

Bestimmung der Lösungsstruktur der dritten
Extrazellulärdomäne des Signaltransduktors
gp130 mittels mehrdimensionaler heteronuklearer
NMR-Spektroskopie

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Chemiker
Thomas Kernebeck
aus Vreden

Berichter: Privat-Dozent Dr. Joachim Grötzinger

Universitätsprofessor Dr. Dieter Enders

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Dezember 2000

Teile dieser Arbeit finden sich in den folgenden Veröffentlichungen:

Kernebeck T, Pflanz S, Müller-Newen G, Kurapkat G, Scheek RM, Dijkstra K, Heinrich PC, Wollmer A, Grzesiek S and Grötzinger J.

The signal transducer gp130: Solution structure of the carboxy-terminal domain of the cytokine receptor homology region,

Protein Sci, 8(1): 5-12, 1999.

Grötzinger J, Kernebeck T, Kallen KJ, Rose-John S.

IL-6 Type Cytokine Receptor Complexes: Hexamer, Tetramer or Both?,

Biol Chem, 380(7-8): 803-813, 1999.

Verzeichnis der Abkürzungen

1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
4D	Vierdimensional
B_0	Statisches Magnetfeld
B_{eff}	Effektives Magnetfeld
BSF-3	<i>Novel Neurotrophin-1/B Cell-Stimulating Factor-3</i>
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CNTRF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor Receptor</i>
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
D	Domäne
DDD	<i>Distance-Bound Driven Dynamics</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPOR	<i>Erythropoetin Receptor</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FN	Fibronektin
GCSFR	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor</i>
GHR	<i>Growth Hormone Receptor</i>
γ	Gyromagnetisches Verhältnis
gp130	Glykoprotein 130
HGH	<i>Human Growth Hormone</i>
HMQC	<i>Hetero Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Hetero Single Quantum Correlation</i>
I	Kernspin

IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IL-11	Interleukin-11
IL-11R	Interleukin-11 Rezeptor
INEPT	<i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer</i>
J	Kopplungskonstante
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LIFR	<i>Leukemia Inhibitory Factor Receptor</i>
M ₀	Makroskopische Gleichgewichtsmagnetisierung
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Exchange</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin M Rezeptor
ω	Lamor-Frequenz
ppm	<i>Parts per Million</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rf	Radiofrequenz
TOCSY	<i>Totally Correlated Spectroscopy</i>
TROSY	<i>Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy</i>
t ₁ , t ₂ , t ₃	Zeitvariablen
vIL-6	Virales Interleukin-6
ZBM	Zytokin-Bindungs-Modul

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	NMR-Spektroskopie	4
1.1.1	Grundlagen der NMR-Spektroskopie	4
1.2	Zytokine und ihre Rezeptoren	14
1.2.1	Funktionen der Zytokine	14
1.2.2	Hämatopoetische Zytokinrezeptoren	15
1.2.3	Die gp130-Zytokine	16
1.2.4	Strukturelle Aspekte der Aktivierung von gp130	17
1.3	Ziel der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Probenvorbereitung	21
2.2	NMR-Experimente	22
2.3	Pulssequenzen	23
2.4	Auswertung der NMR-Experimente	23
2.4.1	Die Zuordnung der Resonanzfrequenzen	24
2.4.2	Die Bestimmung der Protonenabstände	24
2.5	Grundlagen der Strukturbestimmung	26

3	Ergebnisse	31
3.1	NMR-spektroskopische Voruntersuchungen	31
3.2	Die sequentielle Zuordnungsstrategie	34
3.2.1	Das 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Experiment und das 3D- (HBHA)CBCANH-Experiment	37
3.2.2	Das 3D-HCC(CO)NH-Experiment	42
3.2.3	Das 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiment	45
3.2.4	Das 3D-HCCH-TOCSY-Experiment	48
3.3	Extraktion strukturelevanter Parameter	53
3.3.1	Die chemische Verschiebung	53
3.3.2	J-Kopplungen	55
3.3.3	Der NOE-Effekt	58
3.3.4	Austausch der Amidprotonen	67
3.3.5	Sekundärstruktur der D3 von gp130	68
3.4	Die Tertiärstruktur der D3 von gp130	71
3.4.1	Die Berechnung der dreidimensionalen Struktur	71
4	Diskussion	79
5	Zusammenfassung	87
	Literaturverzeichnis	89

Kapitel 1

Einleitung

Proteine zählen zu den vielfältigsten Makromolekülen eines Organismus. Ihre unterschiedlichen Strukturen und Funktionen sind nahezu an jedem Prozess eines lebenden Organismus beteiligt. Mit der Entzifferung des genetischen Codes konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz eines Proteins durch die Basenabfolge der DNA festgelegt ist. Unvollständig geklärt ist jedoch bis heute die Frage, welche Informationen in einer Aminosäuresequenz enthalten sind und wie Proteine (mit dieser Information) ihre dreidimensionale Struktur ausbilden können. Zwischen der Struktur und der Funktion eines Proteins besteht jedoch ein unmittelbarer Zusammenhang. So können z.B. Liganden erst durch ihre räumliche Struktur Rezeptoren mit hoher Spezifität erkennen. Auch die Steuermechanismen innerhalb einer Zelle beruhen auf Wechselwirkungen, deren Spezifität erst durch die dreidimensionalen Molekülstrukturen ermöglicht wird. Für das Verständnis der Funktion eines Proteins ist daher die Kenntnis seiner dreidimensionalen Struktur zwingend.

Die dreidimensionale Raumstruktur von Proteinen ist heute auch im Rahmen der pharmazeutischen Forschung von grossem Interesse, da durch *Rationales Drug Design* auf der Grundlage von Struktur-Wirkungs-Beziehungen neue Medikamente entwickelt werden können. Zur Aufklärung der dreidimen-

sionalen Struktur von Proteinen und anderen biologischen Makromolekülen mit atomarer Auflösung sind heute zwei Methoden gebräuchlich; die Röntgenstrukturanalyse und die NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)-Spektroskopie. Der überwiegende Anteil von Proteinstrukturen die derzeit in der *Protein Datenbank* (*PDB*, *Protein Databank*, www.rcsb.org/pdb/) hinterlegt sind, wurde mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Diese Methode ist seit vielen Jahren bewährt und erfordert hochwertige Einkristalle, aus deren Beugungsmuster man über mathematische Transformationen eine dreidimensionale Elektronendichteverteilung erhält. Aus ihr lassen sich die Positionen einzelner Atome und Atomgruppen bestimmen. Die Züchtung derartiger Einkristalle gestaltet sich für eine Vielzahl von Proteinen (insbesondere Membran- und glykosylierte Proteine) oftmals schwierig. Neben der Röntgenstrukturanalyse hat sich inzwischen die NMR-Spektroskopie zur Aufklärung der Struktur von Proteinen und DNA/RNA-Fragmenten etabliert [1]. Mit ihr können biologische Makromoleküle in Lösung - unter besonderer Berücksichtigung dynamischer Phänomene - untersucht werden. Sie ist damit eine zur Röntgenkristallographie komplementäre Methode. Die wichtigste Voraussetzung für diese Entwicklung war die Einführung der zweidimensionalen (2D) NMR-Spektroskopie [2]. Diese ermöglichte die Interpretation der komplexen NMR-Spektren von Proteinen, DNA/RNA-Fragmenten und die Ermittlung der für die Strukturberechnung benötigten Parameter.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung von Proteinen blieb aber zunächst auf relativ kleine Moleküle mit einer Grösse von bis zu 80 Aminosäureresten beschränkt, da sich für die Untersuchung grösserer Proteine Signalüberlagerungen in den 2D-Spektren als limitierend erwiesen. Drei- (3D) und vierdimensionale (4D) heteronukleare (^{15}N , ^{13}C) NMR-Techniken ermöglichten die Überwindung dieser Barriere [3], so dass heute Systeme mit einem Molekulargewicht von bis zu 40 kDa untersucht werden können. In einer relativ neuen Entwicklung führt man neben $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ auch ^2H partiell oder vollständig ein, was zu einer Vermin-

derung ungünstiger Relaxationseigenschaften und dementsprechenden Steigerung des charakteristischen Grössenbereichs auf über 60 kDa führt [4]. Dieser Grenzwert wird im wesentlichen durch die mit zunehmender Molekülmasse kürzer werdende transversale Relaxationszeit bestimmt. Da die methodische und technische Entwicklung der NMR-Spektroskopie noch lange nicht abgeschlossen ist, zeigt die erst kürzlich entwickelte TROSY (*Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*)-Technik [5]. Sie verspricht eine Unabhängigkeit der transversalen Relaxation von der Molekülmasse, so dass theoretisch biologische Systeme beliebiger Grösse untersucht werden könnten [5]. Nur die spektrale Entartung in den mehrdimensionalen Spektren würde als limitierender Faktor verbleiben.

1.1 NMR-Spektroskopie

1.1.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie beruht auf den magnetischen Eigenschaften der Atomkerne. Der Kernmagnetismus wird durch das magnetische Moment eines Atomkerns bestimmt. Alle Kerne mit einem Kernspin $I \neq 0$ zeigen ein magnetisches Moment und können nach den Gesetzen der Quantenmechanik in einem äusseren Magnetfeld nur diskrete Energiezustände einnehmen. Die Resonanzfrequenz eines Kerns ist gegeben, wenn zwischen dem magnetischen Moment eines Atomkerns in einem konstanten Magnetfeld und einem elektromagnetischen Hochfrequenzfeld mit einer bestimmten Frequenz und Polarisation, eine Wechselwirkung erfolgt. Unter dem Einfluss des Hochfrequenzfeldes werden zwischen den verschiedenen Energiezuständen der Kerne Übergänge angeregt. Die Energiedifferenz wird als Signal registriert und als Resonanzfrequenz in einem Spektrum abgebildet.

In der hochauflösenden NMR-Spektroskopie werden überwiegend Kerne mit einem Spin $I=1/2$ untersucht. Nach quantenmechanischen Überlegungen können diese Kerne in einem Magnetfeld B_0 nur zwei Orientierungen einnehmen; entweder den parallel ausgerichteten α -Zustand (*Spin-Up*) oder den antiparallelen β -Zustand (*Spin-Down*). Im Grundzustand, dem thermischen Gleichgewicht, ist der α -Zustand energetisch günstiger als der β -Zustand. Entsprechend der Boltzmann-Verteilung ist daher der α -Zustand mit höherer Wahrscheinlichkeit populiert. Diese Differenz der Besetzungszahl führt zu einer messbaren, makroskopischen Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 , die sich in Richtung des angelegten Magnetfeldes ausbildet (z- oder longitudinale Magnetisierung).

Dieser Gleichgewichtszustand kann durch ein hochfrequentes, elektromagnetisches Wechselfeld, das senkrecht zum äusseren Magnetfeld eingestrahlt wird, gestört werden. Danach wird die longitudinale Magnetisierung aus der Achse des Magnetfeldes B_0 ausgelenkt und in transversale (x,y)-Magnetisierung überführt.

Die mit der Larmor-Frequenz ω präzedierende Magnetisierung (transversale Magnetisierung) wird durch Relaxationsprozesse zurück in longitudinale Magnetisierung überführt. Die zeitabhängige Änderung der makroskopisch beobachtbaren Magnetisierung wird durch die Blochschen Gleichungen beschrieben [6].

Die Präzessionsfrequenz ω eines Kerns ergibt sich anteilig aus dem gyromagnetischen Verhältnis γ und dem effektiven Feld B_{eff} . Dieses Feld wird durch die lokalen, zusätzlichen Magnetfelder benachbarter Kerne massgeblich mitbestimmt, so dass die Resonanzfrequenz für jeden Kern unterschiedlich ist. Allerdings sind die Abweichungen nur gering, wobei sich die Resonanzfrequenzen von Kernen des gleichen Isotops nur wenig unterscheiden. Die Frequenzen werden konventionsgemäss als Differenz zu der Trägerfrequenz ω_0 ($\omega - \omega_0$) angegeben und betragen für eine Kernsorte nur wenige ppm (*Parts per Million*). Aus der sogenannten chemischen Verschiebung einer Resonanzfrequenz kann bereits auf die Zugehörigkeit zu bestimmten Molekülgruppen eines Moleküls geschlossen werden.

Der freie Induktionsabfall FID (*Free Induction Decay*) beschreibt die zeitliche Entwicklung der transversalen Magnetisierung. Die zeitabhängigen Beiträge dieses Signals bestehen aus einer Überlagerung von Sinusschwingungen aller Präzessionsfrequenzen einer Kernsorte. Die abklingenden Amplituden des freien Induktionsabfalls führen zu dem 'Zerfall' des beobachtbaren Signals. Der vollständige 'Zerfall' wird erreicht, wenn das System wieder in das thermische Gleichgewicht zurückgekehrt ist, d.h. die transversale Magnetisierung durch Relaxationsprozesse in longitudinale Magnetisierung überführt worden ist. Mit Hilfe einer mathematischen Vorschrift, der Fourier-Transformation, können anschliessend die zeitabhängigen Beiträge der einzelnen Kerne frequenzabhängig in einem Spektrum dargestellt werden.

NMR-Experimente setzen sich aus verschiedenen Wartezeiten, Radiofrequenz (rf)-Pulsen und einer Detektionszeit zusammen. Bei eindimensionalen Experimenten wird z.B. mit nur einem rf-Puls das Spinsystem angeregt und die Ant-

wort des Systems als Funktion der Zeit detektiert. Die dem Puls vorangehende Wartezeit ist die Präparationsperiode, in der das Spinsystem nach der Datenaufnahme in den Gleichgewichtszustand zurückkehrt. Der Verlauf eines eindimensionalen NMR-Experiments besteht in der Erzeugung der transversalen Magnetisierung und der anschließenden Datenaquisition. Die spektrale Frequenzachse ω im Spektrum wird im Anschluss durch die Fourier-Transformation der gemessenen Zeitdimension t erhalten.

Die Erweiterung der eindimensionalen zur mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie besteht in der Einführung zusätzlicher Frequenzachsen, die mit n weiteren inkrementierbaren Zeitvariablen verknüpft sind [6]. Während die Zeitdimension der Datenaufnahme durch die t_2 -Zeit festgelegt ist, werden weitere Zeitdomänen für jede Variable durch die Anordnung der Wartezeiten und der Pulssequenz erzeugt. Der den Zeitvariablen zugehörige FID wird in einer Datenmatrix gesammelt und die voneinander unabhängigen Zeitvariablen nacheinander durch eine Fourier-Transformation in frequenzanteilige Informationen überführt. Jeder Zeitvariablen kommt somit im Spektrum eine Frequenzachse zu, auf der dann die entsprechenden Signale abgebildet werden.

Höherdimensionale Spektren zeigen Korrelationen zwischen Paaren von Kernspins. Eine solche Korrelation wird z.B. durch eine Kopplung dieser Spins hervorgerufen. Für die hochauflösende NMR-Spektroskopie sind die skalaren und die dipolaren Kopplungen zwischen den Kernspins die entscheidenden Wechselwirkungen. Sie liefern komplementäre Informationen, die sich zur Strukturaufklärung eignen. Skalare Kopplungen werden über Bindungselektronen vermittelt, dipolare Kopplungen hingegen wirken durch den Raum.

Für ein 2D-Experiment sind mindestens zwei Pulse erforderlich, die durch die Evolutionsperiode t_1 getrennt sind. Das zeitabhängige Signal wird dann als Funktion der beiden unabhängigen Zeitvariablen t_1 und t_2 als FID während der Datenaquisition aufgenommen. Der zeitliche Verlauf eines 2D-Experiments lässt sich damit in vier Perioden einteilen:

$$\textit{Präparation} \longrightarrow \textit{Evolution}(t_1) \longrightarrow \textit{Mischung} \longrightarrow \textit{Detektion}(t_2).$$

- In der Präparationsperiode eines NMR-Experiments wird das Spinsystem in einen definierten Ausgangszustand versetzt. Dieser mit longitudinaler Magnetisierung verbundene Zustand eines Spinsystems erlaubt die Wiederholung eines Experiments unter Berücksichtigung eines erstellten Phasenzklus und einer Inkrementierung der Zeitvariablen in mehrdimensionalen Experimenten.
- In der Evolutionsperiode wird die Zeitvariable (t_1) eines mehrdimensionalen Experiments schrittweise verlängert. In dieser Warteperiode erfolgt eine konstante Inkrementierung dieser Variablen nach jedem aufgezeichneten FID. Jedes dieser Experimente führt in der Zeit der freien Präzession zu einer Frequenzmodulation (*Frequency-Labeling*) der koppelnden Kerne in der betreffenden spektralen Dimension. Die spektrale Weite in dieser Zeitdimension ergibt sich aus den festgelegten äquidistanten Intervallen der Inkrementierung in dieser Zeitdomäne. Dabei bestimmt die Anzahl der in der Periode aufgezeichneten FID-Signale die spektrale Auflösung der Linien auf dieser Frequenzachse.
- In der Mischungsperiode erfolgt der Magnetisierungstransfer zwischen den Kernen durch skalare oder dipolare Kopplung. Der koppelnde Kern k ist aufgrund der Störung durch den in t_1 modulierten Kern l mit dessen Frequenz Ω_l in der indirekten Dimension markiert.

- Für die Datenaufnahme eines NMR-Experiments wird zu Beginn der Detektionsperiode die beobachtbare Einquantenkohärenz mit Hilfe der Phase des Detektionspulses aus den möglichen Kohärenztransferwegen ausgewählt. Während dieser Zeit der freien Präzession entwickeln sich die chemischen Verschiebungen und die Kopplungen der betreffenden Spins. Das beobachtete Signal ist der FID einer festgelegten Zeitdimension, der digitalisiert und in Intervallen aufgezeichnet wird. Das Signal ist unter dem Einfluss aller Wartezeiten des Experiments, der Pulse, der Phasen und der Evolutionsvariablen amplituden- und phasenmoduliert. Für jedes durchgeführte Experiment wird so ein FID-Signal erhalten und gespeichert. Die resultierende Datenmatrix ist eine Funktion der Detektionszeit und der vorausgegangenen Evolutionsperioden des NMR-Experiments. Eine Fourier-Transformation der Zeitdomäne ergibt die gleiche Anzahl von eindimensionalen Spektren, wie Experimente in dieser Evolutionsperiode durchgeführt worden sind.

Ein NMR-Experiment wird nicht nur durch die Anzahl der rf-Pulse, sondern auch durch deren Phasenbeziehung charakterisiert [7]. In einem Phasenzklus wird eine Pulsfolge wiederholt, wobei die Phasen der Pulse (Sender) und die Empfängerphasen systematisch variiert (*Cycled*), sonst aber alle Parameter wie Delays etc. konstant gehalten werden. Die Abfolge der rf-Pulse, deren Phasen und deren Wartezeiten bestimmen, welche Informationen in einem Spektrum enthalten sein werden. So unterscheiden sich einige 2D-Experimente nur durch die unterschiedliche Abfolge von drei $\pi/2$ -Pulsen mit verschiedenen Phasen. Die systematische Veränderung der Phasen ermöglicht die Auswahl bestimmter Signale. Die Anwendung eines Phasenzklus führt ausserdem zu einer Unterdrückung von Artefakten, die durch ungenaue Flipwinkel oder durch Phasenfehler entstehen. Dazu werden lediglich alle Puls- und Empfängerphasen nach der Aufzeichnung eines FID's in einem Experiment um 90° verschoben.

Für die Auswahl bestimmter Signale wurde das Konzept der Kohärenz-Transferwege eingeführt [7]. Unter Kohärenz versteht man den Übergang zwischen einem Paar von Energiezuständen r und s in einem Energieniveau, der mit einer Änderung der magnetischen Quantenzahl verbunden ist. Die Kohärenzordnung p_{rs} ist dabei als Differenz der magnetischen Quantenzahlen M_r und M_s definiert und kann unterschiedliche Werte annehmen. Für die beobachtbare transversale Magnetisierung ergibt die Änderung der magnetischen Quantenzahl die Kohärenzordnung $p=\pm 1$; Doppelquantenkohärenzen erhalten die Kohärenzordnung $p=\pm 2$. Der longitudinalen Magnetisierung kommt die Ordnung $p=0$ zu. Eine Änderung einer Kohärenzordnung kann nur durch rf-Pulse erreicht werden. Während ein rf-Puls aus dem Gleichgewichtszustand nur eine Kohärenzordnung $p=\pm 1$ bewirkt, ist bei nachfolgenden Pulsen jede beliebige Kohärenzordnung möglich. Für die Aufnahme eines NMR-Signals sind dabei die beobachtbaren Einquantenkohärenzen erforderlich. Einer Konvention entsprechend wird die negative Einquantenkohärenz $p=-1$ detektiert. Dabei bestimmt die Anzahl der gekoppelten Spins die maximale Kohärenzordnung.

Eine entscheidende neue Entwicklung in der modernen NMR-Spektroskopie ist der Einsatz gepulster Feldgradienten. Sie bieten formal eine Alternative zu den Phasenzyklen, da durch ihren Einsatz im Experiment gezielt Kohärenztransferwege selektiert werden können [8]. Ein gepulster Feldgradient ist eine Periode, in der ein inhomogenes Feld erzeugt wird. In einem solchen inhomogenen Feld werden transversale Magnetisierung und andere Kohärenzen über die Ausdehnung der Probe hin dephasiert. Entscheidend ist, dass dephasierte Kohärenzen durch entsprechende Gradientenpulse auch wieder refokussiert werden können und ein Gradientenecho erzeugen [8].

Gepulste Feldgradienten werden heutzutage in einer Vielzahl von Protein-NMR-Experimenten eingesetzt, da ihr Einsatz mit einigen Vorteilen verbunden ist.

- Im Vergleich zu den Phasenzyklen führt der Einsatz von gepulsten Gradienten zu einer drastischen Messzeiteinsparung; man erreicht bereits in einem Transienten die gewünschte Kohärenzselektion.
- Selektion gewünschter und Dephasierung unerwünschter Kohärenzen; starke Lösungsmittelsignale führen nicht zum Überlaufen des ADC (Analog-Digital-Wandler), relativ schwache Probensignale können gut detektiert werden.
- Artefakte und t_1 -*Noises* werden weitestgehend eliminiert; es entstehen Spektren mit deutlich besserer Qualität.

Neben diesen deutlichen Vorteilen gibt es allerdings auch einige Nachteile. So wird beim Einsatz gepulster Gradienten die Hälfte der gewünschten Magnetisierung dephasiert und verworfen. Ferner führt die Selektion durch Feldgradienten dazu, dass sich während der Evolutionszeit keine phasensensitive Detektion mit einem *Scan* erzielen lässt.

Die Wirkungsweise eines Gradientenpulses (entweder ein B_1 - oder B_0 -Gradientenpuls) auf die makroskopische Magnetisierung ist in einem Vektormodell in Abbildung 1.1 dargestellt. Ein B_1 -Gradientenpuls dephasiert die Magnetisierung aus der longitudinalen Ebene. Entsprechend dephasiert ein B_0 -Gradientenpuls die transversale Magnetisierung. Der dazugehörige Phasenwinkel, der sich zur 'normalen' Dephasierung (verursacht durch chemische Verschiebung und Kopplung) hinzuaddiert, kann wie folgt ausgedrückt werden:

$$\varphi(g_0, z) = \gamma g_0 z t$$

wobei γ dem gyromagnetischem Verhältniss, g_0 der Amplitude des Gradienten, z der Koordinate der z -Achse und t der Länge des Gradientenpulses entspricht.

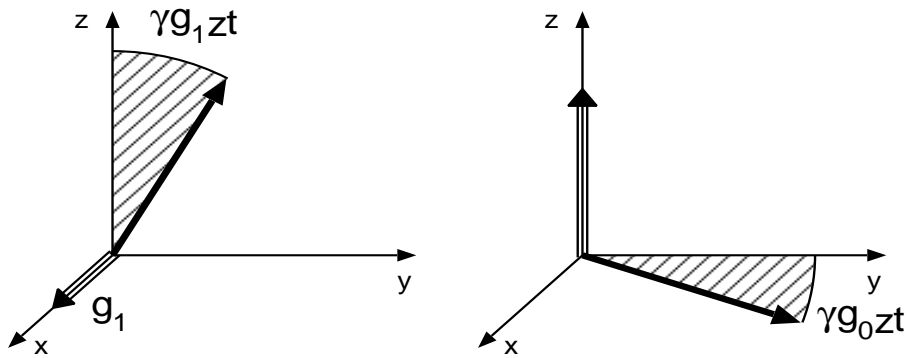


Abbildung 1.1: Wirkungsweise eines Gradientenpulses. Ein Gradientenpuls in x-Richtung führt zu einer Dephasierung in der vertikalen Ebene (links), entsprechend ein Gradientenpuls in Richtung des statischen Magnetfeldes B_0 in die transversale Ebene (rechts).

Vereinfacht kann die Probe als Zylinder betrachtet werden, der in Richtung der z-Achse in Isochromaten aufgeteilt ist. In einem homogenen Magnetfeld sind nach entsprechender Präparation die Spins in den einzelnen Schichten phasenkohärent. Während der Anwendung eines Gradientenpulses geht die Phasenkohärenz als Folge unterschiedlicher Larmor-Frequenzen innerhalb der einzelnen Ebenen verloren, d.h. die Kohärenzen erhalten eine räumlich abhängige Phase. Das Ausmass der Dephasierung ist dabei sowohl von der Pulsdauer und Amplitude, als auch vom gyromagnetischen Verhältnis abhängig.

Trotz des Einsatzes neuer Entwicklungen und mehrdimensionaler Techniken bereitet die Anwendung der ^1H -NMR-Spektroskopie auf immer grössere Biomoleküle Schwierigkeiten. Einerseits wächst mit der Grösse des Proteins die Anzahl der Wasserstoffkerne so stark an, dass die Zahl der Signalüberlagerungen selbst in 3D-Spektren unakzeptabel wird. Andererseits wächst mit dem Molekulargewicht eines Moleküls auch die Linienbreite der Signale. Die Lebensdauer der Kohärenzen (T_2 -Relaxationszeit) ist umgekehrt proportional zur Linienbreite und nimmt daher mit steigendem Molekulargewicht rapide ab.

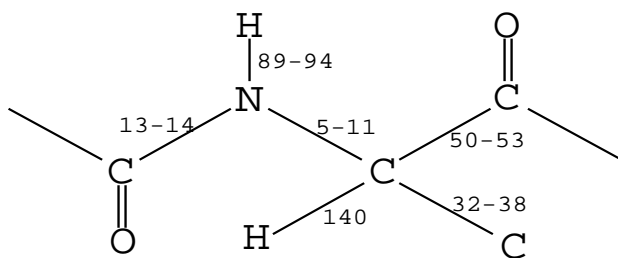


Abbildung 1.2: Charakteristische Werte von Kopplungskonstanten in Hz nach Bystrov [9].

Jeder Kohärenztransfer benötigt eine gewisse Zeit τ , innerhalb der sich die Kopplung entwickeln kann. Die Grösse von τ ist invers proportional zur Kopplungskonstanten J . Kohärenzen zerfallen aber mit der Relaxationszeit T_2 , so dass während der Entwicklung von Kopplungen ein Teil der ursprünglich vorhandenen Magnetisierung, und demzufolge ein Teil des zu beobachtenden Signals verloren geht. Wie erfolgreich ein Magnetisierungstransfer abläuft, hängt also letztendlich vom Verhältnis der Kopplungskonstanten zur Linienbreite des betreffenden Kerns ab. Nur bei verhältnismässig kleinen Linienbreiten und grossen Kopplungskonstanten ist die skalare Kopplung gegenüber der Relaxation im Vorteil. Das ist typischerweise für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von ca. 10 kDa gegeben. Die skalaren ^1H - ^1H -Kopplungen liegen in einem Bereich von 3-12 Hz. Die Linienbreiten steigen oftmals auf 30-40 Hz oder weiter an. Ein effektiver Magnetisierungstransfer ist dann nicht mehr möglich und die homonukleare NMR-Spektroskopie ist an die Grenze ihrer Anwendbarkeit gestossen.

Moderne Techniken in der Molekularbiologie erlauben heutzutage, Proteine einheitlich mit ^{15}N / ^{13}C zu markieren. Über diese NMR-aktiven Isotope (Kernspin $I=1/2$) lassen sich Kohärenzen transferieren, wobei der entscheidende Vorteil dieser Kerne in der grossen Kopplungskonstanten zwischen ^{13}C und ^1H ($^1J \approx 140$ Hz) bzw. ^{15}N und ^1H ($^1J \approx 90$ Hz) liegt. In Abbildung 1.2 sind charakteristische Werte für Kopplungskonstanten in ^{15}N / ^{13}C markierten Proteinen angegeben. Die Grösse der Kopplung ist allerdings abhängig von der Konformation des Moleküls.

Um in einem Protein Kohärenzen von H_N zu H_α zu transferieren, geht man nun nicht mehr den Weg über die kleinen vicinalen ${}^3J_{H,H-}$, sondern über die deutlich grösseren heteronuklearen Kopplungen. In einheitlich isotoptenmarkierten Verbindungen sind somit eine Vielzahl von Experimenten durchführbar, in denen heteronukleare Kerne miteinander korreliert werden. Der Kohärenztransfer lässt sich dabei u.a. durch den sog. INEP-Transfer (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer*) erreichen [10], in dem Antiphase-Magnetisierung übertragen wird. Werden in einem doppelt markierten Protein neben den 1H auch ${}^{15}N$ und/oder ${}^{13}C$ Kerne korreliert, so spricht man von sog. Tripel- bzw. Doppelresonanzexperimenten.

Die Dynamik und Wechselwirkungen mehrerer Spins in NMR-Experimenten können nur durch eine quantenmechanische Betrachtung verstanden werden. Die Eigenschaften eines Spinsystems werden hier durch Zustandsfunktionen bzw. durch den Dichtematrixoperator beschrieben [6]. Für die Herleitung einiger theoretischer Aspekte, wie die Auswahl der Kohärenztransferwege oder der Phasenzyklen, ist die Theorie des Dichtematrixoperators allerdings wenig anschaulich, so dass sich dafür das vereinfachte Modell des Produktoperatorformalismus durchgesetzt hat [6].

Der Produktoperatorformalismus folgt aus der Theorie des Dichtematrixoperators und beschreibt das Verhalten von schwach koppelnden Spinsystemen unter dem Einfluss von Pulssequenzen. Dabei wird die zeitabhängige Dichtematrix als Linearkombination in einen Satz von zueinander orthogonalen Basisoperatoren zerlegt. Diese Operatoren können nun durch eine einfache Produktbildung miteinander verknüpft werden und die Spin-Spin-Wechselwirkung zweier skalar gekoppelter Kerne beschreiben. Die durch den Raum wechselwirkende dipolare Kopplung konnte jedoch bei diesem vereinfachten Modell nicht berücksichtigt werden, so dass NOE-Experimente durch diesen Formalismus nicht vollständig darstellbar sind. Er erklärt jedoch den Kohärenz-Transfer der meisten mehrdimensionalen NMR-Experimente [7].

