

**Die erste Struktur eines Zellwandproteins einer
Diatomee: NMR-spektroskopische
Charakterisierung der PSCD4-Domäne von
Pleuralin-1 aus *Cylindrotheca fusiformis* unter
Verwendung von Methoden zur partiellen
Orientierung**



**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSEN-
SCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III –
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von
Michael Wenzler
aus Villingen im Schwarzwald

durchgeführt am
Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie
der Universität Regensburg
unter Anleitung von
Prof. Dr. Dr. Kalbitzer

April 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 15.4.2003

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

Prüfungsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr. Inga Neumann

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

 Prof. Dr. Eike Brunner

Drittprüfer: Prof. Dr. Manfred Sumper

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Biologische Zusammenhänge	3
2.1	Zellwandsbildung bei Diatomeen	3
2.2	Die Pleuraline und ihre Beteiligung an der Differenzierung der Theca von <i>Cylindrotheca fusiformis</i>	5
2.3	Die Proteindomäne PSCD4 aus Pleuralin-1	7
3	Material und Methoden	8
3.1	Probenpräparation.....	8
3.1.1	PSCD4-Proben	8
3.1.2	HPr-Proben.....	9
3.1.3	BPTI-Proben	9
3.1.4	Verwendete Chemikalien	9
3.2	Spektrenaufnahme und -auswertung	9
3.2.1	Zuordnung der chemischen Verschiebung und Vorhersage von kanonischen Sekundärstrukturelementen der PSCD4-Domäne	10
	Zuordnung der Hauptkette	10
	Zuordnung der Seitenketten.....	10
	Vorhersage von Sekundärstrukturelementen	11
3.2.2	Bestimmung von Einschränkungen für die Strukturrechnung der PSCD4-Domäne	12
	Abstandsinformationen aus NOESY-Spektren	12
	Wasserstoffbrückenbindungen.....	13
	Winkelinformationen aus den $^3J_{H^N H^\alpha}$ - und den $^3J_{H^\alpha N}$ -Kopplungen.....	14
	Restdipolkopplungen	15
3.2.3	Relaxationsuntersuchungen an der PSCD4-Domäne	17
	T_1 -Relaxation	18
	T_2 -Relaxation	18
	Heteronuklearer NOE	19
3.2.4	Prozessierung und Auswertung der NMR-Spektren	19
3.3	Berechnung von Proteinstrukturen der PSCD-Domänen.....	20
3.3.1	CNS	20
3.3.2	ARIA	21
3.3.3	Modell der 5 PSCD-Domänen aus dem Protein Pleuralin-1	21
3.3.4	Ladungsverteilung.....	22
3.3.5	Interaktion der PSCD4-Domäne mit Kieselsäure	22
3.4	Methodische Arbeiten zur Messung von Restdipolkopplungen	24

3.4.1	Vorhersage des magnetischen Suszeptibilitätstensors für diamagnetische Proteine.....	24
3.4.2	Messung von homonuklearen $D_{\text{H}^{\alpha}\text{H}^{\alpha}}$ -Restdipolkopplungen	27
	COSY-Experiment.....	27
	MOCCA-SIAM-Experiment.....	28
3.4.3	HPr: Von der Magnetfeldstärke abhängige Effekte	33
4	Ergebnisse	36
4.1	Strukturbestimmung der PSCD4-Domäne.....	36
4.1.1	Ergebnisse der Zuordnung der chemischen Verschiebungen und der Vorhersage von kanonischen Sekundärstrukturelementen.....	36
	^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment	36
	Umfang der Zuordnung der chemischen Verschiebungen.....	37
	Analyse der chemischen Verschiebungen und Vorhersage der Sekundärstruktur	38
4.1.2	Experimentell bestimmte Einschränkungen für die Strukturrechnung	40
	Restdipolkopplungen	40
	Winkelinformationen aus den $^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{H}^{\alpha}}$ - und den $^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{N}}$ -Kopplungen	42
	Wasserstoffbrückenbindungen aus dem H(N)CO-Experiment.....	43
	Abstandsinformationen aus NOESY-Spektren	43
	Biochemische Bestimmung der Positionen der Disulfidbrücken.....	46
4.1.3	Ergebnisse der Relaxationsstudien am His ₆ PSCD4-Konstrukt.....	47
4.1.4	Struktur der PSCD4-Domäne.....	49
	Lage der Disulfidbrücken	49
	Struktur	52
	Oberflächenpotential und funktionelle Gruppen.....	53
	Qualität der Struktur	55
4.1.5	Strukturmodell der fünf PSCD-Domänen aus Pleuralin-1	56
4.1.6	Wechselwirkung der PSCD4-Domäne mit Kieselsäure.....	56
4.2	Methodische Arbeiten zur Messung von Restdipolkopplungen	58
4.2.1	Lage der magnetischen Suszeptibilitätstensoren in HPr und Melittin	58
4.2.2	Messung von homonuklearen Restdipolkopplungen am BPTI.....	60
	COSY-Experiment.....	60
	MOCCA-SIAM-Experiment.....	62
4.2.3	Von der Magnetfeldstärke abhängige Effekte: Ergebnisse der Messungen am Protein HPr	67
5	Diskussion.....	71
5.1	Die PSCD4-Domäne des Zellwandproteins Pleuralin-1	71
5.1.1	Die NMR-Struktur der PSCD4-Domäne.....	71
	Primärstruktur und Homologe der PSCD4-Domäne.....	71
	Sekundärstruktur der PSCD4-Domäne	71
	Strukturbestimmung der PSCD4-Domäne.....	72
	Tertiärstruktur der PSCD4-Domäne	73
	Einteilung der Struktur der PSCD4-Domäne in eine Proteinfamilie	74
	Funktion der PSCD4-Domäne	74

5.1.2	Strukturmodell der fünf PSCD-Domänen aus Pleuralin-1	75
5.2	Methodische Arbeiten zur Messung von Restdipolkopplungen	76
5.2.1	Vergleich von COSY- und MOCCA-SIAM-Experiment zur Messung der $D_{\text{H}^{\text{N}}_{\text{H}^{\alpha}}}$ -Restdipolkopplung in Proteinen	76
5.2.2	Von der Magnetfeldstärke abhängige Effekte: Kopplungsmessungen am HPr aus <i>Staphylococcus carnosus</i>	77
6	Zusammenfassung	80
7	Literatur	83
8	Danksagung.....	93
9	Anhang.....	95
9.1	Die chemischen Verschiebungen von His ₆ PSCD4	95
9.2	$^3J_{\text{H}^{\text{N}}_{\text{H}^{\alpha}}}$ -Kopplungen, bestimmt aus dem HNCA-E.COSY-Spektrum.....	100
9.3	$^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -Restdipolkopplungen	101
	Erklärung.....	103

1 Einleitung

Die kernmagnetische Resonanz (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) ist die einzige experimentelle Technik, mit deren Hilfe die Struktur und die Dynamik von biologischen Makromolekülen und ihrer Komplexe in Lösung mit atomarer Auflösung bestimmt werden können (PALMER & PATEL, 2002). Die große Bedeutung der NMR-Spektroskopie für das Verständnis der Wirkungsweise von Biomolekülen (z.B. Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Signaltransduktion) wurde durch die Verleihung des Nobelpreises für Chemie 2002 an Kurt Wüthrich für seine „Entwicklung der Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von biologischen Makromolekülen in Lösung“ (überetzt nach www.nobel.se/chemistry/laureates/2002/) unterstrichen.

Seit der ersten mittels NMR-Spektroskopie gelösten Struktur des BUSI (*Bull Seminal Protease Inhibitor*; WILLIAMSON et al., 1985) hat die NMR-Spektroskopie gegenüber der klassischen Methode der Strukturbestimmung, der Röntgendiffraktion an Einkristallen (erste Struktur von Myoglobin: KENDRU et al., 1960, erste Struktur von Hämoglobin: PERUTZ, 1960) stark aufgeholt. Mittlerweile sind 15 % der in der Protein Data Bank (PDB) veröffentlichten Strukturen (Februar 2003: 3102 NMR-Strukturen) mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmt worden. Dieser große Erfolg beruht auf vielen Entwicklungen: technischen, wie z.B. stabileren Magneten mit höheren Feldstärken, oder spektroskopischen, wie die Aufnahme von heteronuklearen dreidimensionalen NMR-Techniken (KAY et al., 1990). Neue Techniken der NMR-Spektroskopie, wie TROSY (PERVUSHIN et al., 1997), CRINEPT (RIEK et al., 1999) oder CRIPT-TROSY (FIAUX et al., 2002), haben die Größenbeschränkung der NMR-Spektroskopie an Makromolekülen von anfänglich 5 bis 10 kDa auf nunmehr circa 900 kDa verschoben. *Cross-Saturation* (TAKAHASHI et al., 2000) und Transfer *Cross-Saturation* (NAKANISHI et al., 2002) ermöglichen die Identifikation von Bindungsflächen zwischen Proteinen größer 150 kDa. Eine weitere bedeutende Entwicklung der letzten Jahre in der Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie ist die Verwendung von anisotropen Größen. Ein Beispiel hierfür ist die Messung von Restdipolkopplungen an partiell orientierten Proteinen (TJANDRA & BAX, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden zur Messung homonuklearer Restdipolkopplungen (BRUNNER et al., 2000) wie das MOCCA-SIAM-Experiment (MÖGLICH et al., 2002) entwickelt. Unter Verwendung dieser Methoden ist der NMR-Spektroskopiker inzwischen gut gerüstet, um biologische Fragestellungen zu lösen.

Diatomeen dominieren in den Ozeanen das Phytoplankton und die Algenblüten (KEMP et al., 2000) und besitzen einen beträchtlichen Anteil an der Nettoprimärproduktion (WERNER,

1. Einleitung

1997). Besonders bekannt sind sie wegen des Formenreichtums und der feinen Musterung ihrer Zellwände aus amorphem Siliziumdioxid. Diese artspezifischen Muster werden bei der Zellteilung reproduziert. Die Bildung dieses nanostrukturierten Siliziumdioxids unterliegt der genetischen Kontrolle (MANN, 1993). Wesentliche zellbiologische Prozesse der Schalenbildung, wie deren Bildung in *Silica Deposition Vesicles* (SDVs), wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen aufgeklärt. Aufnahmestudien von Silizium führten zu der Entdeckung, dass Kieselsäure durch aktive Transporter in der Plasmamembran aufgenommen wird (AZAM & VOLCANI, 1981). Biochemische Untersuchungen zeigten, dass die Zellwände der Diatomeen ein Kompositmaterial aus amorphem hydratisiertem SiO₂ und anderen organischen Komponenten wie Proteinen, Polysacchariden und Polyaminen sind (NAKAJIMA & VOLCANI, 1969; HECKY et al., 1973; KRÖGER et al., 2000). Es gibt Belege, dass ein Teil dieser organischen Komponenten die Bildung des amorphen SiO₂ in einem Prozess der Selbstorganisation kontrollieren (KRÖGER et al., 2001; SUMPER, 2002; KRÖGER et al., 2002). Das Verständnis der daran beteiligten Prozesse ist nicht nur für die Biologie von großem Interesse, sondern auch für die Materialwissenschaften. Nanostrukturierte Materialien wie Zeolithen dienen als Molekularsiebe (KRESGE et al., 1992), Katalysatoren oder Filtermaterialien (HUO et al., 1994; FIROUZI et al., 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die erste Struktur eines Zellwandproteins einer Diatomee, die PSCD4-Domäne des Proteins Pleuralin-1, mittels NMR-Spektroskopie in Lösung bestimmt. Hierzu werden moderne Techniken der NMR-Spektroskopie wie Restdipolkopplungen verwendet. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, Hinweise auf die Funktion der PSCD-Domänen zu bekommen.

2 Biologische Zusammenhänge

2.1 Zellwandbildung bei Diatomeen

Diatomeen sind photosynthetische eukaryotische Einzeller. Sie bilden die größte Klasse der Algen, die *Bacillariophyceae* (SITTE et al., 1991). Sowohl in maritimen als auch in Süßwasserhabitaten sind sie ubiquitär verbreitet und haben einen erheblichen Anteil an der biologischen Primärproduktion (WERNER, 1977). Diatomeen sind von einer zweiteiligen Zellwand (Frustel) aus amorphem hydratisiertem Siliziumdioxid ($\text{SiO}_2 \times n \text{ H}_2\text{O}$, $n \ll 1$) umgeben, welches organische Komponenten wie Proteine und Polysaccharide enthält (VOLCANI, 1981). Die Zellwände offenbaren in der elektronenmikroskopischen Aufnahme ein sehr formenreiches und fein gemustertes Erscheinungsbild. Die Morphologie der Schalen wird zur taxonomischen Klassifikation der Diatomeen genutzt. Nach der Symmetrie unterscheidet man zwei Ordnungen, die rotationssymmetrischen *Centrales* und die bilateralsymmetrischen *Pennales* (SITTE et al., 1991). Abbildung 2.1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellwand der marinen Diatomee *Cylindrotheca fusiformis* aus der Ordnung der *Pennales*. Die Bilateralsymmetrie ist bei *C. fusiformis* nicht ohne weiteres ersichtlich, da die beiden sich überlappenden Schalenhälften (Thecen) in Richtung der Längsachse umeinander gewunden sind, was an den umlaufenden SiO_2 -Bändern gut zu erkennen ist.

Abbildung 2.2a zeigt den schematischen Aufbau der Zellwand von *C. fusiformis*. Die obere Schalenhälfte ist die Epitheca, die etwas kleinere, untere die Hypotheca. Jede Theca ist aus der Epi- bzw. Hypovalva und den sich daran anschließenden silifizierten Gürtelbändern aufgebaut. Jede Valva besteht aus einer so genannten Raphe und den sie einschließenden nicht silifizierten Bereichen. Die Bildung der Valva (außer nach der geschlechtlichen Teilung immer einer Hypovalva) und der Gürtelbänder geschieht in speziellen Zellkompartimenten, den *Silica Deposition Vesicles* (SDV), deren Entstehung an die Mitose geknüpft ist. Durch Exocytose, welche bei einer Valva fast die gesamte Fläche einer Zelle betrifft, gelangen die

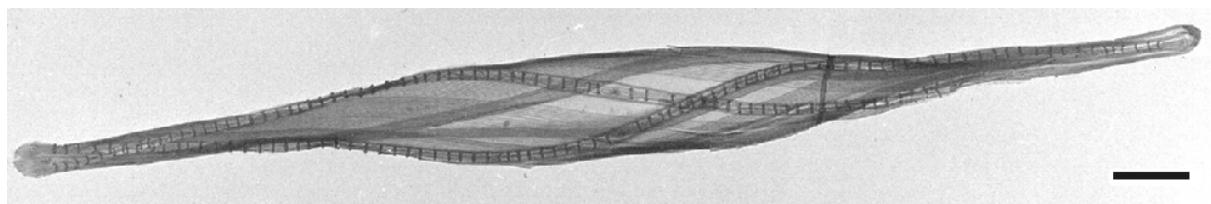


Abb. 2.1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Zellwand von *Cylindrotheca fusiformis*. Parallele Reihen von SiO_2 -Bänder laufen entlang der Längsachse um die Zelle. Der Balken entspricht 2,5 μm (aus KRÖGER et al., 1999)

2. Biologische Zusammenhänge

Zellwandbestandteile an ihren extraplasmatischen Bestimmungsort (VOLCANI, 1981). Die Gesamtheit der Gürtelbänder bilden das Cingulum. Die Gürtelbänder des Überlappungsbereiches von Epi- und Hypotheca werden als pleurale Bänder bezeichnet.

Der molekulare Mechanismus der speziespezifischen Musterbildung wird momentan noch nicht gut verstanden, obwohl er für die Nanotechnologie von großer Bedeutung wäre. Ein vorgeschlagenes Modell geht davon aus, dass Proteine und/oder Polysaccharide eine organische Matrix innerhalb des SDVs bilden, welche die SiO₂-Morphogenese steuert (HECKY et al., 1973; ROBINSON & SULLIVAN, 1987; PICKETT-HEAPS et al., 1990; KRÖGER et al., 1994). Die Charakterisierung solcher Matrixkomponenten wird dadurch erschwert, dass es bisher noch nicht möglich war, die SDVs zu isolieren. Allerdings gelang es KRÖGER et al. (1994, 1996) mehrere Zellwandproteine zu isolieren.

Die erste entdeckte Proteinfamilie ist die der mit EDTA (Ethylendiamintetraethylammonium) von der isolierten Zellwand extrahierbaren Frustuline (KRÖGER et al., 1994, 1996). Dies sind kalziumbindende Glycoproteine, die sich auf der Oberfläche der Zellwand befinden. Frustuline wurden auch in einer weiteren Diatomeenart der Ordnung *Pennales* gefunden. Alle Frustuline enthalten mindestens zwei hoch konservierte so genannte ACR-Domänen. ACR bezeichnet saure cysteinreiche Domänen, welche vermutlich ein EF-Handmotiv ausbilden (KRÖGER et al., 1994).

Zusätzlich gibt es weitere organische Zellwandbestandteile, welche nicht mit EDTA und SDS (Sodiumdodecylsulfat) extrahierbar sind, die also fester an bzw. in der Zellwand verankert sind (KRÖGER et al., 1997). Diese werden erst nach Auflösung der Zellwand mit wasserfreier Flusssäure (HF) freigesetzt. Dies sind die Proteinfamilie der Pleuraline (früher HEPs, HF-extrahierbare Proteine, KRÖGER et al., 1997; KRÖGER & WETHERBEE, 2000, siehe Abschnitt

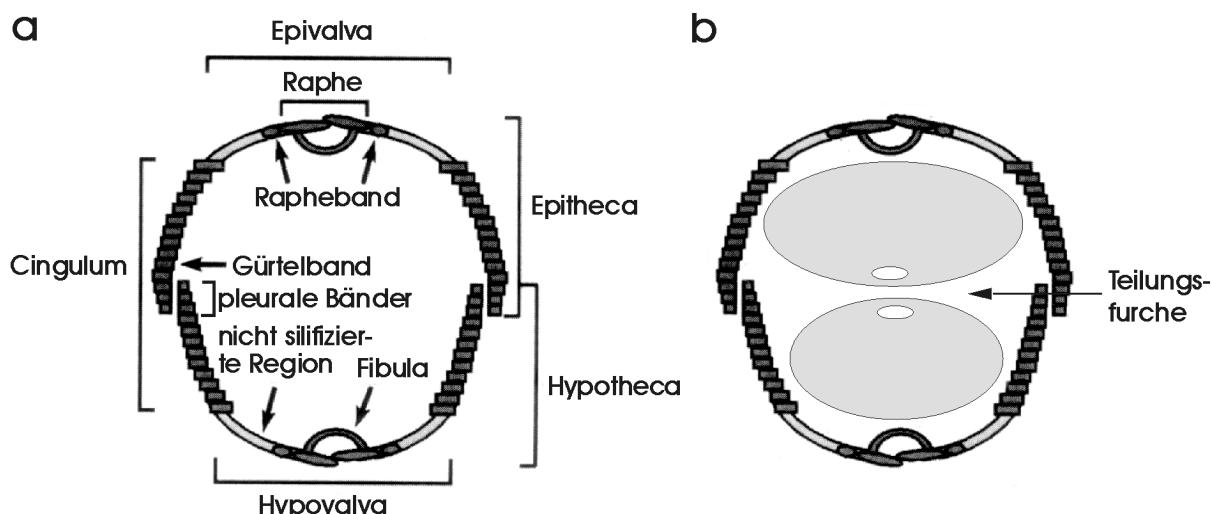


Abb. 2.2: Schematische Darstellung einer Zellwand von *C. fusiformis* im Querschnitt (a) und (b) einer Diatomee im Stadium der Zellteilung (nach KRÖGER & WETHERBEE, 2000)

2. Biologische Zusammenhänge

2.2 und 2.3), die Silaffine (KRÖGER et al., 1999, 2001, 2002) und verschiedene Polyamine (KRÖGER et al., 2000). Silaffine sind polykationische Peptide mit posttranslational modifizierten Aminosäureresten. Eine der gefundenen Modifikationen besteht in der Bindung von Polyaminen an die Seitenketten von Lysinresten (Kröger et al., 2001). Sowohl die Polyamine (Kröger et al. 2000), wie auch die Silaffine (KRÖGER et al., 2001) katalysieren in vitro die SiO₂-Präzipitation aus Kieselsäurelösungen. In vivo steuern beide vermutlich die Morphogenese der SiO₂-Strukturen (KRÖGER et al., 2000, 2001, 2002), wobei die Phosphorylierung von Serin- und Hydroxylsäureresten von wesentlicher Bedeutung ist. Daraus leitet SUMPER (2002) ein neues Modell der Phasenseparation zur Nanostrukturierung des amorphen SiO₂ in Diatomeen ab.

2.2 Die Pleuraline und ihre Beteiligung an der Differenzierung der Theca von *Cylindrotheca fusiformis*

Die Mitglieder der Familie der Pleuraline sind nicht durch EDTA- und SDS-Behandlung aus der isolierten Zellwand extrahierbar, sondern werden erst nach Auflösung der SiO₂-Bestandteile der Frustel mit wasserfreier Flussäure freigesetzt. In EDTA/SDS behandelten Zellwänden sind die Pleuraline dem Verdau durch Pronase zugänglich. Dies zeigt, dass die Pleuraline nicht physikalisch in die Zellwand eingeschlossen sind, sondern sich auf der Oberfläche der Zellwand befinden (KRÖGER et al., 1997). Deshalb kann man annehmen, dass die Pleuraline über kovalente Bindungen mit der Zellwand verknüpft sind, zum Beispiel über Zucker durch O-glykosidische Bindungen oder durch Phosphodiesterbindungen, welche beide durch HF gespalten werden (MORT & Lamport, 1977). Eine andere Möglichkeit ist die von HECKY et al. (1973) und von LOBEL et al. (1996) vorgeschlagene Bindung zwischen OH-Gruppen der Pleuraline und Silanolgruppen des hydratisierten SiO₂ (KRÖGER et al., 1997).

Alle drei beschriebenen Mitglieder der Pleuralinfamilie zeigen den gleichen modularen Aufbau (s. Abb. 2.3) aus einer N-terminalen Präsequenz (Aminosäuren (AA) 1–4 in Pleuralin-1), einem prolinreichen Bereich (AA 46–82, 65 % Proline in Pleuralin-1), 3 bis 5 prolinreichen PSCD-Domänen (87 bzw. 89 AA lang), welche in Abschnitt 2.3 eingehend beschrieben werden und einer für jedes Pleuralin unterschiedlichen C-terminalen Domäne (AA 576–946, 7,5 % Proline in Pleuralin-1, KRÖGER et al., 1997). Die Sequenz der Pleuraline zeigt keine

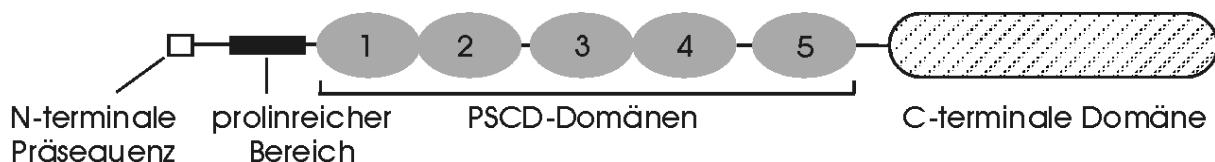


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau des Pleuralin-1 von *C. fusiformis* (nach KRÖGER et al., 1997)

2. Biologische Zusammenhänge

signifikante Sequenzhomologie zu anderen Proteinen in den gängigen Datenbanken. Pleuraline sind mit einem berechneten $pI < 4$ stark negativ geladen (KRÖGER & SUMPER, 1998). Posttranskriptionale Modifikationen (Saccharide werden durch HF-Behandlung abgespalten) wurden nicht untersucht. Der Name Pleuraline beschreibt ihr Vorkommen auf der inneren Oberfläche der pleuralen Bänder der Epitheca (vgl. Abb. 2.2), welches durch Immunlokalisierung bestimmt wurde (KRÖGER et al., 1997).

Die Funktion der Pleuraline ist noch nicht vollständig verstanden, allerdings wurde durch Immunlokalisierung ihre Beteiligung an der Differenzierung der Theca gezeigt (KRÖGER & WETHERBEE, 2000), weshalb in Abb. 2.4 ein kurzer Überblick über den Zellzyklus von *C. fusiformis* gegeben wird. Einen ausführlichen Überblick über die Zellwandbildung gibt z.B. Volcani (1981). Nach der Zellteilung wird in beiden Tochterzellen ein SDV gebildet, in dem eine neue Hypovalva entsteht. Die sich vergrößernden Zellen wandern auseinander, so dass jede Tochterzelle eine alte Theca erhält, die zu einer Epitheca wird und eine neue, aus dem SDV exozytierte Hypovalva. Nach der Trennung beider Zellen wachsen die Protoplasmata, wobei die Frustel durch die Anlagerung neuer Gürtelbänder am Rand der neuen Hypotheca vergrößert wird. KRÖGER und WETHERBEE (2000) haben gezeigt, dass die Pleuraline niemals im SDV vorkommen, sondern während der Zellteilung in die Teilungsfurche (vgl. Abb. 2.2)

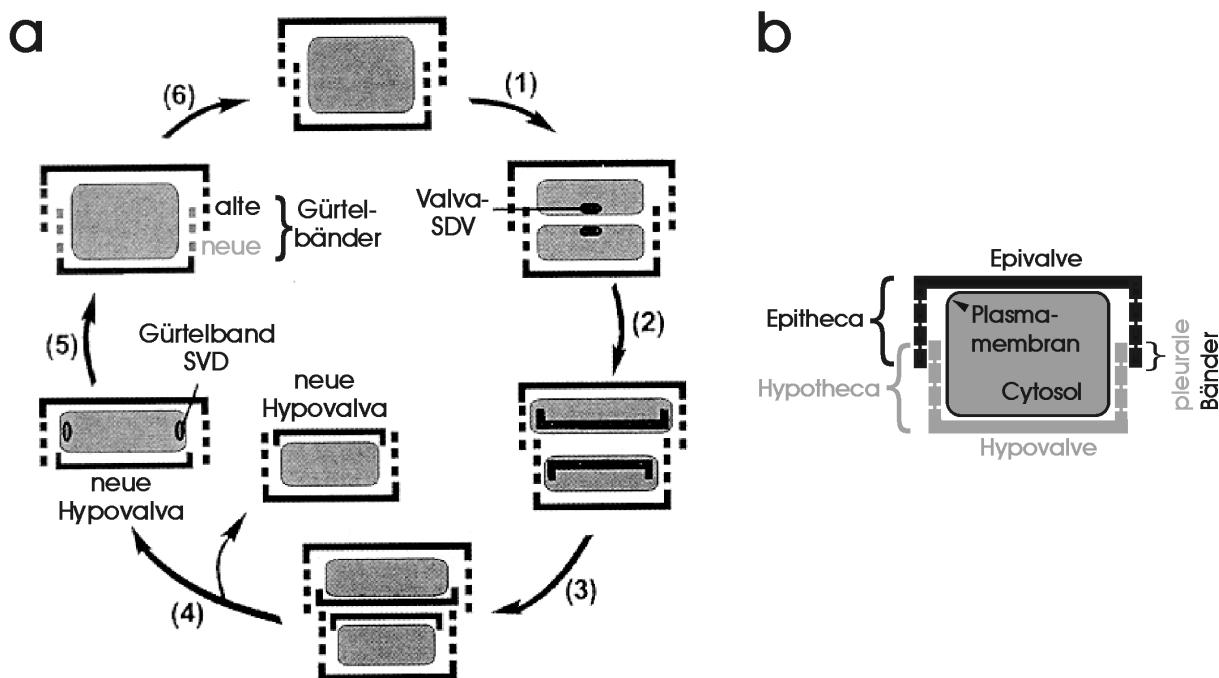


Abb. 2.4: (a) zeigt den Zellzyklus einer Diatomee, (b) ihren schematischen Aufbau aus dem Protoplasmata und der sie vollständig umgebenden Frustel (vgl. Abb. 2.2). (1) Cytokinese und Bildung des Valva-SDV in jedem Protoplasmata. (2) Wachstum der SDV und Bildung einer neuen Hypovalva innerhalb des SDV. (3) Exocytose der neu gebildeten Valven. (4) Trennung der beiden Tochterzellen. (5) Aufeinander folgende Bildung und Sekretion der Gürtelbänder. (6) DNA-Replikation (aus KRÖGER et al., 2000)

2. Biologische Zusammenhänge

exocytiert werden. Von dort wandern sie an die innere Oberfläche der pleuralen Bänder der Epitheca und sind dort während des gesamten Zellzyklus (einschließlich der Interphase) nachweisbar. Das organische Material im Überlappungsbereich verbindet Epi- und Hypotheca fest miteinander, um eine Grenze als Schutz des Protoplasten zu bilden. Während der Cytokinese muss diese allerdings kontrolliert gelockert werden (WATERKEYN & BIENFAIT, 1987). Deshalb spekulieren KRÖGER und WETHERBEE (2000), dass Serin- und Threoninreste der Pleuraline auf der Epitheca durch O-glykosidische Bindungen mit Hydroxylgruppen einer vermuteten callosischen Schicht auf der Hypotheca fest verbunden sind. Während der Zellteilung würde diese Schicht dann abgebaut werden. Allerdings sind noch keine organischen Komponenten spezifisch für die Hypotheca identifiziert worden, ebensowenig wie die Glykosylierung der Pleuraline.

2.3 Die Proteindomäne PSCD4 aus Pleuralin-1

Im Rahmen dieser Arbeit wird die PSCD4-Domäne aus dem 100 kDa schweren Protein Pleuralin-1 (ehemals HEP200, KRÖGER et al., 1997) NMR-spektroskopisch (*Nuclear Magnetic Resonance*) charakterisiert. Das namengebende Merkmal der PSCD-Domänen (entsprechend dem Einbuchstabencode der AA) ist die Häufigkeit der Aminosäurereste Prolin (22 %), Serin (11 %), Cystein (11 %) und Aspartat (9 %). Zusammen machen sie über 50 % der Aminosäuren jeder Domäne aus. In Abbildung 2.4 ist die Sequenz der 5 PSCD-Domänen aufgetragen. Man erkennt, dass die aus 87 bzw. 89 Aminosäuren aufgebauten Domänen sich in der Sequenz stark ähneln. Sie zeigen 73 bis 91 % Sequenzidentität zueinander. Sie alle besitzen 10 Cysteinreste, deren Position konserviert ist. Die PSCD-Domänen 3 und 4 folgen direkt aufeinander, die Domänen 1 und 2, 2 und 3 sowie 4 und 5 sind durch kurze Sequenzen von 5, 11 bzw. 28 Aminosäureresten getrennt (KRÖGER et al., 1997).

Die Sequenz der PSCD-Domänen sind aus der DNA-Sequenz des Pleuralin-1-Gens abgeleitet. Deshalb ist nicht bekannt, ob die PSCD4-Domäne posttranskriptionale Modifikationen wie Glykosylierungen oder ungewöhnliche Aminosäurereste wie Hydroxyproline enthält.

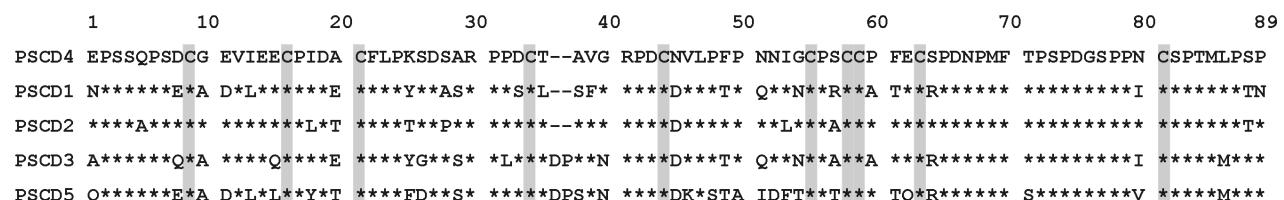


Abb. 2.4: Sequenzvergleich der 5 PSCD-Domänen des Pleuralin-1. Die PSCD-Domänen sind entsprechend ihrer Position zum N-Terminus im Pleuralin-1 nummeriert. Sterne kennzeichnen Aminosäuren, welche mit denen der in dieser Arbeit untersuchten PSCD4-Domäne identisch sind. Die Positionen der 10 konservierten Cysteine sind durch graue Balken unterlegt (nach KRÖGER et al., 1997)

3 Material und Methoden

3.1 Probenpräparation

3.1.1 PSCD4-Proben

Die NMR-Messungen wurden an einem 112 Aminosäuren langen His₆PSCD4-Konstrukt durchgeführt. Dieses wurde von Herrn Gerhard Lehmann in der Gruppe von Herrn Prof. Sumper (Universität Regensburg) kloniert und in *E. coli* überexprimiert (WENZLER et al., 2001). Die Sequenz des His₆PSCD4 ist in Abb. 3.1 gezeigt. Zur Expression von ¹⁵N- bzw. ¹⁵N-¹³C-isotopenmarkiertem Protein wurden die *E. coli* Zellen in M9-Medium (SAMBROOK et al., 1989) mit ¹⁵N-Ammoniumchlorid bzw. ¹⁵N-Ammoniumchlorid und ¹³C₆-D-Glucose angezogen. Die NMR-Messungen erfolgten in einem 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5) mit einer Proteinkonzentration von ca. 10 mg/ml und 10 % D₂O. Zusätzlich enthielt die Lösung 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin, 1 µM BPTI (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*) und als interne Referenz 0,1 mM DSS (4,4-Dimethyl-4-Silapentan-Sulphonsäure). Der pH-Wert der Proben wurde mit einem Knick-761-pH-Meter unter Verwendung einer 3-mm-Glaselektrode gemessen, ohne den Isotopeneffekt des Deuteriums in den Proben zu berücksichtigen. Durch Zugabe von NaOH bzw. HCl wurde der pH-Wert gegebenenfalls korrigiert. NMR-Proben in D₂O wurden durch zweimalige Gefrier-trocknung und anschließende Aufnahme des Proteins in D₂O erhalten. Alle Messungen erfolgten bei T = 298 K. Für Zeiträume länger als 5 Tage zwischen einzelnen Messungen wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Messungen der Restdipolkopplungen in anisotroper Lösung wurde zu der ¹⁵N-markierten Probe 7,5 % ^{w/v} des Bicellsystems DIODPC/CHAPSO/CTAB (4,3:1:0,1; CAVAGNERO et al., 1999) gegeben.

1	10	20	30	40	50
SYYHHHHHHHT	MMPSPEPSSQ	PSDCGEVIEE	CPIDACFLPK	SDSARPPDCT	
60	70	80	90	100	
AVGRPDCNVL	PFPNNIGCP	CCPFECSPDN	PMFTPSPDGS	PPNCSPTMLP	
110					
SPSPSAVTVP	LT				

Abb. 3.1: Sequenz der rekombinanten His₆PSCD4-Domäne, welche in den NMR-Untersuchungen verwendet wurde. Die PSCD4-Domäne ist mit schwarzen Buchstaben dargestellt, zusätzliche Aminosäuren aus Pleuralin-1 in Grau. Inverse Buchstaben kennzeichnen ein für die Expression und Aufreinigung ligiertes Peptid. Die im Weiteren verwendete Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf diese Abbildung

3. Material und Methoden

3.1.2 HPr-Proben

Die Messungen von Wildtyp-HPr-Protein (Histidine-Containing Phosphocarrier Protein) aus *Staphylococcus carnosus* erfolgte an den NMR-Proben von GÖRLER et al. (1999) bei $T = 298\text{ K}$.

3.1.3 BPTI-Proben

BPTI (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,2, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DSS in 500 μL 95 % $\text{H}_2\text{O}/5\%$ D_2O angesetzt. Partielle Orientierung wurde durch Zusatz von 3 bis 9 % $^w/v$ des Bicellsystems DMPC/DHPC/CTAB (3:1:0,1 n_n) (VOLD & PROSSER, 1996; OTTIGER & BAX, 1998; LOSONCZI & PRESTEGARD, 1998) erreicht. Die Messungen der COSY-Experimente wurden bei $T = 308\text{ K}$ durchgeführt, die der MOCCA-SIAM-Experimente bei $T = 305\text{ K}$.

3.1.4 Verwendete Chemikalien

Die Lipidkomponenten der eingesetzten Bicellsysteme sowie die ^{13}C -Glucose und ^{15}N -Ammoniumchlorid wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Verbindung	Hersteller
CHAPSO	Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA
DIODPC	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
DHPC	Larodan AB, Malmö, Schweden
DMPC	Larodan AB, Malmö, Schweden
CTAB	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
$^{13}\text{C}_6$ -D-Glucose	Martek Biosciences Corporation, Columbia, USA
^{15}N -Ammoniumchlorid	Martek Biosciences Corporation, Columbia, USA

Alle weiteren Chemikalien wurden (wenn nicht anders vermerkt) von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) mit Reinheitsgrad p.a. bezogen. Die Lösungen wurden mit entionisiertem und filtriertem Wasser (Millipore) hergestellt.

3.2 Spektrenaufnahme und -auswertung

Die Spektren wurden an Bruker DMX500-, DRX600- bzw. DMX800-Spektrometern mit einer Protonenresonanzfrequenz von 500,13, 600,13 bzw. 800,13 MHz und der Software XWINNMR 2.6 (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen. Die Temperatureinstellung der Spektrometer wurde mit Ethylenglykol als externer Referenz (RAIFORD et al., 1979) überprüft.

3. Material und Methoden

Die Aufnahme der dreidimensionalen (3D) Spektren erfolgte in der Regel mit 1024 Datenpunkten in der direkten ^1H -Dimension, mit 64 Datenpunkten für den an das direkt detektierte Proton gebundenen ^{15}N bzw. ^{13}C , wobei die Frequenzunterscheidung mit der Echo-Antiecho-Methode (SCHLEUCHER et al., 1994) erfolgte. Die zweite indirekte Dimension (^1H bzw. ^{13}C) wurde mit 128 Datenpunkten und mit TPPI (*Time Proportional Phase Incrementation*; MARION & WÜTHRICH, 1983) oder States-TPPI (MARION et al., 1989) zur Frequenzunterscheidung aufgenommen.

3.2.1 Zuordnung der chemischen Verschiebung und Vorhersage von kanonischen Sekundärstrukturelementen der PSCD4-Domäne

Eine gute Übersicht über die Zuordnungsstrategien der chemischen Verschiebungen in Proteinen und die dabei verwendeten NMR-Experimente geben SATTLER et al. (1999). Alle Spektren für die Zuordnung der PSCD4-Domäne wurden bei 600,13 MHz Protonenresonanzfrequenz und $T = 298 \text{ K}$ aufgenommen.

Zuordnung der Hauptkette

Die sequentielle Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Atome des Proteinrückgrats erfolgte mit den folgenden heteronuklearen Experimenten: ^1H - ^{15}N -HSQC (MÜLLER, 1979; BAX et al., 1990; KAY et al., 1992), HNCA (KAY, et al., 1990; GRZESIEK & BAX, 1992; STONEHOUSE et al., 1995), CBCA(CO)NH (GRZESIEK & BAX, 1992a, 1993), HBHA(CO)NH (GRZESIEK & BAX, 1993, MUHANDIRAM & KAY, 1994), ^1H - ^{15}N -TOCCSY HSQC (Mischzeit 100 ms; BAX & DAVIS, 1985; KAY et al., 1992), ^1H - ^{15}N -NOESY HSQC (Mischzeit 100 ms; Marion et al., 1989a; KAY et al., 1992). Aufgrund der hohen Anzahl von Prolinresten im His₆PSCD4 wurde das Prolin-editierte CDCA(NCO)CAHA-Spektrum (BOTTOMLEY et al., 1999) aufgenommen. Die Zuordnung der Carbonylverschiebungen erfolgte mittels des HNCO- (KAY et al., 1990; GRZESIEK et al., 1992; STONEHOUSE et al., 1995) und des HACACO-Experimentes (KAY et al., 1990).

Zuordnung der Seitenketten

Die chemischen Verschiebungen der H^β und C^β der Seitenkettenatome wurden aus den ebenfalls für die sequentielle Zuordnung verwendeten CBCA(CO)NH- und HBHA(CO)NH-Experimenten bestimmt. Zur Bestimmung der chemischen Verschiebungen der restlichen aliphatischen C-Atome und der direkt daran gebundenen Protonen dienten das $\text{H}(\text{C})\text{CH}$ -TOCSY- (KAY et al., 1993), das $(\text{H})\text{CC}(\text{CO})\text{NH}$ -TOCSY- (MONTELIONE et al., 1992; CARLOMAGNO et al., 1996; SATTLER et al., 1999) und das $\text{H}(\text{CC})(\text{CO})\text{NH}$ -TOCSY-Experiment (MONTELIONE

3. Material und Methoden

et al., 1992; SATTLER et al., 1999). Mehrdeutige oder fehlende Zuordnungen, speziell für die Prolinreste wurden teilweise während der Zuordnung der NOESY-Spektren (s. 3.2.2) geklärt bzw. erhalten. Die chemischen Verschiebungen der Seitenketten CO- und NH₂-Gruppen der Asparagin- und Glutaminseitenketten sind dem HNCO bzw. dem HNCA-Spektrum entnommen, die der Carboxygruppe der Aspartat- bzw. Glutamatseitenkette dem HACACO-Experiment. Die N^ε-Verschiebungen der Argininreste wurden mit Hilfe des HNCA-Spektrums bestimmt. Die in D₂O bei einer Protonenresonanzfrequenz von 800,13 MHz aufgenommenen ¹H-¹H-NOESY- (JEENER et al., 1979; KUMAR et al., 1980) und ¹H-¹H-TOCCSY-Experimente (BRAUNSCHWEILER & ERNST, 1983; BAX & DAVIS, 1985), sowie das ¹H-¹³C-NOESY-HSQC-Spektrum (Mischzeit, 100 ms; SCHLEUCHER et al., 1994) wurden zur Zuordnung der Ringprotonen der Aromatenseitenketten verwendet. Das ¹H-¹H-NOESY-Experiment wurde mit einer dem NOESY vorgeschalteten TOCSY-Mischsequenz aufgenommen, so dass Differenzen der chemischen Verschiebungen zwischen NOESY und TOCSY aufgrund einer Probenerwärmung durch die Pulse der MLEV17-TOCSY-Mischsequenz eliminiert werden. Die TOCSY-Mischzeit betrug 80 ms, die Mischzeit für den NOESY-Transfer 65 ms.

Vorhersage von Sekundärstrukturelementen

Die chemische Verschiebung eines Spins enthält Informationen über seine chemische Umgebung und die lokale Konformation des Moleküls. Statistische Analysen an Peptiden und Proteinen haben gezeigt, dass die chemischen Verschiebungen einiger Hauptkettenatome eine starke Abhängigkeit von der Sekundärstruktur des Proteinrückgrats besitzen (SZIÁGYI & JARDETZKY, 1989; PASTORE & SAUDEK, 1990; WISHART et al., 1991). Deshalb wurden die Abweichungen der chemischen Verschiebung von den Werten des entsprechenden Kerns in einem ungefalteten Hexapeptid (so genannte *Random-Coil*-Verschiebung) analysiert. Dabei beobachtet man für die chemischen Verschiebungen der C^α-, C^β- und C^γ-Kerne eine Tieffeldverschiebung relativ zu den *Random-Coil*-Werten, wenn sie in helikalen Strukturen vorliegen, hingegen eine Hochfeldverschiebung in β-Faltblättern. Die H^α-Verschiebungen zeigen ein umgekehrtes Verhalten. Die chemischen Verschiebungen für Reste, denen ein Prolin folgt, wurden wie von WISHART et al. (1995a) vorgeschlagen korrigiert, da sie sonst das Vorliegen eines β-Faltblattes vorspiegeln. Zur Quantifizierung dieser Abweichungen und zur Vorhersage von kanonischen Sekundärstrukturelementen wurde das Computerprogramm CSI (*Chemical Shift Index*) von WISHART et al. (1994) verwendet.

Ein anderer Ansatz zur Vorhersage von Sekundärstrukturelementen aus den chemischen Verschiebungen von C^α-, C^β-, C^γ-, H^α- und H^N-Kernen, bei denen die Diederwinkel Φ und Ψ

3. Material und Methoden

abgeleitet werden, liegt dem Computerprogramm TALOS zugrunde (CORNILESCU et al., 1999). Die Diederwinkel Φ und Ψ , welche die Konformation des Proteinrückgrats festlegen, nehmen in kanonischen Sekundärstrukturelementen nur bestimmte Werte an (RAMACHANDRAN et al., 1963). Im Programm TALOS werden durch eine Datenbanksuche homologe Bereiche (Tripeptide) in Proteinen mit bekannter Struktur gesucht. Für die 10 besten Treffer, dass heißt homologe Aminosäuren und gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats und denen der homologen Tripeptide aus der Datenbank, werden die Winkel Φ und Ψ der mittleren Aminosäure ausgegeben. Wenn diese Wertepaare in einem engen Bereich des Ramachandran-Diagramms zusammenfallen, nimmt man an, dass die beiden Diederwinkel für diese Aminosäure im zu untersuchenden Protein ebenfalls in diesem Bereich liegen und man sie dann sogar als Einschränkungen für die Strukturrechnung verwenden kann.

3.2.2 Bestimmung von Einschränkungen für die Strukturrechnung der PSCD4-Domäne

Abstandsinformationen aus NOESY-Spektren

Die wichtigsten Informationen für die Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie sind die Abstandsinformationen zwischen Protonenpaaren (WÜTHRICH, 1986). Die Quelle für diese Informationen ist die Messung des Kernoverhausereffekts (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE; OVERHAUSER, 1953; NOGGLE & SHIRMER, 1971). Der Kernoverhausereffekt beruht auf dem Polarisationstransfer zwischen dipolar gekoppelten Protonen, wenn die Population eines oder mehrerer Spins gestört wird. Die zeitliche Änderung der Magnetisierung in einem System aus 2 Spins mit einem Kernspin von $1/2$ kann durch folgende Ratengleichungen beschrieben werden (HAUSSER & KALBITZER, 1989):

$$\frac{dM_Z^A}{dt} = -\rho_A(M_Z^A - M_0^A) - \sigma_{AB}(M_Z^B - M_0^B) \quad [3.1]$$

$$\frac{dM_Z^B}{dt} = -\rho_B(M_Z^B - M_0^B) - \sigma_{AB}(M_Z^A - M_0^A) \quad [3.2]$$

Hierin sind ρ_A und ρ_B die Spin-Gitter-Relaxationsraten der Kerne A und B, σ_{AB} die Kreuzrelaxationsrate zwischen den beiden und M_0 die Gleichgewichtsmagnetisierung im thermischen Gleichgewicht. Für ein isoliertes Zwei-Spin-System ist die Intensität des NOE-Signals proportional zum Produkt aus der Mischzeit τ_m und der Kreuzrelaxationsrate. Die Kreuzrelaxationsrate ist proportional zum Inversen der sechsten Potenz des Abstandes r_{AB} zwischen den beiden Kernen (CAVANAGH et al., 1996):

3. Material und Methoden

$$I_{AB} \propto \tau_m \cdot \sigma_{AB} \propto r_{AB}^{-6} \quad [3.3]$$

Die Annahme des isolierten Zwei-Spin-Systems ist nur für sehr kurze Mischzeiten exakt. Für die hier verwendete Mischzeit $\tau_m = 100$ ms müssten eigentlich noch weitere Effekte wie die Spindiffusion und der Rücktransfer der Magnetisierung berücksichtigt werden, welche die Signalintensität verfälschen können. Dies wird durch die Verwendung eines experimentellen Fehlers der ermittelten Abstände in der Strukturrechnung berücksichtigt.

Zur Strukturrechnung wurden Abstandsinformationen aus dem ^1H - ^{15}N - und dem ^1H - ^{13}C -NOESY-HSQC-Spektrum, jeweils bei 600,13 MHz ^1H -Resonanz ($T = 298$ K) aufgenommen, verwendet. Die Eichung der Abstände auf die beobachteten Signalintensitäten erfolgte auf sequentielle $\text{H}^N\text{-H}^N$ -Distanzen (zwischen direkt benachbarten Aminosäuren, ca. 0,22 nm) für das ^{15}N -editierte Experiment und intraresiduale $\text{H}^{\beta 3}\text{-H}^{\beta 2}$ -Distanzen (ca. 0,22 nm) im ^{13}C -editierten Spektrum. Der Fehler wurde mit $\pm 35\%$ angenommen, wobei als untere Grenze (Abstand – Fehler) der van-der-Waals-Abstand von 0,18 nm verwendet wurde.

