

Aufklärung der  
dreidimensionalen Struktur  
der Sushi-Domäne des Interleukin-15-Rezeptor  $\alpha$   
mittels mehrdimensionaler  
NMR-Spektroskopie

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

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin  
Inken Lorenzen

Kiel  
2006



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Immunsystem</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Angeborene Immunität.....	1
1.1.2	Antigenpräsentierende Zellen .....	2
1.1.3	Erworbene Immunität.....	2
1.1.4	Gedächtniszellen .....	4
1.1.5	Autoimmunerkrankungen.....	4
1.1.6	Funktion von Zytokinen im Immunsystem .....	5
<b>1.2</b>	<b>Zytokine</b> .....	<b>6</b>
1.2.1	Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel-Zytokine .....	7
1.2.2	Bindungstypen der Zytokinrezeptoren .....	9
1.2.3	Common $\gamma$ -Chain Zytokine .....	10
1.2.4	Interleukin-2 und Interleukin-15 .....	11
1.2.5	Interleukin-2- und Interleukin-15-Rezeptoren .....	12
1.2.6	Interleukin-15 .....	14
<b>1.3</b>	<b>NMR-Spektroskopie</b> .....	<b>15</b>
1.3.1	Grundlagen der NMR-Spektroskopie.....	15
<b>1.4</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Verwendete Bakterienstämme und Plasmide</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Anzucht und Selektion der Bakterien</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	22
2.3.2	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen .....	23
2.3.3	Isolierung und Reinigung von DNA- Fragmenten .....	24
2.3.4	Isolierung von Plasmiden .....	24
2.3.5	Ligation .....	24
2.3.6	Transformation des <i>E. coli</i> Stammes DH5 $\alpha$ .....	24
2.3.7	Transformation des <i>E. coli</i> Stammes SG13009 .....	25
<b>2.4</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.4.1	Expression rekombinanter Proteine .....	25

---

2.4.2	Proteinisolierung und Reinigung der Einschlußkörper .....	26
2.4.3	Proteinreinigung und -renaturierung .....	26
2.4.4	Pufferaustausch von Proteinlösungen .....	27
2.4.5	Konzentration von Proteinlösungen .....	27
2.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	27
2.4.7	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	27
2.4.8	Größenausschlusschromatographie .....	28
<b>2.5</b>	<b>Circularer Dichroismus (CD).....</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>NMR-Spektroskopie.....</b>	<b>29</b>
2.6.1	Probenvorbereitung .....	29
2.6.2	NMR-Experimente .....	30
2.6.3	Zuordnung der Resonanzfrequenzen.....	30
2.6.4	Bestimmung der Wasserstoffbrücken .....	30
2.6.5	Strukturberechnung .....	30
2.6.6	Generation von Protein-Modellen und Superpositionierung .....	31
2.6.7	Berechnung der Lösungsmittelzugänglichkeit .....	31
2.6.8	Graphischen Darstellungen .....	31
<b>3</b>	<b>Durchführung &amp; Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Umklonierung der Sushi-Domäne des IL-15R<math>\alpha</math>.....</b>	<b>32</b>
3.1.1	Präparative Amplifikation .....	32
3.1.2	Ligation und Transformation .....	33
<b>3.2</b>	<b>Expression und Renaturierung der Sushi-Domäne des IL-15R<math>\alpha</math>.....</b>	<b>33</b>
3.2.1	Circularer Dichroismus (CD-Spektroskopie).....	35
3.2.2	Größenausschlusschromatographie.....	35
<b>3.3</b>	<b>Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie.....</b>	<b>36</b>
3.3.1	Sequentielle Zuordnung der Resonanzfrequenzen.....	36
3.3.2	$^{15}\text{N}$ -editierte und $^{13}\text{C}$ -editierte NOESY-Experimente.....	43
3.3.3	Identifizierung von Wasserstoffbrücken durch das 2D-HNCO- <i>long range</i> - Experiment .....	44
3.3.4	Strukturberechnung .....	46
3.3.5	Qualität der Struktur der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ .....	48
<b>3.4</b>	<b>Struktur der Sushi-Domäne des IL-15R<math>\alpha</math>.....</b>	<b>50</b>
<b>3.5</b>	<b>Strukturvergleich der Sushi-Domänen des IL-15R<math>\alpha</math> und des IL-2R<math>\alpha</math>.....</b>	<b>51</b>

---

<b>3.6</b>	<b>Modell des IL-15/IL-15R<math>\alpha</math>-Komplexes .....</b>	<b>52</b>
<b>3.7</b>	<b>Vergleich der IL-15/IL-15R<math>\alpha</math> und IL-2/IL-2R<math>\alpha</math> Komplexe .....</b>	<b>54</b>
3.7.1	Vergleich der Interaktionsbereiche .....	54
3.7.2	Vergleich der Oberflächenpotentiale .....	55
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>73</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunsystem

Das Immunsystem ist für die Aufrechterhaltung der Integrität eines Organismus erforderlich. Dies beinhaltet neben der Abwehr von Pathogenen, auch den Erhalt der körpereigenen Gewebestrukturen. Letzteres erfolgt durch die Beseitigung von alternden, entarteten oder mit Krankheitserregern infizierten Zellen. Um diese Aufgabe zu bewältigen, verfügt das Immunsystem über zellvermittelte und humorale Mechanismen. Dabei werden unter humoralen Abwehrmechanismen diejenigen verstanden, die nicht von Zellen, sondern von löslichen Proteinen vermittelt werden. Weiterhin lässt sich das Immunsystem in zwei überlappende Bereiche aufteilen, das angeborene unspezifische- und das erworbene spezifische Immunsystem.

### 1.1.1 Angeborene Immunität

Das angeborene Immunsystem ist für die erste Phase der Pathogenabwehr zuständig. Die Erkennung der Zielstrukturen verläuft unspezifisch über konservierte „allgemeine Muster“ von Krankheitserregern, die auch als „Pathogen assoziierten Molekülen“ bezeichnet werden (*pathogen associated molecule*: PAM) <sup>1</sup>. Zu den zellulären Mechanismen des angeborenen Immunsystems gehören phagozytierende Zellen, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Zur ihrer Aktivierung kommt es durch die Erkennung von PAMs mittels Rezeptoren, den „*pattern recognition receptors*“. Dies führt zur Aufnahme (Phagozytose) der potentiellen Krankheitserreger und zur Aktivierung des Immunsystems. So werden zum Beispiel die vom Infektionsort umgebenden Gefäßwände durchlässiger, die Endothelzellen aktiviert und andere Immunzellen zum Entzündungsort angelockt. Diese Aktivierung erfolgt über lösliche Proteinmediatoren, die Zytokine.

Auch die humoralen Mechanismen des angeborenen Immunsystems, das Komplementsystem, erkennt sein Ziel über PAMs der Mikroorganismen. Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von löslichen Proteinen, die nach Bindung an die Oberfläche des Pathogens zu dessen Opsonierung führen, d.h., die phagozytierenden Zellen erkennen gebundene Bestandteile des Komplementsystem über Rezeptoren an ihrer Oberfläche und phagozytieren diese. Der terminale Komplex des Komplementsystems ist zusätzlich in der Lage, Bakterien durch Porenbildung in dessen Membranen zu töten. Zur Erkennung und Eliminierung von intrazellulär befallenen oder entarteten Zellen dienen beim angeborenen Immunsystem die natürlichen Killer-(NK-) Zellen <sup>1</sup>.

Die Trennung von angeborenem und erworbenem Immunsystem ist nicht ganzheitlich. Das angeborene System spielt eine große Rolle in der Aktivierungs-, aber auch in der Effektorphase des erworbenen, spezifischen Immunsystems. Die Aktivierung des erworbenen Immunsystems erfolgt durch die antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC), zu denen auch die Makrophagen zählen, dessen Hauptfunktion jedoch in der Phagozytose und somit in der Beseitigung von Pathogenen liegt.

### 1.1.2 Antigenpräsentierende Zellen

Während die erste Phase der Immunantwort vom angeborenem Immunsystem bewältigt wird, kommt es parallel zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems. Dies geschieht durch die antigenpräsentierenden Zellen (APC), die durch PAMs der Pathogene, aber auch durch Zytokine aktiviert werden<sup>1</sup>. Die Hauptklasse der APCs sind die dendritischen Zellen. Ihre Vorläufer, z.B. die Langerhans Zellen, befinden sich in der Haut und differenzieren nach ihrer Aktivierung zu dendritischen Zellen. Die Aktivierung der Vorläuferzellen führt zur Expression von kostimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen, welche zur Wanderung in die sekundären lymphatischen Organe führen. Die aufgenommene Bestandteile werden prozessiert, in kleine Peptide zerlegt, und über Klasse I und II Oberflächenmoleküle des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (*Major Histocompatibility Complex*, MHC), den Zellen des erworbenen Immunsystems präsentiert. Substanzen, die in der Lage sind das erworbene Immunsystem zu aktivieren, werden als Antigene bezeichnet<sup>1</sup>.

### 1.1.3 Erworbene Immunität

Potentiell kann jede körperfremde Substanz von den Zellen des erworbenen Immunsystems, den Lymphozyten, erkannt werden<sup>1</sup>. Dies führt zu einer wesentlich größeren Bandbreite der immunologischen Abwehr als es das angeborene Immunsystem allein vermag. Die Lymphozyten lassen sich in B- und T-Lymphozyten, die auch als B- und T-Zellen bezeichnet werden, einteilen<sup>1</sup>. Sie exprimieren jeweils einen Antigen-spezifischen Rezeptor. Solange sie keinen Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatten, sind sie inaktiv und werden als naiv bezeichnet. Die naiven Lymphozyten wandern durch Blut- und Lymphsystem, wobei sie regelmäßig die sekundären lymphatischen Organe passieren. Dort treffen naive T-Zellen auf die APCs. Diese präsentieren potentielle Antigene den naiven T-Zellen über MHCs. Erkennt eine naive T-Zelle ein entsprechendes Antigen, kommt es mit Hilfe des zweiten, kostimulatorischen Signals zu

deren Aktivierung<sup>1</sup>. Das kostimulatorische Signal stellt sicher, dass die T-Zellen nur durch APC aktiviert werden können. Dadurch wird ein gewisser Schutz gegen Erkennung körpereigener Moleküle gegeben. Nach einer Proliferationsphase von 3 – 4 Tagen werden die Lymphozyten zu Effektorzellen und sind nun in der Lage, Pathogene spezifisch zu bekämpfen.

T-Zellen exprimieren ihren Antigenrezeptor nur in membrangebundener Form und dienen der zellulären Abwehr des erworbenen Immunsystems<sup>1</sup>. CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sind Unterklassen der T-Zellen. Letztere erkennen intrazellulär infizierte Zellen und eliminieren diese. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen werden auch als T-Helferzellen bezeichnet. Subpopulationen der T-Helferzellen, die T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen, haben im Entzündungsgeschehen unterschiedliche Funktionen, sie inhibieren sich und ihre vermittelten Effekte gegenseitig. Dabei aktivieren sie zum einen Makrophagen (T<sub>H1</sub>) und zum anderen Mastzellen und Vorläuferzellen der eosinophilen Granulozyten (T<sub>H2</sub>). Beiden Subklassen aktivieren B-Zellen. Dies führt, je nach Subklasse, zur Expression unterschiedlicher Isoformen des löslichen Antigenrezeptors, den Antikörpern der B-Zellen.

Generell sind B-Zellen für die Vermittlung der humoralen Antwort des spezifischen Immunsystems zuständig. Nach ihrer Aktivierung sezernieren sie ihre Antikörper. Diese vermitteln die Abwehr von extrazellulären Krankheitserregern und Toxinen, indem sie diese den Komponenten des angeborenen Immunsystems, z.B. den phagozytierenden Makrophagen und dem Komplementsystem, kenntlich machen. Je nachdem, welche Subpopulation der T-Helferzellen die B-Zellen aktiviert, kommt es zu unterschiedlichen Effekten, die durch die jeweiligen Isoformen der sezernierten Antikörper bedingt sind. So wird durch die Aktivierung der B-Zellen mittels T<sub>H1</sub>-Zellen z.B. eine Isoform des Antikörpers exprimiert, die mit hoher Affinität an spezifische Rezeptoren von Makrophagen bindet und so die Phagozytose des gebundenen Pathogens fördert. Demgegenüber können B-Zellen, welche von T<sub>H2</sub>-Zellen aktiviert wurden, eine andere Isoform des Antikörpers exprimieren, welcher durch Bindung an Mastzellen und eosinophile Granulozyten über entsprechende Rezeptoren zu deren Aktivierung führen. Dieser Vorgang dient der Abwehr von Parasiten, führt jedoch in manchen Fällen zur Entstehung von Allergien<sup>1</sup>.

Nach einer erfolgreichen Immunantwort bleibt die Information über die Pathogene dem Organismus erhalten, es bildet sich ein „immunologisches Gedächtnis“ aus.



### 1.1.4 Gedächtniszellen

Durch das immunologische Gedächtnis erfolgt im Falle einer Reinfektion eine schnellere und effektivere Abwehr als bei der Erstinfektion. Diese Eigenschaft des erworbenen Immunsystems ist die Grundlage von Impfungen. Dabei wird der Organismus mit einer abgeschwächten Form oder einem Bestandteil eines Pathogens künstlich infiziert, wodurch ein erhöhter Schutz gegen das entsprechende Pathogen entsteht. Für die Ausbildung dieses Langzeitschutzes sind die Gedächtniszellen verantwortlich. Während die überwiegende Zahl der Lymphozyten nach der Immunantwort in den programmierten Zelltod (Apoptose) gehen, überlebt ein kleiner Anteil der „Antigen-geprägten“ Lymphozyten. Diese differenzieren zu Gedächtniszellen, die über ihre antigen-spezifischen Rezeptoren Informationen zur Abwehr des entsprechenden Pathogens weiter tragen und nach einer erneuten Infektion schnell zu Effektorzellen differenzieren. So bewirkt das immunologische Gedächtnis einen mit dem Alter zunehmenden Schutz gegen Krankheiten<sup>1</sup>. Allerdings funktioniert das Immunsystem nicht immer fehlerfrei, so kann es u.a. zu einer Immunreaktion gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) kommen.

### 1.1.5 Autoimmunerkrankungen

Das Ergebnis der erworbenen Immunität sollte normalerweise die erfolgreich Eliminierung von Fremdantigenen sein. In manchen Fällen kommt es jedoch zu einer Immunreaktion gegen körpereigene Moleküle (Autoantigene). Da das Autoantigen häufig in großen Mengen vorkommt und vom eigenen Organismus „nachgeliefert“ wird, ist das Immunsystem nicht in der Lage das Autoantigen vollständig zu beseitigen. Dies führt zu langanhaltenden chronischen Entzündungen, die tödlich enden können. Diese Fehlleistung des Immunsystems wird normalerweise durch verschiedene Kontrollpunkte verhindert. Dabei findet der erste Schritt während der Reifung der Lymphozyten statt. Hier kommt es zur Eliminierung autogen erkennender Lymphozyten (negative Selektion). Auch die Erforderlichkeit des zweiten kostimulatorischen Signals für eine erfolgreiche Aktivierung der T- und B-Zellen dient zum Schutz gegen Autoimmunität, wobei T-Zellen dieses Signal von APCs und B-Zellen von T<sub>H2</sub>-Zellen erhalten. Weitere Kontrollmechanismen sind regulatorische T-Zellen, sowie der aktivierte induzierte Zelltod (*activation induced cell death*: AICD). Dabei führt eine permanente Aktivierung der T-Zellen zu einer erhöhten Expression von Todesrezeptoren (FAS) und ihren Liganden (FAS-Ligand), wodurch sie in Apoptose gehen. Bekannte Beispiele für Autoimmunerkrankungen sind multiple Sklerose, insulinabhängiger Diabetes (Typ I) und rheumatoide Arthritis.

### 1.1.5.1 Rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis ist die häufigste systemische Autoimmunerkrankung und führt im Anfangsstadium zu einer Zerstörung von Gelenken. Im weiteren Verlauf der Krankheit kann es auch zu Schädigungen anderer Organe, wie Haut, Herz und Lunge, u.a. durch rheumatoide Nekrosen kommen. Das Autoantigen wurde bisher nicht identifiziert. Es befindet sich in der Synovialmembran (Gelenkschleimhaut) von Gelenkkapseln, von dort greift die Zerstörung auf Knorpel und gelenknahe Knochen über.

Während der Initiationsphase werden T-Zellen (überwiegend  $T_H$ ) von APCs aktiviert. Dieser Initiationsphase folgt das Anlocken und Aktivieren weiterer Immunzellen, unter ihnen auch B-Zellen. Die Entzündung führt ebenfalls zur Aktivierung gewebeeigener Zellen, den Synovialzellen. Diese begrenzen in ein bis zwei Schichten die Gelenkseite der Synovialmembran. Zu den Synovialzellen gehören Makrophagen-ähnliche- und Fibroblasten-ähnliche Zellen. Die Entzündung verursacht die Proliferation und Einwanderung Fibroblasten-ähnlicher Zellen, die einen sogenannten Pannus bilden. Dieser zeigt ein autonomes, invasives Wachstum, wobei er Zytokine und Enzyme, z. B. Metalloproteinasen, freisetzt. So kommt es unter Beteiligung von aktivierten Chondrocyten (Hemmung der Kollagen- und Proteoglykansynthese, Zunahme der Sekretion von Metalloproteinasen) und Osteoclasten, zu Zerstörung des Knorpels und des Knochens.

In der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis zeigt sich, wenn auch mit negativen Wirkungen, die Bedeutung von Zytokinen als Kommunikationseinheit unterschiedlicher Zellen eines Organismus.

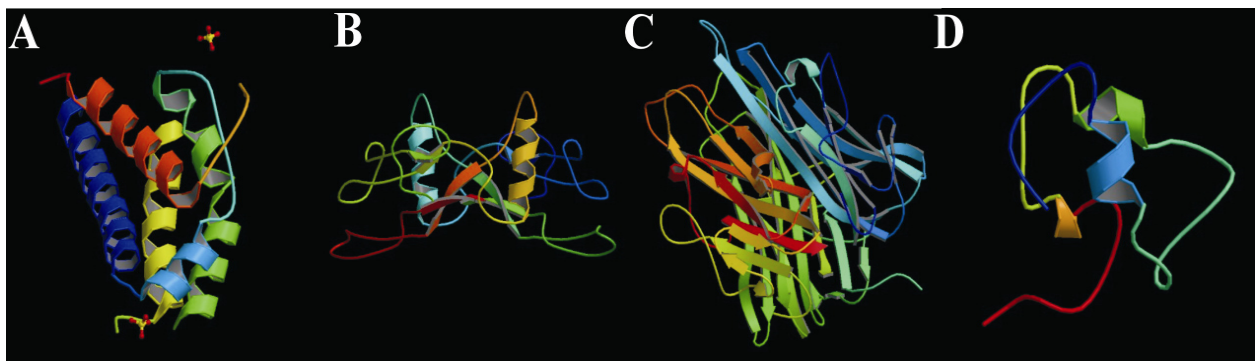
### 1.1.6 Funktion von Zytokinen im Immunsystem

Zur Kontrolle und Regulation des Immunsystems bedarf es eines komplexen Netzwerkes an Koordination. Als Mediatoren dienen hierzu Zytokine. Schon für die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen zu Immunzellen ist jeweils ein entsprechender „Satz“ an Zytokinen erforderlich, um den jeweiligen Zelltyp zu determinieren. Die Kommunikation bei der Aktivierung und Regulation des unspezifischen und spezifischen Immunsystems erfolgt ebenfalls mit der Hilfe von Zytokinen, wie auch das Anlocken von Zellen an die Orte der Entzündung und der programmierte Zelltod.

## 1.2 Zytokine

Zytokine sind lösliche Proteinmediatoren, die von Zellen produziert und freigesetzt werden. Sie beeinflussen das Verhalten ihrer Zielzellen, welche die entsprechenden Rezeptoren für das jeweilige Zytokin in ihrer Plasmamembran tragen. Durch die zeitliche und räumliche Kontrolle der Expression und Freisetzung von Zytokinen und deren Rezeptoren kommt es zu einer hohen Koordination der unterschiedlichen Signale, was für die komplexe Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen des Organismus unabdingbar ist. So spielen Zytokine u.a. in der embryonalen Entwicklung und, wie bereits oben erwähnt, in der Regulation des Immunsystems eine wichtige Rolle.

Als Proteine weisen Zytokine eine definierte räumliche Struktur auf, wobei die kleinste Einheit eines Proteins, welche selbstständig eine stabile Faltung einnehmen kann, als Domäne bezeichnet wird. Die räumliche Anordnung und Verknüpfung der Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt) in einer Domäne wird als Faltungstopologie bezeichnet. Durch die unterschiedlichen Faltungstopologien der Zytokine, werden diese in „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“- , „ $\beta$ -faltblattreiche“- und kleine „ $\alpha/\beta$ -Zytokine“ klassifiziert (Abbildung 1.1).



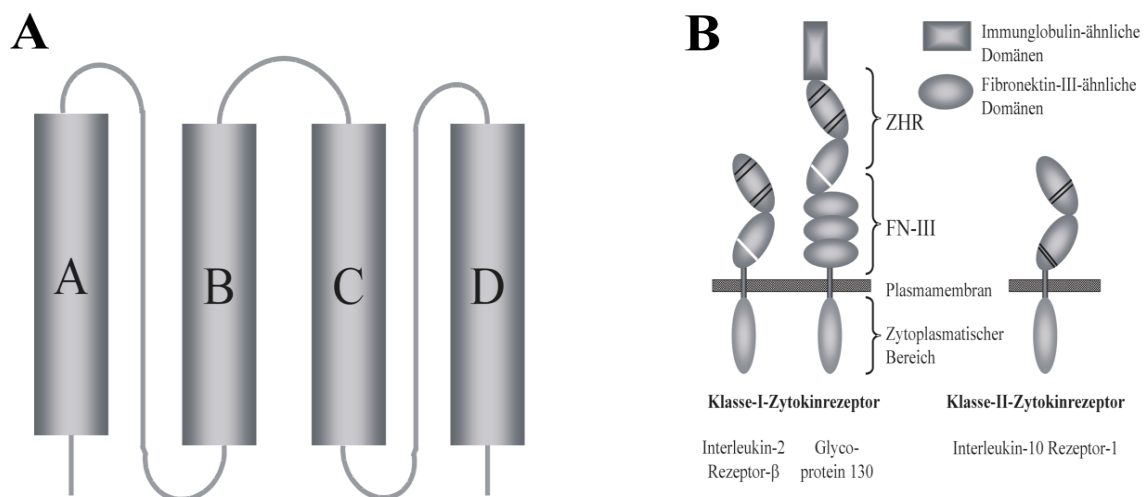
**Abbildung 1.1: Unterschiedliche Faltungstopologien der Zytokine.** A: Interleukin-2 (PDB-Nr.: 1M47), ein Mitglied der „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“-Zytokin-Familie. B&C: Darstellungen von „ $\beta$ -faltblattreichen“- Zytokinen. (B) TGF- $\beta$  (PDB-Nr.: 1KLC) als Vertreter der Cysteinknoten und (C) der trimere TNF- $\alpha$ -Komplex (PDB-Nr.: 1TNF) als Mitglied der „ $\beta$ -Jellyroll“-Familie. D: Darstellung eines kleinen „ $\alpha/\beta$ -Zytokines“, dem Insulin-ähnlichem-Wachstumsfaktor-1 (PDB-Nr.: 1B9G)

Zur Gruppe der kleinen „ $\alpha/\beta$ -Zytokine“ gehören Insulin und „Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren“, sowie die Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (*epidermal growth factor*, EGF). Deren Mitglieder, wie EGF und *Transforming Growth Factor* (TGF) – $\alpha$  sind in der Gewebsmodulierung von Bedeutung (Abbildung 1.1D). Zur Klasse der „ $\beta$ -faltblattreichen

Zytokine“ zählt die Familie der „Cysteinknoten“. Repräsentanten dieser Familie sind TGF- $\beta$  und die *Bone Morphogenic Proteins* (BMP) (Abbildung 1.1B). Ihnen kommen wichtige Funktionen in der Embryogenese, aber auch im adulten Organismus bei der Kontrolle von Proliferation und Differenzierung von Knochen und Bindegewebe, zu. Eine weitere Faltungstopologie der „ $\beta$ -faltblattreichen Zytokine“ repräsentiert die Tumor Nekrose Faktor (TNF) Familie (Abbildung 1.1C), die sogenannten „ $\beta$ -Jellyrolls“. Deren Mitglieder, wie TNF- $\alpha$  und FAS, übernehmen als Homotrimere wichtige Aufgaben im Entzündungsgeschehen und in der Induktion der Apoptose<sup>2</sup>. Eine große Zahl der im Immunsystem bedeutsamen Zytokine wird von der Familie der „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel-Zytokine“ eingenommen.

### 1.2.1 Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel-Zytokine

Die „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“-Zytokine (Abbildung 1.1A) bilden eine große Zytokinklasse, die wichtige immunregulatorische Funktionen übernimmt. Sie weisen eine gemeinsame Faltungstopologie auf, die bisher nur bei Zytokinen gefunden wurde und daher als „Zytokinfaltung“ gilt. Dabei werden über drei *Loops* vier  $\alpha$ -Helices verbunden (Abbildung 1.2A). Diese vier Helices sind in einer „auf-auf-ab-ab“-Topologie angeordnet<sup>3</sup>.



**Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung der „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“-Zytokine und Zytokinrezeptoren.** A: Faltungstopologie der „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“-Zytokine. Die  $\alpha$ -Helices werden durch Zylinder symbolisiert. B: Abbildung eines einfachen- (Interleukin-2 Rezeptor- $\beta$ ) und eines komplexen Klasse-I-Zytokinrezeptors (Glykoprotein 130, gp130), sowie eines Klasse-II-Zytokinrezeptors (IL-10 Rezeptor-1). Cysteinebrücken werden durch schwarze-, das WSXWS- Motiv durch weiße Balken dargestellt.

Die „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel-Zytokine“ werden aufgrund weiterer struktureller Merkmale, nämlich der Länge der  $\alpha$ -Helices, weiter unterteilt. „Lang-Ketten-Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“-, oder auch

Typ-I Zytokine besitzen  $\alpha$ -Helices mit einer Länge von 10-20 Aminosäureresten, während „kurz-Ketten Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel-“ oder auch Typ-II Zytokine nur 8 –10 Reste pro  $\alpha$ -Helix aufweisen<sup>4</sup>. Zu der letzteren Klasse gehören IL-3, IL-4, IL-5 und IL-15, während IL-2, IL-6, IL-10, Leukemia inhibitory Factor (LIF) und Oncostatin M (OSM) Beispiele für die „langen-Ketten-Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“-Zytokine sind. All diese Zytokine benötigen Rezeptoren, um ihr Signal den Zielzellen zu vermitteln<sup>3</sup>.

### 1.2.1.1 Zytokinrezeptoren

„Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“-Zytokine werden von Zytokinrezeptoren gebunden. Der initiale Schritt zur Übermittlung des Signals in die Zelle wird dabei durch die Ligation von Ligand und Rezeptor gebildet. Der finale signalisierende Zytokinrezeptorkomplex enthält mindestens zwei Rezeptoren. Die Ligandenbindung führt in den multimeren Rezeptorkomplexen zu einer Konformationsänderung, die sich in einer Annäherung und korrekten Orientierung der cytoplasmatischen Bereiche der Rezeptoren manifestiert. Durch die nun korrekte Anordnung der Rezeptoren werden Signalkaskaden ausgelöst, die die Nachricht des Zytokins der Zelle übersetzen.

Die Zytokin- oder Hämatopoetinrezeptoren sind baukastenartig (modular) aufgebaut und besitzen homologe Strukturmerkmale. Sie durchspannen mit einer hydrophoben Region von 20 – 26 Aminosäureresten die Plasmamembran. Dadurch teilen sie sich in einen extrazellulären-, den aminoterminalen und in einen cytoplasmatischen den carboxyterminalen Bereich auf. Der extraplasmatische Bereich der Zytokinrezeptoren dient zur Ligandenbindung. Er enthält mindestens ein Zytokin-Bindungs-Modul (ZBM), welches auch als Zytokinrezeptor-Homologie-Region (ZHR) bezeichnet wird (Abbildung 1.2B). Dieses Modul wird durch zwei Fibronektin-Typ-III-ähnliche (FN-III) Domänen gebildet. Bei den Klasse-I-Zytokinrezeptoren weist die membran-distale, N-terminale Domäne vier konservierte Cysteinreste auf. Dagegen enthält die membran-proximale, C-terminale FN-III-Domäne ein typisches Sequenzmotif, das aus der Sequenzabfolge: Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin gebildet und als WSXWS-Motif (X steht hier für einen nicht konservierten Aminosäurerest) bezeichnet wird<sup>3</sup>.