1.2 Zytokine und ihre Rezeptoren

1.2.1 Funktionen der Zytokine

Jeder Organismus benötigt zur Koordination der vielfältigen Funktionen seiner Zellen und Organe ein ausgeprägtes Kommunikationsnetzwerk. Dieses Netzwerk wird u.a. durch eine Vielzahl sezernierter humoraler Faktoren gewährleistet, die von spezifischen zellulären Oberflächenrezeptoren erkannt werden und daraufhin definierte Antworten hervorrufen. Neben den klassischen Hormonen, die von spezialisierten Organen produziert werden und endokrin über den Blutstrom auf das Zielgewebe einwirken, gibt es eine Vielzahl von Faktoren, die parakrin und autokrin wirken. Im Unterschied zu den klassischen Hormonen werden die als Gewebshormone bezeichneten Faktoren meist von mehreren verschiedenen Gewebe- bzw. Zelltypen produziert. Zu ihnen zählen niedermolekulare Substanzen wie Prostaglandine, aber auch eine grosse Anzahl regulatorischer Polypeptide, u.a. die sogenannten Zytokine. Unter dem Begriff Zytokine werden allgemein solche Polypeptid-Gewebshormone zusammengefasst, die auch (aber meist nicht ausschliesslich) auf Zellen des Immunsystems einwirken. Zu den Funktionen der Zytokine zählen im wesentlichen:

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

Darüberhinaus wird Zytokinen auch eine wichtige Bedeutung als neurotrophen Faktoren zugewiesen. Ihre essentiellen Funktionen vermitteln die Zytokine über Interaktionen mit spezifischen Oberflächenrezeptoren auf ihren Zielzellen. Die Bindung an den Rezeptor leitet eine intrazelluläre Signalkaskade ein, an deren Ende eine definierte Zellantwort steht.

1.2.2 Hämatopoetische Zytokinrezeptoren

Die Familie hämatopoetischer Zytokinrezeptoren wurde aufgrund gemeinsamer struktureller Merkmale definiert [11]. Der extrazelluläre Bereich enthält mindestens ein Zytokin-Bindungs-Modul (ZBM), welches aus zwei Fibronectin (FN) Typ-III ähnlichen Domänen besteht, von denen die N-terminale vier konservierte Cysteinreste und die C-terminale ein WSXWS-Motiv enthält. Die Liganden dieser Familie von Rezeptoren zeigen ebenfalls eine strukturelle Verwandtschaft; sie bestehen aus einem Bündel von vier α -Helices mit einer charakteristischen *Up-Down-Down*-Topologie [12].

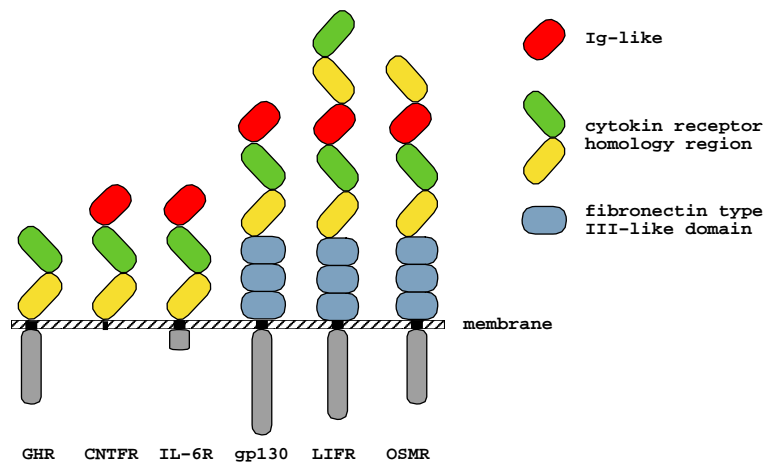


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Domänenarchitektur von GHR (*Growth Hormone Receptor*), CNTFR (*Ciliary Neurotrophic Factor Receptor*), IL-6R (*Interleukin-6 Receptor*), gp130 (*Glykoprotein 130*), LIFR (*Leukemia Inhibitory Factor Receptor*) und OSMR (*Oncostatin M Receptor*). Die zyttoplasmatischen Regionen sind grau unterlegt. Die Farbkodierung der extrazellulären Domänen ist in der Grafik angegeben.

Die Mitglieder der Familie hämatopoetischer Zytokinrezeptoren sind modular aufgebaut, zeigen jedoch in ihrer Konstitution eine individuelle Anzahl und Abfolge von Domänen bzw. Domärentypen (Abb. 1.3). Allen ist jedoch gemeinsam, dass sie keine intrinsische Kinaseaktivität in der zytoplasmatischen Region besitzen. Die Signaltransduktion erfolgt nach Rezeptoraktivierung über eine Kaskade sequentieller zytoplasmatischer Phosphorylierungsereignisse.

1.2.3 Die gp130-Zytokine

Aufgrund der gemeinsamen Nutzung des Signaltransduktors gp130 werden die Zytokine Interleukin (IL)-6, IL-11, virales IL-6 (vIL-6), *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Cardiotrophin-1* (CT-1), *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), *Novel Neurotrophin-1/B Cell-Stimulating Factor-3* (BSF-3) und Oncostatin M (OSM) auch als gp130-Zytokine bezeichnet (Abb. 1.4).

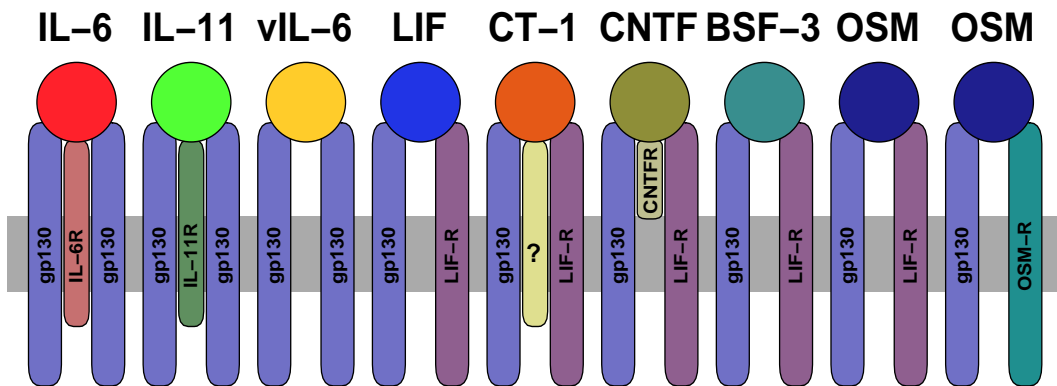


Abbildung 1.4: gp130 als signaltransduzierende Untereinheit der gp130-Zytokine.

Lediglich das virale IL-6 kann mit gp130 allein einen hochaffinen Rezeptorkomplex ausbilden (Abb. 1.4) [13]. Signalisierende Rezeptorkomplexe müssen mindestens zwei signalkompetente Rezeptorketten enthalten. Für IL-6, IL-11 und CNTF ist zunächst die Bindung an ihre spezifischen α -Rezeptoren notwendig. Erst dann kann die Ausbildung eines hochaffinen Rezeptorkomplexes, an dem im

Fälle von IL-6 und IL-11 nur gp130, im Falle von CNTF gp130 und LIFR beteiligt sind, erfolgen. Die spezifischen α -Rezeptoren für IL-6, IL-11 und CNTF besitzen keine Signalkompetenz, obwohl zumindest IL-6R und IL-11R über zytoplasmatische Bereiche verfügen. Für die Signaltransduktion von LIF und OSM scheint die Beteiligung der α -Rezeptoruntereinheit nicht notwendig zu sein. Soweit bisher bekannt, bestehen diese Rezeptorkomplexe aus einem Heterodimer von LIFR und gp130, bzw. im Falle des OSM alternativ aus OSMR und gp130 (Abb. 1.4). Möglicherweise enthalten LIFR und OSMR intracatenar sowohl den spezifischen α -Rezeptor als auch die transduzierende Rezeptorkette, da sie im Vergleich zum gp130 N-terminal über ein zusätzliches ZBM bzw. ZBM-Fragment verfügen.

Resultate aus Tiermodellen untermauern die besondere Bedeutung von gp130 als zentralem Mediator für Signale der gp130-Zytokine. So sind gp130-*Knock-Out* Mäuse nicht lebensfähig; sie sterben in der frühen Embryonalentwicklung. Induzierbare *Knock-Out* Mäuse, bei denen eine gezielte, postnatale Inaktivierung von gp130 möglich ist, entwickeln nach kurzer Zeit schwere hämatopoetische, hepatische, neurologische, cardiale, immunologische und pulmonale Defekte [14, 15, 16].

1.2.4 Strukturelle Aspekte der Aktivierung von gp130

Die funktionale Form des gp130 besteht aus 896 Aminosäureresten. Strukturvorhersagen auf der Basis der Primärstruktur [17] gehen einher mit neueren Daten [18], dass der 597 Aminosäurereste umfassende Extrazellulärteil aus sechs Domänen besteht; eine N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne (D1), zwei FN Typ-III Domänen, die gemeinsam das ZBM konstituieren (D2 und D3) und drei weitere FN Typ-III Domänen (D4, D5 und D6). Dem C-Terminus von D6 folgt die helikale Transmembranregion mit 22 überwiegend hydrophoben Aminosäureresten und der strukturell bisher nicht charakterisierte zytoplasmatische Teil, bestehend aus 277 Aminosäureresten.

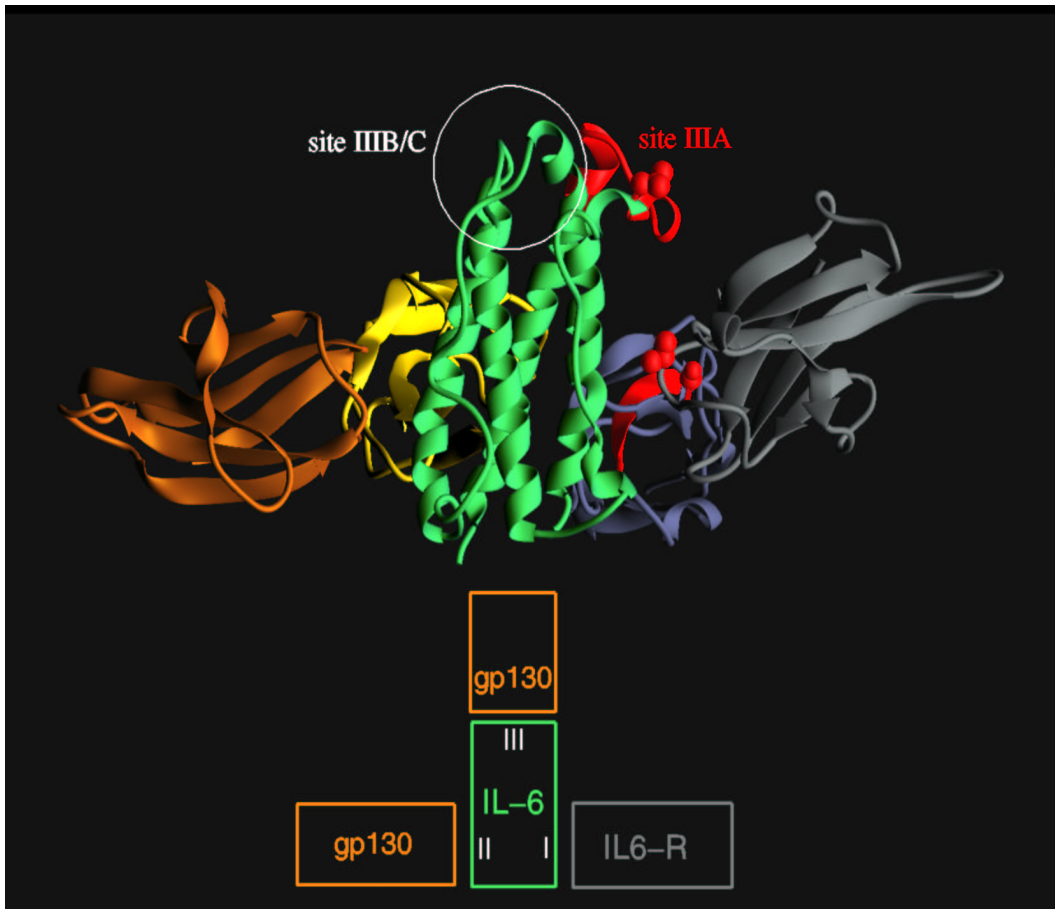


Abbildung 1.5: Modell des IL-6/IL-6R/gp130-Komplexes. Die obere Bildhälfte zeigt eine Ribbon-Präsentation des ternären Komplexes (Aufsicht). Das ZBM des IL-6R (D2 grau, D3 blaugrau) bindet an IL-6 (grün) über *Site I*, während ein gp130 Molekül das IL-6 mit seinem ZBM (D2 bronze, D3 gelb) über *Site II* kontaktiert. Rot markiert sind die Regionen, die an der Bindung des zweiten gp130 Moleküls beteiligt sind. Die untere Bildhälfte zeigt eine schematische Darstellung des tetrameren Komplexes. Angedeutet ist eine mögliche Position des zweiten gp130 Moleküls.

Die Wechselwirkung der gp130-Liganden mit den einzelnen Rezeptoren erfolgt über spezifische Oberflächenbereiche der Zytokine. Durch Modellbau- /Mutagenesestudien und Strukturanalysen wurden an einigen gp130-Zytokinen drei Hauptinteraktionsflächen (*Sites*) mit den jeweiligen Rezeptoren definiert [19, 20, 21, 22]. IL-6, IL-11 und CNTF binden zunächst über die sogenannte *Site I* an ihre jeweils spezifischen α -Rezeptoren, woraufhin zwei gp130 (IL-6 und IL-11) bzw. ein gp130 und ein LIFR (CNTF) zur Ausbildung eines signaltransduzie-

renden Rezeptorkomplexes an *Site* II und III der Zytokine rekrutiert werden. Offensichtlich bildet die initiale Bindung des α -Rezeptors an *Site* I die konformativen Voraussetzungen einer nachfolgenden gp130-Rezeptorbindung an *Site* II und *Site* III, möglicherweise durch die Generierung neuer Bindungs epitope oder konformativer Änderungen im Zytokin [18]. Jede der drei *Sites* wird im aktivierten Rezeptorkomplex dementsprechend von einer Rezeptorkette gebunden. LIF interagiert wie CNTF über *Site* II mit gp130 und über *Site* III mit dem LIFR [23, 24]. Eine *Site* I konnte im Molekül nicht identifiziert werden. Im Falle der Zytokine vIL-6, CT-1, BSF-3 und OSM liegen bisher noch keine detaillierten Daten vor.

In Abbildung 1.5 ist ein Modell des ternären IL-6/IL-6R/gp130 Komplexes dargestellt, das auf der Grundlage der Kristallstruktur des *Human Growth Hormone* (HGH)/ *Growth Hormone Receptor* (GHR)-Komplexes HGH/(GHR)₂ angefertigt wurde [22]. Das ZBM des IL-6R (D2 grau, D3 blaugrau) bindet IL-6 über *Site* I, wobei eine detaillierte Auswertung des Modells ergab, dass die für die Bindung entscheidenden Aminosäurereste innerhalb von D3 lokalisiert sind [25, 26]. Diese Hypothese konnte inzwischen durch Plasmonresonanz-Experimente, in denen die isolierte D3 eine im Vergleich zum gesamten Rezeptor nur um 10% reduzierte Affinität zeigt, bestätigt werden [27]. Desweiteren führten eine Vielzahl von Punktmutationen, die auf der Basis des Modells erzeugt wurden, zur Identifizierung eines Epitops in der *Hinge*-Region des gp130-ZBM's (D2 bronze, D3 gelb), dass an *Site* II des Zytokins bindet [28, 29]. Die Vermutung, dass die isolierte D3 des Signaltransduktors gp130 in der Lage ist IL-6 zu binden, konnte allerdings bisher nicht bestätigt werden. NMR-Experimente, mit denen sich Bindungskonstanten im millimolaren Bereich nachweisen lassen, stehen jedoch noch aus. Eine Erklärung ist möglicherweise in neueren Daten zu finden, nach denen die Bildung des hochaffinen tetrameren Komplexes kein konzertierter Prozess ist, sondern eine sequentielle Abfolge einzelner Bindungsereignisse darstellt [18]. Über welche

Epitope das zweite gp130 Molekül an *Site* III des IL-6 bindet, ist bislang noch nicht geklärt. Ergebnisse aus Mutagenesestudien lassen aber vermuten, dass die Ig-Domäne D1 dabei eine entscheidende Rolle spielt [18, 29].

1.3 Ziel der Arbeit

Obwohl gp130 bereits als signaltransduzierende Rezeptorkomponente für die gp130-Typ Zytokine identifiziert und charakterisiert wurde, ist der Mechanismus (bzw. die Mechanismen) seiner ligandeninduzierten Aktivierung bisher nur ansatzweise verstanden. Strukturdaten bezüglich der Ligandenbindung von hämatopoetischen Zytokinrezeptoren mit vergleichsweise einfacher Architektur ihrer Extrazellulärregion, wie z.B. GHR und EPOR (*Erythropoietin-Rezeptor*) [19, 30], lassen Analogieschlüsse nur in begrenztem Umfang zu. Durch gp130-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die drei membrandistalen Domänen D1-D3 für die Interaktion mit IL-6/IL-6R ausreichen [31]. In Bezug auf die Ligandenbindung ist bislang geklärt, dass ein Epitope der *Hinge*-Region des ZBM's und mindestens ein Epitop der Ig-ähnlichen Domäne D1 an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Die dritte Domäne des gp130 ist als Bestandteil des ZBM's ein entscheidender Baustein. Mit der Kenntnis der Lösungsstruktur wäre die Grundlage zu einem erweiterten Verständnis der gp130 Zytokin/ α -Rezeptorkomplex-Wechselwirkung geschaffen. Zum Zweck einer detaillierten funktionellen und strukturellen Analyse hat die vorliegende Arbeit das Ziel, die Lösungsstruktur der dritten Extrazellulärdomäne des gp130 mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie aufzuklären.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Probenvorbereitung

Für die Bestimmung der Lösungsstruktur von D3 des gp130 wurde zunächst das unmarkierte Protein aus *Escherichia coli* isoliert, gereinigt und renaturiert [32]. Anhand umfangreicher Vorarbeiten wurden Bedingungen ermittelt, unter denen das Protein bis zu einer Konzentration von 2 mM stabil und monodispers vorliegt. Die wässrige Lösung enthielt 2,5 mM KCl, 200 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,1% (m/v) NaN₃ und wurde mit 0,1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Proben enthielten mindestens 10% (v/v) D₂O.

Probe	markierter Kern	Lösungsmittel
a	¹⁵ N	A
b	¹⁵ N/ ¹³ C	A
c	¹⁵ N/ ¹³ C	B

A: wässriges Puffersystem
B: deuteriertes Puffersystem

Tabelle 2.1: NMR-Proben der D3 von gp130.

Nachdem unter den gewählten Bedingungen die 1D- und 2D-NMR-Experimente vielversprechende Ergebnisse lieferten (Kap. 3.1), wurden drei einfach- bzw. doppeltmarkierte Proben (in wässrigem (A) bzw. deuteriertem Puffersystem (B), Tab. 2.1) zur Durchführung der Tripelresonanz- und ^{15}N -/ ^{13}C -editierten Experimente angefertigt.

Für die verschiedenen Experimente (Tab. 2.2) wurde ein Probenvolumen von 500 μl mit einer Proteinkonzentration von 2,0 mM gewählt. Die Proben wurden nach dem Aufkonzentrieren mittels einer Amicon-Ultrafiltrationszelle entgast und in ein 5 mm NMR-Probenröhrchen überführt.

2.2 NMR-Experimente

Die in Tabelle 2.2 zusammengefassten Experimente wurden auf einem UNITY500- bzw. INOVA600-Spektrometer der Firma Varian, bzw. einem DMX600-Spektrometer der Firma Bruker bei einer Temperatur von 25°C aufgenommen. Die relevanten Parameter für die verschiedenen Experimente sind

Tabelle 2.2: Mit der D3 des gp130 durchgeführte NMR-Experimente.

Experiment	Punkte der Datenmatrix ^a (Kern)			spektrale Breite (Hz)			Messzeit h	Probe
	t_1	t_2	t_3	F_1	F_2	F_3		
(HBHA)CBCA(CO)NH ^[33]	72(^{13}C)	38(^{15}N)	512(^1H)	8,446	1,458	8,389	12	b
(HBHA)CBCANH ^[34]	57(^{13}C)	33(^{15}N)	512(^1H)	8,446	1,458	8,389	20.5	b
HCC(CO)NH ^[35]	70(^{13}C)	38(^{15}N)	512(^1H)	10,639	1,458	8,389	15	b
HNCA ^[34]	41(^{15}N)	46(^{13}C)	512(^1H)	1,736	4,167	9,259	10.5	b
HBHA(CBCACO)NH ^[36]	70(^1H)	38(^{15}N)	512(^1H)	3,333	1,458	8,389	15	b
^{15}N -TOCSY-HSQC ^[37]	82(^1H)	44(^{15}N)	512(^1H)	6,002	1,667	9,260	16	a
^{13}C -HCCH-TOCSY ^[38]	64(^1H)	60(^{13}C)	384(^1H)	4,000	6,002	7,788	39	c
^{15}N -NOESY-HSQC ^[39]	100(^1H)	52(^{15}N)	512(^1H)	7,143	1,667	9,260	59	a
^{13}C -HCCH-NOESY ^[40]	143(^1H)	72(^{13}C)	384(^1H)	6,667	6,024	9,260	62	c
HNHA ^[41]	75(^1H)	35(^{15}N)	512(^1H)	4,167	938	9,260	15	a

^akomplexe Datenpunkte

ebenfalls in Tabelle 2.2 angegeben. Das Prozessieren der aufgenommenen Daten erfolgte auf einem SGI O₂-Computer mit dem Software-Paket NMRPipe [42]. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm NMRVIEW [43].

2.3 Pulssequenzen

In den im Ergebnisteil vorgestellten Pulssequenzen, symbolisieren die schmalen und breiten Rechteckpulse 90°- bzw. 180°-Flipwinkel. Pulse, die nicht mit einer Phase gekennzeichnet sind, wurden aus der x-Richtung gegeben. Die Phasen der Pulse (ϕ_x , mit $x=1, 2, \dots$), die *Delays* (griechische Buchstaben) und die Entkopplungssequenzen sind der in Tabelle 2.2 (Kap. 2.2) aufgeführten Literatur zu entnehmen.

2.4 Auswertung der NMR-Experimente

Zu Beginn einer NMR-spektroskopischen Strukturuntersuchung muss jedem Kern in dem zu untersuchenden Molekül ein Resonanzsignal zugeordnet werden. Anhand dieser Resonanzzuordnung (Assignment) können dann die Kreuzsignale der NOESY-Spektren den jeweiligen Protonenpaaren zugeordnet werden. Aus den Intensitäten dieser NOE-Kreuzsignale lassen sich dann die Abstände der Protonenpaare errechnen, welche die Grundlage für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Proteins sind. Die Strategien, die zur Erstellung des sequenzspezifischen Resonanzassignments und zur Auswertung der NOESY-Spektren verwendet wurden, sind den entsprechenden Kapiteln im Ergebnisteil vorangestellt.

2.4.1 Die Zuordnung der Resonanzfrequenzen

Von den in Tabelle 2.2 aufgeführten Experimenten diente das 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH- in Verbindung mit dem 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment zur sequenzspezifischen Zuordnung der $^{13}\text{C}_\beta$ -, $^{13}\text{C}_\alpha$ -, ^{15}N - und $^1\text{H}_\text{N}$ -Resonanzfrequenzen. Für die Zuordnung der übrigen ^{13}C -Seitenresonanzen wurde das 3D-HCC(CO)NH-Experiment verwendet. Mit der Auswertung des 3D-HBHA(CBCACO)NH- und 3D-HCCH-TOCSY-Experiments konnten die Resonanzfrequenzen der aliphatischen ^1H -Kerne zugeordnet werden. Das 3D- ^{15}N -TOCSY-HSQC- und 3D-HNCA-Experiment enthalten bezüglich der oben erwähnten Experimente redundante Informationen und wurden zur Verifizierung des Resonanzassignments verwendet. Sie werden daher im Ergebnisteil nicht detailliert besprochen.

Aus dem 3D-HNHA-Experiment liessen sich die $^3\text{J}_{\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha}$ -Kopplungskonstanten bestimmen, welche für die Identifizierung der Sekundärstrukturelemente von Bedeutung sind.

2.4.2 Die Bestimmung der Protonenabstände

Der mit Abstand wichtigste Parameter für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie ist der NOE-Effekt. Die interatomaren Abstände lassen sich aus den Kreuzsignalintensitäten über folgenden Zusammenhang ableiten [44]:

$$\left. \frac{dI}{dt} \right|_{t=0} = \sigma_{ij} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10r_{ij}^6} \left(\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2\tau_c^2} - \tau_c \right).$$

Hierbei entspricht I der Intensität des NOE; σ_{ij} der Kreuzrelaxationsrate; γ dem gyromagnetischen Verhältnis; \hbar dem Plankschen Wirkungsquantum dividiert durch 2π ; τ_c der Rotationskorrelationszeit; ω der Larmorfrequenz und r_{ij} dem Abstand zwischen den Kernen i und j .

Die dipolare Kreuzrelaxationsrate ist invers proportional zur sechsten Potenz des Abstands zweier Kerne und abhängig von der Rotationskorrelationszeit des atomaren Verbindungsvektors. In erster Näherung sind in der ersten Phase des Aufbaus des NOE-Effekts (d.h. für kurze Mischzeiten) die Kreuzsignalintensitäten proportional zu den Kreuzrelaxationsratenkonstanten. Daher können anhand eines Referenzabstandes die Abstände zwischen Protonen nach folgender Beziehung berechnet werden:

$$r_i = \sqrt[6]{r_{ref} \frac{S_{ref}}{S_i}}.$$

S_{ref} und S_i sind dabei die integrierten Kreuzsignalintensitäten für kürzere Mischzeiten; r_{ref} der Referenzabstand (z.B. die geminalen Protonen einer Methylen-Gruppe); r_i ist der unbekannte, zu berechnende Protonenabstand. In der Praxis gelingt es jedoch nicht, derartig kurze Mischzeiten zu wählen, dass die Aufbaunäherung für den NOE-Effekt gilt (schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis). Für längere Mischzeiten sind allerdings die Kreuzrelaxationsratenkonstanten für die Kreuzsignalintensitäten nicht mehr direkt proportional, da sich Spindiffusionseffekte in den Spektren bemerkbar machen. Ohne den Umweg über komplizierte Rechenverfahren können genaue Proton-Proton-Abstände aus NOE-Kreuzsignalintensitäten nicht mehr bestimmt werden. Man geht deshalb dazu über, die Kreuzsignale hinsichtlich ihrer Intensitäten in bestimmte Gruppen einzuteilen (z.B. stark, mittel, schwach). Jede Gruppe wird mit einer oberen Abstandsgrenze versehen. Die Abstandsgrenzen der einzelnen Gruppen werden von den Kreuzsignalintensitäten zwischen Protonen mit bekanntem Abstand bestimmt. Somit können die zugeordneten Signale der NOESY-Spektren hinsichtlich ihrer Intensität den einzelnen Gruppen zugeordnet werden. Die so ermittelten Protonenabstände werden dann als Grundlage für die Strukturrechnung verwendet (Kap. 3.4.1).

2.5 Grundlagen der Strukturbestimmung

Die aus den NOESY-Experimenten bestimmten Protonenabstände entsprechen internen Koordinaten und müssen zur Generierung der dreidimensionalen Struktur in kartesische Koordinaten überführt werden. Die Lösung einer solchen Transformation wäre nur bei Kenntnis aller intermolekularen Atomabstände eindeutig. Aus einem vollständigen Satz von NOESY-Experimenten ist jedoch nur ein Teil aller möglichen Protonen-Protonen-Abstände ($<5\text{\AA}$) zugänglich. Ein Verfahren mit dem dreidimensionale Strukturen aus interatomaren Abständen generiert werden kann, ist das sog. *Distance-Geometry* (DG)-Verfahren. Die mathematischen Grundlagen dieses Verfahrens wurden von L.M. Blumenthal [45] entwickelt und von Crippen und anderen in den Bereich der chemischen Strukturaufklärung eingeführt [46, 47, 48]. Eine erweiterte *Distance-Geometry*-Prozedur im Sinne von Crippen [49], welche für die Strukturgenerierung der D3 des Signaltransduktors gp130 verwendet wurde, ist im Folgenden kurz erläutert.

1. *Set-up*

Das *Set-Up* bildet den Ausgangspunkt einer DG-Rechnung und beinhaltet die Topologie des Proteins auf der Basis seiner Primärstruktur. Hierunter versteht man die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren, die eine Bestimmung der dadurch auftretenden Diederwinkel ($\phi, \psi, \omega, \chi_1$ u.a.) erlaubt. Aus den N Atomen des Proteins wird eine $N \times N$ -Abstandsmatrix aufgebaut. In diese Matrix werden zunächst die holonomen Abstandsinformationen wie Bindungslängen, Abstände die sich aus geminalen Atompaaren ergeben (Bindungswinkel) bzw. vicinale Atomabstände (Diederwinkel) eingetragen. Die daraus resultierende Abstandsmatrix wird in zwei triangulare Bereiche unter- und oberhalb der Diagonalen eingeteilt. In die Dreiecksmatrix oberhalb der Diagonalen, dessen Elemente mit einem willkürlichen Abstand von 999\AA vorbesetzt sind, werden die Obergrenzen (*Upper Bounds*)

der experimentellen und holonomen Abstände eingetragen. In die untere Dreiecksmatrix, deren Elemente zunächst die Summe der van der Waals-Radien der jeweiligen Atompaaire enthalten, werden die Untergrenzen der experimentellen Abstände eingetragen.

2. *Bound Smoothing*

In der *Bound Smoothing*-Routine wird der Einfluss der gegebenen Abstände durch das Lösen einfacher Dreiecksungleichungen berücksichtigt. Dieses Vorgehen rechtfertigt sich durch die Überlegung, dass obwohl nur ein Teil der möglichen $\frac{N*(N-1)}{2}$ Abstände aus den Experimenten und den holonomen Informationen bekannt ist, diese jedoch die Übrigen stark einschränken. Für die obere Dreiecksmatrix (*Upper Bounds*) betrachtet man die Atome (i, j, k) und deren Abstände zueinander. Der Abstand der Atome i und j muss kleiner (oder gleich) sein als die Summe der Abstände von i zu k und von k zu j:

$$D_{ij}^U \leq \text{MIN}(D_{ij}^U, D_{ik}^U + D_{kj}^U)$$

für $k=1, N$; $k \neq i, j$. Wenn der Abstand zwischen i und j grösser ist als $D_{ik}^U + D_{kj}^U$, wird D_{ij}^U auf die Summe der beiden Abstände reduziert. Diese Prozedur wird solange wiederholt, bis sich in der Matrix keine Änderung mehr ergibt. Im Anschluss daran erfolgt ein entsprechendes Vorgehen für die untere Dreiecksmatrix (*Lower Bounds*). In diesem Fall lautet die Dreiecksungleichung:

$$D_{ij}^L \geq \text{MAX}(D_{ij}^L, D_{ik}^L - D_{kj}^U, D_{jk}^L - D_{ki}^U).$$

Die Obergrenze des Abstands von k und j muss gleich oder grösser sein als die Summe der Obergrenzen des Abstandes von i nach j und der Untergrenze des Abstandes von i nach k.

3. *Embedding*

Die *Embedding*-Prozedur beinhaltet die Transformation der Abstände aus dem $\frac{N*(N-1)}{2}$ -dimensionalen Abstandsraum in ein dreidimensionales kartesisches Koordinatensystem.