Die Zuordnung der NOE-Signale erfolgte manuell. Zur Unterstützung der manuellen Zuordnung wurden während aller Stadien der Strukturbestimmung aus den berechneten Strukturen (s. 3.3) mit dem Computerprogramm RELAX (GÖRLER & KALBITZER, 1997) NOESY-Spektren zurückgerechnet. Die vom Programm RELAX rückgerechneten und zugeordneten Spektren wurden dann mit den experimentellen Spektren verglichen, um Mehrdeutigkeiten der manuellen Zuordnung zu eliminieren.

Wasserstoffbrückenbindungen

Wasserstoffbrückenbindungen spielen eine Schlüsselrolle für die Faltung und Stabilisierung von Proteinen (JEFFREY & SAENGER, 1991). DINGLEY und GRZESIEK (1998) konnten in Watson-Crick-Basenpaaren in einer RNA-Doppelhelix erstmals Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei N-Atomen, die als H-Akzeptor bzw. H-Donor wirken, durch Messung ihrer skalaren Kopplung mittels NMR-Spektroskopie direkt nachweisen. Diese skalare $^{2\text{H}}J_{\text{NN}}$ -Kopplung beträgt ca. 7 Hz und zeigt, dass Wasserstoffbrückenbindungen in gewissem Maße den Charakter einer kovalenten chemischen Bindung tragen.

Zwischen den in Proteinen an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten Atomen N und C' des Proteinrückgrats ist die skalare $^{3\text{H}}J_{\text{NC}'}$ -Kopplung nur 0,3 bis 0,8 Hz groß (CORDIER & GRZESIEK, 1999; CORNILESCU et al., 1999a). Diese kleine Kopplung reicht aber aus um einen Magnetisierungstransfer zwischen den beiden Atomen der Wasserstoffbrückenbindung zu beobachten, indem man die Transferzeit von normalerweise 16,5 ms ($1/4 J_{\text{NC}'}$) deutlich verlängert. Um die Signale zwischen dem N- und dem C'-Atom der Vorgänger-Aminosäure zu minimieren, welche eine Kopplung $^1J_{\text{HC}'} = 15$ Hz besitzen (JURANIC et al., 1996), wird eine

3. Material und Methoden

Transferzeit von $1/(^1J_{NC'}) = 66$ ms verwendet. Zur Überprüfung, ob die Signale wirklich auf Transfer über eine Wasserstoffbrückenbindung beruhen und nicht über die Kopplung des C' des Vorgängers, wurde ein Kontrollexperiment mit 16,5 ms Transferzeit aufgenommen.

Aufgrund der starken Relaxation während der langen Transferzeit wurden für das H(N)CO-Experiment 312 *FIDs* aufaddiert (*Scans*), wobei eine Datenmatrix von 512×1024 Punkten aufgenommen wurde.

Winkelinformationen aus den $^3J_{H^N H^\alpha}$ - und den $^3J_{H^\alpha N}$ -Kopplungen

Die Konformation des Rückgrats von Polypeptiden wird vollständig durch Angabe der beiden Diederwinkel Φ und Ψ beschrieben (RAMACHANDRAN et al., 1963). Von KARPLUS (1959) wurde ein semi-empirischer Zusammenhang zwischen solchen Diederwinkeln und der skalaren 3J -Kopplung über die 3 den Winkel aufspannenden Bindungen, die so genannte Karplus-Kurve, beschrieben:

$$J = A \cos^2(\phi + \theta) + B \cos(\phi + \theta) + C \quad [3.4]$$

ϕ ist der Diederwinkel, A , B , C und θ sind Parameter, welche für den jeweiligen Diederwinkel (z.B. Φ) mit Hilfe der zugehörigen 3J -Kopplung und bekannten NMR- oder Kristallstrukturen bestimmt werden müssen. Für den Winkel Φ und die $^3J_{H^N H^\alpha}$ -Kopplung bzw. für Ψ und $^3J_{H^\alpha N}$ wurden folgende Parametrisierungen von WANG und BAX (1996 bzw. 1995) verwendet:

$$^3J_{H^N H^\alpha} = 6,98 \cdot \cos^2(\Phi - 60^\circ) - 1,38 \cdot \cos(\Phi - 60^\circ) + 1,72 \quad [3.5]$$

$$^3J_{H^\alpha N} = -0,88 \cdot \cos^2(\Psi + 60^\circ) - 0,61 \cdot \cos(\Psi + 60^\circ) - 0,27 \quad [3.5]$$

Solche 3J -Kopplungen sind als Signalaufspaltung z.B. im COSY-Spektrum (JEENER, 1971; AUE et al., 1976) messbar, die dann mittels der Karplus-Kurve als Einschränkungen in der Strukturrechnung verwendet werden können. Allerdings kommt es bei größeren Proteinen im COSY-Spektrum aufgrund der Linienbreite zur teilweisen Auslöschung der durch die J -Kopplung aufgespalteten Signale. Die Bestimmung der Kopplungskonstante ist oft fehlerhaft, da die Signalaufspaltung eine Funktion von Kopplung und Linienbreite ist (NEUHAUS et al., 1985; LUDVIGSEN et al., 1991; SMITH et al., 1991). Kürzlich wurde ein Verfahren entwickelt, bei welchem die Gesamtintensität des Spektrums in die Bestimmung der Kopplung eingeht (ACME, *Amplitude-Constrained Multiplet Evaluation*, DELAGLIO et al., 2001).

In größeren Proteinen ist die Qualität des Spektrums oft wegen der oben genannten Auslöschung gering. Des Weiteren wird die Auswertung und eindeutige Zuordnung der Multiplets durch Signalüberlagerungen erschwert. Deshalb wurden die oben genannten Kopplungen aus E.COSY-Spektren (*Exclusive Correlation Spectroscopy*, GRIESINGER et al., 1985)

3. Material und Methoden

entnommen. Im E.COSY erhält man besonders einfache Kopplungsmuster, wobei alle Signale *Inphase*-Signale sind. In Abb. 3.1 ist ein typisches Kopplungsmuster aus dem HNCA-E.COSY zur Bestimmung der $^3J_{H^N H^\alpha}$ -Kopplung (SEIP et al., 1992; CAI et al., 1999), gemessen am His₆PSCD4, gezeigt. In der indirekten ^{13}C -Dimension ist das Signal durch eine zusätzliche große Kopplung zu einem dritten Kern, die $^1J_{H^\alpha C^\alpha}$ -Kopplung (ca. +140 Hz), aufgespaltet, so dass die beiden durch $^1J_{C^\alpha C^\beta}$ (ca. +35 Hz) weiter aufgespalteten Dubletts sich nicht überlappen. Aus diesem Grund kann die $^3J_{H^N H^\alpha}$ -Kopplung direkt als Differenz der Signalpositionen in direkter Dimension (1H) bestimmt werden.

Zur Bestimmung der $^3J_{H^\alpha N}$ -Kopplungen wurde das HCACO[N]-E.COSY (WANG & BAX, 1995) verwendet. Hierbei erfolgt die E.COSY-Aufspaltung durch die $^1J_{NC^\alpha}$ -Kopplung (-15 Hz). Das Spektrum wurde mit einer Auflösung von 0,59 Hz / Punkt für $^1H^\alpha$, 2,1 Hz / Punkt für ^{13}C und 42,4 Hz / Punkt für $^{13}C^\alpha$ und 16 Scans pro *FID* aufgenommen. Die Signalpositionen wurden beim HCACO[N]-E.COSY mit der in XWINNMR 2.6 implementierten Routine bestimmt.

Restdipolkopplungen

Räumlich anisotrope Größen wie die magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung oder die Anisotropie der chemischen Verschiebung werden normalerweise in der Flüssigkeits-NMR durch schnelle isotrope Bewegungen zu null ausgemittelt. Diese Größen enthalten anderer-

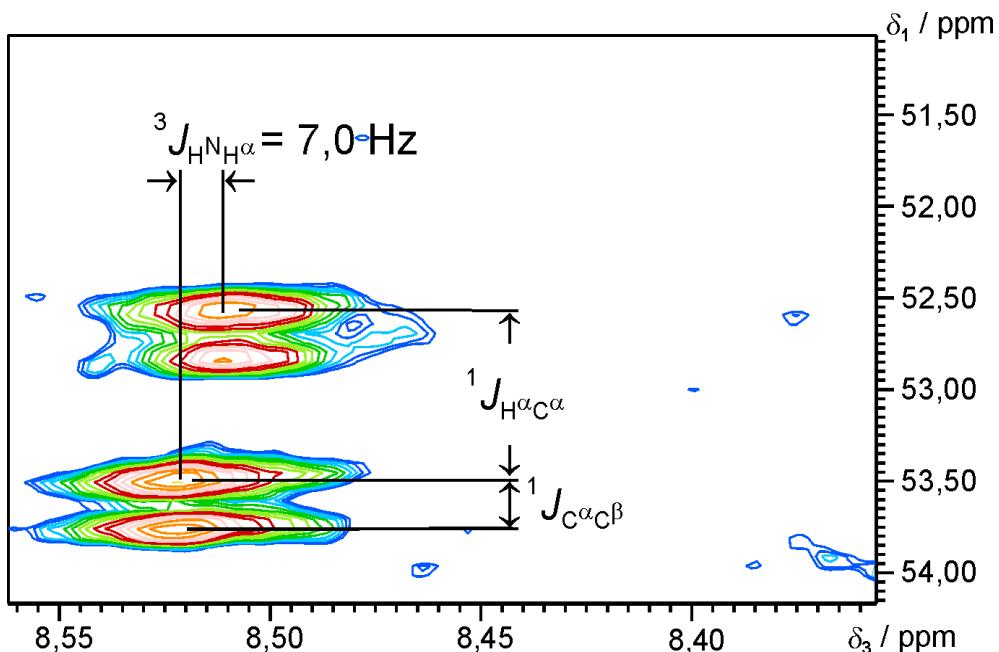


Abb. 3.1: Ausschnitt aus dem HNCA-E.COSY-Spektrum (600,13 MHz) von 0,8 mM His₆PSCD4 in einem 10 mM Natriumphosphatpuffer (90% H₂O, 10% D₂O, pH 6,5, T = 298 K). Gezeigt ist das Kreuzsignal von Asparagin 64 bei einer ^{15}N -Verschiebung von 120,1 ppm. Die Auflösung des Spektrums (aufgenommen mit 8 Scans pro *FID*) beträgt 0,8 Hz / Punkt für 1H , 19,5 Hz / Punkt für ^{15}N und 7,7 Hz / Punkt für ^{13}C

3. Material und Methoden

seits wertvolle Strukturinformationen, die in der Festkörper-NMR-Spektroskopie ausgenutzt werden. Aber auch bei der NMR-Spektroskopie in Lösung haben sie durch partielle Orientierung (s.u.) in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen (GAYATHRI, 1982; BASTIAAN et al., 1987; EMSLEY, 1996; TJANDRA & BAX, 1997). Die Restdipolkopplung zwischen zwei Kernen 1 und 2 ist gegeben durch:

$$\langle D_{12} \rangle = D_{12} S_{zz} S \left(\left(\frac{3}{2} \cos^2 \vartheta - \frac{1}{2} \right) + \frac{\eta}{2} \sin^2 \vartheta \cos 2\varphi \right) \quad [3.6]$$

ϑ und φ sind die Polarwinkel des Kernverbindungsvektors der Kerne 1 und 2 im Hauptachsensystem (HAS) des molekularen Orientierungstensors \mathbf{S}_{ij} (s. Abb. 3.2). D_{12} ist die statische Dipolkopplungskonstante, gegeben als:

$$D_{12} = \frac{1}{\pi} \frac{\mu_0}{4\pi} \gamma_1 \gamma_2 \frac{h}{2\pi} \frac{1}{\langle r_{12}^3 \rangle} \quad [3.7]$$

μ_0 ist die magnetische Permeabilität des Vakuums, γ_1 und γ_2 sind die gyromagnetischen Verhältnisse der Kerne 1 und 2 und h das Planck'sche Wirkungsquantum. Der Abstand r_{12} der beiden Kerne wird gegebenenfalls zeitlich gemittelt, angedeutet durch die spitzen Klammern. Der Ordnungsparameter S ($0 \leq S \leq 1$) beschreibt die Einflüsse intramolekularer Bewegungen, verschieden von der Umorientierung des Gesamt moleküls. Relaxationsstudien am Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima* (*TmCsp*) ergeben ein $S = 0,89 \pm 0,03$ in Bereichen der kanonischen Sekundärstruktur und $S = 0,77 \pm 0,07$ in den beweglicheren Schleifen (KREMER, pers. Mitteilung). Der Ordnungsparameter S kann in beweglicheren Proteinbereichen wesentlich kleiner als 1 sein und folglich die gemessene Restdipolkopplung nach unten skalieren. Der Einfluss von S muss deshalb in der Strukturrechnung beachtet werden. S_{zz} beschreibt den Orientierungsgrad des Moleküls, gegeben als Mittel der Lage des Moleküls zum Magnetfeld B_0 :

$$S_{zz} = \left\langle \frac{3}{2} \cos^2 \Theta - \frac{1}{2} \right\rangle = \frac{\int_0^{2\pi} d\Phi \int_0^{1\pi} d\Theta \sin \Theta \left(\frac{3}{2} \cos^2 \Theta - \frac{1}{2} \right) P(\Theta, \Phi)}{\int_0^{2\pi} d\Phi \int_0^{1\pi} d\Theta \sin \Theta P(\Theta, \Phi)} \quad [3.8]$$

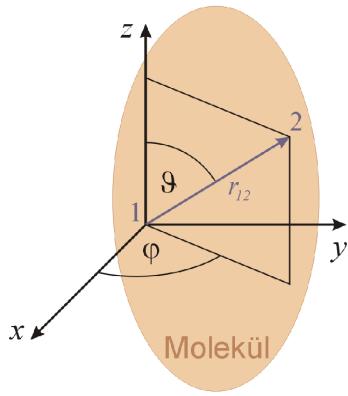


Abb. 3.2: Lage des Kernverbindungsvektors im molekularen Orientierungstensor (aus MÖGLICH, 2001)

Θ und Φ sind die Winkel zwischen den Hauptachsen des Orientierungstensors und B_0 . $P(\Theta, \Phi)$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül eine bestimmte Orientierung

3. Material und Methoden

gegenüber B_0 einnimmt. S_{XX} , S_{YY} und S_{ZZ} sind die drei Hauptwerte des spurlosen Orientierungstensors mit $|S_{ZZ}| \geq |S_{YY}| \geq |S_{XX}|$. Der Asymmetrieparameter η ist wie folgt definiert:

$$\eta = \frac{(S_{XX} - S_{YY})}{S_{ZZ}} \quad [3.9]$$

Die statische Dipolkopplungskonstante für die hier untersuchte D_{HN} -Kopplung in einem Protein beträgt -24 kHz. Andererseits ist die $^1J_{\text{HN}}$ -Kopplung ca. -94 Hz, weshalb die zu messende Restdipolkopplung nur wenige Hertz groß sein sollte. Restdipolkopplungen dieser Größenordnung erhält man bei Orientierungsgraden S_{ZZ} von 10^{-4} bis 10^{-3} . Zur Orientierung des Proteins werden der NMR-Probe orientierende Medien wie Lipid-Bicell-Systeme zugesetzt (s. 3.1; TJANDRA & BAX, 1997).

Die Orientierung des Mediums wurde anhand der Aufspaltung des Deuteriumsignals von HDO vor und nach Aufnahme des eigentlichen Spektrums überprüft und quantifiziert (FINER & DARKE, 1974). Für die hier verwendeten geringen Orientierungsgrade ist der Hamiltonoperator für die Spin-Spin-Kopplung gegeben als:

$$\mathcal{H}_K^{\text{schwach}} = 2\pi(J_{12} + \langle D_{12} \rangle)I_{1Z}I_{2Z} \quad [3.10]$$

Dies bedeutet, dass man in einem Spektrum in anisotroper Lösung als Signalaufspaltung J_{eff} die Summe aus skalarer und dipolarer Kopplung beobachtet. Somit erhält man die Restdipolkopplung als Differenz von J_{eff} , bestimmt in anisotroper Lösung, und der skalaren Kopplung, gemessen in isotroper Lösung.

Zur Messung der D_{HN} -Kopplung wurde das gleiche $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment wie in 3.2.1 verwendet, welches in indirekter ^{15}N -Dimension nicht entkoppelt wurde. Die Auflösung betrug $2,0$ Hz / Punkt für ^1H und $1,2$ Hz / Punkt für die ^{15}N -Dimension, in welcher die HN-Aufspaltung gemessen wurde. Das isotrope Spektrum wurde mit 40 Scans pro *FID* aufgenommen, das anisotope mit 72 .

Zur Verwendung der Restdipolkopplungen in der Strukturrechnung (s. 3.3) werden aus der Verteilung der gemessenen Kopplungswerte die Hauptwerte des Orientierungstensors abgeschätzt (CLORE et al., 1998).

3.2.3 Relaxationsuntersuchungen an der PSCD4-Domäne

Die NMR-Spektroskopie ermöglicht mit Hilfe der ^{15}N -Relaxationsstudien Untersuchungen der Dynamik von Proteinen bzw. von individuellen Amidgruppen des Proteinrückgrats auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala. Für eine ausführliche Darstellung der Relaxationstheorie sei auf die Literatur verwiesen (z.B. CAVANAGH et al., 1996; VAN DE VEN, 1995).

3. Material und Methoden

Die Relaxationsuntersuchungen erfolgten alle bei 500,13 MHz Protonenresonanzfrequenz und $T = 298 \text{ K}$.

T_1 -Relaxation

Zur Messung der longitudinalen T_1 -Relaxationszeit wurden *Inversion-Recovery*- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren verwendet (FARROW et al., 1994). Die in einem refokussierten INEPT-Schritt (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer*; MORRIS & Freeman, 1979; Cavanagh et al., 1996) vom ^1H auf das ^{15}N übertragene Magnetisierung S_x wird durch einen 90° -Puls in $-S_z$ überführt, welche während einer variablen Zeit T relaxiert. Danach wird die verbleibende Magnetisierung für die Evolution in transversale Magnetisierung überführt, bevor sie zur Detektion über einen INEPT-Transfer zurück auf das Proton transferiert wird. Zur Unterdrückung von zeitabhängigen Effekten der dipolaren IS-Kreuzrelaxation und der Dipol-Dipol-CSA-Kreuzkorrelation (*Chemical Shift Anisotropie*) werden die Protonen während des Zeitintervalls T entkoppelt.

Die spektralen Breiten der T_1 -Messungen betrugen 11,5 ppm (*Parts per Million*, s. z.B. HAUSSER & KALBITZER, 1989) in der ^1H -Dimension (F2) und 40 ppm in ^{15}N -Dimension (F1). Es wurden Datenmatrices mit 512×1024 Punkten und 16 *Scans* pro *FID* für Zeiten $T = 10, 20, 40, 80, 160, 160, 320, 640, 1280$ und 2560 ms aufgenommen.

Die Volumina der Signale wurden mit dem Programm AUREMOL bestimmt (GEYER et al., 1995), wobei 100 Iterationen bis zu einer Integrationsgrenze von 0,3 der maximalen Signalintensität und einer maximalen Breite von 100 Hz in F1 und 75 Hz in F2 durchgeführt wurden. Die aus den Spektren zur Messung von T_1 erhaltenen Volumina $I(t)$ wurden mit einer abfallenden Exponentialfunktion angepasst:

$$I(t) = I_{\text{Basl}} - (I_{\text{Basl}} - I_0) * e^{-R_1 * t} \quad [3.11]$$

Dabei ist I_0 das maximale Signalvolumen ohne Relaxation, I_{Basl} ein Term, welcher Fehler in der Basisebene berücksichtigt, t die Zeit und $R_1 = 1 / T_1$ die longitudinale Relaxationsrate. I_0 , I_{Basl} und R_1 werden bei der Anpassung als freie Parameter behandelt.

T_2 -Relaxation

Zur Messung der transversalen T_2 -Relaxationszeit wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren mit einer Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz (CPMG; CARR & PURCELL, 1954; MEIBOOM & GILL, 1958) unterschiedlicher Länge T verwendet (FARROW et al., 1994).

Dabei werden die Protonen, während die durch einen refokussierten INEPT-Schritt erzeugte Magnetisierung S_x relaxiert, durch eine Folge von 180° -Pulsen entkoppelt. Dabei muss der Abstand zwischen den 180° -Pulsen kurz genug sein, um J -Kopplungseffekte zu eliminieren.

3. Material und Methoden

Nach der CPMG-Sequenz und der ^{15}N -Evolution wird die Magnetisierung auf das Proton zurücktransferiert und detektiert.

Die spektralen Breiten der T_2 -Messungen betrugen 11,5 ppm in der ^1H -Dimension (F2) und 40 ppm in ^{15}N -Dimension (F1). Es wurden Datenmatrices mit 256×1024 Punkten und 16 *Scans* pro *FID* für variable CPMG-Dauer $T = 8; 16; 24; 39,9; 63,9; 95,8; 127,7; 159,7; 159,7; 255,5; 319,4; 479$ und 798,4 ms aufgenommen.

Die Integration der Volumina und die Bestimmung von T_2 wurden analog zu der für T_1 beschriebenen durchgeführt.

Heteronuklearer NOE

Der heteronukleare $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE, d.h. die Auswirkung der Sättigung eines Amidprotons auf den direkt gebundenen Stickstoff, wird durch den Vergleich von zwei Spektren gemessen, wobei ein Spektrum mit Sättigung und ein Spektrum ohne Sättigung von $^1\text{H}^{\text{N}}$ aufgenommen wird. Die NOE-Intensität ergibt sich aus dem Verhältnis der Volumina mit (I_{Sat}) und ohne Sättigung (I_{Ref}):

$$\text{NOE} = I_{\text{Sat}} / I_{\text{Ref}} \quad [3.12]$$

Die Sättigung von ^1H erfolgt während einer Dauer von 3 s, durch eine Abfolge von 120° -Pulsen in einem Abstand von je 5 ms (MARKLEY et al., 1971). Die Messung der heteronuklearen NOEs wurde nach FARROW et al. (1994) durchgeführt, wobei die *FIDs* für die Spektren mit und ohne Sättigung in einem einzigen Experiment aufgenommen wurden und anschließend in zwei Experimente aufgetrennt wurden. Durch dieses Verfahren werden Störungen vermindert, da beide Experimente unter gleichen Bedingungen aufgenommen werden.

Die beiden Spektren wurden mit einer spektralen Breite von 12 ppm (^1H , F2) und 53,5 ppm (^{15}N , F1) mit 160×2048 Punkten und 128 *Scans* pro *FID* aufgenommen. Die Bestimmung der Signalvolumina erfolgte wie für T_1 beschrieben.

3.2.4 Prozessierung und Auswertung der NMR-Spektren

Die Referenzierung der Spektren erfolgte für die Protonen auf das der Probe zugesetzte DSS, die der Heterokerne indirekt nach den IUPAC-Richtlinien (WISHART et al., 1995; MARKLEY et al., 1998). Die Spektren wurden mit dem Computerprogramm XWINNMR 2.6 prozessiert. Zur Erhöhung der Auflösung erfolgte vor der Fouriertransformation in allen Dimensionen eine Extrapolation (*Linear Prediction* oder *Zerofilling*) der aufgenommenen Signale (*FID*, *Free Induction Decay*).

Zur Auswertung der Spektren fanden die Programme AURELIA 2.7.10 (Bruker; NEIDIG, 1995) und AUREMOL (Bruker; GANSLMEIER, 2002; GRONWALD et al., 2002) Verwendung.

3.3 Berechnung von Proteinstrukturen der PSCD-Domänen

3.3.1 CNS

Zur Berechnung der Strukturen der PSCD-Domänen wurde das Computerprogramm CNS 1.0 (*Crystallography & NMR System*, BRÜNGER et al., 1998) verwendet. Diesem liegt das Verfahren des *Simulated Annealing* (KIRKPATRICK et al., 1983) zugrunde. Die Anzahl der experimentell bestimmten Einschränkungen der Struktur, wie Proton-Proton-Abstände, Winkeleinschränkungen und Restdipolkopplungen (s. 3.3.2) reichen noch nicht aus um die Proteinstruktur zu berechnen. Deshalb werden zusätzlich weitere so genannte empirische Informationen wie Bindungslängen, Bindungswinkel und van-der-Waals-Wechselwirkungen, in die Strukturrechnung mit einbezogen. Alle Einschränkungen werden durch Potentiale beschrieben und zu einer Energiefunktion E_{pot} zusammengefasst. Von einer zufälligen, gestreckten Startstruktur ausgehend werden die Newton'schen Bewegungsgleichungen:

$$\vec{F}_i(t) = -\vec{\nabla}E_{\text{pot},i}(t) \quad [3.13]$$

für jedes Atom i und sehr kurze Zeitintervalle (10^{-4} s) numerisch gelöst. Zu Beginn der Strukturrechnung wird das System in der Hochtemperaturphase auf 50 000 K aufgeheizt, so dass die Atome eine hohe kinetische Energie besitzen und das sich faltende Molekül Potentialbarrieren überwinden kann, um lokale Minima wieder zu verlassen und einen großen Konformationsraum „abzusuchen“. Im weiteren Verlauf der Strukturrechnung wird die Temperatur in zwei langsam Abkühlungsphasen gesenkt und die experimentellen Potentiale immer stärker gewichtet, so dass man eine Struktur mit möglichst geringer Energie erhält. Im Idealfall hat die Struktur das globale Minimum erreicht. Um dies sicherzustellen, werden viele verschiedene Strukturen ausgehend von verschiedenen Startstrukturen berechnet. Wenn diese konvergieren, liegen die erhaltenen Endstrukturen mit großer Wahrscheinlichkeit in der Nähe des globalen Minimums. Die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) des Strukturbündels zur Struktur mit der geringsten Energie wurde in dieser Arbeit mit dem Programm MolMol (KONRADI et al., 1996) berechnet. Sie gibt ein Maß dafür, wie gut die Struktur definiert ist. Allerdings darf dieser Parameter nicht überinterpretiert werden, da er von vielen Parametern, wie der Größe der Fehler der experimentellen Einschränkungen oder der Anzahl der gerechneten Strukturen abhängt.

In CNS wird das *Simulated Annealing* in der Hochtemperaturphase und der Phase der schnellen Abkühlung im Torsionswinkelraum durchgeführt, in der Phase der langsamen Abkühlung im kartesischen Ortsraum. Nur in dieser langsamen Abkühlung und der folgenden

3. Material und Methoden

Energieminimierung werden die Restdipolkopplungen in CNS, wie von CLORE et al. (1998, 1998a) beschrieben, zur Bestimmung der Struktur verwendet.

In dieser Arbeit wurde das Standard-*Simulated-Annealing*-Protokoll von CNS 1.0 mit den in 3.2.2 beschriebenen Einschränkungen für die Strukturrechnung der PSCD4-Domäne verwendet. Allerdings wurde der finale Gewichtungsfaktor für die Restdipolkopplungen von 50 auf 0,1 gesenkt, so dass die Energien pro verletzter Einschränkung für die Proton-Proton-Abstände in der gleichen Größenordnung liegen wie die der Restdipolkopplungen.

Die sehr umfangreichen Ausgabedateien von CNS, in denen alle Schritte und auch die Verletzung der einzelnen Einschränkungen protokolliert werden, wurden mit dem Computerprogramm *Cnsstat* von STEINER (2001) ausgewertet.

3.3.2 ARIA

Zur Lösung des Mehrdeutigkeitsproblems bei den Positionen der Disulfidbrücken in der PSCD4-Domäne wurden die in CNS implementierten Routinen von ARIA (*Ambiguous Restraints for Iterative Assignment*; NILGES, 1995; NILGES & O'DONOOGHUE, 1998; LINKE et al., 2001) verwendet. Dieses Skript erlaubt die Verwendung von mehrdeutigen Distanzeinschränkungen für nicht eindeutig zugeordnete NOE-Kontakte. In einem iterativen Prozess ordnet ARIA automatisch NOESY-Spektren zu und berechnet mit diesen Zuordnungen, sowie mit den manuell gefundenen Einschränkungen ein Strukturbündel mit CNS. Die aus diesen Strukturen erhaltene Information wird dann im nächsten Zuordnungsschritt verwendet, um Mehrdeutigkeiten zu eliminieren. Unbekannte Positionen von Disulfidbrücken können ebenfalls als mehrdeutige Abstandseinschränkungen in der Strukturrechnung mit ARIA verwendet werden (NILGES et al., 1997). Das hier verwendete Standardprotokoll von ARIA führt 8 Iterationen von Zuordnung und folgender Berechnung von je 20 Strukturen aus.

3.3.3 Modell der 5 PSCD-Domänen aus dem Protein Pleuralin-1

Zur Modellierung der Struktur der 5 PSCD-Domänen aus Pleuralin-1 wurden für die Domänen 1, 2, 3 und 5 Einschränkungen für die Strukturrechnung von den experimentell für die Domäne 4 bestimmten (vgl. 3.2.2) abgeleitet. Da in allen 5 PSCD-Domänen die Lage der 10 Cysteinreste konserviert ist, wurden die Positionen der Disulfidbrücken auf die anderen 4 Domänen übertragen (1. Cys der Sequenz mit letztem Cys etc.). Entsprechend der in Abb. 2.4 gezeigten Übereinstimmungen der Sequenzen wurde eine Proton-Proton-Distanz von PSCD4 auf eine andere Domäne übertragen, wenn beide Aminosäuren der daran beteiligten Protonen

3. Material und Methoden

identisch konserviert sind. Die Fehler für diese Abstandseinschränkungen wurden ebenfalls übernommen.

Mit den so erzeugten Einschränkungen für die Domänen 1, 2, 3 und 5, den experimentell bestimmten für die PSCD4-Domäne und den oben für PSCD4 genannten Parametern wurde mit CNS 90 Strukturen für die Aminosäuren 88 bis 581 des Pleuralin-1 (KRÖGER et al., 1997) berechnet. Für die Sequenzen zwischen den PSCD-Domänen wurden keine experimentellen Einschränkungen in der Strukturrechnung verwendet.

Die Struktur mit der geringsten Gesamtenergie aller 90 Strukturen wurde mit CNS, unter Verwendung zusätzlicher so genannter Nicht-NOE-Kontakte (Mindestabstände > 3 nm) zwischen den einzelnen PSCD-Domänen, verfeinert. Die 25 insgesamt verwendeten Nicht-NOE-Kontakte zwischen jeweils direkt benachbarten Domänen, sowie zwischen Domäne 1 und 5, tragen der experimentell gefundenen Tatsache Rechnung, dass die PSCD4-Domäne in Lösung nicht aggregiert. Die Nicht-NOE-Kontakte wurden um einen Faktor 10 stärker gewichtet als die experimentell ermittelten NOE-Kontakte.

Gegenüber dem in 3.3.1 beschriebenen CNS-Protokoll wurden für die Strukturverfeinerung folgende Änderungen vorgenommen: Hochtemperaturphase: $T = 3000$ K, Anzahl der Minimierungsschritte = 500; erste langsame Abkühlungsphase: $T = 2000$ K, Schritte = 1000; zweite langsame Abkühlungsphase: $T = 700$ K, Schritte = 2000; Anzahl der berechneten Strukturen: 30.

3.3.4 Ladungsverteilung

Die Berechnung der Ladungsverteilung der PSCD-Domänen erfolgte mit dem Computerprogramm MolMol für annähernd physiologische Bedingungen. Es wird angenommen, dass die Ionenkonzentration der Zellwand der des Meerwassers mit einer NaCl-Konzentration von etwa 500 mM (CZIHAK, 1990) entspricht. Folgende Parameter wurden in MolMol verwendet: Dielektrizitätskonstante für das Lösungsmittel: 80 (H_2O ; ADAM et al. 1995); Dielektrizitätskonstante des Proteins: 2 (Vorgabe von MolMol); Radius des Lösungsmittels: 0,14 nm (Vorgabe); Ionenradius gemittelt aus den Radien von Na^+ und Cl^- (0,095 nm bzw. 0,181 nm; MOORE, 1972): 0,138 nm; Atomladung: *simplecharge* (Vorgabe). Die dargestellte Oberfläche entspricht den van-der-Waals-Radien der Atome des Proteins.

3.3.5 Interaktion der PSCD4-Domäne mit Kieselsäure

Ein möglicher Interaktionspartner der PSCD-Domänen in vivo sind Zellwandbestandteile aus amorphem SiO_2 . Zur Untersuchung dieser potentiellen Wechselwirkung wurde die PSCD4-

3. Material und Methoden

Domäne mit Kieselsäure titriert. Wenn die PSCD4-Domäne mit der Kieselsäure reagiert bzw. wechselwirkt, sollte dies zu Strukturänderungen führen, welche wiederum als Änderungen der chemischen Verschiebung sichtbar werden würden.

Freie monomere Kieselsäure ist in neutralen Lösungen nicht stabil. Deshalb wurde sie vor jedem Titrationsschritt aus der Vorläufersubstanz Tetramethoxysilan (TMOS, Si(CH₃)₄, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) mit 1 mM Salzsäure freigesetzt. Die monomere Kieselsäure ist nur wenige Minuten stabil, bevor sie unter Freisetzung von H₂O polymerisiert. Es wurde versucht, diesen Prozess der Polymerisation durch Aufnahme von eindimensionalen (1D) ²⁹Si-NMR-Spektren zu charakterisieren. Dies war allerdings aufgrund der großen Linienbreiten der SiO_x-Polymere und der Tatsache, dass nur TMOS mit der natürlichen Häufigkeit an ²⁹Si zur Verfügung stand, nicht möglich. Um ein Si-Spektrum zu erhalten, mussten zu viele *FIDs* aufaddiert werden, so dass die Zeitauflösung der Messungen niedrig war.

Die Versuchsreihe erfolgte an einem anderen Konstrukt der PSCD4-Domäne, bestehend aus den Aminosäuren 14 bis 112 der His₆PSCD4-Domäne, gefolgt von 6 Histidinresten. Aufgrund der großen Übereinstimmung der Signalpositionen in den HSQC-Spektren beider PSCD-Konstrukte kann beiden Domänen eine gleiche Faltung zugrunde gelegt werden. Die Messungen erfolgten in einem Probenröhrchen aus Glas bei 500,13 MHz Protonenresonanzfrequenz, *T* = 298 K, 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5), 10 % D₂O, 0,1 mM DSS und einer Proteinkonzentration von ca. 0,8 mM. Das Probenvolumen betrug zu Beginn der Messreihe 300 µl. Die zugegebene Konzentration an Silizium wurde anhand des Methyldimethylsilanol-spezifischen Signals des bei der Spaltung des TMOS freigesetzten Methanols in 1D-¹H-Spektren überprüft. In einem weiteren Schritt wurde der selben PSCD-Probe TMOS direkt ohne vorherige Aktivierung mit HCl zugegeben, so dass die monomere Kieselsäure direkt in Anwesenheit der PSCD-Domäne durch Hydrolyse des TMOS durch H₂O entsteht. Es wurde das in 3.2.1 angegebene HSQC-Experiment verwendet. Vor der Prozessierung der Spektren wurde in beiden Dimensionen die Anzahl der Punkte durch *Zerofilling* verdoppelt.

Die genauen Versuchsbedingungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

3. Material und Methoden

Nr. des HSQC	$V(\text{Si-Lsg.}) / \mu\text{l}^1$	$c_{\text{End}}(\text{Si}) / \text{mM}^2$	Anzahl der Scans	Anzahl der Datenpunkte in		Auf- nahme- dauer / h	Inkuba- tions- zeit / h ³
				F2	F1		
1	1,5	0,5	8	2048	512	2,15	0,5
2	1,5	1,0	8	2048	512	2,15	3,2
3	4,5	4,0	8	2048	512	2,15	6,1
4	—	4,0	8	2048	512	2,15	9,0
5	—	4,0	48	2048	512	12,90	20,0
6	6,0	2,0	16	2048	256	2,15	1,0 ⁴
7	—	2,0	16	2048	256	2,15	9,5
8	—	2,0	16	2048	256	2,15	25,5
9	—	2,0	16	2048	256	2,15	32,0
10	—	2,0	16	2048	256	2,15	36,0

¹ Jeweils zugegebenes Volumen an TMOS-Lösung in 1 mM HCl (HSQC 1–5) bzw. zusätzlich zugegebene TMOS-Lösung in H₂O (HSQC 6–10).

² Siliziumkonzentration: in den HSQC-Spektren 1–5 vor der Zugabe durch HCl aktivierte Kieselsäure, in den Spektren 6–10 das zusätzlich als TMOS zugesetzte Silizium.

³ Zeit, in der die Probe seit der ersten Zugabe von Si-Lösung ($T = 298$ K) inkubiert hat. Ca. 30 min nach Zugabe von Si-Lösung wurde jeweils das nächste HSQC-Experiment gestartet.

⁴ Nach Spektrum 5 wird die Zeit nach Zugabe der TMOS-Lösung angegeben. Vor der Messung 5 wurde die Probe 72 h bei 4 °C und ca. 3 Wochen bei –20 °C gelagert.

3.4 Methodische Arbeiten zur Messung von Restdipolkopplungen

3.4.1 Vorhersage des magnetischen Suszeptibilitätstensors für diamagnetische Proteine

Ein weiterer Mechanismus zur partiellen Orientierung von Makromolekülen in Lösung, neben der Verwendung von orientierenden Medien (s. 3.1 und 3.2.2), ist die Wechselwirkung des Moleküls mit dem äußeren magnetischen Feld (GAYATHRI et al., 1982; BOTHNER-BY et al., 1985; BASTIAAN et al., 1987). Eine partielle Orientierung tritt auf, wenn das Molekül entweder ein permanentes magnetisches Dipolmoment (paramagnetische Moleküle; BOTHNER-BY et al., 1981) oder eine Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität besitzt. Letzteres ist auch die Ursache für die Ausrichtung der orientierenden Medien im Magnetfeld (LOSONCZI & PRESTEGARD, 1998).

Die Energie eines diamagnetischen Moleküls in einem äußeren Magnetfeld ist gegeben durch:

$$E_{\text{mag}} = -\frac{1}{\mu_0} \left[\frac{1}{2} \chi_{\text{av}} B_0^2 + \frac{1}{3} \Delta \chi B_0^2 \left(\frac{3}{2} \cos^2 \Theta - \frac{1}{2} \right) + \frac{1}{4} \delta \chi B_0^2 \sin^2 \Theta \cos(2\Phi) \right] \quad [3.14]$$

mit der isotropen magnetischen Suszeptibilität:

$$\chi_{\text{av}} = 1/3 (\chi_{xx} + \chi_{yy} + \chi_{zz}) \quad [3.15]$$

3. Material und Methoden

der Anisotropie:

$$\Delta\chi = \chi_{zz} - 1/2(\chi_{xx} - \chi_{yy}) \quad [3.16]$$

und der Asymmetrie:

$$\delta\chi = \chi_{xx} - \chi_{yy} \quad [3.17]$$

χ_{xx} , χ_{yy} und χ_{zz} sind die Hauptwerte des magnetischen Suszeptibilitätstensors χ_{ij} mit $|\chi_{zz}| \geq |\chi_{yy}| \geq |\chi_{xx}|$, wobei dessen Hauptachsensystem mit dem des Orientierungstensors S_{ij} zusammenfällt.

Die Wahrscheinlichkeit $P(\Theta, \Phi)$ aus Gl. [3.8] ist hier durch den Boltzmannfaktor $\exp(-E_{\text{mag}}/kT)$ gegeben. Dieser kann durch das erste Glied einer Taylor-Reihe als $(1 - E_{\text{mag}}/kT)$ angenähert werden, da $|E_{\text{mag}}| \ll kT$. Aus den Gl. [3.8] und [3.14] lassen sich Ausdrücke für S_{zz} und η , abhängig vom Magnetfeld und der magnetischen Suszeptibilität, herleiten (BOTHNER-BY et al., 1985):

$$S_{zz} = \frac{\Delta\chi B_0^2}{15\mu_0 kT} \quad [3.18]$$

$$\eta = \frac{3}{2} \frac{\delta\chi}{\Delta\chi} \quad [3.19]$$

Unter Verwendung der Gl. [3.15]–[3.17] lässt sich der magnetische Suszeptibilitätstensor χ_{HAS} in einen isotropen und einen anisotropen Teil χ'_{HAS} auftrennen:

$$\chi_{\text{HAS}} = \chi_{\text{av}} \mathbf{E} + \chi'_{\text{HAS}} = \begin{pmatrix} \chi_{\text{av}} & 0 & 0 \\ 0 & \chi_{\text{av}} & 0 \\ 0 & 0 & \chi_{\text{av}} \end{pmatrix} + \frac{1}{3} \begin{pmatrix} -\Delta\chi(1-\eta) & 0 & 0 \\ 0 & -\Delta\chi(1+\eta) & 0 \\ 0 & 0 & 2\Delta\chi \end{pmatrix} \quad [3.20]$$

wobei \mathbf{E} die Einheitsmatrix ist.

Wie aus Gl. [3.18] und [3.19] zu erkennen ist, hängt die Orientierung im Magnetfeld nur von der Magnetfeldstärke, der Temperatur, sowie der Anisotropie und der Asymmetrie des magnetischen Suszeptibilitätstensors ab, jedoch nicht von dessen isotropem Anteil. Des Weiteren wird deshalb nur noch der anisotrope Anteil χ'_{HAS} betrachtet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Computerprogramm in ANSI C erstellt, welches den anisotropen Teil des magnetischen Suszeptibilitätstensors für Proteine bekannter Struktur vorhersagt. Die wesentlichen Beiträge zur Suszeptibilität des Gesamt moleküls leisten hierbei die Peptidbindungsebenen und die aromatischen Seitenketten (TJANDRA et al., 1996). Der magnetische Suszeptibilitätstensor der Peptidbindungsebene kann als rotationssymmetrisch angenommen werden ($\eta = 0$) mit $\Delta\chi = -1,76 \times 10^{-33} \text{ m}^3$ (TIGELAAR & FLYGARE, 1972;

WILLIAMSON & ASAKURA, 1993). Die Z-Achse des Tensors steht senkrecht auf der Peptidbindungs-ebene.

Die magnetischen Suszeptibilitätstensoren für die Seitenketten des Histidins, des Phenylalanins und des Tyrosins sind ebenfalls rotationssymmetrisch, mit der Z-Achse senkrecht zur Ebene der aromatischen Ringe und Werten für $\Delta\chi$ von $-6,66 \times 10^{-34} \text{ m}^3$, $-1,26 \times 10^{-33} \text{ m}^3$ bzw. $-1,18 \times 10^{-33} \text{ m}^3$ (GIESSNER-PRETTRE & PULLMAN, 1987).

Den anisotropen Anteil des magnetischen Suszeptibilitätstensors des Gesamt moleküls im Molekülkoordinatensystem erhält man als:

$$\chi'_{\text{Mol}} = \sum_{k=1}^n \mathbf{R}_{kl} \chi'_{\text{HAS}, kl} \mathbf{R}_{kl}^{-1} \quad [3.21]$$

mit $\chi'_{\text{HAS}, kl}$ dem anisotropen Anteil des magnetischen Suszeptibilitätstensors der einzelnen aromatischen Seitenketten bzw. der Peptidbindungsebene, angezeigt durch den Index 1, in ihrem jeweiligen Hauptachsensystem. Der Index k zählt die einzelnen Gruppen durch. \mathbf{R}_{kl} bzw. dessen reziproke Matrix, sind die Transformationsmatrizen, durch welche der magnetische Suszeptibilitätstensor einer einzelnen Gruppe in das Molekülkoordinatensystem transformiert wird. Die Transformationsmatrix ist gegeben durch:

$$\mathbf{R}_{kl} = \mathbf{A}_{kl}(\varphi_{kl}, z'_{kl}) \mathbf{A}_{kl}(\vartheta_{kl}, x'_{kl}) = \begin{pmatrix} \cos \varphi & \sin \varphi & 0 \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \vartheta & \sin \vartheta \\ 0 & -\sin \vartheta & \cos \vartheta \end{pmatrix} \quad [3.22]$$

wobei \mathbf{A}_{kl} jeweils eine Rotation um die x'_{kl} - bzw. z'_{kl} -Achse des Tensors $\chi'_{\text{HAS}, kl}$ beschreibt. Die z'_{kl} -Achse steht jeweils senkrecht auf der Peptid- bzw. Ringebene (s. Abb. 3.3), die x'_{kl} -Achse wird jeweils so gewählt (da der Tensor rotationssymmetrisch ist), dass sie senkrecht auf der z'_{kl} -Achse und der z-Achse des Molekülkoordinatensystems steht. Für diesen Spezialfall reichen für die Transformation des Tensors ins Molekülkoordinatensystem zwei Drehungen aus. Die Winkel φ_{kl} bzw. ϑ_{kl} sind, wie in Abb. 3.3 gezeigt, die von den Achsen x'_{kl} und x bzw. y'_{kl} und y eingeschlossenen Winkel. Durch Diagonalisierung des Tensors χ'_{Mol} werden dessen Eigenwerte bestimmt, die dessen Anisotropie und Asymmetrie beschreiben (s. Gl. [3.16]–[3.19]).

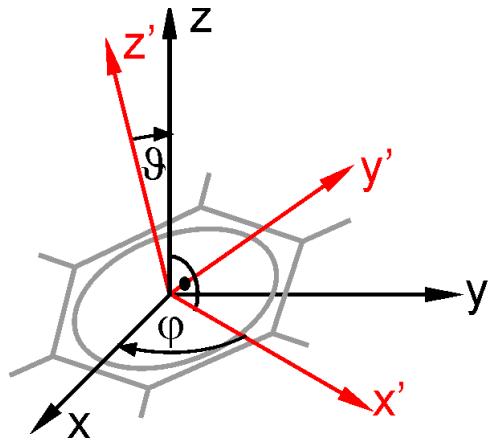


Abb. 3.3: Lage des Hauptachsensystems des magnetischen Suszeptibilitätstensors (rot) einer aromatischen Seitenkette (grau) im Molekülkoordinatensystem (schwarz) und die Definition der Winkel ϑ und φ . Die x' -Achse liegt in der x - y -Ebene des Molekülkoordinatensystems

3. Material und Methoden

Die hier entwickelte Routine zur Vorhersage des anisotropen Anteils des magnetischen Suszeptibilitätstensors aus einer Proteinstruktur ist inzwischen auch in das Computerprogramm AUREMOL integriert worden (s. Abb. 3.4). Die von AUREMOL erzeugte Ausgabedatei gibt die Eigenwerte und die Eigenvektoren sowohl für das gesamte Molekül als auch für die einzelnen Anteile der Peptidbindungsebenen und der aromatischen Seitenketten aus.

3.4.2 Messung von homonuklearen $D_{H^N H^\alpha}$ -Restdipolkopplungen

Wie in Abschnitt 3.2.2 schon gezeigt, enthalten Restdipolkopplungen wertvolle Strukturinformationen. In Abschnitt 3.2.2 wurden Restdipolkopplungen in heteronuklearen Spinsystemen betrachtet. Aber auch in homonuklearen Spinsystemen treten solche Restdipolkopplungen auf. Homonukleare Restdipolkopplungen sind besonders zur Untersuchung von Molekülen interessant, die nicht isotopenmarkiert vorliegen, wie z.B. aus Muskelzellen präpariertes Aktin oder Myosin aus Säugern (STRAUB, 1943).

COSY-Experiment

Das COSY-Experiment wurde zur Messung von homonuklearen Restdipolkopplungen an Oligosacchariden (BOLON & PRESTEGARD, 1998) und an DNA (HANSEN et al., 1998) verwendet. Von HANSEN et al. (1998) wurden an DNA langreichweite dipolare Proton-Proton-Wechselwirkungen mittels des DCOSY-Experiment (*Dipole Coupling Spectroscopy*) untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit des COSY-Experiments zur Messung von homonuklearen $D_{H^N H^\alpha}$ -Restdipolkopplungen an Proteinen demonstriert (BRUNNER et al., 2000).

