular organization of heparan sulphate from human skin fibroblasts. *Biochem. J.*, 265(3):715–724, **1990**.
- [19] J. T. Gallagher. Structure-activity relationship of heparan sulphate. *Biochem. Soc. Trans.*, 25(4):1206–1209, **1997**.
- [20] B. Mulloy & M. J. Forster. Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology*, 10(11):1147–1156, **2000**.
- [21] D. R. Ferro, A. Provasoli, M. Ragazzi, G. Torri, B. Casu, G. Gatti, J. C. Jacquinet, P. Sinay, M. Petitou & J. Choay. Evidence for conformational equilibrium of the sulfated L-iduronate residue in heparin and the synthetic heparin mono- and oligo-saccharides: NMR and force-field studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 108(21):6773–6778, **1986**.
- [22] D. R. Ferro, A. Provasoli, M. Ragazzi, B. Casu, G. Torri, V. Bossennec, B. Perly, P. Sinay, M. Petitou & J. Choay. Conformer populations of L-iduronic acid residues in glycosaminoglycan sequences. *Carbohydr. Res.*, 195(2):157–167, **1990**.
- [23] L. Jin, M. Hricovíni, J. A. Deakin, M. Lyon & D. Uhrín. Residual dipolar coupling investigation of a heparin tetrasaccharide confirms the limited effect of flexibility of the iduronic acid on the molecular shape of heparin. *Glycobiology*, 19(11):1185–1196, **2009**.
- [24] B. Mulloy, M. J. Forster, C. Jones & D. B. Davies. NMR and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem. J.*, 293(Pt 3):849–858, **1993**.
- [25] E. Chautard, L. Ballut, N. Thierry-Mieg & S. Ricard-Blum. MatrixDB, a database focused on extracellular protein-protein and protein-carbohydrate interactions. *Bioinformatics*, 25(5):690–691, **2009**.
- [26] J. Bae, U. R. Desai, A. Pervin, E. E. Caldwell, J. M. Weiler & R. J. Linhardt. Interaction of heparin with synthetic antithrombin III peptide analogues. *Biochem. J.*, 301 (Pt 1):121–129, **1994**.

- [27] L. D. Thompson, M. W. Pantoliano & B. A. Springer. Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain. *Biochemistry*, 33(13):3831–3840, **1994**.
- [28] E. E. Caldwell, V. D. Nadkarni, J. R. Fromm, R. J. Linhardt & J. M. Weiler. Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 28(2):203–216, **1996**.
- [29] R. E. Hileman, R. N. Jennings & R. J. Linhardt. Thermodynamic analysis of the heparin interaction with a basic cyclic peptide using isothermal titration calorimetry. *Biochemistry*, 37(43):15231–15237, **1998**.
- [30] S. Faham, R. E. Hileman, J. R. Fromm, R. J. Linhardt & D. C. Rees. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science*, 271(5252):1116–1120, **1996**.
- [31] A. D. DiGabriele, I. Lax, D. I. Chen, C. M. Svahn, M. Jaye, J. Schlessinger & W. A. Hendrickson. Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor. *Nature*, 393(6687):812–817, **1998**.
- [32] A. C. Rapraeger, A. Krufka & B. B. Olwin. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 252(5013):1705–1708, **1991**.
- [33] T. Spivak-Kroizman, M. A. Lemmon, I. Dikic, J. E. Ladbury, D. Pinchasi, J. Huang, M. Jaye, G. Crumley, J. Schlessinger & I. Lax. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell*, 79(6):1015–1024, **1994**.
- [34] X. Lin, E. M. Buff, N. Perrimon & A. M. Michelson. Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development*, 126(17):3715–3723, **1999**.
- [35] L. Pellegrini, D. F. Burke, F. von Delft, B. Mulloy & T. L. Blundell. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature*, 407(6807):1029–1034, **2000**.
- [36] J. Schlessinger, A. N. Plotnikov, O. A. Ibrahimi, A. V. Eliseenkova, B. K. Yeh, A. Yayon, R. J. Linhardt & M. Mohammadi. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. cell*, 6(3):743–750, **2000**.
- [37] K. Shinmyozu, T. Takahashi, W. Ariyoshi, H. Ichimiya, S. Kanzaki & T. Nishihara. Dermatan sulfate inhibits osteoclast formation by binding to receptor activator of NF-kappa B ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354(2):447–452, **2007**.
- [38] R. E. Miller, J. C. Jones, M. Tometsko, M. L. Blake & W. C. Dougall. RANKL inhibition blocks osteolytic lesions and reduces skeletal tumor burden in models of non-small-cell lung cancer bone metastases. *J. Thorac. Oncol.*, 9(3):345–354, **2014**.

- [39] P. A. D'Amore. Heparin-endothelial cell interactions. *Haemostasis*, 20(Suppl 1): 159–165, **1990**.
- [40] Z. Johnson, A. E. Proudfoot & T. M. Handel. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16(6):625–636, **2005**.
- [41] R. Roberts, J. T. Gallagher, E. Spooncer, T. D. Allen, F. Bloomfield & T. M. Dexter. Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature*, 332(6162):376–378, **1988**.
- [42] D. R. Coombe. The role of stromal cell heparan sulphate in regulating haemopoiesis. *Leuk. Lymphoma*, 21(5-6):399–406, **1996**.
- [43] P. Gupta, T. R. Oegema, J. J. Brazil, A. Z. Dudek, A. Slungaard & C. M. Verfaillie. Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. *Blood*, 92(12):4641–4651, **1998**.
- [44] M. A. Pratta, W. Yao, C. Decicco, M. D. Tortorella, R.-Q. Liu, R. A. Copeland, R. Magolda, R. C. Newton, J. M. Trzaskos & E. C. Arner. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.*, 278(46):45539–45545, **2003**.
- [45] H. Lortat-Jacob, F. Baltzer & J. A. Grimaud. Heparin decreases the blood clearance of interferon- γ and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence. *J. Biol. Chem.*, 271(27):16139–16143, **1996**.
- [46] C. M. Rein, U. R. Desai & F. C. Church. Serpin-glycosaminoglycan interactions. *Method Enzymol.*, 501:105–137, **2011**.
- [47] L. Jin, J. P. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R. N. Pike & R. W. Carrell. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(26):14683–14688, **1997**.
- [48] U. R. Desai, M. Petitou, I. Björk & S. T. Olson. Mechanism of heparin activation of antithrombin. Role of individual residues of the pentasaccharide activating sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin. *J. Biol. Chem.*, 273(13):7478–7487, **1998**.
- [49] U. R. Desai, M. Petitou, I. Björk & S. T. Olson. Mechanism of heparin activation of antithrombin: evidence for an induced-fit model of allosteric activation involving two interaction subsites. *Biochemistry*, 37(37):13033–13041, **1998**.
- [50] M. Petitou, P. Duchaussoy, P. A. Driguez, G. Jaurand, J. P. Herault, J. C. Lormeau, C. A. A. van Boeckel & J. M. Herbert. First synthetic carbohydrates with the full anticoagulant properties of heparin. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37(21):3009–3014, **1998**.
- [51] K. Wolk, S. Kunz, K. Asadullah & R. Sabat. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol.*, 168(11):5397–5402, **2002**.

- [52] M. Jung, R. Sabat, J. Krätzschar, H. Seidel, K. Wolk, C. Schönbein, S. Schütt, M. Friedrich, W.-D. Döcke, K. Asadullah, H.-D. Volk & G. Grütz. Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. *Eur. J. Immunol.*, 34(2):481–493, **2004**.
- [53] R. Sabat, G. Grütz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk & J. Geginat. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21(5):331–344, **2010**.
- [54] R. Kühn, J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky & W. Müller. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2):263–274, **1993**.
- [55] X. Yang, J. Gartner, L. Zhu, S. Wang & R. C. Brunham. IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following *Chlamydia trachomatis* lung infection. *J. Immunol.*, 162(2):1010–1017, **1999**.
- [56] P. J. Murray & R. A. Young. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.*, 67(6):3087–3095, **1999**.
- [57] A. Vazquez-Torres, J. Jones-Carson, R. D. Wagner, T. Warner & E. Balish. Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis. *Infect. Immun.*, 67(2):670–674, **1999**.
- [58] K. G. Tournoy, J. C. Kips & R. A. Pauwels. Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clin. Exp. Allergy*, 30(6):775–783, **2000**.
- [59] G. Grünig, D. B. Corry, M. W. Leach, B. W. Seymour, V. P. Kurup & D. M. Rennick. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Exp. Med.*, 185(6):1089–1099, **1997**.
- [60] D. F. Fiorentino, M. W. Bond & T. R. Mosmann. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, 170(6):2081–2095, **1989**.
- [61] R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor & J. E. de Vries. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, 174(5):1209–1220, **1991**.
- [62] D. F. Fiorentino, A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard & A. O’Garra. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.*, 147(11):3815–3822, **1991**.
- [63] W. D. Creery, F. Diaz-Mitoma, L. Filion & A. Kumar. Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur. J. Immunol.*, 26(6):1273–1277, **1996**.