Aus der Abstandsmatrix wird unter Zuhilfenahme des Kosinus-Satzes und der Wahl eines Referenzpunktes 0 eine metrische Matrix $\underline{\underline{G}}$ erzeugt, deren Elemente die Skalarprodukte der Vektoren der Atome i bzw. j zum Referenzpunkt ($\vec{r}_{0i}, \vec{r}_{0j}$) sind. Eine Diagonalisierung der symmetrischen Matrix erlaubt die Bestimmung der diagonalen Eigenwertmatrix $\underline{\underline{\Lambda}}$ und der Eigenvektoren $\underline{\underline{Y}}$. Der Zusammenhang zwischen der metrischen Matrix $\underline{\underline{G}}$ und den kartesischen Koordinaten besteht darin, dass die Wurzel der Eigenwerte die Hauptachsen des Moleküls repräsentieren, und die Eigenvektoren der Verteilung der Atome längs dieser Achsen entsprechen [50].

Die metrische Matrix wäre bei Kenntnis der exakten Abstände zwischen den Atomen eindeutig und die beschriebene Prozedur würde zu genau drei von Null verschiedenen Eigenwerten führen. Da jedoch die aus den NOESY-Experimenten und der *Bound-Smoothing*-Prozedur gewonnenen Abstände nur innerhalb einer Ober- und Untergrenze definiert sind, müssen zur Aufstellung der metrischen Matrix die Abstände zufällig innerhalb dieser Grenzen gewählt werden. Diese Vorgehensweise hat eine unterschiedliche Projektion der Abstände in den dreidimensionalen Raum zur Folge, weshalb eine mehrfache Wiederholung der *Embedding*-Prozedur zu einem Ensemble von Strukturen führt, die alle mit den experimentellen Daten verträglich und um eine mittlere Struktur verteilt sind.

Da die metrische Matrix nicht vollständig ist, existieren mehr als drei von Null verschiedene Eigenwerte. Ihre Vernachlässigung führt bei der Projektion der Abstandsmatrix in den 3D-Koordinatenraum zu verzerrten Geometrien, die in der nachfolgenden *Optimization*-Routine korrigiert werden.

4. Optimization

In der *Optimization*-Prozedur werden für die Optimierung aus der *Embedding*-Prozedur erhaltenen verzerrten Geometrien verschiedene Fehlerfunktionen herangezogen und mit dem *Conjugata-Gradient*-Algorithmus minimiert. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl reine Abstands- als auch gemischte Chiralitäts- und Abstandsfehlerfunktionen verwendet.

Die Abstandsfunktion beinhaltet die Differenzen zwischen den experimentell bestimmten Abständen B_{ij} und den Abständen D_{ij} in der zu optimierenden Struktur:

$$\mathbf{E}(\text{Distances}) = \sum_{\substack{\text{Violated } ij \\ \text{Distances}}} k' (B_{ij}^2 - D_{ij}^2)^2.$$

k' entspricht der Konstanten 1 \AA^{-4} .

Um die richtige Chiralität der Aminosäuren zu gewährleisten, erfolgt die Berechnung von Chiralitätsvolumina nach:

$$f_{ch} \equiv (\vec{v}_1 - \vec{v}_4)[(\vec{v}_2 - \vec{v}_4)(\vec{v}_3 - \vec{v}_4)].$$

Dabei entsprechen $\vec{v}_1, \vec{v}_2, \vec{v}_3, \vec{v}_4$ den Ortsvektoren der vier Liganden eines Chiralitätszentrums, geordnet nach der Cahn-Ingold-Prelog-Nomenklatur [51]. Die vier Liganden des C_α -Atoms ordnen sich dann nach N, C, C_β , H_α an und haben im Falle einer L-Aminosäure definitionsgemäss ein positives Volumen. Diese Chiralitätsvolumina werden neben dem Abstandskriterium in der gemischten Chiralitäts- und Abstandsfehlerfunktion berücksichtigt. Es werden dann die Abweichungen des in der zu optimierenden Struktur bestimmten Chiralitätsvolumens f_{ch}^* vom Chiralitätsvolumen des Proteins f_{ch} bestimmt:

$$\mathbf{E}(\text{Chiral}) = \sum_{\substack{\text{Chiral} \\ \text{Centers}}} k'' (f_{ch} - f_{ch}^*)^2 + \sum_{\substack{\text{Chiral Center} \\ \text{Distances}}} k' (B_{ij}^2 - D_{ij}^2)^2.$$

k'' entspricht der Konstanten 1 \AA^{-6} .

Die Anwendung des *Conjugate-Gradient*-Algorithmus kann methodenbedingt in ein lokales Minimum führen. Um gegebenenfalls ein solches Minimum verlassen zu können, um so den zugänglichen Konformationsraum effizienter auf weitere Minima abzusuchen, wird der Optimierung eine Moleküldynamik-Simulation nachgeschaltet.

5. *Distance-Bound Driven Dynamics*

Die Anwendung einer Moleküldynamik-Simulation mit einem vollständigen Kraftfeld, bestehend aus bindenden und nicht-bindenden Wechselwirkungsanteilen, hat zur Folge, dass der RMS (*Root Mean Square*)-Wert des generierten Struktur-Ensembles aufgrund der hohen potentiellen Energie der verzerrten Geometrie stark zunimmt [52, 53, 54, 55, 56]. Um dennoch die Eigenschaft der Moleküldynamik-Simulation zu nutzen, durch Versatzschritte gegebenenfalls aus lokalen Minima herauszufinden, führten Scheek et al. [49] eine vereinfachte Moleküldynamik-Simulation ein, die sog. *Distance-Bound Driven Dynamics* (DDD) oder Abstandsgrenzen-Dynamik. In dieser Form der Moleküldynamik-Simulation bewegen sich die Atome in einem vereinfachten Kraftfeld, welches lediglich ein quadratisches Abstandsgrenzen-Potential beinhaltet:

$$V = K \left[\sum_{D>U} (D_{ij}^2 - U_{ij}^2)^2 + \sum_{L>D} (D_{ij}^2 - L_{ij}^2)^2 \right].$$

Hierin entspricht K der Kraftkonstanten; D_{ij} dem Abstand der Atome i und j in der assoziierten Struktur; U_{ij} und L_{ij} den oberen und unteren Grenzen aller Abstände in der Matrix.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 NMR-spektroskopische Voruntersuchungen

Mit der unmarkierten dritten Domäne des Signaltransduktors gp130 wurden die Bedingungen wie Puffersystem, pH-Wert und Salzkonzentration optimiert, so dass die für eine NMR-spektroskopische Strukturuntersuchung geforderte Proteinkonzentration von mindestens 1 mM bei gleichzeitiger Langzeitstabilität der Probe erreicht wurde (Kap. 2.1). Anhand dieser Proteinlösung wurden die optimalen Messbedingungen, wie z.B. Temperatur, etc. bestimmt, und untersucht, ob das Protein unter den gewählten Bedingungen in seiner nativen Form vorliegt.

Das 1D-Protonenspektrum (Abb. 3.1) zeigt über den gesamten Messbereich scharfe Signale. Die relativ grosse Dispersion und Signalintensität im Bereich der Amid- (*Backbone* H_N) und Methylprotonen (um und deutlich unterhalb von 0 ppm) sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Protein eine definierte Tertiärstruktur besitzt. Die zahlreichen isolierten Signale im 2D-NOESY-Spektrum bestätigen dieses (Abb. 3.2). Auf den ersten Blick lässt sich Abschätzen, dass D3 aufgrund nur weniger H_N - H_N -Konnektivitäten kaum helikale-Anteile enthält. Hingegen sprechen die zahlreichen, tieffeldverschobenen Signale von H_α -

Protonen im Bereich zwischen 4,8-6,2 ppm und vereinzelt erkennbare H_α - H_α -Konnektivitäten für einen nicht unerheblichen Anteil an β -Faltblattsegmenten.

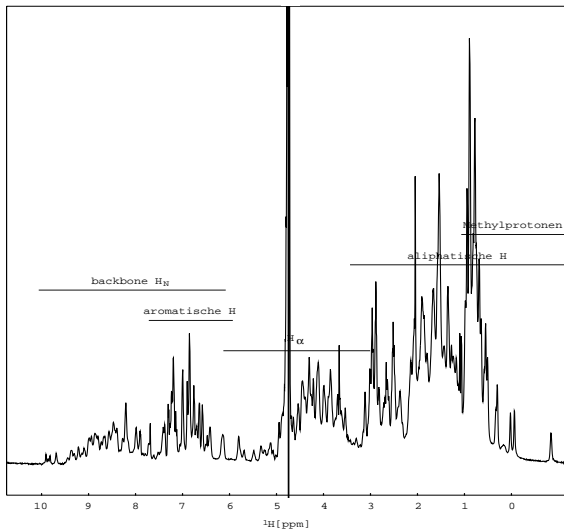


Abbildung 3.1: Eindimensionales Protonenspektrum von D3 bei 25°C. Ein-gezeichnet sind die typischen Bereiche der chemischen Verschiebung für Amid-, aromatische-, H_α -, aliphatische- und Methylprotonen in Proteinen.

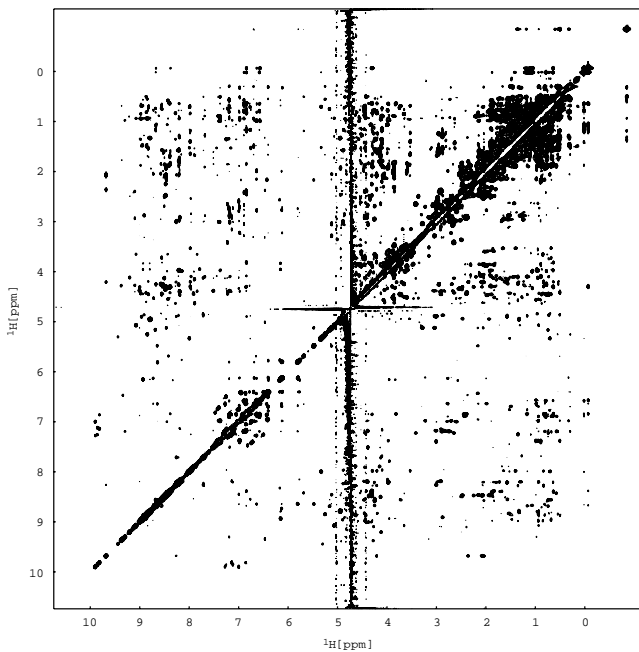


Abbildung 3.2: 2D-NOESY-Spektrum von D3. Die Mischzeit τ_m des Experiments betrug 150 ms. Das Spektrum wurde mit 64 Transienten und 2048 (komplexen) \times 512 (realen) Datenpunkten aufgenommen.

Nachdem die 1D- und 2D- ^1H -Experimente vielversprechende Ergebnisse lieferten, wurde eine ^{15}N -markierte Probe hergestellt und ein 2D- ^{15}N -HSQC (*Hetero Single Quantum Correlation*)-Spektrum aufgenommen. Im 2D- ^{15}N -HSQC-Experiment werden die $^1\text{H}_\text{N}$ -Spins mit den Resonanzen der kovalent verknüpften ^{15}N -Kerne korreliert.

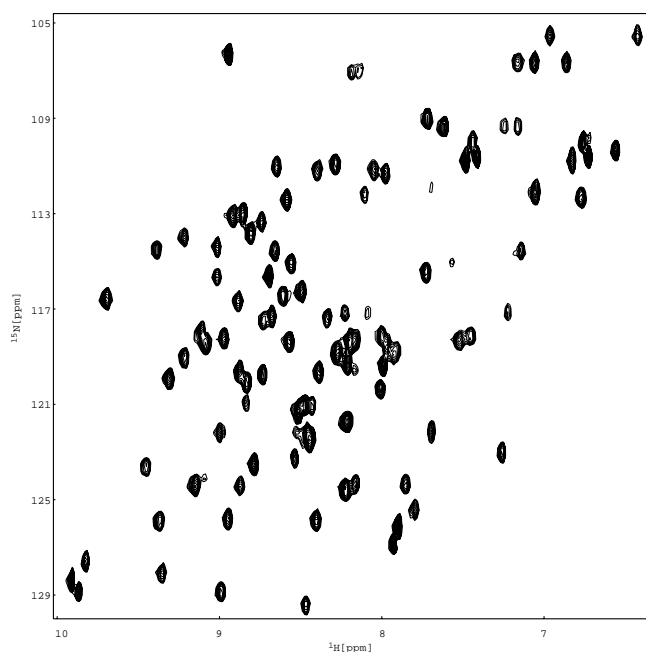


Abbildung 3.3: 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum von D3. Das Spektrum wurde mit zwei Transienten und 2048 (komplexen) \times 64 (realen) Datenpunkten aufgenommen.

Das 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum von D3 ist in Abbildung 3.3 dargestellt und zeigt eine grosse Disperion im Bereich der $^1\text{H}_\text{N}$ - und ^{15}N -Resonanzfrequenzen. Die Anzahl aller Resonanzsignale im 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum sollte kleiner/gleich der Summe der Amidprotonen (abzüglich der Arginin- und Lysin-Seitenkettenamidprotonen) sein. Im Regelfall erhält man aufgrund spektraler Entartung und schnellem Austausch einiger Amidprotonen mit dem Lösungsmittel weniger Signale. Im 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum von D3 zählt man 108 der maximal 130 möglichen $^1\text{H}_\text{N}/^{15}\text{N}$ -Resonanzsignale. Da auch diese NMR-spektroskopischen Experimente erfolgreich verliefen, wurde nun $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markiertes Protein hergestellt (Kap. 2.1).

3.2 Die sequentielle Zuordnungsstrategie

Die dritte Extrazellulärdomäne des Signaltransduktors gp130 besteht aus 109 Aminosäureresten (Tab. 3.1; Kap. 4, Abb. 4.3) und hat ein Molekulargewicht von 12,5 kDa. In neutraler Lösung sollten 787 ^1H -Resonanzfrequenzen in einem Spektrum mit skalarer Verschiebungskorrelation beobachtbar sein. Nicht berücksichtigt wurden dabei die $^1\text{H}_N$ -Protonen der Imidazolringsysteme, der Arginin- und Lysinseitenketten, der N-terminalen Aminogruppen sowie die OH-Protonen der Hydroxyl- und Carbonylgruppen, da alle diese mit dem Lösungsmittel austauschen und daher nicht detektierbar sind.

Aminosäure	Anzahl	Aminosäure	Anzahl	Aminosäure	Anzahl
Ala	3	Gly	3	Pro	7
Arg	5	His	1	Ser	14
Asn	5	Ile	9	Thr	9
Asp	7	Leu	6	Trp	4
Cys	1	Lys	9	Tyr	5
Gln	3	Met	2	Val	5
Glu	8	Phe	3		

Tabelle 3.1: Aminosäurezusammensetzung der dritten Extrazellulärdomäne des Transduktors gp130.

Der erste Schritt einer NMR-spektroskopischen Strukturuntersuchung besteht in der Zuordnung der Resonanzsignale zu einem bestimmten Kern im zu untersuchenden Molekül. Die Zuordnung der Resonanzen muss sequenzspezifisch erfolgen, d.h. jedem Resonanzsignal muss ein Kern einer bestimmten Aminosäure in der Primärstruktur zugeordnet werden. Die NMR-Spektroskopie liefert vier Arten von Informationen, die in einer Sekundärstrukturuntersuchung zur Anwendung kommen. Dazu zählen die Wechselwirkungen über chemische Bindungen (skalare Kopplungen), Wechselwirkungen durch den Raum (dipolare Kopplungen), die chemische Verschiebung und das Austauschverhalten der *Backbone*-Amidprotonen, wobei der letzteren keine Bedeutung im sequenzspezifischen Resonanzassignment zukommt. Strategien, die in einer sequenzspezifischen Zuordnung der Resonanzen zur Anwendung kommen, hängen von der Markierung der Probe (^{15}N , $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$), d.h. den zugänglichen Spektren ab.

Wüthrich und Mitarbeiter entwickelten ein Verfahren, das die sequenzspezifische Zuordnung der Aminosäurespinsysteme eines un- bzw. ^{15}N -markierten Proteins ermöglicht [1]. Zunächst werden dabei die Spinsysteme der im Protein auftretenden Aminosäurereste mit Hilfe von TOCSY (*Totally Correlated Spectroscopy*)- und/oder COSY (*Correlated Spectroscopy*)-Spektren zugeordnet. In einem COSY-Spektrum erzeugen die 20 proteinogenen Aminosäuren 14 verschiedene Kreuzsignalmuster, anhand derer die entsprechenden Aminosäurereste identifiziert werden können. Während sieben der Signalmuster eine direkte Zuordnung des entsprechenden Aminosäurerestes erlauben, können die restlichen Spinsysteme nur im Rahmen der sequentiellen Zuordnung durch NOE-Konnektivitäten zugeordnet werden. Im zweiten Schritt des Verfahrens werden die Spinsysteme der einzelnen Aminosäurereste den Resonanzen in den NOESY-Spektren zugeordnet. Die Methode der sequenzspezifischen Zuordnung von ^1H -Resonanzfrequenzen erlaubt in den NOESY-Spektren die Identifizierung von benachbarten Aminosäureresten in einer Peptidkette und erfolgt mit Hilfe von ^1H - ^1H -Wechselwirkungen zwischen den H_α -, H_β - und H_N -Protonen eines Proteins. Sie beruhen auf der Tatsache dass, unabhängig von der Sekundärstruktur eines Peptidsegments, zwischen den Hauptkettenprotonen der Aminosäurereste ein ^1H - ^1H -Abstand kleiner ist als $3,6 \text{ \AA}$ (s. Kap. 3.3.3, Tab. 3.2) und daher mindestens eine NOE-Konnektivität zwischen den benachbarten Resten detektierbar sein muss.

Für die Identifizierung der sequentiell aufeinanderfolgenden Aminosäurereste in einem Protein sind dabei drei ^1H - ^1H -Abstände in besonderer Weise geeignet. Diese Abstände sind durch die $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ -, $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ - und $d_{\beta\text{N}}(i,i+1)$ -Konnektivitäten charakterisiert (s. Kap. 3.3.3, Tab. 3.2). Die Intensitäten der zugehörigen Kreuzsignale sind abhängig von den Abständen der Protonen und können als Funktion der Torsionswinkel ϕ , ψ und χ beschrieben werden (s. Kap. 3.3.2, Abb. 3.20). Daher können aus diesen Signalintensitäten erste Rückschlüsse auf die Sekundärstrukturelemente eines Proteins gezogen werden.

Substituiert man neben den Stickstoffatomen alle Kohlenstoffatome durch das Isotop ^{13}C , so enthält das Protein keine isolierten Spinsysteme mehr. Damit werden Experimente möglich, in denen die Kerne benachbarter Spinsysteme direkt miteinander korreliert werden können. Seit der Einführung durch Bax im Jahr 1990 [57] wurden bis heute eine Vielzahl der sog. Tripelresonanzexperimente veröffentlicht. Diese Experimente stellen mehr als nur eine Alternative zum klassischen sequentiellen Resonanzassignment dar, da die sequentielle Strategie hier über die Zuordnung der $^1\text{H}_{\alpha-}$, $^1\text{H}_{\beta-}$, $^{13}\text{C}_{\alpha-}$, $^{13}\text{C}_{\beta-}$, $^{15}\text{N-}$, $^1\text{H}_{\text{N-}}$ und $^{13}\text{CO-}$ Kerne benachbarter Spinsysteme verläuft. Eine vorherige Kenntnis des jeweiligen Spinsystemtyps ist bei einer derartigen Zuordnungsstrategie nicht mehr notwendig. Beispielsweise ergibt die Auswertung des 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Experiments, welches ausschliesslich interresiduale Korrelationen zwischen den $^{13}\text{C}_{\beta-}$ und $^{13}\text{C}_{\alpha-}$ -Kernen des Aminosäurerestes i und den $^1\text{H}_{\text{N-}}$ und $^{15}\text{N-}$ -Kernen des Aminosäurerestes $i+1$ liefert, zusammen mit der Auswertung eines 3D-(HBHA)CBCANH-Experiments in dem $^{13}\text{C}_{\beta-}$, $^{13}\text{C}_{\alpha-}$, $^1\text{H}_{\text{N-}}$ und $^{15}\text{N-}$ -Kerne intra- und interresidual korreliert werden, einen einfachen Weg für eine sequentielle Zuordnung. Fehler, basierend auf zweifelhaften Zuordnungen von sequentiellen Konnektivitäten, wie sie in der klassischen Zuordnungsstrategie möglich sind, werden hier vermieden. Das Resonanzassignment der Seitenketten kann durch die Auswertung der 3D-HCC(CO)NH-, 3D-HBHA(CBCACO)NH- und 3D-HCCH-TOCSY-Experimente komplettiert werden.

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 Evolutions- oder Akquisitionszeit entwickeln, werden in Klammern angegeben.

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

Das 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Experiment stellt in Verbindung mit dem 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment ein Paar von Tripelresonanzexperimenten dar, mit dem die sequentielle Zuordnung der $^{13}\text{C}_{\beta^-}$, $^{13}\text{C}_{\alpha^-}$, $^1\text{H}_N$ - und ^{15}N -Resonanzen durchgeführt werden kann. Das 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Experiment ergibt ausschliesslich interresiduale Korrelationen zwischen den $^{13}\text{C}_{\beta^-}$ - und $^{13}\text{C}_{\alpha^-}$ -Kernen eines Aminosäurerestes i und den ^{15}N - und $^1\text{H}_N$ -Kernen des sequentiell benachbarten Aminosäurerestes $i+1$ (Abb. 3.4). In Kombination mit dem 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment, in dem sowohl inter- als auch intraresiduale Korrelationen zwischen den $^{13}\text{C}_{\beta^-}$ - und $^{13}\text{C}_{\alpha^-}$ -Kernen der Aminosäurereste i und $i+1$ und den ^{15}N - und $^1\text{H}_N$ -Kernen des Aminosäurerestes $i+1$ erzeugt werden, ergibt sich ein eleganter Weg für eine beinahe lückenlose sequentielle Zuordnung (Abb. 3.4, Abb. 3.7). Darüber hinaus gibt es eine Reihe weiterer Kombinationen von Tripelresonanzexperimenten, wie z.B. das 3D-HN(CO)CA- und das 3D-HNCA-Experiment, die zu einer sequentiellen Zuordnung eingesetzt werden können.

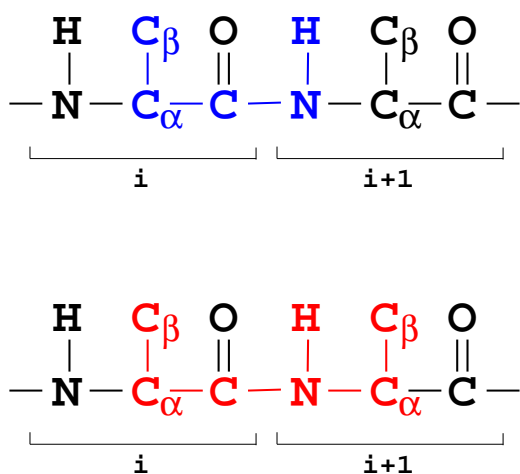


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Korrelationen im 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH- (oben) und 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment (unten). Das 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Experiment liefert ausschliesslich interresiduale (blau), das 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment inter- und intraresiduale Korrelationen (rot) zwischen den $^{13}\text{C}_{\beta^-}$, $^{13}\text{C}_{\alpha^-}$, ^{15}N - und $^1\text{H}_N$ -Kernen.

Tripelresonanzexperimente, in denen neben $^{13}\text{C}_\alpha$ -, ^{15}N - und $^1\text{H}_N$ - auch $^{13}\text{C}_\beta$ - Kerne miteinander korreliert werden, haben den Vorteil, dass bei gleicher $^{13}\text{C}_\alpha$ -chemischer Verschiebung zweier oder mehrerer Aminosäurereste die $^{13}\text{C}_\beta$ -Resonanzen für die sequentielle Zuordnung herangezogen werden können. Ausserdem kann anhand der $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -chemischen Verschiebung der jeweilige Spinsystem-Typ bestimmt werden, was die Identifikation eines sequentiell zugeordneten Peptidsegments in der Primärstruktur ermöglicht.

Die Pulssequenz für das 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Experiment ist in Abbildung 3.5 dargestellt und wird im folgenden besprochen. Nach einem 90° -Protonenpuls

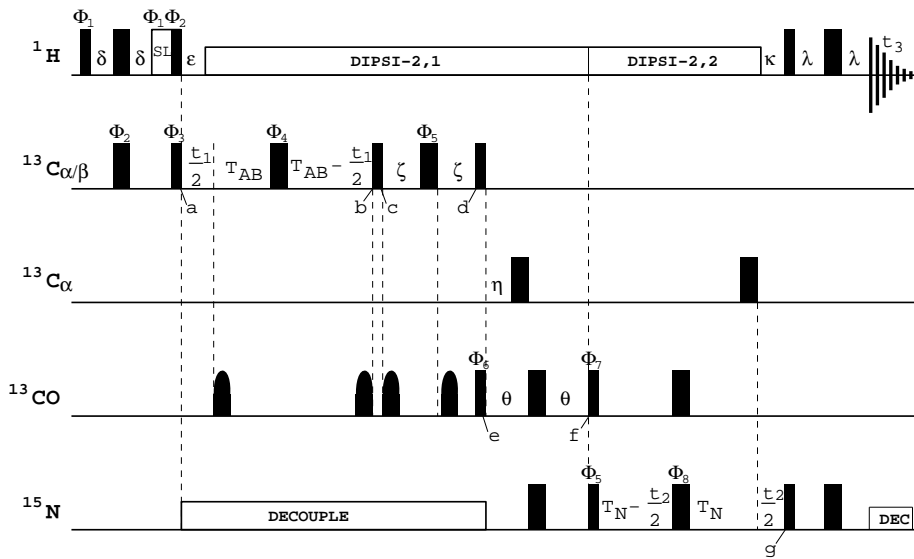


Abbildung 3.5: Pulssequenz des 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Experiments (s. Kap. 2.3).

wird die Magnetisierung der $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Protonen durch ein Paar simultaner $^1\text{H}/^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ - 90° -Pulse (INEPT-Schritt) auf die $^{13}\text{C}_\alpha$ - bzw. $^{13}\text{C}_\beta$ -Kerne transferiert. Während der ersten *Constant-Time*-Periode $2T_{AB}$ (a-b) entwickeln sich deren chemische Verschiebungen. Skalare Kopplungen mit den ^{13}CO -Kernen werden während dieser Evolutionsperiode durch einen selektiven ^{13}CO - 180° -Puls bei $t_1/2$ (nach a) eliminiert. Ein $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ - 90° -Puls am Ende der ersten *Constant-Time*-Periode (b) transferiert die Magnetisierung der $^{13}\text{C}_\beta$ - auf die benachbarten

$^{13}\text{C}_\alpha$ -Kerne, und wird über die relativ grosse $^1\text{J}_{\text{C}_\alpha\text{CO}}$ -Kopplung nach einem Intervall von 2ζ (c-d) auf den Carbonylkohlenstoff übertragen. Die Magnetisierung der ^{13}CO -Kerne dephasiert im Intervall 2θ (e-f) durch Kopplung mit den benachbarten ^{15}N -Spins und wird durch ein Paar simultaner $^{13}\text{CO}/^{15}\text{N}$ - 90° -Pulse (f) auf die Stickstoffkerne transferiert. Während der zweiten *Constant-Time*-Evolutionsperiode $2T_N$ (f-g) entwickeln sich die chemischen Verschiebungen der Stickstoffkerne. Die Datenakquisition (t_3) erfolgt, nachdem die Magnetisierung der Stickstoffkerne über einen reversen INEPT-Schritt auf die kovalent gebundenen Amidprotonen transferiert wurde.

Die Pulssequenz des 3D-(HBHA)CBCANH-Experiments ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Wie im 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Experiment wird die Protonenmag-

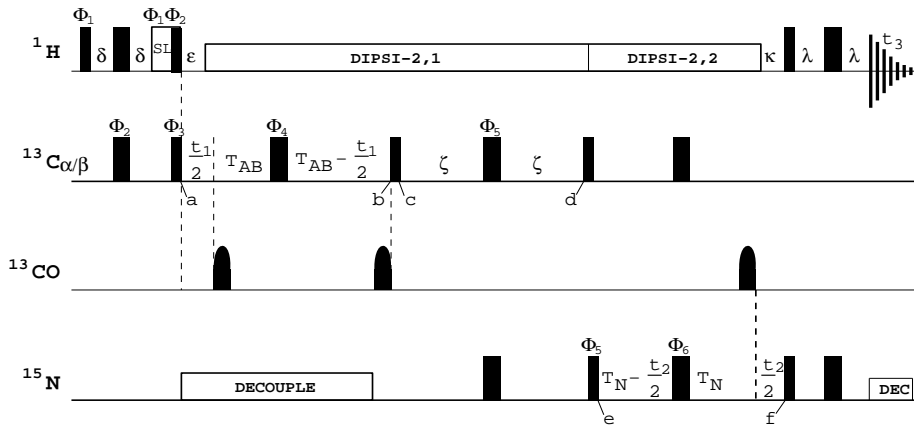


Abbildung 3.6: Pulssequenz des 3D-(HBHA)CBCANH-Experiments (s. Kap. 2.3).

netisierung durch einen INEPT-Transfer auf die $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Spins übertragen und am Ende der *Constant-Time*-Periode $2T_{AB}$ (a-b) durch einen $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ - 90° -Puls (b) auf die $^{13}\text{C}_\alpha$ -Kerne transferiert. Während des Transferintervalls 2ζ (c-d) wird die $^{13}\text{C}_\alpha$ -Magnetisierung durch intraresiduale $^1\text{J}_{\text{C}_\alpha\text{N}}$ - und interresiduale $^2\text{J}_{\text{C}_\alpha\text{N}}$ -Kopplungen dephasiert und kann zum Zeitpunkt d durch ein Paar simultaner $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}/^{15}\text{N}$ - 90° -Pulse auf die Stickstoffkerne transferiert werden. Während der zweiten *Constant-Time*-Periode $2T_N$ (e-f) entwickeln die ^{15}N -Kerne ihre che-

mische Verschiebung. Nachdem die Magnetisierung durch einen reversen INEPT-Schritt (g) auf die Amidprotonen übertragen wurde, erfolgt die Datenaquisition (t_3).

Zu Beginn der sequentiellen Zuordnung werden für einen beliebigen Aminosäurerest i aus den beiden dreidimensionalen Spektren (für ein aus dem 2D- ^{15}N -HSQC-

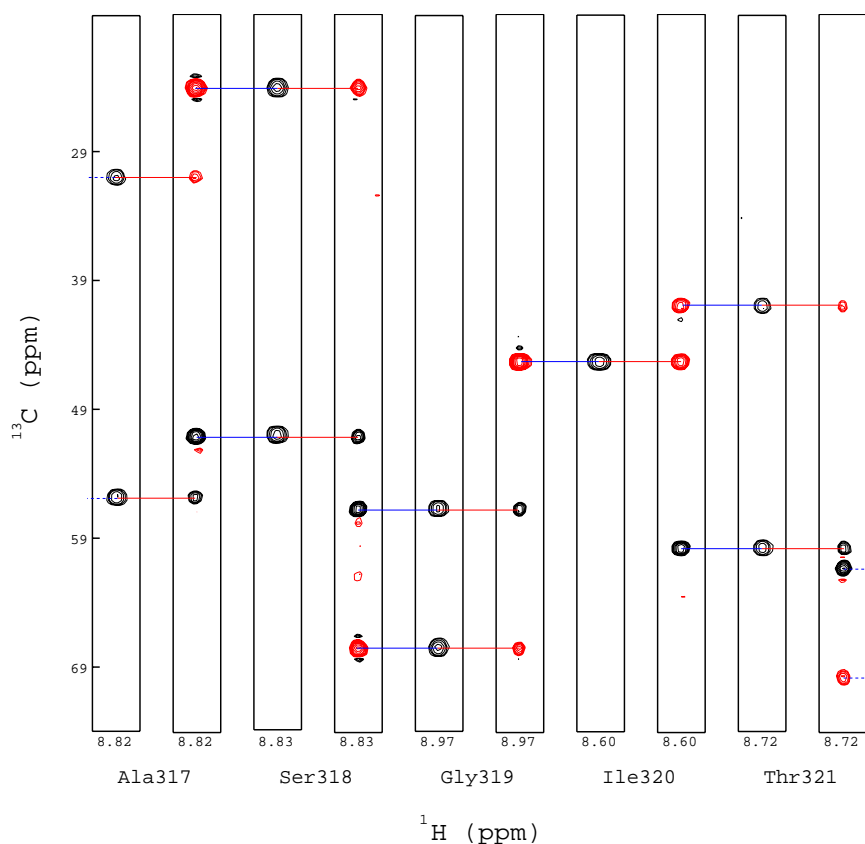


Abbildung 3.7: Sequentielle Zuordnung der $^{13}\text{C}_{\beta^-}$, $^{13}\text{C}_{\alpha^-}$, ^{15}N - und $^1\text{H}_N$ -Resonanzen für das Peptidsegment Ala317-Thr321 von D3. Für die Aminosäurereste sind die 2D-Ausschnitte aus dem 2D-(HBHA)CBCA(CO)NH- bzw. 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment paarweise angeordnet. Die roten Linien kennzeichnen identische Resonanzsignale innerhalb, die blauen Linien identische Resonanzsignale zwischen den kombinierten Ausschnitten. Die Resonanzsignale der $^{13}\text{C}_{\beta^-}$ -Kerne haben im 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment eine negative Intensität (rot).