Nicht alle „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel-Zytokine“ werden über Klasse-I-Zytokinrezeptoren gebunden. So werden die Typ-I- und Typ-II Interferone, sowie Interleukin-10 über Klasse-II-Zytokinrezeptoren gebunden. Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Klasse-I-Rezeptoren durch das Fehlen eines WSXWS-Motif und durch die nicht homologe Lokalisation der Cysteinreste in den FN-III-Domänen<sup>5</sup> (Abbildung 1.2B). Die FN-III-Domänen der ZHR sind in einem Winkel angeordnet, so dass sie einem „Ellenbogen“ ähneln. Die Bindung des Liganden

erfolgt über die *Loops* der  $\beta$ -Faltblätter beider FN-III-Domänen, die sich an der Außenseite des Ellenbogens befinden (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3: Ribbondarstellung des Wachstumshormons im Komplex mit seinen homodimeren Rezeptoren.** In Rot und Blau dargestellt sind die Rezeptoren des Wachstumshormons. Diese binden über identische *sites*, welche sich an den „Ellenbogen“ befinden, an das Wachstumshormon (grün).

### 1.2.2 Bindungstypen der Zytokinrezeptoren

Die „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel-Zytokine“ binden an multimere Zytokinrezeptoren. Dabei ist die „einfachste“ Form der Klasse-I-Zytokinrezeptoren die Bindung des Zytokins an einen homodimeren Rezeptorkomplex. So rekrutiert das Wachstumshormon (*Growth Hormon*, GH) zunächst einen seiner Rezeptoren an den hochaffinen Bindungsbereich (*site*) I. Anschließend erfolgt die Bindung des zweiten Rezeptors über die niederaffine *site* II. Während beide Rezeptoren die gleichen Reste zur Bindung ihres Liganden verwenden, unterscheiden sich die Bindungsepitope (*site* I und *site* II) des GH, was die unterschiedlichen Affinitäten der *sites* erklärt. Die Bindung von Rezeptor und Ligand erfolgt primär über hydrophobe Reste, die sogenannte „*hot spots*“ ausbilden. Diese *hot spots* sind von einem Ring aus polaren und geladenen Resten umgeben<sup>6</sup>. Zur Bindungsenergie tragen überwiegend die Kontakte zwischen den hydrophoben Resten zwischen Ligand und Rezeptor bei, während die hydrophilen Reste für die Spezifität der Bindung erforderlich sind.

Der signalisierende Komplex von Interleukin (IL) -4 unterscheidet sich von dem des GH. IL-4 vermittelt sein Signal über einen heterodimeren Rezeptorkomplex. Dabei bindet das Zytokin zunächst an den IL-4-Rezeptor- $\alpha$ , anschließend erfolgt die Rekrutierung des IL-2-Rezeptor- $\gamma$ . Während die Bindung von GH an den GH-Rezeptor durch hydrophobe Wechselwirkung gekennzeichnet ist, bindet IL-4 seinen  $\alpha$ -Rezeptor über ein sogenanntes

„Avocadocluster“<sup>7</sup>. Dabei wird der Kern der „Avocado“ durch hydrophile, geladene Reste, die über Wasserstoffbrücken mit einander in Wechselwirkung treten, gebildet. Dieser Kern der Avocado wird von hydrophoben Resten umgeben. Dieser hydrophobe Ring führt zu einer Abschirmung der polaren Reste von der wässrigen Umgebung. Dies führt zu einer Erhöhung der freien Bindungsenergie und äußert sich in einer hohen Assoziationskonstante<sup>8</sup>.

Neben den heterodimeren Komplexen kommt es bei Zytokinen wie IL-2 zur Ausbildung heterotrimerer Rezeptorkomplexe, indem drei Rezeptoren, IL-2-Rezeptor  $\alpha$ ,  $-\beta$  und  $-\gamma$ , für die Bindung und das Signalisieren des Zytokins erforderlich sind. Während bisher nur einfache Rezeptoren aufgeführt wurden, in denen im extraplasmatischen Bereich nur Domänen vorhanden sind, die zur Ligandenbindung erforderlich sind, gibt es zudem die Klasse der komplexen Rezeptoren. Diese Rezeptoren enthalten zusätzliche Domänen, die nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt sind. Beispiele hierfür sind signalisierende Rezeptoren der IL-6-ähnlichen-Zytokine. Beim Glycoprotein 130 (gp130), *Leukemia-inhibitory-Factor* Rezeptor und Oncostatin-M Rezeptor folgen auf die membran-distalen, zytokinbindenden Domänen, drei weitere FN-III-Domänen. Diese sind für die Signaltransduktion erforderlich, jedoch nicht an der Ligandenbindung beteiligt<sup>3</sup>. Weiterhin zeichnen sich die IL-6-ähnlichen-Zytokine dadurch aus, dass alle Mitglieder dieser Gruppe mindestens ein Molekül gp130 als gemeinsamen Rezeptor im signaltransduzierenden Rezeptorkomplex beinhalten. Auch die *Common  $\beta$ -Chain*-Zytokinfamilie, bestehend aus IL-3, IL-5 und dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor, sowie die *Common  $\gamma$ -Chain*-Zytokine benötigen jeweils einen gemeinsamen Rezeptor zur Signaltransduktion.

### 1.2.3 Common $\gamma$ -Chain Zytokine

Der Klasse der *Common  $\gamma$ -Chain*-Zytokine gehören IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 an. Bei allen Mitgliedern dieser Familie ist die Rekrutierung des  $\gamma$ -Rezeptors von Interleukin-2 (IL-2) zur Ausbildung ihres signaltransduzierenden Rezeptorkomplexes unerlässlich. Daher wird der IL-2-Rezeptor- $\gamma$  auch als *Common  $\gamma$ -Chain* bezeichnet. Des weiteren erfordert die Signaltransduktion dieser Zytokinfamilie das Vorhandensein eines jeweils spezifischen  $\alpha$ -Rezeptors. IL-4, IL-7, IL-9, und IL-21 vermitteln ihre Effekte über heterodimere Rezeptoren. Anders IL-2 und IL-15, sie signalisieren über heterotrimerer Rezeptorkomplexe, die zusätzlich zum spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor den Interleukin-2- $\beta$ -Rezeptor (IL-2R $\beta$ ) enthalten.

Die Bedeutung der *Common  $\gamma$ Chain*-Zytokine im Immunsystem wird bei dem genetischen Ausfall der *Common  $\gamma$ Chain* deutlich. Defekte in der von dem Rezeptor vermittelten Signaltransduktion äußern sich in schweren kombinierten Immundefizienzen (*severe combined immunodeficiency*, SCID). Dabei ist X-SCID, auch bekannt als „*bubble boy disease*“, direkt auf einen Defekt in dem Gen der *Common  $\gamma$ Chain* zurückzuführen. Immundefizienzen sind angeborene oder erworbene Fehlfunktionen des Immunsystems, die sich in einer hohen Anfälligkeit für Infektionen äußern. Opportunistische Krankheitserreger, die im gesunden Organismus kaum Schaden anrichten, führen bei SCID-Patienten häufig schon innerhalb des ersten Lebensjahres zum Tode. Glücklicherweise kann dies in den meisten Fällen durch Knochenmarkstransplantation verhindert werden.

Auf zellulärer Ebene führt X-SCID zu einer blockierten Differenzierung und Proliferation von T- und NK-Zellen. Zwar sind reife B-Zellen im humanen Organismus vorhanden, sind aber nicht vollständig funktionsfähig. Dabei wird die fehlerhafte Antikörperproduktion der B-Zellen auf die fehlenden Signale von IL-21 und IL-4 zurückgeführt. IL-4 steht jedoch ein alternativer Rezeptorkomplex zur Signaltransduktion zur Verfügung, der sich aus dem IL-4 Rezeptor- $\alpha$  und dem IL-13 Rezeptor- $\alpha 2$  zusammensetzt. Dies und die allgemein vorhandene Redundanz der Zytokine sind mögliche Erklärungen für die Existenz der B-Zellen in X-SCID-Patienten. Der Verlust der T- und NK-Zellen ist hingegen durch das Fehlen der von IL-7 und IL-15 vermittelten Effekte begründet <sup>9</sup>. Diese Phänotypen beruhen auf dem weitgefächerten Wirkungsspektrum der *Common  $\gamma$ Chain*-Zytokine, von Differenzierung und Aktivierung bis hin zur Induktion oder Prävention der Apoptose von Immunzellen. So ist IL-2 sowohl in der Lage naive T-Zellen zur Proliferation zu aktivieren, als auch in aktivierten T-Zellen die Apoptose einzuleiten.

#### 1.2.4 Interleukin-2 und Interleukin-15

Interleukin-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von T-Zellen. So ist das Zytokin *in vitro* und *in vivo* in der Lage T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren.

Bevor naive T-Zellen aktiviert werden, exprimieren sie  $\beta$ - und  $\gamma$ -Rezeptoren des IL-2. Tritt eine naive T-Zelle mit ihrem spezifischen Antigen und kostimulatorischen Molekülen, präsentiert durch APCs, in Wechselwirkung, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle. Durch die daraufhin resultierende Expression von IL-2 und seinem  $\alpha$ -Rezeptor (CD25), werden die T-Zellen durch einen autokrinen *Loop* zur Proliferation stimuliert. Weitere Funktionen von IL-2 sind der Erhalt der peripheren Toleranz von T-Zellen zum Schutz des Organismus vor



autoreaktiven T-Zellen. So führt IL-2 zur Induktion des AICD bei permanent aktivierten T-Zellen. Für die Entwicklung der (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) regulatorischen T-Zellen, welche potentiell autoreaktive T-Zellen supprimieren, ist IL-2 unerlässlich. Weiterhin erhöht IL-2 die zytolytische Aktivität von NK-Zellen und wirkt auf die Differenzierung der T<sub>H2</sub>-Zellen.

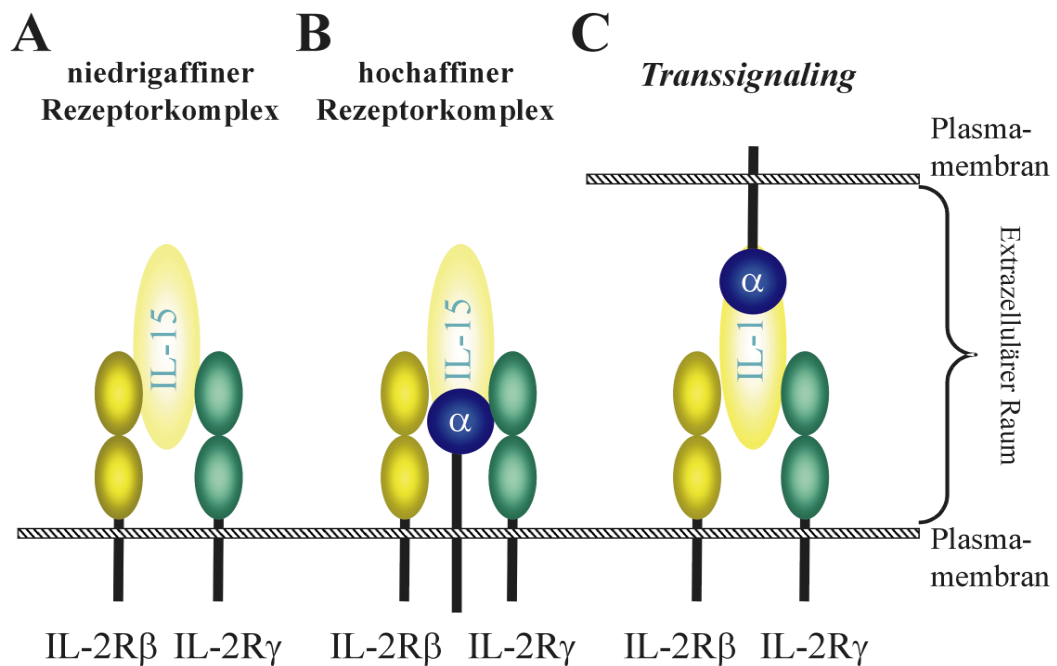
IL-2 und IL-15 verwenden die gleichen signalübertragenden Rezeptoren, den IL-2R $\beta$  und die *Common  $\gamma$ Chain*<sup>10-13</sup>. Daher ist es nicht verwunderlich, dass IL-15 durch seine Fähigkeit entdeckt wurde, die IL-2 vermittelte T-Zellproliferation zu imitieren<sup>10, 11, 14</sup>. Auch die Erhöhung der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen sind beiden Zytokinen gemeinsam. Dem gegenüber steht jedoch eine erhebliche Zahl an unterschiedlichen Funktionen, die in den Phänotypen der „*knock-out*“ Mäuse der Zytokine und ihrer spezifischen  $\alpha$ -Rezeptoren deutlich werden. Im Einklang mit den oben genannten Funktionen von IL-2, zeigen IL-2 und IL-2R $\alpha$  „*knock-out*“ Mäuse eine erhöhte Zahl an T- und B-Zellen, sowie die Ausbildung von Autoimmunphänotypen<sup>15, 16</sup>. Bei IL-15 und IL-15R $\alpha$  „*knock-out*“ Mäusen kommt es zu keiner Ausbildung von Autoimmunerkrankungen. Diese Mäuse sind durch eine reduzierte Zahl an CD8<sup>+</sup>-Gedächtnis-, NK and NK-T Zellen gekennzeichnet<sup>17, 18</sup>.

Dies und die Tatsache, dass IL-15 den von IL-2 vermittelten AICD supprimiert<sup>19</sup>, weist auf ein hohes proinflammatorisches Potential von IL-15 hin.

Weitere Unterschiede bestehen in dem Expressionsmuster von IL-2 und IL-15, sowie ihren spezifischen  $\alpha$ -Rezeptoren. So werden IL-2 und IL-2R $\alpha$  ausschließlich von hämatopoetischen Zellen, überwiegend den T-Zellen, exprimiert. Die Expression von IL-15 und seinem  $\alpha$ -Rezeptor erfolgt hingegen auf einer großen Zahl unterschiedlicher Zelltypen, zu denen nicht nur Zellen des Immunsystems gehören. So konnten die mRNAs von IL-15- und IL-15R $\alpha$  in Herz, Lunge, Leber und Skelettmuskeln nachgewiesen werden<sup>20-22</sup>. Neben den verschiedenen Expressionsmustern der Zytokine und ihren  $\alpha$ -Rezeptoren, bestehen weitere Unterschiede bezüglich ihrer Rezeptorkomplexe.

### 1.2.5 Interleukin-2- und Interleukin-15-Rezeptoren

IL-2 und IL-15 signalisieren über den IL-2R $\beta$  und die *Common  $\gamma$ Chain*<sup>10-13</sup>. Beide Rezeptoren sind typische Vertreter der Klasse-I-Zytokinrezeptoren, welche zur Ligandenbindung die ZHR verwenden. Neben diesen Rezeptoren besitzen IL-2 und IL-15 zusätzliche spezifische  $\alpha$ -Rezeptoren, den IL-2R $\alpha$  bzw. IL-15R $\alpha$ <sup>20</sup>. Diese Rezeptoren gehören nicht der Zytokinrezeptorfamilien an, weisen untereinander jedoch hohe Homologien auf.



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe von IL-15.**  
 A: Der minimale signalisierende Rezeptorkomplex des IL-15 besteht aus den IL-2Rβ und -γ. B: Das Vorhandensein des IL-15Rα (blau), erhöht die Affinität des Komplexes zu seinem Liganden, ist jedoch nicht für das Signalisieren über den IL-2Rβ und -γ erforderlich. C: Beim *transsignaling* präsentiert z.B. ein Makrophage einer CD8<sup>+</sup>-T-Gedächtniszelle das Zytokin, wodurch diese ein „Überlebenssignal“ erhält.

Die Ligandenbindung des IL-2Rα und IL-15Rα erfolgt über eine wesentlich kleinere Einheit als sie die ZHR mit etwa 200 Aminosäureresten darstellt. Sie wird von einer Proteindomäne vermittelt, die als „Sushi-Domäne“ bezeichnet wird<sup>23</sup>. Diese β-Sandwich-Domänen wurden zuvor in Proteinen des Komplement- und Blutgerinnungssystems gefunden<sup>24</sup>. Sushi-Domänen zeigen typischerweise eine Größe von 60 – 70 Aminosäureresten und enthalten zwei konservierte Cysteinbrücken<sup>25,26</sup>.

Der IL-2Rα enthält zwei Sushi-Domänen und bindet seinen Liganden mit relativ niedriger Affinität ( $K_a \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ ). Dem gegenüber bindet der IL-15Rα, der nur eine Sushi-Domäne aufweist, seinen Liganden mit einer 1000-fach höheren Affinität ( $K_a \sim 10^{11} \text{ M}^{-1}$ )<sup>21</sup>. Die Signaltransduktion des IL-2 erfolgt durch die Bindung an seinen α-, β- und γ-Rezeptor. IL15 ist zudem in der Lage ohne seinen α-Rezeptor, nur über β- und γ-Rezeptoren, zu signalisieren. Da die hohe Affinität des IL-15Rα das „*transsignaling*“ des IL-15 ermöglicht<sup>27</sup>. Beim *transsignaling* wird das Zytokin, gebunden an der Oberfläche einer Zelle, einer anderen Zelle präsentiert (Abbildung 1.4). Die Präsentation von IL-15, verbunden mit dem endosomalen Recycling des IL-15/IL-15Rα-Komplexes, führt in biologischen Systemen zu einer

langanhaltenden Persistenz des Zytokins<sup>27</sup>. Dies scheint u.a. für das Überleben von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, sowie für die niedrigen Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins in biologischen Flüssigkeiten gesunder Organismen erforderlich zu sein<sup>28</sup>.

### 1.2.6 Interleukin-15

Anders als IL-2 hat IL-15 auch Effekte auf Zellen, die keine direkte Verbindung zum Immunsystem aufweisen. So wurde gezeigt, dass IL-15 anabolisch auf Skelettmuskeln wirkt und in der Lage ist, Angiogenese des Gefäßendothels zu induzieren<sup>29</sup>.

In der Immunantwort spielt IL-15 in allen Phasen der Abwehr, Aktivierungs- und Effektorphase, sowie bei der Ausbildung bzw. dem Erhalt des immunologischen Gedächtnisses eine entscheidende Rolle. So kommt es in der Phase der Aktivierung des angeborenen Immunsystems in den APCs, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, zur Expression von IL-15 und dem IL-15R $\alpha$ <sup>30,31</sup>. Weiterhin wird vermutet, dass IL-15 für die Initiation der T-Zellaktivierung zuständig und für die ersten fünf Zellteilungen der aktivierten T-Zellen verantwortlich ist<sup>32</sup>. Zusätzlich wirkt IL-15 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, NKZellen und T-Lymphozyten, indem es die Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren induziert. Auch für die Ausbildung des immunologischen Gedächtnis ist IL-15 unerlässlich<sup>22</sup>. Dies äußert sich in der reduzierten Zahl der CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen in IL-15 „knock-out“ Mäusen.

Die hohe proinflammatorische Aktivität von IL-15, verbunden mit dem weitverbreiteten Expressionsmuster und dem anti-apoptischen Charakter, führen zu einer potentiellen Gefährdung des Organismus durch anormale Entzündungen. So wurde gezeigt, dass IL-15 an der Pathogenese von chronischen Entzündungen wie Psoriasis (Schuppenflechte) und chronischen Darmentzündungen, aber auch an Autoimmunerkrankungen, wie insulinabhängiger Diabetes (Typ I), Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis, beteiligt ist<sup>33, 34</sup>. Daher überrascht es nicht, dass im gesunden Organismus die IL-15 Expression streng reguliert wird<sup>29, 35</sup>. Unter anderen schlug Nishimura *et al.* ein Modell der transkriptionellen Regulation vor. Dabei führt IL-15, zusammen mit seinem  $\alpha$ -Rezeptor, zu einer negativen Rückkopplung der eigenen Genexpression<sup>36</sup>. Das Modell basiert auf der Entdeckung, dass von den acht existierenden *Splice*formen des IL-15R $\alpha$  nur diejenigen, die die Fähigkeit besitzen IL-15 zu binden und damit die Sushi-Domäne enthalten, durch ihre Kernlokalisationssequenz in den Zellkern gelangen<sup>37</sup>. In dem Modell wurde vermutet, dass IL-15 über die Bindung an den IL-15R $\alpha$  den Zellkern erreicht und dort die Transkription seines eigenen Genes reprimiert<sup>36</sup>.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine lösliche Form des IL-15R $\alpha$  im Organismus existiert. Diese Form des Rezeptors wird durch enzymatische Abspaltung (*Shedding*) von der Plasmamembran durch das „*tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme*“ (TACE/ADAM17) generiert<sup>38, 39</sup>. Weiterhin wurde gezeigt, dass die lösliche Form des Rezeptors antagonistische Eigenschaften aufweist<sup>38</sup>. So konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass der lösliche IL-15R $\alpha$  in der Lage ist, „Kollagen vermittelte Arthritis“<sup>40</sup>, „kurz Zeit Carragenan-induzierte Inflammationen“<sup>24</sup> und die Induktion von allergischen Entzündungen<sup>41</sup> zu supprimieren, sowie die Überlebenszeit von allogenen Herztransplantaten zu verlängern<sup>42</sup>. Diese Ergebnisse weisen auf ein hohes therapeutisches Potential des löslichen IL-15R $\alpha$  hin. Solche therapeutisch einsetzbaren Moleküle lassen sich durch ein rationelles Design generieren. Grundlage eines solchen Designs ist die dreidimensionale Struktur der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  und die Kenntnis der Interaktion mit seinem Liganden.

### 1.3 NMR-Spektroskopie

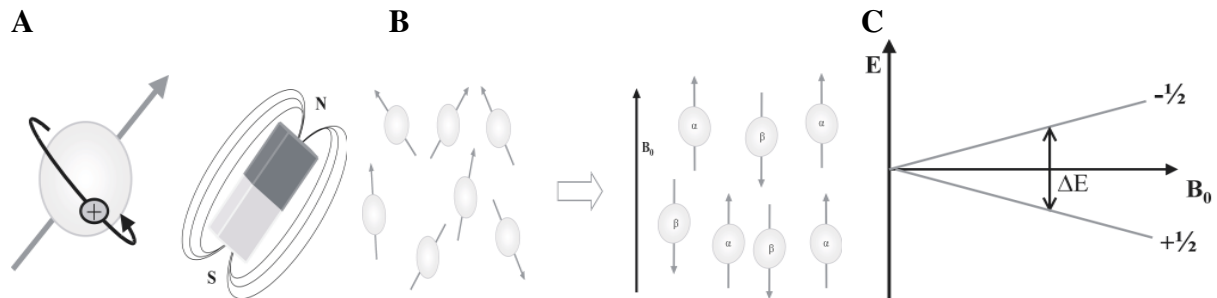
Zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen dient, neben der Röntgenstrukturanalyse, die kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (*Nuclear magnetic Resonance*, NMR)<sup>43</sup>. Mittels der NMR-Spektroskopie ist es möglich geworden, die Struktur von Proteinen in Lösung zu bestimmen. Zusätzlich erlaubt die Methode die Untersuchung dynamischer Prozesse, wie z.B. Rezeptor- und Ligandinteraktionen.

Den Grundstein der NMR-Spektroskopie legten Bloch<sup>44</sup> und Purcel<sup>45</sup> 1946 mit der Entdeckung der Kernresonanz-Signale von Atomkernen. Zur weitreichenden Verbesserung, und damit zu Anwendungsmöglichkeiten in der Proteinbiochemie kam es in den 60iger Jahren durch die Einführung der Fourier-Transformation-(FT)<sup>46</sup> und der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie<sup>47</sup>. So ist heute die NMR-Spektroskopie eine Standardmethode, mit der die strukturelle Aufklärung von Proteinen bis zu einer Größe von 80 kDa<sup>48</sup> bzw. 100 kDa<sup>49</sup> möglich geworden ist.

#### 1.3.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Viele Atomkerne weisen einen Eigendrehimpuls auf, sie rotieren um ihre eigene Achse (Abbildung 1.5A). Hierdurch erzeugen Kerne, die einen Gesamtdrehimpuls ungleich Null besitzen, ein kernmagnetisches Moment ( $\mu$ ). Der Gesamtdrehimpuls ( $I$ ) setzt sich aus den Einzeldrehimpulsen der Protonen und Neutronen eines Atomkerns zusammen. Dabei besitzen

die meisten Kerne, die in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie Verwendung finden, einen Gesamtspin von  $I = 1/2$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ). Werden diese Atomkerne einem statischen Magnetfeld ( $B_0$ ) ausgesetzt, so richten sich diese entlang des äußeren Magnetfeldes in paralleler  $\alpha$  ( $\uparrow$  spin up) oder antiparalleler  $\beta$  ( $\downarrow$  spin down) Orientierung aus (Abbildung 1.5B/ 1.5C).



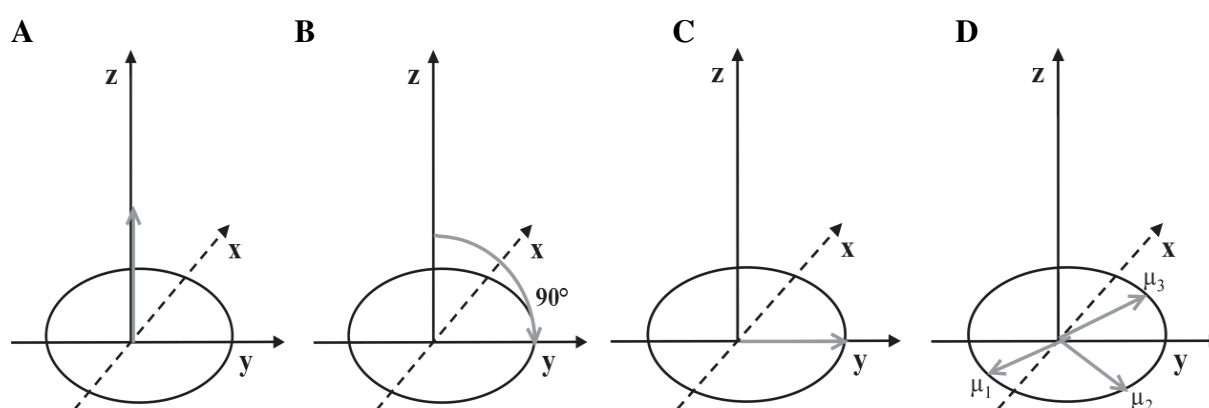
**Abbildung 1.5: Ausrichtung der Atomkerne im äußeren Magnetfeld.** A: Atomkerne, z.B.  $^1\text{H}$ , rotieren um ihre eigene Achse. Die Rotation der Ladung bewirkt die Ausbildung eines magnetischen Feldes, ähnlich eines Stabmagneten. B: Erst durch den Einfluss eines äußeren Magnetfeldes kommt es zur Ausrichtung der Atomkerne in paralleler oder antiparalleler Orientierung. C: Entsprechend dem Zeeman-Effekt bestehen für  $^1\text{H}$  zwei Energieniveaus,  $+1/2$  ( $\alpha$ ) und  $-1/2$  ( $\beta$ ), dessen Energiedifferenz mit zunehmenden äußeren Magnetfeld steigt.

Die dabei induzierten Energieniveaus werden entsprechend der Boltzmannverteilung ( $n_\alpha/n_\beta = e^{-\Delta E/kT} = e^{-\hbar\gamma B_0}$ ) besetzt, wobei die parallele  $\alpha$ -Ausrichtung zum äußeren Magnetfeld die energetisch günstigere darstellt. Die Energiedifferenz wird dabei durch  $\Delta E = \hbar\gamma B_0$  beschrieben. Hierbei wird  $\gamma$  als gyromagnetische Konstante bezeichnet, welche die Empfindlichkeit eines Kerns in der NMR-Spektroskopie widerspiegelt ( $\hbar = h/2\pi$ , wobei  $h$  das Planksche Wirkungsquantum darstellt). Je größer  $\gamma$  ist, desto empfindlicher ist der Kern (siehe Tabelle 1.1). Der niedrige Besetzungsunterschied, der durch das äußere Magnetfeld induzierten Energieniveaus und das seltene Vorkommen der  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}$ -Isotope (siehe Tabelle 1.1) führt zu einer relativ geringen Sensitivität der NMR-Spektroskopie, welche durch Markierung der Proteine mit den entsprechenden Isotopen und durch zunehmend stärkere Magneten verbessert wird. Die Orientierung der Spins entlang des äußeren Magnetfeldes wird als longitudinale oder auch z-Magnetisierung bezeichnet. Durch die zum äußeren Magnetfeld senkrechte Einstrahlung eines hochfrequenten magnetischen Wechselfeldes (Radiofrequenzpuls) wird das Gleichgewicht der Besetzungen gestört, die Spins orientieren sich entlang der xy-Ebene, in einer transversalen Magnetisierung ( $M_x$ ,  $M_y$ ), die Energieniveaus sind nun gleichbesetzt (da  $M_z = 0$  ist, Abbildung 1.6). In der xy-Ebene präzedieren die Spins mit ihrer Larmorfrequenz ( $\omega$ ), entsprechend  $\Delta E = \hbar\omega = \hbar\omega_0$ , induzieren in einer Empfängerspule eine Spannung und kehren durch Relaxationsprozesse zurück in die longitudinale Magnetisierung.