- [64] R. de Waal Malefyt, J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. G. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel & J. E. de Vries. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.*, 174(4):915–924, **1991**.
- [65] J. K. Jenkins, M. Malyak & W. P. Arend. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 β production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res.*, 13(1):47–54, **1994**.
- [66] P. H. Hart, E. K. Hunt, C. S. Bonder, C. J. Watson & J. J. Finlay-Jones. Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J. Immunol.*, 157(8):3672–3680, **1996**.
- [67] K. Speiran, D. P. Bailey, J. Fernando, M. Macey, B. Barnstein, M. Kolawole, D. Curley, S. S. Watowich, P. J. Murray, C. Oskeritzian & J. J. Ryan. Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10. *J. Leukoc. Biol.*, 85(5):826–836, **2009**.
- [68] S. Kennedy Norton, B. Barnstein, J. Brenzovich, D. P. Bailey, M. Kashyap, K. Speiran, J. Ford, D. Conrad, S. S. Watowich, M. R. Moralle, C. L. Kepley, P. J. Murray & J. J. Ryan. IL-10 suppresses mast cell IgE receptor expression and signaling in vitro and in vivo. *J. Immunol.*, 180(5):2848–2854, **2008**.
- [69] Y. Levy & J. C. Brouet. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J. Clin. Invest.*, 93(1):424–428, **1994**.
- [70] H. Ishida, R. Hastings, J. Kearney & M. Howard. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J. Exp. Med.*, 175(5):1213–1220, **1992**.
- [71] G. Cai, R. A. Kastelein & C. A. Hunter. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN- γ when combined with IL-18. *Eur. J. Immunol.*, 29(9):2658–2665, **1999**.
- [72] K. Asadullah, W. Sterry & H.-D. Volk. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. *Pharmacol. Rev.*, 55(2):241–269, **2003**.
- [73] L. Llorente, W. Zou, Y. Levy, Y. Richaud-Patin, J. Wijdenes, J. Alcocer-Varela, B. Morel-Fourrier, J. C. Brouet, D. Alarcon-Segovia, P. Galanaud & D. Emilie. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.*, 181(3):839–844, **1995**.
- [74] A. Roers & W. Müller. Functions of interleukin-10 derived from different cellular sources. *Curr. Immunol. Rev.*, 4(1):37–42, **2008**.
- [75] K. W. Moore, P. Vieira, D. F. Fiorentino, M. L. Trounstein, T. A. Khan & T. R. Mosmann. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI. *Science*, 248(4960):1230–1234, **1990**.

- [76] D. H. Hsu, R. de Waal Malefyt, D. F. Fiorentino, M. N. Dang, P. Vieira, J. de Vries, H. Spits, T. R. Mosmann & K. W. Moore. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science*, 250(4982):830–832, **1990**.
- [77] H. J. Rode, W. Janssen, A. Rösen-Wolff, J. J. Bugert, P. Thein, Y. Becker & G. Darai. The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10)-like gene. *Virus genes*, 7(1):111–116, **1993**.
- [78] S. B. Fleming, C. A. McCaughan, A. E. Andrews, A. D. Nash & A. A. Mercer. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J. Virol.*, 71(6):4857–4861, **1997**.
- [79] S. V. Kotenko, S. Saccani, L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko & S. Pestka. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(4):1695–1700, **2000**.
- [80] K. M. Lockridge, S. S. Zhou, R. H. Kravitz, J. L. Johnson, E. T. Sawai, E. L. Blewett & P. A. Barry. Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein. *Virology*, 268(2):272–280, **2000**.
- [81] A. Zdanov, C. Schalk-Hihi, A. Gustchina, M. Tsang, J. Weatherbee & A. Wlodawer. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon γ . *Structure*, 3(6):591–601, **1995**.
- [82] A. Zdanov, C. Schalk-Hihi & A. Wlodawer. Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6 Å resolution and a model of a complex with its soluble receptor. *Protein Sci.*, 5(10):1955–1962, **1996**.
- [83] M. R. Walter & T. L. Nagabhushan. Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon γ -like fold. *Biochemistry*, 34(38):12118–12125, **1995**.
- [84] A. Zdanov, C. Schalk-Hihi, S. Menon, K. W. Moore & A. Wlodawer. Crystal structure of Epstein-Barr virus protein BCRF1, a homolog of cellular interleukin-10. *J. Mol. Biol.*, 268(2):460–467, **1997**.
- [85] S. I. Yoon, B. C. Jones, N. J. Logsdon & M. R. Walter. Same structure, different function: Crystal structure of the Epstein-Barr virus IL-10 bound to the soluble IL-10R1 chain. *Structure*, 13(4):551–564, **2005**.
- [86] B. C. Jones, N. J. Logsdon, K. Josephson, J. Cook, P. A. Barry & M. R. Walter. Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(14):9404–9409, **2002**.
- [87] Y. Liu, R. de Waal Malefyt, F. Briere, C. Parham, J. M. Bridon, J. Banchereau, K. W. Moore & J. Xu. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J. Immunol.*, 158(2):604–613, **1997**.
- [88] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson & D. G. Higgins. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947–2948, **2007**.

- [89] H. McWilliam, W. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y. M. Park, N. Buso, A. P. Cowley & R. Lopez. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.*, 41(Web Server issue):W597–600, **2013**.
- [90] R. Sabat. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21(5):315–324, **2010**.
- [91] S. Pestka, C. D. Krause, D. Sarkar, M. R. Walter, Y. Shi & P. B. Fisher. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 22:929–979, **2004**.
- [92] M. R. Walter. Structural analysis of IL-10 and Type I interferon family members and their complexes with receptor. *Adv. Protein Chem.*, 68:171–223, **2004**.
- [93] A. Zdanov. Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21(5):325–330, **2010**.
- [94] S. Hör, H. Pirzer, L. Dumoutier, F. Bauer, S. Wittmann, H. Sticht, J.-C. Renault, R. de Waal Malefyt & H. Fickenscher. The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J. Biol. Chem.*, 279(32):33343–33351, **2004**.
- [95] K. Josephson, N. J. Logsdon & M. R. Walter. Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. *Immunity*, 15(1):35–46, **2001**.
- [96] K. Josephson, R. DiGiacomo, S. R. Indelicato, A. H. Iyo, T. L. Nagabhushan, M. H. Parker, M. R. Walter & A. H. Ayo. Design and analysis of an engineered human interleukin-10 monomer. *J. Biol. Chem.*, 275(18):13552–13557, **2000**.
- [97] K. Josephson, B. C. Jones, L. J. Walter, R. DiGiacomo, S. R. Indelicato & M. R. Walter. Noncompetitive antibody neutralization of IL-10 revealed by protein engineering and x-ray crystallography. *Structure*, 10(7):981–987, **2002**.
- [98] J. C. Tan, S. Braun, H. Rong, R. DiGiacomo, E. Dolphin, S. Baldwin, S. K. Narula, P. J. Zavodny & C. C. Chou. Characterization of recombinant extracellular domain of human interleukin-10 receptor. *J. Biol. Chem.*, 270(21):12906–12911, **1995**.
- [99] S. I. Yoon, N. J. Logsdon, F. Sheikh, R. P. Donnelly & M. R. Walter. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 281(46):35088–35096, **2006**.
- [100] R. M. Weber-Nordt, J. K. Riley, A. C. Greenlund, K. W. Moore, J. E. Darnell & R. D. Schreiber. Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J. Biol. Chem.*, 271(44):27954–27961, **1996**.
- [101] L. Williams, L. Bradley, A. Smith & B. Foxwell. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J. Immunol.*, 172(1):567–576, **2004**.

