

# **NMR-spektroskopische Untersuchungen zu Interaktions- und Transportprozessen an Membranen**



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und  
vorklinische Medizin der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Peter Geyer  
aus Regensburg**

**November 2006**

Promotionsgesuch eingereicht am: 20.11.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

1. Gutacher: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

2. Gutachter: Prof. Dr. Eike Brunner

3. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2 Allgemeine methodische Grundlagen</b>	<b>9</b>
2.1 NMR-spektroskopische Bestimmung von Proteinstrukturen	9
2.1.1 Methodik der sequentiellen Zuordnung	9
2.1.2 Analysen der Sekundärstruktur	11
2.1.3 Ermittlung von Strukturbeschränkungen	13
2.1.4 Berechnung von Proteinstrukturen	15
2.1.5 Beurteilung der Qualität der erhaltenen Strukturen	16
2.2 Untersuchung der Dynamik der Proteinhauptkette	16
2.3 Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	17
2.4 NMR-Diffusionsmessungen	19
2.5 Phospholipid-Bizellen als Modellmembranen	21
<b>3 Das <math>\beta</math>-amyloide Protein und seine Wechselwirkung mit Membranlipiden</b>	<b>25</b>
3.1 Einleitung	25
3.2 Materialien und Methoden	31
3.2.1 Probenpräparation und -zusammensetzung	31
3.2.2 NMR-Messungen	33
3.3 Ergebnisse	35
3.3.1 Vorversuche zu den Lösungsbedingungen	35
3.3.2 Die sequentielle Zuordnung und Sekundärstruktur von $A\beta_{40}$	38
3.3.3 Die Wechselwirkung von $A\beta_{40}$ mit Cholesterin	41
3.3.4 Messungen an schnell rotierenden Phospholipid-Bizellen	47
3.3.5 Die Wechselwirkung von $A\beta_{40}$ mit Phospholipid-Bizellen	50
3.4 Diskussion	52
3.4.1 Die Wechselwirkung von $A\beta_{40}$ mit Cholesterin	53
3.4.2 $A\beta_{40}$ und Modellmembranen	57

<b>4 Die Struktur der zweiten Ran-Bindedomäne von RanBP2</b>	<b>61</b>
4.1 Einleitung	61
4.2 Materialien und Methoden	65
4.3 Ergebnisse	68
4.3.1 Ausgangspunkt der Arbeit	68
4.3.2 Die sequentielle Zuordnung von RanBD2	70
4.3.3 Die Struktur von RanBD2	72
4.3.4 Die Wechselwirkung von RanBD2 mit dem C-Terminus von Ran	76
4.4 Diskussion	78
<b>5 Die zentrale Schleife des Saccharosetransporters PmSUC3</b>	<b>83</b>
5.1 Einleitung	83
5.2 Materialien und Methoden	87
5.3 Ergebnisse	90
5.3.1 Ausgangspunkt der Arbeit	90
5.3.2 NMR-Messungen und sequentielle Zuordnung	91
5.3.3 Analysen der Struktur und Dynamik	94
5.3.4 Die Wechselwirkung mit Saccharose	100
5.4 Diskussion	102
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>125</b>
7.1 Abkürzungen	125
7.2 Sequenzen der verwendeten Proteine	126
7.3 Sequentielle Zuordnung von A $\beta$ <sub>40</sub>	127
7.4 Sequentielle Zuordnung von pIB42	128
7.5 Wichtungsfaktoren für die Titrationsexperimente	130
<b>8 Danksagungen</b>	<b>131</b>
<b>9 Erklärung</b>	<b>132</b>



# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe NMR-spektroskopischer Messungen die Strukturen von Proteinen und deren Wechselwirkung mit anderen Molekülen im Rahmen verschiedener Interaktions- und Transportprozesse an Membranen charakterisiert. Dabei wurden Proteine untersucht, die entweder direkt mit zellulären Membranen wechselwirken oder aber am Transport von Proteinen bzw. Nährstoffen durch diese Membranen beteiligt sind.

Die Alzheimersche Demenzerkrankung wird gemäß der „amyloiden Hypothese“ durch das  $\beta$ -amyloide Protein ( $A\beta$ ) ausgelöst. Als Teil seines membranständigen Vorläuferproteins liegt die  $A\beta$ -Sequenz in  $\alpha$ -helikaler Form vor. Nach der proteolytischen Freisetzung des Peptids unterliegt dieses jedoch einem Umfaltungsprozess zu einer  $\beta$ -Strang-Konformation, die zur Aggregation des Peptids führt. Man nimmt an, dass die Wechselwirkung des Proteins mit Membranlipiden an diesem krankheitsauslösenden Umfaltungsschritt beteiligt ist. In dieser Arbeit wurde daher die Wechselwirkung von  $A\beta$  mit krankheitsrelevanten Membranlipiden und Modellmembranen NMR-spektroskopisch charakterisiert. Zunächst wurden geeignete wässrige Lösungsbedingungen identifiziert und die sequentielle Zuordnung des Proteins durchgeführt. In dieser rein wässrigen Lösung liegt das Protein dabei in monomerer Form, in einer eher unstrukturierten, nur teilweise  $\alpha$ -helikalen Konformation vor. Die Wechselwirkung mit Cholesterin bewirkt eine deutliche Aggregation des Peptids und die durchgeführten Messungen zeigen, dass diese Interaktion maßgeblich durch die N-terminale Hälfte von  $A\beta$  vermittelt wird. Diese Wechselwirkung ist damit sehr ähnlich wie die in anderen Studien untersuchte Wechselwirkung mit Gangliosiden. Ein kleiner Teil des beobachteten Effekts wird dabei auch durch das zum Lösen von Cholesterin verwendete Ethanol verursacht. Um die Wechselwirkung von  $A\beta$  mit Lipiden unter physiologischeren Bedingungen analysieren zu können, wurden darüber hinaus Messungen an sog. Phospholipid-Bizellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um Dispersionen von kurz- und langkettigen Phospholipiden, die als Modellmembranen für NMR-Studien in Lösung geeignet sind. Verschiedene Mischungen wurden dabei mit Diffusionsmessungen und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen charakterisiert. Dabei konnten auch Cholesterin und ungesättigte Phospholipide in die Bizellen eingebaut werden. Eine Verlängerung der Kettenlänge der Phospholipide ist jedoch nur sehr begrenzt möglich. Eine erste Untersuchung zur Wechselwirkung von  $A\beta$  mit solchen Bizellen zeigte, dass  $A\beta$  zwar nur schwach mit diesen interagiert. Es konnten so jedoch für langfristige Messungen geeignete, stabile Proben erhalten werden, so dass in Zukunft der spezifische Einfluss einzelner Lipide in diesem System weiter untersucht werden kann.

Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit auch Proteine untersucht, die an Transportvorgängen durch zelluläre Membranen beteiligt sind. Im Rahmen des Kerntransports in eukaryotischen Zellen werden z. B. verschiedene Makromoleküle in Form von Transportkomplexen durch die Kernporen der Kernmembran ins Zytoplasma transportiert. Durch die Wechselwirkung des Proteins Ran, das Bestandteil dieser Komplexe ist, mit den sog. Ran-Bindedomänen kommt es dort zum Zerfall der Komplexe und damit zur Beendigung des Exportprozesses. Um diesen Vorgang besser verstehen zu können, wurde in dieser Arbeit die Struktur der zweiten Ran-Bindedomäne des Ran-Bindeproteins 2 NMR-spektroskopisch charakterisiert. Das Protein zeigt die für Pleckstrin-Homologie-Domänen typische Faltung eines  $\beta$ -Fasses aus insgesamt sieben  $\beta$ -Strängen und einer über dem Fass liegenden  $\alpha$ -Helix. Das Protein ist durch flexible Termini und Schleifen sowie durch eine stark geladene Oberfläche gekennzeichnet. Die Struktur enthält dabei auch den für diesen Faltungstyp typischen fünften  $\beta$ -Strang, der in den Strukturen der Komplexe von anderen Bindedomänen mit Ran gefehlt hatte. Dieser Unterschied wird wohl durch die Wechselwirkung dieses Bereichs der Domäne mit dem C-Terminus von Ran verursacht. Dies zeigen auch zuvor durchgeführte NMR-Messungen zur Wechselwirkung der Domäne mit dem isolierten C-Terminus von Ran. Zusammen liefern diese Ergebnisse ein klareres Bild von der Beendigung von Exportprozessen auf der zytosolischen Seite der Kernmembran.

Ein weiteres Beispiel für Transportvorgänge durch Membranen stellt der Austausch von Nährstoffen zwischen den einzelnen Geweben von photosynthetisch aktiven Pflanzen dar. Dieser erfordert den Transport von Saccharose durch zelluläre Membranen mit Hilfe spezieller Saccharosetransporter. Die SUT2/SUC3-Transporterklasse besitzt dabei im Vergleich zu den anderen solchen Transportern eine vergrößerte zentrale zytoplasmatische Schleife. Daher wird für diese Transporterklasse eine Funktion als Saccharosesensor unter direkter Beteiligung dieser Schleife diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Struktur der zentralen Schleifendomäne von PmSUC3 NMR-spektroskopisch untersucht. Das Protein scheint isoliert in Lösung jedoch eine weitgehend ungefaltete Konformation zu besitzen. Dies zeigen übereinstimmend die Analysen der erhaltenen sequentiellen Zuordnung, die Dynamik des Proteins und die durchgeführten Strukturrechnungen. Darüber hinaus wurde eine im Rahmen der postulierten Sensorfunktion mögliche direkte Wechselwirkung mit Saccharose NMR-spektroskopisch überprüft. Die Ergebnisse schließen eine solche direkte Wechselwirkung oder gar eine Umfaltung in Anwesenheit von Saccharose jedoch aus. Möglicherweise ist eine solche ungefaltete Konformation aber notwendig für eine Wechselwirkung mit noch zu identifizierenden Interaktionspartnern der Domäne.

# 1 Einleitung

Die Zellen aller Lebewesen werden im Wesentlichen durch vier verschiedene Klassen von Biomolekülen aufgebaut und organisiert: Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate. Neben den Nukleinsäuren, die die Aufgabe der Speicherung der Informationen über den Aufbau der Zelle übernehmen, haben dabei die Proteine eine zentrale Bedeutung für die Zelle. Sie werden entsprechend der in den Nukleinsäuren codierten Information synthetisiert und übernehmen die eigentliche Ausführung der in den Nukleinsäuren codierten zellulären Aufgaben. So katalysieren Proteine z. B. in Form von Enzymen eine Vielzahl chemischer Reaktionen im Rahmen des Stoffwechsels der Zelle, die sonst gar nicht ablaufen könnten. Andere Proteine bilden Gerüststrukturen im Inneren der Zelle oder in der extrazellulären Matrix, um so den Aufbau der Zelle bzw. des gesamten Organismus zu stabilisieren. Ein spezieller Teil dieser Gerüstproteine ermöglicht dabei im Zusammenspiel mit Motorproteinen auch eine Fortbewegung der Zellen. Wiederum eine andere Gruppe von Proteinen interagiert mit den Nukleinsäuren und steuert das Ablesen der genetischen Informationen und reguliert damit die Synthese neuer Proteine.

Je größer und komplexer ein Organismus wird, desto umfangreicher müssen solche Regulationsmechanismen werden, um ein korrektes Zusammenspiel seiner einzelnen Komponenten gewährleisten zu können. Daher interagieren Proteine bei der Ausführung ihrer Aufgaben oft mit einer Vielzahl anderer Proteine und beeinflussen sich dabei gegenseitig in ihren Aktivitäten. Eine eigene Klasse von Proteinen dient nur der Aufnahme von Informationen aus der Zelle oder ihrer Umgebung bzw. der Verarbeitung und Weiterleitung dieser Information an andere Proteine der Zelle. So entstehen hoch komplexe Netzwerke von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die letztlich die Aktivität aller Teile der Zelle steuern. Nur so wird eine Anpassung der Zelle an ihre aktuellen Umgebungsbedingungen oder die gewebe- oder entwicklungsspezifische Ausprägung bestimmter Merkmale innerhalb eines Organismus möglich.

Im Rahmen solcher Regulations- und Steuerungsprozesse kommt auch den Lipiden, die neben den Proteinen inzwischen zunehmend in den Fokus wissenschaftlichen Interesses rücken, eine essentielle Funktion zu. Einerseits können Lipide in Form sog. sekundärer Botenstoffe selbst direkt an Signalleitungswegen beteiligt sein. Andererseits bilden Lipide in der Zelle Membranen aus, die nicht nur die Zelle von ihrer Umgebung abschirmen, sondern

auch in der Zelle eine räumliche Trennung bestimmter Prozesse ermöglichen. So kann z. B. die Verarbeitung der genetischen Information der Nukleinsäuren im Zellkern einer eukaryotischen Zelle räumlich und/oder zeitlich getrennt von den übrigen Prozessen in der Zelle ablaufen. Eine solche Kompartimentierung der Zelle erweitert ihre Regulations- und damit Entwicklungsmöglichkeiten erheblich. Darüber hinaus hat sich inzwischen gezeigt, dass die von den Lipiden gebildeten Membranen nicht homogen aufgebaut sind, sondern Membranmikrodomänen (*lipid rafts*) existieren, die sich in ihrer Lipidzusammensetzung von der umgebenden Membran unterscheiden. Durch diese Mikrostrukturierung können Lipide die Lokalisation oder Aktivität von in die Membran eingebetteten Proteinen beeinflussen und so deren Signalleitungsprozesse modifizieren.

Eine solche Einbettung von Proteinen in Membranen wird für die Zelle unter anderem notwendig, weil die Membran selbst für größere Moleküle grundsätzlich nicht permeabel ist. Folglich ist eine Maschinerie in der Membran notwendig, die weiterhin den geregelten Austausch diverser Moleküle und Informationen zwischen den einzelnen Teilen der Zelle und ihrer Umgebung ermöglicht. Diese Aufgabe übernehmen in der Membran verankerte integrale Membranproteine. Ihre vielfältigen Funktionen beinhalten z. B. den Transport von Ionen (Ionenkanäle) oder Nährstoffen wie Zuckern (Saccharidtransporter) durch die Zellmembran, die Weitergabe externer Stimuli ins Zellinnere (Rezeptorproteine) oder den Transport von Proteinen und Nukleinsäuren durch die Kernmembran in Eukaryoten. Auch die Aktivität solcher Membranproteine kann durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen aber auch Lipiden aus der Membran im Detail reguliert und so den aktuellen zellulären Bedingungen angepasst werden.

## Die Struktur von Proteinen

Um den Aufbau, die Stoffwechsel- und die Regulationsprozesse und damit die Funktionsweise einer Zelle im Detail verstehen zu können, ist nicht nur die Kenntnis darüber nötig, welche Moleküle in der Zelle überhaupt vorhanden sind und welche davon miteinander interagieren. Man benötigt insbesondere auch das Wissen darüber, wie diese Moleküle aufgebaut sind und wie und warum sie miteinander interagieren. Proteine bestehen aus linearen Ketten von Aminosäuren, die entsprechend der in den Nukleinsäuren gespeicherten Information zusammengesetzt werden. Die genaue Abfolge der Aminosäuren in einem Protein (Primärsequenz) definiert seine zelluläre Aufgabe. Möglich wird die Ausführung dieser Aufgabe jedoch erst durch die Ausbildung einer definierten räumlichen Struktur, die sich aber aus der Primärsequenz ergibt. Erst die richtige räumliche Anordnung der einzelnen

Aminosäuren in einem Protein (Faltung) ermöglicht z. B. einem Enzym die Katalyse einer ganz bestimmten chemischen Reaktion in seinem aktiven Zentrum oder einem Membrantransporter den selektiven Transport seines Zielmoleküls. Auch die Wechselwirkung zwischen Proteinen ist nur dann möglich, wenn die Strukturen der Proteine komplementäre, ineinander greifende Oberflächen ausbilden, die eine stabile Bindung der Proteine aneinander ermöglichen. Die richtige räumliche Faltung ist also von essentieller Bedeutung für die Funktion eines Proteins.

Diese Faltung ist jedoch nicht unveränderlich, sondern kann durch äußere Faktoren beeinflusst werden. Das ist auch für die Regulation der Funktion von Proteinen von essentieller Bedeutung. Da die Struktur eines Proteins seine Funktion definiert, kann durch Veränderung der Struktur die Funktion beeinflusst werden. So kann z. B. die Bindung anderer Proteine oder kleiner Moleküle an einen Membrantransporter über induzierte Strukturänderungen seine Transportaktivität modifizieren. Andererseits kann es aber auch vorkommen, dass ein Protein unter bestimmten Bedingungen seine funktionale Konformation gar nicht annehmen kann bzw. diese verliert, was zu einem Verlust der Aktivität dieses Proteins führt. Dabei kann es unter Umständen aber auch zur Ausbildung einer veränderten alternativen Konformation kommen, die möglicherweise sogar eine „unerwünschte“ Funktion ausübt. Das wird besonders deutlich im Fall einiger Krankheiten, die auf solch einer Fehlfaltung von Proteinen beruhen. Dies ist vor allem bei einigen Demenzerkrankungen wie der Alzheimerschen Erkrankung oder den transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) der Fall. Dabei aggregieren fehlgefaltete Proteine, bilden Ablagerungen im Gehirn, führen zum Absterben von Neuronen und bewirken so das Auftreten von Demenzsymptomen bei den betroffenen Patienten (s. u.).

## **Die Aufklärung von Proteinstrukturen**

Die Kenntnis der Struktur bzw. der möglichen strukturellen Zustände eines Proteins ist damit essentielle Voraussetzung für das Verständnis darüber, wie ein bestimmtes Protein funktioniert, wie es reguliert wird oder wie es krankhafte Veränderungen bewirken kann. Erst mit Kenntnis der Struktur eines Proteins wird auch eine gezielte Einflussnahme auf diese und damit die Funktion des Proteins möglich. So können anhand der bekannten Struktur eines Proteins z. B. Medikamente entwickelt werden, die spezifisch dessen Enzymaktivität inhibieren oder eine krankhafte Fehlfaltung unterdrücken.

Neben zahlreichen biophysikalischen Methoden, die unterschiedlich detaillierte generelle Informationen über die Struktur von Makromolekülen liefern, gibt es im Wesentlichen nur zwei verschiedene strukturblogische Methoden, die eine Charakterisierung von Proteinstrukturen in atomarer Auflösung erlauben: Die Röntgenbeugung an Proteinkristallen und die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR). Für die Aufklärung einer Proteinstruktur mittels Röntgenbeugung muss das betreffende Protein zunächst kristallisiert werden. Da die dafür geeigneten Lösungsbedingungen kaum vorhersagbar sind, ist das Auffinden dieser Bedingungen ein unter Umständen recht zeitaufwendiger Prozess. Konnten Kristalle des Proteins gewonnen werden, kann durch Auswertung der Beugung von Röntgenstrahlen am Kristallgitter die Struktur des betreffenden Proteins errechnet werden. Durch die langjährige Weiterentwicklung und Automatisierung der Technik ist die Strukturaufklärung selbst jedoch zunehmend schneller möglich. Die gewonnene Struktur im Proteinkristall kann im Vergleich zu den zellulären Bedingungen jedoch fehlerbehaftet sein, da die starken intermolekularen Wechselwirkungen im Kristallgitter die Struktur des Proteins beeinflussen können.

Dies wird durch Aufklärung der Proteinstruktur mit Hilfe der NMR-Spektroskopie vermieden. Die Proteine werden hier in wässriger gepufferter Lösung untersucht, was den tatsächlichen Bedingungen im Inneren einer Zelle wesentlich näher kommt. Für die NMR-spektroskopische Untersuchung wird ein Protein mit Radiowellen bestrahlt und dabei das Resonanzverhalten der Kernspins seiner Atome untersucht. In einem ersten Arbeitsschritt müssen dabei zunächst die Signale aller Atome in den beobachteten Spektren identifiziert werden (sequentielle Zuordnung) und anschließend kann vor allem aus gewonnenen Abstandsinformationen der Kerne die Struktur des Proteins berechnet werden. Da jedoch gerade der erste Arbeitsschritt in der Regel viel Zeit beansprucht, ist eine Proteinstrukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie relativ anspruchsvoll und zeitaufwendig. Dafür liefert die NMR-Spektroskopie im Gegensatz zur Kristallstrukturanalyse auch noch vielfältige weitere Informationen über die untersuchten Proteinstrukturen. Durch geeignete Messungen können z. B. Informationen über die Dynamik der Proteinstruktur gewonnen werden. Dies erlaubt z. B. Rückschlüsse über die Mechanistik von Enzymkatalysen oder Aussagen darüber, welche Teile eines Proteins durch ihre erhöhte Mobilität an einer Umfaltungsreaktion beteiligt sein könnten. Darüber hinaus können nach der NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung eines Proteins sehr einfach Informationen über seine Wechselwirkung mit anderen Molekülen gewonnen werden. Während im Falle der Röntgenstrukturbestimmung der Komplex aus Protein und Ligand neu kristallisiert werden muss, können in NMR-spektroskopischen Messungen direkt und schnell die an der Bindung des Liganden beteiligten Reste des Proteins identifiziert werden.

## **Gliederung und Inhalte dieser Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurden NMR-spektroskopische Methoden eingesetzt, um Strukturuntersuchungen an Proteinen im Rahmen verschiedener Interaktions- und Transportprozesse an Membranen durchzuführen. Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der NMR-Spektroskopie wurden hierbei dazu genutzt, um einerseits direkt den Einfluss von Membranlipiden auf Proteinstrukturen zu untersuchen und andererseits strukturelle Aussagen über Proteine zu treffen, die am Transport von Proteinen bzw. Nährstoffen durch zelluläre Membranen beteiligt sind. Nach einer generelle Einführung zu den Grundlagen der verwendeten NMR-spektroskopischen Methoden (Kapitel 2), folgt daher zunächst ein Kapitel über die Wechselwirkung des  $\beta$ -amyloiden Proteins der Alzheimerschen Erkrankung mit Membranlipiden (Kapitel 3). Es schließt sich ein Kapitel zur Struktur der zweiten Ran-bindenden Domäne des Ran-Bindeproteins 2 an, die am Transport von Makromolekülen durch die eukaryotische Kernmembran beteiligt ist (Kapitel 4). Zuletzt folgt ein Kapitel zur Charakterisierung der zentralen Schleife des pflanzlichen Saccharosetransporters PmSUC3 (Kapitel 5).

Die Alzheimersche Krankheit ist eine hochkomplexe Demenzerkrankung, die zu den auf Proteinefehlfaltung beruhenden Krankheiten gehört. Gemäß der „amyloiden Hypothese“ wird sie durch das  $\beta$ -amyloide Protein ( $A\beta$ ) ausgelöst. Dieses wird aus einem Vorläuferprotein durch proteolytische Spaltung gebildet und macht anschließend einen Umfaltungsprozess von einer  $\alpha$ -helikalen zu einer  $\beta$ -Strang-Konformation durch. Dadurch aggregiert das Protein und bildet Ablagerungen im Gehirn, wobei es zum Absterben der umgebenden Neuronen und so zum fortschreitenden Absterben des Gehirns der betroffenen Patienten kommt. An dem krankheitsauslösenden Umfaltungsschritt sollen nach neuesten Erkenntnissen Membranlipide beteiligt sein. In dieser Arbeit wurden daher NMR-spektroskopische Messungen durchgeführt, um die Wechselwirkung zwischen Membranlipiden und  $A\beta$  und die damit verbundenen strukturellen Änderungen in  $A\beta$  direkt zu untersuchen.

Ran-bindende Domänen sind an der Beendung von Transportprozessen auf der zytosolischen Seite der eukaryotischen Kernporen beteiligt. Proteine und Nukleinsäuren werden dabei in Form von an das Protein Ran gebundenen Komplexen durch die Kernporen ins Zytoplasma transportiert. Treffen diese Komplexe auf die Ran-Bindedomänen, die Bestandteil des Kernporenapparats sind, werden sie eingefangen und die zu transportierenden Makromoleküle werden freigesetzt. Um diesen Prozess besser verstehen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe NMR-spektroskopischer Messungen

die zweite Ran-Bindedomäne des Ran-Bindeproteins 2 untersucht und strukturell charakterisiert. Zuvor waren bereits NMR-spektroskopische Messungen durchgeführt worden, um die Wechselwirkung der Domäne mit dem isolierten C-Terminus von Ran zu untersuchen.

Der pflanzliche Saccharosetransporter PmSUC3 ist am Austausch von Saccharose zwischen den verschiedenen Geweben von photosynthetisch aktiven Pflanzen beteiligt. Dabei unterscheidet sich diese Transporterklasse jedoch von den übrigen Saccharosetransportern durch das Vorhandensein einer vergrößerten zentralen zytoplasmatischen Schleife. Aufgrund verschiedener Befunde wird daher für diese Transporterklasse eine Funktion als Saccharosesensor diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurden daher NMR-spektroskopische Messungen an der zentralen Schleifendomäne von PmSUC3 durchgeführt, um deren Faltung und Dynamik zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde eine im Rahmen der postulierten Sensorfunktion mögliche direkte Wechselwirkung des Proteins mit Saccharose analysiert.



## **2 Allgemeine methodische Grundlagen**

### **2.1 NMR-spektroskopische Bestimmung von Proteinstrukturen**

NMR-spektroskopische Messungen an wässrigen Proben biologischer Makromoleküle erlauben die Aufklärung der Strukturen der betreffenden Makromoleküle in atomarer Auflösung (Stangler et al., 2006; Güntert, 1998). Das Prinzip der NMR-Spektroskopie beruht dabei auf einer Interaktion der magnetischen Momente von Atomkernen in einem externen Magnetfeld mit eingestrahelter elektromagnetischer Strahlung aus dem Frequenzbereich von Radiowellen. Die physikalischen Grundlagen der Methode sind ausgiebig in der Literatur dokumentiert und sollen hier nicht näher behandelt werden (siehe dazu unter anderem: Levitt, 2001; Cavanagh et al., 1996). Die Bestimmung einer Proteinstruktur mit Hilfe der NMR-Spektroskopie läuft prinzipiell in zwei Phasen ab: Zunächst müssen mit Hilfe geeigneter Messungen möglichst vollständig die Resonanzfrequenzen aller Atome des betreffenden Proteins ermittelt werden, um so die durch die einzelnen Atome verursachten Signale in den aufgenommenen Spektren eindeutig identifizieren zu können. Die so gewonnene sog. sequentielle Zuordnung liefert dabei bereits erste Hinweise auf die Sekundärstruktur des untersuchten Proteins. In einer zweiten Phase können aus speziellen NMR-Experimenten verschiedene strukturelle Informationen über das Protein gewonnen werden, wobei meist Informationen über atomare Abstände eine zentrale Stellung einnehmen. Diese Informationen werden dann zusammen mit empirischen Daten genutzt, um die Struktur des Proteins zu berechnen.

#### **2.1.1 Methodik der sequentiellen Zuordnung**

In der Phase der sequentiellen Zuordnung wird von möglichst jedem Atom eines Proteins dessen Resonanzfrequenz bzw. chemische Verschiebung ermittelt. Je vollständiger diese Zuordnung geschieht, desto exakter und vollständiger können später die Spektren zur Gewinnung der strukturellen Parameter ausgewertet werden, wodurch man mehr strukturelle Informationen erhält. Die Methodik der sequentiellen Zuordnung von Proteinen beruht auf dem Vergleich von durch geeignete Messungen erhaltenen Daten über die Verknüpfung von Atomen durch Bindungen und über die Nähe von Atomen im Raum (Wüthrich, 1986).

Während für kleine chemische Verbindungen dabei die Auswertung von eindimensionalen Spektren ausreichend ist, müssen für Proteine mehrdimensionale Spektren aufgenommen werden, da sonst die Signalüberlagerung durch zu viele zu ähnliche Resonanzfrequenzen zu groß wird. Für sehr kleine Proteine und Peptide sind dazu zweidimensionale homonukleare Spektren nötig, in denen auf den beiden Achsen Wasserstoffe miteinander korreliert werden, die über Bindungen verbunden sind bzw. die in räumlicher Nähe zueinander stehen. Der erste Spektrentyp, die 2D-COSY- bzw. 2D-TOCSY-Spektren (Braunschweiler und Ernst, 1983), beruht dabei auf der durch die Bindungselektronen vermittelten sog. skalaren Kopplung (J-Kopplung), während der zweite Spektrentyp, das 2D-NOESY-Spektrum (Jeener et al., 1979), auf dem auf dipolarer Kopplung beruhenden sog. Kern-Overhauser-Effekt (NOE) basiert. Durch eine Auswertung der beobachteten Muster an Kreuzsignalen in den Spektren des TOCSY-Typs und anschließenden Vergleich mit den beobachteten Signalen in den Spektren des NOESY-Typs kann die sequentielle Zuordnung durchgeführt werden.

Bereits bei kleinen Proteinen mit einem Molekulargewicht unter zehn kDa kommt es jedoch auch in solchen zweidimensionalen Spektren durch die erhöhte Atomanzahl und erhöhte Linienbreiten der Signale oft schon zu einer zu starken Überlagerung der beobachteten Signale. Daher müssen solche Proteine bei ihrer Herstellung mit weiteren NMR-aktiven Isotopen,  $^{13}\text{C}$  und/oder  $^{15}\text{N}$ , angereichert werden. Dies erlaubt anschließend eine Korrelation der Protonen mit den daran gebundenen Heteroatomen mittels der J-Kopplung. Im einfachsten Fall können z. B. in einem 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum (Bodenhausen und Ruben, 1980) die Amidprotonen eines Proteins mit den direkt daran gebundenen Stickstoffatomen korreliert werden. Analoges ist für  $^{13}\text{C}$  möglich. Die Verknüpfung dieser Technik mit den oben für homonukleare 2D-Spektren beschriebenen Methoden erlaubt dann z. B. für  $^{15}\text{N}$ -markierte Proteine die Aufnahme von dreidimensionalen TOCSY-HSQC- bzw. NOESY-HSQC-Spektren (Marion et al., 1989). Diese besitzen im Vergleich zu den homonuklearen 2D-Spektren eine deutlich verringerte Signalüberlagerung und ermöglichen so die sequentielle Zuordnung der beobachteten Signalsysteme. Größere Proteine werden sowohl mit  $^{15}\text{N}$  als auch mit  $^{13}\text{C}$  angereichert. Das erlaubt die Aufnahme einer Serie von sog. Tripelresonanzspektren, in denen jeweils ganz bestimmte Atome der Proteinhauptkette oder der Aminosäureseitenketten durch sequentielle J-Kopplungsschritte miteinander korreliert werden (zur Übersicht siehe: Holak et al., 1998). Durch eine geeignete Kombination solcher Tripelresonanzspektren können dann zunächst die Atome der Proteinhauptkette und anschließend der Aminosäureseitenketten zugeordnet werden (Ikura et al., 1990).

Für große Proteine (Molekulargewicht über 20 kDa) wird aber die hohe Linienbreite der Signale, die durch die mit zunehmender Molekülgröße immer langsamere Rotation der Proteine verursacht wird, oft zu einem ernstzunehmenden Problem. Da dieser Effekt auf der hohen transversalen Relaxationsrate dieser Proteine beruht, kann man durch methodische Verbesserungen, die dieser erhöhten Relaxationsrate entgegenwirken, eine Linienverschmälerung erreichen und so auch größere Proteine untersuchen. In der Praxis bewirkt man dies einerseits durch eine vollständige oder teilweise Deuterierung des Proteins (Sattler und Fesik, 1996) und andererseits durch den Einsatz des sog. TROSY-Pulsschemas, das schmalere Linien in Spektren des HSQC-Typs bewirkt (Pervushin et al., 1997). So konnten inzwischen auch sehr große Proteine erfolgreich untersucht werden (Kay, 2005; Fiaux et al., 2002). Gerade die TROSY-Methodik kann dabei ganz allgemein sehr einfach ohne erhöhten Mess- oder Arbeitsaufwand eingesetzt werden.

### **2.1.2 Analysen der Sekundärstruktur**

Nach Abschluss der sequentiellen Zuordnung können bereits ohne die Berechnung der Struktur des untersuchten Proteins bereits erste Hinweise auf dessen Sekundärstruktur erhalten werden. Der Sekundärstrukturgehalt eines Proteins kann zwar auch schon ohne vorhandene sequentielle Zuordnung einfach aus der „Fingerabdruck“-Region eines 2D-COSY- bzw. 2D-TOCSY-Spektrums abgeschätzt werden (Wishart et al., 1991). Diese Methode ist jedoch relativ ungenau und liefert nur für größere stabil gefaltete Proteine brauchbare Vorhersagen. Wesentlich genauere Aussagen über die Sekundärstrukturelemente und ihre Lage im Protein lassen sich nach dem Abschluss der sequentiellen Zuordnung treffen. Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter) sind durch eine jeweils gleichartige Konformation des Proteinrückgrats in dem betroffenen Sequenzbereich gekennzeichnet. Dies führt zu charakteristischen Einflüssen auf die chemische Umgebung vor allem der betroffenen Hauptkettenatome und damit auch auf deren chemische Verschiebung. Daher weichen die chemischen Verschiebungen innerhalb von Sekundärstrukturelementen in charakteristischer Weise positiv oder negativ von für ungefaltete Bereiche typischen Referenzwerten ab, die aus ungefalteten kurzen Standardpeptiden gewonnen wurden. Daher kann durch Differenzbildung der beobachteten chemischen Verschiebungen in einem Protein zu den jeweiligen Referenzwerten auf das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen zurück geschlossen werden. Dabei werden üblicherweise die chemischen Verschiebungen der  $H^\alpha$ ,  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$  und C ausgewertet und aus den beobachteten Abweichungen von den Referenzwerten eine gemeinsame Konsensusvorhersage für die Sekundärstruktur berechnet. Die Berechnung dieses sog. *chemical shift*

*index* (CSI) wurde maßgeblich von Wishart und Mitarbeitern entwickelt (Wishart und Sykes, 1994; Wishart et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden auch deren Referenzwerte für die chemischen Verschiebungen verwendet (Wishart et al., 1995a).

Die chemischen Verschiebungen einer Aminosäure in einem Protein werden außer durch die vorhandenen Sekundärstrukturelemente jedoch auch durch den Typ der benachbarten Aminosäuren beeinflusst. Daher sollten die Referenzwerte der chemischen Verschiebungen aus Standardpeptiden vor der Berechnung eines CSI um die Effekte der lokalen Nachbaraminosäuren bereinigt werden. Während in stabil gefalteten Proteinen der Effekt durch die Sekundärstrukturelemente dominiert, ist diese Korrektur vor allem für nicht oder nur teilweise gefaltete Proteine wichtig, um die verbleibende Teilstrukturierung korrekt vorhersagen zu können. Eine vollständige Charakterisierung des Effekts durch die Nachbaraminosäuren wurde bisher zwar nicht durchgeführt, jedoch haben Schwarzinger und Mitarbeiter dazu durch Messungen an Standardpeptiden vereinfachte lokale Korrekturfaktoren für die jeweils sequentiell umgebenden vier Aminosäuren entwickelt (Schwarzinger et al., 2001). Diese wurden für alle CSI-Analysen in dieser Arbeit berücksichtigt. Da im Spezialfall eines nachfolgenden Prolins in dieser Arbeit aber im Vergleich zu den umgebenden Aminosäuren auch nach der Korrektur nach Schwarzinger noch erhöhte Differenzen der chemischen Verschiebungen auffielen und weil Wishart und Mitarbeiter speziell für diesen Fall ein eigenes Set von Referenzwerten ermittelt haben (Wishart et al., 1995a), wurde nur im Fall eines nachfolgenden Prolins dieses Set für die Analyse verwendet und dafür der Korrekturfaktor nach Schwarzinger für das folgende Prolin nicht berücksichtigt.

Neben der sequentiellen Zuordnung der chemischen Verschiebungen eines Proteins ermöglichen auch typische Muster von Kreuzsignalen in den NOESY-Spektren des Proteins Aussagen über vorhandene Sekundärstrukturen. Der geordnete Aufbau solcher Sekundärstrukturen führt zu einer charakteristischen Verteilung der Distanzen zwischen den beteiligten Atomen. Die räumliche Nachbarschaft bestimmter Protonen führt dabei zum Auftreten von typischen NOE-Signalen in den NOESY-Spektren. Das Vorhandensein eines solchen Signals bzw. Abstands wird dabei üblicherweise mit  $d_{ab}(i,i+x)$  abgekürzt. Die Indices  $a$  und  $b$  stehen dabei für die Typen der beiden beteiligten Protonen und  $x$  für den Abstand der beiden beteiligten Aminosäuren in der Primärsequenz. Ein  $d_{\alpha N}(i,i+1)$ -Abstand steht z. B. für die räumliche Nachbarschaft eines  $H^\alpha$  mit dem  $H^N$  der unmittelbar nachfolgenden Aminosäure. In  $\alpha$ -Helices treten dabei z. B. typischerweise  $d_{NN}(i,i+1)$ -,  $d_{NN}(i,i+2)$ -,  $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ -,  $d_{\alpha N}(i,i+3)$ - und  $d_{\alpha N}(i,i+4)$ -Kontakte auf (für eine vollständige Übersicht siehe: Holak et al., 1998). Die Identifizierung solcher charakteristischen Signale in den NOESY-Spektren erlaubt daher Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur eines Proteins.

### **2.1.3 Ermittlung von Strukturbeschränkungen**

Für die Berechnung der Struktur eines Proteins müssen nach Ende der möglichst vollständigen sequentiellen Zuordnung möglichst viele strukturelle Daten über das Protein gesammelt werden. Dabei handelt es sich üblicherweise hauptsächlich um Informationen über interatomare Abstände, die man aus NOESY-Spektren durch die Abstandsabhängigkeit des Kern-Overhauser-Effekts gewinnen kann. Darüber hinaus können aber auch noch andere aus NMR-Messungen erhältliche Informationen verwendet werden. Dazu zählen Daten über 1) J-Kopplungen, da diese in charakteristischer Weise von den Diederwinkeln der zugrunde liegenden Bindungen abhängen (Pardi et al., 1984; Karplus, 1963), 2) sog. Restdipolkopplungen, die die relative Orientierung von Bindungsvektoren zueinander anzeigen (Prestegard et al., 2004; Brunner, 2001), 3) Wasserstoffbrückenbindungen, die sich direkt (Cordier und Grzesiek, 1999) oder indirekt (Harris und Mildvan, 1999) NMR-spektroskopisch bestimmen lassen, 4) aus den chemischen Verschiebungen vorhergesagte Torsionswinkel der Proteinhauptkette (Cornilescu et al., 1999) und 5) die chemischen Verschiebungen selbst (Szilagyi, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Strukturberechnungen Distanzdaten verwendet, die mittels automatischer Zuordnung von NOESY-Spektren mit KnowNOE (Gronwald et al., 2002) gewonnen wurden. Daneben kamen mit TALOS (Cornilescu et al., 1999) aus den chemischen Verschiebungen berechnete Hauptkettentorsionswinkel zum Einsatz.

#### **Die automatische Zuordnung von NOESY-Spektren**

Da der Kern-Overhauser-Effekt zwischen zwei Atomen von deren Abstand abhängt, kann aus dem Volumen eines Signals in NOESY-Spektren auf diesen Abstand zurück geschlossen werden, sofern die chemischen Verschiebungen des Signals zugeordnet und damit die das Signal verursachenden Atome bekannt sind. Eine manuelle Zuordnung der Signale in den aufgenommenen NOESY-Spektren ist jedoch extrem zeitaufwendig, auch da aufgrund sehr ähnlicher chemischer Verschiebungen von jeweils mehreren Atomen eine Zuordnung oft nicht eindeutig möglich ist. Es gibt jedoch inzwischen verschiedene Programme zur automatischen Zuordnung von NOESY-Spektren, die den Zeitbedarf für diesen Schritt erheblich verkürzen (Gronwald und Kalbitzer, 2004; Güntert, 2003). In den einzelnen Programmen werden dabei jeweils verschiedene Methoden angewendet, um die bei der Zuordnung auftretenden Uneindeutigkeiten aufzulösen und so möglichst viele NOE-Signale zuzuordnen. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu das im Programmpaket AUREMOL implementierte Modul KnowNOE (Gronwald et al., 2002) verwendet, bei dem

verschiedene Verfahren zur Auflösung der auftretenden Uneindeutigkeiten zum Einsatz kommen. Einerseits verwendet das Programm einen wissensbasierten Ansatz, bei dem durch den Vergleich mit einer Datenbank von Abstandsverteilungen in bekannten Strukturen versucht wird, die wahrscheinlichste Zuordnung für ein Signal zu finden. Darüber hinaus wird ein Vergleich mit den übrigen ermittelten Atomabständen durchgeführt, da sich mehrere ermittelte Abstände in räumlicher Nähe zueinander gegenseitig bestätigen (sog. *network anchoring* (Herrmann et al., 2002)). Nicht zuletzt handelt es sich bei einer KnowNOE-Zuordnung jedoch um ein iteratives Verfahren. Bei der Analyse jedes NOE-Signals werden die in Frage kommenden Zuordnungen mit einer Struktur des Proteins verglichen, um zu entscheiden, welche der Zuordnungsmöglichkeiten aufgrund der beobachteten Atomabstände überhaupt plausibel sind. Dabei wird anfänglich eine gestreckte Startstruktur bzw. ein Homologiemodell des Proteins verwendet. Mit den Daten aus der gewonnenen Zuordnung kann anschließend ein verbessertes Strukturmodell errechnet werden, das dann wieder für eine verbesserte KnowNOE-Zuordnung der Spektren verwendet werden kann. So können in mehreren Schritten die gewonnenen Zuordnungen der NOESY-Spektren und die dadurch erhaltenen Strukturen gemeinsam iterativ optimiert werden.

### **Vorhersage von Hauptkettentorsionswinkeln mit TALOS**

Wie bereits oben erläutert, hat die Konformation der Proteinhauptkette einen charakteristischen Einfluss auf die chemischen Verschiebungen der Hauptkettensignale. Neben einer Auswertung im Rahmen einer CSI-Analyse kann dies auch genutzt werden, um durch einen Vergleich mit bekannten Strukturen Vorhersagen für die Torsionswinkel der Hauptkette zu treffen. Das Programm TALOS (*Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and Sequence Similarity*) vergleicht dazu die beobachteten chemischen Verschiebungen der NH, CO, C $^{\alpha}$ , C $^{\beta}$  und der H $^{\alpha}$  eines Proteins mit einer Datenbank, die die Strukturen und sequentiellen Zuordnungen bekannter Proteine enthält (Cornilescu et al., 1999). Dabei werden die Sequenz und die chemischen Verschiebungen von jeweils drei aufeinander folgenden Aminosäureresten mit allen entsprechenden Aminosäuretripletts in der Datenbank verglichen, um für die jeweils mittlere Aminosäure des Tripletts die wahrscheinlichsten Torsionswinkel vorherzusagen. Eine Vorhersage wird dabei als „gut“ klassifiziert, wenn für mindestens neun der zehn ähnlichsten Aminosäuretripletts in der Datenbank die Torsionswinkel des mittleren Rests ausreichend gut übereingestimmt haben.

## 2.1.4 Berechnung von Proteinstrukturen

Ist eine ausreichende Anzahl von experimentellen Beschränkungen aus den Messdaten ermittelt worden, kann anhand dieser Daten zusammen mit weiteren empirischen Daten über den chemischen Aufbau von Proteinen (z. B. typische Bindungslängen, Bindungswinkel, atomare van-der-Waals-Radien und elektrostatische Wechselwirkungen) eine Struktur des betreffenden Proteins berechnet werden (Holak et al., 1998). Zur Berechnung der Struktur am Computer gibt es prinzipiell verschiedene Verfahren, meistens werden jedoch sog. Molekulardynamiksimulationen durchgeführt. Dabei werden die experimentellen und empirischen Beschränkungen in energetische (Pseudo-) Potentiale umgesetzt, aus denen die auf die einzelnen Atome einer gegebenen Struktur wirkenden Kräfte berechnet werden. Üblicherweise ausgehend von einer gestreckten Startstruktur bewegen sich in der Simulation die Atome des Moleküls im Potentialfeld entsprechend der auf sie wirkenden Kräfte bis eine Anordnung mit minimaler Pseudoenergie erreicht ist. Um dabei ein globales Pseudoenergieminimum zu finden wird dabei oft ein mehrfaches Aufheizen und Abkühlen des Systems simuliert (sog. *simulated annealing*). Eine Struktur mit minimaler Pseudoenergie steht dabei für eine maximale Erfüllung der experimentellen und empirischen Vorgaben. In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Strukturberechnungen mit dem so arbeitenden Molekulardynamikpaket CNS 1.1 durchgeführt (Brünger et al., 1998). Dabei erfolgte wie oben beschrieben ein iteratives Wechselspiel zwischen den Strukturberechnungen mit CNS und neuen Zuordnungen der NOESY-Spektren mit KnowNOE anhand der erhaltenen pseudoenergieärmsten Strukturen.

Im Anschluss an erfolgreiche Strukturbestimmungen wurden die erhaltenen Strukturen abschließend einer umfassenden Strukturverfeinerung im Lösungsmittel Wasser unterzogen. Dabei werden die Proteine einer Molekulardynamiksimulation in einer Box aus Wassermolekülen unterzogen. Dies ermöglicht nicht-kovalente Wechselwirkungen des Proteins mit den Lösungsmittelmolekülen. Diese im Vergleich zur Simulation ohne Lösungsmittel wesentlich realistischere Beschreibung des natürlichen Zustands von Proteinen liefert bessere NMR-Strukturen als die herkömmlichen Ansätze, benötigt jedoch viel Rechenzeit (Xia et al., 2002). In dieser Arbeit wurde daher ein rechenzeitoptimiertes Protokoll von Linge und Mitarbeitern für diese Berechnungen verwendet (Linge et al., 2003), wobei das Molekulardynamikpaket Xplor-NIH 2.9.6 zum Einsatz kam (Schwieters et al., 2006).

### **2.1.5 Beurteilung der Qualität der erhaltenen Strukturen**

Um die Qualität der aus den Rechnungen erhaltenen Strukturmodelle beurteilen zu können, wurden jeweils verschiedene Analysen durchgeführt. Einerseits wurden die Strukturen mit dem Programm MOLMOL (Koradi et al., 1996) dargestellt und analysiert. Mit MOLMOL wurden dabei sämtliche, in dieser Arbeit angegebenen, globalen bzw. lokalen RMSD-Werte berechnet und alle strukturellen Darstellungen erstellt, soweit nicht anders angegeben. Weiterhin wurden mit Hilfe verschiedener Perl-Skripten die Erfüllung der experimentellen Vorgaben und die daraus resultierenden Pseudoenergien der erhaltenen Strukturen untersucht. Mit PROCHECK (Laskowski et al., 1996) wurde die Geometrie der Strukturen beurteilt und dabei Ramachandranstatistiken erzeugt (Ramachandran et al., 1963) und die vorhandenen Sekundärstrukturen analysiert. PROCHECK vergleicht dazu die beobachtete Geometrie mit empirischen Erwartungswerten für Bindungslängen, Bindungswinkel, etc. Eine ähnliche Analyse der Geometrien wurde auch mit dem Programm WHATCHECK (Hoof et al., 1996) durchgeführt. Abschließend wurde die Übereinstimmung der ermittelten Proteinstruktur mit den zugrunde liegenden NOESY-Spektren beurteilt. Dazu wurde der NMR-spektroskopische R-Wert mit dem RFAC-Modul in AUREMOL berechnet (Gronwald et al., 2000). Dabei wird aus dem Strukturmodell zusammen mit der sequentiellen Zuordnung ein NOESY-Spektrum simuliert und dieses mit dem entsprechenden experimentell bestimmten Spektrum verglichen. Der R-Wert stellt dabei ein Maß für die Übereinstimmung dieser beiden Spektren und damit die Qualität des Strukturmodells dar.

## **2.2 Untersuchung der Dynamik der Proteinhauptkette**

Eine weitere Anwendung der NMR-Spektroskopie ist die Untersuchung von dynamischen Prozessen in Proteinen. So kann unter anderem die Dynamik der Hauptkette analysiert werden, um ein Bild der intramolekularen Beweglichkeit des Proteins zu erhalten. So lassen sich auch besonders flexible Bereiche der Hauptkette ermitteln, denen eine funktionelle Bedeutung z. B. bei der Bindung von Interaktionspartnern oder bei einer enzymatischen Katalyse zukommen kann. Die Untersuchung der Hauptkettendynamik ist unter anderem durch Auswertung des heteronuklearen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE-Effekts der Hauptkettenamidsignale möglich (Kay et al., 1989). Die Messung beruht auf der Abhängigkeit des heteronuklearen Kern-Overhauser-Effekts zwischen dem Proton und dem Stickstoff einer Amidgruppe von der Beweglichkeit dieser Gruppe. Diese Beweglichkeit setzt



sich zusammen aus der Rotationsbewegung des gesamten Proteins, beschrieben durch die Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$ , und der lokalen internen Beweglichkeit der Hauptkette an dieser Stelle. Die Messung erfolgt durch Aufnahme von modifizierten HSQC-Spektren, die einmal mit einer Vorsättigung der Amidprotonen vor der Pulssequenz und einmal ohne diese Vorsättigung gemessen werden. Bei Vorsättigung der Amidprotonen kann ein bewegungsabhängiger Magnetisierungstransfer über den Kern-Overhauser-Effekt auf den Amidstickstoff stattfinden. Der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE ergibt sich damit durch den Vergleich der Signalvolumina mit ( $I_{\text{sat}}$ ) und ohne ( $I_{\text{eq}}$ ) Vorsättigung der Amidprotonen:

$$^1\text{H}-^{15}\text{N} - \text{NOE} = \frac{I_{\text{sat}}}{I_{\text{eq}}} \quad (1)$$

Dabei ergibt sich im langsam rotierenden Grenzfall ( $\omega_N \tau_c \gg 1$ ) ein Maximalwert für den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE von 0,83 (Annahmen: Isotrope Rotation,  $\omega_N = 60,8$  MHz, NH-Bindungslänge = 1,02 Å). Dieser Fall bedeutet, dass sich der NH-Bindungsvektor ausschließlich mit der Gesamtbewegung des Proteins reorientiert. Negative Werte bis zum Minimalwert von -3,5 im schnell rotierenden Grenzfall ( $\omega_N \tau_c \ll 1$ ) deuten auf eine im Vergleich zur Gesamtbewegung stark erhöhte Beweglichkeit der betroffenen Reste hin (Cho et al., 1996).

## 2.3 Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Mit Hilfe NMR-spektroskopischer Messungen lassen sich auch relativ einfach alle Prozesse charakterisieren, die einen Einfluss auf die Struktur des untersuchten Moleküls haben, da die chemischen Verschiebungen sehr sensitiv auf solche Veränderungen reagieren. Dabei kann es sich z. B. um einen Übergang der Proteinstruktur zwischen zwei verschiedenen Konformationen (konformationeller Austausch) oder um das Bindungsereignis eines Liganden handeln (chemischer Austausch). Bei diesen Prozessen kommt es jeweils zu einer Veränderung der chemischen Umgebung der betroffenen Atomkerne, wodurch sich auch deren Resonanzfrequenz ändert. Betrachten wir z. B. ein Makromolekül M, an dem das Bindungsereignis eines Liganden X untersucht werden soll. Dieses Bindungsereignis ist gekennzeichnet durch die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion  $k_A$  bzw.  $k_D$  und die Austauschrate  $k_{\text{ex}} = k_A + k_D$ :



Im Gleichgewicht ergibt sich die Gleichgewichtskonstante  $K_D$  des Systems aus den freien Konzentrationen bzw. den Gesamtkonzentrationen des Makromoleküls M ( $c_M$  bzw.  $c_M^{Total}$ ), des Liganden X ( $c_X$  bzw.  $c_X^{Total}$ ) und der Konzentration des Komplexes MX ( $c_{MX}$ ) in folgender Form:

$$K_D = \frac{c_M \cdot c_X}{c_{MX}} = \frac{(c_M^{Total} - c_{MX}) \cdot (c_X^{Total} - c_{MX})}{c_{MX}} \quad (3)$$

Für die relativen Populationen  $P_M$  und  $P_{MX}$  des freien Makromoleküls bzw. des Komplexes im Gleichgewicht ergibt sich damit:

$$P_M = \frac{c_M}{c_M + c_{MX}} = \frac{K_D}{K_D + c_X} \quad \text{bzw.} \quad P_{MX} = \frac{c_{MX}}{c_M + c_{MX}} = \frac{c_X}{K_D + c_X} = 1 - P_M \quad (4a \text{ bzw. } 4b)$$

Betrachtet man nun NMR-spektroskopisch das Makromolekül M, so unterscheiden sich die Resonanzfrequenzen der betroffenen Atome von M durch die Wechselwirkung mit X im Komplex ( $\omega_{MX}$ ) von denen im freien Zustand ( $\omega_M$ ). Im Gleichgewicht gibt es für die resultierenden Spektren von M dabei drei verschiedene Möglichkeiten: Ist der Frequenzunterschied der Signale beider Zustände  $\Delta\omega_{MX} = \omega_M - \omega_{MX}$  sehr viel größer als die Austauschrate  $k_{ex}$ , so erhält man zwei getrennte Signale der beiden Zustände in den Spektren (langsamer Austausch). Ist  $k_{ex}$  dagegen wesentlich größer als  $\Delta\omega_{MX}$ , so erhält man nur ein scharfes gemitteltes Signal (schneller Austausch). Sind  $k_{ex}$  und  $\Delta\omega_{MX}$  etwa gleich groß, ergibt sich ein stark verbreitertes gemitteltes Signal (intermediärer Austausch). Im Folgenden soll nur noch der in der vorliegenden Arbeit aufgetretene Fall schnellen Austausches betrachtet werden (für eine umfassende Beschreibung aller Austauschprozesse siehe: Bain, 2003). Für die chemische Verschiebung  $\delta$  des gemittelten Signals bei schnellem Austausch gilt:

$$\delta = P_M \cdot \delta_M + P_{MX} \cdot \delta_{MX} = (1 - P_{MX}) \cdot \delta_M + P_{MX} \cdot \delta_{MX} \quad (5)$$

wobei  $\delta_M$  und  $\delta_{MX}$  die chemischen Verschiebungen des freien Makromoleküls bzw. des Komplexes darstellen. Löst man Gleichung 3 nach  $c_{MX}$  auf, so ergibt sich zusammen mit Gleichungen 4b und 5 mit  $\Delta\delta = \delta - \delta_M$  und  $\Delta\delta_{MX} = \delta_{MX} - \delta_M$ :

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{MX} \cdot \frac{(c_M^{Total} + c_X^{Total} + K_D) - \sqrt{(c_M^{Total} + c_X^{Total} + K_D)^2 - 4 \cdot c_M^{Total} \cdot c_X^{Total}}}{2 \cdot c_M^{Total}} \quad (6)$$

$\Delta\delta$  stellt dabei die in den Spektren von M beobachtete, durch Zugabe von X induzierte Änderung der beobachteten chemischen Verschiebungen des Makromoleküls relativ zum Zustand ohne Liganden dar. Die Beobachtung dieser Änderung erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch Aufnahme einer Serie von  $^1\text{H}$ -1D- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC- bzw. -TROSY-Spektren mit ansteigenden Konzentrationen des Liganden X.

