

Bestimmung des IL-6-Bindungsepitops  
der dritten Domäne des humanen IL-6-Rezeptors  
mittels mehrdimensionaler  
heteronuklearer NMR-Spektroskopie

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

vorgelegt von

**Andreas Schwantner**

Kiel  
Dezember 2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Zytokine und ihre Rezeptoren	1
1.2	Interleukin-6-Typ-Zytokine	1
1.3	Die Familie der Interleukin-6-Typ-Rezeptoren	2
1.4	Der Interleukin-6-Rezeptor	4
1.5	Die dritte Domäne des Interleukin-6-Rezeptors	4
<b>2</b>	<b>Darstellung der Ergebnisse</b>	<b>6</b>
2.1	Darstellung der dritten Domäne des Interleukin-6-Rezeptors	6
2.1.1	Darstellung und Renaturierung	7
2.1.2	Reinigung	8
2.2	CD-Spektroskopie	9
2.2.1	Thermische Stabilität	9
2.3	NMR-Spektroskopie	12
2.3.1	1D- <sup>1</sup> H-NMR-Spektren	12
2.3.2	2D- <sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N-NMR-Spektren	13
2.3.3	3D- <sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C-NMR-Spektren	15
2.3.4	Die Sequentielle Zuordnung	16
2.3.4.1	Das 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH- und das 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment	16
2.3.4.2	Das 3D-(H)CC(CO)NH-Experiment	19
2.3.4.3	Das 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiment	20
2.3.4.4	Das 3D-HCCH-TOCSY-Experiment	20
2.3.4.5	Das 3D- <sup>15</sup> N-NOESY-HSQC- und das 3D- <sup>13</sup> C-HCCH-NOESY-Experiment	22
2.4	Sekundärstruktur der dritten Domäne des Interleukin-6-Rezeptors	25
2.4.1	Sekundärstrukturuntersuchung anhand des Chemical-Shift-Index (CSI)	25
2.4.2	Sekundärstrukturuntersuchung anhand der Long-Range-Konnektivitäten	26
2.4.3	Bestimmung des Interleukin-6 Bindungsepitops	27
<b>3</b>	<b>Zusammenfassung auf Deutsch</b>	<b>30</b>

<b>4</b>	<b>Summary</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>37</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Zytokine und ihre Rezeptoren

Jeder vielzellige Organismus ist auf eine präzise Abstimmung der in ihm ablaufenden komplexen Vorgänge angewiesen. Diese interzelluläre Steuerung und Regulation wird durch eine Vielzahl sezernierter humoraler Faktoren gewährleistet.

Insbesondere die Zytokine nehmen bei der Zell-Zell-Kommunikation eine Schlüsselrolle ein (Arai et al., 1997). Sie steuern die Entwicklung und Homöostase des Immunsystems, kontrollieren das hämatopoetische System und sind an der unspezifischen Abwehr beteiligt.

Zytokine umfassen die Interleukine, Lymphokine, Monokine, Interferone, den koloniestimulierenden Faktor und den Tumornekrose-Faktor (Thomson, 1991).

Ihre Synthese und Sezernierung lässt sich in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen unmittelbar nach Stimulation nachweisen.

## 1.2 Interleukin-6-Typ-Zytokine

Interleukin-6 (IL-6) selbst, namengebend für die Familie der Interleukin-6-Typ-Zytokine, ist beteiligt an der Hämatopoese, der Regulation der Immunantwort, der Akutphase-Reaktion, sowie der Zellproliferation und Tumorregression (Heinrich et al., 2003).

Aufgrund seines pleiotropen Wirkungsspektrums ist IL-6 an der Pathogenese verschiedener Krankheiten beteiligt, wie z. B. dem Auftreten des multiplen Myeloms, der postmenopausalen Osteoporose, der rheumatoiden Arthritis, dem Plasmacytom und dem Prostata-Karzinom, um nur einige zu nennen (Kallen, 2002).

Zu den Mitgliedern der IL-6-Typ-Familie gehören IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), Oncostatin M (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1) und cardiotrophin-like cytokine (CLC).

Sie alle weisen dasselbe „Vier-Helix-Bündel“ Faltungsmuster auf, das aus vier antiparallelen  $\alpha$ -Helices (A, B, C, D) mit up-up-down-down-Topologie besteht (Sprang and Bazan, 1993). Dieses Faltungsmuster wurde bisher nur bei Zytokinen beobachtet und ist daher als Charakteristikum dieser Moleküle anzusehen.

---

Verschiedene Kristall- und NMR-Strukturen bestätigten dieses Strukturmodell. Die Aufklärung der Tertiärstruktur gelang inzwischen für eine Reihe dieser Proteine (s. Übersichtsartikel Grötzinger (Grötzinger, 2002)).

### 1.3 Die Familie der Interleukin-6-Typ-Rezeptoren

Zytokine vermitteln ihre Funktion über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen. Als Typ-I-Transmembranproteine sind sie so in die Zellmembran eingebettet, dass ihr N-Terminus sich extrazellulär und ihr C-Terminus sich zytoplasmatisch befindet.

Sie sind extrazellulär modulartig aus Fibronectin-Typ-III (FN) und Immunglobulin-ähnlichen (Ig) Domänen aufgebaut. Die intrazellulären Teile dieser Rezeptoren besitzen keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, sind aber mit einer Familie von Tyrosin-Kinasen, den Januskinasen (JAK), konstitutiv assoziiert (Ward et al., 2000; Heinrich et al., 2003).

Die Zytokinbindung bewirkt eine Homo- bzw. Heterodimerisierung dieser Rezeptormoleküle, welche zur Aktivierung der assoziierten Kinasen führt und damit die zytoplasmatische Signalkaskade in Gang setzt. Letztendlich werden zytokinresponsive Zielgene im Nukleus aktiviert (Grötzinger, 2002; Heinrich et al., 2003).

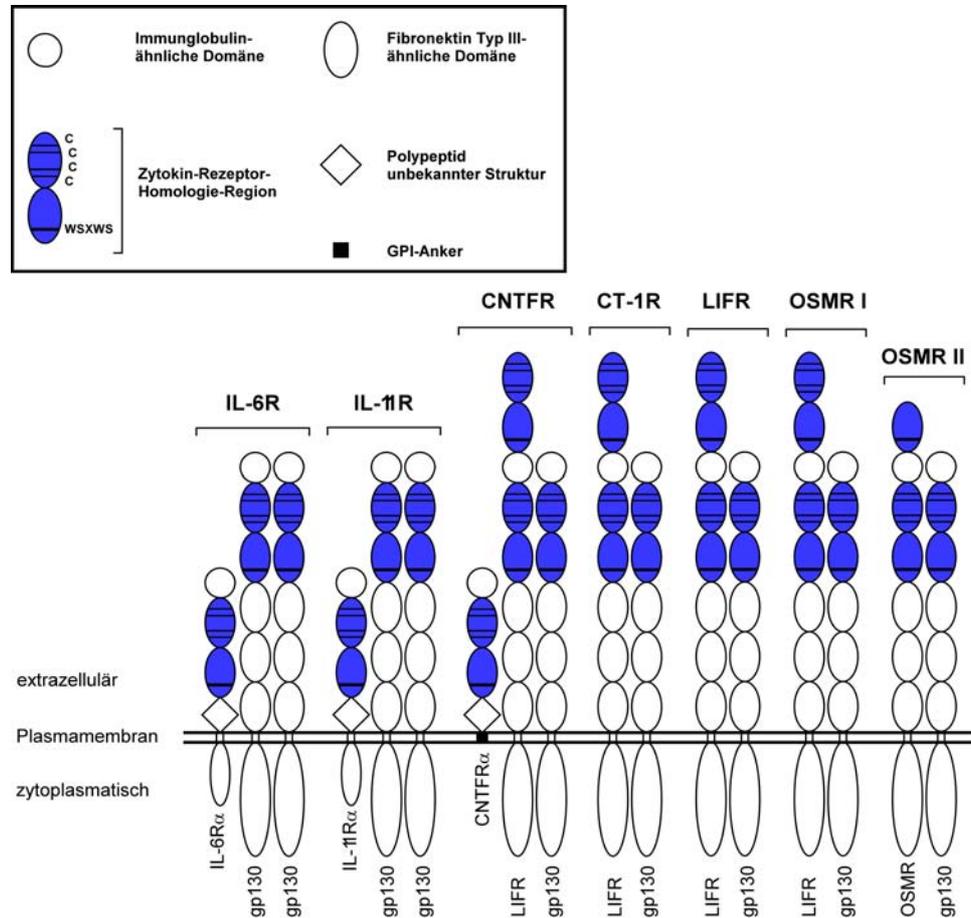
Zytokinen der IL-6-Typ-Familie ist dabei die Nutzung mindestens einer Glykoprotein 130 (gp130) Rezeptoruntereinheit gemein. Eine anschließende Oligomerisierung mit einem weiteren gp130-Molekül bzw. dem LIF-Rezeptor (LIFR) oder dem OSM-Rezeptor (OSMR) führt dann zur Signaltransduktion (Abbildung 1) (Grötzinger, 2002).

Mit Ausnahme des LIFR und des OSMR wurde für diese Rezeptoren gezeigt, dass sie sowohl in membranständiger als auch in löslicher Form vorliegen können (Heaney and Golde, 1996; Jones and Rose-John, 2002). Die lösliche Rezeptorform umfasst dabei nur den extrazellulären Teil des Proteins.

IL-6 und IL-11 wirken über Homodimere des gp130 auf ihre Zielzellen, wohingegen CNTF, CT-1, LIF und OSM über Heterodimere aus gp130 und dem LIFR ihr Signal weiterleiten. OSM kann dazu auch den OSMR rekrutieren.

IL-6, IL-11 und CNTF müssen, um die Rezeptoroligomerisierung initiieren zu können, zunächst an ihre spezifischen  $\alpha$ -Rezeptoruntereinheiten, IL-6R, IL-11R bzw. CNTFR gebunden sein. Im Gegensatz zu den anderen  $\alpha$ -Rezeptoren verfügt der CNTFR

weder über eine transmembrane noch über eine zytoplasmatische Region. Er ist über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker mit der Plasmamembran verankert (Davis et al., 1991; Sleeman et al., 2000).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung einiger prominenter Vertreter der Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokin-Familie: IL-6R, IL-11R, Ciliary neurotrophic factor-Rezeptor (CNTFR), Cardiotrophin-1-Rezeptor (CT-1R), Leukemia inhibitory factor-Rezeptor (LIFR), und die zwei alternativen Oncostatin M-Rezeptoren (OSMR I und II).

---

## 1.4 Der Interleukin-6-Rezeptor

Der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) gehört zu den Klasse-I-Zytokin-Rezeptoren, die durch Homologien im extrazellulären Bereich geprägt sind.

Von seinen 449 Aminosäuren verteilen sich 339 auf den extrazellulären, 28 auf den transmembranen und 82 auf den zytoplasmatischen Bereich. Als Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 80 kDa wird er auch als gp80 bezeichnet.

Der extrazelluläre Teil gliedert sich in 3 Domänen. Eine Ig-Domäne (D1) nimmt die N-terminale Position ein. Anschließend konstituiert sich aus zwei FN-Domänen (D2 und D3) die Zytokin-Rezeptor-Homologie-Region (CHR). Diese CHR weist in D2 vier hochkonservierte Cysteine und in D3 ein ebenso konserviertes Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS)-Sequenzmotiv auf.

Beide Domänen des CHR bestehen nach Sekundärstrukturvorhersagen aus sieben antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen (A-F) (Bazan, 1990; Bazan, 1990). Obwohl beide Domänen zusammen für die Wechselwirkungen mit dem Zytokin verantwortlich sind, trägt IL-6R-D3 alleine mehr als 90 % zur Bindungsenergie bei (Özbek et al., 1998).

Die zytoplasmatische Domäne des IL-6R weist keine Homologien zu bekannten Sequenzen anderer Proteine auf und ist irrelevant für die biologische Aktivität des Moleküls (Yawata et al., 1993).

## 1.5 Die dritte Domäne des Interleukin-6-Rezeptors

Die dritte extrazelluläre Domäne des  $\alpha$ -Rezeptors IL-6R besteht aus 126 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 14,7 kDa. Ihre Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

In neutraler Lösung sollten 870  $^1\text{H}$ -Resonanzen in einem Spektrum mit skalarer Verschiebungskorrelation beobachtbar sein. Nicht berücksichtigt wurden dabei die  $^1\text{H}_\text{N}$ -Protonen der Imidazolringsysteme, der Arginin- und Lysinseitenketten, der N-terminalen Aminogruppe sowie die OH-Protonen der Hydroxyl- und Carbonylgruppen, da diese schnell mit dem Lösungsmittel austauschen und daher nicht detektierbar sind.

**Tabelle 1:** Aminosäurezusammensetzung der dritten Domäne des IL-6R.

Aminosäure	Anzahl	Aminosäure	Anzahl	Aminosäure	Anzahl
Ala	9	Gly	5	Pro	10
Arg	10	His	5	Ser	11
Asn	4	Ile	3	Thr	11
Asp	4	Leu	8	Trp	8
Cys	1	Lys	2	Tyr	2
Gln	7	Met	4	Val	8
Glu	10	Phe	4		

Die Voraussetzung für die Strukturuntersuchung eines Proteins oder dessen Interaktion mit einem Liganden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ist die eindeutige Zuordnung der Resonanzen zu den jeweiligen Atomkernen.

Die Zuordnung der Resonanzen muss dabei sequenzspezifisch erfolgen. Dies bedeutet die eindeutige Zuordnung aller Signale zu ihren jeweiligen Kernen einer bestimmten Aminosäure in der Primärstruktur.

Strategien zur sequenzspezifischen Zuordnung sind von der  $^{15}\text{N}$ - bzw.  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Markierung des Proteins und den damit zugänglichen Spektren abhängig. Für kleine Proteine bis etwa 70 Aminosäuren kann dies prinzipiell vollständig durch die Anwendung homonuklearer, mehrdimensionaler  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und der sequenzspezifischen Zuordnungsstrategie von Wüthrich *et al.* erfolgen (Wüthrich, 1986).

---

## 2 Darstellung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation konnte mit Hilfe der mehrdimensionalen, heteronuklearen NMR-Spektroskopie die sequenzspezifische Resonanzzuordnung für die dritte Domäne des IL-6R durchgeführt werden.

Darauf aufbauend wurden die Sekundärstrukturelemente der IL-6R-D3 bestimmt und die Aminosäurereste identifiziert, die hauptsächlich an der Bindung zwischen dem IL-6R und IL-6 beteiligt sind. Diese Ergebnisse wurden in zwei Publikationen zusammengefasst (vgl. Kap. 6).

Im folgenden sollen die Inhalte der beiden Publikationen dargestellt, sowie wichtige Methoden erläutert werden.

### 2.1 Darstellung der dritten Domäne des Interleukin-6-Rezeptors

Die Ergebnisse mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-Experimente hängen stark von der Qualität der verwendeten Probe ab. Der Probenvorbereitung für die NMR-Spektroskopie muss daher besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden (Oppenheimer, 1989; Primrose, 1993).

Das Protein muss in seiner nativen Konformation vorliegen. Idealerweise sollten pH und Lösungsmittelzusammensetzung nahe bei den physiologischen Bedingungen liegen, so dass die Struktur- und Dynamikuntersuchungen den funktionell natürlichen Zustand des Proteins widerspiegeln.

Die Löslichkeit muss ausreichend hoch sein, um eine Spektrenaufnahme mit annehmbarem Signal-Rausch-Verhältnis in entsprechender Zeit zu ermöglichen. Dafür sind gewöhnlich Probenvolumina von 0,3 bis 0,5 ml mit einer Proteinkonzentration von ca. 1 mM notwendig. In diesem Konzentrationsbereich muss das Protein monodispers vorliegen und für die Zeitdauer der NMR-Messungen stabil sein.

Weiterhin beeinflussen die Temperatur, der pH-Wert, die Konzentration und die Pufferzusammensetzung die Löslichkeit, den Aggregationszustand und die Stabilität von Proteinen erheblich und müssen jeweils empirisch optimiert werden.

---

### 2.1.1 Darstellung und Renaturierung

Die Herstellung einer spektroskopisch geeigneten Proteinlösung erfordert zellbiologische und molekularbiologische Arbeiten und wurde, wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

Die in einen pRSET-Expressionsvektor (Firma Invitrogen) klonierte cDNA wurde in kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes BL21(DE3)pLysS transformiert (Özbek et al., 1998).

Zur Expression des rekombinanten Proteins wurden die transformierten Bakterien als Schüttelkulturen in einem auf 37 °C thermostatisierten Inkubator herangezogen. Die Induktion der Proteinexpression durch Derepression der RNA-Polymerase erfolgte bei Erreichen einer optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von 0,6 – 0,7 durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) zu einer Endkonzentration von 0,4 mM. Nach einer anschließenden dreistündigen Inkubation wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert, vom Medium abgetrennt, anschließend in Tris-Puffer resuspendiert und durch 3-maliges Einfrieren und Auftauen lysiert.

Diese so vorbehandelten Bakterien wurden dann mit 0,5 % Tween-20 (einem nichtionischen Tensid) versetzt und mit Hilfe einer *French Press* unter hohem Druck aufgeschlossen (Thermo Spectronic, 25 kbar).

Mit einer Sequenz von Ultraschallbehandlungen (Bandelin electronics GmbH, Sonopuls HD2200) konnten die Bakterienlysate weiter homogenisiert und vorgereinigt werden. Dabei wurde zu Beginn der Reinigung eine Reihe von Waschschritten mit tensidhaltigem Puffer durchgeführt. Diese Prozedur wurde durch weitere Waschschrritte ohne Tensid abgeschlossen.

Lösliche und unlösliche Bestandteile der Lysate konnten dann mittels SDS-PAGE und anschließender Gelfärbung hinsichtlich ihres Gehalts an rekombinanten Proteinen untersucht werden. Die dritte Domäne des IL-6R (IL-6R-D3) fiel dabei ausschließlich in unlöslicher, denaturierter Form in hochkompakten, sogenannten *inclusion bodies* (IBs) an, die einer *in vitro*-Reinigungs- und Renaturierungsprozedur unterzogen wurden.

Während der Reinigung und *in vitro*-Renaturierung wurde zur Unterdrückung thermischer Destabilisierung grundsätzlich bei 4 °C gearbeitet. Die Solubilisierung der IBs erfolgte unter stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (6 M Guanidinium-Hydrochlorid (GuHCl) (pH 4,0), 100 mM Dithiothreitol (DTT)).

In dieser Solubilisierungslösung wurden die IBs 30 min inkubiert, um vorhandene Aggregate zu monomerisieren. Unlösliche Bestandteile wurden dann per Zentrifugation abgetrennt.