Die Aufnahme der Spektren erfolgte am Protein BPTI (s. 3.1.3), 600,13 MHz Protonenresonanzfrequenz, $T = 308$ K mit 0, 3, 5, 7 und 9 % DMPC/DHPC/CTAB (s. 3.1.4) als orientierendem Medium. Die Referenzierung der Spektren erfolgte auf DSS, welches um Interaktio-

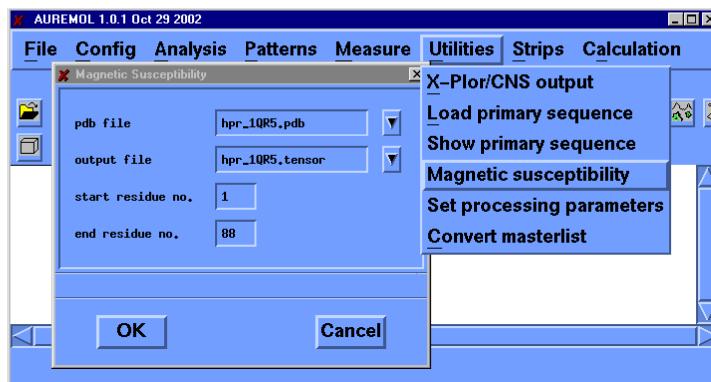


Abb. 3.4: Das Computerprogramm AUREMOL mit dem Aufruf der darin implementierten Routine zur Vorhersage des magnetischen Suszeptibilitätstensors im Programmfpunkt *Utilities*

3. Material und Methoden

nen mit dem orientierenden Medium zu vermeiden, in einer verschlossenen Glaskapillare (Länge 100 mm, Außendurchmesser 1 mm) in das Probenröhrchen gegeben wurde. Die digitale Auflösung in der direkten Dimension betrug 0,2 Hz. Die chemischen Verschiebungen zur Zuordnung der Signale wurden der Arbeit von WAGNER et al. (1987) entnommen. Die H^N-H^α -Kopplungen wurden durch Anpassung der Linienform in der direkten Dimension an überlagernte Lorentzlinien bestimmt, um Fehler, welche aufgrund von Auslöschungen der sich überlagernden Signale in *Antiphase* auftreten, zu eliminieren (NEUHAUS et al., 1985).

Der Grad der Orientierung und die Einflüsse des Proteins auf das DMPC/DHPC/CTAB-Medium wurden mittels der Quadrupolaufspaltung des Deuteriumsignals des HDO untersucht. Zur Überprüfung der Übereinstimmung der gemessenen Kopplungen mit der Struktur wurde der Orientierungstensor mit den Computerprogrammen SVD (*Single Value Decomposition*; LOSONCZI, 1999) und Module (DOSSET et al., 2001) unter Verwendung den Koordinaten der Kristallstruktur des BPTI (PARKIN et al., 1996; PDB-Eintrag 1BPI) bestimmt. Dies erlaubt die Berechnung der erwarteten Restdipolkopplungen aus der Struktur.

MOCCA-SIAM-Experiment

Eine weitere im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und am BPTI getestete Methode zur Messung von homonuklearen $D_{H^N H^\alpha}$ -Restdipolkopplungen an Proteinen ist das MOCCA-SIAM-Experiment (MÖGLICH, 2001; MÖGLICH et al., 2002). Aufgrund der simultanen Aufnahme von *Inphase*- und *Antiphase*-Multipletts (SIAM; PRASCH et al., 1998) ermöglicht es eine sehr genaue Bestimmung der Kopplungskonstanten, da ein von TITMAN & KEELER (1990) entwickeltes Verfahren angewendet werden kann. Der Magnetisierungstransfer im SIAM-Experiment basiert auf einer Hartmann-Hahn-Sequenz (HARTMANN & HAHN, 1962). Hier wurde von uns eine sowohl auf skalare wie dipolare Kopplung optimierte MOCCA-Sequenz (*Modified Phase-Cycled Carr-Purcell*; KRAMER et al., 2001) verwendet.

Abb. 3.5 zeigt das Prinzip des MOCCA-SIAM-Experiments, in dem während einer TOCSY-Mischsequenz (MOCCA-XY16) verschiedene Wege des Kohärenztransfers stattfinden. Im Falle eines Systems aus zwei Spin-½-Teilchen wird Magnetisierung des Spins 1 (I_{1Z}), hier des H^α , in Magnetisierung des Spins 2 (I_{2Z}), dem H^N , und in Null-Quantenkohärenz ($ZQ_Y = I_{1Y}I_{2X} - I_{1X}I_{2Y}$) zwischen den beiden Spins transferiert. Für reine skalare Kopplung J_{12} ist die Transferfunktion gegeben durch (BRAUNSCHWEILER & ERNST, 1983):

$$I_{1Z} \rightarrow I_{1Z} \cos^2(\pi J_{12}) + I_{2Z} \sin^2(\pi J_{12}) - ZQ_Y \sin(2\pi J_{12}) \quad [3.23]$$

3. Material und Methoden

In den meisten TOCSY-Spektren wird nur der Transferweg über I_{2Z} , der zu in *inphase* aufgespaltenen Signalen führt, selektiert. Der Weg $I_{1Z} \rightarrow ZQ_Y$, der in ω_2 in *antiphase* und in ω_1 in *inphase* aufgespaltene Signale liefert, wurde meist ignoriert oder unterdrückt (BRAUNSCHWEILER & ERNST, 1983; BAX & DAVIS, 1985). Andererseits enthält der zweite Transferweg ebenfalls wertvolle Informationen und die Aufnahme beider Wege ermöglicht die genauere Bestimmung der Kopplungskonstante (s.u.). Die Magnetisierung I_{2Z} und die Kohärenz ZQ_Y besitzen die gleiche Koheranzordnung $p = 0$ (CAVANAGH et al., 1996), so dass sie nicht ohne weiteres separiert werden können. Der „Trick“ beim SIAM-Experiment ist, dass die Kohärenz ZQ_Y durch einen für Spin 2 selektiven 180° -Puls in Doppel-Quantenkoheranz ($DQ_Y = I_{1Y}I_{2X} + I_{1X}I_{2Y}$) mit $p = 2$ überführt wird (PRASCH et al., 1998). Nun können diese beiden Zustände durch die Verwendung eines Null-Quanten-Filters (ZQF) bzw. eines Doppel-Quanten-Filters (DQF) getrennt werden (s.u.).

Im rechten Teil der Abb. 3.5 sind die typischen Kopplungsmuster der Signale des ZQF- und des DQF-MOCCA-SIAM-Experiments gezeigt. In der indirekten ω_1 -Dimension ist die Aufspaltung der Signale *inphase*, wogegen sie in den COSY-artigen Experimenten in *antiphase* ist. Im SIAM-Experiment führt deshalb eine Entkopplung in ω_1 zu einer Intensitätssteigerung der Signale und zu weniger Überlappungen im gesamten Spektrum, wogegen eine Entkopplung des COSY-artigen Spektrums zu einer Auslöschung der Signale führt (PRASCH et al., 1998).

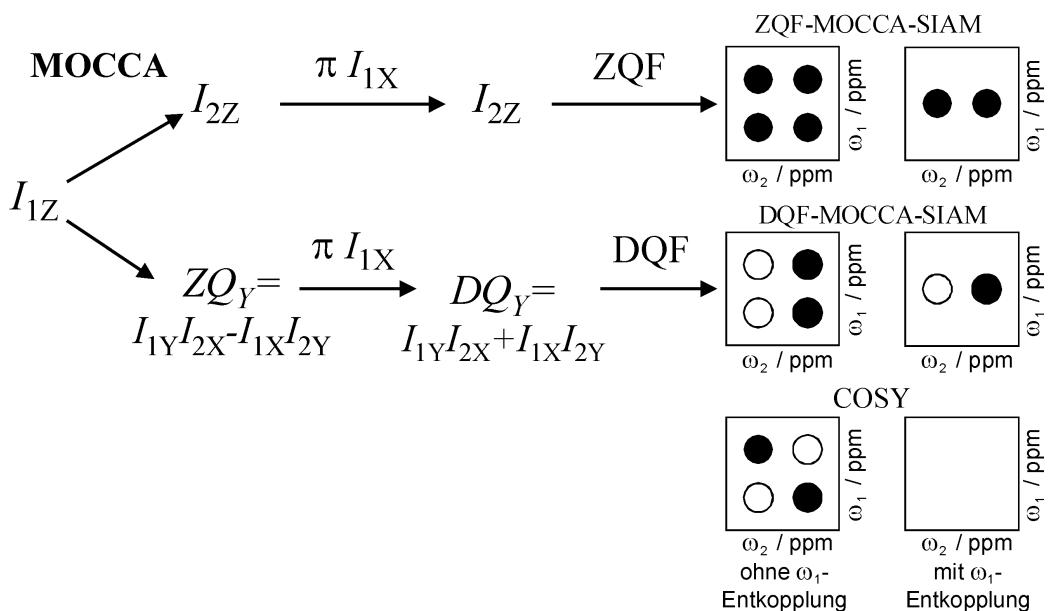


Abb. 3.5: Prinzip des MOCCA-SIAM-Experiments: links sind die wichtigsten während des Experiments erzeugten Zustände, beschrieben als Produktoperatoren für ein Zweispinsystems, gezeigt, rechts sind die für das null- bzw. doppel-quanten-gefilierte MOCCA-SIAM- (ZQF- bzw. DQF-) und das COSY-Experiment typischen Multiplettstrukturen mit und ohne Entkopplung in der indirekten ω_1 -Dimension gezeigt. Schwarze Kreise symbolisieren positive, weiße Kreise negative Intensitäten

3. Material und Methoden

Abb. 3.6 zeigt das verwendete Pulsprogramm des MOCCA-SIAM-Experiments. Die experimentellen Details sind der Bildunterschrift zu entnehmen. Die Trägerfrequenz der Rechteckpulse und für die Detektion lag bei 6,5 ppm, die Einstrahlzfrequenz der Gaußkaskaden (Q3, Q5) bei 4,3 ppm. Die von der Trägerfrequenz verschiedene Einstrahlzfrequenz von Q3 und Q5 wurde durch Phasenmodulation erreicht. Dies erhält, im Gegensatz zum Schalten der Trägerfrequenz, die Phasenkohärenz zwischen den Spins. Die Länge der Gaußkaskaden betrug $t_Q = n / \Delta v_Q$, wobei n eine ganze Zahl ist und Δv_Q die Differenz aus Trägerfrequenz des Spektrums und der Einstrahlzfrequenz der Q3- bzw. Q5-Pulse, um Artefakte durch Phasenfehler zu Verhindern. Vor dem ersten 90°-Puls wurde 1 s lang mit phasen-modulierten Rechteckpulsen der Dauer von je 100 ms das Wasser vorgesättigt. Die Rechteckpulse, die selektiven Pulse und die Z-Gradienten vor der t_1 -Evolutionszeit dienen der selektiven und artefaktfreien Anregung der H^α (Spin 1). Alle übrige Magnetisierung wird durch den ersten Rechteckpuls und den Gradienten G_1 dephasiert. Somit ist zu Beginn der Evolutionszeit nur Magnetisierung I_{1Y} vorhanden, die sich in Abhängigkeit von der Larmorfrequenz Ω_1 entwickelt. Der Sandwich-Puls in der Mitte von t_1 wirkt als ein selektiver 180°-Puls auf Spin 2 (H^N) und dient der Entkopplung

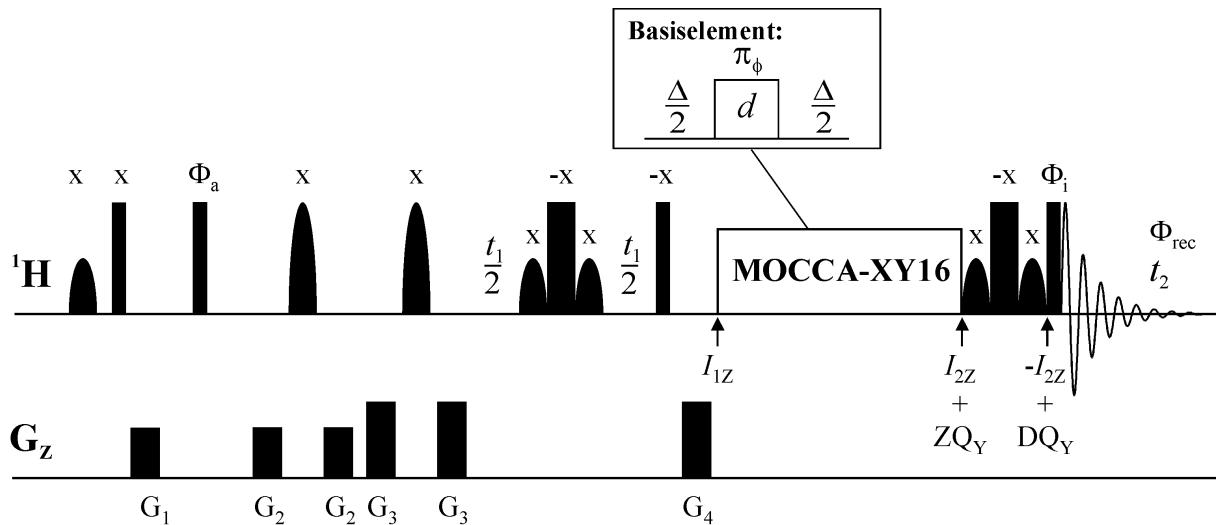


Abb. 3.6: Pulssequenz des MOCCA-XY16-SIAM-Experiments mit ω_1 -Entkopplung. Schmale und breite Rechtecke: breitbandige 90°- und 180°-Pulse, kleine glockenförmige Symbole: für den H^α -Bereich selektive 90°-Pulse, Q5 mit einer Dauer von 4,5 ms (EMSLEY & BODENHAUSEN, 1992), große glockenförmige Symbole: für den H^α -Bereich selektive 180°-Pulse, Q3 mit einer Dauer von 1,8 ms. Die Phasen der Pulse sind jeweils über den Symbolen angegeben. Die Phase Φ_a wurde nach dem TPPI-Modus inkrementiert, der Phasenzzyklus für den letzten 90°-Puls und den Empfänger waren Φ_i : x, -x für den FID1 und y, -y für den FID2; Φ_{rec} : x, -x für den FID1 und y, -y für FID2. Zur Artefaktreduzierung wurde auf alle Phasen zusätzlich der CYCLOPS-Phasenzzyklus (HOULT & RICHARDS, 1975) angewendet. Der Kasten über der MOCCA-XY16-Mischsequenz zeigt deren Basiselement, bestehend aus einem Zeitintervall $\frac{\Delta}{2}$, einem 180°-Puls der Dauer d und der Phase Φ und einem weiteren Zeitintervall $\frac{\Delta}{2}$, wobei $\Delta = 88 \mu\text{s}$, $d = 40 \mu\text{s}$ und $\Phi = x, y, x, y, y, x, y, x, -x, -y, -x, -y, -x, -y, -x$ (XY16; GULLION et al., 1990; LIZAK et al., 1991). G_1 – G_4 sind z-Gradienten mit einer Dauer von je 800 μs . Die relative Stärke der Gradienten ist $G_4 = G_3 = 1,5 G_2 = 1,5 G_1$. Für ein Zweispinsystem sind die charakteristischen Operatoren, welche während des Experiments auftreten gezeigt

3. Material und Methoden

der beiden Spins. Auf die t_1 -Evolution folgt ein 90° -Rechteckpuls mit der Phase $-x$, welcher die Magnetisierung $-I_{1Y} \cos(\Omega_1 t_1)$ in $I_{1Z} \cos(\Omega_1 t_1)$ umwandelt. Der folgende Gradient G_4 dephasiert die verbleibende transversale Magnetisierung, so dass zu Beginn der MOCCA-XY16-Mischsequenz nur die Magnetisierung I_{1Z} existiert.

Die von KRAMER et al. (2001) entwickelte MOCCA-XY16-Sequenz ist eine modifizierte Carr-Purcell-Sequenz, bestehend aus 180° Rechteckpulsen der Länge d mit einem Abstand Δ . Der Zusatz XY16 steht für den verwendeten XY16-Phasenzyklus (GULLION et al., 1990; LIZAK et al., 1991). Die MOCCA-XY16-Sequenz hat – verglichen mit anderen TOCSY-Mischsequenzen – sowohl für skalare, wie für dipolare Kopplung eine sehr gute Transfereffizienz. Ein optimaler Skalierungsfaktor für den dipolaren Transfer erhält man für ein Verhältnis von $\Delta / d = 2,2$ und $\Delta = 88 \mu\text{s}$ und longitudinalen Transfer $I_{1Z} \rightarrow I_{2Z}$ (KRAMER et al., 2001). Die Länge der Mischsequenz betrug 25 ms.

Wie schon weiter oben erwähnt, erzeugt die Mischsequenz sowohl Magnetisierung I_{2Z} und Null-Quantenkohärenz ZQ_Y . Die Letztere wird durch einen selektiven 180° -Puls auf Spin 2, implementiert als ein Sandwich-Puls, in Doppel-Quantenkoheränz umgewandelt. Durch die Aufnahme von zwei getrennten *FIDs* mit unterschiedlichen Phasen Φ_i für den letzten 90° -Puls und Φ_{rec} für den Detektor (s. Abb. 3.6) können beide Transferwege in einem Experiment gemessen werden. Bei der anschließenden Prozessierung des Spektrums werden sie aufaddiert bzw. voneinander subtrahiert, so dass die resultierenden Phasenzyklen ($\Phi_i[\text{FID1}] \pm \Phi_i[\text{FID2}]$ und $\Phi_{\text{rec}}[\text{FID1}] \pm \Phi_{\text{rec}}[\text{FID2}]$) einem Null-Quanten- bzw. einem Doppel-Quantenfilter entsprechen (PRASCH et al., 1998).

Die gleichzeitige Messung von *Inphase*- und *Antiphase*-Spektren ermöglicht die Extraktion der Kopplungen mit einem von TITMAN & KEELER (1990) entwickelten Verfahren, welches in Abb. 3.7 für die Frequenzdomäne veranschaulicht ist. Mathematisch lässt sich dieses Verfahren leichter in der Zeitdomäne beschreiben. Ein Schnitt durch ein einzelnes COSY-artiges (ZQF) bzw. ein TOCSY-artiges (DQF) Multiplett kann als Funktion $S_C(t)$ bzw. $S_T(t)$ beschrieben werden:

$$S_C(t) = A_C L(t) \sin(\pi J_{\text{aktiv}} t) \quad [3.24]$$

$$S_T(t) = A_T L(t) \cos(\pi J_{\text{aktiv}} t) \quad [3.25]$$

3. Material und Methoden

Hierin ist A_C bzw. A_T ein Amplitudenfaktor, $L(t)$ ein Faktor, der die Einflüsse der Entwicklung unter der chemischen Verschiebung, passive Kopplungen und Dämpfung durch Relaxation oder Feldinhomogenitäten beschreibt und J_{aktiv} die experimentelle aktive Kopplung zwischen den beiden Spins 1 und 2. Der Sinus- bzw. Cosinus-Term führen zu einer *Anti-* bzw. *Inphase*-Aufspaltung der Linien in der Frequenzdomäne.

Im Titman-Keeler-Verfahren erfolgt eine Multiplikation der experimentellen Funktionen S_C und S_T mit den Faktoren $\cos(\pi J_{\text{test}} t)$ bzw. $\sin(\pi J_{\text{test}} t)$:

$$\tilde{S}_C(t) = A_C L(t) \sin(\pi J_{\text{aktiv}} t) \cos(\pi J_{\text{test}} t) \quad [3.26]$$

$$\tilde{S}_T(t) = A_T L(t) \cos(\pi J_{\text{aktiv}} t) \sin(\pi J_{\text{test}} t) \quad [3.27]$$

Im Allgemeinen werden die in Gl. [3.26] und [3.27] beschriebenen Funktionen unterschiedliche Multipletts liefern. Allerdings, wie leicht zu erkennen ist, sind die Funktionen identisch, wenn $J_{\text{aktiv}} = J_{\text{test}}$ (TITMAN & KEELER, 1990). Im Titman-Keeler-Verfahren wird J_{test} so lange variiert, bis beide Funktionen identisch sind und man somit J_{aktiv} ermittelt hat.

Zusammen mit Herrn Andreas Möglich wurde eine Routine entworfen, um dieses Verfahren für mit XWINNMR prozessierte Spektren zu automatisieren. Dieses wurde von MÖGLICH

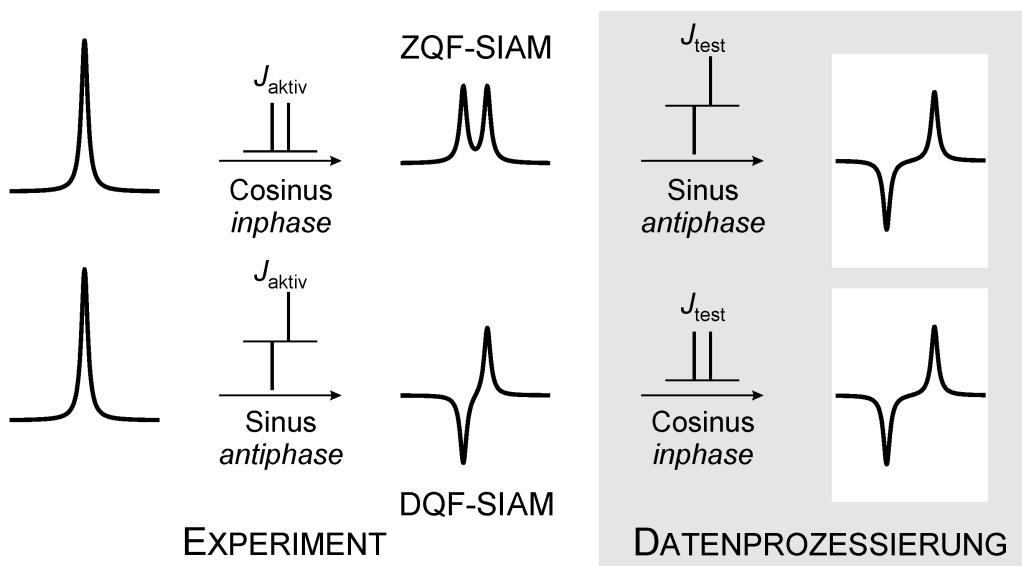


Abb. 3.7: Prinzip des Titman-Keeler-Verfahrens zur Bestimmung von Kopplungskonstanten: Oben ist ein TOCSY-artiges *inphase* aufgespaltenes Signal des ZQF-SIAM gezeigt, das als eine Singulett-Linienform, welche mit einem durch J_{aktiv} *inphase* aufgespaltenen Deltadublett gefaltet ist, betrachtet werden kann. Entsprechend kann das unten gezeigte COSY-artige *Antiphasen*-Dublett des DQF-SIAM als die gleiche Linienform, welche mit einem *antiphase* aufgespaltenen Deltadublett gefaltet ist, betrachtet werden. In der grauen Box auf der rechten Seite der Abbildung ist die Prozessierung der beiden Signale, als Faltung mit einem durch J_{test} aufgespaltenen *Anti-* bzw. *Inphasen*-Deltadubletts, gezeigt. Wenn $J_{\text{aktiv}} = J_{\text{test}}$, dann sind die beiden resultierenden *Antiphase*-Signale identisch. Diese Identität ist der wesentliche Punkt des Titman-Keeler-Verfahrens zur genauen Bestimmung der aktiven Kopplungskonstante (nach TITMAN & KEELER, 1990)

3. Material und Methoden

(2001) im Computerprogramm *cslone.c* implementiert und zur Ermittlung der Kopplungskonstanten verwendet.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte am Protein BPTI (s. 3.1.3) bei einer Protonenresonanzfrequenz von 500,13 MHz, $T = 305$ K und mit 4 % DMPC/DHPC/CTAB (s. 3.1.4) als orientierendem Medium. Die Anregungsbreite der Q3- und Q5-Pulse betrug 1900 bzw. 1370 Hz, die der MOCCA-Sequenz 7 kHz. Für das isotrope Spektrum wurden 16 Scans pro FID1 bzw. FID2 aufaddiert, für das anisotrope Spektrum 32. In ω_1 wurden 2048 Punkte aufgenommen, in ω_2 16384. Die spektrale Breite in ω_1 betrug 7 ppm und die in ω_2 6,7 ppm.

Bei der Prozessierung des Spektrums wurden die abwechselnd in einem Experiment aufgenommenen *FIDs* 1 und 2 jeweils addiert bzw. subtrahiert, so dass die Anzahl der Punkte in der indirekten Dimension auf 1024 reduziert wurde. Das DQF-Spektrum benötigt in der direkten Dimension eine zusätzliche Phasenkorrektur nullter Ordnung, alle anderen Prozessierungsparameter sind identisch.

Mit den gemessenen $D_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungen und der NMR-Struktur des BPTI (WAGNER et al., 1987; BERNDT et al., 1992; PDB-Eintrag 1PIT) bzw. der Kristallstruktur (WLODAWER et al., 1987; PDB-Eintrag 6PTI) wurde mit den Computerprogrammen SVD und DipOCoup (MEILER et al., 2000) der Orientierungstensor bestimmt. Das Computerprogramm Pales (ZWECKSTETTER & BAX, 2000) wurde zur Vorhersage des Orientierungstensors aus dem Diffusionstensor benutzt.

Neben der linearen Korrelation zwischen experimenteller (exp) und berechneter (ber) Restdipolkopplungen (D_{12}) liefert der von CORNILESCU et al. (1998) definierte Qualitätsfaktor

$$Q = \sqrt{\frac{\sum_i (\langle D_{12}^{\text{exp}} \rangle_i - \langle D_{12}^{\text{ber}} \rangle_i)^2 (N-1)}{\sum_i (\langle D_{12}^{\text{exp}} \rangle_i - \langle D_{12}^{\text{exp}} \rangle^{\text{mittel}})^2 N}} \quad [3.28]$$

ein gutes Kriterium für die Güte der Struktur. Hierin ist N die Anzahl der Kopplungen und $\langle D_{12}^{\text{exp}} \rangle^{\text{mittel}}$ der Mittelwert der experimentellen Kopplungen. Die Autoren geben an, dass ein Qualitätsfaktor kleiner 0,3 eine gute Übereinstimmung der Kopplungen mit der Struktur nachweist.

3.4.3 HPr: Von der Magnetfeldstärke abhängige Effekte

Erste Messungen von GÖRLER und BRUNNER (pers. Mitteilung) ergaben für die skalare $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplung bei 800,13 MHz Protonenresonanzfrequenz im COSY-Experiment größere Werte als bei 500,13 MHz Protonenresonanzfrequenz. Eine mögliche Erklärung ist die

3. Material und Methoden

Orientierung des HPr-Moleküls im Magnetfeld (TOLMAN et al., 1995; TJANDRA et al., 1996). Um dies zu überprüfen, wurde mit dem in 3.4.1 beschriebenen Programm und mit den Koordinaten für die Struktur des Wildtyp-HPr aus *Staphylococcus carnosus* (KALBITZER et al., 2000; PDB-Eintrag 1QR5) der magnetische Orientierungstensor vorhergesagt. Mit diesem Tensor wurden dann die durch Orientierung im Magnetfeld (800,13 verglichen mit 500,13 MHz Protonenresonanzfrequenz) zu erwartenden Restdipolkopplungen $D_{H^N H^\alpha}$ und D_{HN} berechnet und mit den experimentell bestimmten verglichen (s. 3.4.1). Die experimentellen Kopplungen D sind gegeben als Differenz der gemessenen effektiven Kopplung bei 800,13 MHz und 500,13 MHz Protonenresonanzfrequenz.

Zur Bestimmung der skalaren $^3J_{H^N H^\alpha}$ -Kopplung mit hoher Genauigkeit wurde das MOCCA-SIAM-Experiment (s. 3.4.2) bei 500,13 und 800,13 MHz Protonenresonanzfrequenz aufgenommen. Dabei wurden die selektiven Q3- und Q5-Pulse bei 800,13 MHz Protonenresonanzfrequenz auf $5/8$ der Länge bei 500,13 MHz verkürzt, so dass die Anregungsbreiten auf der ppm-Skala identisch waren. Die Kopplungswerte wurden mit Hilfe des Titman-Keeler-Verfahrens (s. 3.4.2) aus den Spektren extrahiert. Für einzelne Signale wurde die Kopplung zusätzlich durch Auslesen von eindimensionalen Schnitten aus dem *In-* bzw. *Antiphase*-Spektrum durch Anpassen der Signale als zwei überlagerte Lorentzfunktionen mit dem Computerprogramm Origin® (Microcal Software Inc.) bestimmt. Für das *Inphase*- bzw. das *Antiphase*-Spektrum wurden jeweils Datenmatrices von 512×16384 Punkten aufgenommen, wobei 48 (500,13 MHz) bzw. 32 Scans pro *FID* (800,13 MHz) aufaddiert wurden. Die Auflösung der prozessierten Spektren betrug in direkter Dimension (F2) 0,12 Hz / Punkt bzw. 0,20 Hz / Punkt für 500,13 bzw. 800,13 MHz Protonenresonanzfrequenz und 3,42 Hz / Punkt bzw. 5,47 Hz / Punkt in der indirekten Dimension (F1).

Eine weitere Methode zur Messung von Kopplungskonstanten sind Spektren, bei denen die Signalintensität direkt durch die Größe der interessierenden skalaren Kopplung moduliert wird (NERI et al., 1990). Ein von TJANDRA et al. (1996) entwickeltes $^1J_{NH}$ -moduliertes 1H - ^{15}N -HSQC-Experiment wurde zur genauen Messung der $^1J_{NH}$ -Kopplungen bei beiden Magnetfeldstärken verwendet. Dabei wurde in das auch sonst in dieser Arbeit verwendete HSQC-Experiment mit Echo-Antiecho-Frequenzselektion nach der t_1 -Evolution ein zusätzliches Element eingebaut. Dieses bestand aus einem Zeitintervall Δ gefolgt von zwei zentrierten 180°-Pulsen selektiv für 1H bzw. ^{15}N und einem weiteren Zeitintervall Δ . Die beiden 180°-Pulse verhindern eine Evolution der Magnetisierung unter der chemischen Verschiebung während der Dauer 2Δ , wohingegen sich die $^1J_{HN}$ -Kopplung während der Zeit 2Δ entwickelt. Durch Analyse des Pulsprogramms mit dem Produktoperatorformalismus (SØRENSEN et al.,

3. Material und Methoden

1983) erhält man für die Magnetisierung zu Beginn der Detektion, unter Vernachlässigung der Relaxation folgenden Ausdruck: $I_x \cos(\Omega_S t_1) \cos(2\pi^1 J_{HN} \Delta)$, wobei I_x der Produktoperator für x-Magnetisierung des $^1H^N$ ist, Ω_S die Resonanzfrequenz des Spins S, dem ^{15}N und t_1 die Evolutionszeit in indirekter Dimension (^{15}N). Es ist zu erkennen, dass die Intensität des beobachteten Signals in Abhängigkeit von $^1J_{HN}$ und Δ moduliert wird. Es wurden für beide Magnetfeldstärken 11 Spektren mit Werten für Δ von 22 bis 32 ms im Abstand von je 1 ms aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen für die Identifizierung der Signale wurden aus GÖRLER (1998) entnommen. Die Signalvolumina wurden mit AURELIA bestimmt (GEYER et al., 1995). Die Integration wurde mit 10 Iterationsschritten bis zu einer Signalintensität von 0,5 der Maximalen Signalintensität und einer maximalen Breite von je 30 Hz in F1 und F2 durchgeführt. Die aus den Spektren erhaltenen Volumina $I(2\Delta)$ wurden mit folgender Funktion angepasst (TJANDRA et al., 1996):

$$I(2\Delta) = I_0 * (-I_{Basl} + \cos(2\pi^1 J_{NH} \Delta)) * e^{-2\Delta R_2^*} \quad [3.29]$$

Dabei ist I_0 das maximale Signalvolumen ohne Relaxation und $\Delta = 0$, I_{Basl} ein Term, welcher Fehler in der Basisebene berücksichtigt, und R_2^* die effektive Relaxationsrate von ^{15}N , hervorgerufen, durch transversale Relaxation, nicht aufgelöste langreichweitige 1H - ^{15}N -Kopplungen und durch Inhomogenitäten des Magnetfeldes. Bei der Anpassung mit dem Programm Origin werden all diese Größen als freie Parameter behandelt. TJANDRA et al. (1996) geben für dieses Verfahren eine Genauigkeit der bestimmten Kopplungen von bis zu $\pm 0,02$ Hz an.

4 Ergebnisse

4.1 Strukturbestimmung der PSCD4-Domäne

4.1.1 Ergebnisse der Zuordnung der chemischen Verschiebungen und der Vorhersage von kanonischen Sekundärstrukturelementen

^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment

Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen erfolgte wie in 3.2.1 beschrieben. Abb. 4.1 zeigt das zugeordnete ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des His₆PSCD4-Kontrakts. Von den Aminogruppen der Hauptkette ohne das N-terminale histidinreiche Peptid zur Aufreinigung des Kontrakts (alle weiteren Zahlenangaben zur Zuordnung beziehen sich auf diese „verkürzte“ Sequenz) konnten 94 % zugeordnet werden. Für die Seitenketten wurden die chemischen Verschiebungen der Amidgruppen der Asparagin- und Glutaminreste, sowie die der Aminogruppen der Argininreste vollständig zugeordnet. Die Signale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zeigen

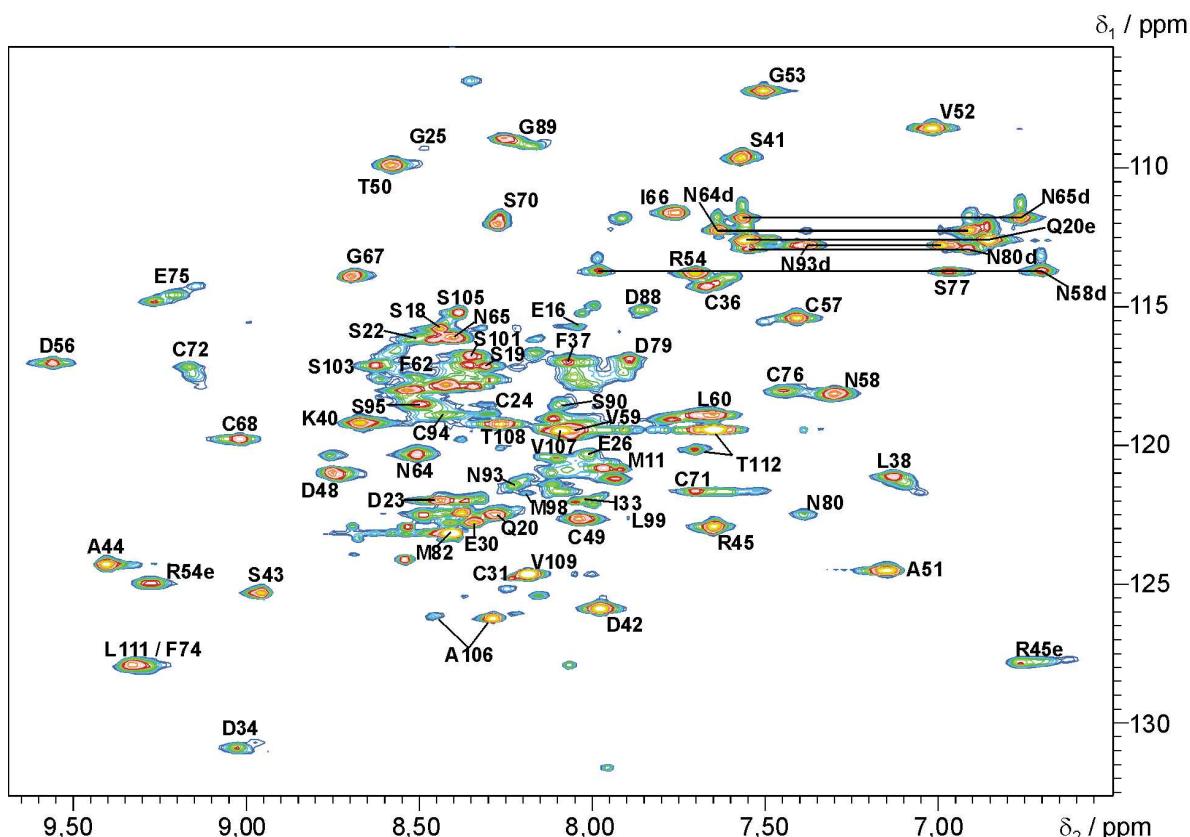


Abb. 4.1: Zugeordnetes ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum (600,13 MHz) von 0,8 mM His₆PSCD4 in einem Puffer aus 90 % H₂O, 10 % D₂O, 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5), 0,1 mM DSS und $T = 298$ K. Die Beschriftung der Signale gibt den Aminosäurerest im Einbuchstabencode und die Position in der Primärsequenz wieder. Die Aminosignale der Argininseitenketten sind mit einem kleinen e versehen. Die beiden Amidsignale der Asparagin- bzw. der Glutaminseitenketten sind durch horizontale Linien verbunden und mit kleinem d bzw. e gekennzeichnet

4. Ergebnisse

eine große Dispersion von ca. 107 bis 131 ppm in der ^{15}N - und von ca. 6,7 bis 9,6 ppm in der ^1H -Dimension. Dabei fällt auf, dass besonders Reste im Sequenzbereich von Aminosäure 30 bis 90 im Randbereich des Spektrums liegen. Die große Dispersion der chemischen Verschiebungen dieser Reste lässt den Schluss zu, dass zumindest der Kernbereich der PSCD4-Domäne eine definierte Struktur besitzt.

Im mittleren Bereich des Spektrums, besonders von 115 bis 120 ppm (^{15}N) und 8,2 bis 8,7 ppm (^1H) ist zu erkennen, dass die Signale stark überlagert sind. Dies wird in erster Linie durch die in hoher Anzahl im weniger stark strukturierten N- und C-terminalen Bereich der Primärsequenz vorkommenden Serinreste verursacht. Die Serine kommen in den PSCD-Domänen zu 57 % im Sequenzmotiv Pro-Ser-Pro bzw. Pro-Ser-Xxx (Xxx steht für eine beliebige von Pro verschiedene AA) vor. Dies lässt eine ähnliche chemische Umgebung der einzelnen Serinreste vermuten, was wiederum die geringe Dispersion erklärt.

Einige Aminosäuren, wie z.B. das Leucin 38 oder Glicin 89, zeigen im 2-dimensionalen (2D) HSQC-Spektrum mit seiner hohen Auflösung eine Aufspaltung der Signale. Eine Ursache könnte die in geringem Maße auftretende cis/trans-Isomerie nahe benachbarter Prolinreste sein (s. 4.1.2). Mehrere Reste des C-Terminus (z.B. Ala 106 und Thr 102) weisen 2 Signale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum auf. Dies deutet darauf hin, dass der flexible C-Terminus (s. 4.1.3) in mehreren Konformationen vorliegt. Diese könnte auf der cis/trans-Isomerie der den Resten Alanin 106 und Threonin 112 nahe benachbarten Prolinresten beruhen. Darauf deuten die Intensitätsverhältnisse von 1:20 bzw. 1:10 der beiden Signale für Alanin 106 bzw. Threonin 112 hin, die in etwa dem Auftreten von cis- und trans-Isomeren in Proteinen entsprechen (WEISS et al., 1998).

Umfang der Zuordnung der chemischen Verschiebungen

Eine Liste der zugeordneten chemischen Verschiebungen ist dem Anhang 9.1 zu entnehmen. Es konnten 95 % der C^α -, 92 % H^α - und 72 % der Carbonyl-Verschiebungen des Proteinrückgrats zugeordnet werden. Es war möglich, 87 % der C^β -Resonanzen und 92 % der H^β -Resonanzen zuzuordnen. Die Zuordnung der restlichen Kerne der Seitenketten erfolgte zu 72 % für aliphatische C-Kerne, zu 82 % für aliphatische Protonen, zu 50 % für aromatische Protonen und zu 78 % für die Carbonyl- und Carboxy-Gruppen.

Die Reste Glutamat 29, Prolin 61, Threonin 84 und Prolin 91 konnten in keinem der aufgenommenen Spektren identifiziert werden. Die sequentiell benachbarten Aminosäuren des Glutamat 29 zeigen alle Signale geringer Intensität. Dies könnte damit erklärt werden, dass in diesen Bereichen mittlerer konformationeller Austausch stattfindet, der zu starken Linienver-

4. Ergebnisse

breiterungen und damit zur Abnahme der Signalintensität bzw. zu einem vollständigen Verschwinden der Signale der beteiligten Reste führt.

Auf die Reste Thr 84 und Pro 91 folgt direkt ein Prolin, auf Pro 61 folgt die Sequenz Phe-Pro, so dass für diese 3 Reste die Zuordnungsstrategie über die auf dem ^1H - ^{15}N -HSQC basierenden 3D-Experimente erschwert ist. Eine Identifikation von einzelnen chemischen Verschiebungen dieser Reste im ^{13}C -NOESY-HSQC-Experiment war aufgrund der hohen Anzahl der Prolinreste in der Sequenz und der dadurch auftretenden Überlagerungen in den entsprechenden Bereichen des Spektrums nicht möglich.

Analyse der chemischen Verschiebungen und Vorhersage der Sekundärstruktur

Die chemischen Verschiebungen der C^α -Kerne sind im oxidierten Zustand, d.h., wenn sie über eine Disulfidbrücke verknüpft sind um ca. 3 ppm kleiner als im reduzierten freien Zustand ($\Delta\delta_{\text{r.c.}}(\text{Cysreduziert}) = 55,4$; WISHART et al., 1995a). Für die C^β -Kerne ist der Effekt noch größer. Die Verbrückung zweier Cysteine führt zu einer Zunahme der chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{r.c.}}(\text{Cysreduziert}) = 28,0$ um ca. 13 ppm auf $\delta_{\text{r.c.}}(\text{Cysoxidiert}) = 41,1$ ppm.

In der PSCD4-Domäne beobachtet man für alle zehn Cysteinreste Verschiebungen der C^α -Kerne kleiner 57,6 ppm und für die C^β -Kerne (C^β von Cys 31 nicht zugeordnet) Verschiebungen größer 36 ppm bzw. größer 38 ppm für Cysteinreste denen ein Prolin bzw. eine andere Aminosäure folgt. Dies zeigt, dass in der PSCD4-Domäne alle zehn Cysteinreste über Disulfidbrücken verbunden sind. Für den Großteil der Amidgruppen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum ist nur ein Signal zu identifizieren. Aufgrund dieser Tatsache kann man annehmen, dass die Positionen der fünf gebildeten Disulfidbrücken in allen Molekülen einheitlich sind und PSCD4 somit, bezogen auf die Disulfidbrücken, als einheitliches Isomer vorliegt.

In Abb. 4.2 ist die Abweichung der Werte der chemischen Verschiebungen von den *Random-Coil*-Werten für die H^α -, C^α -, C^β - und C' -Kerne gezeigt. Für den Kernbereich der PSCD4-Domäne von Aminosäure 30 bis 90 sind signifikante Abweichungen der chemischen Verschiebungen von den *Random-Coil*-Werten zu erkennen. Dies, sowie die Verbrückung der Cysteine, belegt die aus dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment gewonnene Erkenntnis, dass der Kern der PSCD4-Domäne eine definierte Struktur aufweist. Die Aminosäuren im N- und besonders im C-terminalen Bereich der Domäne zeigen deutlich kleinere Abweichungen ihrer chemischen Verschiebungen von den *Random-Coil*-Werten als die des Kernbereiches. Dies ist ein Indiz, dass sie weniger stark strukturiert sind.

Die chemischen Verschiebungen der H^α -Kerne der Reste Aspartat 34 bis Threonin 50 sind, mit Ausnahme des Aspartat 48, alle Hochfeld-verschoben, die der entsprechenden C^α -Kerne

4. Ergebnisse

sind größtenteils Tieffeld-verschoben. Dies würde nach WISHART et al. (1995a) eine α -helikale Sekundärstruktur dieses Bereichs vorhersagen. Dem widerspricht aber die Hochfeldverschiebung der C^β -Kerne, die auf eine gestreckte β -Faltblatt-artige Sekundärstruktur hindeutet. Für die Aminosäuren Asparagin 58 bis Isoleucin 66 deuten die Tieffeldverschiebung der H^α -Kerne und die Hochfeldverschiebung der C^α -Kerne auf die Ausbildung eines β -Faltblattstrangs hin, wohingegen die Verschiebungen der C^β - und C' -Kerne auf die Ausbildung einer Helix hindeuten. Die Verschiebungen der H^α -, C^α - und C' -Kerne zeigen für die Sequenz von Prolin 69 bis Prolin 73 die Ausbildung eines β -Faltblattstrangs an, allerdings im Widerspruch zu den Verschiebungen der C^β -Kerne.

Die Analyse der chemischen Verschiebungen mit den Computerprogrammen CSI und TALOS (s. 3.2.1) sagen für die PSCD4-Domäne keinerlei kanonische Sekundärstrukturelemente voraus. Von den für jedes Tripeptid vorhergesagten Φ/Ψ -Winkelpaaren liegen nie alle zehn in einem engen Bereich (wie von TALOS vorgegeben) des Ramachandran-Diagramms. Für drei der Tripeptide liegen immerhin 8 der 10 Winkelpaare in diesem Bereich. Um die

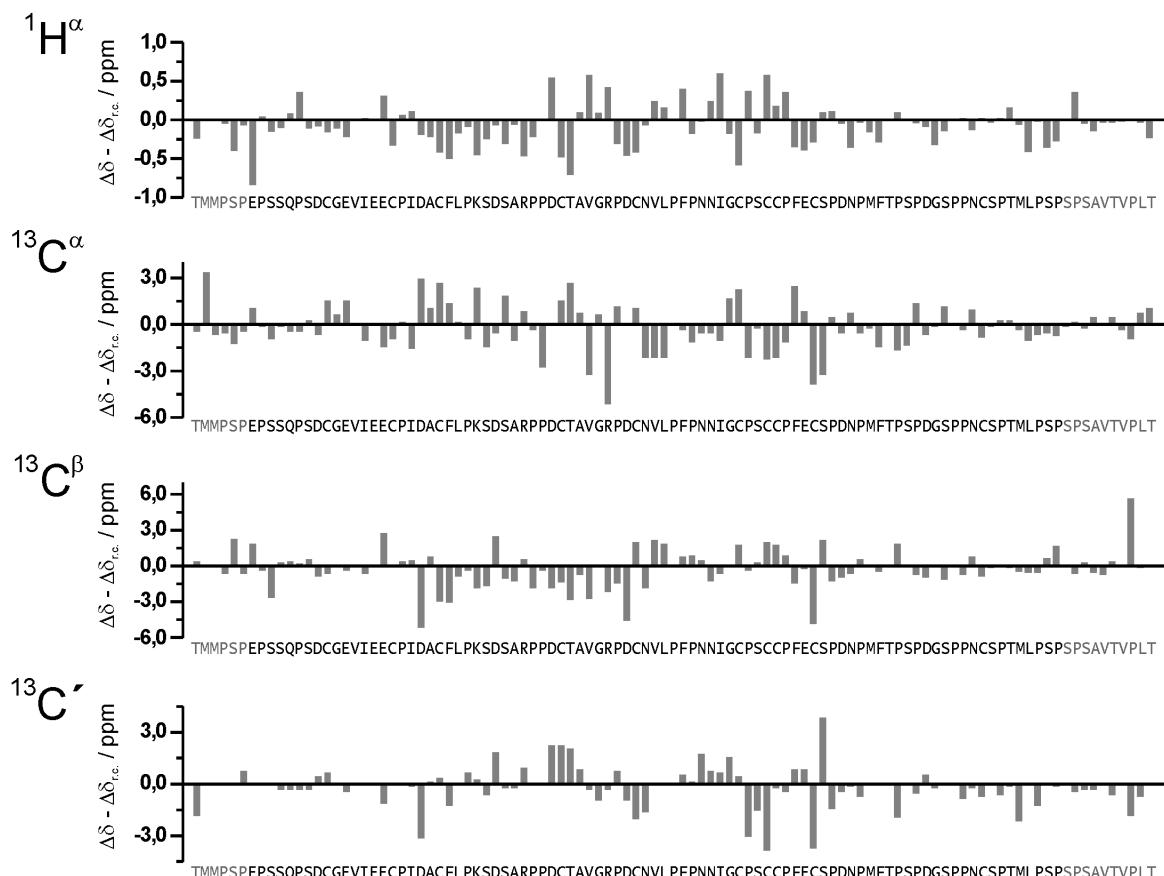


Abb. 4.2: Abweichungen der chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$) von den *Random-Coil*-Werten ($\Delta\delta_{r.c.}$; s. 3.2.1) in Abhängigkeit der Sequenz von His₆PSCD4, beginnend mit AA-Rest 10. Für Reste auf die ein Prolin folgt wurden die entsprechenden *Random-Coil*-Werte aus WISHART et al. (1995a) zur Berechnung der Abweichung verwendet

Ausbildung eines Sekundärstrukturelements vorhersagen zu können, müssen aber die Winkelpaare mehrerer aufeinander folgender Tripeptide in den Winkelbereich der α -Helix oder des β -Faltblatts fallen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Analyse der chemischen Verschiebungen keine kanonischen Sekundärstrukturelemente für die PSCD4-Domäne vorhersagt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass für die ungewöhnliche Sequenz der PSCD4-Domäne die oben genannten empirischen Ansätze wegen einer schlechten Datenbasis trotz des Vorkommens von Sekundärstrukturelementen versagen. Eine Datenbanksuche (<http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/fasta.html>) mit dem Algorithmus FASTA (PEARSON & LIPMAN, 1988) in den Datenbanken PIR-PSC, Swiss-Prot, TreEMBL, RefSeq, GenPept und PDB ergab als besten Treffer, außer den Proteinen der Pleuralin-Familie, das Mitochondrien-assoziierte cysteinreiche Protein aus Spermien von *Mus musculus* (Hausmaus) mit einem e-Faktor von 0,062 und 33 % Sequenzidentität.