- [102] J. Wehinger, F. Gouilleux, B. Groner, J. Finke, R. Mertelsmann & R. M. Weber-Nordt. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett.*, 394(3):365–370, **1996**.
- [103] Y. Ding, D. Chen, A. Tarcsafalvi, R. Su, L. Qin & J. S. Bromberg. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J. Immunol.*, 170(3):1383–1391, **2003**.
- [104] K. Josephson, D. T. McPherson & M. R. Walter. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of a complex between IL-10 and soluble IL-10R1. *Acta Crystallogr. D*, 57(Pt 12):1908–1911, **2001**.
- [105] L. Bleicher, P. R. de Moura, L. Watanabe, D. Colau, L. Dumoutier, J.-C. Renaud & I. Polikarpov. Crystal structure of the IL-22/IL-22R1 complex and its implications for the IL-22 signaling mechanism. *FEBS Lett.*, 582(20):2985–2992, **2008**.
- [106] N. J. Logsdon, A. Deshpande, B. D. Harris, K. R. Rajashankar & M. R. Walter. Structural basis for receptor sharing and activation by interleukin-20 receptor-2 (IL-20R2) binding cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(31):12704–12709, **2012**.
- [107] S. I. Yoon, B. C. Jones, N. J. Logsdon, B. D. Harris, A. Deshpande, S. Radaeva, B. A. Halloran, B. Gao & M. R. Walter. Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Structure*, 18(5):638–648, **2010**.
- [108] J. W. Murphy, Y. Cho, A. Sachpatzidis, C. Fan, M. E. Hodsdon & E. Lolis. Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 α) binding to heparin. *J. Biol. Chem.*, 282(13):10018–10027, **2007**.
- [109] D. J. Johnson & J. A. Huntington. Crystal structure of antithrombin in a heparin-bound intermediate state. *Biochemistry*, 42(29):8712–8719, **2003**.
- [110] D. J. Johnson, W. Li, T. E. Adams & J. A. Huntington. Antithrombin-S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation. *EMBO J.*, 25(9):2029–2037, **2006**.
- [111] I. Capila, M. J. Hernáiz, Y. D. Mo, T. R. Mealy, B. Campos, J. R. Dedman, R. J. Linhardt & B. A. Seaton. Annexin V-heparin oligosaccharide complex suggests heparan sulfate-mediated assembly on cell surfaces. *Structure*, 9(1):57–64, **2001**.
- [112] C. Shao, F. Zhang, M. M. Kemp, R. J. Linhardt, D. M. Waisman, J. F. Head & B. A. Seaton. Crystallographic analysis of calcium-dependent heparin binding to annexin A2. *J. Biol. Chem.*, 281(42):31689–31695, **2006**.
- [113] K. Tan, M. Duquette, J.-H. Liu, R. Zhang, A. Joachimiak, J.-H. Wang & J. Lawler. The structures of the thrombospondin-1 N-terminal domain and its complex with a synthetic pentameric heparin. *Structure*, 14(1):33–42, **2006**.
- [114] D. Lietha, D. Y. Chirgadze, B. Mulloy, T. L. Blundell & E. Gherardi. Crystal structures of NK1-heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable

- engineering of potent agonists of the MET receptor. *EMBO J.*, 20(20):5543–5555, **2001**.
- [115] S. A. Samsonov, J.-P. Gehrcke & M. T. Pisabarro. Flexibility and explicit solvent in molecular-dynamics-based docking of protein-glycosaminoglycan systems. *J. Chem. Inf. Model.*, 54(2):582–592, **2014**.
- [116] L. Ballut, N. Sapay, E. Chautard, A. Imberty & S. Ricard-Blum. Mapping of heparin/heparan sulfate binding sites on $\alpha_V\beta_3$ integrin by molecular docking. *J. Mol. Recognit.*, 26(2):76–85, **2013**.
- [117] O. C. Grant & R. J. Woods. Recent advances in employing molecular modelling to determine the specificity of glycan-binding proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 28: 47–55, **2014**.
- [118] M. Mayer & B. Meyer. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(25):6108–6117, **2001**.
- [119] C. Dalvit, G. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi & B. Stockman. WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability. *J. Biomol. NMR*, 21(4):349–359, **2001**.
- [120] A. Chen & M. J. Shapiro. NOE pumping: A novel NMR technique for identification of compounds with binding affinity to macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(39): 10258–10259, **1998**.
- [121] S. Bartoschek, T. Klabunde, E. Defossa, V. Dietrich, S. Stengelin, C. Griesinger, T. Carlomagno, I. Focken & K. U. Wendt. Drug design for G-protein-coupled receptors by a ligand-based NMR method. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49(8):1426–1429, **2010**.
- [122] F. M. Assadi-Porter, M. Tonelli, E. Maillet, K. Hallenga, O. Benard, M. Max & J. L. Markley. Direct NMR detection of the binding of functional ligands to the human sweet receptor, a heterodimeric family 3 GPCR. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (23):7212–7213, **2008**.
- [123] A. J. Benie, R. Moser, E. Bäuml, D. Blaas & T. Peters. Virus-ligand interactions: identification and characterization of ligand binding by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(1):14–15, **2003**.
- [124] B. Claasen, M. Axmann, R. Meinecke & B. Meyer. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in native platelets than in liposomes. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(3):916–919, **2005**.
- [125] S. Mari, D. Serrano-Gómez, F. J. Cañada, A. L. Corbí & J. Jiménez-Barbero. 1D saturation transfer difference NMR experiments on living cells: the DC-SIGN/oligomannose interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44(2):296–298, **2004**.

- [126] Y.-S. Wang, D. Liu & D. F. Wyss. Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening. *Magn. Reson. Chem.*, 42(6):485–489, **2004**.
- [127] B. Fiege, C. Rademacher, J. Cartmell, P. I. Kitov, F. Parra & T. Peters. Molecular details of the recognition of blood group antigens by a human norovirus as determined by STD NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51(4):928–932, **2012**.
- [128] T. Haselhorst, A.-C. Lamerz & M. von Itzstein. Saturation transfer difference NMR spectroscopy as a technique to investigate protein-carbohydrate interactions in solution. *Methods Mol. Biol.*, 534:375–386, **2009**.
- [129] V. Jayalakshmi & N. R. Krishna. Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J. Magn. Reson.*, 155(1):106–118, **2002**.
- [130] M. Mayer & T. L. James. NMR-based characterization of phenothiazines as a RNA binding scaffold. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(13):4453–4460, **2004**.
- [131] S. Kemper, M. K. Patel, J. C. Errey, B. G. Davis, J. A. Jones & T. D. W. Claridge. Group epitope mapping considering relaxation of the ligand (GEM-CRL): including longitudinal relaxation rates in the analysis of saturation transfer difference (STD) experiments. *J. Magn. Reson.*, 203(1):1–10, **2010**.
- [132] C. Dalvit, M. Flocco, S. Knapp, M. Mostardini, R. Perego, B. J. Stockman, M. Veronesi & M. Varasi. High-throughput NMR-based screening with competition binding experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(26):7702–7709, **2002**.
- [133] J. Angulo, P. M. Enríquez-Navas & P. M. Nieto. Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy: the binding isotherm of STD initial growth rates. *Chem. Eur. J.*, 16(26):7803–7812, **2010**.
- [134] M. C. Fernández-Alonso, D. Díaz, M. Á. Berbis, F. Marcelo, F. J. Cañada & J. Jiménez-Barbero. Protein-carbohydrate interactions studied by NMR: from molecular recognition to drug design. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 13(8):816–830, **2012**.
- [135] A. Antanasijevic, B. Ramirez & M. Caffrey. Comparison of the sensitivities of WaterLOGSY and saturation transfer difference NMR experiments. *J. Biomol. NMR*, 60(1):37–44, **2014**.
- [136] C. Dalvit, M. Fasolini, M. Flocco, S. Knapp, P. Pevarello & M. Veronesi. NMR-based screening with competition water-ligand observed via gradient spectroscopy experiments: Detection of high-affinity ligands. *J. Med. Chem.*, 45(12):2610–2614, **2002**.
- [137] A. Sivertsen, J. Isaksson, H.-K. S. Leiros, J. Svenson, J.-S. Svendsen & B. O. Brandsdal. Synthetic cationic antimicrobial peptides bind with their hydrophobic parts to drug site II of human serum albumin. *BMC Struct. Biol.*, 14:4, **2014**.

- [138] C. Ludwig, P. J. A. Michiels, X. Wu, K. L. Kavanagh, E. Pilka, A. Jansson, U. Oppermann & U. L. Günther. SALMON: solvent accessibility, ligand binding, and mapping of ligand orientation by NMR spectroscopy. *J. Med. Chem.*, 51(1):1–3, **2008**.
- [139] C. B. Post. Exchange-transferred NOE spectroscopy and bound ligand structure determination. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 13(5):581–588, **2003**.
- [140] G. M. Clore & A. M. Gronenborn. Theory and applications of the transferred nuclear Overhauser effect to the study of the conformations of small ligands bound to proteins. *J. Magn. Reson.*, 48(3):402–417, **1982**.
- [141] G. M. Clore & A. M. Gronenborn. Theory of the time-dependent transferred nuclear Overhauser effect: applications to structural analysis of ligand-protein complexes in solution. *J. Magn. Reson.*, 53(3):423–442, **1983**.
- [142] K. Wakamatsu, A. Takeda, T. Tachi & K. Matsuzaki. Dimer structure of magainin 2 bound to phospholipid vesicles. *Biopolymers*, 64(6):314–327, **2002**.
- [143] L. Zhang, R.-H. Mattern, T. I. Malaney, M. D. Pierschbacher & M. Goodman. Receptor-bound conformation of an $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist by ^{15}N -edited 2D transferred nuclear overhauser effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(12):2862–2863, **2002**.
- [144] F. Casset, A. Imberty, S. Pérez, M. E. Etzler, H. Paulsen & T. Peters. Transferred nuclear Overhauser enhancement (NOE) and rotating-frame NOE experiments reflect the size of the bound segment of the Forssman pentasaccharide in the binding site of Dolichos biflorus lectin. *Eur. J. Biochem.*, 244(1):242–250, **1997**.
- [145] J. Angulo, B. Langpap, A. Blume, T. Biet, B. Meyer, N. R. Krishna, H. Peters, M. M. Palcic & T. Peters. Blood group B galactosyltransferase: insights into substrate binding from NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(41):13529–13538, **2006**.
- [146] J. J. Hernández-Gay, A. Ardá, S. Eller, S. Mezzato, B. R. Leeftang, C. Unverzagt, F. J. Cañada & J. Jiménez-Barbero. Insights into the dynamics and molecular recognition features of glycopeptides by protein receptors: the 3D solution structure of hevein bound to the trisaccharide core of N-glycoproteins. *Chem. Eur. J.*, 16(35):10715–10726, **2010**.
- [147] Á. Canales, R. Matesanz, N. M. Gardner, J. M. Andreu, I. Paterson, J. F. Díaz & J. Jiménez-Barbero. The bound conformation of microtubule-stabilizing agents: NMR insights into the bioactive 3D structure of discodermolide and dictyostatin. *Chem. Eur. J.*, 14(25):7557–7569, **2008**.
- [148] F. Marcelo, C. Dias, A. Martins, P. J. Madeira, T. Jorge, M. H. Florêncio, F. J. Cañada, E. J. Cabrita, J. Jiménez-Barbero & A. P. Rauter. Molecular recognition of rosmarinic acid from *Salvia sclareoides* extracts by acetylcholinesterase: a new binding site detected by NMR spectroscopy. *Chem. Eur. J.*, 19(21):6641–6649, **2013**.
- [149] Á. Canales, J. M. Andreu, R. Ojeda, M. Bruix, R. Fayos, R. Lozano, G. Giménez-Gallego, M. Martín-Lomas, P. M. Nieto & J. Jiménez-Barbero. Conformational