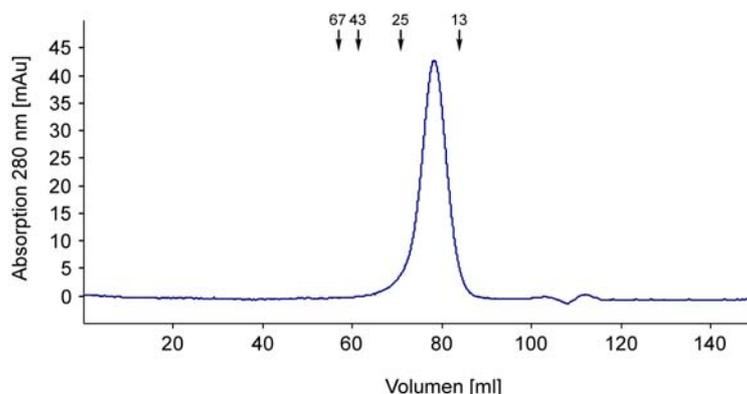
Danach erfolgte die Renaturierung der Domäne durch schnelle Verdünnung der Proteinlösung (Rudolph and Lilie, 1996) in den Renaturierungspuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 200 mM NaCl, 1,5 M L-Arginin, 0,5 mM EDTA, 0,02 % Natriumazid).

Dazu wurden aliquote Teile der solubilisierten IBs in einem Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und temperierter Renaturierungspuffer im Verhältnis 1:100 schnell zupipettiert. Die etwa 100-fache Verdünnung bewirkte die Renaturierung der Domäne bei gleichzeitiger Unterdrückung intermolekularer Protein-Protein-Wechselwirkungen.

## 2.1.2 Reinigung

Nach weiterer Zentrifugation zur Aggregatabtrennung wurde mittels einer im Anschluß an die Renaturierung durchgeführten Größenausschlußchromatographie die monomere dritte Domäne des IL-6R isoliert. Die Proteinkonzentration wurde mit berechneten Extinktionskoeffizienten per UV-Spektrometrie bestimmt.

In verdünnter Lösung (< 0,3 mg/ml) war auch nach einer Woche Lagerung bei 4 °C keine Aggregation festzustellen. Eine wiederholte Chromatographie des IL-6R-D3 zeigte einen einzelnen Proteinpeak bei einer Retentionszeit, die für globuläre monomere Proteine einer Masse von ca. 15 kDa charakteristisch ist (s. Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Gelfiltration nach Renaturierung von IL-6R-D3. Der für die isokratische Elution verwendete Puffer enthielt 50 mM Tris (pH 8,0), 200 mM NaCl und 0,5 mM EDTA. Die Retentionszeiten der vier verwendeten Markerproteine (Albumin 67 kDa, Ovalbumin 43 kDa, Chymotrypsinogen A 25 kDa, Ribonuclease A 13 kDa) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Bei einem Retentionsvolumen von 78 ml eluierte die IL-6R-D3.

---

## 2.2 CD-Spektroskopie

Der Erfolg der Renaturierung wurde durch den Circular dichroismus der dritten Domäne überprüft.

Die CD-Spektroskopie beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht. Amidgruppen weisen im Bereich des fernen UV (180-250 nm) in Abhängigkeit ihrer Sekundärstrukturen einen circularen Dichroismus auf.

CD-Spektren in diesem Spektralbereich können zur Bestimmung des relativen Anteils verschiedener Sekundärstrukturanteile eines Proteins verwendet werden. Diese Analyse basiert auf der Annahme, daß das CD-Spektrum eines Proteins im fernen UV durch eine Linearkombination bekannter CD-Spektren der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente dargestellt werden kann.

Dabei ergaben sich für die IL-6R-D3 ein dominierender  $\beta$ -Faltblatt-Strukturanteil von 56 % und kein Helixelement (Özbek et al., 1998).

### 2.2.1 Thermische Stabilität

Neben der Bestimmung der Sekundärstrukturelemente erlaubt die CD-Spektroskopie auch die Untersuchung der thermischen Stabilität des Proteins in Lösung.

Da hierbei auch kleine Volumina mit geringen Mengen an Protein eingesetzt werden können, ließ sich die Temperatursensitivität der IL-6R-D3 gut mit dieser spektroskopischen Methode verfolgen.

Die dritte Domäne des IL-6R besitzt allerdings nur eine geringe thermische Stabilität. Die Denaturierung des Proteins setzt bei einem pH von 6,8 oberhalb von 25 °C ein und bei 37 °C liegt ein Großteil davon bereits in denaturierter Form vor (Özbek et al., 1998).

Um optimale Bedingungen für die später folgenden NMR-Messungen erhalten zu können, wurde deshalb zunächst das Temperaturverhalten der IL-6R-D3 mittels CD-Spektroskopie untersucht.

Dabei wurde die ausgeprägte positive Bande des Proteins bei 232 nm als Maß des Faltungszustands beobachtet. Die Messtemperatur zu Beginn der Messung war der Temperaturstabilität der IL-6R-D3 angepasst und wurde schrittweise bis zur vollständigen Denaturierung des untersuchten Proteins erhöht.

---

Mit steigender Temperatur verringerte sich die Intensität des charakteristischen Maximums bei dieser Wellenlänge. Die betrachtete Elliptizität wurde normiert und als Funktion der Temperatur dargestellt. Auf diese Weise wurden Schmelzkurven des Proteins unter verschiedenen Bedingungen ermittelt (s. Abbildung 3).

Für die CD-Messungen kamen im nahen UV-Bereich (250-320 nm) ein Jasco J-600 Spektropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Ltd.), im fernen UV-Bereich (185-250 nm) ein Aviv CD-Spektrometer Modell 62 DS (AVIV Associates, Inc.) mit thermostatisierbarer Küvettenhalterung zum Einsatz.

Die Spektrometer wurden mit einer 0,1 %igen wässrigen (1S)-(+)-Campherlösung nach Chen & Yang kalibriert (Chen and Yang, 1977). Die spektralen Bandbreiten lagen bei 1 nm (Jasco) bzw. bei 2 nm (Aviv). Die gemessene Elliptizität wurde auf das mittlere Molgewicht der betrachteten Aminosäurereste bezogen:  $[\theta]_{MRW}[\text{grad} \times \text{cm}^2 \times \text{mol}^{-1}]$ .

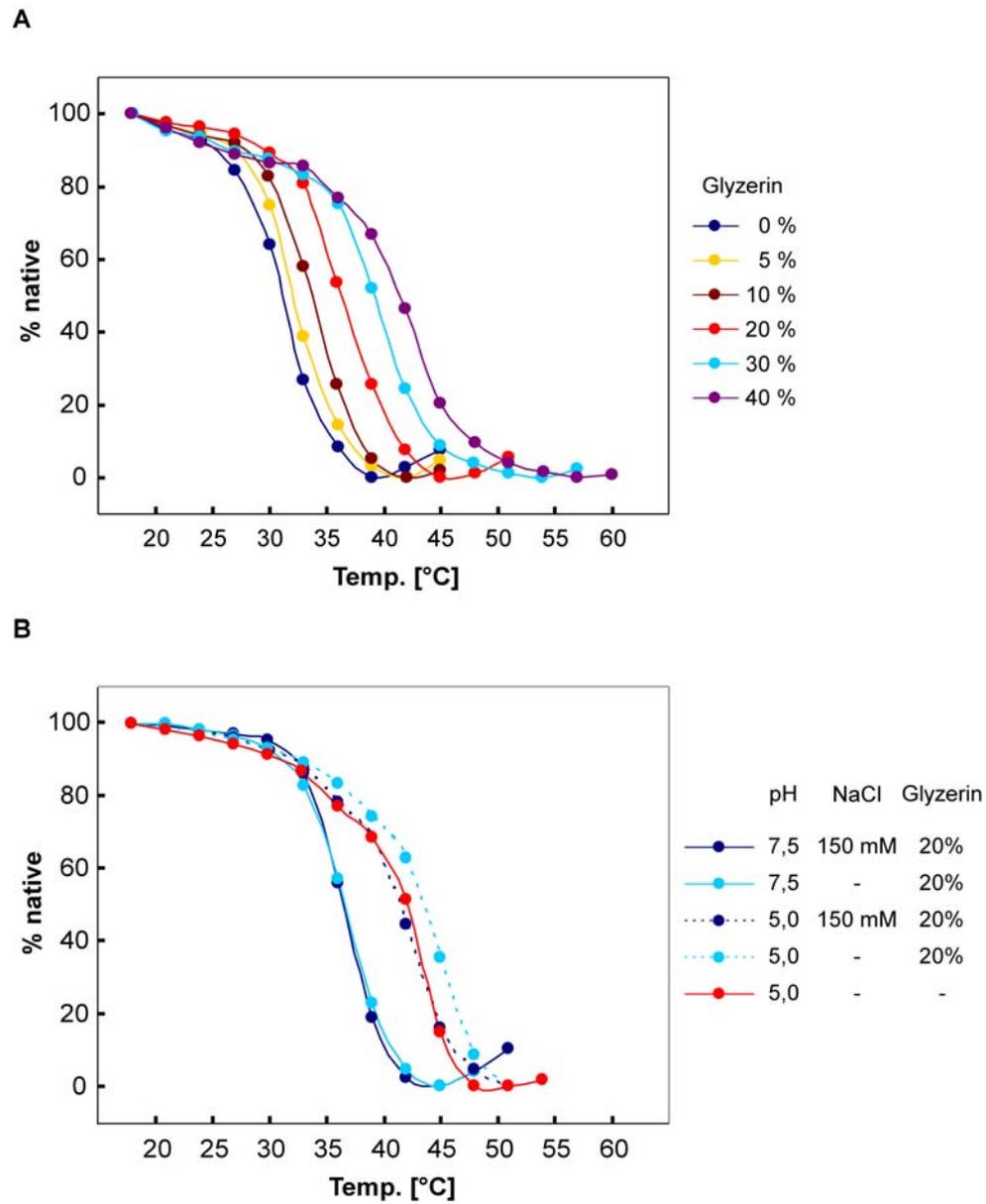
In den untersuchten Proben wurden als Parameter der pH-Wert, die NaCl-Konzentration und der Zusatz von Glycerin als Stabilisator variiert (s. Abbildung 3).

Im Renaturierungspuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 200 mM NaCl, 0,05 mM EDTA) erhöhte sich die gemessene Schmelztemperatur ( $T_M$ ) von 31 °C durch Glycerinzusatz (5, 10, 20, 30 und 40 %) um jeweils auf 32, 34, 36, 39 und 42 °C (Abbildung 3 A). Allerdings deutete der breiter werdende, graduelle Verlauf der Schmelzkurve auf eine instabile Proteinpopulation hin, deren Verhalten den raschen, kooperativen Denaturierungsprozess überlagerte (Plaxco et al., 1996).

Durch einen Wechsel des Puffersystems per Dialyse (50 mM Phosphatpuffer) und Absenken des pH-Wertes von 7,5 auf 5,0 sowie gleichzeitigen Verzicht auf NaCl-Zusatz konnte ebenfalls eine Erhöhung der Schmelztemperatur des Proteins von 31 °C auf 42 °C erreicht werden. Eine weitere Verbesserung ergab sich nur durch einen Lösungsmittelzusatz von 20 % Glycerin (s. Abbildung 3 B).

In den NMR-Messungen müsste ein Glycerinzusatz zur Vermeidung zusätzlicher Signale deuteriert erfolgen. Darüberhinaus würde eine Erhöhung der Viskosität der Lösung zu einer Signalverbreiterung führen.

Daher wurde für die weiteren NMR-Messungen das Puffersystem aus 50 mM Phosphat ohne Zusatz von NaCl und Glycerin verwendet.



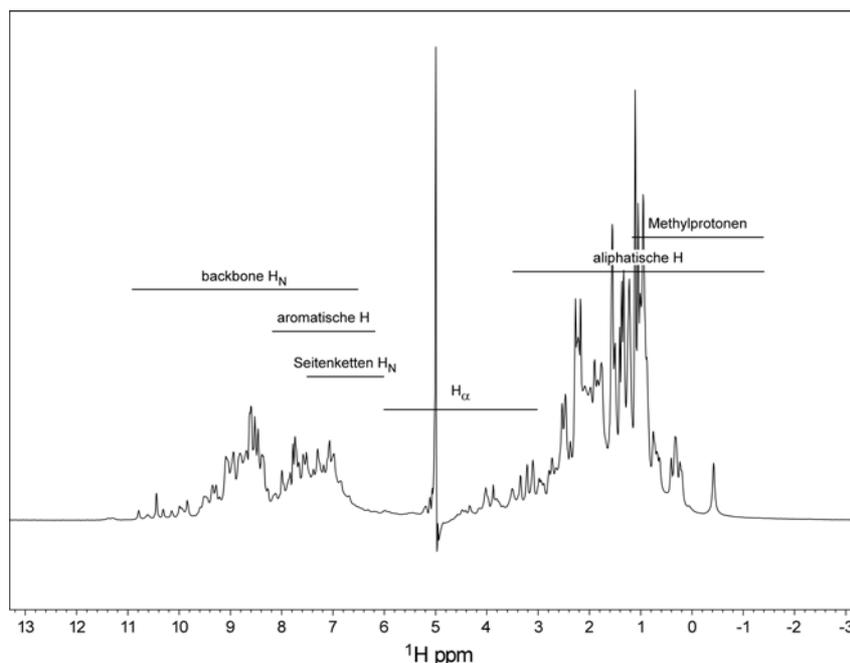
**Abbildung 3:** Das Temperaturverhalten von IL-6R-D3 unter A) Einfluss von Glycerin (w/w%), gepuffert durch 50 mM Tris (pH 8,0), 200 mM NaCl und unter B) 50 mM Phosphatpuffer mit pH 7,5 (durchgezogene Linien) und pH 5,0 (gestrichelte Linien), sowie mit und ohne Salz- bzw. Glycerin-Zusatz. Die normalisierte Elliptizität bei 232 nm ist als Funktion der Temperatur aufgetragen.

## 2.3 NMR-Spektroskopie

Nachdem die Bedingungen der unmarkierten dritten Domäne des IL-6R in Lösung optimiert worden waren, wurden erste NMR-spektroskopische Untersuchungen unternommen.

### 2.3.1 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren

Es wurde eine Lösung des Proteins (50 mM Phosphat, 0,5 mM EDTA (pH 5,0), 95 % H<sub>2</sub>O/5 % D<sub>2</sub>O) hergestellt und zu 0,5 mM konzentriert. Anhand dieser Probe ließen sich mit 1D-<sup>1</sup>H-Experimenten sowohl geeignete Messbedingungen bestimmen, als auch das Vorliegen monomeren Proteins mit einer definierten Tertiärstruktur überprüfen. Abbildung 4 zeigt ein solches 1D-<sup>1</sup>H-Spektrum der IL-6R-D3.



**Abbildung 4:** Eindimensionales Protonenspektrum von IL-6R-D3 bei 25 °C. Die typischen Bereiche der chemischen Verschiebung für Amid-, aromatische, Seitenketten-, H<sub>α</sub>-, aliphatische und Methylprotonen sind zur Orientierung mit eingezeichnet. Das Vorhandensein der Resonanzen zwischen 1,0 und 1,5 ppm ist indikativ für Proteine in gefaltetem Zustand (Wüthrich, 1986). Sie werden von Methylgruppen hervorgerufen, die sich in räumlicher Nähe zu aromatischen Aminosäureseitenketten befinden (Wüthrich, 1986). Im Frequenzbereich von 6,0 bis 10,0 ppm liegen die Resonanzen der Amidprotonen und der Protonen aromatischer Seitenketten. Die große Dispersion der Amidprotonen ist charakteristisch für Proteine mit hohem  $\beta$ -Faltblatt-Anteil. Die Linienbreiten der Resonanzen entsprechen denjenigen eines monomeren Proteins dieser Größe.

Das Vorhandensein scharfer Signale mit hoher Dispersion und Signalintensität im Bereich der Amidprotonen des Proteinerückgrates von 11,0-6,0 ppm und im Bereich der Methylprotonen ist charakteristisch für eine definierte Tertiärstruktur des Proteins (Wüthrich, 1986) und bestätigte somit die CD-spektroskopischen Ergebnisse.

Dabei deuten die Resonanzen in der Region der Amidprotonen, sowie der aromatischen Seitenkettenprotonen, von 11,0-6,0 ppm auf ein Protein mit überwiegender  $\beta$ -Faltblattstruktur hin (Wüthrich, 1986).

Der Bereich des Spektrums zwischen 6,0-4,5 ppm ist durch eine intensive Absorption der Wassermoleküle bei 5,0 ppm geprägt und überlagert etwaige tieffeldverschobene Signale von  $H_{\alpha}$ -Protonen, die in dieser Region für ein  $\beta$ -faltblattdominiertes Protein zu erwarten wären.

Ergänzend ergab die Messung der Rotationsdiffusion des Gesamtmoleküls mit Hilfe der  $T_2$ -Relaxationszeit einen Wert von 16,3  $\mu$ sec, welche der Rotationskorrelationszeit eines Monomers entspricht.

### 2.3.2 2D- $^1H/^{15}N$ -NMR-Spektren

Aus den homonuklearen NMR-Spektren ergab sich eine starke Überlagerung der Amidprotonenresonanzen, was für ein Protein dieser Größe auch zu erwarten ist. Mit Hilfe zweidimensionaler (2D), heteronuklearer NMR-Spektren lässt sich diese Überlagerung auflösen.

Detailliertere Informationen ließen sich durch ein 2D- $^1H/^{15}N$ -HSQC (Hetero Single Quantum Correlation)-Spektrum erhalten.

Für diese Experiment wurde  $^{15}N$ -markiertes Protein hergestellt. Zur Markierung des rekombinanten Proteins wurde die Expression in Minimalmedium durchgeführt, das außer 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) als einzige Nährstoffquellen  $^{15}N$ -markiertes Ammoniumsulfat (Cambridge Isotope Laboratories) und D-Glukose enthielt. Die Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben.