Andererseits sprechen auch die Analyse der NOE-Kontakte (s. 4.1.2) und die Ergebnisse der Strukturrechnung (s. 4.1.4) dafür, dass die PSCD4-Domäne keine kanonischen Sekundärstrukturelemente ausbildet.

Aufgrund der schlechten Konvergenz der von TALOS vorhergesagten Winkelpaare können daraus keine Winkeleinschränkungen für die Strukturrechnung gewonnen werden.

4.1.2 Experimentell bestimmte Einschränkungen für die Strukturrechnung

Restdipolkopplungen

Insgesamt konnten aus dem isotropen und dem anisotropen nicht entkoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment 46 ^1H - ^{15}N -Restdipolkopplungen für die Aminogruppen des Proteinrückgrats und zwei für die Aminogruppen der beiden Argininseitenketten bestimmt werden. Die Werte dieser Kopplungen sind dem Anhang 9.3 zu entnehmen. Als Fehler für die Bestimmung der effektiven Kopplung im anisotropen und der skalaren Kopplung im isotropen Spektrum wurde jeweils dessen digitale Auflösung in der ^{15}N -Dimension von 1,2 Hz angenommen. Daraus ergibt sich der maximale Fehler der Restdipolkopplung als Summe dieser beiden zu 2,4 Hz, da sich die Restdipolkopplung als Differenz aus effektiver und skalarer Kopplung ergibt (s. 3.2.2).

Für die Strukturrechnung können nur Restdipolkopplungen in nicht flexiblen Bereichen des Proteins mit einem Ordnungsparameter S nahe 1 verwendet werden, da in flexibleren Bereichen mit $S \ll 1$, die gemessenen Restdipolkopplungen betragsmäßig verkleinert werden. Wie die Ergebnisse der Analyse der chemischen Verschiebungen und die Relaxationsstudien (s.

4.1.3) zeigen, sind die beiden Termini des His₆PSCD4-Konstrukts flexibel. Die Seitenketten in Proteinen sind meist flexibler als das Proteinrückgrat. Deshalb werden nur die ¹H-¹⁵N-Restdipolkopplungen der Aminogruppen der Hauptketten von Isoleucin 33 bis Aspartat 79 in der Strukturrechnung verwendet.

Um die Restdipolkopplungen als Einschränkungen für die Strukturrechnung verwenden zu können, muss man die Hauptwerte S_{ij} des Orientierungstensors abschätzen. Für den Fall, dass die Orientierungen der ¹H-¹⁵N-Kernverbindungsvektoren im Protein einheitlich und isotrop verteilt sind, zeigt das Histogramm der ¹H-¹⁵N-Restdipolkopplungen die gleiche Form wie die Anisotropie der chemischen Verschiebung in einem Pulverspektrum (GRANT, 1996). Die größten gemessenen Restdipolkopplungen entsprechen der Orientierung des Kernverbindungsvektors parallel der Z-Achse ($\vartheta = 0$) bzw. parallel der Y-Achse ($\vartheta = 90, \varphi = 90$) des Orientierungstensors in dessen Hauptachsensystem. Der Wert mit der größten Häufung entspricht der Orientierung parallel zur X-Achse ($\vartheta = 90, \varphi = 0$). Diese Werte entsprechen somit $-S_{ZZ}D_{12}$, $-S_{YY}D_{12}$ und $-S_{XX}D_{12}$.

Abb. 4.3 zeigt das Histogramm für die in der Strukturrechnung verwendeten ¹H-¹⁵N-Restdipolkopplungen der His₆PSCD4-Domäne. Aus diesem Histogramm lässt sich $-S_{ZZ}D_{12} = 22$ Hz, $-S_{YY}D_{12} = -18$ Hz und $-S_{XX}D_{12} = -4$ Hz abschätzen. Dabei ist anzumerken, dass die Werte für $-S_{ZZ}D_{12}$ und $-S_{YY}D_{12}$ generell unterschätzt werden, da die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kernverbindungsvektor in einem Kegel um die Z- bzw. die Y-Achse mit dem Öffnungswinkel 2Θ liegt, durch $\sin\Theta$ gegeben ist. Deshalb wurde aus $-S_{XX}D_{12}$, $-S_{YY}D_{12}$ und der Tatsache, dass der Tensor spurlos ist $-S_{ZZ}D_{12}$ berechnet. Aus diesen Werten lassen sich der Orientierungsgrad $S_{ZZ} = 9,2 \cdot 10^{-4}$ und der Asymmetrieparameter $\eta = 0,636$ (Gl. 3.9) berechnen. Daraus ergeben sich die im Computerprogramm CNS zu verwendenden Parameter $a_1 = -S_{ZZ}D_{12} / 2 = -11$ und $a_2 / a_1 = 2/3 \eta = 0,424$.

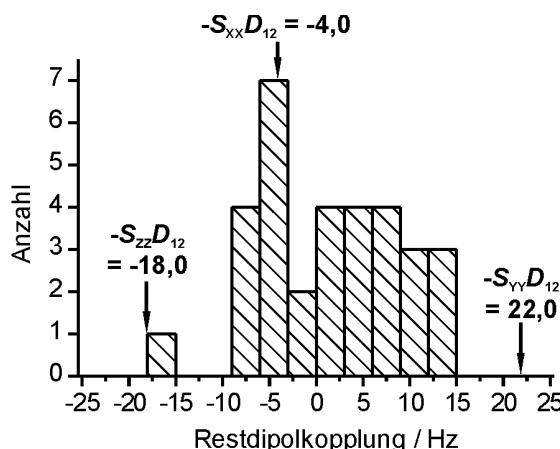


Abb. 4.3: Histogramm, welches die Verteilung der in der Strukturrechnung verwendeten ¹H-¹⁵N-Restdipolkopplungen der His₆PSCD4-Domäne bei $T = 298$ K in 7,5 % $\%$ des Bicellsystems DIODPC/CHAPSO/CTAB zeigt. Die Hauptwerte S_{ij} des Orientierungstensors können wie ange deutet aus dieser Verteilung bestimmt werden (CLORE et al., 1998)

4. Ergebnisse

Vor und nach der Messung des anisotropen HSQC-Spektrums wurde eine Aufspaltung des HDO-Signals von 19,6 und 23,2 Hz gemessen. Diese Aufspaltung ist ein Maß für die Orientierung des verwendeten Bicellsystems. Wenn die Orientierung stabil ist, sollte vor und nach der Messung der Restdipolkopplungen die Aufspaltung gleich sein. In diesem Fall war die Orientierung des Mediums im Magnetfeld zu Beginn des HSQC-Experiments noch nicht vollständig. Dies ist jedoch kein Problem für die Bestimmung der Restdipolkopplungen, da der leicht zunehmende Orientierungsgrad zwar im Laufe des Experiments zu einem Auseinanderwandern der beiden Signale eines Multipletts führt, deren Schwerpunkt aber unverändert lässt. Insgesamt führt dies zu einer Linienverbreiterung und zu einer zeitlichen Mittelung der beobachteten Aufspaltung (also der Kopplung) über den jeweiligen Orientierungsgrad.

Winkelinformationen aus den $^3J_{H^N H^\alpha}$ - und den $^3J_{H^\alpha N}$ -Kopplungen

Aus dem HNCA-E.COSY-Spektrum (s. 3.2.2) konnten insgesamt 41 $^3J_{H^N H^\alpha}$ -Kopplungen bestimmt werden (s. Anhang 9.2). Der Fehler ergibt sich aus der Bestimmung der Position zweier Signale und addiert sich zum Gesamtfehler der skalaren Kopplung auf. Für die Interpolation einer Signalposition wird als Fehler $\pm 0,5$ Hz, circa die Hälfte der digitalen Auflösung (0,8 Hz, s. 3.2.2) angenommen. Somit ergibt sich der Fehler der Kopplung zu ± 1 Hz. Als Einschränkungen für die Strukturrechnung wurden 30 Kopplungen innerhalb der Sequenz der PSCD4-Domäne (AA 16 bis AA 103 des His₆PSCD4-Konstrukts) verwendet. Kopplungen mit Werten zwischen 6 und 8 Hz wurden nicht in die Strukturrechnung einbezogen, da sie durch Mittelung über mehrere Konformationen zustande kommen können und so zu einer gemittelten, aber nicht existierenden Konformation führen würden.

Über den gesamten Wertebereich des Winkels Ψ variiert die im HCACO[N]-E.COSY-Spektrum (s. 3.2.2) beobachtete $^3J_{H^\alpha N}$ -Kopplung nur von -0,16 bis -1,76 Hz, also um insgesamt 1,6 Hz. Die Auswertung ist verglichen mit dem HNCA-E.COSY noch erschwert, da die Aufspaltung des Multipletts durch die passive $^1J_{NC}$ -Kopplung nur 15 Hz beträgt, die Linienbreite auf halber Höhe in der C'-Dimension aber 7 bis 14 Hz beträgt. Die Position der Signalmaxima und die Linienform wird deshalb durch Überlagerungen oft verfälscht. Die Linienbreite auf halber Höhe in der ¹H-Dimension, in der auch die Kopplung bestimmt wurde, beträgt 15 bis 20 Hz. Zur Bestimmung der Signalpositionen wurde an 1-dimensionale Schnitte die Linienform angepasst. Nimmt man einen Fehler für die Signalposition von $\pm 0,3$ Hz an, so ergibt sich für die Kopplung ein Fehler von $\pm 0,6$ Hz. Aufgrund dieses großen Fehlers, verglichen mit der Größe des Wertebereichs von 1,6 Hz, zusammen mit der Mehrdeutigkeit der Karplus-Kurve und den möglichen Abweichungen der Winkel-Kopplungsbeziehung von der empirischen

4. Ergebnisse

Karplus-Kurve, wurden die $^3J_{H^\alpha N}$ -Kopplungen nicht als Einschränkungen in der Strukturrechnung verwendet. Die genaue Bestimmung der Kopplungen und ihre Verwendung in der Strukturrechnung ist nur bei hervorragender Qualität der Spektren und kleinen Linienbreiten, d.h. kleinen Proteinen und Peptiden (< 60 AA) oder bei sehr gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis, d.h. hoher Proteinkonzentration, hoher Magnetfeldstärke und Verwendung eines Cryo-Probenkopfes, möglich.

Wasserstoffbrückenbindungen aus dem H(N)CO-Experiment

Aufgrund der Relaxation während der langen Transferzeit im H(N)CO-Experiment (s. 3.2.2) ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis trotz 312 aufaddierter *FIDs* relativ schlecht. Es kann nur eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe des Serinrestes 43 und der Amidgruppe des Alaninrestes 51 identifiziert werden. Die anderen Signale sind entweder Signale zwischen der Amidgruppe einer Aminosäure und der Carbonylgruppe ihres Vorgängers, da die $^1J_{NC}$ -Kopplung von 15 Hz abweicht und somit der Transfer nicht refokussiert wird, oder zwischen den Amidgruppen des Rückgrats von Asparaginen oder Aspartaten und ihrer Carbonyl- bzw. Carboxygruppe ihrer Seitenkette. Die $^3J_{NC}$ -Kopplung zwischen diesen Gruppen liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie die $^3J_{NC}$ -Kopplung über Wasserstoffbrückenbindungen.

Der Abstand zwischen dem Proton und dem Protonen-Akzeptor (H..O) beträgt normalerweise 0,18 bis 0,20 nm und zwischen Protonen-Donor (N) und Protonen-Akzeptor 0,27 bis 0,30 nm. Für die Strukturrechnung wurden etwas größere Abstandsgrenzen, nämlich 0,18 bis 0,25 nm und 0,23 bis 0,35 nm verwendet.

Abstandsinformationen aus NOESY-Spektren

Die zur Bestimmung der *NOE*-Kontakte verwendeten Spektren sowie ihre Abstandseichung sind in 3.2.2 beschrieben. Die hohe Anzahl einiger Aminosäuren, besonders Prolin, Serin, Cystein und Aspartat in der Primärsequenz des His₆PSCD4, sowie die geringe Anzahl an aromatischen Aminosäuren im Kern des Proteins (4 Phenylalanine), führen zu vielen Signalüberlagerungen in den Spektren und zu Mehrdeutigkeiten der chemischen Verschiebungen. Aufgrund dieser Probleme wurden zur Auswertung hauptsächlich die 3-dimensionalen 1H - ^{15}N - und 1H - ^{13}C -NOESY-HSQC-Experimente verwendet. Die Zuordnung der *NOE*-Kontakte erfolgte in einem iterativen Prozess: In einem ersten Schritt wurden eindeutige *NOE*-Kontakte in den NOESY-Spektren identifiziert. Diese Abstandsinformationen, die Restdipolkopplungen, die $^3J_{HNH^\alpha}$ -Kopplungen sowie die biochemisch bestimmten Positionen der Disulfidbrücken (s.u.) wurden als Einschränkungen für erste Strukturrechnungen verwendet.

4. Ergebnisse

Mit diesen ersten Strukturen und daraus mit dem Computerprogramm RELAX (s. 3.2.2) zurückgerechneten NOESY-Spektren wurden dann Mehrdeutigkeiten bei der Zuordnung der *NOE*-Kontakte, eliminiert und weitere *NOE*-Kontakte identifiziert, um in einer neuen Strukturrechnung verwendet zu werden. Diese Schritte wurden mehrfach wiederholt, bis keine weitere eindeutige Zuordnung von *NOE*-Kontakten mehr möglich war.

Mittels des Computerprogramms cnsstat (s. 3.3.1) wurden Verletzungen der *NOE*-Kontakte in den Strukturrechnungen analysiert. *NOE*-Kontakte die häufig verletzt wurden, wurden anhand der NOESY-Spektren überprüft und gegebenenfalls mit größeren Fehlerngrenzen versehen oder nicht als Einschränkung für die Strukturrechnung verwendet. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die für die Berechnung der endgültigen Struktur (s. 4.1.4) verwendeten eindeutigen *NOE*-Kontakte:

Art der NOE-Kontakte¹	Anzahl der Kontakte AA 15 bis AA 103	Anzahl der Kontakte AA 30 bis AA 94
intraresidual	253	231
interresidual: $i-j = 1$	64	62
Rückgrat-Rückgrat	20	19
Rückgrat-Seitenkette	30	29
Seitenkette-Seitenkette	14	14
interresidual: $1 < i-j < 5$	52	52
Rückgrat-Rückgrat	3	3
Rückgrat-Seitenkette	17	17
Seitenkette-Seitenkette	32	32
interresidual: $ i-j = 2$	15	15
interresidual: $ i-j = 3$	28	28
interresidual: $ i-j = 5$	9	9
interresidual: $i-j \geq 5$	91	88
Rückgrat-Rückgrat	3	3
Rückgrat-Seitenkette	38	37
Seitenkette-Seitenkette	50	48
interresidual: $ i-j = 4$	10	10
Gesamt	460	433

¹ i und j sind die Positionen der am *NOE*-Kontakt beteiligten Aminosäuren in der Sequenz der His₆PSCD4-Domäne.

Die Anzahl der zugeordneten *NOE*-Kontakte ist für ein Protein dieser Größe vergleichsweise gering, andererseits ist hierzu zu bemerken, dass 433 der 460 zugeordneten *NOE*-Kontakte im Kernbereich des His₆PSCD4-Konstrukts von Aminosäure 30 bis 94 liegen. Einige *NOE*-Kontakte im Kernbereich des Proteins können aufgrund von Überlagerungen und Mehrdeutigkeiten nicht zugeordnet werden. Für die Aminosäuren der N- und C-Termini sind nur wenige *NOE*-Kontakte in den NOESY-Spektren beobachtbar. Im Bereich der Termini konnten nur 27 *NOE*-Kontakte zugeordnet werden, davon waren 22 intraresidual. Dies ist in guter

4. Ergebnisse

Übereinstimmung mit der Analyse der chemischen Verschiebungen (4.1.1) und den Relaxationsstudien (4.1.3), die zeigen, dass die Termini eine höhere Flexibilität aufweisen und kaum strukturiert sind.

In Proteinen kann die Aminosäure Prolin als cis- oder als trans-Isomer vorliegen. Die Prolinringe können dabei verschiedene Konformationen („up“, „down“, „twist“) ausbilden, welche anhand von NMR-Parametern unterschieden werden können (CAI et al., 1995). In Abb. 4.4 sind die cis- und trans-Isomere eines Prolinrestes gezeigt. Wie leicht zu erkennen ist und von WÜTHRICH et al. (1984) gezeigt wurde, sind die Abstände zwischen dem H^N - und dem H^α -Proton der dem Prolin in der Sequenz vorangehenden Aminosäure und den H^δ -Protonen des Prolinrestes deutlich kleiner als die zu dessen H^α -Proton. Im cis-Isomer beobachtet man das umgekehrte Verhalten der Abstände. Dies bedeutet, dass man in den NOESY-Spektren anhand des Auftretens von NOE-Kontakten zwischen $H^N_{(i)}$ bzw. $H^\alpha_{(i)}$ und $H^\delta_{(i+1)}$ die trans-Form und zwischen $H^N_{(i)}$ bzw. $H^\alpha_{(i)}$ und $H^\alpha_{(i+1)}$ die cis-Form identifizieren kann.

Abb. 4.5 zeigt einen Ausschnitt aus dem 1H - ^{13}C -NOESY-HSQC-Spektrum, in dem für einige Proline die entsprechenden Kontakte $H^\alpha_{(i)}-H^\delta_{(i+1)}$ zu erkennen sind. Für die Prolinreste 39, 47, 63 und 73 konnten $H^\alpha_{(i)}-H^\delta_{(i+1)}$ NOE-Kontakte identifiziert werden. Für die Prolinreste 46, 55 und 69 konnten zusätzlich zu den $H^\alpha_{(i)}-H^\delta_{(i+1)}$ NOE-Kontakten noch die $H^N_{(i)}-H^\delta_{(i+1)}$ NOE-Kontakte zugeordnet werden. Somit konnte für diese sieben Prolinreste das Vorliegen in der trans-Form gezeigt werden. Für die anderen Prolinreste war es nicht möglich NOE-Kontakte zwischen den H^N - und H^α -Protonen des Vorgängers und des Prolinrestes zu identifizieren. Bei vier Prolinresten (61, 85, 99 und 100) ist eine der beiden beteiligten Aminosäuren überhaupt nicht in den NOESY-Spektren identifiziert (s. 4.1.1), bei einigen anderen zeigen die Vorgängeraminoäuren keine Signale im 1H - ^{15}N -NOESY-HSQC-Experiment. Die Aminosäuren der Termini besitzen insgesamt sehr wenig NOE-Kontakte (s.o.).

Anhand der Differenz aus C^γ - und C^β -Verschiebung können die beiden Isomere ebenfalls unterschieden werden (SCHUBERT et al., 2002). cis-Prolin besitzt eine Differenz der beiden

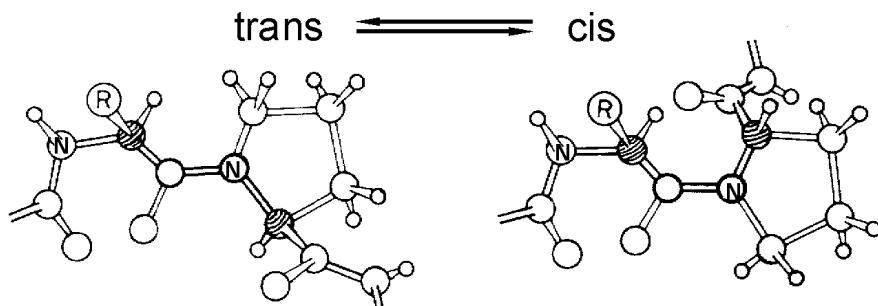


Abb. 4.4: cis-trans-Isomere einer Xxx-Pro-Peptidbindung. Die H^α -Atome sind schraffiert, R symbolisiert die Seitenkette der beliebigen Aminosäure Xxx (aus WÜTHRICH, 1986)

4. Ergebnisse

chemischen Verschiebungen größer 9 ppm, trans-Prolin kleiner 7 ppm. Alle Proline im Kernbereich des Proteins zeigen Differenzen kleiner 7 ppm und liegen deshalb in der trans-Form vor. Für die Prolinreste, für welche die C^β - und C^γ -Verschiebungen nicht zugeordnet werden konnten, wurden in der Strukturrechnung die häufiger auftretende trans-Form angenommen. Die Konformation der Prolinringe erhält man aus der Analyse der Intensitäten von Kreuzsignalen zwischen durch drei kovalente Bindungen getrennten Protonen der Prolinreste in TOCSY-Spektren mit kurzer Mischzeit (ca. 10 ms) und NOESY-Spektren (CAI et al., 1995). Hierzu müssen nahezu alle Protonen eines Prolinrestes in 2-dimensionalen TOCSY- und NOESY-Experimenten identifizierbar und integrierbar sein. In Abb. 4.5 ist zu erkennen, dass die Bereiche der H^δ/C^δ -Verschiebungen im 3-dimensionalen Spektrum stark überlagert sind. Für die H^β/C^β - und H^γ/C^γ -Kerne der Prolinreste ist die Dispersion der chemischen Verschiebungen geringer als für die H^δ/C^δ -Verschiebungen, so dass ein Großteil der Verschiebungen nicht zugeordnet werden konnte. Aus diesem Grund konnte die Konformation der Prolinringe nicht weiter analysiert werden.

Biochemische Bestimmung der Positionen der Disulfidbrücken

Aufgrund der geringen Anzahl an eindeutig zuzuordnenden NOE-Kontakten wurde durch Herrn Lehmann in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Sumper versucht, durch Verdau des

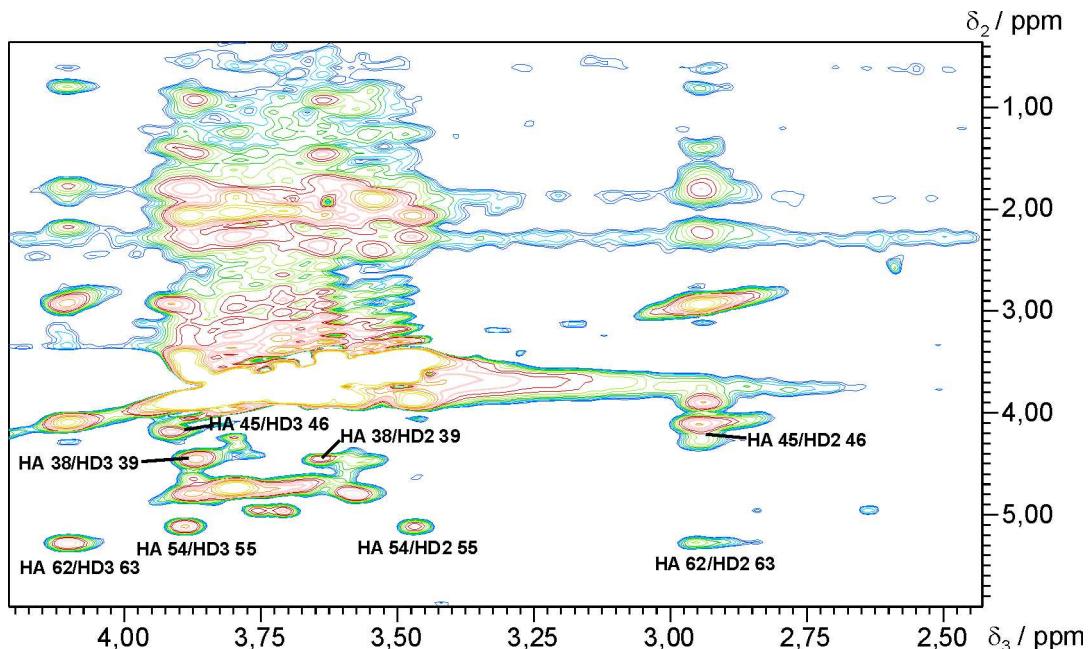


Abb. 4.5: Ausschnitt aus dem ^1H - ^{13}C -NOESY-HSQC-Experiment (600,13 MHz) von 0,8 mM His₆PSCD4 in einem 10 mM Natriumphosphatpuffer (90% H_2O , 10% D_2O , pH 6,5, $T = 298 \text{ K}$). Gezeigt ist ein Ausschnitt bei einer ^{13}C -Verschiebung von 49,95 ppm, der die Kontakte zu den H^δ/C^δ einiger Prolinreste zeigt. Es sind nur Kreuzsignale zwischen den H^δ -Protonen von Prolinresten und den H^α -Protonen ihrer Vorgänger beschriftet. Die Mischzeit betrug 100 ms, die Auflösung des Spektrums (aufgenommen mit 16 Scans pro FID) beträgt 2,3 Hz / Punkt in der direkten ^1H -Dimension (δ_3), 18,8 Hz / Punkt in der indirekten ^1H -Dimension (δ_2) und 80,6 Hz / Punkt für ^{13}C (δ_1)

His₆PSCD4-Konstrukts mit Proteasen, die Positionen der 5 ausgebildeten Disulfidbrücken zu bestimmen. Das His₆PSCD4-Konstrukt erwies sich als sehr stabil gegenüber dem Verdau mit spezifischen Proteasen. Nur durch mehrfachen und abwechselnden Verdau des Proteins mit den unspezifischen Proteasen Subtilisin und Proteinase K konnte der Kern der PSCD4-Domäne gespalten werden. Die Produkte des Verdaus wurden aliquotiert, um durch β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken der Fragmente in einem Aliquot zu reduzieren. Anschließend folgte eine Aufreinigung der einzelnen Fragmente mittels RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, C18-Gel-Säule). Fragmente, die unterschiedliche Signale in den Chromatogrammen mit und ohne Reduktion der Disulfidbrücken ergaben, wurden mittels Edman-Abbau identifiziert. Durch dieses Verfahren konnten die Positionen von drei Disulfidbrücken bestimmt werden (s. Abb. 4.6). Die PSCD4-Domäne ist auf sich selbst zurückgefaltet, der erste Cysteinrest ist mit dem letzten verbrückt, der zweite in der Sequenz mit dem vorletzten, sowie die beiden mittleren miteinander.

Es konnten keine Fragmente aufgereinigt werden, die nur die Cysteinreste 31 und 36 bzw. die direkt benachbarten Cysteinreste 71 und 72 enthielten. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Cysteine 36 und 49 über Disulfidbrücken mit den Cysteinresten 71 und 72 verbunden sind.

4.1.3 Ergebnisse der Relaxationsstudien am His₆PSCD4-Konstrukt

Maße für die Beweglichkeit einer Amidgruppe in einem Protein sind die Intensität des heteronuklearen $^{15}\text{N}\{\text{H}\}$ -NOE und die Relaxationsraten R_1 und R_2 . Abb. 4.7 zeigt die $^{15}\text{N}\{\text{H}\}$ -NOE-Intensität und die Relaxationsraten in Abhängigkeit von der Sequenz.

Die $^{15}\text{N}\{\text{H}\}$ -NOE-Intensitäten haben für den Kernbereich der PSCD4-Domäne von Cysteinrest 24 bis Methioninrest 82 Werte von fast 0,8. Die meisten Reste in diesem Bereich, die geringere NOEs besitzen, haben ein schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis, so dass ihr Fehler größer ist als für die anderen Werte und die Abweichungen nicht signifikant sind. Die NOEs in den Randbereichen der eigentlichen PSCD4-Domäne sind deutlich kleiner als die im

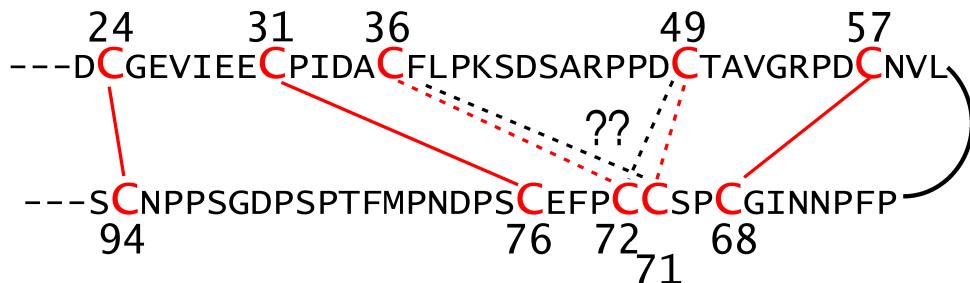


Abb. 4.6: Mit biochemischen Methoden bestimmte Positionen der drei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten 24–94, 31–76 und 57–68. Über die Verbrückung der restlichen vier Cysteinrestegaben die biochemischen Analysen keinen Aufschluss. Allerdings zeigen NOE-Kontakte (s. 4.1.4), dass die Cysteinreste 36 und 49 mit 71 und 72 verknüpft sind. Diese zwei möglichen Verbrückungen sind mit roten und schwarzen gestrichelten Linien angedeutet

4. Ergebnisse

Kernbereich. Für die Aminosäuren des N- und des C-Terminus des His₆PSCD4-Konstrukts nehmen die NOEs negative Werte an.

Die NOE-Werte von ca. 0,8 zeigen, dass der Kernbereich der PSCD4-Domäne nur eine geringe Beweglichkeit des Proteinrückgrats aufweist. Hingegen nimmt diese Beweglichkeit zu den Termini hin deutlich zu. Die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 24 und 94 liegt bereits in einem Bereich mit einer größeren Dynamik als die des Kernbereichs der Domäne. Die NOE-Werte von fast -2, welche für den C-Terminus des His₆PSCD4-Konstrukts beobachtet werden, zeigen, dass dieser sehr flexibel ist. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, dass für mehrere Reste des C-Terminus zwei Signale im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum zu beobachten sind und dieser mindestens zwei Konformationen einnimmt, welche vermutlich miteinander in langsamem Austausch stehen.

Bei den R_1 -Werten beobachtet man für den C-Terminus ebenfalls kleinere Raten als für den Kernbereich. Dies ist ein weiterer Beleg für die höhere Beweglichkeit des C-Terminus. Zwi-

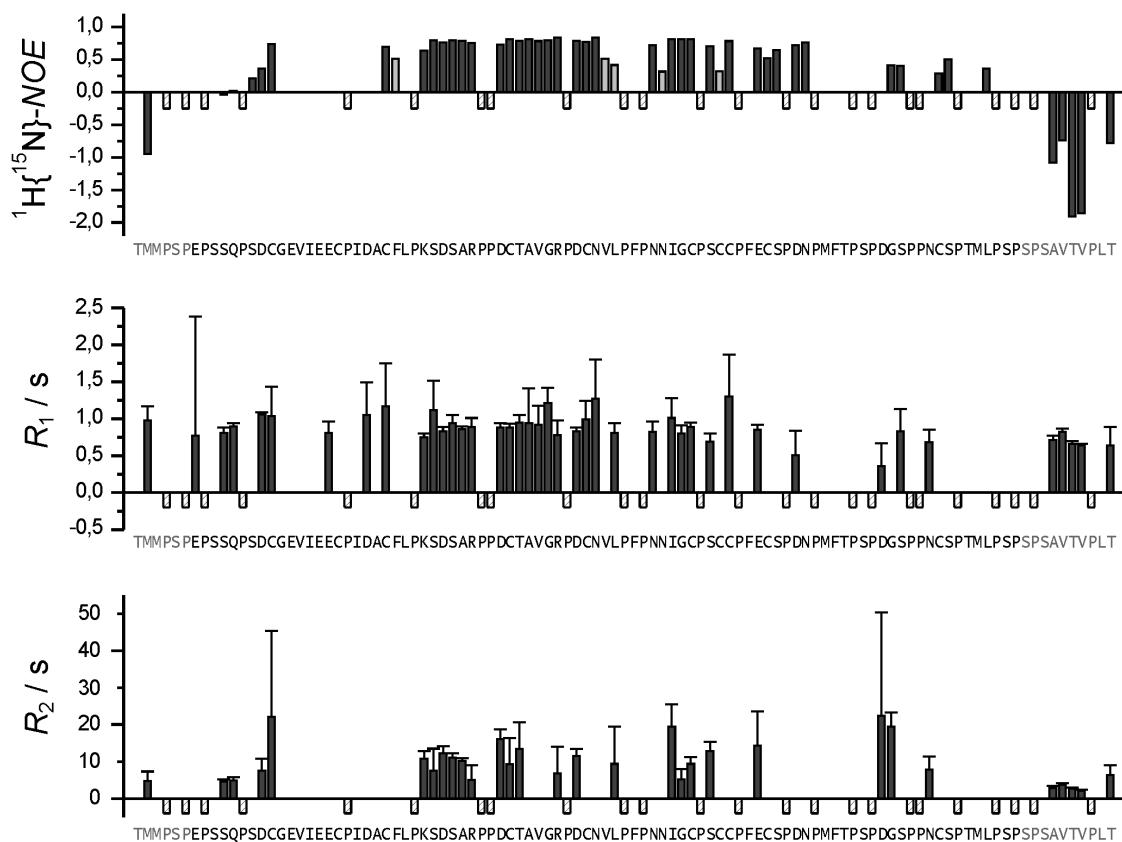


Abb. 4.7: Ergebnisse der Relaxationsmessungen bei 500,13 MHz Protonenresonanzfrequenz in Abhängigkeit der Sequenz von His₆PSCD4, beginnend mit AA-Rest 10. Die schraffierten, nach unten zeigenden Balken symbolisieren die Prolinreste, für die aufgrund des fehlenden ¹⁵N keine Werte gemessen werden können. Oben ist der heteronukleare ¹⁵N{¹H}-NOE gezeigt. Die hellen Balken sind Werte für Signale mit schlechtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis. In der Mitte und unten sind die longitudinale Relaxationsrate R_1 und die transversale Relaxationsrate R_2 gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen der für die Anpassung der Signalintensitäten mit dem Programm Origin erhaltenen Standardabweichung

schen den Werten für den N-Terminus und den Kernbereich ist allerdings kein Unterschied zu erkennen. Jedoch sind die Fehler der Werte für Methionin 10 und Glutamat 16 relativ groß, so dass diese Werte nur begrenzt aussagefähig sind.

Für die transversale Relaxationsrate R_2 sind die Werte für die Reste der beiden Termini, in Einklang mit den Werten der ${}^1\text{H}\{{}^{15}\text{N}\}$ -NOE-Intensität, deutlich kleiner als für den Kernbereich. Aufgrund der geringeren Aufnahmedauer der Experimente zur Messung von R_2 gegenüber denen zur Messung von R_1 , war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis schlechter, so dass für einige Aminosäuren nur die Bestimmung der longitudinalen Relaxationsrate möglich war.

4.1.4 Struktur der PSCD4-Domäne

Lage der Disulfidbrücken

Erste Strukturrechnungen mittels CNS mit den eindeutig zugeordneten NOE-Kontakten und den weiteren in 4.1.2 beschriebenen Einschränkungen, sowie den drei biochemisch bestimmten Disulfidbrücken (s. 4.1.2) zeigten eine schlechte Konvergenz der berechneten Strukturen. Die C^β -Atome der Cysteinreste 36, 49, 71 und 72, welche aufgrund der beobachteten chemischen Verschiebungen (s. 4.1.1) verbrückt sein müssen, wiesen in einem Großteil der erhaltenen Strukturen Abstände größer als 0,4 nm auf. Bei den Strukturen mit geringeren Abständen der C^β -Atome gab es keine bevorzugten Cysteinpaare, so dass die Position der beiden Disulfidbrücken nicht bestimmt werden konnte. Mehrere NOE-Kontakte zwischen den Cysteinresten 71 und 72 und dem Cysteinrest 49, sowie zwischen ihren Nachbarn ($\text{H}^{\text{N}}_{49}-\text{H}^{\text{N}}_{71}$, $\text{H}^\alpha_{49}-\text{H}^\alpha_{71}$, $\text{H}^{\beta2}_{49}-\text{H}^\alpha_{71}$, $\text{H}^{\beta2}_{48}-\text{H}^\alpha_{72}$, $\text{H}^\alpha_{48}-\text{H}^\beta_{72}$, $\text{H}^{\delta*}_{47}-\text{H}^\alpha_{71}$, $\text{H}^\alpha_{47}-\text{H}^\alpha_{71}$, $\text{H}^{\beta*}_{46}-\text{H}^\alpha_{71}$, $\text{H}^{\beta2}_{46}-\text{H}^\alpha_{72}$, $\text{H}^{\text{N}}_{45}-\text{H}^{\text{N}}_{72}$, $\text{H}^{\gamma*}_{52}-\text{H}^{\beta*}_{71}$, $\text{H}^{\beta*}_{49}-\text{H}^{\gamma*}_{69}$) zeigen, dass Cystein 49 sich in räumlicher Nachbarschaft zu Cystein 71 und 72 befindet und vermutlich mit einem der beiden Cysteine verbrückt ist. Für das Cystein 36 sowie seine Nachbarn sind keine langreichweitigen NOE-Kontakte identifizierbar, ebenso wie für Threonin 50 und Alanin 51. Dies ist dadurch zu erklären, dass diese Reste an der Oberfläche des Moleküls liegen. Die Reste 46 bis 49 und 69 bis 72 liegen hingegen im Innern der Struktur.

Trotz der fehlenden langreichweitigen NOE-Kontakte des Cysteinrestes 36 kann aufgrund der räumlichen Nähe des Cysteinrestes 49 zu den Cysteinresten 71 und 72 geschlossen werden, dass Cystein 49 mit 71 oder 72 verknüpft ist und somit Cystein 36 mit 72 oder 71. Die Verknüpfung 36 mit 49 und die Ausbildung eines Achtringes zwischen den Cysteinen 71 und 72 wird dadurch ausgeschlossen. Mittels Strukturrechnungen mit dem Computerprogramm ARIA (s. 3.3.2) wurde versucht zwischen diesen beiden Möglichkeiten für die Disulfidbrü-

cken zu unterscheiden. Dazu wurden vier mehrdeutige Disulfidbrücken von Cystein 71 zu Cystein 36 oder Cystein 49 und von 72 zu 36 oder 49, sowie von 49 zu 71 oder 72 und von 36 zu 71 oder 72 definiert. Allerdings konvergierte der iterative Prozess von zusätzlicher automatischer NOE-Zuordnung und Strukturrechnung nicht zu einer der beiden Verbrückungen. In zwei Läufen des Programms ARIA mit unterschiedlichen Startwerten für den Zufallsgenerator („random seed“) wiesen nur 14 bzw. 12 der 20 energieärmsten Strukturen von 60 gerechneten des achten Iterationsschrittes die eine Verbrückung auf, während die restlichen die andere aufwiesen. Die RMSD-Werte dieser Strukturen mit jeweils gleichem Muster der Disulfidbrücken waren größer als 0,36 nm. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Möglichkeiten für die Disulfidbrücken war somit nicht möglich.

Im Folgenden wurden deshalb mit CNS zwei Sätze von Strukturrechnungen mit jeweils einer der beiden Möglichkeiten für die fünf Disulfidbrücken (24–94, 31–76, 57–68 + 36–71/49–72

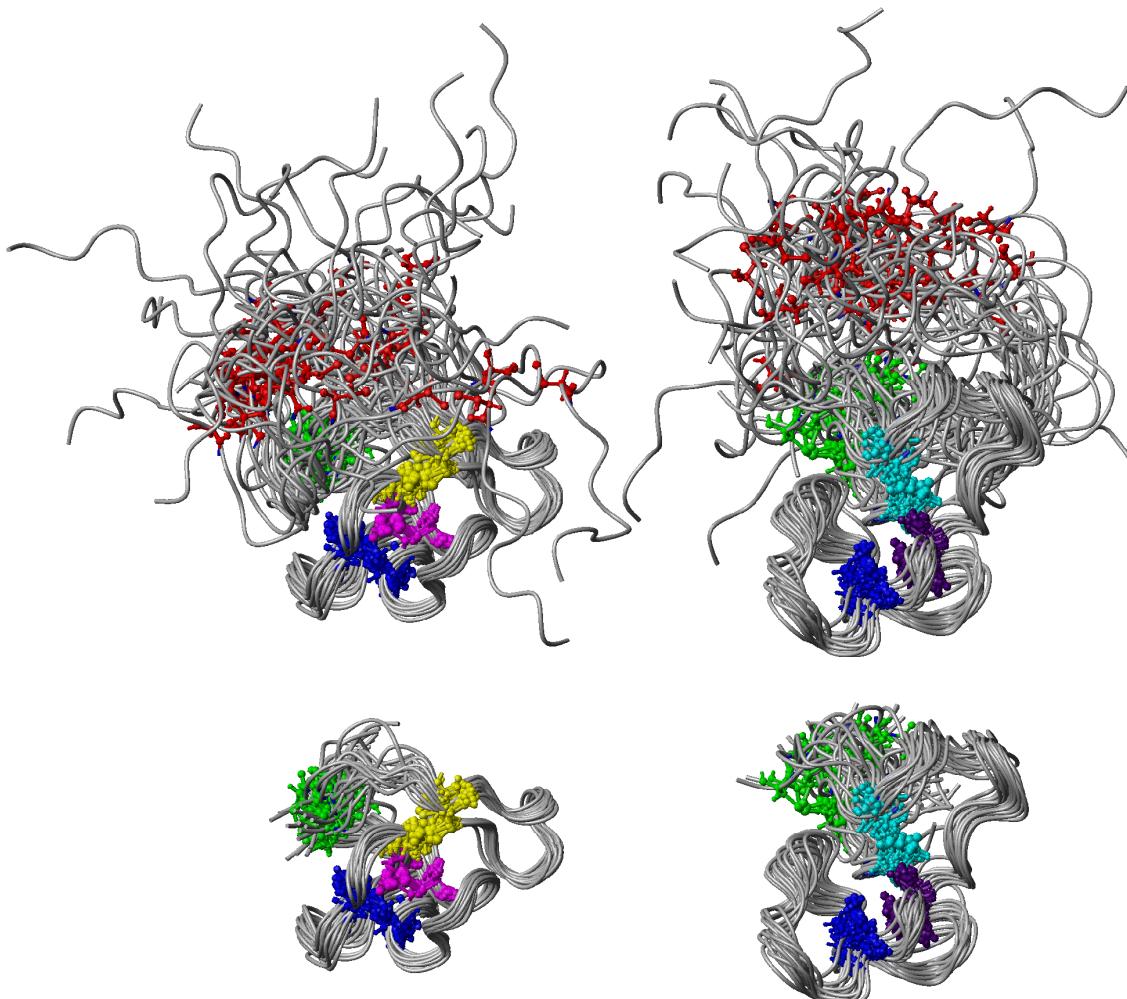


Abb. 4.8: Vergleich von Strukturbündeln der 17 energieärmsten Strukturen von je 900 mit CNS gerechneten Strukturen. Links: Disulfidbrücken 36–71 (gelb), 49–72 (magenta). Rechts: Disulfidbrücken 36–72 (türkis), 49–71 (dunkelviolett). Die anderen drei Disulfidbrücken sind jeweils identisch: 24–94 (rot), 31–76 (grün) und 57–68 (blau). Die oberen Strukturbündel zeigen die Reste 15 bis 103, die unteren die Reste 30 bis 80. Der RMSD, berechnet für das Proteinrückgrat und die Reste 30 bis 80, ist 0,1096 nm für die besten 17 Strukturen mit den Disulfidbrücken 36–71/49–72 (rechts) und 0,1915 nm für die mit den Disulfidbrücken 36–72/49–71 (links)

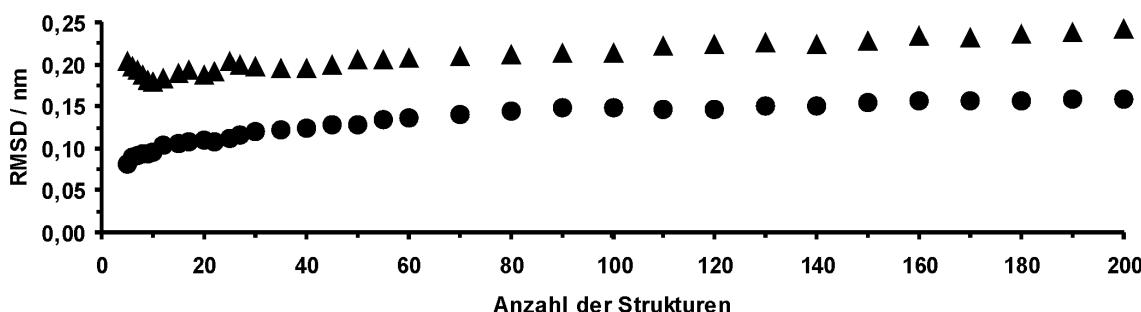


Abb. 4.9: Vergleich der RMSD-Werte der beiden Strukturrechnungen mit unterschiedlicher Disulfidverbrückung. Gezeigt ist der RMSD-Wert in Abhängigkeit der Anzahl der energieärmsten Strukturen. Kreise: Disulfidbrücken 36–71/49–72, Dreiecke: Disulfidbrücken 36–72/49–71

bzw. 36–72/49–71; im Weiteren werden diese Sätze kurz mit 36–71/49–72 bzw. 36–72/49–71 bezeichnet) durchgeführt. Für jeden Satz wurde dabei in mehreren Zyklen Strukturen berechnet, um mit diesen weitere am Anfang mehrdeutige NOE-Kontakte zuzuordnen bzw. den Strukturen widersprechende Abstandseinschränkungen zu eliminieren. Aus diesem Grund unterscheiden sich die für die Berechnung der beiden Sätze verwendeten NOE-Kontakte. Für den Satz 36–71/49–72 konnten 15 NOE-Kontakte mehr eindeutig zugeordnet werden als für 36–72/49–71. Die damit erhaltenen Strukturbündel sind in Abb. 4.8 dargestellt.

In beiden Sätzen ist die Struktur von N- und C-Terminus, einschließlich der Disulfidbrücke 24–94, schlecht definiert. Sie nehmen in der Strukturrechnung in Übereinstimmung mit den Relaxationsmessungen (s. 4.1.3) mehrere Konformationen ein.

Der Kern beider Strukturbündel wird durch mehrere, durch die Disulfidbrücken zusammengehaltene Schleifen gebildet. Die Strukturen mit den Disulfidbrücken 36–71/49–72 sind kompakter als die mit den Disulfidbrücken 36–72/49–71. Die Abweichungen des Kernbereichs (Rest 30 bis 80) zwischen den energieärmsten Strukturen (RMSD) sind für den Satz 36–71/49–72, wie in Abb. 4.9 gezeigt ist, deutlich geringer. Dies ist auch direkt an den Strukturbündeln in Abb. 4.8 erkennbar. Für die energieärmsten 17 Strukturen aus 900 berechneten ist der RMSD 0,1096 nm für 36–71/49–72 und 0,1915 nm für 36–72/49–71.