-Spektrum ermitteltes $^1\text{H}_N/^{15}\text{N}$ -Frequenzpaar) entsprechende zweidimensionale Ausschnitte extrahiert, kombiniert und miteinander verglichen (Abb. 3.7). Signale gleicher ^{13}C - chemischer Verschiebung (rote Linien) entsprechen da-

bei den $^{13}\text{C}_\alpha/^{13}\text{C}_\beta$ -Frequenzen des Aminosäurerestes $i-1$ die sich im 3D-(HBHA)CBCANH-Spektrum auf der $^1\text{H}_N/^{15}\text{N}$ -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 $^1\text{H}_N/^{15}\text{N}$ -Frequenz des Aminosäurerestes $i+1$ wiedergefunden werden (blaue Linien). Welche Resonanzfrequenz den $^{13}\text{C}_\alpha$ - bzw. $^{13}\text{C}_\beta$ -Kernen zugeordnet werden muss, kann anhand des 3D-(HBHA)CBCANH-Spektrums entschieden werden, in dem die Resonanzsignale der $^{13}\text{C}_\beta$ -Kerne mit negativer Intensität (rot) auftreten. Die beschriebene Prozedur ist für fünf Aminosäurereste

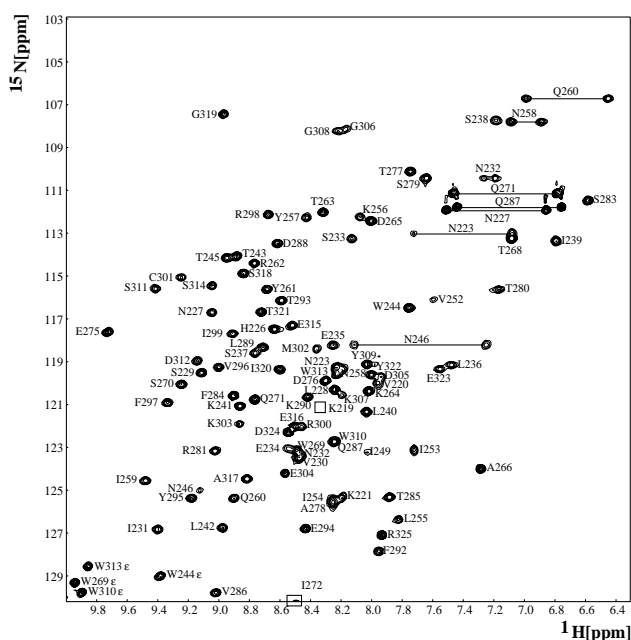


Abbildung 3.8: 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum der dritten Domäne des Signaltransduktors gp130. Die $^1\text{H}_N/^{15}\text{N}$ -Resonanzsignale von D3 sind mit den zugehörigen Aminosäureresten markiert. Die Seitenkettenamidprotonen der Aminosäurereste Asparagin und Glutamin sind durch waagerechte Linien miteinander verbunden. Resonanzsignale die aufgrund geringer Intensität nicht sichtbar sind, wurden durch kleine Vierecke markiert.

($^1\text{H}_N/^{15}\text{N}$ -Frequenzpaare) in Abbildung 3.7 veranschaulicht. Nachdem anhand dieser Strategie die $^{13}\text{C}_\beta$ -, $^{13}\text{C}_\alpha$ -, ^{15}N - und $^1\text{H}_N$ -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 Ala317, Ser318, Gly319, Ile320 und Thr321 in der Primärstruktur der D3 zugewiesen.

In Abbildung 3.8 sind den $^1\text{H}_N/^{15}\text{N}$ -Resonanzsignalen im 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum die entsprechenden Aminosäurereste der D3 zugeordnet. Die Zuordnung der Seitenkettenamidprotonen erfolgte anhand der NOESY-Spektren (Kap. 3.3.3).

3.2.2 Das 3D-HCC(CO)NH-Experiment

Aus dem 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH- und 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment ergeben sich u.a. die Zuordnungen der aliphatischen $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Resonanzen. Die Resonanzzuordnung der aliphatischen ^{13}C -Kerne kann durch das 3D-HCC(CO)NH-Experiment vervollständigt werden. Das 3D-HCC(CO)NH-Experiment liefert ausschliesslich interresiduale Korrelationen zwischen den aliphatischen ^{13}C -Kernen eines Aminosäurerestes i und den ^{15}N - und $^1\text{H}_N$ -Kernen des sequentiell benachbarten Aminosäurerestes $i+1$ (Abb. 3.9, ausgenommen ^{13}C -Kerne aromatischer Ringsysteme). Da die $^1\text{H}_N/^{15}\text{N}$ -Frequenzen der Aminosäurereste aus der sequentiellen Zuordnung bekannt sind (Kap. 3.2.1), können die ^{13}C -Seitenkettenresonanzen sequenzspezifisch zugeordnet werden.

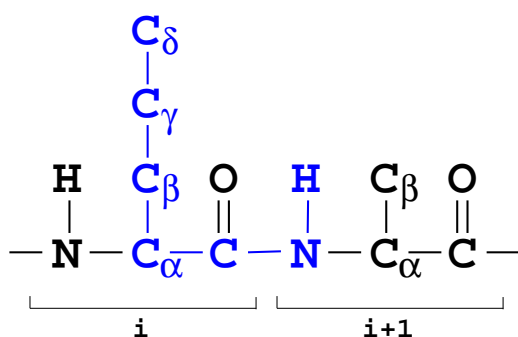


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Korrelationen im 3D-HCC(CO)NH-Experiment. In dem Experiment werden ausschliesslich interresiduale Korrelationen zwischen ^{13}C -, ^{15}N - und $^1\text{H}_N$ -Kernen erzeugt.

In Abbildung 3.11 sind für das Peptidsegment Ala317, Ser318, Gly319, Ile320 und Thr321 die entsprechenden 2D-Ausschnitte aus dem 3D-HCC(CO)NH-Experiment dargestellt. Neben den aus der sequentiellen Zuordnung bereits bekannten $^{13}\text{C}_\alpha/^{13}\text{C}_\beta$ -Frequenzen (Kap. 3.2.1), können hier die übrigen aliphatischen ^{13}C -Resonanzen für Glu316 ($^{13}\text{C}_\gamma$) und Ile320 ($^{13}\text{C}_{\gamma_1}$, $^{13}\text{C}_{\gamma_2}$ und $^{13}\text{C}_\delta$) zugeordnet werden. Der 2D-Ausschnitt des Aminosäurerestes Ser318 enthält keine $^{13}\text{C}_\alpha$ -Resonanz, jedoch zwei Signale im hohen Feld. Auf dieser Spur hätte man die $^{13}\text{C}_\alpha/^{13}\text{C}_\beta$ -Resonanzsignale von Ala317 erwartet, die bereits übereinstimmend im 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH- und 3D-(HBHA)CBCANH-Experiment bestimmt wurden (s. Kap. 3.2.1, Abb. 3.7).

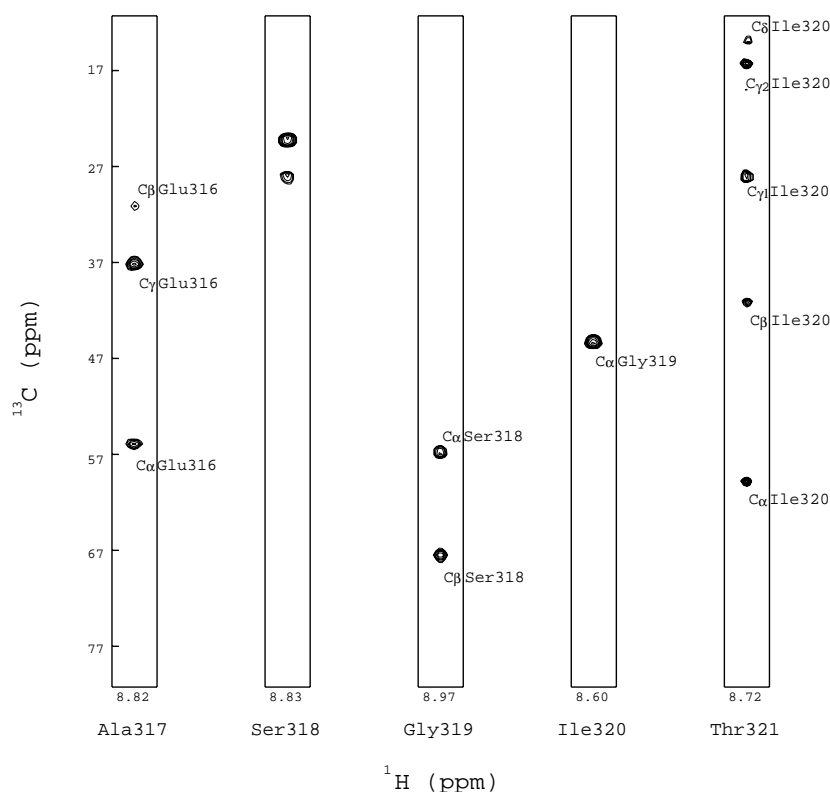


Abbildung 3.11: Sequentielle Zuordnung der ^{13}C -Seitenkettenresonanzen. Abgebildet sind die 2D-Ausschnitte für das Peptidsegment Ala317-Thr321. Die auf den Spuren erkennbaren Signale sind den entsprechenden ^{13}C -Kernen zugeordnet.

3.2.3 Das 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiment

Mit dem 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiment wurde das Resonanzassignment auf die aliphatischen $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Protonen ausgeweitet. Im 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiment werden die $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Kerne eines Aminosäurerestes i mit den ^{15}N - und $^1\text{H}_\text{N}$ -Kernen des benachbarten Aminosäurerestes $i+1$ korreliert (Abb. 3.12), was die sequenzspezifische Zuordnung der $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Resonanzen erlaubt.

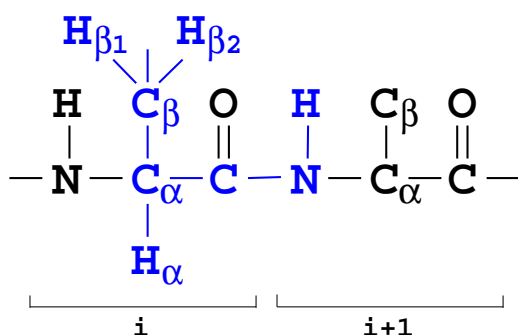


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Korrelationen im 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiment. In dem Experiment werden ausschliesslich interresiduale Korrelationen zwischen $^1\text{H}_\alpha$ -, $^1\text{H}_\beta$ -, ^{15}N - und $^1\text{H}_\text{N}$ -Kernen erzeugt.

Die Pulssequenz des 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiments ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Das Experiment ist vom Konzept analog zum 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH-Experiment (s. Kap. 3.2.1, Abb. 3.5). Nach einem 90° -Protonenpuls entwickeln die $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Kerne in der *Semi-Constant-Time*-Evolutionsperiode (a-b) ihre chemische Verschiebung. Am Ende dieser Periode ist die $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Magnetisierung durch Kopplung mit den benachbarten ^{13}C -Kernen in Antiphase und kann durch ein Paar simultaner $^1\text{H}/^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ - 90° -Pulse (b) in transversale ^{13}C -Antiphase magnetisierung transferiert werden, die in der Periode ϵ rephasiert. Im Intervall 2γ (c-d) dephasiert die transversale ^{13}C -Magnetisierung aufgrund homonuklearer Kopplung mit benachbarten Kernen, wobei Kopplungen zwischen aliphatischen und Carbonyl-Kohlenstoffkernen durch einen $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ - $180^\circ_{\phi_4}$ -Puls eliminiert werden. Die Pulsamplitude wird dabei so gewählt, dass keine ^{13}CO -Kerne angeregt werden. Der $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ - 90° -Puls am Ende des 2γ -Intervalls (d) transferiert die Magnetisierung der $^{13}\text{C}_\beta$ auf die

$^{13}\text{C}_\alpha$ -Kerne, welche dann über die relativ grosse Kopplung $^1J_{\text{C}_\alpha\text{CO}}$ nach einem Intervall von 2ζ (e-f) durch zwei simultane $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}/^{13}\text{CO}$ - 90° -Pulse auf den Carbonylkohlenstoff übertragen werden kann. Im darauffolgenden Transfer-Intervall 2θ (g-h) dephasieren die ^{13}CO -Spins, und ein Paar simultaner $^{13}\text{CO}/^{15}\text{N}$ - 90° -Pulse (h) transferiert ^{13}CO -Antiphase- in ^{15}N -Antiphasemagnetisierung. Während der sich anschliessenden *Constant-Time*-Evolutionsperiode $2T_N$ (i-j) entwickeln die ^{15}N -Kerne ihre chemische Verschiebung. Nachdem die ^{15}N -Magnetisierung durch einen reversen INEPT-Schritt (j) auf die Amidprotonen zurückübertragen wurde, erfolgt die Datenakquisition (t_3).

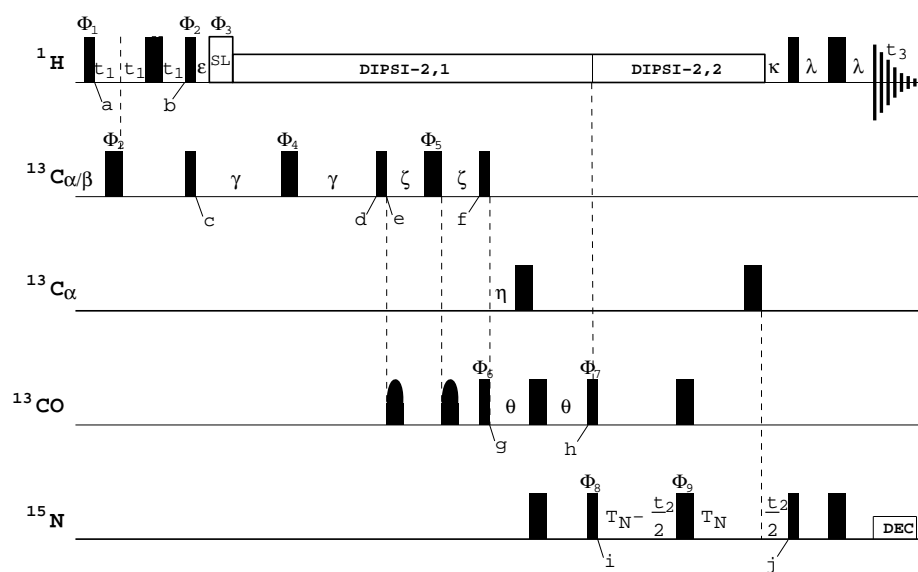


Abbildung 3.13: Pulssequenz des 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiments (s. Kap. 2.3).

Die 2D-Ausschnitte aus dem 3D-HBHA(CBCACO)NH-Spektrum der D3 sind für die benachbarten Aminosäurereste Ala317, Ser318, Gly319, Ile320 und Thr321 in Abbildung 3.14 dargestellt. Den Signalen in diesen Ausschnitten sind die $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Protonen der Aminosäurereste Glu316, Ala317, Ser318, Gly319 und Ile320 zugeordnet. Man kann den jeweiligen Spuren entnehmen, dass die Resonanzen der $^1\text{H}_\beta$ - bzw. $^1\text{H}_\alpha$ -Protonen von Ser318 oder Gly319 aufspalten, die $^1\text{H}_\beta$ -Protonen des Aminosäurerestes Glu316 hingegen spektral entartet sind. Das Resonanz-

signal des $^1\text{H}_\alpha$ -Kerns von Ser318 faltet in das Spektrum ein und erweckt daher nur den Anschein einer drastischen Verschiebung zu hohem Feld. Seine tatsächliche chemische Verschiebung liegt bei 6,19 ppm.

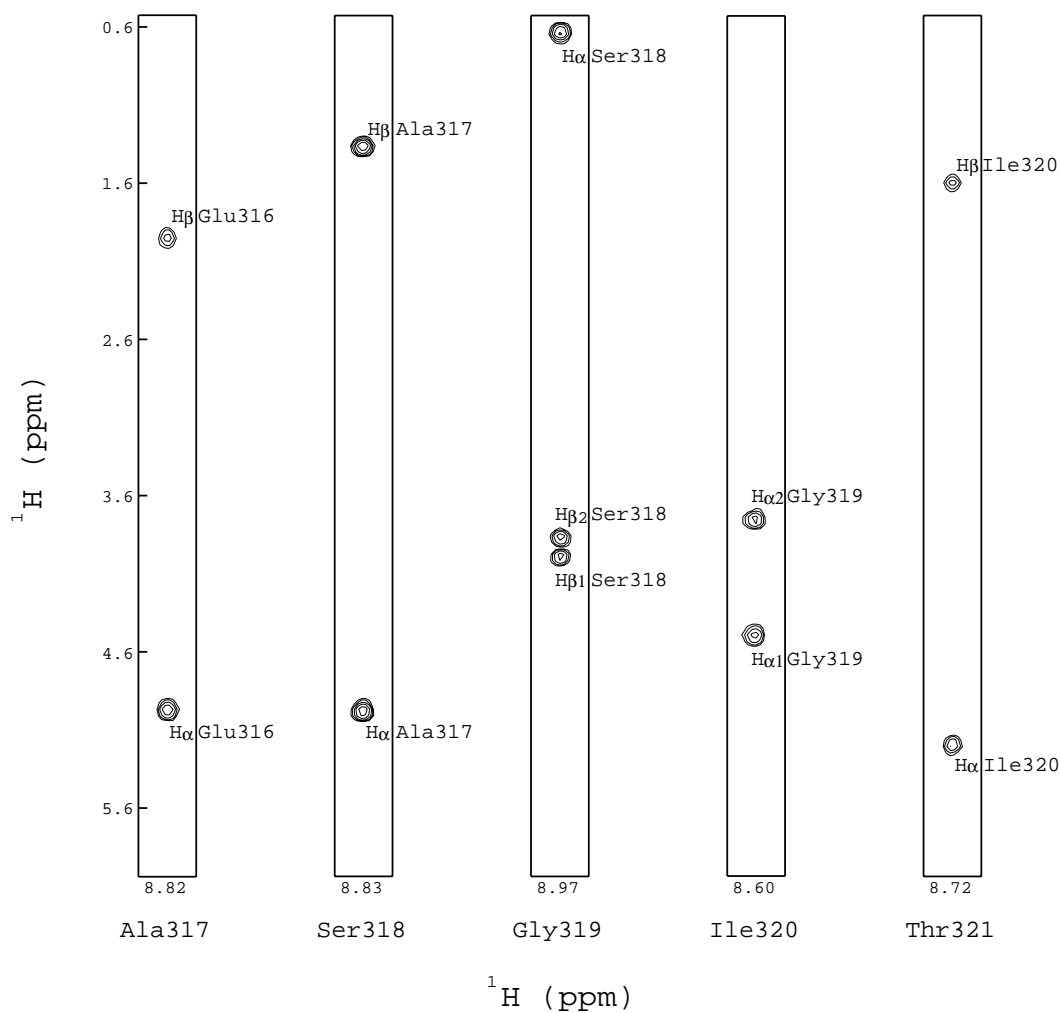


Abbildung 3.14: Sequentielle Zuordnung der $^1\text{H}_\alpha/{}^1\text{H}_\beta$ -Resonanzen anhand des HBHA(CBCACO)NH-Experiments. Abgebildet sind die 2D-Ausschnitte für das Peptidsegment Ala317-Thr321. Die auf den Ausschnitten erkennbaren Signale sind den entsprechenden $^1\text{H}_\alpha/{}^1\text{H}_\beta$ -Kernen zugeordnet.

3.2.4 Das 3D-HCCH-TOCSY-Experiment

Die in Kapitel 3.2.1 vorgestellte Kombination der 3D-(HBHA)CBCA(CO)NH- und des 3D-(HBHA)CBCANH-Experimente ermöglichte die sequenzspezifische Zuordnung der $^{13}\text{C}_\alpha$ -, ^{15}N -, $^1\text{H}_N$ -Rückgrat- und $^{13}\text{C}_\beta$ -Seitenkettenresonanzen. Die Zuordnung der aliphatischen ^{13}C -Resonanzen konnte anhand des 3D-HCC(CO)NH-Experiments (Kap. 3.2.2) vervollständigt werden. Für die sequenzspezifische Zuordnung der $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Resonanzen wurde ein 3D-HBHA(CBCACO)NH-Spektrum ausgewertet (Kap. 3.2.3). Das Resonanzassignment der aliphatischen Protonen wurde mit Hilfe des 3D-HCCH-TOCSY-Experiments abgeschlossen.

Im HCCH-TOCSY-Experiment werden die ^1H -Kerne der Seitenketten mit dem direkt gebundenen ^{13}C - und allen intraresidualen aliphatischen ^1H -Kernen korreliert (Abb. 3.15).

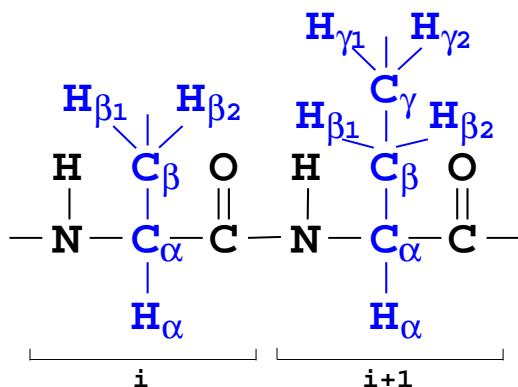


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Korrelationen im 3D-HCCH-TOCSY-Experiment. In dem Experiment werden ausschliesslich intraresiduale Korrelationen zwischen aliphatischen ^1H -Kernen mit den kovalent gebundenen ^{13}C - und allen anderen ^1H -Kernen der Seitenkette erzeugt.

Der Magnetisierungstransfer erfolgt dabei in drei Schritten. Zunächst wird die Protonenmagnetisierung zu den direkt gebundenen ^{13}C -Kernen über die $^1J_{CH}$ -Kopplung (~ 140 Hz) transferiert, von wo aus sie über die Kopplung $^1J_{CC}$ (~ 32 - 40 Hz) auf einen benachbarten ^{13}C -Kern übertragen und schliesslich zu den kovalent verknüpften Protonen zurücktransferiert wird. Dabei kann der Magnetisierungstransfer durch eine isotrope TOCSY-Mischsequenz über mehrere ^{13}C -Kerne

der Seitenkette hinweg erfolgen. Da im 3D-HCCH-TOCSY-Experiment die Magnetisierung aliphatischer Protonen detektiert wird, werden solche Experimente aufgrund der günstigeren Relaxationseigenschaften in deuterierten Lösungsmitteln durchgeführt.

Die Pulssequenz für das 3D-HCCH-TOCSY-Experiment ist in Abbildung 3.16 dargestellt und wird im folgendem kurz besprochen. Die Sequenz beginnt mit einem ^1H - 90° -Puls, der transversale Magnetisierung erzeugt. Während der ersten Evolutionsperiode t_1 (a-b) entwickeln die Protonen ihre chemische Verschiebung.

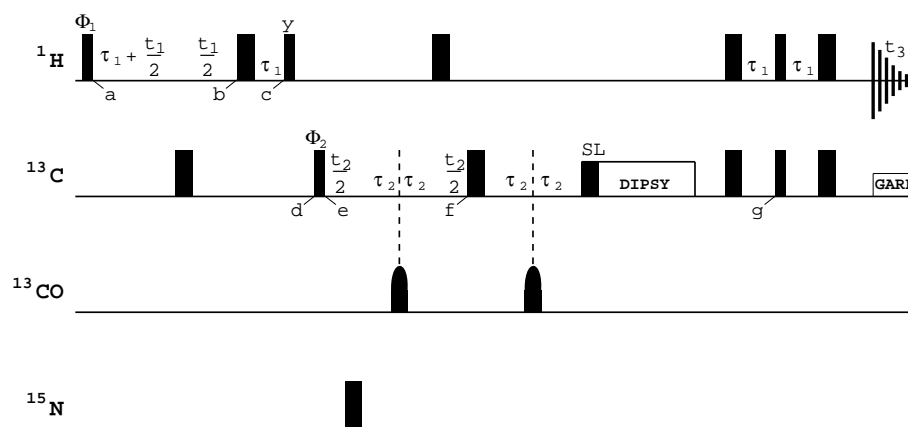


Abbildung 3.16: Pulssequenz des 3D-HCCH-TOCSY-Experiments (s. Kap. 2.3).

Durch ein Paar von $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ - 90° -Pulsen (c, d) wird die Protonen-Magnetisierung auf die kovalent gebundenen ^{13}C -Kerne transferiert. In der darauffolgenden Evolutionsperiode t_2 (e-f) entwickeln sich die chemischen Verschiebungen der aliphatischen ^{13}C -Kerne, wobei die ^1H -, ^{13}CO - und ^{15}N -Kerne durch entsprechende 180° -Pulse entkoppelt werden. Der Evolutionsperiode folgt eine isotrope DIPSY-Mischsequenz, die die Magnetisierung der einzelnen ^{13}C -Kerne auf alle ^{13}C -Spins der Seitenkette überträgt. Die Magnetisierung wird dann in einem reversen INEPT-Schritt (g) wieder auf die aliphatischen Protonen zurückübertragen und detektiert (t_3).

Im Rahmen der Auswertung werden in einem ersten Schritt für die bereits bekannten Frequenzpaare $^{13}\text{C}_\alpha/{}^1\text{H}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta/{}^1\text{H}_\beta$ 2D-Ausschnitte aus dem 3D-Spektrum extrahiert und miteinander verglichen. Auf jeder der beiden Spuren (Diagonalsignale werden mit H_x gekennzeichnet ($x = \alpha, \beta, \gamma, \text{etc.}$)) sollten sich die Resonanzsignale aller Seitenkettenprotonen befinden. Dies ist immer dann der Fall, wenn der Magnetisierungstransfer entlang der ^{13}C -Seitenkette vollständig

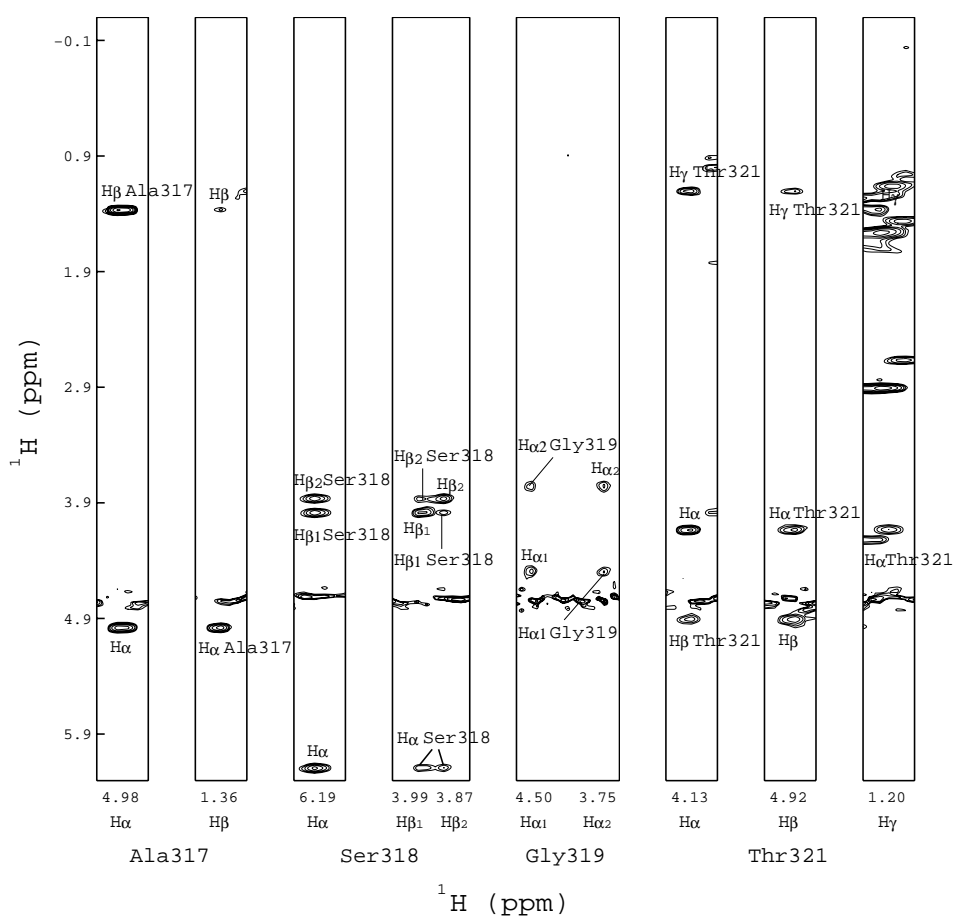


Abbildung 3.17: Zuordnung der ${}^1\text{H}$ -Seitenkettenresonanzen für die Aminosäurereste Ala317, Ser318, Gly319 und Thr321 von D3. Abgebildet sind die 2D-Ausschnitte aus dem 3D-HCCH-TOCSY-Spektrum. Die Diagonalsignale der ${}^1\text{H}$ -Kerne sind mit H_x ($x = \alpha, \beta, \gamma, \text{etc.}$) gekennzeichnet. Die auf den Spuren erkennbaren Resonanzsignale sind den entsprechenden ${}^1\text{H}$ -Kernen zugeordnet.

verläuft. In einem zweiten Schritt werden für die neu bestimmten ^1H -Resonanzfrequenzen eines Spinsystems die entsprechenden 2D-Ausschnitte aus dem Spektrum extrahiert, anhand derer den Resonanzsignalen die entsprechenden Protonen zugeordnet werden können. Die entsprechenden ^{13}C -Resonanzen sind aus dem 3D-HCC(CO)NH-Experiment bekannt.

