

NMR-Lösungsstruktur des Proteins Saratin,
strukturelle Charakterisierung der
Saratin-Kollagen-Interaktion und des
Carausius-Morosus-Hyperthrehalosämischen-
Hormons (Cam-HrTH-I)



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

vorgelegt von

Barbara Domogalla

aus

Regensburg

durchgeführt am Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie
der Universität Regensburg
unter Anleitung von
Prof. Dr. Dr. Kalbitzer
März 2005

Promotionsgesuch eingereicht am 31.03.2005

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Kalbitzer

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Witzgall

1. Gutachter: Prof. Dr. Kalbitzer
(1. Prüfer)

2. Gutachter: Prof. Dr. Sterner
(2. Prüfer)

3. Prüfer: Prof. Dr. Warth

"Der Fortschritt der Wissenschaft,
das ist nicht nur die Weisheit der Alten,
das sind auch die Fragen der Jungen."

Heinz Riesenhuber (*1935) Bundesminister für
Forschung u. Technologie (1982-1993)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
2	GRUNDLAGEN	10
2.1	HÄMOSTASE UND DIE ROLLE VON KOLLAGEN	10
2.1.1	Kollagene	10
2.1.2	Hämostase	12
2.2	SARATIN - EIN INHIBITOR DER HÄMOSTASE	14
2.3	CAM-HRTH-I - EIN TRP SUBSTITUIERTES PROTEIN	17
2.4	NMR-METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON PROTEINEN	18
3	METHODEN UND EXPERIMENTE	21
3.1	STRUKTURAUFKLÄRUNG VON SARATIN	21
3.1.1	Proteinexpression und Isotopenmarkierung	21
3.1.2	Probenzusammensetzung und Spektrenaufnahme	21
3.1.3	NMR-Experimente zur Zuordnung der Resonanzen	22
3.1.3.1	Zuordnung der Hauptkette	22
3.1.3.2	Zuordnung der Seitenketten	24
3.1.4	Sekundärstrukturvorhersage	25
3.1.5	Bestimmung der strukturelevanten Parameter	27
3.1.5.1	NOE-Einschränkungen	27
3.1.5.2	Wasserstoff-Brücken	28
3.1.5.3	Residuale dipolare Kopplungen	29
3.1.5.4	Einschränkungen für dihedrale Winkel	31
3.1.5.5	Molekül-Dynamik	32
3.1.6	Strukturrechnung	33
3.1.6.1	Strukturrechnung mit CNS	33
3.1.6.2	Bewertung der Struktur	35
3.1.7	Strukturverfeinerung im Lösungsmittel Wasser	35
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR TEMPERATURSTABILITÄT VON SARATIN	36
3.3	BINDUNGSSTUDIE VON SARATIN UND KOLLAGEN-PEPTID	37
3.3.1	Bestimmung der Saratin-Bindungsfläche	37
3.3.1.1	Titrationsexperiment (^1H - ^{15}N -HSQC)	37
3.3.1.1.1	Datenauswertung	38
3.3.1.2	Das ^1H - ^{15}N -TROSY-Experiment	40
3.3.2	Bestimmung der Diffusionskoeffizienten	41
3.3.3	Untersuchungen des Kollagen-Peptides	43
3.3.3.1	Zuordnung der Resonanzen	43

3.3.3.2	Bindungsstudie des Kollagen-Peptides	43
3.4	MODELL DER KOMPLEXSTRUKTUR.....	44
3.4.1	Strukturmodell des Kollagen-Peptides	44
3.4.2	Saratin-Kollagen Docking mit HADDOCK	45
3.4.2.1	Cluster-Analyse.....	47
3.5	ZUORDNUNG VON CAM-HRTH-I	48
3.5.1	Probenzusammensetzung und Spektrenaufnahme	48
3.5.2	NMR-Experimente zur Zuordnung der Resonanzen	48
4	ERGEBNISSE	50
4.1	DIE LÖSUNGSSTRUKTUR VON SARATIN.....	50
4.1.1	Zuordnung der Resonanzen	50
4.1.2	Sekundärstruktur	53
4.1.2.1	Vorhersage durch chemische Verschiebung	53
4.1.2.2	Sekundärstrukturbestimmung durch NOE-Kontakte	56
4.1.2.3	Dynamik des Proteinrückgrats.....	59
4.1.3	Restraints für die Strukturrechnung.....	61
4.1.3.1	NOE-Kontakte.....	62
4.1.3.2	Wasserstoff-Brücken	63
4.1.3.3	Dihedrale Winkel.....	66
4.1.3.4	Residuale Dipolkopplungen	67
4.1.4	Tertiärstruktur von Saratin	68
4.1.5	Strukturverbesserung in Wasser	72
4.2	VERGLEICH VON SARATIN MIT ANDEREN PROTEINEN	75
4.2.1	Die Proteine Saratin, Eglin und LAPP	75
4.3	TEMPERATURSTABILITÄT VON SARATIN.....	78
4.4	INTERAKTION VON SARATIN UND KOLLAGEN.....	80
4.4.1	Bestimmung der Bindungsfläche von Saratin.....	80
4.4.2	Das ^1H - ^{15}N -TROSY-Experiment	87
4.4.3	Diffusionskoeffizienten von Saratin und Komplex	89
4.4.4	Untersuchungen des Kollagen-Peptids	91
4.4.4.1	Vorläufige Zuordnung	91
4.4.4.2	Bindungsstudie vom Kollagen-Peptid.....	93
4.5	MODELL DER KOMPLEXSTRUKTUR.....	93
4.5.1	Strukturmodell des Kollagen-Peptids.....	93
4.5.2	Modell der Komplexstruktur	95
4.5.2.1	Cluster-Analyse.....	99
4.6	MODIFIZIERUNG VON CAM-HRTH-I.....	100
4.6.1	Zuordnung der Resonanzen	100

5	DISKUSSION	106
5.1	TERTIÄRSTRUKTUR VON SARATIN.....	106
5.2	INTERAKTION VON SARATIN UND KOLLAGEN.....	108
5.3	CAM-HRTH-I: MODIFIKATION VON TRP8.....	113
6	ZUSAMMENFASSUNG	116
	Verzeichnis der Abkürzungen.....	119
	Literaturverzeichnis.....	120
	Anhang.....	123

1 Einleitung

Kollagen spielt eine wichtige strukturelle Rolle in der extrazellulären Matrix von Geweben. Unter normalen Umständen ist es dem Blutfluß nicht ausgesetzt. Bei Gefäßverletzungen kommt es mit Blut und seinen Bestandteilen in Berührung. Dies führt zur Aktivierung und Ausschüttung von einer Vielzahl von Pro-Aggregationsfaktoren, die in der Aggregation von Thrombozyten (Blutplättchen) und Ausbildung eines Thrombus an der verletzten Stelle gipfelt.

Durch Bindung der Thrombozyten an Kollagen werden sie und ihre Rezeptoren, wie der Fibrinogen-Rezeptor GP IIb/GP IIIa, aktiviert. Die Anheftung von Thrombozyten an Kollagen von verletzten Arterienwänden mit einer hohen Fließgeschwindigkeit wird vermittelt durch den von Willebrand Faktor (vWF). Er bindet an Kollagen und die vWF-Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten (GP Ib/IX) [Six97] und verstärkt die Anheftung der Thrombozyten an Kollagen. In Gefäßen mit einer niedrigen Fließgeschwindigkeit ist die Vermittlung durch den vWF nicht notwendig.

Die aktivierten Thrombozyten bilden Pseudopodien aus und aggregieren an der verletzten Stelle [Sad98]. Die ebenfalls aktivierten Fibrinogen-Rezeptoren binden an im Blut gelöstes Fibrinogen. Im letzten Schritt der Blut-Koagulation führt eine proteolytische Kaskade zur Spaltung des Fibrinogens in unlösliches Fibrin. Fibrin verbindet nahegelegene Thrombozyten und sorgt für Stabilität und Festigkeit des sich entwickelnden Thrombus. Somit kann der vWF als eine Brücke zwischen Kollagen und Thrombozyten agieren und ist, zumindest in Gefäßen mit hohen Fließgeschwindigkeiten, eine Grundvoraussetzung für die Anhaftung der Blutplättchen.

Die Prozess der Blutgerinnung (Hämostase) bewahrt uns bei äußeren oder inneren Verletzungen vor lebensbedrohlichem Blutverlust und dem Einwandern von Infektionselementen in die Wunde. Aber in manchen Fällen kann es lebenserhaltend sein diesen Mechanismus zu unterdrücken. Dies betrifft Patienten mit einer hohen Disposition zur Blut-Koagulation, Patienten mit einem hohen Herz-Infarkt-Risiko oder ganz allgemein nach invasiven Eingriffen. Seit vielen Jahren werden in diesen Bereichen in der Thrombose-Prävention oder Therapie verschiedene Koagulationsinhibitoren wie Heparin,

Cumarin-Derivate oder Acetylsalicylsäure (ASS) verwendet. Neben mehr oder minder schweren Nebenwirkungen ist ein Nachteil dieser Stoffe, daß sie systemisch angewendet werden und somit das komplette Gerinnungssystem des Organismus beeinflussen. So birgt die Anwendung derartiger Medikamente generell ein erhöhtes Blutungsrisiko, bis hin zum Tod.

Kardiovaskuläre¹ Krankheiten, wie die Atherosklerose oder Infakte, sind heutzutage einer der Hauptgründe der Mortalität in der westlichen Welt. Am Ende oft langer Krankengeschichten stehen häufig operative kardiovaskuläre Interventionen, die selbst das lebensbedrohliche Risiko der Thrombosis mit sich bringen. 2001 wurde ein weiterer Blutgerinnungshemmer, das in dieser Arbeit untersuchte Blutegel-Protein Saratin, entdeckt und charakterisiert [Bar01]. Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Antikoagulanzen, deren hemmende Wirkung auf Faktoren der Gerinnungskaskade zielen, inhibiert Saratin die Thrombozyten-Aggregation an der Gefäßwand durch Bindung an Kollagen [Bar01]. Man erhofft sich mit Saratin einen therapeutischen Wirkstoff gefunden zu haben der lokal die Blutgerinnung unterdrückt, ohne jedoch Einfluß auf die normalen hämostatischen Funktionen zu nehmen. In vivo Studien an Ratten, deren Karotis² nach vaskulären Eingriffen lokal mit Saratin behandelt wurden, zeigen, daß Saratin effizient die Aggregation der Thrombozyten im Operationsgebiet inhibiert und damit das Thromboserisiko deutlich reduziert. Der antithrombotische Effekt von lokal angewandtem Saratin konnte bereits auch in in vitro Studien am Menschen nachgewiesen werden [Vil04]. Die lokale Anwendung von Saratin auf human atherosklerotische Läsionen³ und Plaques führte zu einer Reduzierung der Thrombozyten Adhesion um 44% im Bereich von Läsionen und um 57% in Gefäßbereichen mit Atherosklerose Plaques.

Die Ergebnisse bisheriger Studien, die das Ziel haben die Wirkung von Saratin auf das hämostatische System aufzuklären und medizinische Anwendungsbereiche zu definieren, lassen das große therapeutische Potential von Saratin bei der Thromboseprävention nach invasiven vaskulären Eingriffen vermuten. Sie werfen aber auch die Frage nach dem Wirkungsmechanismus auf. Wir wissen zwar, daß der antithrombotische Effekt von Saratin auf der Inhibierung der Thrombozyten-Aggregation durch Bindung an Kollagen beruht, nicht aber in welcher Weise Saratin und Kollagen miteinander interagieren. Wie ist die Stöcheometrie des Saratin-Kollagen-Komplex? Bindet

¹ kardiovaskulär lat.: *cor* (Herz), *vas* (Gefäß)

² *Arteria carotis* (Halsschlag-Ader)

³ *laesus* lat.: *verletzt*

Saratin nur an spezifischen Regionen der Kollagen Tripelhelix? Wie sieht die Bindungsstelle von Saratin an Kollagen aus? Welche dreidimensionale Struktur hat Saratin und welche der Komplex?