Aus den Spektren des HSQC-Typs wurde dabei auch ein gewichteter Mittelwert der Änderungen der chemischen Verschiebungen der Protonen ( $\Delta\delta^1\text{H}$ ) und der Stickstoffe ( $\Delta\delta^{15}\text{N}$ ) in folgender Form gebildet:

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \cdot (f_H |\Delta\delta^1\text{H}| + |\Delta\delta^{15}\text{N}|) \quad (7)$$

Dabei ist  $\Delta\delta$  die kombinierte chemische Verschiebungsänderung (in ppm) und  $f_H$  ein Wichtungsfaktor, der abhängig vom Aminosäuretyp die unterschiedlichen Varianzen der chemischen Verschiebungen der Protonen und der Stickstoffe ausgleicht. Zugrunde gelegt wurden dafür die in der Madison NMR-Datenbank (Seavey et al., 1991) beobachteten Varianzen dieser chemischen Verschiebungen. Die berechneten und anschließend verwendeten Wichtungsfaktoren sind im Anhang 7.5 zusammengefasst.

## 2.4 NMR-Diffusionsmessungen

Auch das Diffusionsverhalten von Makromolekülen in Lösung kann NMR-spektroskopisch untersucht werden. Der translationale Selbstdiffusionskoeffizient  $D$  eines kugelförmigen Partikels hängt bei gegebenen Lösungsbedingungen nach der Stokes-Einstein-Gleichung (Einstein, 1905) von seinem hydrodynamischen Radius  $R$  ab:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R} \quad (8)$$

Dabei ist  $k_B$  die Boltzmannkonstante,  $T$  die absolute Temperatur und  $\eta_0$  die Viskosität des Lösungsmittels. Messungen des Diffusionsverhaltens eines Partikels erlauben somit Rückschlüsse auf die Größe bzw. Form des Partikels.

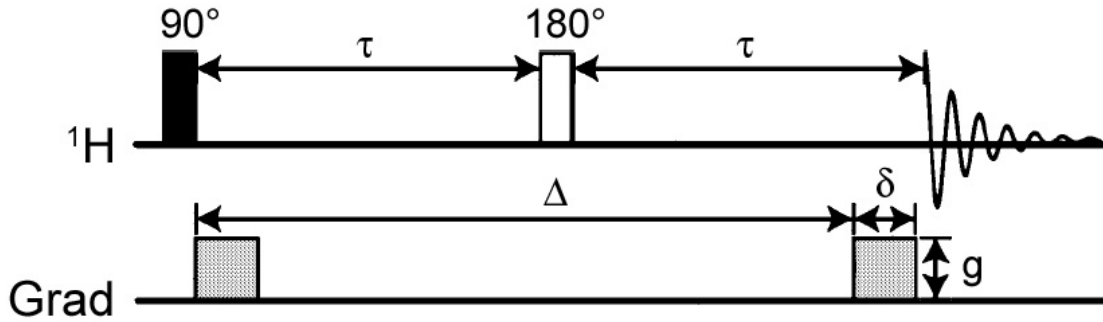


Abbildung 2.1: PFG-SE-Pulssequenz

Dargestellt sind die Pulse auf dem Protonen- und Gradientenkanal.  $\delta$  ist die Gradientendauer und  $g$  die Gradientenstärke.  $\Delta$  ist die Diffusionsdauer und  $\tau$  die Wartezeit für die Ausbildung des Spin-Echos. Abbildung modifiziert nach Loening (Loening et al., 2001).

Die NMR-spektroskopische Messung des Diffusionsverhaltens von Partikeln basiert auf dem Einsatz von Feldgradientenimpulsen (PFG), mit deren Hilfe ein Spin-Echo (SE) bzw. ein stimuliertes Echo (STE) erzeugt wird (Hahn, 1950). Alle heute für Diffusionsmessungen verwendeten Pulssequenzen basieren dabei auf den PFG-SE- bzw. PFG-STE-Pulssequenzen, die von Tanner und Mitarbeitern entwickelt wurden (Tanner, 1970; Stejskal und Tanner, 1965). Das Grundprinzip dieser Messungen soll am Pulsschema einer PFG-SE-Diffusionsmessung (siehe Abbildung 2.1) erläutert werden. Nach der Präparation des Systems durch einen anfänglichen  $90^\circ$ -Puls wird die transversale Magnetisierung durch einen Feldgradienten entlang des Gradienten dephasiert. Durch einen  $180^\circ$ -Puls nach einer Wartezeit  $\tau$  kommt es nach einer weiteren Wartezeit  $\tau$  zur Ausbildung eines Spin-Echos. Durch einen weiteren Feldgradienten wird dabei die durch den ersten Feldgradienten bewirkte Dephasierung für ortsfeste Partikel wieder aufgehoben. Bewegen sich die einzelnen Partikel jedoch während der beiden Wartezeiten entlang des Feldgradienten, so kann die Rephasierung nicht mehr vollständig erfolgen. Es kommt daher zu einem Intensitätsverlust des betreffenden Signals, der umso größer ist, je weiter sich der Partikel von seiner ursprünglichen Position entlang des Gradienten entfernt hat. Durch Auswertung des Intensitätsverlusts der Signale eines Makromoleküls kann damit sein Diffusionsverhalten analysiert werden. Für den Intensitätsverlust gilt dabei:

$$\frac{I}{I_0} = \exp\left(-D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right) \quad \text{bzw.} \quad \ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) \quad (9a \text{ bzw. } 9b)$$

Dabei ist  $I$  die Signalintensität,  $I_0$  die anfängliche Signalintensität ohne Gradient,  $\gamma$  die gyromagnetische Konstante,  $g$  die Gradientenstärke,  $\delta$  die Gradientendauer und  $\Delta$  die

Diffusionszeit (siehe Abbildung 2.1). Im Rahmen einer Diffusionsmessreihe wird üblicherweise die Gradientenstärke  $g$  variiert, während die übrigen Parameter konstant gehalten werden. Bei Auftragung des logarithmierten Intensitätsabfalls gegen das Quadrat der Gradientenstärke ergibt sich somit eine Gerade, deren Steigung proportional zu  $D$  ist. Den Diffusionskoeffizienten eines Proteins kann man damit durch Vergleich mit Standardproteinen abschätzen, da sich die erhaltenen Steigungen  $S$  wie die Diffusionskoeffizienten verhalten. Unter Annahme kugelförmiger Partikel gleicher Dichte lässt sich damit auch das Molekulargewicht  $M$  des diffundierenden Proteins wie folgt abschätzen:

$$M_1 = \left( \frac{S_2}{S_1} \right)^3 \cdot M_2 \quad \text{wobei} \quad S = \frac{d \ln \left( \frac{I}{I_0} \right)}{dg^2} \quad (10)$$

Zur Durchführung von NMR-Diffusionsmessungen existieren heute eine Reihe weiter entwickelter Pulssequenzen (Johnson Jr., 1999; Pelta et al., 1998). Dabei wird mit verschiedenen Strategien einerseits die Minimierung von durch transversale Relaxation auftretenden Signalverlusten angestrebt, sowie andererseits die Minimierung von sog. Eddy-Strömen, die durch das schnelle Schalten der Gradientenpulse in der Probe induziert werden und so Störungen des Spektrums verursachen. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei ausschließlich Messungen auf Basis von stimulierten Echos unter Verwendung von bipolaren Feldgradientenimpulsen verwendet (BPPSTE: Pelta et al., 1998; Wu et al., 1995a).

## **2.5 Phospholipid-Bizellen als Modellmembranen**

Untersuchungen zur Wechselwirkung von Proteinen und Peptiden mit Membranen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in Lösung sind im Allgemeinen mit einigen experimentellen Schwierigkeiten behaftet. So sind Lipide meist nur in sehr geringen Konzentrationen in wässrigen Proben löslich bzw. sie bilden aus Membranen aufgebaute Vesikel, die wegen ihrer Größe und den damit verbundenen hohen Linienbreiten nur schlecht NMR-spektroskopisch zugänglich sind. Daher wurden viele bisherige NMR-Studien zur Wechselwirkung von Proteinen und Lipiden mit Hilfe von Mizellen wie z. B. SDS-Mizellen untersucht, so auch das in dieser Arbeit untersuchte  $\beta$ -amyloide Protein (Mandal und Pettegrew, 2004; Shao et al., 1999; Coles et al., 1998). Mizellen sind zwar klein genug, um sie noch gut NMR-spektroskopisch untersuchen zu können, besitzen jedoch völlig anders als

physiologische Membranen eine stark gekrümmte Oberfläche. Dies kann im Vergleich zu den Bedingungen in einer Membran Artefakte hervorrufen, z. B. dass in den in die Mizellen integrierten Peptiden eine Krümmung induziert wird (Chou et al., 2002; Vold et al., 1997). Andererseits sind größere integrale Membranproteine in solchen Mizellen oft auch nicht ausreichend stabil (Sanders und Prosser, 1998). Daher sind Lipidsysteme erstrebenswert, die den untersuchten Proteinen eine membranähnlichere Umgebung zur Verfügung stellen, aber dennoch gut NMR-spektroskopisch untersucht werden können.

Ein solches System stellen sog. Phospholipid-Bizellen dar (Prosser et al., 2006; Katsaras et al., 2005; Marcotte und Auger, 2005; Whiles et al., 2002; Sanders und Prosser, 1998). Dabei handelt es sich um Dispersionen von Phospholipiden, die kurzkettige Phospholipide, üblicherweise Dihexanoylphosphatidylcholin (DHPC), und langkettige Phospholipide, üblicherweise Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC, siehe Abbildung 2.2), enthalten. Solche Dispersionen besitzen komplexe Phasendiagramme bei denen zahlreiche Phasenübergänge in Abhängigkeit von z. B. Temperatur, Lipidkonzentration und dem Verhältnis der beiden Lipidarten zueinander auftreten (Harroun et al., 2005). Das molare Verhältnis der beiden Lipidarten wird dabei üblicherweise mit  $q$  abgekürzt:

$$q = \frac{c_{\text{langkettig}}}{c_{\text{kurzkettig}}} \quad \text{üblicherweise} \quad q = \frac{c_{\text{DMPC}}}{c_{\text{DHPC}}} \quad (11)$$

wobei  $c_{\text{langkettig}}$  und  $c_{\text{kurzkettig}}$  die molaren Gesamtkonzentrationen von langkettigen bzw. kurzkettigen Phospholipiden darstellen. Solche Dispersionen bilden sog. „Bizellen“ aus. Dabei handelt es sich um scheibenförmige Mizellen, die aus einer flachen Zentralregion bestehen, die einer Lipiddoppelmembran entspricht und vor allem langkettiges Lipid enthält, und einem gekrümmten Rand, der vor allem aus kurzkettigem Lipid besteht und der den zentralen Teil gegen das Lösungsmittel abgrenzt (siehe Abbildung 2.2). Während die Gültigkeit dieser Morphologie für Mischungen mit höheren  $q$ -Verhältnissen und/oder höheren Temperaturen derzeit noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion ist, ist diese Morphologie für kleine  $q$ -Werte ( $q < 2$ ) und niedrige Temperaturen ( $T < 283 \text{ K}$ ) inzwischen generell akzeptiert (Nieh et al., 2005; Harroun et al., 2005; Triba et al., 2005; Glover et al., 2001; Luchette et al., 2001; Gaemers und Bax, 2001; Nieh et al., 2001).

Nach der anfänglichen Untersuchung solcher Lipid-Dispersionen durch die Gruppe von Mary Roberts (siehe u. a.: Gabriel und Roberts, 1984) stieß das System zunächst auf reges Interesse wegen seiner Fähigkeit, sich in Magnetfeldern auszurichten (Sanders und

Schwonek, 1992). Phospholipid-Bizellen mit höheren  $q$ -Werten (typisch  $q \geq 3$ ) richten sich bei erhöhten Temperaturen (typisch  $35^\circ\text{C} - 40^\circ\text{C}$ ) in Magnetfeldern so aus, dass die zentrale Lipiddoppelmembran der Bizellen parallel zur  $z$ -Achse des Magnetfelds orientiert ist. Diese Eigenschaft lässt sich einerseits zur Untersuchung von Membranproteinen mit Hilfe von Festkörper-NMR-Studien ausnutzen (Triba et al., 2006b; De Angelis et al., 2004; Sanders und Landis, 1995). Andererseits ermöglichen Lösungen

orientierter Bizellen die Messung von Restdipolkopplungen bei NMR-Untersuchungen in Lösung, weil die orientierten Bizellen die isotrope Rotation von gelösten Makromolekülen zwischen den Bizellen einschränken (Bax, 2003; Tjandra und Bax, 1997).

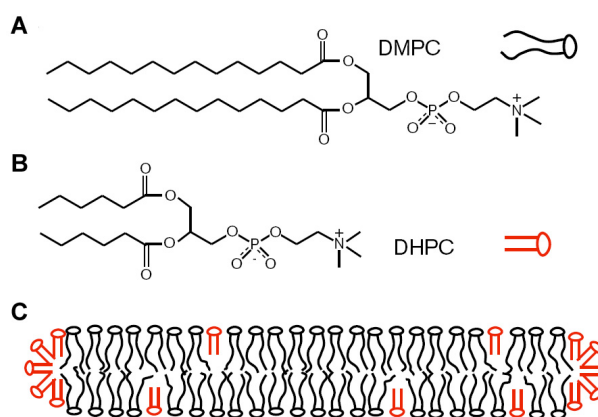


Abbildung 2.2: Phospholipid-Bizellen  
A und B: Strukturen der beiden oft verwendeten Lipide DMPC bzw. DHPC.  
C: Querschnitt einer Bizelle  
Abbildung modifiziert nach Sanders (Sanders und Prosser, 1998).

Im letzten Jahrzehnt ist jedoch klar geworden, dass sich das System der Phospholipid-Bizellen auch sehr gut zur Untersuchung der Wechselwirkung von Peptiden mit Membranen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in Lösung eignet (Prosser et al., 2006; Marcotte und Auger, 2005; Glover et al., 2001; Luchette et al., 2001; Vold et al., 1997). Die dazu verwendeten Lipidmischungen entsprechen grundsätzlich denen für die oben beschriebenen Anwendungen, jedoch werden Mischungen mit kleineren  $q$ -Werten verwendet ( $0,1 \leq q \leq 1,0$ ). Durch den Überschuss des kurzkettigen Phospholipids in diesen Mischungen sind die gebildeten Bizellen kleiner als bei höheren  $q$ -Werten. Der Durchmesser von Bizellen mit  $q = 0,5$  beträgt dabei um die 10 nm (Andersson und Mäler, 2006; Whiles et al., 2002; Luchette et al., 2001). Daher reorientieren diese Bizellen sich so schnell in Lösung, dass strukturelle Studien an in die Bizellen eingebaute oder daran gebundene Peptide mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Messungen in Lösung möglich werden. Daher werden solche Bizell-Präparationen als „schnell rotierend“ (*fast-tumbling*) bezeichnet oder auch als „isotrop“, weil eine Orientierung im Magnetfeld nicht mehr auftritt (Triba et al., 2005; Opella und Marassi, 2004; Sanders et al., 1994; Sanders und Schwonek, 1992). Mit Hilfe solcher kleinen Bizellen konnten bereits zahlreiche erfolgreiche strukturelle NMR-Studien v. a. an verschiedenen Peptiden durchgeführt werden (siehe dazu u. a.: Chandrasekhar et al., 2006; Prosser et al., 2006; Dhanasekaran et al., 2005; Marcotte et al., 2004; Chou et al., 2002; Andersson und

Mäler, 2002), sie sind jedoch auch für den Einsatz mit anderen Messmethoden wie der CD-Spektroskopie geeignet (siehe z. B.: Lührs et al., 2006).

Beim praktischen Einsatz solcher kleinen Bizellen für die Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen und Membranen muss neben der Stabilität des Proteins in Anwesenheit der Lipide auch auf eine kritische Mindestkonzentration an Lipiden und auf den pH-Wert der Proben geachtet werden. Da immer ein kleiner Anteil des DHPCs monomer in Lösung vorliegt (etwa 5 - 7 mM), nimmt mit zunehmender Verdünnung der für die Bizellen verfügbare Anteil an DHPC ab (van Dam et al., 2004; Glover et al., 2001; Struppe und Vold, 1998). Daher nimmt der Radius der Bizellen bei starker Verdünnung zu. Für Bizellen mit  $q = 0,5$  ist deswegen eine Mindestkonzentration an Lipiden von 130 mM (5% w/w) nötig (Glover et al., 2001). Der pH-Wert der Proben sollte in allen Fällen stabil im Bereich zwischen pH 6,5 und 7,0 bleiben, da die Esterbindungen der Lipide außerhalb dieses Bereichs zu schnell hydrolysiert werden (Ottiger und Bax, 1998; Grit und Crommelin, 1993). Dies kann durch den Einsatz von Phospholipid-Analoga mit Etherbindungen vermieden werden (Ottiger und Bax, 1999), was jedoch mit stark erhöhten Kosten verbunden ist. In der vorliegenden Arbeit kamen daher ausschließlich reguläre Phospholipide zum Einsatz.



# **3 Das $\beta$ -amyloide Protein und seine Wechselwirkung mit Membranlipiden**

## **3.1 Einleitung**

Die Alzheimer-Krankheit (AD) gehört zu den häufigsten und schwersten Formen von Demenzerkrankungen im Alter. Sie führt bei den betroffenen Patienten zu einem langsam voranschreitenden Verlust von Gedächtnis, Urteilsvermögen und klarem Denken bis hin zur völligen Persönlichkeitsveränderung. Weltweit sind bereits etwa 15 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen und aufgrund der ansteigenden mittleren Lebenserwartung wird sich diese Zahl in Zukunft auch noch weiter erhöhen. Die Krankheit wurde zwar bereits 1907 zum ersten Mal beschrieben (Alzheimer, 1907) und wird seitdem wegen ihrer hohen Bedeutung v. a. für die Industriestaaten intensiv erforscht. Dennoch konnten die molekularen Ursachen der Krankheit bei weitem noch nicht vollständig aufgeklärt werden, u. a. bedingt durch den komplexen und gleichzeitig extrem langsamen Krankheitsverlauf. Daher befinden sich sowohl effektive Therapieansätze als auch diagnostische Methoden für die Krankheit noch in der Entwicklungsphase (zur Übersicht siehe: Blennow et al., 2006). Es besteht also immer noch immenser Forschungsbedarf, um der Krankheit Einhalt gebieten zu können.

Im Gehirn der Alzheimer-Patienten finden sich neben einem beträchtlichen Verlust von Gehirnzellen einerseits sog. amyloide Plaques zwischen den Nervenzellen, d. h. fibrilläre Ablagerungen des  $\beta$ -amyloiden Proteins A $\beta$  (Glennner und Wong, 1984). Um diese Plaques herum sind lokale Entzündungsprozesse erkennbar und die Neuronen sind deformiert. Später in der Pathogenese der Krankheit finden sich andererseits auch sog. neurofibrilläre Bündel (NFT) in den Zellen, wobei es sich um Fasern des sog. Tau-Proteins handelt. Aufgrund zahlreicher experimenteller Befunde geht man in der inzwischen weitestgehend akzeptierten „amyloiden Hypothese“ davon aus, dass dabei das A $\beta$ -Protein am Anfang der Ursachenkette in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit steht, während die Tau-Ablagerungen einen sekundären Prozess darstellen (Tanzi und Bertram, 2005; Hardy und Selkoe, 2002). Der genaue molekulare Ablauf der einzelnen Schritte von der Bildung von A $\beta$  bis zum Ausbruch der Krankheit ist aber noch unklar.

## Die Prozessierung des $\beta$ -amyloiden Vorläuferproteins

A $\beta$  entsteht in den Neuronen durch die proteolytische Spaltung des sog.  $\beta$ -amyloiden Vorläuferproteins ( $\beta$ APP) durch die sog. Secretasen (Selkoe, 2001). Weder die physiologische Funktion von  $\beta$ APP selbst noch der einzelnen dabei entstehenden Spaltstücke konnte bisher zweifelsfrei geklärt werden (zur Übersicht über mögliche Funktionen siehe: Zheng und Koo, 2006; Reinhard et al., 2005).  $\beta$ APP ist ein 695 bis 770 Aminosäuren großes integrales Membranprotein mit einer einzelnen Transmembrandomäne, die auch einen Teil der A $\beta$ -Sequenz enthält (siehe Abbildung 3.1). Bei der Spaltung von  $\beta$ APP durch die  $\alpha$ -Secretase entstehen nur nicht toxische Proteinfragmente (sog. sAPP $\alpha$  und C83). Diese Variante stellt den Hauptweg der Prozessierung von  $\beta$ APP dar. Wird  $\beta$ APP

jedoch zunächst durch die  $\beta$ - und anschließend durch die  $\gamma$ -Secretase gespalten, entsteht das A $\beta$ -Peptid (neben sog. sAPP $\beta$  und AICD). Die Prozessierung durch die  $\gamma$ -Secretase ist dabei nicht vollkommen sequenzspezifisch, so dass A $\beta$  in mehreren unterschiedlich langen Isoformen vorkommt. Die beiden Hauptformen sind das 40 Aminosäuren lange, weniger toxische, aber überwiegend gebildete A $\beta_{40}$  und das 42 Aminosäuren lange, stärker toxische A $\beta_{42}$ . Bei der funktionellen  $\gamma$ -Secretase handelt es sich um einen Komplex aus mehreren Proteinen (Wolfe, 2006; Edbauer et al., 2003). Besonders wichtig für das A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$ -Verhältnis sind dabei zwei Membranproteine, die sog. Preseniline PS1 und PS2. Mutationen in den beteiligten

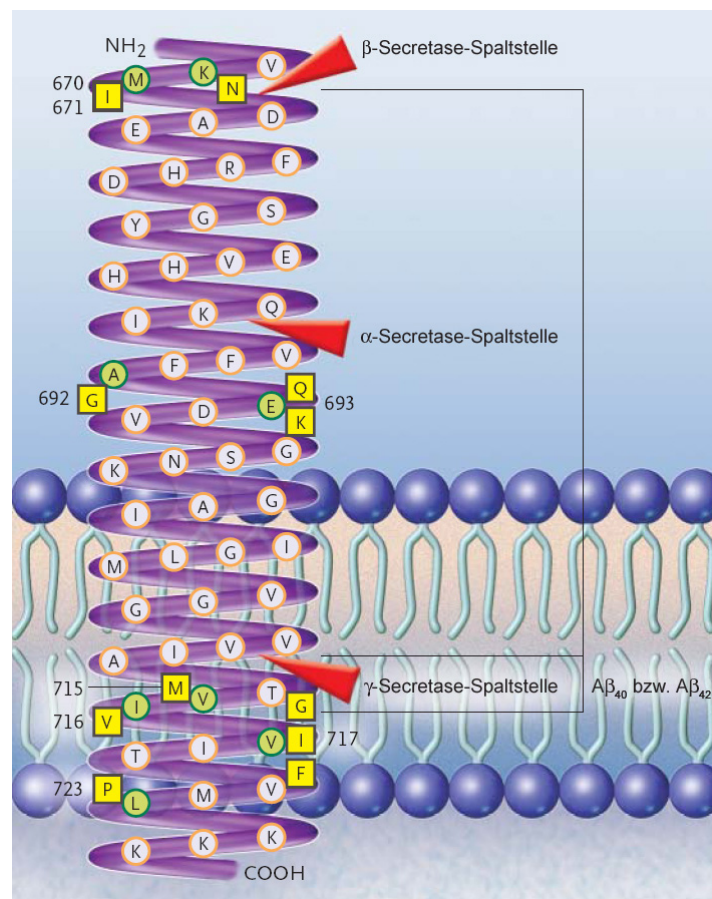


Abbildung 3.1:  
Schematische Darstellung der Transmembranregion und A $\beta$ -Sequenz von  $\beta$ APP. Die Secretase-Spaltstellen sind in Rot dargestellt. Sequenzpositionen mit bekannten Mutationen sind gekennzeichnet (Nummerierung bezogen auf  $\beta$ APP770). Dabei ist der Wildtyp in Grün dargestellt und die Mutationen in Gelb. Die Mutationen führen i. d. R. zur vermehrten Bildung von A $\beta_{42}$ . Abbildung modifiziert nach Nussbaum (Nussbaum und Ellis, 2003)

Genen, die jeweils eine verstärkte Produktion des toxischen  $A\beta_{42}$  bewirken, führen zu den erblichen, früh im Leben auftretenden Varianten von Morbus Alzheimer. Solche Mutationen konnten bisher in  $\beta$ APP, in PS1 und PS2 identifiziert werden (siehe auch Abbildung 3.1). Im Laufe der komplexen Entwicklung der Krankheit haben noch eine Vielzahl weiterer Moleküle Einfluss auf die Bildung, die Aggregation und die Beseitigung von  $A\beta$ , von denen einige als weitere genetische Risikofaktoren für die Krankheit diskutiert werden. Bisher konnte das neben den Genen von  $\beta$ APP, PS1 und PS2 nur für ein weiteres Gen zweifelsfrei bewiesen werden, dem Gen des Apolipoproteins ApoE (Tanzi und Bertram, 2005).

## **Erkenntnisse zur Pathogenese**

$A\beta$  entsteht zunächst in monomerer Form in der Zellmembran der Neuronen. Die gebildeten Peptide sammeln sich anschließend einerseits im Zytoplasma der Neuronen (Billings et al., 2005; Wirths et al., 2004), zum überwiegenden Teil jedoch extrazellulär an. Die ursprünglich löslichen  $A\beta$ -Peptide oligomerisieren und bilden schließlich die für die Alzheimer-Krankheit typischen Fibrillen der amyloiden Plaques. Inzwischen geht man dabei davon aus, dass nicht die Fibrillen selbst, sondern lösliche Oligomere die am stärksten toxische Spezies von  $A\beta$  darstellen (Cleary et al., 2005; Klein et al., 2004). Diese Oligomere sollen in einem ersten kritischen Schritt der Krankheit die synaptischen Transmission zwischen den Neuronen behindern (Walsh und Selkoe, 2004; Selkoe, 2002). Darüber hinaus gibt es aber noch zahlreiche andere Erklärungsansätze für die Toxizität von  $A\beta$  und die molekularen Ursachen der Erkrankung. Diese beschäftigen sich u. a. mit Defekten in axonalen Transportmechanismen (Stokin und Goldstein, 2006), einer Störung des Metallionenhaushalts (Gaggelli et al., 2006; Maynard et al., 2005), der Auslösung von oxidativem Stress (Andersen, 2004; Varadarajan et al., 2000) insbesondere in den Mitochondrien (Eckert et al., 2003), der Aktivierung von neuronalen Rezeptoren und der Auslösung von apoptotischen Signaltransduktionswegen (Verdier et al., 2004; Kawasumi et al., 2002), der Bildung von Transmembranporen (Quist et al., 2005; Kagan et al., 2002), der Störung von zellulären Entsorgungsmechanismen (Klionsky, 2006; de Vrij et al., 2004) oder Störungen im Lipidstoffwechsel (siehe unten; Lukiw et al., 2005). Letztlich stellen all diese beobachteten Phänomene wohl nur einzelne Stationen in der Entwicklung der Krankheit dar, ihre ursächliche Reihenfolge ist jedoch noch ungeklärt. Neben den durch  $A\beta$  verursachten Störungen kommt es in späteren Stadien der Erkrankung durch veränderte Kinase- und Phosphataseaktivitäten auch zur Bildung der intrazellulären Tau-Ablagerungen, die zu einem weiteren Absterben von Neuronen und damit zu den schließlich immer stärker auftretenden Demenzsymptomen beitragen (Selkoe, 2002).

## Strukturelle Untersuchungen an A $\beta$

Unabhängig vom genauen molekularen Ablauf der einzelnen Stationen der Alzheimerschen Erkrankung steht nach der amyloiden Hypothese doch immer die Aggregation von A $\beta$  ursächlich am Anfang dieser Ereigniskette. Damit kommt der biophysikalischen Aufklärung dieses Aggregationsprozesses eine zentrale Bedeutung bei der Erforschung der Krankheit zu. Es gibt daher bereits auch eine Vielzahl von strukturellen Studien zur Struktur von A $\beta$  in seinen verschiedenen Aggregationszuständen (zur Übersicht siehe: Morgan et al., 2004; Serpell, 2000). Dabei gestaltet sich speziell die Untersuchung der Fibrillen wegen ihrer Unlöslichkeit schwierig (Temussi et al., 2003). In den letzten Jahren konnten jedoch insbesondere mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie deutliche Fortschritte gemacht werden und Strukturmodelle für die Fibrillen von A $\beta_{40}$  (Petkova et al., 2002) und A $\beta_{42}$  (Lührs et al., 2005) ermittelt werden (siehe Abbildung 3.2 C). Die Peptide sind in den Fibrillen grundsätzlich in parallelen  $\beta$ -Faltblättern angeordnet, jedoch ist die genaue Quartärstruktur noch unklar (Petkova et al., 2006), die offenbar auch von den Präparationsbedingungen abhängt (Petkova et al., 2005). Der N-Terminus des Peptids ist in den Strukturmodellen jeweils ungefaltet. Frei in Lösung dagegen scheinen die Peptide tendenziell eher eine helikale Konformation anzunehmen

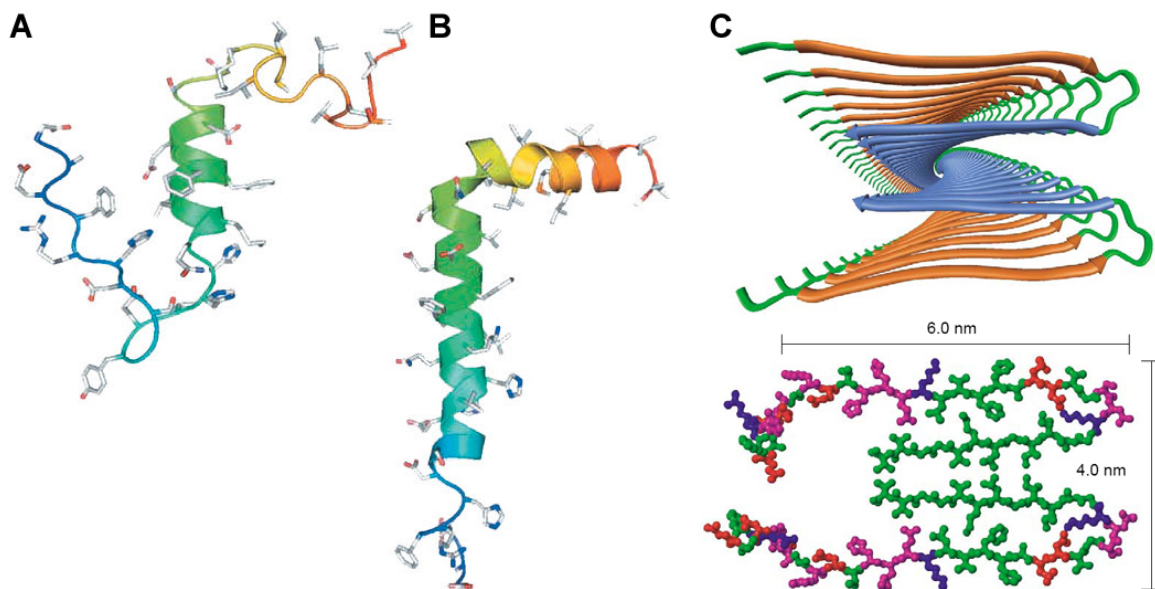


Abbildung 3.2: Strukturen von A $\beta$

A: Lösungs-NMR-Struktur von 1 mM A $\beta_{40}$  in 100 mM SDS-Lösung (Watson et al., 1998)

B: Lösungs-NMR-Struktur von 2 mM A $\beta_{42}$  in 80% (v/v) Hexafluorisopropanol (Crescenzi et al., 2002)

C: Modell einer A $\beta_{40}$ -Fibrille, basierend auf Festkörper-NMR-Daten (Petkova et al., 2002). Oben Bänderdarstellung, unten atomare Darstellung. Die Reste 1-9 sind ungefaltet und nicht dargestellt.

Abbildung modifiziert nach Bossy-Wetzel (Bossy-Wetzel et al., 2004) und Tycko (Tycko, 2004).

(siehe Abbildung 3.2 A und B), anscheinend ist die genaue Konformation aber stark von den verwendeten Lösungsbedingungen abhängig. Während sich das Peptid bei NMR-Messungen in rein wässriger Lösung weitgehend ungefaltet mit einer nur teilweisen Strukturierung zeigte (Danielsson et al., 2006; Hou et al., 2004; Riek et al., 2001), konnten durch organische Zusätze unterschiedlich lange helikale Segmente stabilisiert werden (Crescenzi et al., 2002; Janek et al., 2001; Watson et al., 1998; Coles et al., 1998; Sticht et al., 1995). Daher geht man davon aus, dass die Sequenz auch als Teil von  $\beta$ APP vor der Prozessierung eingebettet in die Membran eine  $\alpha$ -helikale Konformation annimmt (Temussi et al., 2003).

Bei der Aggregation des A $\beta$ -Peptids kommt es daher zu einer Umfaltung von einer „nativen“  $\alpha$ -helikalen zu einer alternativen  $\beta$ -Strang-Konformation (Gross, 2000). Dieser Umfaltungsprozess stellt einen zentralen Schritt in der Entwicklung der Alzheimerschen Krankheit dar, ist aber noch wenig verstanden. Die Krankheit gehört damit zu den auf Proteinefehlfaltung beruhenden neurodegenerativen Krankheiten, zu denen zum Beispiel auch die Parkinsonsche Krankheit oder die TSE-Krankheiten gehören (Chiti und Dobson, 2006; Chaudhuri und Paul, 2006). Die Aufklärung der Mechanismen des Umfaltungsprozesses ist daher für das Verständnis der Alzheimerschen Krankheit und die Entwicklung neuer Therapieansätze essentiell.

## **Die Bedeutung von Lipiden**

Bereits seit langem ist bekannt, dass Lipide maßgeblich an der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit beteiligt sind. Dabei nimmt insbesondere das Steroid Cholesterin eine zentrale Rolle ein (Shobab et al., 2005; Hartmann, 2005). So ist bereits seit langem bekannt, dass das  $\epsilon$ 4-Allel des Gens des Apolipoproteins ApoE einen Risikofaktor für die Krankheit darstellt (Mahley et al., 2006). Bei ApoE handelt es sich um das Haupttransportmolekül für Cholesterin und andere Lipide im Zentralen Nervensystem. Darüber hinaus wird darüber diskutiert, dass hohe Cholesterinkonzentrationen im Blut ebenfalls einen Risikofaktor darstellen (Kivipelto und Solomon, 2006), weswegen cholesterinsenkende Medikamente als Therapie getestet werden (Sjogren et al., 2006). Außerdem ist Cholesterin auch direkt in den amyloiden Plaques von Alzheimer-Patienten angereichert (Mori et al., 2001).

Weiterhin ist auch die Prozessierung von  $\beta$ APP lipidabhängig, da die Aktivität der Secretasen von der Zusammensetzung der umgebenden Membran abhängig ist. In

speziellen Membrankompartimenten, den sog. Membranmikrodomänen (*lipid rafts*), findet bevorzugt eine zur Bildung von A $\beta$  führende Prozessierung statt (Hooper, 2005; Eehalt et al., 2003). Bei Membranmikrodomänen handelt es sich um Mikrostrukturierungen der Membran, die etwa zehn nm groß sind (Pencer et al., 2005), besonders reich an Cholesterin und Sphingolipiden sind und einen höheren Ordnungsgrad aufweisen als die umgebende Phospholipidmembran (Simons und Vaz, 2004; Simons und Eehalt, 2002). Durch die unterschiedliche bevorzugte Lokalisation und Aktivität der einzelnen Secretasen innerhalb bzw. außerhalb der Membranmikrodomänen (Urano et al., 2005; Eehalt et al., 2003) kommt es zur verstärkten Bildung von A $\beta$  in den Membranmikrodomänen. Umgekehrt konnte inzwischen auch gezeigt werden, dass das gebildete A $\beta$  wiederum die Synthese der für diese Domänen typischen Lipide Cholesterin und Sphingomyelin steuert (Grimm et al., 2005).

Insbesondere gibt es aber inzwischen auch zunehmend Hinweise, dass die für Membranmikrodomänen typischen Lipide direkt an A $\beta$  binden und so die Oligomerisierung und Fibrillogenese der A $\beta$ -Peptide einleiten (Kim et al., 2006; Yanagisawa, 2005a; Yanagisawa, 2005b; Kawarabayashi et al., 2004; Kakio et al., 2001; Mizuno et al., 1999; Choo-Smith et al., 1997). Das bedeutet, dass die Lipide direkt an dem molekularen Umfaltungsprozess von A $\beta$  beteiligt sind, der die Entwicklung der Alzheimerschen Erkrankung einleitet. Damit kommt der strukturellen Untersuchung der dabei stattfindenden Wechselwirkung zwischen A $\beta$  und den Lipiden eine zentrale Bedeutung bei der Aufklärung der molekularen Ursachen der Erkrankung zu.

## **Zielsetzung der Arbeit**

Um den Mechanismus der Umfaltung des A $\beta$ -Peptids besser zu verstehen, sollten in dieser Arbeit NMR-Messungen an A $\beta$ -Peptiden durchgeführt werden und dabei der Einfluss von Lipiden, insbesondere den für Membranmikrodomänen typischen, auf die Konformation von A $\beta$  untersucht werden. Dazu musste zunächst die sequentielle Zuordnung von A $\beta$  durchgeführt werden. Diese ermöglicht es, anschließend Studien zur Wechselwirkung mit den Lipiden durchzuführen. Dazu mussten auch Messungen an isolierten Lipidsystemen durchgeführt werden, um geeignete Bedingungen für die Interaktionsstudien mit A $\beta$  zu finden.

## **3.2 Materialien und Methoden**

### **3.2.1 Probenpräparation und -zusammensetzung**

#### **Materialien**

Eine erste chemisch synthetisierte, nicht isotopenmarkierte Probe von  $A\beta_{42}$  wurde freundlicherweise von Prof. Botond Penke von der Universität Szeged (Ungarn) zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Proteinproben von  $A\beta_{40}$  wurden von der Firma rPeptide (Bogard, Georgia, USA) bezogen. Diese waren nicht isotopenmarkiert bzw.  $^{15}\text{N}$ -markiert und wurden mittels rekombinanter Expression in *E. coli* hergestellt. Die Sequenzen von  $A\beta_{40}$  bzw.  $A\beta_{42}$  (siehe Anhang 7.2) entsprechen dabei den Resten 672 bis 711 bzw. 713 von  $\beta\text{APP770}$  (Swiss-Prot Eintrag P05067).

Die Phospholipide DAPC, DCPC, DHPC, DMPC, DMlePC, DPPC und DSPC wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA) bezogen. Cholesterin, Cholesterinethylether und DTPA stammen von Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA). EDTA-d16 und Tris-d11 wurden erhalten von Cambridge Isotope Laboratories (Andover, Massachusetts, USA).

#### **Probenpräparation**

Sofern nicht anders angegeben wurden die lyophilisierten  $A\beta$ -Peptide in 10 mM NaOH aufgenommen, je nach Säuregehalt der Lyophilisate auch in höher konzentrierten NaOH Lösungen. Anschließend wurde die Suspension ca. eine Minute im Ultraschallbad inkubiert, bis das Peptid gelöst war. Abschließend wurden die Pufferstammlösung (typisch 1M Tris-d11 HCl pH 7.3) sowie Stammlösungen übriger Komponenten zugegeben und der pH-Wert mit HCl auf den gewünschten Wert eingestellt. Bei der gesamten Präparation muss ein auch nur vorübergehendes Abfallen des pH-Werts unter pH 7,0 strikt vermieden werden.

Für die Präparation der Bizell-Proben wurden die langkettigen Phospholipide in ein Eppendorf-Probengefäß eingewogen. Sofern Cholesterin enthalten war, wurde dieses je nach benötigter Menge ebenfalls mit eingewogen bzw. in Form einer 40 mM Stammlösung in Ethanol zugegeben und das Lösungsmittel mittels Lyophilisation entfernt. Anschließend

wurde das kurzkettige Phospholipid in Form einer 1 M Stammlösung zugegeben. Nach Zugabe der übrigen Komponenten wurde die Suspension so lange bei wechselnden Temperaturen bewegt, bis sich alles vollständig gelöst hatte. Bei den Proben mit längeren Phospholipiden war dabei auch eine stärkere Erwärmung der Proben notwendig. Abschließend wurde der pH-Wert der Proben kontrolliert.

Für die Präparation der Probe mit Bizellen und A $\beta$  wurden die Bizell- und die A $\beta$ -Lösung zunächst getrennt wie oben beschrieben hergestellt, jedoch mit jeweils dem halben finalen Lösungsvolumen und damit verdoppelten Lipid- bzw. Peptidkonzentrationen. Bei der Präparation der A $\beta$ -Lösung war dann eine höher konzentrierte NaOH Lösung notwendig, um ein Abfallen des pH-Werts unter pH 7,0 sicher zu unterbinden. Abschließend wurde die Bizell-Lösung mit der A $\beta$ -Lösung überschichtet und vorsichtig mit Hilfe einer Pipette durchmischt.

## **Probenzusammensetzungen**

Die NMR-Proben für die sequentielle Zuordnung von A $\beta_{40}$  und die Titrationsmessungen an A $\beta_{40}$  enthielten jeweils 20 mM Tris-d11 HCl pH=7,2, 1 mM EDTA-d16 und 0,1 mM DSS in 92% H<sub>2</sub>O / 8% D<sub>2</sub>O. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0,45 mM unter Verwendung von <sup>15</sup>N-angereichertem A $\beta_{40}$ .

Die Proben der Lipid-Bizellen enthielten jeweils 40 mM Tris-d11 HCl pH=7,0 in 92% H<sub>2</sub>O / 8% D<sub>2</sub>O. Die Gesamtlipidkonzentration betrug jeweils 150 mM bei einem q-Faktor von 0,5 (siehe Kapitel 2.5). Das entspricht einer Konzentration von 100 mM des kurzkettigen Phospholipids und 50 mM der langkettigen Lipide. Als kurzkettige Phospholipide kamen dabei DHPC und DCPC zum Einsatz. Als langkettige Lipide wurden DAPC, DMPC, DMlePC, DPPC, DSPC und Cholesterin verwendet. Die genaue Lipidzusammensetzung und die Konzentrationsverhältnisse sind jeweils bei den entsprechenden Ergebnissen in Kapitel 3.3 mit angegeben.

Die Probe mit A $\beta_{40}$  und Lipid-Bizellen enthielt 40 mM Tris-d11 HCl pH=7,0 und 1 mM EDTA-d16 in 92% H<sub>2</sub>O / 8% D<sub>2</sub>O. Die Gesamtlipidkonzentration betrug wie bei den reinen Lipidproben 150 mM bei einem q-Faktor von 0,5. Dabei wurden jeweils DHPC (100 mM) und DMPC (50 mM) verwendet. Die Proteinkonzentration betrug 0,23 mM unter Verwendung von nicht isotopeangereichertem A $\beta_{40}$ .



### **3.2.2 NMR-Messungen**

Sämtliche NMR-Messungen an A $\beta$ - und A $\beta$ -Lipid-Proben wurden an 600 MHz und 800 MHz Bruker Avance Spektrometern mit TXI- bzw. TCI-Kryoprobenköpfen (anfänglich noch mit QXI-Probenkopf) bei 278 K durchgeführt. Messungen an Bizell-Proben bzw. A $\beta_{40}$ -Bizell-Proben wurden an denselben Geräten bei 293 K bzw. 278 K durchgeführt.  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen wurden an einem 500 MHz Bruker Avance Spektrometer mit QXI-Probenkopf bei 293 K durchgeführt. Alle Temperaturen wurden dabei mit Hilfe einer Ethylenglykol-Probe kalibriert (Raiford et al., 1979).

Die chemischen Verschiebungen von Protonen wurden in der Regel auf internes DSS referenziert. Im Fall von lipidhaltigen Proben wurde diese Referenzierung wegen der Wechselwirkung von DSS mit den Lipiden nur indirekt durchgeführt. Dazu wurden das Signal (1,9 ppm) einer immer in den Proben vorhandenen niedermolekularen Verunreinigung, bei der es sich um Azetat handeln könnte (Gottlieb et al., 1997), sowie Parallelmessungen an Proben mit identischen Lösungsbedingungen ohne Lipide verwendet. Die  $^{15}\text{N}$  bzw.  $^{31}\text{P}$  chemischen Verschiebungen wurden unter Verwendung der Umrechnungsfaktoren von Wishart und Mitarbeitern (Wishart et al., 1995b) bzw. Maurer und Kalbitzer (Maurer und Kalbitzer, 1996) indirekt auf DSS referenziert. Alle Spektren wurden mit Hilfe der Softwarepakete XWINNMR bzw. Topspin (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen und prozessiert. Die weitere Analyse der Spektren erfolgte mit Hilfe des Softwarepakets AUREMOL (Gronwald und Kalbitzer, 2004).

### **Sequentielle Zuordnung von A $\beta_{40}$**

Zur sequentiellen Zuordnung von A $\beta_{40}$  wurden 2D-TOCSY- (Mischzeit 55 ms), 2D-NOESY- (Mischzeit 200 ms),  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC- bzw. -TROSY-,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TOCSY-TROSY- (Mischzeit 55 ms) und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOESY-TROSY-Spektren (Mischzeit 200 ms) bei einer Protonenfrequenz von 600 Mhz bei 278 K aufgenommen. Die TROSY-basierten (anstatt von HSQC-basierten) Varianten der genannten 3D-Spektren wurden dabei aufgrund des hohen Aggregationspotentials von A $\beta$  auch im Hinblick auf die späteren Messungen zusammen mit Lipiden verwendet.

## **Titrationstudien zur Wechselwirkung von $A\beta_{40}$ mit Cholesterin**

Um die Wechselwirkung von  $A\beta_{40}$  mit Cholesterin zu untersuchen, wurde Cholesterin in Form einer 40 mM Stammlösung in Ethanol in schrittweise steigenden Konzentrationen zu einer  $^{15}\text{N}$ - $A\beta_{40}$ -Probe zugegeben. Die Wechselwirkung mit  $A\beta_{40}$  wurde dabei analysiert auf Basis der beobachteten Signaländerungen in 1D- $^1\text{H}$ - und 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren, die bei 278 K und einer Protonenfrequenz von 800 MHz aufgenommen wurden. Alle TROSY-Spektren wurden dabei mit einer Auflösung von  $2048 \times 256$  Punkten und einer Frequenzbreite von  $8013 \times 2595$  Hz aufgenommen. Die anfängliche Konzentration von  $^{15}\text{N}$ - $A\beta_{40}$  betrug dabei 0,45 mM und Cholesterin wurde in den folgenden molaren Konzentrationsverhältnissen ( $A\beta_{40}$ :Cholesterin) zugegeben: 1:0; 1:0,25; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1,0 und 1:1,2. Bereits die ersten Zugaben der Cholesterinstammlösung führten zu einer deutlichen Präzipitation der Probe und damit stark abnehmenden Signalintensitäten. Nach dem „1:1,2“ Titrationsschritt musste die Messung daher beendet werden. Für die in den 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebungen der einzelnen Amidgruppensignale von  $A\beta_{40}$  wurde jeweils auch ein gewichteter Mittelwert der Änderungen der chemischen Verschiebungen der Protonen und der Stickstoffe (kombinierte chemische Verschiebungsänderung  $\Delta\delta$ ) entsprechend Gleichung (7) (siehe Kapitel 2.3) berechnet.

Eine zweite Titrationsreihe an  $^{15}\text{N}$ - $A\beta_{40}$  mit Ethanol alleine unter ansonsten identischen Bedingungen wie oben beschrieben wurde als Referenzmessung durchgeführt. Dabei wurden in den einzelnen Schritten jeweils identische Mengen Ethanol wie bei der ersten Titration zugegeben. Abschließend wurde noch ein zusätzlicher Konzentrationsschritt vermessen, der einem molaren Konzentrationsverhältnis von 1:1,78 bei der ersten Titration mit Cholesterin entsprochen hätte. Erst die letzten beiden Titrationsschritte führten hierbei zu einer sichtbaren Präzipitation der Probe. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte in identischer Weise wie für die erste Titrationsreihe mit Cholesterin.

## **Diffusionsmessungen**

Die NMR-Diffusionsmessungen wurden durchgeführt auf Basis von 1D-Spektren unter Verwendung von stimulierten Echos und bipolaren Feldgradientenimpulsen (BPPSTE: Pelta et al., 1998; Wu et al., 1995). Dabei erfolgte eine Wasserunterdrückung mit Hilfe eines 3-9-19-WATERGATE-Moduls vor der Aufnahme (Sklenar et al., 1993). Innerhalb einer Diffusionsmessreihe wurde die Gradientenstärke  $g$  systematisch variiert. Für die

Diffusionszeit  $\Delta$  und die Gradientendauer  $\delta$  wurde bei den einzelnen Messreihen verschiedene Werte verwendet. Diese sind jeweils bei den entsprechenden Ergebnissen in Kapitel 3.3 mit angegeben.

## **3.3 Ergebnisse**

### **3.3.1 Vorversuche zu den Lösungsbedingungen**

Vor Beginn der sequentiellen Zuordnung des  $\beta$ -amyloiden Proteins mussten zunächst geeignete Lösungsbedingungen für das Peptid gefunden werden. In der Literatur gab es dazu bereits mehrere publizierte NMR-spektroskopischen Messungen (zur Übersicht siehe: Morgan et al., 2004; Serpell, 2000), dabei wurden aber anfänglich wegen des starken Aggregationspotentials von A $\beta$  v. a. verkürzte A $\beta$ -Varianten verwendet. Bei späteren Messungen an unverkürzten Varianten wurden dann hohe Konzentrationen verschiedener organischer Verbindungen zugesetzt, die eine helikale Konformation von A $\beta$  stabilisieren und so die Aggregation hemmen (Crescenzi et al., 2002; Janek et al., 2001; Watson et al., 1998; Coles et al., 1998; Sticht et al., 1995). Zu Beginn dieser Arbeit gab es erst eine Publikation zu NMR-Strukturuntersuchungen an unverkürztem A $\beta$  ohne organische Zusätze (Riek et al., 2001). Diese wurden jedoch an einer an der Position Methionin 35 oxidierten Variante durchgeführt, was ebenfalls die Aggregation hemmt (Hou et al., 2002).

Da in dieser Arbeit Messungen zur Wechselwirkung von A $\beta$  mit Lipiden durchgeführt werden sollten, ohne diese durch die Anwesenheit organischer Zusätze oder eine Oxidation des Peptids zu verfälschen, mussten dazu zunächst geeignete Bedingungen gefunden werden. Dabei wurde eine Messung in Tris-Puffer angestrebt, da A $\beta$  auch bei der bereits publizierten Messung unter diesen Bedingungen offenbar ausreichend stabil war (Riek et al., 2001) und weil das Tris-System auch für mögliche anschließende Messungen mittels Hochdruck-NMR-Spektroskopie geeignet ist. Daher wurde versucht, dass Peptid in diesem Puffer zu lösen. Erste Versuche und erste NMR-spektroskopische Messungen wurden dabei zunächst an einer nicht isotoopenmarkierten, chemisch synthetisierten A $\beta_{42}$ -Probe durchgeführt. Dabei erwies sich jedoch die geeignete Behandlung des sehr leicht aggregierenden Materials als äußerst kritisch.