- flexibility of a synthetic glycosylaminoglycan bound to a fibroblast growth factor. FGF-1 recognizes both the ${}^1\text{C}_4$ and ${}^2\text{S}_\text{O}$ conformations of a bioactive heparin-like hexasaccharide. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(16):5778–5779, **2005**.
- [150] G. Otting & K. Wüthrich. Extended heteronuclear editing of 2D ${}^1\text{H}$ NMR spectra of isotope-labeled proteins, using the $X(\omega_1, \omega_2)$ double half filter. *J. Magn. Reson.*, 85(3):586–594, **1989**.
- [151] A. L. Breeze. Isotope-filtered NMR methods for the study of biomolecular structure and interactions. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, 36(4):323–372, **2000**.
- [152] J. L. Asensio, F. J. Cañada, M. Bruix, A. Rodríguez-Romero & J. Jiménez-Barbero. The interaction of hevein with N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complexed to chitobiose. *Eur. J. Biochem.*, 230(2):621–633, **1995**.
- [153] E. R. P. Zuiderweg. Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 41(1):1–7, **2002**.
- [154] D. S. Wishart, B. D. Sykes & F. M. Richards. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.*, 222(2):311–333, **1991**.
- [155] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges & B. D. Sykes. ${}^1\text{H}$, ${}^{13}\text{C}$ and ${}^{15}\text{N}$ random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR*, 5(1):67–81, **1995**.
- [156] M. A. McCoy & D. F. Wyss. Structures of protein-protein complexes are docked using only NMR restraints from residual dipolar coupling and chemical shift perturbations. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(10):2104–2105, **2002**.
- [157] M. A. McCoy & D. F. Wyss. Spatial localization of ligand binding sites from electron current density surfaces calculated from NMR chemical shift perturbations. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(39):11758–11763, **2002**.
- [158] J. Stark & R. Powers. Rapid protein-ligand costructures using chemical shift perturbations. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(2):535–545, **2008**.
- [159] C. Hetényi & D. van der Spoel. Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Sci.*, 11(7):1729–1737, **2002**.
- [160] U. Schieberr, M. Vogtherr, B. Elshorst, M. Betz, S. Grimme, B. Pescatore, T. Langer, K. Saxena & H. Schwalbe. How much NMR data is required to determine a protein-ligand complex structure? *ChemBioChem*, 6(10):1891–1898, **2005**.
- [161] C. Dominguez, R. Boelens & A. M. J. J. Bonvin. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(7):1731–1737, **2003**.

- [162] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew & A. J. Olson. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, 19(14):1639–1662, **1998**.
- [163] R. Huey, G. M. Morris, A. J. Olson & D. S. Goodsell. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.*, 28(6):1145–1152, **2007**.
- [164] H. Gouda, M. Shiraishi, H. Takahashi, K. Kato, H. Torigoe, Y. Arata & I. Shimada. NMR study of the interaction between the B domain of staphylococcal protein A and the Fc portion of immunoglobulin G. *Biochemistry*, 37(1):129–136, **1998**.
- [165] H. Takahashi, T. Nakanishi, K. Kami, Y. Arata & I. Shimada. A novel NMR method for determining the interfaces of large protein-protein complexes. *Nat. Struct. Biol.*, 7(3):220–223, **2000**.
- [166] T. Nakanishi, M. Miyazawa, M. Sakakura, H. Terasawa, H. Takahashi & I. Shimada. Determination of the interface of a large protein complex by transferred cross-saturation measurements. *J. Mol. Biol.*, 318(2):245–249, **2002**.
- [167] K. Takeuchi, M. Yokogawa, T. Matsuda, M. Sugai, S. Kawano, T. Kohno, H. Nakamura, H. Takahashi & I. Shimada. Structural basis of the KcsA K⁺ channel and agitoxin2 pore-blocking toxin interaction by using the transferred cross-saturation method. *Structure*, 11(11):1381–1392, **2003**.
- [168] N. Nishida, H. Sumikawa, M. Sakakura, N. Shimba, H. Takahashi, H. Terasawa, E.-I. Suzuki & I. Shimada. Collagen-binding mode of vWF-A3 domain determined by a transferred cross-saturation experiment. *Nat. Struct. Biol.*, 10(1):53–58, **2003**.
- [169] M. Takeda, H. Terasawa, M. Sakakura, Y. Yamaguchi, M. Kajiwara, H. Kawashima, M. Miyazawa & I. Shimada. Hyaluronan recognition mode of CD44 revealed by cross-saturation and chemical shift perturbation experiments. *J. Biol. Chem.*, 278(44):43550–43555, **2003**.
- [170] I. Shimada. NMR techniques for identifying the interface of a larger protein-protein complex: cross-saturation and transferred cross-saturation experiments. *Method Enzymol.*, 394:483–506, **2005**.
- [171] M. A. S. Hass & M. Ubbink. Structure determination of protein-protein complexes with long-range anisotropic paramagnetic NMR restraints. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 24:45–53, **2014**.
- [172] P. H. J. Keizers & M. Ubbink. Paramagnetic tagging for protein structure and dynamics analysis. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, 58(1–2):88–96, **2011**.
- [173] K. Barthelmes, A. M. Reynolds, E. Peisach, H. R. A. Jonker, N. J. DeNunzio, K. N. Allen, B. Imperiali & H. Schwalbe. Engineering encodable lanthanide-binding tags into loop regions of proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(4):808–819, **2011**.
- [174] M. Nitz, K. J. Franz, R. L. Maglathlin & B. Imperiali. A powerful combinatorial screen to identify high-affinity terbium(III)-binding peptides. *ChemBioChem*, 4(4):272–276, **2003**.

- [175] K. L. Gempfl, S. J. Butler, A. M. Funk & D. Parker. Direct and selective tagging of cysteine residues in peptides and proteins with 4-nitropyridyl lanthanide complexes. *Chem. Commun.*, 49(80):9104–9106, **2013**.
- [176] C. T. Loh, K. Ozawa, K. L. Tuck, N. Barlow, T. Huber, G. Otting & B. Graham. Lanthanide tags for site-specific ligation to an unnatural amino acid and generation of pseudocontact shifts in proteins. *Bioconjugate Chem.*, 24(2):260–268, **2013**.
- [177] T. Saio, K. Ogura, M. Yokochi, Y. Kobashigawa & F. Inagaki. Two-point anchoring of a lanthanide-binding peptide to a target protein enhances the paramagnetic anisotropic effect. *J. Biomol. NMR*, 44(3):157–166, **2009**.
- [178] L. J. Martin, M. J. Hähnke, M. Nitz, J. Wöhnert, N. R. Silvaggi, K. N. Allen, H. Schwalbe & B. Imperiali. Double-lanthanide-binding tags: design, photophysical properties, and NMR applications. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(22):7106–7113, **2007**.
- [179] P. H. J. Keizers, A. Saragliadis, Y. Hiruma, M. Overhand & M. Ubbink. Design, synthesis, and evaluation of a lanthanide chelating protein probe: CLaNP-5 yields predictable paramagnetic effects independent of environment. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(44):14802–14812, **2008**.
- [180] D. Häussinger, J. R. Huang & S. Grzesiek. DOTA-M8: An extremely rigid, high-affinity lanthanide chelating tag for PCS NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(41):14761–14767, **2009**.
- [181] B. Graham, C. T. Loh, J. D. Swarbrick, P. Ung, J. Shin, H. Yagi, X. Jia, S. Chhabra, N. Barlow, G. Pintacuda, T. Huber & G. Otting. DOTA-amide lanthanide tag for reliable generation of pseudocontact shifts in protein NMR spectra. *Bioconjugate Chem.*, 22(10):2118–2125, **2011**.
- [182] M. A. Keniry, A. Y. Park, E. A. Owen, S. M. Hamdan, G. Pintacuda, G. Otting & N. E. Dixon. Structure of the theta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III in complex with the epsilon subunit. *J. Bacteriol.*, 188(12):4464–4473, **2006**.
- [183] C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, N. Tjandra & G. M. Clore. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J. Magn. Reson.*, 160(1):65–73, **2003**.
- [184] L. Banci, I. Bertini, G. Cavallaro, A. Giachetti, C. Luchinat & G. Parigi. Paramagnetism-based restraints for Xplor-NIH. *J. Biomol. NMR*, 28(3):249–261, **2004**.
- [185] P. Güntert, C. Mumenthaler & K. Wüthrich. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.*, 273(1):283–298, **1997**.
- [186] P. Güntert. Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.*, 278:353–378, **2004**.