Die Klärung dieser Fragen ist das Ziel dieser Arbeit. Ein zentrales Dogma der Molekularbiologie besagt, daß *sich die Wirkungsweise und Funktion von biologischen Makromolekülen über die Kenntnis ihrer Struktur und Dynamik unter physiologischen Bedingungen erschließt*. So liegt das Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit in der Lösung der dreidimensionalen Struktur von rekombinantem Saratin. Sie wird unter nahezu physiologischen Umständen mittels homo- und heteronuklearer Flüssigkeits-NMR entschlüsselt werden. Basierend auf der Tertiärstruktur von Saratin werden ferner die Wechselwirkungen von Saratin und Kollagen mit NMR-Methoden auf struktureller Ebene untersucht und computer-gesteuert ein Modell des Saratin-Kollagen-Komplexes entwickelt.

Das Insekten-Peptid Cam-HrTH-I ist ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit. Das Glykoprotein Cam-HrTH-I ist an der Aminosäure Tryptophan durch eine Hexose substituiert [Gäd92]. Eine glykosyliertes Tryptophan-Derivat wurde bis heute nur bei sehr wenigen Proteinen beobachtet, zum Beispiel bei der human RNase U_s [Hof94, Fur00]. Gewöhnlich findet man posttranslationale Glykosylierungen nur an den Resten Asparagin (N-Glykosylierung) und an Serin, bzw. Threonin (O-Glykosylierung). Hofsteenge et al. wies mit NMR-Methoden nach, daß es sich bei der Modifikation der RNase U_s um keinen der beiden bekannten glykosidischen Bindungstypen (N- oder O-glykosidische Bindung) handelt. Der Tryptophan-Rest von U_s ist am Kohlenstoff CD1 des Indol-Ringes substituiert. Dabei handelt es sich um einen neuartigen Bindungstyp, der sogenannten "C-Glykosylierung".

In dieser Arbeit wird auf der Basis von NMR-Experimenten untersucht werden, an welcher Position der Indol-Ring des Tryptophans von Cam-HrTH-I durch die Hexose substituiert ist und ob die Modifikation der RNase U_s bei dem Insekten-Neuropeptid nachvollzogen werden kann.

2 Grundlagen

2.1 Hämostase und die Rolle von Kollagen

2.1.1 Kollagene

Die Kollagene⁴ sind eine Familie von Faserproteinen, die in allen vielzelligen Organismen vorkommen. Sie sind wichtiger Strukturbestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel und Blutgefäßen. Kollagene sind bei Säugetieren das am häufigsten vertretene Protein und machen etwa 25% des Gesamtproteingewichts aus. Sie haben eine große Bedeutung bei der Wundheilung, aber vorallem bei der Erhaltung der strukturellen Stabilität von Zellen und Organen.

Kollagene werden als Familie von genetisch unterschiedlichen, aber verwandten Proteinen betrachtet, da aus verschiedenen Geweben isolierte Kollagene eindeutige strukturelle Unterschiede aufweisen. Bis heute sind mindestens 25 verschiedene Kollagen-Typen beschrieben worden. Die ständig wachsende Kollagen-Familie wird in Fibrillen-bildende und nichtfibrilläre Kollagen unterteilt. Zu der zuletzt genannten Gruppe zählen die netzbildenden, Basalmembran-, kurzkettigen und fibrillenassoziierten Kollagene.

Die Kollagen-Haupttypen I, II und III, die 90% aller Körperkollagene ausmachen, gehören zur Familie der fibrillären Kollagene, zu denen auch die Typen V und XI gehören. Die einzelnen Kollagenmoleküle, die die Form eines Stäbchens besitzen, haben einen Durchmesser von 1,5 nm und eine Länge von 300 nm. Hierbei lagern sich drei links-gängige α -helikale Einzelstränge, die sogenannten α -Ketten, zu einer rechtsgängigen Tripelhelix zusammen. Die Kollagen Tripelhelices bilden durch Parallelanlagerung die in den verschiedenen Organen vorkommenden Fibrillen aus. Der Kollagentyp I ist Haupt-

⁴ *kolla (gr.): Leim; genéa (gr.): Entstehung*

bestandteil der Haut, Knochen und Sehnen. Typ III ist neben der Haut auch in Blutgefäßen und inneren Organen vertreten.

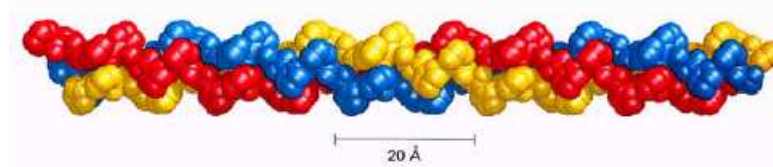


Abbildung 1 Modell einer Kollagen Tripelhelix. Drei linksgängige helikale Einzelstränge (sequentiell identisch oder nicht identisch), die sogenannten α -Ketten, winden sich rechtsgängig umeinander und bilden eine Tripelhelix. Die einzelnen α -Ketten sind aus Gründen der Übersichtlichkeit verschieden farbig eingefärbt [Str96].

Andere Kollagene besitzen eine davon abweichende Struktur, in denen die charakteristische Tripelhelix nur in einzelnen Molekülabschnitten vorkommt. Von den netzbildenden Kollagen Typen ist Typ IV ein wichtiger Bestandteil aller Basalmembranen. Er ist spezifisch für die extrazellulären Strukturen, die unter Epithel- und Endothelzellschichten liegen oder Muskeln, Nerven und glatte Muskelzellen umgeben. Die Moleküle des Typs IV weisen neben fibrillären Strukturanteilen auch globuläre Domänen auf.

Die Kollagene des Typs IX, XII, XIV, XVI und XIX weisen Unterbrechungen der Tripelhelix durch ein oder zwei nicht helikale Bereiche auf [Ols97] und befinden sich auf der Oberfläche von Fibrillen. Sie werden deshalb als fibrillen-assoziierte Kollagene bezeichnet. Sie sorgen für eine Verknüpfung der Kollagenfibrillen untereinander und mit anderen Molekülen der extrazellulären Matrix.

Ein charakteristisches Merkmal aller bekannten Kollagen Typen ist, daß zumindest ein Teil des Moleküls aus drei (sequentiell identischen oder nicht identischen) Proteinketten besteht, die die sich wiederholende Tripeptid-Sequenz Gly-X-Y besitzen und in Form einer Tripelhelix umeinandergewunden sind. In der Tripeptid-Sequenz sind die Aminosäuren X und Y meist durch ein Prolin oder Hydroxy-Prolin vertreten. Aufgrund dieser ungewöhnlichen Aminosäuresequenz weist die Tripelhelix besondere Strukturmerkmale auf. Jede dritte Aminosäure ist aus sterischen Gründen ein Glycin und befindet sich im Zentrum der Helix. Sie ist gestreckter, so daß der Abstand zwischen zwei Aminosäuren auf der Längsachse 0,28 nm anstatt 0,15 nm beträgt. Die Carbonylsauerstoff- und Iminowasserstoffkerne weisen von der Helixachse weg, wodurch sich keine intrahelikalen Wasserstoff-Brücken ausbilden können. Wasserstoff-Brücken zwischen den einzelnen α -

Ketten werden bei Kollagen erst ausgebildet, wenn sich drei Helices zu einer Tripelhelix umeinander winden. Im Gegensatz dazu stehen die Karbonylsauerstoff- und Iminowasserstoff-Kerne bei einer α -Helix parallel zur Hauptachse und können so die stabilisierenden Brücken ausbilden.

2.1.2 Hämostase

Im Fall einer Gewebeverletzung droht dem Organismus die grundlegende Gefahr des Verlustes des lebensnotwendigen Organs Blut. Die Hämostase (Blutgerinnung oder -stillung) stellt ein wirkungsvolles Werkzeug dar, um diesen Verlust bei Verletzungen möglichst gering zu halten. Sie erhält ihre Effektivität aus dem Zusammenspiel von drei Vorgängen: 1) Als Folge der Verletzung kontrahieren die Gefäße. Dies sorgt für eine Verlangsamung des Blutstroms und damit für eine Reduzierung des Blutverlustes. 2) Die im Blut zirkulierenden Thrombozyten aggregieren an der verletzten Gefäßstelle und bilden so einen vorläufigen Thrombus⁵, der die verletzte Stelle provisorisch verschließt. 3) Der vorläufige Thrombus wird in einer Enzymkaskade, der sogenannte Gerinnungskaskade, durch ein Fibrin-Netz verstärkt und verschließt die Gefäßstelle dauerhaft.

Bei Gefäßwandverletzungen wird die subendotheliale Matrix zerrissen, die Kollagenfasern der Matrix dem Blut und den darin zirkulierenden Bestandteilen wie Thrombozyten ausgesetzt. Die Thrombozyten sammeln sich unmittelbar an den exponierten Kollagenfasern, an die sie direkt mit dem Kollagenrezeptor (GPVI) und indirekt mit dem vWF-Rezeptor-Komplex (GPIb-V-IX) über Kollagen-gebundenem von-Willebrand-Faktor (vWF) binden [Kui04]. Der vWF ist ein multimeres Glykoprotein (GP), das von den Endothelzellen in das Blutplasma sezerniert wird. Er zirkuliert im Plasma wo er als Trägerprotein für den Faktor VIII, der Teil der Gerinnungskaskade ist, fungiert [Sad98]. Im Fall einer Gefäßverletzung interagiert er mit Kollagen und dem vWF-Rezeptor-Komplex auf der Thrombozytenmembran und schafft so eine Brücke zwischen Thrombozyten und Kollagen des Gefäßsubendothels.

Die Wechselwirkung mit den Proteinen der Matrix führt zur Aktivierung der Membranrezeptoren, was in Folge über intrazelluläre Botenstoffe zu einer Reihe von Folgeaktionen der Thrombozyten führt. Sie erfahren eine Formveränderung, bilden Pseudopodien aus und aggregieren in der verletzten Stelle. Die erwähnten intrazellulären Boten-

⁵ *thrombos (gr.): Klumpen*

stoffe sorgen auch für die Aktivierung eines weiteren Rezeptors, dem Fibrinogenrezeptor (GP IIb/GP IIIa) auf der Thrombozytenmembran [Bar01]. Das im Blut gelöste Gerinnungsprotein Fibrinogen bindet an den aktivierten Rezeptor und fördert damit die Aggregation durch Verbindung benachbarter Thrombozyten.

Der durch die Aggregation gebildete Propf aus Thrombozyten hat nicht genügend Festigkeit, um das verletzte Gefäß dauerhaft zu verschließen. Sie erhält er in den anschließenden plasmatischen Vorgängen der Hämostase, innerhalb derer das die Thrombozyten verbindende Fibrinogen in einer Enzym-Kaskade in Fibrin gespalten wird und polymerisiert. Zusätzlich wird das Polymer durch Ausbildung kovalenter Quervernetzungen der Fibrin-Monomere stabilisiert. Das Fibrin-Netz umschließt die aggregierenden Thrombozyten und verleiht so dem Thrombus die nötige Stabilität um die verletzte Gefäßstelle dauerhaft zu verschließen.