**Tabelle 1.1: Kernspin, natürliche Häufigkeit und gyromagnetische Verhältnisse einiger wichtiger Kerne für die NMR-Spektroskopie.**

Kernisotop	Spin	natürliche Häufigkeit	$\gamma$ (gyro-magnetisches Verhältnis) $10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$^1\text{H}$	$\frac{1}{2}$	99,98	26,7519
$^2\text{H}$	1	0,016	4,1066
$^{14}\text{N}$	1	99,63	1,9338
$^{15}\text{N}$	$\frac{1}{2}$	0,37	-2,712
$^{12}\text{C}$	0	98,9	-
$^{13}\text{C}$	$\frac{1}{2}$	1,108	6,7283

Bloch beschrieb diesen Vorgang mit Zeitgesetzen erster Ordnung und unterscheid dabei zwei Prozessen, die longitudinale- ( $T_1$ ) und die transversale- ( $T_2$ ) Relaxation<sup>50</sup>. Erstere wird durch die Wechselwirkung des Spins mit seiner Umgebung bestimmt und daher auch als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet. Die transversale Relaxation ist hingegen abhängig von den Wechselwirkungen der Spins untereinander und wird daher auch als Spin-Spin-Relaxationszeit benannt. Die Relaxation ist von der Dynamik und damit auch von der Größe des Moleküls, dem Molekulargewicht (MW), abhängig. Dieser Zusammenhang wird von der Korrelationszeit ( $\tau_c$ ) beschrieben [ $\text{MW} \approx 2\tau_c$ ]. Sie gibt die Frequenz an, mit welcher die einzelnen Spins um die z-Achse rotieren und steht mit der  $T_2$ -Relaxation im umgekehrt proportionalen Verhältnis [ $\tau_c \approx (5T_2)^{-1}$ ].



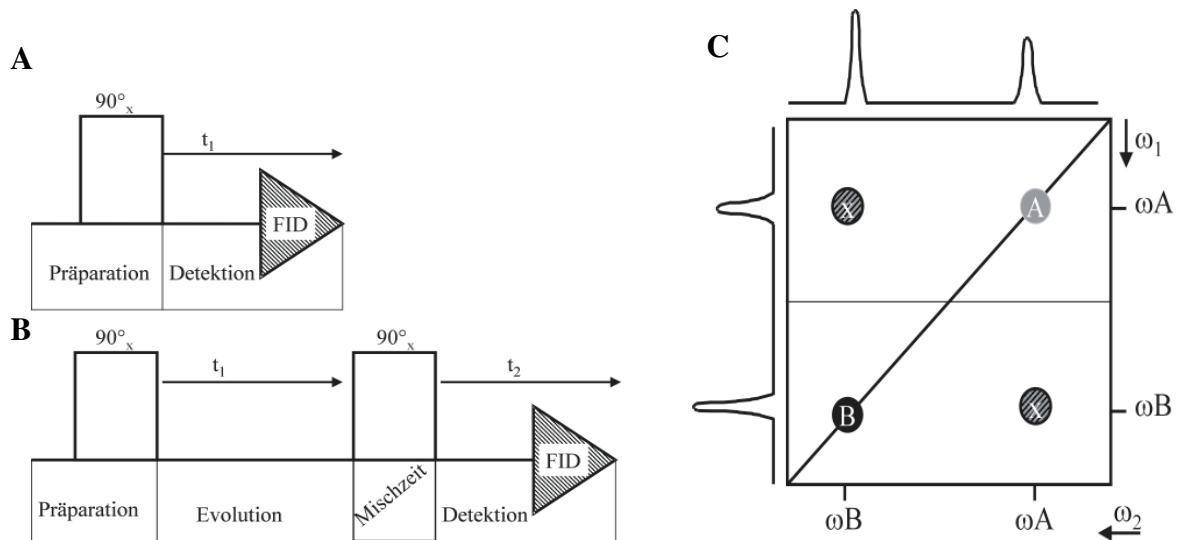
**Abbildung 1.6: Wirkung eines 90° Pulses auf die z-Magnetisierung.** A: Durch den Einfluss des äußeren Magnetfeldes befindet sich die makroskopische Magnetisierung in der z-Achse. B: Ein von  $-x$  Richtung kommender Radiofrequenzpuls führt die Spins rechtshändig in auf die  $+y$ -Achse. C: Ausgehend von dieser Orientierung präzedieren die Spins je nach ihrer chemischen Umgebung mit unterschiedlicher Magnetisierung ( $\mu$ ) und daraus resultierender Geschwindigkeit in der  $x,y$ -Ebene, wo sie eine entsprechende Spannung in eine Empfängerspule induzieren.

Je größer nun die Korrelationszeit ( $\tau_c$ ) ist, desto schneller relaxieren die Spins und kehren zurück in die z-Magnetisierung. Dies hat zur Folge, dass mit zunehmender Größe des Proteins die Signale schwächer werden, da die Spins nur relativ kurz eine Spannung in der Empfängerspule induzieren. Das Signal, welches registriert wird, nimmt daher mit der Zeit ab. Die Abnahme der Signalamplituden wird aus diesem Grund auch als „Freier Induktionsverfall“ (*free induction decay*, FID) bezeichnet. Detektiert wird folglich die transversale Magnetisierung, welche aus einer Überlagerung von Sinuskurven einer Kernsorte besteht. Durch die Fourier-Transformation (FT) wird dieses zeitabhängige Signal anschließend in eine Frequenzdomäne überführt, wodurch ein eindimensionales (1D) Spektrum entsteht.

Wie erwähnt entstehen die Signale im Spektrum durch die transversale Magnetisierung, die durch die Wechselwirkung der Spins bzw. Atomkerne innerhalb eines Moleküls gekennzeichnet wird. So werden Orbitale und Elektronen eines Atomkerns durch benachbarte Atome beeinflusst. Ziehen elektronegative Atome die Bindungselektronen der Nachbarn zu sich heran (negativer induktiver Effekt), werden diese Kerne entschirmt, d.h. sie sind stärker dem äußeren Magnetfeld ausgesetzt. Dagegen verstärken Atome mit einem positiven induktiven Effekt das lokale Magnetfeld ihrer Nachbarn und schirmen diese so ab. Dadurch entsteht für jeden Atomkern eine charakteristische Umgebung, ein charakteristisches lokales, effektives Magnetfeld ( $B_{\text{eff}}$ ). Dieses legt gemeinsam mit dem gyromagnetischen Verhältnis die Larmorfrequenz des entsprechenden Kerns fest. Die Frequenzen der einzelnen Kerne werden in ppm (*parts per million*) angegeben, die sich aus dem Quotienten aus der Differenz der Resonanzfrequenz und Trägerfrequenz ( $\omega - \omega_0$ ) und der Trägerfrequenz ( $\delta_{\text{ppm}} = (\omega - \omega_0) / \omega_0$ ) ergeben. Die Frequenzen einer Kernsorte liegen im Bereich weniger ppm. Proteine besitzen eine Vielzahl ähnlicher Kerne. Dies führt häufig zu starken Signalüberlagerungen in 1D-Spektren. Durch die Einführung einer zweiten Dimension ist es möglich, dies zu vermindern.

### 1.3.1.1 Mehrdimensionale Spektren

Durch die Einführung einer weiteren Dimension in NMR-Spektren ist es möglich geworden 1D-Spektren zu entzerren, und so diese Technik für die Proteinbiochemie zugänglich zu machen. Wie in Abbildung 1.7A dargestellt besteht ein 1D-Spektrum aus der Präparation und der Detektion. Im einfachsten Fall besteht die Präparationsphase aus der Einstrahlung eines einzigen Radiofrequenzpulses. Anschließend erfolgt in der Detektionsphase die Aufnahme des FID ( $t_1$ -Zeit). Die Einführung einer Evolutions- und Mischzeit zwischen Präparations- und Detektionszeit ist die Grundlage der 2D-Spektren (Abbildung 1.7B).



**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung eines 1D- und eines 2D NMR-Experimentes.** A: Ein 1D-Experiment besteht aus den Phasen der Präparation und der Detektion. Der  $90^\circ$  Puls wird durch einen Balken dargestellt. B: Die Einführung der Evolutions- und Mischzeit ermöglicht die Aufnahme von 2D-Spektren. C: Schematische Darstellung eines 2D homonuklearen Höhenliniendiagramms. Kern „A“ und „B“ koppeln miteinander, dies resultiert in den, mit „x“ markierten Kreuzsignalen.

Während der Evolutionszeit ( $t_1$ -Zeit) präzedieren die Kerne entsprechend ihrer Larmorfrequenz frei in der  $xy$ -Ebene. Anschließend erfolgt eine Mischsequenz, die je nach Art der Spektren aus unterschiedlichen Pulsen und Wartezeiten bestehen kann. Erst nach der Mischsequenz erfolgt die Detektionsphase ( $t_2$ -Zeit). Durch Variation, d.h. Zunahme der Evolutionszeit ( $t_1$ -Zeit) um einen festen Betrag, erfolgt die Mischsequenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Spinevolution in  $t_1$ , wobei jeweils die Magnetisierung vom ersten Kern ( $t_1$ ) auf einen zweiten Kern ( $t_2$ ) übertragen wird. Dadurch wird die  $t_2$ -Zeit entsprechend der zunehmenden Evolution in  $t_1$  moduliert. Mittels FT der  $t_2$ -Richtung wird ein 1D-Spektrum erhalten, durch eine zweite FT in Richtung  $t_1$  entsteht das 2D-Spektrum. Dies wird üblicherweise als Höhenliniendiagramm dargestellt.

Entlang der  $x$ - und  $y$ -Achse eines Quadrates befinden sich die 1D-Spektren, der  $t_2$ - und  $t_1$ -Richtung, die nun über die Fläche des Quadrates separiert werden. Die Signale erscheinen als Höhenlinien ähnlich einer Kreisform und werden auch als „*Peaks*“ bezeichnet. Sind der erste und der zweite Kern gleich, z.B.  $^1\text{H}$ , so entstehen homonukleare Spektren. Unterscheiden sich die Kerne, z.B.  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  so werden diese Spektren als heteronuklear bezeichnet. Durch die Einführung einer weiteren Mischzeit entstehen 3D-Spektren. Hier sind die Signale nicht mehr auf einer Fläche, sondern auf einem Quader verteilt und weiter separiert.

Zur Übertragung der Magnetisierung von Kern1 auf Kern2, während der Mischzeiten, werden zwei Mechanismen verwendet, die skalare Kopplung und die dipolare Kopplung. Bei der skalaren Kopplung verläuft der Transfer direkt über die chemischen Bindungen in einem



Molekül, während die Übertragung mittels dipolarer Kopplung über den Raum erfolgt. Durch die Ausnutzung letzterer Kopplung ist es möglich die räumliche Struktur von Molekülen zu ermitteln<sup>48</sup>.

#### 1.4 Ziel der Arbeit

Eine Reihe von inflammatorischen Erkrankungen ist mit einem Ungleichgewicht der IL-15/IL-15R $\alpha$  Expression verbunden. Während im gesunden Organismus IL-15 nur schwer in biologischen Flüssigkeiten nachzuweisen ist, ändert sich dies in der Pathogenese dieser Krankheiten<sup>28, 34</sup>. Da IL-15 in der frühesten Induktionsphase der Immunantwort, sowie in dem weiteren Fortschreiten der Entzündungen eine erhebliche proinflammatorische Rolle spielt, ist die Entwicklung IL-15 neutralisierender Moleküle, wie der lösliche IL-15R $\alpha$  ein vielversprechender Ansatz diesen pathogenen Entzündungen Einhalt zu gewähren. Dabei erfordert ein rationales Design eines antagonistischen Moleküls die Kenntnis der Bindungsflächen und des Interaktionsmodus des Zielproteins, hier IL-15, und seines Rezeptors. Die Kenntnis der Struktur der Bindedomäne des IL-15R $\alpha$ , der Sushi-Domäne, und einem Interaktionsmodell des Komplexes kann hierzu als Basis dienen. Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  rekombinat herzustellen und ihre Struktur mittels multidimensionaler NMR-Spektroskopie aufzuklären.

## 2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien waren in pro Analysequalität und von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München). Kits wurden von der Firma Quiagen (Hilden) und Enzyme sowie dNTPs wurden, wenn nicht anders erwähnt, von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Die Handhabung der Kits und Enzyme entsprach den Angaben der Hersteller. Für enzymatische Reaktionen und Kits wurden jeweils die mitgelieferten Puffer verwendet. Die übrigen Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt und sind in Anhang I aufgeführt.

### 2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Es wurden folgende *Escherichia (E.) coli* Stämme (Tabelle 2.1) und Plasmide (Tabelle 2.2) verwendet:

**Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme.**

Bakterienstämme	Verwendung
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (Invitrogen)	Klonierung
<i>E. coli</i> SG13009 [pREP4] (Quiagene)	Proteinexpression

**Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren.** Ptac, ein Hybrid-Promotor aus Tryptophan-Synthetase- und  $\beta$ -Galactosidasepromotor; GST, Expressionskassette der Glutathion-S-Transferase; MCS, multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*); Amp<sup>r</sup>, Ampicillin-Resistenz-Gen ( $\beta$ -Lactamase); lacI, kodierender Bereich des lac-Repressors; PT5, T5-Promotor; lac O, Lac-Operon; RBS, Ribosomen-Bindungsstelle; His-Tag, 6\*His-tag kodierender Bereich; ori, *Origin of Replication*; Kana<sup>r</sup>, Kanamycin-Resistenz-Gen.

Plasmide	Charakteristika	Referenzen
pGEX-2T	Ptac, GST, MCS, Amp <sup>r</sup> , lacI, ori pBR322	Amersham Bioscience
pQE 30	PT5, lac O, RBS, His-Tag, MCS, ori Col E1, Amp <sup>r</sup>	Quiagen
pREP4	lac I, Kana <sup>r</sup> , p15A ori	Quiagen

### 2.2 Anzucht und Selektion der Bakterien

Zur Anzucht und Selektion der *E. coli* Stämme wurden, wenn nicht anders erwähnt, Luria Broth Base Medium, Miller (LB; Qbiogene, Heidelberg) und Luria Broth Agar (1,2%) verwendet. Diese wurden für 20 Minuten bei 121°C und 1 bar sterilisiert. Zur Selektion der Bakterien wurden die in Tabelle 2.3 angegebenen sterilfiltrierten Antibiotika zugegeben.

**Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika.**

Antibiotikum	Verwendete Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	50 mg/ ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ ml
Kanamycin	30 mg/ ml in H <sub>2</sub> O	30 µg/ ml

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden, wenn nicht anders erwähnt, nach den Standardprotokollen von Sambrook *et al.*<sup>51</sup> und Ausubel *et al.*<sup>52</sup> durchgeführt.

### 2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zu präparativen und analytischen Zwecken verwendet. Die Reaktionsansätze hatten generell ein Volumen von 50 µl. Die im Anhang II angegebenen Primer wurden von der Firma MWG (Martinsried) erhalten und auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt.

#### 2.3.1.1 Präparative PCR

Zur präparativen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts wurde der in Tabelle 2.4 angegebene Reaktionsansatz mit der PLATINIUM®Pfx-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) und das in Tabelle 2.5 aufgeführte Temperaturprogramm verwendet.

**Tabelle 2.4: Verwendeter 50 µl Ansatz der präparativen PCR.**

5 µl	Puffer
1,5 µl	dNTPs (je 10mM)
1 µl	Template (1pg-1µg)
0,5 µl	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (100 mM)
2,5 µl	5' Primer (10 pmol)
2,5 µl	3' Primer (10 pmol)
3 µl	Enhancer
34 µl	dest. Wasser
1 µl	Pfx-Polymerase

**Tabelle 2.5: Temperaturprogramm der präparativen PCR.**

Vorgang	Temperatur	Zeit (sec)	Cyklen
Initiale Denaturierung	94°C	300	
Denaturierung	94°C	30	26x
Annealing	58°C	60	
Extension	68°C	30	
Abschließende Extension	68°C	600	
Kühlung	4°C	∞	

### 2.3.1.2 Analytische PCR

Die Kolonien transformierter Bakterien wurden von Ligationsplatten in PCR-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde der in Tabelle 2.6 aufgeführte Reaktionsansatz hinzugefügt und das in Tabelle 2.5 angegebene Temperaturprogramm, mit einer Denaturierungstemperatur von 95°C und einer Extensionstemperatur von 72°C, durchgeführt.

**Tabelle 2.6: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes einer präparativen PCR.**

5µl	Puffer
1µl	dNTPs (je 10 mM)
3µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM Endkonz. 1,5 mM)
1,5µl	5' Primer (10 pmol)
1,5µl	3' Primer (10 pmol)
37,5µl	dest. Wasser
0,5 µl	Taq-Polymerase

### 2.3.2 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung der DNA erfolgte mittels Typ-II Restriktionsendonucleasen. Ein typischer präparativer Ansatz von 30 µl setzte sich wie folgend zusammen:

**Tabelle 2.7: Typischer Ansatz eines Restriktionsverdaus.**

22 µl	DNA (aus Miniprep)
6 µl	Puffer
1 µl	BamHI
1 µl	NcoI

### 2.3.3 Isolierung und Reinigung von DNA- Fragmenten

Zur Auftrennung der DNA-Fragmenten wurde das „Sub-Cell<sup>®</sup>GT, Agarose Gel Elektrophorese System“ verwendet (BIO-RAD, München). Dabei erfolgte die Auftrennung in 1,5%igen Agarosegelen bei 100 Volt. Als Laufmittel diente TE-Puffer. Die DNA-Molekulargewichtsmarker XIII und X (Roche, Mannheim) wurden als Standards verwendet. Zur Isolierung der erwünschten DNA-Fragmente wurden die entsprechenden Banden des Gels ausgeschnitten und die DNA-Fragmente mit dem „QIAquick<sup>™</sup> Gelextraktions Kit“ gereinigt.

### 2.3.4 Isolierung von Plasmiden

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 4 ml-Übernachtskulturen mittels des „QIAquick<sup>™</sup> Miniprep Kits“.

### 2.3.5 Ligation

Bei der Ligation wurde ein Insert zu Vektor Verhältnis von 4 zu 1 gewählt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 17°C inkubiert. Entsprechend der Angaben des Herstellers setzte sich ein 20 µl Ansatz wie folgend zusammen:

**Tabelle 2.8: Beispiel eines 20 µl Ligationsansatzes.**

1 µl	T4-Ligase
2 µl	Puffer
4 µl	Insert
2 µl	Vektor
11µl	dest. Wasser

### 2.3.6 Transformation des *E. coli* Stammes DH5α

Die chemisch kompetente DH5α-Zellen wurden bei –80°C gelagert und für die Transformation auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl der kompetenten Bakterien wurden 5 µl eines Ligationsansatzes gegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1,5 Minuten auf 42°C erhitzt, 400µl 37°C warmes LB-Medium zugeben und für 1 Stunde bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute (rpm) inkubiert. Nach Zentrifugation (5 Minuten bei 1301 g,

„Zentrifuge 5417R“, Eppendorf, Hamburg) wurden 400 µl des Überstandes abgenommen und die Bakterien in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Je 1/10 bzw. 9/10 der transformierten Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und übernacht bei 37°C inkubiert.

### 2.3.7 Transformation des *E. coli* Stammes SG13009

Zur Transformation des *E. coli* Stammes SG13009 wurde die „schnelle Transformationsmethode“ verwendet<sup>53</sup>. Dabei wurden 2-3 Kolonien von einer frisch ausgestrichenen LB-Agar-Platte in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 200 µl Transformationspuffer zugegeben und vorsichtig resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wurden bis zu 20 µl DNA (10-200 ng) zugegeben und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1,5 Minuten. Die transformierten Bakterien wurden, wie oben, auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und übernacht bei 37°C inkubiert.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Expression rekombinanter Proteine

Die Expression des rekombinaten Proteins erfolgte mittels des T5-Expressionssystems von Quiagen (Hilden).

#### 2.4.1.1 Expression in LB-Medium

Zur Expression des rekombinaten Proteins wurden *E. coli* SG13009 mit pQE30 Vektor, welcher das gewünschte Insert enthielt, transformiert. Anschließend wurde ein Klon in 4 ml LB-Medium (100 µl/ml Ampicillin, 30 µg/ml Kanamycin) inokuliert und für 6 Stunden bei 37°C und 180 rpm bebrütet. 50 µl dieser Bakterienkultur wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane, welche 50 ml LB-Medium (100 µl/ml Ampicillin, 30 µg/ml Kanamycin) enthielten, überführt und übernacht bei gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde mit 4 ml der Übernachtskultur 350 ml LB-Medium (100 µl/ml Ampicillin, 30 µg/ml Kanamycin, 1 L Erlenmeyerkolben mit Schikane) inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1, bei gleichen Bedingungen, bebrütet. Daraufhin erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid). Nach einer Expressionszeit von 3 Stunden wurden die Kulturen auf 4°C gekühlt.

### 2.4.1.2 Expression im Minimalmedium

Zur Expression des rekombinaten Proteins in Minimalmedium (Anhang I) wurden beide Vorkulturen in Minimalmedium mit 100 µl/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin für 24 Stunden bei 37°C und 180 rpm bebrütet. Die Proteinexpression erfolgte in Minimalmedium mit 50 µl/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin, wobei die Induktion bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 durch die Zugabe von 1 mM IPTG erfolgte. Die Expressionszeit betrug 4 Stunden. Das zur <sup>15</sup>N- bzw. <sup>13</sup>C-Markierung verwendete <sup>15</sup>N-Ammoniumsulfat und die α-D-Glucose<sup>13</sup>C<sub>6</sub> wurden von der Firma *Campro Scientific* (Berlin) erhalten.

### 2.4.2 Proteinisolierung und Reinigung der Einschlusskörper

Nach der Proteinexpression wurden die Bakterien für 15 Minuten bei 10,816g (Sorvall PC-5B, Sorval, Hanau) und 4°C sedimentiert und der Überstand verworfen. Für den Aufschluss der Bakterien wurde das Pellet im Resuspensionspuffer resuspendiert und ultraschallbehandelt (4\*je 1 Minute mit einer *power* etwa 30 % und 6 Zyklen; Sonopuls HD2200, Bandelin electronic GmbH, Berlin). Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 10,816g (Sorvall PC-5B, Sorval, Hanau) und 4°C, sedimentiert. Die erhaltenen Einschlusskörperchen wurden durch Wiederholung des Ultraschalls- und Zentrifugationsvorgangs gereinigt. Dies erfolgte dreimal in Waschpuffer mit 0,5 % Tween-20 und dreimal mit Waschpuffer ohne Tween-20. Die Einschlusskörper wurden im Renaturierungspuffer, welcher zusätzlich 6 M Guanidinhydrochlorid und 1 mM Dithiothreitol enthielt, gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation (20 Minuten bei 17949 g „Zentrifuge 5417R“, Eppendorf, Hamburg) abgetrennt.

### 2.4.3 Proteinreinigung und -renaturierung

Die Renaturierung und Reinigung erfolgte mit Hilfe eines N-terminalen His-Tags bei Raumtemperatur. Dafür wurde eine Nickel-Agarose-Säule mit einem Volumen von 1 ml (Quiagen, Hilden) mit Renaturierungspuffer, welcher 6 M Guanidinhydrochlorid und ein Redoxsystem, aus 1 mM reduzierten- und 0.2 mM oxidierten Glutathion, enthielt, equilibriert. Das gelöste Protein wurde auf die Säule gegeben und dabei an die Nickel-Agarose gebunden. Zur Beseitigung der unspezifisch haftenden Proteine wurde die Säule mit 20 – 30 ml des obigen Puffers gewaschen. Die Renaturierung des Proteins erfolgte durch einen schrittweisen Gradienten von 6-0 M Guanidinhydrochlorid, mit einem Volumen von jeweils 18 ml pro Mol im

Renaturierungspuffer mit Redoxsystem. Die Elution des renaturierten Proteins erfolgte durch einen Zusatz von 250 mM Imidazol zum Renaturierungspuffer<sup>54</sup>.

#### 2.4.4 Pufferaustausch von Proteinlösungen

Der Pufferaustausch von Proteinlösungen erfolgte mittels NAP-Säulen entsprechend der Angaben des Herstellers (Amersham-Bioscience, Freiburg).

#### 2.4.5 Konzentration von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung der Proteinlösungen wurde für größere Volumen (bis 4 ml) Ultrafiltrationsrührzelle mit einem Volumen von 10 ml verwendet (Millipore, Eschborn). Zur weiteren Aufkonzentrierung wurden VIVAspin 500 Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa verwendet (Vivascience, Hannover).

#### 2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels der diskontinuierlichen Elektrophorese<sup>55</sup> unter Verwendung des „Mini-Protean Electrophorese System“ (BIO-RAD, München) bei 200 Volt und maximal 100 Milliampère. Die Proben wurden mit 2fach konzentrierten, reduzierenden Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „Mark12™ Unstained Standard“- (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Anfärbung der Proteine erfolgte durch Coomassie-Blau-Färbung.

#### 2.4.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes mittels Photometrie:

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

$c_m$ : Massenkonzentration

$E_{280}$ : Extinktion bei 280 nm

$M_r$ : Molekularmasse in g/mol

$d$ : Schichtdicke in cm

$\epsilon_{280}$ : molarer Extinktionskoeffizient



Dabei wurde ein UV-Spektrum von 240-320 nm in einem Zweistrahlenspektrophotometer (U-2001, Hitachi Instruments, Tokyo, Japan) gegen den jeweiligen Puffer als Referenz gemessen. Aus der durch das Lambert-Beerschen Gesetz bestimmten Massenkonzentration lässt sich durch Division mit der Molekularmasse ( $M_r$ ) die molare Konzentration errechnen. Der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{280}$ ) der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  beträgt  $15460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  <sup>56</sup> und die Molekularmasse  $9074.79 \text{ g/mol}$ .

#### 2.4.8 Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes des Proteins wurde die Größenausschlusschromatographie verwendet. Dazu wurde eine Superdex<sup>TM</sup> 75 16/60 Chromatographiesäule (Amersham-Bioscience, Freiburg) auf einem Äkta FPLC-System (Amersham-Bioscience, Freiburg) eingesetzt. Die Kalibrierung der Chromatographiesäule mit dem *LMW Calibrations Kit* (Amersham-Bioscience, Freiburg) erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend.

#### 2.5 Circularer Dichroismus (CD)

Die CD-Spektroskopie ermöglicht eine schnelle Bestimmung des Faltungszustandes eines Proteins. Weiterhin kann mit Hilfe einer temperierten Küvettenhalterung die Temperaturstabilität eines Proteins durch eine schrittweise Temperaturerhöhung ermittelt werden. Die Messung erfolgte mit einem Jasco J-720-Spektrometer (Jasco, Tokyo, Japan) mit einer spektralen Bandbreite von 2,0 nm. Verwendet wurden Küvetten aus Quarzglas mit unterschiedlichen Schichtdicken (Hellma GmbH, Müllheim). Zunächst wurde die zu analysierende Proteinlösung gemessen, anschließend in der gleichen Küvette, der Puffer in welchem sich das Protein befand. Letzteres Spektrum wurde von dem Spektrum der Proteinlösung subtrahiert, so dass das eigentliche CD-Spektrum erhalten wurde.

Die Aufnahme der Schmelzkurve erfolgte in einem Temperaturbereich von 22°C bis 96°C. Dabei wurde die Temperatur um 1°C pro Minute erhöht und das Signal bei 230 nm, detektiert. Die Kalibrierung des CD-Spektrometers erfolgte nach Chen und Yang <sup>57</sup>. Die gemessene Elliptizität  $\Theta_\lambda$  wurde auf die mittlere Molmasse der Aminosäurereste des

Proteins und die Schichtdicke der Probenlösung sowie ihre Konzentration bezogen:

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

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

Dabei beträgt die mittlere Molekularmasse der Aminosäurereste der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  113,459 g/mol.

## 2.6 NMR-Spektroskopie

### 2.6.1 Probenvorbereitung

Die zu messende Probe wurde mittels Pufferaustausch mit 7 % D<sub>2</sub>O und 0.05 % Natriumazid versetzt. 270  $\mu$ l der Probe, mit einer Endkonzentration von etwa 1 mM, wurden in ein <sup>15</sup>NMR-SHIGEMI-Röhrchen (Shigemi Inc., Allison Park, USA) überführt.