- [187] L. Banci, I. Bertini, M. A. Cremonini, G. Gori-Savellini, C. Luchinat, K. Wüthrich & P. Güntert. PSEUDYANA for NMR structure calculation of paramagnetic metalloproteins using torsion angle molecular dynamics. *J. Biomol. NMR*, 12(4):553–557, **1998**.
- [188] C. Schmitz & A. M. J. J. Bonvin. Protein-protein HADDOCK using exclusively pseudocontact shifts. *J. Biomol. NMR*, 50(3):263–266, **2011**.
- [189] W. Jahnke, S. Rüdisser & M. Zurini. Spin label enhanced NMR screening. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(13):3149–3150, **2001**.
- [190] M. Gochin, G. Zhou & A. H. Phillips. Paramagnetic relaxation assisted docking of a small indole compound in the HIV-1 gp41 hydrophobic pocket. *ACS Chem. Biol.*, 6(3):267–274, **2011**.
- [191] N. U. Jain, A. Venot, K. Umemoto, H. Leffler & J. H. Prestegard. Distance mapping of protein-binding sites using spin-labeled oligosaccharide ligands. *Protein Sci.*, 10(11):2393–2400, **2001**.
- [192] T. Saio, K. Ogura, K. Shimizu, M. Yokochi, T. R. Burke & F. Inagaki. An NMR strategy for fragment-based ligand screening utilizing a paramagnetic lanthanide probe. *J. Biomol. NMR*, 51(3):395–408, **2011**.
- [193] T. Zhuang, H.-S. Lee, B. Imperiali & J. H. Prestegard. Structure determination of a Galectin-3-carbohydrate complex using paramagnetism-based NMR constraints. *Protein Sci.*, 17(7):1220–1231, **2008**.
- [194] Á. Canales, Á. Mallagaray, M. Á. Berbís, A. Navarro-Vázquez, G. Domínguez, F. J. Cañada, S. André, H.-J. Gabius, J. Pérez-Castells & J. Jiménez-Barbero. Lanthanide-chelating carbohydrate conjugates are useful tools to characterize carbohydrate conformation in solution and sensitive sensors to detect carbohydrate-protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 136(22):8011–8017, **2014**.
- [195] M. John, G. Pintacuda, A. Y. Park, N. E. Dixon & G. Otting. Structure determination of protein-ligand complexes by transferred paramagnetic shifts. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(39):12910–12916, **2006**.
- [196] J.-Y. Guan, P. H. J. Keizers, W.-M. Liu, F. Löhr, S. P. Skinner, E. A. Heeneman, H. Schwalbe, M. Ubbink & G. Siegal. Small-molecule binding sites on proteins established by paramagnetic NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(15):5859–5868, **2013**.
- [197] W. A. Kibbe. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.*, 35(Web Server issue):W43–6, **2007**.
- [198] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker & L. A. Marky. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(11):3746–3750, **1986**.

- [199] N. Sugimoto, S. Nakano, M. Yoneyama & K. Honda. Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.*, 24(22):4501–4505, **1996**.
- [200] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, **1970**.
- [201] J. Buchner & T. Kiefhaber, Hrsg. *Protein folding handbook*. WILEY-VCH, Weinheim, 1. Aufl., **2005**.
- [202] R. Syto, N. J. Murgolo, E. H. Braswell, P. Mui, E. Huang & W. T. Windsor. Structural and biological stability of the human interleukin 10 homodimer. *Biochemistry*, 37(48):16943–16951, **1998**.
- [203] G. L. Ellman. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82(1):70–77, **1959**.
- [204] G. Bulaj, T. Kortemme & D. P. Goldenberg. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry*, 37(25):8965–8972, **1998**.
- [205] S. W. Provencher & J. Glöckner. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20(1):33–37, **1981**.
- [206] W. C. Johnson. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins*, 35(3):307–312, **1999**.
- [207] N. Sreerama & R. W. Woody. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Bioch.*, 209(1):32–44, **1993**.
- [208] N. Sreerama & R. W. Woody. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Bioch.*, 287(2):252–260, **2000**.
- [209] C. Traversari, P. van der Bruggen, B. van den Eynde, P. Hainaut, C. Lemoine, N. Ohta, L. Old & T. Boon. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics*, 35(3):145–152, **1992**.
- [210] J. K. Riley, K. Takeda, S. Akira & R. D. Schreiber. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J. Biol. Chem.*, 274(23):16513–16521, **1999**.
- [211] C. Di Guan, P. Li, P. D. Riggs & H. Inouye. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*, 67(1):21–30, **1988**.
- [212] P. Riggs. Detection and isolation of recombinant protein based on binding affinity reporter. Maltose binding protein. *Methods Mol. Biol.*, 63:85–101, **1997**.

- [213] P. Riggs, E. R. La Vallie & J. M. McCoy. Introduction to expression by fusion protein vectors. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl, Hrsg., *Current Protocols in Molecular Biology*, Seiten: 16.4.1–16.4.9. John Wiley & Sons, Inc, New York, **2001**.
- [214] P. Riggs. Expression and purification of maltose-binding protein fusions. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl, Hrsg., *Current Protocols in Molecular Biology*, Seiten: 16.6.1–16.6.12. John Wiley & Sons, Inc, New York, **2001**.
- [215] E. R. LaVallie, J. M. McCoy, D. B. Smith & P. Riggs. Enzymatic and chemical cleavage of fusion proteins. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl, Hrsg., *Current Protocols in Molecular Biology*, Seiten: 16.4.10–16.4.11. John Wiley & Sons, Inc, New York, **2001**.
- [216] E. L. Ulrich, H. Akutsu, J. F. Doreleijers, Y. Harano, Y. E. Ioannidis, J. Lin, M. Livny, S. Mading, D. Maziuk, Z. Miller, E. Nakatani, C. F. Schulte, D. E. Tolmie, R. Kent Wenger, H. Yao & J. L. Markley. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.*, 36 (suppl 1):D402–D408, **2008**.
- [217] M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenár. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR*, 2(6):661–665, **1992**.
- [218] V. Sklenár, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek. Gradient-tailored water suppression for ^1H - ^{15}N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. *J. Magn. Reson. Ser. A*, 102(2):241–245, **1993**.
- [219] A. Bax & D. G. Davis. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 65(2):355–360, **1985**.
- [220] M. L. Liu, X. A. Mao, C. H. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson & J. C. Lindon. Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 132(1):125–129, **1998**.
- [221] S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O. Johnson & P. C. van Zijl. Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation. *J. Magn. Reson. Ser. B*, 108(1):94–98, **1995**.
- [222] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider & K. Wüthrich. Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(23):12366–12371, **1997**.
- [223] D. A. Case, V. Babin, J. T. Berryman, R. M. Betz, Q. Cai, D. S. Cerutti, T. E. III. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, H. Gohlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, F. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith,

- J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu & P. A. Kollman. AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.
- [224] K. N. Kirschner, A. B. Yongye, S. M. Tschampel, J. González-Outeiriño, C. R. Daniels, B. L. Foley & R. J. Woods. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. *Carbohydrates. J. Comput. Chem.*, 29(4):622–655, **2008**.
- [225] C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell & P. A. Kollman. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.*, 97(40):10269–10280, **1993**.
- [226] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti & H. J. C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.*, 23(3):327–341, **1977**.
- [227] C. J. Lusty. A gentle vapor-diffusion technique for cross-linking of protein crystals for cryocrystallography. *J. Appl. Crystallogr.*, 32:106–112, **1999**.
- [228] A. G. W. Leslie. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr. D*, 62(Pt 1):48–57, **2006**.
- [229] T. G. G. Battye, L. Kontogiannis, O. Johnson, H. R. Powell & A. G. W. Leslie. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D*, 67(Pt 4):271–281, **2011**.
- [230] W. Kabsch. XDS. *Acta Crystallogr. D*, 66(Pt 2):125–132, **2010**.
- [231] W. Kabsch. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. D*, 66(Pt 2):133–144, **2010**.
- [232] P. Evans. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D*, 62(Pt 1):72–82, **2006**.
- [233] A. A. Vagin & A. Teplyakov. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.*, 30:1022–1025, **1997**.
- [234] P. Emsley & K. Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D*, 60(Pt 12 Pt 1):2126–2132, **2004**.
- [235] G. N. Murshudov, A. A. Vagin & E. J. Dodson. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D*, 53(Pt 3):240–255, **1997**.
- [236] G. Bricogne. Direct phase determination by entropy maximization and likelihood ranking: status report and perspectives. *Acta Crystallogr. D*, 49(Pt 1):37–60, **1993**.
- [237] G. Bricogne. Bayesian statistical viewpoint on structure determination: Basic concepts and examples. *Method Enzymol.*, 276:361–423, **1997**.
- [238] P. Roversi, E. Blanc, C. Vonrhein, G. Evans & G. Bricogne. Modelling prior distributions of atoms for macromolecular refinement and completion. *Acta Crystallogr. D*, 56(Pt 10):1316–1323, **2000**.