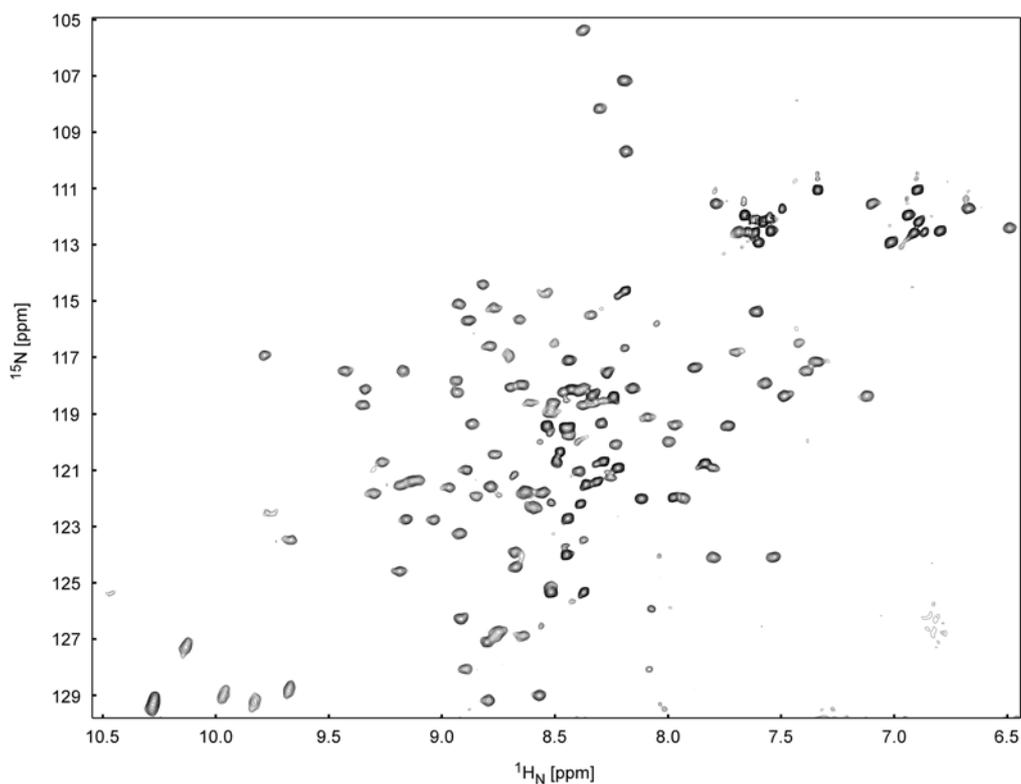
Standardpulssequenzen (2D-HSQC) wurden zur Aufnahme der  $^1H/^{15}N$ -NMR-Spektren verwendet (Croasmun, 1994).

Abbildung 5 zeigt das  $^1H/^{15}N$ -HSQC-Spektrum des IL-6R-D3. Jedes im Spektrum auftretende Signal repräsentiert ein an ein  $^{15}N$ -Atom gebundenes Proton. Das Spektrum besteht daher überwiegend aus den Signalen der  $^1H_N$ -Protonen des Proteinerückgrats (außer Prolin) und zusätzlich, je nach pH und Lösungsmittel-

exponiertheit, aus den Signalen der NH<sub>2</sub>-Gruppen der Seitenketten Asn und Gln bzw. der aromatischen <sup>1</sup>H<sub>N</sub>-Protonen von Trp und His.

Proteine mit einer definierten Tertiärstruktur ergeben Spektren mit einer großen Dispersion der Frequenzen. Die Resonanzen ungefalteter Proteine besitzen sehr ähnliche NMR-Frequenzen, so dass ihre Signale sich überlagern. Die große Dispersion der Resonanzen in der Abbildung 5 belegt daher ebenfalls den nativen Zustand der IL-6R-D3.

Die theoretisch maximale Anzahl aller Resonanzsignale wird, aufgrund spektraler Entartung und schnellem Austausch einiger Amidprotonen mit dem Lösungsmittel, erwartungsgemäß nicht erreicht. Da die 10 Proline der IL-6R-D3 in diesem Experiment keine Signale liefern, stimmen die 155 Resonanzen, die im Spektrum detektierbar sind, gut mit den 165 möglichen Resonanzen überein.



**Abbildung 5:** 2D-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum von IL-6R-D3. Das Spektrum wurde mit 1024 X 100 komplexen Datenpunkten aufgenommen.

Da auch diese NMR-spektroskopischen Experimente erfolgreich verliefen, wurde nun <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-markiertes Protein wie oben beschrieben hergestellt. Die unmarkierte D-Glukose wurde im Minimalmedium gegen <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-D-Glukose ausgetauscht.

### 2.3.3 3D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren

Der Einbau NMR-aktiver Heteroatome mit einem Kernspin  $I = \frac{1}{2}$ , wie  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$ , lässt eine experimentelle Korrelation der Protonenresonanzen mit diesen Kernen zu und führt zu einer Dispersion der überlagerten Signale in weitere Frequenzachsen.

Die Streuung der Signale in die weiteren Dimensionen der 3D- und 4D-Spektroskopie verschiebt das Überlappungsproblem förmlich in die Frequenzachsen der Heterokerne (Zuiderweg and Fesik, 1989) und erweitert den Bereich, welcher der NMR-Untersuchung zugänglich ist, auf eine Proteingröße von bis zu 40 kDa.

Neben der verbesserten spektralen Dispersion der Signale ermöglichte es erst die komplette Markierung mit  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$ , die Isolation der Spinsysteme einzelner Aminosäuren aufzuheben und erlaubte die Verwendung einer Reihe neuartiger NMR-Experimente, den sogenannten Tripelresonanz-Experimenten.

Hierbei werden die Netzwerke skalar gekoppelter, interresidualer Heterokerne benutzt und die sequentielle Zuordnung durchführbar, ohne auf interresiduale NOE-Kontakte zurückgreifen zu müssen, welche stark abhängig von der Sekundärstruktur sein können.

Die sequentielle Zuordnung verläuft hierbei über die  $^1\text{H}_{\alpha^-}$ ,  $^1\text{H}_{\beta^-}$ ,  $^{13}\text{C}_{\alpha^-}$ ,  $^{13}\text{C}_{\beta^-}$ ,  $^1\text{H}_{\text{N}^-}$ ,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{CO}$ -Kerne von Spinsystemen direkt benachbarter Aminosäuren. Eine vorherige Kenntnis der jeweiligen Spinsystemtypen ist bei dieser Strategie nicht mehr notwendig.

Die Bedeutung dieser Experimente für die Strukturaufklärung von Proteinen lässt sich an der Vielzahl der Veröffentlichungen ermesen, die seit der Einführung durch Bax im Jahr 1990 erschienen sind (Bax et al., 1990).

Für die Nomenklatur von Tripelresonanzexperimenten hat sich die folgende Systematik durchgesetzt. Die Kerne, deren Frequenzen sich während einer Evolutions- oder Akquisitionszeit entwickeln, werden mit HA, HB, CA, CB, NH, N und CO bezeichnet und stehen stellvertretend für die  $^1\text{H}_{\alpha^-}$ ,  $^1\text{H}_{\beta^-}$ ,  $^{13}\text{C}_{\alpha^-}$ ,  $^{13}\text{C}_{\beta^-}$ ,  $^1\text{H}_{\text{N}^-}$ ,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{CO}$ -Kerne. Kerne, über die lediglich Kohärenzen transferiert werden, deren Frequenzen sich jedoch in keiner der Evolutions- oder Akquisitionszeiten entwickeln, werden in Klammern angegeben.

Die an der IL-6R-D3 durchgeführten Experimente sind in Tabelle 2 zusammengefasst und wurden auf Spektrometern der Firmen Varian (Varian INOVA Unity 600) bzw. Bruker (Bruker DMX 600) aufgenommen. Die relevanten Parameter

der Experimente sind ebenfalls dort angegeben. Das Prozessieren der Rohdaten erfolgte mit dem Software-Paket NMRPipe (Delaglio et al., 1995). Die nachfolgende Analyse der Spektren wurde mit dem Programm NMRView durchgeführt (Johnson and Blevins, 1994).

**Tabelle 2:** Liste der NMR-Experimente, die an der dritten extrazellulären Domäne des IL-6R durchgeführt wurden. Sämtliche Experimente wurden bei einer Temperatur von 25°C und mit einer Probenkonzentration von 1mM aufgenommen.

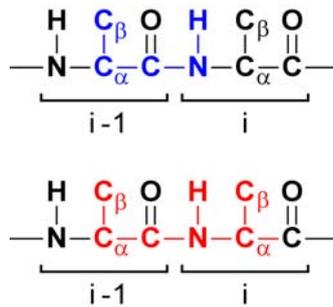
Experiment	Komplexe Punkte der Datenmatrix (Kern)			Spektrale Breite (Hz)		
	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>
(HBHA)CBCA(CO)NH (Grzesiek and Bax, 1992)	57 ( <sup>13</sup> C)	38 ( <sup>15</sup> N)	512 ( <sup>1</sup> H)	8446	1458	8389
(HBHA)CBCANH (Grzesiek and Bax, 1992)	57 ( <sup>13</sup> C)	33 ( <sup>15</sup> N)	512 ( <sup>1</sup> H)	8446	1458	8389
(H)CC(CO)NH (Logan et al., 1992)	73 ( <sup>13</sup> C)	38 ( <sup>15</sup> N)	512 ( <sup>1</sup> H)	10638	1458	8389
HNCA (Grzesiek and Bax, 1992)	41 ( <sup>15</sup> N)	46 ( <sup>13</sup> C)	512 ( <sup>1</sup> H)	1736	1667	9259
HNCO (Kay et al., 1990)	60 ( <sup>13</sup> C)	47 ( <sup>15</sup> N)	512 ( <sup>1</sup> H)	1667	1736	9259
HBHA(CBCACO)NH (Grzesiek and Bax, 1993)	70 ( <sup>1</sup> H)	36 ( <sup>15</sup> N)	512 ( <sup>1</sup> H)	3333	1458	8389
<sup>13</sup> C-HCCH-TOCSY (Bax et al., 1990)	96 ( <sup>1</sup> H)	64 ( <sup>13</sup> C)	256 ( <sup>1</sup> H)	3500	10500	3800
<sup>15</sup> N-NOESY-HSQC (Grzesiek and Bax, 1993)	100 ( <sup>1</sup> H)	44 ( <sup>15</sup> N)	512 ( <sup>1</sup> H)	7199	1900	4500
<sup>13</sup> C-HCCH-NOESY (Zuiderweg and Fesik, 1989)	96 ( <sup>1</sup> H)	64 ( <sup>13</sup> C)	512 ( <sup>1</sup> H)	8000	5300	8000

## 2.3.4 Die Sequentielle Zuordnung

### 2.3.4.1 Das 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH- und das 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment

Das 2D-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC-Experiment liefert weder Informationen über die Resonanzen der Seitenketten, noch gibt es Auskunft über sequentielle Konnektivitäten.

Die <sup>1</sup>H<sub>N</sub>/<sup>15</sup>N-Resonanzpaare dieses Experiments dienen als Startpunkte für die weitere Analyse der Tripelresonanzexperimente. Das Prinzip der sequentiellen Zuordnung mit Hilfe der beiden komplementären 3D-Spektren (HBHA)CBCA(CO)NH und (HBHA)CBCANH ist in Abbildung 6 skizziert.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des (HBHA)CBCA(CO)NH- (oben) und des komplementären (HBHA)CBCANH-Experiments (unten). Im (HBHA)CBCA(CO)NH-Experiment werden ausschließlich interresiduale Korrelationen zwischen  $^{13}\text{C}_\beta$ ,  $^{13}\text{C}_\alpha$ ,  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}_\text{N}$ -Kernen beobachtet (blau), das (HBHA)CBCANH-Experiment detektiert sowohl inter- als auch intraresiduale Korrelationen (rot).

Durch die Auswertung des (HBHA)CBCA(CO)NH-Experiments werden interresiduale Korrelationen zwischen den  $^1\text{H}_\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kernen eines Aminosäurerestes  $i$  und den  $^{13}\text{C}_\beta$ - und  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Kernen des sequentiell benachbarten, vorhergehenden Restes  $i-1$  erhalten.

Die Erweiterung durch das (HBHA)CBCANH-Experiment generiert sowohl inter- als auch intraresiduale Korrelationen zwischen den  $^1\text{H}_\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kernen des Aminosäurerestes  $i$  und den  $^{13}\text{C}_\beta$ - und  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Kernen der Aminosäurereste  $i$  und  $i-1$ .

Proline liefern dabei keine Signale im (HBHA)CBCANH- und können nur im (HBHA)CBCA(CO)NH-Experiment durch den ihnen nachfolgenden Aminosäurerest identifiziert werden. Glyzine führen aufgrund des nicht vorhandenen  $\text{C}_\beta$ -Atoms in beiden 3D-Spektren zu einer reduzierten Zahl von Signalen.

Dies eröffnet einen Weg für eine nahezu vollständige, sequentielle Zuordnung (Abbildung 7).

In den Fällen von spektraler Überlagerung kann aufgrund seiner reduzierten Signalzahl das HNCA-Experiment zur Aufklärung beitragen. Die erweiterte Kombination mit dem komplementären HN(CO)CA-Experiment ist allerdings durch den engen Bereich der  $^{13}\text{C}_\alpha$ -chemischen Verschiebungen in der Praxis eingeschränkt (Kraulis, 1994).

Die Korrelation weiterer  $^{13}\text{C}$ -Kerne mit  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}_\text{N}$ -Kernen bietet den Vorteil, bei Überlappungen der  $^{13}\text{C}_\alpha$ -chemischen Verschiebung trotzdem den Aminosäurerest zu identifizieren. Dadurch lässt sich der jeweilige Spinsystem-Typ bestimmen und die sequentielle Zuordnung eines Peptidsegments in der Primärstruktur ermöglichen.

---

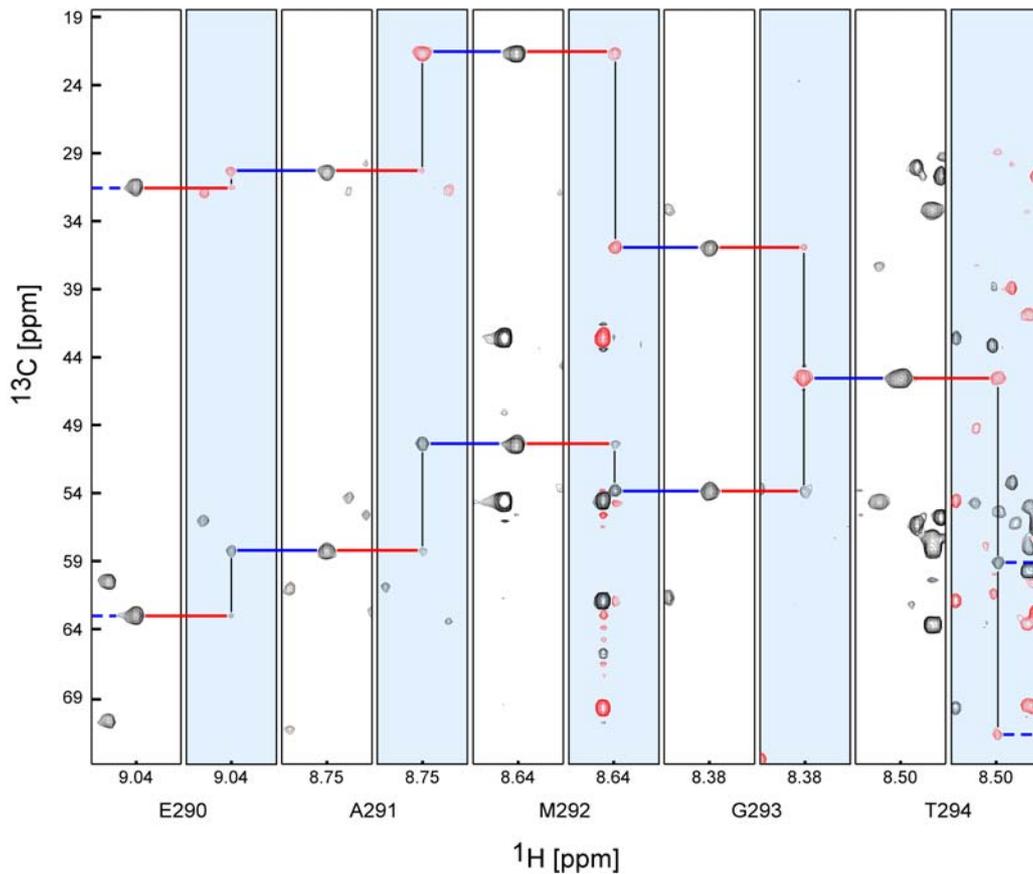
Zu Beginn der sequentiellen Zuordnung werden für einen beliebigen Aminosäurerest  $i$  aus den beiden dreidimensionalen Spektren (für ein aus dem 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum ermitteltes  $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ -Resonanzpaar) entsprechende zweidimensionale Ausschnitte extrahiert, kombiniert und miteinander verglichen (Abbildung 7).

Signale gleicher  $^{13}\text{C}$ -chemischer Verschiebung (rote Linien) entsprechen dabei den  $^{13}\text{C}_\alpha-/^{13}\text{C}_\beta$ -Frequenzen des Aminosäurerestes  $i-1$  die sich im 3D-(HBHA)CBCANH-Spektrum auf der  $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ -Spur des Aminosäurerestes  $i-1$  wiederfinden, und auf der sich ebenfalls die  $^{13}\text{C}_\alpha-/^{13}\text{C}_\beta$ -Resonanzsignale des Aminosäurerestes  $i-2$  befinden.

Die übrigen Signale entsprechen den  $^{13}\text{C}_\alpha-/^{13}\text{C}_\beta$ -Frequenzen des Aminosäurerestes  $i$  und können im 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Spektrum bei der  $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ -Frequenz des Aminosäurerestes  $i+1$  wiedergefunden werden (blaue Linien).

Welche Resonanzsignale den  $^{13}\text{C}_\alpha$ - bzw.  $^{13}\text{C}_\beta$ -Kernen zugeordnet werden muss, kann anhand des 3D-(HBHA)CBCANH-Spektrums entschieden werden, in welchem die Resonanzsignale der  $^{13}\text{C}_\beta$ -Kerne mit negativer Intensität (rot) auftreten. Die beschriebene Prozedur ist für fünf Aminosäurereste ( $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ -Frequenzpaare) in Abbildung 7 veranschaulicht.

Nachdem anhand dieser Strategie die  $^{13}\text{C}_\alpha$ -,  $^{13}\text{C}_\beta$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}_\text{N}$ -Resonanzen der fünf sequentiell benachbarten Aminosäurereste zugeordnet werden konnten, wurden diese aufgrund der für die einzelnen Spinsysteme charakteristischen  $^{13}\text{C}_\alpha-/^{13}\text{C}_\beta$ -chemischen Verschiebungen dem Peptidsegment Glu290, Ala291, Met292, Gly293 und Thr294 in der Primärstruktur des IL-6R-D3 zugewiesen.

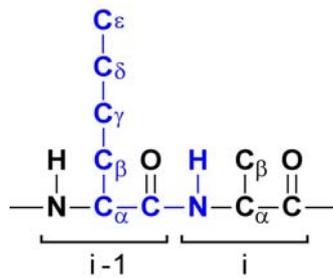


**Abbildung 7:** Beispiel der sequentiellen Zuordnung der  $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -,  $^{13}\text{C}_{\beta}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}_\text{N}$ -Resonanzen für das Fragment Glu290 bis Thr294 der dritten Domäne des IL-6R. Dieses Fragment umfasst den  $\beta$ -Faltblattstrang G. Den jeweiligen Aminosäureresten sind 2D-Ausschnitte der Tripelresonanz-Experimente (HBHA)CBCA(CO)NH und (HBHA)CBCANH (blau hinterlegt) zugehörig. Die roten Linien kennzeichnen identische Resonanzsignale innerhalb, die blauen Linien identische Resonanzsignale zwischen den kombinierten Ausschnitten. Schwarze Linien kennzeichnen den Verlauf der sequentiellen Zuordnung. Die Resonanzsignale der  $^{13}\text{C}_{\beta}$ -Kerne erhalten im (HBHA)CBCANH-Experiment eine negative Intensität und werden deshalb in Rot dargestellt.