**Tabelle 2.9: Durchgeführte NMR-Experimente.**

Experiment	<u>Komplexe Punkte der Datenmatrix (Kern)</u>			<u>Spektrale Breite (Hz)</u>			Mischzeit (msec)
	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	f <sub>1</sub>	f <sub>2</sub>	f <sub>3</sub>	
HNCA <sup>58-60</sup>	1024 ( <sup>1</sup> H)	45 ( <sup>13</sup> C)	60 ( <sup>15</sup> N)	8,389	4,167	3,846	-
H(CCO)NH <sup>61-66</sup>	1024 ( <sup>1</sup> H)	45 ( <sup>13</sup> C)	60 ( <sup>15</sup> N)	8,389	4,167	3,846	-
(H)C(CO)NH <sup>61-66</sup>	1024 ( <sup>1</sup> H)	45 ( <sup>13</sup> C)	60 ( <sup>15</sup> N)	8,389	1,923	1,0638	-
<sup>13</sup> C-editiertes TOCSY <sup>67-69</sup>	565 ( <sup>1</sup> H)	114 ( <sup>1</sup> H)	89 ( <sup>13</sup> C)	4,600	4,600	11,001	-
<sup>15</sup> N-editiertes TOCSY <sup>68, 69</sup>	448 ( <sup>1</sup> H)	128 ( <sup>1</sup> H)	32 ( <sup>15</sup> N)	3,600	5,500	1,700	-
<sup>15</sup> N-editiertes NOESY <sup>68, 69</sup>	512 ( <sup>1</sup> H)	128 ( <sup>1</sup> H)	32 ( <sup>15</sup> N)	4,200	7,400	1,800	100
<sup>13</sup> C-editiertes TOCSY <sup>67-69</sup>	565 ( <sup>1</sup> H)	104 ( <sup>1</sup> H)	88 ( <sup>13</sup> C)	4,600	4,600	11,001	-
<sup>13</sup> C-editiertes NOESY <sup>68, 69</sup>	1024 ( <sup>1</sup> H)	128 ( <sup>1</sup> H)	38 ( <sup>13</sup> C)	8,000	6,150	9,300	100
<sup>13</sup> C-editiertes NOESY <sub>D<sub>2</sub>O</sub> <sup>68, 69</sup>	1024 ( <sup>1</sup> H)	128 ( <sup>1</sup> H)	38 ( <sup>13</sup> C)	8,000	6,150	9,300	100
H(N)CO <sup>70</sup>	896 ( <sup>1</sup> H)	65 ( <sup>13</sup> C)	-	7,500	1,700	-	-
H(N)CO <sup>70</sup>	896 ( <sup>1</sup> H)	65 ( <sup>13</sup> C)	-	7,500	1,700	-	-
3D-HNCO <sup>58-60</sup>	1024 ( <sup>1</sup> H)	45 ( <sup>15</sup> N)	60 ( <sup>13</sup> C)	9,260	1,666	1,736	-

### 2.6.2 NMR-Experimente

Die NMR-Experimente (Tabelle 2.9) wurden bei einer Temperatur von 298 Kelvin auf einem DRX600 (Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten) und einem Varian INOVA (Palo Alto, USA) 600 MHz Spektrometer durchgeführt. Diese waren jeweils mit einer 5-mm z-Gradienten  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Probe, die für die  $^1\text{H}$ -Detektion optimiert war, ausgestattet. Die Spektren wurden mit dem NMRPipe-Programm <sup>71</sup> prozessiert und mit der NMRview Software <sup>72</sup> ausgewertet. Während die chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -Kerne auf TSP referenziert wurden, wurden die der  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne indirekt nach Markley *et al.* referenziert <sup>73</sup>.

### 2.6.3 Zuordnung der Resonanzfrequenzen

Die Zuordnung der Resonanzen des Proteinerückgrats- und der Seitenketten erfolgte von einer Reihe von 3D Tripel-Resonanz-Experimenten [HNCA, HNCO, (H)C(CO)NH, H(CCO)NH], sowie mit den  $^{15}\text{N}$ -editierten und  $^{13}\text{C}$ -editierten TOCSY- und NOESY -Experimenten.

### 2.6.4 Bestimmung der Wasserstoffbrücken

Einige der Wasserstoffbrücken konnten mit Hilfe von 2D-*long range*-HNCO-Experimenten <sup>70</sup> ermittelt werden. Diese Experimente wiesen während der  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Entkopplung eine lange  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -Defokussierung /Refokussierungsperiode auf <sup>74</sup>. Zusätzlich konnten weitere Hinweise auf Wasserstoffbrücken dem  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum, welches einen Wasser *flip-back*-Puls enthielt, entnommen werden. Dies ist möglich, da das Verhältnis der Intensitäten des Wasser und des korrespondierenden  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Diagonalpeaks ( $< 0.1$ ) in diesen Spektren ein Indikator für einen langsamen Austausch der Amidprotonen ist. Diese Amidgruppen sind somit potentielle Protonendonatoren in Wasserstoffbrücken. Die Identifikation der dazu gehörigen Protonenakzeptoren erfolgte nach den ersten Strukturberechnungen.

### 2.6.5 Strukturberechnung

Die Strukturberechnungen wurden mit der Dyana Software <sup>75</sup> durchgeführt. Sie basierte auf 1123 NOE (*nuclear overhauser effect*) Abständen, die aus den  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY-Spektren (Tabelle 2.9) ermittelt wurden. Dabei wurde 1,8 Å und 5,0 Å als untere bzw. obere Abstandsbegrenzung für alle NOE-Kreuzsignale angegeben. Die Wasserstoffbrücken wurden durch  $2 \cdot 10$  Abstandsbegrenzungen repräsentiert. Dabei stellten Abstände von 1,8-2,4 Å die

Begrenzungen zwischen Wasserstoff- und Sauerstoffatom, sowie 2,8-3,4 Å die zwischen Stickstoff- und Sauerstoffatom dar. Die Berücksichtigung der nicht durch die *2D-long range*-HNCO-Experimente ermittelten Wasserstoffbrücken erfolgte erst in der letzten Phase der Strukturberechnung. Die Abstände innerhalb der zwei Disulfidbrücken wurden mit 2.03–2.15, 3.03–3.13 und 2.97–4.49 Å für SG/SG, SG/CB and SG/CA bemessen und ebenfalls in die finale Strukturberechnung einbezogen. Dabei wurden 100 Strukturen berechnet, von denen 20 Strukturen, welche die geringste Zielfunktionen besaßen, ausgewählt wurden. Aus diesen Ensemble wurde eine mittlere Struktur berechnet, die anschließend mittels eines *steepest descent* Algorithmus, energieminiert wurde <sup>76</sup>.

Die chemischen Verschiebungen wurden in der *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB) unter der Zugangsnummer 6882 und die Koordinaten in der Protein Daten Bank (PDB) mit dem Zugangscode 2ERS hinterlegt.

### 2.6.6 Generation von Protein-Modellen und Superpositionierung

Die Generation von Protein-Modellen und Superpositionierung erfolgte mit dem Programm WHATIF <sup>77</sup>. Bei der Superposition wurden die korrespondierenden Bereiche homologer Proteine zur Deckung gebracht.

### 2.6.7 Berechnung der Lösungsmittelzugänglichkeit

Berechnung der Lösungsmittelzugänglichkeit erfolgte mit dem Programm WHATIF <sup>77</sup>. Die Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit durch die Komplexbildung von Ligand und Rezeptor erfolgte durch die Berechnung der Zugänglichkeiten der monomeren Moleküle bzw. der im Komplex befindlichen Moleküle. Die erhaltenen Werte wurden anschließend subtrahiert und die Differenz gegen die Aminosäurereste in einem Diagramm aufgetragen.

### 2.6.8 Graphischen Darstellungen

Für graphische Darstellungen der Molekülstrukturen wurden die Programme RIBBONS <sup>78</sup> und GRASP <sup>79</sup> verwendet.

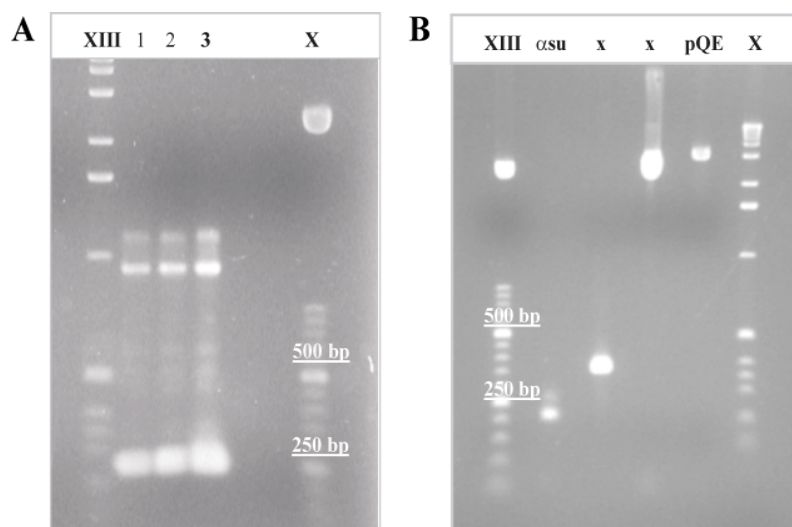
### 3 Durchführung & Ergebnisse

#### 3.1 Umklonierung der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$

Die für die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  codierende Sequenz befand sich in dem Vektor pGEX-2T, zwischen den Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI. Die cDNA umfasst, mit einer Größe von 198 bp, das gesamte Exon2 des IL-15R $\alpha$  und die ersten zwei Aminosäurereste die von Exon3 kodiert werden. Bei diesem Konstrukt handelt es sich um ein Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST), welche eine Größe von 26 kDa aufweist. Deswegen wurde die cDNA der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  in den Vektor pQE30 kloniert.

##### 3.1.1 Präparative Amplifikation

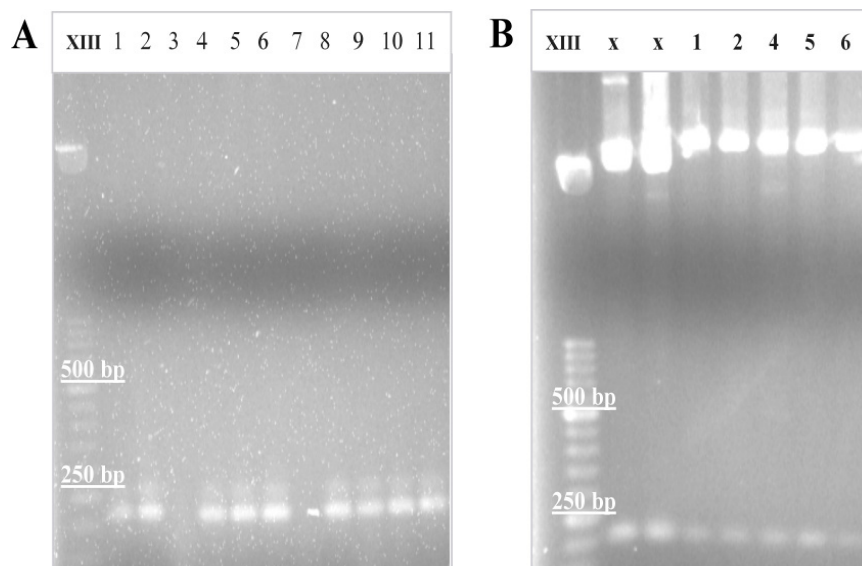
Die 3' Restriktionsstelle EcoRI des pGEX-2T-Vektors ist nicht mit der MCS von pQE30 kompatibel. Weil sich in dem Zielvektor (pQE30) die EcoRI-Restriktionsschnittstelle in der Ribosomenbindestelle und nicht in der MCS des Vektors befindet. Infolgedessen wurde als 3' Restriktionsschnittstelle HindIII gewählt. Diese Schnittstelle wurde durch den 3' Primer mittels präparativer PCR hinter dem Stopkodon der cDNA der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  angefügt. Der komplementäre Bereich des verwendeten 5' Primer befand sich innerhalb des pGEX-2T-Vektors, etwa 30 Nukleotide vor seiner BamHI Schnittstelle. Dadurch ergab sich für das amplifizierte Insert eine Größe von 265 bp (Abbildung 3.1 A).



**Abbildung 3.1: PCR- und Restriktionsfragmente der amplifizierten cDNA der Sushi-Domäne.** A: Produkte der präparativen PCR vor ihrer Reinigung. B: Analytisches Gel nach Reinigung und Restriktionsverdau des Inserts (235 bp) und des Vektors pQE30 (3,4 kbp). Mit „x“ sind für diese Arbeit unbedeutende Proben gekennzeichnet. XIII und X stehen für die verwendeten Marker.

### 3.1.2 Ligation und Transformation

Das amplifizierte Produkt, sowie der pQE30-Vektor wurden durch die Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII verdaut und anschließend gereinigt (Abbildung 3.1B). Danach erfolgte die Ligation von Vektor und Insert, sowie die Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Die Kontrolle der Ligation erfolgte zunächst mittels analytischer PCR, wobei ein anderer 5' Primer als in der präparativen PCR verwendet wurde. Es wurde so verfahren, weil ersterer Primer für den pGEX-2T-Vektor und nicht für die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  spezifisch ist (Abbildung 3.2A). Der in der analytischen PCR verwendete 5' Primer, ist dem 5' Ende der cDNA der Sushi-Domäne komplementär. Die als positiv selektierten Klone wurden anschließend durch Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen bestätigt (Abbildung 3.2B). Die korrekte Sequenz des Klons, welcher für die Proteinexpression verwendet wurde, wurde durch Sequenzierung bestätigt (SeqLab, Göttingen).

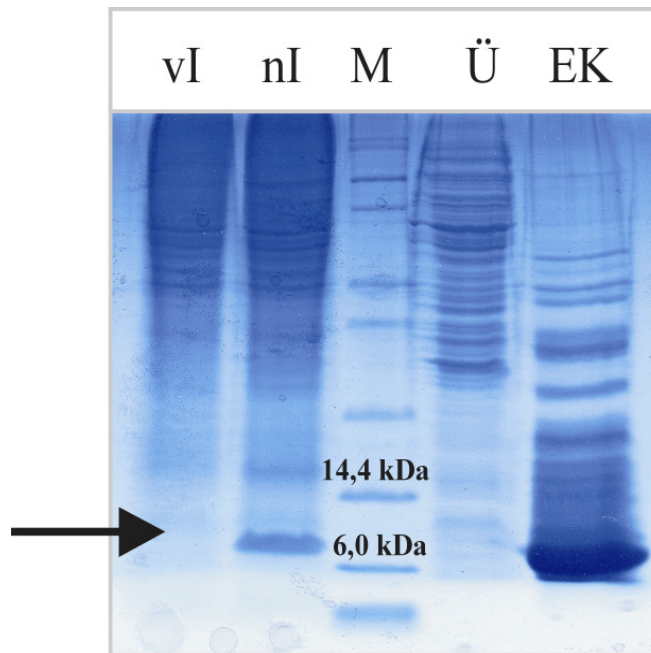


**Abbildung 3.2: Kontrolle der Ligation.**  
 A: Analytische PCR der transformierten Klone.  
 B: Restriktionsverdauung zur Kontrolle der Ligation. Mit „x“ sind für diese Arbeit unbedeutende Proben gekennzeichnet. XIII stehen für den verwendeten Marker. Die erhaltenen Klone wurden von 1 bis 11 nummeriert.

## 3.2 Expression und Renaturierung der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$

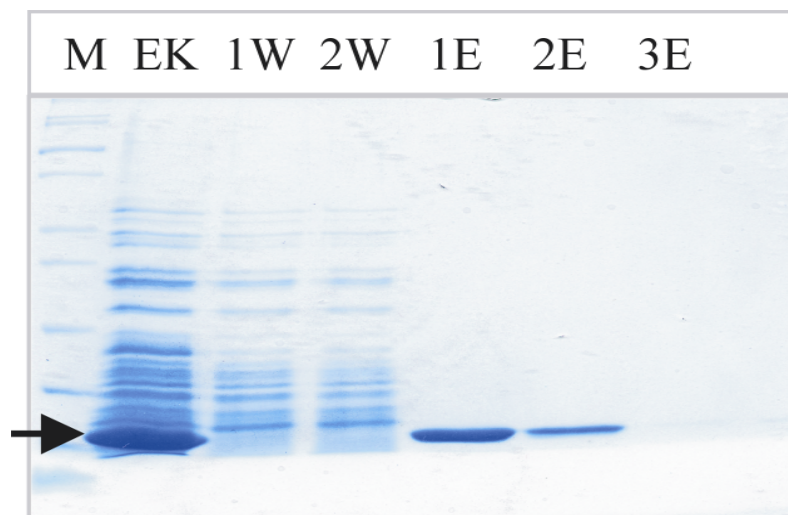
Die Expression der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  erfolgte mittels des T5-Expressionssystems von Qiagen (Hilden).

Dafür wurde der pQE30-Vektor, welcher die cDNA der Sushi-Domäne enthielt, in *E. coli* SG13009 transformiert. Die Expression erfolgte über 3 Stunden. Weil eine längere Expression keine höheren Ausbeuten des Proteins ergab. Wie aus Abbildung 3.3 ersichtlich wird, wurde das Protein mit einer Größe von 9,1 kDa in Einschlusskörpern exprimiert.



**Abbildung 3.3: Expression der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ .** Der Pfeil zeigt die Höhe der Bande des rekombinanten Proteins an. vI, vor Induktion der Proteinexpression; nI, 3 Stunden nach Induktion der Proteinexpression; M, Marker; Ü, Überstand nach Zentrifugation der, mittels Ultraschall, aufgeschlossenen Bakterien; EK, Einschlusskörper.

Das in Einschlusskörper auftretende Protein konnte unter denaturierenden Bedingungen an Nickel-Agarose gebunden und das unspezifisch haftende Protein durch Waschen entfernt werden. Anschließend erfolgte die Renaturierung des Proteins durch einen schrittweisen Gradienten von 6 M bis 0 M Guanidinhydrochlorid. Das saubere Protein wurde durch die Zugabe von 250 mM Imidazol in Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml eluiert.

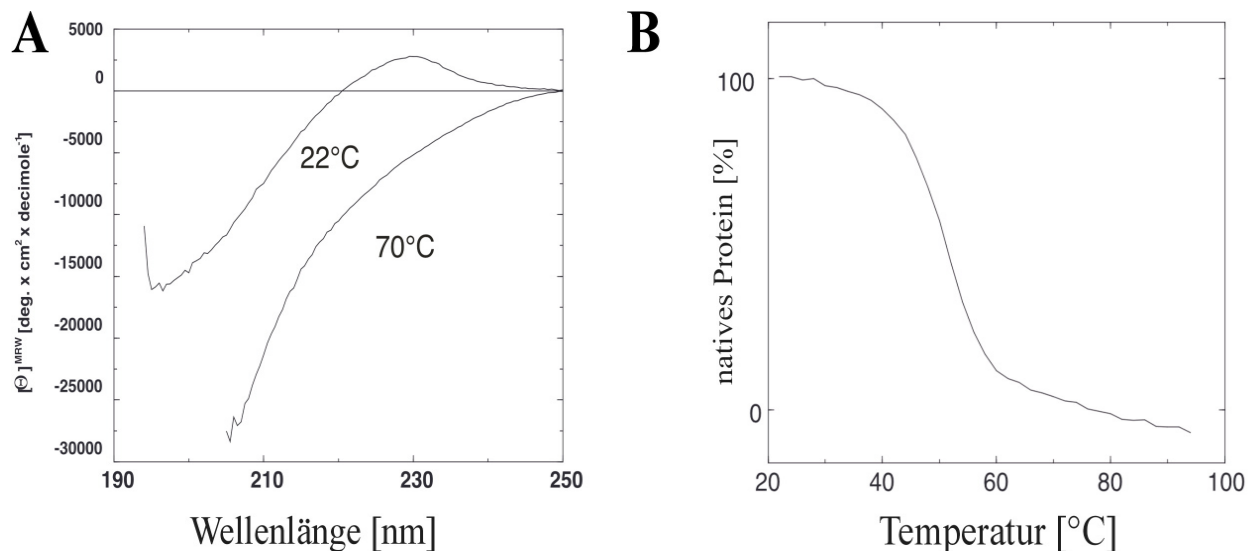


**Abbildung 3.4: Reinigung und Renaturierung der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ .** Die einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen hatten ein Volumen von 1 ml. M, Marker; EK, Einschlusskörper; W, Waschfraktion; E, Elutionsfraktion.

Nach der Reinigung und Renaturierung des Proteins wurde es in 20 mM Natriumphosphat, pH 7,4 und 150 mM Natriumchlorid umgepuffert und die Faltung mit Hilfe der CD-Spektroskopie überprüft.

### 3.2.1 Circularer Dichroismus (CD-Spektroskopie)

Das in Abbildung 3.5A dargestellte CD-Spektrum (22°C) zeigt einen repräsentativen Verlauf für die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ . Die Form des Spektrums, mit einem Maximum bei 230 nm, ist typisch für  $\beta$ -Faltblattproteine. Die in Abbildung 3.5B dargestellte Schmelzkurve zeigt die Temperaturstabilität des Proteins, wobei dieses bei 55°C zur Hälfte in denaturierter Form auftrat und bei 70°C vollständig ungefaltet vorlag (Abbildung 3.5A, 70°C).



**Abbildung 3.5: CD-spektrometrische Analysen der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ .**

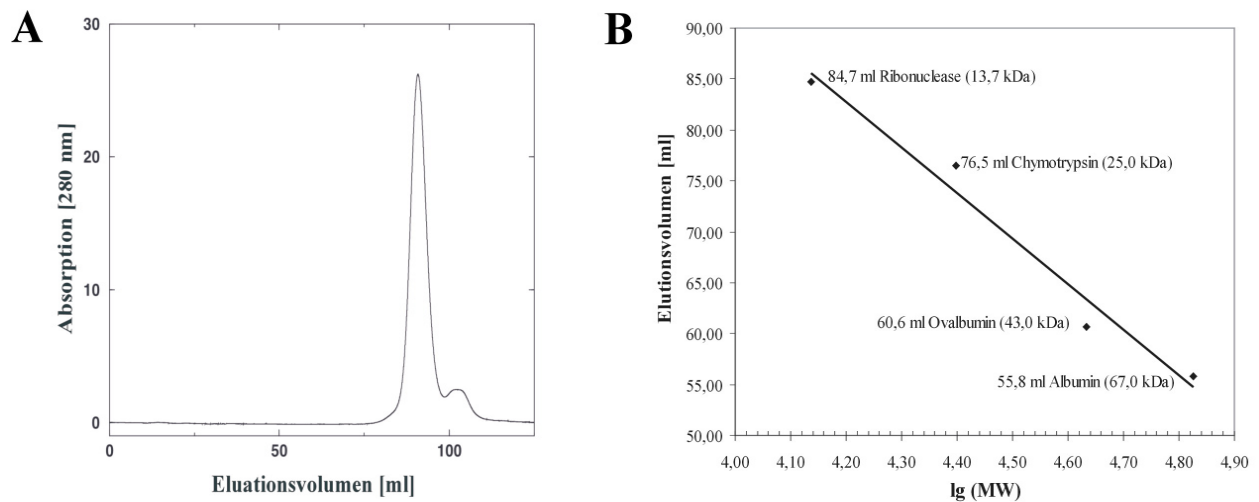
A: CD-Spektren des Proteins im nativen Zustand, bei 22°C, und im entfalteten Zustand bei 70°C. B: Temperaturstabilität der Sushi-Domäne. Die Elliptizität ( $\Theta_{230\text{nm}}$ ) bei 22°C wurde gleich 100% des nativen Zustand des Proteins gesetzt, die bei 96°C auf 0%.

### 3.2.2 Größenausschlusschromatographie

Für die NMR-Spektroskopie ist das Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins von entscheidender Bedeutung, da mit zunehmender Größe die Signalintensitäten abnehmen. Zusätzlich können durch Multimerisierung von Proteinen Resonanzen entstehen die nicht intramolekular, sondern intermolekularer Natur sind. Daher wurde der Oligomerisierungszustand der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie überprüft.

In Abbildung 3.6A ist ein Elutionsprofil der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  gezeigt. Dabei wurde das Protein bei einem Volumen von 92 ml eluiert. Dies entspricht einem Molekulargewicht von etwa 9,7 kDa. Da das berechnete Molekulargewicht des Proteins 9,1 kDa beträgt kann von einem monomeren Zustand ausgegangen werden.





**Abbildung 3.6: Elutionsprofil der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  und Kalibrierungskurve der Superdex 75 16/60.** A: Das Retentionsvolumen der Sushi-Domäne liegt bei 92 ml. B: Kalibrierung der verwendeten Chromatographiesäule mit dem *LMW-Calibrations Kit*. Aufgetragen wurde das Elutionsvolumen gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts. Durch die Ermittlung der linearen Regression wurde eine Ausgleichsgerade erhalten. Ihre Gleichung lautet  $f(x) = 40,1 x - 270$ , mit  $f(x)$  als Retentionsvolumen und  $x$  als dem dekadischen Logarithmus der Molekularmasse.

### 3.3 Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie

Nachdem das Protein in *E. coli* SG13009 exprimiert, renaturiert und in monomerer Form erhalten wurde, erfolgte die Darstellung von einfachem ( $^{15}\text{N}$ ) und doppelt ( $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ) markierten Protein in der gleichen Weise. Mit diesen Proteinen erfolgte die Aufnahme der NMR-Spektren.

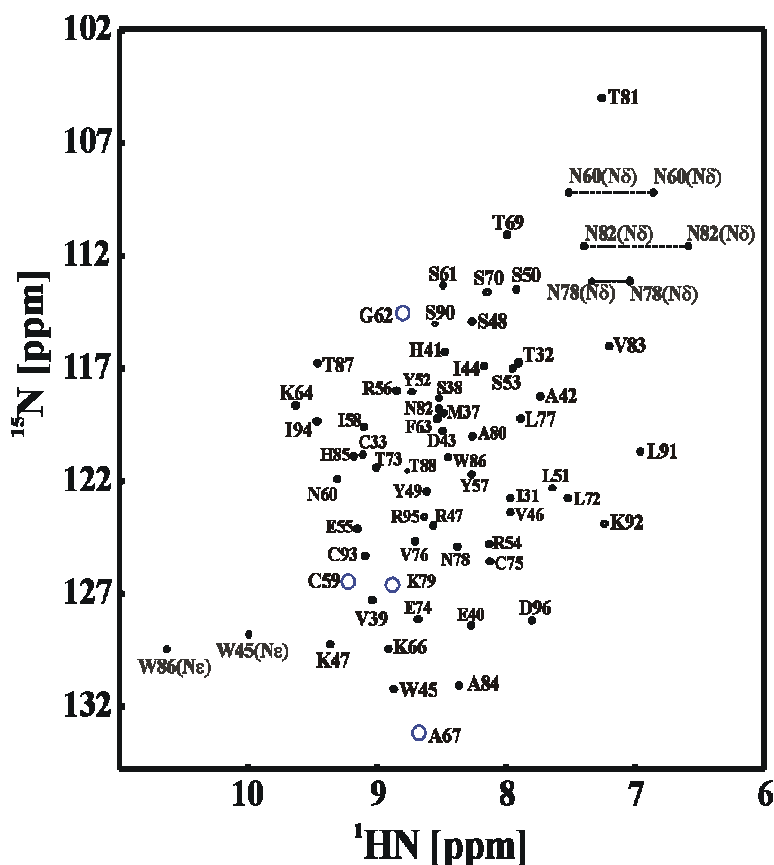
Zur Strukturaufklärung war es zunächst notwendig die gemessenen Frequenzen den Kernen der Aminosäurereste entsprechend der Primärstruktur zu zuordnen. Der N-terminale His-Tag, mit einer Länge von 12 Aminosäuren war durch seine hohe Flexibilität nicht in den  $^{15}\text{N}$ -editierten Spektren sichtbar. Demzufolge wurde dieser Bereich nicht in die Strukturaufklärung einbezogen. Daher umfasste das zu analysierende Protein 66 Aminosäurereste. Die Nomenklatur entsprach der Abfolge der natürlich vorkommenden Sequenz des Proteins, inklusive des ersten Exons. Dadurch ergab sich, dass die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  mit Rest 31 beginnt und mit Rest 96 endet.

#### 3.3.1 Sequentielle Zuordnung der Resonanzfrequenzen

Mit der  $^{15}\text{N}$ -markierten Probe wurde zunächst ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgenommen (Abbildung 3.7). In diesem Spektrum entsteht für jede Amidgruppe ein Signal, das sich aus den

Frequenzen des Amidstickstoffs ( $^{15}\text{N}$ ) und des dort gebundenen Amidprotons ( $^1\text{H}_\text{N}$ ) bildet. Daher treten in einem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum alle Aminosäurereste auf, die eine Amidgruppe enthalten, also alle außer Prolin. Zusätzlich sind die Amidgruppen der Glutamin- und Asparaginreste vertreten. Da dort zwei Protonen an einen Stickstoffatom gebunden sind, entstehen jeweils zwei Signale bei derselben Stickstofffrequenz aber unterschiedlicher Protonenfrequenz.

Das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  zeigt eine gute Dispersion der Signale (Abbildung 3.7) Dies ist eine weitere Bestätigung für die erfolgreiche Renaturierung des Proteins. Die drei Amidgruppen der Asparaginreste des Proteins sind leicht zu identifizieren und in Abbildung 3.7 jeweils durch eine gestrichelte Linie verbunden.

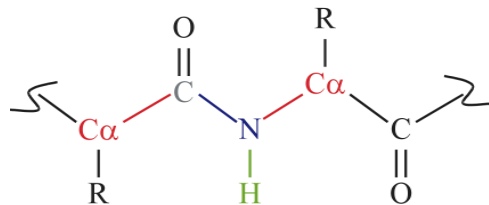


**Abbildung 3.7:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ . Die Resonanzen der AS sind im Einbuchstabencode angegeben. Aufgrund der geringen Intensitäten der Kreuzsignale von Cys59, Gly62, Ala67 und Lys79 sind diese hier nicht sichtbar und jeweils mit einem Kreis markiert.

Bei der folgenden sequentiellen Zuordnung, d.h. bei der Zuordnung der Resonanzen zu den jeweiligen Aminosäureresten, dient das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum als „Basis“, da dort jeder Aminosäurerest, außer Prolin, durch ein Signal repräsentiert wird.