- [239] E. S. Seo, B. S. Blaum, T. Vargues, M. de Cecco, J. A. Deakin, M. Lyon, P. E. Barran, D. J. Campopiano & D. Uhrin. Interaction of human β -defensin 2 (HBD2) with glycosaminoglycans. *Biochemistry*, 49(49):10486–10495, **2010**.
- [240] C. Schmitz, M. J. Stanton-Cook, X.-C. Su, G. Otting & T. Huber. Numbat: an interactive software tool for fitting $\Delta\chi$ -tensors to molecular coordinates using pseudocontact shifts. *J. Biomol. NMR*, 41(3):179–189, **2008**.
- [241] C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski & G. M. Clore. Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, 48(1):47–62, **2006**.
- [242] G. J. Kleywegt. Crystallographic refinement of ligand complexes. *Acta Crystallogr. D*, 63(Pt 1):94–100, **2007**.
- [243] T. E. Furia. Sequestrants in food. In T. E. Furia, Hrsg., *CRC handbook of food additives*, Seiten: 271–294. CRC Press, Cleveland Ohio, **1972**.
- [244] F. Nyasulu & R. Barlag. Colorimetric determination of the iron(III)–thiocyanate reaction equilibrium constant with calibration and equilibrium solutions prepared in a cuvette by sequential additions of one reagent to the other. *J. Chem. Educ.*, 88(3):313–314, **2011**.
- [245] J. Iwahara, C. Tang & G. M. Clore. Practical aspects of ^1H transverse paramagnetic relaxation enhancement measurements on macromolecules. *J. Magn. Reson.*, 184(2):185–195, **2007**.
- [246] K. Maskos. The interaction of metal ions with nucleic acids. A nuclear magnetic resonance relaxation time study of the copper(II)-inosine 5'-monophosphate system in solution. *Acta Biochim. Pol.*, 28(2):183–200, **1981**.
- [247] K. Maskos. The interaction of metal ions with nucleic acids. NMR study of the copper(II) interaction with inosine derivatives. *Acta Biochim. Pol.*, 28(3-4):317–335, **1981**.
- [248] J. Iwahara, C. D. Schwieters & G. M. Clore. Ensemble approach for NMR structure refinement against ^1H paramagnetic relaxation enhancement data arising from a flexible paramagnetic group attached to a macromolecule. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(18):5879–5896, **2004**.
- [249] J. Iwahara, C. D. Schwieters & G. M. Clore. Characterization of nonspecific protein-DNA interactions by ^1H paramagnetic relaxation enhancement. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(40):12800–12808, **2004**.
- [250] I. Solomon & N. Bloembergen. Nuclear magnetic interactions in the HF molecule. *J. Chem. Phys.*, 25(2):261–266, **1956**.
- [251] J. P. Hall. Applying fusion protein technology to *E.coli*. *Biopharm. Int.*, (S):6+, **2007**.
- [252] F. Baneyx & M. Mujacic. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.*, 22(11):1399–1408, **2004**.

- [253] C. A.G. Haasnoot, F. A. A. M. de Leeuw & C. Altona. Prediction of *anti* and *gauche* vicinal proton-proton coupling-constants for hexapyranose rings using a generalized Karplus equation. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 89(2):125–131, **1980**.
- [254] Y. Nishida, H. Hori, H. Ohrui & H. Meguro. ^1H NMR analysis of the rotameric distribution of C5-C6 bonds of D-glucopyranoses in solution. *J. Carbohydr. Chem.*, 7(1):239–250, **1988**.
- [255] M. Hricovíni & F. Bízík. Relationship between structure and three-bond proton-proton coupling constants in glycosaminoglycans. *Carbohydr. Res.*, 342(6):779–783, **2007**.
- [256] D. S. Wishart & B. D. Sykes. The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR*, 4(2):171–180, **1994**.
- [257] G. Cornilescu, F. Delaglio & A. Bax. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR*, 13(3): 289–302, **1999**.
- [258] M. V. Berjanskii & D. S. Wishart. A simple method to predict protein flexibility using secondary chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(43):14970–14971, **2005**.
- [259] K. L. Longenecker, S. M. Garrard, P. J. Sheffield & Z. S. Derewenda. Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI. *Acta Crystallogr. D*, 57(Pt 5):679–688, **2001**.
- [260] A. Mateja, Y. Devedjiev, D. Krowarsch, K. L. Longenecker, Z. Dauter, J. Otlewski & Z. S. Derewenda. The impact of Glu→Ala and Glu→Asp mutations on the crystallization properties of RhoGDI: the structure of RhoGDI at 1.3 Å resolution. *Acta Crystallogr. D*, 58(Pt 12):1983–1991, **2002**.
- [261] D. R. Cooper, T. Boczek, K. Grelewska, M. Pinkowska, M. Sikorska, M. Zawadzki & Z. S. Derewenda. Protein crystallization by surface entropy reduction: optimization of the SER strategy. *Acta Crystallogr. D*, 63(Pt 5):636–645, **2007**.
- [262] A. S. Maltsev, J. Ying & A. Bax. Deuterium isotope shifts for backbone ^1H , ^{15}N and ^{13}C nuclei in intrinsically disordered protein α -synuclein. *J. Biomol. NMR*, 54 (2):181–191, **2012**.
- [263] S. Grzesiek, H. Döbeli, R. Gentz, G. Garotta, A. M. Labhardt & A. Bax. ^1H , ^{13}C , and ^{15}N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon- γ . *Biochemistry*, 31(35):8180–8190, **1992**.
- [264] W. Klaus, B. Gsell, A. M. Labhardt, B. Wipf & H. Senn. The three-dimensional high resolution structure of human interferon α -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol. Biol.*, 274(4):661–675, **1997**.
- [265] P. G. Vekilov, A. R. Feeling-Taylor, S. T. Yau & D. Petsev. Solvent entropy contribution to the free energy of protein crystallization. *Acta Crystallogr. D*, 58:1611–1616, **2002**.

- [266] P. G. Vekilov. Solvent entropy effects in the formation of protein solid phases. *Method Enzymol.*, 368:84–105, **2003**.
- [267] Z. S. Derewenda. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods*, 34(3):354–363, **2004**.
- [268] F. Avbelj & L. Fele. Role of main-chain electrostatics, hydrophobic effect and side-chain conformational entropy in determining the secondary structure of proteins. *J. Mol. Biol.*, 279(3):665–684, **1998**.
- [269] Z. S. Derewenda. It's all in the crystals .. *Acta Crystallogr. D*, 67:243–248, **2011**.
- [270] A. McPherson & B. Cudney. Searching for silver bullets: an alternative strategy for crystallizing macromolecules. *J. Struct. Biol.*, 156(3):387–406, **2006**.
- [271] H. Yamada, T. Tamada, M. Kosaka, K. Miyata, S. Fujiki, M. Tano, M. Moriya, M. Yamamishi, E. Honjo, H. Tada, T. Ino, H. Yamaguchi, J. Futami, M. Seno, T. Nomoto, T. Hirata, M. Yoshimura & R. Kuroki. 'Crystal lattice engineering', an approach to engineer protein crystal contacts by creating intermolecular symmetry: crystallization and structure determination of a mutant human RNase 1 with a hydrophobic interface of leucines. *Protein Sci.*, 16(7):1389–1397, **2007**.
- [272] C. Wingren, A. B. Edmundson & C. A. K. Borrebaeck. Designing proteins to crystallize through beta-strand pairing. *Protein Eng.*, 16(4):255–264, **2003**.
- [273] E. N. Salgado, R. J. Radford & F. A. Tezcan. Metal-directed protein self-assembly. *Accounts Chem. Res.*, 43(5):661–672, **2010**.
- [274] E. N. Salgado, X. I. Ambroggio, J. D. Brodin, R. A. Lewis, B. Kuhlman & F. A. Tezcan. Metal templated design of protein interfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(5):1827–1832, **2010**.
- [275] D. R. Banatao, D. Cascio, C. S. Crowley, M. R. Fleissner, H. L. Tienison & T. O. Yeates. An approach to crystallizing proteins by synthetic symmetrization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(44):16230–16235, **2006**.
- [276] M. D. Sweeney, Y. Yu & J. A. Leary. Effects of sulfate position on heparin octasaccharide binding to CCL2 examined by tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 17(8):1114–1119, **2006**.
- [277] A. Pichert, S. A. Samsonov, S. Theisgen, L. Thomas, L. Baumann, J. Schiller, A. G. Beck-Sickinger, D. Huster & M. T. Pisabarro. Characterization of the interaction of interleukin-8 with hyaluronan, chondroitin sulfate, dermatan sulfate and their sulfated derivatives by spectroscopy and molecular modeling. *Glycobiology*, 22(1):134–145, **2012**.
- [278] M. Rusnati, D. Coltrini, P. Oreste, G. Zoppetti, A. Albini, D. Noonan, F. d'Adda di Fagagna, M. Giacca & M. Presta. Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J. Biol. Chem.*, 272(17):11313–11320, **1997**.