### 2.3.4.2 Das 3D-(H)CC(CO)NH-Experiment

Die Resonanzzuordnung der aliphatischen Seitenketten- $^{13}\text{C}$ -Kerne kann durch das 3D-(H)CC(CO)NH-Experiment vervollständigt werden.

Das 3D-(H)CC(CO)NH-Experiment liefert ausschließlich interresiduale Korrelationen zwischen den  $^{13}\text{C}$ -Kernen eines Aminosäurerestes  $i-1$  und den  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}_\text{N}$ -Kernen des sequentiell benachbarten Aminosäurerestes  $i$  (Abbildung 8, ausgenommen  $^{13}\text{C}$ -Kerne aromatischer Ringsysteme). Da die  $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ -Frequenzen der Aminosäurereste aus der sequentiellen Zuordnung bekannt sind, können die  $^{13}\text{C}$ -Seitenkettenresonanzen sequenzspezifisch zugeordnet werden.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des 3D-(H)CC(CO)NH-Experiments. In diesem Experiment werden ausschließlich interresiduale Korrelationen zwischen  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}_\text{N}$ -Kernen erzeugt.

### 2.3.4.3 Das 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiment

Das 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiment erweitert die Resonanzbestimmung auf die  $\alpha$ - und  $\beta$ -ständigen aliphatischen Seitenkettenprotonen. Auch hierbei wurden die zu bestimmenden Kerne des Aminosäurerestes  $i-1$  mit den  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}_\text{N}$ -Kernen des sequentiell benachbarten Aminosäurerestes  $i$  korreliert und sequenzspezifisch zugewiesen.

### 2.3.4.4 Das 3D-HCCH-TOCSY-Experiment

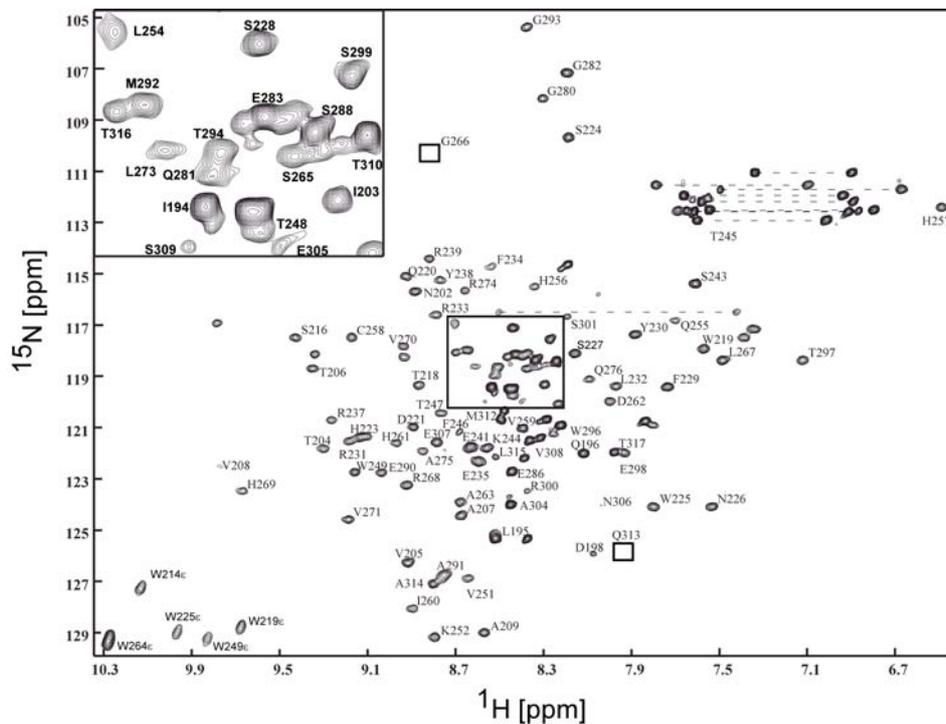
NMR-Experimente, wie das 3D-(H)CC(CO)NH-Experiment, die einen C,C-Magnetisierungstransfer nutzen, um über die Korrelation der Seitenkettenprotonen mit Resonanzen des Proteinrückgrates die Seitenkettenzuordnung zu erlauben, werden mit zunehmendem Molekulargewicht unsensitiver.

Daher wurden nicht detektierte Seitenketten-Resonanzen mit dem 3D-HCCH-TOCSY-Experiment ergänzt (Bax et al., 1990; Fesik et al., 1990; Olejniczak et al., 1992; Majumdar et al., 1993). In diesem Experiment werden die  $^1\text{H}$ -Kerne der Seitenketten mit den direkt gebundenen  $^{13}\text{C}$ - und allen intraresidualen, aliphatischen  $^1\text{H}$ -Kernen korreliert.

Die chemischen Verschiebungen der zusammengehörigen  $^1\text{H}_{\alpha/\beta}$ - und  $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ -Kerne aus den vorangegangenen Experimenten wurden dabei benutzt, um die Seitenkettenresonanzen mit den bereits sequentiell zugeordneten  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}_\text{N}$ -Kernen zu verknüpfen.

Die bisher getroffene sequentielle Zuordnung wurde durch die Auswertung der 3D-(H)CC(CO)NH-, 3D-HBHA(CBCACO)NH- und 3D-HCCH-TOCSY-Experimente verifiziert.

In Abbildung 9 sind den  $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ -Resonanzsignalen im 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum die entsprechenden Aminosäurereste der IL-6R-D3 zugeordnet.



**Abbildung 9:** 2D- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der dritten Domäne des IL-6R. Die  $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ -Resonanzsignale von D3 sind mit den zugehörigen Aminosäureresten markiert. Die Seitenkettenamidprotonen der Aminosäurereste Asparagin und Glutamin sind durch waagerechte Linien miteinander verbunden. Resonanzsignale die aufgrund geringer Intensität nicht sichtbar sind, wurden durch kleine Vierecke gekennzeichnet.

Darüberhinaus lässt sich mittels der Analyse der NOESY-Spektren die Resonanzzuordnung der Seitenketten komplettieren.

### 2.3.4.5 Das 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC- und das 3D-<sup>13</sup>C-HCCH-NOESY-Experiment

In einem 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Experiment werden die Amidprotonen eines Aminosäurerestes *i* mit den kovalent verknüpften <sup>15</sup>N-Kernen und allen räumlich benachbarten Protonen korreliert, deren Abstand kleiner als 5 Å ist.

Daher finden sich im 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Spektrum überwiegend Konnektivitäten, welche die lokale Umgebung des Proteinerückgrates und damit die Sekundärstruktur des Proteins beschreiben.

Aus der sequentiellen Zuordnungsstrategie nach Wüthrich ist bekannt, dass sich NOESY-Kreuzsignale nach den Distanzen ( $< 2,4, \leq 3,0 \leq 3,6$  Å) als stark, mittel und schwach klassifizieren lassen. Zuordnungen, die auf den starken <sup>1</sup>H<sub>α</sub>- und <sup>15</sup>N-Konnektivitäten zwischen den Aminosäureresten *i* und *i*+1 basieren, erweisen sich in der Praxis als sehr verlässlich ( $> 90$  %) (Billeter et al., 1982).

Daraus folgt, dass starke <sup>1</sup>H<sub>α</sub>- und <sup>15</sup>N-Konnektivitäten (d<sub>αN</sub>-Konnektivitäten) ausreichend sind, um ein betrachtetes Spinsystem sequentiell zuzuordnen. Ähnliche Beobachtungen gelten auch für die <sup>1</sup>H<sub>N</sub>-Konnektivitäten (d<sub>NN</sub>-Konnektivitäten) aufeinanderfolgender Aminosäurereste.

Die bisher getroffene sequentielle Zuordnung ließ sich mit dem <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Experiment zusätzlich verifizieren und ist in Abbildung 10 am Beispiel der Aminosäurereste Asn202 bis Thr206 dargestellt. Außer den sequentiellen Konnektivitäten sind im <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC-Spektrum auf den Spuren der einzelnen <sup>1</sup>H<sub>N</sub>-Kerne auch intraresiduale Kontakte von Aminosäureresten beobachtbar, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen können, aber durch die Proteinkonformation dennoch räumlich benachbart sind. Diese sogenannten Long-Range-Kontakte liefern sowohl für die Sekundärstrukturbestimmung als auch für eine spätere Proteinstrukturberechnung sehr wichtige Informationen (s. Kap. 2.4.2.).

In dem 3D-HCCH-NOESY-Experiment werden die aliphatischen Protonen eines Aminosäurerestes *i* mit den kovalent verknüpften <sup>13</sup>C-Kernen und allen räumlich benachbarten Protonen korreliert, deren Abstand kleiner als 5 Å ist.

Weiterhin lassen sich im 3D-<sup>13</sup>C-HCCH-NOESY-Experiment auch Seitenketten-Seitenketten-Kontakte ermitteln, die die räumliche Anordnung der einzelnen Sekundärstrukturelemente zueinander beschreiben.

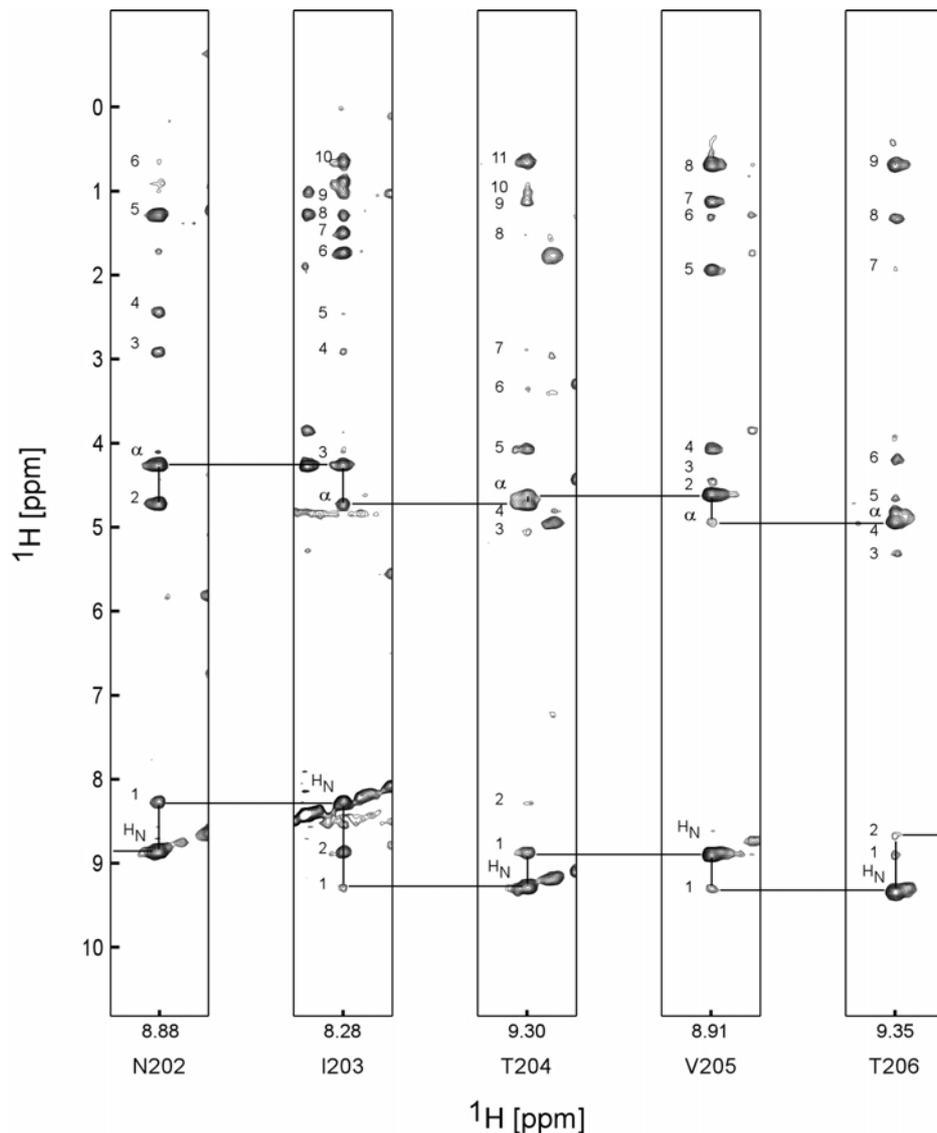
---

Ferner können charakteristische interresiduale  $^1\text{H}_\alpha/{}^1\text{H}_\alpha$ -Long-Range-Konnektivitäten ( $d_{\alpha\alpha}$ -Konnektivitäten) identifiziert werden, die die Unterscheidung von parallelen und antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen erlauben (s. Kap. 2.4.2.)

Die Ergebnisse der sequentiellen Zuordnung und die Bestimmung der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne wurden in der Veröffentlichung

Andreas Schwantner, Andrew J. Dingley, Suat Özbek, Oliver Hecht, Stefan Rose-John, Joachim Grötzinger (2003),  **$^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  backbone assignment of the carboxyl terminal domain of the cytokine binding module of the interleukin-6 receptor**, J. Biomol. NMR (in Druck)

zusammengefasst und die chemischen Verschiebungen in der BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) Datenbank hinterlegt (Accession number BMRB-5940).



**Abbildung 10:** Ausschnitte aus dem 3D- $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum der IL-6R-D3 mit den sequentiellen Aminosäureresten Asn202 – Thr206 bei ihren entsprechenden  $^1\text{H}_\text{N}$ -Resonanzen. Das gewählte Fragment der IL-6R-D3 erstreckt sich über den Bereich des  $\beta$ -Faltblattstranges A. Die durchgezogenen horizontalen Linien verdeutlichen dabei den Verlauf der sequentiellen Zuordnung. Den Kreuzsignalen wurden folgende Konnektivitäten zugeordnet.  $\text{H}_\text{N}$ Asn202: 1  $\text{H}_\text{N}$ Ile203; 2  $\text{H}_\alpha$ Ala201;  $\alpha$   $\text{H}_\alpha$ Asn202; 3  $\text{H}_{\beta 2}$ Asn202; 4  $\text{H}_{\beta 1}$ Asn202; 5  $\text{H}_{\beta 1}$ Ala201; 6  $\text{H}_{\delta 11}$ Ile203.  $\text{H}_\text{N}$ Ile203: 1  $\text{H}_\text{N}$ Thr204; 2  $\text{H}_\text{N}$ Asn202;  $\alpha$   $\text{H}_\alpha$ Ile203; 3  $\text{H}_\alpha$ Asn202; 4  $\text{H}_{\beta 2}$ Asn202; 5  $\text{H}_{\beta 1}$ Asn202; 6  $\text{H}_{\beta}$ Ile203; 7  $\text{H}_{\gamma 12}$ Ile203; 8  $\text{H}_{\gamma 11}$ Ile203; 9  $\text{H}_{\gamma 21}$ Ile203 (spaltet auf); 10  $\text{H}_{\delta 11}$ Ile203.  $\text{H}_\text{N}$ Thr204: 1  $\text{H}_\text{N}$ Val205; 2  $\text{H}_\text{N}$ Ile203; 3  $\text{H}_\alpha$ Trp219; 4  $\text{H}_\alpha$ Ile203;  $\alpha$   $\text{H}_\alpha$ Thr204; 5  $\text{H}_\beta$ Thr204; 6  $\text{H}_{\beta 2}$ Trp219; 7  $\text{H}_{\beta 1}$ Trp219; 8  $\text{H}_{\gamma 12}$ Ile203; 9  $\text{H}_{\gamma 21}$ Thr204; 10  $\text{H}_{\gamma 21}$ Ile203; 11  $\text{H}_{\delta 11}$ Ile203.  $\text{H}_\text{N}$ Val205: 1  $\text{H}_\text{N}$ Thr206;  $\alpha$   $\text{H}_\alpha$ Val205; 2  $\text{H}_\alpha$ Thr204; 3  $\text{H}_{\alpha 2}$ Gly293; 4  $\text{H}_\beta$ Thr204; 5  $\text{H}_\beta$ Val205; 6  $\text{H}_\alpha$ Ala291; 7  $\text{H}_{\gamma 21}$ Thr204; 8  $\text{H}_{\gamma 11}$ Val205.  $\text{H}_\text{N}$ Thr206: 1  $\text{H}_\text{N}$ Val205; 2  $\text{H}_\text{N}$ Ala207; 3  $\text{H}_\alpha$ Val217; 4  $\text{H}_\alpha$ Val205;  $\alpha$   $\text{H}_\alpha$ Thr206; 5  $\text{H}_\alpha$ Leu215; 6  $\text{H}_\beta$ Thr206; 7  $\text{H}_\beta$ Val205; 8  $\text{H}_{\gamma 21}$ Thr206; 9  $\text{H}_{\gamma 11}$ Val205.

---

## 2.4 Sekundärstruktur der dritten Domäne des Interleukin-6-Rezeptors

### 2.4.1 Sekundärstrukturuntersuchung anhand des Chemical-Shift-Index (CSI)

In gefalteten Proteinen ist die Äquivalenz aller Resonanzen aufgehoben, wobei die strukturinduzierten Resonanzverschiebungen je nach Kern in bestimmten Bereichen variieren. In statistischen Auswertungen zeigte sich bisher, dass die chemischen Verschiebungen von  $^1\text{H}_{\alpha^-}$ ,  $^{13}\text{C}_{\alpha^-}$ ,  $^{13}\text{C}_{\beta^-}$  und  $^{13}\text{CO}$ -Kernen sehr verlässlich mit der Sekundärstruktur des Proteins korrelieren (Spera and Bax, 1991).

Die chemische Verschiebung in Protein-NMR-Spektren stellt deshalb einen wichtigen Parameter dar, mit dem zuverlässige Aussagen über die Sekundärstrukturelemente des zu untersuchenden Proteins getroffen werden können (Spera and Bax, 1991).

Dabei ist die Bestimmung von Sekundärstrukturelementen abhängig von der Vollständigkeit der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen (Szilagyi and Jardetzky, 1989; Pastore and Saudek, 1990).

Eine Methode, die auf einer qualitativen Interpretation von  $^1\text{H}_{\alpha^-}$ ,  $^1\text{H}_{\text{N}^-}$ ,  $^{13}\text{C}_{\alpha^-}$  und  $^{13}\text{C}_{\beta^-}$ -chemischen Verschiebungen basiert, beinhaltet den Vergleich der experimentell ermittelten chemischen Verschiebungen mit sog. Random-Coil-Verschiebungen. Je nach Abweichung davon werden die so erhaltenen sekundären chemischen Verschiebungen mit einem Chemical-Shift-Index (CSI) ausgezeichnet und darauf aufbauend Sekundärstrukturelementen zugewiesen (Wishart et al., 1992; Wishart and Sykes, 1994).