Anfänglich löste sich das Material kaum bzw. aggregierte teilweise, so dass nur NMR-Spektren mit einem sehr schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis erhalten werden konnten. Später wurde jedoch klar, dass es sich wohl um eine pH-induzierte Aggregation des Peptids handelt. Möglicherweise bedingt durch das Vorhandensein von Trifluoressigsäure im lyophilisierten Material kommt es beim Lösen des Materials trotz ausreichender Pufferung zu einem zumindest vorübergehenden Abfall des pH-Werts unter pH 7,0. Im pH-Bereich zwischen 4,0 und 7,0, nahe dem isoelektrischen Punkt von A $\beta$ , ist jedoch dessen Aggregation maximiert (Barrow et al., 1992; Barrow und Zagorski, 1991). Einmal aggregiert, löst sich das Peptid auch bei geeignetem pH-Wert nicht mehr selbstständig. Daher muss das Peptid so gelöst werden, dass der pH-Wert dabei niemals den pH-Bereich 4,0 bis 7,0 erreicht. Dazu wird das Peptid direkt in mindestens 10 mM NaOH mit Hilfe von Ultraschall gelöst und erst danach der Puffer zugegeben und der gewünschte pH-Werte eingestellt. Diese Methode wurde auch in einer neueren NMR-Studie von A $\beta$  verwendet (Hou et al., 2004). Alle folgenden Proben von A $\beta$  wurden auf diese Weise hergestellt. Dabei hat sich herausgestellt, dass zumindest rein pH-aggregiertes Material durch sofortige Lyophilisation und anschließende Wiederholung des beschriebenen Vorgehens mit einer höheren NaOH-Konzentration oft wieder in Lösung gebracht werden kann.

Eine weitere Ursache für eine mögliche Aggregation von A $\beta$  in den NMR-Proben können Metallionen wie insbesondere Cu $^{2+}$ , Zn $^{2+}$  und Fe $^{3+}$  sein (Maynard et al., 2005). Durch die extrem hohe Affinität von A $\beta$  speziell für Cu $^{2+}$  können bereits die minimalen, typisch als Verunreinigung in den Puffern enthaltenen Konzentrationen dieser Metallionen ausreichen, um die Aggregation von A $\beta$  zu induzieren (Huang et al., 2004; Atwood et al., 2000). Daher müssen die Schwermetallionen in den Lösungen durch geeignete Chelatoren abgefangen werden. Dazu wurden Tests mit dem Chelator DTPA gemacht, der eine sehr hohe Affinität für die beteiligten Ionen hat und effektiv die dadurch verursachte Aggregation von A $\beta$  verhindert (Huang et al., 2004). Die gebildeten DTPA-Metallionen-Chelate sind jedoch starke paramagnetische Relaxationsagentien (Wenzel et al., 1982). Die in den Lösungen gebildeten Konzentrationen dieser Chelate waren dabei hoch genug, um eine sichtbare Dämpfung der NOE-Signale von A $\beta$  in NOESY-Spektren zu bewirken. Der Chelator EDTA dagegen besitzt zwar eine etwas geringere Affinität für die Metallionen und unterbindet die ioneninduzierte Aggregation von A $\beta$  weniger effektiv (Atwood et al., 2000), ist jedoch ein deutlich schwächeres Relaxationsagens (Wenzel et al., 1982) und führte dabei zu keinen deutlichen Beeinträchtigungen von NOESY-Spektren. Daher wurde allen folgenden A $\beta$ -Proben 1 mM EDTA-d16 zugesetzt.

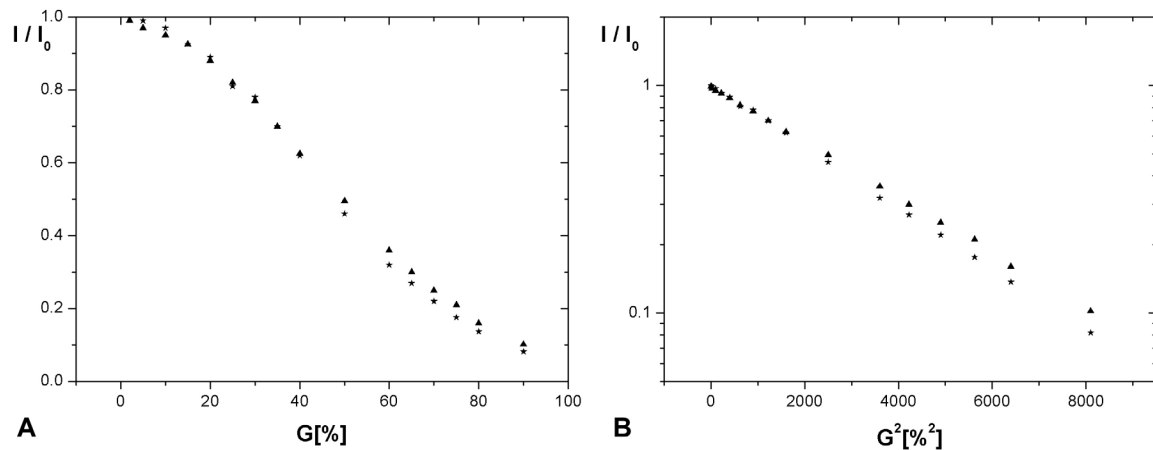


Abbildung 3.3:

$^1\text{H}$ -NMR-Diffusionsmessungen von 0,22 mM  $A\beta_{40}$  (Dreiecke) und 0,25 mM  $Ran^{189-216}$  (Sterne). Messungen jeweils in 40 mM Tris-d11 HCl pH=7,1, 1 mM EDTA-d16 und 0,1 mM DSS in 92%  $\text{H}_2\text{O}$  / 8%  $\text{D}_2\text{O}$  bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz bei 278 K. Die Diffusionszeit  $\Delta$  der BPPSTE-Pulssequenz betrug 500 ms und die Gradientendauer  $\delta$  3 ms. Dargestellt ist die Intensitätsabnahme der Signale mit der Gradientenstärke (A) bzw. die logarithmierte Intensitätsabnahme mit dem Quadrat der Gradientenstärke (B).

Mit  $^1\text{H}$ -NMR-Diffusionsmessungen wurde anschließend überprüft, ob  $A\beta_{40}$  unter den gewählten Lösungsbedingungen tatsächlich monomer gelöst ist. Als Referenz wurde dazu das gut lösliche  $Ran^{189-216}$ -Peptid (siehe Kapitel 4.3.4) herangezogen, das mit einer Größe von 28 Aminosäuren ähnlich groß ist wie  $A\beta_{40}$ . Abbildung 3.3 zeigt das Ergebnis der Messungen. Man erkennt, dass  $A\beta_{40}$  tatsächlich mit sehr ähnlicher Geschwindigkeit wie  $Ran^{189-216}$  diffundiert. Durch Anpassung von Gleichung (9b) an die beobachtete Abnahme der Signalintensitäten mit zunehmender quadrierter Gradientenstärke und Vergleich der erhaltenen Steigungen erhält man mittels Gleichung (10) aus dem Molekulargewicht von  $Ran^{189-216}$  (3084 Da) eine Abschätzung für das Gewicht des diffundierenden  $A\beta_{40}$  von 4201 Da. Durch direkte Anpassung von Gleichung (9a) an die beobachtete Intensitätsabnahme mit zunehmender Gradientenstärke ergibt sich entsprechend eine Abschätzung von 5421 Da. Diese Werte stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit und der verwendeten Annahmen recht gut mit dem tatsächlichen Molekulargewicht von monomerem  $A\beta_{40}$  von 4329 Da überein. Damit kann man davon ausgehen, dass  $A\beta$  wohl überwiegend monomer vorliegt.

Nach Etablierung der Lösungsbedingungen wurden alle weiteren NMR-Proben mit der oben beschriebenen Methodik hergestellt. Dabei wurde kommerziell verfügbares, rekombinant hergestelltes Material von  $A\beta_{40}$  verwendet. Die so erhaltenen Proben lieferten gut aufgelöste NMR-Spektren. Abbildung 3.4 zeigt dazu ein typisches 1D-Spektrum. Die Proben blieben auch bei Langzeitmessungen ausreichend stabil, so dass die sequentielle Zuordnung von  $A\beta_{40}$  unter diesen Bedingungen durchgeführt werden konnte.

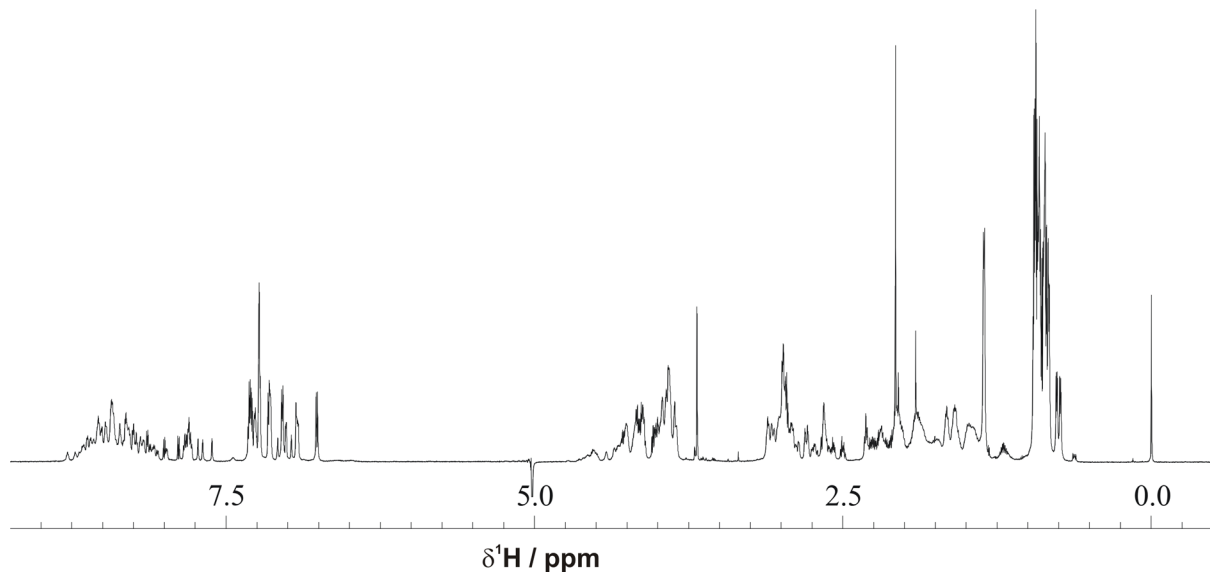


Abbildung 3.4:

$^1\text{H}$ -1D-Spektrum von 0,45 mM  $^{15}\text{N}$ - $\text{A}\beta_{40}$  in 20 mM Tris- $\text{d}_{11}$  HCl pH=7,2, 1 mM EDTA- $\text{d}_{16}$  und 0,1 mM DSS in 92%  $\text{H}_2\text{O}$  / 8%  $\text{D}_2\text{O}$ , aufgenommen bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz bei 278 K.  $\text{H}_2\text{O}$ -Unterdrückung mittels W5-WATERGATE-Sequenz (Liu et al., 1998).

### 3.3.2 Die sequentielle Zuordnung und Sekundärstruktur von $\text{A}\beta_{40}$

#### Durchführung der Zuordnung

Die anschließende sequentielle Zuordnung von  $\text{A}\beta_{40}$  erfolgte nach Standardmethoden ausschließlich auf Basis von 2D-TOCSY-, 2D-NOESY-,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-, 3D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TOCSY-TROSY- und 3D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOESY-TROSY-Spektren. Dabei konnten alle 38 in den  $^{15}\text{N}$ -editierten Spektren beobachtbaren Signalsysteme erfolgreich zugeordnet werden. Die final erhaltene Zuordnung der Hauptkettenamidsignale ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Diese steht im Wesentlichen in Einklang mit einer publizierten Zuordnung von  $\text{A}\beta_{40}$  unter ähnlichen Bedingungen (Hou et al., 2004). Letztlich betrug die globale Vollständigkeit der finalen Zuordnung 100 % für die beobachtbaren Hauptkettenamidsignale, 100 % aller  $\text{H}^\alpha$ , 100 % der  $\text{H}^\beta$ , 97 % der  $\text{H}^\gamma$ , 93 % der  $\text{H}^\delta$ , 88% der  $\text{H}^\epsilon$  und somit insgesamt 95 % aller Protonen. Die gewonnene Zuordnung ist im Anhang dieser Arbeit in Kapitel 7.3 zusammengefasst.

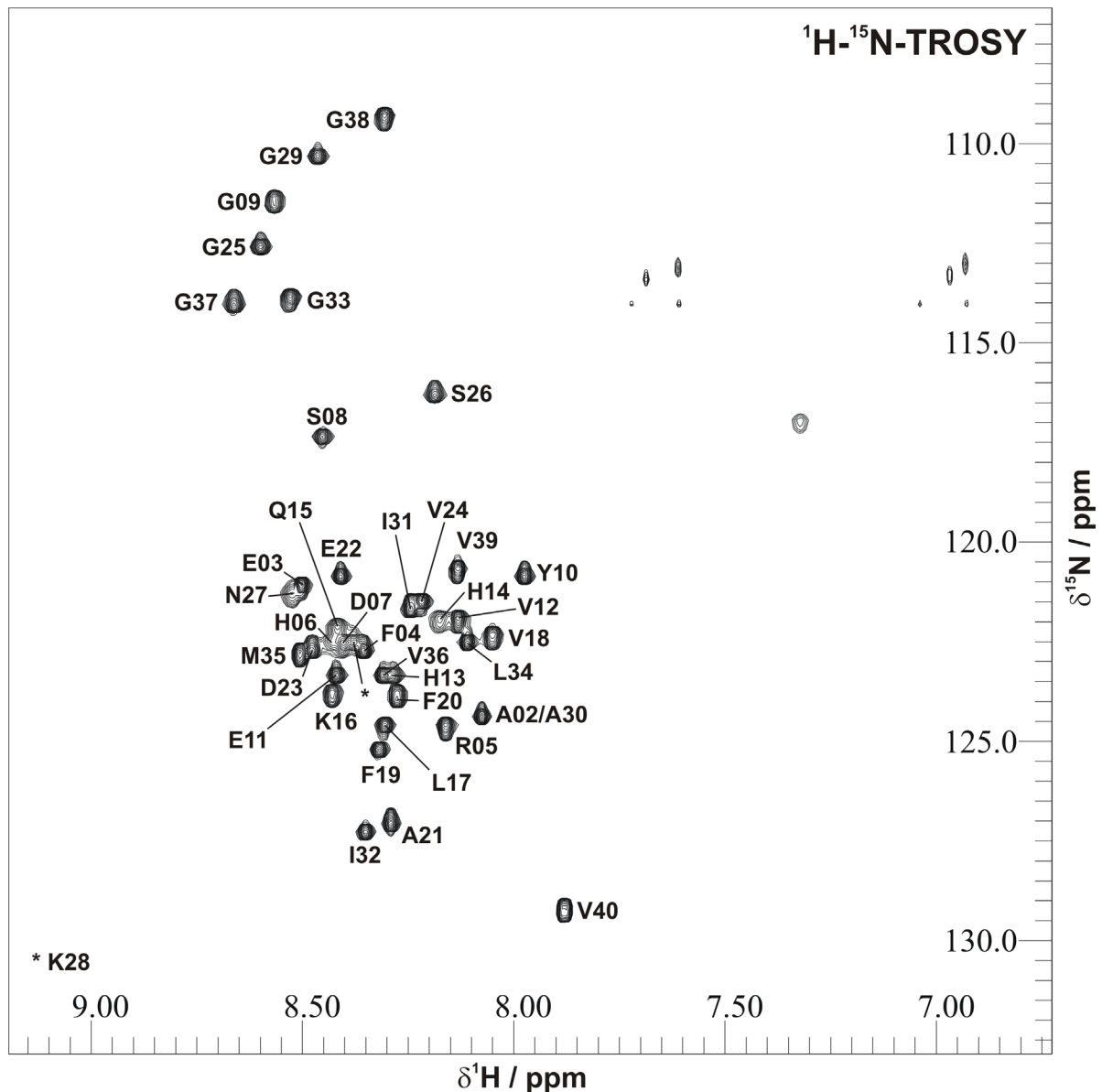


Abbildung 3.5: Sequentielle Zuordnung von  $A\beta_{40}$

$^1H$ - $^{15}N$ -TROSY von 0,45 mM  $^{15}N$ - $A\beta_{40}$  in 20 mM Tris-d11 HCl pH=7,3, 1 mM EDTA-d16 und 0,1 mM DSS in 92%  $H_2O$  / 8%  $D_2O$ , aufgenommen bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz bei 278 K.

## Analyse der gewonnenen chemischen Verschiebungen

Eine grobe Abschätzung des Sekundärstrukturgehalts von  $A\beta_{40}$  unter den gegebenen Lösungsbedingungen aus der „Fingerabdruck“-Region eines 2D-TOCSY-Spektrums nach der Methode von Wishart und Mitarbeitern (Wishart et al., 1991) liefert einen Sekundärstrukturgehalt von  $A\beta_{40}$  von etwa 84 % unstrukturiert und 16%  $\alpha$ -helikal. Diese Methode ist aber gerade für kleinere Proteine und Peptide recht ungenau.

Eine genauere Vorhersage der einzelnen Sekundärstrukturelemente ist durch eine Analyse der Unterschiede der beobachteten chemischen Verschiebungen eines Proteins zu

ihren jeweiligen Referenzwerten aus ungefalteten Standardpeptiden möglich (Wishart und Sykes, 1994; Wishart et al., 1992). Für die Analyse der chemischen Verschiebungen von  $A\beta_{40}$  wurden dazu deren Differenzen zu den Referenzwerten von Wishart und Mitarbeitern (Wishart et al., 1995a) berechnet, die zuvor um den Effekt der jeweils lokalen Nachbar-aminosäuren nach der Methode von Schwarzinger und Mitarbeitern (Schwarzinger et al., 2001) bereinigt worden waren. Die ermittelten Differenzen für die  $H^\alpha$  ( $\Delta\delta H^\alpha$ ) sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Wegen der fehlenden  $^{13}C$ -Markierung des Proteins konnten diese Daten leider nicht um die aussagekräftigen entsprechenden Differenzen der  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$  und  $C$  chemischen Verschiebungen ergänzt werden. Die Analyse der erhaltenen  $\Delta\delta H^\alpha$  zeigt, dass die beobachteten Differenzen der  $H^\alpha$  insgesamt relativ klein sind (vgl. die entsprechende Analyse zu der ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten Ran-Bindedomäne 2, siehe Abbildung 5.7). Der Mittelwert der Beträge der  $\Delta\delta H^\alpha$  beträgt nur 0,05 ppm. Dennoch zeigt  $A\beta_{40}$  tendenziell negative  $\Delta\delta H^\alpha$ -Werte, insbesondere in der N-terminalen Region bis Lys16. Dies deutet auf eine zumindest teilweise  $\alpha$ -helikale Konformation des Peptids unter den gewählten Bedingungen hin. Auch eine Vorhersage von Hauptkettentorsionswinkeln mit Hilfe des Programms TALOS (Cornilescu et al., 1999) basierend auf der gewonnenen Zuordnung liefert als „gut“ klassifizierte  $\alpha$ -helikale Winkelvorhersagen für die Reste Ala2, His6, His14 und V39. Dies unterstützt die Annahme einer teilweise helikalen Struktur in Lösung. Da die beobachteten  $\Delta\delta H^\alpha$ -Werten jedoch insgesamt relativ klein sind und auch die anderen NMR-Studien an  $A\beta$  in rein wässriger Lösung (Danielsson et al., 2006; Hou et al., 2004; Riek et al., 2001) auf keine stabile  $\alpha$ -helikale Konformation unter diesen Bedingungen hindeuten, wurde in dieser Arbeit nicht versucht, eine Lösungsstruktur von  $A\beta_{40}$  zu berechnen.



Abbildung 3.6:  $H^\alpha$ -CSI-Analyse

Differenzen der beobachteten  $H^\alpha$  chemischen Verschiebungen zu ihren Referenzwerten aus ungefalteten Standardpeptiden nach Wishart und Mitarbeitern (Wishart et al., 1995a), jeweils bereinigt um die Effekte der lokalen Nachbarn nach Schwarzinger und Mitarbeitern (Schwarzinger et al., 2001). Aufgetragen gegen die Sequenz von  $A\beta_{40}$ . X markiert fehlende Zuordnungen.



### **3.3.3 Die Wechselwirkung von $A\beta_{40}$ mit Cholesterin**

Wegen der generellen hohen Bedeutung des Steroids Cholesterin für die Alzheimersche Erkrankung (siehe Kapitel 3.1) und den zunehmenden Hinweisen, dass Cholesterin und andere für Membranmikrodomänen typische Lipide direkt mit  $A\beta$  interagieren könnten (Yanagisawa, 2005a), sollte zunächst versucht werden, direkt die Wechselwirkung von  $A\beta$  mit Cholesterin zu untersuchen. Dazu wurde eine Titrationsmessung an einer  $A\beta_{40}$ -Probe mit Cholesterin durchgeführt. Da Cholesterin selbst in wässrigen Lösungen nahezu unlöslich ist (Small, 1986) wurde dieses dabei vorher in Ethanol gelöst, um anschließend eine ausreichende Durchmischung mit der  $A\beta$ -Probe zu gewährleisten. Um dabei jedoch Fehlinterpretationen zu vermeiden, die durch das in die Probe eingebrachte Ethanol verursacht werden könnten, wurde anschließend eine identische Titrationsmessung nur mit Ethanol an einer weiteren  $A\beta_{40}$ -Probe durchgeführt.

#### **Titrationstudie von $A\beta_{40}$ mit Cholesterin in Ethanol**

Die erste Titrationsstudie zur Untersuchung der Wechselwirkung von  $A\beta_{40}$  und Cholesterin erfolgte durch schrittweise Zugabe der Cholesterinstammlösung in Ethanol zu einer  $^{15}\text{N}$ - $A\beta_{40}$ -Probe unter gleichzeitiger Beobachtung der eintretenden Signaländerungen in  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren. Als erstes Zeichen einer Wechselwirkung von  $A\beta_{40}$  mit Cholesterin kam es beginnend mit der ersten Cholesterinzugabe zu einer immer stärkeren Aggregation der zuvor stabilen Probe. Abbildung 3.7 zeigt dazu die auf das Ausgangsspektrum ohne Cholesterin normierte Abnahme der Singalvolumina in den aufgenommenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren. Bereits bei einer Zugabe von 0,8 molaren Äquivalenten von Cholesterin relativ zu  $A\beta_{40}$  sind die Signalvolumina auf unter 5 % des Ausgangswerts abgefallen. Leider führte dies aber auch zu einer kontinuierlichen Abnahme der Spektrenqualität. Daher musste die Titrationsreihe bei einem 1,2 fachen molaren Überschuss von Cholesterin relativ zum  $A\beta_{40}$  abgebrochen werden.

Zusätzlich zu der starken Signalabnahme war in den TROSY-Spektren jedoch auch eine schnelllem Austausch gehorchende, kontinuierliche Änderung der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale zu beobachten. Aus den beobachteten Änderungen der  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungen wurde ein gewichtetes Mittel entsprechend Gleichung (7) gebildet, die kombinierte chemische Verschiebungsänderung  $\Delta\delta$  (siehe

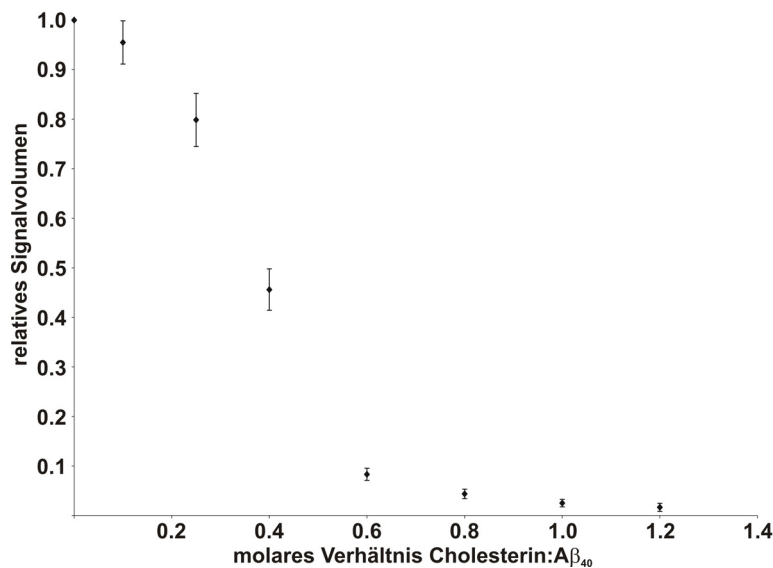


Abbildung 3.7:  
Änderung der Volumina der Amidsignale in den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren von 0,45 mM  $^{15}\text{N}$ -A $\beta_{40}$  verursacht durch die Zugabe von 40 mM Cholesterin in Ethanol, normiert auf das Ausgangsspektrum ohne Cholesterin. Die Standardabweichung ist jeweils mit dargestellt.

Kapitel 2.3). Abbildung 3.8 zeigt die beobachteten Änderungen der  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungen sowie die daraus ermittelten Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta$  für den Titrationsschritt mit 0,8 molaren Äquivalenten von Cholesterin relativ zu A $\beta_{40}$ , der trotz der bereits geringen Signalintensitäten (siehe oben) noch relativ gut auswertbar war. Man erkennt, dass die beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebungen insgesamt zwar relativ klein sind. Trotzdem sind deutliche Unterschiede über die Sequenz vorhanden, einige Signale zeigen gar keine Veränderung. Darüber hinaus konnten bereits in zahlreichen Fällen selbst noch kleine Verschiebungsänderungen im Zusammenhang mit verschiedensten biologisch relevanten Wechselwirkungen gezeigt werden (siehe z. B.: Lima et al., 2006; Lysek und Wüthrich, 2004; Morrison et al., 2003; Laguri et al., 2003), insbesondere auch an A $\beta$  selbst (Williamson et al., 2006).

Betrachtet man die Verteilung der Signalveränderungen über die Sequenz, so zeigt sich, dass größere Verschiebungen von Signalen nahezu exklusiv auf die N-terminale Hälfte des Peptids bis einschließlich Phe19 beschränkt sind. Besonders stark betroffen sind die Reste Glu3, Phe4, His6, Glu11 und Gln15 bis Val18, die eine Änderung der kombinierten chemischen Verschiebungen von mehr als einer Standardabweichung über dem Mittelwert aller Änderungen zeigen. Damit ist einerseits die Hälfte des Peptids betroffen, die viele geladene Reste enthält, während die wenig betroffene C-terminale Hälfte vor allem - ab Gly29 sogar ausschließlich - hydrophobe Reste enthält. Andererseits liegen die stark betroffenen Reste gerade in dem Bereich von A $\beta$ , in dem Nagetiere, die kaum amyloide Plaques bilden (Selkoe, 1989), drei Aminosäureaustausche (Arg5Gly, Tyr10Phe und His13Arg) im Vergleich zur menschlichen Sequenz besitzen (Otvos, Jr. et al., 1993).

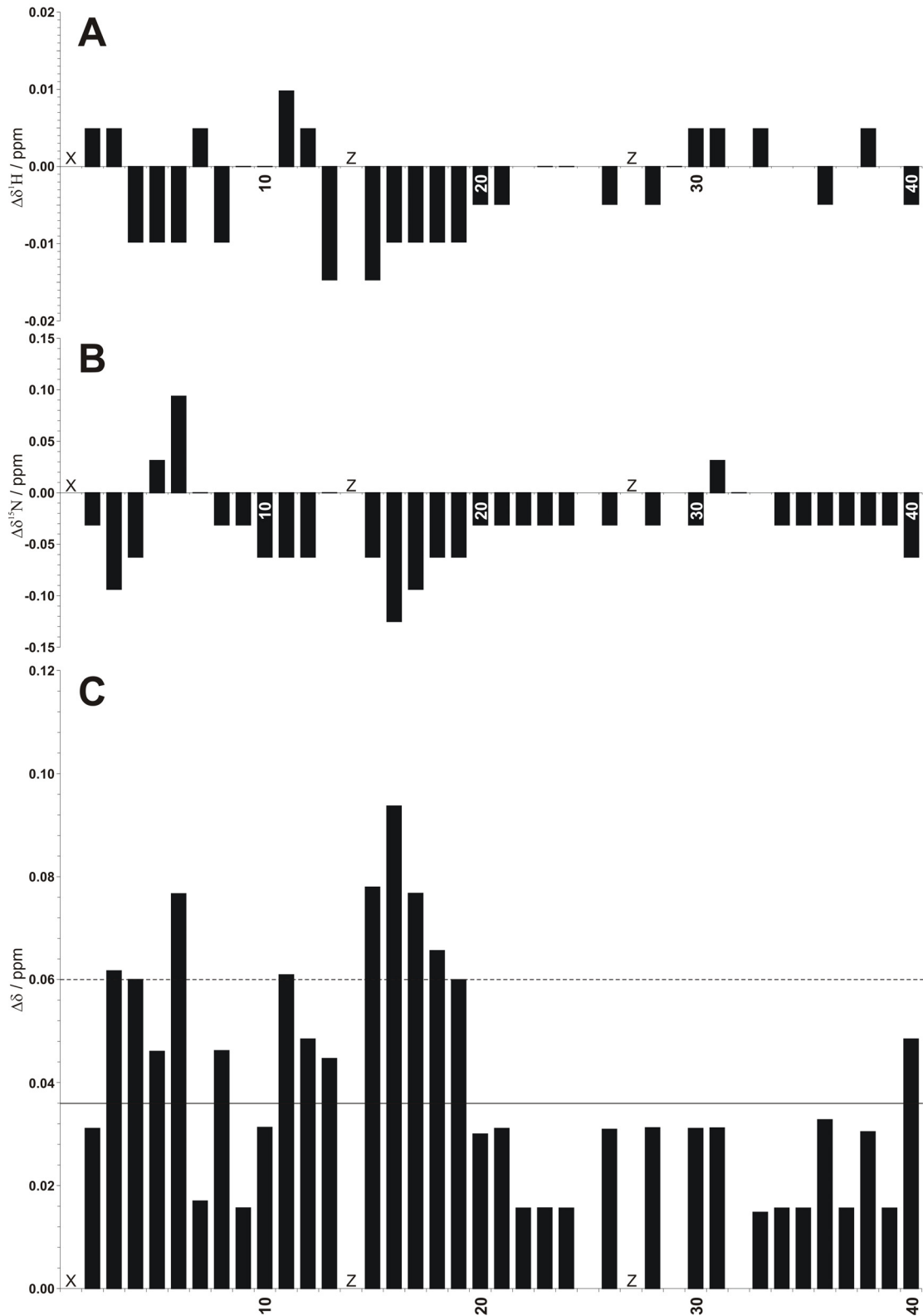


Abbildung 3.8: Verschiebungsänderungen bei der Titration von  $\text{A}\beta_{40}$  mit Cholesterin  
 Änderung der  $^1\text{H}$  (A) bzw. der  $^{15}\text{N}$  (B) chemischen Verschiebungen und die daraus ermittelten kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta$  (C) der Amidsignale in den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren von  $^{15}\text{N}$ - $\text{A}\beta_{40}$  verursacht durch die Zugabe von 0,8 molaren Äquivalenten von Cholesterin (40 mM in Ethanol), aufgetragen gegen die Sequenz von  $\text{A}\beta_{40}$ . X markiert fehlende Zuordnungen. Z markiert Signale, die aufgrund der Spektrenqualität oder der Überlappung mit anderen Signalen nicht aufgelöst werden konnten. Der Mittelwert aller  $\Delta\delta$ -Werte ist als durchgezogene Linie und der Mittelwert plus eine Standardabweichung als gestrichelte Linie dargestellt.

Eine Analyse der Richtung der beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebungen zeigt, dass diese insbesondere für die am stärksten betroffenen Signale hauptsächlich in Richtung kleinerer chemischer Verschiebungen sowohl in der Stickstoff- als auch in der Protonendimension stattfinden. Das spricht für eine tendenziell stärker  $\alpha$ -helikale Konformation von  $A\beta_{40}$  durch die Wechselwirkung mit Cholesterin in Ethanol. Für eine stärker ausgeprägte  $\beta$ -Strang-Konformation würde man dagegen Verschiebungen in die entgegengesetzte Richtung erwarten (Xu und Case, 2002; Williamson, 1990).

### Titrationstudie von $A\beta_{40}$ mit Ethanol

Um den Einfluss des als Lösungsmittel verwendeten Ethanols auf das Ergebnis der Titrationstudie mit Cholesterin zu untersuchen, wurde als nächstes eine weitere Titrationsserie unter identischen Bedingungen durchgeführt, bei der nur Ethanol ohne Cholesterin in gleichen Mengen wie bei der ersten Titrationsserie zu  $A\beta_{40}$  zugegeben wurde. Abweichend von der ersten Titrationsserie wurde lediglich ein letzter zusätzlicher Titrationsschritt mit einer im Vergleich zur ersten Reihe nochmals um die Hälfte höheren finalen Ethanolkonzentration durchgeführt.

Als erster sichtbarer Unterschied zu der ersten Titrationsserie mit Cholesterin blieb die Probe bei der zunehmenden Zugabe von Ethanol zunächst stabil und aggregierte nicht. Erst bei den letzten beiden Schritten der Titrationsserie, also bei dem Schritt, der dem letzten

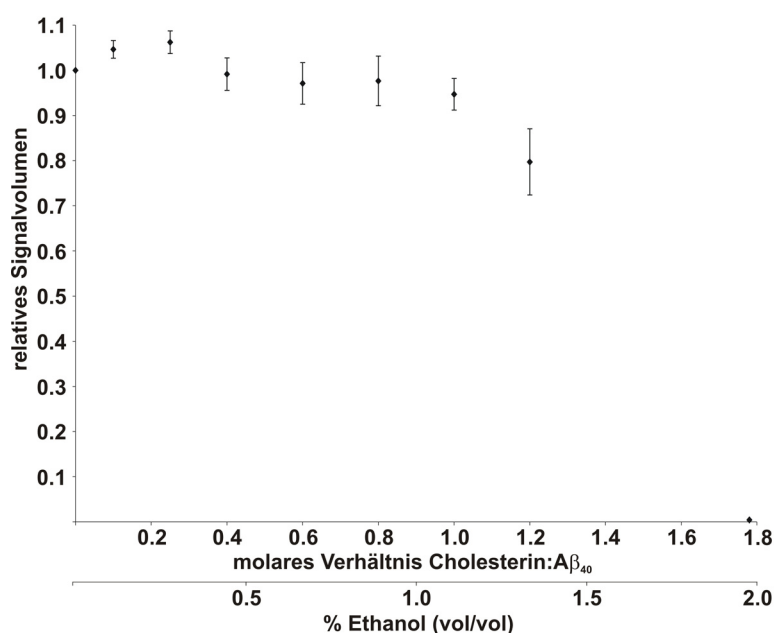


Abbildung 3.9:  
Änderung der Volumina der Amidsignale in den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren von 0,45 mM  $^{15}\text{N}$ - $A\beta_{40}$  verursacht durch die Zugabe von Ethanol, normiert auf das Ausgangsspektrum ohne Ethanol. Die Standardabweichung ist jeweils mit dargestellt. Die Konzentrationsangaben von Ethanol sind der Vergleichbarkeit mit der ersten Titrationsserie wegen zweifach aufgetragen: Die obere Skala ist auf die analoge Untersuchung mit Cholesterin bezogen (siehe Abbildung 3.7) und die untere gibt die tatsächlichen Konzentrationen von Ethanol an.

Schritt der Cholesterin-Titrationsreihe entspricht und bei dem zusätzlichen Titrationsschritt, kam es auch bei dieser Titrationsreihe - entgegen der Erwartungen (siehe Diskussion 3.4) - zur Aggregation der Probe. Abbildung 3.9 zeigt dazu die auf das Ausgangsspektrum ohne Ethanol normierte Abnahme der Signalvolumina in den aufgenommenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren. Man erkennt, dass die Signalvolumina bis zu dem Titrationsschritt, der dem Schritt mit einem molaren Verhältnis von 1:1,0 bei der Titration mit Cholesterin entspricht bzw. eine Gesamtzugabe von 1,1 % (vol/vol) Ethanol darstellt, stabil bleiben und erst bei den letzten beiden Titrationsschritten abfallen.

Auch bei dieser Titrationsreihe war in den TROSY-Spektren beginnend mit dem ersten Titrationsschritt eine schnellem Austausch gehorchende, kontinuierliche Änderung der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale zu beobachten. Aus den beobachteten Änderungen der  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungen wurde erneut eine kombinierte chemische Verschiebungsänderung  $\Delta\delta$  entsprechend Gleichung (7) gebildet. Abbildung 3.10 zeigt die beobachteten Änderungen der  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungen sowie die daraus ermittelten Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta$  für den Titrationsschritt mit einer Ethanolkonzentration von 0,9 % (vol/vol), der dem Titrationsschritt von 0,8 molaren Äquivalenten von Cholesterin relativ zu  $\text{A}\beta_{40}$  bei der Titration mit Cholesterin entspricht (siehe oben). Dadurch ist ein direkter Vergleich mit Abbildung 3.8 möglich. Man erkennt, dass die beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebungen von ähnlicher Größenordnung sind wie bei der ersten Titrationsstudie mit Cholesterin, dass jedoch die Verteilung der Änderungen über die Sequenz anders ist. Besonders stark von Signalverschiebungen betroffen sind die Reste Glu11, His13, Leu17, Val 18 und Ile32, die eine Änderung der kombinierten chemischen Verschiebungen von mehr als einer Standardabweichung über dem Mittelwert aller Änderungen zeigen. Damit ergeben sich folgende wesentliche Unterschiede zu der analogen Titrationsstudie mit Cholesterin in Ethanol: Die Region Glu3 bis Ser8 ist im Gegensatz zur Studie mit Cholesterin überhaupt nicht von signifikanten Änderungen der chemischen Verschiebungen betroffen. Die Region Glu11 bis Phe19 ist bei beiden Titrationsuntersuchungen betroffen, jedoch bei der Titration mit Ethanol allein weniger stark als bei der Titration mit Cholesterin. Darüber hinaus zeigt die Titration mit Ethanol allein Änderungen der chemischen Verschiebungen der Region Ile31 bis Val36, die bei der Titration mit Cholesterin keine auffälligen Änderungen gezeigt hatte.

Die Richtung der beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebungen war bei der Titrationsreihe mit Ethanol allein sowohl in der Stickstoff- als auch in der Protonendimension fast vollständig in Richtung kleinerer chemischer Verschiebungen, also

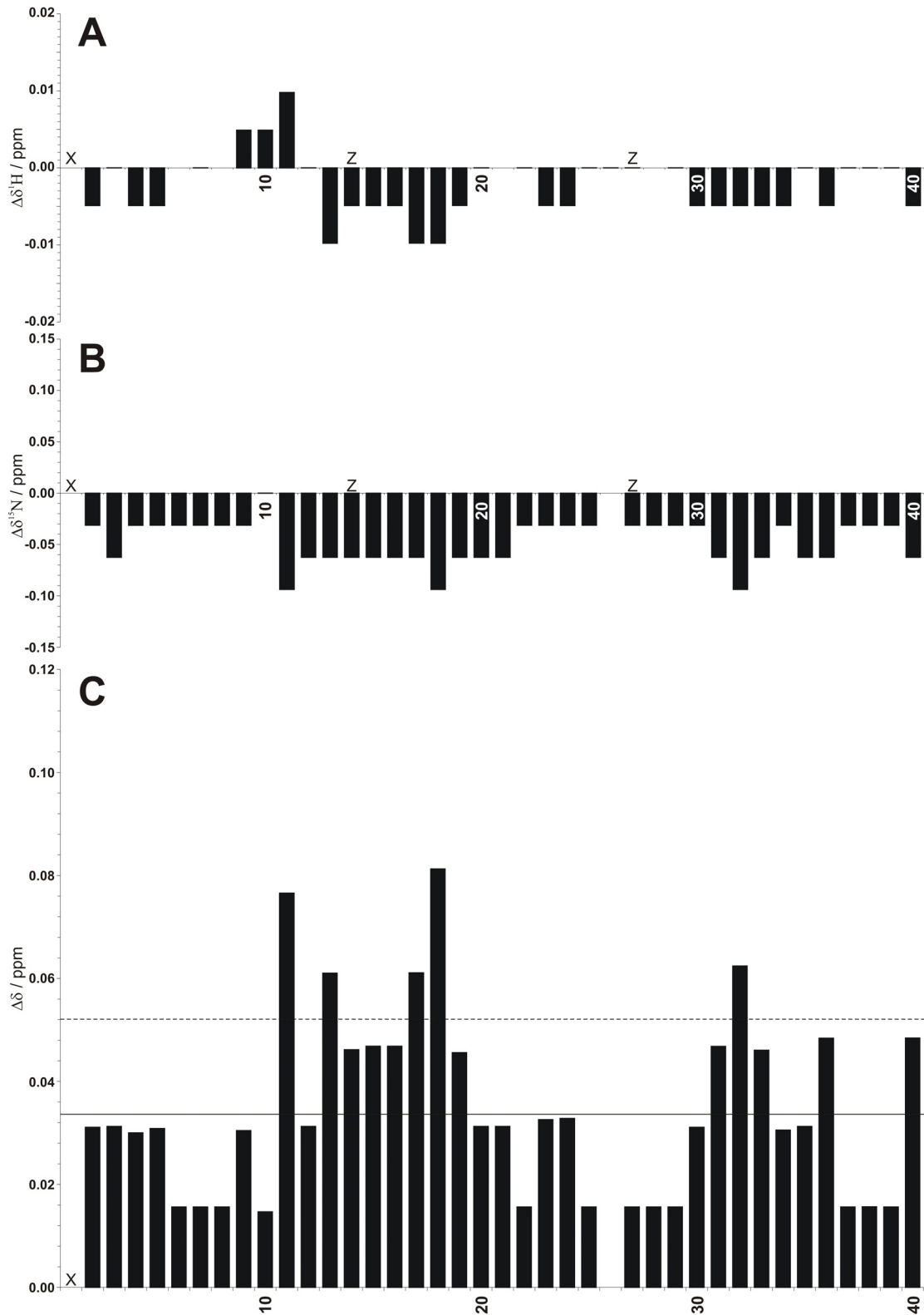


Abbildung 3.10: Verschiebungsänderungen bei der Titration von  $\text{A}\beta_{40}$  mit Ethanol  
 Änderung der  $^1\text{H}$  (A) bzw. der  $^{15}\text{N}$  (B) chemischen Verschiebungen und die daraus ermittelten kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta$  (C) der Amidsignale in den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren von  $^{15}\text{N}$ - $\text{A}\beta_{40}$  verursacht durch die Zugabe von 0,9 % (vol/vol) Ethanol, aufgetragen gegen die Sequenz von  $\text{A}\beta_{40}$ . Dies entspricht dem Titrationsschritt mit 0,8 molaren Äquivalenten von 40 mM Cholesterin in Ethanol bei der ersten Titrationsserie (vergleiche Abbildung 3.8). X markiert fehlende Zuordnungen. Der Mittelwert aller  $\Delta\delta$ -Werte ist als durchgezogene Linie und der Mittelwert plus eine Standardabweichung als gestrichelte Linie dargestellt.

sogar noch exklusiver, als das bei der Titrationsreihe mit Cholesterin in Ethanol der Fall war. Das spricht für eine tendenziell stärker  $\alpha$ -helikale Konformation von A $\beta$ <sub>40</sub> durch die Zugabe von Ethanol. Dies entspricht dem erwarteten Einfluss von Alkoholen auf die Struktur von Peptiden (Vieira et al., 2003; Dwyer und Bradley, 2000).

### **3.3.4 Messungen an schnell rotierenden Phospholipid-Bizellen**

Die NMR-spektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit Membranlipiden ist durch die allgemein schlechte Löslichkeit von Lipiden in wässrigen Lösungen mit experimentellen Schwierigkeiten behaftet. Darüber hinaus spiegeln solche wässrigen Lipidlösungen auch nur bedingt die physiologische Situation von Membranen wider. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit zur Wechselwirkung von A $\beta$  mit Membranlipiden auch Membranmodelle zum Einsatz kommen, die besser den physiologischen Bedingungen einer Membran entsprechen. Dazu wurden Mischungen aus Phospholipiden ausgewählt, die in Lösung kleine schnell rotierende sog. Phospholipid-Bizellen ausbilden (siehe Kapitel 2.5). Dazu mussten zunächst Messungen zur Charakterisierung von isolierten Bizellen durchgeführt werden, um festzustellen, ob sie für derartige Messungen geeignet sind. Dabei sollte einerseits auch versucht werden, die Kettenlänge der Fettsäuren der Phospholipide noch stärker den Gegebenheiten in physiologischen Membranen anzupassen. Wegen der sich abzeichnenden großen Bedeutung von für Membranmikrodomänen typischen Lipiden, insbesondere Cholesterin, für die Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung (siehe Kapitel 3.1) sollte andererseits versucht werden, solche Lipide mit in die Bizellen zu integrieren.

In der vorliegenden Arbeit kamen ausschließlich Phospholipid-Bizellen mit einem q-Wert (siehe Gleichung (11)) von 0,5 zum Einsatz, weil sich diese in anderen Studien für die NMR-spektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung von Lipiden mit Membranen etabliert haben (siehe Kapitel 2.5). Die verwendeten Bizell-Proben wurden jeweils mit <sup>31</sup>P-NMR-Messungen und NMR-Diffusionsmessungen untersucht. Abbildung 3.11 zeigt dazu das <sup>31</sup>P-Spektrum der einfachsten verwendeten Phospholipid-Probe, bestehend aus DMPC und DHPC im molaren Verhältnis 2:1, das zwei getrennte Resonanzlinien bei knapp -1 ppm aufweist. Das Signal bei niedrigerem Feld (-0,66 ppm) gehört dabei zu DHPC und das Signal bei höherem Feld (-0,76 ppm) zu DMPC. Die Tatsache, dass überhaupt zwei getrennte Resonanzlinien beobachtet werden können, zeigt die räumliche Trennung von DHPC und DMPC in der Bizelle, da beide Phospholipide in rein organischen Lösungsmitteln in ihrer

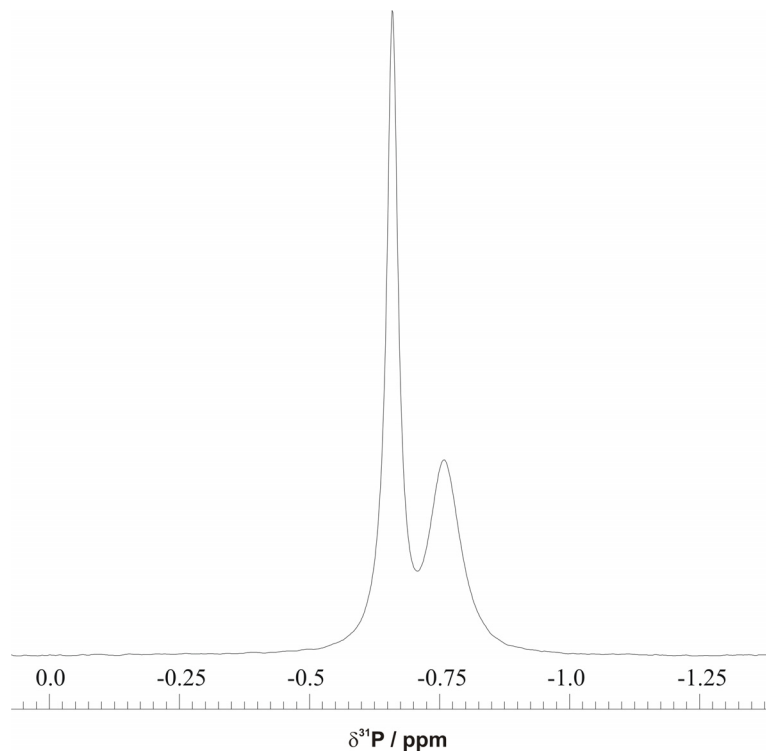


Abbildung 3.11:  
 $^{31}\text{P}$ -1D-Spektrum von 150 mM DMPC/DHPC ( $q = 0,5$ ) in 40 mM Tris- $\text{d}_{11}$  HCl pH=7,0 und 0,1 mM DSS in 92%  $\text{H}_2\text{O}$  / 8%  $\text{D}_2\text{O}$ , aufgenommen bei einer Protonenfrequenz von 500 MHz bei 293 K.

$^{31}\text{P}$  chemischen Verschiebung nicht unterscheidbar sind (Triba et al., 2005; Glover et al., 2001). Eine Aussage über die Größe solcher Bizellen ist mit Hilfe von  $^1\text{H}$ -NMR-Diffusionsmessungen möglich, wie sie in Abbildung 3.12 dargestellt sind. Man erkennt, dass das Diffusionsverhalten einer DMPC/DHPC-Bizelle mit  $q = 0,5$  ähnlich ist, wie das des Referenzproteins Ovalbumin (Molekulargewicht 44 kDa). Die Bizellen besitzen damit eine noch gut NMR-spektroskopisch untersuchbare Größe. In anderen Studien wurde ein Durchmesser von etwa 8 - 12 nm für solche  $q = 0,5$  Bizellen ermittelt (Andersson und Mäler, 2006; Whiles et al., 2002; Luchette et al., 2001). Aufgrund ihrer hohen Rotationsrate sind solche Bizellen damit grundsätzlich gut für NMR-Studien zur Wechselwirkung von Peptiden mit diesen Bizellen geeignet (siehe dazu u. a.: Prosser et al., 2006).

In weiteren Versuchen wurde anschließend versucht, die Kettenlänge der Fettsäuren stärker den physiologischen Gegebenheiten anzupassen, da natürliche Membranen des zentralen Nervensystems auch deutlich längere Fettsäureketten enthalten können (Sastry, 1985). Tabelle 3.1 zeigt dazu eine Übersicht der verschiedenen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phospholipid-Bizell-Präparationen. Die Übersicht zeigt, dass eine Erhöhung der Kettenlänge des langkettigen Lipids nur sehr begrenzt auf 16 Kohlenstoffatome möglich war. Eine weitere Erhöhung der Kettenlänge auf 18 oder 20 Kohlenstoffe erforderte dagegen erheblich erhöhte Temperaturen, um die Lipide überhaupt in Lösung zu bringen. Eine Erhöhung der Kettenlänge des kurzkettigen Lipids auf acht Kohlenstoffatome hingegen ist



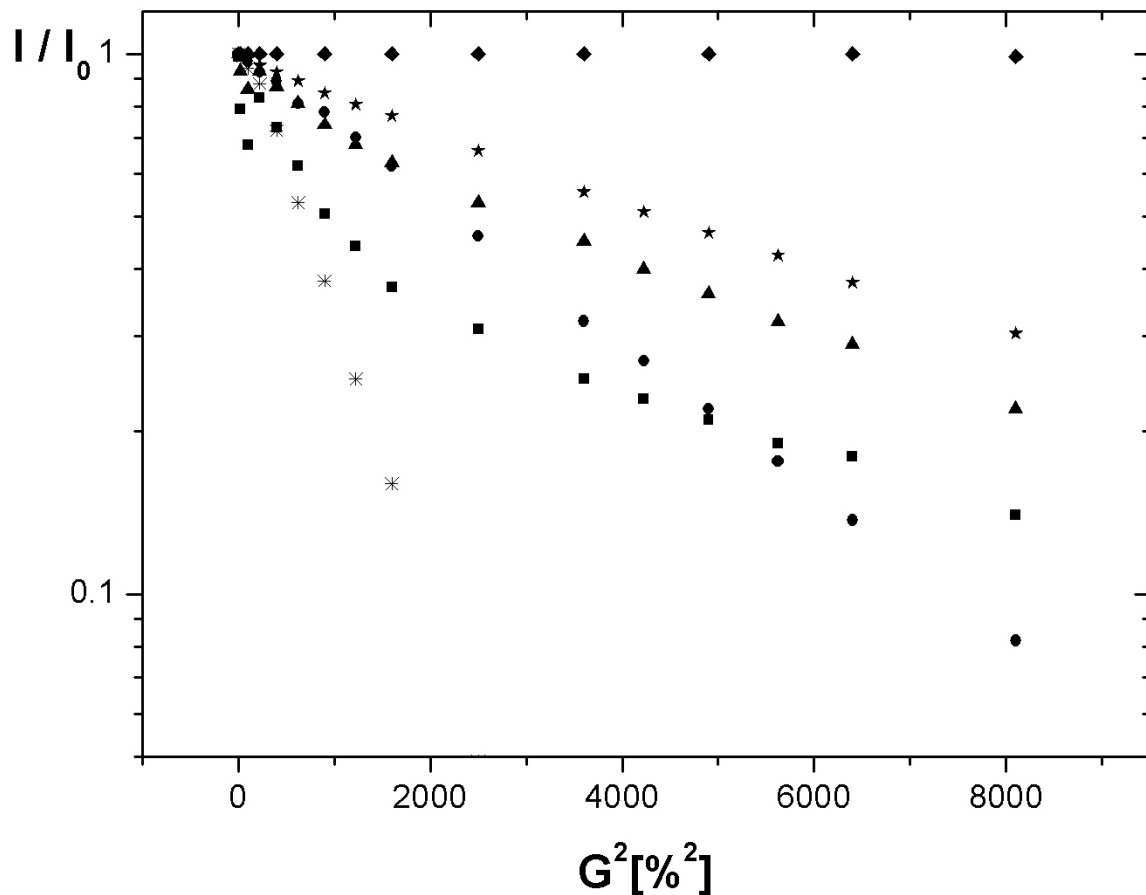


Abbildung 3.12: Diffusionsmessungen von Bizellen und Referenzproteinen

$^1\text{H}$ -NMR-Diffusionsmessungen an 150 mM DMPC/DHPC ( $q = 0,5$ ) (Sterne), Polyacrylamid (Rauten), 0,5 mM Ovalbumin (44,3 kDa, Dreiecke), 0,5 mM BSA (66 kDa, Quadrate), 0,25 mM Ran<sup>189-216</sup> (3,0 kDa, Kreise), jeweils in 40 mM Tris-d11 HCl pH=7,0, 1 mM EDTA-d16 und (außer bei der Lipid-Probe) 0,1 mM DSS (Sterne) in 92% H<sub>2</sub>O / 8% D<sub>2</sub>O, aufgenommen bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz bei 278 K. Die Diffusionszeit  $\Delta$  der BPPSTE-Pulssequenz betrug 500 ms und die Gradientendauer  $\delta$  3 ms. Dargestellt ist die Intensitätsabnahme der Signale gegen das Quadrat der Gradientenstärke. Bei dem nicht-linearen Verhalten von Ovalbumin und v. a. von BSA bei niedrigen Gradientenstärken dürfte es sich um ein Artefakt der Messung bzw. einen Austauschprozess in den Proben handeln. Die Steigung der Geraden bei hohen Gradientenstärken dürfte dem tatsächlichen Diffusionskoeffizienten entsprechen.

zwar möglich, führt allerdings zu extrem viskosen Lösungen mit sehr hohen Linienbreiten. Außerdem wurde versucht, das für Membranmikrodomänen typische Lipid Cholesterin zusammen mit ungesättigten Phospholipiden in die Bizellen mit zu integrieren. Ähnliche Mischungen waren schon in Studien an größeren Bizellen verwendet worden (Minto et al., 2004). Dabei hat sich jedoch gezeigt, dass zumindest gleichzeitig nicht mehr als jeweils zehn Prozent an Cholesterin und ungesättigtem langkettigen Phospholipid relativ zu DMPC integriert werden konnten. Eine weitere Erhöhung des Anteils auf 20 % oder mehr führt unter den verwendeten Bedingungen nicht zu löslichen Proben.