Die aus der CNS-Rechnung erhaltenen Energiebeiträge (Mittelwert \pm Standardabweichung) der in Abb. 4.8 gezeigten Strukturen sind in der folgenden Tabelle gezeigt:

Art der Verletzung	Verbrückung 36–71/49–72 Energie / kJ·mol ⁻¹	Verbrückung 36–72/49–71 Energie / kJ·mol ⁻¹
$E_{\text{van-der-Waals}}$	244,9 ± 7,5	44,4 ± 4,1
$E_{\text{Diederwinkel}}$	175,4 ± 6,5	56,9 ± 2,2
$E_{\text{Bindungen}}$	30,4 ± 1,5	7,0 ± 0,5
$E_{\text{Winkel-Aromatenringe}}$	29,0 ± 3,8	4,4 ± 0,6
E_{NOE}	170,0 ± 5,5	21,3 ± 2,5
$E_{\text{Restdipolkopplungen}}$	20,9 ± 2,4	10,3 ± 2,1
$E_{\text{skalare-Kopplungen}}$	42,3 ± 7,7	12,0 ± 3,0
E_{Gesamt}	713,7 ± 10,7	156,1 ± 6,6

Die deutlich geringeren Energiebeiträge von 36–72/49–71 sind auf die geringere Anzahl der in der Strukturrechnung verwendeten Abstandseinschränkungen, besonders von langreichweiten NOE-Kontakten, zurückzuführen. Strukturrechnungen mit der gleichen Anzahl von NOE-Kontakten ergeben für 36–71/49–72 vergleichbare Energiebeiträge (nicht gezeigt).

Aufgrund der kompakteren Struktur, dem geringeren RMSD-Wert und der besseren Übereinstimmung der Struktur mit den langreichweiten NOE-Kontakten zwischen den Cysteinen 49, 71 und 72 sowie ihren Nachbarn kann eine Entscheidung für die Disulfidverbrückung zwischen Cystein 36 und 71 und zwischen Cystein 49 und 72 getroffen werden (s. Abb. 4.10). Im Folgenden wird nur noch diese betrachtet. Eine direkte Identifizierung der Lage der Disulfidbrücken anhand von NOE-Kontakten ist aufgrund der geringen Anzahl der NOE-Kontakte des Cysteinrestes 36 und seiner Nachbarn, sowie von Überlagerungen in den NOESY-Spektren in den Bereichen der Cystein- und Prolinreste und der hohen Anzahl sehr ähnlicher chemischer Verschiebungen und dadurch verursachter Mehrdeutigkeiten nicht möglich.

Struktur

Abb. 4.11 stellt den Kern der PSCD4-Domäne von Aminosäure 30 bis 80 dar. Gezeigt ist das Proteinrückgrat sowie die Cystinreste. Anhand einer Analyse dieser Strukturen mit dem in MolMol implementierten Algorithmus von KABSCH und SANDER (1983) konnten keine kanonischen Sekundärstrukturelemente identifiziert werden.

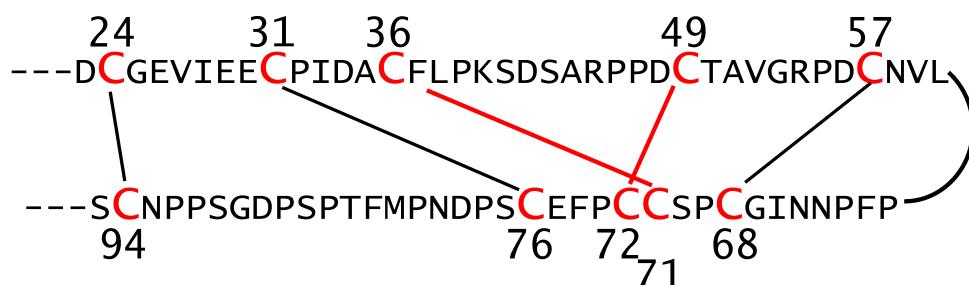


Abb. 4.10: Verknüpfung der 10 Cysteinreste der PSCD4-Domäne über Disulfidbrücken. Die mit biochemischen Methoden bestimmten Positionen von drei Disulfidbrücken sind schwarz eingezeichnet (s. 4.1.2), die aus der Strukturrechnung bestimmten Positionen rot

Der Kern der PSCD-Domäne bildet drei wohl definierte Schleifen aus, welche durch drei Disulfidbrücken (36–71, 49–72, 57–68) stabilisiert sind. Die Schleifen werden von den Resten 37 bis 48, 50 bis 56 und 58 bis 67 gebildet. Die PSCD4-Domäne bildet einen neuen Faltungstyp aus. Die drei Schleifen liegen wie die Blätter eines Kleeblatts, zusammengehalten durch Disulfidbrücken zu den sequentiell nahe benachbarten Cysteinen 68, 71 und 72. Die größten Bereiche dieser Schleifen liegen an der Oberfläche des Moleküls und sind somit dem Lösungsmittel zugänglich. Die Reste 32 bis 34, 46 bis 49, 57 bis 60, 70 bis 72, sowie der Rest 74 sind fast komplett im Innern der Struktur und dem Lösungsmittel kaum zugänglich, wie Analysen mit dem Computerprogramm Procheck-NMR (LASKOWSKI et al., 1996) ergaben.

Die Struktur der N- und C-Termini ist, wie in Abb. 4.8 zu sehen, kaum definiert. Die Reste zwischen den Cysteinen 24 und 31, sowie zwischen den Cysteinen 76 und 94 bilden zwei flexible Schleifen aus.

Oberflächenpotential und funktionelle Gruppen

Aufgrund der von KRÖGER und WETHERBEE (2000) postulierten Wechselwirkung der Pleuraleine mit anderen organischen Komponenten der Zellwand (s. 2.2) sind die funktionellen Gruppen und die Ladung auf der Oberfläche der PSCD4-Domäne von besonderem Interesse. In Abb. 4.12 ist zu erkennen, dass die gesamte Oberfläche des Kernbereichs der PSCD4-Domäne durch saure Seitenketten der sieben Aspartat- und fünf Glutamatreste negativ geladen ist. Eine Ausnahme hiervon bilden 2 basische Bereiche: ein größerer, der von den beiden räumlich benachbarten Resten Lysin 40 und Arginin 45 gebildet wird, sowie ein kleinerer, gebildet durch den Argininrest 45. Die beiden basischen Bereiche liegen auf einer Seite der

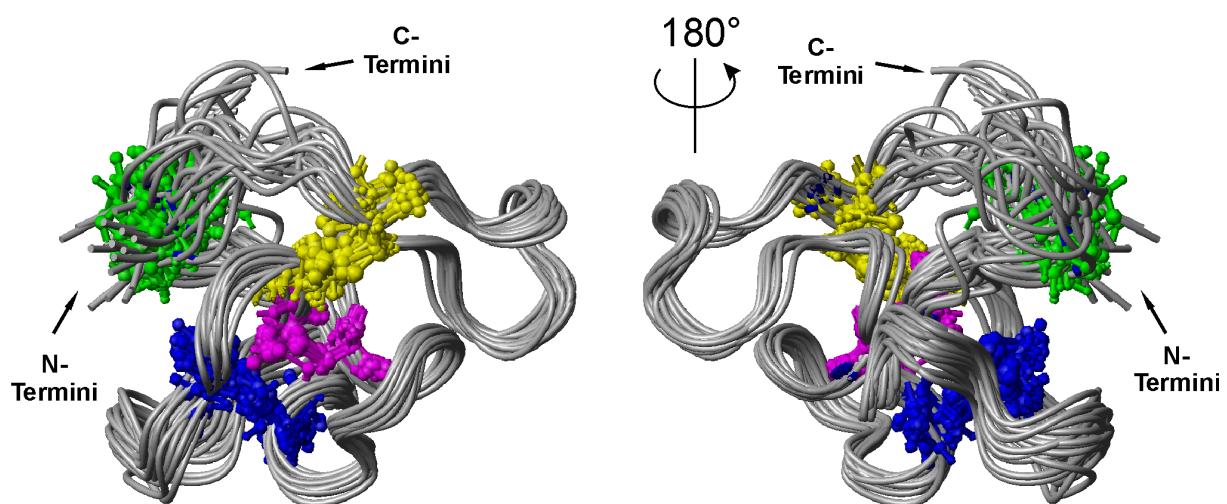


Abb. 4.11: Strukturbündel der 20 energieärmsten von 1000 berechneten Strukturen der PSCD4-Domäne von Aminosäure 30 bis 80. Der RMSD für das Proteinrückgrat dieser Strukturen von Rest 30 bis 80 beträgt 0,1096 nm. Die Cystinreste sind farblich hervorgehoben: grün: 31–76, gelb: 36–71, magenta: 49–72, blau 57–68. Das rechte Strukturbündel ist gegenüber dem linken um 180° gedreht

Domäne mit einem Abstand von ca. 20 nm. Dabei liegen die Seitenketten von Lysin 40 und Arginin 45 parallel zueinander und ragen in das umgebende Lösungsmittel, wie im rechten Teil von Abb. 4.12 zu erkennen ist.

Dieser zeigt die energieärmste von 1000 gerechneten Strukturen der PSCD4-Domäne in der Kalottendarstellung. Die Seitenketten verschiedener geladener und funktioneller Reste sind dabei farblich hervorgehoben. Auffällig ist, dass die sauren Seitenketten der Glutamate und Aspartate gleichmäßig über die Oberfläche verteilt sind, mit Ausnahme des Bereichs zwischen den beiden basischen Bereichen. Dieser wird von mehreren aliphatischen Resten (L38, P39, P46, A51, V52), dem Phenylalanin 37 und dem Cystein 36 gebildet. Allerdings zeigen die meisten Seitenketten dieser Reste ins Innere des Proteins und das polare Rückgrat dieser Reste ist der Oberfläche zugewandt.

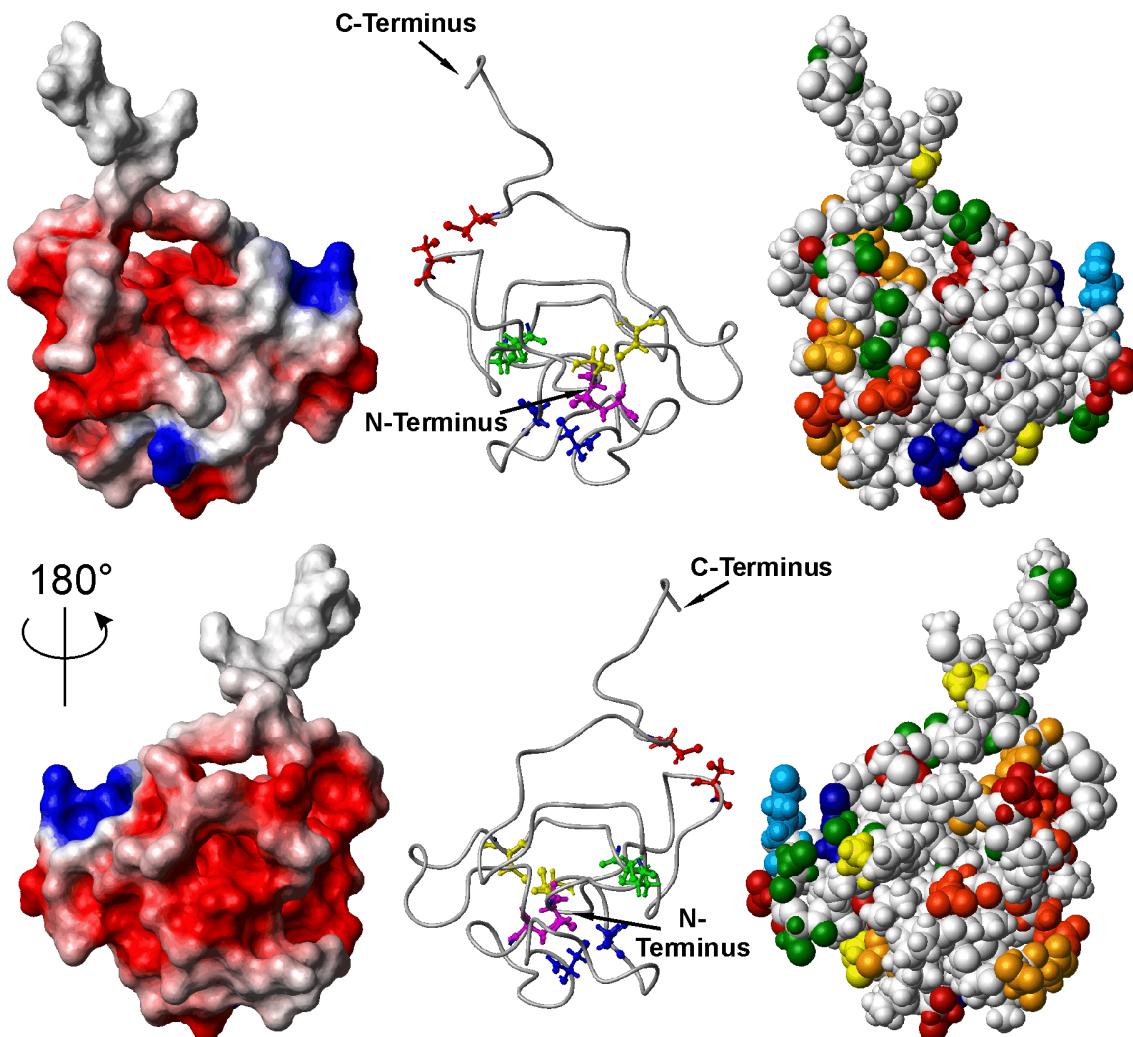


Abb. 4.12: Energieärmste Struktur der PSCD4-Domäne aus 1000 berechneten. Gezeigt sind die Reste 15 bis 103. Links: Oberflächenpotential der PSCD4-Domäne. Blau gefärbte Flächen zeigen ein positives, rot gefärbte ein relativ negatives elektrostatisches Potential an. Mitte: Zur Orientierung ist das Proteinrückgrat mit den Cystinresten gezeigt (Farbgebung wie in Abb. 4.11). Rechts: Kalottenmodell mit geladenen und polaren Gruppen: grün: Serin, gelb: Threonin, hellblau: Lysin, dunkelblau: Arginin, hellrot: Glutamat, dunkelrot: Aspartat, helles Orange: Glutamin, dunkles Orange: Asparagin. Die unteren Strukturen sind gegenüber den oberen um 180° gedreht

Die polaren Serin- und Threoninreste liegen zu 70 % außerhalb des gut strukturierten Kernbereichs der Domäne (Rest 30–80).

Qualität der Struktur

In Abb. 4.13 ist ein Ramachandrandiagramm für die PSCD4-Domäne gezeigt. Für die energieärmste Struktur aus 1000 berechneten liegen 22 % der Φ/Ψ -Winkelpaare im bevorzugten Bereich, 34,9 % im zusätzlich erlaubten Bereich, 28,6 % im großzügig erlaubten Bereich und 14,3 % im nicht erlaubten Bereich. Die Einteilung dieser Bereiche wurde vom Computerprogramm Procheck-NMR übernommen. Sie beruht auf einer Statistik der Φ/Ψ -Winkelpaare in hochaufgelösten Röntgenstrukturen von Proteinen in der PDB-Datenbank. Für ein gutes Strukturmodell sollten mehr als 90 % der Winkelpaare im bevorzugten Bereich liegen.

Aus diesem Gesichtspunkt wäre die Struktur als qualitativ schlecht einzustufen. Die über das Ramachandrandiagramm von Procheck-NMR ermittelte Äquivalentauflösung ist 0,4 nm. Allerdings weisen die meisten der Statistik zugrunde liegenden Proteine in der PDB-Datenbank auch kanonische Sekundärstrukturelemente auf.

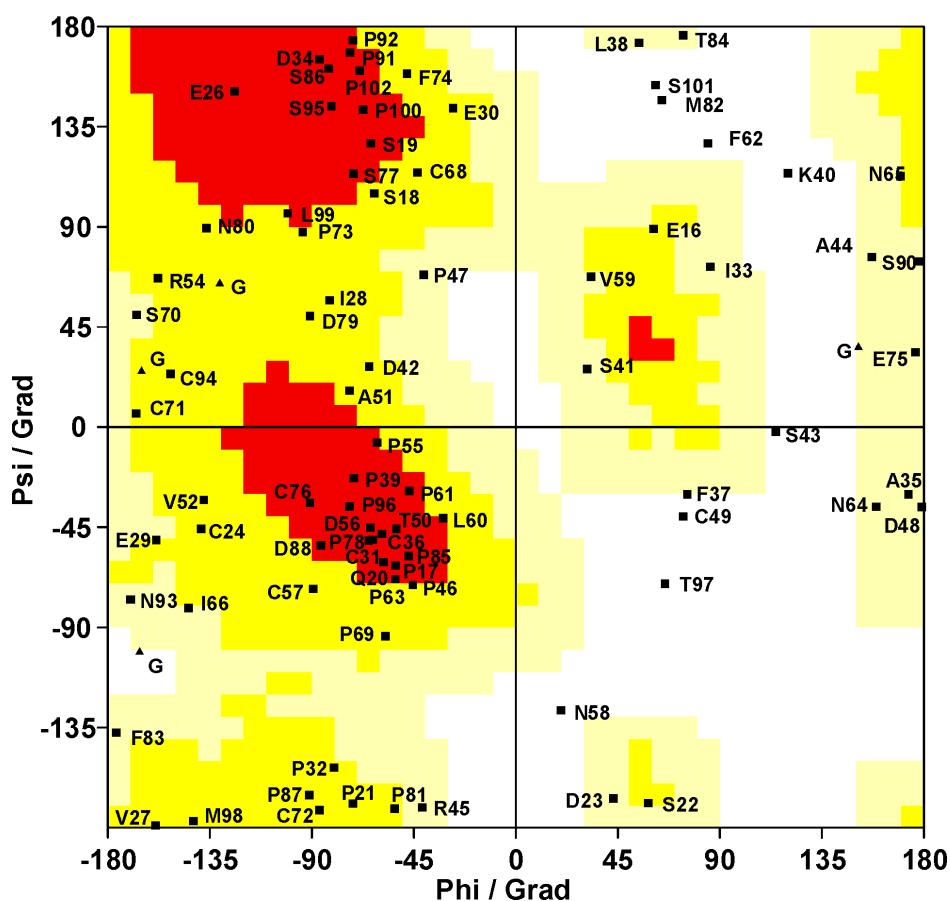


Abb. 4.13: Φ - und Ψ -Winkel der energieärmsten Struktur aus 1000 berechneten: rot: Gebiet für bevorzugte Winkel, gelb: zusätzlich erlaubte Gebiete, cremefarben: großzügig erlaubte Gebiete, weiß: nicht erlaubte Gebiete. Die Erstellung dieses Ramachandran-Diagramms und die Einteilung der Gebiete erfolgte mit dem Computerprogramm Procheck-NMR (LASKOWSKI et al., 1996)

Wie der Sequenzvergleich der PSCD4-Domäne mit anderen Proteinen in den gängigen Datenbanken ergab (vgl. 4.1.1), ist ihre Sequenz sehr ungewöhnlich und zeigt keine Homologie zu den Sequenzen bekannter Proteine. Der geringe Anteil an Winkelpaaren in den bevorzugten Bereichen des Ramachandrandiagramms kann deshalb, zumindest für den gut definierten Kernbereich, durch die ungewöhnliche Sequenz und die daraus resultierende ungewöhnliche Struktur der PSCD4-Domäne erklärt werden. Die Auflösung für den Kern der Struktur ist somit sicher höher einzuschätzen als die von Procheck-NMR angegebenen 0,4 nm.

Für die Struktur der beiden Termini ist die Auflösung gering. Dies liegt aber in der Struktur dieser Domäne selbst begründet. Für die Aminosäuren in diesen Bereichen sind nur sehr wenig NOE-Signale in den NOESY-Spektren zu beobachten. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Messungen der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOEs.

4.1.5 Strukturmodell der fünf PSCD-Domänen aus Pleuralin-1

Abb. 4.14 zeigt das Oberflächenpotential eines Modells aller fünf PSCD-Domänen des Proteins Pleuralin-1. Die Berechnung des Modells erfolgte wie in 3.3.3 beschrieben.

Das Modell zeigt, dass alle fünf PSCD-Domänen einen kompakten und geladenen Kernbereich besitzen. Diese sind durch verschieden lange, größtenteils ungeladene Sequenzabschnitte getrennt. Die Kerne aller fünf Domänen sind wie der der PSCD4-Domäne negativ geladen, wiederum mit Ausnahme einzelner basischer Bereiche.

Die Anordnung der Domänen dieses Modells relativ zueinander ist zufällig, da für die Sequenzen zwischen den Domänen und zwischen den Domänen selbst nur sehr wenig Abstands einschränkungen verwendet worden sind. Aufgrund der Tatsache, dass die PSCD-Domänen stark negativ geladen sind und die PSCD4-Domäne in Lösung nicht aggregiert, ist anzunehmen, dass die fünf PSCD-Domänen im Pleuralin-1 keine feste Quartärstruktur ausbilden, sondern flexibel, wie Perlen auf einer Schnur, angeordnet sind.

4.1.6 Wechselwirkung der PSCD4-Domäne mit Kieselsäure

Eine mögliche Funktion der PSCD-Domänen könnte deren Bindung an die SiO₂-Bestandteile der Zellwand sein. Um dies zu untersuchen, wurden, wie in 3.3.5 beschrieben, erste Wechselwirkungsstudien der PSCD4-Domäne mit Kieselsäure anhand von ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimenten durchgeführt. Durch die Zunahme des Methyldimethylsilanolsignals des Methanols ($\delta = 3,4$ ppm) konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse des TMOS in Salzsäure bzw. nach direkter Zusage zur NMR-Probe, und somit die Freisetzung der Kieselsäure, funktioniert hat.

4. Ergebnisse

Die Zugabe der Kieselsäure führt zu keinen Veränderungen in den NMR-Spektren, weder zu Signalverschiebungen noch zu Intensitätsänderungen. Dies legt den Schluss nahe, dass keine Wechselwirkung zwischen der PSCD4-Domäne und der Kieselsäure stattgefunden hat. Eine Wechselwirkung mit der Kieselsäure müsste, zumindest im direkten Interaktionbereich, zu einer Änderung der lokalen Struktur und somit zu Änderungen in den ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren führen.

Dieses Ergebnis kann eine Interaktion der PSCD-Domänen mit amorphem SiO_2 in vivo nicht ausschließen. In vivo könnten noch andere Komponenten, wie z.B. Enzyme, welche die PSCD-Domänen oder die Kieselsäure aktivieren, beteiligt sein. Andererseits können auch methodische Ursachen eine Interaktion verhindern. Eine Möglichkeit wäre, dass die Kiesel-

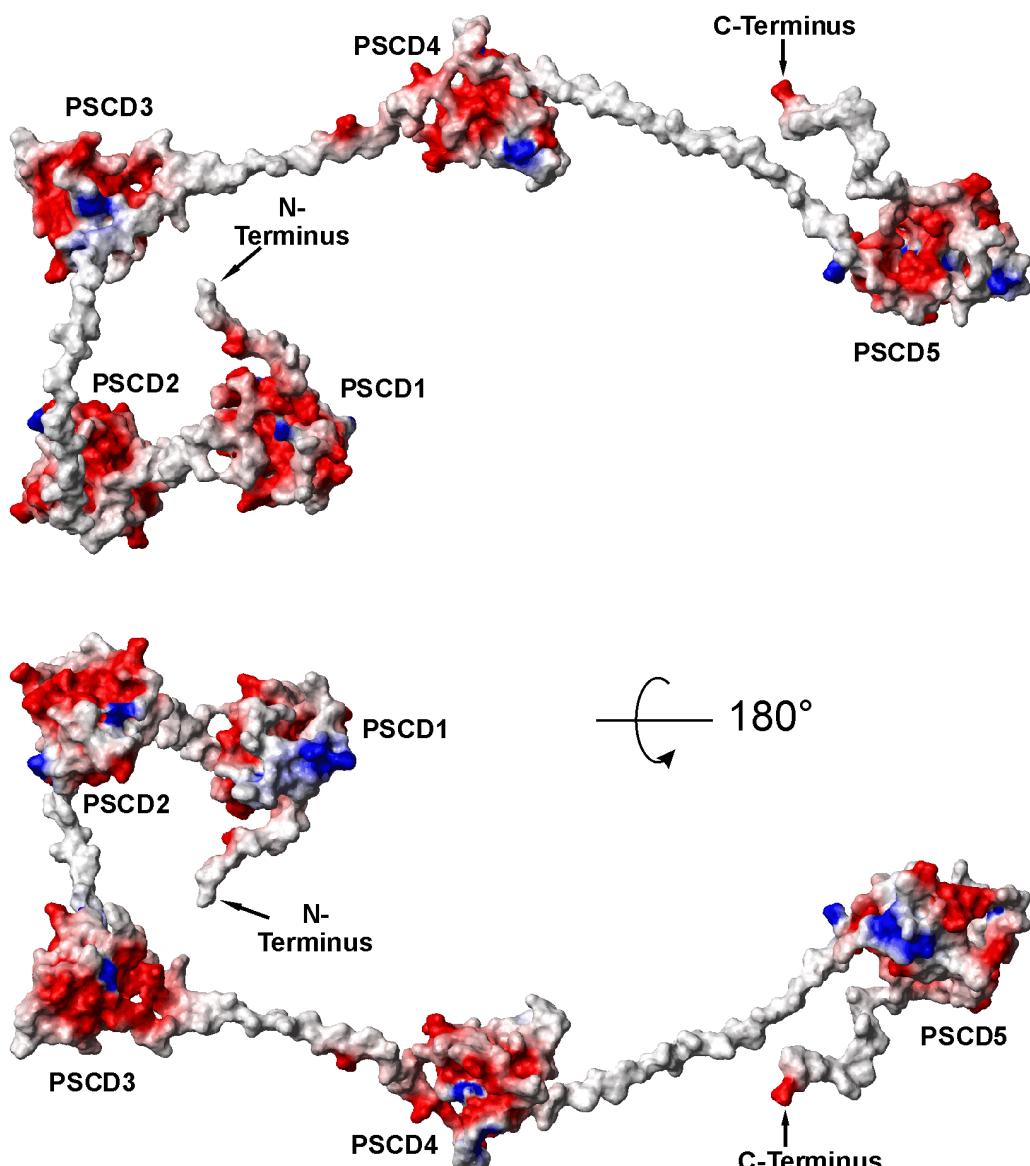


Abb. 4.14: Oberflächenpotential des Modells der fünf PSCD-Domänen aus dem Protein Pleuralin-1. Blau gefärbte Flächen zeigen ein positives, rot gefärbte ein relativ negatives elektrostatisches Potential an. Gezeigt ist das Modell mit der geringsten Gesamtenergie. Die untere Struktur ist gegenüber der oberen um 180° gedreht

säure mit der Glaswand des Probenröhrchens wechselwirkt und gar nicht frei bzw. als Oligomer in Lösung ist. Um dies zu überprüfen, müsste mittels NMR-Spektroskopie an ^{29}Si -angereicherter Kieselsäure das ganze System besser charakterisiert werden. Eine weitere experimentelle Möglichkeit, um eine Interaktion zu erreichen, wäre die Veränderung der Bedingungen wie Salzgehalt, Ionenstärke, pH und Temperatur.

4.2 Methodische Arbeiten zur Messung von Restdipolkopplungen

4.2.1 Lage der magnetischen Suszeptibilitätstensoren in HPr und Melittin

Mit dem in 3.4.1 beschriebenen Computerprogramm wurde für die beiden Proteine Melittin, dem Gift der Honigbienen (*Apis mellifera*) und für HPr aus *Staphylococcus carnosus* der magnetische Suszeptibilitätstensor vorhergesagt. Die Lage ihrer Hauptachsensysteme ist in Abb. 4.15 gezeigt. Melittin ist ein helikales Peptid aus 26 Aminosäuren. Für den magnetischen Suszeptibilitätstensor des Melittins erhält man die Anisotropie $\Delta\chi = 1,2 \cdot 10^{-33} \text{ m}^3$ und die Asymmetrie $\delta\chi = 4,0 \cdot 10^{-34} \text{ m}^3$. α -Helices besitzen aufgrund der besonderen Anordnung der Peptidbindungsebenen eine relativ hohe Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität, wie man auch im Fall des Melittins sieht. Ein anderes eindrucksvolles Beispiel für diese hohe Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität ist das helikale Rhodospin in den Purpurmembranen von Rhodobakter, welches die Ursache für die Orientierung dieser Membranen im Magnetfeld sind. Sie werden auch als orientierende Medien zur Messung von Restdipolkopplungen verwendet (KOENIG et al., 1999).

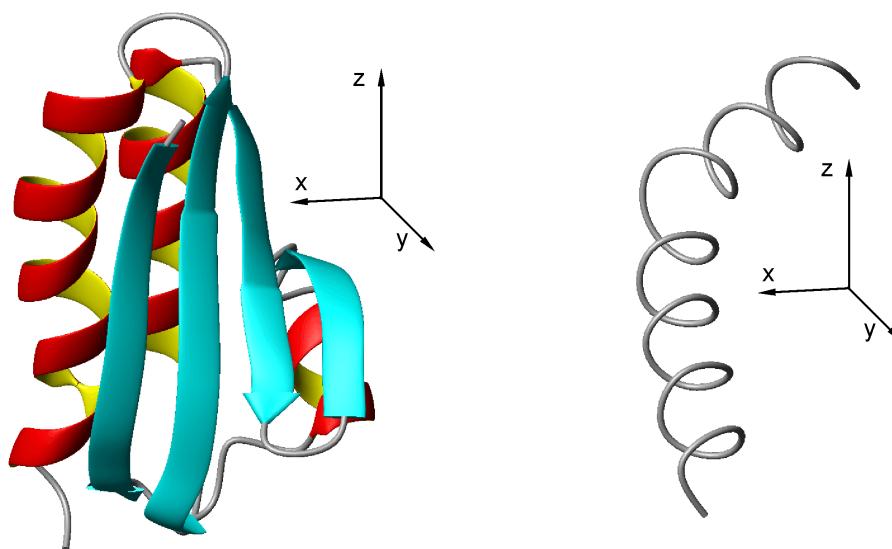


Abb. 4.15: Darstellung des Proteinrückgrats von HPr aus *Staphylococcus carnosus* (links) und von Melittin aus *Apis mellifera*. Neben den Strukturen ist schematisch die Lage des Hauptachsensystems ihres magnetischen Suszeptibilitätstensors eingezeichnet

4. Ergebnisse

Für das HPr mit zwei langen Helices und fünf aromatischen Seitenketten erhält man $\Delta\chi = 3,5 \cdot 10^{-33} \text{ m}^3$ und $\delta\chi = 1,4 \cdot 10^{-33} \text{ m}^3$. Mit Gleichung [3.19] kann man den Orientierungsgrad S_{ZZ} berechnen. Für die größte der NMR-Spektroskopie momentan zugängliche Feldstärke von 23,4 T (1000 MHz Protonenresonanzfrequenz) und $T = 298 \text{ K}$ ergibt sich S_{ZZ} zu $8,6 \cdot 10^{-6}$ bzw. $2,46 \cdot 10^{-5}$ für Melittin bzw. HPr und η zu 0,5 bzw. 0,6. Aus Gleichung [3.6] lässt sich leicht abschätzen, dass man für die $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -Restdipolkopplung, verursacht durch magnetische Orientierung, Werte von maximal 0,25 bzw. 0,6 Hz für das Melittin bzw. das HPr beobachten kann.

Diese Effekte sind trotz verfeinerter Experimente zur Messung solcher Restdipolkopplungen noch zu gering, um für die Strukturbestimmung genutzt werden zu können. Hierfür müssten die Effekte wenigstens um einen Faktor 5 bis 10 größer sein. Allerdings wären hierzu Magnetfeldstärken entsprechend 2200 bis 3000 MHz Protonenresonanzfrequenz nötig, welche in den nächsten Jahren wohl nicht realisierbar sind.

4.2.2 Messung von homonuklearen Restdipolkopplungen am BPTI

COSY-Experiment

Zur Bestimmung des Vorzeichens der Restdipolkopplung muss das Vorzeichen der effektiven, im isotropen und anisotropen Spektrum gemessenen Kopplung bekannt sein. Im isotropen Fall ist $J_{\text{eff}} = J_{\text{skalar}}$. Für die hier untersuchten $^3J_{\text{H}_\alpha\text{H}_\alpha}$ -Kopplungen liegen die Werte zwischen +4 und +14 Hz. Aus dem COSY-Spektrum ist das Vorzeichen der Kopplung nicht bestimmbar. Dies bedeutet, dass man den Orientierungsgrad gering halten muss, damit $J_{\text{skalar}} < \langle D_{12} \rangle$ gilt, so dass das Vorzeichen der Restdipolkopplung über das bekannte Vorzeichen der skalen Kopplung bestimmt werden kann. Allerdings zeigen die Signale im COSY-Spektrum auch ein unterschiedliches Verhalten für positive und negative Restdipolkopplungen. Negative Restdipolkopplungen führen zumindest bei geringen Orientierungsgraden zu einer Verringerung von J_{eff} und somit, besonders wenn J_{eff} kleiner als die Linienbreite wird, zu einem Auslöschen der Antiphase-Signale und einer Abnahme der Signalintensität. Dies ist beispielsweise für das Kreuzsignal des Arginin 53 gut zu erkennen (Abb. 4.16). Auch bei höheren Ori-

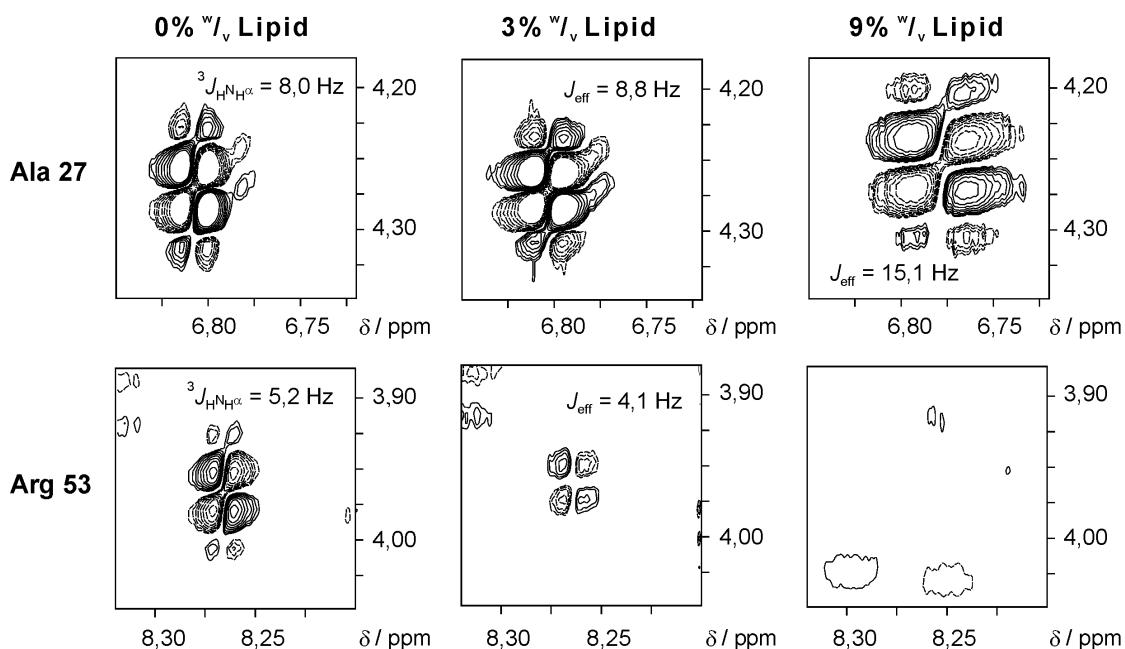


Abb. 4.16: Intraresiduale $\text{H}^\text{N}-\text{H}^\alpha$ -Kreuzsignale der Aminosäurereste Alanin 27 (oben) und Arginin 53 (unten) bei verschiedenen Konzentrationen des orientierenden Mediums und 600,13 MHz Protonenresonanzfrequenz. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen beruhen hauptsächlich auf dem Einfluss der magnetischen Suszeptibilität. Aufgrund von Wechselwirkungen des DSS mit dem DMPC/DHPC/CTAB-Medium ist dessen ^1H -Signal stark verbreitert, was die genaue Messung der chemischen Verschiebung erschwert. Um dies zu umgehen wurde DSS in einer verschlossenen Glaskapillare dem Probenröhrchen zugesetzt. Diese führt für alle Signale bei gegebener Konzentration an orientierendem Medium zu identischen Suszeptibilitäts-Verschiebungen. Diese könnten durch die Verwendung eines kugelförmigen Gefäßes für das DSS vermieden werden (HOMER, 1984). Die kugelförmigen DSS-Gefäße führten jedoch zu großen Linienverbreiterungen und wurden deshalb nicht verwendet (nach BRUNNER et al., 2000)

4. Ergebnisse

entierungsgraden treten diese Signale nicht wieder im Spektrum auf, obwohl bei stark negativer Restdipolkopplung der Betrag der effektiven Kopplung wieder zunimmt. Die Ursache hierfür ist, dass die Linienbreiten bei höheren Orientierungsgraden stark zunehmen, wie z.B. am Kreuzsignal des Alanin 27 (Abb. 4.16) zu erkennen ist. Die Hauptursache sind passive residuale dipolare Kopplungen zu räumlich benachbarten Kernen, die mit höheren Orientierungsgraden ebenfalls zunehmen. Anhand dieser charakteristischen Auslöschung der Signale können negative Restdipolkopplungen relativ leicht identifiziert werden. Die Messung von negativen Restdipolkopplungen wird jedoch durch den schnellen Intensitätsabfall der Signale erschwert bzw. meist ganz verhindert.

In den COSY-Spektren der anisotropen Proben treten auch durch reinen dipolaren Transfer vermittelte Kreuzsignale zwischen räumlich benachbarten Protonen auf (vgl. BRUNNER et al., 2000). Diese werden hier nicht weiter betrachtet, da das Vorzeichen dieser Kopplungen, aufgrund einer fehlenden Referenz wie der skalaren $^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplung, nicht bestimmt werden kann.

Bei einer Konzentration des orientierenden Mediums von 5 % konnten für 20 Reste des BPTI $D_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Restdipolkopplungen bestimmt werden (Abb. 4.17). Von den 58 Aminosäuren des BPTI sind vier Reste Proline, welche kein H^{N} besitzen, und sechs Glycine, da bei ihnen die Analyse der $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}$ -Kopplung durch die zwei H^{α} -Protonen kompliziert wird. Von den verbleibenden Aminosäuren konnte die $D_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Restdipolkopplung für 42 % der Reste bestimmt werden. Für weitere neun Reste konnte das Vorzeichen, wie oben beschrieben, aus der schnellen Abnahme der Signalintensität vorhergesagt werden. Diese Reste sind in Abb. 4.17

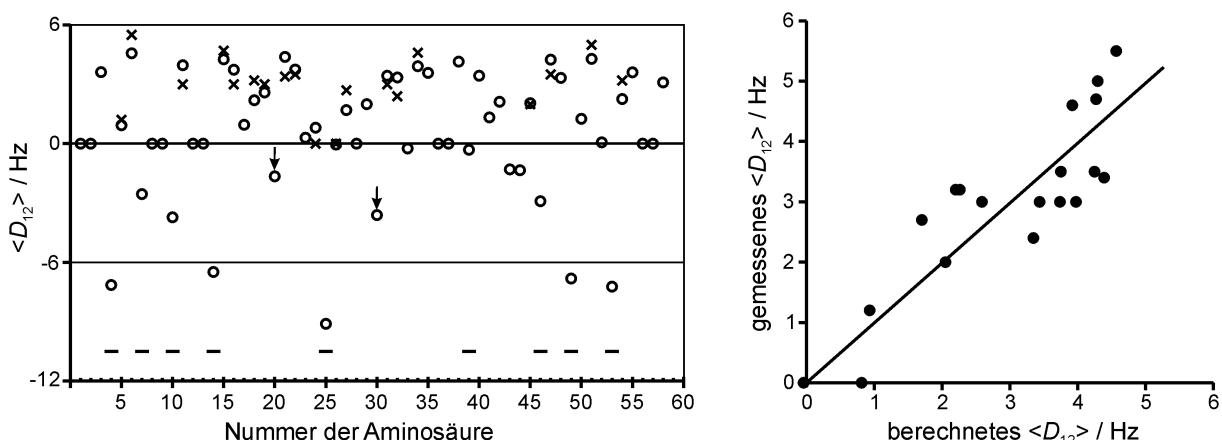


Abb. 4.17: Links: Vergleich zwischen gemessenen (x) und berechneten (o) $^3D_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Restdipolkopplungen des Proteins BPTI in 5 % W/v DMPC/DHPC/CTAB. Die Minuszeichen am unteren Rand der Abbildung zeigen Aminosäurereste an, für die, aufgrund der schnellen Abnahme der Intensität der Kreuzsignale, eine negative Restdipolkopplung vorhergesagt werden kann, aber keine Werte für die effektive Kopplung bestimmt werden können. Die Kreuzsignale der Aminosäurereste 20 und 30 (durch einen Pfeil gekennzeichnet) liegen unter dem Wasserartefakt und können deshalb nicht ausgewertet werden. Rechts: Korrelation zwischen den gemessenen und den berechneten $^3D_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Restdipolkopplungen (nach BRUNNER et al., 2000)

durch ein Minuszeichen gekennzeichnet. Mit dem Computerprogramm SVD wurde aus den gemessenen Kopplungen und einer Kristallstruktur des BPTI (PARKIN et al., 1996) der Orientierungstensor vorhergesagt. Mit diesem lassen sich die aus der Struktur erwarteten $D_{H^N H^\alpha}$ -Restdipolkopplungen berechnen (Abb. 4.17). Die gemessenen Kopplungen stimmen gut mit den berechneten Werten überein (Abb. 4.17, rechts). Die aus dem Signalabfall vorhergesagten negativen Restdipolkopplungen werden durch die aus dem Tensor und der Struktur berechneten Kopplungen ebenfalls bestätigt.

MOCCA-SIAM-Experiment

In Abb. 4.18 sind die *Inphase*- (DQF) und *Antiphase*-SIAM-Spektren (ZQF) des BPTI in einer anisotropen Lösung von 4 % ^{W/V} DMPC/DHPC/CHAPSO gezeigt. Die Spektren sind in der indirekten Dimension (δ_1) entkoppelt. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und die Auflösung des Spektrums ist für die meisten Signale sehr gut. Allerdings erkennt man, dass auch im ZQF-SIAM-Spektrum eine Auslöschung von Signalen mit einer großen negativen Restdipolkopplung, wie z.B. für Alanin 25 oder das Glutamat 29 (vgl. Abb. 4.17), auftritt. Im DQF-SIAM zeigen diese Signale keine sichtbare Aufspaltung durch die effektive Kopplung und besitzen eine geringe Linienbreite. Wie bei dem in anisotroper Lösung aufgenommenen COSY-Spektrum, treten im SIAM-Spektrum, mit der auf dipolaren Transfer optimierten MOCCA-Mischsequenz, durch reine dipolare Kopplung vermittelte Kreuzsignale auf. Beispiele hierfür sind die Kreuzsignale zwischen dem räumlich benachbarten H^α von Isoleucin 18 und dem H^N von Isoleucin 19 oder zwischen dem $H^{\beta 3}$ und dem H^N von Cystein 30. Ein weiteres spektroskopisches Phänomen ist das Auftreten eines dritten Signals in den Kreuzsignalen der Glycinreste mit einer Resonanzfrequenz, welche der gemittelten Resonanzfrequenz ihrer beiden H^α -Kerne entspricht. Die selektiven Entkopplungspulse in der Mitte der t_1 -Evolutionszeit, mit einer Dauer von insgesamt 9 ms, wirken für die beiden H^α eines Glycinrests wie eine bandselektive TOCSY-Mischsequenz (GLASER & QUANT, 1996). Somit wird in der Mitte der t_1 -Evolutionszeit Magnetisierung von $H^{\alpha 3}$ mit einer Resonanzfrequenz $\omega_3 = 2\pi\nu(H^{\alpha 3})$ auf $H^{\alpha 2}$ mit einer Resonanzfrequenz $\omega_2 = 2\pi\nu(H^{\alpha 2})$ transferiert und umgekehrt. Diese Magnetisierung erfährt während der t_1 -Evolutionszeit eine Entwicklung unter der gemittelten Resonanzfrequenz $\omega_{\text{mittel}} = (\omega_3 + \omega_2) / 2$. Eine genaue theoretische Betrachtung dieses Phänomens ist in MÖGLICH et al. (2002) gegeben.

In Abb. 4.19 ist für einen 1-dimensionalen Schnitt durch das Kreuzsignal von Isoleucin 18 das Verfahren nach Titman und Keeler zur Bestimmung der effektiven Kopplungskonstante demonstriert. Man sieht, dass der normierte RMSD in Abhängigkeit von J_{test} ein wohl

4. Ergebnisse

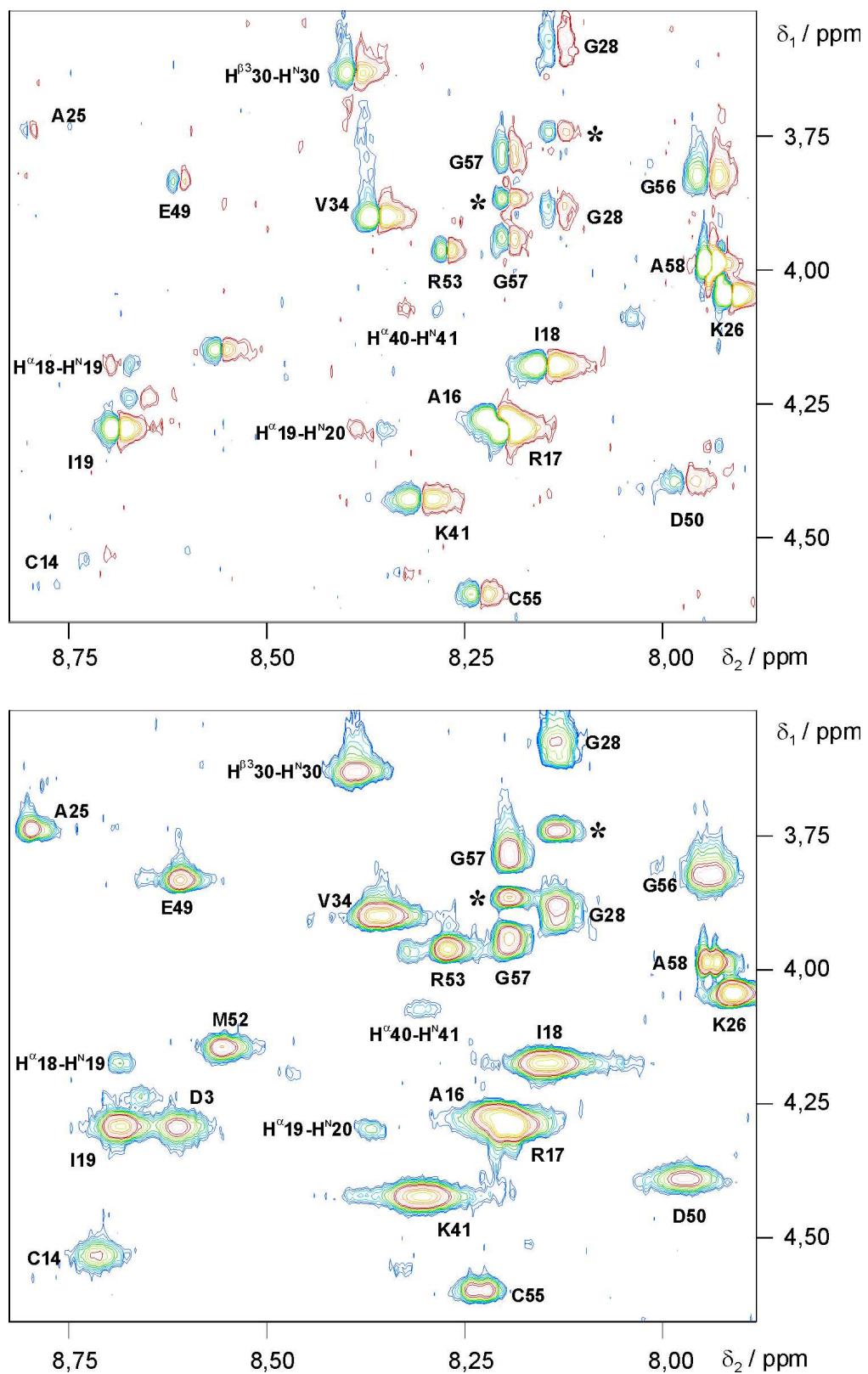


Abb. 4.18: Zugeordnetes ZQF-SIAM (oben) und DQF-SIAM (unten) von 2,0 mM BPTI in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2), 0,1 mM EDTA, $T = 305\text{ K}$ in 4% DMPC/DHPC/CTAB. Die Beschriftung der Signale gibt den Aminosäurerest im Einbuchstabencode und die Position in der Primärsequenz wieder. Es treten auch Kreuzsignale auf, die auf reinem dipolarem Transfer beruhen, wie z.B. zwischen dem H^α von Isoleucin 18 und dem H^N von Isoleucin 19. Bemerkenswert sind die mit Sternen markierten Signale der Glycinreste mit zwei nicht degenerierten H^α -Verschiebungen, mit deren gemittelter Resonanzfrequenz. Diese Signale entstehen durch einen TOCSY-Transfer, vermittelt durch die selektiven Entkopplungspulse in der Mitte der t_1 -Zeit, mit einer Dauer im Millisekundenbereich

4. Ergebnisse

definiertes Minimum aufweist. Dieses entspricht der effektiven Kopplungskonstante, welche zur Aufspaltung des Signals führt. Das Minimum kann durch eine Anpassung an ein Polynom zweiter Ordnung (s. Abb. 4.19) mit noch höherer Präzision bestimmt werden. Der Fehler für die Bestimmung einer einzelnen Kopplung mit diesem Verfahren beträgt weniger als $\pm 0,2$ Hz. Die mit diesem Verfahren bestimmten Kopplungskonstanten sind in Tab. 4.1 dargestellt. Die in isotroper Lösung gemessenen skalaren Kopplungen zeigen eine gute Übereinstimmung mit den von PARDI et al. (1984) veröffentlichten Werten. Ein Diagramm der mit dem SIAM-Experiment bestimmten skalaren Kopplungen als Funktion der von PARDI et al. bestimmten Kopplungen zeigt eine Steigung von eins mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,981 (MÖGLICH et al., 2002).