Die Anwendung und Ergebnisse der CSI-Methode sind in der Veröffentlichung

Andreas Schwantner, Andrew J. Dingley, Suat Özbek, Stefan Rose-John, Joachim Grötzinger (2003), **Direct determination of the interleukin-6 binding epitope of the interleukin-6-receptor by NMR spectroscopy**, J. Biol. Chem. (in Druck)

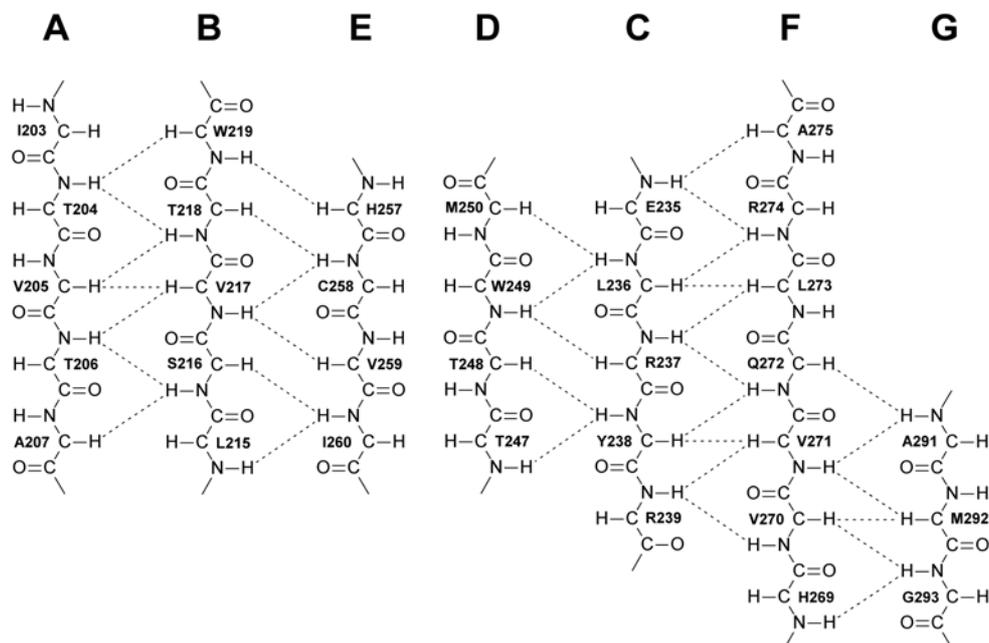
ausführlich beschrieben.

## 2.4.2 Sekundärstrukturuntersuchung anhand der Long-Range-Konnektivitäten

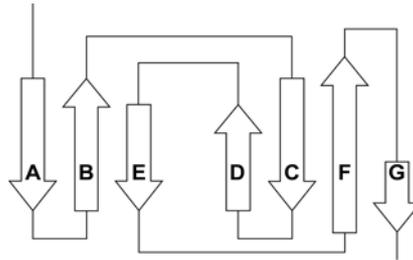
Unter Berücksichtigung der Long-Range-Konnektivitäten aus dem 3D-<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC- und dem 3D-<sup>13</sup>C-HCCH-NOESY-Spektrum, sowie der Ergebnisse aus der CSI-Untersuchung, liess sich die Sekundärstruktur der IL-6R-D3 skizzieren. Die charakteristischen  $d_{NN^-}$ ,  $d_{\alpha N^-}$  und  $d_{\alpha\alpha^-}$ -Longe-Range-Konnektivitäten, welche die  $\beta$ -Sheet-Topologie des Proteins definieren, sind in Abbildung 11 dargestellt.

Das erste antiparallele  $\beta$ -Sheet besteht aus den drei  $\beta$ -Faltblattsträngen A, B und E. Das zweite antiparallele  $\beta$ -Sheet setzt sich aus den vier  $\beta$ -Faltblattsträngen D, C, F und G zusammen. Diese Abfolge und Anordnung der Sekundärstrukturelemente entspricht der Fibronektin-Typ-III-Topologie (s. Abbildung 12).

Weiterhin eröffnet dies auch die Möglichkeit einer anschließenden Proteinstrukturberechnung. Der Erfolg einer Strukturberechnung ist hauptsächlich von der Anzahl der sogenannten Long-Range-Kontakte abhängig.



**Abbildung 11:** Long-Range-NOE-Kontakte, die die  $\beta$ -Faltblatt-Topologie der D3 des IL-6R definieren. Die identifizierten  $d_{NN^-}$ ,  $d_{\alpha N^-}$  und  $d_{\alpha\alpha^-}$ -Konnektivitäten sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

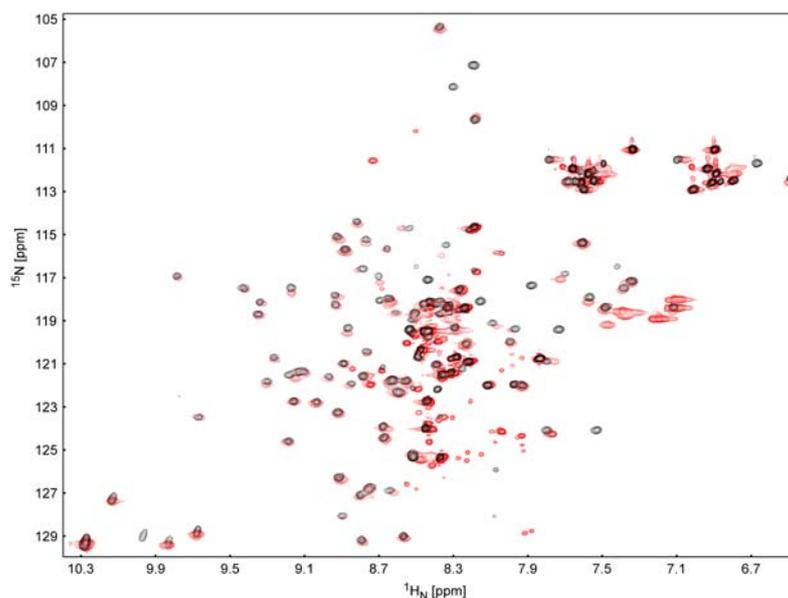


**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der  $\beta$ -Faltblatt Topologie der D3 des gp130. Die sieben  $\beta$ -Faltblattstränge ordnen sich in zwei antiparallele  $\beta$ -Sheets (ABE, DCFG) an.

### 2.4.3 Bestimmung des Interleukin-6 Bindungsepitops

Die chemische Verschiebung von NMR-aktiven Kernen ist abhängig von ihrer chemischen Umgebung und von physikalischen Einflüssen. Alle Faktoren, die zu einer veränderten magnetischen Abschirmung der beobachteten Kerne führen, bewirken daher veränderte chemische Verschiebungen. Dadurch eignet sich das  $2D$ - $^1H/^{15}N$ -HSQC-Experiment für Bindungsstudien. Die sequentiell zugeordneten chemischen Verschiebungen erlauben es, den  $^1H/^{15}N$ -Resonanzpaaren im  $2D$ - $^1H/^{15}N$ -HSQC-Spektrum einzelne Aminosäuren der IL-6R-D3 zuzuweisen.

Gibt man nun unmarkiertes IL-6 als Liganden hinzu, kann man beobachten, welche Resonanzpaare eine Änderung erfahren und damit, welche Aminosäuren durch die Bindung beeinflusst werden (s. Abbildung 13).

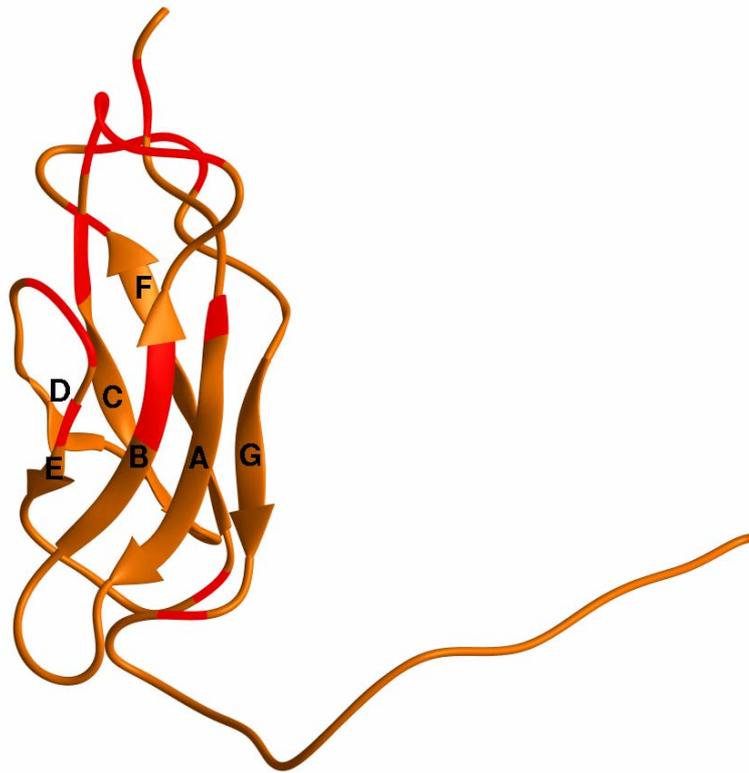


**Abbildung 13:** Einander überlagerte  $2D$ - $^1H/^{15}N$ -HSQC-Spektren der IL-6R-D3, in Abwesenheit (schwarz) und in Anwesenheit (rot) von IL-6. Verschiebungen von Signalen, welche unter dem Zusatz des Liganden zu beobachten sind, indizieren die Aminosäuren der IL-6R-D3, die durch die Bindung beeinflusst werden.

Die qualitative Auswertung und grafische Darstellung der auftretenden Differenzen in den  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Resonanzfrequenzen erleichtert dabei die Identifikation der Aminosäuren. Die Aminosäuren, die durch diese Analyse identifiziert werden konnten, wurden in einer vorläufigen, berechneten Struktur farblich hervorgehoben (s. Abbildung 14). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Veröffentlichung

Andreas Schwantner, Andrew J. Dingley, Suat Özbek, Stefan Rose-John, Joachim Grötzinger (2003), **Direct determination of the interleukin-6 binding epitope of the interleukin-6-receptor by NMR spectroscopy**, J. Biol. Chem. (in Druck)

dargestellt.



**Abbildung 14:** Darstellung der IL-6R-D3-Struktur. Die Ribbon-Darstellung repräsentiert eine von 32 berechneten Strukturen der IL-6R-D3 in ungebundener Form. Die sieben  $\beta$ -Faltblattstränge sind in Großbuchstaben angezeigt. Die rot markierten Aminosäurereste verdeutlichen, dass die Bindung von IL-6 hauptsächlich die Loop-Regionen (B/C-, D/E-, und F/G-Loop) beeinflusst.

Obwohl die sequentielle Zuordnung von IL-6 durch die Arbeiten von Xu *et al.* bereits bekannt ist (Xu et al., 1996), konnte das inverse Experiment von <sup>15</sup>N-markiertem IL-6 mit IL-6R-D3 leider nicht durchgeführt werden, da sich IL-6R-D3 in dem dort verwendeten Puffersystem als schwerlöslich erwies.

Interessanterweise hat eine abgewandelte Form dieser Methode, als sogenannte „SAR by NMR“-Technik (Structure Activity Relationship by NMR) bereits Einzug in die pharmazeutische Forschung genommen (Shuker et al., 1996; Hajduk et al., 1997). Diese Technik wird dort im Zusammenhang von Protein-Ligand-Interaktionen angewandt, um geeignete Bindungspartner für Zielproteine zu identifizieren, die dann als Leitstrukturen für die Synthese hochaffiner Liganden verwendet werden können.

### 3 Zusammenfassung auf Deutsch

Die Zytokine der IL-6-Typ-Familie IL-6, IL-11 und CNTF benötigen im Prozess der Signalübertragung spezifische  $\alpha$ -Rezeptoren, die extrazellulär aus einer N-terminalen Immunglobulin-ähnlichen (Ig)-Domäne und zwei C-terminalen Fibronectin-Typ-III Domänen aufgebaut sind. Auf seinen Zielzellen bindet IL-6 zunächst an seinen spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor (IL-6R) und daran anschließend an ein Homodimer des Signaltransduktors gp130. Dabei wird die Ig-Domäne des IL-6R nicht für die IL-6-Bindung benötigt, da die dritte Domäne des IL-6R (IL-6R-D3) alleine mehr als 90 % zur Bindungsenergie beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die  $^{15}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierte IL-6R-D3 dargestellt, renaturiert und gereinigt. Es wurden konzentrierte Proteinlösungen vorbereitet, welche für eine Untersuchung mittels heteronuklearer, mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie geeignet waren. Die Analyse der  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren lieferte sowohl die Grundlagen für die Sekundärstrukturuntersuchung der IL-6R-D3 in Lösung als auch für die Bestimmung des IL-6-Bindungssepitops der IL-6R-D3. Desweiteren bereiten die Ergebnisse dieser Untersuchungen auch die Berechnung der hochaufgelösten NMR-Struktur der IL-6R-D3 vor.

Folgende Erkenntnisse konnten erzielt werden:

- In dieser Arbeit wurden die  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen der IL-6R-D3 mit Hilfe heteronuklearer, mehrdimensionaler  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -NMR-Experimente vollständig zugeordnet.
- Die Sekundärstruktur der IL-6R-D3 wurde anhand charakteristischer NOEs und des chemischen Verschiebungsindex (CSI) definiert. Unter Berücksichtigung dieser Parameter enthält die Domäne sieben  $\beta$ -Faltblattstränge, die sich in zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern anordnen. Die Abfolge und Anordnung der Sekundärstrukturelemente entspricht der Fibronectin-Typ-III-Topologie.
- Die Aminosäurereste der IL-6R-D3, die für die Bindung von IL-6 essentiell sind, wurden aus einer Bindungsstudie mit  $^{15}\text{N}$ -markierter IL-6R-D3 und IL-6 ermittelt und mit bekannten Strukturdaten verglichen. Diese Reste befinden sich hauptsächlich in den exponierten B/C-, D/E- und F/G-Loops. Die Beeinflussung auch räumlich benachbarter, in  $\beta$ -Faltblattsträngen gelegener Aminosäurereste legt eine als „Induced Fit“ bezeichnete Konformationsänderung der IL-6R-D3 während der Wechselwirkung mit IL-6 nahe.

---

## 4 Summary

The cytokines of the IL-6-type family, IL-6, IL-11 and CNTF utilize during signal transduction specific  $\alpha$ -receptors, which consist of one N-terminal immunoglobulin-like (Ig) domain and two C-terminal fibronectin-type-III-like domains in the extracellular part. On target cells, interleukin-6 first binds to its specific  $\alpha$ -receptor and subsequently to a homodimer of the signal transducer protein gp130. Whereas the N-terminal Ig-domain is not involved in ligand binding, the third membrane proximal domain (IL-6R-D3) accounts for more than 90% of the binding energy to IL-6.

In the presented work samples of  $^{15}\text{N}$ - and  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled IL-6R-D3 were expressed in *E. coli*, refolded and purified. Concentrated protein samples were prepared which are suitable for heteronuclear, multidimensional NMR spectroscopy. The analysis of  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -NMR spectra provided the basis for secondary structure analysis as well as for direct determination of the IL-6 binding epitope of the IL-6R-D3. Furthermore these results are the basis for calculation of the high resolution NMR structure of IL-6R-D3.

The following results are presented:

- The  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  resonances of IL-6R-D3 were almost completely assigned using heteronuclear, multidimensional  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -NMR experiments.
- The secondary structure of IL-6R-D3 was analyzed on the basis of characteristic NOE pattern and the chemical shift index (CSI). According to these data the domain consists of seven  $\beta$ -strands arranged in two antiparallel  $\beta$ -sheets. The sequence and topology of the secondary structure elements is according to the fibronectin-type-III-like fold.
- The amino acid residues of IL-6R-D3 essential for IL-6 binding were identified in a binding study using  $^{15}\text{N}$ -labeled IL-6R-D3 and unlabeled IL-6 and are located in the exposed B/C-, D/E- and F/G-loops. The influence of IL-6 binding onto amino acid residues in the flanking  $\beta$ -strands demonstrates a conformational change in IL-6R-D3, a process known as “induced fit”.

---

## 5 Literaturverzeichnis

- Arai, K., L. Tsuruta, et al., *Cytokine signal networks and a new era in biomedical research*. Mol. Cells, 1997. **7**(1): p. 1-12.
- Bax, A., G. M. Clore, et al.,  *$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correlation via isotropic mixing of  $^{13}\text{C}$  magnetization, new three-dimensional approach for assigning  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra of  $^{13}\text{C}$  enriched proteins*. J. Magn. Reson., 1990. **88**: p. 425-31.
- Bazan, J. F., *Haemopoietic receptors and helical cytokines*. Immunol. Today, 1990. **11**(10): p. 350-4.
- Bazan, J. F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990. **87**(18): p. 6934-8.
- Billeter, M., W. Braun, et al., *Sequential resonance assignments in protein  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectra. Computation of sterically allowed proton-proton distances and statistical analysis of proton-proton distances in single crystal protein conformations*. J. Mol. Biol., 1982. **155**(3): p. 321-46.
- Chen, G. C. and J. T. Yang, *Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid*. Anal. Lett., 1977. **10**(14): p. 1195-1207.
- Croasmun, W. R. u. C., R. M. K., *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. 2nd edition VCH. 1994, New York.
- Davis, S., T. H. Aldrich, et al., *The receptor for ciliary neurotrophic factor*. Science, 1991. **253**(5015): p. 59-63.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, et al., *NMRPipe: A Multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes*. J. Biomol. NMR, 1995. **6**: p. 277-293.
- Fesik, S. W., H. L. Eaton, et al., J. Am. Chem. Soc., 1990. **112**: p. 886.

- 
- Grötzinger, J., *Molecular mechanisms of cytokine receptor activation*. Biochim. Biophys. Acta, 2002. **1592**(3): p. 215-23.
- Grzesiek, S. and A. Bax, *Correlating backbone amide and side-chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR*. J. Am. Chem. Soc., 1992. **114**: p. 6291-93.
- Grzesiek, S. and A. Bax, *An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins*. J. Magn. Reson., 1992. **99**: p. 201-9.
- Grzesiek, S. and A. Bax, *Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-enriched proteins*. J. Biomol. NMR., 1993. **3**(2): p. 185-204.
- Grzesiek, S. and A. Bax, *The importance of not saturating water in protein NMR. Application to sensitive enhancement and NOE measurements*. J. Am. Chem. Soc., 1993. **115**: p. 12593-94.
- Hajduk, P. J., R. P. Meadows, et al., *DRUG DESIGN: Discovering High-Affinity Ligands for Proteins*. Science, 1997. **278**: p. 497-99.
- Heaney, M. L. and D. W. Golde, *Soluble Cytokine Receptors*. Blood, 1996. **87**: p. 847-857.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al., *Principles of IL-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem. J., 2003: p. in press.
- Johnson, B. A. and R. A. Blevins, *NMRview: A computer program for the visualization and analysis of NMR data*. J. Biomol. NMR, 1994. **4**: p. 603-614.
- Jones, S. and S. Rose-John, *The role of soluble receptors in cytokine biology: The agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex*. Biochim. Biophys. Acta, 2002. **1592**: p. 251-264.