Lipide (q = 0,5)	Spezielle Zusammensetzung	Anmerkungen
DMPC(C14)/DHPC(C6)		Standard-Bizelle, siehe Text
(DMPC+DMlePC+Chol)/DHPC	DMPC:DMlePC:Chol = 10:1:1	Löslich, Diffusion ca. 30 % langsamer als ohne DMlePC und Chol
(DMPC+DMlePC+Chol)/DHPC	DMPC:DMlePC:Chol = 5:1:1 , 3:1:1 oder 1:1:1	Unter den verwendeten Bedingungen nicht löslich
DPPC(C16)/DHPC		Löslich, aber längerer Lösungsprozess, dabei leichte Erwärmung nötig. Nur geringe Unterschiede in den Spektren bzw. im Diffusionsverhalten zu DMPC/DHPC
DSPC(C18)/DHPC		≤ 60°C zum Lösen notwendig, wird bei Abkühlung wieder milchig.
DAPC(C20)/DHPC		≤ 70°C zum Lösen notwendig, wird bei Abkühlung wieder milchig.
DPPC/DCPC(C8)		Löslich, aber längerer Lösungsprozess, dabei leichte Erwärmung nötig. Extrem viskos, daher sehr breite Linien und sehr langsame Diffusion

Tabelle 3.1: Untersuchte Phospholipid-Bizell-Präparationen  
Abkürzungen der Lipide siehe Anhang 7.1. Chol = Cholesterin. Die Kettenlänge der Fettsäureketten ist jeweils in Klammern mit angegeben. Für alle Präparationen gilt q = 0,5.

### 3.3.5 Die Wechselwirkung von $A\beta_{40}$ mit Phospholipid-Bizellen

Nach Untersuchung der isolierten Phospholipid-Bizellen wurde abschließend begonnen, die Wechselwirkung von  $A\beta_{40}$  mit diesen Bizellen zu untersuchen. Dabei wurden wieder DMPC/DHPC-Bizellen mit q = 0,5 verwendet und an einer nicht isotopenmarkierten  $A\beta_{40}$ -Probe untersucht, ob  $A\beta$  in Anwesenheit dieser einfachen Bizellen stabil bleibt, oder ob das Peptid durch die Wechselwirkung mit den Lipiden aggregiert. Dies war jedoch nicht zu beobachten. Die Probe war auch nach vorsichtiger Durchmischung der Hälfte der Probe mit einer Lösung der Phospholipid-Bizellen klar und zeigte keine Anzeichen von Aggregation. Abbildung 3.13 zeigt dazu den Amidbereich des erhaltenen  $^1\text{H}$ -1D-Spektrums im Vergleich zu einem Spektrum der zweiten, in gleicher Weise mit Puffer verdünnten Probenhälfte unter identischen Bedingungen ohne Lipide. In diesem Frequenzbereich besitzt nur  $A\beta$  Signale, die Lipide hingegen nicht. Die Qualität des Spektrums mit Lipiden ist dabei durch den hohen molaren Überschuss der Lipide in der Probe und die dadurch sehr niedrige Signalintensität von  $A\beta$  relativ zu den Lipiden erheblich schlechter. Solche Probleme könnten durch den Einsatz (teurer) deuterierter Lipide umgangen werden. Im Vergleich erkennt man, dass die Spektren relativ ähnlich sind, im Detail sind jedoch Unterschiede zu erkennen. Das deutet auf eine nur schwache Wechselwirkung zwischen  $A\beta$  und den Lipiden hin.

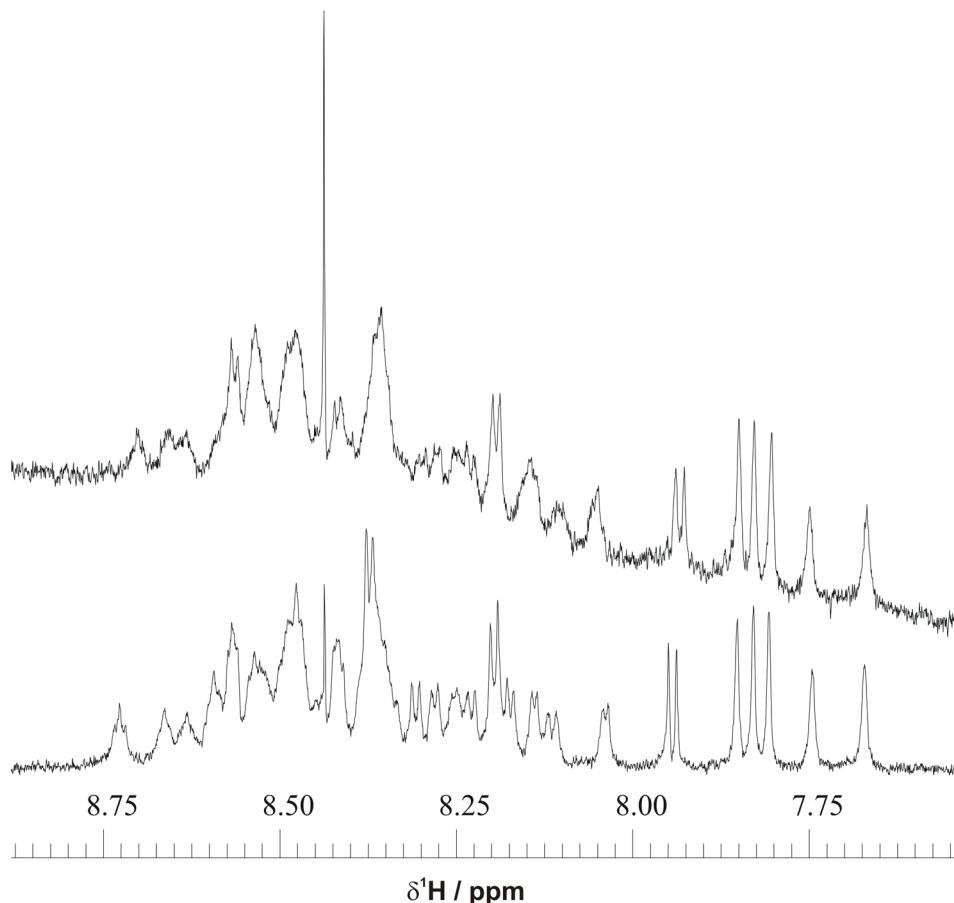


Abbildung 3.13: Einfluss von Phospholipid-Bizellen auf A $\beta$ <sub>40</sub>

Amidbereich von  $^1\text{H}$ -1D-Spektren von 0,22 mM A $\beta$ <sub>40</sub> in 40 mM Tris-d11 HCl pH=7,0 und 1 mM EDTA-d16 in 92% H<sub>2</sub>O / 8% D<sub>2</sub>O, aufgenommen bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz bei 278 K. Oberes Spektrum in Anwesenheit von 150 mM DMPC/DHPC (q = 0,5), aufgenommen mit 256 Wiederholungen. Unteres Spektrum ohne Lipide, aufgenommen mit 16 Wiederholungen. Die schlechtere Qualität des oberen Spektrums ergibt sich durch die hohe Intensität der Lipidsignale im Aliphatenbereich des Spektrums.

Durchgeführte  $^1\text{H}$ -NMR-Diffusionsmessungen an den A $\beta$ <sub>40</sub>-Proben mit und ohne Lipide zeigen, dass die Bizellen mit und ohne A $\beta$  in vergleichbarer Weise diffundieren (siehe Abbildung 3.14). Die Diffusionsgeschwindigkeit von A $\beta$ <sub>40</sub> selbst nimmt durch die Anwesenheit der Lipide auf 83,5 % des Werts ohne Lipide ab (berechnet mittels Anpassung von Gleichung (9a) an die beobachteten Intensitätsabnahmen mit zunehmender Gradientenstärke). Die Diffusionsgeschwindigkeit einer niedermolekularen Verunreinigung in den Proben nimmt jedoch durch die Anwesenheit der Lipide sogar auf 76,9 % des Werts ohne Lipide ab, die Daten sind aber durch die niedrige Intensität des Signals insbesondere bei der lipidhaltigen Probe auch relativ stark verrauscht. Dies legt nahe, dass es sich bei der verringerten Diffusionsgeschwindigkeit von A $\beta$ <sub>40</sub> um einen durch die erhöhte Viskosität in der lipidhaltigen Lösung bedingten Effekt handelt. Auch die Diffusionsmessungen sprechen damit für eine allenfalls schwache Wechselwirkung zwischen A $\beta$  und den Lipiden.

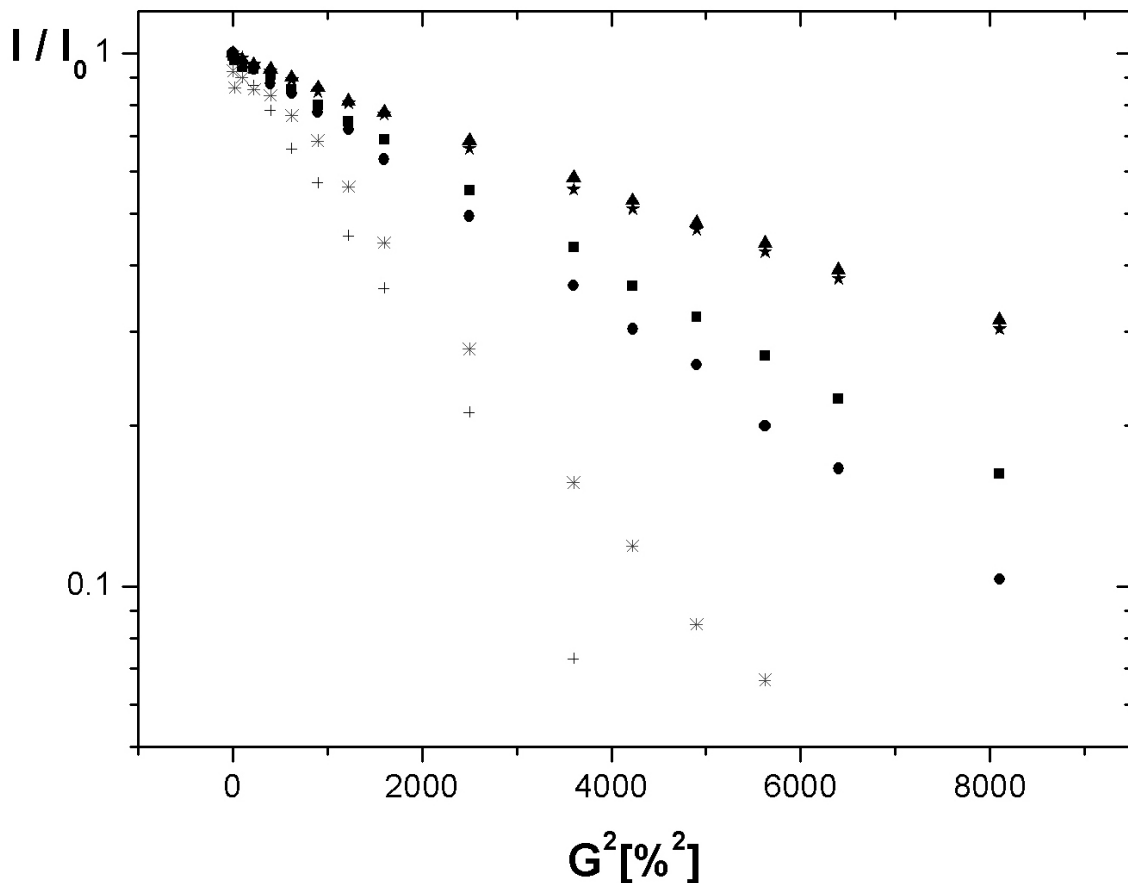


Abbildung 3.14: Diffusionsmessungen von  $A\beta_{40}$  und Bizellen

$^1\text{H}$ -NMR-Diffusionsmessungen von 150 mM ( $q = 0,5$ ) DMPC/DHPC ohne  $A\beta_{40}$  (Sterne) bzw. mit 0,22 mM  $A\beta_{40}$  (Dreiecke), von 0,22 mM  $A\beta_{40}$  alleine (Kreise) bzw. mit 150 mM ( $q = 0,5$ ) DMPC/DHPC (Quadrate) und von einer niedermolekularen Verunreinigung (Signal bei 1,9 ppm) in der Probe von  $A\beta_{40}$  alleine (Kreuze) bzw. in der Probe mit 150 mM ( $q = 0,5$ ) DMPC/DHPC (Sterne). Proben jeweils in 40 mM Tris- $d_{11}$  HCl pH=7,0, 1 mM EDTA- $d_{16}$  in 92%  $\text{H}_2\text{O}$  / 8%  $\text{D}_2\text{O}$ , aufgenommen bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz bei 278 K. Die Diffusionszeit  $\Delta$  der BPPSTE-Pulssequenz betrug 500 ms (für die niedermolekulare Verunreinigung nur 150 ms) und die Gradientendauer  $\delta$  3 ms. Dargestellt ist die Intensitätsabnahme der Signale gegen das Quadrat der Gradientenstärke.

### 3.4 Diskussion

Ein zentraler Schritt in der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung ist die Umfaltung des krankheitsauslösenden  $\beta$ -amyloiden Proteins  $A\beta$  von einer  $\alpha$ -helikalen zu einer  $\beta$ -Strang-Konformation, die anschließend fibrilläre Ablagerungen im Gehirn der Patienten bildet. An diesem kritischen Schritt soll nach neuen Erkenntnissen die Wechselwirkung von  $A\beta$  mit Lipiden maßgeblich beteiligt sein. Besondere Bedeutung innerhalb der Lipide hat dabei das Steroid Cholesterin, das über mehrere Mechanismen an der Entstehung der Erkrankung beteiligt zu sein scheint. In der vorliegenden Arbeit wurden

daher NMR-spektroskopische Messungen zur Wechselwirkung des  $\beta$ -amyloiden Proteins  $A\beta_{40}$  mit Cholesterin und Modellmembranen durchgeführt, um den Einfluss der Lipide auf die Konformation von  $A\beta_{40}$  zu untersuchen.

Dazu wurden zunächst geeignete Lösungsbedingungen für das Peptid ermittelt. Die Aufnahme des käuflichen, lyophilisierten Materials direkt in verdünnter Natriumhydroxidlösung gestattet die Lösung des Peptids in wässrigem Puffer ohne die Zugabe von organischen Zusätzen. Durch  $^1\text{H}$ -NMR-Diffusionsmessungen wurde bestätigt, dass  $A\beta_{40}$  unter den gewählten Bedingungen tatsächlich in monomerem Zustand vorliegt. Dies steht auch im Einklang mit vergleichbaren anderen Studien an  $A\beta_{40}$  (Hou et al., 2004; Danielsson et al., 2002). Anschließend konnte die sequentielle Zuordnung von  $^{15}\text{N}$ - $A\beta_{40}$  unter diesen Bedingungen durchgeführt werden. Die Abweichungen der erhaltenen chemischen Verschiebungen des Peptids von ihren Referenzwerten aus ungefalteten Standardpeptiden deuten dabei auf eine eher ungefaltete, jedoch vor allem im N-terminalen Bereich zumindest teilweise  $\alpha$ -helikale Konformation des Peptids in Lösung hin. Da dieses Ergebnis in Einklang mit anderen bisher publizierten NMR-Strukturuntersuchungen an  $A\beta$  steht, die in rein wässriger Lösung ohne organische Zusätze ebenfalls eine weitgehend ungeordnete Konformation von  $A\beta$  gezeigt haben (Danielsson et al., 2006; Hou et al., 2004; Riek et al., 2001), wurde in dieser Arbeit nicht versucht, eine Lösungsstruktur von  $A\beta_{40}$  zu berechnen. Die Etablierung der sequentiellen Zuordnung von  $A\beta$  unter den gegebenen Lösungsbedingungen war jedoch Voraussetzung für die folgenden Studien zur Wechselwirkung des Peptids mit Lipiden.

### **3.4.1 Die Wechselwirkung von $A\beta_{40}$ mit Cholesterin**

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen  $A\beta_{40}$  und Cholesterin wurden in der vorliegenden Arbeit entsprechende NMR-Titrationsstudien an  $A\beta_{40}$  durchgeführt. Dabei musste ein organisches Lösungsmittel für Cholesterin verwendet werden, da dieses nur in nanomolaren Konzentrationen in wässrigen Lösungen löslich ist (Small, 1986) und somit sonst keine ausreichende Durchmischung mit der  $A\beta$ -Lösung gewährleistet wäre. Dazu wurde Ethanol ausgewählt, weil es selbst sehr gut in Wasser löslich ist, aber Cholesterin dennoch konzentriert genug darin gelöst werden kann (Flynn et al., 1979), dass dabei nur wenig Lösungsmittel in die Proben mit eingebracht wird. Darüber hinaus war bereits in zwei Studien gezeigt worden, dass Ethanol erst bei wesentlich höheren als den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen einen Einfluss auf die Konformation von  $A\beta$  haben bzw. eine

Aggregation moderat verstärken sollte (Eckenhoff et al., 2004; Vieira et al., 2003). Zur Untersuchung der Wechselwirkung von  $A\beta_{40}$  und Cholesterin wurde zunächst eine Titrationsstudie an 0,45 mM  $^{15}\text{N}$ - $A\beta_{40}$  mit 40 mM Cholesterin in Ethanol durchgeführt. Anschließend wurde eine identische Studie mit Ethanol allein durchgeführt, um den Einfluss des Ethanols auf das beobachtete Ergebnis zu untersuchen.

Bei der Studie mit Cholesterin kam es zu einer starken Wechselwirkung zwischen  $A\beta$  und Cholesterin, wie bereits die mit der ersten Zugabe beginnende Aggregation der Probe zeigt. Für diesen Effekt muss das Cholesterin verantwortlich sein, da die Probe der zweiten Studie nur mit Ethanol bei denselben Konzentrationen an Ethanol keine Aggregation zeigte. Darüber hinaus konnten in den Spektren von  $A\beta$  auch schnellem Austausch gehorchende kontinuierliche Änderungen der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale beobachtet werden. Die beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebungen sind zwar insgesamt relativ klein, jedoch konnte bereits in zahlreichen Fällen gezeigt werden, dass Änderungen in dieser Größenordnung mit biologisch relevanten Interaktionen einhergehen, so z. B. im Fall des thematisch verwandten Prionproteins (Lima et al., 2006; Lysek und Wüthrich, 2004; Vogtherr et al., 2003), aber auch bei verschiedenen anderen Proteinen (Morrison et al., 2003; Laguri et al., 2003). Insbesondere wurden jedoch bei einer sehr ähnlich angelegten NMR-Studie zur Wechselwirkung von  $A\beta_{40}$  mit Gangliosid-Mizellen (Williamson et al., 2006) ähnliche Änderungen derselben Größenordnung beobachtet, trotz deutlich höherer Konzentrationen der Ganglioside relativ zu  $A\beta_{40}$ .

Untersucht man die Verteilung der beobachteten Signalveränderungen über die Sequenz von  $A\beta$ , so erkennt man, dass bei der Untersuchung mit Cholesterin größere Verschiebungen von Signalen fast ausschließlich in der N-terminalen Hälfte des Peptids bis einschließlich Phe19 stattfinden, während der C-Terminus kaum betroffen ist. Besonders stark betroffen ist die Region Glu3 bis His6 und die Region um Lys16. Die Richtung der beobachteten Änderung der chemischen Verschiebungen spricht dabei für eine stärker  $\alpha$ -helikale Konformation von  $A\beta_{40}$  durch die Wechselwirkung mit Cholesterin in Ethanol (Xu und Case, 2002; Williamson, 1990). Interessant ist dabei einerseits, dass die stark betroffenen Reste gerade in jenem Bereich von  $A\beta$  liegen, in dem Nagetiere, die kaum amyloide Plaques bilden (Selkoe, 1989), drei Aminosäureaustausche (Arg5Gly, Tyr10Phe und His13Arg) relativ zur menschlichen Sequenz besitzen (Otvos, Jr. et al., 1993). Andererseits hat die bereits erwähnte NMR-Studie zur Wechselwirkung von  $A\beta_{40}$  mit Gangliosid-Mizellen ebenfalls eine Beteiligung derselben N-terminalen Region gezeigt (Williamson et al., 2006), wobei ein ähnliches Muster von beteiligten Resten, sowie eine ähnliche Größenordnung und Richtung von beobachteten Signalverschiebungen auftraten.

Dies deutet auf einen ähnlichen Mechanismus bei der Wechselwirkung von  $A\beta_{40}$  mit Cholesterin wie bei der Wechselwirkung mit Gangliosid-Mizellen hin. Ganglioside sind glykosylierte Sphingolipide, d. h. sie sind mit Cholesterin zumindest insofern vergleichbar, als sie neben einem hydrophoben Lipidanteil auch Hydroxylgruppen besitzen. Darüber hinaus konnte in einer kürzlich erschienenen Studie, in der nach Peptiden gesucht wurde, die an  $A\beta$  binden und dessen Aggregation beeinflussen, gezeigt werden, dass die Aggregation gerade durch jene Peptidliganden besonders deutlich verstärkt wird, die an die N-terminalen zehn Aminosäuren von  $A\beta$  binden (Orner et al., 2006). Zusammenfassend zeigen die genannten Studien und die hier durchgeführten Messungen damit eine hohe Bedeutung der N-terminalen Reste von  $A\beta$  für die Bindung von Lipiden bzw. anderen Liganden und den Aggregationsprozess von  $A\beta$ . Das ist insofern bemerkenswert als diese Reste von  $A\beta$  offenbar gar keinen Teil der geordneten Fibrillenstruktur der Aggregate bilden (Lührs et al., 2005; Petkova et al., 2002).

Vergleicht man nun die durchgeführten Untersuchungen mit Cholesterin in Ethanol und mit Ethanol allein, so ergeben sich folgende Ähnlichkeiten bzw. wesentlichen Unterschiede: Bei der Titration mit Ethanol allein zeigt die Region um Lys16 ebenfalls starke Signalverschiebungen, ähnlich wie bei der Titration mit Cholesterin, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass das Ethanol in molaren Konzentrationen gesehen erheblich stärker konzentriert ist als das Cholesterin, die Wechselwirkung mit Ethanol muss also relativ schwach sein. Zumindest ein Teil des bei der Titration mit Cholesterin beobachteten Effekts in der Region um Lys16 wird damit wohl durch eine (wesentlich schwächere) Wechselwirkung mit dem Ethanol selbst verursacht. Da Ethanol wie Cholesterin eine Hydroxylgruppe besitzt, könnte die Wechselwirkung mit dieser Region durch die Hydroxylgruppe vermittelt werden. Das würde auch zu der Studie an  $A\beta_{40}$  mit Gangliosid-Mizellen passen (Williamson et al., 2006), die sehr ähnliche Ergebnisse gezeigt hat. Gangliosid-Mizellen präsentieren auf ihrer Oberfläche zahlreiche Zuckerreste und damit eine hohe lokale Konzentration an Hydroxylgruppen. Die Titrationsstudie mit Cholesterin in Ethanol zeigt jedoch auch zwei Regionen in  $A\beta_{40}$ , die sich klar von der entsprechenden Studie mit Ethanol alleine unterscheiden. Einerseits zeigt die Region Glu3 bis His6 nur bei der Titration mit Cholesterin signifikante Verschiebungen. Dies deutet auf eine spezifische Wechselwirkung dieses Bereichs mit Cholesterin hin. Andererseits zeigt die C-terminale Region von  $A\beta$ , vor allem um Ile32 herum, nur bei der Titration mit Ethanol alleine starke Signalverschiebungen. Das bedeutet, dass die durch das Ethanol verursachte Wechselwirkung in diesem Bereich durch die stärkere Wechselwirkung mit Cholesterin unterdrückt wird. Die durch die primäre Wechselwirkung mit dem Cholesterin in  $A\beta$  induzierte

Konformation ist also nicht mehr in der Lage, in diesem Bereich in gleicher Weise wie freies A $\beta$  mit Ethanol zu interagieren.

Zur Wechselwirkung von Cholesterin mit A $\beta$  existieren in der bisherigen Literatur unterschiedlich angelegte Studien, jedoch mit sehr widersprüchlichen Ergebnissen (siehe dazu auch: Yanagisawa, 2005a). Etliche Studien haben diese Wechselwirkung zunächst nur indirekt über den Einfluss des Cholesteringehalts von Membranen auf die Aggregation von A $\beta$  untersucht, z. B. durch die Entfernung von Cholesterin aus zellulären Membranen. Während einige dabei zeigen konnten, dass Cholesterin in den Membranen die Aggregation von A $\beta$  fördert (Schneider et al., 2006; Mizuno et al., 1999), haben andere dagegen gezeigt, dass es keinen Einfluss darauf hat (Kim et al., 2006) bzw. dass die Aggregation durch eine cholesterinabhängige Insertion von A $\beta$  in die Membran sogar inhibiert wird (Ji et al., 2002). Gerade zu solch einer möglichen Insertion von A $\beta$  in Membranen in Abhängigkeit von Cholesterin gibt es aber auch wieder völlig gegensätzliche Erkenntnisse (siehe Diskussion zu den Bizellen unten). Einige wenige Studien haben versucht, die Wechselwirkung zwischen A $\beta$  und Cholesterin direkt *in vitro* zu untersuchen, ebenfalls mit unterschiedlichen Ergebnissen. Während in manchen dieser Studien keinerlei direkte Interaktion festgestellt werden konnte (Chauhan et al., 2000; Liang et al., 1996), konnte in anderen Studien eine Wechselwirkung gezeigt werden (Harris, 2002; Avdulov et al., 1997). Die Tatsache, dass die bisherigen Studien zu so widersprüchlichen Ergebnissen kommen, könnte dabei einerseits auf unterschiedliche Ausgangszustände in den einzelnen verwendeten A $\beta$ -Präparationen zurückzuführen sein (Fezoui et al., 2000). Andererseits spielen dabei aber sicher auch die unterschiedlichen eingesetzten Methoden und Vorgehensweisen, sowie die unterschiedlichen beobachteten Messgrößen eine große Rolle. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten NMR-Messungen an A $\beta_{40}$  in Anwesenheit von Cholesterin unterstützen jedoch eindeutig das Stattfinden einer Wechselwirkung zwischen A $\beta_{40}$  und Cholesterin. Diese wird durch den N-terminalen Bereich des Peptids vermittelt und findet damit in sehr ähnlicher Weise statt, wie die Wechselwirkung des Peptids mit Gangliosid-Mizellen (Williamson et al., 2006).

Als Nebenergebnis der Arbeiten lässt sich festhalten, dass auch Ethanol alleine zumindest im Konzentrationsbereich zwischen ein und zwei Volumenprozent eine deutliche Aggregation von A $\beta$  auslösen kann. Dies steht zwar im Widerspruch zu anderen Studien zur Wechselwirkung von A $\beta$  mit Ethanol (Eckenhoff et al., 2004; Vieira et al., 2003), möglicherweise tritt eine Aggregation jedoch speziell bei diesen niedrigen Konzentrationen auf, nicht jedoch bei höheren, in den anderen Studien beobachteten Konzentrationen. Ein solches Verhalten konnte z. B. auch für Triflourethanol beobachtet werden (Fezoui und



Teplow, 2002). Alternativ sind die unterschiedlichen Beobachtungen aber auch wieder auf unterschiedliche Techniken und A $\beta$ -Präparationen zurückzuführen.

### **3.4.2 A $\beta_{40}$ und Modellmembranen**

Nach der Untersuchung der direkten Wechselwirkung zwischen A $\beta$  und Cholesterin waren Messungen zusammen mit Modellmembranen, die eine Untersuchung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen unter annähernd physiologischen Bedingungen erlauben, das nächste Ziel der vorliegenden Arbeit. Um solche Messungen an A $\beta$  vorzubereiten, wurden dabei zunächst Messungen an isolierten Modellmembranen durchgeführt. Bei diesen handelt es sich um kleine, schnell rotierende sog. Bizellen aus lang- und kurzkettigen Phospholipiden, die sich in den letzten Jahren in der Literatur vor allem für NMR-Untersuchungen zur Wechselwirkung von Peptiden mit Membranen in Lösung etabliert haben (Prosser et al., 2006; Vold et al., 1997). Die traditionell verwendeten Mischungen bestehen aus DMPC und DHPC, also Phospholipiden mit einer Fettsäurekettenlänge von 14 bzw. sechs Kohlenstoffatomen. Für die schnell rotierenden Bizellen liegt dabei DHPC in einem Überschuss vor. Im Rahmen der Messungen an isolierten Bizellen wurden diese mit  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen und NMR-Diffusionsmessungen untersucht. Die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen zeigen dabei die räumliche Trennung der beiden Lipide in der Bizelle. Die Diffusionsmessungen zeigen, dass die Bizellen im Größenordnungsbereich eines 40 KDa Proteins diffundieren und daher prinzipiell geeignet sind, hochauflösende Spektren von assoziierten Peptiden zu erhalten.

Solche Phospholipid-Bizellen stellen dabei in ihrer Zusammensetzung natürlich nur ein stark vereinfachtes Modell biologischer Membranen dar. Biologische Membranen enthalten oft hunderte verschiedener Lipidspezies (Edidin, 2003) und sind damit sowohl bezüglich der vorkommenden Lipidtypen, als auch bezüglich der Kettenlänge der Lipide wesentlich heterogener aufgebaut als die Membran der Bizellen. So variiert z. B. auch die Kettenlänge von Phospholipiden in Membranen des zentralen Nervensystems zwischen 14 und 24 Kohlenstoffatomen, wobei die Varianten mit 18 Kohlenstoffatomen besonders häufig sind (Sastry, 1985). Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Schritte durchgeführt, um die verwendeten Bizell-Mischungen besser an die Gegebenheiten in biologischen Membranen anzupassen.

Zunächst wurde versucht, die Kettenlänge der verwendeten Phospholipide zu erhöhen. Dabei hat sich jedoch gezeigt, dass dies zumindest im Rahmen der verwendeten

Präparationsmethode nur sehr begrenzt möglich ist. Eine Erhöhung der Kettenlänge des langkettigen Lipids auf 16 war möglich und führte lediglich zu einem länger dauernden Lösungsprozess. Eine weitere Erhöhung der Kettenlänge auf 18 oder 20 Kohlenstoffe erforderte jedoch erheblich erhöhte Temperaturen, um die Lipide überhaupt in Lösung zu bringen. Bei physiologischen Temperaturen werden die Proben dann jedoch wieder milchig. Solche Mischungen sind also allenfalls für Messungen bei hohen Temperaturen geeignet, dabei ist jedoch zu beachten, dass hierbei auch die Esterbindungen der Lipide wesentlich schneller gespalten werden (Grit und Crommelin, 1993), die Proben also schneller unbrauchbar werden. Problematisch ist auch die Erhöhung der Kettenlänge des kurzkettigen Phospholipids. Eine Erhöhung auf acht Kohlenstoffatome ist zwar möglich, die Lösungen werden dadurch jedoch sehr viskos, verbunden mit einer hohen Linienbreite der Signale in den Spektren und einer sehr langsamen Diffusion der Lipidaggregate. Damit ist es fraglich, ob solche Mischungen für Studien zur Wechselwirkung mit Peptiden geeignet sind. Die gefundenen Ergebnisse stehen in Einklang mit einer anderen Studie, in der die Kettenlänge in Phospholipid-Bizellen variiert wurde (Triba et al., 2006a). Zwar wurden nur orientierende Bizellen mit einem q-Faktor von mindestens 3,0 untersucht, jedoch konnte die erfolgreiche Verwendung von kurz- und langkettigen Phospholipiden mit einer Kettenlänge von sieben bzw. 16 Kohlenstoffatomen gezeigt werden. Noch längerkettige Lipide wurden jedoch nicht untersucht.

Abschließend wurde in den Studien an den isolierten Phospholipid-Bizellen getestet, ob sich Cholesterin zusammen mit ungesättigten Phospholipiden in die Bizellen integrieren lässt. Ähnliche trimere Mischungen aus gesättigten und ungesättigten Phospholipiden und Cholesterin waren bereits in anderen Studien als verbesserte Membrananaloga bzw. als Modell für Membranmikrodomänen verwendet worden (Orädd et al., 2005; Minto et al., 2004). Dabei zeigte sich, dass Mischungen mit jeweils 10 % an Cholesterin und ungesättigtem langkettigen Phospholipid relativ zu DMPC unter den verwendeten Bedingungen noch löslich waren, während Mischungen mit jeweils 20 % oder mehr nicht mehr löslich waren. Möglicherweise sind Cholesterin und ungesättigtes Phospholipid jedoch getrennt voneinander auch in höheren Anteilen löslich. In einigen bisherigen Studien an Bizellen mit großen q-Werten wird zwar der Einbau von bis zu 20 % Cholesterin berichtet (Dave et al., 2005; Lu et al., 2004), auch zusammen mit bis zu 30 % teilweise ungesättigtem Phospholipid (Minto et al., 2004), dies kann jedoch auch an dem insgesamt wesentlich höheren Anteil an langkettigen Lipiden in diesen Mischungen liegen. Eine einzelne Studie an kleinen Bizellen ( $q = 0,5$ ) berichtet nur den Einbau von 5 % Cholesterin relativ zu DMPC (Andersson et al., 2006). Zumindest für Cholesterin ist eine deutliche Steigerung seines Anteils in den Mischungen jedoch wohl ohnehin nicht notwendig, da die Membranen des

menschlichen Nervensystems auch nur etwa 7 - 20 % Cholesterin enthalten (O'Brien und Sampson, 1965). Ungesättigte Fettsäureketten dagegen können auch in höheren Anteilen vorkommen, ihr Anteil ist jedoch in verschiedenen Geweben, Membranen und Lipiden des Zentralen Nervensystems sehr unterschiedlich (Sastry, 1985).

Nach der Untersuchung von isolierten Phospholipid-Bizellen wurden in der vorliegenden Arbeit auch erste Messungen zur Wechselwirkung des  $\beta$ -amyloiden Proteins mit diesen Membrananaloga begonnen. Dazu wurde eine Studie an nicht isotopenmarkiertem  $A\beta_{40}$  in Anwesenheit von DMPC/DHPC-Bizellen ( $q = 0,5$ ) durchgeführt. Die dabei durchgeführten NMR-Diffusionsmessungen deuten darauf hin, dass  $A\beta_{40}$  nicht stabil mit den Bizellen assoziiert ist. Weder  $A\beta_{40}$  noch die Bizellen ändern ihr Diffusionsverhalten im Vergleich zu den Messungen ohne den Partner, wenn man Viskositätsunterschiede berücksichtigt. Dennoch sind in den Spektren von  $A\beta_{40}$  kleine Änderungen der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale zu beobachten, die auf eine zumindest kurzlebige Wechselwirkung hindeuten. Von einer stabilen Insertion des Peptids in die Membran der Bizelle ist dabei nicht auszugehen, da dann neben einer Änderung des Diffusionsverhaltens auch deutlichere Änderungen der chemischen Verschiebungen zu erwarten wären.

Das Ausbleiben einer möglichen stabilen Assoziation von  $A\beta_{40}$  mit den Phospholipid-Bizellen in den durchgeführten Messungen kann verschiedene Ursachen haben. Denkbare Ursachen wären z. B. eine fehlende Oberflächenladung der zwitterionischen Bizellen oder das Fehlen bestimmter Lipidklassen. Auch zu diesen Punkten existieren in der Literatur jedoch viele zum Teil stark widersprüchliche Erkenntnisse. So finden einige Studien, dass eine Wechselwirkung von  $A\beta$  mit Membranen nur stattfinden kann, wenn die Membranen dabei eine negative Oberflächenladung besitzen (Bokvist et al., 2004; Terzi et al., 1997; McLaurin und Chakrabartty, 1997). Andere Studien dagegen finden eine Wechselwirkung auch mit ungeladenen (zwitterionischen) oder gar mit positiv geladenen Membranen (Devanathan et al., 2006; Ravault et al., 2005; Ege und Lee, 2004; Kremer et al., 2001). Weitere Untersuchungen finden eine Insertion von  $A\beta$  in Membranen bzw. eine Wechselwirkung von  $A\beta$  mit Membranen nur in Anwesenheit von Cholesterin (Micelli et al., 2004; Subasinghe et al., 2003; Ji et al., 2002). In anderen Studien wurde dagegen gerade eine Abnahme der Membraninsertion von  $A\beta$  mit steigendem Cholesteringehalt der Membranen beobachtet (McLaurin et al., 2002; Yip et al., 2001). Bei den geschilderten gegensätzlichen Ergebnissen dürften einerseits die unterschiedlichen in den einzelnen Studien verwendeten Messmethoden und Membranpräparationen eine Rolle spielen. Andererseits dürften die Ergebnisse auch wieder durch die unterschiedlichen  $A\beta$ -

Präparationen und damit unterschiedlichen Aggregationszustände von A $\beta$  beeinflusst werden (Fezoui et al., 2000). Dabei ist aber nicht einmal klar, ob eine Aggregation die Lipid- bzw. Membranbindung fördert (Subasinghe et al., 2003; Avdulov et al., 1997), inhibiert (Kakio et al., 2004) oder nur das Gleichgewicht zwischen Bindung an die Membranoberfläche und die Insertion ins Membraninnere verschiebt (Eckert et al., 2005). Darüber hinaus könnten gerade diese Bindung von A $\beta$  an bzw. die Insertion in die Membran zwei voneinander getrennte Prozesse darstellen, die jeweils in unterschiedlicher Weise durch die Membranzusammensetzung beeinflusst werden (Bokvist et al., 2004). Zusammenfassend legen die durchgeführten Studien damit nahe, dass es sich bei der Wechselwirkung des  $\beta$ -amyloiden Proteins mit Membranen um einen hoch komplexen Prozess handelt, der vom Zusammenspiel aller Komponenten wie Membranladung und Zusammensetzung der Membran abhängt. Die einzelnen Einflüsse müssen daher bei den Studien getrennt berücksichtigt werden.

Die Messungen an den Phospholipid-Bizellen zusammen mit A $\beta_{40}$  haben jedoch auch gezeigt, dass dieses System grundsätzlich stabile Proben liefert, die damit auch für längere NMR-Messungen geeignet sind. Durch den Einsatz von deuterierten Lipiden könnte die Empfindlichkeit der Messungen an A $\beta$  auch noch weiter gesteigert werden. Das System ist damit ideal dafür geeignet, die Auswirkungen der Membranzusammensetzung oder ihrer Oberflächenladung auf die Bindung von A $\beta$  zu untersuchen. Dabei können die einzelnen Einflüsse spezifischer Lipide in einer Membrenumgebung direkt analysiert werden. In diesem Zusammenhang ist sicher besonders der Einfluss von Cholesterin interessant, um Aussagen über die immer noch unklare Rolle von Cholesterin auf die Bindung von A $\beta$  an bzw. eine mögliche Insertion in Membranen zu gewinnen. So können auch die zuvor gemachten Studien zur Wechselwirkung von A $\beta$  mit isoliertem Cholesterin um die Effekte einer umgebenden Membran erweitert werden. Letztlich können so detaillierte Erkenntnisse zu den lipidabhängigen konformationellen Gleichgewichten von A $\beta$  und damit den der Alzheimerschen Krankheit zugrunde liegenden Prozessen gewonnen werden.

## 4 Die Struktur der zweiten Ran-Bindedomäne von RanBP2

### 4.1 Einleitung

#### Der eukaryotische Kerntransport und die kleine GTPase Ran

Ein wesentliches Merkmal aller eukaryotischen Zellen ist die Kompartimentierung der Zellen durch interne Membranen. So ist auch der Zellkern durch eine Doppelmembran vom Rest der Zelle abgetrennt. Dadurch wird der Stoffwechsel der DNA im Zellkern räumlich vom Proteinstoffwechsel im Zytoplasma getrennt, wodurch die Regulations- und damit die Entwicklungsmöglichkeiten der Zelle deutlich erweitert werden. Da jedoch weiterhin ein geregelter Austausch von Proteinen und Nukleinsäuren zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma möglich sein muss, existieren in der Kernmembran spezielle Kanäle, die sog. Kernporenkomplexe (*nuclear pore complex*, NPC). Dabei handelt es sich um riesige ringförmige in die Membran eingebettete Proteinaggregate mit fibrillären Fortsätzen auf beiden Membranseiten und einer Gesamtmasse von über 100 MDa (Lim et al., 2006; Lim und Fahrenkrog, 2006). Die NPCs ermöglichen den selektiven und gesteuerten Transport bestimmter Makromoleküle zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma. Dieser Transport erfolgt nicht passiv, sondern aktiv mit Hilfe von speziellen Transportrezeptoren, die an die zu transportierenden Makromoleküle binden. Einen wesentlichen Anteil an der Steuerung des gesamten Transportvorgangs hat dabei die kleine GTPase Ran.

Ran (*Ras-related nuclear protein*) gehört zur Superfamilie der kleinen Ras-ähnlichen GTP-bindenden Proteine und ist neben der Steuerung des Kerntransports auch noch maßgeblich an der Steuerung weiterer zentraler Prozesse im Inneren des eukaryotischen Zellkerns beteiligt. So konnte bisher gezeigt werden, dass Ran auch an der Rückbildung der Kernmembranen und der Kernporen nach der Mitose, dem Aufbau der Mitosespindeln und der DNA-Replikation beteiligt ist (zur Übersicht über die zahlreichen verschiedenen Funktionen von Ran siehe z. B.: Pemberton und Paschal, 2005; Li et al., 2003; Quimby und Dasso, 2003; Weis, 2003). Ran reguliert all diese verschiedenen Funktionen mit Hilfe seines GTPase-Zyklus, d. h. durch den zyklischen Wechsel zwischen einem GTP-gebundenen und

einem GDP-gebundenen Zustand, in denen Ran jeweils mit unterschiedlichen Effektoren wechselwirkt. Dieser Zyklus wird durch die Wechselwirkung von Ran mit GTPase-aktivierenden Proteinen (RanGAP) und einem Guaninnukleotidaustauschfaktor (RanGEF) kontrolliert, die die Effektorbindung von Ran durch Änderung seines Komplexierungszustands beeinflussen, Ran also jeweils „deaktivieren“ bzw. „aktivieren“. Da RanGAPs vorwiegend im Zytoplasma der Zelle lokalisiert sind, während RanGEF (auch RCC1 genannt) hauptsächlich im Zellkern zu finden ist, entstehen einander entgegen gerichtete Gradienten von RanGTP und RanGDP über die Kernmembran.

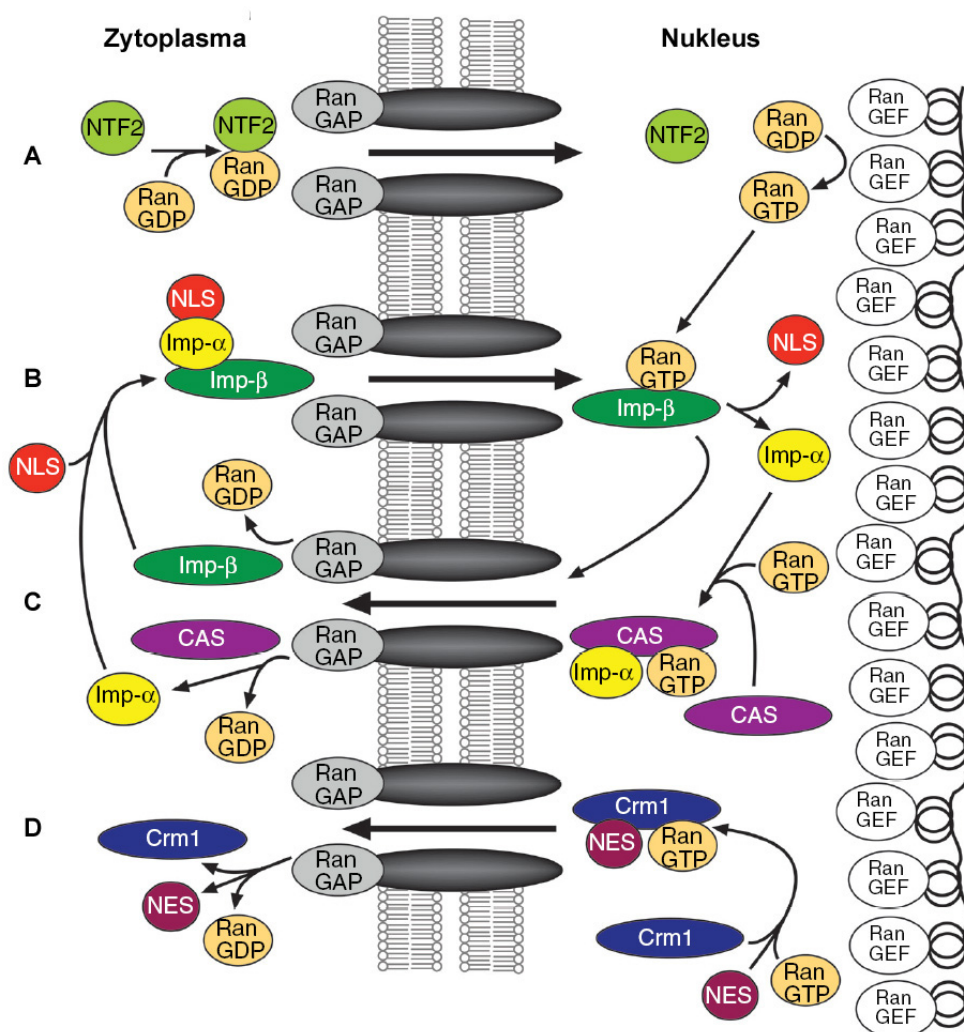


Abbildung 4.1: Vereinfachte Darstellung der molekularen Abläufe des eukaryotischen Kerntransports  
A: Der Transportfaktor NTF2 reimportiert RanGDP. Wiederherstellung von RanGTP durch an Chromatin gebundenes RanGEF.  
B: Zu importierende Frachtmoleküle (NLS-markiert) werden durch Bindung an das Importin-Heterodimer importiert. Die Bindung von RanGTP führt zur Dissoziation des Importkomplexes.  
C: Export von Importin-β im Komplex RanGTP. Importin-α benötigt zusätzlich den Exportfaktor CAS. Durch die Wechselwirkung von RanGAP mit RanGTP kommt es zum Zerfall der Exportkomplexe.  
D: Zu exportierende Frachtmoleküle (NES-markiert) werden im Komplex mit dem Exportfaktor Crm1 und RanGTP exportiert. Zerfall des Komplexes wie bei C.  
Abbildung modifiziert nach Pemberton (Pemberton und Paschal, 2005).

Für die Funktion von Ran innerhalb des Kerntransports werden diese Gradienten genutzt, um die Richtung der verschiedenen Transportprozesse durch die Kernporenkomplexe zu steuern (siehe Abbildung 4.1). Abgesehen von den RanGAPs und RanGEF interagiert Ran im Rahmen dieser Transportprozesse dabei vor allem mit zwei verschiedenen Typen von Effektormolekülen: Einerseits mit den Transportrezeptoren (sog. Importinen bzw. Exportinen), die die Bindung an die zu transportierenden Makromoleküle gewährleisten, und andererseits mit Ran-Bindeproteinen (RanBPs), die für die Beendigung von Exportprozessen im Zytoplasma sorgen. Im Fall von Importprozessen (Abbildung 4.1 B) sind die zu transportierenden Proteine mit einer Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization signal*, NLS) markiert. Diese wird von Importin- $\alpha$  erkannt und der Transportkomplex aus Importin- $\alpha$ , Importin- $\beta$  und Frachtmolekül wird durch die Kernporen in den Zellkern transportiert. Dort bindet RanGTP an Importin- $\beta$ , was zum Zerfall des Transportkomplexes führt. Der Komplex aus RanGTP und Importin- $\beta$  wandert anschließend durch die Kernporen zurück ins Zytoplasma (Abbildung 4.1 C). Für Importin- $\alpha$  ist zusätzlich der Exportfaktor CAS (*cellular apoptosis susceptibility gene*) nötig. Im Fall von Exportprozessen (Abbildung 4.1 D) werden die zu transportierenden Substrate über ein Exportsignal (*nuclear export signal*, NES) von den Exportinen (z. B. Crm1) erkannt. Der Export erfolgt jedoch nur als trimerer Komplex aus Exportin, RanGTP und Frachtmolekül. Sobald die RanGTP-Importin-Komplexe bzw. die RanGTP-Exportin-Fracht-Komplexe das Zytoplasma erreichen, binden Ran-Bindeproteine über ihre Ran-Bindedomänen (RanBDs) an das RanGTP in den Komplexen. Die RanBPs aktivieren daraufhin RanGAP, was zur Hydrolyse des an Ran gebundenen GTPs, dem anschließenden Zerfall des RanGDP-Transportin-Komplexes und damit zum Abschluss des Transportvorgangs führt. RanGDP wird daraufhin mit Hilfe eines speziellen Transportfaktors, dem *nuclear transport factor 2* (NTF2), ins Nukleoplasma zurück transportiert (Abbildung 4.1 A). Durch den Kontakt mit dem dort lokalisierten RanGEF kann schließlich RanGTP wiedergewonnen werden.

## Die Ran-Bindeproteine

Die Hauptaufgabe der Ran-Bindeproteine im Rahmen des Kerntransports ist die Beendigung von Exportprozessen auf der zytoplasmatischen Seite der Kernporen. Darüber hinaus sind RanBPs aber auch direkt an einigen speziellen Transportprozessen beteiligt (siehe dazu u. a.: Lindsay et al., 2002; Englmeier et al., 2001; Lindsay et al., 2001). Alle eukaryotischen Zellen enthalten RanBP1, ein kleines 23 kDa schweres Protein, das löslich im Zytoplasma vorliegt und in niederen Eukaryoten wie *S. cerevisiae* das Hauptsystem zur Zerlegung der Exportkomplexe darstellt. In Vertebraten dagegen scheint RanBP2 (Nup358)

diese Aufgabe zu übernehmen, ein 358 kDa schweres Protein, das Bestandteil der zytoplasmatischen Fibrillen des Kernporenkomplexes ist und das in niederen Eukaryoten nicht vorkommt. RanBP2 besteht aus einer endständigen leucinreichen Region, acht Zinkfingermotiven, einer zu Cyclophilin-A homologen Domäne und insgesamt vier Ran-Bindedomänen, die homolog zu RanBP1 sind (Wu et al., 1995b; Yokoyama et al., 1995). Eine möglichst effiziente Zerlegung der Transportfaktorkomplexe durch RanBP2 wird durch eine SUMO-1-modifizierte (*small ubiquitin-related modifier 1*) Variante von RanGAP gewährleistet (Mahajan et al., 1997), die über SUMO-1 direkt an RanBP2 bindet und so in die unmittelbare Nähe von dessen RanBDs gelangt. RanBP1 scheint in Vertebraten dagegen nur als Sicherungssystem zur Zerlegung von RanGTP-Importin-Komplexen zu dienen, die der Zerlegung durch RanBP2 entkommen sind (Bischoff et al., 2002).