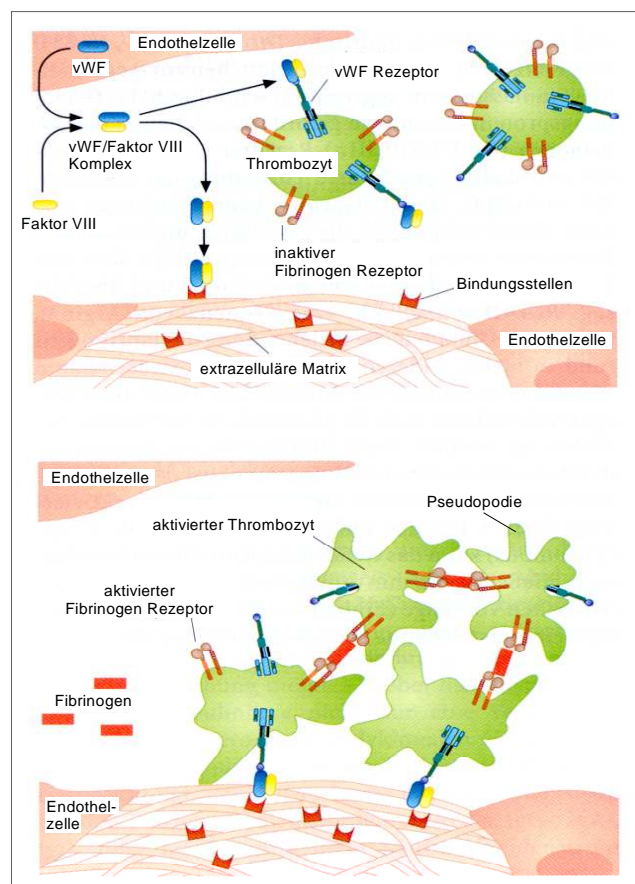


Abbildung 2 Thrombozytenaktivierung und -aggregation bei der Hämostase. Die Interaktion von Thrombozyten und Matrixproteinen führt zu einer Reihe von Folgereaktionen: Aktivierung der Rezeptoren, Formveränderung, Ausbildung von Pseudopodien, bis hin zur Aggregation. Die

aktivierten Fibrinogen-Rezeptoren stabilisieren durch Bindung von Fibrinogen den sich entwickelnden Thrombus [Löf98].

Gerinnungsinhibitoren verhindern dabei eine überschießende Fibrinbildung, so daß die Bildung des Blutgerinnsels auf den Ort der Verletzung beschränkt bleibt und sich nicht auf das übrige gesunde Gefäßsystem ausweitet. Eine weitere wichtige Komponente der Hämostase ist die Auflösung des Fibrinnetzwerks (Fibrinolyse) durch das Enzym Plasmin. Auch die Fibrinolyse ist ein wichtiger natürlicher Vorgang, da das Blutgerinnsel nach Beendigung der Wundheilungsvorgänge an der Verletzungsstelle nicht mehr benötigt wird und entfernt werden muss. Alle Vorgänge der Gerinnungsaktivierung und -hemmung sowie die Fibrinolyse laufen in einem sehr komplexen Gleichgewichtssystem ab.

2.2 Saratin - ein Inhibitor der Hämostase

Hämostase und Fibrinolyse stehen im Organismus im Gleichgewicht. In einem intakten System läuft im geringen Maße fortlaufend Blutgerinnung ab, die immer wieder rückgängig gemacht werden muss. Keine der beiden Mechanismen Hämostase und Fibrinolyse darf die Überhand erhalten. Sobald ein Thrombus seine Arbeit erledigt hat und gesundes Gewebe nachgewachsen ist, muss er aufgelöst werden. Ist die "hämostatische Wage" in Richtung Gerinnung verlagert, kommt es häufiger zu Herzinfarkt, Schlaganfall, Thrombosen oder Lungenembolien. Ist sie in Richtung Fibrinolyse verlagert, kommt es zu Blutungen. Dem Organismus steht zur Erhaltung des Gleichgewichts ein System aus Aktivatoren und Inhibitoren der Hämostase und Fibrinolyse zur Verfügung, beispielsweise hemmen Bestandteile der Hämostase in ihrer aktiven Form die Fibrinolyse, und umgekehrt. So baut Plasmin in der Fibrinolyse nicht nur Fibrin ab, sondern inhibiert die Faktoren V und VIII der Gerinnungskaskade bei der Hämostase.

Neben den Bestandteilen der Hämostase zur Aufrechterhaltung, bzw. Inhibierung des Gerinnungssystems stehen in der Natur in ganze Reihe verschiedener Inhibitoren der Blutgerinnung, sogenannte Antikoagulantien, zur Verfügung. Der Gerinnungshemmer Heparin⁶ wird von Mastzellen, die vor allem im Gewebe von Leber und Lunge sowie in der Dünndarmschleimhaut vorkommen, und von Granulozyten des Blutes gebildet und sezerniert. Es hemmt verschiedene Enzyme der Gerinnungskaskade (u.a. die Faktoren IX, X und XII) und die Bildung von Thrombin, dessen Substrat Fibrinogen ist.

⁶ *hepar (gr.): Leber*

In der Pflanzenwelt gibt es einige Substanzen mit Gerinnungshemmender Wirkung, bekannte Beispiele hierfür sind die Acetylsalicyl-Säure und Cumarin-Derivate. Der in Blättern und Rinde der Silberweide (*Salix alba*) vorkommende Stoff Acetylsalicyl-Säure (ASS) erschwert die Thrombozytenaggregation indem er in die Synthese von dafür nötigen Botenstoffen eingreift. In der Folge kommt es zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit. Cumarine sind sekundäre Pflanzenstoffe die besonders in vielen Gräsern und Schmetterlingsblütlern (*Fabaceae*) vorkommen. Sie wirken indirekt über die Verdrängung des für die Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X nötige Vitamin-K. In Folge verlieren die Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren ihre Aktivierbarkeit und die Enzymkaskade ist unterbrochen.

In der Tierwelt findet man bei parasitierenden Organismen wie Vampirfledermäusen, Stechmücken und Blutegel⁷ (*Hirudinea*) ebenfalls Stoffe die die Blutgerinnung inhibieren. Ihr Speichel enthält Substanzen die mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen den Blutfluß an der parasitierten Stelle des Wirts fließfähig und die Wunde offen halten. Ein Beispiel ist der Speichel von Blutegeln. Er ist ein Cocktail verschiedenster Wirkstoffe. Gerinnungshemmend wirken zum Beispiel die Proteine Hirudin, LAPP, Calin und Saratin. Weitere Substanzen wirken gefäßerweiternde, antithrombotische und spasmolytische. Darüber hinaus haben einige dieser Substanzen auch entzündungshemmende und weitergehende Eigenschaften.

Die Gerinnungshemmer Hirudin, LAPP, Calin und Saratin inhibieren die Blutkoagulation auf unterschiedlichen Wegen. Der Wirkstoff Hirudin inhibiert die Aktivierung von Thrombin, das für die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin und damit für die Bildung des Fibrinnetzes zuständig ist.

LAPP, Calin und Saratin dagegen hemmen die Blutgerinnung durch direkte Bindung an Kollagen Typ I und III, die in der Blutgefäßwand zu finden sind. Sie greifen somit in den ersten Schritt der Hämostase, die Thrombozyten-Aggregation, ein. Die rekombinanten Blutegelproteine LAPP [Hui01], Calin [Dep99] und Saratin inhibieren die Bindung von vWF durch direkte Bindung an Kollagen.

Es konnte in vitro und in vivo nachgewiesen werden, daß Saratin sowohl die Bindung von gereinigtem human vWF an die human Kollagen Typen I und III, als auch die vWF-unabhängige Thrombozyten-Aggregation inhibiert [Cru01, Van03].

⁷ echis (gr.): kleine Schlange

Glu	Glu	Arg	Glu	Asp	Cys	Trp	Thr	Phe	Tyr	Ala	Asn	Arg	Lys	Tyr	Thr	Asp	Phe	Asp	Lys
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ser	Phe	Lys	Lys	Ser	Ser	Asp	Leu	Asp	Glu	Cys	Lys	Lys	Thr	Cys	Phe	Lys	Thr	Glu	Tyr
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Cys	Tyr	Ile	Val	Phe	Glu	Asp	Thr	Val	Asn	Lys	Glu	Cys	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Val	Asp	Gly
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Glu	Glu	Leu	Asp	Gln	Glu	Lys	Phe	Val	Val	Asp	Glu	Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Tyr	Leu	Thr
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Asp	Cys	Glu	Gly	Lys	Asp	Ala	Gly	Asn	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Asp	Glu	Ser	Asp	Glu	Val
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Asp	Glu	Asp																	
101	102	103																	

Abbildung 3 Primärsequenz des Proteins Saratin (dargestellt im Drei-Buchstaben-Code).

Das Vorhandensein und Ineinandergreifen mehrerer verschiedener Koagulationsinhibitoren bei Blutegeln (LAPP, Saratin, Calin, Hirudin und ähnliche) macht im Hinblick auf die Dauer des Saugaktes (30 Minuten bis zwei Stunden) Sinn. Beispielsweise hält das schnell wirkende Hirudin die Wunde offen und das Blut fließfähig. Calin bewirkt im Anschluß an das "schnelle" Hirudin die etwa 12 Stunden dauernde Reinigung der Wunde durch Nachbluten.

In der Klinik finden Inhibitoren der Hämostase, sogenannte Antikoagulationen, Verwendung bei der Behandlung und Prävention u.a. von Atherosklerose, Hirninfarkt, und Thrombosen. Die wichtigsten Klassen von Antikoagulanzen, die heute klinisch verwendet werden, sind die bereits besprochenen Wirkstoffe Hirudin, Heparin, Cumarinderivate und ASS. Im naturheilkundlichen Bereich kommt der Therapie mit Blutegeln eine immer größer werdende Bedeutung zu.

Die genannten Wirkstoffe haben neben dem generellen Blutungsrisiko mehr oder minder schwere Nebenwirkungen. ASS kann Magenschleimhautreizungen, bis hin zu Magengeschwüren verursachen. Eine mögliche Nebenwirkung von Hirudin und Heparin ist eine Verminderung der Thrombozytenanzahl im Blut, die in Folge das Blutungsrisiko weiter erhöhen. Cumarinderivate, auch Vitamin-K-Antagonisten genannt, können zu schweren Leberschäden führen.

Allen genannten Antikoagulantien ist gemein, daß sie systemisch, also auf den gesamten Organismus, wirken und somit zu den unerwünschten und oft lebensbedrohlichen Nebenwirkungen führen. Saratin dagegen erfüllt seine antithrombotische Wirkung auch bei lokaler Anwendung. In in vivo Studien mit Ratten, deren Gefäße nach chirurgischen Eingriffen lokal mit Saratin behandelt wurden, zeigten, daß die Aggregation der Thrombozyten an der betroffenen Stelle, und damit das Thromboserisiko, signifikant

reduziert wurde [Cru01]. Die Tatsache, daß Saratin bereits in den ersten Schritt der Blutgerinnung, der Thrombozytenaggregation, eingreift und somit die Gerinnungskaskade gar nicht erst angestoßen wird, und seine lokalen Anwendbar- und Wirksamkeit lassen ein großes therapeutisches Potential vermuten.

2.3 Cam-HrTH-I - ein Trp substituiertes Protein

Wie auch in Vertebraten repräsentieren Peptide und Proteine bei Insekten die größte Klasse an neuroregulatorischen Substanzen. Neuropeptide regulieren bei Insekten eine Vielzahl von Prozessen, einschließlich Häutungsstimulation, Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts oder die Stimulierung der Fettkörper zur Bereitstellung der Metabolite für die Synthese und Freisetzung von Speicherstoffen in den Kreislauf. Der zu letzt genannte Prozess wird durch Neuropeptide aus der Familie der adipokinetischen Hormone (AKH) reguliert. Neuropeptide aus der Familie der hypertrehalosämische Hormone (HrTH) sind für die Mobilisierung des Hämolympheinzuckers Trehalose von Bedeutung. Der wichtigste Hämolympheinzucker der Insekten ist Trehalose. Sie ein Disaccharid der Glucose, das in der Hämolymphe von Insekten in sehr hohen Konzentration vorkommen kann. Daneben findet man bei vielen Insekten auch Glucose, aber in deutlich geringerer Konzentration. Die Neuropeptide werden in einem wichtigen Neurohaemalorgan der Insekten, der Corpora cardiata, gespeichert. Neurohaemalorgane sind Speicher- und Freisetzungsorte für im Nervensystem hergestellte Neuropeptide, die in die Hämolymphe abgegeben werden und eine wichtige Rolle in der Regulation von Verhalten und Metabolismus spielen. Die synthetisierenden Zellen sind in diesem Fall Nervenzellen, die keine synaptischen Beziehungen mit anderen Neuronen oder Effektorzellen eingehen. Vielmehr enden die Axone an Blutgefäßen in komplexen Strukturen, die als Neurohaemalorgane bezeichnet werden. Bei Insekten sind die Corpora cardiaca wichtige Neurohaemalorgane, die aus dem Gehirn stammende Neurohormone speichern und entlassen. Viele dieser Faktoren sind Peptide, die bei der Regulation der Lipid-(adipokinetische Hormone) oder Zucker-(hypertrehalosämische Hormone) konzentration in der Hämolymphe eine Rolle spielen. Gemeinsame strukturelle Merkmale dieser Familien von Octa-, Nona- oder Decapeptiden sind geblockte Termini (Pyroglutamat-Reste am N-Terminus und eine Amid-Gruppe am C-Terminus), ein aromatischer Rest (Phe oder Tyr) an Position 4, Tryptophan an Position 8 und Gly in Position 9 [Köl00].