Kallen, K.-J., *The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**: p. 323-343.

Kay, L. E., M. Ikura, et al., *Three-dimensional triple resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins*. J. Magn. Reson., 1990. **89**: p. 496-514.

Kraulis, P. J., *Protein three-dimensional structure determination and sequence-specific assignment of <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-separated NOE data. A novel real-space ab initio approach*. J. Mol. Biol., 1994. **243**(4): p. 696-718.

Logan, T. M., E. T. Olejniczak, et al., *Side chain and backbone assignments in isotopically labeled proteins from two heteronuclear triple resonance experiments*. FEBS Lett., 1992. **314**: p. 413-18.

Majumdar, A., H. Wang, et al., J. Biomol. NMR, 1993. **3**: p. 387.

Olejniczak, E. T., R. X. Xu, et al., J. Biomol. NMR, 1992. **2**: p. 655.

Oppenheimer, N. J., *Meth. Enzymol.* 1989. **176**: p. 78-89.

Özbek, S., J. Grötzinger, et al., *The Membrane Proximal Cytokine Receptor Domain of the Human Interleukin-6-Receptor is Sufficient for Ligand Binding but not for gp130 Association*. J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 21374-21379.

Pastore, A. and V. Saudek, J. Magn. Reson., 1990. **90**: p. 165.

Plaxco, K. W., C. Spitzfaden, et al., *Rapid refolding of a proline-rich all-beta-sheet fibronectin type III module*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996. **93**: p. 10703-6.

Primrose, W. U., in *NMR of Macromolecules, a Practical Approach*, G. C. K. Roberts, Editor. 1993, IRL Press, Oxford. p. 7-34.

- 
- Rudolph, R. and H. Lilie, *In vitro folding of inclusion body proteins*. FASEB J., 1996. **10**: p. 49-56.
- Shuker, S. B., P. J. Hajduk, et al., *Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR*. Science, 1996. **274**: p. 1531-34.
- Sleeman, M. W., K. D. Anderson, et al., *The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha*. Pharm. Acta. Helv., 2000. **74**(2-3): p. 265-272.
- Spera, S. and A. Bax, *Empirical Correlation between Protein Backbone Conformation and  $C_{\alpha}$  and  $C_{\beta}$   $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts*. J. Am. Chem. Soc., 1991. **113**: p. 5490-92.
- Sprang, S. R. and J. F. Bazan, *Cytokine structural taxonomy and mechanism of receptor engagement*. Curr. Opin. Struct. Biol., 1993. **3**: p. 815-827.
- Szilagyi, L. and O. Jardetzky, J. Magn. Reson., 1989. **83**: p. 441.
- Thomson, A. W., *The Cytokine Handbook*. 1991: Academic Press, London.
- Ward, A. C., I. Touw, et al., *The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis*. Blood, 2000. **95**(1): p. 19-29.
- Wishart, D. S. and B. D. Sykes, *The  $^{13}\text{C}$  Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using  $^{13}\text{C}$  chemical-shift data*. J Biomol. NMR, 1994. **4**: p. 171-180.
- Wishart, D. S., B. D. Sykes, et al., *The Chemical Shift Index: A fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR Spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc., 1992. **31**: p. 1647-1651.
- Wüthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. 1986: John Wiley & Sons, New York, N.Y.

---

Xu, G. Y., J. Hong, et al., *Complete  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments, secondary structure, and topology of recombinant human interleukin-6*. *J. Biomol. NMR*, 1996. **8**: p. 123-135.

Yawata, H., K. Yasukawa, et al., *Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130*. *EMBO J.*, 1993. **12**(4): p. 1705-12.

Zuiderweg, E. R. and S. W. Fesik, *Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a*. *Biochemistry*, 1989. **28**: p. 2387-91.

## 6 Veröffentlichungen

Andreas Schwantner, Andrew J. Dingley, Suat Özbek, Oliver Hecht, Stefan Rose-John, Joachim Grötzinger (2003),  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  backbone assignment of the carboxyl terminal domain of the cytokine binding module of the interleukin-6 receptor  
*J. Biomol. NMR* (im Druck)

Andreas Schwantner, Andrew J. Dingley, Suat Özbek, Stefan Rose-John, Joachim Grötzinger (2003), Direct determination of the interleukin-6 binding epitope of the interleukin-6-receptor by NMR spectroscopy  
*J. Biol. Chem.* (im Druck)



## Letter to the Editor: $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ and $^{13}\text{C}$ backbone assignment of the carboxyl terminal domain of the cytokine binding module of the interleukin-6 receptor

Andreas Schwantner<sup>a</sup>, Andrew J. Dingley<sup>b</sup>, Suat Özbek<sup>c</sup>, Oliver Hecht<sup>a</sup>, Stefan Rose-John<sup>a</sup> & Joachim Grötzinger<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Olshausenstr. 40, 24118 Kiel, Germany;

<sup>b</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, Gower Street, London, WC1E 6BT, U.K.; <sup>c</sup>Department of Biophysical Chemistry, Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstrasse 70, CH-4056 Basel, Switzerland.

Received 18 September 2003; Accepted 28 November 2003

**Key words:** backbone assignment, cytokine receptor, 3D NMR, FN III domain, IL-6R

### Biological context

Cytokines are key molecules in intercellular communication and signal transduction (Arai et al., 1997). The family of Interleukin-6 (IL-6)-type cytokines comprises IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1) and cardiotrophin-like cytokine (CLC). All of these proteins share the characteristic four-helix bundle fold (Grötzinger, 2002).

IL-6, which gave the name to this group of cytokines, is involved in haematopoiesis, regulation of immune responses, and the acute phase reaction (Heinrich et al., 2003). Due to its pleiotropy, the dysregulation of both IL-6 and its receptor has been implicated in the pathogenesis of several diseases, e.g., multiple myeloma, postmenopausal osteoporosis, autoimmune diseases and prostate cancer (for a review see (Kallen, 2002)).

IL-6-type cytokines act on target cells by binding to their specific cell surface receptors and induce receptor oligomerization for signal transduction into the cell (Grötzinger, 2002). The receptor of interleukin-6 (IL-6R) is a modular built protein. The extracellular part of IL-6R consists of an N-terminal Immunoglobulin (Ig)-like domain and two fibronectin type III (FN)-like domains, which form the cytokine recognition site (Grötzinger, 2002). Since the cytoplasmic part of this  $\alpha$ -receptor lacks intrinsic protein kinase activity it is not involved in the intracellular signal

transduction cascade and only upon association with gp130, the common signal transducing protein of the IL-6-type family of cytokines, initiates the signalling cascade.

Only after forming a high-affinity complex with IL-6R, IL-6 can efficiently recruit its signalling receptor subunit gp130 (Grötzinger, 2002; Heinrich et al., 2003).

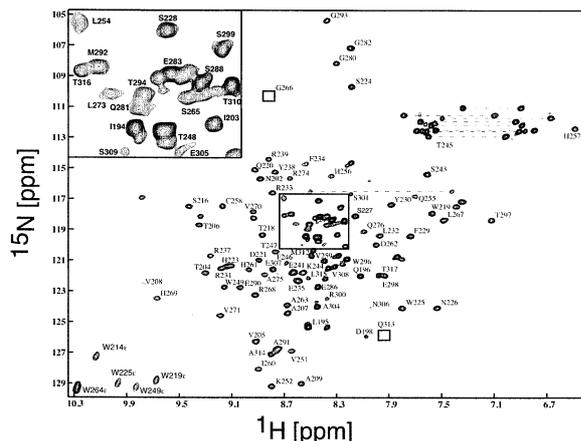
The N-terminal immunoglobulin-like domain of IL-6R is thereby not involved in IL-6 binding, whereas the C-terminal FN-III-like domain, which contains the signature tryptophan-serine-X-tryptophan-serine (WSXWS) sequence motif, is responsible for receptor-ligand and receptor-receptor interactions (Özbek et al., 1998). The third membrane proximal domain (IL-6R-D3) alone accounts for more than 90% of the binding energy to IL-6 (Özbek et al., 1998). Interestingly, it has been shown recently that another member of the IL-6 type family, CNTF, can associate with the IL-6R (Schuster et al., 2003).

In order to identify the key residues that constitute the binding site of IL-6R to IL-6 we have carried out the sequence-specific backbone assignment of the recombinant third domain of the IL-6R and delineate its secondary structure.

### Methods and experiments

The third domain of IL-6R (IL-6R-D3) constitutes residues 192 to 317 (14.7 kDa) of IL-6R. The cDNA of IL-6R-D3 was cloned into the pRSet expression vector and transformed into BL21(DE3) pLysS *E. coli*

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: jgroetzinger@biochem.uni-kiel.de



**Figure 1.** Sequential assignment of the third extracellular domain of the interleukin-6 receptor. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of the third extracellular domain of IL-6R acquired at 20 °C. Sequential assignments obtained in this study are indicated. Although most cross peaks were assigned, some are not labeled for clarity. Side-chain amide resonances of Asn and Gln residues are connected by horizontal lines. Due to the low peak intensities, the resonances of Gly-266 and Gln-313 are not contoured and marked by rectangles.

cells as described previously (Özbek et al., 1998). Production of uniform  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  double labeled recombinant IL-6R-D3 was achieved by growing the bacteria in M9 minimal medium containing 1 g l $^{-1}$   $^{15}\text{N}$ -ammonium chloride and 2 g l $^{-1}$   $^{13}\text{C}_6$ -labeled glucose as sole nitrogen and carbon sources, respectively. Purification and refolding of the recombinant protein was performed as described previously (Özbek et al., 1998).

After purification, the protein concentration was determined by UV-spectroscopy. Using an Amicon stirring cell (MILLIPORE, Eschborn, Germany) NMR samples were concentrated to 1.0 mM in 20 mM phosphate buffer at pH 5.0 containing 95%  $\text{H}_2\text{O}/5\%$   $\text{D}_2\text{O}$  or 100%  $\text{D}_2\text{O}$ .

All NMR experiments were recorded at 293 K on Bruker DRX600 and Varian INOVA 600 MHz NMR spectrometers equipped with pulsed-field gradient  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  probes optimized for  $^1\text{H}$  detection. Sequence-specific backbone assignments of IL-6R-D3 were accomplished using  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, CBCA(CO)NH, CBCANH, HNCA, HNCO, HBHA(CBCACO)NH and C(CO)NH spectra. The sequential assignment data were finally confirmed by 3D  $^{15}\text{N}$ -edited NOESY-HSQC and  $^{13}\text{C}$ -edited NOESY-HSQC experiments. Partial side-chain assignments were achieved from C(CO)NH and HCCH-TOCSY data. NMR data were processed using the NMRPipe software package (Delaglio et al., 1995) and analyzed

with the NMRView program (Johnson and Blevins, 1994). Proton chemical shifts were referenced to TSP, while  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts were indirectly referenced (Cornilescu et al., 1999).

### Extent of assignments and data deposition

Almost all of the protein backbone resonances have been assigned. Even the  $\text{C}\alpha$  and  $\text{H}\alpha$  resonances of the prolines and the protons of the indole side chain of tryptophan residues are assigned. A couple of residues could only be partially assigned: the HN and N resonances of Arg-210 to Leu-215, Leu-236, Glu-278, Phe-279, Trp-284, Ser-285 and Trp-287 were missing from the spectra, probably due to local conformational exchange on an intermediate timescale. Figure 1 shows the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-spectrum of a uniformly  $^{15}\text{N}$  labeled sample of the IL-6R-D3. Analysing the chemical shifts revealed that the third domain of the IL-6R is predominantly in  $\beta$ -sheet conformation (Wishart et al., 1992) (data not shown). With the help of this assignment it is now possible to determine the epitope of the interleukin-6 receptor which is responsible for the binding to IL-6 and CNTF. A full 3D structure determination is in progress. The chemical shift data have been deposited in the BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) database, under accession number BMRB-5940.

### Acknowledgements

This work was supported by SFB 415 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to J.G., and S.R.-J.).

### References

- Arai, K., Tsuruta, L., Watanabe, S. and Arai, N. (1997) *Mol. Cells*, **7**, 1–12.
- Cornilescu, G., Delaglio, F. and Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR*, **13**, 289–302.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. and Bax, A. (1995) *J. Biomol. NMR*, **6**, 277–293.
- Grötzinger, J. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**, 215–223.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G. and Schaper, F. (2003) *Biochem. J.*, **374**, 1–20.
- Johnson, B.A. and Blevins, R.A. (1994) *J. Biomol. NMR*, **4**, 603–614.
- Kallen, K.-J. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**, 323–343.
- Özbek, S., Grötzinger, J., Krebs, B., Fischer, M., Wollmer, A., Jostock, T., Müllberg, J. and Rose-John, S. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 21374–21379.
- Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grötzinger, J., Rose-John, S. and Kallen, K.-J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 9528–9535.
- Wishart, D.S., Sykes, B.D. and Richards, F.M. (1992) *Biochemistry*, **31**, 1647–1651.

## Direct Determination of the Interleukin-6 Binding Epitope of the Interleukin-6 Receptor by NMR Spectroscopy\*

Received for publication, October 7, 2003  
Published, JBC Papers in Press, October 13, 2003, DOI 10.1074/jbc.M311019200

Andreas Schwantner‡, Andrew J. Dingley§, Suat Özbek¶, Stefan Rose-John‡,  
and Joachim Grötzinger‡||

From the ‡Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Olshausenstrasse 40, 24118 Kiel, Germany, the §Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, United Kingdom, and the ¶Department of Biophysical Chemistry, Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstrasse 70, CH-4056 Basel, Switzerland

All cytokines belonging to the interleukin-6 (IL-6)-type family of cytokines utilize receptors that have a modular build of several immunoglobulin-like and fibronectin type III-like domains. Characteristic of these receptors is a cytokine receptor homology region consisting of two such fibronectin domains defined by a set of four conserved cysteines and a tryptophan-serine-X-tryptophan-serine sequence motif. On target cells, interleukin-6 first binds to its specific receptor and subsequently to a homodimer of the signal transducer protein gp130. The interleukin-6 receptor consists of three extracellular domains. The N-terminal immunoglobulin-like domain is not involved in ligand binding, whereas the third membrane proximal fibronectin-like domain accounts for more than 90% of the binding energy to IL-6. Here, the key residues of this fibronectin-like domain involved in the interaction with IL-6 are described. Chemical shift mapping data with <sup>15</sup>N-labeled IL-6R-D3 and unlabeled IL-6 coupled with recent structural data clearly reveal the epitope within the IL-6R-D3 responsible for mediating the high affinity interaction with its cognate cytokine.

Cytokines are key mediators in the regulation and coordination of immune responses and hematopoiesis (1). Such molecules act on their target cells by binding to specific cell surface receptors and thereby induce receptor oligomerization (2). Cytokine receptors are type I transmembrane proteins. The receptors ectodomains consist of a number of fibronectin (FN)<sup>1</sup> type III-like and immunoglobulin-like (Ig) domains (3). The cytoplasmic region of these receptors lack intrinsic protein kinase activity but are constitutively associated with tyrosine kinases of the Janus kinase family (2, 4). Ligand binding enforces homo- or heterodimerization of receptor molecules lead-

ing to activation of the associated kinases and initiation of cytoplasmic signaling cascades (2, 3).

Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine involved in hematopoiesis, regulation of immune responses, and the acute phase reaction (2, 5). This cytokine belongs to the family of interleukin-6-type cytokines that includes interleukin-11 (IL-11), cardiotrophin-1 (CT-1), ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), and cardiotrophin like factor. All of these cytokines share the characteristic four-helix bundle protein fold (6). This family of proteins signals via receptor complexes, which contain at least one molecule of gp130, the common signal transducing protein of the IL-6-type family of cytokines (3). IL-6 and IL-11 act via a homodimer of gp130, whereas CNTF, CT-1, LIF, and OSM induce a signaling event via the heterodimerization of gp130 and LIFR. Alternatively, OSM recruits gp130 and the OSM receptor. On target cells, IL-6, IL-11, and CNTF first bind to their specific  $\alpha$ -receptor subunits, IL-6R, IL-11R, and CNTFR, respectively, which are not involved in the intracellular signal transduction cascade (3). These membrane-bound  $\alpha$ -receptors can be functionally replaced by their soluble forms, which lack transmembrane and cytoplasmic parts (7). Interestingly, it has been shown recently that CNTF not only interacts with CNTFR but also with the IL-6R (8).

All receptors of the IL-6-type cytokines belong to the cytokine receptor class I family characterized by the presence of at least one cytokine receptor homology (CRH) region consisting of two FN domains (6). The conserved CRH plays a central role in cytokine recognition by the receptor. The N-terminal FN domain of the CRH contains four conserved cysteine residues, whereas the C-terminal FN domain is characterized by a tryptophan-serine-X-tryptophan-serine (WSXWS) sequence motif. The extracellular part of the IL-6R consists of an Ig domain (D1) and one CRH (D2 and D3). It is the C-terminal domain of IL-6R and IL-11R of the corresponding CRH that are primarily responsible for ligand binding, since these domains have been shown to account for more than 90% of the binding energy (9, 10). However, the IL-6-IL-6R-D3 complex is not able to associate with the signal transducer gp130 and as such is not able to elicit a signaling cascade (9). The individual structures of IL-6 (11, 12) as well as IL-6R (13) have been solved by x-ray crystallography or NMR spectroscopy. In addition, the crystal structure (3.65 Å resolution) of the hexameric IL-6-IL-6R-gp130 complex has recently been published (14). A number of amino acid residues of IL-6 and IL-6R involved at the interaction interface have been defined by mutational studies (15) from molecular modeling (16) and with limitations from the recently published crystal structure of the hexameric IL-6-IL-6R-gp130 complex (14). Using chemical shift mapping in combination

\* This work was supported by Grant SFB 415 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to J. G. and S. R.-J.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

|| To whom correspondence should be addressed: Biochemisches Inst., Christian-Albrechts-Universität Kiel, Olshausenstr. 40, 24118 Kiel, Germany. Tel.: 49-431-8801686; Fax: 49-431-8805007; E-mail: jgroetzinger@biochem.uni-kiel.de.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: FN, fibronectin; IL, interleukin; IL-6R, IL-6 receptor; gp130, glycoprotein 130; CNTF, ciliary neurotrophic factor; CT-1, cardiotrophin-1; LIF, leukemia inhibitory factor; LIFR, LIF receptor; OSM, oncostatin M; IL-11R, IL-11 receptor; CNTFR, CNTF receptor; CRH, cytokine receptor homology region; IL-6R-D3, third domain of IL-6 receptor; HSQC, heteronuclear single-quantum coherence; NOESY, nuclear Overhauser effect (enhancement) spectroscopy; TOCSY, total correlation spectroscopy; CSI, chemical shift index.