Diese Zuordnungsstrategie der ^1H -Seitenkettenresonanzen ist für die Aminosäurereste Ala317, Ser318, Gly319, Thr321 in Abbildung 3.17, und für Ile320 in Abbildung 3.18 veranschaulicht. Für die α - und α/β -Spinsysteme Gly319 bzw. Ala317 und Ser318 konnten die Protonenresonanzen bereits vollständig durch das 3D-HBHA(CBCACO)NH-Experiment (Kap. 3.2.3) zugeordnet werden. Anhand des 3D-HCCH-TOCSY-Experiments wurden diese Zuordnungen bestätigt. Das auf der $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Spur des Aminosäurerestes Thr321 befindliche Resonanzsignal bei 1,20 ppm kann somit der γ -Methylgruppe zugeordnet werden. Der der $^1\text{H}_\gamma$ -Resonanzfrequenz entsprechende 2D-Ausschnitt bestätigt diese Zuordnung, obwohl nur eine Korrelation zwischen den $^1\text{H}_\gamma$ - und $^1\text{H}_\alpha$ -Protonen auf dieser Spur beobachtet werden kann.

Auf der $^1\text{H}_\alpha$ - und $^1\text{H}_\beta$ -Spur des Aminosäurerestes Ile320 konnten neben den $^1\text{H}_\beta$ - bzw. $^1\text{H}_\alpha$ -Korrelationen weitere vier Resonanzsignale grosser (0,78 ppm, 0,71 ppm) und geringer Intensität (1,48 ppm, 0,84 ppm) identifiziert werden, die nun den entsprechenden $^1\text{H}_{\gamma 1}$ -, $^1\text{H}_{\gamma 2}$ - und $^1\text{H}_\delta$ -Kernen zugeordnet werden mussten. Anhand der Signalintensitäten konnte man vermuten, dass die Resonanzen grosser Intensität den $^1\text{H}_{\gamma 2}$ - bzw. $^1\text{H}_\delta$ -Methylprotonen zuzuordnen waren. Demnach würden die Resonanzfrequenzen der beiden $^1\text{H}_{\gamma 1}$ -Kerne aufspalten und dementsprechend Signale geringerer Intensität im Spektrum hinterlassen. Diese Vermutung konnte anhand des $^1\text{H}_{\gamma 11}/^1\text{H}_{\gamma 12}$ -Ausschnitts bestätigt werden. Die beiden Spuren der $^1\text{H}_{\gamma 11}$ - und $^1\text{H}_{\gamma 12}$ -Kerne zeigen die Resonanzsignale der $^1\text{H}_\beta$ -, $^1\text{H}_{\gamma 2}$ - und $^1\text{H}_\delta$ -Kerne. Eine Korrelation mit den $^1\text{H}_\alpha$ -Kernen kann für keinen der beiden $^1\text{H}_{\gamma 1}$ -Kerne beobachtet werden.

Da die chemischen Verschiebung der einzelnen ^{13}C -Kerne in einem Protein relativ wenig variieren, kann die Resonanzzuordnung der $^1\text{H}_{\gamma 2}$ - und $^1\text{H}_{\delta}$ -Methylprotonen bei Kenntnis von Referenzwerten anhand der ^{13}C -chemischen Verschiebung erfolgen. Ausserdem kann man die Resonanzzuordnung mit Hilfe von NOESY-Spektren durchführen, indem man die Signalintensitäten der intraresidualen NOE-Konnektivitäten miteinander vergleicht. So kann man den $^1\text{H}_{\gamma 2}$ - und $^1\text{H}_{\delta}$ -Kernen die chemische Verschiebung von 0,78 ppm bzw. 0,71 ppm zuordnen.

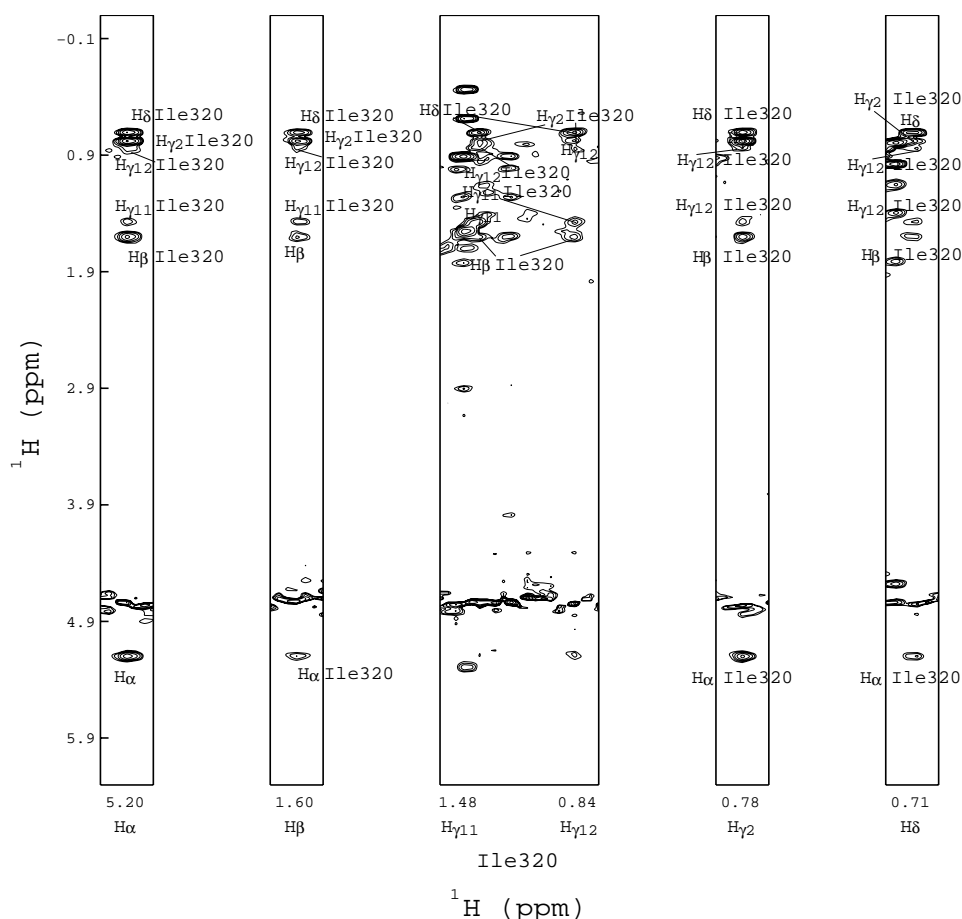


Abbildung 3.18: Zuordnung der ^1H -Seitenkettenresonanzen für den Aminosäurerest Ile320. Abgebildet sind die 2D-Ausschnitte aus dem 3D-HCCH-TOCSY-Spektrum. Die Diagonalsignale der ^1H -Kerne sind mit H_x ($x = \alpha, \beta, \gamma$, etc.) gekennzeichnet. Die auf den Spuren erkennbaren Resonanzsignale sind den entsprechenden ^1H -Kernen zugeordnet.

3.3 Extraktion strukturelevanter Parameter

Die sequenzspezifische Zuordnung der NMR-Resonanzsignale eines Proteins erfordert in der Regel die Auswertung von unterschiedlichen NMR-Experimenten. Die alleinige Zuordnung der Resonanzsignale ermöglicht jedoch nur eine Aussage über die Art der Sekundärstrukturanteile in einem Protein, wobei in einer Sekundärstrukturanalyse auch skalare Kopplungskonstanten miteinbezogen werden können. Das Resonanzassignment liefert jedoch die Grundlage zur Auswertung der verschiedenen NOESY-Experimente, die die charakteristischen NOE-Konnektivitäten zur Beschreibung der Sekundärstruktur und die Protonenabstände für die Berechnung der Tertiärstruktur enthalten.

3.3.1 Die chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung stellt einen wichtigen Parameter dar, mit dem zuverlässige Aussagen über die Sekundärstrukturelemente des zu untersuchenden Proteins getroffen werden können. In gefalteten Proteinen ist die Äquivalenz aller Resonanzen aufgehoben, wobei die strukturinduzierten Resonanzverschiebungen je nach Kern in bestimmten Bereichen variieren.

Die Methode, die für eine qualitative Interpretation von $^1\text{H}_\alpha$ -, $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -chemischen Verschiebungen herangezogen wird, beinhaltet den Vergleich mit den sog. *Random-Coil*-Verschiebungen und wird als *Chemical Shift Index* (CSI) bezeichnet [58, 59]. Sie erlaubt eine Unterscheidung von α -helikalen-, β -Faltblatt- und *Coil*-Bereichen. Bei einer Differenz von mehr als $\pm 0,1$ ppm für $^1\text{H}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\alpha/^{13}\text{C}_\beta$ -Kerne normiert man den Verschiebungsindex auf einen Wert von 1 bzw. -1. Für die Bereiche der $^1\text{H}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -chemischen Verschiebungen zeichnen sich α -helikale Anteile und β -Faltblatt Segmente durch mindestens vier konsekutive negative bzw. positive Indizes aus. Bei der $^{13}\text{C}_\alpha$ -chemischen Verschiebung ist dieser Trend umgekehrt, d.h. Gruppierungen von mindestens vier negativen

oder positiven Indizes beschreiben ein β -Faltblattstrang bzw. α -helikale Bereiche. Letztlich kann aus den Einzelindizes der $^1\text{H}_\alpha$ -, $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Kerne ein resultierender *Consensus* Index berechnet werden, bei dem α -helikalen-, β -Faltblatt- und *Coil*-Bereichen Indizes von -1, 1 bzw. 0 zugeordnet werden.

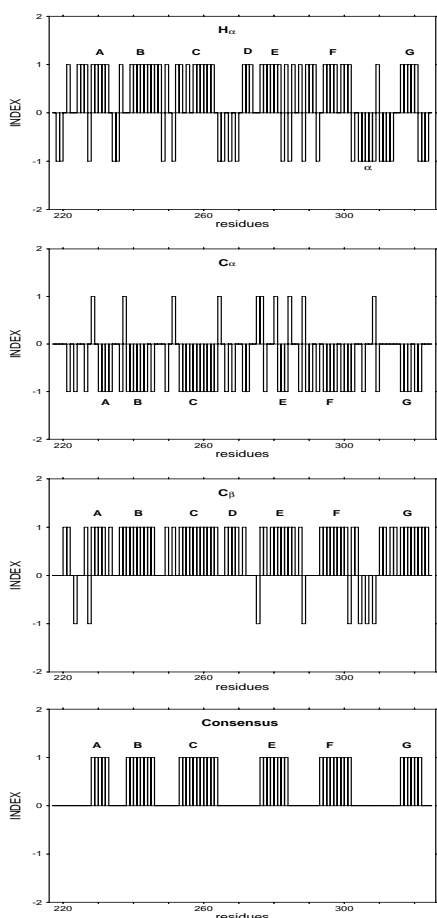


Abbildung 3.19: Der chemische Verschiebungsindex CSI (*Chemical Shift Index*) der $^1\text{H}_\alpha$ -, $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Kerne dient zur Identifizierung von Sekundärstrukturelementen. Bereiche von β -Faltblattstrukturen sind mit grossen Buchstaben, α -helikale Bereiche mit α gekennzeichnet. Der aus den Einzelindizes berechnete *Consensus* Index führt zur Identifizierung von sechs (A, B, C, E, F, G) β -Faltblatt-Bereichen in der D3 von gp130.

Die Anwendung des CSI auf die $^1\text{H}_\alpha$ -, $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -chemischen Verschiebungen der gp130-D3 ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Die $^1\text{H}_\alpha$ -, $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Indizes deuten übereinstimmend auf den β -Faltblatt-Anteil (A-G) hin. Lediglich der α -helikale-Bereich zwischen den β -Faltblattsträngen F und G ($^1\text{H}_\alpha$ -Index) und der β -Faltblattstrang D ($^{13}\text{C}_\beta$ -Index) kann in den entsprechend übrigen Indizes nicht identifiziert werden, so dass die Berechnung des *Consensus* Index zur Bestimmung von sechs (A, B, C, E, F, G) β -Faltblattbereichen führt.

3.3.2 J-Kopplungen

Neben den chemischen Verschiebungen sind die vicinalen Kopplungen wichtige Parameter mit struktureller Relevanz. Die Grösse der Kopplungskonstanten lässt sich über die Karplus-Gleichung [60] beschreiben:

$${}^3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C.$$

3J entspricht dabei der vicinalen Kopplungskonstanten, und θ dem Diederwinkel der von den drei Bindungen definiert wird, die die gekoppelten Kerne miteinander verbinden. Die Koeffizienten A, B und C unterscheiden sich jedoch je nach Art der Kopplungskonstanten und müssen empirisch bestimmt werden. Für die Konformation eines Peptidsegments sind die Diederwinkel ϕ , ψ und χ_1 von Bedeutung (Abb. 3.20).

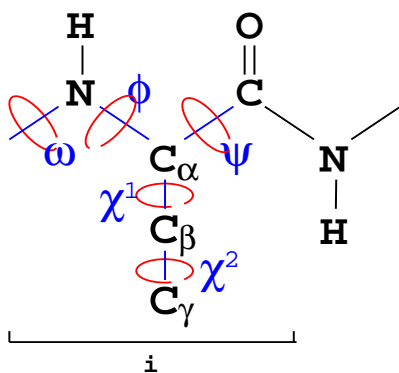


Abbildung 3.20: Standardnomenklatur der Diederwinkel innerhalb eines Peptidsegments.

Mit der Verfügbarkeit von ${}^{15}\text{N}$ - und ${}^{15}\text{N}/{}^{13}\text{C}$ -markierten Proteinen stieg die Zahl der Experimente zur Bestimmung von ${}^{13}\text{C}/{}^{13}\text{C}$ -, ${}^{13}\text{C}/{}^{15}\text{N}$ -, ${}^1\text{H}/{}^{13}\text{C}$ - und ${}^1\text{H}/{}^{15}\text{N}$ -Kopplungen rasch an. Zur Bestimmung von Kopplungskonstanten in Proteinen bedient man sich entweder der Aufspaltungen in COSY-Experimenten, oder man berechnet die Kopplungskonstanten aus den Signalintensitäten entsprechender Korrelationsspektren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der ${}^3J_{\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha}$ -Kopplung das 3D-HNHA-Experiment durchgeführt. Das Experiment

liefert ausschliesslich intraresiduale Korrelationen zwischen den $^1\text{H}_N$ - und $^1\text{H}_\alpha$ -Kernen eines Aminosäurerestes (Abb. 3.21), aus denen der Diederwinkel ϕ berechnet werden kann.

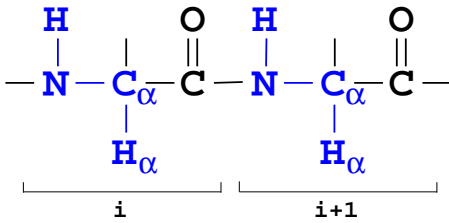


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Korrelationen im 3D-HNHA-Experiment. Das Experiment liefert ausschliesslich intraresiduale Korrelationen zwischen den $^1\text{H}_N$ - und $^1\text{H}_\alpha$ -Kernen eines Aminosäurerestes.

Die dem 3D-HNHA-Experiment entsprechende Pulssequenz ist in Abbildung 3.22 veranschaulicht. Der erste ^1H - 90° -Puls erzeugt transversale Protonenmagnetisierung. In einem HMQC (*Hetero Multiple Quantum Correlation*)-analogen Schritt werden durch ein ^{15}N - 90° -Puls (a) Null- und Doppelquantenkohärenzen erzeugt. Während der *Constant-Time*-Evolutionsperiode $4T_N$ (b-c) entwickeln die ^{15}N -Kerne im Zeitintervall t_1 ihre chemische Verschiebung, wobei die Null-

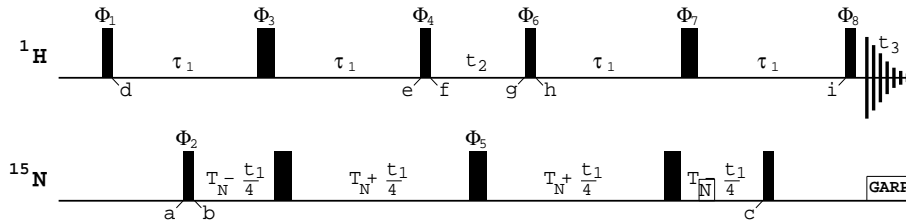


Abbildung 3.22: Pulssequenz des 3D-HNHA-Experiments-Experiments (s. Kap. 2.3).

und Doppelquantenkohärenzen von der $^1\text{J}_{\text{H}_N\text{N}}$ -Kopplung in diesem Intervall nicht beeinflusst werden. Im Intervall 2τ (d-e) dephasiert die Protonenmagnetisierung als Folge der homonuklearen $^3\text{J}_{\text{H}_N\text{H}_\alpha}$ -Kopplung. Die dabei entstehende $^1\text{H}_N$ -Antiphasemagnetisierung wird durch einen ^1H - 90° -Puls (e) in $^1\text{H}_\alpha$ -Antiphasemagnetisierung transferiert. Nachdem die $^1\text{H}_\alpha$ -Kerne ihre chemische Verschiebung in der Evolutionsperiode t_2 (f-g) entwickelt haben, wird dann die $^1\text{H}_\alpha$ -Antiphasemagnetisierung durch einen ^1H - 90° -Puls (g) wieder in $^1\text{H}_N$ -Antiphasemagnetisierung transferiert. Im sich anschliessenden Intervall 2τ (h-

i) rephasiert die Magnetisierung unter Einwirkung der ${}^3J_{H_N H_\alpha}$ -Kopplung. Der ${}^{15}\text{N}$ -90°-Puls (c) transferiert Null- und Doppelquantenkohärenzen in ${}^1\text{H}_N$ -Antiphasemagnetisierung, die bis zum Zeitpunkt i rephasiert. Nach einem abschliessenden ${}^1\text{H}$ -90°-Puls (i) erfolgt die Datenakquisition (t_3).

Das 3D-HNHA-Experiment ist sehr sensitiv und kann neben der Bestimmung von ${}^3J_{H_N H_\alpha}$ -Kopplungskonstanten auch zur sequentiellen Resonanzzuordnung genutzt werden, da ausschliesslich intraresiduale Korrelationen zwischen den ${}^1\text{H}_N$ - und ${}^1\text{H}_\alpha$ -Kernen eines Aminosäurerestes i erzeugt werden.

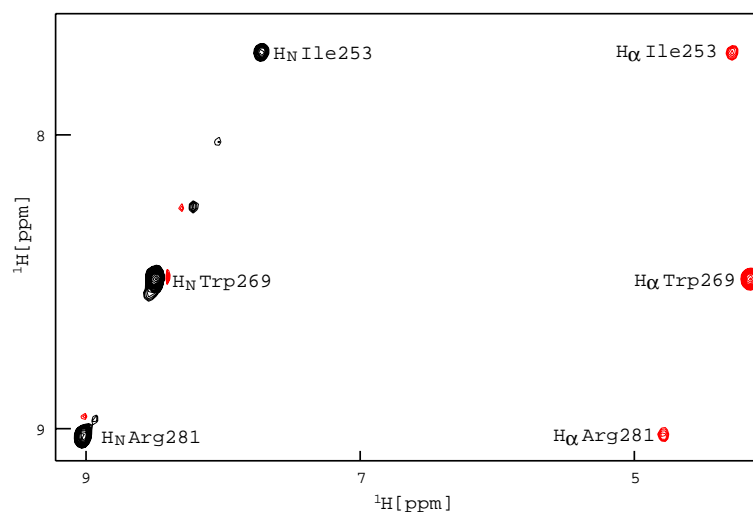


Abbildung 3.23: Ausschnitt aus dem 3D-HNHA-Spektrum der D3 von gp130. Die Diagonalsignale (schwarz) und Kreuzsignale (rot) für die Aminosäurereste Ile253, Trp269 und Arg281 sind entsprechend markiert. Aus dem Verhältnis der Signalintensitäten kann die ${}^3J_{H_N H_\alpha}$ -Kopplungskonstante berechnet werden (s. Text).

In Abbildung 3.23 ist eine 2D-Ebene aus dem 3D-HNHA-Spektrum von D3 des gp130 gezeigt, in der die Diagonalsignale (schwarz) und Kreuzsignale (rot) für die Aminosäurereste Ile253, Trp269 und Arg281 entsprechen markiert sind.

Aus dem Verhältnis der Signalintensitäten kann die ${}^3J_{H_N H_\alpha}$ -Kopplungskonstante direkt berechnet werden durch:

$$S_{Kreuz}/S_{Diagonal} = -\tan^2(2\pi {}^3J_{H_N H_\alpha} \tau_1).$$

Die aus den Signalintensitäten bestimmte ${}^3J_{H_N H_\alpha}$ -Kopplung fällt im Regelfall etwas zu klein aus. Für Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 10 kDa führt eine Erhöhung von 10 % zu einem realistischen Wert der Kopplungskonstanten [41].

Die ${}^3J_{H_N H_\alpha}$ -Kopplungskonstanten der D3 von gp130 sind in Abbildung 3.31 (Kap. 3.3.5) vermerkt. Im Bereich von β -Faltblattstrukturen liegt diese Kopplungskonstante in einem Bereich zwischen 8-10 Hz. In α -helikalen Bereichen liegt die ${}^3J_{H_N H_\alpha}$ -Kopplungskonstante in einem Bereich von 6-8 Hz.

3.3.3 Der NOE-Effekt

Die Sekundärstrukturbestimmung anhand der NOESY-Spektren erfolgt durch die Identifizierung charakteristischer NOE-Konnektivitäten und die Berechnung der entsprechenden Protonenabstände. In Tabelle 3.2 sind die charakteristischen Abstände aller Sekundärstrukturelemente zusammengefasst, mit Hilfe derer die Sekundärstruktur eines Proteins bestimmt werden kann [1]. Parallele und antiparallele β -Faltblattstrukturen unterscheiden sich durch die charakteristischen *Long-Range* Konnektivitäten $d_{NN}(i,j)$, $d_{\alpha N}(i,j)$ und $d_{\alpha\alpha}(i,j)$.

Von der D3 des gp130 wurde ein 3D- ${}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC- und ein 3D-HCCH-NOESY-Spektrum aufgenommen, in denen die zur Sekundärstrukturbestimmung charakteristischen NOE's identifiziert, und die entsprechenden Abstände berechnet werden konnten. Die für die Bestimmung der Sekundärstrukturmerkmale charakteristischen sequentiellen Konnektivitäten sind in Abbildung 3.31 (Kap. 3.3.5), die *Long-Range* Konnektivitäten in Abbildung 3.32 (Kap. 3.3.5) dargestellt.

Tabelle 3.2: Sequentielle ^1H - ^1H -Abstände $<5\text{\AA}$ in Sekundärstrukturelementen von Polypeptiden [1].

Konnektivitäten	α -Helix	3_{10} -Helix	β -Faltblatt		β -Turn I ¹	β -Turn II ¹
			antiparallel	parallel		
$d_{\alpha N}(i,i+1)$	3,5	3,4	2,2	2,2	3,4 3,2	2,3 3,2
$d_{\alpha N}(i,i+2)$	4,4	3,8	-	-	3,6	3,3
$d_{\alpha N}(i,i+3)$	3,4	3,3	-	-	3,1-4,2	3,8-4,7
$d_{\alpha N}(i,i+4)$	4,2	-	-	-	-	-
$d_{NN}(i,i+1)$	2,8	2,6	4,3	4,2	2,6 2,4	4,5 2,4
$d_{NN}(i,i+2)$	4,2	4,1	-	-	3,8	4,3
$d_{\beta N}(i,i+1)$	2,5-4,1	2,9-4,4	3,2-4,5	3,7-4,7	2,9-4,4 3,6-4,6	3,6-4,6 3,6-4,6
$d_{\alpha\beta}(i,i+3)$	2,5-4,4	3,1-5,1	-	-	-	-
$d_{NN}(i,j)$	-	-	3,3	4,0	-	-
$d_{\alpha N}(i,j)$	-	-	3,2	3,0	-	-
$d_{\alpha\alpha}(i,j)$	-	-	2,3	4,8	-	-

¹ Turnstrukturen bestehen aus drei Aminosäureresten. Die ersten beiden Zahlen geben die Abstände zwischen den Resten eins und zwei, die nachfolgenden zwischen den Resten zwei und drei an.

Das 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Experiment

In einem 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Experiment werden die Amidprotonen eines Aminosäurerestes i mit den kovalent verknüpften ^{15}N -Kernen und allen räumlich benachbarten Protonen korreliert, deren Abstand $<5\text{\AA}$ ist (Abb. 3.24).

Da die Amidprotonen unmittelbar mit dem *Backbone* eines Proteins verknüpft sind, finden sich im 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektrum überwiegend Konnektivitäten, die die lokale Umgebung des Rückgrates, d.h. die Sekundärstruktur eines Proteins beschreiben. Daher finden sich auf den Spuren der einzelnen $^1\text{H}_N$ -Kerne neben den intraresidualen hauptsächlich die für die Sekundärstruktur charakteristischen sequenziellen Konnektivitäten (Tab. 3.2). Enthält das Protein β -Faltblattbereiche, so können unter anderem auch *Long-Range* Kontakte beobachtet werden.

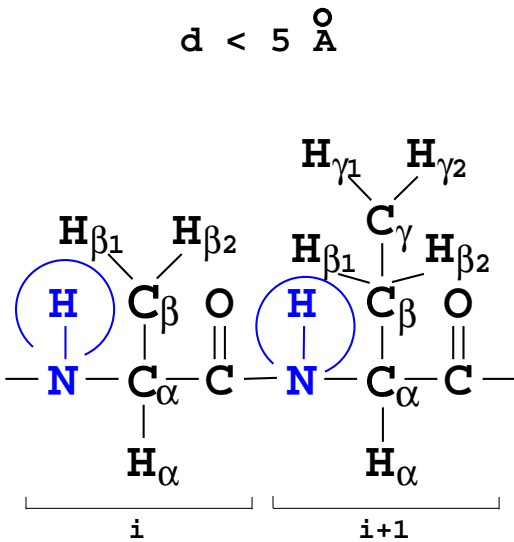


Abbildung 3.24: Schematische Darstellung der Korrelationen im 3D-¹⁵N-NOESY-HSQC-Experiment. In dem Experiment werden Korrelationen zwischen den ¹H_N- mit den benachbarten ¹⁵N-Kernen und allen räumlich benachbarten Protonen erzeugt, deren Abstand <5Å ist.

In Abbildung 3.25 ist die dem 3D-¹⁵N-NOESY-HSQC-Experiment entsprechende Pulssequenz veranschaulicht. Die Pulssequenz ist prinzipiell aus den zwei Einzelsequenzen eines 2D-¹H-NOESY- und eines 2D-¹⁵N-HSQC-Experiments zusammengesetzt. Nach einem 90°-Protonenpuls entwickeln die ¹H-Kerne in der Evolutionsperiode t_1 (a-b) ihre chemische Verschiebung, wobei ein ¹⁵N-180°-Puls (c) die ¹⁵N-Kerne während dieses Zeitraums entkoppelt. Am Ende der ersten Evolutionsperiode wird der Magnetisierungsvektor mit einem ¹H-90°-Puls (b) in z-Richtung ausgelenkt, und in der darauffolgenden Mischzeit τ_m (e-f) koppeln die ¹H-Spins mit den räumlich benachbarten Protonen (dipolare Kopplung), deren

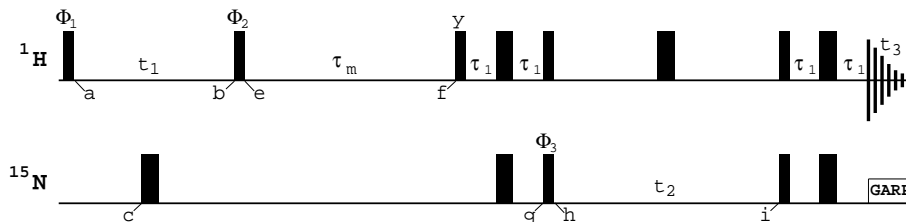


Abbildung 3.25: Pulssequenz des 3D-¹⁵N-NOESY-HSQC-Experiments (s. Kap. 2.3).

Abstand <5Å ist. Mit einem INEPT-Transfer (g) wird die Magnetisierung der ¹H_N-Kerne auf die kovalent verknüpften ¹⁵N-Kerne übertragen, die in der zweiten Evolutionsperiode t_2 (h-i) ihre chemische Verschiebung entwickeln. Durch

einen reversen INEPT-Schritt (i) wird die Magnetisierung auf die Amidprotonen zurücktransferiert und nach dem Rephasieren im Intervall $2\tau_1$ detektiert (t_3).

Für die Aminosäurereste Ala317, Ser318, Gly319, Ile320 und Thr321 sind die bei entsprechender $^1\text{H}_N/^{15}\text{N}$ -Frequenz extrahierten 2D-Ausschnitte aus dem 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektrum in Abbildung 3.26 dargestellt. Die Diagonalsignale sind mit H_N , die Kreuzsignale mit Zahlen gekennzeichnet. Die Zuordnungen der Kreuzsignale befinden sich in der Legende der Abbildung. Neben den intraresidualen konnten eine Vielzahl von sequenziellen und einige *Long-Range* Konnektivitäten den Kreuzsignalen zugeordnet werden.

Die Zuordnung der Kreuzsignale erfolgte in mehreren Stufen. In einem ersten Schritt wurden intraresiduale und Resonanzsignale einzigartiger chemischer Verschiebung zugeordnet. In einem weiteren Schritt wurden dann die charakteristischen sequentiellen Konnektivitäten identifiziert. Zusammen mit den zugeordneten charakteristischen *Long-Range* Konnektivitäten aus dem 3D-HCCH-NOESY-Spektrum (s.u.) wurde die Sekundärstruktur skizziert (Kap. 3.3.5, Abb. 3.32). Mit Hilfe derer wurden dann 2D-Ausschnitte gezielt nach möglichen *Long-Range* Kontakten durchsucht.

Auf der H_N -Spur des Aminosäurerestes Gly319 z.B. konnten neben den intraresidualen ($\text{H}_{\alpha 1}/\text{H}_{\alpha 2}$) die sequentiellen $d_{\alpha N}$ - und $d_{\beta N}$ -Konnektivitäten zum Aminosäurerest Ser318 identifiziert werden. Die für α -helikale Bereiche typischen $d_{\alpha N}(i,i+2)$ -, $d_{\alpha N}(i,i+3)$ -, $d_{\alpha N}(i,i+4)$ -, $d_{NN}(i,i+2)$ - und $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ -Kontakte werden auf dieser Spur nicht beobachtet. Stattdessen konnten die für β -Faltblattstrukturen charakteristischen $d_{\alpha N}(i,j)$ - ($\text{H}_\alpha \text{Val296}$) und $d_{NN}(i,j)$ - ($\text{H}_N \text{Tyr295}$) Konnektivitäten zugeordnet werden, wobei eine Unterscheidung zwischen parallelem und antiparallelem β -Faltblattsegment am zuverlässigsten über den Abstand der $d_{\alpha\alpha}(i,j)$ - Konnektivitäten, die sich aus dem 3D-HCCH-NOESY-Experiment ermitteln lassen, getroffen werden kann. Desweiteren konnten einige typische *Long-Range* Konnektivitäten zugeordnet werden, die sich aus der

Kopplung mit den Seitenkettenprotonen von Aminosäureresten des benachbarten β -Faltblattstranges ergeben (H_δ Tyr295, H_ϵ Tyr295, H_β Tyr295, H_{γ_1} Glu294, H_{γ_2} Glu294). Die anhand des 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Experiments zugeordneten charakteristischen sequentiellen und *Long-Range* Konnektivitäten sind in Abbildung 3.31 bzw. Abbildung 3.32 (Kap. 3.3.5) dargestellt.