Zur Bestimmung des Orientierungstensors (s. 3.4.2) wurden nur die 19 Restdipolkopplungen von Aminosäureresten in Bereichen von kanonischen Sekundärstrukturelementen verwendet. Abb. 4.20 zeigt, dass die Korrelation zwischen den berechneten und den gemessenen Restdipolkopplungen von Resten in den Sekundärstrukturelementen gut ist. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,960. Der Qualitätsfaktor (Gl. [3.28]) ist 0,259, was ebenfalls zeigt, dass die gemessenen Restdipolkopplungen in guter Übereinstimmung mit der Struktur des BPTI sind. In Abb. 4.20 sind durch offene Kreise auch die Reste, welche außerhalb der Sekundärstrukturrelemente liegen, dargestellt. Es fällt auf, dass der Betrag der gemessenen Kopplung für diese

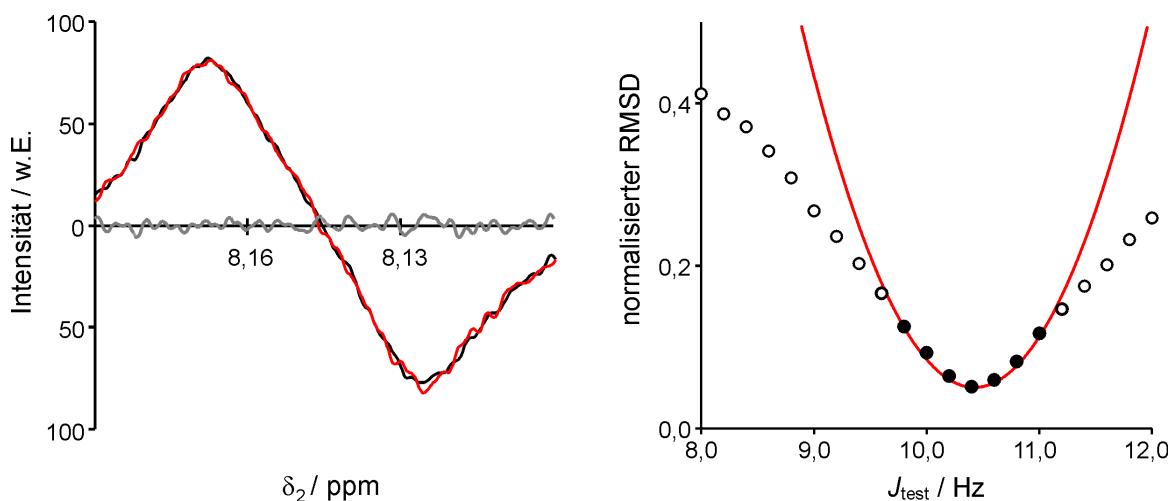


Abb. 4.19: Links: Demonstration des Titman-Keeler-Verfahrens am H^N - H^α -Kreuzsignal von Isoleucin 18 in anisotroper Lösung. Ein 1-dimensionaler Schnitt durch das *inphase* aufgespaltene Kreuzsignal des DQF-SIAM wurde mit einem mit $J_{\text{test}} = 10,4$ Hz *antiphase* aufgespaltenen Delta-dublett gefaltet (schwarz). Entsprechend wurde das *antiphase* aufgespaltene Signal des ZQF-SIAM mit einem mit identischem J_{test} aufgespaltenen *inphase* Dublett gefaltet (rot). Die Differenz der beiden ist in Grau gezeigt. Die Intensität der Signale ist in willkürlichen Einheiten (w.E.) angegeben. Rechts: Normalisierter RMSD zwischen den gefalteten Schnitten des *Inphase*- und des *Antiphase*-Signals in Abhängigkeit von J_{test} (Kreise). Die rote Linie zeigt die Anpassung der Werte nahe des Minimums (gefüllte Kreise) an ein Polynom zweiter Ordnung $Y = aX^2 + bX + c$ ($a = 0,189$, $b = -3,935$ und $c = 20,526$). Ein klar definiertes Minimum ist bei 10,4 Hz zu erkennen (nach MÖGLICH et al., 2002)

4. Ergebnisse

Tab. 4.1: Kopplungskonstanten des Proteins BPTI, bestimmt in isotroper (iso) und anisotroper (aniso) Lösung, sowie die gemessenen und aus dem Tensor berechneten (ber.) Restdipolkopplungskonstanten. Es sind nur die Reste angegeben, für welche die Kopplungskonstante in isotroper Lösung bestimmt werden konnte. Zum Vergleich sind in der zweiten Spalte die von PARDI et al. (1984) bestimmten Kopplungskonstanten angegeben. Die letzte Spalte zeigt an, ob ein Rest in einem kanonischen Sekundärstrukturelement liegt oder nicht (nach MÖGLICH et al., 2002)

Rest	$J_{\text{Pardi}} / \text{Hz}$	$J_{\text{iso}} / \text{Hz}$	$J_{\text{aniso}} / \text{Hz}$	$\langle D_{12} \rangle / \text{Hz}$	ber. $\langle D_{12} \rangle / \text{Hz}$	sek. Strukt.
Asp 3	3,8	3,5	—	—	—	nein
Cys 5	4,9	4,8	5,3	0,5	0,8	ja
Leu 6	8,1	8,4	9,6	1,2	1,3	ja
Tyr 10	10,1	9,8	8,3	-1,5	-0,2	nein
Lys 15	8,7	8,7	9,4	0,7	0,9	nein
Ala 16	7,4	8,0	8,5	0,5	1,9	nein
Arg 17	9,3	9,4	8,6	-0,8	-0,7	nein
Ile 18	9,2	8,8	10,4	1,6	1,4	ja
Ile 19	6,9	6,8	6,4	-0,4	-0,2	ja
Tyr 21	10,2	9,7	10,2	0,5	0,3	ja
Phe 22	9,1	9,0	10,6	1,6	1,8	ja
Tyr 23	6,7	7,3	7,2	-0,1	0,1	ja
Asn 24	8,7	9,4	10,4	1,0	1,1	ja
Ala 25	3,9	3,2	—	—	—	nein
Lys 26	6,1	6,2	4,8	-1,4	-1,9	nein
Ala 27	7,8	8,0	8,6	0,6	0,8	nein
Leu 29	7,0	7,5	8,8	1,3	1,0	ja
Cys 30	9,1	8,9	8,2	-0,7	-0,3	ja
Gln 31	10,2	9,5	—	—	—	ja
Thr 32	8,1	8,0	8,5	0,5	0,6	ja
Phe 33	7,1	7,4	7,1	-0,3	0,3	ja
Val 34	8,8	8,4	8,4	0,0	0,3	ja
Arg 39	6,9	7,2	7,1	-0,1	0,3	nein
Lys 41	10,2	10,2	10,2	0,0	0,7	nein
Asn 43	7,4	7,6	7,9	0,3	0,4	nein
Asn 44	7,9	7,8	7,3	-0,5	-0,3	nein
Phe 45	10,0	10,2	11,0	0,8	0,6	ja
Lys 46	6,1	5,8	5,7	-0,1	-1,1	nein
Ser 47	8,3	8,2	10,0	1,8	1,8	ja
Glu 49	4,3	3,6	—	—	—	ja
Asp 50	4,9	4,4	4,8	0,4	0,6	ja
Met 52	5,2	4,4	—	—	—	ja
Arg 53	4,1	4,2	—	—	—	ja
Thr 54	6,5	6,6	7,7	1,1	1,0	ja
Cys 55	9,4	9,2	10,1	0,9	1,0	ja
Ala 58	5,7	6,2	6,8	0,6	— ¹	nein

¹ Die Kristallstruktur enthält für diesen Rest aufgrund einer fehlenden Elektronendichte keine Koordinaten

Reste meistens kleiner ist als die der berechneten. Diese Reste in den flexibleren Bereichen des Proteins besitzen einen kleineren Ordnungsparameter S (s. 3.4.1) als die Reste in den Sekundärstrukturelementen. Wie leicht in Gl. [3.6] zu erkennen ist, wird die effektive Kopplung durch den Ordnungsparameter betragsmäßig verkleinert.

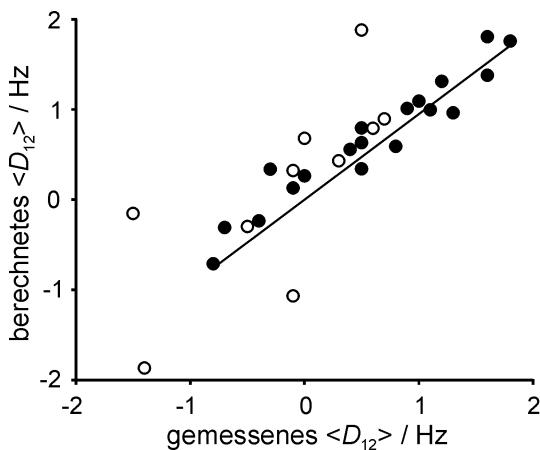


Abb. 4.20: Korrelation zwischen den gemessenen und den berechneten ${}^3D_{\text{H}\text{N}\text{H}\alpha}$ -Restdipolkoppungen. Zur Berechnung des Orientierungstensors und des Korrelationskoeffizienten wurden nur Kopplungen von Aminosäureresten in den Sekundärstrukturelementen mit einem Ordnungsparameter S nahe eins verwendet (gefüllte Kreise). Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,960. Kopplungen von Aminosäureresten in den flexibleren Schleifen sind als offene Kreise dargestellt (nach MÖGLICH et al., 2002)

Die Lage des Orientierungstensors ist in Abb. 4.21 gezeigt. Für den Orientierungsgrad des Tensors erhält man $S_{ZZ} = 3,1 \cdot 10^{-4}$ und den Asymmetrieparameter $\eta = 0,42$. Die Z-Achse des Hauptachsensystems des Orientierungstensors ist nahezu parallel zur Längsachse des Moleküls. Die Lage dieser Achse stimmt gut mit der Z-Achse des mit dem Computerprogramm Pales bestimmten Diffusionstensors des BPTIs überein. Dies ist durch die von ALBA et al. (1999) gemachte Beobachtung zu erklären, dass die Orientierung eines Proteins im DMPC/DHPC-Medium hauptsächlich durch sterische Wechselwirkungen zustande kommt.

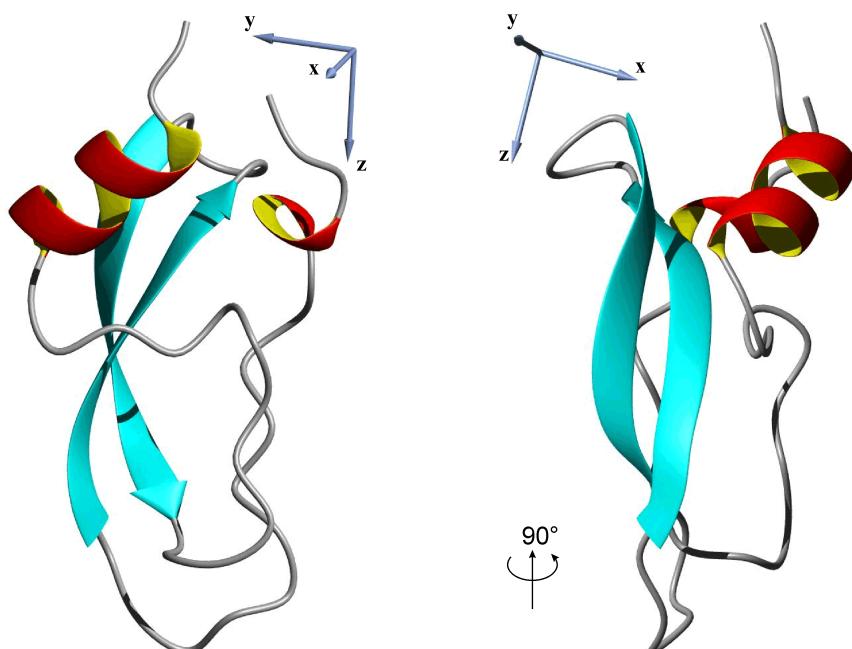


Abb. 4.21: Darstellung des Proteinrückgrats von BPTI, sowie die Lage des aus den Kopplungen und der Struktur bestimmten Hauptachsensystems des Orientierungstensors. Die rechte Struktur ist gegenüber der linken um 90° gedreht (aus MÖGLICH, 2001)

4.2.3 Von der Magnetfeldstärke abhängige Effekte: Ergebnisse der Messungen am Protein HPr

GÖRLER und BRUNNER (pers. Mitteilung) fanden für die skalare $^3J_{\text{H}\text{N}\text{H}^\alpha}$ -Kopplung bei 800,13 MHz Protonenresonanzfrequenz im COSY-Experiment für einen Großteil der Reste größere Werte als bei 500,13 MHz Protonenresonanzfrequenz (s. Abb. 4.22 und Tab. 4.2). Die größte Zunahme der skalaren Kopplung um bis zu 1,5 Hz sind für Aminosäuren in den drei α -Helices von Rest 17 bis 29, 48 bis 53 und 72 bis 86 zu beobachten. In den 4 β -Faltblättern (Reste 2–8, 32–37, 40–43 und 59–66) sind die maximalen Effekte kleiner 0,5 Hz. Die Lage der Sekundärstrukturelemente ist der Arbeit von KALBITZER et al. (2000) entnommen.

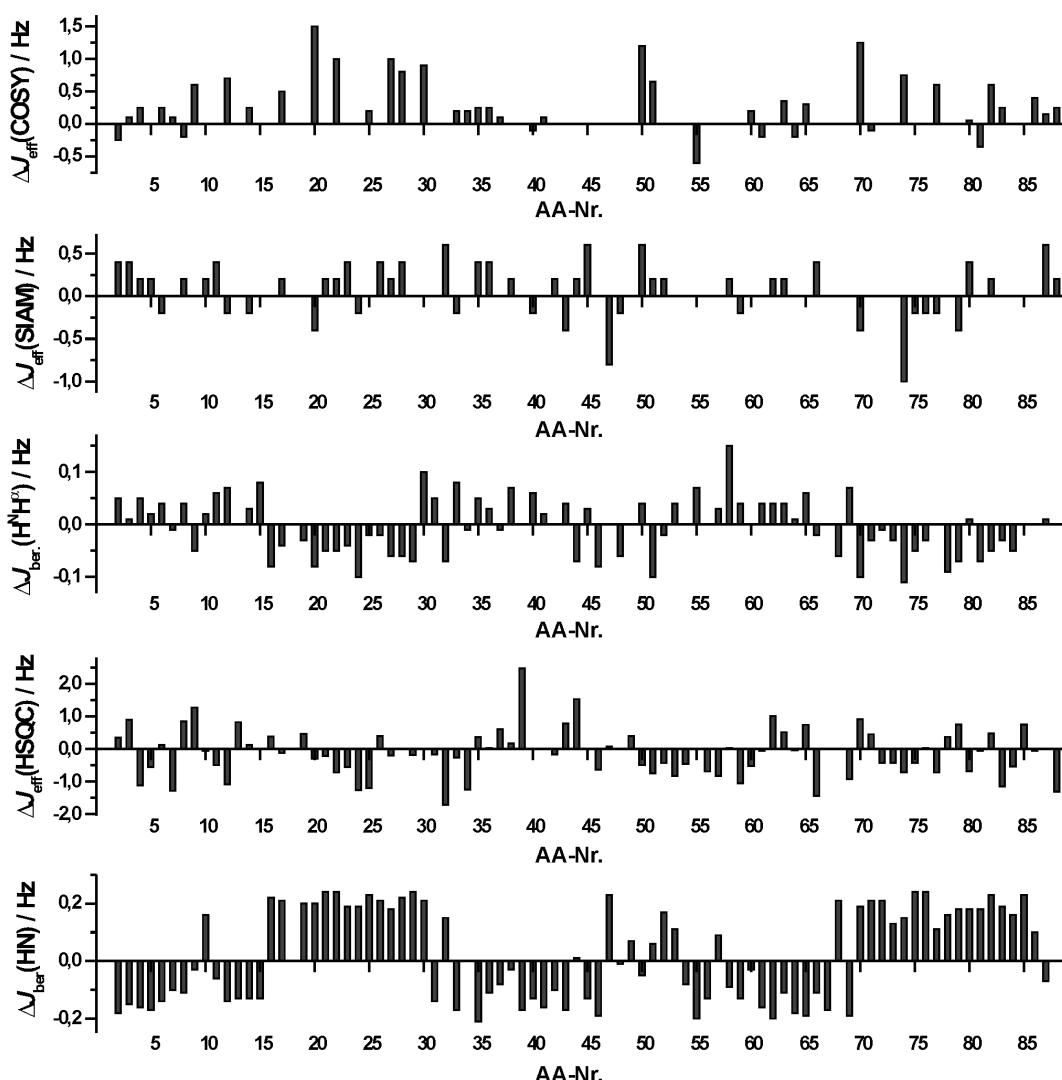


Abb. 4.22: Abhängigkeit der $^3J_{\text{H}\text{N}\text{H}^\alpha}$ - und $^1J_{\text{H}\text{N}}$ -Kopplungen des HPr von der Magnetfeldstärke. Aufgetragen ist die Differenz der Kopplungen (ΔJ_{eff}) bei 800,13 und 500,13 MHz Protonenresonanzfrequenz in Abhängigkeit der Sequenz des HPr: $\Delta J_{\text{eff}}(\text{COSY})$, $\Delta J_{\text{eff}}(\text{SIAM})$: Differenz der $^3J_{\text{H}\text{N}\text{H}^\alpha}$ -Kopplungen, gemessen mit dem COSY- bzw. MOCCA-SIAM-Experiment; $\Delta J_{\text{ber}}(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^\alpha)$, $\Delta J_{\text{ber}}(\text{H}\text{N})$: Für die beiden Magnetfeldstärken (800 bzw. 500 MHz ^1H -Resonanzfrequenz) aus dem in 4.2.1 bestimmten magnetischen Suszeptibilitätstensor berechnete $D_{\text{H}\text{N}\text{H}^\alpha}$ - bzw. $D_{\text{H}\text{N}}$ -Restdipolkopplung. $\Delta J_{\text{eff}}(\text{HSQC})$: Differenz der $^3J_{\text{H}\text{N}\text{H}^\alpha}$ -Kopplungen, gemessen mit J -modulierten HSQC-Experimenten

4. Ergebnisse

Tab. 4.2: $^3J_{\text{H}\text{N}\alpha}$ -Kopplungen des HPr bei 500,13 und 800,13 MHz Protonenresonanzfrequenz, sowie die aus dem in 4.2.1 bestimmten magnetischen Suszeptibilitätstensor für diese Resonanzfrequenzen zu erwartenden $D_{\text{H}\text{N}\alpha}$ -Restdipolkopplungen. $^3J_{\text{H}\text{N}\alpha}$ (SIAM): mit dem MOCCA-SIAM-Experiment gemessen. $^3J_{\text{H}\text{N}\alpha}$ (COSY): mit dem COSY-Experiment gemessen (BRUNNER, pers. Mitteilung). Es sind nur Reste aufgeführt, für die mindestens im SIAM- oder im COSY-Experiment bei beiden Magnetfeldstärken die Kopplungskonstante bestimmt werden konnte

Rest	$^3J_{\text{H}\text{N}\alpha}$ (SIAM)/Hz		$^3J_{\text{H}\text{N}\alpha}$ (COSY)/Hz		$D_{\text{H}\text{N}\alpha}$ /Hz	Rest	$^3J_{\text{H}\text{N}\alpha}$ (SIAM)/Hz		$^3J_{\text{H}\text{N}\alpha}$ (COSY)/Hz		$D_{\text{H}\text{N}\alpha}$ /Hz
	500 MHz	800 MHz	500 MHz	800 MHz			500 MHz	800 MHz	500 MHz	800 MHz	
Glu 2	9,2	9,6	9,7	9,4	0,05	Lys 45	7,6	8,2	—	—	0,03
Gln 3	8,2	8,6	8,8	8,9	0,01	Ile 47	4,0	3,2	—	—	0,00
Gln 4	7,4	7,6	7,8	8,0	0,05	Met 48	4,2	4,0	—	—	-0,06
Ser 5	9,4	9,6	9,9	9,9	0,02	Val 50	3,4	4,0	5,1	6,3	0,04
Tyr 6	9,8	9,6	9,6	9,9	0,04	Met 51	4,8	5,0	6,0	6,6	-0,10
Thr 7	9,8	9,8	9,9	10,0	-0,01	Ser 52	4,8	5,0	—	—	-0,02
Ile 8	7,2	7,4	7,9	7,7	0,04	Leu 53	6,0	6,0	6,6	6,6	0,04
Ile 9	9,6	9,6	9,7	10,3	-0,05	Val 55	—	—	6,1	5,5	0,07
Asp 10	5,8	6,0	—	—	0,02	Asp 58	6,8	7,0	—	—	0,15
Glu 11	4,0	4,4	—	—	0,06	Ala 59	5,4	5,2	—	—	0,04
Thr 12	9,0	8,8	9,7	10,4	0,07	Glu 60	9,0	9,0	9,4	9,6	0,00
Ile 14	9,2	9,0	9,6	9,8	0,03	Ile 61	9,8	9,8	10,5	10,3	0,04
Arg 17	7,8	8,0	8,0	8,5	-0,04	Thr 62	9,2	9,4	—	—	0,04
Thr 20	3,8	3,4	4,5	6,0	-0,08	Ile 63	9,6	9,8	10,0	10,4	0,04
Met 21	5,2	5,4	—	—	-0,05	Tyr 64	—	—	9,7	9,5	0,01
Leu 22	4,0	4,2	5,1	6,1	-0,05	Ala 65	9,2	9,2	9,4	9,7	0,06
Val 23	4,8	5,2	—	—	-0,04	Asp 66	9,4	9,8	—	—	-0,02
Gln 24	4,2	4,0	—	—	-0,10	Asp 69	10,0	10,0	—	—	0,07
Thr 25	5,4	5,4	6,2	6,4	-0,02	Glu 70	4,4	4,0	2,8	4,0	-0,10
Ala 26	3,6	4,0	—	—	-0,02	Ala 71	5,0	5,0	6,3	6,2	-0,03
Ser 27	3,6	3,8	3,0	4,0	-0,06	Asp 72	5,8	5,8	—	—	-0,01
Lys 28	6,4	6,8	6,2	7,0	-0,06	Ile 74	4,6	3,6	5,0	5,8	-0,11
Phe 29	9,2	9,2	9,3	9,3	-0,07	Gln 75	4,2	4,0	—	—	-0,05
Asp 32	7,8	8,4	—	—	-0,07	Ala 76	4,6	4,4	—	—	-0,03
Ile 33	9,6	9,4	10,1	10,3	0,08	Ile 77	5,2	5,0	6,0	6,6	0,00
Gln 34	10,0	10,0	10,3	10,5	-0,01	Thr 78	4,4	4,4	—	—	-0,09
Leu 35	9,2	9,6	9,9	10,1	0,05	Asp 79	4,4	4,0	—	—	-0,07
Glu 36	9,0	9,4	9,8	10,0	0,03	Val 80	4,8	5,2	6,3	6,3	0,01
Tyr 37	—	—	9,3	9,4	-0,01	Leu 81	—	—	5,0	4,7	-0,07
Asn 38	6,8	7,0	—	—	0,07	Ser 82	5,8	6,0	6,4	7,0	-0,05
Lys 40	9,6	9,4	9,5	9,4	0,06	Lys 83	3,6	3,6	5,0	5,3	-0,03
Lys 41	9,4	9,4	9,6	9,7	0,02	Glu 84	7,4	7,4	7,6	7,6	-0,05
Val 42	9,6	9,8	—	—	0,00	Leu 86	—	—	4,8	5,2	0,00
Asn 43	5,8	5,4	—	—	0,04	Thr 87	9,2	9,8	9,9	10,0	0,01
Leu 44	5,2	5,4	—	—	-0,07	Glu 88	6,4	6,6	6,4	6,6	—

Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die $^3J_{\text{H}\text{N}\alpha}$ -Kopplung bei 500,13 und 800,13 MHz Protonenresonanzfrequenz mit dem MOCCA-SIAM-Experiment unter Verwendung des sehr genauen Titman-Keeler-Verfahrens bestimmt (vgl. 4.2.2 und 5.2.1). Es fällt auf, dass die Unterschiede der Kopplungen bei beiden Feldstärken in der Regel

kleiner als 0,5 Hz sind und sowohl negativ als auch positiv sind. Göße Effekte von -0,8 bzw. -1,0 Hz sind nur für die beiden Isoleucinreste 47 und 74 beobachtbar. Die meisten Effekte sind also kleiner als der Fehler zur Bestimmung der Kopplungen. Der maximale Fehler der Differenz der Kopplungen ist $\pm 0,4$ Hz, die Summe der Fehler der beiden einzelnen Messungen. Bemerkenswert ist, dass, bei 500,13 MHz ^1H -Resonanzfrequenz, die aus den SIAM-Spektren mit dem Titman-Keeler-Verfahren extrahierten Kopplungskonstanten um bis zu 0,8 Hz kleiner sind als die aus dem COSY-Spektrum ermittelten.

Die Bestimmung der Kopplungskonstante als Abstand der beiden Signalmaxima ist oft fehlerhaft, da die Signalaufspaltung eine Funktion von Kopplung und Linienbreite ist (NEUHAUS et al., 1985). Aus diesem Grund wurden im COSY-Experiment die Kopplungen durch Anpassung der Signale an zwei überlagerte Lorentzfunktionen bestimmt. Dieses Verfahren kann, wie in Abb. 4.23 an Schnitten durch das *Inphase*- und das *Antiphase*-Signal des Threoninrestes 20 des SIAM-Spektrums demonstriert wird, zu falschen Werten führen. Aus dem *Inphase*-

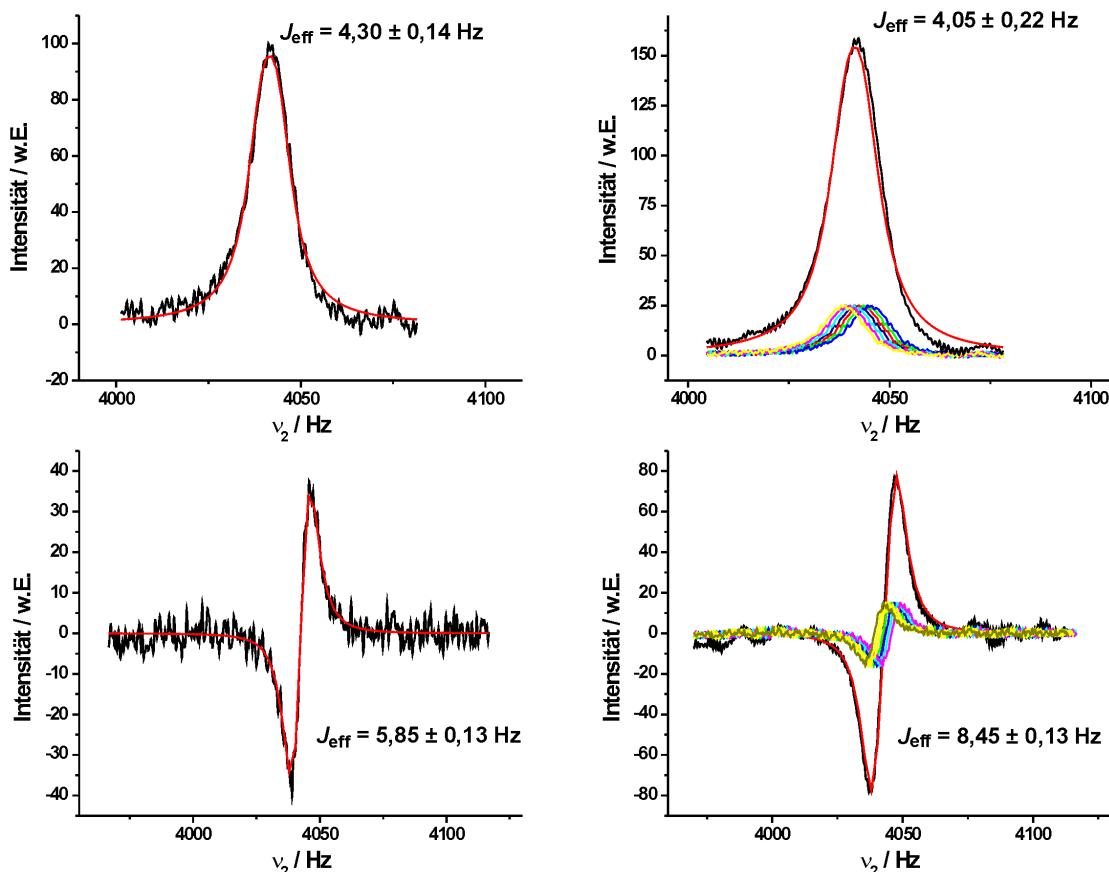


Abb. 4.23: Links: 1-dimensionaler Schnitt durch das Kreuzsignal des Threoninrestes 20 (schwarz) im DQF- (oben) und ZQF-SIAM-Experiment (unten), sowie eine Anpassung der Linienform an zwei überlagerte Lorentzfunktionen (rot). Rechts: Simulation von Feldinhomogenitäten bzw. Mikroheterogenitäten der chemischen Umgebung: Die links gezeigten Schnitte durch das Kreuzsignal von Threonin 20 wurden in Schritten von 1 Hz um ± 3 Hz verschoben (kleine farbige Signale) und dann aufaddiert. Die roten Kurven zeigen die Anpassung des aus der Addition resultierenden Signals (schwarz) an zwei überlagerte Lorentzfunktionen. Die aus der Anpassung der Kurven erhaltenen $^3J_{\text{HNHO}}$ -Kopplungen, sowie deren Fehler, sind in den Diagrammen angegeben

4. Ergebnisse

Signal bestimmt man eine Kopplung von 4,3 Hz, aus dem *Antiphase*-Signal eine Kopplung von 5,85 Hz, wenn man die Linienbreite des *Inphase*-Signals verwendet und während der Anpassung konstant hält, und einen Wert von 4,6 Hz, wenn man die Linienbreite während der Anpassung als freien Parameter verwendet. Aus dem Titman-Keeler-Verfahren ermittelt man einen Wert von 3,8 Hz für den Threoninrest 20. Aus dem *Antiphase*-Signal des Threoninrestes 20 bei 800,13 MHz ^1H -Resonanzfrequenz erhält man eine Kopplung von 6,15 Hz.

Eine Linienverbreiterung, wie sie zum Beispiel durch Inhomogenitäten des Magnetfeldes über den Bereich der NMR-Probe von hier ± 3 Hz oder durch einen Austausch zwischen mehreren Konformationen auftreten kann, verstärkt diese Unterschiede noch. Sie führt beim *Inphase*-Signal zu einer Verkleinerung der ermittelten Kopplung um 0,2 Hz und für das *Antiphase*-Signal zu einer Vergrößerung um 2,6 Hz gegenüber den nicht verbreiterten Signalen.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Kopplungskonstanten könnte die Orientierung des HPr-Moleküls im Magnetfeld sein. Um dies zu überprüfen wurde mit dem in 4.2.1 vorhergesagten Orientierungstensor die zu erwartenden $D_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ - und D_{NH} -Restdipolkopplungen bei einer Zunahme der ^1H -Resonanzfrequenz von 500,13 auf 800,13 MHz berechnet (s. Abb. 4.22). Die zu erwartenden Effekte betragen maximal $\pm 0,15$ Hz für $D_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ und $\pm 0,25$ Hz für D_{NH} .

Die $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplungen wurden aus den Signalintensitäten von J -modulierten HSQC-Spektren (s. 3.4.3) bestimmt. Die daraus ermittelten Restdipolkopplungen sind in Abb. 4.22 gezeigt. Die Anpassung der Signalintensitäten an Gl. [3.29] ist für den Threoninrest 20 in Abb. 4.24 demonstriert. Wie leicht zu erkennen ist, zeigen die Datenpunkte eine gute Übereinstimmung mit der Funktion aus Gl. [2.29], allerdings ist der Fehler mit $\pm 0,2$ Hz deutlich größer als der von TJANDRA et al. (1996) für dieses Verfahren angegebene Fehler von $\pm 0,02$ Hz.

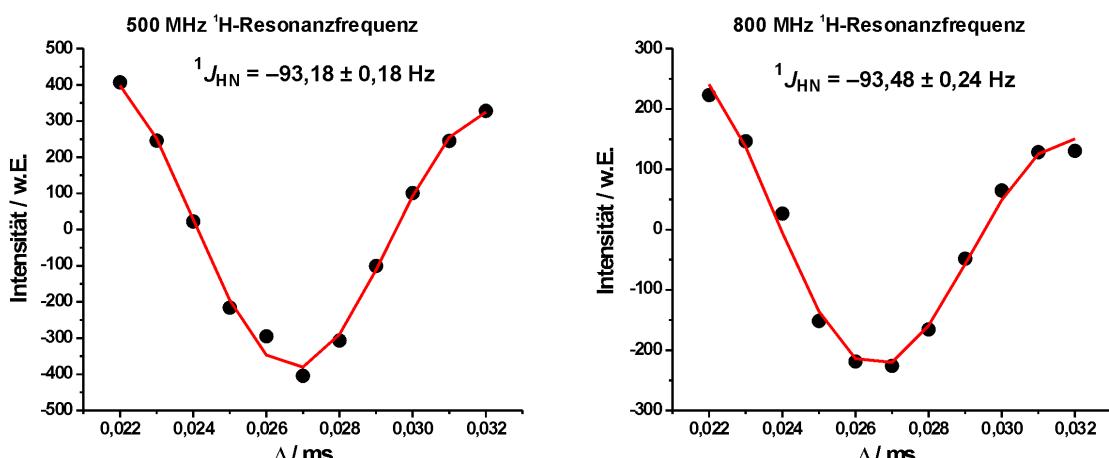


Abb. 4.24: Intensitäten (in willkürlichen Einheiten; w.E.) der Kreuzsignale des Threoninrestes 20 in den J -modulierten HSQC-Experimenten bei 500,13 (links) und 800,13 MHz ^1H -Resonanzfrequenz (rechts) in Abhängigkeit der Länge des Zeitintervalls Δ . Die roten Kurven zeigen die Anpassung der Daten an Gl. [3.29]. Die daraus erhaltenen $^1J_{\text{HN}}$ -Kopplungen und Fehler sind in den Diagrammen angegeben

5 Diskussion

5.1 Die PSCD4-Domäne des Zellwandproteins Pleuralin-1

5.1.1 Die NMR-Struktur der PSCD4-Domäne

Primärstruktur und Homologe der PSCD4-Domäne

Die PSCD4-Domäne besitzt eine sehr ungewöhnliche Sequenz, mit einem hohen Anteil der Aminosäurereste Prolin, Serin, Cystein und Aspartat. Eine Datenbanksuche mit dem Algorithmus FASTA (s. 4.1.1) zeigt, dass keine den PSCD-Domänen homologe Proteine beschrieben sind. Eine Homologie-Suche, die nur auf einem Vergleich der Sequenzen beruht, ist normalerweise nicht geeignet funktionelle bzw. strukturelle Homologe mit geringer Sequenzhomologie zu entdecken (HOBOHM & SANDER, 1995). Allerdings lieferte auch eine Datenbanksuche mit dem Ansatz PropSearch (HOBOHM & SANDER, 1995; <http://www.infobiosud.univ-montp1.fr/SERVEUR/PROPSEARCH/propsearch.html>) keine funktionellen Homologen der PSCD-Domänen. PropSearch beruht auf dem Vergleich von über 100 verschiedenen aus der Sequenz ableitbaren Eigenschaften wie Aminosäurezusammensetzung, Anteil der aromatischen Aminosäuren und dem isoelektrischen Punkt. Die Ergebnisse der beiden Datenbanksuchen weisen darauf hin, dass die PSCD4-Domäne keine Homologen in den gängigen Datenbanken besitzt, so dass man davon ausgehen kann, dass sie einen neuen Faltungstyp besitzt.

Sekundärstruktur der PSCD4-Domäne

Die Analyse der chemischen Verschiebungen mit den Computerprogrammen CSI und TALOS sowie die Abweichungen von den *Random-Coil*-Werten (s. 4.1.1) ergab, dass die PSCD4-Domäne keine kanonischen Sekundärstrukturelemente aufweist. Möglicherweise versagen diese, auf statistischen Ansätzen beruhenden Methoden zur Vorhersage der Sekundärstruktur, bei der ungewöhnlichen Primärstruktur der PSCD4-Domäne, da der Statistik zugrunde liegenden Satz an Proteine keine Homologen der PSCD4-Domäne enthält.

Allerdings liefert auch die Auswertung der NOESY-Spektren keine für die kanonischen Sekundärstrukturelemente typischen *NOE*-Kontakte (WÜTHRICH, 1986). Die Analyse der Tertiärstruktur der PSCD4-Domäne mit dem Kabsch-Sanders-Algorithmus führte zu keiner Identifizierung von Sekundärstrukturelementen.

Aufgrund der Tatsache, dass die PSCD4-Domäne keine Sekundärstrukturelemente ausbildet ist sie nach der hierarchischen Klassifikation der Strukturen von Proteindomänen CATH (ORENGO et al., 1997) in die Klasse 4 mit wenig Sekundärstrukturelementen einzuordnen.

Strukturbestimmung der PSCD4-Domäne

Das Fehlen von homologen Proteinen bedeutet für die Strukturaufklärung, besonders in der Anfangsphase, dass man auch keine Modellstruktur besitzt, welche die Zuordnung der NOESY-Spektren, z.B. durch Rückrechnung der Spektren, erleichtern könnte.

Ein wesentliches Problem bei der Strukturbestimmung der PSCD4-Domäne war die Tatsache, dass wenige Aminosäuretypen einen hohen Anteil der Gesamtsequenz ausmachen. Dies führte zu vielen Überlagerungen in den Spektren und zu vielen Mehrdeutigkeiten bei der Zuordnung der NOE-Kontakte. Dies und die Tatsache, dass insgesamt nur wenige NOE-Kontakte pro Aminosäurereste in den NOESY-Spektren zu sehen waren, verhinderten die Bestimmung der Position der fünf Disulfidbrücken mittels NMR-spektroskopischer Methoden.

Die Ausbildung von fünf Disulfidbrücken wurde über die chemischen Verschiebungen nachgewiesen. Drei der fünf Disulfidbrücken konnten mittels proteolytischem Verdau der PSCD-Domäne und Edman-Abbau lokalisiert werden. Für die beiden restlichen war dies nicht möglich, da keine der bekannten Proteasen zwischen zwei direkt benachbarten oxidierten Cysteinen das Proteinrückgrat spaltet. Deshalb wurden diese Positionen anhand der besseren Konvergenz der Strukturrechnung bestimmt (s. 4.1.4). Allerdings besitzen die berechneten Strukturen mit der Verbrückung 36–72/49–71 etwas geringere Energien als die mit der Verbrückung 36–71/49–72. Wie in 4.1.4 gezeigt, kann mittels NOE-Kontakten, aufgrund ihrer Mehrdeutigkeiten bzw. ihres Fehlens, nicht zwischen den beiden Verbrückungen unterschieden werden. Eine Möglichkeit die getroffene Entscheidung weiter zu belegen, wäre der direkte Nachweis von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carbonylgruppe von Cystein 71 und den Aminogruppen von Aspartat 48 und Cystein 49. Die 10 energieärmsten Strukturen mit der Verbrückung 36–71/49–72 weisen zwischen dem O-Atom von Rest 48 bzw. 49 und dem H^N von Rest 71 einen mittleren Abstand von $0,173 \pm 0,025$ nm bzw. $0,213 \pm 0,053$ nm auf. Die Strukturen mit der Verbrückung 36–72/49–71 weisen hingegen Abstände größer 0,5 nm auf. Mit dem bei 600,13 MHz Protonenresonanzfrequenz aufgenommenen HNCO-Spektrums (s. 4.1.2) war die Identifizierung dieser Wasserstoffbrückenbindungen aufgrund der schlechten Spektrenqualität nicht möglich. Allerdings sollte dieser Nachweis durch Messung eines HNCO-Experiments bei 800 MHz ¹H-Resonanzfrequenz mit dem seit kurzem verfügbaren Cryo-Probenkopf möglich sein. Durch die Kühlung der elektronischen Bauteile des Cryo-

5. Diskussion

Probenkopfes und des Vorverstärkers wird das elektronische Rauschen unterdrückt, so dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis um einen Faktor 3 bis 4 größer ist.

Die Tatsache, dass man für alle Reste außer denen des C-Terminus nur einen Satz von Signalen im Spektrum identifizieren kann, zeigt, dass die Verknüpfung der Disulfidbrücken der in *E. coli* exprimierten PSCD4-Domäne einheitlich ausgebildet ist. Dies ist ein guter Hinweis, dass dies die energetisch günstigste Konformation ist, die vermutlich der nativen Konformation innerhalb des Pleuralin-1 entspricht. Derzeit wird in der Arbeitsgruppe von Herrn Sumper natives Pleuralin-1 aufgereinigt, um durch proteolytischen Verdau und anschließenden Edman-Abbau den Nachweis, dass die Verbrückung der PSCD4-Domäne der nativen Disulfidverbrückung entspricht, zu führen.

Die Verwendung von Restdipolkopplungen als Einschränkungen in der Strukturrechnung mit CNS war nur mit einer geringen Gewichtung möglich. Bei starker Gewichtung stieg sowohl die Energie als auch der RMSD der Strukturen an. Dies zeigt, dass die Restdipolkopplungen teilweise den anderen verwendeten Einschränkungen wie den NOE-Kontakten widersprachen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Struktur der PSCD-Domäne aus vielen Schleifen besteht und relativ flexibel ist. Aufgrund der Flexibilität können die gemessenen Restdipolkopplungen durch den Ordnungsparameter S betragsmäßig verkleinert werden. Die Verwendung dieser verkleinerten Restdipolkopplungen in der Strukturrechnung führt zu einer falschen Lage der HN-Kernverbindungsvektoren und somit zu starken Änderungen im Proteinrückgrat, was wiederum zu Verletzungen der Abstandsinformationen aus den NOESY-Spektren führt.

Tertiärstruktur der PSCD4-Domäne

Die Tertiärstruktur der PSCD4-Domäne besteht aus einem wohl strukturierten Kernbereich und flexibleren wenig strukturierten Termini. Der Kernbereich wird von mehreren Schleifen gebildet, die durch Disulfidbrücken stabilisiert sind. Die aus dem Ramachandran-Diagramm bestimmte Auflösung beträgt 0,4 nm, da nur 22 % der Φ/Ψ -Winkelpaare im bevorzugten Bereich liegen. Dies erklärt auch die relativ hohen Energien der Strukturen. Auffällig ist, dass auch die Φ/Ψ -Winkelpaare einiger Reste aus dem Bereich der Termini, für die keine NOE-Kontakte als Einschränkungen in der Strukturrechnung verwendet wurden, in den großzügig und nicht erlaubten Bereichen des Ramachandran-Diagramms liegen. Dies legt den Schluss nahe, dass die Energieminimierung während der Strukturrechnung mit CNS nicht ausreichend war. Um dies zu überprüfen wurde die energieärmste Struktur in einem zusätzlichen Schritt mit CNS weiter energieminiert. Dies führte nur zu einer geringfügigen Abnahme der Energie um maximal 10 %, allerdings nicht zu wesentlichen Verbesserungen des Ramachandran-

diagramms. Eine weitere Möglichkeit der Energieminimierung wäre die sehr Rechenzeit aufwendige Minimierung der Domäne in einer Wasserbox.

Die Auflösung von 0,4 nm lässt sich sicher teilweise durch die geringe Anzahl an experimentellen Einschränkungen für die Strukturrechnung erklären. Allerdings zeigen die NOESY-Spektren aber auch nur eine begrenzte Anzahl von *NOE*-Signalen für die Reste im Kernbereich der PSCD4-Domäne und nur intraresiduale *NOE*-Signale für die Reste in den beiden Termini. Aufgrund des hohen Anteils weniger Aminosäuren an der Primärstruktur des PSCD waren einige dieser *NOE*-Kontakte wegen Überlagerungen oder Mehrdeutigkeiten der chemischen Verschiebungen nicht zuzuordnen. Die geringe Zahl an *NOE*-Signalen ist ein Indiz dafür, dass die gesamte Struktur sehr locker und relativ flexibel ist. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Relaxationsuntersuchungen, die besonders die große Dynamik der beiden Termini zeigen.

Einteilung der Struktur der PSCD4-Domäne in eine Proteinfamilie

Wie die Analyse der Sekundärstruktur gezeigt hat (s.o.) gehört die PSCD4-Domäne nach CATH zur Klasse der Proteine mit wenig Sekundärstrukturelementen. Die automatische Zuordnung von Proteindomänen z.B. für die Einteilung nach SCOP (MURZIN et al., 1995; <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>) beruht meist auf der Analyse der Sekundärstrukturelemente und war somit für die PSCD4-Domäne nicht möglich.

Das Programm Dali (HOLM & SANDER, 1983; <http://www2.ebi.ac.uk/dali>) beruht auf der paarweisen Überlagerung von Proteinstrukturen mittels Distanz-Matrizes. Die Datenbanksuche mit Dali ergab, dass es in der PDB-Datenbank keine der PSCD4-Domäne ähnliche Struktur gibt. Das Protein mit der besten Übereinstimmung hat einen Z-Wert von 0,4. Z-Werte kleiner 2,0 zeigen, dass zwei Proteine einander unähnlich sind. Dies zeigt, dass die PSCD4-Domäne einen neuen bis jetzt unbekannten Faltungstyp ausbildet.

Funktion der PSCD4-Domäne

Über die Funktion der Pleuraline ist nur bekannt, dass sie an der artspezifischen Morphogenese der Zellwand beteiligt sind und im Überlappungsbereich von Epi- und Hypotheca lokalisiert sind (KRÖGER & WETHERBEE, 2000).

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien (s. 4.1.6) sind keine Aussagen über mögliche Wechselwirkungen der PSCD4-Domäne mit der Kieselsäure oder der SiO₂-Bestandteilen der Zellwand möglich.

Betrachtet man die Ladungsverteilung auf der Oberfläche der PSCD4-Domäne, so fällt auf, dass diese fast komplett negativ geladen ist, mit Ausnahme zweier basischer Bereiche (s.

5. Diskussion

4.1.4). Möglicherweise ist diese Ladungsverteilung für die Wechselwirkung der PSCD4-Domäne mit anderen Zellwandkomponenten und somit für die Funktion der PSCD-Domänen bzw. der Pleuraline essentiell. Durch Mutation der zwei Argininreste und des Lysinrestes könnte deren Bedeutung für die Ausbildung der Struktur der PSCD4-Domäne untersucht werden.