- [279] S. S. Deepa, Y. Umehara, S. Higashiyama, N. Itoh & K. Sugahara. Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J. Biol. Chem.*, 277(46):43707–43716, **2002**.
- [280] A. Purushothaman, J. Fukuda, S. Mizumoto, G. B. ten Dam, T. H. van Kuppevelt, H. Kitagawa, T. Mikami & K. Sugahara. Functions of chondroitin sulfate/ dermatan sulfate chains in brain development. Critical roles of E and iE disaccharide units recognized by a single chain antibody GD3G7. *J. Biol. Chem.*, 282(27):19442–19452, **2007**.
- [281] L. Liu, I. Bytheway, T. Karoli, J. K. Fairweather, S. Cochran, C. Li & V. Ferro. Design, synthesis, FGF-1 binding, and molecular modeling studies of conformationally flexible heparin mimetic disaccharides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18(1):344–349, **2008**.
- [282] J. Angulo, M. Hricovíni, M. Gairi, M. Guerrini, J. L. de Paz, R. Ojeda, M. Martín-Lomas & P. M. Nieto. Dynamic properties of biologically active synthetic heparin-like hexasaccharides. *Glycobiology*, 15(10):1008–1015, **2005**.
- [283] D. Mikhailov, K. H. Mayo, I. R. Vlahov, T. Toida, A. Pervin & R. J. Linhardt. NMR solution conformation of heparin-derived tetrasaccharide. *Biochem. J.*, 318(Pt 1):93–102, **1996**.
- [284] B. M. Sattelle, S. U. Hansen, J. Gardiner & A. Almond. Free energy landscapes of iduronic acid and related monosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(38):13132–13134, **2010**.
- [285] M. Erdélyi, E. d’Auvergne, A. Navarro-Vázquez, A. Leonov & C. Griesinger. Dynamics of the glycosidic bond: conformational space of lactose. *Chem. Eur. J.*, 17(34):9368–9376, **2011**.
- [286] P. D. Mosier, C. Krishnasamy, G. E. Kellogg & U. R. Desai. On the specificity of heparin/heparan sulfate binding to proteins. Anion-binding sites on antithrombin and thrombin are fundamentally different. *PLoS One*, 7(11):e48632, **2012**.
- [287] J. R. Fromm, R. E. Hileman, E. E. Caldwell, J. M. Weiler & R. J. Linhardt. Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.*, 323(2):279–287, **1995**.
- [288] A. D. Cardin & H. J. Weintraub. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis*, 9(1):21–32, **1989**.
- [289] H. Margalit, N. Fischer & S. A. Ben-Sasson. Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues. *J. Biol. Chem.*, 268(26):19228–19231, **1993**.
- [290] M. Torrent, M. V. Nogues, D. Andreu & E. Boix. The "CPC clip motif": a conserved structural signature for heparin-binding proteins. *PLoS One*, 7(8):e42692, **2012**.

- [291] H. Lortat-Jacob & J. A. Grimaud. Interferon- γ binds to heparan sulfate by a cluster of amino acids located in the C-terminal part of the molecule. *FEBS Lett.*, 280(1): 152–154, **1991**.
- [292] H. Lortat-Jacob, J. E. Turnbull & J. A. Grimaud. Molecular organization of the interferon γ -binding domain in heparan sulphate. *Biochem. J.*, 310(Pt 2):497–505, **1995**.
- [293] O. Braum, H. Pirzer & H. Fickenscher. Interleukin-26, a highly cationic T-cell cytokine targeting epithelial cells. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.*, 11(3):221–229, **2012**.
- [294] H. Perez Sanchez, K. Tatarenko, M. Nigen, G. Pavlov, A. Imberty, H. Lortat-Jacob, J. G. de la Torre & C. Ebel. Organization of human interferon γ -heparin complexes from solution properties and hydrodynamics. *Biochemistry*, 45(44):13227–13238, **2006**.
- [295] E. Saesen, S. Sarrazin, C. Laguri, R. Sadir, D. Maurin, A. Thomas, A. Imberty & H. Lortat-Jacob. Insights into the mechanism by which interferon- γ basic amino acid clusters mediate protein binding to heparan sulfate. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(25):9384–9390, **2013**.
- [296] H. Lortat-Jacob, C. Brisson, S. Guerret & G. Morel. Non-receptor-mediated tissue localization of human interferon- γ : role of heparan sulfate/heparin-like molecules. *Cytokine*, 8(7):557–566, **1996**.
- [297] M. S. Douglas, D. A. Rix, J. H. Dark, D. Talbot & J. A. Kirby. Examination of the mechanism by which heparin antagonizes activation of a model endothelium by interferon- γ (IFN- γ). *Clin. Exp. Immunol.*, 107(3):578–584, **1997**.

Symbole und Abkürzungen

β	Bohrsches Magneton
$\Delta\chi$	Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität
$\Delta\delta$	Änderung der chemischen Verschiebung
γ	gyromagnetisches Verhältnis
Γ_2	paramagnetischer Beitrag zur transversalen Relaxationsrate
ω_I	Lamorfrequenz des Kernspins
ω_S	Lamorfrequenz des Elektronenspins
τ_c	Korrelationszeit der dipolaren Wechselwirkung
τ_r	Rotationskorrelationszeit
τ_S	Elektronenspinrelaxationszeit
I, S	Spinquantenzahl
J	Kopplungskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
k_{off}	Dissoziationsrate
R_1	longitudinale Relaxationsrate
R_2	transversale Relaxationsrate
T_1	longitudinale Relaxationszeit
T_2	transversale Relaxationszeit
T_m	DNA-Schmelztemperatur
ΔUA	4,5-ungesättigte Uronsäure
$DpnI$	Restriktionsendonuklease aus <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41
$NdeI$	Restriktionsendonuklease aus <i>Neisseria denitrificans</i>
$XhoI$	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas holcicola</i>
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid

Symbole und Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i> , engl. für komplementäre DNA
COSY	<i>correlation spectroscopy</i> , engl. für Korrelationsspektroskopie
CS	Chondroitinsulfat
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i> , engl. für Anisotropie der chemischen Verschiebung
CT	<i>constant time</i>
CW	<i>continuous wave</i> , engl. für zeitlich ungedämpfte RF-Welle
Da	Dalton
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , engl. für Desoxyribonukleinsäure
DNTP	5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , engl. für Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FID	<i>free induction decay</i> , engl. für freier Induktionszerfall
GAG	Glykosaminoglykan
GalN	D-Galaktosamin
GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin
GARP	<i>globally optimized alternating phase rectangular pulse scheme</i> , engl. für global optimiertes phasenalternierendes Rechteckpuls-Schema
GlcA	D-Glukuronsäure
GlcN	D-Glukosamin
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glukosamin
HA	Hyaluronan
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure

HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i> , engl. für heteronukleare Korrelation über mehrere Bindungen
HS	Heparansulfat
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlation</i> , engl. für heteronukleare Einzelquantenkorrelation
IdoA	L-Iduronsäure
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-10R	IL-10-Rezeptor
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> , engl. für Metallchelatchromatographie
INEPT	<i>insensitive nuclei enhanced by polarization transfer</i> , engl. für Verstärkung insensitiver Kerne durch Polarisationstransfer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
KS	Keratansulfat
LBT	<i>lanthanide binding tag</i> , engl. für Lanthanoidionenbindungspeptid
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i> , engl. Massenspektrometrie mit matrixunterstützter Laserdesorption-Ionisation und Flugzeitanalysator
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MD	Moleküldynamik
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MLEV	Entkopplungssequenz aus zusammengesetzten Pulsen nach Malcolm Levitt
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i> , engl. für Boten-RNA
NMGG	nominale Molekulargewichtsgrenze
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , engl. für Kernmagnetresonanz
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i> , engl. für Kern-Overhauser-Effekt
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> , engl. für Spektroskopie mit Kern-Overhauser-Effekt

Symbole und Abkürzungen

NTA	Nitrilotriacetat
OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , engl. für Polymerasekettenreaktion
PCS	<i>pseudo contact shift</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i> , engl. für Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	<i>parts per million</i>
PRE	<i>paramagnetic relaxation enhancement</i> , engl. für paramagnetische Relaxationsverstärkung
psHA	persulfatierte Hyaluronsäure
RDC	<i>residual dipolar coupling</i> , engl. restliche dipolare Kopplung
RF-Puls	Radiofrequenzpuls
RMSD	<i>root mean square distance</i> , engl. für mittlerer quadratischer Abstand
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , engl. für Ribonukleinsäure
ROESY	<i>rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> , engl. für Spektroskopie mit Kern-Overhauser-Effekt im rotierenden Koordinatensystem
SA	<i>simulated annealing</i> , engl. für simulierte Abkühlung
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , engl. für Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> , Transkriptionsfaktorprotein
STD	<i>saturation transfer difference</i> , engl. für Sättigungstransfer-Differenzspektroskopie
STD-AF	<i>STD amplification factor</i> , engl. STD-Verstärkungsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i> , engl. für vollständige Korrelationsspektroskopie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

trNOE	<i>transferred NOE</i>
TROSY	<i>transverse relaxation optimized spectroscopy</i> , engl. für transversalrelaxationsoptimierte Spektroskopie
UV-Vis	<i>ultraviolet-visible</i> , engl. für ultraviolettes bis sichtbares Licht
WATERGATE	<i>water suppression by gradient-tailored excitation</i>
WaterLOGSY	<i>water-ligand observed via gradient spectroscopy</i>
Å	Ångström (10^{-10} m)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Daniel Huster für die Betreuung der Arbeit und für seine Unterstützung während dieser Zeit, insbesondere dabei, meine Ideen und Vorschläge im Projekt umzusetzen. Sein Vertrauen in meine Arbeit ehrt mich sehr.