1992 wurde von Gäde et al. das Neuropeptid Cam-HrTH-I aus der HrTH-Familie beschrieben [Gäd94]. Es verursacht in verschiedenen Invertebraten Spezies (*Carausius morosus*, *Periplaneta americana*) Hypertrehalosaemie, einen Anstieg des Hauptkohlenhydrats Trehalose in der Hämolymphe. Das Decapeptid Cam-HrTH-I, das aus der Corpora cardiata von Stabheuschrecken *Carausius morosus* isoliert wurde, besitzt zusätzlich zu den für diese Familie typischen modifizierten Termini ein weiteres Merkmal, einen durch eine Hexose substituierten Tryptophan-Rest (Trp8).

Diese Modifikation stellt aus zwei Gründen eine Besonderheit dar: 1) Tryptophan ist eine selten modifizierte Aminosäure. 2) Es wird vermutet, daß die Substitution der Hexose durch eine C-C-Bindung am Indolring erfolgt. Hofsteenge wies 1994 eine derartige neue C-Glykosidische Bindung einer Hexose an das C^{δ1}-Atom des Indolrings von Trp in Position 7 bei einer human RNase nach [Hof94].

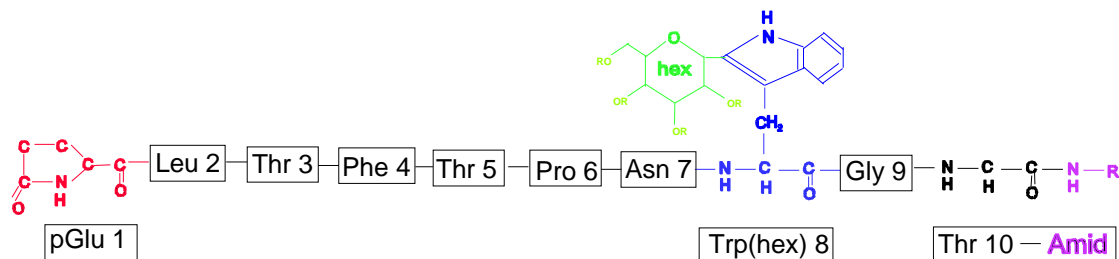


Abbildung 4 Sequenz von Cam-HrTH-I. Das Modell der Modifikation von Trp8 wurde von Hofsteenge et al. übernommen [Hof94].

2.4 NMR-Methoden zur Untersuchung von Proteinen

Alle ein Lebewesen beschreibende Information ist in seiner DNA gespeichert. Aus dieser DNA ergibt sich unter anderem direkt die Primärsequenz der Proteine, die das Lebewesen zu seiner Funktion benötigt. Die Funktion dieser Proteine wird aber im wesentlichen von ihrer dreidimensionalen Struktur bestimmt. Leider ist es momentan noch nicht möglich, auf einfachem Weg von der Primärstruktur zur Tertiärstruktur zu kommen, da der Vorgang der Proteinfaltung immer noch eines der ungelösten Rätsel der Biologie ist. Nichtsdestoweniger existieren inzwischen Verfahren die es ermöglichen die

dreidimensionale Struktur von Proteinen zu erforschen. Die zur Zeit wichtigste experimentelle Methode ist die Kernspinresonanzspektroskopie an Lösungen.

Sie erlaubt es Strukturen unter annähernd physiologischen Bedingungen in Lösung zu bestimmen und auch dynamische Prozesse, die sich im Bereich von Picosekunden bis Stunden erstrecken können, sichtbar zu machen. Jedoch muß das zu beobachtende Protein in Wasser löslich sein und darf bei einer Konzentration von mindestens 1 mM nicht aggregieren. Die NMR ist starkem Maße von einer Größenlimitation der untersuchten Systeme unterworfen. Durch das Fortschreiten zu zwei-, drei- und vier-dimensionalen Spektren zusammen mit Isotopenmarkierung und aktuellen methodischen Entwicklungen, wie TROSY-Spektroskopie [Per00] zur Optimierung der spektralen Auflösung, hat sich diese Begrenzung für Proteine in einen Bereich von über 300 Aminosäuren verschoben.

Der aufwendigste Schritt bei der Bestimmung von Proteinstrukturen mittels NMR-Spektroskopie ist weiterhin die manuelle Auswertung der NMR-Spektren. Die sequentielle Zuordnung beruht auf heteronuklearen Tripelresonanzexperimenten, die die Hauptkettenatome (C^α , H^α) und die Seitenketten (H^β , C^β) über skalare Kopplungen korrelieren. Für die Strukturbestimmung selbst sind momentan noch Abstandsbeschränkungen von dominierender Bedeutung, die man aus dem abstandsabhängigen Kern-Overhauser-Effekt (NOE) erhält. Ihr Energiebeitrag zur errechneten Struktur wird als Pseudopotentiale in verschiedenen Strukturrechenprogrammen mit verschiedenen Algorithmen zur Simulierung der Proteinfaltung minimiert. Wegen der zu r^{-6} proportionalen Abstandsabhängigkeit des NOEs liefert diese Methode nur Informationen über Spins, die näher als rund 0,5 nm zusammenliegen.

Zusätzlich zu Abstandsinformationen sind außerdem Winkelbeschränkungen hilfreich. Die Konformation des Proteinrückgrats wird dabei wegen der Planarität der Peptidbindung von nur zwei Winkeln ϕ und ψ pro Aminosäurerest vollständig definiert.

In der Praxis stellen Zuordnung, Strukturrechnung und Verfeinerung zusammenhängende iterative Prozesse dar.

Die NMR-Spektroskopie beruht auf dem Phänomen der kernmagnetischen Resonanz, welche auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments μ eines Atomkerns mit einem äußeren magnetischen Feld B_0 beruht. Das äußere Feld führt zu einer Aufspaltung der Energieniveaus die der betrachtete Kern einnehmen kann.

In starken Magnetfeldern richten sich Atomkerne mit halbzahligem Kernspin, zum Beispiel der biologisch-medizinisch bedeutende Wasserstoffkern 1H mit einem Spin

$I=1/2$, entsprechend ihrem magnetischen Kernmoment in einer Vorzugsrichtung aus, genauer gesagt: das magnetische Kernmoment präzediert mit der sogenannten Larmorfrequenz um diese Vorzugsrichtung. Die Zufuhr elektromagnetischer Energie senkrecht zum äußeren Magnetfeld mit der charakteristischen Frequenz (Larmorfrequenz) führt zu einer Energiezustandsänderung dieser Atomkerne und damit zum Wechsel der Ausrichtung im Magnetfeld. Die Larmorfrequenz entspricht der Resonanzfrequenz des Kerns und damit der Übergangsfrequenz zwischen den Energieniveaus:

$$\omega = \gamma * B_0 . \quad (2.1)$$

Die Larmorfrequenz ist abhängig von der Stärke des Feldes und vom gyromagnetischen Verhältnis. Das gyromagnetische Verhältnis ist für jede Kernart eine charakteristische Konstante. Von γ hängt die Empfindlichkeit eines Kerns in der NMR ab: ein großes gyromagnetisches Verhältnis bedeutet eine hohe Empfindlichkeit des entsprechenden Isotops.

Beim Abschalten der elektromagnetischen Frequenzeinstrahlung richten sich die Atomkerne wieder in ihrer Vorzugsrichtung aus und nehmen ihren ursprünglichen Energiezustand wieder ein. Dabei strahlen sie selbst kurzzeitig (Relaxationszeit) elektromagnetische Wellen ab, die in einer Empfängerspule mit abnehmender Intensität gemessen werden können. Die Signale sind von der Wasserstoffdichte und den Abklingzeiten abhängig. Sie lassen Rückschlüsse auf die Protonenkonzentration und Umgebung der Kerne zu.

3 Methoden und Experimente

3.1 Strukturaufklärung von Saratin

3.1.1 Proteinexpression und Isotopenmarkierung

Die Saratin Proben wurden von Saratin wurde Merck (Darmstadt) bezogen. Saratin wurde in *Hansenula polymorpha* exprimiert und isoliert. Die Proben wurden chromatographisch aufgereinigt. Die Produktion und Charakterisierung von Saratin ist bei [Bar01] beschrieben. Für die Herstellung der ^{15}N -, ^{13}C -und $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten Proben wurde dem Hauptkulturmedium ^{13}C markiertes Methanol und ^{15}N markiertes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugegeben.

Das Kollagen-Peptid mit der Einzelstrang-Sequenz Gly-Lys-Hyp-(Gly-Pro-Hyp) $_{10}$ -Gly-Lys-OH wurde von der Fa. Biosyntan (Berlin) hergestellt. Die automatische Peptid-Synthese erfolgte unter der Verwendung der Fmoc/But-Strategie. Das Protein wurde über HPLC chromatographisch gereinigt und massenspektrometrisch analysiert.

3.1.2 Probenzusammensetzung und Spektrenaufnahme

Das Protein Saratin war in einem Puffer von 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer und 50 mM NaCl bei pH 6,5 gelöst. Zur Herstellung der NMR-Proben wurde 0,2 mM DSS (2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonsäure) als Standard und 100 mM NaN_3 , 100 μM Leupeptin (475 Da), 100 μM Pepstatin (685 Da) und 10 μM BPTI (6,5 kDa) als Protease-Inhibitoren beigefügt. Der voreingestellte pH-Wert wurde nicht verändert. Die Proteinkonzentration variierte von 1,4 mM bis 3,3 mM. Je nach Art des Experiments wurde als Lösungsmittel 99,9% D_2O oder eine Mischung aus 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ verwendet. Die Beimengung von mindestens 5% D_2O ist erforderlich um mit Hilfe des Deuterium-Locksignals die

Homogenität des stationären Feldes sicher zu stellen. Die Proben wurden ausschließlich in 5 mm-Glasröhrchen gemessen, was einem Probenvolumen von 500 µl entspricht.

Die NMR Spektren wurden an einem Bruker DRX600 Spektrometer aufgenommen (Protonenresonanzen von 600 MHz). Soweit nicht anders vermerkt, wurde bei einer Temperatur von 298 K gemessen. Die chemische Verschiebung der Protonen wurde auf den internen Standard DSS referenziert. Die Aufnahme der Messungen und Prozessierung erfolgte mit dem Programm XWINNMR 2.6 (Bruker, Karlsruhe). Die Daten wurden mit den Programmen AURELIA [Nei95] und AUREMOL [Gro04] ausgewertet.

3.1.3 NMR-Experimente zur Zuordnung der Resonanzen

Der aufwendigste Schritt bei der Bestimmung von NMR Strukturen besteht in der Zuordnung der gemessenen Resonanzen zu den entsprechenden Aminosäure-Resten (*residue*). Das Grundprinzip der nach wie vor noch manuell durchgeführten Zuordnung besteht darin, zuerst die einzelnen Spinsysteme des Proteinrückgrats, bzw. der Hauptkette mittels geeigneter Experimente sequenzspezifisch zuzuordnen. Anhand dieser sequentiellen Zuordnung können im folgenden die Atome der Seitenketten in geeigneten Experimenten identifiziert und den jeweiligen Aminosäure-Resten zugeordnet werden.