## Strukturen von Ran-Bindedomänen und Ziele der Arbeit

Im Rahmen der Untersuchung des eukaryotischen Kerntransports wurden in den letzten Jahren auch die Strukturen von zahlreichen daran beteiligten Proteinen vor allem mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen erfolgreich aufgeklärt (zur Übersicht siehe Madrid und Weis, 2006; Süel et al., 2006). Auch zu den Ran-Bindeproteinen waren zu Beginn dieser Arbeit bereits einige strukturelle Informationen bekannt: Die Struktur der ersten RanBD von RanBP2 im Komplex mit RanGppNHp (Vetter et al., 1999b) und die Struktur von RanBP1 im Komplex mit RanGppNHp und RanGAP (Seewald et al., 2002). Bezogen auf ihre Ran-Bindedomänen sind diese beiden Strukturen insgesamt recht ähnlich. Die Struktur einer freien RanBD war bis dahin aber nicht gelöst worden. Die Kenntnis einer solchen Struktur ist jedoch notwendig, um zu verstehen, welchen Einfluss die Bindung von Ran bzw. von RanGAP auf die Struktur der RanBDs hat. Aus den oben genannten Kristallstrukturen weiß man, dass Ran zwei Interaktionsflächen mit dem globulären Teil der RanBDs hat. Die Erste umfasst Teile der Schalter-1-Region (Reste 28-38) und die  $\beta 6$ - $\alpha 5$  Schleife (Reste 153-158). Die Zweite wird durch den C-Terminus gebildet, der sich um die RanBD herum wickelt (Seewald et al., 2002; Vetter et al., 1999b). Diese Region von Ran wird auch C-terminaler Schalter genannt, weil sie bei den verschiedenen Bindungsereignissen große Konformationsänderungen erfährt, wie man an den bekannten Strukturen von Ran alleine und im Komplex mit verschiedenen Bindungspartnern erkennen kann. In freiem RanGDP (Stewart et al., 1998b; Scheffzek et al., 1995) und RanGDP-NTF2 (Stewart et al., 1998a) ist der C-Terminus auf der Oberfläche von Ran selbst gebunden. Für RanGTP vermutet man eine kleinere Konformationsänderung dieser Region (Macara, 1999), die genaue Struktur von RanGTP ist aber immer noch unbekannt. In den bekannten Strukturen von RanGTP im



Komplex mit Importinen (Lee et al., 2005; Chook und Blobel, 1999; Vetter et al., 1999a) oder Exportinen (Matsuura und Stewart, 2004) ist der C-Terminus - sofern er in den genannten Strukturen erkennbar ist - vom globulären Teil von Ran weg gerichtet und ist frei zugänglich. Daher vermutet man, dass der C-terminale Schalter und insbesondere seine letzten sechs sauren Reste (D<sup>211</sup>EDDDL<sup>216</sup>), die in den verschiedenen bekannten Kristallstrukturen meist nicht zu erkennen sind, maßgeblich an der Erkennung des RanGTP in den Transportkomplexen durch die RanBDs beteiligt sind (Vetter et al., 1999a; Kuhlmann et al., 1997). Die Wechselwirkung des C-terminalen Schalters mit der RanBD induziert möglicherweise weitere konformationelle Veränderungen, die schließlich eine optimale Wechselwirkung zwischen Ran und der RanBD gewährleisten. Um diese Strukturänderungen besser verstehen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Struktur einer freien RanBD gelöst werden, der zweiten RanBD von RanBP2. Im Zusammenhang mit den zuvor durchgeführten Messungen zur Wechselwirkung der RanBD2 mit dem C-Terminus von Ran kann so der molekulare Ablauf der Beendigung von Transportprozessen besser verstanden werden.

## **4.2 Materialien und Methoden**

### **Materialien**

Die Proteinproben von RanBP2-RanBD2ΔN wurden freundlicherweise von PD Dr. Jürgen Kuhlmann vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund zur Verfügung gestellt. Die Reste 3 - 129 des RanBD2ΔN-Konstrukts (Sequenz siehe Anhang 7.2) entsprechen dabei den Resten 2028 - 2154 von RanBP2 (Swiss-Prot Eintrag P49792). Bei den Resten 1,2 und 130 des Konstrukts handelt es sich um Klonierungsartefakte. Die Expression und Aufreinigung des Konstrukts wurde von Döker et al. (Döker et al., 2002; Döker, 2002) beschrieben.

Das Ran<sup>189-216</sup>-Peptid wurde bei Jerini Peptide Technologies (Berlin) gekauft (nicht isotopenmarkiert; Reinheit >90% mittels HPLC, 220 nm). Die Reste 1 - 28 entsprechen dabei den Resten 189 - 216 von Ran (Swiss-Prot Eintrag P17080).

Alle NMR-Proben von RanBP2-RanBD2ΔN und Ran<sup>189-216</sup> enthielten 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=6,5, 150 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM DTE, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 0,5 mM EDTA und 0,1

mM DSS in entweder 92% H<sub>2</sub>O / 8% D<sub>2</sub>O oder 99% D<sub>2</sub>O. Die Proteinkonzentration der RanBD2-Proben variierte dabei zwischen 0,7 und 1,4 mM unter Verwendung von <sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N-angereichertem RanBP2-RanBD2ΔN. Bei den Proben des nicht isotopenmarkierten Ran<sup>189-216</sup>-Peptids betrug die Proteinkonzentration 1,0 mM.

## **NMR-Messungen**

Sämtliche NMR-Messungen wurden an 600 MHz und 800 MHz Bruker Avance Spektrometern durchgeführt. Alle Temperaturen wurden dabei mit Hilfe einer Ethylenglykol-Probe kalibriert (Raiford et al., 1979). Zur weiteren sequentiellen Zuordnung und den Strukturrechnungen der RanBD2 wurden zusätzlich zu den bereits publizierten Spektren (Döker et al., 2002; Döker, 2002) ein HCCH-TOCSY- und ein <sup>13</sup>C-editiertes 3D-NOESY-HSQC-Spektrum (Mischzeit 120 ms) am 600 MHz Spektrometer bei 298 K aufgenommen. Für die Analyse der Dynamik des Proteintrückgrats wurden <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-NOEs mittels <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren unter Verwendung von Standardpulsprogrammen (Li und Montelione, 1994) bei 600 MHz und 298 K gemessen. Die dabei notwendige Breitband-Sättigung der Amidprotonen erfolgte für 5 s unter Verwendung einer GARP-Entkopplung (Shaka et al., 1985). Die Auswertung erfolgte entsprechend Gleichung (1). Für die sequentielle Zuordnung und Strukturberechnung des Ran<sup>189-216</sup>-Peptids wurden Standard 2D-TOCSY- (Mischzeit 80 ms) und 2D-NOESY-Spektren (Mischzeit 200 ms) bei 283 K am 600 MHz Spektrometer aufgenommen.

Sämtliche chemischen Verschiebungen von Protonen wurden auf internes DSS referenziert und die <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N chemischen Verschiebungen wurden unter Verwendung der Umrechnungsfaktoren von Wishart et al. (Wishart et al., 1995b) indirekt auf DSS referenziert. Alle Spektren wurden mit Hilfe der Softwarepakete XWINNMR bzw. Topspin (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen und prozessiert. Die weitere Analyse der Spektren erfolgte mit Hilfe des Softwarepakets AUREMOL (Gronwald und Kalbitzer, 2004).

## **Strukturelle Parameter**

Die NOE-Distanzbeschränkungen für die Strukturrechnungen wurden mittels manueller sowie automatischer Zuordnung von NOESY-Spektren unter Verwendung des KnowNOE-Moduls in AUREMOL (Gronwald und Kalbitzer, 2004; Gronwald et al., 2002) gewonnen. Dabei wurden für die RanBD2 ein in H<sub>2</sub>O aufgenommenes 2D-NOESY-, ein in D<sub>2</sub>O

aufgenommenes 2D-NOESY-, ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC- und ein  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC-Spektrum verwendet. Für das Ran<sup>189-216</sup>-Peptid wurden die in  $\text{H}_2\text{O}$  bzw.  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommenen 2D-NOESY-Spektren verwendet. Alle Distanzen wurden direkt aus den Signalvolumina gewonnen. Die verwendeten Wasserstoffbrückenbeschränkungen wurden unverändert von Rolf Döker übernommen (Döker, 2002). Kurz zusammengefasst wurden diese auf der Basis von NOE-Informationen und Amidprotonenaustauschschutzfaktoren bei 298 K (Bai et al., 1993) bestimmt. Zusätzlich wurden Torsionswinkelbeschränkungen unter Verwendung des Programms TALOS (Cornilescu et al., 1999) aus den chemischen Verschiebungen der Hauptkettenatome gewonnen.

## Strukturrechnungen

Die Proteinstrukturen wurden mit Hilfe des *simulated annealing* Protokolls des Programms CNS 1.1 (Brünger et al., 1998) berechnet. Ausgehend von einer gestreckten Startstruktur wurden bei der Hochtemperaturphase der Molekulardynamiksimulation dabei 1000 Schritte im Torsionswinkelraum mit einem Abstand von je 0,015 ps bei 50000 K berechnet. In der ersten Abkühlungsphase wurden beginnend mit einer Starttemperatur von 50000 K wieder 1000 Schritte im Torsionswinkelraum mit einem Abstand von je 0,015 ps simuliert. In der zweiten Abkühlungsphase wurden dann 3000 Schritte im kartesischen Raum mit einem Abstand von je 0,005 ps ausgehend von einer Starttemperatur von 3000 K berechnet. Abschließend folgte eine finale Pseudoenergieminimierungsphase bestehend aus 50 Zyklen mit je 300 Schritten. Für alle übrigen Parameter wurden die jeweiligen Standardwerte des *simulated annealing* Protokolls von CNS verwendet. Für die RanBD2 wurde eine Familie von 200 Strukturen und für das Ran<sup>189-216</sup>-Peptid eine Familie von 500 Strukturen berechnet. Die erhaltenen Strukturen wurden abschließend mit Hilfe des entsprechenden Protokolls von Linge et al. (Nabuurs et al., 2004; Linge et al., 2003) einer umfassenden Strukturverfeinerung im Lösungsmittel Wasser unter Verwendung von Xplor-NIH 2.9.6 (Schwieters et al., 2006) unterzogen.

## Analysen

Die chemischen Verschiebungen der  $\text{H}^\alpha$ ,  $\text{C}^\alpha$ , C und  $\text{C}^\beta$  wurden unter Verwendung des Programms csi (zu finden unter <http://www.pence.ca/software/csi>) nach der Methode von Wishart und Mitarbeitern analysiert (Wishart et al., 1995a; Wishart und Sykes, 1994). Die aus den Strukturrechnungen erhaltenen Strukturen wurden visualisiert und analysiert unter

Verwendung der Programme MOLMOL (Koradi et al., 1996), PROCHECK (Laskowski et al., 1996) und WHATCHECK (Hooft et al., 1996). Zur Kontrolle der Qualität der erhaltenen Strukturen wurde darüber hinaus der NMR-spektroskopische R-Faktor mit AUREMOL berechnet (Gronwald und Kalbitzer, 2004; Gronwald et al., 2000).

## **Titrationstudien**

Die Messungen zur Wechselwirkung der RanBD2 mit dem C-Terminus von Ran waren bereits im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit in Form von Titrationsstudien von RanBP2-RanBD2 $\Delta$ N mit dem Ran<sup>189-216</sup>-Peptid durchgeführt worden (Geyer, 2003). Die Wechselwirkung wurde dabei analysiert durch Beobachtung der Änderung der Amidsignale in 2D-<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC- und 2D-<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-TROSY-Spektren, die am 600 MHz Spektrometer bei schrittweise steigenden Konzentrationen des Ran<sup>189-216</sup>-Peptids aufgenommen worden waren. Die anfängliche Konzentration von RanBP2-RanBD2 $\Delta$ N hatte dabei 0,5 mM betragen und das Peptid war bis zu einem bis zu fünffachen molaren Überschuss zugegeben worden. Die kombinierten gewichteten chemischen Verschiebungsänderungen wurden entsprechend Gleichung (7) bestimmt.

## **4.3 Ergebnisse**

### **4.3.1 Ausgangspunkt der Arbeit**

Die Arbeiten an der Struktur der RanBD2 waren bereits von Rolf Döker begonnen worden (Döker, 2002), so dass zu Beginn dieser Arbeit bereits eine weitgehende Zuordnung von RanBD2 (Döker et al., 2002) und eine vorläufige, noch relativ schlecht definierte Struktur vorlagen. Um die Strukturbestimmung des Proteins abschließen zu können, mussten jedoch die sequentielle Zuordnung vor allem im Bereich der Seitenkettensignale und insbesondere die eigentliche Struktur noch deutlich verbessert werden. Ein möglichst gut definiertes Strukturmodell der Domäne ist auch wesentliche Voraussetzung für eine korrekte Interpretation der Messungen zur Wechselwirkung der Ran-Bindedomäne mit dem C-Terminus von Ran, die bereits im Rahmen der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit durchgeführt worden waren (Geyer, 2003).

Bei dem zur Strukturaufklärung verwendeten Konstrukt handelt es sich um eine N-terminal verkürzte Variante der RanBD2-RanBP2, weil mit einem vollständigen Konstrukt nur NMR-Spektren mit einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis erhalten werden konnten (Döker, 2002). Das verkürzte Konstrukt erkennt Ran immer noch spezifisch in der GTP-gebundenen Form, jedoch ist die hohe Affinität der vollständigen Domäne (2,6 nM) bereits um den Faktor 500 herabgesetzt. Die Erkennung von RanGTP bleibt aber erhalten, weil offenbar der C-terminale Schalter die Hauptinteraktionsstelle zwischen Ran und der RanBD darstellt. Dies zeigen sowohl die bekannten Kristallstrukturen (Seewald et al., 2002; Vetter et al., 1999b), als auch die 2000-fache Abnahme der Affinität allein bei Entfernung der letzten sechs sauren Reste des C-Terminus von Ran (Villa Braslavsky et al., 2000; Richards et al., 1995) und der sogar völlige Verlust der Affinität bei Entfernung des gesamten C-terminalen Schalters (Nilsson et al., 2002). Die zweite Interaktionsfläche zwischen dem globulären Teil von Ran und der RanBD bleibt in dem verwendeten Konstrukt ebenfalls erhalten.

Die von Rolf Döker für dieses Konstrukt erhaltene sequentielle Zuordnung basierte auf NMR-Spektren der folgenden Typen: HNCA, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, CBCANH, HBHA(CBCACO)NH, HNCO, 2D-NOESY,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC. Während die anhand dieser Spektren erhaltene Zuordnung für die Hauptkettenatome bereits fast vollständig war, war die Zuordnung der Seitenkettensignale noch sehr unvollständig und musste daher vor den eigentlichen Strukturrechnungen verbessert werden.

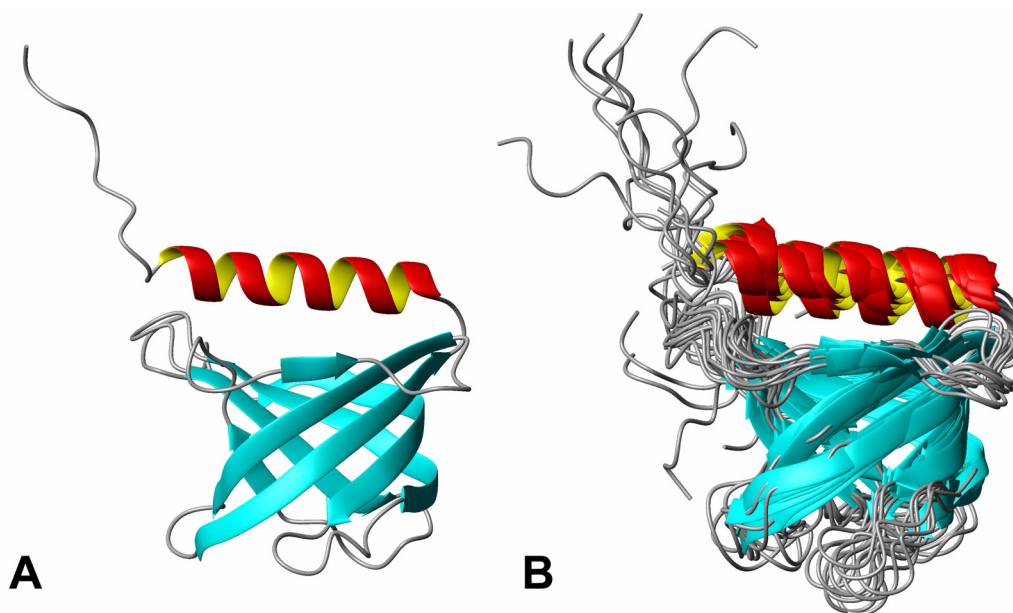


Abbildung 4.2: Bänderdarstellung der vorläufigen Struktur von RanBD2.

A: Pseudoenergieärmste Struktur von 200 berechneten.

B: Bündel der zehn pseudoenergieärmsten Strukturen von 200 berechneten.

Die mit dieser Zuordnung erhaltene vorläufige Struktur basierte auf insgesamt 833 NOE-Distanzbeschränkungen, 29 Wasserstoffbrückenbeschränkungen und 156 Torsionswinkelbeschränkungen, also im Mittel nur 7,8 Beschränkungen pro Rest des Proteins. Daher war diese Struktur auch noch relativ schlecht definiert. Abbildungen 4.2 A und B zeigen dazu die pseudoenergieärmste bzw. ein Bündel der zehn pseudoenergieärmsten von 200 berechneten Strukturen. Für diese zehn pseudoenergieärmsten Strukturen beträgt der globale RMSD-Wert für die Reste 7 bis 120 für alle Atome des Proteinrückgrats noch 0,149 nm. Bezogen auf diese zehn pseudoenergieärmsten Strukturen liegen in einem mit PROCHECK (Laskowski et al., 1996) erzeugten Ramachandrandiagramm 78,6%, 14,7%, 4,9% bzw. 1,8% der Reste in den bevorzugten, den erlaubten, der großzügig erlaubten bzw. nicht erlaubten Bereichen.

### **4.3.2 Die sequentielle Zuordnung von RanBD2**

Für die folgenden Strukturrechnungen wurde zunächst die bestehende sequentielle Zuordnung weiter verbessert. Dazu wurden die vorhandenen zwei- und dreidimensionalen Spektren von RanBD2 teilweise neu ausgewertet. Dabei war insbesondere eine vollständige Neuauswertung des HCCH-TOCSY-Spektrums sehr hilfreich. Insgesamt ermöglichte dies eine deutliche Erweiterung insbesondere der Zuordnung der Seitenkettensignale. Im Vergleich zur aktuellsten Version der Zuordnung vor Beginn dieser Doktorarbeit (Geyer, 2003) konnten z. B. weitere 18% der  $C^\gamma$ , 4% der  $C^\delta$ , 3% der  $C^\epsilon$ , 25% der  $H^\gamma$ , 15% der  $H^\delta$  und 12% der  $H^\epsilon$  neu zugeordnet werden. Letztendlich betrug die Vollständigkeit der finalen Zuordnung 99% für die beobachtbaren Hauptkettenamidssignale, 94% für die Carbonylkohlenstoffkerne, 99% für die  $C^\alpha$ , 100% für die  $C^\beta$ , 50% für die  $C^\gamma$ , 17% für die  $C^\delta$ , 5% für die  $C^\epsilon$ , 98% für die  $H^\alpha$  und 100% für die  $H^\beta$ , 71% der  $H^\gamma$ , 43% der  $H^\delta$  und 13% der  $H^\epsilon$ . Die finale Zuordnung wurde in der Madison NMR-Datenbank (Seavey et al., 1991) unter der Zugangsnummer 5159 abgelegt.

Basierend auf dieser Zuordnung wurden anschließend die vorhandenen zwei- und dreidimensionalen NOESY-Spektren iterativ im Wechsel mit Strukturrechnungen unter Verwendung des KnowNOE-Moduls in AUREMOL (Gronwald und Kalbitzer, 2004; Gronwald et al., 2002) zugeordnet. Die dabei abschließend erhaltenen NOE-Distanzbeschränkungen sind in Abbildung 4.3 A und Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Beschränkungen	Anzahl
NOEs	
Total	1281
Intraresiduell ( $i = j$ )	556
Sequentiell ( $ i-j  = 1$ )	385
Mittlere Reichweite ( $1 <  i-j  < 5$ )	146
Große Reichweite ( $ i-j  \geq 5$ )	194
Torsionswinkel $\Phi$ ; $\Psi$ (TALOS)	182
Wasserstoffbrücken	29
Gesamtzahl der Beschränkungen	1492
Gesamtzahl der Beschränkungen pro Rest	11,5
<b>Statistiken für die 20 pseudoenergieärmsten Strukturen (von 200 berechneten)</b>	
NOE-Verletzungen > 0,03 nm	$20,3 \pm 1,8$
NOE-Verletzungen > 0,05 nm	$1,3 \pm 1,0$
Verletzungen von Diederwinkeln > $5^\circ$	$4,4 \pm 1,7$
$E_{\text{Gesamt}}$	$-3952 \pm 152$ kJ/mol
$E_{\text{NOE}}$	$369 \pm 10$ kJ/mol
$E_{\text{cdih}}$	$34 \pm 4$ kJ/mol
Ramachandranstatistik	
Bevorzugt	$89,3 \pm 1,6$ %
Erlaubt	$8,3 \pm 1,7$ %
Großzügig erlaubt	$1,8 \pm 1,2$ %
Verboten	$0,6 \pm 0,5$ %
NMR-R-Faktor	
Gesamt	0,35
Intraresiduelle Signale	0,34
Sequentielle Signale	0,27
Signale mittlerer Reichweite	0,23
Signale großer Reichweite	0,20
Interresiduelle Signale	0,24
Durchschnittlicher RMSD vom Mittelwert für Reste 7 - 120 <sup>a</sup>	
Hauptkettenatome	$0,072 \pm 0,012$ nm
Alle schweren Atome	$0,135 \pm 0,010$ nm
<sup>a</sup> Die RMSD-Werte wurden nur für den gefalteten Teil von RanBD2ΔN berechnet (Reste 7 bis 120). Die Termini wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt, weil sie sehr mobil sind, wie durch die Messung von $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOEs gezeigt werden konnte.	

Tabelle 4.1

### **4.3.3 Die Struktur von RanBD2**

Für die folgenden Strukturberechnungen wurden 1281 NOE-Distanzbeschränkungen, 29 Wasserstoffbrückenbeschränkungen und 182 Torsionswinkelbeschränkungen verwendet. Insgesamt wurden also 11,5 Beschränkungen pro Rest des Proteins verwendet und damit deutlich mehr als für die Ausgangsstruktur verwendet worden waren. Die Verteilung dieser NOE-Distanzbeschränkungen auf die Sequenz des Proteins ist in Abbildung 4.3 A dargestellt. Abgesehen von den beiden Termini und einzelnen Schleifenregionen wird die Struktur der RanBD2 gut durch die verwendeten experimentellen Beschränkungen definiert. Die Strukturrechnungen wurden mit CNS 1.1 (Brünger et al., 1998) durchgeführt, wobei eine Familie von 200 Strukturen unter Verwendung der oben genannten Beschränkungen berechnet wurde. Die erhaltenen Strukturen wurden anschließend anhand des Protokolls von Linge und Mitarbeitern (Linge et al., 2003) im Lösungsmittel Wasser unter Verwendung von Xplor-NIH (Schwieters et al., 2006) verfeinert. Das Bündel der 20 pseudoenergieärmsten erhaltenen Strukturen wurde abschließend in der RCSB-Proteindatenbank (Berman et al., 2000) unter dem Zugangscode 1XKE abgelegt.

Betrachtet man diese 20 pseudoenergieärmsten der erhaltenen Strukturen, so liegen 89,3%, 8,3%, 1,8% bzw. 0,8% der Reste in den bevorzugten, den erlaubten, den großzügig erlaubten bzw. den nicht erlaubten Bereichen eines mit PROCHECK (Laskowski et al., 1996) erzeugten Ramachandrandiagramms. Im Vergleich zur Ausgangsstruktur konnten diese Werte also deutlich verbessert werden. Für die Reste 7 - 120 der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen beträgt der globale RMSD der Hauptkettenatome 0,072 nm, was ebenfalls eine erhebliche Verbesserung darstellt. Die lokalen RMSD-Werte der Hauptkettenatome sind in Abbildung 4.3 B dargestellt. Die terminalen Reste von RanBD2 zeigen keine gut definierte 3D-Struktur und wurden daher bei der Berechnung des globalen RMSD-Werts nicht berücksichtigt. Das Fehlen einer geordneten Struktur in diesen Bereichen wird dabei durch eine hohe interne Beweglichkeit der beteiligten Reste verursacht. Dies konnte durch die Messung von heteronuklearen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE-Werten bestätigt werden. Diese sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Die negativen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE-Werte für die Termini des Proteins weisen auf eine hohe Mobilität der jeweiligen Reste hin, vergleichbar mit der von ungefalteten Peptiden. Zur Überprüfung der Qualität der erhaltenen Strukturen wurden darüber hinaus R-Faktoren mit AUREMOL berechnet (Gronwald et al., 2000). Diese liegen in einem Bereich wie er für gut definierte NMR-Strukturen zu erwarten ist. Die strukturellen Parameter der Strukturrechnung und der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die erhaltene Struktur ist in Abbildung 4.5 A dargestellt.



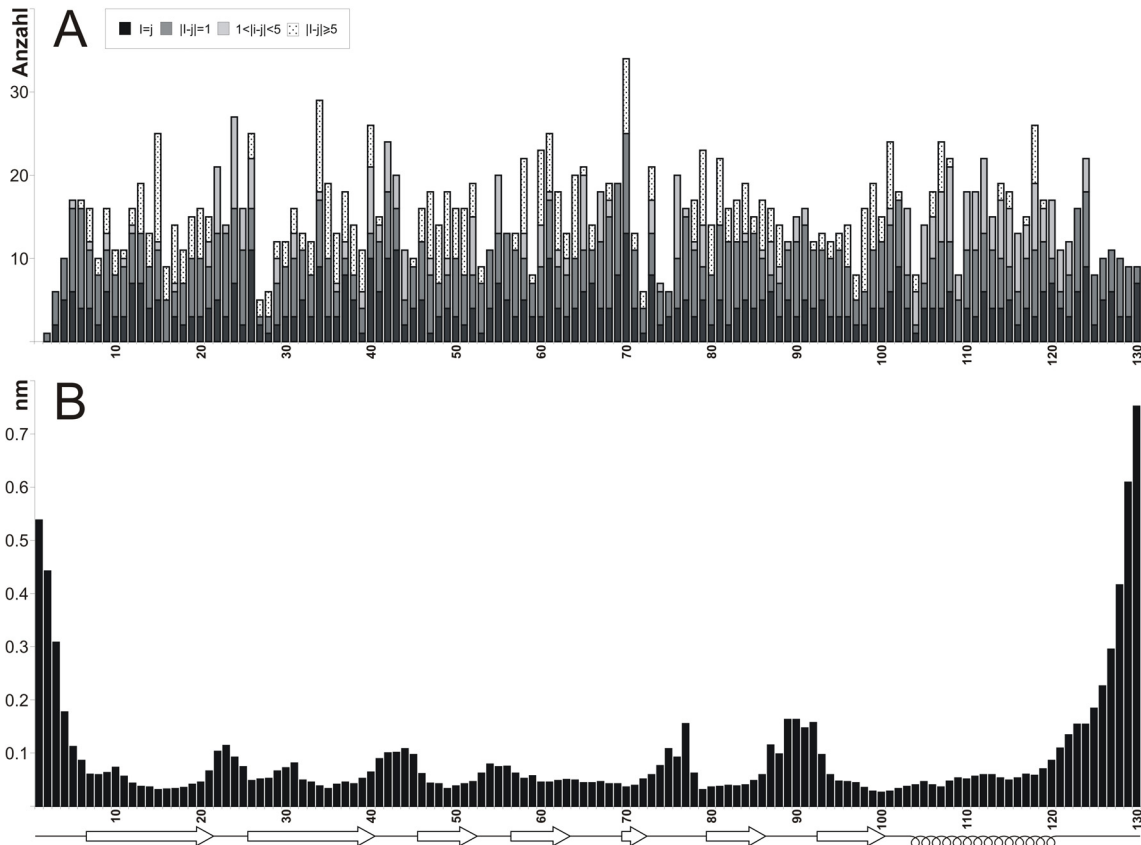


Abbildung 4.3: NOE-Beschränkungen und lokale RMSD-Werte von RanBD2

A: Verteilung der NOE-Beschränkungen auf die Sequenz.

B: Lokale RMSD-Werte der Hauptkettenatome der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen.

Die Sekundärstruktur ist durch Pfeile ( $\beta$ -Stränge) und Schleifen ( $\alpha$ -Helices) dargestellt.

Die Analyse der  $H^\alpha$ ,  $C^\alpha$ , C und  $C^\beta$  chemischen Verschiebungen (Wishart et al., 1995a; Wishart und Sykes, 1994) unter Verwendung des Programms *csi* führt zur Vorhersage von insgesamt sieben  $\beta$ -Strängen (Glu7 bis Arg19, Arg30 bis Lys39, Leu46 bis Arg51, Asn61 bis Thr65, Thr67 bis Leu73, Asp77 bis Ser85 und Leu94 bis Lys100) und von einer  $\alpha$ -Helix (Glu105 bis Leu120). Dies stimmt gut mit den Sekundärstrukturelementen überein, die in der berechneten Struktur der RanBD2 mit Hilfe von PROCHECK (Laskowski et al., 1996) identifiziert werden können. Im Ensemble der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen reicht  $\beta$ -Strang 1 von Glu7 bis Asp21,  $\beta$ -Strang 2 von Gln26 bis Asn40,  $\beta$ -Strang 3 von Leu46 bis Arg52,  $\beta$ -Strang 4 von Lys57 bis Trp63,  $\beta$ -Strang 5 von Leu70 bis Pro72,  $\beta$ -Strang 6 von Trp80 bis Asp86,  $\beta$ -Strang 7 von Lys93 bis Lys100 und die  $\alpha$ -Helix von Pro104 bis Leu120. Folglich sind die  $\beta$ -Stränge 1 bis 4 und 7 minimal länger als über die chemischen Verschiebungen vorhergesagt, während  $\beta$ -Stränge 5 und 6 geringfügig kürzer sind. Da bei mittleren Auflösungen Sekundärstrukturelemente in Strukturen üblicherweise eher zu kurz bestimmt werden, könnten  $\beta$ -Stränge 5 und 6 sogar noch etwas länger als in der berechneten 3D-Struktur sein.

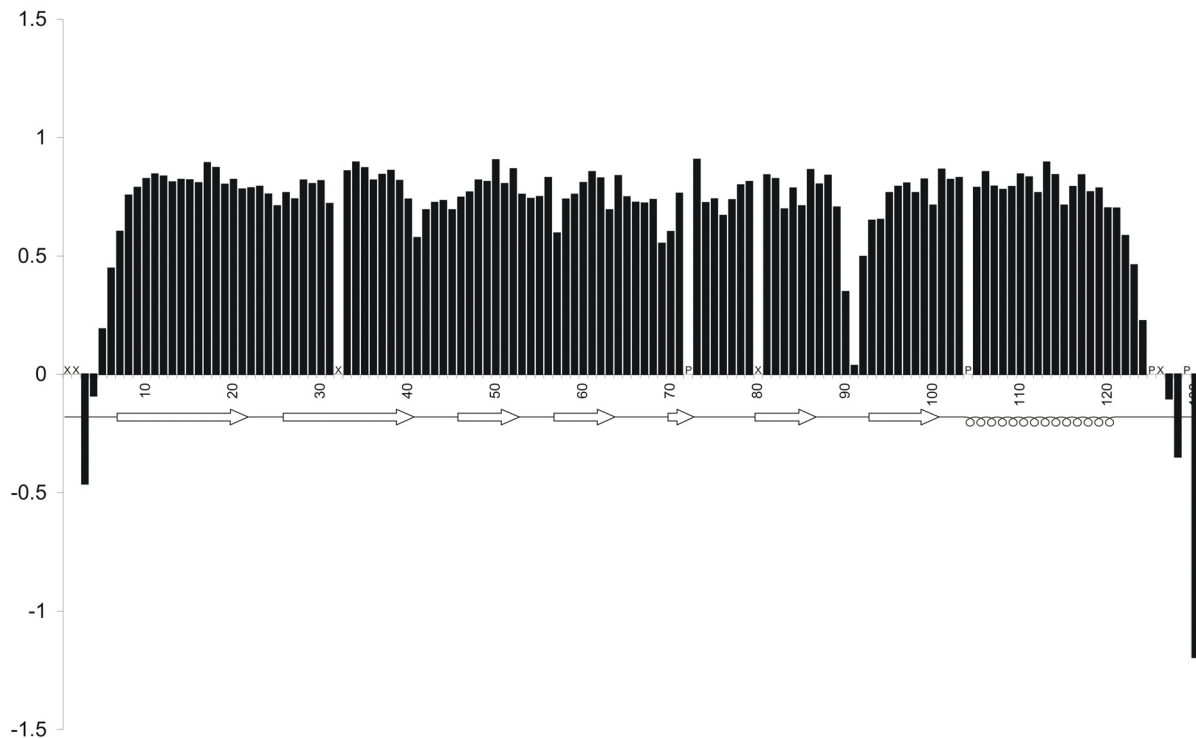


Abbildung 4.4:

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronukleare NOEs der Hauptkettenamidgruppen, bestimmt bei einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von 600 MHz bei 298 K unter Verwendung von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren. P kennzeichnet Proline und X fehlende Zuordnungen bzw. nicht aufgelöste Signale. Die Sekundärstruktur ist durch Pfeile ( $\beta$ -Stränge) und Schleifen ( $\alpha$ -Helices) dargestellt.

Die Sekundärstrukturelemente der RanBD2 sind in Form eines  $\beta$ -Fasses angeordnet, wobei die  $\beta$ -Stränge zwei rechtwinklig angeordnete antiparallele  $\beta$ -Faltblätter bilden und die  $\alpha$ -Helix quer darüber liegt (siehe Abbildung 4.5 A). Diese Anordnung entspricht der häufig anzutreffenden Faltung von Pleckstrin-Homologie-Domänen (PH-Domänen: Saraste und Hyvonen, 1995) und den dazu ähnlichen phosphotyrosinbindenden Domänen (PTB-Domänen: Yan et al., 2002). Wie die niedrigen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE-Werte (siehe Abbildung 4.4) und die erhöhten lokalen RMSD-Werte (siehe Abbildungen 4.3 B und 4.5 A) zeigen, handelt es sich bei der Schleife zwischen den  $\beta$ -Strängen 6 und 7 um den am stärksten flexiblen Teil des Proteins unter Ausnahme der beiden Termini. Im Gegensatz zu den mittels Röntgenkristallographie bestimmten homologen Strukturen der RanBD1 von RanBP2 (Vetter et al., 1999b) und von RanBP1 (Seewald et al., 2002) beinhaltet die ermittelte Struktur der RanBD2 auch den fünften  $\beta$ -Strang, der typischer Bestandteil der Faltung von PH-Domänen ist, jedoch in besagten Kristallstrukturen fehlt (siehe Abbildung 4.5). Dieser Unterschied könnte durch die Wechselwirkung der RanBDs mit der C-terminalen  $\alpha$ -Helix von Ran verursacht werden, da Ran in den genannten Kristallstrukturkomplexen vorhanden ist und die terminale Helix gerade entlang dieses Teils der Peptidkette der RanBD verläuft. Die

Auflösung der beiden Kristallstrukturen ist jedoch mit 2,9 Å bzw. 2,7 Å relativ schlecht. Eine Schlauchdarstellung (siehe Abbildung 4.5, untere Reihe), die die Unsicherheit der Atomkoordinaten veranschaulicht, die sich aus den kristallographischen B-Faktoren bzw. den lokalen RMSD-Werten der Lösungsstruktur ergibt, zeigt, dass gerade diese Region des Proteins in den Kristallstrukturen schlechter definiert ist als in der RanBD2-RanBP2-Struktur. Daher könnte es sich bei dem Fehlen von  $\beta$ -Strang 5 in den Kristallstrukturen auch um ein Problem der Kristallstrukturbestimmungen handeln.

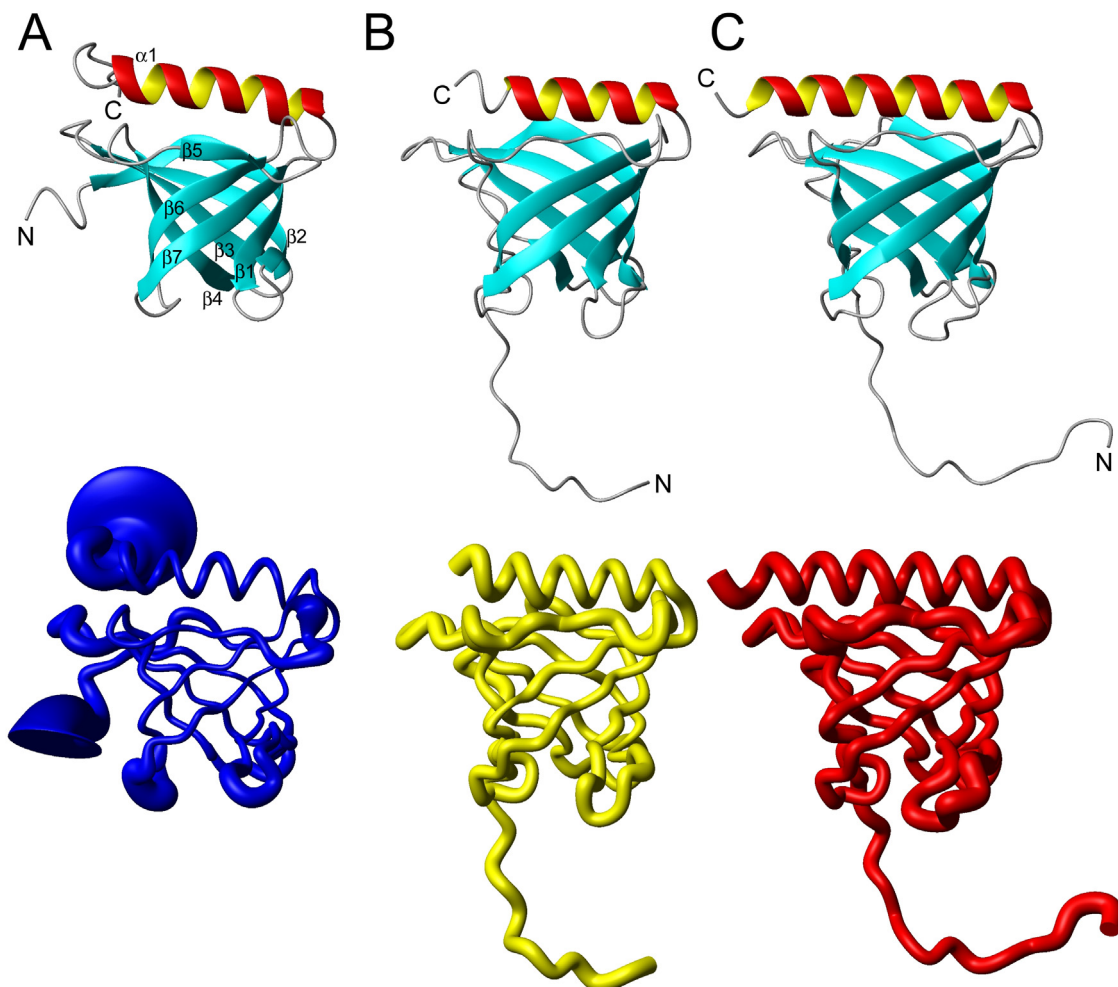


Abbildung 4.5: Strukturen der Ran-Bindedomänen im Vergleich

A: NMR-Struktur von RanBD2-RanBP2

B: Kristallstruktur von RanBD1-RanBP2 im Komplex mit Ran (Vetter et al., 1999b)

C: Kristallstruktur von RanBP1 im Komplex mit Ran und RanGAP (Seewald et al., 2002)

Obere Reihe: Bänderdarstellung der Struktur und ihrer Sekundärstrukturelemente

Untere Reihe: Schlauchdarstellung, wobei die Schlauchdicke den lokalen mittleren RMSD vom Mittel für die C $\alpha$ -Atompositionen der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen der RanBD2 von 200 berechneten veranschaulicht. Für die Kristallstrukturen wurden die RMSD-Werte der C $\alpha$ -Atompositionen mittels der Debye-Waller-Gleichung  $RMSD = \sqrt{\frac{f_B}{8\pi^2}}$  unter Annahme einer isotropen

Atombewegung aus den kristallographischen B-Faktoren berechnet.

In allen Darstellungen sind jeweils nur die Strukturen der RanBD abgebildet, alle jeweils in derselben Ansicht nach optimaler Überlagerung der Hauptkettenatome.

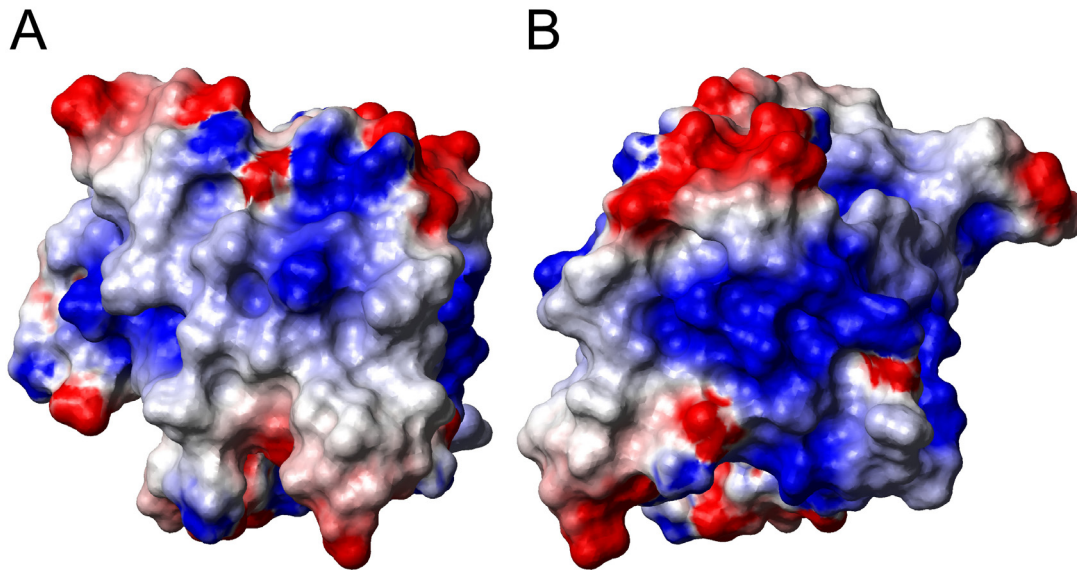


Abbildung 4.6: Elektrostatisches Oberflächenpotential der RanBD2

A: Oberflächenpotential der pseudoenergieärmsten Struktur, Orientierung des Moleküls wie in Abbildung 4.5 A

B: Wie in A nach einer Rotation von 90° um die z-Achse. Die basische Bindungsfläche, an die das DEDDDL-Motiv von Ran bindet, ist in der Mitte erkennbar.

Die stark geladene Oberfläche der erhaltenen RanBD2-Struktur zeigt auch eine basische Bindungsfläche, die von Arg14, Lys16, Lys100 und Lys102 gebildet wird und an die die C-terminalen letzten sechs sauren Reste von Ran ( $D^{211}EDDDL^{216}$ ) binden (Abbildung 4.6). Dieses Bindungsverhalten war bereits von Vetter und Mitarbeitern (Vetter et al., 1999b) aus der Kristallstruktur der RanBD1 im Komplex mit Ran postuliert worden, obwohl die entsprechenden Reste von Ran in der Struktur nicht aufgelöst waren. In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit (Geyer, 2003) konnte die Wechselwirkung der RanBD2 mit diesen Resten von Ran jedoch auch experimentell bestätigt werden.

#### 4.3.4 Die Wechselwirkung von RanBD2 mit dem C-Terminus von Ran

Im Rahmen der Veröffentlichung der RanBD2-Struktur wurden auch die Ergebnisse aus diesen früheren Arbeiten (Geyer, 2003) zur Wechselwirkung der RanBD2 mit dem C-Terminus von Ran nochmals vollständig überarbeitet und aktualisiert. So wurde die NMR-Struktur des für die Interaktionsstudien verwendeten Ran<sup>189-216</sup>-Peptids einer Strukturverfeinerung im Lösungsmittel Wasser anhand des Protokolls von Linge und Mitarbeitern (Linge et al., 2003) unter Verwendung von Xplor-NIH (Schwieters et al., 2006)

unterzogen. Die dabei in die Strukturrechnung eingeflossenen Beschränkungen und die strukturellen Parameter der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die erhaltene Struktur des Peptids ist in Abbildung 4.7 dargestellt.

Im finalen Ensemble der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen kann mit PROCHECK (Laskowski et al., 1996) eine  $\alpha$ -Helix identifiziert werden, die die Reste Pro3 – Ala16 (Ran Reste Pro191 – Ala204) umfasst. Dies stimmt mit der Analyse der  $H^\alpha$  chemischen Verschiebungen von Ran<sup>189-216</sup> überein (Geyer, 2003). Die Reste der Termini scheinen dagegen flexibel zu sein und zeigen keine definierte Struktur.

Darüber hinaus wurden für alle durchgeführten Titrationsuntersuchungen an der RanBD2 nochmals vollständig die kombinierten gewichteten chemischen Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta$  (entsprechend Gleichung (7)) unter Verwendung von neu aus der Madison NMR-Datenbank (Seavey et al., 1991) berechneten aktuellen Wichtungsfaktoren bestimmt. Abschließend konnten die so erhaltenen chemischen Verschiebungsänderungen der einzelnen Untersuchungen auf der Oberfläche der in dieser Arbeit

Beschränkungen	Anzahl
NOEs	
Total	278
Intraresiduell ( $i = j$ )	131
Sequentiell ( $ i-j  = 1$ )	93
Mittlere Reichweite ( $1 <  i-j  < 5$ )	53
Große Reichweite ( $ i-j  \geq 5$ )	1
Torsionswinkel $\Phi$ ; $\Psi$ (TALOS)	18
Gesamtzahl der Beschränkungen	296
Gesamtzahl der Beschränkungen pro Rest	10,6

Statistiken für die 20 pseudoenergieärmsten Strukturen (von 500 berechneten)	
NOE-Verletzungen $> 0,03$ nm	$0 \pm 0$
NOE-Verletzungen $> 0,05$ nm	$0 \pm 0$
Verletzungen von Diederwinkeln $> 5^\circ$	$0 \pm 0$
$E_{\text{Gesamt}}$	$-832 \pm 46$ kJ/mol
$E_{\text{NOE}}$	$9,5 \pm 2,2$ kJ/mol
$E_{\text{coil}}$	$1,5 \pm 2,3$ kJ/mol
Ramachandranstatistik	
Bevorzugt	$72,7 \pm 8,6$ %
Erlaubt	$21,7 \pm 9,0$ %
Großzügig erlaubt	$2,3 \pm 3,2$ %
Verboten	$3,3 \pm 3,5$ %
NMR-R-Faktor	
Gesamt	0,36
Intraresiduelle Signale	0,15
Sequentielle Signale	0,24
Signale mittlerer Reichweite	0,21
Signale großer Reichweite	0,20
Interresiduelle Signale	0,23
Durchschnittlicher RMSD vom Mittelwert für Reste 3 - 16 (Ran Reste 191 - 204) <sup>a</sup>	
Hauptkettenatome	$0,075 \pm 0,019$ nm
Alle schweren Atome	$0,133 \pm 0,018$ nm

<sup>a</sup> Die RMSD-Werte wurden nur für den geordneten Teil von Ran<sup>189-216</sup> berechnet (Reste 3 bis 16).

Tabelle 4.2

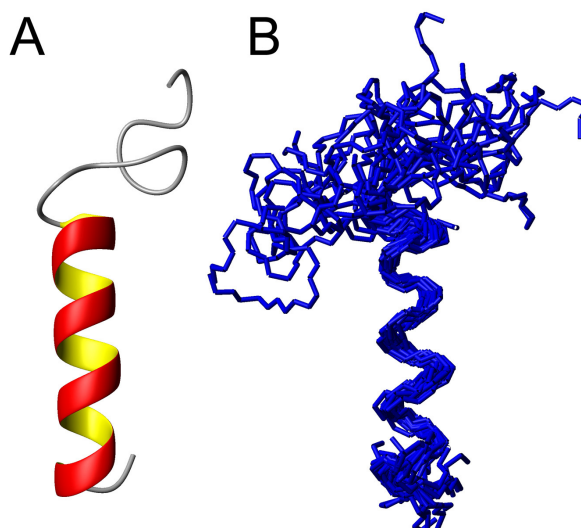


Abbildung 4.7: NMR-Struktur von Ran<sup>189-216</sup>

- A: Bänderdarstellung der pseudoenergieärmsten Struktur aus 500 berechneten  
 B: Darstellung der Proteinhauptkette der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen

ermittelten finalen Struktur der RanBD2 dargestellt werden, um die jeweiligen Bindungsoberflächen der einzelnen Peptide zu charakterisieren.

Da jedoch keine neuen Messungen zur Wechselwirkung der RanBD2 mit dem C-Terminus von Ran mehr durchgeführt wurden und damit die erhaltenen Aussagen auch inhaltlich im Vergleich zu denen aus der vorangegangenen Diplomarbeit im Wesentlichen dieselben geblieben sind, sollen die Daten an dieser Stelle nicht nochmals detailliert erörtert werden. Kurz zusammengefasst zeigen sie eine spezifische Bindung des Ran<sup>189-216</sup>-Peptids an die RanBD2 in einer den entsprechenden Kristallstrukturen (Seewald et al., 2002; Vetter et al., 1999b) vergleichbaren Weise, obwohl das isolierte DEDDDL-Motiv von Ran alleine keine spezifische Bindung gezeigt hatte. Diese Ergebnisse sind in der zusammenfassenden Veröffentlichung sämtlicher Daten zur Struktur der RanBD2 und ihrer Wechselwirkung mit dem C-Terminus von Ran (Geyer et al., 2005) ausführlich dargestellt.

## **4.4 Diskussion**

Ran-Bindeproteine leiten durch die Bindung ihrer Ran-Bindedomänen an die kleine GTPase Ran die Beendigung von Exportvorgängen durch die eukaryotische Kernmembran auf der zytosolischen Seite der Kernporen ein. Um die Wechselwirkung der Ran-Bindedomänen mit Ran besser zu verstehen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Struktur der freien zweiten Ran-Bindedomäne von RanBP2 NMR-spektroskopisch untersucht werden. Ausgehend von einer unvollständigen Zuordnung und einer nur schlecht definierten vorläufigen Struktur (Döker, 2002) wurde dazu zunächst die sequentielle Zuordnung des Proteins vor allem im Bereich der Seitenkettensignale deutlich erweitert. Anschließend wurden durch eine iterative automatische Zuordnung der NOESY-Spektren neue Strukturen berechnet und diese abschließend einer Strukturverfeinerung im Lösungsmittel Wasser unterzogen. Das letztlich erhaltene Ensemble der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen aus der Strukturrechnung entspricht einer gut definierten NMR-Struktur, wie unter anderem die RMSD-Werte des Bündels, seine Ramachandranqualität und die berechneten R-Werte zeigen (siehe Tabelle 4.1).

Die so erhaltene Lösungsstruktur der RanBD2-RanBP2 besitzt die typische  $\beta$ -Fass-Faltung von Pleckstrin-Homologie-Domänen (PH-Domänen: Saraste und Hyvonen, 1995) bzw. phosphotyrosinbindenden Domänen (PTB-Domänen: Yan et al., 2002) bestehend aus



sieben  $\beta$ -Strängen und einer darüber liegenden  $\alpha$ -Helix. Diese Struktur steht im Einklang mit der aus den  $H^\alpha$ ,  $C^\alpha$ , C und  $C^\beta$  chemischen Verschiebungen ermittelten Sekundärstruktur der Domäne. Wie die gemessenen heteronuklearen  $^1H$ - $^{15}N$ -NOE-Werte der Hauptkettenamidgruppen zeigen, besteht die Domäne aus einem durch die genannten Sekundärstrukturelemente gebildeten stabilen Kern sowie hochgradig flexiblen Termini. Von den Schleifen des Proteins ist darüber hinaus die Schleife zwischen den  $\beta$ -Strängen 6 und 7 besonders flexibel. Dabei handelt es sich aber offenbar um eine typische Eigenschaft von PH-Domänen, wie z. B. Probleme bei der sequentiellen Zuordnung dieser Region im Rahmen der NMR-Strukturbestimmungen von anderen PH-Domänen zeigen (Auguin et al., 2004; Fushman et al., 1995). Eine weitere für PH-Domänen typische Eigenschaft der hier vorgestellten RanBD2-Struktur ist ihre stark geladene Oberfläche (Saraste und Hyvonen, 1995; Gibson et al., 1994).

Im Gegensatz zu den Kristallstrukturen der homologen RanBD1 von RanBP2 im Komplex mit Ran (Vetter et al., 1999b) bzw. von RanBP1 im Komplex mit Ran und RanGAP (Seewald et al., 2002) enthält die Struktur auch den fünften  $\beta$ -Strang, der typischer Bestandteil der PH-Domänenfaltung ist (Saraste und Hyvonen, 1995). Insgesamt betrachtet sind die beiden Ran-Bindedomänen der genannten Kristallstrukturen einander sehr ähnlich, wenn man deren Auflösung berücksichtigt, während einige strukturelle Unterschiede zur RanBD2 NMR-Struktur erkennbar sind. Im Folgenden sollen diese Unterschiede detaillierter betrachtet werden. Für diese strukturellen Vergleiche werden zunächst jeweils die Hauptketten der beiden zu vergleichenden Strukturen optimal überlagert. Anschließend werden nur Differenzen - also lokale paarweise RMSD-Werte - zwischen den beiden Hauptketten in Betracht gezogen, die größer sind als die Summe der lokalen Koordinatenunsicherheiten der beiden Strukturen. Für die NMR-Struktur wird diese Koordinatenunsicherheit dabei durch den lokalen mittleren RMSD zum Mittel des NMR-Ensembles repräsentiert und für die Kristallstrukturen durch den lokalen RMSD-Wert, der sich aus den kristallographischen B-Faktoren errechnet (siehe dazu die Bildunterschrift zu Abbildung 4.5).