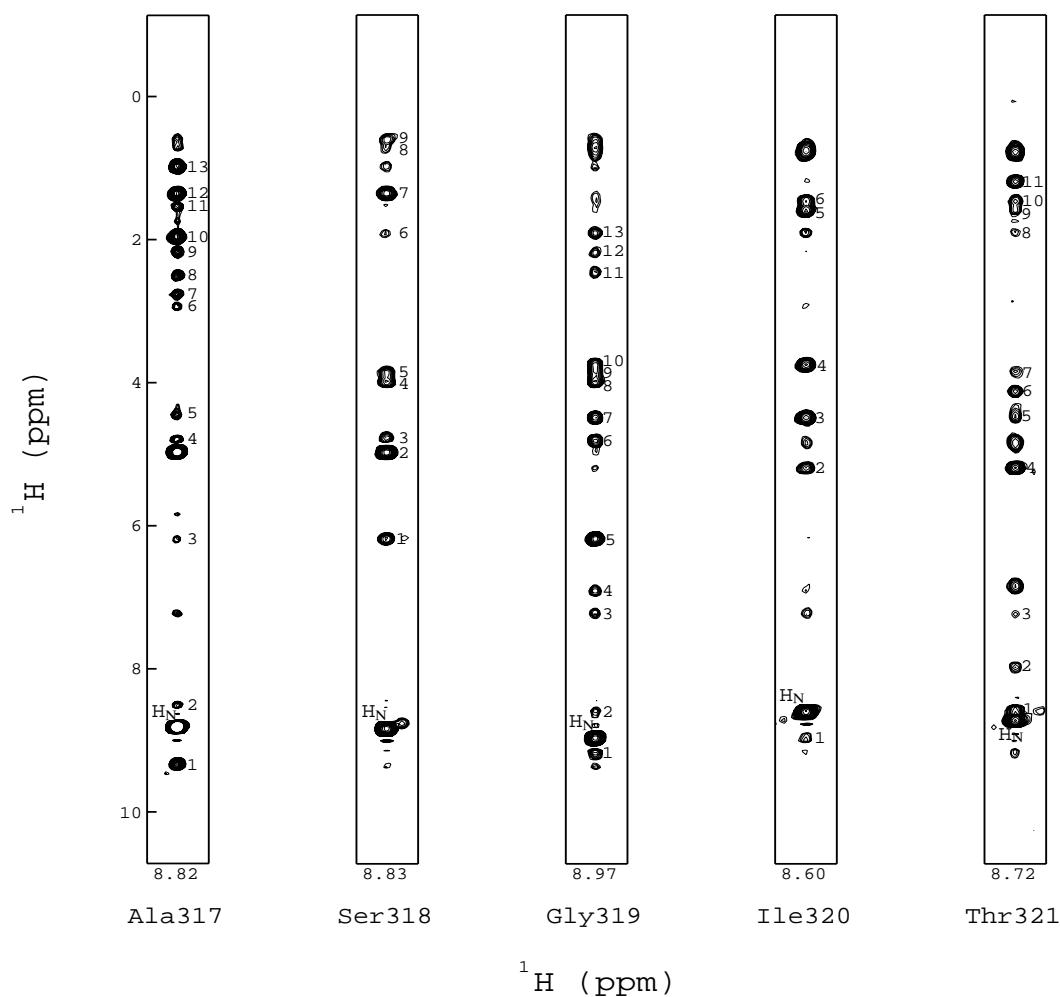


Abbildung 3.26: Zuordnung der Kreuzsignale im 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektrum für die Aminosäurereste Ala317, Ser318, Gly319, Ile320 und Thr321 von D3 des gp130. Den Kreuzsignalen wurden folgenden Konnektivitäten zugeordnet; H_N Ala317: 1, H_N Phe297; 2, H_N Glu316; 3, H_α Ser318; 4, H_α Val296; 5, H_α Arg298; 6, H_{β_1} Phe297; 7, H_{β_2} Phe297; 8, H_{γ_1} Glu316; 9, H_{γ_2} Glu316; 10, H_β Glu316; 11, H_β Arg296; 12, H_β Ala317; 13, H_{δ_2} Leu228. H_N Ser318: 1, H_α Ser318; 2, H_α Ala317; 3, H_2O ; 4, H_{β_1} Ser318; 5, H_{β_2} Ser318; 6, H_β Val230; 7, H_β Ala317; 8, H_{γ_1} Val230; 9, H_{γ_2} Val230. H_N Gly319: 1, H_N Tyr295; 2, H_N Ile320; 3, H_δ Tyr295; 4, H_ϵ Tyr295; 5, H_α Ser318; 6, H_α Val296; 7, H_{α_1} Gly319; 8, H_{β_1} Ser318; 9, H_{β_2} Ser318; 10, H_{α_2} Gly319; 11, H_β Tyr295; 12, H_{γ_1} Glu294; 13, H_{γ_2} Glu294. H_N Ile320: 1, H_N Gly319; 2, H_α Ile320; 3, H_{α_1} Gly319; 4, H_{α_2} Gly319; 5, H_β Ile320; 6, H_{γ_1} Ile320. H_N Thr321: 1, H_N Thr293; 2, H_N Tyr322; 3, H_ϵ Phe292; 4, H_α Ile320; 5, H_α Phe292; 6, H_α Thr321; 7, H_β Thr293; 8, H_{β_2} Pro291; 9, H_β Ile320; 10, H_{γ_1} Ile320; 11, H_γ Thr321.

Das 3D-HCCH-NOESY-Experiment

In einem 3D-HCCH-NOESY-Experiment werden die aliphatischen Protonen eines Aminosäurerestes i mit den kovalent verknüpften ^{13}C -Kernen und allen räumlich benachbarten Protonen korreliert, deren Abstand $<5\text{\AA}$ ist (Abb. 3.27).

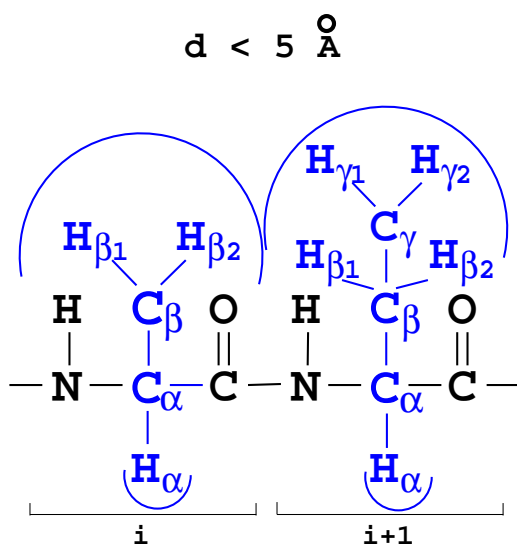


Abbildung 3.27: Schematische Darstellung der Korrelationen im 3D-HCCH-NOESY-Experiment. In dem Experiment werden Korrelationen zwischen den aliphatischen ^1H - mit den benachbarten ^{13}C -Kernen und allen räumlich benachbarten Protonen erzeugt, deren Abstand $<5\text{\AA}$ ist.

Während ein 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Experiment hauptsächlich Konnektivitäten liefert, die Aussagen über die lokalen Strukturelemente des Proteinrückgrates erlauben, können im 3D-HCCH-NOESY-Experiment u.a. Seitenketten-Seitenketten-Kontakte ermittelt werden, die die Anordnung der einzelnen Sekundärstrukturelemente zueinander, d.h. die Tertiärstruktur beschreiben. Ferner können charakteristische *Long-Range* Konnektivitäten ($d_{\alpha\alpha}(i,j)$) identifiziert werden, die die Unterscheidung von parallelen und antiparallelen β -Faltblattstrukturen erlaubt.

In Abbildung 3.28 ist die dem 3D-HCCH-NOESY-Experiment entsprechende Pulssequenz dargestellt und wird im folgenden kurz beschrieben. Die Pulssequenz ist der des 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Experiments ähnlich. Nach einem ^1H - 90° -Puls entwickeln die aliphatischen ^1H -Kerne in der Evolutionsperiode t_1 (a-b) ihre chemische Verschiebung, wobei ein ^{13}C -*Composite*-Puls (c) und ein ^{15}N - 180° -Puls

(d) die ^{13}C - bzw. ^{15}N - Kerne während dieser Zeit entkoppelt. Am Ende der ersten Evolutionsperiode wird der Magnetisierungsvektor mit einem ^1H - 90° -Puls (b) in z-Richtung transferiert, und in der darauffolgenden Mischzeit τ_m (e-f) koppeln die ^1H -Spins mit den räumlich benachbarten Protonen, deren Abstand $<5\text{\AA}$ ist.

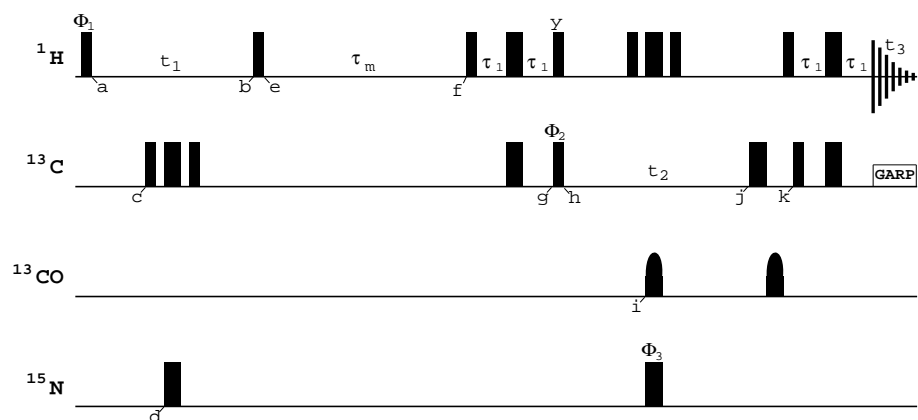


Abbildung 3.28: Pulssequenz des 3D-HCCH-NOESY-Experiments (s. Kap. 2.3).

Über einen INEPT-Transfer (g) wird die Magnetisierung der aliphatischen Protonen auf die kovalent verknüpften ^{13}C -Kerne übertragen, die in der zweiten Evolutionsperiode t_2 (h-j) ihre chemische Verschiebung entwickeln, während entsprechende Pulse (i) die ^1H -, ^{13}CO - und ^{15}N -Kerne entkoppeln. Durch einen reversen INEPT-Schritt (j) wird die Magnetisierung auf die aliphatischen Protonen zurücktransferiert und nach dem Intervall $2\tau_1$ detektiert (t_3).

Für die Aminosäurereste Ala317, Ser318, Gly319, Thr321 und Ile320 sind die aus dem 3D-HCCH-NOESY-Spektrum extrahierten 2D-Ausschnitte der aliphatischen Protonen in Abbildung 3.29 bzw. Abbildung 3.30 dargestellt. Die Diagonalsignale sind mit H_x ($x = \alpha, \beta, \gamma, \text{etc.}$), die Kreuzsignale mit Zahlen gekennzeichnet. Die Zuordnungen der Kreuzsignale befinden sich in den jeweiligen Legenden der Abbildungen. Neben den intraresidualen konnten eine Vielzahl von Seitenketten-Seitenketten-Kontakten identifiziert werden.

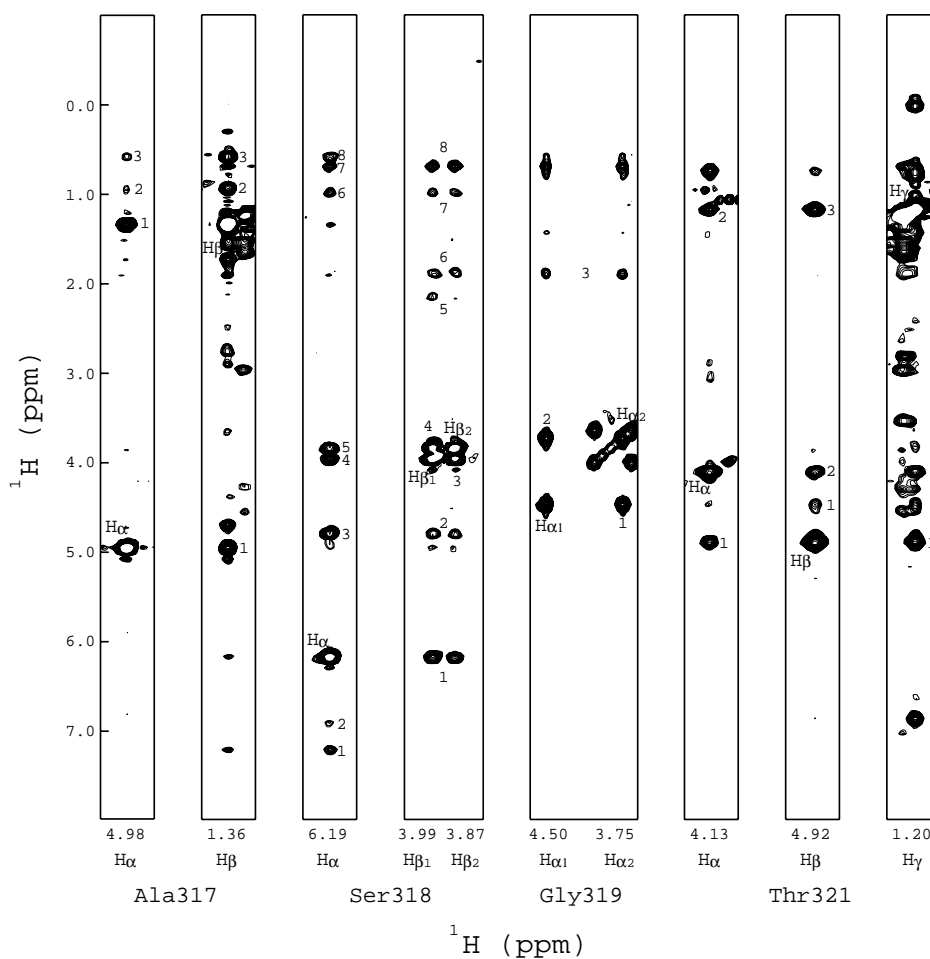


Abbildung 3.29: Zuordnung der Kreuzsignale im 3D-HCCH-NOESY-Spektrum für die aliphatischen Protonen der Aminosäurereste Ala317, Ser318, Gly319 und Thr321 von D3 des gp130. Den Kreuzsignalen wurden folgenden Konnektivitäten zugeordnet; H_α Ala317: 1, H_β Ala317; 2, $H_{\delta 1}$ Leu228; 3, $H_{\gamma 1}$ Val230. H_β Ala317: 1, H_α Ala317; 2, $H_{\delta 1}$ Leu228; 3, $H_{\gamma 1}$ Val230. H_α Ser318: 1, H_δ Phe297; 2, H_ϵ Phe297; 3, H_α Val296; 4, $H_{\beta 1}$ Ser318; 5, $H_{\beta 2}$ Ser318; 6, $H_{\gamma 1}$ Val296; 7, $H_{\gamma 1}$ Val230; 8, $H_{\gamma 2}$ Val230. $H_{\beta 1\beta 2}$ Ser318: 1, H_α Ser318; 2, H_α Val296; 3, $H_{\beta 1}$ Ser318; 4, $H_{\beta 2}$ Ser318; 5, $H_{\gamma 1}$ Glu294; 6, $H_{\gamma 2}$ Glu294; 7, $H_{\gamma 1}$ Val296; 8, $H_{\gamma 2}$ Val296. $H_{\alpha 1\alpha 2}$ Gly319: 1, $H_{\alpha 1}$ Gly319; 2, $H_{\alpha 2}$ Gly319; 3, H_β Val230. H_α Thr321: 1, H_β Thr321; 2, H_γ Thr321. H_β Thr321: 1, x; 2, H_α Thr321; 3, H_γ Thr321. H_γ Thr321: 1, H_β Thr321; 2, H_α Thr321.

Die Zuordnung der Kreuzsignale erfolgte wie bei der Auswertung des 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektrums in mehreren Schritten. Im ersten Schritt wurden wieder intraresiduale und Resonanzsignale einzigartiger chemischer Verschiebung zugeordnet. In einem weiteren Schritt wurden dann neben den charakteristischen weitere *Long-Range* Kontakte identifiziert, welche die Topologie der Sekundärstrukturelemente zueinander beschreiben.

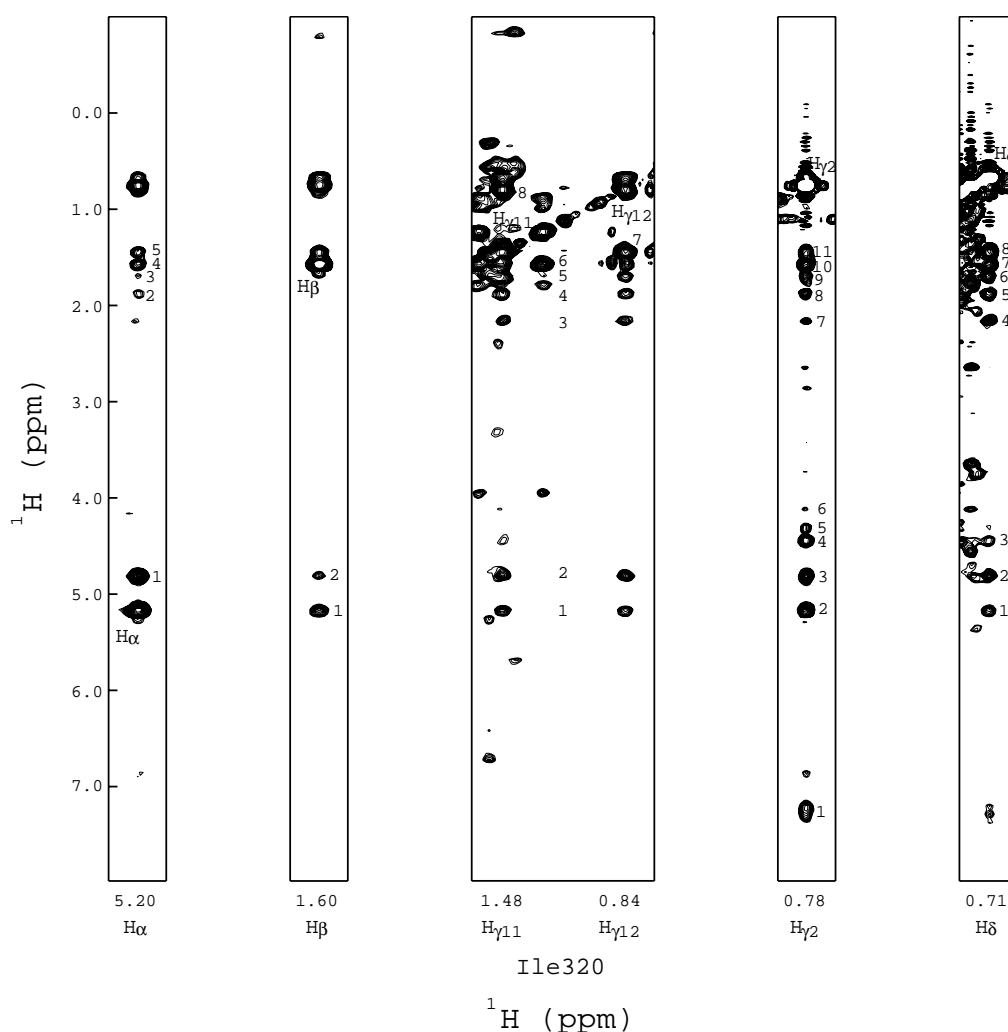


Abbildung 3.30: Zuordnung der Kreuzsignale im 3D-HCCH-NOESY-Spektrum für die aliphatischen Protonen des Aminosäurerestes Ile320. Den Kreuzsignalen wurden folgenden Konnektivitäten zugeordnet; H α Ile320: 1, H α Glu294; 2, H β_1 Glu294; 3, H β_2 Glu294; 4, H β Ile320; 5, H γ_1 Ile320. H β Ile320: 1, H α Ile320; 2, H α Glu294. H γ_{11} /H γ_{12} Ile320: 1, H α Ile320; 2, H α Glu294; 3, H γ_1 Glu294; 4, H γ_2 Glu294; 5, H β_2 Glu294; 6, H β Ile320; 7, H γ_{11} Ile320; 8, H γ_{12} Ile320. H γ_2 Ile320: 1, H δ Phe292; 2, H α Ile320; 3, H α Glu294; 4, H α Phe292; 5, x; 6, x; 7, H γ_1 Glu294; 8, H γ_2 Glu294; 9, H β_2 Glu294; 10, H β Ile320; 11, H γ_{11} Ile320. H δ Ile320: 1, H α Ile320; 2, H α Glu294; 3, x; 4, H γ_1 Glu294; 5, H γ_2 Glu294; 6, H β_2 Glu294; 7, H β Ile320; 8, H γ_{11} Ile320.

Auf den H_α -Spuren der Aminosäurereste Ser318 und Ile320 können die für β -Faltblattstrukturen charakteristischen $d_{\alpha\alpha}$ -Konnektivitäten mit den Aminosäureresten Val296 (3) bzw. Glu294 (1) identifiziert werden. Aus den Intensitäten dieser Resonanzsignale konnte für die Abstände ein Wert von 2,8 Å berechnet werden. Derartig kurze $d_{\alpha\alpha}$ -Abstände treten nur in antiparallelen β -Faltblättern auf (Tab. 3.2). Die für D3 des gp130 identifizierten $d_{\alpha\alpha}$ -Konnektivitäten sind in Abbildung 3.32 (Kap. 3.3.5) dargestellt.

Die Konnektivitäten zwischen zwei Aminosäureresten benachbarter β -Faltblattstränge müssen sich nicht nur auf die Wechselwirkung zwischen den H_α -Protonen beschränken. So konnten auf den H_α -Spuren der Aminosäurereste Ser318 und Ile320 weitere Seitenketten-Konnektivitäten zu den Resten Val296 (6) und Glu294 (2, 3) detektiert werden.

In Proteinstrukturen orientieren sich die einzelnen Sekundärstrukturelemente zueinander und bilden dabei den sog. hydrophoben *Core* aus. Für die Strukturrechnung werden daher Seitenketten-Seitenketten Konnektivitäten benötigt, die die Orientierung der einzelnen β -*Sheets* bzw. α -*Helices* zueinander definieren. So konnten beispielsweise auf der H_β -Spur des Aminosäurerestes Ala317 zwei Resonanzsignale den H_{δ_1} Leu228- bzw. H_{γ_1} Val230 zugeordnet werden, welche die Orientierung der β -*Sheets* zueinander bestimmen.

3.3.4 Austausch der Amidprotonen

Die Austauschrate von Amidprotonen mit dem Lösungsmittel ist ein entscheidender Parameter für die Identifizierung von Wasserstoffbrücken [1]. Langsam austauschende Amidprotonen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligt. Die Identifikation des Akzeptors der entsprechenden Wasserstoffbrücke erfolgt aufgrund von Informationen über die Sekundärstruktur oder auf der Basis von grob definierten dreidimensionalen Struk-

turen. Darüber hinaus lässt die Austauschrate Schlüsse darüber zu, wie stark ein Strukturelement dem Lösungsmittel exponiert ist.

Das 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Experiment (Kap. 3.3.3) wurde mit einer sog. *Water Flip Back*-Modifikation [39] durchgeführt, die eine Quantifizierung des Amidprotonenaustauschs erlaubt. In Abhängigkeit von der Austauschrate beobachtet man auf den Spuren der Amidprotonen Kreuzsignale auf der Frequenz des Wassers (4,75 ppm). Ein Verhältnis der Intensitäten von dem Kreuzsignal zum $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Diagonalpeak $<0,1$ wird als Indikator für einen langsamen Austausch angesehen [61]. Für Wasserstoffbrücken können somit die entsprechenden $d_{\text{NH/O-}}$ und $d_{\text{N/O-}}$ Abstände in die Strukturrechnung einbezogen werden.

Für D3 des gp130 sind die Aminosäurereste, bei denen ein langsamer Austausch der Amidprotonen beobachtet werden konnte, in Abbildung 3.31 (Kap. 3.3.5) dargestellt. Aus der Abbildung 3.32 (Kap. 3.3.5) kann man für einen Teil dieser Aminosäurereste entnehmen, mit welchem Akzeptor die entsprechende Wasserstoffbrücke ausgebildet wird.

3.3.5 Sekundärstruktur der D3 von gp130

Die Sekundärstruktur der dritten Extrazellulärdomäne des Signaltransduktors gp130 wurde anhand einer Kombination aus charakteristischen NOE's, der $^3\text{J}_{\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha}$ -Kopplungskonstanten und des chemischen Verschiebungsindex (CSI) der $^1\text{H}_\alpha$ -, $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Kerne bestimmt. Eine Zusammenfassung der sequentiellen bzw. *Medium-Range* NOE's und der $^3\text{J}_{\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha}$ -Kopplungskonstanten ist in Abbildung 3.31 gezeigt. Die charakteristischen $d_{\text{NN-}}$, $d_{\alpha\text{N-}}$ und $d_{\alpha\alpha}$ -*Longe-Range* Konnektivitäten, die die β -*Sheet* Topologie des Proteins definieren, sind in Abbildung 3.32 dargestellt.

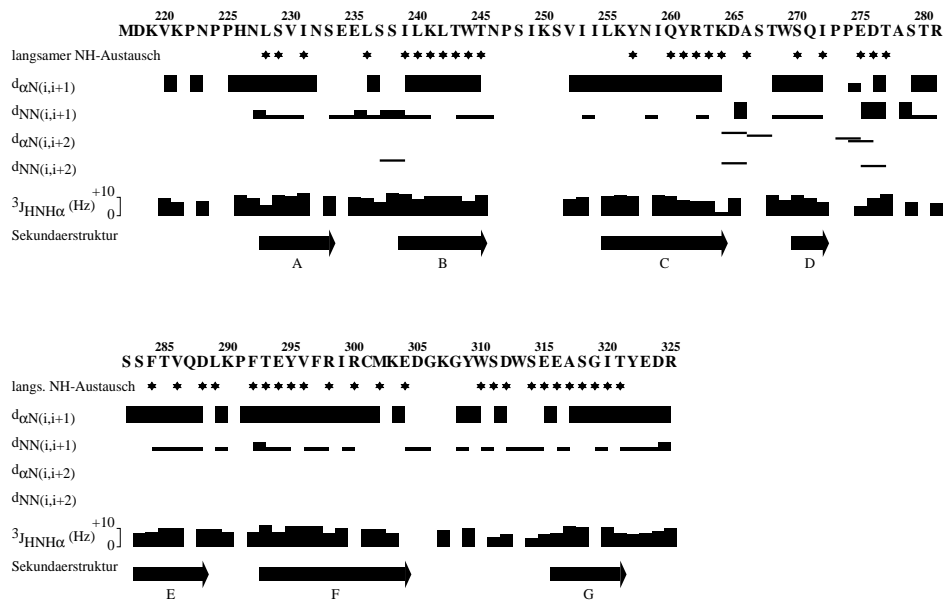


Abbildung 3.31: Zusammenfassung der für die Sekundärstruktur relevanten sequentiellen- bzw. *Medium-Range* NOE's und $^3J_{H_N H_\alpha}$ -Kopplungskonstanten der D3 von gp130. Die Höhe der Linien symbolisiert die Intensität der NOE's bzw. die Grösse der Kopplungskonstanten. Aminosäurereste, bei denen ein langsamer Austausch der Amidprotonen beobachtet wurde, sind mit einem Stern markiert. Die letztlich aus allen Parametern ermittelten Sekundärstrukturelemente sind ebenfalls angegeben, wobei β -Faltblattstränge durch Pfeile symbolisiert werden.

Unter Berücksichtigung all dieser Parameter besitzt D3 des gp130 sieben β -Faltblattstränge, die sich in zwei antiparallelen β -*Sheets* anordnen (Abb. 3.33). Das erste antiparallele β -*Sheet* besteht aus den drei β -Faltblattsträngen A, B und E (Leu228-Ser233, Ile239-Trp244, Ser283-Asp288). Das zweite antiparallele β -*Sheet* setzt sich aus den vier β -Faltblattsträngen D, C, F und G zusammen (Leu255-Lys264, Ser270-Ile272, Thr293-Lys303, Glu316-Thr321). Diese Abfolge und Anordnung der Sekundärstrukturelemente entspricht der Fibronektin (FN) Typ-III Topologie.

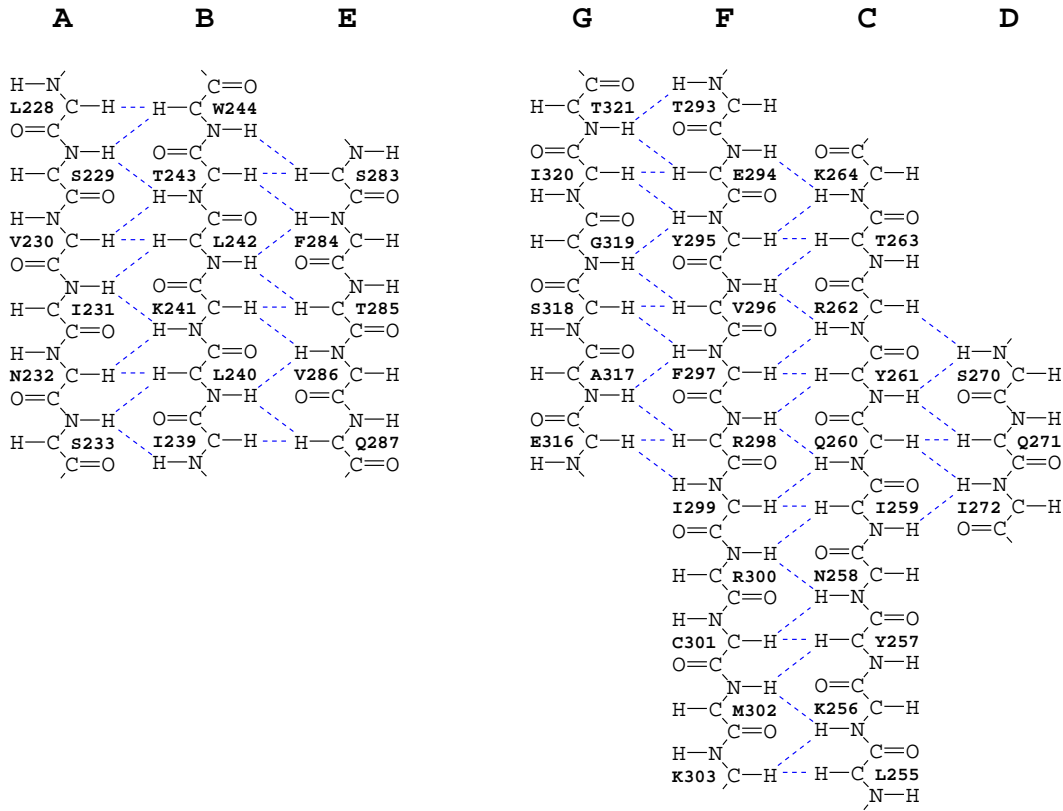


Abbildung 3.32: Longe-Range NOE's die die β -Sheet Topologie der D3 des gp130 definieren. Die identifizierten $d_{NN'}$ -, $d_{\alpha N'}$ - und $d_{\alpha\alpha'}$ -Konnektivitäten sind durch blaue gestrichelte Linien dargestellt.