Für die sequentielle Zuordnung wurde eine Reihe von 3D-Tripelresonanzspektren aufgenommen. In diesen Experimenten erfolgt der Magnetisierungstransfer über die kovalenten Bindungen des Proteins. Die Nomenklatur dieser Spektren entspricht dem jeweiligen Kohärenztransfer. So erfolgt dieser Transfer im HNCA-Experiment vom Amidproton ( $^1\text{H}_\text{N}$ ) über

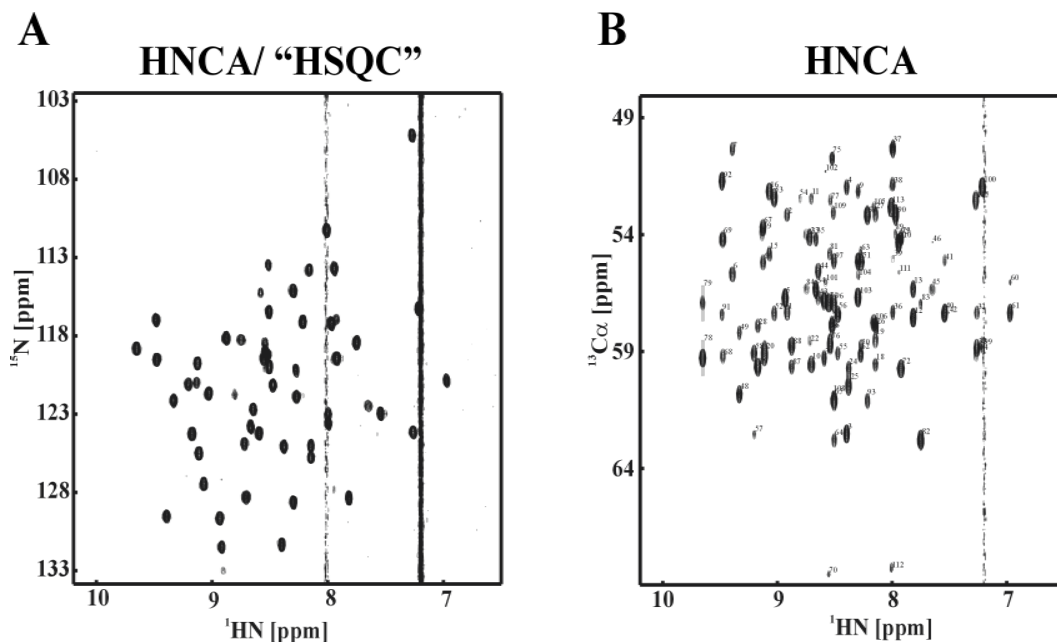
den Amidstickstoff ( $^{15}\text{N}$ ) zum eigenen alpha-Kohlenstoff ( $^{13}\text{C}_\alpha$ ) des Aminosäurerestes, sowie über den Carbonylkohlenstoff ( $^{13}\text{C}_\text{O}$ ) zum  $^{13}\text{C}_\alpha$  des in der Primärsequenz vorangehenden Aminosäurerestes (Abbildung 3.8). Üblicherweise werden diejenigen Kerne, welche am Kohärenztransfer beteiligt sind, jedoch nicht detektiert werden, in Klammern aufgeführt.



**Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der im HNCA korrelierten Kerne.** Der Kohärenztransfer im HNCA verläuft, ausgehend vom Amidproton, über das Amidstickstoff zum eigenen alpha-Kohlenstoff, sowie zu dem alpha-Kohlenstoff des vorangehenden Restes.

### 3.3.1.1 Das HNCA-Spektrum

Das HNCA-Spektrum ist für die sequentielle Zuordnung der Resonanzen sehr hilfreich. Es korreliert die Frequenzen einer Amidgruppe mit der Verschiebung des  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atoms des eigenen Restes und der des  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atoms des in der Primärsequenz vorhergehenden Restes (Abbildung 3.8).

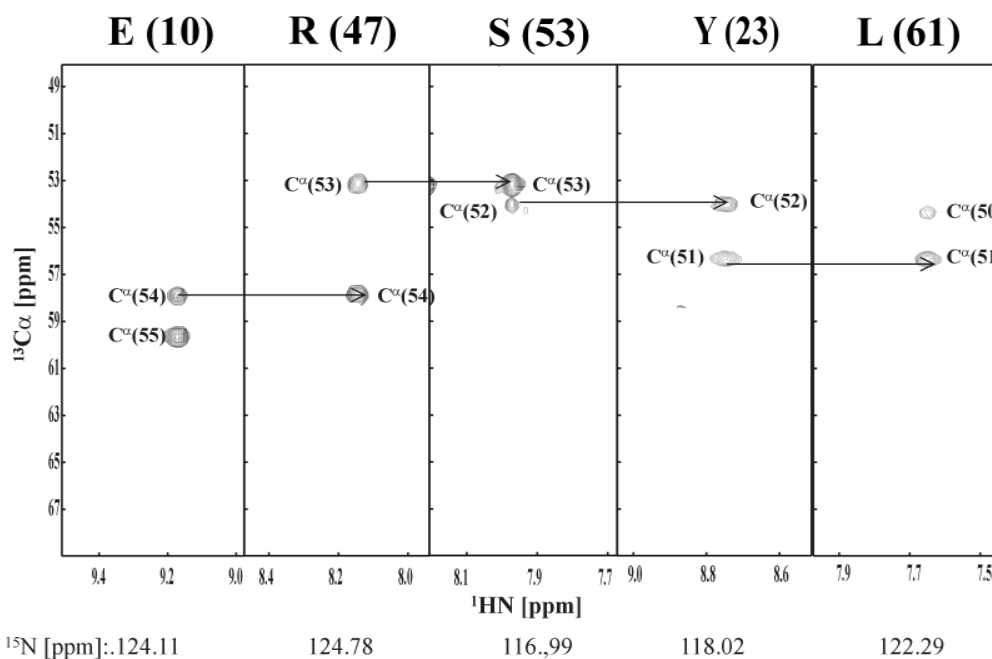


**Abbildung 3.9: Darstellung des HNCA-Spektrums der Sushi-Domäne des IL-15Rα in zwei unterschiedlichen Totalprojektionen.** A: Das Spektrum wurde entsprechend eines  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums projiziert. Unterschiede hinsichtlich des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums sind die fehlenden Signale der Amidgruppen der Asparaginreste, da diese nicht das entsprechende Verknüpfungsmuster mit  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Kernen aufweisen. B: Totalprojektion des HNCA-Spektrums, wobei die  $^{15}\text{N}$ -Frequenzen in einer Ebene abgebildet sind. Die zwei von den  $^1\text{H}_\text{N}$ -Frequenzen ausgehenden Signale der  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Frequenzen sind überwiegend gut erkennbar.

In Abbildung 3.9 sind zwei Totalprojektionen des 3D-HNCA-Spektrums der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  dargestellt. Das Aussehen des Spektrums in Abbildung 3.9A ähnelt dem des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC, da hier die Signale aus der dritten Dimension ( $^{13}\text{C}_\alpha$ ) in einer Ebene abgebildet sind und die Achsen dem des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC entsprechen. In Abbildung 3.9B hingegen ist die Aufspaltung der  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Frequenzen im HNCA erkennbar. Dort sind die  $^1\text{H}_\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Frequenzen auf den x- bzw. y-Achsen aufgetragen und die  $^{15}\text{N}$ -Frequenzen in diese Ebene projiziert.

Das HNCA-Spektrum ermöglicht einem Signal des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums die eigenen  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Frequenzen und die des vorangehenden Restes zuzuordnen. Letztere Verschiebung befindet sich auch auf der  $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ -Frequenz des zugehörigen Restes, wodurch dieser im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum identifiziert werden konnte (Abbildung 3.10). Das HNCA-Spektrum erlaubt es Nachbarn in der Primärsequenz zu identifizieren und den Resonanzen des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums zuzuordnen. Dadurch wurde die Abfolge der Primärsequenz erhalten.

Die Aussage, um welchen Aminosäurerest es sich handelt, konnte allein mit dem HNCA-Experiment nicht getroffen werden, da hierfür die chemischen Verschiebungen der Kerne in den Seitenketten benötigt werden. Diese Informationen wurden dem  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*), dem H(CCO)NH- und dem (H)C(CO)NH-Spektren entnommen.

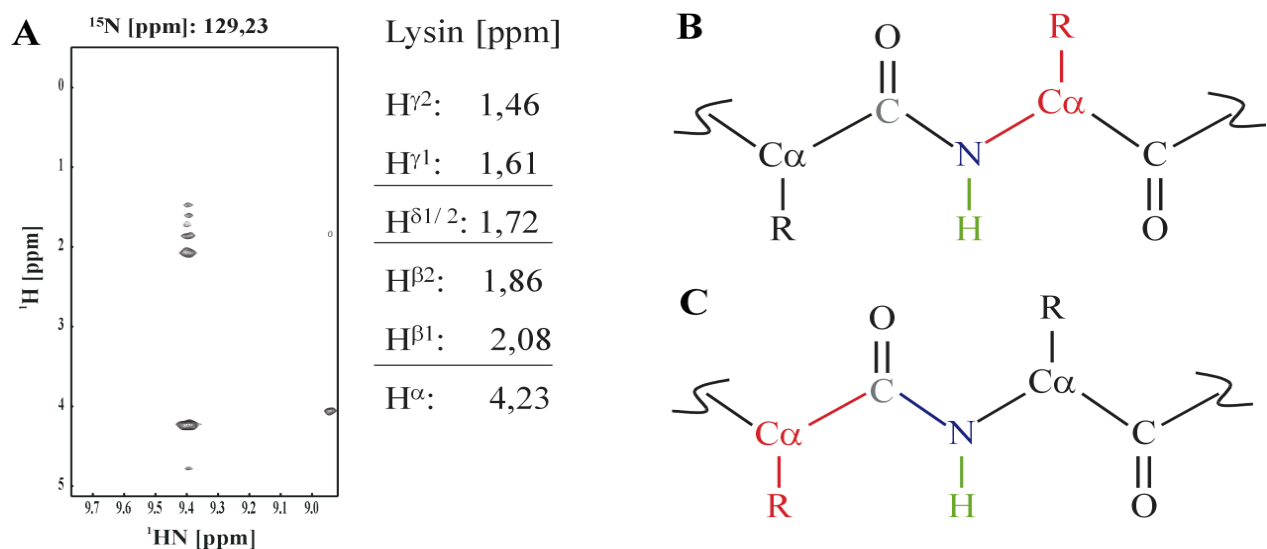


**Abbildung 3.10: Identifizierung benachbarter Aminosäurereste durch das HNCA-Spektrum.** Gezeigt sind Ausschnitte des HNCA-Spektrums in unterschiedlichen  $^{15}\text{N}$ -Ebenen. Sie repräsentieren eine Abfolge in der Primärstruktur benachbarter Aminosäurereste. Die in Klammern aufgeführten Nummern entsprechen den jeweiligen Signalen im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum.

### 3.3.1.2 Das $^{15}\text{N}$ -editierte TOCSY-Spektrum

Das  $^{15}\text{N}$ -editierte TOCSY-Spektrum korreliert die Protonen innerhalb eines Aminosäurerestes (Abbildung 3.11B). Ausgehend von einer gegebenen Amidfrequenz ( $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ ) werden die chemischen Verschiebungen der Protonen der eigenen Seitenkette über die dritte Dimension ( $^1\text{H}$ ) separiert.

Dabei zeigt jede Aminosäure ein charakteristisches Muster (Abbildung 3.11A). Dieses Muster erlaubt die Identifizierung einiger Aminosäurereste. Weitere Hilfen in der sequentiellen Zuordnung lieferten die H(CCO)NH- und (H)C(CO)NH-Spektren.



**Abbildung 3.11: Ausschnitt des  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-Spektrum und die schematische Darstellung des Magnetisierungstransfer im  $^{15}\text{N}$ -editiertem TOCSY- (B) und H(CCO)NH-Experiment (C).** A: Auf einer Frequenzebene von 129 ppm befinden sich die Signale eines Lysinrestes bei einer chemischen Verschiebung von 9,4 ppm des Amidprotons ( $^1\text{H}_\text{N}$ ). B: Der Kohärenztransfer im  $^{15}\text{N}$ -editierte TOCSY erfolgt über die Amidgruppe eines Restes zu den Protonen der eigenen Seitenkette. C: Demgegenüber wird im H(CCO)NH-Experiment die Seitenkette des in der Primärsequenz vorangehenden Nachbarn sichtbar. Weil hier der Transfer über den Carbonylkohlenstoff erfolgt.

### 3.3.1.3 H(CCO)NH & (H)C(CO)NH

Durch die H(CCO)NH- und (H)C(CO)NH-Experimente können vorangehende Seitenkette eines Aminosäurerestes identifiziert werden (Abbildung 3.11C). Im H(CCO)NH-Experiment werden die  $^1\text{H}$ -Frequenzen der Seitenkette des vorangehenden Restes auf die Amidfrequenz ( $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ ) des entsprechenden Restes übertragen. Das (H)C(CO)NH-Spektrum liefert ein ähnliches Resultat, nur dass hier die  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen der Nachbarseitenkette sichtbar werden. Die Kenntnis über die Protonen- und Kohlenstoffverschiebung der Seitenketten erlaubt die

Identifizierung des jeweiligen Amionsäurerestes. Weitere Hinweise ergaben sich aus der zuvor ermittelten Abfolge der Signale in der Primärsequenz. Dies erleichtert die Zuordnung besonders von ähnlichen Aminosäuren wie Leucin und Isoleucin.

Einige Bereiche der Primärsequenz, die nicht mittels der 3D-Tripelresonanzexperimente eindeutig identifiziert werden konnten, wurden mit Hilfe des  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Experimentes (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*) bestätigt.

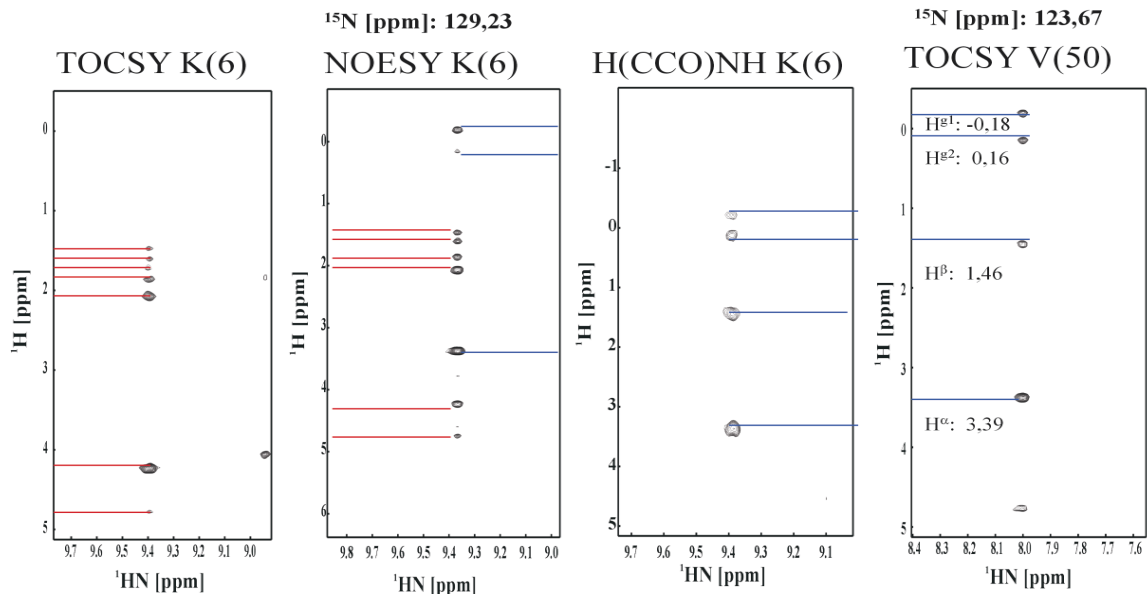
#### 3.3.1.4 Das $^{15}\text{N}$ -editierte NOESY-Spektrum

Ein  $^{15}\text{N}$ -editiertes NOESY-Experiment unterscheidet sich hinsichtlich der vorherigen Spektren durch die Art des Magnetisierungstransfers. Während in den zuvor erwähnten Spektren der Transfer über kovalente Bindungen des Proteins erfolgte, geschieht dies im NOESY-Experiment über den Raum. Dabei ist die Amplitude des Transfers, und damit die Signalintensität proportional zum Abstand der Kerne ( $I \propto r^{-6}$ ).

Daraus resultiert, dass Amidgruppen im  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Experiment Frequenzen zu den Protonen der eigenen Seitenkette (intraresidual) und zu denen des in der Primärsequenz vorangehenden Restes (sequentiell) aufweisen. Weiterhin entstehen Resonanzen die aus der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins resultieren. So können Kerne, die in der Primärsequenz weit auseinander liegen, durch die räumliche Anordnung innerhalb des Proteins in enger Nachbarschaft stehen und dadurch im NOESY-Experiment ein entsprechendes Signal erzeugen (interresidual).

Treten bei einer ausgewählten Amidfrequenz neben den eigenen Protonensignalen (entsprechend dem  $^{15}\text{N}$ -editiertem TOCSY-Experiment) die Frequenzen des potentiellen Nachbarn auf, kann dieser Rest als vorangehender Aminosäurerest identifiziert werden (Abbildung 3.12).

Abbildung 3.12 stellt ein Beispiel der sequentiellen Zuordnung dar. Der erste Ausschnitt des  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-Experimentes entspricht dem der Abbildung 3.11A und identifiziert diese Aminosäure als Lysin. In dem  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum befinden sich weitere Resonanzen, die nicht zu den intraresidualen Frequenzen gehören. Diese treten ebenfalls in dem entsprechenden Ausschnitt des H(CCO)NH-Experimentes auf. Dies bedeutet, dass die interresidualen Kreuzsignale im  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Experiment die Signale des vorangehenden Nachbarn darstellen. Dieses Muster lässt sich wiederum im  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-Spektrum bei einer Amidfrequenz ( $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ ) finden, welche dem Signal „50“ im HSQC entspricht.

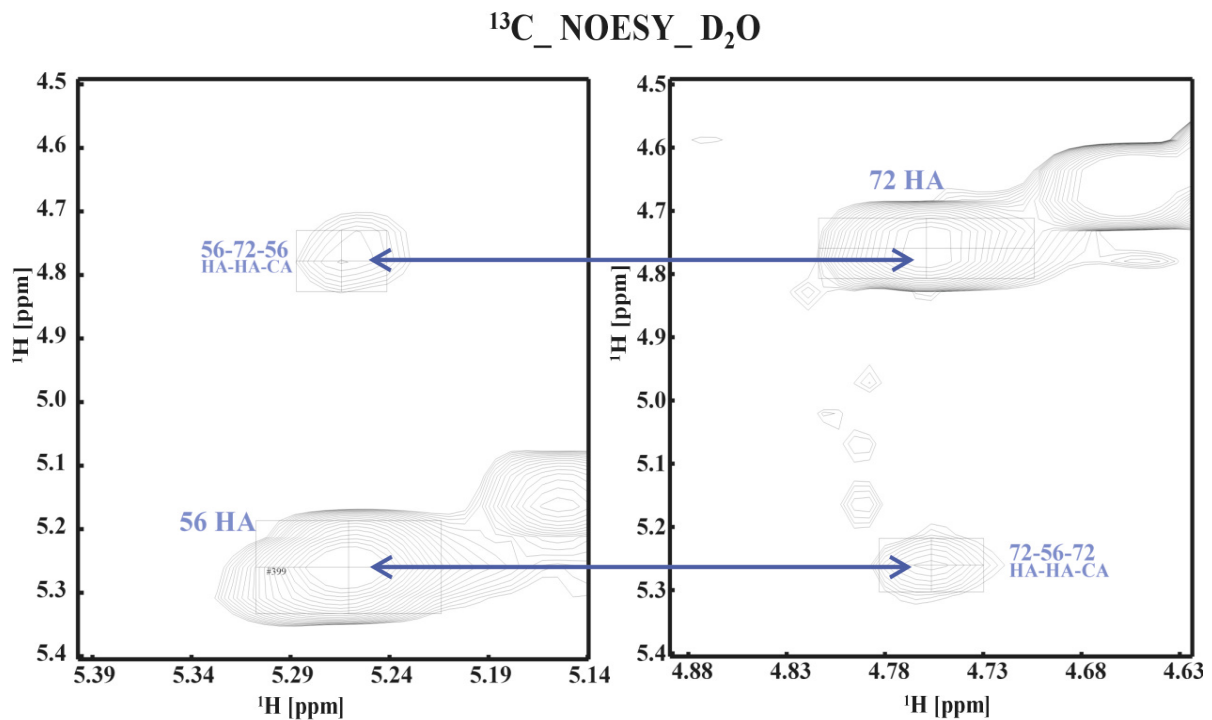


**Abbildung 3.12: Beispiel der sequentiellen Zuordnung eines Aminosäurerestes.** Das  $^{15}\text{N}$ -editierte NOESY-Experiment eines Lysinrestes (6) zeigt zusätzlich zu den intraresidualen Resonanzen interresiduale Signale, welche ebenfalls im entsprechenden Ausschnitt des H(CCO)NH-Spektrums erscheinen. Die gleichen chemischen Verschiebungen treten im  $^{15}\text{N}$ -editierten-TOCSY-Spektrum auf einer Amidfrequenz, welcher dem Signal „50“ im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum entspricht, auf. Dieser Rest konnte als Valin identifiziert werden.

Durch die Verwendung der bisher aufgeführten Spektren ließ sich ein Grossteil der Resonanzen zuordnen. Weiter vervollständigt wurde die Zuordnung durch die Verwendung des  $^{13}\text{C}$ -editierten TOCSY-Experimentes.

In den  $^{13}\text{C}$ -editierten Spektren werden die Protonensignale nicht mehr auf die Amidgruppen, sondern auf die Kohlenstofffrequenzen der Seitenketten eines Aminosäurerestes übertragen. Es entsteht ein 3D-Spektrum, welches in zwei Dimensionen die  $^1\text{H}$ -Frequenzen enthält und in der dritten Dimension durch die  $^{13}\text{C}$ -Frequenzen separiert wird. Dadurch können z.B. Prolinreste identifiziert werden.

Der nächste Schritt in der Strukturaufklärung der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  ist die Identifizierung von räumlichen Kontakten, welche durch die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins entstehen. Hierzu dient ein  $^{15}\text{N}$ -editiertes und zwei  $^{13}\text{C}$ -editierte NOESY-Experimente.

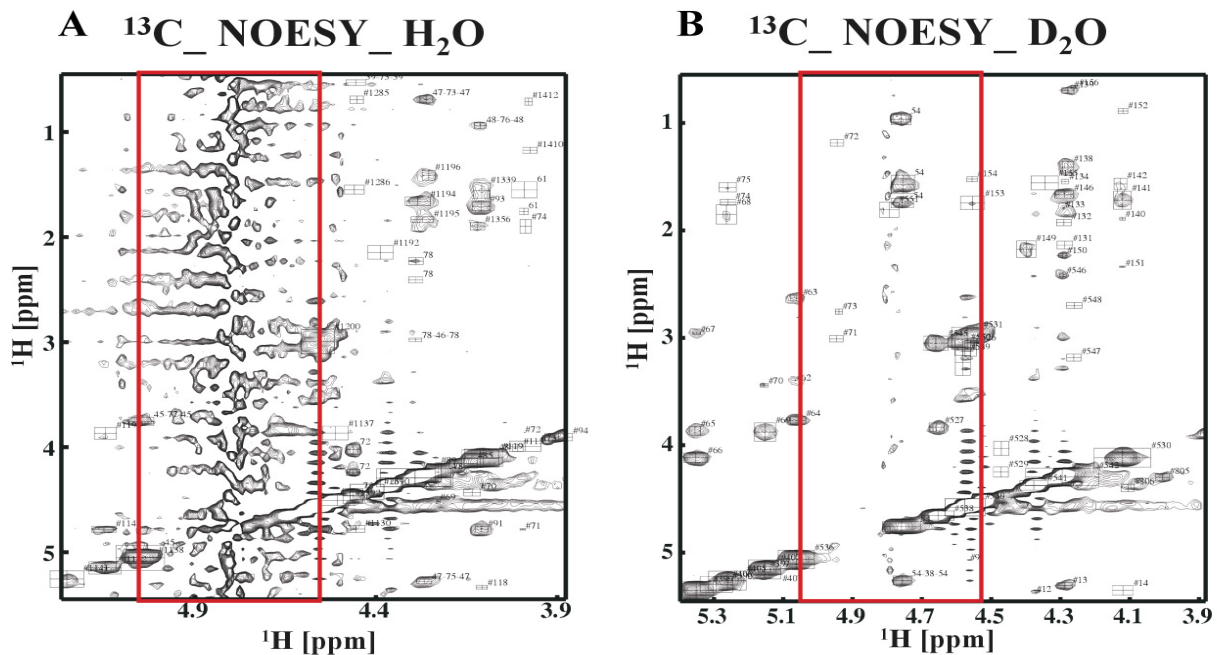
3.3.2  $^{15}\text{N}$ -editierte und  $^{13}\text{C}$ -editierte NOESY-Experimente

**Abbildung 3.13:** Beispiel eines *long range* NOE's. *Long range* Kreuzsignal zwischen den  $^1\text{H}_\alpha$ -Kernen von R38 und V56.

Die in den NOESY-Experimenten entstehenden Signale resultieren aus der räumlichen Nähe von Kernen. Wie zuvor beschrieben können diese Signale intraresidualer Natur sein, d.h. Kerne innerhalb eines Aminosäurerestes „sehen sich“ oder auch interresidual, d.h. Kerne von zwei unterschiedlichen Aminosäureresten sind in räumlicher Nachbarschaft. Je nachdem wie weit diese Reste in der Primärsequenz voneinander entfernt sind, werden die interresidualen Kontakte in sequentielle- ( $|i - j| = 1$ ), *medium range*- ( $2 \leq |i - j| \leq 4$ ) oder *long range*-Kontakte ( $|i - j| \geq 5$ ) klassifiziert. In Abbildung 3.13 ist ein Beispiel eines *long range*-Kontaktes zwischen den Aminosäuren R38 und V56 dargestellt.

Die in Tabelle 3.1 angegebenen Kontakte wurden aus drei unterschiedlichen NOESY-Experimenten ermittelt, dem  $^{15}\text{N}$ -editierten und zwei  $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY-Experimenten. Da in wässrigen Lösungen das Signal des Wassers, welches seine Frequenz bei 4,75 ppm hat, eine Reihe der  $^1\text{H}_\alpha$ -Signale überdeckt, befand sich die Probe in dem zweiten  $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY-Experiment in Deuteriumoxid (Abbildung 3.14).



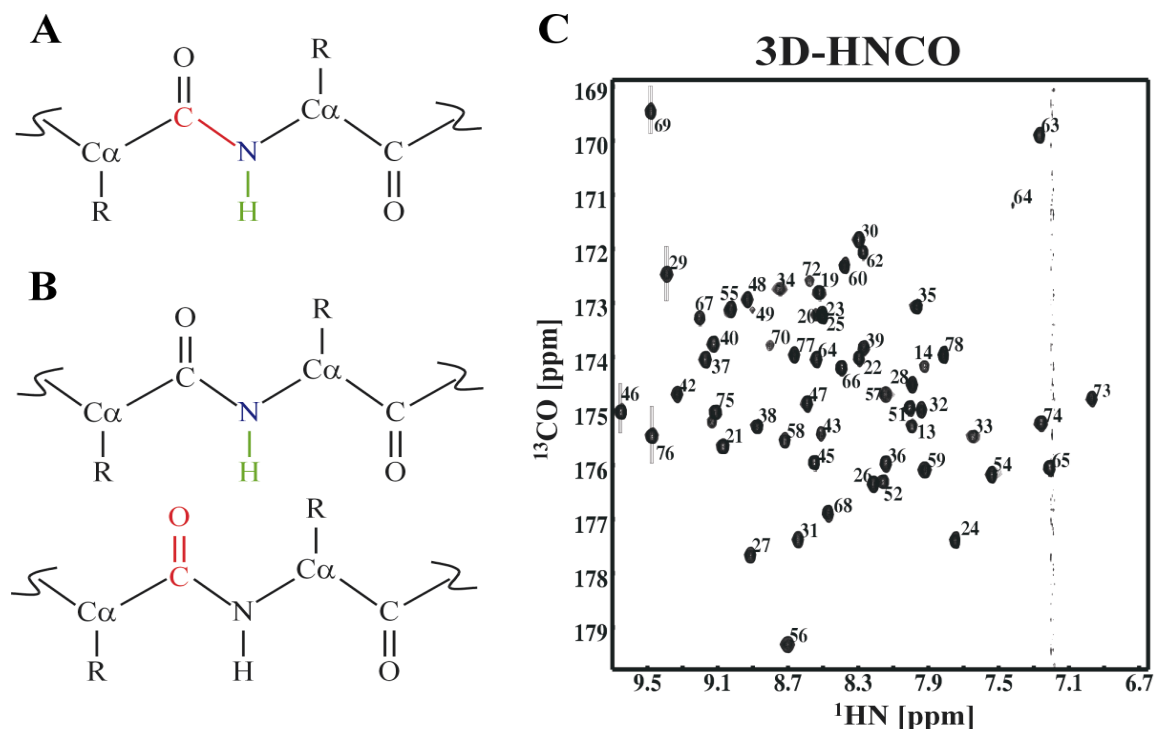


**Abbildung 3.14: Vergleich der in Wasser und Deuteriumoxid aufgenommenen  $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY-Experimente.** A: Dargestellt ist ein Ausschnitt des in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommenen Spektrums auf einer  $^{13}\text{C}$ -Ebene. In dem roten Kasten befindet sich der Bereich, der vom Wasser überlagert wird. B: Gleiche Darstellung des  $^{13}\text{C}$ -editierten NOSY-Experimentes in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen. In dem markierten Bereich sind deutliche Signale vorhanden.