Frau Prof. Dr. Annette Beck-Sickingher für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie.

Herrn Dr. Stephan Theisgen (Universität Leiden/ Niederlande) für seinen energischen Einsatz und seine Hilfe bei der Zuordnung von IL-10. Selbst nach Feierabend und an Wochenenden stand er mir mit Rat und Tat zur Seite und hat mir viele theoretische und praktische Inhalte in der NMR-Spektroskopie vermittelt. Unsere gemeinsamen Gespräche und Diskussionen habe ich sehr geschätzt.

Herrn Dr. Jan-Philip Gehrcke (BIOTEC, TU Dresden) für seine MD-Strukturberechnungen von Heparin und die sehr gute Zusammenarbeit, welche bisher zu einer gemeinsamen Publikation führte. Danke für das kritische Hinterfragen, die anregenden Diskussionen, den gemeinsamen Austausch unserer Ergebnisse und die entgegengebrachte Sympathie.

Herrn Sebastian Köhling und Herrn Prof. Dr. Jörg Rademann (Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin) für die Synthese des spinmarkierten Hyaluronan-Tetrasaccharids und die Bereitstellung weiterer GAGs. Ich danke ihnen, dass sie meinen Vorschlägen und Plänen entgegenkamen und die schwierige Synthese umsetzten.

Herrn Prof. Dr. Norbert Sträter für die Möglichkeit, die Kristallisation von IL-10 in seinem Labor durchzuführen. Ich danke den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Christoph Döhler, Ulrike Krug und Michael Zahn für ihre Hilfe bei der Kristallisation und der Durchführung und Auswertung der Röntgenbeugungsmessungen.

Herrn Prof. Dr. Jörg Matysik und Herrn Dr. Matthias Findeisen (Institut für Analytische Chemie, Universität Leipzig) für die Messzeit und technische Betreuung am 700 MHz-Spektrometer.

Herrn Prof. Dr. Jochen Balbach und Herrn Dr. Stefan Gröger (Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Messzeit und technische Betreuung am 800 MHz-Spektrometer.

Herrn Dr. Charles Schwieters (Division of Computational Bioscience, Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda/ USA) für seine Ratschläge zu den Strukturberechnungen mit Xplor-NIH.

Herrn Dr. Christian Berger (Actilor GmbH, Leuna) und Herrn Mario Keller für ihre Hilfe

Danksagung

bei der Hochzelllichtfermentation.

Den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Physik und Biophysik und meiner Arbeitsgruppe für die gemeinsame Zeit und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Dem Verband der Chemischen Industrie e.V. für ihre Bewilligung eines Stipendiums in den ersten zwei Jahren meiner Promotion.

Meinen Freunden und meiner Familie für ihre moralische Unterstützung während der Promotion.

Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

- **Persönliche Angaben:**

Name: Georg Martin Künze
Geburtsdatum: 07.09.1985
Geburtsort: Hoyerswerda (Sachsen)
Familienstand: ledig
Adresse: Oeserstraße 42, 04229 Leipzig
Telefon: 0341-9715744
E-Mail: Georg.Kuenze@medizin.uni-leipzig.de

- **Werdegang:**

06/2004 Abitur am Lessing-Gymnasium Hoyerswerda (Note: 1,0)
10/2004 - 06/2005 Grundwehrdienst, Bad Salzungen
10/2005 - 09/2008 Bachelor-Studium Biochemie, Universität Leipzig (Note: 1,0)
10/2008 - 09/2010 Master-Studium Biochemie, Universität Leipzig und Cardiff University/ UK (Note: 1,0)
seit 10/2010 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Leipzig, Anfertigung der Dissertation und Lehrtätigkeit

- **Stipendien und Preise:**

04/2007 - 10/2010 Stipendium der Bischöflichen Studienstiftung Cusanuswerk e.V.
10/2008 Preis für den besten Abschluss im Fach BSc. Biochemie
09/2009 - 04/2010 Erasmus-Stipendium für ein Auslandssemester in Cardiff/ UK
10/2010 Preis für den besten Abschluss im Fach MSc. Biochemie
12/2010 Posterpreis 9. Research-Festival Leipzig
02/2011 - 02/2013 Stipendium vom Verband der Chemischen Industrie e.V.
11/2014 Publikationspreis des SFB Transregio 67

Veröffentlichungen und wissenschaftliche Vorträge

- **Veröffentlichungen:**

1. **G. Künze**, J.-P. Gehrcke, M.T. Pisabarro & D. Huster (2014) NMR characterization of the binding properties and conformation of glycosaminoglycans interacting with interleukin-10. *Glycobiology* 24, 1036-1049
2. **G. Künze**, S. Theisgen & D. Huster (2014) Backbone ^1H , ^{15}N , and ^{13}C and side chain $^{13}\text{C}\beta$ NMR chemical shift assignment of murine interleukin-10. *Biomol. NMR Assign.* 8, 375-378
3. **G. Künze**, P. Barré, H.A. Scheidt, L. Thomas, D. Eliezer & D. Huster (2012) Binding of the three-repeat domain of tau to phospholipid membranes induces an aggregated-like state of the protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2302-2313
4. M. Gamble, **G. Künze**, A. Brancale, K.S. Wilson & D.D. Jones (2012) The role of substrate specificity and metal binding in defining the activity and structure of an intracellular subtilisin. *FEBS Open Bio.* 20, 209-215
5. M. Gamble, **G. Künze**, E. Dodson, K.S. Wilson & D.D. Jones (2011) Regulation of an intracellular subtilisin protease activity by a short propeptide sequence through an original combined dual mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 3536-3541
6. J. Vévodová, M. Gamble, **G. Künze**, A. Ariza, E. Dodson, D.D. Jones & K.S. Wilson (2010) Crystal structure of an intracellular subtilisin reveals novel structural features unique to this subtilisin family. *Structure* 18, 744-755

- **Wissenschaftliche Vorträge:**

- 11.04.2014 Frühlingsretreat des SFB Transregio 67, Nimbschen/ Deutschland: "NMR spectroscopy reveals principles of the interaction between IL-10 and glycosaminoglycans"
- 23.02.2014 NMR meets Biology, gemeinsame Tagung des Tata Instituts (Mumbai/Indien), der Universität Leipzig (Deutschland) und der Universität Aarhus (Dänemark), Goa/ Indien: "Structural investigation of glycosaminoglycan binding to the immune-regulatory protein interleukin-10"
- 17.01.2014 Institutskolloquium des Instituts für Medizinische Physik & Biophysik, Leipzig/ Deutschland: "Characterization of carbohydrate binding to the immune-regulatory protein interleukin-10 by NMR spectroscopy"

Veröffentlichungen und wissenschaftliche Vorträge

- 19.04.2013 Frühlingsretreat des SFB Transregio 67, Nimbschen/ Deutschland:
“Characterization of complexes between interleukin-10 and
glycosaminoglycans by NMR spectroscopy”
- 27.04.2012 Frühlingsretreat des SFB Transregio 67, Nimbschen/ Deutschland:
“Investigation of the GAG-binding protein interleukin-10 by
NMR-spectroscopy and X-ray crystallography”
- 01.02.2012 Stipendiatentreffen des Fonds der Chemischen Industrie, Berlin/
Deutschland: “Preparation of interleukin-10 for studies in
structural biology – overcoming the protein folding problem”
- 09.12.2011 Institutskolloquium des Instituts für Medizinische Physik &
Biophysik, Leipzig/ Deutschland: “Preparation of interleukin-10
for studies in structural biology – overcoming the protein folding
problem”

Selbstständigkeitserklärung

Die vorgelegte Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2010 bis April 2015 am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Daniel Huster angefertigt.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen benutzt habe. Alle Personen, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren, wurden von mir genannt. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Die Zeichnungen und Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt worden oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen.

Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

Datum, Unterschrift