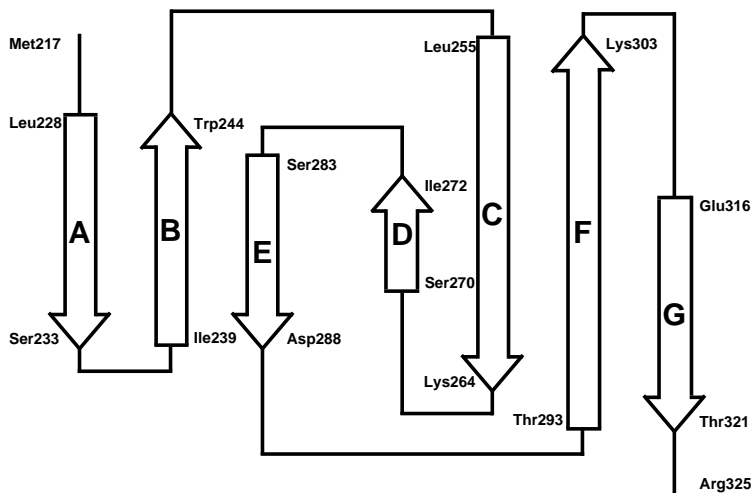


Abbildung 3.33: Schematische Darstellung der β -Faltblatt Topologie der D3 des gp130. Die sieben β -Faltblattstränge ordnen sich in zwei antiparallele β -Sheets (ABE, DCFG) an.

3.4 Die Tertiärstruktur der D3 von gp130

Es existieren mittlerweile mehrere Verfahren zur Berechnung von Proteinstrukturen aus den aus NMR-Experimenten extrahierten Parametern [49, 62, 63]. Alle diese Verfahren haben zum Ziel, aus den NMR-Daten die kartesischen Koordinaten für die Atome eines Proteins zu generieren. Bei Kenntnis aller interatomaren Abstände wären die Lösungen dieser Verfahren eindeutig. Die NMR-Strukturparameter (Protonenabstände, Diederwinkel, Wasserstoffbrücken, Disulfidbrücken) definieren eine Struktur jedoch niemals eindeutig, da nur ein geringer Teil aller interatomaren Protonenabstände im Experiment beobachtet werden kann. Die Strukturrechnungen werden deshalb mehrmals wiederholt, um ein mit den Eingabedaten konsistentes Ensemble von Strukturen niedrigster Energie zu generieren. Ein gebräuchliches Verfahren, mit dem dreidimensionale Strukturen aus internen Zwangsbedingungen generiert werden können, ist das sog. *Distance-Geometry-Verfahren* (Kap. 2.5). Es wurde zur Berechnung der dreidimensionalen Lösungsstruktur der D3 von gp130 angewendet.

3.4.1 Die Berechnung der dreidimensionalen Struktur

Für die Strukturrechnung konnten aus dem 3D-¹⁵N-NOESY-HSQC- und 3D-HCCH-NOESY-Spektrum insgesamt 1544 Protonenabstände ermittelt werden. In Tabelle 3.3 sind die für die Strukturrechnung verwendeten NOE's näher klassifiziert. Für die *Upper Bounds* wurden je nach Intensität der NOE's Werte von 2,8, 3,4, 4,3 bzw. 5,0 Å in die Abstandsmatrix eingesetzt. Den entsprechenden *Lower Bounds* wurde ein Wert von 1,8 Å, welcher der Summe der van der Waals-Radien zweier Wasserstoffatome entspricht, zugewiesen. Desweiteren wurden 31 Wasserstoffbrücken, die in Bereichen regulärer Sekundärstrukturelemente identifiziert werden konnten, in die Strukturrechnung miteinbezogen. Die d_{ON} - und d_{OH} - Abstandsgrenzen zwischen Akzeptor und Donor wurden dabei mit 3,8-2,8 Å bzw. 2,8-1,8 Å berücksichtigt.

Anhand der so erstellten Abstandsmatrix wurden 32 Strukturen nach Crippens *Embedding*-Algorithmus [46] generiert. Im nächsten Schritt wurden diese Strukturen optimiert, in dem die Fehlerfunktion, bestehend aus einem Abstands- und einem Chiralitätsterm, nach dem Algorithmus des konjugierten Gradienten zweimal minimiert wurde. Die so optimierten Strukturen wurden dann einer Moleküldynamik-Simulation unterworfen, deren Kraftfeld aus einem quadratischen Abstandspotential besteht [49, 64]. Diese sog. *Distance-Bound Driven Dynamics*-Simulation wurde für die ersten 1000 Zeitschritte bei einer Temperatur von 1000 K und einem Integrationszeitschritt von 0,01 ps durchgeführt. Anschliessend wurde das System während 1000 Integrationszeitschritten durch Kopplung an ein externes Wärmebad [65] langsam auf 10 K abgekühlt (*Simulated Annealing*). Im nächsten Schritt wurden die Strukturen wieder mittels des Algorithmus der konjugierten Gradienten hinsichtlich einer Abstandsfehlerfunktion minimiert. Anschliessend wurden die Chiralitäten der nicht äquivalenten Methylgruppen der Aminosäurereste Leucin und Valin, die H_α -Protonen der Glycinreste sowie die nicht äquivalenten Methylenprotonen nach der Methode der *Flipping Chiralities* [66, 67] korrigiert, und abschliessend die Strukturen nochmals mittels des Algorithmus der konjugierten Gradienten optimiert.

Konnektivitäten	
Anzahl der NOE's (insgesamt)	1544
Intraresiduale	328
Sequentielle (i, i+1)	371
<i>Medium-Range</i> (i+2 - i+5)	104
<i>Long-Range</i>	741
Abweichungen von der kovalenten Geometrie	Ensemble
Bindungen (Å)	0,030±0,0005
Winkel (°)	2,27±0,0596
Strukturelle Präzision	Ensemble
RMSD für die 50 C_α -Atome (Å) der β -Faltblätter	0,81±0,14
RMSD für alle C_α -Atome (Å)	1,59±0,37
RMSD für alle nicht Wasserstoffatome (Å)	2,31±0,36

Tabelle 3.3: Statistische Daten und RMSD-Werte des Ensembles bestehend aus 22 Strukturen. Die RMSD-Werte sind relativ zur mittleren Struktur angegeben.

Von den 32 generierten Strukturen wiesen 22 Abstandsverletzungen $\leq 0,2 \text{ \AA}$ auf und genügten ebenfalls den Chiralitätskriterien. Sie wurden durch Superpositionierung anhand der C_α -Atome der sieben β -Faltblattstränge in ein Strukturensemble zusammengefasst (Abb. 3.34). Aus dem Ensemble wurde die geme-

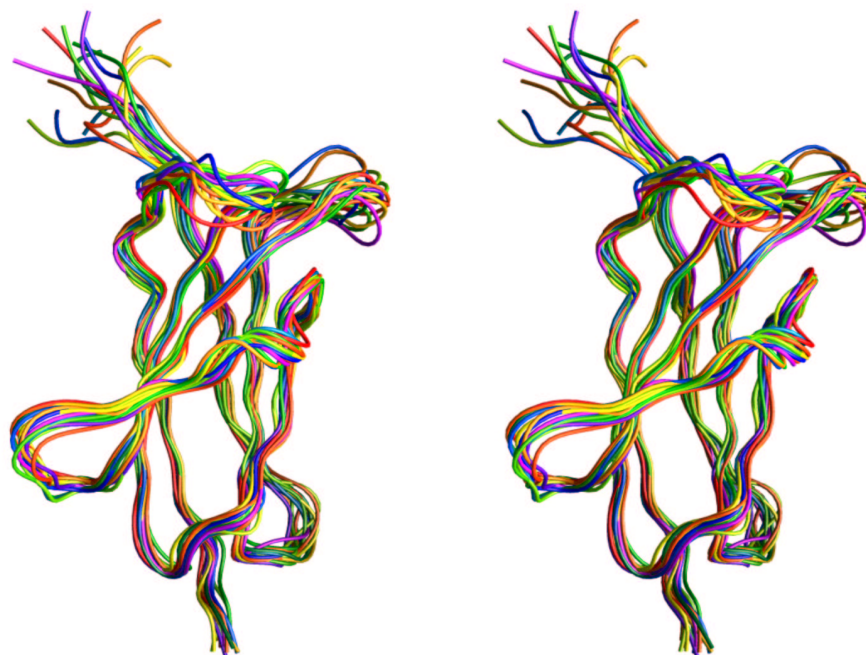


Abbildung 3.34: Spaghetti-Darstellung der 22 superpositionierten C_α -Strukturen von D3 (Stereobild).

trisch gemittelte Struktur berechnet. Die Abweichung vom mittleren Abstandsquadrat (*Root Mean Square Deviation* (RMSD)) der Rückgrat-atome des Ensembles zu dieser mittleren Struktur beträgt in Bereichen der β -Faltblätter $0,81 \text{ \AA}$. Weitere statistische Daten des Strukturensambles sind in der Tabelle 3.3 aufgeführt. Der Abbildung 3.35 kann man entnehmen, dass der RMSD-Wert der Rückgrat-atome mit der Anzahl der NOE's der Aminosäurereste korreliert. Im Gegensatz zu den *Coil*-Regionen konnten für die Aminosäurereste der β -Faltblätter deutlich mehr NOE's in den Spektren beobachtet und zugeordnet werden, was zu entsprechend kleineren RMSD-Werten in diesen Bereichen führt.

Die geometrisch gemittelte Struktur wurde anschliessend erneut gegen die Abstandsmatrix optimiert, um die durch das Mittelungsverfahren generierten geometrischen Artefakte auszuschliessen. Die optimierte mittlere Struktur von D3 ist in Abbildung 3.36 dargestellt.

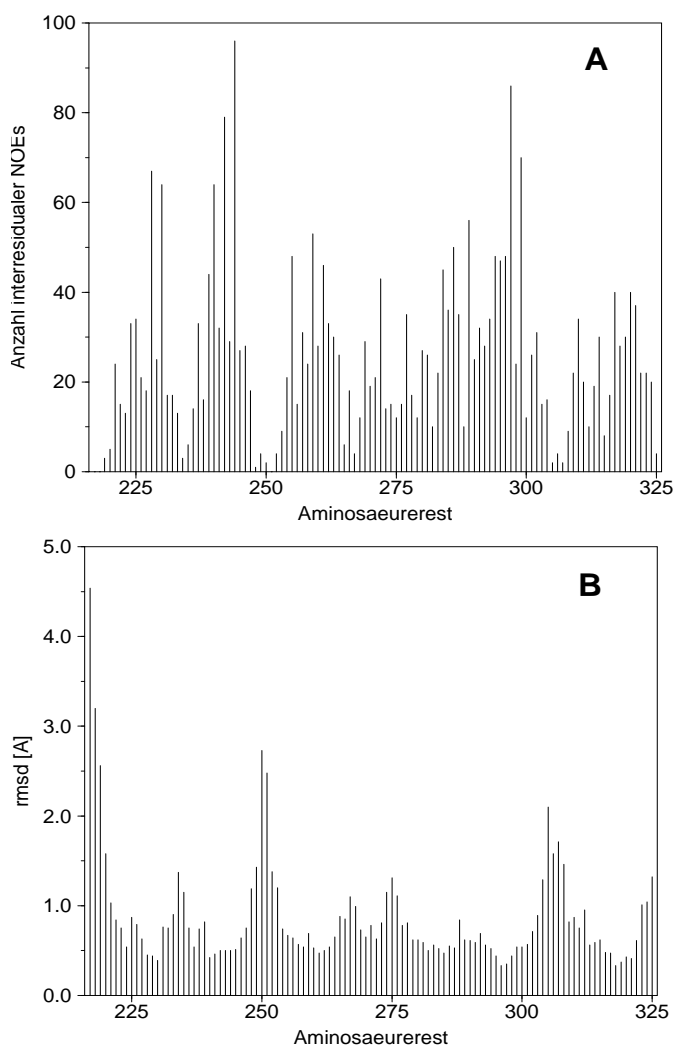


Abbildung 3.35: **A**: Anzahl der Abstands-*Restraints* der einzelnen Aminosäurereste, die zur Generierung des Strukturensambles eingesetzt wurden. **B**: RMSD-Werte der C_{α} -Atome des Ensembles zur mittleren Struktur.

Beschreibung der Lösungsstruktur

Die mittlere C_α -Struktur von D3 ist in Abbildung 3.36 in einer sog. *Ribbon*-Präsentation dargestellt. Die sieben β -Faltblattstränge der Domäne ordnen sich in zwei antiparallelen β -Faltblättern (A, B, E, und C, D, F, G) an, die beide rechtsgängig verdreht sind. Die hydrophoben Flächen der Faltblätter sind zueinander orientiert und bilden den *Core* des Proteins, wobei die β -Faltblätter in einem Winkel von 30° gegeneinander verdreht sind. Die *Loop*-Regionen der Domäne lassen sich in drei Klassen einteilen (Abb. 3.34); während der DE- und EF-*Loop* strukturell gut definiert sind, zeigen der AB- und CD-*Loop* eine mittlere Flexibilität. Der BC- und der N-terminale Teil des FG-*Loops*, die an der Bindung des Liganden beteiligt sind [28], weisen eine sehr hohe Flexibilität auf.

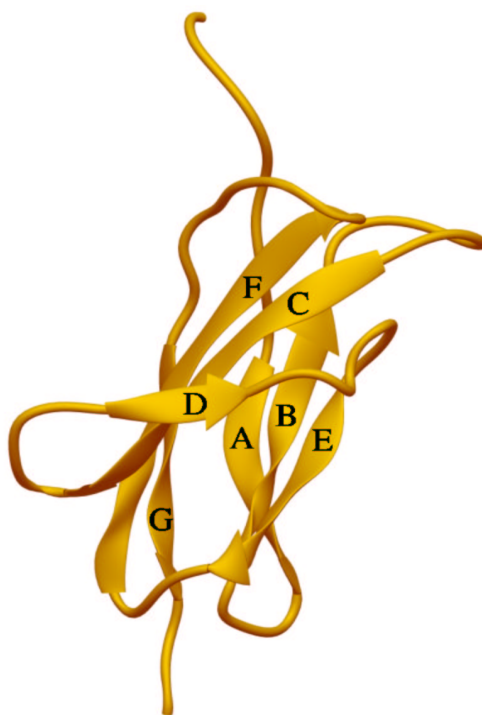


Abbildung 3.36: *Ribbon*-Darstellung der mittleren C_α -Struktur von D3. Die Sekundärstrukturelemente wurden analog der charakteristischen Konnektivitäten (s. Kap. 3.3.5, Abb. 3.32) in die Grafik übernommen. Die sieben β -Faltblattstränge sind mit grossen Buchstaben (A-G) gekennzeichnet.

Das WSXWS-Motiv

Die Familie hämatopoetischer Zytokinrezeptoren wurde aufgrund gemeinsamer struktureller Merkmale definiert [11]. Die Transmembranproteine enthalten in ihrem Extrazellulärteil mindestens ein Zytokin-Bindungs-Modul (ZBM), welches aus zwei Fibronektin Typ-III ähnlichen Domänen besteht, von denen die N-terminale vier konservierte Cysteinreste, die C-terminale ein WSXWS-Motiv enthält.

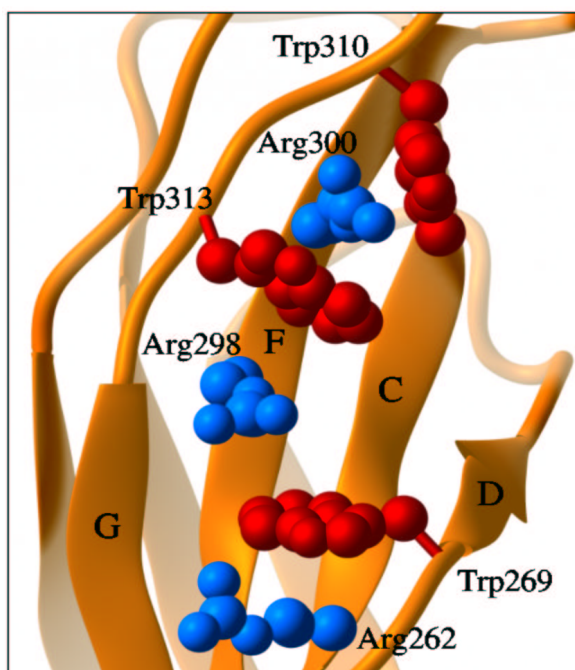


Abbildung 3.37: Das WR-Zipper Strukturelement der D3 von gp130. Das Bild zeigt die exponierte Oberfläche des viersträngigen β -Faltblatts (G, F, C, D), auf der sich die Tryptophanreste (rot) 310, 313 und 269 sowie die Argininreste (blau) 300, 298 und 262 alternierend anordnen und so das Strukturelement eines WR-Zippers ausbilden.

Das WSDWS-Motiv der D3 des Transmembranproteins gp130 befindet sich im C-terminalen Teil des FG-Loops und verläuft annähernd parallel zu den Aminosäureresten Ile299-Met302, die den C-terminalen Teil des β -Stranges F bilden. Die Seitenketten der Aminosäurereste Trp310 und Trp313 sind in Furchen auf der exponierten Oberfläche des viersträngigen β -Faltblatts so verankert, dass die H_{ζ_3} - und H_{ϵ_3} -Protonen beider Indolringsysteme NOE's zu Aminosäureresten der β -Stränge C und F zeigen. Für das Indolringsystem des Aminosäurerestes Trp310 konnten NOE's zu den H_{α} Tyr257-, H_N Tyr257-, H_{α} Cys301-, H_N Cys301-

und H_N Met302-Protonen beobachtet werden. Der Indolring des Aminosäurerestes Trp313 zeigt Konnektivitäten zu den H_α - und H_N -Protonen der Aminosäurereste Ile299 bzw. Arg300 und Gln260. Die H_{ζ_3} - und H_{ϵ_3} -Protonen des Aminosäurerestes Trp269, der im C-terminalen Teil des CD-*Loops* lokalisiert ist, zeigen ebenfalls NOE's zu *Backbone*-Protonen der β -Stränge C und F (H_α Phe297, H_N Arg298, H_N Arg262).

Die Indolringsysteme der Aminosäurereste Trp310, Trp313 und Trp269 besetzen somit aufeinanderfolgende Furchen zwischen den β -Strängen C und F auf der exponierten Oberfläche des Proteins, die durch die Reste Tyr257/Cys301, Ile259/Ile299 bzw. Tyr261/Phe297 ausgebildet werden. Die Seitenketten der Aminosäurereste Arg300, Arg298 (β -Strang F) und Arg262 (β -Strang C) richten sich in dem verbleibenden Raum zwischen den annähernd parallel orientierten Indolringen aus und bilden ein Tryptophan/Arginin (WR)-*Zipper* Strukturelement.

Das Ramachandran-Diagramm

Die Qualität einer generierten Struktur kann unter anderem anhand eines Ramachandran-Diagramms untersucht werden [68]. In einem solchen Diagramm trägt man die *Backbone*-Diederwinkel ϕ und ψ gegeneinander auf. In Polypeptidketten sind für diese Diederwinkel in der Regel nur bestimmte Bereiche des Konformationsraums zugänglich, während die übrigen Bereiche auf Grund hoher potentieller Energie nicht populiert werden.

Die Abbildung 3.38 zeigt das Ramachandran-Diagramm der optimierten mittleren Struktur von D3. In den energetisch günstigsten Konformationsbereichen (rot: A, B, L) befinden sich 36 der insgesamt 109 Aminosäurereste. Desweiteren finden sich 37 Aminosäurereste in den zusätzlich-erlaubten (gelb: a, b, l, p) und 18 Reste in den generell-erlaubten Regionen (hellgelb: \sim a, \sim b, \sim l, \sim p). Ausserhalb dieser Bereiche liegen die N- und C-terminalen Aminosäurereste Lys221, His226 bzw.

Tyr322. Bei den terminalen Resten muss berücksichtigt werden, dass sie aufgrund ihrer Flexibilität strukturell schlecht aufgelöst sind und daher keine eindeutige Bestimmung der *Backbone*-Diederwinkel zulassen. Desweiteren haben die Reste Glu234, Val252 und Thr280 ungünstige ϕ/ψ -Diederwinkel, wobei Glu234 und Val252 in den nicht gut definierten Regionen des AB- bzw. BC-Loops lokalisiert sind.

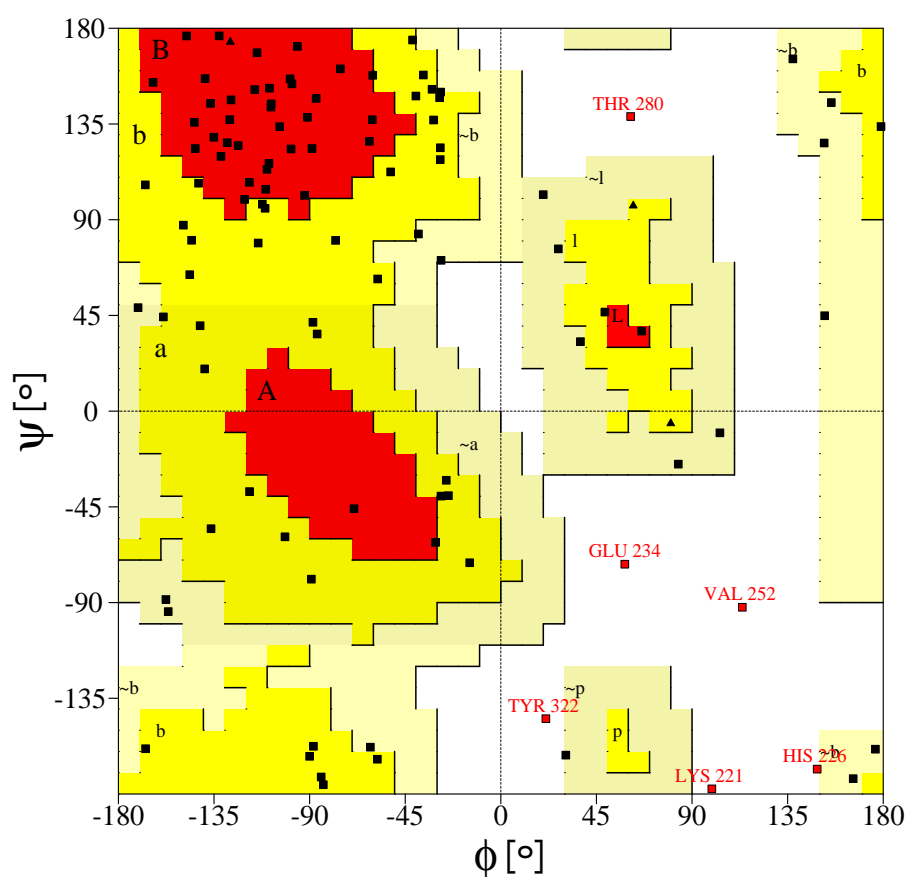


Abbildung 3.38: Ramachandran-Diagramm der mittleren Struktur von D3. Aminosäurereste werden durch Vierecke bzw. Glycinreste durch Dreiecke symbolisiert. Die roten Polygone (A, B, L) entsprechen den energetisch günstigsten Konformationsbereichen. Die gelben (a, b, l, p) und hellgelben ($\sim a$, $\sim b$, $\sim l$, $\sim p$) Bereiche kennzeichnen den zusätzlich- bzw. generell-erlaubten Konformationsraum. Die übrigen Regionen entsprechen unerlaubten ϕ/ψ -Diederwinkelkombinationen.

Kapitel 4

Diskussion

Gp130 ist die signaltransduzierende Untereinheit einer Familie von Zytokinen, die daher auch als gp130-Zytokine bezeichnet werden. Strukturvorhersagen auf der Basis der Primärstruktur [17] und Strukturuntersuchungen an entsprechenden Proteinsegmenten [18] zeigen übereinstimmend, dass der Extrazellulärteil des Signaltransduktors aus sechs Domänen besteht; eine N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne (D1); zwei FN Typ-III Domänen, die gemeinsam das ZBM konstituieren (D2-D3) und drei weiteren FN Typ-III Domänen (D4, D5 und D6). Punktmutationen, die auf der Basis von Modellstudien angefertigt wurden, ergaben, dass die für die Bindung des IL-6/IL-6R-Primärkomplexes entscheidenden Aminosäurereste u.a. in der D3 lokalisiert sind [28]. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Tertiärstruktur der gp130-D3 mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Die Domäne enthält sieben β -Faltblattstränge die sich in zwei antiparallelen β -Faltblättern anordnen. Die β -Faltblätter orientieren sich zueinander und bilden den hydrophoben *Core* des Proteins.

Ein Vergleich der Tertiärstruktur der D3 von gp130 mit denen der entsprechenden homologen Domänen der hämatopoetischen Zytokinrezeptoren EPOR (*Erythropoetin Receptor*) [30], GHR (*Growth Hormone Receptor*) [19] und GCSFR (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor*) [69] zeigt, dass die Domänen dem FN Typ-III Strukturtyp entsprechen, jedoch in der Länge der

β -Stränge und *Loops* variieren. Ein charakteristischer Unterschied zwischen den Domänen besteht in der relativen Orientierung der β -Faltblattstränge C und D (Abb. 4.1). Während sie in der EPOR-Domäne fast parallel zueinander verlaufen, überkreuzen sie sich in den Rezeptordomänen von gp130, HGR und GCSFR und bringen dadurch den *CD-Loop* in die räumliche Nähe zur exponierten Seite des viersträngigen β -Faltblatts. Ursache für diese strukturelle Besonderheit ist im Falle der gp130-D3 die Seitenkette des Aminosäurerestes Trp269, die in eine durch die Aminosäurereste Tyr261/Phe297 ausgebildete Furche verankert ist und so zu einer Erweiterung des *WR-Zippers* führt. Ähnliche Befunde findet man für die Rezeptorketten des HGR und des GCSFR, hingegen befindet sich im EPOR an der entsprechenden Position des *CD-Loops* ein Valinrest (Abb. 4.3).

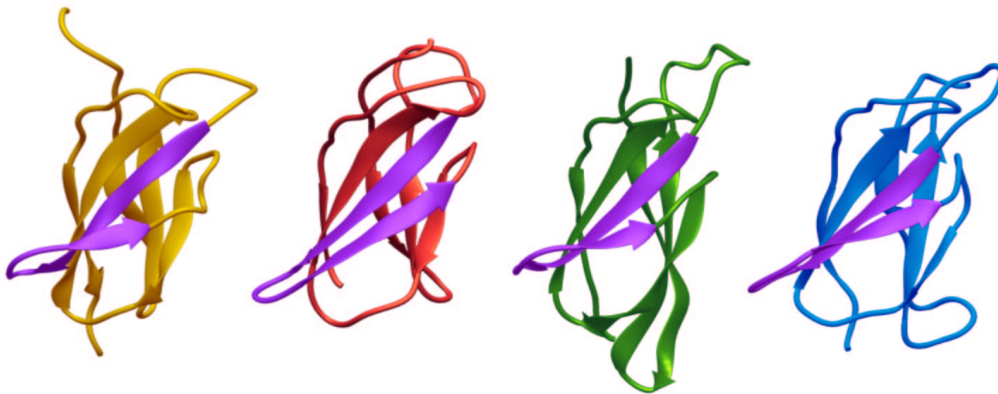


Abbildung 4.1: Vergleich der Strukturen von gp130-D3 (gelb), mit den entsprechenden homologen Domänen des EPOR (rot) [30], GHR (grün) [19] und des GCSFR (blau) [69]. Die β -Faltblattstränge C und D sowie der *CD-Loop* sind in violett hervorgehoben.

Die Anwesenheit eines Tryptophanrestes am Ende des CD-Loops trägt somit zu einer Erweiterung des aus dem WSXWS-Motiv gebildeten WR-Zippers bei (s. Kap. 3.4.1, Abb. 3.37) und führt zu einem überkreuzenden Verlauf der β -Faltblattstränge C und D, sowie zu einer Verdrillung des CD-Loops (Abb. 4.1, Abb. 4.2). In der EPOR-Rezeptordomäne schirmt dieser Loop Teile einer unterhalb des β -Stranges D gelegenen hydrophoben Region ab. In den anderen drei Rezeptordomänen hingegen wird durch die Verdrillung des CD-Loops ein erweiterter hydrophober Bereich zugänglich. Dieser Bereich wird im Falle von gp130

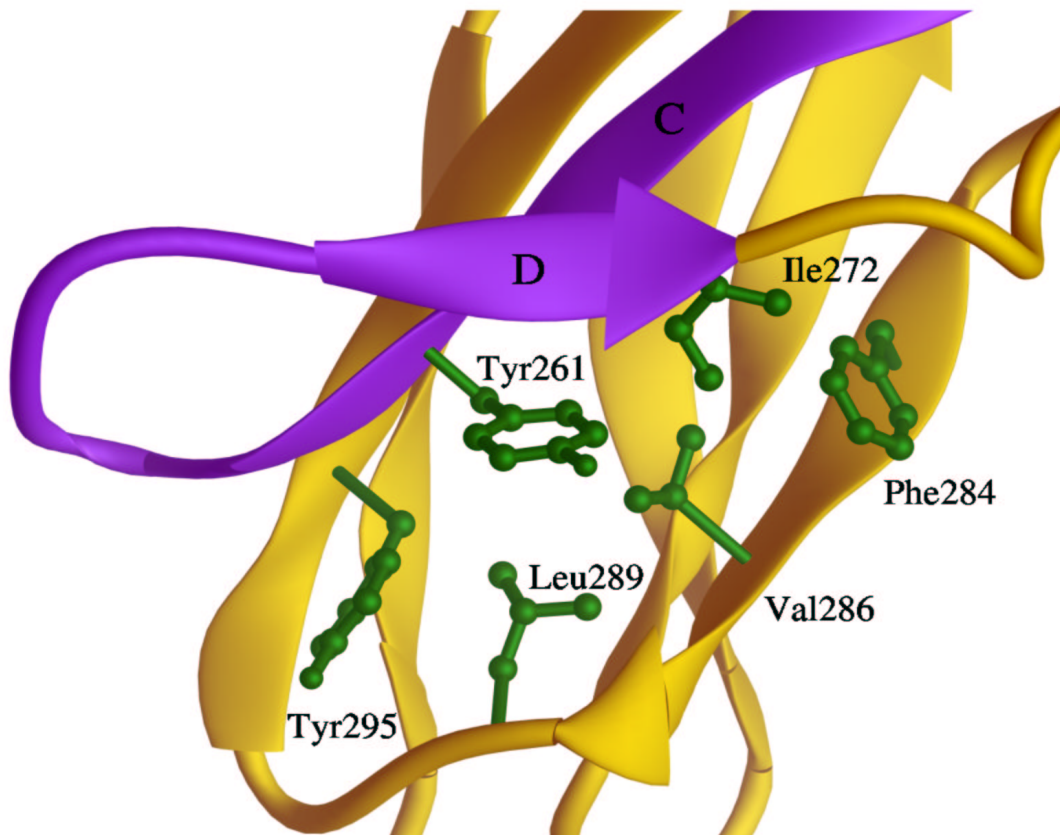


Abbildung 4.2: Ausschnitt aus der gp130-D3 Struktur. Die β -Faltblattstränge C und D sowie der CD-Loop sind in violett dargestellt. Aminosäurereste, die einen hydrophoben Bereich unterhalb des β -Stranges D ausbilden und in den entsprechenden Domänen des EPOR, GHR und des GCSFR konserviert bzw. homolog sind, sind in grün hervorgehoben.

durch die Seitenketten der Aminosäurereste Tyr261, Ile272, Phe284, Val286, Leu289 und Tyr295 gebildet (Abb. 4.2), die in den übrigen Rezeptordomänen konserviert bzw. homolog sind (Abb. 4.3). Der WR-*Zipper* führt zu einem charakteristischen Ladungsprofil auf der exponierten Oberfläche der Domäne und wird von der hydrophoben Region durch den β -Strang D begrenzt. Möglicherweise bilden diese Regionen ein Bindungsepitop für eine bisher unbekannte Rezeptorkomponente.