### 3.3.3 Identifizierung von Wasserstoffbrücken durch das 2D-HNCO-long range-Experiment

Wasserstoffbrücken tragen einen großen Anteil zur Stabilität von Proteinen bei. Die bisher aufgeführten Spektren enthalten keine direkte Information über die Partner der Wasserstoffbrücken in der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ . Dingley *et al.* gelang es erstmals mittels 2D-HNCO-long range-Experimenten Wasserstoffbrücken zwischen RNA Watson-Crick Basenpaarung sichtbar zu machen<sup>80</sup>. Diese Methode wurde weiterentwickelt und ist heute auch für Proteine anwendbar<sup>70</sup>.

Als Basis der Identifizierung der Wasserstoffbrücken diente ein 3D-HNCO-Experiment. In diesem Spektrum sind die chemischen Verschiebungen der Carbonylkohlenstoffatome ( $^{13}\text{CO}$ ) eines Aminosäurerestes auf der Amidfrequenz ( $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ ) des folgenden Restes sichtbar (Abbildung 3.15A). Die 2D-HNCO-Experimente entsprechen einer Totalprojektion des 3D-HNCO-Experimentes (Abbildung 3.15C), in dem alle  $^{15}\text{N}$ -Frequenzen in eine Ebene projiziert sind.

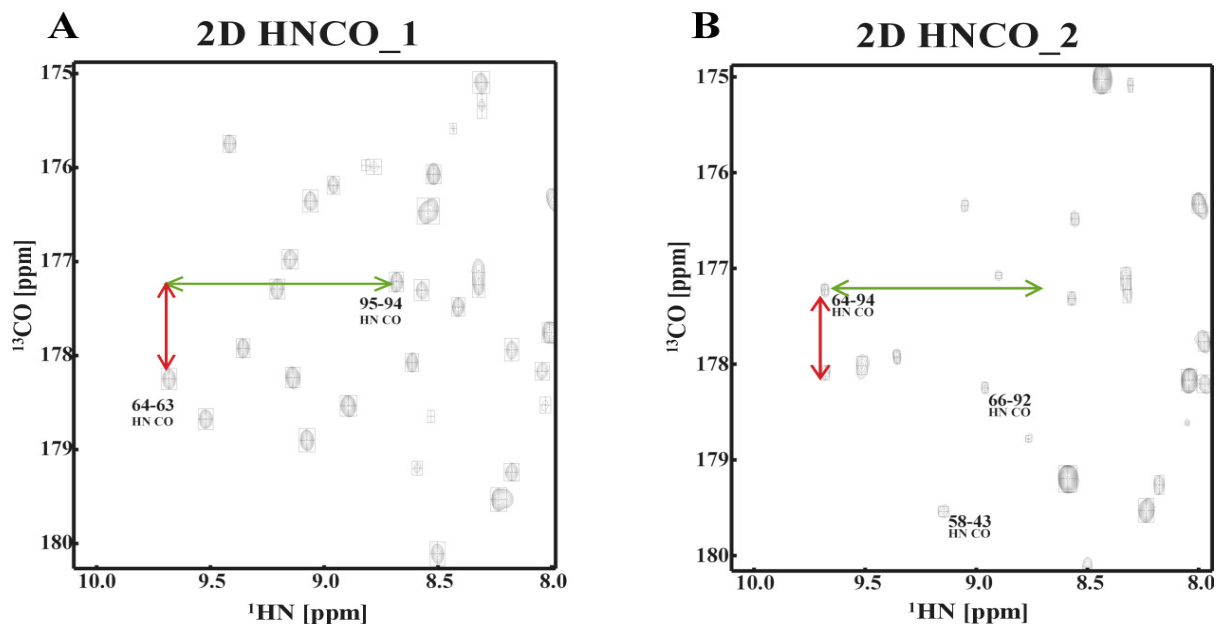


**Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des Magnetisierungstransfers in den verwendeten HNCO-Experimenten und Totalprojektion des 3D-HNCO-Spektrums der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ .** A: Der Transfer im HNCO-Experiment erfolgt ausgehend vom Amidproton ( $^1\text{H}_\text{N}$ ) über das Amidstickstoff ( $^{15}\text{N}$ ) zum Carbonylsauerstoff ( $^{13}\text{CO}$ ) des in der Primärsequenz vorangehenden Restes. B: Eine Verlängerung des Kohärenztransfers führt zu einem Transfer über die Wasserstoffbrücken zwischen Amidproton ( $^1\text{H}_\text{N}$ ) und Carbonylsauerstoff ( $^{13}\text{CO}$ ). C In der Totalprojektion des 3D-HNCO-Spektrums sind alle  $^{15}\text{N}$ -Frequenzen in eine Ebene projiziert.

Durch die sequentiellen Zuordnungen waren die Amidfrequenzen ( $^1\text{H}^\text{N}/^{15}\text{N}$ ) der einzelnen Aminosäurereste bekannt. Daher konnten die Signale des 3D-HNCO-Experimentes einfach zugeordnet werden. Zur Identifizierung der Wasserstoffbrücken diente ein 2D-HNCO-Experiment als Referenz. In diesem Spektrum wurden zunächst die Signale den einzelnen Aminosäureresten zugeordnet.

Das zweite 2D-HNCO-Experiment wurde mit einer verlängerten Carbonyl-Dephasingzeit aufgenommen ( $2T \approx 2/{}^1J_{\text{NC}}$  gegenüber  $2T \approx 1/2 \cdot {}^1J_{\text{NC}}$ ). Dies erlaubte einen Magnetisierungstransfer über Wasserstoffbrücken (Abbildung 3.15B)<sup>70</sup>. Die Signale von Amid- bzw. Carbonylgruppen, welche in der Bildung von Wasserstoffbrücken beteiligt sind, verlieren daher an Intensität. Gleichermäßen treten neue Signale auf, die auf der Carbonylverschiebung des Protonenakzeptors und auf der Amidfrequenz des Protonendonators einer Wasserstoffbrücke entstehen. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Hier wurde die  $^{13}\text{CO}$ -Verschiebung des Aminosäurerestes 94 auf die  $^1\text{H}_\text{N}$ -Frequenz des Restes 64 verschoben.

Durch diese Experimente konnten fünf Wasserstoffbrücken in der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  identifiziert werden. Diese wurden zusätzlich zu den räumlichen Informationen, erhalten aus den NOESY-Spektren, in die Strukturberechnung des Proteins einbezogen.



**Abbildung 3.16: Ausschnitt der 2D-HNCO-Spektren der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ .**  
 A: Stellt ein klassisches 2D-HNCO-Experiment dar, in dem die Signale aus den Resonanzen des  $^1\text{H}_\text{N}$  eines Restes und dem  $^{13}\text{CO}$  des in der Primärsequenz vorangehenden Restes gebildet werden. B: Im zweiten Spektrum kommt es, durch eine verlängerte Dephasingzeit, zu einem Magnetisierungstransfer über die Wasserstoffbrücken. Dies führt zu einer Verschiebung der entsprechenden Signale.

### 3.3.4 Strukturberechnung

Um die räumliche Struktur der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  zu erhalten, mussten die durch die NOESY-Spektren erhaltenen Abstandsinformationen in kartesische Koordinaten überführt werden.

Dafür erhielt jedes Atompaar, welches in den NOESY-Spektren ein Kreuzsignal bildete, zwei Abstandsgrenzen. Die untere Begrenzung ergab sich aus den van-der-Waals-Radien der Protonen und wurde auf 1,8 Å festgelegt, da ein engerer Kontakt zu Abstoßungen zwischen den Kernen führen würde. Die Limitierung des oberen Abstandes erfolgte durch die Gegebenheit, dass Kreuzsignale im NOESY-Experiment nur entstehen, wenn Protonen weniger als 6 Å von einander entfernt sind. Daher wurde für die obere Grenze ein Wert von 5 Å angegeben.

Die Strukturberechnung erfolgte mit dem Programm Dyana („*Dynamics algorithm for NMR applications*“) <sup>75</sup>. Dabei werden, unter Berücksichtigung der gegebenen Abstandsinformationen und der van-der-Waals-Radien, die Torsionswinkel einer zufälligen

Startstruktur variiert. Die Bindungswinkel, -längen, Chiralitäten und Planaritäten werden bei diesem Vorgang, entsprechend ihres optimalen Wertes, konstant gehalten. Ziel der Berechnung ist eine energetisch möglichst günstige Struktur zu erhalten, wobei lokale Minima durch ein langsam abkühlendes Wärmebad umgangen werden<sup>81</sup>.

**Tabelle 3.1: Strukturelle Statistik der 20 Konformere.** In keiner der Strukturen wurden die Abstandsbeschränkung mehr als 0.5 Å verletzt.

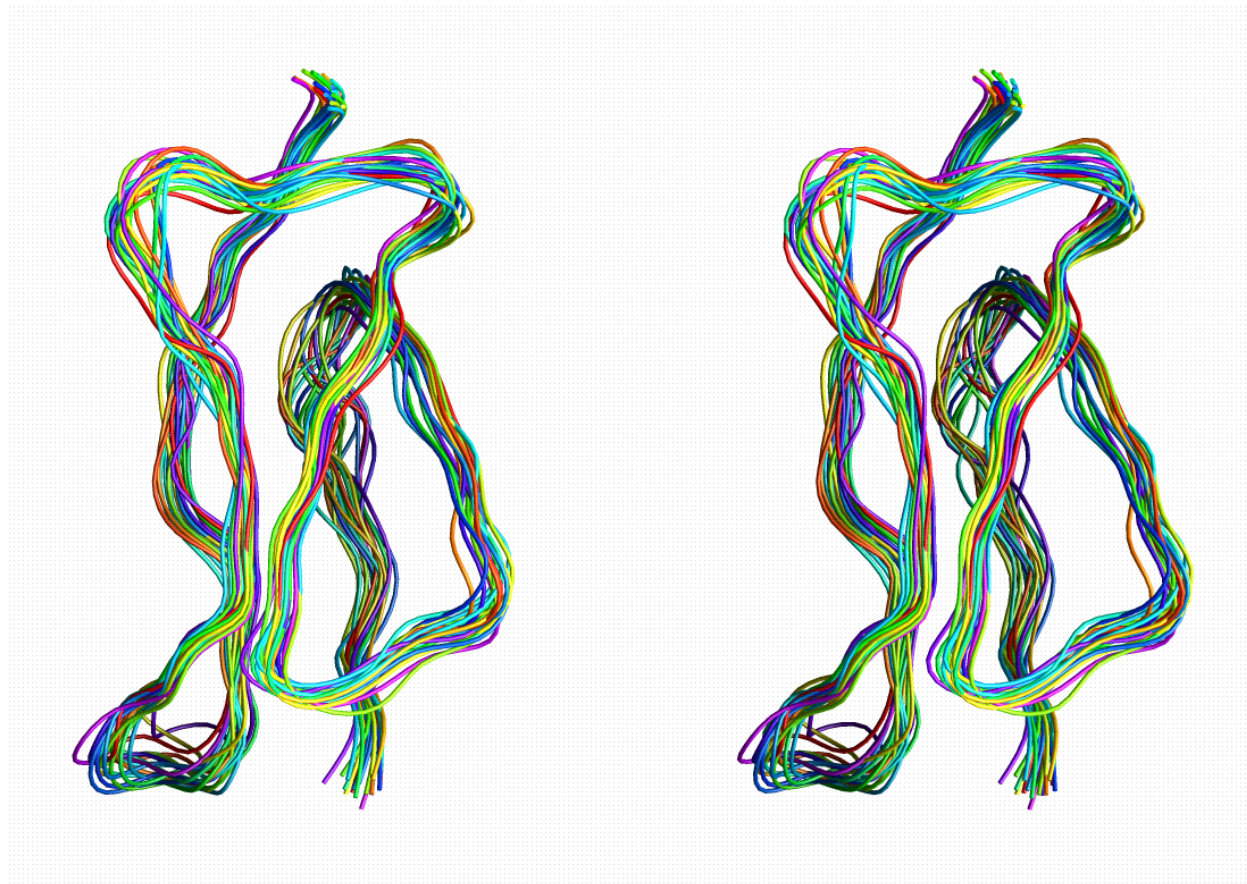
Abstandsbeschränkung	
Intraresidual ( $i - j = 0$ )	129
Sequentiell ( $ i - j  = 1$ )	322
<i>Medium range</i> ( $2 \leq  i - j  \leq 4$ )	123
<i>Long range</i> ( $ i - j  \geq 5$ )	549
Wasserstoffbrücken	2 * 10
Disulfidbrücken	3 * 4
Gesamt	1155
Paarweiser r.m.s.d. für	
Aminosäurereste 31-96 in Å	
Mittlere Rückgrad r.m.s.d. <sup>a</sup>	1.48 +/- 0.29
Mittlere r.m.s.d. der schweren Atome	2.33 +/- 0.25
Paarweiser r.m.s.d. für	
Sekundärstrukturen <sup>b</sup> in Å	
Mittlere Rückgrad r.m.s.d.	0.82 +/- 0.20
Mittlere r.m.s.d. der schweren Atome	1.93 +/- 0.27
Ramachandran-Plot <sup>c</sup>	
Am meisten begünstigte Bereiche (%)	50
Zusätzlich erlaubte Bereiche (%)	36
Generell erlaubte Bereiche (%)	9
Nicht erlaubte Bereiche (%)	5

<sup>a</sup> r.m.s.d. root mean square deviation.  
<sup>b</sup> Aminosäurereste: 52-56, 64-65, 72-77, 84-86, 93-94.  
<sup>c</sup> Werte der mittleren Struktur

Das <sup>15</sup>N-editierte NOESY-Experiment lieferte durch ein geringes Verhältnis zwischen den Intensitäten des Wasser und des korrespondierenden <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-Diagonalpeaks (< 0.1) Hinweise auf potentielle Wasserstoffbrückendonatoren. Die Akzeptoren dieser Wasserstoffbrücken wurden nach den ersten Strukturberechnungen aus der noch relativ undefinierten Struktur ermittelt. Anschließend wurden diese, zusätzlich zu den Wasserstoffbrücken, die durch das HNC0-*long range*-Experiment identifiziert wurden, in die weiteren Kalkulationen mit einbezogen.

Die Berechnung der finalen Struktur erfolgte mit 129 intraresidualen, 322 sequentiellen, 123 *medium range* und 549 *long range* Abständen. Weitere Abstandsinformationen ergaben sich aus den Cystein- und Wasserstoffbrücken (Tabelle 3.1). Aus den 100 berechneten Strukturen bildeten die 20 Strukturen mit der geringsten Energie das Ensemble aus welchem anschließend die mittlere Struktur berechnet wurde.

### 3.3.5 Qualität der Struktur der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$



**Abbildung 3.17: Stereoansicht des Ensembles der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  in Spagettidarstellung.** Der N-Terminus des Proteins befindet sich im unteren, der C-Terminus im oberen Abschnitt der Darstellung.

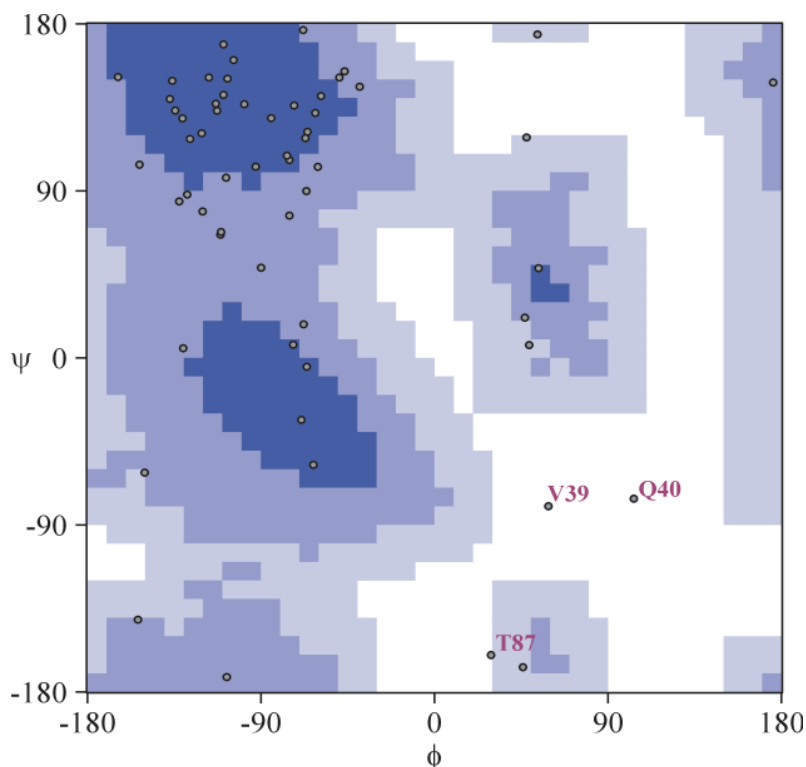
Generell werden bei der Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie Strukturfamilien (Ensemble) erhalten. Die Abweichungen innerhalb des Ensembles gegenüber der mittleren Struktur reflektieren zum einem die Dynamik der Struktur, zum anderen können diese Abweichungen auf eine geringe Anzahl von zugeordneten NOE-Kreuzsignalen zurückzuführen sein. Diese zu geringe Anzahl kann entweder auf spektraler Überlappung oder auf einem Nichtvorhandensein solcher Signale beruhen. Eine weitere Limitation ergibt sich aus der

Tatsache, dass die Abstände nicht „genau“ bestimmt werden, sondern sie eine Obergrenze ( $< 5 \text{ \AA}$ ) und eine Untergrenze (Summe der van-der-Waals Radien) zugewiesen bekommen.

Die Qualität einer mittels NMR-Spektroskopie gelösten Struktur wird durch die mittlere Abweichung (*root mean square deviation*: r.m.s.d.) der Strukturfamilie bestimmt. Das Ensemble der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Es weist eine r.m.s.d. des mittleren Rückgrats von  $1,48 \pm 0,29$  auf. Über alle Sekundärstrukturelemente der Sushi-Domäne ergab sich eine r.m.s.d. von  $0,82 \pm 0,20$  (Tabelle 3.1).

Ein weiteres Qualitätsmerkmal der berechneten Struktur ist die Einhaltung der Diederwinkel,  $\Phi$  und  $\Psi$ , des Proteinrückgrates entsprechend des Ramachandran-Diagramms<sup>82</sup>. So sind für die Diederwinkel von Polypeptidketten nur drei Bereiche im Konformationsraum erlaubt.

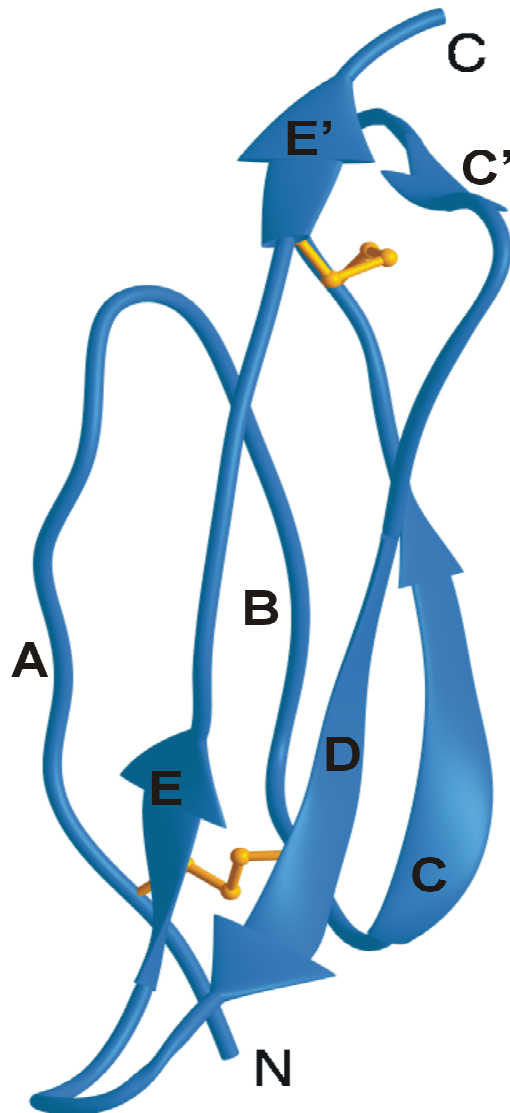
Die nicht erlaubten Flächen sind durch eine hohe potentielle Energie gekennzeichnet und können daher nicht eingenommen werden. In Abbildung 3.18 ist das Ramachandran-Diagramm der mittleren Struktur der Sushi-Domäne abgebildet. Entsprechend Tabelle 3.1 befinden sich nur 5%, also 3 Reste im energetisch ungünstigen Konformationsraum.



**Abbildung 3.18:**  
**Ramachandran-Diagramm der mittleren Struktur der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ .** Die Verteilung der Reste in dem Konformationsraum entspricht Tabelle 3.1. Drei Aminosäurereste aus unstrukturierten Bereichen, Val39, Gln40 (*Loop A*) und Thr87 (*Loop E*), sind in nicht erlaubten Bereichen lokalisiert.



### 3.4 Struktur der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$

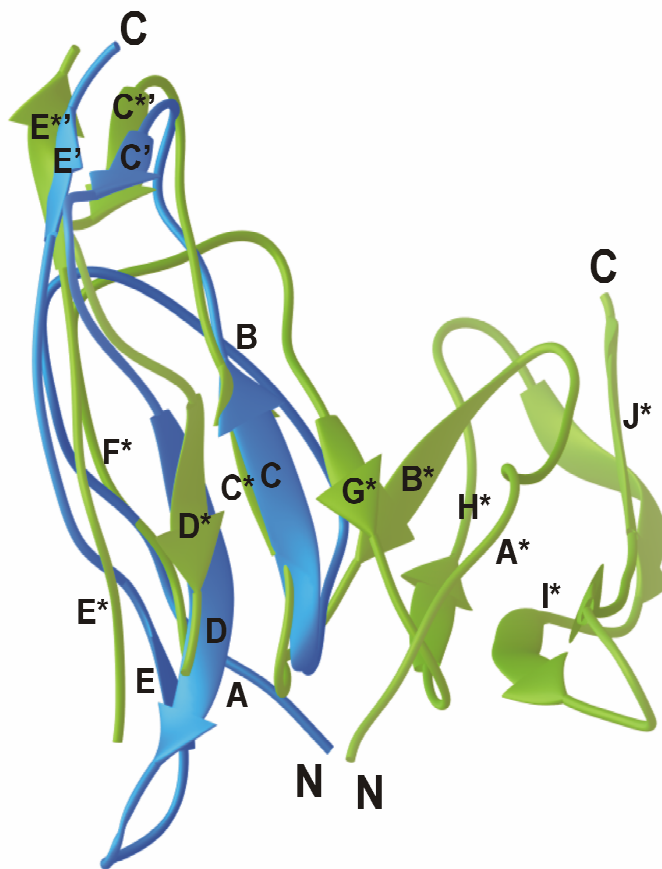


**Abbildung 3.19:** Mittlere Struktur der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  in *Ribbon-Darstellung*. N- und C-Terminus, sowie *Loops* und  $\beta$ -Stränge sind gekennzeichnet. Die Cysteinbrücken sind in gelb dargestellt.

In Abbildung 3.19 ist die mittlere Struktur der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  dargestellt. Das Protein enthält zwei  $\beta$ -Faltblätter, welche aus den Resten 52–56 ( $\beta$ -Strang C), 64–65 ( $\beta$ -Strang C'), 72–77 ( $\beta$ -Strang D), 84–86 ( $\beta$ -Strang E) und 93–94 ( $\beta$ -Strang E') gebildet werden. Die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  zeigt die typische Faltung der Sushi-Domänen. Ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt wird aus den  $\beta$ -Strängen C, D und E gebildet. Im Unterschied zu anderen Sushi-Domänen werden in *Loop A* und *Loop B* keine  $\beta$ -Stränge ausgebildet. Daher wird kein typisches 2 auf 3  $\beta$ -sandwich-Motiv generiert. Die Disulfidbrücke zwischen Cys33 und Cys75 verbinden den N-Terminus mit dem  $\beta$ -Strang D, während *Loop B* mit dem  $\beta$ -Strang E' durch die zweite Disulfidbrücke, zwischen Cys59 und Cys93, verbunden werden.

### 3.5 Strukturvergleich der Sushi-Domänen des IL-15R $\alpha$ und des IL-2R $\alpha$

Die Struktur der Sushi-Domänen des IL-2R $\alpha$  im Komplex mit dem Liganden wurde 2005 mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt<sup>83</sup>. Um einen Einblick in eventuelle strukturelle Unterschiede zwischen der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  und des IL-2R $\alpha$  zu erhalten, wurden diese Strukturen verglichen. Der IL-2R $\alpha$  enthält zwei Sushi-Domänen. Da die Ligandenbindung hauptsächlich über die N-terminale Domäne des IL-2R $\alpha$  (IL-2R $\alpha$ -D1) erfolgt wurde diese mit der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  superpositioniert (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:**  
**Superpositionierung der**  
**Sushi-Domänen des IL-15R $\alpha$**   
**und des IL-2R $\alpha$ .** Die Sushi-  
 Domäne des IL-15R $\alpha$  wurde  
 mit der ersten Domäne des  
 IL2R $\alpha$  (grün) überlagert. Die  
 Kennzeichnungen in den  
 IL-2R $\alpha$  Domänen erfolgten mit  
 einem Stern.

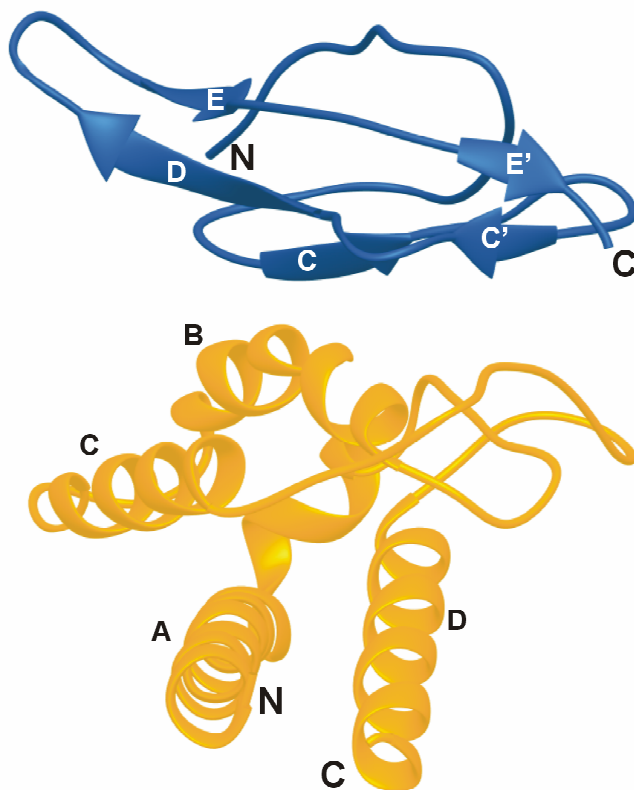
Wie in Abbildung 3.20 erkennbar weisen die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  und die IL-2R $\alpha$ -D1 im zentralen Bereich strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Die  $\beta$ -Stränge C, C', D und E' der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  liegen in der homologen Region der korrespondierenden Stränge, C\*, C'\*, D\* und E'\* des IL-2R $\alpha$ -D1. Während der E\*-Loop dieser Domäne nicht durch die Röntgenstrukturanalyse geklärt werden konnte, zeigt die Struktur des IL-15R $\alpha$  im homologen Bereich einen vierten  $\beta$ -Strang (E).

Weitere strukturelle Unterschiede entstehen aus dem Strangtausch innerhalb der Sushi-Domänen des IL-2R $\alpha$ . Da Loop A\* und Strang B\* Teile der C-terminalen Sushi-Domäne



(IL-2R $\alpha$ -D2) sind, beginnt die IL-2R $\alpha$ -D1 mit Strang C\* und endet mit Strang G\*. Loop F\* des IL-2R $\alpha$  entspricht in seiner Lokalisation dem Loop A des IL-15R $\alpha$ . Durch den Strangtausch zwischen den Domänen des IL-2R $\alpha$  ist die Orientierung des G\* Strangs innerhalb der ersten Domäne abweichend von der des korrespondierenden Loop B\* in der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ . Der  $\beta$ -Strang G\* des IL-2R $\alpha$  ist Teil eines  $\beta$ -Faltblattes, welches aus den  $\beta$ -Strängen D\*, C\* und G\* gebildet wird. Loop B des IL-15R $\alpha$  ist nicht an der Ausbildung eines  $\beta$ -Faltblattes beteiligt, er befindet sich hinter dem  $\beta$ -Strang C und verläuft senkrecht zu dem A-Loop der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ .

### 3.6 Modell des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplexes

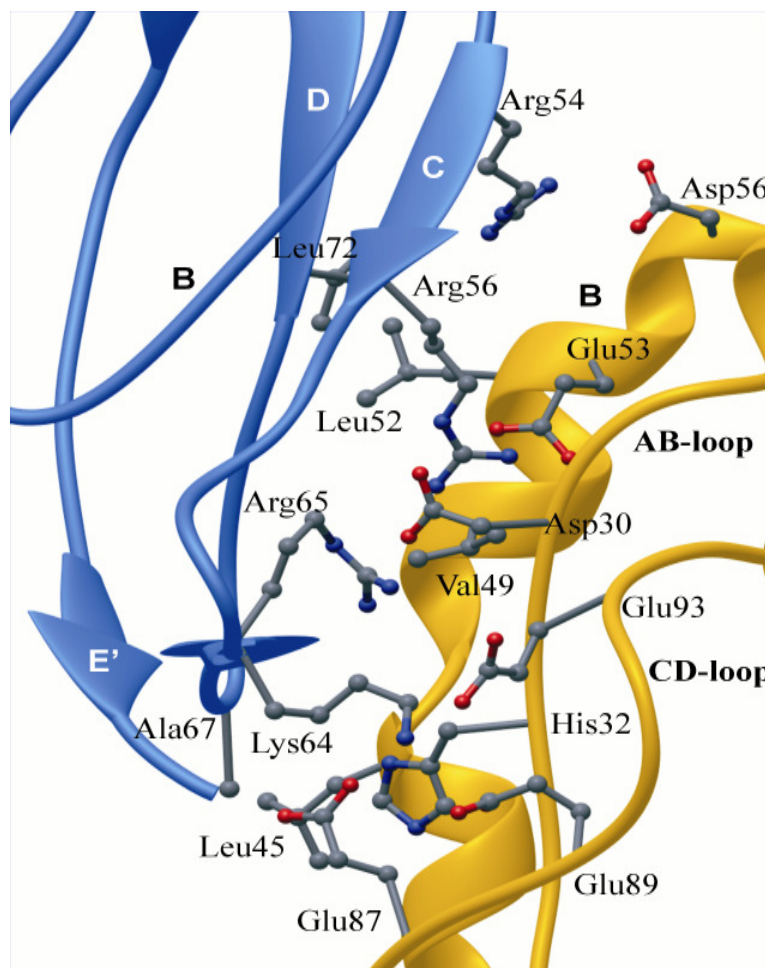


**Abbildung 3.21: Modell des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplex in Ribbon-Darstellung.** Die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  ist in blau, das Modell des IL-15 in gelb dargestellt.

Um ein Modell des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplex zu erstellen wurde die 2005 veröffentlichte Struktur des IL-2/IL-2R $\alpha$ -Komplex als Vorlage verwendet<sup>83</sup>. Zunächst wurde die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$ , entsprechend Abbildung 3.20, mit der IL-2R $\alpha$ -D1 superpositioniert. Anschließend erfolgte die Überlagerung eines IL-15 Modells<sup>84</sup> auf die Struktur des IL-2 in dem als Matrize dienenden Komplex.

Die dreidimensionale Struktur des Modells des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplexes ist in Abbildung 3.21 dargestellt. In diesem Komplex befindet sich die Sushi-Domäne „auf“ dem IL-15. Die Bindung des Zytokins erfolgt über die C, C' und D-Stränge. Das Bindungsepitop des IL-15 besteht aus dem AB-Loop, der B-Helix und der Region des CD-Loops.

Eine Nahaufnahme des IL-15/IL-15R $\alpha$  Interaktionsbereichs zeigt Abbildung 3.22. Es wird deutlich, dass die meisten Reste, welche an der Interaktion beteiligt sind, geladen sind. Während das Bindungsepitop der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  überwiegend basische Reste enthält, zeigt der Bindungsbereich des IL-15 eine Anhäufung von sauren Resten. Drei Argininreste (Arg54, Arg56, Arg 65) und ein Lysinreste (Lys64) des IL-15R $\alpha$ , sowie zwei Aspartatreste (Asp30 und Asp56) und vier Glutamatreste (Glu53, Glu87, Glu89 and Glu93) des IL-15 bilden eher ein großes Netzwerk an Ladungs-Ladungsinteraktionen, als spezifische Ionenpaare. Nur wenige hydrophobe Reste, wie Leu72 und Ala67 der Sushi-Domäne sowie Leu52 und Leu45 des IL-15 sind in der Bindungsregion enthalten.



**Abbildung 3.22: Nahansicht des Interaktionsbereichs des IL-15/IL15R $\alpha$ -Komplexes.**

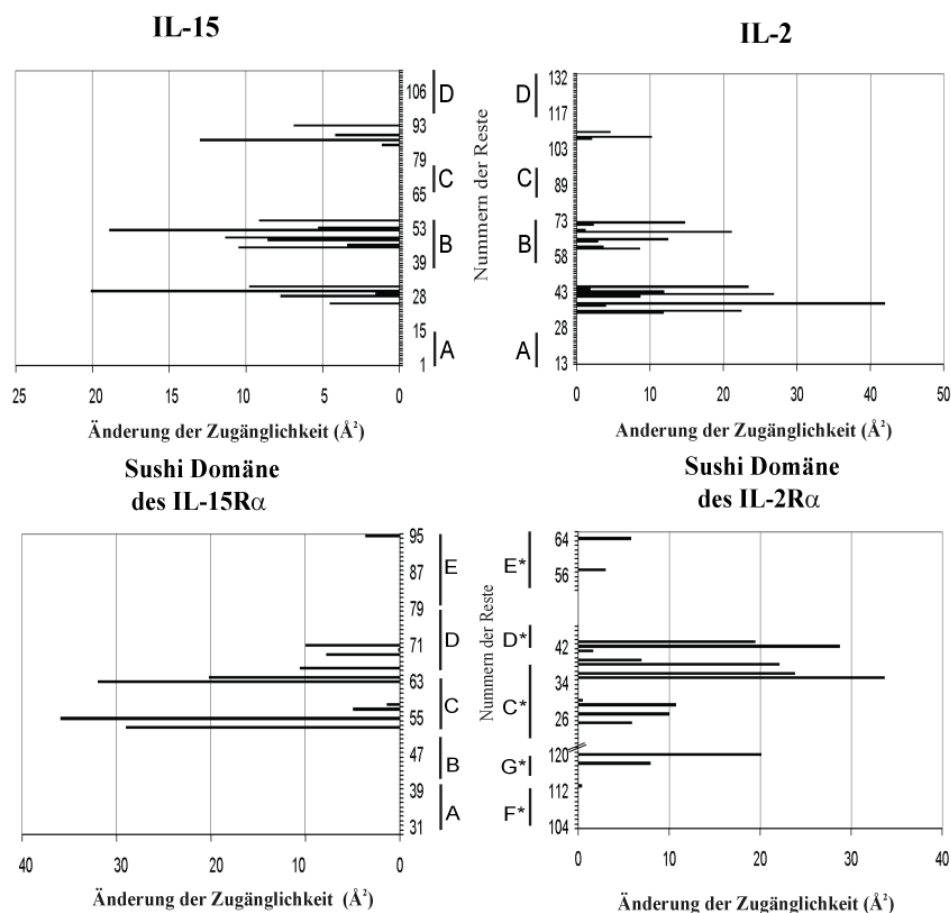
Die Sushi-Domäne des Modells (blau) bringt überwiegend basische Reste in die Bindung ein. Dementsprechend involviert IL-15 (gelb) hauptsächlich saure Aminosäurereste.

### 3.7 Vergleich der IL-15/IL-15R $\alpha$ und IL-2/IL-2R $\alpha$ Komplexe

Die Affinität ( $K_D$ ) des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplex ist um drei Zehnerpotenzen höher als die des IL-2 zu seinem  $\alpha$ -Rezeptor <sup>21</sup>. Um einen potentiellen strukturellen Ursprung dieser Affinitätsunterschiede zu ermitteln wurden die Interaktionsflächen analysiert und verglichen.

#### 3.7.1 Vergleich der Interaktionsbereiche

Zunächst erfolgte die Berechnung der durch die Komplexbildung verursachten Änderungen der Lösungsmittelzugänglichkeit der Moleküle (Abbildung 3.23).



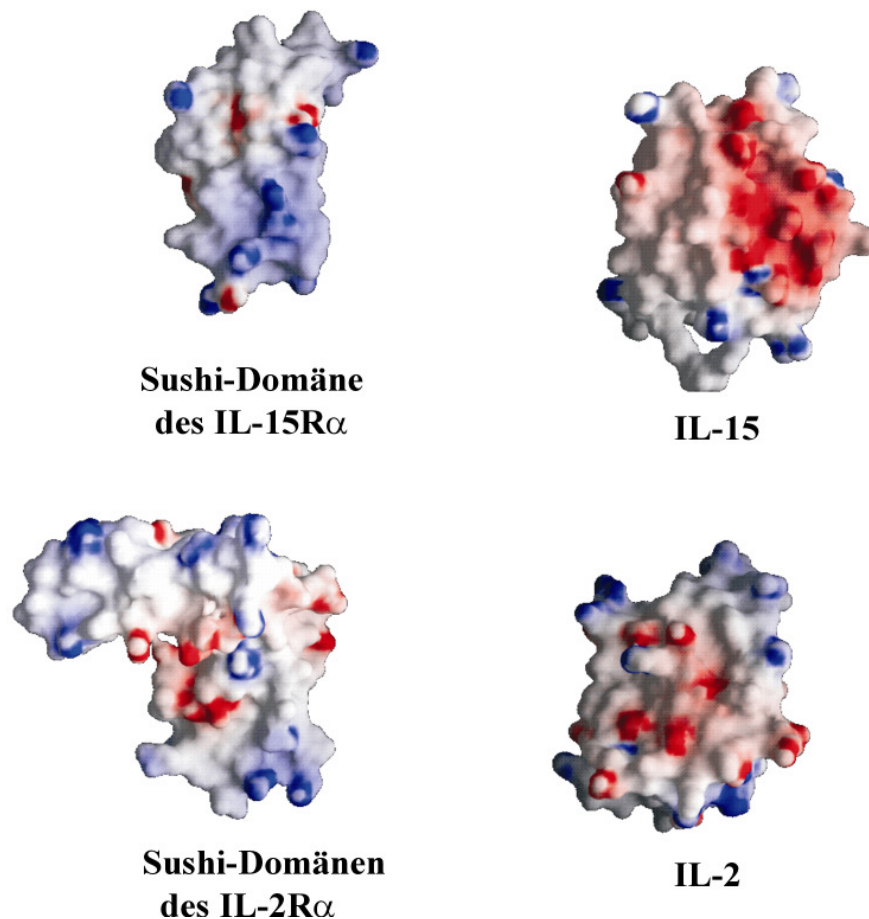
**Abbildung 3.23: Vergleich der Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit durch Komplexbildung des IL-15/IL-15R $\alpha$  und des IL-2/IL-2R $\alpha$ .** Die Lösungsmittelzugänglichkeit der Seitenketten in monomerer- und komplexierter Form wurde berechnet und die Änderung für jedes Protein dargestellt. Homologe Strukturregionen wurden gekennzeichnet und mit schwarzen Balken markiert.

Beide Zytokine, IL-15 und IL-2, besitzen nahezu identische Bindungsepitope, die aus dem AB-Loop, der B-Helix und dem CD-Loop gebildet werden. Anders ist es bei den  $\alpha$ -Rezeptoren. Hier ist ein deutlicher Unterschied in den Bindungsbereichen erkennbar. Die Interaktionsbereiche beider Rezeptoren beinhalten den E- $\beta$ -Strang bzw. E-Loop, den D- und den

C- $\beta$ -Strang. Zusätzlich ist bei der Interaktion des IL-2 mit dem IL-2R $\alpha$  der G\*-Strang in die Bindung involviert. Da die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  keinen Strangaustausch aufweist, ist der korrespondierende B-Loop nicht an der Bindung des Zytokins beteiligt (Abbildung 3.20). Daraus resultiert für den IL-2/IL-2R $\alpha$ -Komplex eine größere Interaktionsfläche als für den IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplex.

### 3.7.2 Vergleich der Oberflächenpotentiale

Wie in Abbildung 3.24 ersichtlich wird, besteht die IL-15/IL-15R $\alpha$ -Interaktionsfläche fast ausschließlich aus geladenen Resten.



**Abbildung 3.24:** Vergleich der elektrostatischen Oberflächenpotentiale der Sushi-Domänen des IL-15R $\alpha$  und des IL-2R $\alpha$  sowie ihrer Zytokine. Der Komplex der  $\alpha$ -Rezeptoren und ihrer Liganden wurden um 90° gedreht, die Rezeptoren rechtsherum und die Liganden linksherum. Dadurch sind die Potentiale der Bindungsbereiche sichtbar: negativ geladene Reste sind rot und positive Ladung ist blau dargestellt.

Dadurch resultiert für den Bindungsbereich der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  ein hohes positives elektrostatisches Oberflächenpotential (Abbildung 3.24). Dieser Bereich der Sushi-Domäne ist komplementär zu dem negativen elektrostatischen Potential des IL-15. Demgegenüber stehen die Interaktionsflächen des IL-2/IL-2R $\alpha$ -Komplex, die im Vergleich ein relativ geringes Oberflächenpotential aufweisen (Abbildung 3.24).

## 4 Diskussion

Die  $\alpha$ -Rezeptoren von IL-15 und IL-2 stellen strukturell gesehen ein neues Bindungsmodul der Rezeptoren der „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“-Zytokine dar. Während die üblichen Rezeptoren dieser Zytokinfamilie, die Klasse-I- und Klasse-II-Zytokinrezeptoren, ihre Liganden über ein Modul aus zwei FN-III-Domänen binden, erfolgt dies bei den  $\alpha$ -Rezeptoren des IL-15 und des IL-2 über ihre Sushi-Domänen<sup>24</sup>. Zwischen dem IL-15R $\alpha$  und dem IL-2R $\alpha$  bestehen Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an Sushi-Domänen. So enthält der IL-15R $\alpha$  nur eine Sushi-Domäne, zeigt jedoch eine deutlich höhere Affinität zu seinem Liganden als der IL-2R $\alpha$ , welcher zwei Sushi-Domänen besitzt. Durch einen Strangaustausch sind diese Domänen ineinander verwunden. Diese Divergenz impliziert ein unterschiedliches Verhalten der Rezeptoren sowohl in der Struktur als auch in der Ligandenbindung, was in den hohen Affinitätsunterschieden der Rezeptoren zu ihren Liganden ihren Ausdruck findet (Tabelle 4.1).

Die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  zeigt einen relativ geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen. So sind nur 29% der Aminosäurereste des Proteins an der Ausbildung von 2  $\beta$ -Faltblättern beteiligt (Abbildung 3.19). Die Ausbildung eines für Sushi-Domänen typischen 2 auf 3  $\beta$ -*sandwich*-Motivs kann nicht erfolgen, da die Gegenwart von drei Prolinresten (Pro34 bis Pro36) die Entstehung eines  $\beta$ -Stranges im *Loop A* verhindert. Durch die Superpositionierung der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  mit der IL-2R $\alpha$ -D1 wird deutlich, dass die IL-2R $\alpha$ -D1 ebenfalls kein typisches 2 auf 3  $\beta$ -*sandwich*-Motiv ausbildet (Abbildung 3.20). Die Region des E\*-Loops wurde in dieser Domäne nicht aufgeklärt. Demgegenüber enthält die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  in der entsprechenden Region einen  $\beta$ -Strang. Das Fehlen dieses  $\beta$ -Stranges in der IL-2R $\alpha$ -D1 wird durch den G\*- $\beta$ -Strang kompensiert, wodurch beide Domänen, die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  und die IL-2R $\alpha$ -D1, fünf  $\beta$ -Stränge enthalten. Durch den Strangaustausch der Sushi-Domänen des IL-2R $\alpha$  zeigt der G\*-Strang einen von der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  abweichenden Verlauf und endet in der zweiten Sushi-Domäne des IL-2R $\alpha$ .

Dieser strukturelle Unterschied hat unmittelbaren Einfluss auf die an der Bindung des Liganden beteiligten Reste. So zeigte die Analyse der Oberflächenzugänglichkeit, dass der IL-2/IL-2R $\alpha$ , zusätzlich zu den homologen Bereichen des Interaktionsmodells des IL-15/IL-15R $\alpha$ , den G\*- $\beta$ -Strang in die Bindung mit einbringt. Daraus resultiert, dass der IL-2/IL-2R $\alpha$ -Komplex eine größere Interaktionsfläche aufweist, als der von IL-15 und IL-15R $\alpha$ . Dem stehen die erwähnten Affinitätsunterschiede der Komplexe gegenüber. So ist die Affinität

des IL-15R $\alpha$  für seinen Liganden tausendfach höher, als die des IL-2R $\alpha$  für IL-2. Dies wird in den kinetischen Bindungskonstanten ( $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$ ) und Affinitäten ( $K_D$ ) der Komplexe deutlich (Tabelle 4.1).

**Table 4.1: Bindungskonstanten von Zytokinen zu ihren entsprechenden Rezeptoren.**

	$k_{\text{on}}$	$k_{\text{off}}$	$K_d$
IL-2/IL-2R $\alpha$ <sup>85</sup>	$1.06 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0.298 \text{ s}^{-1}$	28.1 nM
IL-4/IL-4R $\alpha$ <sup>86</sup>	$1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	105 pM
IL-6/IL-6R $\alpha$ <sup>87</sup>	$1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$6.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	34 nM
IL-15/IL-15R $\alpha$ <sup>88</sup>	$3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	38 pM

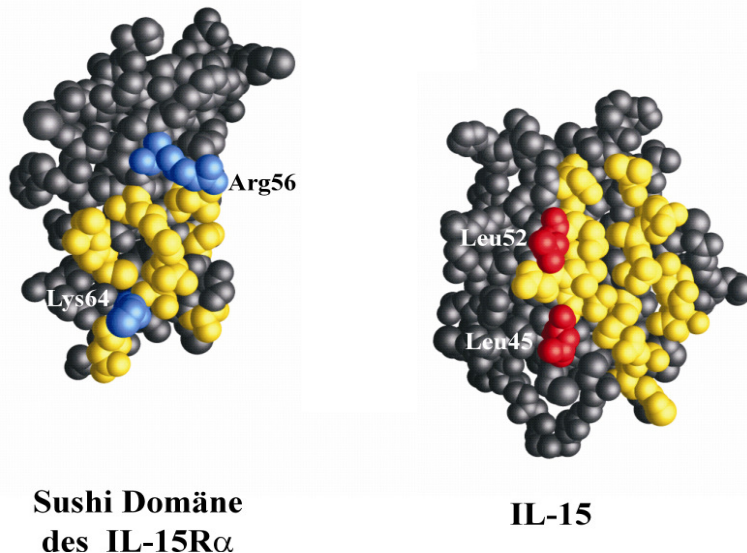
Diese Divergenz muss daher in der Art der Interaktion zwischen den Rezeptoren und ihren Liganden begründet sein.

Durch das Modell des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplex wurde ein näherer Einblick in dessen Interaktion ermöglicht. Während die Rezeptoren den oben erwähnten Unterschied in der eingebrachten gesamten Fläche zeigen, sind die Bindungsepitope der korrespondierenden Zytokine nahezu identisch (Abbildung 3.23). Sie bestehen jeweils aus dem AB-Loop, der B-Helix und dem CD-Loop.

Die Beteiligung des AB-Loops (Aminosäurerest 23-33) des IL-15 in der hochaffinen Bindung zum IL-15R $\alpha$  wurde zuvor von Pettit *et al.* vermutet<sup>89</sup>, während Beranard *et al.* die Beteiligung der B- und C-Helix des Zytokins an der Rezeptorbindung nahe legten<sup>84</sup>. Die Beteiligung des AB-Loop und der B-Helix konnte durch das Modell des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplex bestätigt werden. Eine Interaktion der C-Helix ist hingegen unwahrscheinlich, da entsprechend des Modells die Sushi-Domäne „auf“ dem AB-Loop, der B-Helix und dem CD-Loop seines Liganden „liegt“. Durch die limitierte Größe der Sushi-Domäne ist es kaum denkbar, dass sie parallel dazu die „unterhalb“ dieser Ebene befindliche C-Helix erreichen kann (Abbildung 3.21).

Durch die Analyse der an der Interaktion beteiligten Reste wurde deutlich, dass diese überwiegend geladene Seitenketten aufweisen. Nur wenige hydrophobe Reste befinden sich in der Interaktionsfläche zwischen der Sushi-Domäne und IL-15. Beispiele hierfür sind Leu72 und Ala67 des Rezeptors, sowie Leu52 und Leu45 des Zytokins. Die Mutagenese von Leu52 und Leu45 in Aspartatreste im IL-15 erhöhte jeweils die Affinität der generierten Mutanten zum IL-15R $\alpha$ <sup>84</sup>. Durch den Aminosäureaustausch von Leucin- in einen Aspartatrest kommt es

entsprechend des generierten Modells zu einer weiteren Steigerung des negativen elektrostatischen Potentials des Bindungs epitops von IL-15, welche die Affinität zur positiven Oberfläche der Sushi-Domäne weiterhin erhöht (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1:**  
**Raumfüllende Darstellung der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  und IL-15.** Die in der Bindung involvierten Reste sind gelb dargestellt. Die in IL-15 mutierten Reste sind rot gekennzeichnet. Potentielle Interaktionspartner der mutierten Reste, in der Sushi-Domäne sind blau dargestellt.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Interaktion des IL-15 mit seinem IL-15R $\alpha$  durch ein Netzwerk von ionischen Wechselwirkungen dominiert wird. Diese Art der Interaktion ist gegensätzlich zu den bisher bekannten Interaktionen zwischen anderen Zytokinen mit ihren Zytokinrezeptoren, erklärt jedoch die hohen Affinitätsunterschiede der Komplexe.

Die Interaktionsflächen des IL-2/IL-2R $\alpha$ -Komplexes wurden beschrieben<sup>83</sup> und entsprechen der klassischen Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor<sup>3</sup>. So ist die Bindung des Komplexes durch einen hydrophoben Kern gekennzeichnet, welcher durch einen Ring von hydrophilen Resten umgeben und so vom wässrigen Milieu abgeschirmt wird<sup>83</sup>. Diese Art der Interaktion wurde für viele Zytokin/Zytokinrezeptor-Komplexe, wie dem Wachstumshormon/Wachstumshormonrezeptor- und dem IL-6/IL-6R $\alpha$ -Komplex, beschrieben<sup>6, 8, 90</sup>. Wie für den IL-4/IL-4R $\alpha$ -Komplex gezeigt wurde, führt die Ausbildung eines Avocadoclusters zu einer Erhöhung der Affinität von Rezeptor und Ligand. Im Interaktionsbereich des Avocadoclusters werden hydrophile Reste von einem hydrophoben Kern umgeben<sup>7</sup>.

Die Interaktionen des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplexes ähneln jedoch der Wechselwirkung eines Polyanions (IL-15) mit einem Polykation (IL-15R $\alpha$ ). Deren hohe Affinität zueinander beruht vor allem auf der niedrigen Dissoziationskonstante ( $k_{\text{off}}$ ) des Komplexes (Tabelle 4.1). Diese kinetische Konstante beschreibt die Wahrscheinlichkeit eines Komplexes, zu dissoziieren,



und ist daher ein direktes Maß für die Aktivierungsbarriere zwischen dem Komplex und den freien Molekülen. Ein Komplex mit einer so niedrigen  $k_{\text{off}}$  wie sie für den IL-15/IL-15R $\alpha$  beschrieben wurde, kann daher als kinetisch gefangen betrachtet werden. Dieses Phänomen ist typisch für Polyanion/Polykation-Wechselwirkungen, wie sie zwischen IL-15 und IL-15R $\alpha$  bestehen.

Die in der Studie von Bernard *et al.* durchgeführten Mutationen beruhten nicht auf der Kenntnis der Art der IL-15/IL-15R $\alpha$ -Interaktion. Sie führten jedoch zu einer Erhöhung der Affinität des Komplexes. Durch die nun vorhandene Kenntnis des Interaktionsmodus kann eine gezielte Mutation von Aminosäureresten beider Komponenten des Komplexes erfolgen.

Dies erlaubt das rationale Design eines hochaffinen löslichen IL-15R $\alpha$ . Dabei wurde schon für die natürliche Form des löslichen IL-15R $\alpha$  ein viel versprechendes therapeutisches Potential gezeigt<sup>24, 40-42</sup>. Die Verwendung der einzelnen Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  anstelle des gesamten löslichen Rezeptors scheint jedoch fraglich zu sein. So konnte Mortier *et al.* zeigen, dass die Bindung der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  an seinen Liganden einen agonistischen Effekt ausübt, sobald die Zielzellen nur den IL-2R $\beta$  und die *Common- $\gamma$ Chain*, nicht aber den  $\alpha$ -Rezeptor tragen<sup>88</sup>.

Häufig wird IL-15 in fehlgeleiteten Entzündungen, wie Psoriasis, Morbus Crohn und rheumatoider Arthritis, im überhöhten Ausmaß exprimiert<sup>34, 91</sup>. Es wird angenommen, dass dadurch ein Ungleichgewicht in dem Verhältnis von IL-15 und IL-15R $\alpha$  entsteht und das Zytokin nicht mehr in der Plasmamembran oder in endosomalen Kompartimenten zurückgehalten werden kann. Damit kommt es zur Sekretion von IL-15 in das umgebende Milieu, wo es seine proinflammatorischen Effekte ausüben kann<sup>28</sup>. Die antiinflammatorische Wirkung des löslichen IL-15R $\alpha$  beruht dementsprechend auf einer Neutralisation des „überschüssigen“ IL-15.

TNF- $\alpha$ -neutralisierende Moleküle werden mit Erfolg in der Therapie von Psoriasis, Morbus Chron und rheumatoider Arthritis eingesetzt. Zu diesen Medikamenten zählen lösliche monoklonale Antikörper, wie „Infliximab“ und „Adalimumab“, aber auch ein löslicher TNFR, der mit der konstanten Region der schweren Kette eines Immunglobulins fusioniert wurde, „Etanercept“.

IL-15 führt zu einer Expression von TNF- $\alpha$ . Daher würde die Neutralisation von IL-15 in einer früheren Phase der Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen eingreifen, und so den Verlauf der Erkrankung in einem vorhergehenden Stadium blockieren. Spezifische

---

Antikörper gegen die IL-2R $\beta$ -Kette werden bereits in klinischen Studien eingesetzt<sup>33</sup>. Sie inhibieren sowohl die IL-15-, als auch die IL-2 vermittelten Effekte. Der lösliche IL-15R $\alpha$  stellt hingegen einen spezifischen Antagonisten des IL-15 da<sup>38</sup> und wurde mit viel versprechenden Ergebnissen zur Therapie von Erkrankungen in Mausmodellen eingesetzt.

Da sich das Modell des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplexes in guter Übereinstimmung mit den *Site-directed*-Mutagenese-Daten befindet, kann es nun als Basis für ein rationales Design von potenten IL-15 Antagonisten dienen, welche von einem hohen Interesse für die Therapie von inflammatorischen Erkrankungen sind.

## 5 Zusammenfassung

IL-15 ist ein Mitglied der kleinen „Vier- $\alpha$ -Helix-Bündel“-Zytokinfamilie. Das proinflammatorische Zytokin wurde durch seine Fähigkeit entdeckt, die IL-2 vermittelte T-Zellproliferation zu imitieren. Beide Zytokine, IL-15 und IL-2, verwenden einen jeweils spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor, den IL-15R $\alpha$  und den IL-2R $\alpha$ . Zusätzlich benutzen sie zur Signaltransduktion den  $\beta$ - und den  $\gamma$ -Rezeptor des IL-2. Zytokinrezeptoren sind gewöhnlich Multi-Domänen Proteine, welche ihre Liganden über eine Zytokin-Homologie-Region binden, die aus zwei Fibronectin Typ-III-ähnliche Domänen besteht. Demgegenüber sind bei den  $\alpha$ -Rezeptoren des IL-15 und IL-2 die Sushi-Domänen für die Zytokinbindung verantwortlich. So wird die ausgesprochen hochaffine Bindung des IL-15 an den IL-15R $\alpha$  über dessen Sushi-Domäne vermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  rekombinant hergestellt und die Struktur des Proteins mittels multidimensionaler heteronuklearer NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  mit der IL-2R $\alpha$ -D1. Dabei stellte sich heraus, dass die Unterschiede dieser homologen Domänen aus einem Strangaustausch der Sushi-Domänen des IL-2R $\alpha$  resultieren.

Die Generation eines Modells der Sushi-Domäne des IL-15R $\alpha$  im Komplex mit IL-15 erlaubte einen Einblick in den Interaktionsbereich. Dabei zeigte sich, dass die Bindung zwischen IL-15 und dem IL-15R $\alpha$  nicht von hydrophoben Wechselwirkungen gekennzeichnet ist, sondern von einem Netzwerk aus ionischen Interaktionen dominiert wird. Diese Art der Interaktion erklärt die außergewöhnlich hohe Affinität des IL-15/IL-15R $\alpha$ -Komplexes, welche für die biologischen Effekte des Zytokins von großer Bedeutung ist und bisher in anderen Zytokin/Zytokinrezeptor-Komplexen nicht beobachtet wurde.

---

## 6 Summary

IL-15 is a member of the small four  $\alpha$ -helix bundle family of cytokines. This proinflammatory cytokine was discovered by its ability to mimic IL-2-mediated T cell-proliferation. Both cytokines, IL-15 and IL-2, share the  $\beta$ - and  $\gamma$ -receptor chains of the IL-2 receptor for signaltransduction. In addition, they target specific  $\alpha$ -chain receptors, the IL-15R $\alpha$  and IL-2R $\alpha$ , respectively. Cytokine receptors are multi-domain, transmembrane proteins and utilize a cytokine-binding module for ligand binding, which consists of two fibronectin type-III domains. In contrast to these receptors, both, the IL-15R $\alpha$  and the IL-2R $\alpha$ , contain sushi domains, which are responsible for the cytokine binding. The exceptionally high-affinity binding of IL-15 to the IL-15R $\alpha$  is mediated by its sushi domain.