Die Wahl der jeweiligen Experimente für die Zuordnung der Resonanzen ist abhängig von der Molekülgröße. Die Anzahl der Signale in zweidimensionalen homonuklearen ^1H -Spektren wie dem 2D NOESY- oder TOCSY-Experiment nimmt mit der Größe des Proteins zu und führt zu Signalüberlagerungen. Bei größeren Proteinen mit einer Molekülmasse über 10 - 15 kDa eignen sich diese zweidimensionalen Experimente nicht mehr zur Identifikation der Spinsysteme. Durch das Einführen einer weiteren, dritten Dimension werden die Signale entzerrt und Überlappungen beseitigt. Die Signale verteilen sich dann auf einen Quader und nicht mehr wie im Fall der zweidimensionalen Spektren auf eine Fläche. Derartige dreidimensionale heteronukleare Experimente wie das ^1H ^{15}N -NOESY-HSQC oder HNCA ermöglichen die sequentielle Zuordnung auch bei größeren Proteinen mit einer Molekülmasse bis zu 35 kDa.

3.1.3.1 Zuordnung der Hauptkette

Für die sequenzspezifische Zuordnung der Resonanz des Proteinrückgrats von Saratin mit einer Molekülmasse von 12,06 kDa wurden folgende zwei und dreidimensionale Experimente verwendet:

- 2D ^1H - ^{15}N HSQC,
- 3D ^1H ^{15}N -NOESY-HSQC,
- HNCA,
- CBCANH,
- CBCA(CO)NH.

Das ^1H - ^{15}N -HSQC und ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC wurde jeweils von einer ^{15}N -markierten und die Tripelresonanz-Experimente HNCA, CBCANH und CBCA(CO)NH an einer $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Saratin-Probe bei 298 K an einem 600 MHz-Spektrometer gemessen.

Entscheidend für die sequenzspezifische Zuordnung der Spinsysteme sind die heteronuklearen dreidimensionalen Experimente NOESY-HSQC und Tripelresonanzexperimente HNCA, CBCANH und CBCA(CO)NH. Sie stellen eine Verbindung zwischen den Atomen benachbarter Aminosäurereste her. Das einfachste Tripelresonanz-Experiment stellt das HNCA dar. Ausgehend vom Amid-Proton wird die Magnetisierung zuerst auf den skalar koppelnden Stickstoffkern transferiert. Von dort wird sie auf die C^α -Kerne und wieder zurück auf das Amid-Proton übertragen. Da die skalare Kopplung des Stickstoffkernes mit dem C^α -Kern der vorhergehenden Aminosäure und die mit dem eigenen C^α -Kern mit 15 Hz, bzw. 11 Hz nahezu gleich groß ist, erfolgt der Magnetisierungstransfer vom Stickstoffkern sowohl zum C^α -Kern der eigenen als auch der vorhergehenden Aminosäure und zurück zum Amid-Proton (Abbildung 5). Im Fall des CBCA(CO)NH-Experiments erhält man interresiduale Korrelationen zwischen den $^1\text{H}_\text{N}$ - und ^{15}N -Kernen eines Aminosäurerestes i und den $^{13}\text{C}^\alpha$ - und $^{13}\text{C}^\beta$ -Kernen des sequentiell vorhergehenden Restes $i-1$, d.h. man erhält nur Signale von den $^{13}\text{C}^\alpha$ - und $^{13}\text{C}^\beta$ -Kernen der sequentiell vorhergehenden. Im CBCANH-Experiment erhält man inter- und intra-residuale Korrelationen zwischen den $^1\text{H}_\text{N}$ - und ^{15}N -Kernen eines Aminosäurerestes mit den eigenen $^{13}\text{C}^\alpha$ - und $^{13}\text{C}^\beta$ -Kernen und zusätzlich mit denen der vorhergehenden Aminosäure.

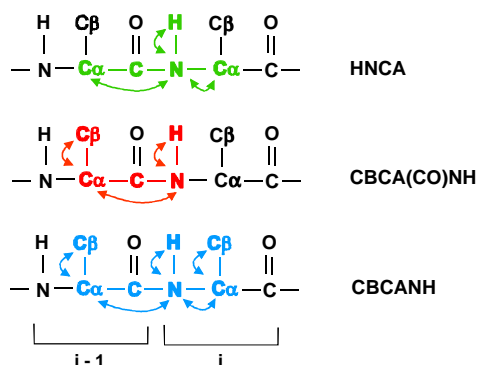


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Tripelresonanzexperimente HNCA (grün), CBCA(CO)NH (rot) und CBCANH (blau). Im CBCA(CO)NH und HNCA werden ausschließlich interresiduale Korrelationen zwischen $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, ^{15}N - und ^1H -Kernen beobachtet, im CBCANH- und HNCA-Experiment sowohl inter- als auch intraresiduale. Die Kerne, zwischen denen die Magnetisierung transferiert wird, sind farbig markiert. Die Pfeile geben die Richtung des Transfers an.

Das grundsätzliche Prinzip bei der sequenzspezifischen Zuordnung der Resonanzen bestand darin, zunächst die einzelnen Spinsysteme in den Spektren zu isolieren und mit dem Programm AURELIA [Nei95] in Form von Streifen (*strips*) zu dokumentieren. In dieser Form wurden anhand der chemischen Verschiebungen der C^α - und C^β -Atome die sequentiell benachbarten Spinsysteme ermittelt und in Blöcken zusammengefasst. Anschließend wurden die Blöcke nach und nach in die Primärsequenz eingepaßt.

Im zweidimensionalen ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum wird Stickstoff-Frequenz mit der des gebundenen Amid-Protons innerhalb einer NH-Gruppe verknüpft. Dieses Spektrum liefert eine gute Übersicht über die Resonanzfrequenzen der Amid-Protonen des Proteins. Jedes Signal im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum repräsentiert ein an einen ^{15}N -Kern gebundenes Proton. Neben den Signalen der Amid-Protonen der Seitenketten handelt es sich dabei überwiegend um die Signale des Proteinrückgrats. In HSQC-Spektren ist jede Aminosäure durch das Signal des Amid-Protons der Hauptkette vertreten und stellt damit den sogenannten "*fingerprint*" des Proteins dar.

3.1.3.2 Zuordnung der Seitenketten

Um eine möglichst vollständige Zuordnung aller Atome der Seitenketten zu erhalten wurden folgende zwei und dreidimensionale Experimente verwendet:

- 3D ^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC,
- 3D ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC,
- 3D HCCH-TOCSY,

- 2D NOESY,
- 2D ^1H - ^{13}C -HSQC.

Die Experimente wurden jeweils an einer $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Saratin-Probe bei 298 K an einem 600 MHz-Spektrometer gemessen.

Entscheidend für die Zuordnung der Seitenketten sind die dreidimensionalen Spektren ^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC und 3D HCCH-TOCSY. Im ^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC korrelieren die Amid-Protonen mit den Protonen der Seitenketten und man erhält die Signale der Protonen. Im HCCH-TOCSY korrelieren die Kohlenstoffkerne der Seitenkette mit den Protonen und man erhält zusätzlich zu den Protonensignalen auch die Signale der Kohlenstoffkerne (Abbildung 6).

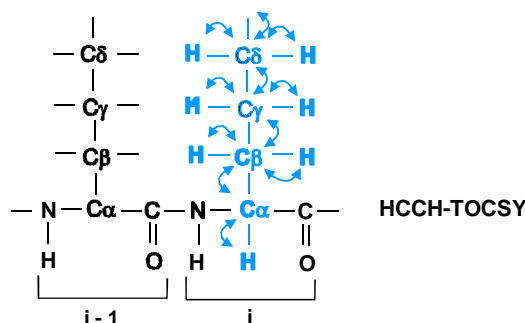


Abbildung 6 Schematische Darstellung des dreidimensionalen heteronuklearen HCCH-TOCSY-Experiments. Ähnlich dem zweidimensionalen TOCSY erhält man für eine Aminosäure-Typ charakteristisches Spinsystemmuster. In jeder Kohlenstoff-Ebene einer Seitenkette ist im Prinzip das komplette Spinmuster der zugehörigen Protonen zu sehen. Die Kerne zwischen denen die Magnetisierung transferiert wird sind blau markiert. Die Pfeile geben die Richtung des Transfers an.

Für die Zuordnung der Kerne der Seitenketten wurden beide Spektren herangezogen.

Die Zuordnung der Seitenketten-Kerne der aromatischen Aminosäuren wurde mit 2D ^1H - ^{13}C -HSQC vervollständigt.

3.1.4 Sekundärstrukturvorhersage

Die Vorhersage der Sekundärstruktur eines Proteins lässt sich bereits anhand der sequentiellen Zuordnung treffen. Die Analyse der NOE-Daten liefert eine detailliertere Vorhersage der Sekundärstruktur.

Die chemischen Verschiebungen der Kerne beinhalten an sich Informationen über Strukturelemente eines Proteins. Die chemische Verschiebung der Kerne der Hauptkette, H^α , C^α und C^β , weisen in den jeweiligen Sekundärstruktur-Elementen charakteristische Abweichungen zu denen in unstrukturierten (*random coil*) Proteinbereichen auf. Die C^α -Resonanzen sind bei α -Helices deutlich Tieffeld-verschoben, also in Richtung größerer ppm-Werte. Bei β -Strängen sind sie hingegen gegenüber dem *random coil*-Wert Hochfeld-verschoben, also in Richtung kleinerer ppm-Werte. Bei den Resonanzen der H^α - und C^β -Kerne verhält es sich genau umgekehrt. Die Aminosäurespezifischen *random coil*-Werte wurden durch Messungen an kurzen, und damit voraussichtlich unstrukturierten, Peptiden ermittelt und tabelliert [Wis95]. Anhand der Differenzwerte von den experimentell ermittelten chemischen Verschiebungen der H^α -, C^α - und C^β -Kerne und den jeweiligen tabellierten *random coil*-Werten kann somit die Sekundärstruktur eines Proteins vorhergesagt werden.

Die graphische Darstellung der Änderungen der chemischen Verschiebungen jeweils eines Kern-Typs jeder Aminosäure gegen die Proteinsequenz liefert nur eine "grobe" Vorhersage. Eine exakte Eingrenzung der Sekundärstrukturbereiche ist in vielen Fällen schwierig, da eventuell auftretende Schwankungen die Grenzen der Strukturelemente verwischen können. Eine aussagekräftigere Darstellung ergibt sich aus dem *chemical shift* Index (CSI) mit dem Programm CSI [Wis94]. Bei der Berechnung des CSI wird der C' -Kern als vierter Kern in die Auswertung mit einbezogen. Für jede Aminosäure werden die Änderungen der chemischen Verschiebungen der H^α -, C^α -, C^β - und C' -Kerne unabhängig von einander analysiert und eine Sekundärstruktur Vorhersage getroffen. Die vier einzelnen Vorhersagen für eine Aminosäure werden auf Übereinstimmungen überprüft und das Ergebnis zu einem diskreten Wert, den *chemical shift* Index, zusammengefasst. Der Wert 1 steht für β -Strang, 0 für *random coil* und -1 für α -Helix. Die graphische Darstellung des CSI gegen die Proteinsequenz liefert eine aussagekräftigere Vorhersage über die Sekundärstruktur des untersuchten Proteins.

Anhand der NOE-Kontakte lässt sich die Sekundärstrukturvorhersage konkretisieren. Die Sekundärstrukturelemente weisen ein für sie charakteristisches Muster an NOE-Kontakten auf. Aus der periodischen Windungsstruktur von α -Helices ergibt sich ein charakteristisches Muster an NOE-Kontakten. Man erhält sequentielle Kontakte der Amid-Protonen ($d_{NN}(i, i+1)$). Zusätzlich beobachtet man, bedingt durch eine Steighöhe der α -Helix von 0,5 nm, NOE-Kontakte der Windungen zueinander ($d_{\alpha N}(i, i+3)$ - und $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ -Kontakte). Innerhalb eines β -Stranges findet man starke sequentielle Kontakte ($d_{\alpha N}(i,$

i+1). Liegen mehrere Stränge vor, so korrelieren die H^α -Kernen des einen Strangs mit den Amid-Protonen des gegenüberliegenden ($d_{\alpha N}(i, j)$ -Kontakt). Sind die Stränge antiparallel orientiert, treten zusätzlich $d_{\alpha\alpha}(i, j)$ - und $d_{NN}(i, j)$ -Kontakte auf. Die graphische Darstellung der NOE-Kontakte gegen die Proteinsequenz liefert eine gute Übersicht über die Lage und Verteilung der Sekundärstrukturelemente.