Auf der Oberfläche der PSCD4-Domäne liegen gut zugänglich eine große Zahl von OH- und NH-Gruppen, die möglicherweise glykosyliert sein können. 70 % der OH-Gruppen der Serin- und Threoninreste liegen an der Oberfläche der PSCD4-Domäne. Dies unterstützt Vermutung von KRÖGER und WETHERBEE (2000), dass diese über O-glykosidische Bindungen mit Hydroxylgruppen einer postulierten callosischen Schicht auf der Hypotheca fest verbunden sind. Die Verankerung der Pleuraline an der Zellwand über glykosidische Bindungen wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Pleuraline nicht durch Auflösung der Zellwand mit Ammoniumfluorid (SWIFT & WHEELER, 1992) aus der Zellwand extrahiert werden können (LEHMANN & KRÖGER, pers. Mitteilung). Ammoniumfluorid löst wie HF die SiO₂-Bestandteile der Zellwand auf, spaltet aber keine O-glykosidischen Bindungen.

5.1.2 Strukturmodell der fünf PSCD-Domänen aus Pleuralin-1

Aufgrund der hohen Sequenzidentität innerhalb der PSCD-Domänen war es möglich mit den Ergebnissen aus der Strukturbestimmung der PSCD4-Domäne ein Modell aller 5 PSCD-Domänen aus Pleuralin-1 zu erstellen. Es zeigt sich, dass in allen Domänen die Oberfläche negativ geladen ist, mit Ausnahme weniger basischen Bereichen. Deshalb kann man spekulieren, dass diese Ladungsverteilung wichtig für die Funktion der PSCD-Domänen ist.

Die relative Lage der Domänen innerhalb des Modells ist zufällig, da für die Reste zwischen den Domänen keine Einschränkungen für die Strukturrechnung aus den Ergebnissen der PSCD4-Domäne abgeleitet werden konnten. Wie Studien zur Immunlokalisierung von KRÖGER und WETHERBEE (2000) und die Zugänglichkeit des Pleuralins für den Abbau mit Pronase (KRÖGER et al., 1997) zeigen, ist Pleuralin-1 auf der Oberfläche der Zellwand dem umgebenden Wasser exponiert. Da die PSCD4-Domäne in Lösung nicht aggregiert, kann angenommen werden, dass die einzelnen Domänen innerhalb des Pleuralins ebenfalls nicht aggregieren. Vielmehr sind sie vermutlich flexibel wie die Perlen auf einer Schnur angeordnet, getrennt durch Peptide unterschiedlicher Länge. Diese Flexibilität kann es ihnen dann ermöglichen, mit verschiedenen Komponenten der postulierten callosischen Schicht oder anderen Zellwandbestandteilen zu interagieren.

5.2 Methodische Arbeiten zur Messung von Restdipolkopplungen

5.2.1 Vergleich von COSY- und MOCCA-SIAM-Experiment zur Messung der $D_{\text{H}^N\text{H}^\alpha}$ -Restdipolkopplung in Proteinen

Sowohl das COSY- wie auch das MOCCA-SIAM-Experiment erlauben die Bestimmung von homonuklearen $D_{\text{H}^N\text{H}^\alpha}$ -Restdipolkopplungen in Proteinen. Beide unterscheiden sich aber deutlich in der Genauigkeit, mit der diese bestimmt werden können. Die Korrelation zwischen den aus dem MOCCA-SIAM-Experiment ermittelten Restdipolkopplungen und den berechneten ist deutlich größer als die der Restdipolkopplungen aus dem COSY-Experiment. Der Fehler für die Bestimmung der effektiven Kopplung aus dem COSY-Experiment beträgt, je nach Qualität der Signale, $\pm 1,0$ bis $\pm 2,0$ Hz. Im MOCCA-SIAM-Experiment ist der Fehler der bestimmten Kopplungskonstanten kleiner als $\pm 0,2$ Hz, da die simultane Aufnahme von *Inphase*- und *Antiphase*-Signalen die Verwendung des Verfahrens nach TITMAN und KEELER (1990) zur Extraktion der Kopplungen ermöglicht. Aufgrund der höheren Genauigkeit reichen zur Messung der Restdipolkopplungen mit dem MOCCA-SIAM-Experiment kleinere Orientierungsgrade aus. Die geringeren Orientierungsgrade resultieren in einer besseren Qualität der Spektren.

Hohe Orientierungsgrade führen aufgrund der größeren Restdipolkopplungen zu einer Auslöschung der *Antiphase*-Signale sowohl im COSY- als auch im ZQF-SIAM-Experiment. Im COSY-Experiment tritt dieser Effekt schon bei geringeren Orientierungsgraden auf, da die Signale in beiden Dimensionen *antiphase* sind. Passive Kopplungen zwischen dem H^α -Spin und skalar gekoppelten H^β -Spins oder zu räumlich benachbarten dipolar gekoppelten Spins können in einer starken Linienverbreiterung resultieren. Solche Linienverbreiterungen bewirken in der indirekten Dimension des COSY-Experiments, so wie in der direkten Dimension von COSY- und ZQF-SIAM-Experiment eine Auslöschung der *Antiphase*-Signale. Im SIAM-Experiment sind die Signale in der indirekten Dimension jedoch immer *inphase*, so dass in dieser Dimension keine Auslöschung der Signale stattfindet. Diese Tatsache ermöglicht eine Entkopplung der $\text{H}^N\text{-H}^\alpha$ -Kopplung während der t_1 -Evolutionszeit des MOCCA-SIAM-Experiments. Die Entkopplung führt zu einer zusätzlichen Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses im MOCCA-SIAM-Experiment.

Die geringere Auslöschung der Signale durch negative und passive Kopplungen im MOCCA-SIAM-Experiment, welche durch die Aufnahme bei geringeren Orientierungsgraden noch zusätzlich vermindert wird, ermöglicht die Bestimmung von negativen Restdipolkopplungen.

5. Diskussion

Ein weiterer Vorteil des MOCCA-SIAM-Experiments ist, aufgrund der Entkopplung in der indirekten Dimension, die geringere Fläche der Signale. Dadurch weisen die Spektren weniger Überlagerungen und weniger Verfälschungen der Signalform auf.

Die Wasserunterdrückung im MOCCA-SIAM-Experiment ist sehr gut, so dass auch für den Cysteinrest 30, welcher im COSY-Experiment durch den Wasserartefakt nicht auszuwerten war, die skalare und die Restdipolkopplung bestimmt werden konnte.

Mit dem MOCCA-SIAM-Experiment konnten insgesamt 29 sowohl positive als auch negative $D_{\text{H}\text{N}\text{H}\alpha}$ -Restdipolkopplungen mit hoher Genauigkeit bestimmt werden, wohingegen das COSY-Experiment nur die Bestimmung von 20 positiven Kopplungen zuließ.

Das Vorzeichen der Kopplung von Signalen, die durch reinen dipolaren Transfer vermittelt werden, kann mit keinem der beiden Experimente bestimmt werden. Allerdings kann der Betrag dieser Restdipolkopplungen zur Evaluation einer Proteinstruktur verwendet werden. Die dazu notwendige Kenntnis über der Lage des Orientierungstensors kann aus den $D_{\text{H}\text{N}\text{H}\alpha}$ -Restdipolkopplungen und der Struktur bestimmt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das MOCCA-SIAM-Experiment die Bestimmung skalarer $^3J_{\text{H}\text{N}\text{H}\alpha}$ -Kopplungen, sowie positiver und negativer $D_{\text{H}\text{N}\text{H}\alpha}$ -Restdipolkopplungen mit hoher Genauigkeit ermöglicht und deshalb, sowie aufgrund der besseren Spektrenqualität, dem COSY-Experiment deutlich überlegen ist. Die Nachteile des COSY-Experiments, welche auf der geringeren Genauigkeit der Bestimmung der Kopplungen beruhen, ließen sich durch die Verwendung des von DELAGLIO et al. (2001) entwickelten ACME-Verfahrens (s. 4.2.1), zur Extraktion der Kopplungen, vermindern. Dieses Verfahren ermöglicht die Bestimmung der effektiven Kopplung mit einem minimalen Fehler von bis zu $\pm 0,5$ Hz, der aber immer noch größer ist als bei der Bestimmung nach dem Titman-Keeler-Verfahren im SIAM-Experiment.

5.2.2 Von der Magnetfeldstärke abhängige Effekte: Kopplungsmessungen am HPr aus *Staphylococcus carnosus*

Eine mögliche Erklärung für die deutlich größeren $^3J_{\text{H}\text{N}\text{H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten bei 800,13 gegenüber 500,13 MHz ^1H -Resonanzfrequenz könnte die Orientierung des HPr-Moleküls im Magnetfeld aufgrund seiner Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität sein. Weitere Erklärungen wären Linien-verbreiternde Effekte, wie Mikroheterogenitäten der Proteinkonformation oder Inhomogenitäten des Magnetfeldes.

5. Diskussion

Die aus dem vorhergesagten Orientierungstensor berechneten $D_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ - und D_{NH} -Restdipolkopplungen sind deutlich kleiner als die in den COSY-Spektren beobachteten Effekte. Außerdem sind sie, im Gegensatz zu den in den COSY-Spektren beobachteten Effekten, sowohl negativ als auch positiv. Die Differenzen der aus den SIAM-Spektren bestimmten Kopplungen liegen in der gleichen Größenordnung wie die vorhergesagten Restdipolkopplungen. Allerdings sind die zu erwartenden Restdipolkopplungen immer noch kleiner als der Fehler für die Bestimmung mittels dem Titman-Keeler-Verfahren aus dem SIAM-Experiment. Das Gleiche gilt für die aus den J -modulierten HSQC-Experimenten bestimmten Restdipolkopplungen. Diese Experimente zeigen, dass die aufgrund der magnetischen Orientierung zu erwartenden Restdipolkopplungen kleiner als der experimentelle Fehler von $\pm 0,4$ Hz sind. Dies belegt, dass die magnetische Orientierung nicht als Ursache für die im COSY-Spektrum beobachteten Phänomene in Frage kommt. Die Lage des für das HPr vorhergesagten magnetischen Orientierungstensors ist anhand der SIAM- und der J -modulierten HSQC-Experimente aufgrund ihres zu großen Fehlers nicht überprüfbar.

Mikroheterogenitäten der Konformation, d.h., unterschiedliche Konformationen, welche sich in langsamem Austausch miteinander befinden, führen zu mehreren Signalen im Spektrum. Sind die Unterschiede der chemischen Verschiebungen in der Größenordnung der Linienbreite, so beobachtet man keine aufgelösten Signale, sondern nur eine Linienverbreiterung. Diese Linienverbreiterung ist abhängig von der Magnetfeldstärke, da die Verschiebungänderung auf der ppm-Skala bei verschiedenen Feldstärken gleich ist, somit aber auf der Frequenzskala mit der Feldstärke zunimmt. Dies heißt, dass die zu erwartende Linienverbreiterung durch Mikroheterogenitäten bei 800 MHz ^1H -Resonanzfrequenz größer ist als bei 500 MHz.

Wie in Abb. 4.24 demonstriert wurde, führt eine Linienverbreiterung zur Bestimmung einer größeren effektiven Kopplungskonstanten aus einem COSY-artigen *Antiphase*-Signal und einer kleineren effektiven Kopplungskonstanten aus einem TOCSY-artigen *Inphase*-Signal. Wie leicht aus den Gl. [3.24]–[3.27] zu erkennen ist, ist das Verfahren nach Titman und Keeler, das sowohl das *Inphase*- als auch das *Antiphase*-Signal zur Bestimmung der Kopplungen verwendet, unabhängig von der Linienform. Folglich treten die bei der Bestimmung der Kopplungskonstanten aus den COSY-Spektren beobachteten Effekte nicht auf. Die kleineren, mittels der SIAM-Spektren ermittelten Werte zeigen, dass die in den COSY-Spektren bei 800 MHz ^1H -Resonanzfrequenz zu beobachtende Zunahme der effektiven Kopplungen auch bei 500,13 MHz ^1H -Resonanzfrequenz auftritt.

5. Diskussion

Dass die größten Effekte bei Resten in den α -Helices auftreten, lässt sich leicht erklären. In den α -Helices sind die Werte der $^3J_{\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha}$ -Kopplungen normalerweise kleiner 7 Hz und in den β -Faltblättern größer als 9 Hz. Somit ist die Auslöschung der beiden *Antiphase*-Signale, bei gleicher Linienbreite, für die Reste in den Helices mit ihrer kleineren Aufspaltung größer als für die Reste in den β -Faltblättern. Somit führen kleine zusätzliche Linienverbreiterungen bei den Resten in den α -Helices zu einer stärkeren Signalauslöschung und daher zu einer Bestimmung von größeren effektiven Kopplungen.

Zusätzliche Linienverbreiterungen in den bei 800,13 MHz ^1H -Resonanz gemessenen COSY-Spektren, können die beobachteten größeren effektiven Kopplungskonstanten erklären. Allerdings lässt sich die Ursache der Linienverbreiterungen nicht aus den Spektren bestimmen. Um die Mikroheterogenitäten des HPr-Moleküls nachzuweisen, müssen Linienverbreiterungen durch größere Inhomogenitäten des Magnetfeldes, verursacht durch einen schlechteren *Shim*, ausgeschlossen werden. Wenn dies der Fall wäre, dann könnte man durch Messung der COSY-Spektren bei verschiedenen Magnetfeldstärken aus der Zunahme der effektiven $^3J_{\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha}$ -Kopplungskonstanten die Größe der Mikroheterogenitäten abschätzen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die erste Struktur eines Zellwandproteins einer Kieselalge mit Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie bestimmt. Das Verständnis der Prozesse, die an der Bildung dieser reich gemusterten und für jede Art spezifischen SiO₂-Zellwand beteiligt sind, sind von großem Interesse für die Materialwissenschaften, im Besonderen für das Gebiet der Nanotechnologie. Diese Prozesse sind auch aus Sicht der Ökologen interessant, da die Kieselalgen eine wichtige Quelle für die Biomineralisation und Sedimentation darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir ebenfalls eine neue Methode zur Messung von homonuklearen Restdipolkopplungen mit besonders hoher Genauigkeit – das MOCCA-SIAM-Experiment entwickelt.

Das Objekt meiner Studien war die PSCD4-Domäne des Zellwandproteins Pleuralin-1 aus *Cylindrotheca fusiformis*. Die PSCD-Domänen (87 bzw. 89 AA) sind hoch konserviert und wurden nur in den Mitgliedern der Pleuralin-Familie (früher HEP) gefunden. Der Name PSCD bezieht sich auf die am häufigsten vorkommenden Aminosäuren (~22 % Pro, ~11 % Ser, ~11 % Cys und ~9 % Asp). Während die PSCD-Domänen 70 % bis 92 % Sequenzidentität untereinander aufweisen, zeigen sie keine signifikante Homologie zu anderen Proteinen in den gängigen Datenbanken. Aufgrund der ungewöhnlichen Aminosäurezusammensetzung erwarteten wir ein neues Faltungsmotiv, welches das PSCD4 auch tatsächlich ausbildet.

Die chemischen Verschiebungen des rekombinanten His₆PSCD4-Konstrukts (112 Aminosäuren) wurde unter Verwendung moderner multidimensionaler NMR-Experimente zugeordnet. Die Zuordnung wurde durch den ungewöhnlich hohen Anteil an Prolinen behindert. Da sie kein H^N-Atom besitzen, unterbrechen die Proline das Standard-Verfahren zur Zuordnung des Proteinrückgrats. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das für Proline selektive CDCA(NCO)CAHA-Spektrum verwendet.

Aufgrund der signifikanten Abweichungen der chemischen Verschiebungen von den *Random-Coil*-Werten, scheint der Kern der Domäne gut strukturiert zu sein. Allerdings deuten die Analysen der chemischen Verschiebungen mit den Computerprogrammen CSI und TALOS darauf hin, dass PSCD4 keine kanonischen Sekundärstrukturelemente ausbildet. Die Bestimmung der Struktur in Lösung wurde durch die relativ geringe Anzahl an beobachtbaren NOE-Kontakten erschwert. Des Weiteren kommt es, aufgrund des Überwiegens weniger nicht aromatischer Aminosäuren, zu vielen Überlagerungen in den Spektren. Um diese Hindernisse zu umgehen, wurde die Position von drei der fünf Disulfidbrücken, ihre Existenz ist anhand ihrer chemischen Verschiebungen gezeigt, mit biochemischen Methoden, wie enzymatische Spaltung, HPLC-Analyse, Massenspektroskopie und Edman-Abbau bestimmt. Um die Mehr-

6. Zusammenfassung

deutigkeit der beiden übrigen Disulfidbrücken zu lösen, wurden Strukturen mit beiden Möglichkeiten mit dem Computerprogramm CNS berechnet bzw. die Möglichkeit im in CNS implementierten Skript ARIA zur mehrdeutigen Zuordnung von Einschränkungen benutzt. Zusätzlich zu den Positionen der Disulfidbrücken und den Abstandsinformationen aus den NOESY-Spektren wurden Restdipolkopplungen zwischen dem H^N und N gemessen, welche sehr wertvolle Strukturinformationen enthalten. Informationen über den Diederwinkel Φ wurden dem HNCA-E.COSY-Spektrum entnommen. Wasserstoffbrückenbindungen wurden mittels des modifizierten HNCO-Experiments direkt nachgewiesen. Die Struktur der PSCD4-Domäne, ebenso wie ein Modell aller fünf PSCD-Domänen aus Pleuralin-1 wurde mittels *Simulated Annealing* mit dem Computerprogramm CNS berechnet.

Der Kern der PSCD4-Struktur enthält keine klassischen Sekundärstrukturelemente und zeigt ein neues Faltungsmotiv. Er besteht aus mehreren Schleifen, welche durch die fünf Disulfidbrücken verbunden sind. Der RMSD des Kerns ist 0,109 nm (Proteinrückgrat, Reste 30 bis 80). Die aus dem Ramachandran-Diagramm bestimmte Auflösung der Struktur ist 0,4 nm. Die zwei Termini sind flexibel, was durch die Relaxationsuntersuchungen bestätigt wurde. Mit dem Computerprogramm Dali konnte gezeigt werden, dass es in der PDB-Datenbank keine der PSCD4-Domäne ähnlichen Strukturen gibt. Deshalb ist anzunehmen, dass die PSCD4-Domäne einen neuen Faltungstyp besitzt.

Aufgrund dieser Struktur kann über die Funktion des Proteins spekuliert werden. Die gesamte Oberfläche ist aufgrund von sauren Seitenketten von 12 Asparaginen und Glutamaten negativ geladen, mit Ausnahme zweier basischen Bereiche, gebildet von Arginin- 45 und Lysin 40, sowie von Arginin 54. Wie Studien zur Immunlokalisierung (KRÖGER & WETHERBEE, 2000) und die Zugänglichkeit für den Abbau mit Pronase (KRÖGER et al., 1997) zeigen, ist Pleuralin-1 auf der Oberfläche der Zellwand dem umgebenden Wasser exponiert. Da die PSCD4-Domäne in Lösung nicht aggregiert, kann man spekulieren, dass die fünf PSCD-Domänen des Pleuralin-1 wie Perlen auf einer Schnur aufgereiht sind, verbunden durch verschiedene lange Peptide. Diese Annahme wird von den Modellrechnungen für ein Protein aus allen 5 PSCD-Domänen bestätigt. Auf der Oberfläche der PSCD-Domäne ist eine große Anzahl potentiell modifizierbarer funktioneller Gruppen, wie die Seitenketten von Aspartaten, Asparaginen, Serinen und Threoninen. Diese können kovalent mit anderen organischen Komponenten der Zellwand, z.B. Oligosacchariden verknüpft sein. Solche Verknüpfungen könnten die Morphologie der Zellwandbildung kontrollieren (KRÖGER & WETHERBEE, 2000). Die dreidimensionale Struktur ermöglicht gezielte Mutagenesestudien um diese Hypothese zu überprüfen.

6. Zusammenfassung

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde eine Methode zur genauen Messung von $\text{H}^N\text{-H}^\alpha$ -Restdipolkopplungen an unmarkierten Proteinen etabliert. Das MOCCA-SIAM-Experiment erlaubt die Bestimmung von Kopplungskonstanten mit weit höherer Genauigkeit und höherer Sensitivität als das COSY-Experiment. Der Fehler für die Restdipolkopplungen ist bei guter Spektrenqualität $\pm 0,4$ Hz. Dadurch können die Restdipolkopplungskonstanten auch bei geringeren Orientierungsgraden gemessen werden und Untersuchungen zur Orientierung im Magnetfeld, wie hier für das HPr gezeigt, durchgeführt werden.

Aufgrund der höheren Qualität der Spektren, gegenüber dem COSY, erlaubt das MOCCA-SIAM-Experiment die Bestimmung von $\text{H}^N\text{-H}^\alpha$ -Restdipolkopplungen mit negativem Vorzeichen. Die Qualität der mit dem MOCCA-SIAM-Experiment bestimmten Restdipolkopplungen wurde am BPTI überprüft, wobei sich für 19 $\text{H}^N\text{-H}^\alpha$ -Restdipolkopplungen innerhalb der Sekundärstrukturelemente ein Qualitätsfaktor $Q = 0,286$ ergab.

7 Literatur

- ADAM, G.; LÄUGER, P. AND STARK, G.** (1995): Physikalische Chemie und Biophysik. *Springer-Verlag Berlin*, 530 S.
- ALBA DE, E., BABER, K.L. AND TJANDRA, N.** (1999): The use of residual dipolar couplings in concert with backbone relaxation rates to identify conformational exchange by NMR. *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 4282–4283.
- AUE, W.P.; BARTHOLDI, E. AND ERNST, R.R.** (1976): Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *Journal of Chemical Physics*, **64**, 2229–2246.
- AZAM, F.; VOLCANI, B.E.** (1981): In SIMPSON, T.L. AND VOLCANI, B.E. [Eds.] Silicon and Silicious Structures in Biological Systems, *Springer-Verlag, New York*, 43–47.
- BASTIAAN, E.W.; MACLEAN, C.; VAN ZIJL, P.C.M. AND BOTHNER-BY, A.A.** (1987): High-resolution NMR of liquids and gases: Effects of magnetic-field-induced molecular alignment. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, **19**, 35–77
- BAX, A. AND DAVIS, D.G.** (1985): Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, **63**, 207–213.
- BAX, A.; IKURA, M.; KAY, L.E.; TORCHIA, D.A. AND TSCHUDIN, R.** (1990): Comparison of different modes of two-dimensional reverse correlation NMR for the study of proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, **86**, 304–318.
- BERNDT, K.D.; GÜNTERT, P.; ORBONS, L.P. AND WÜTHRICH, K.** (1992): Determination of a high-quality nuclear magnetic resonance solution structure of the bovine pancreatic trypsin inhibitor and comparison with three crystal structures. *Journal of Molecular Biology*, **227**, 757–775.
- BOLON, P.J. AND PRESTEGARD, J.H.** (1998): COSY cross-peaks from ^1H - ^1H dipolar couplings in NMR spectra of field oriented oligosaccharides. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 9366–9367.
- BOTHNER-BY, A.A.; DOMAILLE, P.J. AND GAYATHRI, C.** (1981): Observation of proton-proton dipolar coupling in paramagnetic bis[tolyltris(pyrazolyl)borato]cobalt[II]. *Journal of the American Chemical Society*, **103**, 5602–5603.
- BOTHNER-BY, A.A.; GAYATHRI, C.; ZIJL, V.P.C.M.; MACLEAN, C.; LAI, J. AND SMITH, K.M.** (1985): High-field orientation effects in the high-resolution proton NMR spectra of diverse porphyrins. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **23**, 935–938.
- BOTTOMLEY, M.J.; MACIAS, M.J.; LIU, Z. AND SATTLER, M.** (1999): A novel NMR experiment for the sequential assignment of proline residues and proline stretches in ^{13}C - ^{15}N -labelled proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, **13**, 381–385.
- BRAUNSCHWEILER, L. AND ERNST, R.R.** (1983): Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, **53**, 521–528.
- BRÜNGER, A.T.; ADAMS, P.D.; CLORE, G.M.; DELANO, W.L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; JIANG, J.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N.S.; READ, R.J. AND RICE, L.M.** (1998): Crystallography & NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, **54**, 905–921.
- BRUNNER, E.; OGLE, J.; WENZLER, M. AND KALBITZER, H.R.** (2000): Molecular alignment of proteins in bicellar solutions: Quantitative evaluation of effects induced in 2D COSY spectra. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **272**, 694–698.
- CAI, M.; HUANG, Y.; LIU, J. AND KRISHNAMOORTHI, R.** (1995): Solution conformations of proline rings in proteins studied by NMR spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR*, **6**, 123–128.

7. Literatur

- CAI, M.; WANG, H.; OLEJNICZAK, E.T.; MEADOWS, R.P.; GUNASEKERA, A.H.; XU, N. AND FESIK, S.W. (1999): Accurate measurement of H^N - H^α residual dipolar couplings in proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, **139**, 451–453.
- CARLOMAGNO, T.; MAURER, M.; SATTLER, M.; SCHWENDINGER, M.G.; GLASER, S.J. AND GRIESINGER, C. (1996): PLUSH TACSY: Homonuclear planar TACSY with two-band selective shaped pulses applied to C^α , C' transfer and C^β , $C^{aromatic}$ correlations. *Journal of Biomolecular NMR*, **8**, 161–170.
- CARR, H.Y. AND PURCELL, E.M. (1954): effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Physical Review*, **94**, 630–638.
- CAVAGNERO, S.; DYSON, H.J. AND WRIGHT, P.E. (1999): Improved low pH bicelle system for orienting macromolecules over a wide temperature range. *Journal of Biomolecular NMR*, **13**, 387–391.
- CAVANAGH, J.; FAIRBROTHER, W.J.; PALMER III, A.G. AND SKELTON, N.J. (1996): Protein NMR Spectroscopy: Principles and practice. *Academic Press San Diego, California*, 587 S.
- CLORE, G.M.; GRONENBORN, A.M. AND BAX, A. (1998): A robust method for determining the magnitude of the fully asymmetric alignment tensor of oriented macromolecules in the absence of structural information. *Journal of Magnetic Resonance*, **133**, 216–221.
- CLORE, G.M.; GRONENBORN, A.M. AND TJANDRA, N. (1998a): Direct structure refinement against residual dipolar couplings in the presence of rhombicity of unknown magnitude. *Journal of Magnetic Resonance*, **131**, 159–162.
- CORDIER, F. AND GRZESIEK, S. (1999): Direct observation of hydrogen bonds in proteins by interresidue $^3J_{NC}$ -couplings. *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 1601–1602.
- CORNILESCU, G.; MARQUARDT, J.L.; OTTIGER, M. AND BAX, A. (1998): Validation of protein structure from anisotropic carbonyl chemical shifts in a dilute liquid crystalline phase. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 6836–6837.
- CORNILESCU, G.; DELAGLIO, F. AND BAX, A. (1999): Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *Journal of Biomolecular NMR*, **13**, 289–302.
- CORNILESCU, G.; HU, J. AND BAX, A. (1999): Identification of the hydrogen bonding network in a protein by scalar coupling. *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 2949–2950.
- CZIHAK, G.; LANGER, H. AND ZIEGLER, H. (Hrsg.; 1990): Biologie. *Springer-Verlag Berlin*, 995 S.
- DELAGLIO, F.; WU, Z. AND BAX, A. (2001): Measurement of homonuclear proton couplings from regular 2D COSY spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, **149**, 276–281.
- DINGLEY, A.J. AND GRZESIEK, S. (1998): Direct observation of hydrogen bonds in nucleic acid base pairs by internucleotide $^2J_{NN}$ couplings. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 8293–9297.
- DOSSET, P.; HUS, J.C.; MARION, D. AND BLACKLEDGE, M. (2001): A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings. *Journal of Biomolecular NMR*, **20**, 223–231.
- EMSLEY, L. AND BODENHAUSEN, G. (1992): Optimization of shaped selective pulses for NMR using a quaternion description of their overall propagators. *Journal of Magnetic Resonance*, **97**, 135–148.
- EMSLEY, J.W. (1996): Liquid crystals: General considerations. In GRANT, D.M.; HARRIS, R.K. [Eds.] *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*. Wiley London, 2788–2799.
- FARROW, N.A.; MUHANDIRAM, R.; SINGER, A.U.; PASCAL, S.M.; KAY, C.M.; GISH, G.; SHOELSON, S.E.; PAWSON, T.; FORMAN-KAY, J.D. AND KAY, L.E. (1994): Backbone dynamics of a free and a phosphopeptide-complexed Src Homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. *Biochemistry*, **33**, 5984–6003.
- FIAUX, J.; BERTELSEN, E.B.; HORWICH, A.L. AND WÜTHRICH, K. (2002): NMR analysis of a 900K GroEL-GroES complex. *Nature*, **418**, 207–211.

7. Literatur

- FINER, E.G. AND DARKE, A.** (1974): Phospholipid hydration studied by deuteron magnetic resonance spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, **12**, 1–16.
- FIROUZI, A.; KUMAR, D.; BULL, L.M.; BESIER, T.; SIEGER, P.; HUO, Q.; WALKER, S.A.; ZAADZINSKI, J.A.; GLINKA, C.; NICOL, J.; BARGOLESE, D.; STUCKY, G.D. AND CHMELKA, B.F.** (1995): Cooperative organization of inorganic-surfactant and biomimetic assemblies. *Science*, **267**, 1138–1143.
- GAYATHRI, C.; BOTHNER-BY, A.A.; ZIJL, V.P.C.M. AND MACLEAN, C.** (1982): Dipolar magnetic field effects in NMR spectra of liquids. *Chemical Physics Letters*, **87**, 192–196.
- GANSLMEIER, B.** (2002): AUREMOL – Softwareprojekt zur automatischen Auswertung von Multidimensionalen NMR-Spektren. *Dissertation – Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie, Universität Regensburg*, 125 S.
- GEYER, M.; NEIDIG, K.P. AND KALBITZER, H.R.** (1995): Automated peak integration in multidimensional NMR spectra by an optimized iterative segmentation procedure. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* **109**, 31–38.
- GIESSNER-PRETTRE, C. AND PULLMAN, B.** (1987): Quantum mechanical calculations of NMR chemical shifts in nucleic acids. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **20**, 113–172.
- GLASER, S.J. AND QUANT, J.J.** (1996). Homonuclear and heteronuclear Hartmann-Hahn transfer in isotropic liquids. In WARREN W.S. [Ed.], *Advances in Magnetic and Optical Resonance*, San Diego, Academic Press, 59–252.
- GÖRLER, A. AND KALBITZER H.R.** (1997): Relax, a flexible program for the back calculation of NOESY spectra based on complete-relaxation-matrix formalism. *Journal of Magnetic Resonance*, **124**, 177–188.
- GÖRLER, A.** (1998): Entwicklung neuer Methoden zur Auswertung von Kern-Overhauser-Effekt-Spektren und ihre Anwendung zur Bestimmung der dreidimensionalen NMR-Struktur des Proteins HPr aus *S. carnosus*. *Dissertation – Naturwissenschaftliche-Mathematische Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*, 105 S.
- GÖRLER, A.; HENGSTENBERG, W.; KRAVANJA, M.; BENEICKE, W.; MAURER, T. AND KALBITZER, H.R.** (1999): Solution structure of the histidine-containing phosphocarrier protein from *Staphylococcus carnosus*. *Applications in Magnetic Resonance*, **17**, 465–480.
- GRANT, D.M.** (1996): Chemical shift tensors. In GRANT, D.M. AND HARRIS, R.K. [Eds.] *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, **2**, Wiley, Chichester, 1320–1321.
- GRIESINGER, C.; SØRENSEN, O.W. AND ERNST, R.R.** (1986): Correlation of connected transitions by two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Chemical Physics*, **85**, 6837–6852.
- GRONWALD, W.; MOUSSA, S.; ELSNER, R.; JUNG, A.; GANSLMEIER, B.; TRENNER, J.; KREMER, W.; NEIDIG, K.P. AND KALBITZER, H.R.** (2002): Automated assignment of NOESY NMR spectra using a knowledge based method (KNOWNOE). *Journal of Biomolecular NMR* **23**, 271–287.
- GRZESIEK, S. AND BAX, A.** (1992): Improved 3D triple resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *Journal of Magnetic Resonance*, **96**, 432–440.
- GRZESIEK, S. AND BAX, A.** (1992a): Correlating backbone amide and sidechain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *Journal of the American Chemical Society*, **114**, 6291–629.
- GRZESIEK, S.; DOBELI, H.; GENTZ, R.; GAROTTA, G.; LABHARDT, A.M. AND BAX, A.** (1992): ^1H , ^{13}C , and ^{15}N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma. *Biochemistry*, **31**, 8180–8190.
- GRZESIEK, S. AND BAX, A.** (1993): Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ enriched proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, **3**, 185–204.

7. Literatur

- GULLION, T.; BAKER, D.B. AND CONRADI, M.S.** (1990): New, compensated Carr-Purcell sequences. *Journal of Magnetic Resonance*, **89**, 479–484.
- HANSEN, M.R.; MUELLER, L. AND PARDI, A.** (1998): Tuneable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nature Structural Biology*, **5**, 1065–1074.
- HANSEN, M.R.; RANCE, M. AND PARDI, A.** (1998a): Observation of long-range 1H-1H distances in solution by dipolar coupling interactions. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 11210–11211.
- HARTMANN, S.R. AND HAHN, E.L.** (1962): Nuclear double resonance in the rotating frame. *Physical Review*, **128**, 2042–2053.
- HAUSSER, K.H. UND KALBITZER, H.R.** (1989): NMR für Mediziner und Biologen: Strukturbestimmung, Bildgebung, In-vivo-Spektroskopie. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, 221 S.
- HECKY, R.E.; MOPPER, K.; KILHAM, P. AND DEGENS, T.E.** (1973): The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Marine Biology*, **19**, 323–331.
- HOBOHM, U. AND SANDER, C.** (1995): A sequence property approach to searching protein databases. *Journal of Molecular Biology*, **251**, 390–399.
- HOLM, L. AND SANDER, C.** (1993): Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices. *Journal of Molecular Biology*, **233**, 123–138.
- HOMER, J.** (1984): Potential errors in volume magnetic susceptibility corrections to NMR chemical shifts when using a heteronuclear field/frequency lock. *Journal of Magnetic Resonance*, **57**, 171–177.
- HOULT, D.I. AND RICHARDS, R.E.** (1975): Critical factors in the design of sensitive high resolution nuclear magnetic resonance spectrometers. *Proceedings of the Royal Society of London, Series A* **344**, 311–340.
- HUO, Q.; MARGOLESE, D.I.; CIESLA, U.; FENG, P.; GIER, T.E.; SIEGER, P.; LEON, R.; PETROFF, P.M.; SCHÜTH, F. AND STUCKY, G.D.** (1994): Generalized synthesis of periodic surfactant/inorganic composite materials. *Nature*, **368**, 317–321.
- JEFFREY, G.A. AND SAENGER, W.** (1991): Hydrogen bonding in biological structures. *Springer-Verlag New York*, 569. S.
- JEENER, J.** (1971): AMPERE Summer School, Basko Polje, Jugoslawien.
- JEENER, J.; MEIER, B.H.; BACHMANN, P. AND ERNST, R.R.** (1979): Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Chemical Physics*, **71**, 4546–4553.
- JURANIC, N.; LIKIC, V. A.; PRENDERGAST, F. G. AND MACURA, S.** (1996): Protein-solvent hydrogen bonding studied by NMR $^1J_{NC}$ coupling constant determination and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 7859–7860.
- KABSCH, W. AND SANDER, C.** (1983): Dictionary of protein secondary structures: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577–2637.
- KALBITZER, H.R.; GÖRLER, A.; LI, H.; DUBOVSKII, P.V.; HENGSTENBERG, W.; KOWOLIK, C.; YAMADA, H. AND AKASAKA, K.** (2000): ^{15}N and ^1H NMR Study of Histidine Containing Protein (Hpr) from Staphylococcus Carnosus at High Pressure. *Protein Science*, **9**, 693–703.
- KARPLUS, M.** (1959): Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *The Journal of Chemical Physics*, **30**, 11–15.
- KAY, L.E.; IKURA, M.; TSCHUDIN, R. AND BAX, A.** (1990): Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, **89**, 496–514.
- KAY, L.E.; KEIFER, P. AND SAARINEN, T.** (1992): Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *Journal of the American Chemical Society*, **114**, 10663–10665.

7. Literatur

- KAY, L.E.; XU, G.Y.; SINGER, A.U.; MUHANDIRAM, D.R. AND FORMAN-KAY, J.D. (1993): A gradient enhanced HCCH-TOCSY experiment for recording side-chain ¹H and ¹³C correlations in H₂O samples of proteins. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* **101**, 333–337.
- KEMP, A.E.S.; PIKE, J.; PEARCE, R.B. AND LANGE, C.B. (2000) The “Fall dump” – a new perspective on the role of a “shade flora” in the annual cycle of diatom production and export flux. *Deep-Sea Research II*, **47**, 2129–2154.
- KENDREW, J.C.; DICKERSON, R.E.; STRANDBERG, B.E.; HART, R.G.; DAVIES, D.R.; PHILLIPS, D.C. AND SHORE, D.C. (1960): Structure of myoglobin: a three dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **185**, 422–427.
- KIRKPATRICK, S.; GELATT, JR., C.D. AND VECCHI, M.P. (1983): Optimization by Simulated Annealing. *Science*, **220**, 671–680.
- KOENIG, B.W.; HU, J.S.; OTTIGER, M.; BOSE, S.; HENDLER, R.W. AND BAX, A. (1999): NMR measurement of dipolar couplings in proteins aligned by transient binding to purple membrane fragments. *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 1385–1386.
- KORADI, R.; BILLETER, M. AND WÜTHRICH, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, **14**, 51–55.
- KRAMER, F.; PETI, W.; GRIESINGER, C. AND GLASER, S.J. (2001): Optimized homonuclear Carr-Purcell-type dipolar mixing sequences. *Journal of Magnetic Resonance*, **149**, 58–66.
- KRESGE, C.T.; LEONOWICZ, M.E.; ROTH, W.J.; VARTULI, J.C. AND BECK, J.S. (1992): Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, **359**, 710–712.
- KRÖGER, N.; BERGSDORF, C. AND SUMPER, M. (1994): A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component. *The EMBO Journal*, **13**, 4676–4683.
- KRÖGER, N.; BERGSDORF, C. AND SUMPER, M. (1996): Frustulins: domain conservation in a protein family associated with diatom cell walls. *European Journal of Biochemistry*, **239**, 259–264.
- KRÖGER, N.; LEHMANN, G.; RACHEL, R. AND SUMPER, M. (1997): Characterization of a 200-kDa diatom protein that is specifically associated with a silica-based substructure of the cell wall. *European Journal of Biochemistry*, **250**, 99–105.
- KRÖGER, N. AND SUMPER, M. (1998): Diatom cell wall proteins and the cell biology of silica biominerilization. *Protist*, **149**, 213–219.
- KRÖGER, N.; DEUTZMANN, R. AND SUMPER, M. (1999): Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, **286**, 1129–1132.
- KRÖGER, N.; DEUTZMANN, R.; BERGSDORF, C. AND SUMPER, M. (2000): Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 14133–14138.
- KRÖGER, N. AND WETHERBEE, R. (2000): Pleuralins are involved in theca differentiation in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Protist*, **151**, 263–73.
- KRÖGER, N.; DEUTZMANN, R. AND SUMPER, M. (2001): Silica-precipitating peptides from diatoms. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 26066–26070.
- KRÖGER, N.; LORENZ, S.; BRUNNER, E. AND SUMPER, M. (2002): Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. *Science*, **298**, 584–586.
- KUMAR, A.; ERNST, R.R. AND WÜTHRICH, K. (1980): A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **95**, 1–6.

7. Literatur

- LASKOWSKI, R.A.; RULLMANN, J.A.C.; MACARTHUR, M.W.; KAPTEIN, R. AND THORNTON, J.M. (1996): AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, **8**, 477–486.
- LINGE, J.P.; O'DONOOGHUE, S.I. AND NILGES, M. (2001): Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Methods in Enzymology Academic Press, San Diego, California*, 71–90.
- LIZAK, M.J.; GULLION, T. AND CONRADI, M.S. (1991): Measurement of like-spin dipole couplings. *Journal of Magnetic Resonance*, **91**, 254–260.
- LOBEL, K.D.; WEST, J.K. AND HENCH, L.L. (1996): Computational model for protein-mediated biominerization of the diatom frustule. *Marine Biology*, **126**, 353–360.
- LOSONCZI, J.A. AND PRESTEGARD, J.H. (1998): Improved dilute bicelle solutions for high-resolution NMR of biological macromolecules. *Journal of Biomolecular NMR*, **12**, 447–451.
- LOSONCZI, J.A.; ANDREC, M.; FISCHER, M.W.F. AND PRESTEGARD, J.H. (1999): Order matrix analysis of residual dipolar couplings using singular value decomposition. *Journal of Magnetic Resonance*, **138**, 334–342.
- LUDVIGSEN, S.; ANDERSEN, K.V. AND POULSEN, F.M. (1991): Accurate measurements of coupling constants from two-dimensional nuclear magnetic resonance spectra of proteins and determination of phi-angles. *Journal of Molecular Biology*, **217**, 731–736.
- MANN, S. (1993): Molecular tectonics in biominerization and biomimetic materials chemistry. *Nature*, **365**, 499–505.
- MARION, D. AND WÜTHRICH, K. (1983): Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy COSY for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **113**, 967–974.
- MARION, D.; IKURA, M.; TSCHUDIN, R. AND BAX, A. (1989): Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, **85**, 393–399.
- MARION, D.; KAY, L.E.; SPARKS, S.W.; TORCHIA, D.A. AND BAX, A. (1989a): Three-dimensional heteronuclear NMR of ^{15}N labelled proteins. *Journal of the American chemical Society*, **111**, 1515–1517.
- MARKLEY, J.L.; HORSLEY, W.J. AND KLEIN, M.P. (1971): Spin-Lattice relaxation measurements in slowly relaxing complex spectra. *Journal of Chemical Physics*, **55**, 3604–3605.
- MARKLEY, J.L.; BAX, A.; ARATA, Y.; HILBERS, C.W.; KAPTEIN, R.; SYKES, B.D.; WRIGHT, P.E. AND WÜTHRICH, K. (1998): Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *Journal of Biomolecular NMR*, **12**, 1–23.
- MEIBOOM, S. AND GILL, D. (1958): Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Review of Scientific Instruments*, **29**, 688–691.
- MEILER, J.; PETI, W. AND GRIESINGER, C. (2000): Dipocoup: A versatile program for 3D-structure homology comparison based on residual dipolar couplings and pseudocontact shifts. *Journal of Biomolecular NMR*, **17**, 283–294.
- MÖGLICH, A. (2001): Strukturbestimmung der Ile14→Ala-Austauschmutante des Histidine-Containing Phosphocarrier Protein aus *Staphylococcus carnosus* unter Verwendung von Restdipolkopplungen. *Diplomarbeit – Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie, Universität Regensburg*, 111 S.
- MÖGLICH, A.; WENZLER, M.; KRAMER, F.; GLASER, S.J. AND BRUNNER, E. (2002): Determination of residual dipolar couplings in homonuclear MOCCA-SIAM experiments. *Journal of Biomolecular NMR*, **23**, 211–219.

7. Literatur

- MONTELIONE, G.T.; LYONS, B.A.; EMERSON, S.D. AND TASHIRO, M.** (1992): An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically-enriched proteins. *Journal of the American Chemical Society*, **114**, 10974–10975.
- MOORE, W.J.** (1971): Physical Chemistry. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 977 S.
- MORRIS, G.A. AND FREEMAN, R.** (1979): Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *Journal of the American Chemical Society*, **101**, 760–762.
- MUHANDIRAM, D.R. AND KAY, L.E.** (1994): Gradient-enhanced triple-resonance three-dimensional NMR experiments with improved sensitivity. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* **103**, 203–216.
- MÜLLER, L.** (1979): Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence. *Journal of the American Chemical Society*, **101**, 4481–4484.
- MURZIN A.G.; BRENNER S.E.; HUBBARD T. AND CHOTHIA C.** (1995): SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*, **247**, 536–540.
- NAKAJIMA, T. AND VOLCANI, B.E.** (1969): 3,4-dihydroxyproline: a new amino acid in diatom cell walls. *Science*, **164**, 1400–1401.
- NAKANISHI, T.; MIYAZAWA, M.; SAKAKURA, M.; TERASAWA, K.; TAKAHASHI, K. AND SHIMADA, I.** (2002): Determination of the interface of a large protein complex by transferred cross-saturation. *Journal of molecular biology*, **318**, 245–249.
- NEIDIG, K.P.; GEYER, M.; GÖRLER, A.; ANTZ, C.; SAFFRICH, R.; BENEICKE, W. AND KALBITZER, H.R.** (1995): AURELIA, a program for computer-aided analysis of multidimensional spectra. *Journal of Biomolecular NMR*, **6**, 255–270.
- NERI, D.; OTTING, G. AND WÜTHRICH, K.** (1990): New nuclear magnetic resonance experiment for measurements of the vicinal coupling constants $^3J_{\text{HN}^\alpha}$ in proteins. *Journal of the American Chemical Society*, **112**, 3663–3665.
- NEUHAUS, D.; WAGNER, G.; VASAK, M.; KAGI, J.H. AND WÜTHRICH K.** (1985): Systematic application of high-resolution, phase-sensitive two-dimensional ^1H -NMR techniques for the identification of the amino-acid-proton spin systems in proteins. Rabbit metallothionein-2. *European Journal of Biochemistry*, **151**, 257–273.
- NILGES, M.** (1995): Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *Journal of Molecular Biology*, **245**, 645–660.
- NILGES, M.; MACIAS, M.J.; O'DONOOGHUE, S.I. AND OSCHKINAT, H.** (1997): Automated NOESY interpretation with ambiguous distance restraints: The refined NMR solution structure of the pleckstrin homology domain from β -Spektrin. *Journal of Molecular Biology*, **269**, 408–422.
- NILGES, M. AND O'DONOOGHUE, S.I.** (1998): Ambiguous NOEs and automated NOE assignment. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **32**, 107–139.
- NOGGLE, J.H. AND SHIRMER, R.E.** (1971): The nuclear overhauser effect: chemical applications. Academic Press New York, 1–259.
- ORENGO, C.A.; MICHEL, A.D.; JONES, S.; JONES, D.T.; SWINDELLS, M.B. AND THORNTON, J.M.** (1997): CATH – A hierarchic classification of protein domain structures. *Structure*, **5**, 1093–1108.
- OTTIGER, M. AND BAX, A.** (1998): Characterization of magnetically oriented phospholipid micelles for measurement of dipolar couplings in macromolecules. *Journal of Biomolecular NMR*, **12**, 361–372.
- OVERHAUSER, A.W.** (1953): Polarization of nuclei in metals. *Physical Review*, **92**, 411–415.
- PALMER, A.G. AND PATEL, D.J.** (2002): Kurt Wüthrich and NMR of biological macromolecules. *Structure*, **10**, 1603–1604.