In the present work the recombinant sushi domain of the IL-15R $\alpha$  was produced and its structure was solved by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy. A comparison with the IL-2R $\alpha$  revealed, that differences between these homologue domains are due to a strand exchange of the sushi domains of the IL-2R $\alpha$ .

The generation of a model of the IL-15R $\alpha$  sushi domain in complex with IL-15 allows an insight into the interaction interface between the cytokines and its cognate receptors. It shows that the binding between IL-15 and IL-15R $\alpha$  is not characterized by hydrophobic interaction, but is dominated by a large network of ionic interactions. This type of interaction explains the exceptionally high affinity of the IL-15/IL-15R $\alpha$  complex, which is essential for the biological effects of this cytokine and has not been observed in other cytokine/cytokine receptor complexes.

## 7 Abkürzungen

$\epsilon_{280}$	molarer Extinktionskoeffizient
$\gamma$	gyromagnetische Konstante
$\mu$	kernmagnetisches Moment
$\omega$	Lamorfrequenz
$\Theta_\lambda$	$\Theta_\lambda$ : Elliptizität in Grad
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
APC	antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
APS	<u>A</u> mmonium <u>P</u> ersulfate
$B_0$	statisches Magnetfeld
BMRB	<i>B</i> iological <i>M</i> agnetic <i>R</i> esonance <i>D</i> ata <i>B</i> ank
$c$	Konzentration der Probe in $\text{g/cm}^3$
$c_m$	Massenkonzentration
$d$	Schichtdicke in cm
dest.	destilliert
$E_{280}$	Extinktion bei 280 nm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic</i> )
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> , EGF)
FN-III	<u>F</u> ibronektin Typ-III-ähnlich
FT	<u>F</u> ourier- <u>T</u> ransformation
GH	Wachstumshormon ( <i>growth hormon</i> )
gp130	Glycoprotein 130
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
$h$	Planksches Wirkungsquantum
$I$	Gesamtdrehimpuls
$I$	Signalintensität
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
IL-2R	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin- <u>2</u> <u>R</u> ezeptor
IL-15R	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin- <u>15</u> <u>R</u> ezeptor
IPTG	Isopropyl-Thio- $\beta$ -D- <u>G</u> alactopyranosid
$k$	Boltzmannkonstante
Kana <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton

---

lacI	lac-Repressor
lac O	Lac-Operon
LIF	<i>Leukemia inhibitory Factor</i>
LB	Lurial Broth
M	Magnetisierung
MCS	multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitäts Komplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
M <sub>r</sub>	Molekularmasse in g/mol
MES	<i>Morpholino Ethan Sulfonsäure</i>
MRW	mittlere Molekularmasse ( <i>mean residue weight</i> ) der Aminosäurereste eines Proteins (g/mol)
MW	Molekulargewicht
NMR	kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
NK-Zellen	<i>Natürliche Killer-Zellen</i>
NOE	Kern Overhauser Effekt ( <i>nuclear overhauser effect</i> )
NOESY	<i>Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ori	<i>Origin of Replication</i>
OSM	<i>Oncostatin M</i>
PAM	Pathogen assoziierten Molekülen ( <i>pathogen associated molecule</i> )
PDB	<i>Protein Daten Bank</i>
PT5	T5-Promotor
Ptac	tac-Promotor
RBS	<i>Ribosomen-Bindungsstelle</i>
r.m.s.d.	<i>root mean square deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
SCID	schweren kombinierten Immundefizienz ( <i>severe combined immunodeficiency</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
TACE	„ <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i> “
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
t <sub>1</sub> , t <sub>2</sub>	Zeitvariablen

T <sub>1</sub>	longitudinale Relaxation
T <sub>2</sub>	transversale Relaxation
TOCSY	<i><u>T</u>otal <u>C</u>orrelation <u>S</u>pectroscopy</i>
ZBM	<u>Z</u> ytokin- <u>B</u> indungs- <u>M</u> odul
ZHR	<u>Z</u> ytokin- <u>H</u> omologie- <u>R</u> egion

---

## 8 Literaturverzeichnis

- (1) Janeway, C. A.; Travers, P. *Immunologie*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2002.
- (2) Stroud, R. M.; Wells, J. A., Mechanistic diversity of cytokine receptor signaling across cell membranes, *Sci STKE* **2004**, re7.
- (3) Grötzinger, J., Molecular mechanisms of cytokine receptor activation, *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, 1592, 215– 223.
- (4) Boulanger, M. J.; Garcia, K. C., Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system, *Adv Protein Chem* **2004**, 68, 107-146.
- (5) Bazan, J. F., Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily, *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**, 87, 6934-6938.
- (6) Clackson, T.; Wells, J. A., A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface, *Science* **1995**, 267, 383-386.
- (7) Hage, T.; Sebald, W.; Reinemer, P., Crystal structure of the interleukin-4/receptor alpha chain complex reveals a mosaic binding interface, *Cell* **1999**, 97, 271-281.
- (8) Wells, J. A., Hematopoietic Receptor Complexes, *Annu Rev Biochem* **1996**, 65, 609-634.
- (9) Kovanen, P. E.; Leonard, W. J., Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways, *Immunol Rev* **2004**, 202, 67-83.
- (10) Bamford, R. N.; Grant, A. J.; Burton, J. D.; Peters, C.; Kurys, G.; Goldman, C. K.; Brennan, J.; Roessler, E.; Waldmann, T. A., The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells, *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91, 4940-4944.
- (11) Grabstein, K. H.; Eisenman, J.; Shanebeck, K.; Rauch, C.; Srinivasan, S.; Fung, V.; Beers, C.; Richardson, J.; Schoenborn, M. A.; Ahdieh, M.; Johnson, L.; Alderson, M. R.; Watson, J. D.; Anderson, D. M.; Giri, J. G., Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor, *Science* **1994**, 264, 965-968.
- (12) Giri, J. G.; Ahdieh, M.; Eisenman, J.; Shanebeck, K.; Grabstein, K.; Kumaki, S.; Namen, A.; Park, L. S.; Cosman, D.; Anderson, D., Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15, *EMBO J* **1994**, 13, 2822-2830.
- (13) Carson, W. E.; Giri, J. G.; Lindemann, M. J.; Linett, M. L.; Ahdieh, M.; Paxton, R.; Anderson, D.; Eisenmann, J.; Grabstein, K.; Caligiuri, M. A., Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor, *J Exp Med* **1994**, 180, 1395-1403.
- (14) Burton, J. D.; Bamford, R. N.; Peters, C.; Grant, A. J.; Kurys, G.; Goldman, C. K.; Brennan, J.; Roessler, E.; Waldmann, T. A., A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells, *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91, 4935-4939.



- (15) Kundig, T. M.; Schorle, H.; Bachmann, M. F.; Hengartner, H.; Zinkernagel, R. M.; Horak, I., Immune responses in interleukin-2-deficient mice, *Science* **1993**, *262*, 1059-1061.
- (16) Willerford, D. M.; Chen, J.; Ferry, J. A.; Davidson, L.; Ma, A.; Alt, F. W., Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment, *Immunity* **1995**, *3*, 521-530.
- (17) Kennedy, M. K.; Glaccum, M.; Brown, S. N.; Butz, E. A.; Viney, J. L.; Embers, M.; Matsuki, N.; Charrier, K.; Sedger, L.; Willis, C. R.; Brasel, K.; Morrissey, P. J.; Stocking, K.; Schuh, J. C.; Joyce, S.; Peschon, J. J., Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice, *J Exp Med* **2000**, *191*, 771-780.
- (18) Lodolce, J. P.; Boone, D. L.; Chai, S.; Swain, R. E.; Dassopoulos, T.; Trettin, S.; Ma, A., IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation, *Immunity* **1998**, *9*, 669-676.
- (19) Marks-Konczalik, J.; Dubois, S.; Losi, J. M.; Sabzevari, H.; Yamada, N.; Feigenbaum, L.; Waldmann, T. A.; Tagaya, Y., IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**, *97*, 11445-11450.
- (20) Giri, J. G.; Kumaki, S.; Ahdieh, M.; Friend, D. J.; Loomis, A.; Shanebeck, K.; DuBose, R.; Cosman, D.; Park, L. S.; Anderson, D. M., Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor, *EMBO J* **1995**, *14*, 3654-3663.
- (21) Anderson, D. M.; Kumaki, S.; Ahdieh, M.; Bertles, J.; Tometsko, M.; Loomis, A.; Giri, J.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Valentine, V.; Shapiro, D. N.; Morris, S. W.; Park, L. S.; Cosman, D., Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes, *J Biol Chem* **1995**, *270*, 29862-29869.
- (22) Schluns, K. S.; Lefrancois, L., Cytokine control of memory T-cell development and survival, *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, 269-279.
- (23) Ichinose, A., *persönliche Mitteilung*.
- (24) Wei, X.; Orchardson, M.; Gracie, J. A.; Leung, B. P.; Gao, B.; Guan, H.; Niedbala, W.; Paterson, G. K.; McInnes, I. B.; Liew, F. Y., The Sushi domain of soluble IL-15 receptor alpha is essential for binding IL-15 and inhibiting inflammatory and allogenic responses in vitro and in vivo, *J Immunol* **2001**, *167*, 277-282.
- (25) Perkins, S. J.; Haris, P. I.; Sim, R. B.; Chapman, D., A study of the structure of human complement component factor H by Fourier transform infrared spectroscopy and secondary structure averaging methods, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4004-4012.
- (26) Norman, D. G.; Barlow, P. N.; Baron, M.; Day, A. J.; Sim, R. B.; Campbell, I. D., Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution, *J Mol Biol* **1991**, *219*, 717-725.
- (27) Dubois, S.; Mariner, J.; Waldmann, T. A.; Tagaya, Y., IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells, *Immunity* **2002**, *17*, 537-547.
- (28) Van Belle, T.; Grooten, J., IL-15 and IL-15Ralpha in CD4+T cell immunity, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2005**, *53*, 115-126.
- (29) Fehniger, T. A.; Caligiuri, M. A., Interleukin 15: biology and relevance to human disease, *Blood* **2001**, *97*, 14-32.

- 
- (30) Doherty, T. M.; Seder, R. A.; Sher, A., Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages, *J Immunol* **1996**, *156*, 735-741.
- (31) Mattei, F.; Schiavoni, G.; Belardelli, F.; Tough, D. F., IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation, *J Immunol* **2001**, *167*, 1179-1187.
- (32) Li, X. C.; Demirci, G.; Ferrari-Lacraz, S.; Groves, C.; Coyle, A.; Malek, T. R.; Strom, T. B., IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo, *Nat Med* **2001**, *7*, 114-118.
- (33) Waldmann, T. A., Targeting the interleukin-15/interleukin-15 receptor system in inflammatory autoimmune diseases, *Arthritis Res Ther* **2004**, *6*, 174-177.
- (34) McInnes, I. B.; Gracie, J. A., Interleukin-15: a new cytokine target for the treatment of inflammatory diseases, *Curr Opin Pharmacol* **2004**, *4*, 392-397.
- (35) Waldmann, T. A.; Tagaya, Y., The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens, *Annu Rev Immunol* **1999**, *17*, 19-49.
- (36) Nishimura, H.; Fujimoto, A.; Tamura, N.; Yajima, T.; Wajjwalku, W.; Yoshikai, Y., A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing, *FASEB J* **2005**, *19*, 19-28.
- (37) Dubois, S.; Magrangeas, F.; Lehours, P.; Raher, S.; Bernard, J.; Boisteau, O.; Leroy, S.; Minvielle, S.; Godard, A.; Jacques, Y., Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 26978-26984.
- (38) Mortier, E.; Bernard, J.; Plet, A.; Jacques, Y., Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist, *J Immunol* **2004**, *173*, 1681-1688.
- (39) Budagian, V.; Bulanova, E.; Orinska, Z.; Ludwig, A.; Rose-John, S.; Saftig, P.; Borden, E. C.; Bulfone-Paus, S., Natural soluble interleukin-15Ralpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17), *J Biol Chem* **2004**, *279*, 40368-40375.
- (40) Ruchatz, H.; Leung, B. P.; Wei, X. Q.; McInnes, I. B.; Liew, F. Y., Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology, *J Immunol* **1998**, *160*, 5654-5660.
- (41) Rückert, R.; Brandt, K.; Braun, A.; Hoymann, H. G.; Herz, U.; Budagian, V.; Durkop, H.; Renz, H.; Bulfone-Paus, S., Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation in vivo, *J Immunol* **2005**, *174*, 5507-5515.
- (42) Smith, X. G.; Bolton, E. M.; Ruchatz, H.; Wei, X.; Liew, F. Y.; Bradley, J. A., Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival, *J Immunol* **2000**, *165*, 3444-3450.
- (43) Stryer, L. *Biochemie*; Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg Berlin Oxford, 1999.
- (44) Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M., Nuclear Induction, *Pys Rev* **1946**, *69*, 127.
- (45) Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V., Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid, *Phys Rev* **1946**, *69*, 37-38.

- 
- (46) Ernst, R. R.; Anderson, W. A., Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance, *Rev Sci Instr.* **1966**, *37*, 93-102.
- (47) Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; John Wiley & Sons, Inc: New York Chichester Brisbane Toronto Singapore, 1986.
- (48) Lottspeich, F.; Zorbas, H. *Bioanalytik*; Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 1998.
- (49) Fiaux, J.; Bertelsen, E. B.; Horwich, A. L.; Wüthrich, K., NMR analysis of a 900K GroELGroEScomplex, *Nature* **2002**, *418*, 207-211.
- (50) Ernst, R. R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A. *Prinziples of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*; Oxford University Press, Oxford, 1987.
- (51) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1998.
- (52) Ausuble, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. *Short protocols in molecular Biology*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1999.
- (53) Hanahan, D., Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, *J Mol Biol.* **1983**, *166*, 557-580.
- (54) Matsumoto, M.; Misawa, S.; Tsumoto, K.; Kumagai, I.; Hayashi, H.; Kobayashi, Y., On-column refolding and characterization of soluble human interleukin-15 receptor alpha-chain produced in Escherichia coli, *Protein Expr Purif* **2003**, *31*, 64-71.
- (55) Lämmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- (56) Gill, S. C.; von Hippel, P. H., Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal Biochem* **1989**, *182*, 319-326.
- (57) Chen, G. C.; Yang, J. T., Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid, *Anal Lett* **1977**, *10*, 1195-1207.
- (58) Grzesiek, S.; Bax, A., Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31-kDa protein, *J Magn Reson* **1992**, *96*, 432-440.
- (59) Schleucher, J.; Sattler, M.; Griesinger, C., Coherence selection by gradients without signal attenuation: application to three-dimensional HNC0 experiments, *Angew Chem Int Ed Engl* **1993**, *32*, 1489-1491.
- (60) Kay, L. E.; Xu, G. Y.; Yamazaki, T., Enhanced-sensitivity triple-resonance spectroscopy with minimal H<sub>2</sub>O saturation, *J Magn Reson*, **1994**, *A 109*, 129-133.
- (61) Montelione, G. T.; Lyons, B. A.; Emerson, S. D.; M., T., An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically-enriched proteins, *J Am Chem Soc* **1992**, *114*, 10974-10975.
- (62) Grzesiek, S.; Anglister, J.; Bax, A., Correlation of backbone and amide and aliphatic side-chain resonances in <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-enriched proteins by isotropic mixing of <sup>13</sup>C magnetization, *J Magn Reson* **1993**, *B 101*, 114-119.
- (63) Lyons, B. A.; Montelione, G. T., An HCCNH triple-resonance experiment using <sup>13</sup>C isotropic mixing for correlating backbone amide and side-chain aliphatic resonances in isotopically enriched proteins, *J Magn Reson* **1993**, *101 B*, 206-209.

- (64) Logan, T. M.; Olejniczak, E. T.; Xu, R. X.; Fesik, S. W., A general method for assigning NMR spectra of denatured proteins using 3D HC(CO)NH-TOCSY triple resonance experiments, *J Biomol NMR* **1993**, *3*, 225-231.
- (65) Clowes, R. T.; Boucher, W.; Hardman, C. H.; Domaille, P. J.; Laue, E. D., A 4D HCC(CO)NNH experiment for the correlation of aliphatic sidechain and backbone resonances in <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-labelled proteins, *J Biomol NMR* **1993**, *3*, 349-354.
- (66) Carlomagno, T.; Maurer, M.; Sattler, M.; Schwendinger, M. G.; Glaser, S. J.; Griesinger, C., PLUSH TACS Y: Homonuclear planar TACS Y with two-band selective shaped pulses applied to C $\alpha$ ,C' transfer and C $\beta$ ,C $\alpha$  aromatic correlations, *J Biomol NMR* **1996**, *8*, 161-170.
- (67) Ikura, M.; Kay, L. E.; Bax, A., Improved three-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H correlation spectroscopy of a <sup>13</sup>C-labeled protein using constant-time evolution, *J Biomol NMR* **1991**, *1*, 299-304.
- (68) Palmer, I. I. I. A. G.; Cavanagh, J.; Wright, P. E.; Rance, M., Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy, *JMR* **1991**, *93*, 151-170.
- (69) Kay, L.; Keifer, P.; Saarinen, T., Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity, *J Am Chem Soc* **1992**, *114*, 10663 - 10665.
- (70) Cordier, F.; Grzesiek, S., Direct Observation of Hydrogen Bonds in Proteins by Interresidue <sup>3</sup>hJNC' Scalar Couplings, *J Am Chem Soc* **1999**, *121*, 1601-1602.
- (71) Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A., NMRPipe: Multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes., *J Biomol NMR* **1995**, *6*, 277-293.
- (72) Johnson, B. A.; Blevins, R. A., NMRview: A computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J Biomol NMR* **1994**, *4*, 603-614.
- (73) Markley, J. L.; Bax, A.; Arata, Y.; Hilbers, C. W.; Kaptein, R.; Sykes, B. D.; Wright, P. E.; Wuthrich, K., Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy, *J Biomol NMR* **1998**, *12*, 1-23.
- (74) Liu, A.; Hu, W.; Majumdar, A.; Rosen, M. K.; Patel, D. J., Detection of very weak side chain-main chain hydrogen bonding interactions in medium-size <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-labeled proteins by sensitivity-enhanced NMR spectroscopy, *J Biomol NMR* **2000**, *17*, 79-82.
- (75) Güntert, P.; Mumenthaler, C.; Wüthrich, K., Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA, *J Mol Biol* **1997**, *273*, 283-298.
- (76) van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krüger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G. *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*; vdf Hochschulverlag AG: Zürich, 1996.
- (77) Vriend, G., WHAT IF: a molecular modeling and drug design program, *J Mol Graph* **1990**, *8*, 52-56.
- (78) Carson, M., Ribbons 2.0, *J Appl Crystallogr* **1991**, *24*, 946-950.
- (79) Nicholls, A.; Sharp, K. A.; Honig, B., Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins* **1991**, *11*, 281-296.

- 
- (80) Dingley, A. J.; Stephan Grzesiek, S., Direct Observation of Hydrogen Bonds in Nucleic Acid Base Pairs by Internucleotide 2JNN Couplings, *J Am Chem Soc* **1998**, *120*, 8293 - 8297.
- (81) Güntert, P.; Mumenthaler, C.; Wüthrich, K., Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA, *J Mol Biol* **1997**, *273*, 283-298.
- (82) Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V., Conformation of polypeptides and proteins, *Adv Protein Chem* **1968**, *23*, 283-438.
- (83) Rickert, M.; Wang, X.; Boulanger, M. J.; Goriatcheva, N.; Garcia, K. C., The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor, *Science* **2005**, *308*, 1477-1480.
- (84) Bernard, J.; Harb, C.; Mortier, E.; Quemener, A.; Meloen, R. H.; Vermot-Desroches, C.; Wijdeness, J.; van Dijken, P.; Grötzinger, J.; Slootstra, J. W.; Plet, A.; Jacques, Y., Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15, *J Biol Chem* **2004**, *279*, 24313-24322.
- (85) Liparoto, S. F.; Myszka, D. G.; Wu, Z.; Goldstein, B.; Laue, T. M.; Ciardelli, T. L., Analysis of the role of the interleukin-2 receptor gamma chain in ligand binding, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2543-2551.
- (86) Shen, B. J.; Hage, T.; Sebald, W., Global and local determinants for the kinetics of interleukin-4/interleukin-4 receptor alpha chain interaction. A biosensor study employing recombinant interleukin-4-binding protein, *Eur J Biochem* **1996**, *240*, 252-261.
- (87) Weiergräber, O.; Hemmann, U.; Kuster, A.; Müller-Newen, G.; Schneider, J.; Rose-John, S.; Kurschat, P.; Brakenhoff, J. P.; Hart, M. H.; Stabel, S.; Heinrich, P. C., Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization, *Eur J Biochem* **1995**, *234*, 661-669.
- (88) Mortier, E.; Quemener, A.; Vusio, P.; Lorenzen, I.; Boublik, Y.; Grötzinger, J.; Plet, A.; Jacques, Y., Soluble IL-15Ralpha sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15Rbeta /gamma: hyper-agonist IL-15-IL-15Ralpha fusion proteins, *J Biol Chem* **2005**, *281*, 1612-1619.
- (89) Pettit, D. K.; Bonnert, T. P.; Eisenman, J.; Srinivasan, S.; Paxton, R.; Beers, C.; Lynch, D.; Miller, B.; Yost, J.; Grabstein, K. H.; Gombotz, W. R., Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 2312-2318.
- (90) Boulanger, M. J.; Chow, D.-C.; Brevnova, E. E.; Garcia, K. C., Hexameric Structure and Assembly of the Interleukin-6/IL-6  $\alpha$  Receptor/gp130 Complex, *Science* **2003**, *300*, 2101-2104.
- (91) Liu, Z.; Geboes, K.; Colpaert, S.; D'Haens, G. R.; Rutgeerts, P.; Ceuppens, J. L., IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production, *J Immunol.* **2000**, *164*, 3608-3615.

## 9 Anhang

### Anhang I: Verwendete Puffer

#### TE- (Tris- EDTA)- Puffer:

- 10 mM Tris-HCl pH 8,0,
- 1 mM EDTA pH 8,0

#### Transformationspuffer:

- 10 mM K-MES, pH 6,2
- 100 mM RbCl
- 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- 45 mM MnCl<sub>2</sub>, → für 20 Minuten bei 121°C und 1 bar sterilisieren, anschließende Zugabe von
- 3 mM Hexamin Cobalt(III)Chlorid, sterilfiltriert

#### 10fach DNA-Autragspuffer:

- 0,33 g Orange G
- 0,33 g Bromphenol Blau
- 0,33 g Xylenecyanol
- 12,5 g Ficoll 4000
- 16,6 mM Tris/HCL pH 7,5
- 83,3 mM EDTA pH 8,0 → auf 50 ml mit dest. Wasser auffüllen.

#### Sammelgel (7,5%ig):

- 2,45 ml dest. Wasser
- 1,25 ml 1.5 mM Tris/HCl pH 8,8
- 50 µl 10 %ige SDS-Lösung
- 50 µl APS
- 1,25 ml Acrylamid (30%ig)
- 5 µl TEMED

**Trenngel (15%ig):**

- 2,75 ml dest. Wasser
- 3 ml 1.5 mM Tris/HCl pH 8,8
- 120 µl 10 %ige SDS-Lösung
- 120 µl APS
- 6 ml Acrylamid (30%ig)
- TEMED

**2fach reduzierender SDS-Probenpuffer nach Lämmli:**

- 20% Glycerin
- 10% Mercaptoethanol
- 4% SDS
- 125 mM Tris/HCl pH 6,8
- 0,005 % Bromphenolblau

**10fach SDS-Elektrophorese Laufpuffer**

- 144g Glycin
- 30g Tris
- 1% SDS → auf 1 Liter mit dest. Wasser auffüllen.

**Coomassie Blau Färbelösung:**

- 0,1% Brilliant Blue R-250
- 250 ml Methanol
- 100 ml Essigsäure → auf 1 Liter mit dest. Wasser auffüllen.

**Coomassie Entfärbungslösung:**

- 100 ml Methanol
- 100 ml Essigsäure → auf 1 Liter mit dest. Wasser auffüllen.

**Resuspensionspuffer**

- 50 mM Tris/ HCl pH 8,0
- 1 mM EDTA

**Waschpuffer**

- 50 mM Tris/ HCl pH 8,0
- 1 mM EDTA
- 2 mM Harnstoff

**Renaturierungspuffer**

- 20 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,4
- 20 mM Imidazol
- 150 mM NaCl

**Minimal Medium**

- 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2 g NaCl
- 0.24 g MgSO<sub>4</sub>
- 2 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl → auf 1 Liter auffüllen, bei 121°C und 1 bar für 20 Minuten sterilisieren, anschließend
- 1.86 g <sup>13</sup>C- Glucose oder 2 g <sup>12</sup>C-Glucose\*H<sub>2</sub>O zugeben.

**Anhang II****Verwendete Primer:**

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
asu_pQE_for	CCACGTTTGGTGGTGGCGACC	5' Primer, analytisch
asu_for	AACCATGGGCATCACATGCCCTCCCCCATGTCCG	5' Primer, präparativ
asu_pQE_rev	CCCAAGCTTCTAGTCTCTAATGC	3' Primer PCR



---

## Lebenslauf

Inken Lorenzen

- 12.11.1974                      Geboren in Niebüll
- Staatsangehörigkeit:        deutsch
- 1981-1985                      Besuch der Grundschule Ladelund
- 1985-1990                      Besuch der Hauptschule Leck, Hauptschulabschluss
- 1990-1992                      Besuch der Berufsfachschule Niebüll, sozialwirtschaftlicher  
Zweig Gesundheit, mittlere Reife
- 1992-1995                      Besuch des Fachgymnasium Niebüll, sozialwirtschaftlicher  
Zweig Ernährung allgemeine Hochschulreife
- 08.1995-06.1997              Ausbildung bei der Nordmilch e.G. Hohenwestedt mit Abschluss  
zur Milchwirtschaftlichen Laborantin
- 03.1998-08.1998              Angestellt bei der Nestlé AG in Kappeln als Milchwirtschaftliche  
Laborantin
- 09.1998-03.2003              Studium der Biochemie & Molekularbiologie an der Christian-  
Albrechts-Universität zu Kiel
- 09.2002-03.2003              Diplomarbeit am Zentrum für Molekularbiologie der Christian-  
Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. U.-P.  
Hansen, Thema: Expression eines anionenspezifischen Indikators  
in *Arabidopsis thaliana*.
- 03.2003                          Diplom im Fach Biochemie & Molekularbiologie
- seit 05.2003                      Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Biochemischen Institut der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

---

## ***Danksagung:***

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger für die Vergabe dieser interessanten Aufgabenstellung. Diese hat mich im Verlauf der Arbeit zunehmend begeistert. Weiterhin möchte ich mich bei ihm für die fachliche Betreuung und für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken, welches zu einem sehr angenehmen Arbeitsklima geführt hat.

Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John danke ich für die freundliche Aufnahme im Biochemischen Institut und für die Übernahme des Referats.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Leippe.

Andrew Dingley möchte ich für die Aufnahme der NMR-Spektren danken, für die gegebenen Tipps und für die Prozessierung einiger Spektren.

Sonja Hollmer war für mich eine große Hilfe, sowohl im Labor als auch im Überwinden „kleiner Mutlosigkeiten“.

Heiko Käßner danke ich für seine immer freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Aufnahme der NMR-Spektren im Forschungszentrum Borstel.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe, sowohl der ersten als auch der zweiten „Generation“, möchte ich mich für ein angenehmes, jeweils individuelles Arbeitsklima bedanken.

Oliver Hecht danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei NMR-spezifischen Problemstellungen, auch über seine Zeit in Kiel hinaus.

Justyna Mysliwy danke ich, ebenso wie Oliver Hecht, Philip Kraft, Michael Pachta und Andreas Schwantner, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie für ihre Unterstützung. Britta Hansen und Patrycja Kozak danke ich für ihre Hilfsbereitschaft. Der „zweiten Generation“ Sascha Jung, Agnes Nolting und Matthias Michalek danke ich für die Fortsetzung einer kollegialen Arbeitsatmosphäre.

Bei Alexander Schulte und Agnes Nolting bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dem gesamten Institut möchte ich für die freundliche Aufnahme, die angenehme Atmosphäre und Hilfsbereitschaft danken.

Björn Schuster danke ich für seinen unerbittlichen Glauben, dass die Struktur in zwei Tagen fertig wird!

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Rosemarie und Wolfgang Lorenzen, ohne die ich niemals diesen Weg gegangen wäre. Ebenso danke ich meiner Schwester Petra, die mich stets motiviert und unterstützt hat.

Danke!

## **Erklärung**

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

Auch wurde die Dissertation bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt.

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

Kiel, 13.03.2006

Inken Lorenzen

---

Referent/in: .....

Korreferent/in .....

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Zum Druck genehmigt: Kiel, .....

Der Dekan