A		B		C			
KVKPNPPHNL	SVINSEELS	...	SILKLTWTNPSIKS	...	VIILKYNIOYRTKDA	.S gp130	
NEVVL	LDAPVGLVARLADE	SGHVLLRWLPPPETPMTSH	...	IRYEVDV	SAGNGAG EPOR	
DEIVQDP	PIALNWTLLNVSLT	GIHADI	QVRWEAPRNADI	QKGWMV	LEYELO	KEVNE.T GHR	
GSSLEPP	MLQALDIGPDVVSHQ	PGCLWLSWK	PWKPSEYM	...	EQECELR	YQPQLKGA GCSFR	
D		E		F		G	
TWSQ	IPPEDTASTRSS	FTVODL	KPFTEYVFR	IR	CMKEDG	..	KGYS
SVQR	VEI	...	LEGRTECVL	SNLRGR	TRYTF	AVR	ARMAEPSFGGF
KWK	KMDP	...	ILTTS	VEVYSLKVD	KEYEVR	VR	SKORN
NT	TLVF	..	HLPSSK	QEF	CGLHQ	APVY	TLOMRCIRSSLP
							..
							GFWS
							PSPGLQLRPTMK GCSFR

Abbildung 4.3: Sequentielles Alignment der gp130-D3 mit den entsprechenden Domänen des EPOR, GHR und des murinen GCSFR. Peptidsegmente, die β -Faltblattstränge ausbilden sind unterstrichen. Tryptophan- und Argininreste, die den WR-*Zipper* bilden, sind rot bzw. blau unterlegt, wobei nur die Argininreste farblich markiert sind, deren Seitenketten sich zwischen zwei Indolringsystemen befinden. Man beachte, dass im Fall des HGR die Tryptophanreste des WSXWS-Motivs durch einen Tyrosin- bzw. Phenylalaninrest ersetzt sind. Die durch eine Verdrillung des CD-*Loops* zugänglichen hydrophoben Aminosäurereste unterhalb des β -Stranges D sind grün unterlegt.

Für einige Mitglieder der Familie hämatopoetischer Zytokinrezeptoren wie z.B. GCSFR [70], PRLR [71], EPOR [30] und IL-6R [26] konnte gezeigt werden, dass in den jeweiligen ZBM's Aminosäurereste lokalisiert sind, die für die Bindung des entsprechenden Liganden verantwortlich sind. Das ZBM des Signaltransduktors gp130 ist an der Bindung der gp130-Zytokine und ihren spezifischen α -Rezeptoren beteiligt. Mit Hilfe von gp130-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die drei membrandistalen Domänen (D1, D2 und D3) für die Bildung der ternären IL-6/IL-6R/gp130- und IL-11/IL-11R/gp130-Rezeptorkomplexe ausreichen [31]. Modellstudien zufolge, sollte das ZBM mit den IL-6/IL-6R- bzw. IL-11/IL-11R-Primärkomplexen interagieren, wobei für die D2 eine Wechselwirkung mit dem

Liganden, für die D3 eine mit dem Liganden und der α -Rezeptorkomponente vorhergesagt wurde [22]. Punktmutationen der Aminosäurereste Val252 (BC-Loop), Gly306 und Lys307 (FG-Loop), die auf der Basis des Modells angefertigt wurden, führten zu einer verminderten Affinität des gp130 zu den IL-6/IL-6R- bzw. IL-11/IL-11R-Primärkomplexen [28, 72] und bestätigten damit, die der Modellstudie zugrundeliegende Idee, dass gp130 analog zu den Befunden aus der Kristallstruk-

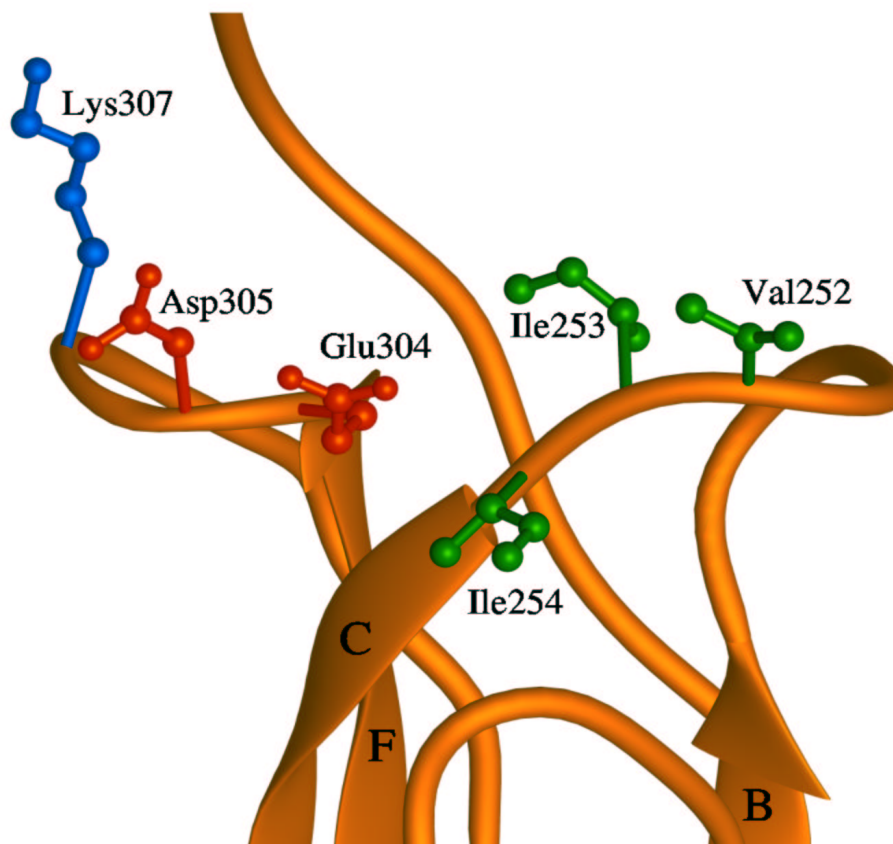


Abbildung 4.4: Ausschnitt aus der gp130-D3 Struktur. Dargestellt sind Aminosäurereste des BC- und des FG-Loops, die an der Bindung der gp130-Zytokine beteiligt sind bzw. beteiligt sein könnten. Hydrophobe Aminosäurereste sind in grün, saure in rot und basische in blau dargestellt.

tur des HGH/GHR₂-Komplexes [19] die gp130-Zytokine mit seinem ZBM über Site II kontaktiert. Die Lösungsstruktur der D3 von gp130 bestätigt die Daten aus Modell- und Mutagenesestudien; Val252 bzw. Gly306 und Lys307 sind in den

exponierten Regionen des BC- bzw. FG-*Loops* lokalisiert und liegen somit in für Interaktionen zugänglichen Bereichen (Abb. 4.4). Die Kristallstruktur des gp130-ZBM's zeigt, dass Val252 teilweise durch die Seitenkette des im EF-*Loop* der D2 befindlichen Aminosäurerestes Phe191 abgeschirmt wird [73]. Da jedoch beide Aminosäurereste an der Ligandenbindung beteiligt sind, bilden sie vermutlich die Hauptinteraktionsseite des gp130 mit dem Zytokin. Es ist anzunehmen, dass bei Ligandenbindung in einer als *Induced Fit* bezeichneten Konformationsänderung die Seitenkette des Val252 freigelegt und so für eine hydrophobe Interaktion zugänglich wird.

Die Aminosäurereste Val252, Ile253 und Ile254 bilden ein hydrophobes Peptidsegment innerhalb des BC-*Loops*. Während die Seitenkette des Aminosäurerestes Ile253 in Richtung des hydrophoben *Cores* orientiert ist, ist die Seitenkette des Restes Ile254 dem Lösungsmittel zugänglich, und wäre daher ein weiterer möglicher Kandidat für weitere hydrophobe Interaktionen mit den gp130-Zytokinen (Abb. 4.4). Ebenso könnten neben Lys307 Glu304 und Asp305 an einer Wechselwirkung mit den Liganden beteiligt sein, die zusammen eine hochgeladene Region innerhalb des FG-*Loops* bilden.

Obwohl gp130 bereits als signaltransduzierende Rezeptorkomponente für die gp130-Zytokine identifiziert, und zahlreiche Struktur-/Funktionsuntersuchungen an ihr durchgeführt wurden, ist der Mechanismus seiner ligandeninduzierten Aktivierung bisher nur unvollständig verstanden. Ein Aktivierungsmodell, das die bislang erhältlichen biologischen und strukturellen Daten hinreichend erklärt, ist in Abbildung 4.5 dargestellt [74]. Demzufolge liegt gp130 als inaktives symmetrisches Homodimer auf der Zellmembran vor, in dem sich die ligandenbindenden Epitope der *Hinge*-Region des ZBM's und der Ig-Domänen wechselseitig kontaktieren. Dieses präformierte Dimer wird unter Bildung eines Tetramerkomplexes aktiviert, wobei der IL-6/IL-6R-Primärkomplex über das ZBM des einen gp130 Moleküls an *Site II* und über die Ig-Domäne des anderen gp130 Moleküls an

Site III des Liganden gebunden wird. Aufgrund der ursprünglichen Symmetrie des gp130-Homodimers kann dieses Tetramer unter Ausbildung eines Hexamerkomplexes ein weiteres IL-6/IL-6R-Assoziat binden. Diese Tetramer/Hexamer-Verschiebung, die bei den über ein Heterodimer signalisierenden Zytokinen LIF, CT-1, CNTF, und OSM nicht möglich ist, wird unter supraoptimalen Zytokin-konzentrationen ermöglicht und äussert sich in einer verminderten biologischen Antwort. Dem Aktivierungsmodell entsprechend konnte bisher nur für die über

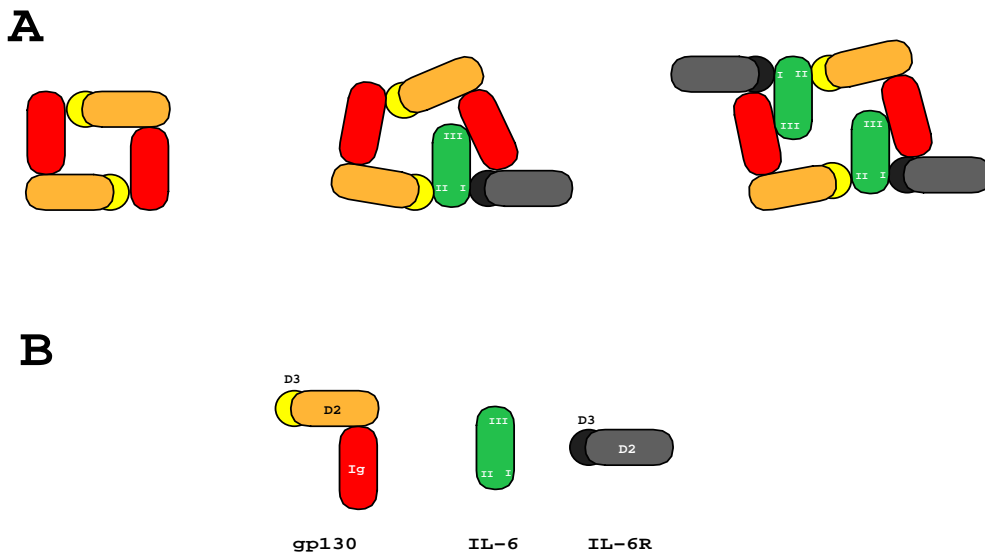


Abbildung 4.5: Tetramer/Hexamer-Modell des IL-6-Rezeptorkomplexes. **A:** Modell der Interaktionen zwischen dem IL-6/IL-6R-Primärkomplex mit gp130. Ein präformiertes symmetrisches gp130 Homodimer (links) interagiert mit einem IL-6/IL-6R-Primärkomplex unter Bildung eines Tetramerkomplexes (mitte). Aufgrund der ursprünglichen Symmetrie des gp130-Dimers kann dieses Tetramer unter Ausbildung eines Hexamers ein weiteres IL-6/IL-6R-Assoziat binden (rechts). Die Bindungssepitope des IL-6 sind mit I, II und III gekennzeichnet. **B:** Symbole und Farbkodierung, die zur Darstellung des gp130, IL-6 und IL-6R verwendet wurden.

ein Homodimer signalisierenden Zytokine IL-6 und IL-11 glockenförmige Aktivitäts-Kurven beobachtet werden [75, 76]. Hingegen beobachtet man für CNTF keinen Rückgang der biologischen Antwort über einen weiten Konzentrationsbereich [24].

Neueren Daten zufolge ist die Rezeptoraktivierung kein konzertierter Prozess, sondern beinhaltet die sequentielle Abfolge einzelner Bindungsereignisse [18]. Diesen Ergebnissen nach muss in einem ersten Schritt die Ig-Domäne eines gp130 Moleküls an *Site* III des Liganden binden, bevor das zweite gp130 über sein ZBM mit *Site* II des Liganden interagieren kann. In Verbindung mit dem oben beschriebenen Aktivierungsmodell wären diese Resultate eine gute Erklärung dafür, warum für die isolierte D3 weder in Gelfiltrations-, Co-Immunopräzipitations-, Oberflächenplasmonresonanz-, Inhibitions- noch chemischen *Crosslinking*-Experimenten eine Bindung an den IL-6/IL-6R-Primärkomplex nachgewiesen werden konnte [18].

Kapitel 5

Zusammenfassung

Gp130 ist die gemeinsame signaltransduzierende Rezeptorkomponente der Zytokine IL-6, IL-11, vIL-6, LIF, CT-1, CNTF, BSF-3, und OSM. Der aktivierte Rezeptorkomplex besteht im Falle des IL-6 aus dem IL-6/IL-6R-Primärkomplex und mindestens zwei Molekülen gp130. Strukturvorhersagen und Strukturuntersuchungen zeigen übereinstimmend, dass der Extrazellulärteil des Signaltransduktors aus sechs Domänen besteht; eine N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne (D1) und fünf FN Typ-III Domänen (D2-D6), wobei D2 und D3 gemeinsam das Zytokin-Bindungs-Modul (ZBM) konstituieren. Die drei membrandistanten Domänen (D1, D2 und D3) sind für die Bindung des IL-6/IL-6R- und des IL-11/IL-11R-Primärkomplexes ausreichend. Mutagenesestudien ergaben, dass die für die Bindung des Primärkomplexes entscheidenden Aminosäurereste u.a. in der gp130-D3 lokalisiert sind. Die Strukturaufklärung der dritten Domäne des gp130 mittels NMR-Spektroskopie soll zu einem detaillierten Verständnis beitragen, wie gp130 mit Zytokinen interagiert.

- In dieser Arbeit wurden die ^1H -, ^{15}N - und ^{13}C -Resonanzfrequenzen der gp130-D3 mit Hilfe von heteronuklearen Tripelresonanzexperimenten vollständig zugeordnet.

- Die Sekundärstruktur der gp130-D3 wurde anhand charakteristischer NOE's, der $^3J_{H_N H_\alpha}$ -Kopplungskonstanten und des chemischen Verschiebungsindex (CSI) bestimmt. Unter Berücksichtigung dieser Parameter enthält die Domäne sieben β -Faltblattstränge, die sich in zwei antiparallelen β -Faltblättern anordnen. Die Abfolge und Anordnung der Sekundärstrukturelemente entspricht einer Fibronektin (FN) Typ-III Topologie.
- Für die Berechnung der Tertiärstruktur konnten aus den 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC- und 3D-HCCH-NOESY-Spektren insgesamt 1544 Protonenabstände ermittelt werden, anhand derer mittels des *Distance-Geometry*-Verfahrens ein Ensemble von 22 Strukturen generiert wurde. In der Tertiärstruktur der gp130-D3 sind die zwei Flächen der beiden antiparallelen β -Faltblätter zueinander orientiert und bilden den hydrophoben *Core* des Proteins.
- Das WSXWS-Motiv ist ein strukturelles Merkmal der Familie hämatopoetischer Zytokinrezeptoren. Das WSDWS-Motiv der gp130-D3 (Trp310-Ser314) befindet sich im C-terminalen Teil des FG-*Loops*. Die Indolringsysteme der Aminosäurereste Trp310, Trp313 und Trp269 besetzen aufeinanderfolgende Furchen zwischen den β -Strängen C und F auf der exponierten Oberfläche des Proteins. Die Seitenketten der Aminosäurereste Arg300, Arg298 und Arg262 richten sich zwischen den Indolringsystemen aus und bilden so das Strukturelement eines WR-*Zipper*s.
- Der Aminosäurerest Val252 ist für die Bindung von gp130 an den IL-6/IL-6R-Primärkomplex essentiell. In der Lösungsstruktur ist dieser Rest in einer exponierten Region des flexiblen BC-*Loops* lokalisiert, wobei sich an Erkennung und Bindung beteiligte Aminosäurereste sehr häufig in flexiblen *Loop*-Regionen befinden, wo sie nach einer als *Induced Fit* bezeichneten Konformationsänderung mit dem Zielprotein wechselwirken.

Literaturverzeichnis

- [1] Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley, New York, 1st edition, 1986.
- [2] Jeener J. *Ampere International Summer School*. (unpublished), Basko Polje (Yugoslavia), 1971.
- [3] Zuiderweg ER and Fesik SW. Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry*, 28:2387–91, 1989.
- [4] Gronenborn AM Clore GM. NMR structures of proteins and protein complexes beyond 20,000 m(r). *Nat Struct Biol*, 4:849–53, 1997.
- [5] Pervushin K, Riek R, Wider G, and Wüthrich K. Attenuated t2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to nmr structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci*, 94:12366–71, 1997.
- [6] Ernst RR, Bodenhausen G, and Wokaun A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Oxford University Press, Oxford, 1st edition, 1987.
- [7] Kessler H, Gehrke M, and Griesinger C. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Grundlagen und Übersicht über die Experimente. *Angew Chem*, 100:507–54, 1988.

- [8] Bax A, Jong P, Mehlkopf A, and Schmidt J. *Chem Phys Lett*, 69:567–70, 1980.
- [9] Bystrov V. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 10:41–81, 1976.
- [10] Morris GA and Freeman R. *J Am chem Soc*, 101:760, 1979.
- [11] Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci*, 87:6934–38, 1990.
- [12] Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today*, 11:350–54, 1990.
- [13] Hoischen SH, Vollmer P, März P, Özbek S, Gotze KS, Peschel C, Jostock T, Geib T, Müllberg J, Mechtersheimer S, Fischer M, Grötzinger J, Galle PR, and Rose-John S. Human herpes virus 8 interleukin-6 homologue triggers gp130 on neuronal and hematopoietic cells. *Eur J Biochem*, 267:3604–12, 2000.
- [14] Betz UAK, Bloch W, van den Broek M, Yoshida K, Taga T, Kishimoto T, Addicks K, Rajewsky K, and Müller W. Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J Exp Med*, 188:1955–65, 1998.
- [15] Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J Jr, Müller W, and Chien KR. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell*, 97:189–98, 1999.
- [16] Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, and Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334:297–314, 1998.

- [17] Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, and Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63:1149–57, 1990.
- [18] Pflanz S. *Struktur- und Funktionsanalysen der Extrazellulärregion des Signaltransduktors gp130: Mechanismus der Interleukin-6-induzierten Rezeptoraktivierung*. Dissertation, Aachen, 1999.
- [19] de Vos AM, Ultsch M, and Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 255:306–12, 1992.
- [20] Ehlers M, Grötzinger J, de Hon FD, Müllberg J, Brakenhoff JP, Liu J, Wollmer A, and Rose-John S. Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction. *J Immunol*, 153:1744–53, 1994.
- [21] Savino R, Ciapponi L, Lahm A, Demartis A, Cabibbo A, Toniatti C, Delmastro P, Altamura S, and Ciliberto G. Rational design of a receptor superantagonist of human interleukin-6. *EMBO J*, 13:5863–70, 1994.
- [22] Grötzinger J, Kurapkat G, Wollmer A, Kalai M, and Rose-John S. The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins*, 27:96–109, 1997.
- [23] Hudson KR, Vernallis AB, and Heath JK. Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. *J Biol Chem*, 271:11971–78, 1996.
- [24] Kallen KJ, Grötzinger J, Lelievre E, Vollmer P, Aasland D, Renne C, Müllberg J, Meyer zum Büschenfelde KH, Gascan H, and Rose-John S. Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable modules.

- Transfer of the leukemia inhibitory factor receptor-binding site from ciliary neurotrophic factor to interleukin-6. *J Biol Chem*, 274:11859–67, 1999.
- [25] Kalai M, Montero-Julian FA, Grötzinger J, Wollmer A, Morelle D, Brochier J, Rose-John S, Heinrich PC, Brailly H, and Content J. Participation of two ser-ser-phe-tyr repeats in interleukin-6 (IL-6)-binding sites of the human IL-6 receptor. *Eur J Biochem*, 238:714–23, 1996.
- [26] Kalai M, Montero-Julian FA, Grötzinger J, Fontaine V, Vandebussche P, Deschuyteneer R, Wollmer A, Brailly H, and Content J. Analysis of the human interleukin-6/human interleukin-6 receptor binding interface at the amino acid level: proposed mechanism of interaction. *Blood*, 89:1319–33, 1997.
- [27] Özbek S, Grötzinger J, Krebs B, Fischer M, Wollmer A, Jostock T, Müllberg J, and Rose-John S. 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*, 273:21374–79, 1998.
- [28] Horsten U, Müller-Newen G, Gerhartz C, Wollmer A, Wijdenes J, Heinrich PC, and Grötzinger J. Molecular modeling-guided mutagenesis of the extracellular part of gp130 leads to the identification of contact sites in the interleukin-6 (IL-6)/IL-6 receptor/gp130 complex. *J Biol Chem*, 272:23748–57, 1997.
- [29] Kurth I, Horsten U, Pflanz S, Dahmen H, Küster A, Grötzinger J, Heinrich PC, and Müller-Newen G. Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. *J Immunol*, 162:1480–87, 1999.
- [30] Livnah O, Stura EA, Johnson DL, Middleton SA, Mulcahy LS, Wrighton NC, Dower WJ, Jolliffe LK, and Wilson IA. Functional mimicry of a protein

- hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 a. *Science*, 273:464–71, 1996.
- [31] Horsten U, Schmitz-Van de Leur H, Müllberg J, Heinrich PC, and Rose-John S. The membrane distal half of gp130 is responsible for the formation of a ternary complex with IL-6 and the IL-6 receptor. *FEBS Lett*, 360:43–6, 1995.
- [32] Müller-Newen G, Pflanz S, Hassiepen U, Stahl J, Wollmer A, Heinrich PC, and Grötzinger J. The signal transducer gp130—bacterial expression, refolding and properties of the carboxy-terminal domain of the cytokine-binding module. *Eur J Biochem*, 247:425–31, 1997.
- [33] Grzesiek S and Bax A. Correlating backbone amide and side-chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J Am Chem Soc*, 114:6291–93, 1992.
- [34] Grzesiek S and Bax A. An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *J Magn Reson*, 99:201–9, 1992.
- [35] Logan TM, Olejniczak ET, Xu RX, and Fesik SW. Side chain and backbone assignments in isotopically labeled proteins from two heteronuclear triple resonance experiments. *FEBS Lett*, 314:413–18, 1992.
- [36] Grzesiek S and Bax A. Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J Biomol NMR*, 3:185–204, 1993.
- [37] Marion D, Driscoll PC, Kay LE, Wingfield PT, Bax A, Gronenborn AM, and Clore GM. Overcoming the overlap problem in the assignment of ^1H NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear ^1H - ^{15}N Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-

- multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1 beta. *Biochemistry*, 28:6150–56, 1989.
- [38] Bax A, Clore GM, and Gronenborn AM. ^1H - ^1H correlation via isotropic mixing of ^{13}C magnetization, new three-dimensional approach for assigning ^1H and ^{13}C spectra of ^{13}C enriched proteins. *J Magn Reson*, 88:425–31, 1990.
- [39] Grzesiek S and Bax A. The importance of not saturating water in protein NMR. Application to sensitivity enhancement and NOE measurements. *J Am Chem Soc*, 115:12593–94, 1993.
- [40] Zuiderweg ER and Fesik SW. Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry*, 28:2387–91, 1989.
- [41] Kuboniwa H, Grzesiek S, Delaglio F, and Bax A. Measurement of h_n - h alpha j couplings in calcium-free calmodulin using new 2d and 3d water-flip-back methods. *J Biomol NMR*, 4:871–78, 1994.
- [42] Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, and Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR*, 6:277–93, 1995.
- [43] Johnson B and Blevins R. NMRVIEW: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J Biomol NMR*, 4:603–614, 1994.
- [44] Croasmun WR and Carlson RMK. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. VCH, New York, 2nd edition, 1994.
- [45] Blumenthal LM. *Theory and Applications of Distance Geometry*. Chelsea, New York, 1970.
- [46] Crippen GM. A novel Approach to the Calculation of Coordinates from Distance Matrices. *J comp Phys*, 26:449–52, 1977.

- [47] Crippen GM. Distance constraints on macromolecular conformation. *J Pept Protein Res*, 13:320–26, 1979.
- [48] Havel TF and Wüthrich K. An evaluation of the combined use of nuclear magnetic resonance and distance geometry for the determination of protein conformations in solution. *J Mol Biol*, 182:281–94, 1985.
- [49] Scheek RM, van Gunsteren WF, and Kaptein R. Molecular dynamics simulation techniques for determination of molecular structures from nuclear magnetic resonance data. *Methods Enzymol*, 177:204–18, 1989.
- [50] Havel TF, Kuntz ID, and Crippen GM. The Theory and Practice of Distance Geometry. *Bull Math Biol*, 45:281–94, 1983.
- [51] Cahn RS, Ingold SC, and Prelog V. Spezifikation der molekularen Chiralität. *Angew Chem*, 8:413–47, 1966.
- [52] Clore GM, Gronenborn AM, Nilges M, and Ryan CA. Three-dimensional structure of potato carboxypeptidase inhibitor in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics. *Biochemistry*, 26:8012–23, 1987.
- [53] Clore GM, Gronenborn AM, Nilges M, Sukumaran DK, and Zarbock J. The polypeptide fold of the globular domain of histone H5 in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *EMBO J*, 6:1833–42, 1987.
- [54] Cooke RM, Wilkinson AJ, Baron M, Pastore A, Tappin MJ, Campbell ID, Gregory H, and Sheard B. The solution structure of human epidermal growth factor. *Nature*, 327:339–41, 1987.
- [55] de Vlieg J, Scheek RM, van Gunsteren WF, Berendsen HJ, Kaptein R, and Thomason J. Combined procedure of distance geometry and restrained molecular dynamics techniques for protein structure determination from nuclear

- magnetic resonance data: application to the DNA binding domain of lac repressor from *Escherichia coli*. *Proteins*, 3:209–18, 1988.
- [56] Fesik SW, Bolis G, Sham HL, and Olejniczak ET. Structure refinement of a cyclic peptide from two-dimensional NMR data and molecular modeling. *Biochemistry*, 26:1851–59, 1987.
- [57] Ikura M, Kay LE, and Bax A. A novel approach for sequential assignment of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry*, 29:4659–67, 1990 May.
- [58] Wishart DS, Sykes BD, and Richards FM. The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 31:1647–51, 1992.
- [59] Wishart DS and Sykes BD. The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J Biomol NMR*, 4:171–80, 1994.
- [60] Karplus M. *J Phys Chem*, 30:11–15, 1959.
- [61] Grzesiek S. *persönliche Mitteilung*.
- [62] Brünger AT. *X-PLOR, version 3.1, a system for X-ray crystallography and NMR*. Yale University Press, New Haven, Connecticut, 1992.
- [63] Güntert P, Mumenthaler C, and Wüthrich K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J Mol Biol*, 273:283–98, 1997.
- [64] Kaptein R, Boelens R, Scheek RM, and van Gunsteren WF. Protein structures from NMR. *Biochemistry*, 27:5389–95, 1988.

- [65] Berendsen H, Gunsteren WF, Dinola A, and Haak J. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys*, 81:3684–90, 1984.
- [66] Ab E, Schuurman-Wolters G, Reizer J, Saier MH, Dijkstra K, Scheek RM, and Robillard GT. The NMR side-chain assignments and solution structure of enzyme IIBcellobiose of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *Protein Sci*, 6:304–14, 1997.
- [67] van Nuland NA, Grötzinger J, Dijkstra K, Scheek RM, and Robillard GT. Determination of the three-dimensional solution structure of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Escherichia coli* using multidimensional NMR spectroscopy. *Eur J Biochem*, 210:881–91, 1992.
- [68] Ramachandran GN and Sasisekharan V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem*, 23:283–438, 1968.
- [69] Yamasaki K, Naito S, Anaguchi H, Ohkubo T, and Ota Y. Solution structure of an extracellular domain containing the WSXWS motif of the granulocyte colony-stimulating factor receptor and its interaction with ligand. *Nat Struct Biol*, 4:498–504, 1997.
- [70] Hiraoka O, Anaguchi H, Asakura A, and Ota Y. Requirement for the immunoglobulin-like domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor in formation of a 2:1 receptor-ligand complex. *J Biol Chem*, 270:25928–34, 1995.
- [71] Somers W, Ultsch M, De Vos AM, and Kossiakoff AA. The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature*, 372:478–81, 1994.
- [72] Dahmen H, Horsten U, Küster A, Jacques Y, Minvielle S, Kerr IM, Ciliberto G, Paonessa G, Heinrich PC, and Müller-Newen G. Activation of the signal transducer gp130 by interleukin-11 and interleukin-6 is mediated by similar molecular interactions. *Biochem J*, 331:695–702, 1998.

- [73] Bravo J, Staunton D, Heath JK, and Jones EY. Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *EMBO J*, 17:1665–74, 1998.
- [74] Grotzinger J, Kernebeck T, Kallen KJ, and Rose-John S. IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biol Chem*, 380:803–13, 1999.
- [75] Curtis DJ, Hilton DJ, Roberts B, Murray L, Nicola N, and Begley CG. Recombinant soluble interleukin-11 (IL-11) receptor alpha-chain can act as an IL-11 antagonist. *Blood*, 90:4403–12, 1997.
- [76] van Dam M, Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Brakenhoff JP, Graeve L, Heinrich PC, and Rose-John S. Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding. *J Biol Chem*, 268:15285–90, 1993.

Lebenslauf

Thomas Kernebeck

13.08.1968

geboren in Vreden

Staatsangehörigkeit

deutsch

8/1975 - 6/1979

Besuch der Grundschule

St. Marien in Vreden

8/1979 - 6/1988

Besuch des Gymnasium

Georgianum Vreden

6/1988

Abitur

7/1988 - 9/1989

Bundeswehr

10/1989 - 11/1996

Studium der Chemie an
der RWTH Aachen

12/1996 - 6/1997

Diplomarbeit am Institut
für Biochemie der
RWTH Aachen

6/1997

Diplom

7/1997 - heute

wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Institut für Biochemie der
RWTH Aachen

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Grötzinger für die interessante Aufgabenstellung, die guten Arbeitsbedingungen und sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. D. Enders danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Wollmer für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit seine Laboreinrichtungen zu nutzen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. S. Grzesiek für die Durchführung der Tripelresonanz-Experimente.

Herrn Prof. P.C. Heinrich danke ich für die Möglichkeit seine Laboreinrichtungen zu nutzen.

Dr. Stefan Pflanz und Bernd Giese danke ich für die gute Zusammenarbeit an verschiedenen Projekten.

Ich danke meinen Laborkolleginnen und Laborkollegen Dr. Thomas Mülders, Dr. Günther Kurapkat, Elke de Wolf-Schraven, Karin Schleinkofer, Michael Pachta-Nick, Andreas Schwantner sowie Wolfgang Swegat für die kollegiale und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt weiterhin allen Institutsangehörigen für ihre stetige Hilfsbereitschaft.