Vergleicht man RanBD1-RanBP2 und RanBP1 auf diese Weise (siehe Abbildung 4.8 A), ergeben sich nur für zwei Bereiche der Bindedomäne kleine Unterschiede, nämlich die Schleife zwischen  $\beta$ -Strängen 1 und 2 und das Ende von  $\beta$ -Strang 6. An beiden Stellen besitzt RanBP1 zwei bzw. eine Aminosäureinsertion im Vergleich zu RanBD1-RanBP2 und den anderen RanBDs von RanBP2, die durch ihren räumlichen Anspruch eine kleine Reorientierung der Hauptkette in diesen Bereichen bewirken. Vergleicht man die

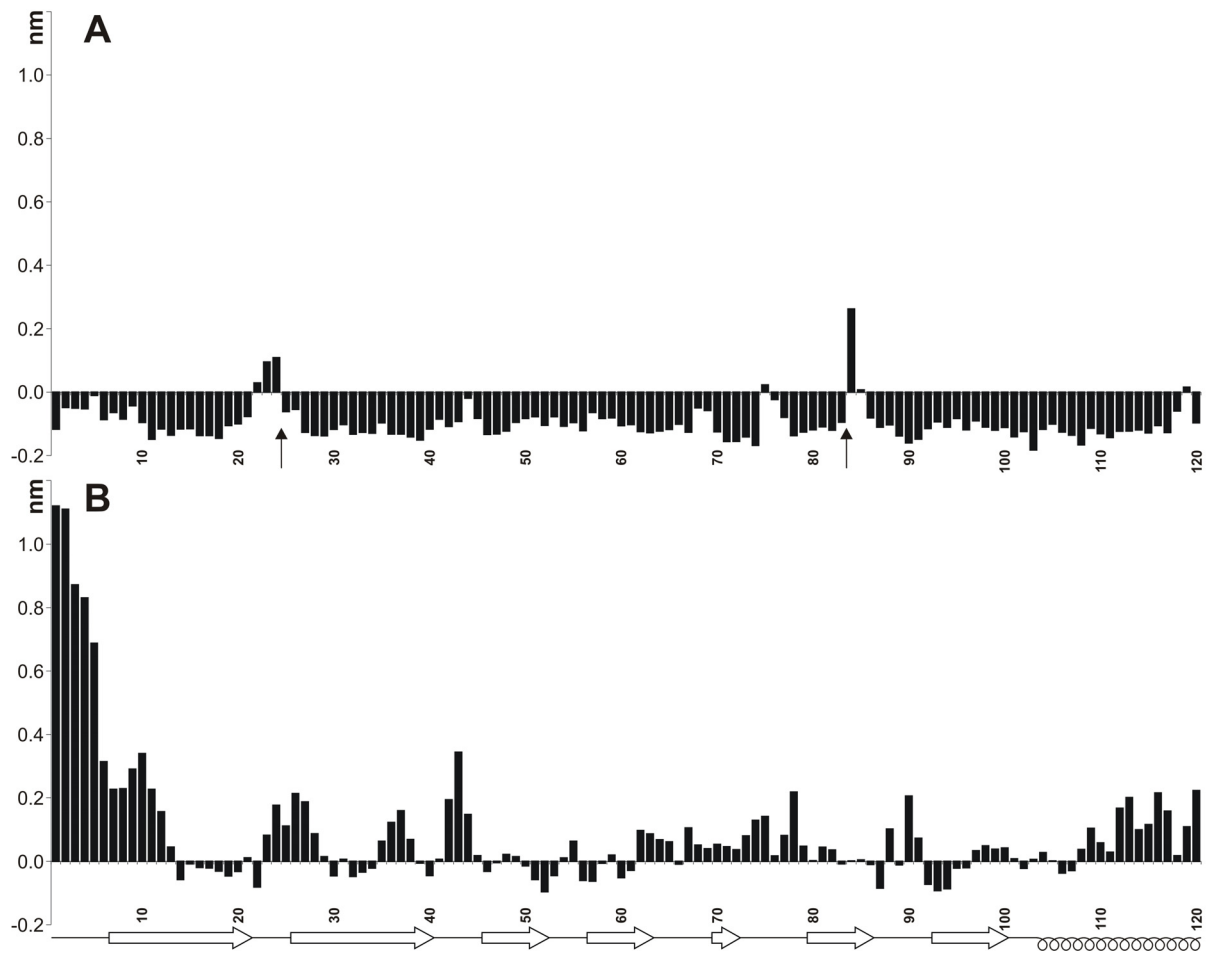


Abbildung 4.8: Unterschiede zwischen den Strukturen von Ran-Bindedomänen

A: Vergleich von RanBP1 (Seewald et al., 2002) mit RanBD1-RanBP2 (Vetter et al., 1999b). Die Pfeile markieren die Stellen, an denen RanBP1 zwei bzw. eine Aminosäureinsertion im Vergleich zu den RanBDs von RanBP2 besitzt.

B: Vergleich von RanBD2-RanBP2 (diese Arbeit) mit RanBD1-RanBP2 (Vetter et al., 1999b).

Dargestellt sind jeweils die lokalen paarweisen RMSD-Werte der Hauptketten der beiden betrachteten Strukturen abzüglich der lokalen Koordinatenunsicherheiten (NMR-Struktur: mittlerer RMSD zum Mittel, Kristallstrukturen: aus den B-Faktoren berechneter RMSD; siehe Bildunterschrift zu Abbildung 4.5), aufgetragen gegen die Sequenz von RanBD2. Negative Werte bedeuten somit, dass der beobachtete Strukturunterschied innerhalb der Koordinatenunsicherheiten liegt. Die Sekundärstruktur von RanBD2 ist durch Pfeile ( $\beta$ -Stränge) und Schleifen ( $\alpha$ -Helices) dargestellt.

RanBD2-RanBP2 NMR-Struktur mit RanBD1-RanBP2 (siehe Abbildung 4.8 B), stellt die Umorientierung des in Lösung flexiblen N-Terminus der RanBD2 den größten Unterschied zwischen den beiden Strukturen dar. Dies wird unmittelbar begleitet von einer kleinen Umorientierung des Endes des ersten  $\beta$ -Faltblatts (Anfang von  $\beta$ -Strang 1 und Ende von  $\beta$ -Strang 2 inklusive der Schleife danach). Weiterhin gibt es Konformationsunterschiede in der Schleife zwischen den  $\beta$ -Strängen 1 und 2 und der sehr flexiblen Schleife nach  $\beta$ -Strang 6. Darüber hinaus kommt es zu einer kleinen Reorientierung der gesamten Region zwischen dem Ende von  $\beta$ -Strang 4 und dem Anfang von  $\beta$ -Strang 6 inklusive dem gesamten  $\beta$ -Strang 5. Abschließend gibt es eine kleine Veränderung der Lage der C-terminalen  $\alpha$ -Helix



insbesondere ihres Endes. Wenn man die RanBD2-Struktur mit RanBP1 vergleicht, sind die Unterschiede sehr ähnlich zu den eben für RanBD1-RanBP2 beschriebenen, da die beiden Kristallstrukturen wie oben beschrieben ja sehr ähnlich sind. Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass für das Fehlen von  $\beta$ -Strang 5 in den beiden publizierten Kristallstrukturen von Ran-Bindedomänen (Seewald et al., 2002; Vetter et al., 1999b) einerseits zwar nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass dieser Unterschied lediglich durch die im Vergleich zur NMR-Struktur niedrigere Auflösung der Kristallstrukturen verursacht wird (siehe Abbildung 4.5). Es erscheint andererseits jedoch plausibel, dass dieser Unterschied durch die Bindung der C-terminalen Helix von Ran an diesen Bereich der RanBD verursacht wird. In den beiden Kristallstrukturkomplexen ist die C-terminale Helix von Ran um die RanBD gewickelt, interagiert dabei mit der  $\beta$ -Strang 5 Region der Bindedomäne und führt dadurch wahrscheinlich zu der beobachteten Reorientierung dieser Region.

Dieser Schluss wird durch die Ergebnisse aus der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit unterstützt (Geyer, 2003). Die dort durchgeführte NMR-Titrationsstudie an der RanBD2 mit einem Peptid, das den letzten 28 Aminosäuren des C-Terminus von Ran entspricht, zeigt unter anderem auch eine starke Wechselwirkung dieses Peptids mit dem  $\beta$ -Strang 5 der Ran-Bindedomäne. Dies kann durchaus auch zu einer Änderung der lokalen Konformation der Hauptkette führen, was den Verlust des Sekundärstrukturelements zur Folge hat. Diese Untersuchung zeigte auch die spezifische Interaktion dieses Peptids mit einer basischen Bindungsoberfläche auf der hier berichteten Struktur der RanBD2, die von Arg14, Lys16, Lys100 und Lys102 gebildet wird (siehe Abbildung 4.6 B). Die Bindung der letzten sechs sauren Reste von Ran an diese basische Oberfläche war bereits zuvor aus der Kristallstruktur der RanBD1 im Komplex mit Ran postuliert worden (Vetter et al., 1999b), obwohl die entsprechenden Reste von Ran in der Struktur nicht aufgelöst waren. Die Titrationsstudie mit dem Ran<sup>189-216</sup>-Peptid konnte diese Vermutung bestätigen. Die NMR-Struktur dieses Peptids wurde in der vorliegenden Arbeit nochmals einer Strukturverfeinerung im Lösungsmittel Wasser unterzogen. Die Tatsache, dass das Peptid in Lösung eine  $\alpha$ -Helix wie im vollständigen Ran bildet, macht es wahrscheinlich, dass dieser Bereich von Ran auch in den Komplexen mit Importinen eine Helix bildet. In den entsprechenden Kristallstrukturen (Chook und Blobel, 1999; Vetter et al., 1999a) ist dieser Bereich zwar zur Lösung exponiert, jedoch konnten die endständigen Reste von Ran nicht oder nur teilweise aufgelöst werden.

Zusammenfassend stehen die Daten aus dieser Arbeit und der vorangegangenen Diplomarbeit in Einklang mit Modellen des eukaryotischen Kerntransports, die von einer Erkennung der Exportkomplexe durch die RanBDs über den in den Komplexen exponierten

Ran C-Terminus ausgehen (Bischoff et al., 2002; Nilsson et al., 2001; Vetter et al., 1999a; Richards et al., 1995). Dass dieser Terminus in den Transportkomplexen frei zugänglich ist, konnte bereits in verschiedenen biochemischen Studien (Plafker und Macara, 2002; Nilsson et al., 2001; Hieda et al., 1999) und den entsprechenden Kristallstrukturen (Chook und Blobel, 1999; Vetter et al., 1999a) gezeigt werden. Die auf der zytoplasmatischen Seite der Kernporen lokalisierten Ran-Bindedomänen erkennen diese „Markierung“ des Transportkomplexes, binden darüber an das RanGTP in den Komplexen und ermöglichen durch das Wegfangen des Ran C-Terminus auch den Zugang von RanGAP zu RanGTP (Madrid und Weis, 2006; Richards et al., 1995). Dies führt schließlich über die Hydrolyse des gebundenen GTPs zum Zerfall des Transportkomplexes und damit zur Beendigung des Exportprozesses.

# **5 Die zentrale Schleife des Saccharosetransporters PmSUC3**

## **5.1 Einleitung**

### **Der Nährstofftransport in Pflanzen**

Wie in allen hoch entwickelten vielzelligen Lebewesen sind auch in höheren Pflanzen einzelne Aufgaben im Organismus auf jeweils dafür spezialisierte Organe verteilt. So sind z. B: die photosynthetisch aktiven Gewebe der Blätter auf die Assimilation von CO<sub>2</sub> und den Aufbau organischer Verbindungen spezialisiert, während die Aufnahme von Wasser und Mineralstoffen in den Wurzeln stattfindet. Da aber alle Gewebe der Pflanze sowohl auf organische Nährstoffe als auch auf Wasser und Mineralstoffe angewiesen sind, ist ein effizientes System zur Umverteilung dieser Substanzen zwischen den verschiedenen Geweben notwendig. Dazu haben die Pflanzen ein vaskuläres System entwickelt. die sog. Leitbündel. Diese lassen sich in zwei funktionelle Einheiten gliedern: Das Xylem und das Phloem. Das Xylem dient dem Transport von Wasser und Mineralstoffen aus der Wurzel zu den Blättern, während das Phloem für den Transport organischer Nährstoffe in entgegengesetzter Richtung sorgt. Bei den im Phloem transportierten Photoassimilaten handelt es sich um eine Vielzahl verschiedener Zuckerverbindungen, den am weitesten verbreiteten Transportzucker stellt jedoch das Disaccharid Saccharose dar (Lalonde et al., 2004).

Im Phloem erfolgt der Transport der Nährstoffe je nach Pflanzenart in den sog. Siebzellen oder den kernlosen Zellen der sog. Siebröhren. Der Austausch von Nährstoffen mit den Zellen der umgebenden Gewebe kann je nach Pflanzenart grundsätzlich entweder symplastisch, d. h. über Plasmodesmata, oder apoplastisch erfolgen, d. h. durch Zellmembranen hindurch. Generell sind aber nicht alle Zellen einer Pflanze über Plasmodesmata verbunden (Oparka et al., 1994). Bei höheren Pflanzen findet z. B. auch die Beladung des Phloems mit Nährstoffen in den photosynthetisch aktiven Geweben in der Regel auf apoplastischem Weg statt (Lalonde et al., 2004). Daher benötigen Pflanzen membranständige Transportproteine, die den einzelnen Transportzuckern in den verschiedenen Geweben den Durchtritt durch die Plasmamembranen ermöglichen.

## Pflanzliche Saccharosetransporter

Bereits in den 60er Jahren wurde die Existenz eines solchen aktiven Transportsystems für den Haupttransportzucker Saccharose postuliert (Sovonick et al., 1974). Zunächst konnte die Existenz eines solchen Systems in biochemischen Studien aber nur indirekt gezeigt werden. In den 90er Jahren gelang jedoch schließlich die Klonierung und Charakterisierung des ersten Saccharosetransporters aus Spinat (Riesmeier et al., 1992), von dem inzwischen zahlreiche Homologe identifiziert werden konnten (Lalonde et al., 2004). Die Nomenklatur der Saccharosetransporter ist in der Literatur dabei leider nicht einheitlich, meist werden diese aber mit SUT (*Sucrose Transporter*) oder mit SUC (*Sucrose Carrier*) abgekürzt. Phylogenetische Analysen der bekannten Saccharosetransporter haben gezeigt, dass sich diese in insgesamt drei Unterfamilien untergliedern: Die sog. SUT1/SUC2-Familie, die SUT2/SUC3-Familie und die SUT4-Familie (siehe Abbildung 5.1). Pflanzen besitzen dabei jeweils mehrere verschiedene Transporter, *Arabidopsis* enthält z. B. insgesamt neun Saccharosetransportergene, sieben davon aus der SUT1-Familie (Sauer et al., 2004). Da Pflanzen mehrere Saccharosetransporter gleichzeitig besitzen, handelt es sich beim Saccharosetransport offenbar um einen hochkomplexen und detailliert regulierten Prozess bei dem die einzelnen Transporter neben der reinen Transportfunktion jeweils spezialisierte Aufgaben übernehmen, wie z. B. die spezifische Steuerung des Saccharosetransports in bestimmten Geweben oder Entwicklungsstufen.

Bei den Saccharosetransportern handelt es sich um integrale Membranproteine, die insgesamt zwölf  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen

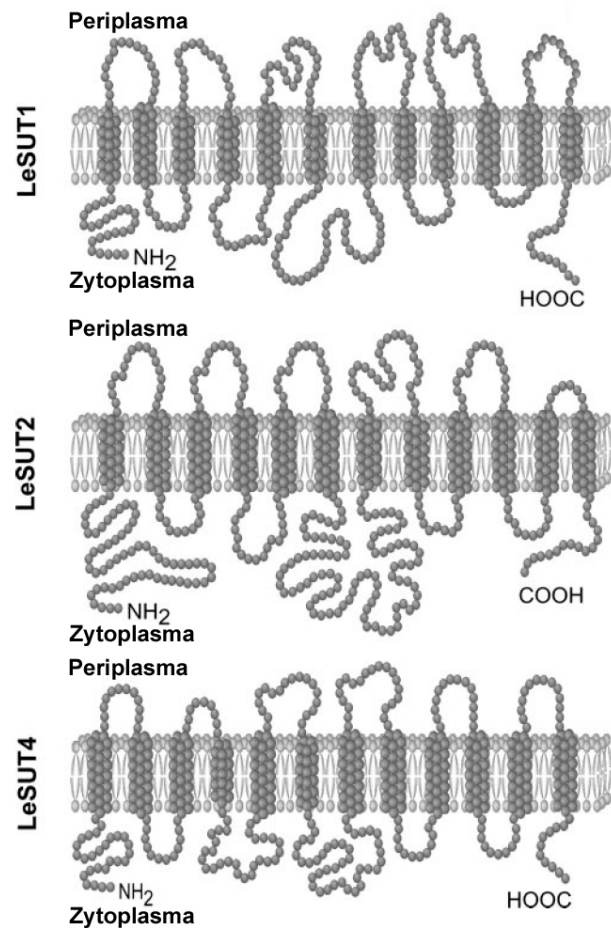


Abbildung 5.1: Vergleich der postulierten Strukturen der Saccharosetransporter des SUT1/SUC2-, SUT2/SUC3- und SUT4-Typs am Beispiel der Transporter aus *Lycopersicon esculentum*. Der verlängerte N-Terminus und die verlängerte zytoplasmatische Schleife des SUT2/SUC3-Typs sind erkennbar. Abbildung modifiziert nach Lalonde (Lalonde et al., 2004).

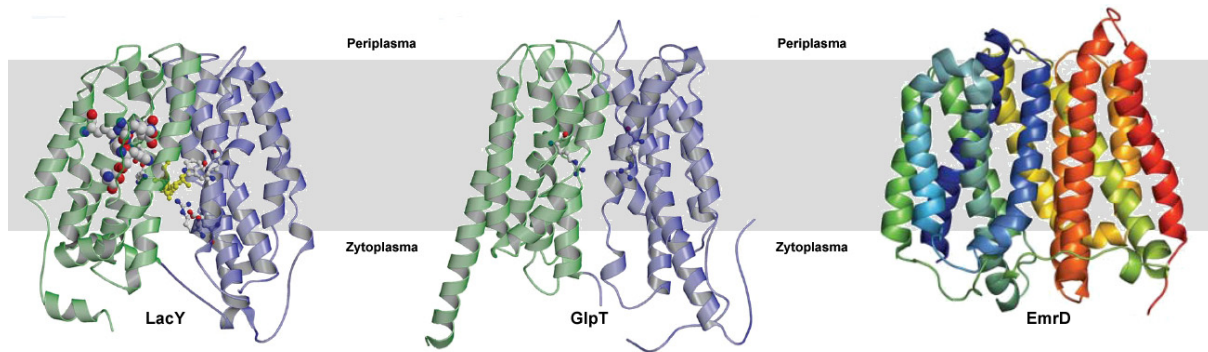


Abbildung 5.2: Strukturen von Transportern der *major facilitator superfamily*. Links der LacY-Transporter aus *E. coli* (Abramson et al., 2003), in der Mitte der GlpT-Transporter aus *E. coli* (Huang et al., 2003) und rechts der EmrD-Transporter aus *E. coli* (Yin et al., 2006). Abbildung modifiziert nach Locher (Locher et al., 2003) und Yin (Yin et al., 2006).

besitzen (siehe Abbildung 5.1). Der N- und der C-Terminus liegen dabei zusammen mit fünf der elf Schleifenregionen auf der zytoplasmatischen Membranseite. Die Proteine untergliedern sich in zwei homologe Hälften aus jeweils sechs Transmembrandomänen. Die Transporter sind daher offenbar aus einer Genduplikation eines nur sechsspännigen Vorläuferproteins entstanden, das ursprünglich nur ein nicht-kovalentes Dimer bildete (Lalonde et al., 2004). Wie in elektrophysiologischen Messungen gezeigt werden konnte, handelt es sich bei den Saccharosetransportern um Protonen-Saccharose-Cotransporter mit einer 1:1 Stöchiometrie bzgl. des Transports von Protonen und Saccharose (Boorer et al., 1996). Damit gehören die Saccharosetransporter zur Familie der Glykosid-Pentosid-Hexuronid/Kationen-Symporter, bei der es sich wiederum um ein Mitglied der *major facilitator superfamily* (MFS) von Membrantransportern handelt. Von den zahlreichen Mitgliedern dieser Superfamilie konnten bisher nur die Strukturen von drei verschiedenen Transportern aus Bakterien aufgeklärt werden (siehe Abbildung 5.2): Die Strukturen der Laktosepermease (Mirza et al., 2006; Abramson et al., 2003), des Glycerin-3-Phosphat-Transporters (Huang et al., 2003) und des Multidrug-Transporters EmrD (Yin et al., 2006). Alle drei zeigen eine grundsätzlich ähnliche Anordnung der zwölf Transmembranhelices in der Membran, die damit ein typisches Merkmal der MFS-Transporter zu sein scheint. Die Hauptunterschiede zwischen den Strukturen liegen in den zum Inneren der Pore gerichteten Helices, da die Pore den jeweiligen Substraten optimal angepasst sein muss.

## Die Klasse der SUT2/SUC3-Transporter

In Dikotyledonen geht die Unterteilung der Saccharosetransporter in drei Unterfamilien mit strukturellen oder funktionellen Unterschieden einher, so sind z. B. die Affinitäten der

einzelnen Familien für Saccharose unterschiedlich. Die SUT2/SUC3-Familie unterscheidet sich dabei besonders stark von den anderen beiden Unterfamilien. Kennzeichnend für diese Familie sind v. a. ein verlängerter N-Terminus und eine vergrößerte zentrale Schleife, die die beiden Hälften des Transporters verbindet (siehe Abbildung 5.1). Teile dieser beiden Verlängerungen sind darüber hinaus zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert, sogar zwischen Mono- und Dikotyledonen. Innerhalb der zentralen zytoplasmatischen Schleife gibt es dabei zwei hoch konservierte Sequenzbereiche, die als *central conserved boxes* (CCB) CCB1 und CCB2 bezeichnet werden (siehe Abbildung 5.3). Die hohe Konservierung der Sequenzen auch zwischen nur entfernt verwandten Pflanzenarten spricht für eine wichtige spezifische Funktion dieses Transportertyps, insbesondere da dieser Transporter scheinbar in allen höheren Pflanzen vorkommt.

Dennoch scheint der SUT2-Transportertyp zumindest unter Standardbedingungen nicht überlebensnotwendig für die Pflanzen zu sein (Barth et al., 2003). Darüber hinaus konnte zwar eine Saccharosetransportaktivität gezeigt werden (Schulze et al., 2000; Meyer et al., 2000), jedoch scheint die konservierte Insertion in der zentralen Schleife nicht für diese Transportaktivität notwendig zu sein (Meyer et al., 2000). Für die Insertion im N-Terminus ist das noch unklar (Meyer, 2003; Schulze et al., 2000). Aufgrund dieser Befunde wird für den SUT2-Transporter eine Funktion als Sensorprotein für die Saccharosekonzentration oder -flussrate diskutiert (Lalonde et al., 2004). Die vergrößerte zentrale Schleife, die im Zytoplasma lokalisiert ist (Barth, 2005), könnte dabei entweder an der Sensorfunktion beteiligt sein, oder aber die Wechselwirkung mit anderen Proteinen insbesondere anderen Saccharosetransportern vermitteln. All diese Überlegungen sind jedoch zum momentanen Zeitpunkt noch spekulativ.

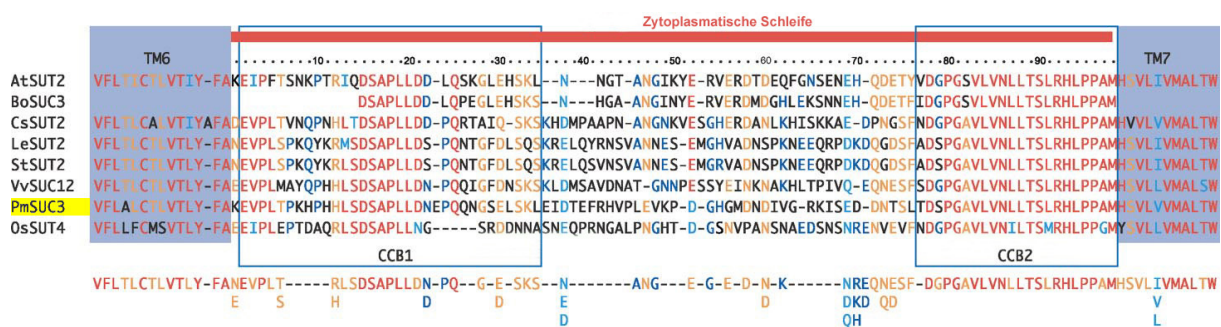


Abbildung 5.3: Sequenzvergleich von Saccharosetransportern  
Vergleich der Sequenzen der zentralen Schleifen von Saccharosetransportern des SUT2/SUC3-Typs aus *Arabidopsis* (AtSUT2), *Brassica oleraceae* (BoSUC3), *Plantago major* (PmSUC3), *Citrus sinensis* (CsSUT2), *Lycopersicon esculentum* (LeSUT2), *Vitis vinifera* (VvSUC12) und *Oryza sativa* (OsSUT4). Transmembranbereiche (TM), die zytoplasmatische Schleife und konservierte Sequenzbereiche (CCB) sind gekennzeichnet. Perfekt konservierte Reste sind in rot dargestellt, in vier Spezies konservierte Reste in orange und in drei Spezies konservierte Reste in blau. Abbildung modifiziert nach Lalonde (Lalonde et al., 2004).

## Zielsetzung der Arbeit

Um einen Einblick in die physiologische Funktion der SUT2/SUC3-Transporter und insbesondere ihrer zentralen zytoplasmatischen Schleife zu erhalten, sollte in dieser Arbeit ein Konstrukt der isolierten Schleifendomäne NMR-spektroskopisch charakterisiert werden. Die zentrale Schleife der SUT2/SUC3-Transporter ist mit fast 100 Aminosäuren deutlich länger als die entsprechenden Schleifen aus den bekannten MFS-Strukturen (siehe oben, dort jeweils 25 bis 44 Aminosäuren) und könnte damit durchaus eine eigenständige Faltung besitzen. An Proteinproben eines Konstrukts der zentralen Schleife des SUC3-Transporters aus *Plantago major* sollte zunächst die sequentielle Zuordnung ermittelt und später die Struktur der Domäne charakterisiert werden, um dadurch Aussagen über deren mögliche Funktion zu erhalten. Da für die zentrale Schleife auch eine Beteiligung an der postulierten Sensorfunktion diskutiert wird, sollte in diesem Zusammenhang insbesondere auch eine mögliche direkte Wechselwirkung mit der Saccharose überprüft werden.

## 5.2 Materialien und Methoden

### Materialien

Die Proteinproben der zentralen Schleifendomäne des Saccharosetransporters PmSUC3 aus *Plantago major* wurden freundlicherweise von Prof. Norbert Sauer von der Universität Erlangen zur Verfügung gestellt. Die Reste 2-95 dieses sog. pIB42-Konstrukts (Sequenz siehe Anhang 7.2) entsprechen dabei den Resten 277-370 von PmSUC3 (Swiss-Prot Eintrag Q7X9X8). Bei den Resten 1 bzw. 96-100 des Konstrukts handelt es sich um Klonierungsartefakte bzw. die Affinitätsmarkierung zum Aufreinigen des Proteins. Die Klonierung, Expression und Aufreinigung des Konstrukts wurde von Inga Barth (Barth, 2005) beschrieben.

Die NMR-Proben von pIB42 enthielten 9,2 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH=6,5 und 0,1 mM DSS in 93%  $H_2O$  / 7%  $D_2O$ . Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0,92 mM unter Verwendung von  $^{15}N$ -angereichertem bzw. nicht isotopenmarkiertem pIB42.

## **NMR-Messungen**

Sämtliche NMR-Messungen wurden an 600 MHz und 800 MHz Bruker Avance Spektrometern mit TXI- bzw. TCI-Kryoprobenköpfen bei 283 K durchgeführt. Die Temperatur wurde dabei mit Hilfe einer Ethylenglykol-Probe kalibriert (Raiford et al., 1979). Zur sequentiellen Zuordnung wurden 2D-TOCSY- (Mischzeiten 55 und 80 ms), 2D-NOESY- (Mischzeiten 80 bis 150 ms),  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC- bzw. -TROSY-,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC- bzw. -TOCSY-TROSY- (Mischzeiten 55 ms und 80 ms) und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOESY-TROSY- bzw. -NOESY-HSQC-Spektren (Mischzeit 150 ms) aufgenommen. Für die Analyse der Dynamik des Proteinerückgrats wurden  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOEs mittels  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren unter Verwendung von Standardpulsprogrammen (Li und Montelione, 1994) bei 600 MHz gemessen. Die dabei notwendige Breitband-Sättigung der Amidprotonen erfolgte für 5 s unter Verwendung einer GARP-Entkopplung (Shaka et al., 1985). Die Auswertung erfolgte entsprechend Gleichung (1).

Sämtliche chemischen Verschiebungen von Protonen wurden auf internes DSS referenziert und die  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungen wurden unter Verwendung der Umrechnungsfaktoren von Wishart et al. (Wishart et al., 1995b) indirekt auf DSS referenziert. Alle Spektren wurden mit Hilfe der Softwarepakete XWINNMR bzw. Topspin von Bruker prozessiert. Die weitere Analyse der Spektren erfolgte mit Hilfe des Softwarepakets AUREMOL (Gronwald und Kalbitzer, 2004).

## **Strukturelle Parameter**

Die NOE-Distanzbeschränkungen für die Strukturrechnungen wurden mittels automatischer Zuordnung von NOESY-Spektren unter Verwendung des KnowNOE-Moduls in AUREMOL (Gronwald und Kalbitzer, 2004; Gronwald et al., 2002) gewonnen. Dazu wurden ein 2D-NOESY- und ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC- bzw. -NOESY-TROSY-Spektrum verwendet. Alle gewonnenen Distanzen wurden direkt aus den Signalvolumina gewonnen. Zusätzlich wurden Torsionswinkelbeschränkungen unter Verwendung des Programms TALOS (Cornilescu et al., 1999) aus den chemischen Verschiebungen der Hauptkettenatome gewonnen.



## Strukturrechnungen

Die Proteinstrukturen wurden mit Hilfe des *simulated annealing* Protokolls des Programms CNS 1.1 (Brünger et al., 1998) berechnet. Ausgehend von einer gestreckten Startstruktur wurden bei der Hochtemperaturphase der Molekulardynamiksimulation dabei 1000 Schritte im Torsionswinkelraum mit einem Abstand von je 0.015 ps bei 50000 K berechnet. In der ersten Abkühlungsphase wurden beginnend mit einer Starttemperatur von 50000 K wieder 1000 Schritte im Torsionswinkelraum mit einem Abstand von je 0.015 ps simuliert. In der zweiten Abkühlungsphase wurden dann 3000 Schritte im kartesischen Raum mit einem Abstand von je 0.005 ps ausgehend von einer Starttemperatur von 3000 K berechnet. Abschließend folgte eine finale Pseudoenergieminimierungsphase bestehend aus 30 Zyklen mit je 300 Schritten verwendet. Für alle übrigen Parameter wurden die jeweiligen Standardwerte des *simulated annealing* Protokolls von CNS verwendet.

## Analysen

Die chemischen Verschiebungen der  $H^{\alpha}$  wurden manuell und unter Verwendung des Programms csi (zu finden unter <http://www.pence.ca/software/csi>) nach der Methode von Wishart und Mitarbeitern analysiert (Wishart et al., 1995a; Wishart und Sykes, 1994). Dabei wurden auch zusätzlich die Effekte der jeweils umliegenden Aminosäuren nach der Methode von Schwarzingen und Mitarbeitern (Schwarzingen et al., 2001) und dabei insbesondere der Effekt nachfolgender Proline (Wishart et al., 1995a) berücksichtigt.

Darüber hinaus wurden Vorhersagen für die Sekundärstruktur von pIB42 aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe der Programme GOR4 (Garnier et al., 1996), HNN (Guermeur, 1997), Jpred (Cuff et al., 1998), nnPredict (Kneller et al., 1990), NPS@ (Combet et al., 2000), Prof (Ouali und King, 2000), PSIPred (McGuffin et al., 2000), SOPMA (Geourjon und Deleage, 1995) und SSpro (Pollastri et al., 2002) berechnet. Außerdem wurde die Sekundärstruktur aus einem 2D-TOCSY-Spektrum nach der Methode von Wishart und Mitarbeitern (Wishart et al., 1991) abgeschätzt.

Die aus den Strukturrechnungen erhaltenen Strukturen wurden unter Verwendung des Programme MOLMOL (Koradi et al., 1996) visualisiert.

## NMR-Titrationsstudie zur Wechselwirkung von pIB42 und Saccharose

Um eine mögliche direkte Wechselwirkung der zentralen Schleife von PmSUC3 mit Saccharose zu untersuchen, wurde Saccharose in Form einer 100 mM bzw. 1M Stammlösung in 10 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH=6,5 in 95%  $H_2O$  / 5%  $D_2O$  in schrittweise steigenden Konzentrationen zu der pIB42-Probe bis zu einem zwanzigfachen molaren Überschuss zugegeben. Die Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen wurde dabei analysiert auf Basis der beobachteten Signaländerungen in 1D- $^1H$ - und 2D- $^1H$ - $^{15}N$ -TROSY-Spektren, die bei 283 K und einer Protonenfrequenz von 800 MHz aufgenommen wurden. Alle TROSY-Spektren wurden dabei mit einer Auflösung von 2048 \* 512 Punkten und einer Frequenzbreite von 8013 \* 2595 Hz aufgenommen. Die anfängliche Konzentration von pIB42 betrug dabei 0,92 mM und Saccharose wurde in folgenden molaren Konzentrationsverhältnissen (pIB42 zu Saccharose) zugegeben: 1:0; 1:0,1; 1:0,2; 1:0,4; 1:0,7; 1:1,0; 1:2; 1:3; 1:5; 1:7; 1:10; 1:15 und 1:20.

## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 Ausgangspunkt der Arbeit

In dieser Arbeit wurde die isolierte zentrale Schleifendomäne des Saccharosetransporters PmSUC3 aus *Plantago major* mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert. Dazu wurden Proteinproben eines entsprechenden Konstrukts freundlicherweise von Prof. Norbert Sauer von der Universität Erlangen zur Verfügung gestellt. Zunächst waren nicht isotopenmarkierte Proteinproben des Konstrukts aus *Plantago major* (pIB42) und eines gleichartigen Konstrukts aus *Arabidopsis thaliana* (pIB41) untersucht worden. Dabei hatte sich bei den ersten NMR-Messungen gezeigt, dass das pIB42-Konstrukt aus *Plantago* deutliche bessere Spektren lieferte. Daher wurden die NMR-Strukturuntersuchen völlig auf das *Plantago*-Konstrukt beschränkt. Da der zur Expression des pIB42-Proteins verwendete entsprechende *E.coli*-Stamm jedoch nur ein schlechtes Wachstum auf Minimalmedium zeigte, wurde auf eine Markierung mittels  $^{13}C$ -Glukose verzichtet und lediglich eine  $^{15}N$ -Markierung des Proteins vorgenommen. Die Klonierung, Expression und Reinigung sämtlicher beteiligter Konstrukte ist in der Dissertation von Inga Barth (Barth, 2005) beschrieben. Das letztlich verwendete pIB42-Konstrukt enthält dabei die

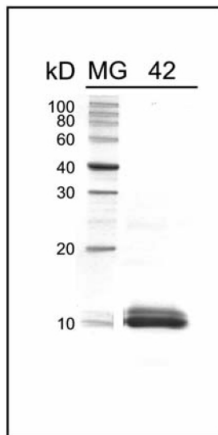


Abbildung 5.4:  
Auftrennung von 2 µg pIB42 nach der finalen  
Aufreinigung auf einem 15%igen Polyacrylamidgel nach  
Coomassie-Färbung, dargestellt für das nicht  
isotopenmarkierte Protein.  
Abbildung übernommen von Inga Barth (Barth, 2005).

Reste 277 - 370 von PmSUC3 und eine C-terminale 6xHIS-Markierung zum Aufreinigen des Proteins. Das Konstrukt besitzt ein Molekulargewicht von 11,1 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 5,9. Die zur Beurteilung der Reinheit des Proteins durchgeführte Analyse mittels Polyacrylamidgelelektrophorese ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

### 5.3.2 NMR-Messungen und sequentielle Zuordnung

Die verfügbaren Proben von pIB42 lieferten gut aufgelöste NMR-Spektren und zeigten sich auch bei Langzeitmessungen als sehr stabil. In Abbildung 5.5 ist ein 1D-Spektrum des Proteins dargestellt und man erkennt ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Die Dispersion der Amidprotonensignale ist jedoch relativ gering, sie sind zwischen 7,9 und 8,9 ppm verteilt. Darüber hinaus sind keine Signale im Methylprotonenbereich unter 0,8 ppm zu erkennen, die auf einen hydrophoben Kern des Proteins hindeuten würden. Eine globuläre Faltung des Proteins ist daher trotz des hohen Anteils hydrophober Aminosäuren eher unwahrscheinlich, was jedoch das Vorhandensein lokaler Sekundärstrukturelemente nicht ausschließt.

Da wegen der fehlenden  $^{13}\text{C}$ -Markierung der zur Verfügung stehenden Proteinproben keine auf J-Kopplung basierenden typischen Tripelresonanz-Zuordnungsspektren aufgenommen werden konnten, erfolgte die anschließende sequentielle Zuordnung von pIB42 ausschließlich auf Basis von 2D-TOCSY-, 2D-NOESY-,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC- bzw. -TROSY-, 3D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC- bzw. -TOCSY-TROSY- und 3D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOESY-TROSY- bzw. -NOESY-HSQC-Spektren. Die Zuordnung der genannten 3D-Spektren allein basierend auf den NOE-Informationen erwies sich dabei anfänglich als ausgesprochen schwierig. Das Protein besitzt eine deutlich inhomogene Aminosäureverteilung (u. a. 13% Leu, 13% Asx,

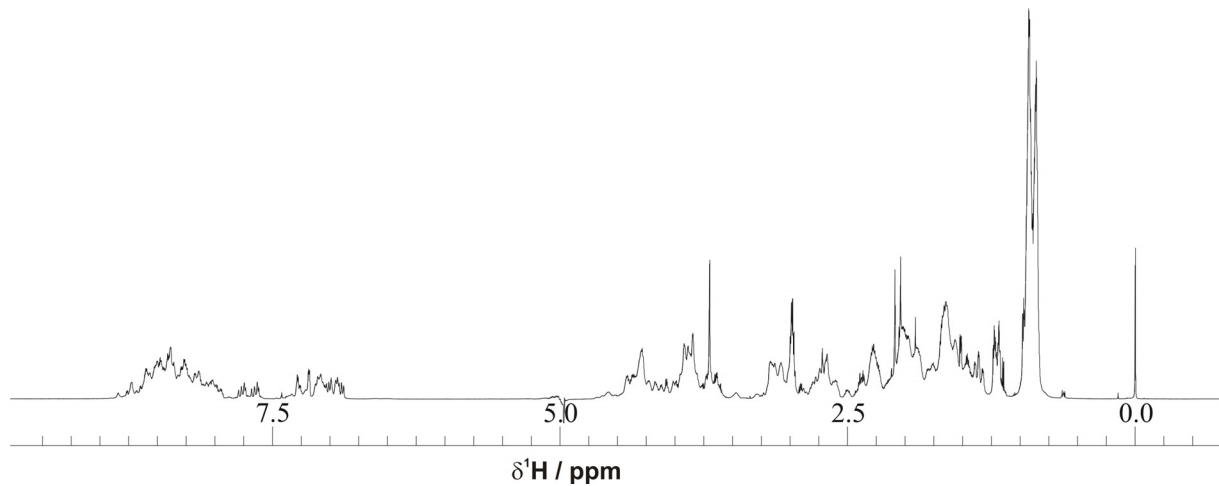


Abbildung 5.5:

$^1\text{H}$ -1D-Spektrum von 0,92 mM  $^{15}\text{N}$ -pIB42 in 9,2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=6,5 und 0,1 mM DSS in 93%  $\text{H}_2\text{O}$  / 7%  $\text{D}_2\text{O}$ , aufgenommen bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz bei 283 K.  $\text{H}_2\text{O}$ -Unterdrückung mittels W5-WATERGATE-Sequenz (Liu et al., 1998).

12% His, 10% Pro, 9% Glx), so dass etliche Aminosäuredupletts bzw. -tripletts in der Primärsequenz mehrfach vorkommen. Zudem waren die chemischen Verschiebungen der Seitenkettesignale innerhalb eines bestimmten Aminosäuretyps meist sehr ähnlich, so dass eine eindeutige Identifizierung schwierig war. Erst eine nochmalige Neuaufnahme aller 3D-Zuordnungsspektren am 800 MHz Spektrometer mit Kryoprobekopf mit im Vergleich zu den Standardbedingungen verdoppelter Auflösung in der indirekten Protonendimension führte letztlich zum Erfolg. Von den 89 prinzipiell in den  $^{15}\text{N}$ -editierten Spektren beobachtbaren Signalsystemen waren dabei 81 in den Spektren tatsächlich beobachtbar (u. a. lieferte die 6xHIS-Markierung nur ein gemeinsames Signalsystem) und konnten zugeordnet werden.

Neben den Hauptsignalen waren jedoch v. a. in den 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC- bzw. -TROSY-Spektren oft zusätzliche schwache Nebensignale zu erkennen (siehe Abbildung 5.6). Diese könnten zu einer zweiten, nur schwach populierten, alternativen Konformation von pIB42 gehören. Dabei könnte es sich z. B. um eine bereits teilweise aggregierte Konformation handeln, da die Proben v. a. an der Grenzfläche zur Luft zu aggregieren begannen. Alternativ könnte es sich dabei aber auch um die Signale einer nicht vollständig exprimierten, also verkürzten Version von pIB42 (oder auch eines anderen Nebenprodukts aus der Expression) handeln, die in der Aufreinigung des Proteins nicht entfernt werden konnte, vgl. dazu die schwache Bande über der Hauptbande auf dem SDS-PAGE-Gel in Abbildung 5.4. Die Signale dieser zweiten Konformation oder dieses zweiten Produkts waren aber in den 3D-Spektren nur sehr schwach oder gar nicht erkennbar, so dass eine zusätzliche Zuordnung dieses zweiten Signalsets nicht möglich war.

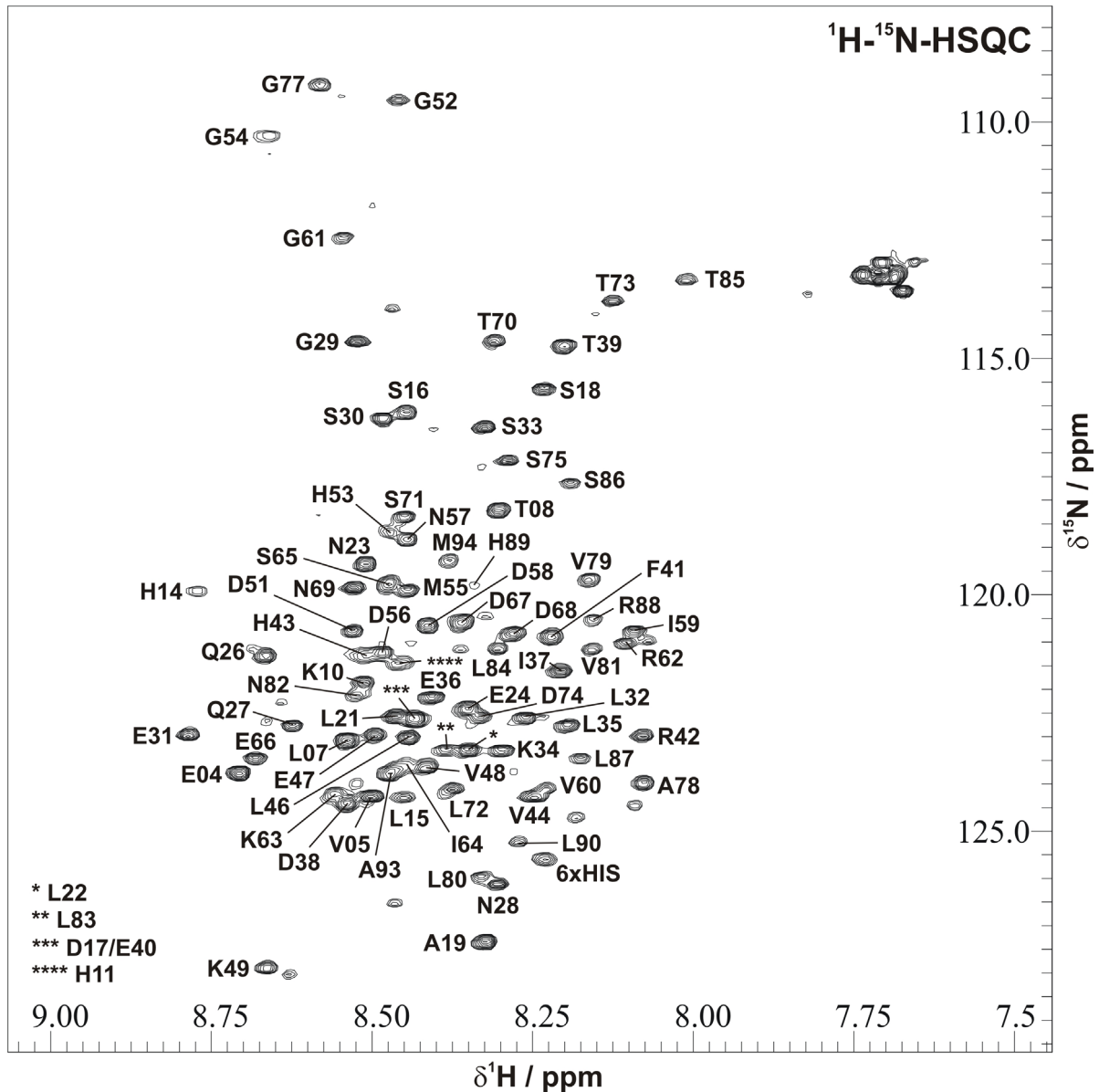


Abbildung 5.6: Sequentielle Zuordnung von pIB42

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von 0,92 mM  $^{15}\text{N}$ -pIB42 in 9,2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=6,5 bei 283 K aufgenommen bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz.

Die für die Hauptsignale letztlich erhaltene Zuordnung der Hauptkettenamidsignale ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Letztendlich betrug die globale Vollständigkeit der finalen Zuordnung (ohne Berücksichtigung der 6xHIS-Markierung, der nur ein gemeinsames Signalsystem liefert) 96 % für die beobachtbaren Hauptkettenamidsignale, 96 % der  $\text{H}^\alpha$ , 94 % der  $\text{H}^\beta$ , 86 % der  $\text{H}^\gamma$ , 78 % der  $\text{H}^\delta$ , 28% der  $\text{H}^\epsilon$  und somit insgesamt 82 % aller Protonen. Die gewonnene Zuordnung ist im Anhang dieser Arbeit in Kapitel 7.4 zusammengefasst.

### 5.3.3 Analysen der Struktur und Dynamik

#### Automatische Sekundärstrukturvorhersagen

Um erste Anhaltspunkte für die potentielle Struktur der zentralen Schleifendomäne zu erhalten, wurde zunächst versucht, mit bioinformatischen Methoden Strukturinformationen aus der Primärsequenz von pIB42 abzuleiten. Eine BLAST-Suche (Altschul et al., 1997) der Sequenz in der RCSB-Proteindatenbank bekannter Strukturen (Berman et al., 2000) brachte jedoch keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Auch die drei bekannten Strukturen von MFS-Transportern tauchen dabei nicht auf, diese besitzen aber auch nur wesentlich kürzere zentrale Schleifenregionen. Strukturen von Proteinen mit einer vergleichbaren Primärsequenz wie pIB42 wurden bisher also noch nicht aufgeklärt. Anschließend wurden mit verschiedenen Sekundärstrukturvorhersageprogrammen Vorhersagen für die Sekundärstruktur von pIB42 gemacht. Acht der neun verwendeten Programme beruhen dabei auf jeweils einem Vorhersagealgorithmus, während der NPS@-Server (Combet et al., 2000) bereits eine Konsensusvorhersage aus insgesamt elf Methoden bereitstellt. Die Ergebnisse der einzelnen Vorhersagen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Die Vorhersagen zeigen alle eine weitestgehend ungefaltete Struktur von pIB42, lediglich für die C-terminale Region um Leu84 sagen alle Methoden eine kürzere  $\alpha$ -Helix voraus, die also inmitten des konservierten Sequenzbereichs CCB2 liegt. Die Länge dieser Helix variiert jedoch zwischen den einzelnen Vorhersagen, teilweise wird auch ein kurzer  $\beta$ -Strang direkt vor der Helix vorhergesagt. Darüber hinaus tendieren alle verwendeten

Sekundärstrukturvorhersagen für pIB42										
Methode	Vorhersage <sup>a</sup>									
	1	21	41	61	81					
GOR4 <sup>b</sup>	MAKEVPLTPKHPHLLSDSAP	LLNEPQQNGS <b>ELSKLEIDTE</b>	<b>R</b> HRV <b>P</b> <b>LEV</b> KPDGHGMDND <b>IV</b>	<b>G</b> RKISEDNTSLTDSPGA <b>VL</b>	<b>V</b> NLLTSLR <b>H</b> LPPAM <b>IHH</b> <b>HH</b>					
HNN <sup>c</sup>	MAKEVPLTPKHPHLLSDSAP	LLNEPQQNGSE <b>LSKLEIDTE</b>	FRHVPLEVKPDGHGMDNDIV	GRKISEDNTSLTDS <b>PGAVL</b>	<b>V</b> NLLTSLR <b>H</b> LPPAM <b>IHHHHHH</b>					
Jpred <sup>d</sup>	MAKEVPLTPKHPHLLSDSAP	LLNEPQQNGSELSKLEIDTE	FRHVPLEVKPDGHGMDNDIV	GRKISEDNTSLTDSPGA <b>VL</b>	<b>V</b> NLLTSLR <b>H</b> LPPAM <b>IHHHHHH</b>					
nnPredict <sup>e</sup>	MAKEVPLTPKHPHLLSDSAP	LLNEPQQNGSELS <b>KLEIDTE</b>	FRHVPLEVKPDGHGMDNDIV	GRKISEDNTSLTDSPGA <b>VL</b>	<b>V</b> NLLTSLR <b>H</b> LPPAM <b>IHHHHHH</b>					
Prof <sup>f</sup>	MAKEVPLTPKHPHLLSDSAP	LLNEPQQNGSELSKLEIDTE	<b>R</b> HRVPLEVKPDGHGMDNDIV	GRKISEDNTSLTDSPGA <b>VL</b>	<b>V</b> NLLTSLR <b>H</b> LPPAM <b>IHHHHHH</b>					
PSIpred <sup>g</sup>	MAKEVPLTPKHPHLLSDS <b>AP</b>	<b>L</b> NEP <b>Q</b> NGSELSKLEIDTE	FRHVPLEVKPDGHGMDNDIV	GRKISEDNTSLTDSP <b>GA</b> VL	<b>V</b> NLLTSLR <b>H</b> L <b>P</b> AM <b>IHHHHHH</b>					
SOPMA <sup>h</sup>	MAKEVPLTPKHPHLLSDS <b>AP</b>	<b>L</b> NEP <b>Q</b> NGSE <b>LSKLEIDTE</b>	FRHV <b>P</b> <b>LEV</b> KPDGHGMDND <b>IV</b>	GRKISEDNTSL <b>T</b> DS <b>PGAVL</b>	<b>V</b> NLLTSLR <b>H</b> LPPAM <b>IHHHHHH</b>					
SSpro <sup>i</sup>	MAKEVPLTPKHPHLLSDSAP	LLNEPQQNGSELSKLEIDTE	FRHVPLEVKPDGHGMDNDIV	GRKISEDNTSLTDSP <b>GA</b> VL	<b>V</b> NLLTSLR <b>H</b> LPPAM <b>IHHHHHH</b>					
NPS@ <sup>j</sup>	MAKEVPLTPKHPHLLSDSAP	LLNEPQQNGSE <b>LSKLEIDTE</b>	FRHVPLEVKPDGHGMDNDIV	GRKISEDNTSLTDSPGA <b>VL</b>	<b>V</b> NLLTSLR <b>H</b> LPPAM <b>IHHHHHH</b>					

<sup>a</sup>Farben: **Rot** =  $\alpha$ -Helix, **Grün** =  $\beta$ -Strang. **Grau**: Konservierte Sequenzbereiche CCB1 (E4 - L35) und CCB2 (T73 - M94), soweit diese nicht durch Vorhersagen überlagert werden.

Referenzen: <sup>b</sup>(Garnier et al., 1996), <sup>c</sup>(Guermeur, 1997), <sup>d</sup>(Cuff et al., 1998), <sup>e</sup>(Kneller et al., 1990), <sup>f</sup>(Ouali und King, 2000), <sup>g</sup>(McGuffin et al., 2000), <sup>h</sup>(Geourjon und Deleage, 1995), <sup>i</sup>(Pollastri et al., 2002), <sup>j</sup>(Combet et al., 2000).

Tabelle 5.1: Sekundärstrukturvorhersagen für pIB42

Die Vorhersage mit NPS@ stellt bereits eine Konsensusvorhersage aus insgesamt elf verschiedenen Methoden dar (incl. u. a. GOR4, HNN und SOPMA) und ist daher abgesetzt dargestellt.