3.1.5 Bestimmung der strukturelevanten Parameter

3.1.5.1 NOE-Einschränkungen

Entscheidend für die Strukturrechnung sind die Abstandsinformationen der Kerne zueinander. Diese Distanzangaben erhält man mit dem NOESY-Experiment (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*). Es basiert auf der dipolaren Wechselwirkung der Kernspins durch den Raum, dem *Nuclear Overhauser-Effect* (NOE). Die Intensität des NOE (I_{AB}) ist proportional zum Abstand der beteiligten Kerne (r)

$$I_{AB} \approx r_{AB}^{-6} \quad (3.1)$$

Der Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen wird nur dann beobachtet, wenn die Kerne weniger als 5 Å voneinander entfernt sind. Die Intensität des NOE ist daher von dem räumlichen Abstand der beteiligten Protonen abhängig.

Im NOESY-Spektrum sieht man für alle Protonen ein Signal, solange ihr räumlicher Abstand kleiner als 5 Å ist. Dabei handelt es sich um Protonen, die in der Primärstruktur sequentiell benachbart sind, oder um Protonen, die aufgrund der Tertiärstruktur in räumliche Nähe zueinander gelangen. Aufgrund dieser räumlichen Beziehung stellt der NOE die wichtigste Strukturinformation in der NMR-Spektroskopie von Proteinen dar.

Für die Strukturanalyse von Saratin wurden die NOE-Daten aus drei Spektren herangezogen: zwei homonukleare 2D NOESY-Spektren gemessen in 95% H_2O/D_2O und in 99,9% D_2O , sowie ein 3D NOESY-HSQC-Spektrum gemessen in 95% H_2O/D_2O . Die Spektren wurden bei 298 K und 600 MHz aufgenommen. Die Integration der Signale und Umrechnung der Signalvolumina in Distanzen erfolgte mit dem Programm AURELIA [Nei95]. Für die Eichung der Distanzen der Spektren wurde das überlagerungsfreie Signal

von $H^{\alpha33}/H^{N36}$ mit einem Abstand von 3,2 Å als Eichsignal herangezogen. Die Distanz von $H^{\alpha33}/H^{N36}$ entspricht dem Referenzabstand in α -Helices.

3.1.5.2 Wasserstoff-Brücken

Wasserstoff-Brücken gehören zu den wichtigsten Wechselwirkungen bei der Ausbildung von Sekundärstrukturen. Bei α -Helices werden die Wasserstoff-Brücken die die Sekundärelemente stabilisieren zwischen dem Amid-Proton der Aminosäure i und dem Carbonyl-Sauerstoff des Restes $i-4$ ausgebildet. Die Brücken liegen nahezu parallel zur Hauptachse der α -Helix. Im Fall des β -Faltblatts werden die stabilisierenden Brücken zwischen benachbarten β -Strängen eines Faltblattes ausgebildet.

Experimentell können die Wasserstoff-Brückenbindungen und ihre Lage mittels NMR durch direkte und indirekte Methoden nachgewiesen werden. Der direkte Nachweis erfolgt durch ein modifiziertes zweidimensionales 1H - ^{13}C -HNCO. Bei dieser Methode macht man sich die geringe aber messbare Kopplung der N- und C'-Kerne ($^3J_{NC'} < 1$ Hz) zu Nutzen [Wan99]. Gegenüber dem herkömmlichen 1H - ^{13}C -HNCO, bei dem die Magnetisierung vom Amid-Proton der Aminosäure i zum Carbonyl-Kohlenstoffkern der vorhergehenden Aminosäure $i-1$ und wieder zurück übertragen wird, wird beim sogenannten "H-Brücken"-, oder "lang-reichweitigen"-HNCO [Cor99] die Zeit des Magnetisierungstransfers so lang gewählt, dass die Magnetisierung durch die Wasserstoff-Brücke hindurch, bzw. über die koppelnden Kerne, auf den Carbonyl-Kohlenstoffkern der an der Brücke beteiligten Aminosäure j transferiert wird (Abbildung 7). Detektiert werden in diesem Fall die Resonanz beider an der Wasserstoff-Brücke beteiligten Kerne, die des Amid-Protons i und die des Carbonyl-Kohlenstoffkerns j .

Der indirekte Nachweis von Wasserstoff-Brücken erfolgt mit einem Deuterium-Austausch-Experiment. Hierbei wird die Protein Probe nach Gefriertrocknung in 100% Deuterium gelöst und schrittweise nach definierten Zeiten HSQC- oder NOESY-Spektren gemessen. Amid-Protonen, die in Wasserstoff-Brücken gebunden sind, tauschen mit dem Lösungsmittel D_2O , langsamer aus. Sie sind demnach in der 1H -Spektroskopie länger nachweisbar als ungebundene und nach einer gewissen Zeit bereits deuterierten Amid-Gruppen.

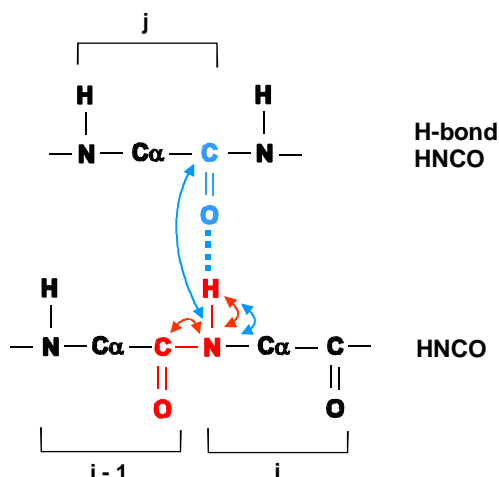


Abbildung 7 Die Tripelresonanzexperimente HNCO und H-Brücken-HNCO. Der Magnetisierungs-transfer im herkömmlichen HNCO ist rot, im H-Brücken HNCO blau markiert. Die Pfeile geben die Richtung des Transfers an. Im H-Brücken HNCO ist die Zeit des Magnetisierungstransfers gegenüber dem normalen HNCO verlängert. Dadurch wird die Magnetisierung durch die Wasserstoff-Brücke hindurch auf den an der Brücke beteiligten Carbonyl-Kohlenstoffkern und wieder zurück transferiert.

Zur Identifizierung der Wasserstoff-Brücken in Saratin wurden beide Verfahren angewandt. Zum direkten Nachweis der Wasserstoff-Brücken wurde ein zweidimensionales ^1H - ^{13}C -HNCO-Spektrum mit einem Magnetisierungstransfer von 66,6 ms von einer $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten Saratin Probe gemessen. Für den indirekten Nachweis im Deuterium-Austausch-Experiment wurde eine ungelabelte Saratin Probe lyophilisiert, in 100% D_2O aufgenommen. 1,5 Stunden nach dem Umpuffern wurde bei 298 K ein 2D NOESY-Spektrum mit 32 Scans gemessen.

3.1.5.3 Residuale dipolare Kopplungen

Die residuale dipolare Kopplung ist eine anisotrope magnetische Wechselwirkung. Die Messung dieser magnetischen Anisotropie ist grundsätzlich möglich, nur ist sie bei den meisten Proteinen zu gering um eine meßbare Orientierung im äußeren Feld nachzuweisen. Durch Zugabe von magnetisch orientierbaren Medien kann eine Anisotropie der (flüssigen) Probe erreicht werden (Abbildung 8). Damit wird den Proteinmolekülen eine gewisse Vorzugsrichtung der Orientierung vermittelt. Wechselwirkungen wie die dipolare Kopplung zwischen zwei Spins können so experimentell bestimmt werden. Die daraus gewonnene Information besteht in der Ausrichtung der chemischen Bindung in Bezug auf den "Orientierungstensor" des Moleküls.

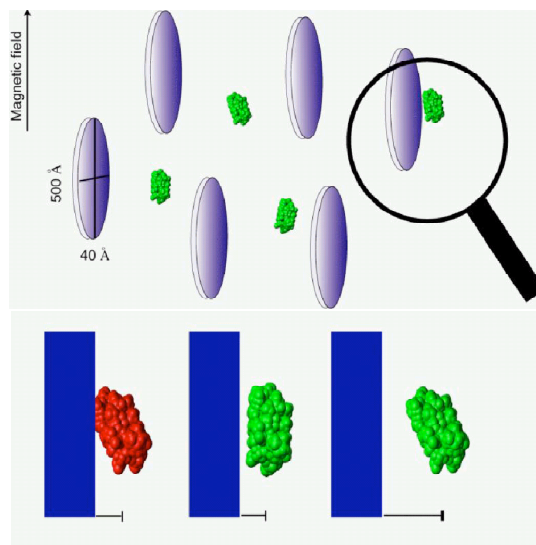


Abbildung 8 Modell der Orientierung von Makromolekülen in einem statischen Magnetfeld durch Zugabe von orientierenden Lipid-Bicellen [Zwe00].

Zur Bestimmung der residualen dipolaren Kopplungen bei Saratin wurde eine Lipid-Mischung [Ott98] aus Dimyristoyl-Phosphatidylcholin (DMPC) und Dihexanoyl-Phosphatidylcholin (DHPC) als orientierendes Medium verwendet. Die Lipide aggregieren zu zweilagigen, scheibchenförmigen Bicellen [San92], die sich im statischen Magnetfeld B_0 ausrichten. Die Bicellen vermitteln die "Orientierung" über Kollisionen mit den Proteinmolekülen. Die Stabilität der Bicellen wurden zusätzlich durch Zugabe von Cetyltrimethyl-Ammoniumbromid (CTAB) erhöht [Los98], da CTAB temperaturabhängig selbst eine flüssig-kristalline Phase ausbildet, die sich ebenfalls im Magnetfeld orientieren [Rap99]. Das Vorhandensein und die zeitliche Stabilität von magnetisch orientierten Bicellen lässt sich anhand der charakteristischen Dublett Aufspaltung des Deuterium-Signals mittels ^2H -NMR-Spektroskopie überprüfen [Bru00].

Die dipolaren Kopplungen zwischen den direkt gekoppelten Spins ^1H und ^{15}N von Saratin wurden in ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren bei 306 K von einer ^{15}N -angereicherten Probe unter isotropen Bedingungen und nach Zugabe des orientierenden Mediums unter anisotropen Bedingungen in der ^{15}N -Dimension gemessen. Da sich die residuale Dipolkopplung zur skalaren Kopplung der Spins addiert können die ^1H - ^{15}N -Rest-Dipolkopplungen direkt aus dem Vergleich beider Spektren ermittelt werden.

Anhand der Verteilung der residualen Dipolkopplung (Abbildung 25) wurden die Werte D_{zz}^{AB} , D_{yy}^{AB} und D_{xx}^{AB} für den molekularen Orientierungstensor abgeschätzt [Clo98]. D_{zz}^{AB} , D_{yy}^{AB}

und D_{xx}^{AB} stellen die z-, y- und x-Komponenten des Orientierungstensors dar. Sie entsprechen dem größten Zahlenwert, dem des kleinsten und dem häufigsten Kopplungswert:

$$D_{zz}^{AB} = 2 * D_a^{AB} \quad (\text{größter Kopplungswert}), \quad (3.2)$$

$$D_{yy}^{AB} = - D_a^{AB} * (1 + 1,5 * R) \quad (\text{kleinster Kopplungswert}), \quad (3.3)$$

$$D_{xx}^{AB} = - D_a^{AB} * (1 - 1,5 * R) \quad (\text{häufigster Kopplungswert}). \quad (3.4)$$

Aus diesem Zusammenhang ergibt sich die axiale Komponente D_a^{AB} und die rhombische Komponente R des molekularen Orientierungstensors, die Rhombizität.