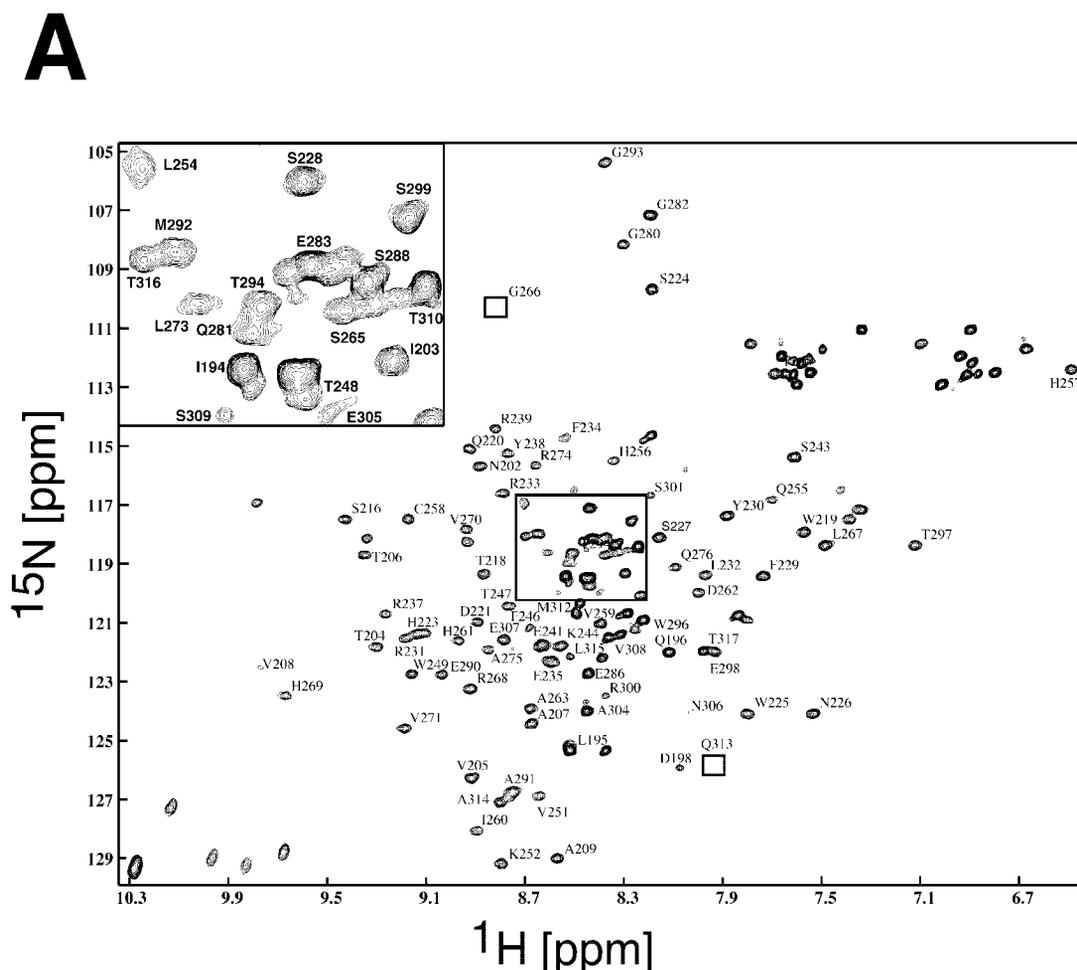


FIG. 1. **Sequential assignment of the third extracellular domain of the interleukin-6 receptor.** A, two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of the third extracellular domain of IL-6R acquired at 20 °C. Sequential assignments obtained in this study are indicated. The *inset* (top left) shows an enlargement of the most crowded region (boxed) of the spectrum. Side-chain amide resonances of Asn and Gln residues and the protons of the indole side chain of tryptophan residues are not labeled. Due to the low peak intensities, the resonances of Gly-266 and Gln-313 are not contoured and marked by rectangles. B, secondary structure prediction of IL-6R-D3 based on chemical shift data. Differences of more than  $\pm 0.1$  ppm with respect to random coil values for the  $^1\text{H}_\alpha$ ,  $^1\text{H}_\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}_\alpha$ , and  $^{13}\text{C}_\beta$  chemical shifts received an index value of +1 or -1. For the  $^1\text{H}_\alpha$  chemical shifts, three consecutive positive (downfield shift) or four consecutive negative (upfield shift) indices designate  $\beta$ -strand or  $\alpha$ -helical structures, respectively.  $^{13}\text{C}_\beta$  chemical shifts can only be used to identify stretches of  $\beta$ -strands, and a grouping of four or more positive indices denotes such a secondary structure (20, 21). For the  $^1\text{H}_\text{N}$  and  $^{13}\text{C}_\alpha$  chemical shift values, three consecutive negative index values indicate that those residues form a  $\beta$ -strand, whereas four positive indices imply an  $\alpha$ -helix (20, 21). All other regions are designated as random coil or flexible regions of the protein. Residue numbers correspond to the full-length IL-6R.

with the current structural data the amino acid residues of IL-6R that are key in the interaction with its cognate cytokine are detailed. The results confirm the conclusions drawn from previous mutagenesis studies and clearly indicate that structural rearrangement of the IL-6R-D3 is required to induce the correct interaction between this domain and its cognate cytokine. In contrast, the NMR results presented do not entirely translate to the recent crystal structure of the complex and indicate that such structural rearrangements are not fully accounted for in the current complex model.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Protein Expression and Purification**—Unlabeled interleukin-6 was expressed and purified as described previously (17). The third domain of IL-6R was expressed using the BL21(DE3)pLysS *Escherichia coli* strain, refolded, and purified as described previously (9).  $^{15}\text{N}$ -Labeled and  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  double-labeled IL-6R-D3 was prepared by growing the bacteria in M9 minimal medium using  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 g/liter) and  $^{13}\text{C}_6$ -labeled glucose (2 g/liter) as the sole nitrogen and carbon sources, respectively.

**NMR Sample Preparation**—After purification protein concentrations were determined by UV spectroscopy. Unlabeled IL-6 was mixed with the  $^{15}\text{N}$ -labeled IL-6R-D3 in a molar ratio of 1:1. This sample was concentrated using an Amicon stirring cell (Millipore, Eschborn,

Germany) to a final concentration of about 0.5 mM in 20 mM phosphate buffer at pH 5.0 containing 95%  $\text{H}_2\text{O}/5\%$   $\text{D}_2\text{O}$  and used to record two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra.

**NMR Spectroscopy**—The NMR sample of the complex consisted of a 0.5 mM 1:1 complex of  $^{15}\text{N}$ -enriched IL-6R-D3-IL-6, 20 mM sodium phosphate in 260  $\mu\text{l}$  of 95%  $\text{H}_2\text{O}/5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ , pH 5.0. The NMR sample of  $^{15}\text{N}$ -enriched IL-6R-D3 was prepared in identical buffer conditions. All NMR data were acquired at 20 °C on a Varian Inova Unity 600 MHz NMR spectrometer equipped with a  $z$  axis pulsed-field gradient  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  probe optimized for  $^1\text{H}$  detection. Two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments were recorded with the insensitive nuclei enhanced by polarization transfer delay set to 2.25 ms as a compromise between the fast relaxing amide protons and the optimal transfer time for the  $^1\text{J}_{\text{NH}}$  couplings of  $\sim 90$  Hz. The recycle delay was 1.3 s. The data matrix consisted of  $128^* \times 384^*$  data points (where  $n^*$  refers to complex points) with acquisition times of 61 ( $t_{\text{N}}$ ) and 96 ms ( $t_{\text{HN}}$ ). A total of 32 scans per complex  $t_{\text{N}}$  increment was collected. The total measuring time for each experiment was 1.6 h. The experiment was performed with the  $^1\text{H}$  carrier positioned in the center of the amide proton frequency (7.52 ppm) and the  $^{15}\text{N}$  carrier at 118.4 ppm.  $^{15}\text{N}$  decoupling was applied during data acquisition. Sequence-specific backbone assignments of IL-6R-D3 were achieved<sup>2</sup> from a series of three-dimensional triple res-

<sup>2</sup> A. Schwantner, A. J. Dingley, S. Özbek, O. Hecht, S. Rose-John, and J. Grötzinger, manuscript in preparation.

**B**

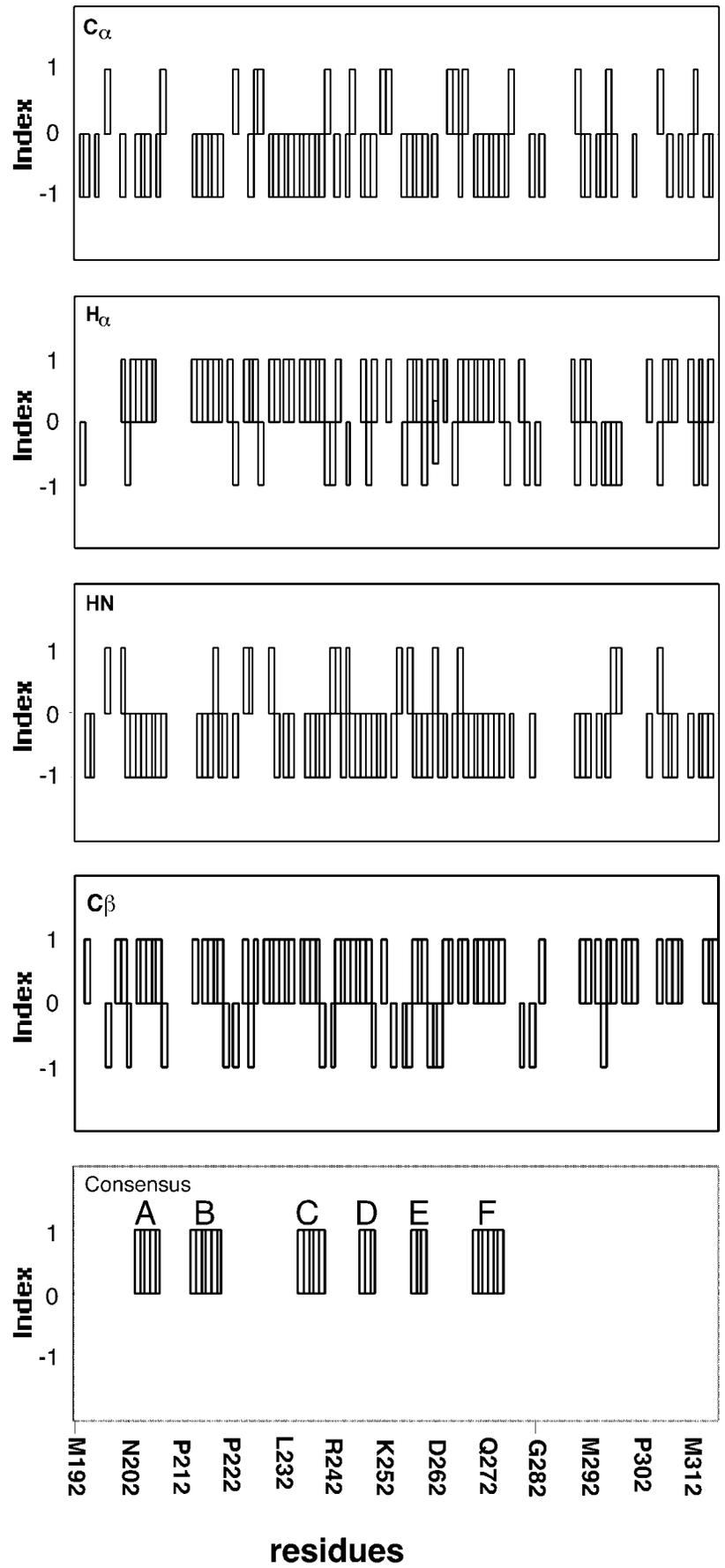


FIG. 1—continued

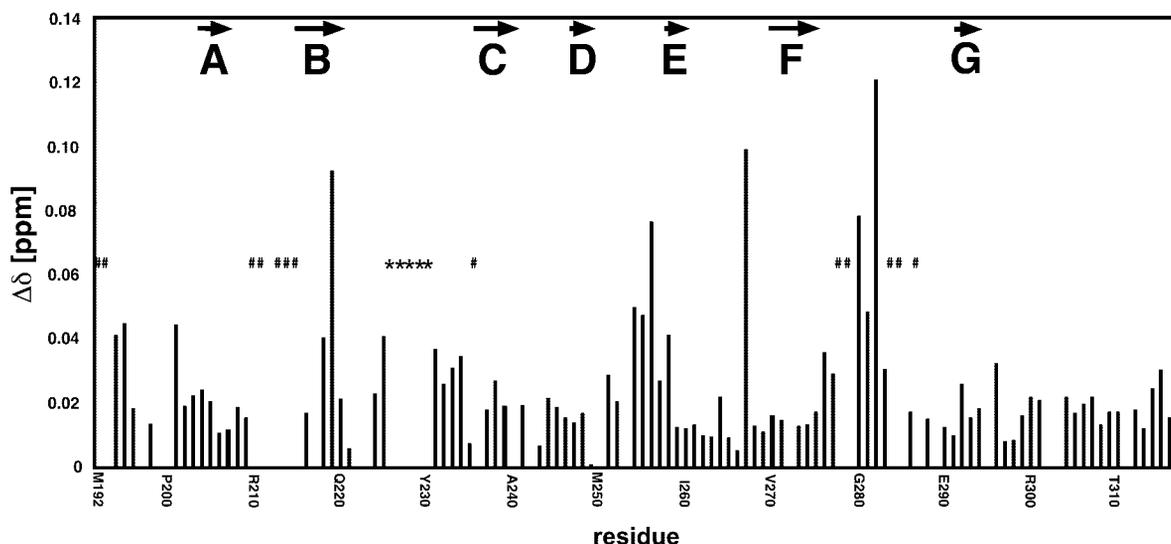


FIG. 2. **Binding of interleukin-6 to the third extracellular domain of the IL-6 receptor.** Normalized chemical shift differences ( $\Delta\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N}) = [(\Delta\delta(^1\text{H}))^2 + (\Delta\delta(^{15}\text{N}/6)^2]^{1/2}$ ) of  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  resonances of the free IL-6R-D3 and the IL-6R-D3 bound to IL-6. Asterisks indicate residues for which the chemical shift differences could not be calculated, since the resonances arising from these residues were not identified in the spectrum of the protein complex. Residues not assigned are marked by hash marks. Arrows mark the  $\beta$ -strands (arrow A, Ala-204 to Thr-208; arrow B, Leu-215 to Gln-220; arrow C, Leu-236 to Ala-240; arrow D, Thr-248 to Met-250; arrow E, Cys-258 to Ile-260; arrow F, His-270 to Glu-275). The  $\beta$ -strands A–F have been derived from the consensus chemical shift index, whereas  $\beta$ -strand G has been taken from the structure of the IL-6-IL-6R-gp130 model (14). Amino acid residues in loop regions involved in binding to IL-6 are: Trp-225 to Arg-231 (B/C loop), Leu-254 to His-256 (D/E loop), Gly-280 to Glu-283 (F/G loop); Phe-279 was not visible in both spectra due to chemical exchange.

onance experiments (CBCA(CO)NH, CBCANH, HNCA, HNCOC, HBHA(CBCACO)NH, C(CO)NH) as well as  $^{15}\text{N}$ -edited NOESY,  $^{13}\text{C}$ -edited NOESY, and  $^{13}\text{C}$ -edited TOCSY experiments. Proton chemical shifts were referenced with respect to 3-(trimethylsilyl)propionate, while  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts were referenced indirectly using the gyromagnetic ratios of  $^{13}\text{C}$ : $^1\text{H}$  (0.251449530) and  $^{15}\text{N}$ : $^1\text{H}$  (0.101329118), respectively. All data were processed using the nmrPipe software package (18) and analyzed with the nmrView program (19).

The chemical shift data have been deposited in the BioMagResBank (www.bmrb.wisc.edu) data base, under accession number BMRB-5940.

#### RESULTS AND DISCUSSION

The two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of the IL-6R-D3 is presented in Fig. 1A. The sequence-specific  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  assignment of IL-6R-D3 was derived from a series of three-dimensional triple resonance experiments (see “Experimental Procedures”) and resonances are labeled with assignment information. The chemical shift index (CSI) is a simple and reliable statistical method to predict secondary structure elements from recorded chemical shifts by comparison with their corresponding random coil values (20, 21). From the calculated CSI values derived from the  $^1\text{H}_\text{N}$ ,  $^1\text{H}_\alpha$ ,  $^{13}\text{C}_\alpha$ , and  $^{13}\text{C}_\beta$  chemical shifts a consensus CSI value can be determined that allows the identification of  $\alpha$ -helical,  $\beta$ -strand, or coiled structures by indices of  $-1$ ,  $+1$ , or  $0$ , respectively (20, 21). The third domain of the extracellular part of IL-6R has been predicted to share a fibronectin type III-like fold consisting of seven  $\beta$ -strands that has been recently confirmed by the x-ray structure of the extracellular part of the IL-6R (13). The chemical shifts of  $^1\text{H}_\text{N}$ ,  $^1\text{H}_\alpha$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}_\alpha$ , and  $^{13}\text{C}_\beta$  nuclei of the IL-6R-D3 were derived from the following set of experiments: two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, three-dimensional HBHA(CBCACO)NH, three-dimensional CBCA(CO)NH, three-dimensional CBCANH, and three-dimensional HNCA spectra. Chemical shift indexing was performed with the  $^1\text{H}_\text{N}$ ,  $^1\text{H}_\alpha$ ,  $^{13}\text{C}_\alpha$ , and  $^{13}\text{C}_\beta$  chemical shifts to obtain an estimate of the secondary structure of the IL-6R-D3 (Fig. 1B). Of the expected seven  $\beta$ -strands observed in the crystal structure, six  $\beta$ -strands were estimated from the CSI values. Only the short  $\beta$ -strand G was not clearly identified. The CSI results agree with the lengths of the  $\beta$ -strands determined in the x-ray structure (13) with the exception of  $\beta$ -strand

C that extends from Leu-232 to Ala-240 in the x-ray structure and from Leu-236 to Ala-240 in the IL-6R-D3. Apparently, the shorter  $\beta$ -strand C is due to the absence of assignment data for the  $^1\text{H}_\alpha$  and  $^{13}\text{C}_\beta$  of Glu-235 due to spectral overlap.