Methoden zur Vorhersage einer weiteren kurzen  $\alpha$ -Helix im Bereich Ala19 - F41, jedoch sind hier die Vorhersagen wesentlich heterogener (siehe Tabelle 5.1). Auch dieser Bereich liegt innerhalb eines konservierten Sequenzbereichs, am Ende der CCB1-Sequenz. Die automatischen Sekundärstrukturvorhersagen lassen also insgesamt zwar keine ausgeprägte 3D-Struktur erwarten, jedoch werden gerade für die beiden konservierten Sequenzbereiche CCB1 und CCB2  $\alpha$ -helikale Vorhersagen ausgegeben, was neben dem hohen Grad der Konservierung ihre Bedeutung für die noch unbekannte Funktion der zentralen Schleife des Saccharosetransporters unterstreicht. Solche rein sequenzbasierten Sekundärstrukturvorhersagen sind jedoch auch oft stark fehlerbehaftet, so liefert z. B. eine NPS@-Konsensusvorhersage für das ebenfalls in dieser Arbeit untersuchte Protein RanBD2 fälschlicherweise eine fast vollständig  $\alpha$ -helikale Vorhersage, obwohl das Protein die Struktur eines  $\beta$ -Fasses hat (siehe Kapitel 4).

## **Analyse der sequentiellen Zuordnung**

Der Sekundärstrukturgehalt eines Proteins kann mittels NMR-Spektroskopie bereits ohne sequentielle Zuordnung einfach aus der „Fingerabdruck“-Region eines 2D-COSY- bzw. -TOCSY-Spektrums grob abgeschätzt werden (Wishart et al., 1991). Eine derartige Analyse liefert für die pIB42-Proben einen Sekundärstrukturgehalt von 79% unstrukturiert, 19%  $\alpha$ -helikal und 2%  $\beta$ -Strang. Diese Werte passen gut zu der mit bioinformatischen Methoden vorhergesagten Sekundärstruktur (s. o.).

Eine genauere Vorhersage der einzelnen Sekundärstrukturelemente ist aus den Differenzen der chemischen Verschiebungen der  $H^\alpha$ -Kerne (und sofern zugeordnet der  $C^\alpha$ ,  $C^\beta$  und C) zu den jeweiligen Referenzwerten aus ungefalteten Standardpeptiden möglich (Wishart und Sykes, 1994; Wishart et al., 1992). Dazu wurden die Differenzen der beobachteten chemischen Verschiebungen zu den Referenzwerten von Wishart und Mitarbeitern (Wishart et al., 1995a) berechnet, die zuvor um den Effekt der jeweils lokalen Nachbaraminosäuren nach der Methode von Schwarzinger und Mitarbeitern (Schwarzinger et al., 2001) bereinigt worden waren. Die ermittelten Differenzen für die  $H^\alpha$  ( $\Delta\delta H^\alpha$ ) sind in Abbildung 5.7 A dargestellt. Um einen Anhaltspunkt für die typische Größenordnung solcher Differenzen für ein gefaltetes Protein zu erhalten, ist in Abbildung 5.7 B zusätzlich die entsprechende Analyse für die ebenfalls in dieser Arbeit untersuchte RanBD2 (siehe Kapitel 4) dargestellt. Man erkennt an den Werten der RanBD2 deutlich, dass die  $H^\alpha$ -Werte eines gefalteten Proteins im Bereich der Sekundärstrukturelemente deutlich und systematisch von

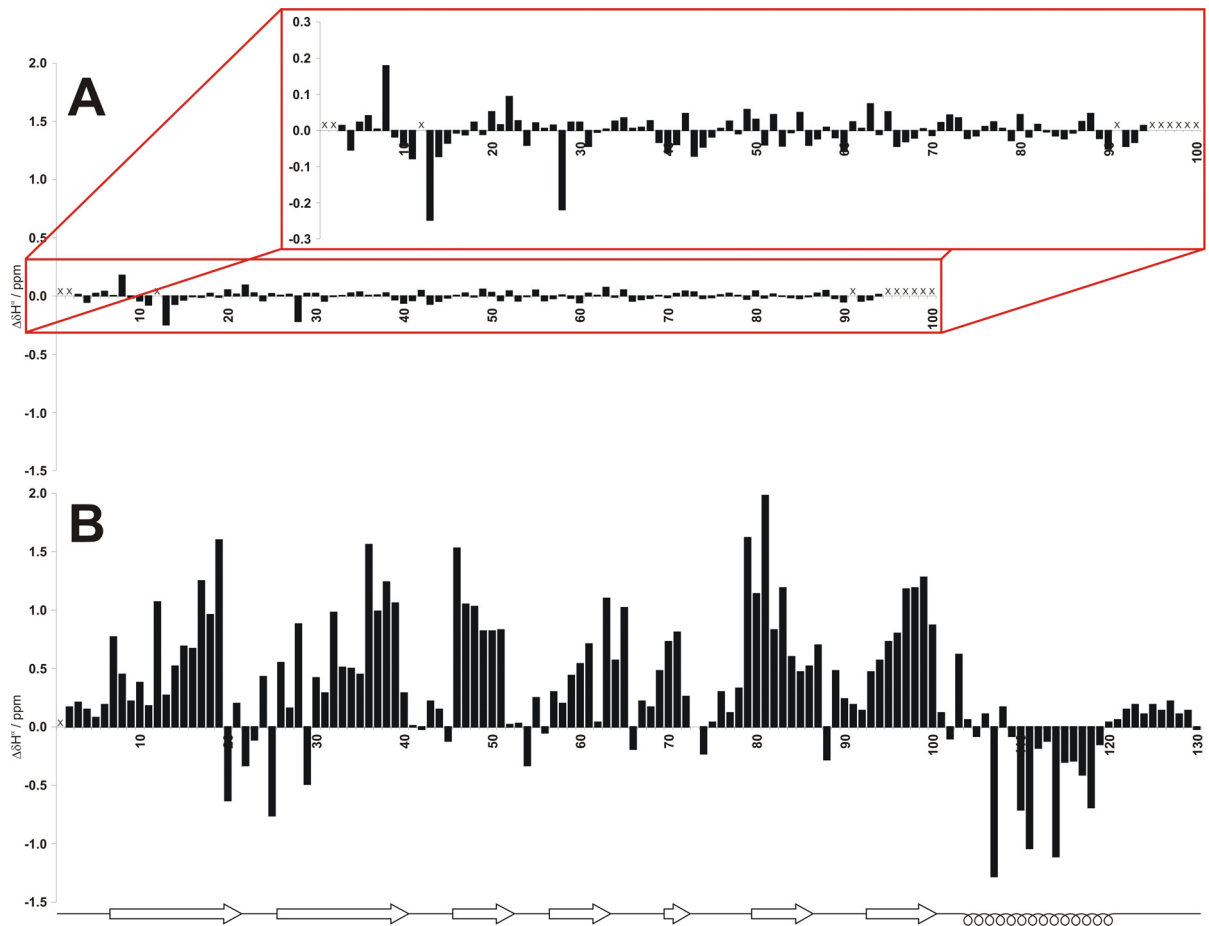


Abbildung 5.7:  $H^{\alpha}$ -CSI-Analysen

Differenzen der beobachteten  $H^{\alpha}$  chemischen Verschiebungen zu ihren Referenzwerten aus ungefalteten Standardpeptiden nach Wishart und Mitarbeitern (Wishart et al., 1995a), jeweils bereinigt um die Effekte der lokalen Nachbarn nach Schwarzinger und Mitarbeitern (Schwarzinger et al., 2001). Aufgetragen gegen die Sequenzen von pIB42 bzw. RanBD2.

A: pIB42. B: RanBD2. Beide Graphiken sind in derselben Skalierung aufgetragen. Der besseren Erkennbarkeit wegen ist der Graph in A zusätzlich nochmals vergrößert dargestellt (roter Kasten). Bei B ist zusätzlich die Sekundärstruktur der RanBD2 $\Delta$ N-Struktur in Form von Pfeilen ( $\beta$ -Stränge) und Schleifen ( $\alpha$ -Helices) dargestellt. X markiert fehlende Zuordnungen.

den Referenzwerten abweichen:  $\beta$ -Stränge ergeben positive  $\Delta\delta H^{\alpha}$ -Werte und  $\alpha$ -Helices negative  $\Delta\delta H^{\alpha}$ -Werte. Darüber hinaus erkennt man, dass auch in Schleifenbereichen deutliche Abweichungen von den Referenzwerten möglich sind (vgl. z. B. die Schleife zwischen den  $\beta$ -Strängen eins und zwei von RanBD2).

Im direkten Vergleich mit RanBD2 zeigt sich daher deutlich, dass die beobachteten chemischen Verschiebungen von pIB42 nur unwesentlich von den für ein ungefaltetes Peptid zu erwarteten Werten abweichen. Der Mittelwert der Beträge der  $\Delta\delta H^{\alpha}$  von pIB42 (0,035 ppm) liegt um mehr als eine Größenordnung unter dem der  $\Delta\delta H^{\alpha}$  von RanBD2 (0,505 ppm). Die an pIB42 beobachteten  $\Delta\delta H^{\alpha}$ -Werte entsprechen damit der Größe von  $\Delta\delta H^{\alpha}$ -Werten, wie sie an künstlich entfalteten Proteinen beobachtet wurden (Yao et al., 2001). Darüber hinaus



ist die Verteilung der Abweichungen über die Sequenz von pIB42 weit weniger systematisch als bei RanBD2. Der einzige Teil von pIB42, in dem eine längere Sequenz von Aminosäuren hintereinander eine etwas deutlichere Abweichung in die gleiche Richtung zeigt, ist die Region Pro9 - Asp17, bei dem die Abweichungen Richtung  $\alpha$ -Helix tendieren. Ansonsten sind die Abweichungen eher statistisch verteilt. Eine automatisierte Analyse der  $H^\alpha$  chemischen Verschiebungen von pIB42 mit dem Programm csi auf Basis der Methode von Wishart und Mitarbeitern (Wishart und Sykes, 1994) liefert nur für die Reste Thr39 - Arg42 eine  $\alpha$ -helikale Vorhersage, ansonsten werden ungefaltete Bereiche vorhergesagt. Das Programm csi berücksichtigt allerdings noch nicht die Einflüsse der lokalen Nachbarn nach Schwarzingen und Mitarbeitern (Schwarzingen et al., 2001), was aber gerade für weitestgehend ungefaltete Peptide und Proteine von großer Bedeutung ist, weil bei diesen die beobachteten Abweichungen grundsätzlich relativ gering sind. Da auch für pIB42 die Berücksichtigung dieser lokalen Korrekturfaktoren deutlichen Einfluss auf die gesamte Analyse hat, könnte die Vorhersage des helikalen Segments durch das Programm csi eine Folge der fehlenden lokalen Korrektur sein. Insgesamt lässt sich damit zusammenfassend festhalten, dass die Analyse der beobachteten  $\delta H^\alpha$  chemischen Verschiebungen von pIB42 auf eine eher ungefaltete Struktur hindeutet. Wegen der fehlenden  $^{13}\text{C}$ -Markierung konnten leider keine zusätzlichen  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebungen ausgewertet werden, die noch sensitiver auf das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen reagieren (Yao et al., 2001).

Darüber hinaus wurden die ermittelten chemischen Verschiebungen von pIB42 zur Vorhersage von Torsionswinkeln mit Hilfe des Programms TALOS (Cornilescu et al., 1999) benutzt. Die Analyse lieferte für insgesamt zwölf Reste Torsionswinkelvorhersagen, die als „gut“ klassifiziert wurden. Die erhaltenen Werte für die Torsionswinkel sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Die Vorhersagen entsprechen sowohl  $\alpha$ -helikalen als auch  $\beta$ -Strang-Konformationen und sind

Winkelvorhersagen für pIB42					
Rest	$\Phi$	$\Psi$	$\Delta\Phi$	$\Delta\Psi$	Konformation
Val05	-106,65	123,83	23,89	20,62	$\beta$
Leu07	-96,39	142,81	25,82	21,70	$\beta$
Thr08	-90,55	135,02	18,84	20,98	$\beta$
Glu24	-86,39	132,97	20,85	30,64	$\beta$
Glu31	-68,59	-37,99	9,82	10,72	$\alpha$
Lys34	-73,21	-31,22	8,67	12,40	$\alpha$
Lys49	-88,31	135,89	20,36	26,23	$\beta$
Arg62	-95,08	129,91	27,65	14,68	$\beta$
Glu66	-67,32	-35,11	9,62	16,16	$\alpha$
Ser75	-91,63	137,59	24,06	31,64	$\beta$
Leu83	-71,70	-29,12	11,4	23,83	$\alpha$
Leu87	-65,64	-34,54	11,57	23,71	$\alpha$

Tabelle 5.2: TALOS-Vorhersage  
Ergebnis der Vorhersage der Hauptkettentorsionswinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  mit TALOS (Cornilescu et al., 1999) mit Angabe der jeweiligen Fehler  $\Delta\Phi$  und  $\Delta\Psi$ . Die Konformation gibt an, ob die Winkelkombination einer  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ ) oder einem  $\beta$ -Strang ( $\beta$ ) entspricht.

nicht deutlich gruppiert, sondern über die gesamte Primärsequenz von pIB42 verteilt. Der Vergleich der für pIB42 ermittelten Zuordnung mit einer Datenbank bekannter Strukturen liefert also durchaus Hinweise auf das Vorhandensein von Sekundärstrukturmerkmalen in pIB42. Die gewonnenen Vorhersagen der Torsionswinkel konnten darüber hinaus auch für die anschließenden Strukturrechnungen verwendet werden (s. u.).

## Konformationelle Dynamik der Proteinhauptkette

Die Dynamik der Proteinhauptkette der zentralen Schleifendomäne von PmSUC3 wurde durch Messung von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOEs basierend auf  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren bei 600 MHz Protonenfrequenz gemessen. Die für die einzelnen Hauptkettenamidgruppen von pIB42 erhaltenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE-Werte sind in Abbildung 5.8 dargestellt. Man erkennt, dass die Werte im Vergleich zu denen eines gefalteten Proteins (vgl. die Werte von RanBD2 in Abbildung 4.2) relativ klein ausfallen. Der Mittelwert beträgt gerade einmal 0,14 und ist damit dem anderer ungefalteter Proteine vergleichbar (vgl.: Meyer, 2005). Wie häufig zu beobachten, besitzen die Termini des Proteins eine besonders hohe Beweglichkeit und zeigen negative  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE-Werte. Ohne Berücksichtigung dieser besonders flexiblen Termini beträgt der Mittelwert aller Werte 0,17. Auch die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE-Messung bestätigt damit, dass pIB42 keine ausgeprägte globuläre Faltung besitzt, da die Proteinhauptkette hierfür eine zu hohe interne

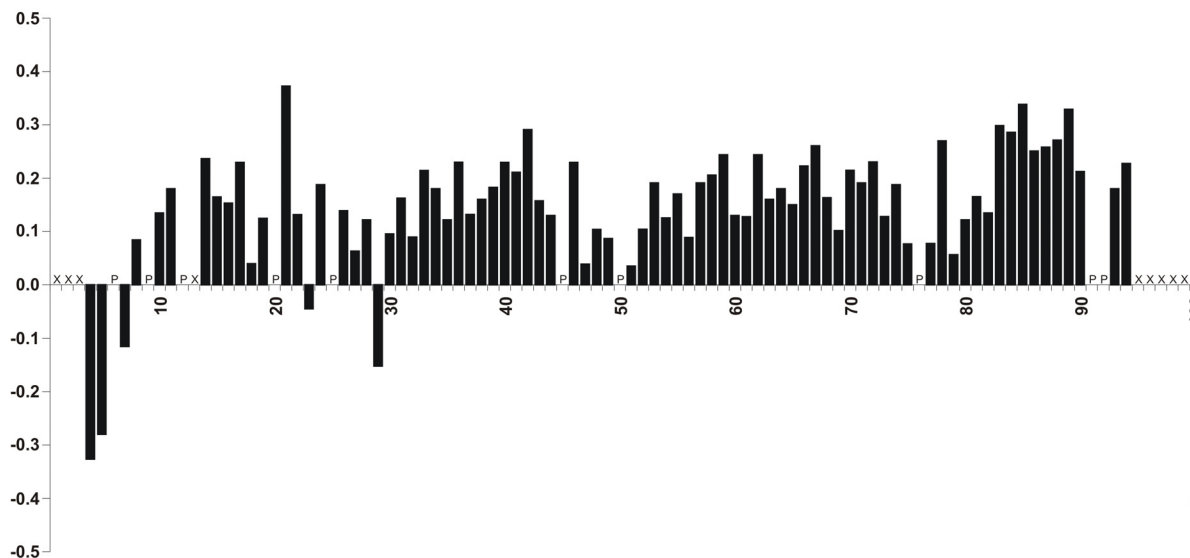


Abbildung 5.8:

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronukleare NOEs der Hauptkettenamidgruppen aufgetragen gegen die Sequenz von pIB42. Bestimmt bei einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von 600 MHz bei 283 K unter Verwendung von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren. P kennzeichnet Proline und X fehlende Zuordnungen. Bei dem für Rest 100 angegebenen Wert handelt es sich um das dem 6xHIS-Markierung zugeordnete Signal, so dass es sich wohl um einen gemittelten Wert für die Reste 95 - 100 handelt.

Beweglichkeit besitzt. Die einzige Region die minimal erhöhte  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE-Werte besitzt, ist der Bereich Leu83 bis His89, der Mittelwert beträgt hier 0,29. Das ist gerade der Teil innerhalb der konservierten Sequenz CCB2, für den sowohl die Sekundärstrukturvorhersagealgorithmen als auch TALOS das Vorhandensein einer  $\alpha$ -Helix vorhersagen. Möglicherweise liegt hier ein zumindest im Zeitmittel teilweise  $\alpha$ -helikal strukturierter Bereich vor.

## **Strukturrechnungen und NOE-Analysen**

Nach Abschluss der sequentiellen Zuordnung wurden für die anschließenden Strukturrechnungen die vorhandenen 2D-NOESY- und 3D-NOESY-HSQC-Spektren von pIB42 unter Verwendung des KnowNOE-Moduls in AUREMOL (Gronwald und Kalbitzer, 2004; Gronwald et al., 2002) ausgehend von einer gestreckten Startstruktur zugeordnet. Anschließend wurden aus den erhaltenen Zuordnungen Distanzlisten für die Strukturrechnungen mit Hilfe des RELAX-Moduls in AUREMOL erzeugt. In mehreren Iterationen wurden anschließend 100 oder 200 Strukturen mit CNS 1.1 (Brünger et al., 1998) anhand der erhaltenen Distanztabelle berechnet und die pseudoenergieärmsten Strukturen jeweils für eine neue KnowNOE-Zuordnung verwendet. Dabei wurden insbesondere auch die einzelnen KnowNOE-Parameter wie das Distanzlimit oder die Verschiebungstoleranzen variiert. Typischerweise wurden so für die einzelnen Strukturrechnungen nach dem Vereinigen der Distanzlisten und Entfernen mehrfach vorhandener NOE-Distanzbeschränkungen jeweils Distanztabelle mit etwa 600 bis 1000 verschiedenen NOEs erhalten und für die Rechnungen verwendet. Das entspricht sechs bis zehn Distanzbeschränkungen pro Rest von pIB42. Darüber hinaus wurden bei einem weiteren Teil der Strukturrechnungen neben den Distanzlisten zusätzlich die mit TALOS erhaltenen Winkelvorhersagen mit einbezogen.

Trotz zahlreicher Versuche war es jedoch leider nicht möglich, eine wenigstens teilweise gut definierte Struktur in den einzelnen Strukturrechnungen zu erhalten. Die erhaltenen Strukturen lagen jeweils vollständig oder fast vollständig in einer ungefalteten Konformation vor und zeigten nur selten Sekundärstrukturelemente. Diese waren darüber hinaus stark variabel und konnten nicht auf einen bestimmten Bereich von pIB42 eingegrenzt werden. Daher besaßen die Bündel der jeweils 20 pseudoenergieärmsten Strukturen einer Rechnung auch jeweils noch sehr hohe RMSD-Werte für die Hauptkettenatome im Bereich mehrerer nm. Auch die zusätzliche Einbeziehung der mit TALOS erhaltenen Winkelvorhersagen führte zu keinen besseren Ergebnissen.

Um das Vorhandensein von  $\alpha$ -Helices manuell zu überprüfen, wurde abschließend v. a. in den als  $\alpha$ -helikal vorhergesagten Bereichen der pIB42-Sequenz (siehe oben) das Auftreten dafür typischer NOE-Signale in den NOESY-Spektren überprüft. Die Überprüfung des typisch  $\alpha$ -helikalen  $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ -Kontaktes war dabei oft nicht möglich, da die entsprechende Region der 2D-NOESY-Spektren durch die Größe des Proteins und die innerhalb eines Aminosäuretyps sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen teilweise sehr stark überlagert ist. In den  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektren war jedoch eine einfache Überprüfung der typischen  $d_{\text{NN}}$  und  $d_{\alpha\text{N}}$ -Kontakte möglich. Dabei war bereits im Rahmen der sequentiellen Zuordnung aufgefallen, dass über weite Teile der Sequenz von pIB42 einerseits deutliche  $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ -Kontakte zu beobachten waren, während andere  $d_{\text{NN}}$ -Kontakte nur selten vorhanden waren. Andererseits waren meist starke  $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ -Kontakte erkennbar, sonstige  $d_{\alpha\text{N}}$ -Kontakte hingegen nur sehr vereinzelt. Damit fehlen auch die typisch  $\alpha$ -helikalen  $d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$ - und  $d_{\alpha\text{N}}(i,i+4)$ -Kontakte. Gerade das gleichzeitige Auftreten von  $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ - und  $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ -Kontakten über längere Sequenzbereiche ist jedoch ein typisches Anzeichen für flexible, ungefaltete Sequenzbereiche, in denen nur zeitlich gemittelte lokale Konformationen beobachtbar sind (Yao et al., 2001; Dyson und Wright, 1991).

Zusammenfassend lassen die Strukturrechnungen und NOE-Analysen damit ebenfalls auf eine im Wesentlichen unstrukturierte Konformation von pIB42 schließen, die weder eine globuläre Faltung noch einzelne lokale fest definierte Sekundärstrukturelemente besitzt.

### **5.3.4 Die Wechselwirkung mit Saccharose**

Aufgrund seiner besonderen Eigenschaften wird für den SUT2/SUC3-Typ von Saccharosetransportern unter anderem eine Funktion als Saccharosensensor diskutiert (siehe Kapitel 5.1). Da eine Beteiligung der zentralen Schleife des Transporters an solch einer Sensorfunktion durchaus auch eine direkte Wechselwirkung mit der zu überwachenden Saccharose einschließen könnte, sollte auch die Wechselwirkung der Schleifendomäne mit Saccharose untersucht werden. Dazu wurde eine NMR-Titrationsstudie an einer pIB42-Probe mit steigenden Konzentrationen an Saccharose durchgeführt. In insgesamt dreizehn anfänglich kleinen, anschließend größeren Schritten wurden steigende Mengen einer 100 mM bzw. 1M Saccharosestammlösung bis zu einem finalen zwanzigfachen molaren Überschuss zu der Probe zugegeben und dabei die Signalveränderungen sowohl in 1D- als auch in 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren beobachtet. Im Rahmen der Auflösung der Spektren

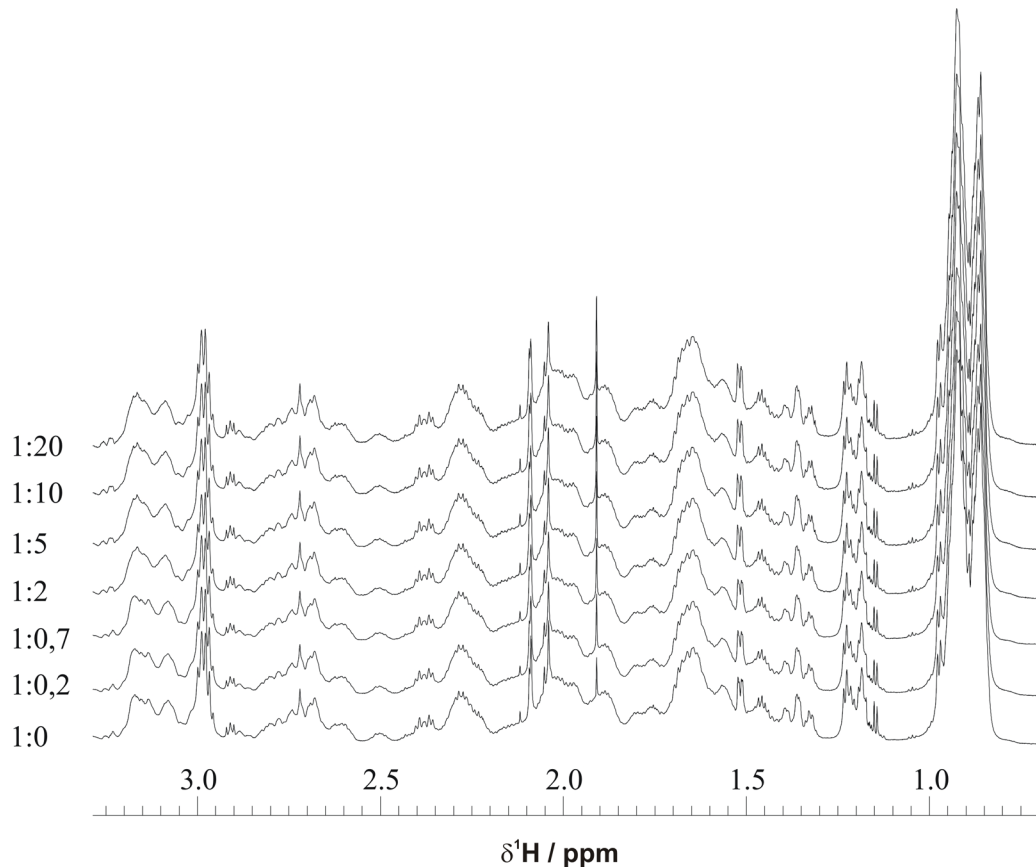


Abbildung 5.9: Titration mit Saccharose

Ausschnitte aus den  $^1\text{H}$ -1D-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -pIB42 bei Zugabe von steigenden Konzentrationen von Saccharose, aufgenommen bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz bei 283 K. Der Ausschnitt ist so gewählt, dass nur pIB42-Signale aber keine Saccharosesignale zu sehen sind. Die Startkonzentration von pIB42 betrug 0,92 mM in 9,2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=6,5 und 0,1 mM DSS in 93%  $\text{H}_2\text{O}$  / 7%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Zugabe von Saccharose erfolgte in Form einer 100 mM bzw. 1M Stammlösung in 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH=6,5 in 95%  $\text{H}_2\text{O}$  / 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Das molare Verhältnis von pIB42 zu Saccharose ist jeweils links neben den Spektren angegeben. Der Übersichtlichkeit halber ist hier nur jeder zweite Schritt der aufgenommenen Titrationsreihe gezeigt.

konnten dabei jedoch keinerlei Signalveränderungen beobachtet werden. Abbildung 5.9 zeigt dazu einen nicht von den durch die Saccharose verursachten Signalen überlagerten Bereich der aufgenommenen 1D-Spektren. Wie man gut erkennen kann, wird trotz der stark ansteigenden Saccharosekonzentrationen das Ausgangsspektrum von pIB42 ohne Saccharose selbst bei einem zwanzigfachen molaren Überschuss nahezu perfekt reproduziert. Eine Wechselwirkung der isolierten zentralen Schleifendomäne von PmSUC3 mit Saccharose oder gar eine Umfaltung der Domäne in Anwesenheit von Saccharose kann daher zumindest unter den verwendeten Bedingungen völlig ausgeschlossen werden.

## 5.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die zentrale Schleife des Saccharosetransporters PmSUC3 aus *Plantago major* NMR-spektroskopisch charakterisiert. Diese Schleife ist im Zytoplasma lokalisiert (Barth, 2005), im Vergleich zu den beiden anderen homologen Klassen von pflanzlichen Saccharosetransportern deutlich vergrößert, aber nicht für die Saccharosetransportaktivität notwendig. Dennoch sind Teile dieser Domäne zwischen verschiedenen Arten stark konserviert, sie sind also offenbar funktionell wichtig. Daher wird für diesen Transportertyp eine Sensorfunktion diskutiert, wobei die zentrale Schleife die eigentliche Sensorfunktion oder eine Funktion bei der Protein-Protein-Wechselwirkung v. a. mit anderen Transportern übernehmen könnte (Lalonde et al., 2004). Die zentrale Schleifendomäne ist mit einer Länge von knapp 100 Aminosäuren dabei einerseits wesentlich größer als die entsprechenden Schleifen anderer Transporter aus der *major facilitator superfamily*, deren Strukturen bereits aufgeklärt werden konnten (siehe Abbildung 5.2). Andererseits kann bei solch einer Größe grundsätzlich bereits eine globuläre Faltung erwartet werden, da das bereits mit deutlich kürzeren Sequenzen möglich ist, (vgl. z. B.: Gueguen et al., 2006; Mygind et al., 2005). Um Einblicke in die potentielle Funktion der zentralen Schleifendomäne von PmSUC3 zu erhalten, sollte daher ein Proteinkonstrukt dieser Domäne (pIB42) mit Hilfe der NMR-Spektroskopie strukturell charakterisiert werden. Dabei sollte auch eine mögliche direkte Wechselwirkung mit Saccharose überprüft werden.

Als erster Schritt dazu mussten zunächst die chemischen Verschiebungen von pIB42 sequentiell zugeordnet werden. Da wegen der fehlenden  $^{13}\text{C}$ -Markierung der zur Verfügung stehenden Proteinproben keine auf J-Kopplung basierenden typischen Tripelresonanz-Zuordnungspektren aufgenommen werden konnten, wurde die Zuordnung allein basierend auf NOE-Informationen durchgeführt. Dies gestaltete sich wegen der beobachteten starken Ähnlichkeit der einzelnen chemischen Verschiebungen innerhalb eines Aminosäuretyps verbunden mit dem häufigen Auftreten einzelner Aminosäuretypen zunächst schwierig. Letztlich konnte mit Hilfe von höher aufgelösten 3D-Spektren die sequentielle Zuordnung jedoch erfolgreich abgeschlossen werden und ein Großteil aller  $^1\text{H}$  chemischen Verschiebungen zugeordnet werden.

Im nächsten Schritt sollten anhand der NMR-spektroskopischen Messungen und Strukturrechnungen strukturelle Aussagen über pIB42 gewonnen werden. Zwar deuten schon 1D-Spektren auf das Fehlen einer klassischen globulären Faltung hin, jedoch konnte von dem Vorliegen einzelner lokaler Sekundärstrukturelemente ausgegangen werden. Mit mehreren zur Verfügung stehenden Sekundärstrukturvorhersagealgorithmen (siehe Tabelle

5.1) konnten zunächst v. a.  $\alpha$ -helikale Segmente in den beiden konservierten Sequenzbereichen CCB1 und CCB2 von pIB42 vorhergesagt werden, was neben dem hohen Grad der Konservierung ihre Bedeutung für die noch unbekannte Funktion der zentralen Schleife des Saccharosetransporters unterstreicht.

Die Auswertung der ermittelten chemischen Verschiebungen deutet jedoch auch auf eine weitgehend ungefaltete Struktur von pIB42 hin. Die Differenzen der  $H^{\alpha}$  chemischen Verschiebungen zu ihren sequenzkorrigierten Referenzwerten aus ungefalteten Standardpeptiden (Schwarzinger et al., 2001; Wishart et al., 1995a) sind im Vergleich zu gefalteten Proteinen insgesamt relativ gering und liegen im Bereich der für ein künstlich entfaltetes Protein zu erwartenden Differenzen (Yao et al., 2001). Darüber hinaus sind diese Differenzen nicht deutlich über die Sequenz gruppiert, wie es für längere Sekundärstrukturelemente zu erwarten wäre. Lediglich das Segment der Reste Pro9 - Asp17 tendiert einheitlich etwas deutlicher Richtung  $\alpha$ -Helix. Eine automatisierte Analyse der chemischen Verschiebungen mit Hilfe des Programms csi (Wishart und Sykes, 1994) lieferte dagegen für die Reste Thr39 - Arg42 eine  $\alpha$ -helikale Vorhersage, jedoch könnte das auch an der dabei fehlenden Sequenzkorrektur der Referenzwerte der chemischen Verschiebungen liegen. Die ebenfalls auf der sequentiellen Zuordnung basierende Vorhersage von Hauptkettentorsionswinkeln mit Hilfe des Programms TALOS (Cornilescu et al., 1999) lieferte hingegen Hinweise auf das Vorhandensein mehrerer über die Sequenz verteilter Sekundärstrukturelemente (siehe Tabelle 5.2). Insgesamt ist damit das Bild aus der Analyse der chemischen Verschiebungen nicht ganz einheitlich, deutet aber auf eine eher ungefaltete Konformation mit einer höchstens teilweisen Strukturierung hin. Diese Beurteilung wird darüber hinaus auch durch  $^1H$ - $^{15}N$ -NOE Messungen unterstützt. Diese zeigen eine insgesamt sehr hohe interne Beweglichkeit und damit geringe Strukturierung des Proteinrückgrats von pIB42.

Bei den anschließenden Strukturrechnungen konnte ebenfalls weder eine geordnete globuläre Struktur noch stabile einzelne Sekundärstrukturelemente von pIB42 ermittelt werden. Dabei führte auch der Einsatz der ermittelten Hauptkettentorsionswinkel zu keinen besseren Resultaten. Dieses Ergebnis könnte möglicherweise an grundsätzlichen Problemen bei den Strukturrechnungen gelegen haben, die wegen der starken Ähnlichkeit der einzelnen chemischen Verschiebungen innerhalb eines Aminosäuretyps, verbunden mit der Anhäufung einzelner Aminosäuretypen aufgetreten sein könnten. Dies führt bei den KnowNOE-basierten Zuordnungen der NOESY-Spektren zu einer erhöhten Anzahl von Zuordnungsmöglichkeiten für einzelne NOEs, so dass diese häufiger nicht zugeordnet werden können. Weiterhin erhöht sich durch die ähnlichen chemischen Verschiebungen je

nach gewählter Distanzgrenze der KnowNOE-Zuordnung auch die Wahrscheinlichkeit von Fehlzusordnungen. Solche potentiellen Probleme lassen sich aber nur durch eine sehr zeitaufwändige vollständig manuelle Zuordnung der NOESY-Spektren umgehen. Zumindest das Vorhandensein von typisch  $\alpha$ -helikalen NOEs wurde jedoch auch manuell überprüft. Dabei hat sich gezeigt, dass typisch  $\alpha$ -helikale  $d_{\alpha N}$ -Kontakte fehlen, während über weite Teile der pIB42-Sequenz sowohl deutliche  $d_{NN}(i,i+1)$ - als auch  $d_{\alpha N}(i,i+1)$ -Kontakte auftreten. Diese Kombination ist jedoch auch typisch für sehr bewegliche, ungefaltete Sequenzbereiche, in denen nur zeitlich gemittelte lokale Konformationen beobachtbar sind (Yao et al., 2001; Dyson und Wright, 1991). Eine solche durch eine hohe interne Beweglichkeit des Proteins (siehe oben) verursachte zeitliche Mittelung der Konformation führt auch zu zeitlich gemittelten NOE-Distanzbeschränkungen. Dies ist eine weitere mögliche Erklärung dafür, dass in den Strukturrechnungen keine einheitlichen Sekundärstrukturelemente definiert werden konnten. Die Strukturbestimmung nur kurzfristig vorhandener Strukturierungen allein über die NOE-Informationen ist generell schwierig (Dyson und Wright, 2004). Insgesamt deuten damit neben den chemischen Verschiebungen und der hohen internen Beweglichkeit auch die Strukturrechnungen und NOE-Analysen auf eine weitgehend ungeordnete Struktur der isolierten zentralen Schleifendomäne von PmSUC3 hin.

Unabhängig von der Struktur der Domäne ermöglicht die Etablierung ihrer sequentiellen Zuordnung eine detaillierte NMR-spektroskopische Charakterisierung ihrer Wechselwirkungen mit möglichen Interaktionspartnern. Da für den SUT2/SUC3-Typ von Saccharosetransportern unter anderem eine Funktion als Saccharosesensor diskutiert wird, käme dabei insbesondere eine direkte Wechselwirkung der zentralen zytoplasmatischen Schleife mit der dabei zu überwachenden Saccharose in Betracht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Wechselwirkung des pIB42-Konstrukts mit Saccharose mit Hilfe einer NMR-spektroskopischen Titrationsreihe untersucht. Dabei konnten jedoch selbst bei einem letztlich erreichten zwanzigfachen molaren Überschuss von Saccharose relativ zur Schleifendomäne keinerlei Signalveränderungen des Proteins in den Spektren beobachtet werden. Eine stabile direkte Wechselwirkung einzelner Reste der Domäne mit Saccharose oder gar eine Faltung des Proteins in Anwesenheit von Saccharose kann damit zumindest unter den verwendeten Bedingungen sicher ausgeschlossen werden. Sofern der SUC3-Transporter also tatsächlich eine Funktion als Saccharosesensor haben sollte, übernehmen dabei wohl die Reste im Inneren der Pore, die sonst auch für den Transport von Saccharose verantwortlich sind, die Wechselwirkung mit dem Zucker. Auch die Beteiligung der zentralen Schleife an der normalen Transportfunktion des Proteins ist damit eher unwahrscheinlich. Dies steht jedoch in Einklang mit Studien an Deletionsmutanten, die gezeigt haben, dass die Schleife nicht für die reguläre Transportfunktion notwendig ist (Meyer et al., 2000).



Zusammenfassend deuten die in dieser Arbeit durchgeführten NMR-Messungen damit auf eine weitgehend ungeordnete Struktur der isolierten zentralen Schleifendomäne von PmSUC3 sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Saccharose hin. Möglicherweise ist jedoch das Fehlen einer geordneten Struktur auch auf das Fehlen anderer externer Faktoren zurückzuführen. Dabei sind verschiedene Möglichkeiten denkbar. Es könnte z. B. sein, dass sich eine „korrekte“ Faltung von pIB42 nur im Komplex mit den anderen zytosolischen Teilen von PmSUC3 ausbilden kann. Dabei kommt hauptsächlich der lange freie N-Terminus des Proteins in Frage. Dieser ist deutlich länger als die übrigen verbleibenden zytosolischen Sequenzbereiche (vgl.: Barker et al., 2000), ist im Vergleich zu den beiden übrigen Transporterklassen verlängert und enthält darüber hinaus ebenfalls zwischen den Spezies konservierte Sequenzbereiche (Barth, 2005), die auf eine wichtige Funktion hindeuten. Eine Klärung dieser Fragestellung wäre mit weiteren NMR-Titrationsstudien an pIB42-Proben mit einem dem N-Terminus entsprechenden Peptid relativ einfach möglich. Im Falle einer Umfaltung von pIB42 wären deutliche Signalveränderungen in den Spektren des Proteins zu erwarten (siehe unten).

Eine weitere Möglichkeit stellt die Rückfaltung der zentralen Schleife von PmSUC3 in die Kanalpore bzw. die Membran selbst dar. Ein solches strukturelles Motiv konnte bereits bei anderen Zuckertransportern wie z. B. dem Melobiosetransporter von *E. coli* (Ding, 2004), oder auch verschiedenen spannungs- oder ligandengesteuerten Ionenkanälen gefunden werden (Zhorov und Tikhonov, 2004). Die Teile der Proteinkette, die dabei in die Pore hineinreichen, könnten dabei die Transporteigenschaften oder die Porenselektivität beeinflussen. Für die zentrale Schleifendomäne von PmSUC3 konnte zu dieser Frage mit Hilfe von Antikörperuntersuchungen bisher nur gezeigt werden, dass die Schleife zumindest nicht bis auf die extrazelluläre Seite des Kanals hinausreicht, sondern ganz oder teilweise zytosolisch lokalisiert ist (Barth, 2005). Dennoch wäre eine zumindest teilweise Rückfaltung in die Kanalpore oder die angrenzende Membran theoretisch möglich und würde zu dem relativ hohen Anteil hydrophober Aminosäuren (45%) passen. Die Untersuchung dieser Frage wäre jedoch sehr komplex, da eine strukturelle Untersuchung an einem komplett rekonstituierten PmSUC3-Kanal notwendig wäre.

Eine dritte Möglichkeit wäre schließlich, dass es sich beim Fehlen einer geordneten Struktur der isolierten Schleifendomäne nicht um ein durch die Messbedingungen verursachtes „Artefakt“, sondern einfach um den physiologisch aktiven Zustand dieser Domäne handelt. Eine Faltung der Domäne wäre dann nur im Rahmen einer Wechselwirkung mit Effektormolekülen möglich, wie z. B. mit anderen Kanälen, deren Transporteigenschaften beeinflusst werden. Leider konnten bisher im Rahmen einer

einzelnen Hefe-Zweihybrid-Analyse aber keine Interaktionspartner der zentralen Schleifendomäne identifiziert werden (Meyer, 2003), weitere Untersuchungen sind dazu nötig.

Das Konzept eines Proteins, das in seiner nativen Form nicht gefaltet, sondern weitestgehend ungefaltet ist, ist dabei nichts Ungewöhnliches und findet in der wissenschaftlichen Literatur der letzten Jahre zunehmend Beachtung (zur Übersicht siehe: Fink, 2005; Tompa, 2005; Dyson und Wright, 2005). Solche intrinsisch ungefalteten Proteine (IUPs) falten sich erst ganz oder teilweise, wenn sie mit ihren jeweiligen Effektormolekülen wechselwirken, d. h. Bindungs- und Faltungsprozess sind gekoppelt. In manchen Fällen kann es auch im ungebundenen Zustand schon eine gewisse Strukturierung geben, in anderen Fällen ist eine solche Strukturierung nur unter den dicht gedrängten Bedingungen im Zellinneren stabil (vgl. z. B.: Dedmon et al., 2002). IUPs sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, wie z. B. Signaltransduktions- oder Regulationsprozessen. Die hohe Mobilität ihrer Proteinhauptketten ist dabei immer von entscheidender Bedeutung für die Erfüllung der jeweiligen Aufgabe, z. B. um ein Effektorprotein komplett umwickeln zu können.

Die Strukturen solcher intrinsisch ungefalteten Proteine werden insbesondere mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht (Dyson und Wright, 2004), da diese mehr dynamische Informationen als die Röntgenstrukturanalyse liefert. Im Fall einer Faltung des Proteins im direkten Zusammenhang mit der Wechselwirkung mit dem Interaktionspartner können dann deutliche Änderungen der chemischen Verschiebungen des untersuchten Proteins beobachtet werden, so z. B. beim N-Protein von Phage  $\lambda$  (Prasch et al., 2006) oder der Kinase-Inhibierungsdomäne von p21 (Wang et al., 2005). Obwohl es sich bei solchen Interaktionspartnern neben Proteinen grundsätzlich auch um kleine Liganden handeln kann (Tompa, 2005), kann für die zentrale Schleife von PmSUC3 aber zumindest eine Faltung zusammen mit dem nahe liegenden Liganden Saccharose aufgrund der durchgeführten Messungen ausgeschlossen werden. Sobald jedoch andere potentielle Interaktionspartner der Domäne identifiziert sind, wären weitere NMR-Titrationsuntersuchungen mit diesen sicher sehr lohnenswert. Möglicherweise kann das Protein tatsächlich erst zusammen mit den richtigen Effektorproteinen bzw. Liganden eine geordnete Struktur ausbilden.

## 6 Literaturverzeichnis

Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S. (2003). Structure and Mechanism of the Lactose Permease of Escherichia coli. *Science* **301**, 610-615.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* **25**, 3389-3402.

Alzheimer A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr Psych Gerichl Med* **64**, 146-148.

Andersen JK. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* **10 Suppl**, S18-S25.

Andersson A, Måler L. (2002). NMR solution structure and dynamics of motilin in isotropic phospholipid bicellar solution. *J Biomol NMR* **24**, 103-112.

Andersson A, Måler L. (2006). Size and Shape of Fast-tumbling Bicelles as Determined by Translational Diffusion. *Langmuir* **22**, 2447-2449.

Andersson A, Biverstahl H, Nordin J, Danielsson J, Lindahl E, Måler L. (2006). The membrane-induced structure of melittin is correlated with the fluidity of the lipids. *Biochim Biophys Acta* In Press (Corrected Proof), doi:10.1016/j.bbamem.2006.07.009.

Atwood CS, Scarpa RC, Huang X, Moir RD, Jones WD, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI. (2000). Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid  $\beta$  peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid  $\beta$ 1-42. *J Neurochem* **75**, 1219-1233.

Auguin D, Barthe P, Auge-Senegas MT, Stern MH, Noguchi M, Roumestand C. (2004). Solution structure and backbone dynamics of the pleckstrin homology domain of the human protein kinase B (PKB/Akt). Interaction with inositol phosphates. *J Biomol NMR* **28**, 137-155.

Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, Warden CS, Vassiliev AV, Wood WG. (1997). Lipid binding to amyloid  $\beta$ -peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids. *J Neurochem* **69**, 1746-1752.

Bai Y, Milne JS, Mayne L, Englander SW. (1993). Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 75-86.

Bain AD. (2003). Chemical exchange in NMR. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **43**, 63-103.

Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Himer B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB. (2000). SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *Plant Cell* **12**, 1153-1164.

Barrow CJ, Zagorski MG. (1991). Solution structures of  $\beta$  peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science* **253**, 179-182.

- Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PTM, Zagorski MG. (1992). Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid  $\beta$ -peptides of Alzheimer's disease: Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol* **225**, 1075-1093.
- Barth I, Meyer S, Sauer N. (2003). PmSUC3: Characterization of a SUT2/SUC3-Type Sucrose Transporter from *Plantago major*. *Plant Cell* **15**, 1375-1385.
- Barth I. (2005). Charakterisierung der Saccharosetransporter AtSUC3 und PmSUC3 aus *Arabidopsis thaliana* und *Plantago major*. *Dissertation*, Universität Erlangen-Nürnberg.
- Bax A. (2003). Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics. *Protein Sci* **12**, 1-16.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. (2000). The Protein Data Bank. *Nucl Acids Res* **28**, 235-242.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. (2005). Intraneuronal A $\beta$  Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. *Neuron* **45**, 675-688.
- Bischoff FR, Scheffzek K, Ponstingl H. (2002). How Ran is regulated. *Results Probl Cell Differ* **35**, 49-66.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* **368**, 387-403.
- Bodenhausen G, Ruben DJ. (1980). Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem Phys Lett* **69**, 185-189.
- Bokvist M, Lindstrom F, Watts A, Grobner G. (2004). Two types of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation. *J Mol Biol* **335**, 1039-1049.
- Boorer KJ, Loo DDF, Frommer WB, Wright EM. (1996). Transport Mechanism of the Cloned Potato H<sup>+</sup>/Sucrose Cotransporter StSUT1. *J Biol Chem* **271**, 25139-25144.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* **10 Suppl**, S2-S9.
- Braunschweiler L, Ernst RR. (1983). Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *J Magn Reson* **53**, 521-528.
- Brünger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54 (Pt 5)**, 905-921.
- Brunner E. (2001). Residual dipolar couplings in protein NMR. *Concepts Magn Reson* **13**, 238-259.
- Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer III AG, Skelton NJ. (1996). *Protein NMR Spectroscopy*. Academic Press, San Diego.
- Chandrasekhar I, Van Gunsteren WF, Zandomenighi G, Williamson PTF, Meier BH. (2006). Orientation and conformational preference of leucine-enkephalin at the surface of a hydrated dimyristoylphosphatidylcholine bilayer: NMR and MD simulation. *J Am Chem Soc* **128**, 159-170.
- Chaudhuri TK, Paul S. (2006). Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J* **273**, 1331-1349.

- Chauhan A, Ray I, Chauhan VPS. (2000). Interaction of Amyloid  $\beta$ -Protein with Anionic Phospholipids: Possible Involvement of Lys28 and C-Terminus Aliphatic Amino Acids. *Neurochem Res* **25**, 423-429.
- Chiti F, Dobson CM. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333-366.
- Cho HS, Liu CW, Damberger FF, Pelton JG, Nelson HC, Wemmer DE. (1996). Yeast heat shock transcription factor N-terminal activation domains are unstructured as probed by heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci* **5**, 262-269.
- Choo-Smith LP, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Surewicz WK. (1997). Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of A $\beta$ -(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J Biol Chem* **272**, 22987-22990.
- Chook YM, Blobel G. (1999). Structure of the nuclear transport complex karyopherin- $\beta$ 2-Ran x GppNHp. *Nature* **399**, 230-237.
- Chou JJ, Kaufman JD, Stahl SJ, Wingfield PT, Bax A. (2002). Micelle-induced curvature in a water-insoluble HIV-1 Env peptide revealed by NMR dipolar coupling measurement in stretched polyacrylamide gel. *J Am Chem Soc* **124**, 2450-2451.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. (2005). Natural oligomers of the amyloid- $\beta$  protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* **8**, 79-84.
- Coles M, Bicknell W, Watson AA, Fairlie DP, Craik DJ. (1998). Solution structure of amyloid  $\beta$ -peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? *Biochemistry* **37**, 11064-11077.
- Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* **25**, 147-150.
- Cordier F, Grzesiek S. (1999). Direct Observation of Hydrogen Bonds in Proteins by Interresidue  $^3\text{J}_{\text{NC}}$  Scalar Couplings. *J Am Chem Soc* **121**, 1601-1602.
- Cornilescu G, Delaglio F, Bax A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* **13**, 289-302.
- Crescenzi O, Tomaselli S, Guerrini R, Salvadori S, D'Ursi AM, Temussi PA, Picone D. (2002). Solution structure of the Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *Eur J Biochem* **269**, 5642-5648.
- Cuff JA, Clamp ME, Siddiqui AS, Finlay M, Barton GJ. (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* **14**, 892-893.
- Danielsson J, Jarvet J, Damberg P, Gräslund A. (2002). Translational diffusion measured by PFG-NMR on full length and fragments of the Alzheimer A $\beta$ (1-40) peptide. Determination of hydrodynamic radii of random coil peptides of varying length. *Magn Reson Chem* **40**, S89-S97.
- Danielsson J, Andersson A, Jarvet J, Gräslund A. (2006).  $^{15}\text{N}$  relaxation study of the amyloid  $\beta$ -peptide: structural propensities and persistence length. *Magn Reson Chem* **44**, 114-121.
- Dave PC, Nusair NA, Inbaraj JJ, Lorigan GA. (2005). Electron paramagnetic resonance studies of magnetically aligned phospholipid bilayers utilizing a phospholipid spin label: The effect of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* **1714**, 141-151.

- De Angelis AA, Nevzorov AA, Park SH, Howell SC, Mrse AA, Opella SJ. (2004). High-resolution NMR spectroscopy of membrane proteins in aligned bicelles. *J Am Chem Soc* **126**, 15340-15341.
- de Vrij FM, Fischer DF, van Leeuwen FW, Hol EM. (2004). Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog Neurobiol* **74**, 249-270.
- Dedmon MM, Patel CN, Young GB, Pielak GJ. (2002). FlgM gains structure in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12681-12684.
- Devanathan S, Salamon Z, Lindblom G, Grobner G, Tollin G. (2006). Effects of sphingomyelin, cholesterol and zinc ions on the binding, insertion and aggregation of the amyloid A $\beta$ 1-40 peptide in solid-supported lipid bilayers. *FEBS J* **273**, 1389-1402.
- Dhanasekaran M, Palian MM, Alves I, Yeomans L, Keyari CM, Davis P, Bilsky EJ, Egleton RD, Yamamura HI, Jacobsen NE, Tollin G, Hruby VJ, Porreca F, Polt R. (2005). Glycopeptides related to  $\beta$ -endorphin adopt helical amphipathic conformations in the presence of lipid bilayers. *J Am Chem Soc* **127**, 5435-5448.
- Ding PZ. (2004). Loop X/XI, the largest cytoplasmic loop in the membrane-bound melibiose carrier of Escherichia coli, is a functional re-entrant loop. *Biochim Biophys Acta* **1660**, 106-117.
- Döker R. (2002). NMR-spektroskopische Untersuchung von Bindungspartnern kleiner GTPasen: Bindedomänen von RalGDS und RanBP2. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- Döker R, Zhao X, Kremer W, Villa Braslavsky CI, Kuhlmann J, Kalbitzer HR. (2002). Sequence-specific resonance assignment of the second Ran-binding domain of human RanBP2. *J Biomol NMR* **22**, 185-186.
- Dwyer DS, Bradley RJ. (2000). Chemical properties of alcohols and their protein binding sites. *Cell Mol Life Sci* **57**, 265-275.
- Dyson HJ, Wright PE. (1991). Defining solution conformations of small linear peptides. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **20**, 519-538.
- Dyson HJ, Wright PE. (2004). Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chem Rev* **104**, 3607-3622.
- Dyson HJ, Wright PE. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 197-208.
- Eckenhoff RG, Johansson JS, Wei H, Carnini A, Kang B, Wei W, Pidikiti R, Keller JM, Eckenhoff MF. (2004). Inhaled anesthetic enhancement of amyloid- $\beta$  oligomerization and cytotoxicity. *Anesthesiology* **101**, 703-709.
- Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller WE. (2003). Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **66**, 1627-1634.
- Eckert GP, Wood WG, Iler WE. (2005). Membrane disordering effects of  $\beta$ -amyloid peptides. *Sub-cell biochem* **38**, 319-337.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. (2003). Reconstitution of  $\gamma$ -secretase activity. *Nat Cell Biol* **5**, 486-488.
- Edidin M. (2003). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 414-418.