3.1.5.4 Einschränkungen für dihedrale Winkel

Die dihedralen Winkel φ und ψ legen die Konformation des Protein-Rückgrats fest (Abbildung 9). Für die jeweiligen Sekundärstrukturelemente nehmen φ - und ψ -Winkel charakteristische Werte an. Anhand der experimentell ermittelten chemischen Verschiebungen können die Winkel mit dem Programm TALOS [Cor99b] abgeschätzt werden. Analog zur Strukturvorhersage anhand der Abweichungen der chemischen Verschiebungen von Referenzwerten werden mit TALOS die Abweichungen der chemischen Verschiebungen von H^α -, C^α -, C^β -, C' - und H^N -Kernen von den Mittelwerten analysiert. Zusätzlich werden die Abweichungen von den Mittelwerten jeder Aminosäure mit den Daten einer internen Strukturdatenbank verglichen. Dabei werden von der zu untersuchenden Sequenz Tripel benachbarter Aminosäuren gebildet und auf Ähnlichkeiten in der Strukturdatenbank untersucht. Entspricht die Sequenzhomologie den Verschiebungsänderungen der zu untersuchenden Aminosäure werden die Werte der dihedralen Winkel aus der Datenbank auf die Aminosäure übertragen.

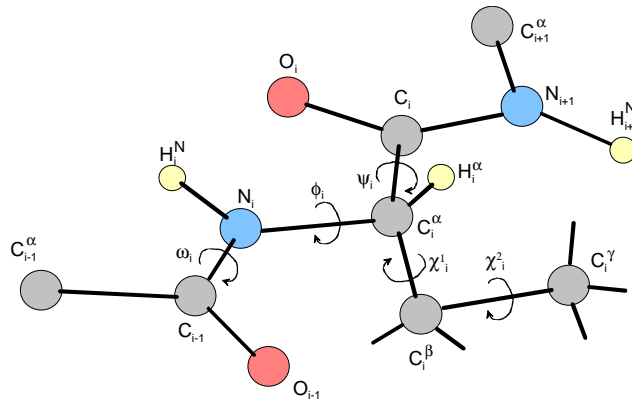


Abbildung 9 Winkelfreiheitsgrade im Protein mit den Rückgratwinkeln ψ , ϕ und ω und Seitenkettenwinkeln χ^1_i , χ^2_i und χ^n_i . Da der Winkel ω der Peptidbindung weitgehend auf 180° fixiert ist, wird die Rückgratkonformation nur von den dihedralen Winkeln ψ und ϕ festgelegt.

3.1.5.5 Molekül-Dynamik

Die Dynamik des Proteinrückgrats wurde mit ^{15}N - T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten der ^{15}N -Kerne des Proteinrückgrats und heteronukleare ^1H - ^{15}N -NOEs (hetNOEs) charakterisiert.

Die Relaxationsparameter der Amid-Protonen der Hauptketten, wie die longitudinale Relaxationszeit T_1 und die transversale Relaxationszeit T_2 , bzw. die Relaxationsraten R_1 und R_2 , sind abhängig von der Größe des Proteins und dynamischen Vorgängen, denen die Kerne unterworfen sind.

$$R_1 = 1 / T_1, \quad (3.5)$$

$$R_2 = 1 / T_2, \quad (3.6)$$

Damit lässt sich anhand ihrer Werte eine Aussage über die Beweglichkeit des Proteinrückgrats treffen [Far94].

Die Bestimmung der Relaxationsraten, bzw. -zeiten erfolgte bei 298 K mit modifizierten ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren mit unterschiedlichen Evolutionszeiten t_1 . Die Messung der T_1 -Relaxationszeiten erfolgte mit den Evolutionszeiten t_1 10, 20, 40, 80 (2x), 160, 640, 1280 und 2560 ms. Für die Bestimmung der T_2 -Zeiten wurden die folgenden Zeitschritte benutzt: 7.8, 15.6, 23.4, 38, 62.3, 93.5, 124.7, 155.8 (2x), 249.3, 311.7, 467.5 und 780 ms. Die Spektren wurden mit dem Programm XWINNMR bei dem gleichen nc_proc -Faktor, einem Programm internen Skalierungsfaktor, prozessiert. Die Signale wurden mit

dem Programm AUREMOL [Gro04] integriert. Die T_1 und T_2 Werte wurden anschließend bestimmt durch einen Fit der Signalvolumina an die Gleichung

$$V_{1,2}(t_1) = V_{1,2}(0) \cdot e^{-(1/T_{1,2})t_1}, \quad (3.7)$$

wobei $V_{1,2}(t_1)$ das Volumen bei einer Evolutionszeit t_1 und $V_{1,2}(0)$ das Volumen zur Zeit $t_1=0$ ist [Far94].

Zusätzliche Informationen zur Dynamik des Proteinrückgrats erhält man aus heteronuklearen ^1H - ^{15}N -NOE Werten (hetNOE) [Fen98]. Zur Bestimmung des hetNOE werden zwei ^1H - ^{15}N -NOESY-Spektren gemessen, einmal mit Vorsättigung der Protonen (entspricht dem herkömmlichen NOESY) und einmal ohne Vorsättigung. Der hetNOE ergibt aus dem Quotienten der Signalvolumina V der jeweiligen Amid-Protonen,

$$\text{hetNOE} = \frac{V_{\text{NOE}}}{V_{\text{NONOE}}}, \quad (3.8)$$

wobei V_{NOE} dem Signalvolumina der Amid-Protonen bei Vorsättigung der Protonen und V_{NONOE} dem ohne Vorsättigung entspricht.

Der Quotient ist eine Maß für den Magnetisierungstransfer der dipolar koppelnden Stickstoff-Kerne und Amid-Protonen. Aminosäuren die in einem flexiblen Strukturteil lokalisiert sind weisen im heteronuklearen ^1H - ^{15}N -NOESY-Experimenten negative hetNOEs auf.

Die Auswertung der Relaxationsdaten erfolgte mit dem Programm Excel. Zusätzlich wurde der Ordnungsparameter S^2 , der ein Maß für Molekül-Bewegungen darstellt, mit dem Programm DYNAMICS bestimmt [Fus97].

3.1.6 Strukturrechnung

3.1.6.1 Strukturrechnung mit CNS

Die Datengrundlage der Strukturrechnungen mit dem Programm CNS [Brü98] bilden die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Einschränkungen des Konformationsraumes. Prinzipiell wird bei der Strukturrechnungen mit CNS vom gestreckten Molekülstrang ausgehend rechnerisch schrittweise der Konformationsraum unter Berück-

sichtigung der Einschränkungen immer weiter eingeschränkt. Am Ende einer Rechnung steht eine Struktur, bei der die Strukturbeschränkungen bestmöglichst erfüllt und die Energien möglichst niedrig sind. Allerdings liefert die Rechnung keine Information darüber wie nahe sich die gerechnete Struktur tatsächlich am Energie-Minimum befindet. Deswegen wird bei jedem Rechnungslauf bei unterschiedlichen Start-Bedingungen ein Ensemble von mehreren 100 Strukturen gerechnet und davon die energieärmsten Strukturen ermittelt.

Der abschließende Rechnungslauf der Struktur von Saratin bestand aus 1000 Strukturen. Von diesen 1000 gerechneten Strukturen wurden die energetisch zehn Besten mit dem Skript *cnsstat* ermittelt [Ste01] und zu weiteren Analysen herangezogen (Abbildung 10). Unter Energie-Minimierung durch Eliminierung falscher Einschränkungen erhält man in einem iterativen Prozess letztlich die "energieärmste" und damit "wahrscheinlichste" Struktur.

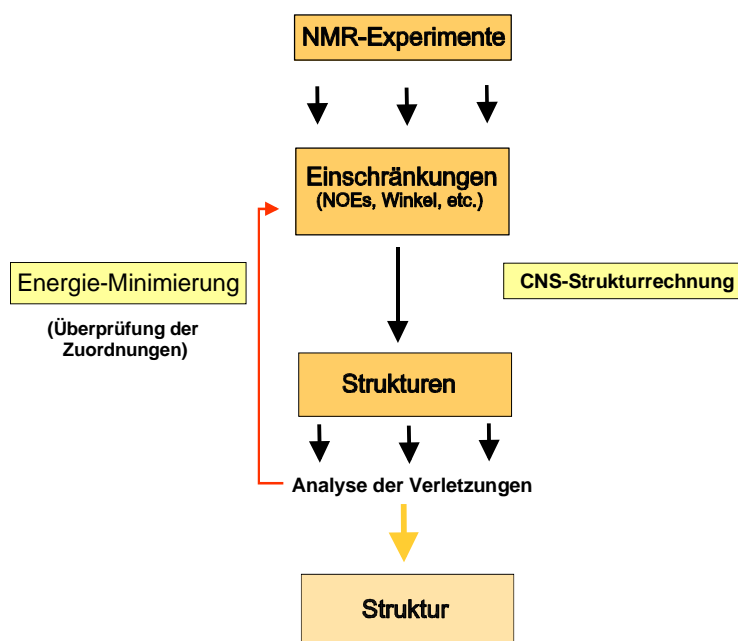


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Strukturrechnung. Die experimentell ermittelten Beschränkungen für die Struktur, NOE-Kontakte, dihedrale Winkel, Wasserstoff-Brücken, etc., bilden die Basis für die Strukturrechnung mit dem Programm CNS. Bei jedem Rechnungslauf werden 1000 Strukturen berechnet. Die energetisch zehn besten werden nach Anzahl, Stärke und Art der Verletzung der jeweiligen Beschränkungen analysiert. Verletzte Beschränkungen werden überprüft. Die korrigierten Daten bilden die Grundlage für die nächste Strukturrechnung. Dieser iterative Prozess führt unter Energie-Minimierung zu der Lösungsstruktur von Saratin.

3.1.6.2 Bewertung der Struktur

Die Beurteilung und Bewertung derart errechneter Strukturen ist generell schwierig. Ein Makromolekül stellt kein starres Gebilde dar. Es ist dynamischen Prozessen unterworfen. So stellt eine auf NMR-Daten basierende und errechnete Struktur generell nur eine "Momentaufnahme" dieses komplexen dynamischen Systems dar. Es existiert daher auch kein Parameter der eindeutige Aussagen über die "Richtigkeit" solcher Strukturen gibt. Um diese zu bewerten ist es nötig verschiedene Parameter auf ihre Stimmigkeit und Konvergenz zu überprüfen. Betrachtet man diese Werte in der Gesamtheit der Strukturbeurteilung, erhält man einen Aufschluß über die Qualität der Struktur. Solche Parameter sind vorrangig die Energien, wie NOE-Energien. Eine Verletzung einer Distanz-Einschränkung führt zur Erhöhung der zugehörigen NOE-Energie. So sind geringe Energie ein Maß für die Erfüllung dieser Einschränkung bei der errechneten Struktur. Sind die Einschränkungen bestmöglichst erfüllt, so liegen auch die dihedralen Winkel ϕ und ψ in den zu erwartenden bevorzugten Kombinationsbereichen. Und so ist auch die Verteilung dieser Winkel ein Maßstab für die Struktur. Der RMSD-Wert, berechnet mit dem Programm MOLMOL [Kor96], gibt Aufschluß über die Konvergenz der errechneten Strukturen. Letztlich liefern auch Vergleiche mit anderen Proteinen wertvolle Hinweise zur Stimmigkeit der ermittelten Struktur.

3.1.7 Strukturverfeinerung im Lösungsmittel Wasser

Das Ziel von Struktur-Berechnungen allgemein ist es die experimentell erhaltenen Daten und die Lösungsstruktur möglichst nahe an der Realität in Einklang zu bringen. Neuere Studien zeigten, dass das Einbeziehen der Interaktionen mit Lösungsmittel durch eine höhere Gewichtung sogenannter "nicht-bindender" Parameter, zum Beispiel schwache NOE-Kontakte mit dem Lösungsmittel, in der Rechnung zu einer signifikanten Verbesserung der Struktur führt [Lin99, Xia02]. Durch eine höhere Gewichtung dieser Parameter in der Strukturverbesserung (*refinement*) nähert man sich den natürlichen Bedingungen der Proteine und damit ihrer natürlichen Struktur auf rechnerischem Wege immer näher an. Bei herkömmlichen Strukturrechnungen aber werden diese Parameter im Moleküldynamik-Kraftfeld meist zu Gunsten des Computer-gesteuerten Rechenaufwandes nur gering gewichtet.