The  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts of the resonances arising from the  $^{15}\text{N}$ -enriched IL-6R-D3-unlabeled IL-6 complex were compared with the  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts of the resonances arising from the unbound  $^{15}\text{N}$ -enriched IL-6R-D3. The majority of the resonances showed only minor or no chemical shift changes upon formation of the complex and were unambiguously assigned using the assignment data for the free IL-6R-D3. Such chemical shift changes are indicative that these residues of IL-6R-D3 are not located at the binding interface but are probably a reflection that binding of IL-6 causes subtle conformational changes to be transmitted through the protein to facilitate binding of IL-6. The much larger chemical shift changes or disappearance observed for some resonances abrogated the ability to unambiguously assign the full complement of resonances in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of IL-6R-D3 in complex with IL-6. The large shifts observed for these resonances are indicative of slow-to-intermediate exchange and strongly suggest that the binding of IL-6 to IL-6R-D3 has a low dissociation constant. This observation is supported by the measured  $k_a$  and  $k_d$  values of  $2.72 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $1.04 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively (9). Although we were not able to reassign all the resonances that showed the largest shifts or disappeared, due to intermediate exchange, using the assignment data for the free IL-6R-D3 did provide unambiguous identification of those key residues located at the binding interface (see below for discussion).

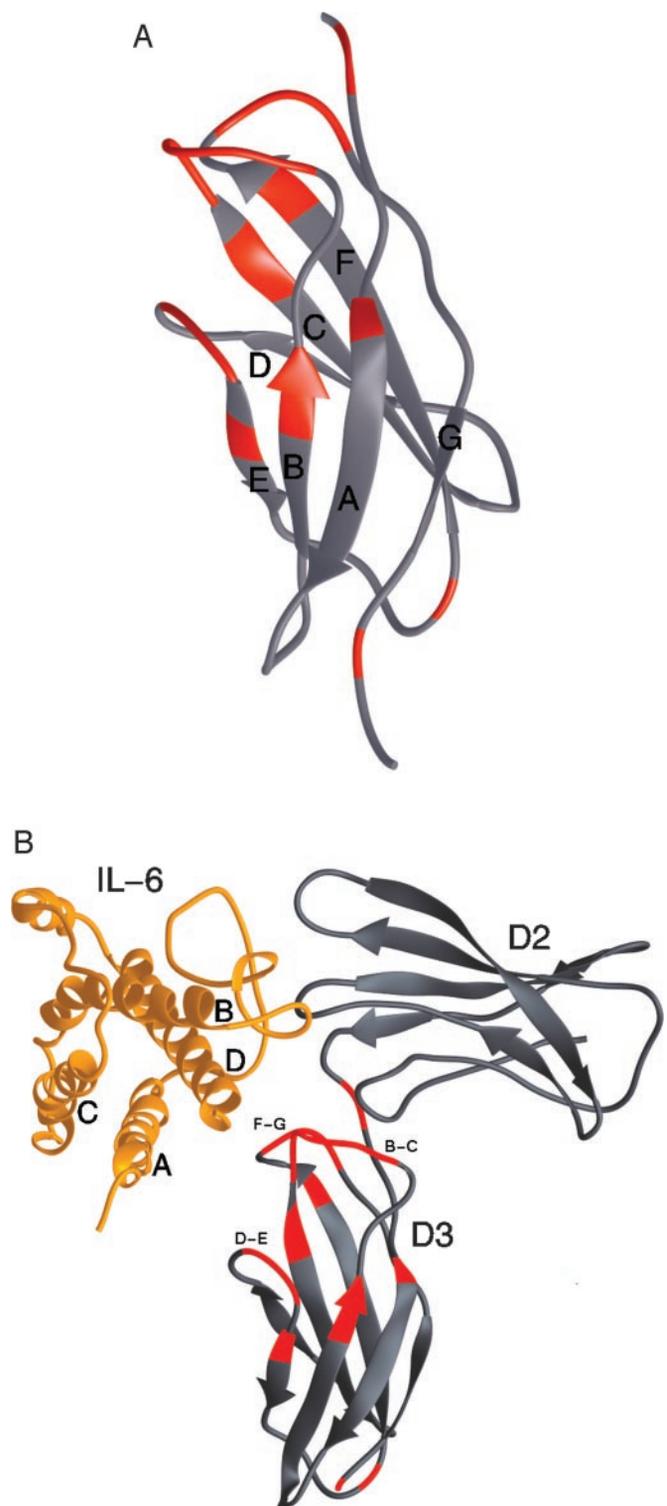
For a quantitative analysis of these data the normalized chemical shift differences were calculated. Fig. 2 shows the normalized chemical shift change for each residue of the IL-6R-D3 after binding to IL-6. Depending on the magnitude of the detected changes in the chemical shifts, residues were divided into two groups. The first group contains peaks that showed no or small changes in chemical shifts ( $<0.03$  ppm). The second group contains peaks with a significantly larger chemical shift difference ( $>0.03$  ppm). Chemical shift differences could not be

calculated for some of the IL-6R-D3 residues, since their corresponding resonances in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the protein complex could not be unambiguously assigned. Although chemical shift differences were not calculated for these resonances, the residues were considered to be involved in the binding interface with IL-6. For some resonances (e.g. Asp-253 and Gln-272), nearby or overlapping peaks obscured accurate chemical shift measurements and were excluded from this analysis.

Using the crystal structure of the IL-6R (13), the measured changes in the  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts of the amide groups were projected onto the structure of the third extracellular domain of this receptor with regions colored *red* indicating the largest changes observed (i.e.  $>0.03$  ppm). As can be seen in Fig. 3A, changes in IL-6R-D3 conformation upon interacting with IL-6 occur predominately in the B/C, D/E, and F/G loops and the adjacent stretches in the corresponding  $\beta$ -strands. Interestingly, some significant chemical shift changes were observed on the opposite side of this domain in the E/F loop. Since a contact with the ligand can be excluded, this may indicate that upon binding IL-6 a slight structural displacement of one or both of the  $\beta$ -strands E and F results in a subsequent movement of the E/F loop to accommodate the displacement. The involvement of the B/C, D/E, and F/G loops in the binding interface with IL-6 has been predicted from model building and site-directed mutagenesis studies (15, 16, 22). These predictions are confirmed by the NMR data.

Recently, the medium-resolution x-ray data of the IL-6-IL-6R-gp130 complex (14) coupled with high resolution structures of the single components, IL-6 (11), IL-6R (13), and the three membrane-distal domains of gp130 (23) were used to create a model of the protein complex. Using this model, the authors suggested several residues in IL-6R to be involved in the interaction with IL-6. In Fig. 3B the crystal structure of the IL-6-IL-6R (D2 and D3) complex is shown. The crucial role of the residues Phe-229 and Tyr-230 in the B/C loop and Glu-278 and Phe-279 in the F/G loop for ligand binding has been demonstrated by site-directed mutagenesis (15) and was confirmed by the structure of the IL-6-IL-6R complex (14). According to this model Phe-229 (B/C loop) and Phe-279 (F/G loop) contribute 28 and 20%, respectively, to the total binding area (14).

Besides Phe-229, an apparent conformational change of the IL-6R-D3 was also observed for the adjacent residues in the B/C loop upon binding to its cognate cytokine. Chemical shift differences greater than 0.03 ppm were observed between residues Trp-225 (0.040 ppm) and Arg-231 (0.037 ppm). The resonances arising from the amide groups of Asn-226 to Tyr-230 either broadened due to intermediate chemical exchange or disappeared and reappeared due to slow exchange in the spectrum and were consequently not assigned in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of the complex. Such changes clearly showed that these residues undergo conformational changes upon binding to IL-6. One of the significant differences between the crystal structure and our NMR data concerned Arg-233 (start of  $\beta$ -strand C). Arg-233 and the adjacent residues display chemical shift differences suggesting their involvement in IL-6 binding. In accordance with this observation are site-directed mutagenesis results that showed that Arg-233 plays an important role in binding to IL-6 (15). In the crystal structure, this residue apparently does not participate in the interaction with IL-6 but has intramolecular contacts with main-chain atoms of residue Phe-297, which is one of the signature residues in the IL-6/IL-6R interface (14). Therefore, the observed chemical shift difference of Arg-233 reflects a conformational change at the beginning of strand C rather than a direct involvement in ligand binding.



**FIG. 3. Display of residues of the third extracellular domain of the interleukin-6 receptor influenced strongly by binding of IL-6.** A, the results of the chemical shift mapping data were translated onto the crystal structure of IL-6R-D3.  $\beta$ -Strands are labeled A–G, and residues that appear to undergo a significant structural change upon binding IL-6 are colored *red*. B, orientation of IL-6 and receptor IL-6R-D2/D3 relative to each other as displayed in the crystal structure. Residues of IL-6R-D3 with chemical shift differences  $\Delta\delta > 0.03$  ppm are marked in *red*.

The chemical shift mapping data revealed residues located in the D/E loop (Fig. 3A) to be influenced by ligand binding. The amino acid residues in this loop, especially Leu-254, Gln-255, His-256, and in addition Cys-258 (beginning of  $\beta$ -strand E),

exhibit pronounced chemical shift differences (0.050, 0.048, 0.077, and 0.042, respectively), which are among the largest differences observed in this study. These observations are in excellent agreement with data derived from a site-directed mutagenesis studies (22). Yawata *et al.* (22) reported that a double mutant Gln-255-Leu and His-256-Gln resulted in a decreased binding capacity of 39% compared with the wild type protein. These data are somewhat contradictory to what can be deduced from the crystal structure of the complex (14). In this model, the D/E loop is far from the bound IL-6 with the shortest C $\alpha$ -C $\alpha$  distance of 11.9 Å (IL-6, Lys-27; IL-6R-D3, Asp-253). Furthermore, the side chains of the corresponding residues of IL-6-D3 D/E loop are not geometrically positioned in the crystal structure to be making opposite contacts with the bound IL-6. Like in the case of the B/C loop, the pronounced chemical shift differences observed in the D/E loop seem to indicate a more general conformational change rather than a direct involvement in the interaction with IL-6.

Pronounced chemical shift differences were measured for resonances arising from residues located in the F/G loop (Fig. 3, A and B). This loop and the adjacent  $\beta$ -strands comprise the residues Gln-276 to Glu-283. This region contains Phe-279, which, in analogy to the human growth hormone receptor, is the hot spot residue that contributes the largest ligand binding energy (24). The Phe-279  $\rightarrow$  Ile mutation resulted in a complete loss of binding (22). For this residue as well as the preceding one (Glu-278), no resonances could be unambiguously identified in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra. The missing assignment data of Glu-278 and Phe-279 of IL-6R-D3 are indicative of fast chemical exchange (*i.e.* conformational flexibility) in the unbound form. Both residues have been shown to be crucial for IL-6 binding (15, 22). This loop also contains two glycines, Gly-280 and Gly-282. Mutagenesis of Gly-282 abolished binding to IL-6 completely (22), reflecting the importance of this residue in the F/G loop. Since glycines are known to impart flexibility to loop regions, these two residues might also be responsible for the apparent flexibility of other residues in this loop. The measured chemical shift differences for the resonances corresponding to these two glycines are the largest measured (Fig. 2), indicating a distinct change in their chemical environment. These results imply an induced fit mechanism, in which the apparently flexible F/G loop adopts a specific rigid conformation upon IL-6 binding. Many cytokine receptors exhibit glycines at identical positions in the F/G loop (16) and the residues crucial for binding (hot spots) are also located in this loop (22, 24–26). Intriguingly, in all type I

cytokine receptors these conserved glycines precede the canonical WSXWS sequence motif that is the typical signature of the C-terminal domain of the CRH. It has been suggested that this motif plays a structural role (26–28). Our data and other data suggest that this motif serves as an anchor for the adjacent mobile F/G loop that is crucial for the ligand receptor interaction.

## REFERENCES

1. Arai, K., Tsuruta, L., Watanabe, S., and Arai, N. (1997) *Mol. Cell* **7**, 1–12
2. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Herrmanns, H. M., Müller-Newen, G., and Schaper, F. (2003) *Biochem. J.* **374**, 1–20
3. Grötzinger, J. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 215–223
4. Giese, B., Au-Yeung, C. K., Herrmann, A., Diefenbach, S., Haan, C., Küster, A., Wortmann, S., Roderburg, C., Heinrich, P. C., Behrmann, I., and Müller-Newen, G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39205–39213
5. Taga, T., and Kishimoto, T. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 797–819
6. Sprang, S. R., and Bazan, J. F. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 815–827
7. Jones, S., and Rose-John, S. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 251–264
8. Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grötzinger, J., Rose-John, S., and Kallen, K.-J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 9528–9535
9. Özbek, S., Grötzinger, J., Krebs, B., Fischer, M., Wollmer, A., Jostock, T., Müllberg, J., and Rose-John, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 21374–21379
10. Schleinkofer, K., Dingley, A., Tacke, I., Federwisch, M., Müller-Newen, G., Heinrich, P. C., Vusio, P., Jacques, Y., and Grötzinger, J. (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 263–274
11. Somers, W., Stahl, M., and Seehra, J. S. (1997) *EMBO J.* **16**, 989–997
12. Xu, G. Y., Yu, H. A., Hong, J., Stahl, M., McDonagh, T., Kay, L. E., and Cumming, D. A. (1997) *J. Mol. Biol.* **268**, 468–481
13. Varghese, J. N., Moritz, R. L., Lou, M. Z., Van Donkelaar, A., Ji, H., Ivancic, N., Branson, K. M., Hall, N. E., and Simpson, R. J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15959–15964
14. Boulanger, M. J., Chow, D.-C., Brevnova, E. E., and Garcia, K. C. (2003) *Science* **300**, 2101–2104
15. Kalai, M., Montero-Julian, F. A., Grötzinger, J., Fontaine, V., Vandebussche, P., Deschuyteneer, R., Wollmer, A., Brailly, H., and Content, J. (1997) *Blood* **89**, 1319–1333
16. Grötzinger, J., Kurapkat, G., Wollmer, A., Kalai, M., and Rose-John, S. (1997) *Proteins Struct. Funct. Genet.* **27**, 96–109
17. Arcone, R., Arpaia, G., Ruoppolo, M., Malorni, A., Pucci, P., Marino, G., Ialenti, A., Di Rosa, M., and Ciliberto, G. (1993) *Eur. J. Biochem.* **211**, 347–355
18. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) *J. Biomol. NMR* **6**, 277–293
19. Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1994) *J. Biomol. NMR* **4**, 603–614
20. Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994) *J. Biomol. NMR* **4**, 171–180
21. Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1992) *Biochemistry* **31**, 1647–1651
22. Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993) *EMBO J.* **12**, 1705–1712
23. Chow, D.-C., He, X.-L., Snow, A. L., Rose-John, S., and Garcia, K. C. (2001) *Science* **291**, 2150–2155
24. Clackson, T., and Wells, J. A. (1995) *Science* **267**, 383–386
25. Horsten, U., Müller-Newen, G., Gerhartz, C., Wollmer, A., Wijdenes, J., Heinrich, P. C., and Grötzinger, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23748–23757
26. Yamasaki, K., Naito, S., Anaguchi, H., Ohkubo, T., and Ota, Y. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 498–504
27. Kernebeck, T., Pflanz, S., Müller-Newen, G., Kurapkat, G., Scheek, R. M., Dijkstra, K., Heinrich, P. C., Wollmer, A., Grzesiek, S., and Grötzinger, J. (1999) *Protein Sci.* **8**, 5–12
28. Man, D., He, W., Sze, K. H., Gong, K., Smith, D. K., Zhu, G., and Ip, N. Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 23285–23294

---

An dieser Stelle möchte ich Dank sagen:

Ich danke Herrn Prof. Dr. S. Rose-John für die sehr freundliche Aufnahme in sein Institut, die stimulierende wissenschaftliche Arbeitsatmosphäre, sowie seine Unterstützung in schwierigen Phasen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Grötzinger danke ich für die interessante Aufgabenstellung, die guten Arbeitsbedingungen, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine nachhaltige Unterstützung während dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Lindhorst und Herrn Prof. Dr. Hansen möchte ich für ihre unkomplizierte Unterstützung danken, besonders in Bezug auf den letzten Abschnitt dieser Dissertation.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. A. Dingley sehr herzlich bedanken für die NMR-spektroskopischen Messungen im Forschungszentrum Jülich und am University College London, sowie seine Hilfe bei Fragen zu dem Gebiet der NMR-Spektroskopie.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei meinen Büro- und Laborkollegen Oliver „The Sir“ Hecht, Michael „Mipa“ Pachta, Inken Lorenzen, Justyna Mysliwy und Philip „Marc“ Kraft, nicht zu vergessen unseren beiden Technischen Assistentinnen Sonja Hollmer und Britta Hansen und unserem Mitarbeiter für Computer Cord Gudegast für unvergessliche Stunden im Labor, aber auch für die Gespräche im Büro bei Kaffee, Keksen und Kuchen. Ausserdem gehört den vielen anderen Doktoranden und Doktorandinnen Dank wie Björn Schuster, Sylvius von Borries, Sebastian Dietrich, Marina Kovaleva, Christian Hundhausen, Cathrin Claussen, Björn Rabe und Sigrid Lang für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und privaten Gespräche. Dank auch all den anderen, die hier nicht aufgeführt wurden und mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben.

---

Aus meiner Aachener Zeit möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Wollmer, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, seine Laboreinrichtungen nutzen zu dürfen.

Herrn Jürgen Stahl, für die professionelle Bedienung des CD-Spektrometers und die Aufnahme der CD-Spektren.

Herrn Dr. S. Haan, für die Einführung in die Grundlagen der Molekularbiologie.

Frau Dr. K. Schleinkofer und Herrn Dr. T. Kernebeck, für die gute Kollegialität und stete Hilfsbereitschaft, wo immer sie vonnöten war.

Aber ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, dass sie mir diese Ausbildung erst ermöglichten, mich fortwährend unterstützten, mir den fehlenden Mut zusprachen in schwierigen Zeiten und die nötige Geduld für mich aufbrachten.

Ein ebensolcher Dank gebührt auch meiner Freundin Franziska, die mich während meiner Promotionszeit getragen und genauso ertragen hat. Wissenschaftler sind nicht gerade einfach...

---

## Lebenslauf

Andreas Schwantner

04.02.1970	geboren in Düsseldorf
Staatsangehörigkeit:	deutsch
1976 - 1980	Besuch der Grundschule Düsseldorf-Flingern
1980 - 1989	Besuch des Humboldt-Gymnasiums Düsseldorf-Pempelfort
05.05.1989	Allg. Hochschulreife
10.1989 - 07.1997	Studium der Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10.1996 - 07.1997	Anfertigung der Diplomarbeit im Forschungszentrum Jülich
16.07.1997	Diplom in Chemie
11.1997 - 10.1998	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut der Technischen Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
11.1998 - 06.2001	Beginn der Dissertation am Institut für Biochemie der RWTH Aachen
seit 07.2001 - heute	Fortsetzung der Dissertation am Institut für Biochemie der Universität zu Kiel

---

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Andreas Schwantner, die vorliegende Dissertation, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater, selbständig 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.

---

Referent/in: .....

Korreferent/in .....

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Zum Druck genehmigt: Kiel, .....

Der Dekan