- Ege C, Lee KY. (2004). Insertion of Alzheimer's A $\beta$ 40 peptide into lipid monolayers. *Biophys J* **87**, 1732-1740.
- Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* **160**, 113-123.
- Einstein A. (1905). Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann Phys* **322**, 549-560.
- Englmeier L, Fomero M, Bischoff FR, Petosa C, Mattaj JW, Kutay U. (2001). RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Rep* **2**, 926-932.
- Fezoui Y, Hartley DM, Harper JD, Khurana R, Walsh DM, Condron MM, Selkoe DJ, Lansbury PT, Jr., Fink AL, Teplow DB. (2000). An improved method of preparing the amyloid  $\beta$ -protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments. *Amyloid* **7**, 166-178.
- Fezoui Y, Teplow DB. (2002). Kinetic studies of amyloid  $\beta$ -protein fibril assembly. Differential effects of  $\alpha$ -helix stabilization. *J Biol Chem* **277**, 36948-36954.
- Fiaux J, Bertelsen EB, Horwich AL, Wüthrich K. (2002). NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature* **418**, 207-211.
- Fink AL. (2005). Natively unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 35-41.
- Flynn GL, Shah Y, Prakongpan S, Kwan KH, Higuchi WI, Hofmann AF. (1979). Cholesterol solubility in organic solvents. *J Pharm Sci* **68**, 1090-1097.
- Fushman D, Cahill S, Lemmon MA, Schlessinger J, Cowburn D. (1995). Solution structure of pleckstrin homology domain of dynamin by heteronuclear NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 816-820.
- Gabriel NE, Roberts MF. (1984). Spontaneous formation of stable unilamellar vesicles. *Biochemistry* **23**, 4011-4015.
- Gaemers S, Bax A. (2001). Morphology of three lyotropic liquid crystalline biological NMR media studied by translational diffusion anisotropy. *J Am Chem Soc* **123**, 12343-12352.
- Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, Valensin G. (2006). Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev* **106**, 1995-2044.
- Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* **266**, 540-553.
- Geourjon C, Deleage G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* **11**, 681-684.
- Geyer JP. (2003). NMR-spektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der Ran-Bindedomäne 2 aus RanBP2 und Ran. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Geyer JP, Döker R, Kremer W, Zhao X, Kuhlmann J, Kalbitzer HR. (2005). Solution Structure of the Ran-binding Domain 2 of RanBP2 and its Interaction with the C Terminus of Ran. *J Mol Biol* **348**, 711-725.
- Gibson TJ, Hyvonen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E. (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* **19**, 349-353.

- Glennier GG, Wong CW. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885-890.
- Glover KJ, Whiles JA, Wu G, Yu Nj, Deems R, Struppe JO, Stark RE, Komives EA, Vold RR. (2001). Structural Evaluation of Phospholipid Bicelles for Solution-State Studies of Membrane-Associated Biomolecules. *Biophys J* **81**, 2163-2171.
- Gottlieb HE, Kotlyar V, Nudelman A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem* **62**, 7512-7515.
- Grimm MO, Grimm HS, Patzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, Tschape JA, De Strooper B, Muller U, Shen J, Hartmann T. (2005). Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid- $\beta$  and presenilin. *Nat Cell Biol* **7**, 1118-1123.
- Grit M, Crommelin DJA. (1993). Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids* **64**, 3-18.
- Gronwald W, Kirchhofer R, Gorler A, Kremer W, Ganslmeier B, Neidig KP, Kalbitzer HR. (2000). RFAC, a program for automated NMR R-factor estimation. *J Biomol NMR* **17**, 137-151.
- Gronwald W, Moussa S, Elsner R, Jung A, Ganslmeier B, Trenner J, Kremer W, Neidig KP, Kalbitzer HR. (2002). Automated assignment of NOESY NMR spectra using a knowledge based method (KNOWNOE). *J Biomol NMR* **23**, 271-287.
- Gronwald W, Kalbitzer HR. (2004). Automated structure determination of proteins by NMR spectroscopy. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **44**, 33-96.
- Gross M. (2000). Proteins that convert from  $\alpha$  helix to  $\beta$  sheet: implications for folding and disease. *Curr Protein Pept Sci* **1**, 339-347.
- Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, Garnier J, Fievet J, Escoubas JM, Bulet P, Gonzalez M, Lelong C, Favrel P, Bachere E. (2006). Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J Biol Chem* **281**, 313-323.
- Guermeur, Y (1997). Combinaison de classifieurs statistiques, Application a la prediction de structure secondaire des proteines. *Dissertation*, Universität Paris 6.
- Güntert P. (1998). Structure calculation of biological macromolecules from NMR data. *Q Rev Biophys* **31**, 145-237.
- Güntert P. (2003). Automated NMR protein structure calculation. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **43**, 105-125.
- Hahn EL. (1950). Spin Echoes. *Phys Rev* **80**, 580-594.
- Hardy J, Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.
- Harris TK, Mildvan AS. (1999). High-precision measurement of hydrogen bond lengths in proteins by nuclear magnetic resonance methods. *Proteins* **35**, 275-282.
- Harris JR. (2002). In vitro fibrillogenesis of the amyloid  $\beta$ 1-42 peptide: cholesterol potentiation and aspirin inhibition. *Micron* **33**, 609-626.



- Harroun TA, Koslowsky M, Nieh MP, de Lannoy CF, Raghunathan VA, Katsaras J. (2005). Comprehensive examination of mesophases formed by DMPC and DHPC mixtures. *Langmuir* **21**, 5356-5361.
- Hartmann T. (2005). Cholesterol and Alzheimer's disease: statins, cholesterol depletion in APP processing and A $\beta$  generation. *Sub-cell biochem* **38**, 365-380.
- Herrmann T, Güntert P, Wüthrich K. (2002). Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment Using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA. *J Mol Biol* **319**, 209-227.
- Hieda M, Tachibana T, Yokoya F, Kose S, Imamoto N, Yoneda Y. (1999). A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J Cell Biol* **144**, 645-655.
- Holak TA, Mühlhahn P, Schirra HJ. (1998). NMR-Spektroskopie von Biomolekülen. In: Lottspeich F, Zorbas H, (Hrsg.). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. S. 371-411.
- Hooft RW, Vriend G, Sander C, Abola EE. (1996). Errors in protein structures. *Nature* **381**, 272.
- Hooper NM. (2005). Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochem Soc Trans* **33**, 335-338.
- Hou L, Kang I, Marchant RE, Zagorski MG. (2002). Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid A $\beta$ -(1-42) peptide of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **277**, 40173-40176.
- Hou L, Shao H, Zhang Y, Li H, Menon NK, Neuhaus EB, Brewer JM, Byeon IJL, Ray DG, Vitek MP, Iwashita T, Makula RA, Przybyla AB, Zagorski MG. (2004). Solution NMR Studies of the A $\beta$ (1-40) and A $\beta$ (1-42) Peptides Establish that the Met35 Oxidation State Affects the Mechanism of Amyloid Formation. *J Am Chem Soc* **126**, 1992-2005.
- Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN. (2003). Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from Escherichia coli. *Science* **301**, 616-620.
- Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI. (2004). Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's A $\beta$  peptides. *J Biol Inorg Chem* **9**, 954-960.
- Ikura M, Kay LE, Bax A. (1990). A novel approach for sequential assignment of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry* **29**, 4659-4667.
- Janek K, Rothmund S, Gast K, Beyermann M, Zipper J, Fabian H, Bienert M, Krause E. (2001). Study of the conformational transition of A $\beta$ (1-42) using D-amino acid replacement analogues. *Biochemistry* **40**, 5457-5463.
- Jeener J, Meier BH, Bachmann P, Ernst RR. (1979). Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J Chem Phys* **71**, 4546-4553.
- Ji SR, Wu Y, Sui Sf. (2002). Cholesterol Is an Important Factor Affecting the Membrane Insertion of  $\beta$ -Amyloid Peptide (A $\beta$ 1-40), Which May Potentially Inhibit the Fibril Formation. *J Biol Chem* **277**, 6273-6279.
- Johnson Jr. CS. (1999). Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **34**, 203-256.

- Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC. (2002). The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides* **23**, 1311-1315.
- Kakio A, Nishimoto SI, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K. (2001). Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J Biol Chem* **276**, 24985-24990.
- Kakio A, Yano Y, Takai D, Kuroda Y, Matsumoto O, Kozutsumi Y, Matsuzaki K. (2004). Interaction between amyloid  $\beta$ -protein aggregates and membranes. *J Pept Sci* **10**, 612-621.
- Karplus M. (1963). Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J Am Chem Soc* **85**, 2870-2871.
- Katsaras J, Harroun TA, Pencer J, Nieh MP. (2005). "Bicellar" lipid mixtures as used in biochemical and biophysical studies. *Naturwissenschaften* **92**, 355-366.
- Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH, Younkin SG. (2004). Dimeric Amyloid  $\beta$  Protein Rapidly Accumulates in Lipid Rafts followed by Apolipoprotein E and Phosphorylated Tau Accumulation in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* **24**, 3801-3809.
- Kawasumi M, Hashimoto Y, Chiba T, Kanekura K, Yamagishi Y, Ishizaka M, Tajima H, Niikura T, Nishimoto I. (2002). Molecular mechanisms for neuronal cell death by Alzheimer's amyloid precursor protein-relevant insults. *Neurosignals* **11**, 236-250.
- Kay LE, Torchia DA, Bax A. (1989). Backbone dynamics of proteins as studied by  $^{15}\text{N}$  inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: Application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **28**, 8972-8979.
- Kay LE. (2005). NMR studies of protein structure and dynamics. *J Magn Reson* **173**, 193-207.
- Kim SI, Yi JS, Ko YG. (2006). Amyloid  $\beta$  oligomerization is induced by brain lipid rafts. *J Cell Biochem*.
- Kivipelto M, Solomon A. (2006). Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease - epidemiological evidence. *Acta Neurol Scand* **114**, 50-57.
- Klein WL, Stine WB, Jr., Teplow DB. (2004). Small assemblies of unmodified amyloid  $\beta$ -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 569-580.
- Klionsky DJ. (2006). Neurodegeneration: good riddance to bad rubbish. *Nature* **441**, 819-820.
- Kneller DG, Cohen FE, Langridge R. (1990). Improvements in protein secondary structure prediction by an enhanced neural network. *J Mol Biol* **214**, 171-182.
- Koradi R, Billeter M, Wüthrich K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* **14**, 51-32.
- Kremer JJ, Sklansky DJ, Murphy RM. (2001). Profile of Changes in Lipid Bilayer Structure Caused by  $\beta$ -Amyloid Peptide. *Biochemistry* **40**, 8563-8571.
- Kuhlmann J, Macara I, Wittinghofer A. (1997). Dynamic and equilibrium studies on the interaction of Ran with its effector, RanBP1. *Biochemistry* **36**, 12027-12035.

- Laguri C, Phillips-Jones MK, Williamson MP. (2003). Solution structure and DNA binding of the effector domain from the global regulator PrrA (RegA) from *Rhodobacter sphaeroides*: insights into DNA binding specificity. *Nucl Acids Res* **31**, 6778-6787.
- Lalonde S, Wipf D, Frommer WB. (2004). Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 341-372.
- Laskowski RA, Rullmannn JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* **8**, 477-486.
- Lee SJ, Matsuura Y, Liu SM, Stewart M. (2005). Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* **435**, 693-696.
- Levitt MH. (2001). *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Li YC, Montelione GT. (1994). Overcoming solvent saturation-transfer artifacts in protein NMR at neutral pH. Application of pulsed field gradients in measurements of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Overhauser effects. *J Magn Reson B* **105**, 45-51.
- Li HY, Cao K, Zheng Y. (2003). Ran in the spindle checkpoint: a new function for a versatile GTPase. *Trends Cell Biol* **13**, 553-557.
- Liang JS, Fine RE, Abraham CR, Sipe JD. (1996). The Fibril Forming Region of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Differs from That of the Amyloid A Precursor in Its Interaction with Lipids<sup>1</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* **219**, 962-967.
- Lim RY, Aebi U, Stoffler D. (2006). From the trap to the basket: getting to the bottom of the nuclear pore complex. *Chromosoma* **115**, 15-26.
- Lim RY, Fahrenkrog B. (2006). The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 342-347.
- Lima LMTR, Cordeiro Y, Tinoco LW, Marques AF, Oliveira CLP, Sampath S, Kodali R, Choi G, Foguel D, Torriani I, Caughey B, Silva JL. (2006). Structural Insights into the Interaction between Prion Protein and Nucleic Acid. *Biochemistry* **45**, 9180-9187.
- Lindsay ME, Holaska JM, Welch K, Paschal BM, Macara IG. (2001). Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J Cell Biol* **153**, 1391-1402.
- Lindsay ME, Plafker K, Smith AE, Clurman BE, Macara IG. (2002). Npap60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates importin- $\alpha$ : $\beta$ -mediated nuclear protein import. *Cell* **110**, 349-360.
- Linge JP, Williams MA, Spronk CA, Bonvin AM, Nilges M. (2003). Refinement of protein structures in explicit solvent. *Proteins* **50**, 496-506.
- Liu M, Mao Xa, Ye C, Huang H, Nicholson JK, Lindon JC. (1998). Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J Magn Reson* **132**, 125-129.
- Locher KP, Bass RB, Rees DC. (2003). Structural biology: Enhanced: Breaching the Barrier. *Science* **301**, 603-604.
- Loening NM, Keeler J, Morris GA. (2001). One-Dimensional DOSY. *J Magn Reson* **153**, 103-112.
- Lu JX, Caporini MA, Lorigan GA. (2004). The effects of cholesterol on magnetically aligned phospholipid bilayers: a solid-state NMR and EPR spectroscopy study. *J Magn Reson* **168**, 18-30.

- Luchette PA, Vetman TN, Prosser RS, Hancock REW, Nieh MP, Glinka CJ, Krueger S, Katsaras J. (2001). Morphology of fast-tumbling bicelles: a small angle neutron scattering and NMR study. *Biochim Biophys Acta* **1513**, 83-94.
- Lührs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, Döbeli H, Schubert D, Riek R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid- $\beta$ (1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17342-17347.
- Lührs T, Zahn R, Wüthrich K. (2006). Amyloid Formation by Recombinant Full-length Prion Proteins in Phospholipid Bicelle Solutions. *J Mol Biol* **357**, 833-841.
- Lukiw WJ, Pappolla M, Pelaez RP, Bazan NG. (2005). Alzheimer's disease-a dysfunction in cholesterol and lipid metabolism. *Cell Mol Neurobiol* **25**, 475-483.
- Lysek DA, Wüthrich K. (2004). Prion protein interaction with the C-terminal SH3 domain of Grb2 studied using NMR and optical spectroscopy. *Biochemistry* **43**, 10393-10399.
- Macara IG. (1999). Nuclear transport: randy couples. *Curr Biol* **9**, R436-R439.
- Madrid A, Weis K. (2006). Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma* **115**, 98-109.
- Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97-107.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. (2006). Inaugural Article: Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5644-5651.
- Mandal PK, Pettegrew JW. (2004). Alzheimer's disease: soluble oligomeric A $\beta$ (1-40) peptide in membrane mimic environment from solution NMR and circular dichroism studies. *Neurochem Res* **29**, 2267-2272.
- Marcotte I, Separovic F, Auger M, Gagne SM. (2004). A Multidimensional  $^1\text{H}$  NMR Investigation of the Conformation of Methionine-Enkephalin in Fast-Tumbling Bicelles. *Biophys J* **86**, 1587-1600.
- Marcotte I, Auger M. (2005). Bicelles as model membranes for solid-and solution-state NMR studies of membrane peptides and proteins. *Concepts Magn Reson A* **24**, 17-35.
- Marion D, Driscoll PC, Kay LE, Wingfield PT, Bax A, Gronenborn AM, Clore GM. (1989). Overcoming the overlap problem in the assignment of  $^1\text{H}$  NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: Application to interleukin 1 $\beta$  *Biochemistry* **28**, 6150-6156.
- Matsuura Y, Stewart M. (2004). Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* **432**, 872-877.
- Maurer T, Kalbitzer HR. (1996). Indirect Referencing of  $^{31}\text{P}$  and  $^{19}\text{F}$  NMR Spectra. *J Magn Reson B* **113**, 177-178.
- Maynard CJ, Bush AI, Masters CL, Cappai R, Li QX. (2005). Metals and amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol* **86**, 147-159.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404-405.
- McLaurin J, Chakrabarty A. (1997). Characterization of the interactions of Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptides with phospholipid membranes. *Eur J Biochem* **245**, 355-363.

- McLaurin J, Darabie AA, Morrison MR. (2002). Cholesterol, a modulator of membrane-associated A $\beta$ -fibrillogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **977**, 376-383.
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hummer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N. (2000). AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J* **24**, 869-882.
- Meyer S. (2003). Herstellung einer T-DNA Insertionsbank zur molekularen Analyse von Plasmodesmata. *Dissertation*, Universität Erlangen-Nürnberg.
- Meyer SM. (2005). NMR-spektroskopische Charakterisierung der C-terminalen Domäne des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4 und ihrer Interaktion mit der T1-Domäne und einer PDZ-Domäne. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Micelli S, Meleleo D, Picciarelli V, Gallucci E. (2004). Effect of Sterols on  $\beta$ -Amyloid Peptide (A $\beta$ P 1-40) Channel Formation and their Properties in Planar Lipid Membranes. *Biophys J* **86**, 2231-2237.
- Minto RE, Adhikari PR, Lorigan GA. (2004). A  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectroscopic investigation of biomimetic bicelles containing cholesterol and polyunsaturated phosphatidylcholine. *Chem Phys Lipids* **132**, 55-64.
- Mirza O, Guan L, Verner G, Iwata S, Kaback HR. (2006). Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H $^+$  symport in LacY. *EMBO J* **25**, 1177-1183.
- Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C, Yanagisawa K. (1999). Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid  $\beta$ -protein in cell culture. *J Biol Chem* **274**, 15110-15114.
- Morgan C, Colombres M, Nunez MT, Inestrosa NC. (2004). Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **74**, 323-349.
- Mori T, Paris D, Town T, Rojiani AM, Sparks DL, Delledonne A, Crawford F, Abdullah LI, Humphrey JA, Dickson DW, Mullan MJ. (2001). Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 778-785.
- Morrison J, Yang JC, Stewart M, Neuhaus D. (2003). Solution NMR study of the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *J Mol Biol* **333**, 587-603.
- Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sonksen CP, Ludvigsen S, Raventos D, Buskov S, Christensen B, De Maria L, Taboureau O, Yaver D, Elvig-Jorgensen SG, Sorensen MV, Christensen BE, Kjaerulff S, Frimodt-Moller N, Lehrer RI, Zasloff M, Kristensen HH. (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* **437**, 975-980.
- Nabuurs SB, Nederveen AJ, Vranken W, Doreleijers JF, Bonvin AM, Vuister GW, Vriend G, Spronk CA. (2004). DRESS: a database of REfined solution NMR structures. *Proteins* **55**, 483-486.
- Nieh MP, Glinka CJ, Krueger S, Prosser RS, Katsaras J. (2001). SANS study of the structural phases of magnetically alignable lanthanide-doped phospholipid mixtures. *Langmuir* **17**, 2629-2638.

- Nieh MP, Raghunathan VA, Kline SR, Harroun TA, Huang CY, Pencer J, Katsaras J. (2005). Spontaneously formed unilamellar vesicles with path-dependent size distribution. *Langmuir* **21**, 6656-6661.
- Nilsson J, Askjaer P, Kjems J. (2001). A role for the basic patch and the C terminus of RanGTP in regulating the dynamic interactions with importin  $\beta$ , CRM1 and RanBP1. *J Mol Biol* **305**, 231-243.
- Nilsson J, Weis K, Kjems J. (2002). The C-terminal extension of the small GTPase Ran is essential for defining the GDP-bound form. *J Mol Biol* **318**, 583-593.
- Nussbaum RL, Ellis CE. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* **348**, 1356-1364.
- O'Brien JS, Sampson EL. (1965). Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* **6**, 537-544.
- Oparka KJ, Duckett CM, Prior DAM, Fisher DB. (1994). Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of Arabidopsis. *Plant J* **6**, 759-766.
- Opella SJ, Marassi FM. (2004). Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy. *Chem Rev* **104**, 3587-3606.
- Orädd G, Westerman PW, Lindblom G. (2005). Lateral diffusion coefficients of separate lipid species in a ternary raft-forming bilayer: a pfg-NMR multinuclear study. *Biophys J* **89**, 315-320.
- Omer BP, Liu L, Murphy RM, Kiessling LL. (2006). Phage display affords peptides that modulate  $\beta$ -amyloid aggregation. *J Am Chem Soc* **128**, 11882-11889.
- Ottiger M, Bax A. (1998). Characterization of magnetically oriented phospholipid micelles for measurement of dipolar couplings in macromolecules. *J Biomol NMR* **12**, 361-372.
- Ottiger M, Bax A. (1999). Bicelle-based liquid crystals for NMR-measurement of dipolar couplings at acidic and basic pH values. *J Biomol NMR* **13**, 187-191.
- Otvos L, Jr., Szendrei GI, Lee VM, Mantsch HH. (1993). Human and rodent Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents. *FEBS J* **211**, 249-257.
- Ouali M, King RD. (2000). Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Sci* **9**, 1162-1176.
- Pardi A, Billeter M, Wüthrich K. (1984). Calibration of the angular dependence of the amide proton- $C^{\alpha}$  proton coupling constants,  $^3J_{HN\alpha}$ , in a globular protein. Use of  $^3J_{HN\alpha}$  for identification of helical secondary structure. *J Mol Biol* **180**, 741-751.
- Pelta MD, Barjat H, Morris GA, Davis AL, Hammond SJ. (1998). Pulse sequences for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy (HR-DOSY). *Magn Reson Chem* **36**, 706-714.
- Pemberton LF, Paschal BM. (2005). Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear Import and Nuclear Export. *Traffic* **6**, 187-198.
- Pencer J, Mills T, Anghel V, Krueger S, Epand RM, Katsaras J. (2005). Detection of submicron-sized raft-like domains in membranes by small-angle neutron scattering. *Eur Phys J E Soft Matter* **18**, 447-458.
- Pervushin K, Riek R, Wider G, Wüthrich K. (1997). Attenuated  $T_2$  relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12366-12371.

- Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. (2002). A structural model for Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16742-16747.
- Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau WM, Mattson MP, Tycko R. (2005). Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils. *Science* **307**, 262-265.
- Petkova AT, Yau WM, Tycko R. (2006). Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils. *Biochemistry* **45**, 498-512.
- Plafker K, Macara IG. (2002). Fluorescence resonance energy transfer biosensors that detect Ran conformational changes and a Ran x GDP-importin- $\beta$  -RanBP1 complex in vitro and in intact cells. *J Biol Chem* **277**, 30121-30127.
- Pollastri G, Przybylski D, Rost B, Baldi P. (2002). Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles. *Proteins* **47**, 228-235.
- Prasch S, Schwarz S, Eisenmann A, Wohrl BM, Schweimer K, Rosch P. (2006). Interaction of the intrinsically unstructured phage lambda N Protein with Escherichia coli NusA. *Biochemistry* **45**, 4542-4549.
- Prestegard JH, Bougault CM, Kishore AI. (2004). Residual dipolar couplings in structure determination of biomolecules. *Chem Rev* **104**, 3519-3540.
- Prosser RS, Evanics F, Kitevski JL, Abdul-Wahid MS. (2006). Current Applications of Bicelles in NMR Studies of Membrane-Associated Amphiphiles and Proteins. *Biochemistry* **45**, 8453-8465.
- Quimby BB, Dasso M. (2003). The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 338-344.
- Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J, Lal R. (2005). Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10427-10432.
- Raiford DS, Fisk CL, Becker ED. (1979). Calibration of methanol and ethylene glycol nuclear magnetic resonance thermometers. *Anal Chem* **51**, 2050-2051.
- Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* **7**, 95-99.
- Ravault S, Soubias O, Saurel O, Thomas A, Brasseur R, Milon A. (2005). Fusogenic Alzheimer's peptide fragment A $\beta$  (29-42) in interaction with lipid bilayers: Secondary structure, dynamics, and specific interaction with phosphatidyl ethanolamine polar heads as revealed by solid-state NMR. *Protein Sci* **14**, 1181-1189.
- Reinhard C, Hebert SS, De Strooper B. (2005). The amyloid- $\beta$  precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* **24**, 3996-4006.
- Richards SA, Lounsbury KM, Macara IG. (1995). The C terminus of the nuclear RAN/TC4 GTPase stabilizes the GDP-bound state and mediates interactions with RCC1, RAN-GAP, and HTF9A/RANBP1. *J Biol Chem* **270**, 14405-14411.
- Riek R, Güntert P, Döbeli H, Wipf B, Wüthrich K. (2001). NMR studies in aqueous solution fail to identify significant conformational differences between the monomeric forms of two Alzheimer

peptides with widely different plaque-competence, A $\beta$ (1-40)<sup>ox</sup> and A $\beta$ (1-42)<sup>ox</sup>. *Eur J Biochem* **268**, 5930-5936.

Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB. (1992). Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J* **11**, 4705-4713.

Sanders CR, Schwonek JP. (1992). Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. *Biochemistry* **31**, 8898-8905.

Sanders CR, Hare BJ, Howard KP, Prestegard JH. (1994). Magnetically-oriented phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **26**, 421-444.

Sanders CR, Landis GC. (1995). Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayered mixed micelles for NMR studies. *Biochemistry* **34**, 4030-4040.

Sanders CR, Prosser RS. (1998). Bicelles: a model membrane system for all seasons? *Structure* **6**, 1227-1234.

Saraste M, Hyvonen M. (1995). Pleckstrin homology domains: a fact file. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 403-408.

Sastry PS. (1985). Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Prog Lipid Res* **24**, 69-176.

Sattler M, Fesik SW. (1996). Use of deuterium labeling in NMR: overcoming a sizeable problem. *Structure* **4**, 1245-1249.

Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrz M, Klebl F. (2004). AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. *Plant J* **40**, 120-130.

Scheffzek K, Klebe C, Fritz-Wolf K, Kabsch W, Wittinghofer A. (1995). Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature* **374**, 378-381.

Schneider A, Schulz-Schaeffer W, Hartmann T, Schulz JB, Simons M. (2006). Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid- $\beta$  peptide in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* **23**, 573-577.

Schulze W, Weise A, Frommer WB, Ward JM. (2000). Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Lett* **485**, 189-194.

Schwarzinger S, Kroon GJ, Foss TR, Chung J, Wright PE, Dyson HJ. (2001). Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *J Am Chem Soc* **123**, 2970-2978.

Schwieters CD, Kuszewski JJ, Marius Clore G. (2006). Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **48**, 47-62.

Seavey BR, Farr EA, Westler WM, Markley JL. (1991). A relational database for sequence-specific protein NMR data. *J Biomol NMR* **1**, 217-236.

Seewald MJ, Korner C, Wittinghofer A, Vetter IR. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* **415**, 662-666.

Selkoe DJ. (1989). Biochemistry of Altered Brain Proteins in Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* **12**, 463-490.



- Selkoe DJ. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-766.
- Selkoe DJ. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789-791.
- Serpell LC. (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta* **1502**, 16-30.
- Shaka AJ, Barker PB, Freeman R. (1985). Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J Magn Reson* **64**, 547-552.
- Shao H, Jao Sc, Ma K, Zagorski MG. (1999). Solution structures of micelle-bound amyloid  $\beta$ -(1-40) and  $\beta$ -(1-42) peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* **285**, 755-773.
- Shobab LA, Hsiung GY, Feldman HH. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **4**, 841-852.
- Simons K, Eehalt R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* **110**, 597-603.
- Simons K, Vaz WL. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 269-295.
- Sjogren M, Mielke M, Gustafson D, Zandi P, Skoog I. (2006). Cholesterol and Alzheimer's disease-is there a relation? *Mech Ageing Dev* **127**, 138-147.
- Sklenar V, Piotto M, Leppik R, Saudek V. (1993). Gradient-Tailored Water Suppression for  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *J Magn Reson A* **102**, 241-245.
- Small D. (1986). Sterols and Sterol Esters. In: *Handbook of Lipid Research 4: The Physical Chemistry of Lipids*. Plenum Press, New York. S. 395-474.
- Sovonick SA, Geiger DR, Fellows RJ. (1974). Evidence for Active Phloem Loading in the Minor Veins of Sugar Beet. *Plant Physiol* **54**, 886-891.
- Stangler T, Hartmann R, Willbold D, Koenig BW. (2006). Modern high resolution NMR for the study of structure, dynamics and interactions of biological macromolecules. *Z Phys Chem* **220**, 567-613.
- Stejskal EO, Tanner JE. (1965). Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J Chem Phys* **42**, 288-292.
- Stewart M, Kent HM, McCoy AJ. (1998a). Structural basis for molecular recognition between nuclear transport factor 2 (NTF2) and the GDP-bound form of the Ras-family GTPase Ran. *J Mol Biol* **277**, 635-646.
- Stewart M, Kent HM, McCoy AJ. (1998b). The structure of the Q69L mutant of GDP-Ran shows a major conformational change in the switch II loop that accounts for its failure to bind nuclear transport factor 2 (NTF2). *J Mol Biol* **284**, 1517-1527.
- Sticht H, Bayer P, Willbold D, Dames S, Hilbich C, Beyreuther K, Frank RW, Rosch P. (1995). Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease. *Eur J Biochem* **233**, 293-298.
- Stokin GB, Goldstein LSB. (2006). Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 607-627.
- Struppe J, Vold RR. (1998). Dilute Bicellar Solutions for Structural NMR Work. *J Magn Reson* **135**, 541-546.

- Subasinghe S, Unabia S, Barrow CJ, Mok SS, Aguilar MI, Small DH. (2003). Cholesterol is necessary both for the toxic effect of A $\beta$  peptides on vascular smooth muscle cells and for A $\beta$  binding to vascular smooth muscle cell membranes. *J Neurochem* **84**, 471-479.
- Süel KE, Cansizoglu AE, Chook YM. (2006). Atomic resolution structures in nuclear transport. *Methods* **39**, 342-355.
- Szilagyi L. (1995). Chemical shifts in proteins come of age. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **27**, 325-430.
- Tanner JE. (1970). Use of the Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies. *J Chem Phys* **52**, 2523-2526.
- Tanzi RE, Bertram L. (2005). Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. *Cell* **120**, 545-555.
- Temussi PA, Masino L, Pastore A. (2003). From Alzheimer to Huntington: why is a structural understanding so difficult? *EMBO J* **22**, 355-361.
- Terzi E, Holzemann G, Seelig J. (1997). Interaction of Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide(1-40) with lipid membranes. *Biochemistry* **36**, 14845-14852.
- Tjandra N, Bax A. (1997). Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* **278**, 1111-1114.
- Tompa P. (2005). The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett* **579**, 3346-3354.
- Triba M, Warschawski DE, Devaux P. (2005). Reinvestigation by Phosphorus NMR of Lipid Distribution in Bicelles. *Biophys J* **88**, 1887-1901.
- Triba M, Devaux P, Warschawski D. (2006a). Effects of Lipid Chain Length and Unsaturation on Bicelles Stability. A Phosphorus NMR Study. *Biophys J* **91**, 1357-1367.
- Triba M, Zoonens M, Popot JL, Devaux P, Warschawski D. (2006b). Reconstitution and alignment by a magnetic field of a  $\beta$ -barrel membrane protein in bicelles. *Eur Biophys J* **35**, 268-275.
- Tycko R. (2004). Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 96-103.
- Urano Y, Hayashi I, Isoo N, Reid PC, Shibasaki Y, Noguchi N, Tomita T, Iwatsubo T, Hamakubo T, Kodama T. (2005). Association of active  $\gamma$ -secretase complex with lipid rafts. *J Lipid Res* **46**, 904-912.
- van Dam L, Karlsson G, Edwards K. (2004). Direct observation and characterization of DMPC/DHPC aggregates under conditions relevant for biological solution NMR. *Biochim Biophys Acta* **1664**, 241-256.
- Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. (2000). Review: Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity. *J Struct Biol* **130**, 184-208.
- Verdier Y, Zarandi M, Penke B. (2004). Amyloid  $\beta$ -peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J Pept Sci* **10**, 229-248.
- Vetter IR, Arndt A, Kutay U, Gorlich D, Wittinghofer A. (1999a). Structural view of the Ran-Importin  $\beta$  interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* **97**, 635-646.

- Vetter IR, Nowak C, Nishimoto T, Kuhlmann J, Wittinghofer A. (1999b). Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature* **398**, 39-46.
- Vieira EP, Hermel H, Mohwald H. (2003). Change and stabilization of the amyloid- $\beta$ (1-40) secondary structure by fluorocompounds. *Biochim Biophys Acta* **1645**, 6-14.
- Villa Braslavsky CI, Nowak C, Gorlich D, Wittinghofer A, Kuhlmann J. (2000). Different structural and kinetic requirements for the interaction of Ran with the Ran-binding domains from RanBP2 and importin- $\beta$ . *Biochemistry* **39**, 11629-11639.
- Vogtherr M, Grimme S, Elshorst B, Jacobs DM, Fiebig K, Griesinger C, Zahn R. (2003). Antimalarial drug quinacrine binds to C-terminal helix of cellular prion protein. *J Med Chem* **46**, 3563-3564.
- Vold RR, Prosser RS, Deese AJ. (1997). Isotropic solutions of phospholipid bicelles: a new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. *J Biomol NMR* **9**, 329-335.
- Walsh DM, Selkoe DJ. (2004). Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* **11**, 213-228.
- Wang Y, Filippov I, Richter C, Luo R, Kriwacki RW. (2005). Solution NMR studies of an intrinsically unstructured protein within a dilute, 75 kDa eukaryotic protein assembly; probing the practical limits for efficiently assigning polypeptide backbone resonances. *Chembiochem* **6**, 2242-2246.
- Watson AA, Fairlie DP, Craik DJ. (1998). Solution structure of methionine-oxidized amyloid  $\beta$ -peptide (1-40). Does oxidation affect conformational switching? *Biochemistry* **37**, 12700-12706.
- Weis K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**, 441-451.
- Wenzel TJ, Ashley ME, Sievers RE. (1982). Water-soluble paramagnetic relaxation reagents for carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal Chem* **52**, 615-621.
- Whiles JA, Deems R, Vold RR, Dennis EA. (2002). Bicelles in structure-function studies of membrane-associated proteins. *Bioorg Chem* **30**, 431-442.
- Williamson MP. (1990). Secondary-structure dependent chemical shifts in proteins. *Biopolymers* **29**, 1423-1431.
- Williamson MP, Suzuki Y, Bourne NT, Asakura T. (2006). Binding of amyloid  $\beta$ -peptide to ganglioside micelles is dependent on histidine-13. *Biochem J* **397**, 483-490.
- Wirths O, Multhaup G, Bayer TA. (2004). A modified  $\beta$ -amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the  $\beta$ -amyloid peptide - the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* **91**, 513-520.
- Wishart DS, Sykes BD, Richards FM. (1991). Simple techniques for the quantification of protein secondary structure by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *FEBS Lett* **293**, 72-80.
- Wishart DS, Sykes BD, Richards FM. (1992). The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 1647-1651.
- Wishart DS, Sykes BD. (1994). The  $^{13}\text{C}$  chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using  $^{13}\text{C}$  chemical-shift data. *J Biomol NMR* **4**, 171-180.

- Wishart DS, Bigam CG, Holm A, Hodges RS, Sykes BD. (1995a).  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J Biomol NMR* **5**, 67-81.
- Wishart DS, Bigam CG, Yao J, Abildgaard F, Dyson HJ, Oldfield E, Markley JL, Sykes BD. (1995b).  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* **6**, 135-140.
- Wolfe MS. (2006). The  $\gamma$ -Secretase Complex: Membrane-Embedded Proteolytic Ensemble. *Biochemistry* **45**, 7931-7939.
- Wu DH, Chen A, Johnson CS. (1995a). Flow Imaging by Means of 1D Pulsed-Field-Gradient NMR with Application to Electroosmotic Flow. *J Magn Reson A* **115**, 123-126.
- Wu J, Matunis MJ, Kraemer D, Blobel G, Coutavas E. (1995b). Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* **270**, 14209-14213.
- Wüthrich K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons, New York.
- Xia B, Tsui V, Case DA, Dyson HJ, Wright PE. (2002). Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water. *J Biomol NMR* **22**, 317-331.
- Xu XP, Case DA. (2002). Probing multiple effects on  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\beta$ , and  $^{13}\text{C}'$  chemical shifts in peptides using density functional theory. *Biopolymers* **65**, 408-423.
- Yan KS, Kuti M, Zhou MM. (2002). PTB or not PTB - that is the question. *FEBS Lett* **513**, 67-70.
- Yanagisawa K. (2005a). Cholesterol and amyloid  $\beta$  fibrillogenesis. *Sub-cell biochem* **38**, 179-202.
- Yanagisawa K. (2005b). GM1 Ganglioside and the Seeding of Amyloid in Alzheimer's Disease: Endogenous Seed for Alzheimer Amyloid. *Neuroscientist* **11**, 250-260.
- Yao J, Chung J, Eliezer D, Wright PE, Dyson HJ. (2001). NMR structural and dynamic characterization of the acid-unfolded state of apomyoglobin provides insights into the early events in protein folding. *Biochemistry* **40**, 3561-3571.
- Yin Y, He X, Szewczyk P, Nguyen T, Chang G. (2006). Structure of the Multidrug Transporter EmrD from Escherichia coli. *Science* **312**, 741-744.
- Yip CM, Elton EA, Darabie AA, Morrison MR, McLaurin J. (2001). Cholesterol, a modulator of membrane-associated A $\beta$ -fibrillogenesis and neurotoxicity. *J Mol Biol* **311**, 723-734.
- Yokoyama N, Hayashi N, Seki T, Pante N, Ohba T, Nishii K, Kuma K, Hayashida T, Miyata T, Aeibi U. (1995). A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* **376**, 184-188.
- Zheng H, Koo EH. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* **1**:5.
- Zhorov BS, Tikhonov DB. (2004). Potassium, sodium, calcium and glutamate-gated channels: pore architecture and ligand action. *J Neurochem* **88**, 782-799.

# 7 Anhang

## 7.1 Abkürzungen

$\omega$	Resonanzfrequenz
$\tau_C$	Rotationskorrelationszeit
AD	Alzheimer's disease
AICD	APP intracellular domain
APP	Amyloid precursor protein
BLAST	Basic local alignment search tool
BPPSTE	Bipolar pulse pair stimulated echo
BSA	Bovines Serumalbumin
C83	83 Reste langes C-terminales Fragment von APP
CAS	Cellular apoptosis susceptibility gene
CCB	Central conserved box
CNS	Crystallography and NMR system
Crm1	Chromosome region maintenance 1
CSI	Chemical shift index
DAPC	1,2-Diarachidoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DCPC	1,2-Dioctanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (Trivialname: „...Dicapryloyl...“)
DHPC	1,2-Dihexanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DMlePC	1,2-Dimyristoleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentanon-5-sulfonsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Gpp(NH)p	5'-Guanosyl-[ $\beta,\gamma$ -imido]-triphosphat
HSQC	Hetero single quantum coherence
IUP	Intrinsically unstructured protein
MFS	Major facilitator superfamily
NES	Nuclear export signal
NFT	Neurofibrillary tangles
NLS	Nuclear localization signal
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOE	Nuclear Overhauser enhancement
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
NPC	Nuclear pore complex
NTF2	Nuclear transport factor 2
Nup	Nucleoporin
PC	Phosphocholine
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PDB	Protein data base

PFG	Pulsed field gradient
PH	Pleckstrin homology
PmSUC3	Saccharosetransporter der SUT2/SUC3-Klasse aus <i>Plantago major</i>
PTB	Phosphotyrosine binding
Ran	Ras-related nuclear protein
RanBD	Ran-Bindedomäne
RanBP	Ran-Bindeprotein
RanGAP	Ran GTPase activating protein
RanGEF	Ran guanine nucleotide exchange factor
RCC1	Regulator of chromosome condensation 1
RCSB	Research collaboratory for structural bioinformatics
RMSD	Root mean square deviation
sAPP $\alpha/\beta$	soluble APP fragment $\alpha/\beta$
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Spin echo
STE	Stimulated echo
SUMO-1	Small ubiquitin-like modifier 1
SUC	Sucrose carrier
SUT	Sucrose transporter
TALOS	Torsion angle likelihood obtained from shift and sequence similarity
TFA	Trifluoressigsäure
TOCSY	Total correlation spectroscopy
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	Transverse relaxation-optimized spectroscopy
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
WATERGATE	Water suppression by gradient-tailored excitation

## 7.2 Sequenzen der verwendeten Proteine

Primärsequenzen der verwendeten Proteine:

A $\beta$ <sub>40</sub>	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV
A $\beta$ <sub>42</sub>	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA
RanBD2 $\Delta$ N	GSGEEDKVL YSQRVKLFRF DAEVSQWKER GLGNLKILKN EVNGKLRMLM RREQVLKVCA NHWITTTMNL KPLSGSDRAW MWLASDFSDG DAKLEQLAAK FKTPELAEFF KQKFEECQRL LLDIPLQTPK
Ran <sup>189-216</sup>	MDPALAAQYE HDLEVAQTTA LPDEDDDL
pIB42	MAKEVPLTPK HPHHLSDSAP LLNEPQQNGS ELSKLEIDTE FRHVPLEVKP DGHGMDNDIV GRKISEDNT SLTDSPGAVL VNLLTSLRHL PPAMHHHHHH

### 7.3 Sequentielle Zuordnung von A $\beta$ <sub>40</sub>

Rest	N	H <sup>N</sup>	H <sup><math>\alpha</math></sup>	H <sup><math>\beta</math></sup>	H <sup><math>\gamma</math></sup>	H <sup><math>\delta</math></sup>	H <sup><math>\epsilon</math></sup> und übrige H
D1	-	-	4,13	2,66/2,79			
A2	123,8	8,14	4,29	1,35			
E3	120,6	8,56	4,16	1,89	2,10/2,21		
F4	122,1	8,42	4,52	2,98		7,14	7,23
R5	124,2	8,22	4,24	1,60/1,70	1,47	3,11	7,39
H6	122,1	8,50	4,47	3,01/3,08		7,01	7,84
D7	122,0	8,44	4,59	2,65			
S8	116,8	8,52	4,35	3,87/3,90			
G9	110,9	8,63	3,85/3,92				
Y10	120,3	8,04	4,50	2,92/3,01		7,04	6,76
E11	122,8	8,48	4,17	1,80	2,16		
V12	121,4	8,19	3,91	1,93	0,76/0,85		
H13	122,8	8,35	4,56	3,00		6,91	7,79
H14	121,4	8,24	4,51	2,97/3,06		6,93	7,82
Q15	121,7	8,48	4,24	1,96/2,04	2,31		6,98/7,67
K16	123,3	8,49	4,24	1,74/1,78	1,38/1,43	1,66	2,97
L17	124,1	8,37	4,31	1,59	1,42	0,83/0,90	
V18	121,8	8,11	4,01	1,88	0,72/0,82		
F19	124,7	8,38	4,56	2,90/2,97		7,15	7,29
F20	123,3	8,34	4,54	2,91/3,06		7,23	7,27/7,31
A21	126,5	8,35	4,19	1,35			
E22	120,3	8,47	4,17	1,89	2,25		
D23	122,1	8,54	4,63	2,62/2,73			
V24	121,0	8,28	4,11	2,17	0,93		
G25	112,0	8,66	3,96				
S26	115,7	8,25	4,40	3,87/3,90			
N27	120,8	8,58	4,72	2,80/2,86		7,01/7,74	
K28	121,9	8,47	4,25	1,76/1,87	1,41/1,45	1,66	2,99
G29	109,8	8,52	3,90				
A30	123,8	8,14	4,29	1,35			
I31	121,1	8,30	4,12	1,83	0,86/1,18/1,49	0,86	
I32	126,7	8,42	4,14	1,84	0,91/1,20/1,48	0,91	
G33	113,4	8,60	3,91				
L34	121,9	8,17	4,32	1,58	1,58	0,86/0,91	
M35	122,3	8,57	4,51	2,02	2,50/2,57		
V36	122,8	8,37	4,10	2,07	0,93		
G37	113,5	8,72	3,96				
G38	108,9	8,37	3,92/3,99				
V39	120,2	8,20	4,16	2,07	0,92		
V40	128,7	7,94	4,03	2,03	0,89		

Sequentielle Zuordnung von <sup>15</sup>N-A $\beta$ <sub>40</sub> in 20 mM Tris-d11 HCl pH=7,2, 1 mM EDTA-d16 und 0,1 mM DSS in 92% H<sub>2</sub>O / 8% D<sub>2</sub>O bei 278 K. Alle Angaben in ppm.

## 7.4 Sequentielle Zuordnung von plB42

Rest	N	H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup> und übrige H
M1							
A2							
K3			4,26	1,78/1,92	1,43		
E4	123,7	8,71	4,27	1,90	2,23		
V5	124,2	8,50	4,40	2,06	0,94		
P6			4,40	2,27	1,86	3,69/3,86	
L7	123,1	8,54	4,34	1,53/1,63	1,53	0,86/0,90	
T8	118,2	8,30	4,56	4,11	1,22		
P9			4,34	1,98/2,25	1,77	3,69	
K10	121,8	8,51	4,17	1,67	1,31/1,39	1,67	2,96
H11	121,4	8,46	4,87	3,00/3,05			
P12			4,34	1,92/2,21	1,76		
H13							
H14	119,9	8,77	4,62	3,11			
L15	124,2	8,45	4,33	1,59	1,59	0,84	
S16	116,1	8,45	4,40	3,84/3,89			
D17	122,6	8,43	4,62	2,68			
S18	115,6	8,23	4,42	3,84			
A19	127,3	8,32	4,56	1,35			
P20			4,34	1,98/2,25	1,84	3,60	
L21	122,6	8,46	4,29	1,55/1,61	1,55	0,86	
L22	123,2	8,35	4,34	1,55/1,63	1,55	0,84/0,90	
N23	119,3	8,51	4,68	2,68/2,76			
E24	122,4	8,35	4,56	1,86/2,02	2,25		
P25			4,38	2,27	1,88	3,68/3,79	
Q26	121,2	8,66	4,29	1,98/2,08	2,37		
Q27	122,7	8,62	4,33	1,96/2,12	2,35		
N28	126,1	8,30	4,50	2,72/2,76			
G29	114,6	8,52	3,93/3,99				
S30	116,2	8,48	4,42	3,89			
E31	122,9	8,78	4,27	1,96/2,06	2,23/2,29		
L32	122,6	8,26	4,31	1,57/1,65	1,57	0,84/0,90	
S33	116,4	8,32	4,36	3,88			
K34	123,2	8,29	4,29	1,74/1,84	1,43	1,65	2,96
L35	122,7	8,19	4,31	1,57/1,63	1,57	0,84/0,90	
E36	122,1	8,40	4,27	1,92/2,02	2,21/2,27		
I37	121,6	8,20	4,13	1,84	0,88/1,16/1,45	0,88	
D38	124,4	8,54	4,68	2,66/2,74			
T39	114,7	8,20	4,21	4,21	1,18		
E40	122,6	8,43	4,17	1,88/2,02	2,13		
F41	120,9	8,22	4,50	3,00/3,07		7,16	
R42	122,9	8,08	4,23	1,63/1,68	1,49	3,11	7,28
H43	121,2	8,51	4,58	3,07			
V44	124,2	8,25	4,36	2,04	0,92		
P45			4,34	2,27			
L46	123,0	8,44	4,27	1,55/1,61	1,55	0,88	
E47	122,9	8,49	4,29	1,90/1,96	2,15/2,23		



Rest	N	HN	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>ε</sup> und übrige H
V48	123,6	8,41	4,05	1,98	0,88		
K49	127,8	8,66	4,62	1,70/1,78	1,43	1,65	2,96
P50			4,42	1,92/2,29	1,78	3,64/3,91	
D51	120,7	8,53	4,54	2,66			
G52	109,5	8,46	3,91				
H53	118,6	8,47	4,66	3,17/3,27			
G54	110,2	8,66	3,93				
M55	119,9	8,44	4,52	1,98/2,12	2,51/2,58		
D56	121,2	8,48	4,56	2,60/2,72			
N57	118,8	8,44	4,66	2,72/2,80			
D58	120,6	8,41	4,58	2,62/2,68			
I59	120,7	8,09	4,11	1,88	0,86/1,18/1,45	0,86	
V60	124,1	8,23	4,01	2,06	0,94		
G61	112,4	8,54	3,91				
R62	121,0	8,10	4,29	1,74/1,78	1,59	3,15	7,30
K63	124,2	8,56	4,34	1,72/1,80	1,37/1,43	1,67	2,98
I64	123,6	8,46	4,15	1,86	0,90/1,18/1,45	0,90	
S65	119,7	8,47	4,46	3,84/3,88			
E66	123,4	8,68	4,27	1,92/2,08	2,27		
D67	120,6	8,36	4,56	2,58/2,68			
D68	120,8	8,28	4,58	2,66/2,72			
N69	119,8	8,53	4,76	2,80/2,88			
T70	114,6	8,31	4,29	4,29	1,22		
S71	118,3	8,45	4,44	3,88			
L72	124,1	8,37	4,40	1,61/1,68	1,61	0,84/0,92	
T73	113,7	8,12	4,31	4,23	1,16		
D74	122,6	8,33	4,62	2,60/2,66			
S75	117,1	8,29	4,74	3,84			
P76			4,40	2,03/2,29	1,96	3,72	
G77	109,2	8,58	3,89				
A78	123,9	8,08	4,27	1,37			
V79	119,7	8,16	4,01	2,04	0,92		
L80	125,9	8,33	4,34	1,57/1,65	1,57	0,84	
V81	121,1	8,16	3,99	2,04	0,90		
N82	122,1	8,52	4,66	2,74/2,85			
L83	123,2	8,38	4,27	1,63/1,67	1,63	0,84/0,90	
L84	121,1	8,30	4,31	1,59/1,74	1,67	0,84/0,91	
T85	113,3	8,01	4,25	4,25	1,20		
S86	117,6	8,19	4,40	3,89			
L87	123,4	8,17	4,31	1,53/1,63	1,53	0,84/0,90	
R88	120,5	8,15	4,23	1,72	1,57	3,15	7,30
H89	119,7	8,34	4,64	3,05/3,13			
L90	125,2	8,27	4,58	1,49/1,55	1,49	0,86/0,88	
P91							
P92			4,30	2,01/2,25	1,86	3,64/3,81	
A93	123,7	8,47	4,21	1,31			
M94	119,2	8,38	4,36	1,90	2,41/2,47		
6xHIS	125,6	8,23	4,38	3,02/3,17			

Sequentielle Zuordnung von <sup>15</sup>N-pIB42 in 9,2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=6,5 und 0,1 mM DSS in 93% H<sub>2</sub>O / 7% D<sub>2</sub>O bei 283 K. Alle Angaben in ppm.

## 7.5 Wichtungsfaktoren für die Titrationsexperimente

Wichtungsfaktoren  $f_H$  entsprechend Gleichung (7), Kapitel 2.3. Die Wichtungsfaktoren wurden berechnet aus den in der Madison NMR-Datenbank (Seavey et al., 1991) beobachteten Varianzen der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen relativ zu denen der Amidstickstoffe. Die entsprechenden Statistiken dieser chemischen Verschiebungen finden sich unter [www.bmrb.wisc.edu/ref\\_info/statsel.htm](http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm). Die verwendeten Wichtungsfaktoren basieren auf der am 19.01.2006. aktualisierten Statistik.

Aminosäure	Wichtungsfaktor $f_H$
Ala	6.32
Cys	7.02
Asp	6.95
Glu	6.07
Phe	5.88
Gly	6.06
His	6.09
Ile	6.36
Lys	6.38
Leu	6.11
Met	6.03
Asn	6.42
Gln	6.37
Arg	6.23
Ser	6.25
Thr	7.81
Val	7.03
Trp	5.56
Tyr	6.00

## 8 Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei all jenen bedanken, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die Möglichkeit, in seiner Gruppe an einer interessanten interdisziplinären Thematik arbeiten zu können, sowie für die direkte persönliche Betreuung meiner Arbeit. Beim Fonds der chemischen Industrie möchte ich mich dabei für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeiten bedanken.

Im Rahmen meiner Arbeit am  $\beta$ -amyloiden Protein möchte ich mich bei Prof. Dr. Botond Penke von der Universität Szeged (Ungarn) für die Bereitstellung einer ersten unmarkierten Probe von  $A\beta_{42}$  bedanken. Meinem Mitdoktorand Roland Hofweber danke ich für die stets gute Zusammenarbeit an diesem Projekt.

Bei PD Dr. Jürgen Kuhlmann sowie bei Dr. Xiaodong Zhao vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund möchte ich mich für die Kooperation bei der Untersuchung der RanBD2 sowie für die Bereitstellung der Proteinproben der RanBD2 bedanken. Dr. Rolf Döker danke ich dabei für die Einführung in die NMR-spektroskopischen Arbeiten an der Domäne und die stets gute Zusammenarbeit am Themenkomplex RanBD2 schon während meiner Diplomarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Norbert Sauer und Dr. Inga Barth von der Universität Erlangen für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung der zentralen Schleife von PmSUC3 sowie die Bereitstellung der NMR-Proben für dieses Projekt.

Darüber hinaus möchte ich mich bei PD Dr. Werner Kremer für die Einführung in die eigentliche Praxis NMR-spektroskopischer Messungen und Auswertungen sowie seine stete Unterstützung meiner Arbeit bedanken. Dr. Michael Spörner und PD Dr. Wolfram Gronwald sei für das Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit gedankt. Abschließend möchte ich mich auch ganz herzlich bei allen anderen, nicht namentlich genannten Mitgliedern des Instituts bedanken, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mir durch die angenehme Atmosphäre die Arbeit erleichtert haben.

## 9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, November 2006

---

(Peter Geyer)