7. Literatur

- PARDI, A.; BILLETER, M. AND WÜTHRICH, K.** (1984): Calibration of the angular dependence of the amide proton-Ca proton coupling constants, $^3J_{HN\alpha}$, in a globular protein. *Journal of Molecular Biology*, **180**, 741–751.
- PARKIN, S.; RUPP, B. AND HOPE, H.** (1996): Structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 125 K: Definition of carboxyl-terminal residues Gly57 and Ala58. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, **52**, 18–29.
- PASTORE, A. AND SAUDEK, V.** (1990): The relationship between chemical shift and secondary structure in proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, **90**, 165–176.
- PEARSON, W.R. AND LIPMAN, D.J.** (1988): Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **85**, 2444–2448.
- PERUTZ, M.F.** (1960) Structure of hemoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, **185**, 416–422.
- PERVUSHIN, K.; RIEK, R.; WIDER, G. AND 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **94**, 12366–12371.
- PICKETT-HEAPS, J.; SCHMID, A.M.M. AND EDGAR, L.A.** (1990): The cell biology of diatom valve formation. In ROUND, F.E. AND CHAPMAN, D.J. [Eds.] *Progress in Phycological Research*, **7**, Biopress Ltd, Bristol, 1–168.
- PORT, A.J. AND LAMPORT, D.T.A.** (1977): Anhydrous hydrogen fluoride deglycosylates glycoproteins. *Analytical Biochemistry*, **82**, 289–309.
- PRASCH, T.; GRÖSCHKE, P. AND GLASER, S.J.** (1998): SIAM, a novel NMR experiment for the determination of homonuclear coupling constants. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **37**, 802–806.
- RAIFORD, D.S.; FISK, C.G. AND BECKER, E.D.** (1979): Calibration of methanol and ethylene glycol nuclear magnetic resonance thermometers. *Analytical Chemistry*, **51**, 2050–2051.
- RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN, C. AND SASISEKHARAN, V.** (1963): Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, **7**, 95–99.
- RIEK, R.; WIDER, G.; PERVUSHIN, K. AND WÜTHRICH, K.** (1999): Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **964**, 4918–4923.
- ROBINSON, D.H. AND SULLIVAN, C.W.** (1987): How do diatoms make silicon biominerals? *Trends in Biochemical Sciences*, **12**, 151–154.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T.** (1989): Molecular Cloning,: A laboratory Manuel. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SATTLER, M.; SCHLEUCHER, J. AND GRIESINGER, C.** (1999): Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **34**, 93–158.
- SCHLEUCHER, J.; SCHWENDINGER, M.; SATTLER, M.; SCHMIDT, P.; SCHEDELTZKY, O.; GLASER, S.J.; SØRENSEN, O.W. AND GRIESINGER, C.** (1994): A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *Journal of Biomolecular NMR*, **4**, 301–306.
- SCHUBERT, M.; LABUDE, D., OSCHKINAT, H. AND SCHMIEDER, P.** (2002): A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ^{13}C chemical shift statistics. *Journal of Biomolecular NMR*, **24**, 149–154.
- SEIP, S.; BALBACH, J. AND KESSLER, H.** (1992): Bestimmung der $\text{H}^N\text{-H}^\alpha$ -Kopplungskonstanten in großen isotopenmarkierten Proteinen. *Angewandte Chemie*, **104**, 1656–1658.

7. Literatur

- SITTE, P.; ZIEGLER, H.; EHRENDORFER, F. UND BRESINSKY, A.** (1991): Strasburger Lehrbuch der Botanik. 33. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1030 S.
- SMITH, L.J.; SUTCLIFFE M.J.; REDFIELD, C. AND DOBSON, C.M.** (1991): Analysis of phi and chi 1 torsion angles for hen lysozyme in solution from ¹H NMR spin-spin coupling constants. *Biochemistry*, **30**, 986–996.
- SØRENSEN, O.W.; EICH, G.W.; LEVIT, M.H.; BODENHAUSEN, G. AND ERNST, R.R.** (1983): Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments. *Progress in NMR Spectroscopy*, **16**, 163–192.
- STEINER, G.** (2001): NMR-Untersuchungen zur Struktur und Dynamik kleiner GTPasen und ihrer Effekte. *Dissertation – Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie, Universität Regensburg*, 181 S.
- STONEHOUSE, J.; CLOWES, R.T.; SHAW, G.L.; KEELER, J. AND LAUE, E.D** (1995): Minimization of Sensitivity losses due to the use of gradient pulses in triple-resonance NMR of proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, **5**, 226–232.
- STRAUB, F.B.** (1943). Actin. *Studies from the Inst. of Med. Chem. Univ. Szeged*, **2**, 3–15.
- SUMPER, M.** (2002): A phase separation model for the nanopatterning of diatom biosilica. *Science*, **295**, 2430–2433.
- SWIFT, D.M. AND WHEELER, A.P.** (1992): *Journal of Phycology*, **28**, 202, zitiert nach KRÖGER et al., 2002.
- SZILÁGYI, L. AND JARDETZKY, O.** (1989): α -Proton chemical shifts and secondary structure in proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, **83**, 441–449.
- TAKAHASHI, H.; NAKANISHI, T.; KAMI, K.; ARATA, YOJI AND SHIMADA, I.** (2000): A novel NMR method for determining the interfaces of large protein-protein complexes. *Nature Structural Biology*, **7**, 220–223.
- TIGELAAR, H.L. AND FLYGARE, W.H.** (1972): Molecular Zeeman effect in formamide and the α -proton chemical shift in poly(L-alanine). *Journal of the American Chemical Society*, **94**, 343–346.
- TITMAN, J.J. AND KEELER, J.** (1990): Measurement of homonuclear coupling constants from NMR correlation spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, **89**, 640–646.
- TJANDRA, N.; GRZESIEK, S. AND BAX, A.** (1996): Magnetic field dependence of nitrogen-proton *J* splittings in ¹⁵N-enriched human ubiquitin resulting from relaxation interference and residual dipolar coupling. *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 6264–6272.
- TJANDRA, N. AND BAX, A.** (1997): Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science*, **278**, 1111–1114.
- TOLMAN, J.R.; FLANAGAN, J.M.; KENNEDY, M.A. AND PRESTEGARD, J.H.** (1995): Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: Information for structure determination in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **92**, 9279–9283.
- VAN DE VEN, F.J.M.** (1995): Multidimensional NMR in liquids. Basic Principles and experimental methods. VCH New York, 399 S.
- VOLCANI, B.E.** (1981): Cell wall formation in diatoms: morphogenesis and biochemistry. In SIMPSON, T.L. AND VOLCANI, B.E. [Eds.] Silicon and siliceous structures in biological systems. Springer-Verlag, New York, 157–200.
- VOLD, R.R. AND PROSSER, R.S.** (1996): Magnetically oriented phospholipid bilayered micelles for structural studies of polypeptides. Does the ideal bicelle exist? *Journal of Magnetic Resonance B*, **113**, 267–271.
- WAGNER, G.; BRAUN, W.; HAVEL, T.F.; SCHAUMANN, T.; GO, N. AND WÜTHRICH, K.** (1987): Protein structures in solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry. The polypeptide fold of the basic pancreatic trypsin inhibitor determined using two different algorithms, DISGEO and DISMAN. *Journal of Molecular Biology*, **196**, 611–639.

7. Literatur

- WANG, A.C. AND BAX, A.** (1995): Reparametrization of the Karplus relation for $^3J(\text{H}^\alpha\text{-N})$ and $^3J(\text{H}^\text{N}\text{-C}')$ in peptides from uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched human ubiquitin. *Journal of the American Chemical Society*, **117**, 1810–1813.
- WANG, A.C. AND BAX, A.** (1996): Determination of the backbone dihedral angles Φ in human ubiquitin from reparametrized empirical Karplus Equations. *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 2483–2494.
- WATERKEYN, L. ET BIENFAIT, A.** (1987): Localisation et rôle des β -1,3-glucanes (calluna et chrysolaminarine) dans le genre *Pinnularia* (Diatomées). *La Cellule*, **74**, 189–226.
- WEISS, M.S.; JABS, A. AND HILGENFELD, R.** (1998): Peptide bonds revisited. *Nature Structural Biology*, **5**, 676
- WENZLER, M.; BRUNNER, E.; KRÖGER, N.; LEHMANN, G.; SUMPER, M. AND KALBITZER, H.R.** (2001): ^1H , ^{13}C and ^{15}N sequence-specific resonance assignment of the PSCD4 domain of diatom cell wall protein pleuralin-1. *Journal of Biomolecular NMR*, **20**, 191–192.
- WERNER, D.** (1977): Introduction with a note on taxonomy. In WERNER, D. [Ed.] *Biology of diatoms. Botanical Monographs*, **13**, Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K., 1–17.
- WILLIAMSON, M.P.; HAVEL, T.F. AND WÜTHRICH, K.** (1985): Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ^1H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Journal of Molecular Biology*, **182**, 295–315.
- WILLIAMSON, M.P. AND ASAOKURA, T.** (1993): Empirical comparisons of models for chemical-shift calculation in proteins. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* **101**, 63–71.
- WISHART, D.S.; SYKES, B.D. AND RICHARDS, F.M.** (1991): Relationships between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *Journal of Molecular Biology*, **222**, 311–333.
- WISHART, D.S. AND SYKES, B.D.** (1994): The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR*, **4**, 171–180.
- WISHART D.S.; BIGAM C.G.; YAO, J.; ABILDGAARD, F.; DYSON, H.J.; OLDFIELD, E.; MARKLEY, J.L. AND SYKES, B.D.** (1995): ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, **2**, 135–140.
- WISHART, D.S.; BIGAM, C.G.; HODGES, R.S. AND SYKES, B.D.** (1995a): ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigation of nearest-neighbour effects. *Journal of Biomolecular NMR*, **5**, 67–81.
- WLODAWER, A.; NACHMAN, J. AND GILLILAND, G.L.** (1987): Structure of form III crystals of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor. *Journal of Molecular Biology*, **198**, 469–480.
- WÜTHRICH, K.** (1986): NMR of proteins and nucleic acids. Wiley New York, 292 S.
- WÜTHRICH, K.; BILLETER, M. AND BRAUN, W.** (1984): Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances. *Journal of Molecular Biology*, **180**, 715–740.
- ZWECKSTETTER, M. AND BAX, A.** (2000): Prediction of sterically induced alignment in a dilute liquid crystalline phase: Aid to protein structure determination by NMR. *Journal of the American Chemical Society*, **122**, 3791–3792.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Hans Robert Kalbitzer für die Ermöglichung dieser Arbeit herzlich bedanken. Er hatte während der ganzen Zeit, trotz eines sehr vollen Terminkalenders, ein offenes Ohr für Fragen und auch stets eine Menge Ideen, wie auftretende Probleme zu lösen sind. Besonders schätzte ich das angenehme und offene Klima in seiner Arbeitsgruppe.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gebührt Prof. Eike Brunner für seine gute Betreuung. Besonders zu Beginn meiner Arbeit nahm er sich viel Zeit für meine Einführung in die NMR-Spektroskopie und das Bedienen der Spektrometer. Aber auch später hatte er immer die Zeit über meine Probleme nachzudenken und diese mit mir zu diskutieren oder auch mal ein paar motivierende Worte zu finden („Tun Sie das, heute noch!“). Vielen Dank!

Danken möchte ich auch Prof. Manfred Sumper, PD Nils Kröger und Gerhard Lehmann vom Lehrstuhl für Biochemie I der Universität Regensburg für die Kooperation in diesem Projekt. Besonders zu erwähnen ist Gerhard Lehmann, der das His₆PSCD4-Konstrukt kloniert und exprimiert hat, sowie die Lage von 3 SS-Brücken bestimmt hat. In diesem Zusammenhang habe ich auch Dr. Rainer Deutzmann und Eduard Hochmut für massenspektroskopische Messungen und die Sequenzanalyse zahlreicher Peptide per Edman-Abbau zu danken.

Für weitere Versuche die Positionen der SS-Brücken zu bestimmen, ist Dr. Roland Kellner und Andreas Schönemann von Merk (Darmstadt) und Prof. Helmut Meyer, Dr. Albert Sickmann und Jörg Reinders von der Ruhr-Universität Bochum zu danken.

Andreas Möglich sei an dieser Stelle für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit beim MOCCA-SIAM-Projekt und auch für die Freundschaft gedankt. Im Rahmen dieses Projektes möchte ich auch Prof. Steffen Glaser und seinem Doktoranden Frank Kramer von der Technischen Universität München für die fruchtbare und freundschaftliche Kooperation danken.

Prof. Ad Bax sei für das zur Verfügungstellen der Pulspogramme zur Messung der J-modulierten HSQCs gedankt.

Johannes Landskron sei für die Verbesserungen der Diagonalisierungsroutine im Programm für die Vorhersage des magn. Suszeptibilitätstensors und verschiedene Änderungen, die zum Einbau in Auremol notwendig waren, welche er im Rahmen eines Praktikums durchgeführt hat, gedankt.

Besonderer Dank gilt PD Wolfram Gronwald, der trotz großer zeitlicher Belastung wegen seiner Habilitation, Vorstellungsvorträgen etc., sich immer Zeit nahm für meine Fragen zur NMR oder zu Auremol. Auremol, da war noch was (nein kein Bug): Bedanken möchte ich

8. Danksagung

mich auch bei allen Auremol-Programmierern für das schöne Programm. Besonders bei Dr. Bernhard Ganselmeier und Jochen Trenner für das geduldige Beantworten meiner Fragen und den anhaltenden Humor trotz manch eines Bugreports von meiner Seite. Josef Schreiber danke ich für die Erzeugung diverser *Restraint*-Dateien zum Modelling der PSCD-Domänen. Lieber Björni (alias Dr. Björn Heitmann), du wirst auch nicht vergessen. Dir als meinem langjährigen Zimmergenossen danke ich für viele wissenschaftliche Diskussionen, eine Einführung in Baseball, manch wertvollen Tipp beim Skating (Bogen treten) und die Hilfe bei meinen Bewerbungen in England. Es war wirklich eine nette Zeit.

Dr. habil. Werner Kremer und Dr. habil. Till Maurer nahmen sich ebenfalls stets Zeit, um meine Fragen zu diskutieren, vielen Dank (das Danken wiederholt sich, aber das ist das Wesen einer Danksagung).

Des Weiteren danke ich ganz herzlich Dr. Jörg Bomke für viele Diskussionen über NMR, Biochemie und andere Dinge, Dr. Harry Kany für die Einführung in die HPLC und die langen Diskussionen über Wissenschaft, Gott und die Welt, meinem alten Zimmerkollegen Dr. Guido Steiner für die viele Hilfe in Sachen Unix und für meine Bekehrung zu Perl und Dr. Michael Spörner für viele Diskussionen und allen zusammen für die nette Zeit.

Meinen letzten Zimmergenossen Guido, Björni, Sonja Lorenz und Adriana Campeanu möchte ich für die nette Atmosphäre danken.

Dank gilt auch allen Leuten in unserem Biochemielabor, besonders Emmi Fuchs, Christina Schreier und Dörte Rochelt, welche stets hilfsbereit waren, wenn ich dort wirken durfte.

Auch allen anderen Mitgliedern der Gruppen von Prof. Brunner und Prof. Kalbitzer möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima herzlich danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des SFB 521.

Meiner Mutter und Frau Kuno sei für das Korrekturlesen der Arbeit gedankt.

Herzlich danken möchte ich auch meinen Eltern, die meine Pläne seit vielen Jahren (schon über 31) unterstützen und mir mein Studium ermöglicht haben.

Als Letztes möchte ich von Herzen Konstanze für ihre Liebe, ihre tatkräftige Unterstützung meiner Pläne als Post-Doc nach Schottland zu gehen und ihre großen Geduld in der Endphase dieser Arbeit danken.

9 Anhang

9.1 Die chemischen Verschiebungen von His₆PSCD4

Tyr	2	CA	57,79	Pro	15	CB	31,47	Pro	21	CA	62,92
Tyr	2	CB	40,55	Pro	15	HB3	2,21	Pro	21	HA	4,77
Tyr	2	C	175,33	Pro	15	HB2	1,90	Pro	21	CB	32,20
Tyr	3	N	114,95	Pro	15	CG	26,92	Pro	21	HB3	2,32
Tyr	3	HN	7,65	Pro	15	CD	50,69	Pro	21	HB2	1,95
Tyr	3	CA	59,00	Pro	15	HD3	3,67	Pro	21	CG	27,12
Tyr	3	HA	4,77	Pro	15	HD2	2,79	Pro	21	CD	50,33
His	5	CA	56,70	Pro	15	C	177,97	Pro	21	C	176,98
His	5	HA	3,97	Glu	16	N	115,59	Ser	22	N	116,88
His	5	CB	30,07	Glu	16	HN	8,16	Ser	22	HN	8,57
His	5	HB3	3,20	Glu	16	CA	55,18	Ser	22	CA	58,49
His	5	HB2	3,11	Glu	16	HA	3,81	Ser	22	HA	4,37
His	5	C	176,39	Glu	16	CB	31,00	Ser	22	CB	64,28
His	8	CA	55,00	Glu	16	HB3	2,18	Ser	22	HB3	3,92
His	8	CB	31,16	Glu	16	HB2	2,11	Ser	22	HB2	3,84
His	9	N	120,41	Glu	16	CG	31,79	Ser	22	C	174,32
His	9	HN	8,35	Glu	16	HG	2,63	Asp	23	N	121,37
His	9	CA	56,17	Glu	16	CD	177,06	Asp	23	HN	8,44
His	9	HA	4,65	Pro	17	CA	63,18	Asp	23	CA	53,64
His	9	CB	30,27	Pro	17	HA	4,45	Asp	23	HA	4,57
His	9	HB	3,08	Pro	17	CB	31,79	Asp	23	CB	40,34
His	9	C	175,59	Pro	17	HB3	2,28	Asp	23	HB3	2,67
Thr	10	N	114,95	Pro	17	HB2	1,97	Asp	23	HB2	2,51
Thr	10	HN	8,12	Pro	17	CG	26,89	Asp	23	CG	180,07
Thr	10	CA	61,36	Pro	17	CD	48,88	Asp	23	C	176,70
Thr	10	HA	4,12	Pro	17	HD3	3,85	Cys	24	N	118,48
Thr	10	CB	70,11	Pro	17	HD2	3,75	Cys	24	HN	8,30
Thr	10	HB	4,02	Ser	18	N	115,59	Cys	24	CA	56,90
Thr	10	CG2	21,20	Ser	18	HN	8,43	Cys	24	HA	4,56
Thr	10	HG2	1,20	Ser	18	CA	57,43	Cys	24	CB	40,52
Thr	10	C	172,91	Ser	18	HA	4,33	Cys	24	HB3	3,17
Met	11	N	120,41	Ser	18	CB	61,17	Cys	24	HB2	3,10
Met	11	HN	7,91	Ser	18	HB	3,80	Cys	24	C	175,20
Met	11	CA	58,74	Ser	19	N	117,16	Gly	25	N	109,17
Met	12	N	123,62	Ser	19	HN	8,30	Gly	25	HN	8,49
Met	12	HN	8,01	Ser	19	CA	58,15	Gly	25	CA	45,68
Met	12	CA	52,73	Ser	19	HA	4,38	Gly	25	HA	3,86
Pro	13	CA	62,82	Ser	19	CB	64,00	Gly	25	C	174,87
Pro	13	HA	4,38	Ser	19	HB	3,80	Glu	26	N	120,29
Pro	13	CB	31,50	Ser	19	C	174,30	Glu	26	HN	8,00
Pro	13	HB3	2,19	Gln	20	N	122,03	Glu	26	CA	58,06
Pro	13	HB2	1,89	Gln	20	HN	8,30	Glu	26	HA	4,14
Pro	13	CG	26,98	Gln	20	CA	53,27	Glu	26	CB	29,63
Pro	13	HG	1,92	Gln	20	HA	4,72	Glu	26	HB	2,05
Pro	13	CD	50,57	Gln	20	CB	29,13	Glu	26	CG	35,90
Pro	13	HD3	3,77	Gln	20	HB3	2,13	Glu	26	HG	2,27
Pro	13	HD2	3,65	Gln	20	HB2	1,97	Glu	26	C	176,20
Ser	14	N	114,63	Gln	20	CG	33,29	Val	27	N	116,50
Ser	14	HN	7,98	Gln	20	HG	2,40	Val	27	HN	7,01
Ser	14	CA	55,19	Gln	20	CD	180,45	Ile	28	CA	60,09
Ser	14	HA	4,39	Gln	20	NE2	111,74	Ile	28	HA	4,18
Ser	14	CB	65,53	Gln	20	HE21	7,56	Ile	28	CB	38,20
Pro	15	CA	62,94	Gln	20	HE22	6,86	Ile	28	HB	1,86
Pro	15	HA	4,36	Gln	20	C	174,09	Ile	28	CG1	26,45

9. Anhang

Ile	28	HG13	1,46	Cys	36	HB3	3,20	Asp	42	HA	4,58
Ile	28	HG12	1,18	Cys	36	HB2	2,35	Asp	42	CB	43,54
Ile	28	CG2	17,38	Cys	36	C	174,87	Asp	42	HB3	3,02
Ile	28	HG2	0,90	Phe	37	N	116,55	Asp	42	HB2	2,40
Ile	28	CD1	12,04	Phe	37	HN	8,06	Asp	42	CG	178,96
Ile	28	HD1	0,84	Phe	37	CA	59,03	Asp	42	C	178,12
Glu	30	N	122,66	Phe	37	HA	4,13	Ser	43	N	124,91
Glu	30	HN	8,34	Phe	37	CB	36,60	Ser	43	HN	8,95
Glu	30	CA	55,20	Phe	37	HB3	3,26	Ser	43	CA	60,10
Glu	30	HA	4,65	Phe	37	HB2	2,76	Ser	43	HA	4,17
Glu	30	CB	32,60	Phe	37	HD	7,16	Ser	43	CB	62,77
Glu	30	HB	1,97	Phe	37	C	174,55	Ser	43	HB	3,96
Glu	30	HG	2,35	Leu	38	N	120,73	Ser	43	C	174,45
Glu	30	C	175,50	Leu	38	HN	7,12	Ala	44	N	123,94
Cys	31	N	123,94	Leu	38	CA	53,16	Ala	44	HN	9,41
Cys	31	HN	8,09	Leu	38	HA	4,47	Ala	44	CA	51,55
Cys	31	CA	52,67	Leu	38	CB	40,87	Ala	44	HA	4,27
Cys	31	HA	4,65	Leu	38	HB3	1,73	Ala	44	CB	17,91
Cys	31	HB	3,07	Leu	38	HB2	1,47	Ala	44	HB	1,31
Pro	32	CA	63,36	Leu	38	CG	26,45	Ala	44	C	177,59
Pro	32	HA	4,47	Leu	38	HG	0,94	Arg	45	N	122,66
Pro	32	CB	32,43	Leu	38	CD	24,85	Arg	45	HN	7,63
Pro	32	HB3	2,29	Leu	38	HD	0,84	Arg	45	CA	54,76
Pro	32	HB2	1,99	Pro	39	CA	62,36	Arg	45	HA	4,19
Pro	32	CG	26,91	Pro	39	HA	4,34	Arg	45	CB	30,73
Pro	32	CD	50,70	Pro	39	CB	31,81	Arg	45	HB3	1,78
Pro	32	HD	4,09	Pro	39	HB3	2,34	Arg	45	HB2	1,59
Ile	33	N	120,41	Pro	39	HB2	1,84	Arg	45	CG	27,52
Ile	33	HN	8,02	Pro	39	CG	27,65	Arg	45	HG3	2,29
Ile	33	CA	59,56	Pro	39	HG	2,09	Arg	45	HG2	1,87
Ile	33	HA	4,27	Pro	39	CD	49,50	Arg	45	CD	43,01
Ile	33	CB	39,20	Pro	39	HD3	3,84	Arg	45	HD	3,06
Ile	33	HB	1,76	Pro	39	HD2	3,63	Arg	45	NE	127,48
Ile	33	CG1	26,54	Pro	39	C	177,91	Arg	45	HE	6,75
Ile	33	HG13	1,32	Lys	40	N	118,80	Arg	45	CZ	159,21
Ile	33	HG12	0,95	Lys	40	HN	8,66	Arg	45	C	175,39
Ile	33	CG2	17,38	Lys	40	CA	58,50	Pro	46	CA	61,17
Ile	33	HG2	0,86	Lys	40	HA	3,88	Pro	46	HA	4,52
Ile	33	CD1	13,10	Lys	40	CB	31,26	Pro	46	CB	29,12
Ile	33	HD1	0,78	Lys	40	HB3	1,89	Pro	46	HB3	2,28
Ile	33	C	176,30	Lys	40	HB2	1,75	Pro	46	HB2	1,88
Asp	34	N	130,69	Lys	40	CG	26,45	Pro	46	CD	50,49
Asp	34	HN	9,02	Lys	40	HG3	1,60	Pro	46	HD3	3,92
Asp	34	CA	57,13	Lys	40	HG2	1,28	Pro	46	HD2	2,94
Asp	34	HA	4,46	Lys	40	CD	28,35	Pro	47	CA	60,63
Asp	34	CB	36,00	Lys	40	HD	1,71	Pro	47	HA	4,42
Asp	34	HB3	2,27	Lys	40	CE	41,41	Pro	47	CB	31,79
Asp	34	HB2	1,85	Lys	40	HE	2,96	Pro	47	HB3	2,24
Asp	34	CG	184,11	Lys	40	HZ	8,29	Pro	47	HB2	1,89
Asp	34	C	173,25	Lys	40	C	176,85	Pro	47	CG	26,99
Ala	35	N	131,50	Ser	41	N	109,17	Pro	47	HG	2,03
Ala	35	HN	7,95	Ser	41	HN	7,57	Pro	47	CD	48,88
Ala	35	CA	53,45	Ser	41	CA	56,89	Pro	47	HD3	3,75
Ala	35	HA	4,11	Ser	41	HA	4,23	Pro	47	HD2	3,59
Ala	35	CB	19,77	Ser	41	CB	62,23	Pro	47	C	177,30
Ala	35	HB	1,32	Ser	41	HB3	4,07	Asp	48	N	120,73
Ala	35	C	177,89	Ser	41	HB2	3,76	Asp	48	HN	8,73
Cys	36	N	113,98	Ser	41	HG	4,74	Asp	48	CA	54,22
Cys	36	HN	7,66	Ser	41	C	174,03	Asp	48	HA	5,17
Cys	36	CA	57,96	Asp	42	N	125,55	Asp	48	CB	39,27
Cys	36	HA	4,30	Asp	42	HN	7,97	Asp	48	HB3	2,89
Cys	36	CB	38,20	Asp	42	CA	53,69	Asp	48	HB2	2,47

9. Anhang

Asp	48	CG	178,75	Pro	55	HB2	2,14	Phe	62	CB	39,80
Asp	48	C	178,53	Pro	55	CG	26,95	Phe	62	HB3	3,21
Cys	49	N	122,34	Pro	55	HG3	2,60	Phe	62	HB2	3,03
Cys	49	HN	8,03	Pro	55	HG2	2,08	Phe	62	HD	7,52
Cys	49	CA	56,89	Pro	55	CD	49,95	Phe	62	HE	7,58
Cys	49	HA	4,24	Pro	55	HD3	3,90	Phe	62	HZ	7,87
Cys	49	CB	39,80	Pro	55	HD2	3,48	Phe	62	C	174,91
Cys	49	HB3	3,30	Pro	55	C	177,98	Pro	63	CA	62,23
Cys	49	HB2	2,36	Asp	56	N	116,55	Pro	63	HA	4,25
Cys	49	C	176,81	Asp	56	HN	9,55	Pro	63	CB	32,86
Thr	50	N	109,49	Asp	56	CA	54,22	Pro	63	HB3	2,10
Thr	50	HN	8,57	Asp	56	HA	4,19	Pro	63	HB2	1,76
Thr	50	CA	64,37	Asp	56	CB	36,60	Pro	63	CG	27,52
Thr	50	HA	3,65	Asp	56	HB3	2,75	Pro	63	HG3	2,19
Thr	50	CB	67,04	Asp	56	HB2	2,51	Pro	63	HG2	1,80
Thr	50	HB	4,27	Asp	56	CG	181,70	Pro	63	CD	50,49
Thr	50	CG2	22,18	Asp	56	C	175,43	Pro	63	HD3	4,12
Thr	50	HG2	1,26	Cys	57	N	114,95	Pro	63	HD2	2,94
Thr	50	C	176,68	Cys	57	HN	7,40	Pro	63	C	177,40
Ala	51	N	124,26	Cys	57	CA	56,36	Asn	64	N	120,09
Ala	51	HN	7,14	Cys	57	HA	4,30	Asn	64	HN	8,49
Ala	51	CA	53,16	Cys	57	CB	43,01	Asn	64	CA	52,62
Ala	51	HA	4,41	Cys	57	HB3	3,35	Asn	64	HA	4,73
Ala	51	CB	18,44	Cys	57	HB2	3,05	Asn	64	CB	39,27
Ala	51	HB	1,67	Cys	57	C	172,60	Asn	64	HB3	3,01
Ala	51	C	178,62	Asn	58	N	117,84	Asn	64	HB2	2,88
Val	52	N	108,20	Asn	58	HN	7,29	Asn	64	CG	176,82
Val	52	HN	7,02	Asn	58	CA	51,02	Asn	64	ND2	111,74
Val	52	CA	59,03	Asn	58	HA	4,68	Asn	64	HD21	7,64
Val	52	HA	4,69	Asn	58	CB	37,13	Asn	64	HD22	6,90
Val	52	CB	30,19	Asn	58	HB3	3,26	Asn	64	C	176,86
Val	52	HB	2,59	Asn	58	HB2	2,22	Asn	65	N	115,91
Val	52	CG1	21,14	Asn	58	CG	177,30	Asn	65	HN	8,40
Val	52	HG1	0,95	Asn	58	ND2	113,34	Asn	65	CA	52,62
Val	52	CG2	18,44	Asn	58	HD21	7,97	Asn	65	HA	4,97
Val	52	HG2	0,93	Asn	58	HD22	6,71	Asn	65	CB	37,67
Val	52	C	175,99	Asn	58	C	173,60	Asn	65	HB3	3,03
Gly	53	N	106,92	Val	59	N	119,12	Asn	65	HB2	2,80
Gly	53	HN	7,51	Val	59	HN	8,05	Asn	65	CG	178,04
Gly	53	CA	45,68	Val	59	CA	60,10	Asn	65	ND2	111,09
Gly	53	HA3	4,04	Val	59	HA	4,35	Asn	65	HD21	7,57
Gly	53	HA2	3,88	Val	59	CB	35,00	Asn	65	HD22	6,77
Gly	53	C	174,03	Val	59	HB	1,91	Asn	65	C	175,85
Arg	54	N	113,66	Val	59	CG1	20,05	Ile	66	N	111,42
Arg	54	HN	7,69	Val	59	HG1	0,83	Ile	66	HN	7,75
Arg	54	CA	48,88	Val	59	CG2	20,05	Ile	66	CA	60,10
Arg	54	HA	5,06	Val	59	HG2	0,77	Ile	66	HA	4,76
Arg	54	CB	28,06	Leu	60	N	118,48	Ile	66	CB	38,20
Arg	54	HB3	1,82	Leu	60	HN	7,65	Ile	66	HB	2,13
Arg	54	HB2	1,53	Leu	60	CA	51,02	Ile	66	CG1	26,45
Arg	54	CG	24,32	Leu	60	HA	4,78	Ile	66	HG13	1,30
Arg	54	HG	1,45	Leu	60	CB	43,54	Ile	66	HG12	0,65
Arg	54	CD	39,27	Leu	60	HB3	1,63	Ile	66	CG2	16,84
Arg	54	HD	3,37	Leu	60	HB2	1,28	Ile	66	HG2	0,78
Arg	54	NE	124,58	Leu	60	CG	26,99	Ile	66	CD1	13,64
Arg	54	HE	9,27	Leu	60	HG	1,65	Ile	66	HD1	0,65
Arg	54	CZ	159,054	Leu	60	CD1	23,78	Ile	66	C	177,00
Arg	54	C	174,22	Leu	60	HD1	1,03	Gly	67	N	113,66
Pro	55	CA	64,37	Leu	60	CD2	25,39	Gly	67	HN	8,69
Pro	55	HA	4,12	Leu	60	HD2	0,91	Gly	67	CA	46,73
Pro	55	CB	30,72	Phe	62	CA	55,29	Gly	67	HA2	3,86
Pro	55	HB3	2,29	Phe	62	HA	5,29	Gly	67	HA3	3,79

9. Anhang

Gly	67	C	176,38	Phe	74	HD	7,23	Pro	81	CA	62,80
Cys	68	N	119,45	Phe	74	HE	7,37	Pro	81	HA	4,40
Cys	68	HN	9,01	Phe	74	HZ	7,32	Pro	81	CB	32,63
Cys	68	CA	55,83	Phe	74	C	176,64	Pro	81	HB3	2,26
Cys	68	HA	4,40	Glu	75	N	114,55	Pro	81	HB2	1,92
Cys	68	CB	41,94	Glu	75	HN	9,20	Pro	81	CG	27,03
Cys	68	HB3	3,19	Glu	75	CA	57,43	Pro	81	HG3	2,70
Cys	68	HB2	2,72	Glu	75	HA	3,97	Pro	81	HG2	2,06
Cys	68	C	173,38	Glu	75	CB	29,66	Pro	81	CD	50,89
Pro	69	CA	61,17	Glu	75	HB3	2,18	Pro	81	HD3	3,85
Pro	69	HA	4,78	Glu	75	HB2	1,89	Pro	81	HD2	3,68
Pro	69	CB	31,79	Glu	75	CG	37,13	Pro	81	C	176,63
Pro	69	HB3	2,26	Glu	75	HG3	2,38	Met	82	N	122,66
Pro	69	HB2	2,00	Glu	75	HG2	2,31	Met	82	HN	8,40
Pro	69	CG	25,92	Glu	75	CD	177,22	Met	82	CA	55,18
Pro	69	HG3	2,19	Glu	75	C	177,37	Met	82	HA	4,33
Pro	69	HG2	1,50	Cys	76	N	117,52	Met	82	HB3	1,86
Pro	69	CD	49,95	Cys	76	HN	7,43	Met	82	HB2	1,53
Pro	69	HD	3,80	Cys	76	CA	51,58	Phe	83	CA	56,28
Pro	69	C	174,35	Cys	76	HA	4,43	Phe	83	HA	4,34
Ser	70	N	111,74	Cys	76	CB	36,30	Phe	83	CB	39,23
Ser	70	HN	8,26	Cys	76	HB3	2,86	Phe	83	HB3	2,74
Ser	70	CA	58,06	Cys	76	HB2	2,31	Phe	83	HB2	2,71
Ser	70	HA	4,31	Cys	76	C	170,86	Pro	85	CA	61,70
Ser	70	CB	64,04	Ser	77	N	113,66	Pro	85	HA	4,51
Ser	70	HB	3,77	Ser	77	HN	6,95	Pro	85	CB	33,93
Ser	70	C	173,13	Ser	77	CA	53,16	Pro	85	HB3	2,43
Cys	71	N	121,37	Ser	77	HA	4,87	Pro	85	HB2	2,05
Cys	71	HN	7,68	Ser	77	CB	65,44	Pro	85	CG	24,85
Cys	71	CA	53,16	Ser	77	HB3	3,92	Pro	85	HG	1,91
Cys	71	HA	5,28	Ser	77	HB2	3,38	Pro	85	CD	50,27
Cys	71	CB	43,01	Ser	77	C	176,86	Pro	85	HD	3,96
Cys	71	HB3	3,04	Pro	78	CA	63,74	Pro	85	C	175,40
Cys	71	HB2	2,95	Pro	78	HA	4,52	Ser	86	N	115,27
Cys	71	C	170,75	Pro	78	CB	30,95	Ser	86	HN	8,06
Cys	72	N	116,88	Pro	78	HB3	2,27	Ser	86	CA	55,07
Cys	72	HN	9,15	Pro	78	HB2	2,02	Pro	87	CA	64,58
Cys	72	CA	51,55	Pro	78	CG	26,57	Pro	87	HA	4,39
Cys	72	HA	5,14	Pro	78	HG	1,80	Pro	87	CB	31,39
Cys	72	CB	41,94	Pro	78	CD	50,34	Pro	87	HB3	2,33
Cys	72	HB3	3,17	Pro	78	HD3	3,90	Pro	87	HB2	1,94
Cys	72	HB2	2,89	Pro	78	HD2	3,70	Pro	87	CG	27,26
Cys	72	C	172,78	Pro	78	C	175,95	Pro	87	HG	2,06
Pro	73	CA	62,23	Asp	79	N	116,87	Pro	87	CD	50,96
Pro	73	HA	4,77	Asp	79	HN	7,90	Pro	87	HD	3,67
Pro	73	CB	32,86	Asp	79	CA	53,69	Pro	87	C	176,80
Pro	73	HB3	2,73	Asp	79	HA	4,60	Asp	88	N	114,95
Pro	73	HB2	1,84	Asp	79	CB	40,16	Asp	88	HN	7,85
Pro	73	CG	28,05	Asp	79	HB3	2,70	Asp	88	CA	53,65
Pro	73	HG3	2,91	Asp	79	HB2	2,43	Asp	88	HA	4,56
Pro	73	HG2	2,32	Asp	79	CG	179,85	Asp	88	CB	40,23
Pro	73	CD	52,09	Asp	79	C	175,87	Asp	88	HB3	2,86
Pro	73	HD3	4,37	Asn	80	N	122,01	Asp	88	HB2	2,61
Pro	73	HD2	3,61	Asn	80	HN	7,41	Asp	88	CG	180,56
Pro	73	C	176,91	Asn	80	CA	51,96	Asp	88	C	176,85
Phe	74	N	127,48	Asn	80	HA	4,65	Gly	89	N	108,53
Phe	74	HN	9,31	Asn	80	CB	38,11	Gly	89	HN	8,24
Phe	74	CA	60,10	Asn	80	HB	3,00	Gly	89	CA	45,00
Phe	74	HA	4,28	Asn	80	ND2	112,06	Gly	89	HA2	4,23
Phe	74	CB	38,20	Asn	80	HD21	7,56	Gly	89	HA3	3,65
Phe	74	HB3	3,38	Asn	80	HD22	6,93	Gly	89	C	174,70
Phe	74	HB2	3,15	Asn	80	C	173,51	Ser	90	N	118,48

9. Anhang

Ser	90	HN	8,10	Met	98	CG	31,62	Ser	105	HB	3,87
Ser	90	CA	57,54	Met	98	HG	2,47	Ser	105	C	174,25
Ser	90	HA	4,65	Met	98	C	174,23	Ala	106	N	125,87
Ser	90	CB	62,22	Leu	99	N	122,33	Ala	106	HN	8,28
Ser	90	HB	3,87	Leu	99	HN	7,88	Ala	106	CA	52,91
Pro	92	CA	63,03	Leu	99	CA	52,06	Ala	106	HA	4,19
Pro	92	HA	4,43	Leu	99	HA	4,23	Ala	106	CB	18,59
Pro	92	CB	31,45	Leu	99	CB	41,20	Ala	106	HB	1,38
Pro	92	HB3	2,23	Leu	99	HB	1,68	Ala	106	C	177,48
Pro	92	HB2	1,91	Leu	99	CG	26,35	Val	107	N	119,12
Pro	92	CG	26,86	Leu	99	HG	1,68	Val	107	HN	8,08
Pro	92	HG	1,98	Leu	99	CD1	23,32	Val	107	CA	62,20
Pro	92	CD	50,65	Leu	99	HD1	1,06	Val	107	HA	4,10
Pro	92	HD	3,69	Leu	99	CD2	25,09	Val	107	CB	32,19
Pro	92	C	176,49	Leu	99	HD2	0,93	Val	107	HB	2,06
Asn	93	N	121,37	Pro	100	CA	62,74	Val	107	CG1	20,35
Asn	93	HN	8,25	Pro	100	HA	4,41	Val	107	HG1	0,93
Asn	93	CA	54,01	Pro	100	CB	31,63	Val	107	CG2	20,35
Asn	93	HA	4,62	Pro	100	HB3	2,22	Val	107	HG2	0,88
Asn	93	CB	39,56	Pro	100	HB2	1,86	Val	107	C	176,28
Asn	93	HB	2,71	Pro	100	CG	27,04	Thr	108	N	118,80
Asn	93	CG	176,42	Pro	100	HG	1,98	Thr	108	HN	8,25
Asn	93	ND2	112,06	Pro	100	CD	50,49	Thr	108	CA	62,20
Asn	93	HD21	7,42	Pro	100	HD3	3,78	Thr	108	HA	4,33
Asn	93	HD22	6,98	Pro	100	HD2	3,66	Thr	108	CB	70,11
Asn	93	C	174,98	Pro	100	C	176,13	Thr	108	HB	4,11
Cys	94	N	118,80	Ser	101	N	116,87	Thr	108	HG2	1,18
Cys	94	HN	8,37	Ser	101	HN	8,35	Thr	108	C	174,05
Cys	94	CA	54,60	Ser	101	CA	55,91	Val	109	N	124,26
Cys	94	HA	4,72	Ser	101	HA	4,43	Val	109	HN	8,18
Cys	94	CB	40,34	Ser	101	CB	63,93	Val	109	CA	59,54
Cys	94	HB3	3,26	Ser	101	HB	3,85	Val	109	HA	4,43
Cys	94	HB2	3,00	Pro	102	CA	62,58	Val	109	HB	2,09
Cys	94	C	173,92	Pro	102	HA	4,16	Val	109	HG2	0,91
Ser	95	N	118,30	Pro	102	CB	33,67	Pro	110	CA	62,40
Ser	95	HN	8,43	Pro	102	HB3	2,36	Pro	110	HA	4,42
Ser	95	CA	56,30	Pro	102	HB2	2,08	Pro	110	CB	37,72
Ser	95	HA	4,76	Pro	102	CG	24,85	Pro	110	HB3	2,46
Ser	95	CB	63,24	Pro	102	HG	1,91	Pro	110	HB2	2,00
Ser	95	HB3	3,88	Pro	102	CD	49,47	Pro	110	CG	25,43
Ser	95	HB2	3,78	Pro	102	HD	3,53	Pro	110	HG	1,89
Pro	96	CA	63,51	Pro	102	C	177,16	Pro	110	CD	50,34
Pro	96	HA	4,43	Ser	103	N	117,20	Pro	110	HD	3,50
Pro	96	CB	32,12	Ser	103	HN	8,61	Pro	110	C	175,50
Pro	96	HB3	2,24	Ser	103	CA	56,33	Leu	111	N	127,80
Pro	96	HB2	1,90	Ser	103	HB3	3,87	Leu	111	HN	9,36
Pro	96	CG	27,06	Ser	103	HB2	3,80	Leu	111	CA	55,83
Pro	96	CD	50,65	Pro	104	CA	63,39	Leu	111	HA	4,32
Pro	96	C	176,75	Pro	104	HA	4,77	Leu	111	CB	42,06
Thr	97	N	113,98	Pro	104	CB	31,53	Leu	111	HB3	1,78
Thr	97	HN	8,20	Pro	104	HB3	2,25	Leu	111	HB2	1,65
Thr	97	CA	62,05	Pro	104	HB2	1,99	Leu	111	CG	26,92
Thr	97	HA	4,50	Pro	104	CG	27,03	Leu	111	CD1	24,58
Thr	97	CB	69,70	Pro	104	HG	1,95	Leu	111	HD1	1,02
Thr	97	HB	4,17	Pro	104	CD	50,49	Leu	111	CD2	23,61
Thr	97	C	174,56	Pro	104	HD	3,69	Leu	111	HD2	0,94
Met	98	N	122,01	Pro	104	C	176,90	Leu	111	C	176,88
Met	98	HN	8,20	Ser	105	N	114,95	Thr	112	N	119,77
Met	98	CA	55,07	Ser	105	HN	8,40	Thr	112	HN	7,70
Met	98	HA	4,43	Ser	105	CA	58,06	Thr	112	CA	62,75
Met	98	CB	32,47	Ser	105	HA	4,43	Thr	112	HA	4,13
Met	98	HB	1,95	Ser	105	CB	64,04				

9.2 $^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungen, bestimmt aus dem HNCA-E.COSY-Spektrum

AA		$^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplung / Hz ¹	in Strukturrechnung verwendet ²
Met	11	8,5	nein
Glu	16	7,2	ja
Ser	19	4,7	ja
Asp	23	5,5	ja
Cys	36	4,3	ja
Leu	38	4,8	ja
Lys	40	2,8	ja
Ser	41	6,0	ja
Asp	42	4,5	ja
Ser	43	3,2	ja
Ala	44	7,1	nein
Arg	45	3,3	ja
Asp	46	3,1	ja
Cys	49	2,4	ja
Thr	50	3,9	ja
Ala	51	5,5	ja
Glu	52	8,4	ja
Arg	54	5,9	ja
Asp	56	4,3	ja
Cys	57	8,0	ja
Asn	58	6,1	ja
Val	59	5,6	ja
Leu	60	7,5	nein
Asn	64	7,0	nein
Asn	65	7,3	nein
Ile	66	8,2	ja
Cys	68	1,8	ja
Cys	71	6,0	ja
Cys	72	5,3	ja
Phe	74	2,0	ja
Glu	75	3,8	ja
Asp	79	8,1	ja
Met	82	7,1	nein
Ser	90	4,2	ja
Asn	93	5,5	ja
Thr	97	8,5	ja
Ala	106	5,6	nein
Val	107	7,5	nein
Thr	108	7,2	nein
Val	109	7,9	nein
Thr	112	8,6	nein

¹ Der Fehler für die Bestimmung der Kopplung ist $\pm 1,0$ Hz.

² In der Strukturrechnung wurden nur J-Kopplungen $\leq 6,0$ Hz oder $\geq 8,0$ Hz der Aminosäurereste 15 bis 103 verwendet.

9.3 $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -Restdipolkopplungen

AA		$J_{\text{isotrop}} / \text{Hz}^1$	$J_{\text{anisotrop}} / \text{Hz}^1$	Restdipol-kopplung / Hz ¹	In Strukturrechnung verwendet ²
Met	11	-93,0	-98,0	-5,0	nein
Ser	18	-92,7	-79,9	12,8	nein
Ser	19	-94,1	-97,7	-3,6	nein
Gln	20	-94,7	-97,0	-2,3	nein
Asp	23	-94,4	-94,8	-0,4	nein
Ile	28	-92,7	-94,2	-1,5	nein
Ile	33	-92,0	-98,8	-6,8	ja
Asp	34	-95,2	-113,2	-18,0	ja
Cys	36	-93,5	-100,2	-6,7	ja
Lys	40	-93,3	-93,7	-0,4	ja
Ser	41	-92,1	-83,9	8,2	ja
Asp	42	-94,7	-81,9	12,8	ja
Ser	43	-94,4	-90,5	3,9	ja
Ala	44	-94,1	-91,1	3,0	ja
Arg	45	-94,4	-100,2	-5,8	ja
Arg	45e ³	-95,5	-94,3	1,2	nein
Asp	48	-95,4	-100,6	-5,2	ja
Cys	49	-94,1	-83,9	10,2	ja
Thr	50	-93,9	-84,8	9,1	ja
Ala	51	-94,4	-97,6	-3,2	ja
Val	52	-92,4	-82,1	10,3	ja
Gly	53	-93,8	-100,2	-6,4	ja
Arg	54	-94,1	-91,4	2,7	ja
Arg	54e ³	-92,4	-89,4	3,0	nein
Asp	56	-93,5	-78,8	14,7	ja
Cys	57	-92,7	-90,7	2,0	ja
Asn	58	-92,1	-94,8	-2,7	ja
Val	59	-93,3	-97,1	-3,8	ja
Leu	60	-92,4	-98,4	-6,0	ja
Asn	64	-95,3	-83,1	12,2	ja
Asn	65	-95,9	-101,2	-5,3	ja
Ile	66	-92,1	-89,4	2,7	ja
Gly	67	-95,6	-103,4	-7,8	ja
Cys	68	-95,8	-88,5	7,3	ja
Cys	71	-93,0	-87,5	5,5	ja
Cys	72	-93,7	-91,7	2,0	ja
Glu	75	-95,7	-91,4	4,3	ja
Cys	76	-93,5	-87,5	6,0	ja

9. Anhang

Ser	77	-91,5	-95,2	-3,7	ja
Asp	79	-92,4	-85,9	6,5	ja
Ser	90	-94,1	-96,5	-2,4	nein
Asn	93	-94,1	-95,4	-1,3	nein
Met	98	-94,7	-91,4	3,3	nein
Ala	106	-94,4	-101,5	-7,1	nein
Val	107	-92,1	-102,9	-10,8	nein
Thr	108	-94,1	-101,4	-7,3	nein
Val	109	-93,8	-103,7	-9,9	nein
Thr	112	-92,7	-89,4	3,3	nein

¹ Der Fehler für die Bestimmung von J_{isotrop} bzw. $J_{\text{anisotrop}}$ wurde mit $\pm 1,2$ Hz angenommen. Somit ergibt sich der maximale Fehler für die Restdipolkopplung, welcher für diese Einschränkungen in der Strukturrechnung verwendet wurde, zu $\pm 2,4$ Hz.

² In der Strukturrechnung wurden nur Restdipolkopplungen zwischen den Rückgratatenen H^N und N aus dem rigiden Kern des Proteins von Aminosäurerest 30 bis 80 verwendet.

³ Das kleine e hinter der Nummer des Aminosäurerestes zeigt an, dass es sich um das N^e -Atom der Argininseitenkette handelt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln verwendet habe.

Regensburg, im April 2003

Michael Wenzler