Bei der Strukturverfeinerung (*refinement*) nach dem Verfahren von Linge und Spronk [Lin03] wird den physiologischen Gegebenheiten Rechnung getragen. Die Verbesserung

der Proteinstruktur im Lösungsmittel Wasser erfolgt hierbei durch eine höhere Gewichtung der nicht-bindenden gegenüber den kovalenten Kraftfeldern bei der Rechnung mit XPLOR-NIH. Die Struktur wird hierbei in einem Hybrid-Kraftfeld basierend auf kovalenten Parametern und zusätzlich modifizierten "nicht-bindenden" Parametern verfeinert [Nab04, Lin03]. Bei diesem Verfahren werden die Strukturen abschließend automatisch mit den Programmen PROCHECK [Las93] und WHATCHECK [Hoo96] analysiert.

Die Daten-Basis der Strukturverbesserung von Saratin bilden die zehn energetisch besten Strukturen aus der Strukturrechnung mit CNS und die experimentell ermittelten Einschränkungen des Konformationsraums. Unter Berücksichtigung der Einschränkungen werden die zehn besten Strukturen bei entsprechender Gewichtung der Kraftfelder mit dem Programm XPLOR-NIH verfeinert. Man erhält nach Linge und Sponk neben den verfeinerten zehn Strukturen zusätzlich die Analyse der in die Rechnung eingebrachten und der verbesserten Strukturen. Anhand dieser Analysen ist es möglich die Strukturverbesserung zu quantifizieren, da aufgrund der unterschiedlichen Kraftfeld-Gewichtungen bei der ursprünglichen Strukturrechnung und der Strukturverbesserung in explizit Wasser ein direkter Vergleich der Werte, zum Beispiel der Energien, nicht möglich ist.

3.2 Untersuchungen zur Temperaturstabilität von Saratin

Das grundlegende Ziel bei Charakterisierung von Proteinen ist es mehr Informationen über die Funktion des Proteins zu erhalten. Die Struktur an sich gibt Hinweise auf die Funktion und die Funktionsweise von Proteinen. Neben der Struktur sind aber auch die chemischen und physikalischen Eigenschaften für die Charakterisierung - und auch für die praktische Arbeit mit Proteinen oder deren medizinische Anwendung - von großer Bedeutung.

Die Temperaturstabilität eines Proteins stellt einen wichtigen Faktor zum Beispiel bei der therapeutischen Anwendung von Proteinen dar. Viele humane Enzyme verlieren bereits bei 37 °C ihre Temperaturstabilität und denaturieren. Die Denaturierung führt zum Funktionsverlust. Anders verhält sich das Temperaturverhalten von Proteinen hyperthermophiler Organismen wie den Archaeen. Das thermophile Archaeon *Sulfolobus islandicus* hat sein Wachstumsoptimum bei 80 °C. So ist der Transskriptionsfaktor Orf56 von *Sulfolobus islandicus* bis zu einer Temperatur von 90 °C funktionell und strukturell stabil [Zee04].

In dieser Arbeit wurde die Temperaturempfindlichkeit von Saratin untersucht. Dazu wurden verschiedene ein- und zweidimensionale Temperaturreihen von Saratin gemessen. Bei der eindimensionalen Temperaturreihe wurden in fünf Kelvin Schritten von 298 K aufwärts bis 343 K und anschließend abwärts bis 320 K ^1H -Spektren einer unmarkierten Saratin Probe aufgenommen. Für die zweidimensionale Temperaturreihe wurden in einem Bereich von 298 K bis 348 K auf- und abwärts in fünf Kelvin Schritten jeweils ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren an einer ^{15}N -markierten Probe gemessen. Beide Proben waren in 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ gelöst.

3.3 Bindungsstudie von Saratin und Kollagen-Peptid

3.3.1 Bestimmung der Saratin-Bindungsfläche

Durch die Liganden-Bindung an ein Protein ändert sich die chemische Umgebung der von der Bindung betroffenen Kerne und damit ihre kernmagnetische Resonanz. Anhand der Änderungen der Resonanzen können die von der Liganden-Bindung beteiligten Aminosäuren identifiziert und so die Bindungsfläche am Protein bestimmt werden.

Zur Identifizierung der Kollagen-Bindungsfläche von Saratin wurde in einer Titrationsreihe vom Kollagen-Saratin-Komplex ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimente mit zunehmender Kollagen-Konzentration gemessen. Da die Empfindlichkeit des HSQC-Experiments mit zunehmender Molekülmasse, wie es bei größerer Komplexen der Fall ist, abnimmt wurden zusätzlich die bei großen Komplexen empfindlicheren ^1H - ^{15}N -TROSY-Experimente aufgenommen.

3.3.1.1 Titrationsexperiment (^1H - ^{15}N -HSQC)

Das zweidimensionale heteronukleare ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment (*Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*) korreliert die Amid-Protonen mit dem ^{15}N markiertem Stickstoff-Kernen. Man erhält die Signale aller Protonen die an einen Stickstoff gebunden sind. Im wesentlichen sind das die Signale der Amid-Protonen des Protein-Rückgrats. Zusätzlich erhält man auch Signale von den Amid-Protonen der Seitenketten.

Durch die Bindung eines Moleküls an ein Protein ändert sich die chemische Umgebung der Protein-Kerne die von der Bindung betroffen sind. Daraus resultiert eine Änderung der chemischen Verschiebungen und Signal-Volumina der Kerne in der Bindungsfläche. Das HSQC-Experiment ermöglicht so die Identifizierung der Liganden-Bindung durch Detektion allein der Signale der Amid-Protonen, bzw. deren Änderung in der chemischen Verschiebung.

Zur Bestimmung der Bindungsfläche von Saratin wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren mit steigenden Konzentrationen von tripelhelikalen Kollagen-Peptiden gemessen (Tabelle 1). Saratin wurde mit 0,35 mM vorgelegt. Die Saratin Probe war ^{15}N - und die Kollagen Probe unmarkiert. Die Spektren wurden bei 298 K an einem 600 MHz Spektrometer aufgenommen und mit dem Programm XWINNMR bei gleichen nc_proc-Faktor, einem Programm internen Skalierungsfaktor, prozessiert. Die Signale wurden zur Volumen-Bestimmung mit dem Programm AUREMOL [Gro04] integriert.

Saratin [mmol]	tripelhelikales Kollagen [mmol]
1	0
1	0,132
1	0,264
1	0,396

Tabelle 1 Titrationsreihe des Komplexes Saratin-Kollagen zur Bestimmung der Saratin-Bindungsfläche von tripelhelikalen Kollagen-Peptiden. Es wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren mit steigender Kollagen-Konzentration bei 298 K und 600 MHz aufgenommen. Saratin wurde mit 0,35 mM vorgelegt.

3.3.1.1.1 Datenauswertung

Als Maß für die Änderung der chemischen Verschiebung im HSQC-Titrationsexperiment wurden die Verschiebungsänderungen der Stickstoff-Kerne und Amid-Protonen kombiniert. Dieser kombinierte Wert für die Verschiebungsänderungen einer Aminosäure ist ein Maß dafür wie "stark" sich die chemischen Verschiebungen der Stickstoff-Kerne und Amid-Protonen einer Aminosäure, induziert durch die Komplexierung, ändert.

Dazu wurde die Verschiebungsänderung der Stickstoff-Kerne ($\Delta\delta_{^{15}\text{N}}$) und Amid-Protonen ($\Delta\delta_{^1\text{H}}$) einzeln für jede Aminosäure, bei jedem einzelnen Titrationsschritt, in Bezug auf die Signale von unkomplexiertem Saratin bestimmt (3.9, 3.10). Die Werte $\Delta\delta_{^{15}\text{N}}$ und $\Delta\delta_{^1\text{H}}$

ergeben sich aus der Differenz der Resonanzfrequenzen des jeweiligen Kern-Typs im komplexierten und im ungebundenen Zustand (angegeben in ppm). Die Resonanzfrequenzen der Amid-Protonen sind numerisch etwa um das 10fache größer als die der Stickstoff-Kerne. Bei einer Feldstärke von 14 T liegt die Resonanzfrequenz von ^1H -Kernen bei 600 MHz und von ^{15}N -Kernen bei 60 MHz. Da in dieser Auswertung ein kombinierter Wert ($\Delta\delta_{15\text{N}/1\text{H}}$) der Verschiebungsänderung bestimmt wird, ist es von Bedeutung, daß die Änderung der chemischen Verschiebungen beider Kern-Typen zu gleichen Teilen in die Rechnung miteingehen. Die Verschiebungsänderungen der Stickstoff-Kerne wurde daher um das 10fache höher gewichtet.

$$\Delta\delta_{15\text{N}} = \delta_{15\text{N}}(\text{Saratin gebunden}) - \delta_{15\text{N}}(\text{Saratin frei}), \quad (3.9)$$

$$\Delta\delta_{1\text{H}} = [\delta_{1\text{H}}(\text{Saratin gebunden}) - \delta_{1\text{H}}(\text{Saratin frei})] \cdot 10. \quad (3.10)$$

Die Änderungen beider Kerntypen wurde zu einem Wert $\Delta\delta_{15\text{N}/1\text{H}}$ kombiniert nach

$$\Delta\delta_{15\text{N}/1\text{H}} = \sqrt{(\Delta\delta_{15\text{N}})^2 + (\Delta\delta_{1\text{H}})^2} \quad (3.11)$$

und wird ebenfalls in ppm angegeben.

Die $\Delta\delta_{15\text{N}/1\text{H}}$ -Werte wurden für jede Aminosäure einzeln gegen die Kollagen-Konzentration aufgetragen. In erster Näherung kann der Verlauf der Verschiebungsänderungen als linear angesehen werden, und so wurde die Steigung der Geraden ($d\Delta\delta_{15\text{N}/1\text{H}}/dc$) als Maß für die Änderung der chemischen Verschiebung einer Aminosäure herangezogen.

Die an der Komplexierung mit Kollagen beteiligten Kerne von Saratin erfahren neben der Verschiebungsänderung auch eine Änderung der Volumina der Resonanzsignale. Zur Bestimmung der Volumenänderungen der Resonanzsignale im HSQC-Titrationsexperiment wurden zuerst die Signale aus aller Titrationsschritten auf einen Scan normiert, da das Signalvolumen in Abhängigkeit zu der Anzahl der Scans steht. Die Volumenänderungen dieser normierten Signale wurden anhand

$$\Delta_{\text{Vol}} = |\text{Vol}_{(\text{Saratin gebunden})} / \text{Vol}_{(\text{Saratin frei})}| \quad (3.12)$$

bestimmt. Die Änderung der Signalvolumina Δ_{Vol} ergibt sich hierbei aus dem Absolutwert des Quotienten von dem Signalvolumen einer Aminosäure jeweils gemessen an gebundenem ($\text{Vol}_{(\text{Saratin gebunden})}$) und an freiem Saratin ($\text{Vol}_{(\text{Saratin frei})}$). Die Δ_{Vol} -Werte wurden für jede Aminosäure einzeln gegen die Kollagen-Konzentration aufgetragen. In

erster Nährung kann auch die Volumenänderung als linear angesehen werden, und so wurde die Steigung der Geraden ($d\Delta_{Vol}/dc$) als Maß für die Änderung der Volumina einer Aminosäure herangezogen.

3.3.1.2 Das ^1H - ^{15}N -TROSY-Experiment

Im ^1H - ^{15}N -TROSY-Experiment (*transverse relaxation optimized spectroscopy*) korrelieren wie auch im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum die Amid-Protonen mit den Stickstoff-Kernen. Man erhält für jedes an einen Stickstoff-Kern gebundenes Proton ein Signal. Im Gegensatz zum ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum, dessen Mess-Empfindlichkeit bei einem Protein mit einer Größe von 30 kDa an seine Grenzen stößt, ermöglicht das ^1H - ^{15}N -TROSY-Experiment auch die Untersuchung von größeren Proteinen und Komplexen (> 30 kDa) [Sal98].

Die Anwendbarkeit von HSQC-Experimenten auf größere Proteine wird durch die abnehmende Geschwindigkeit der molekularen Taumelbewegung, die Brownsche Molekularbewegung, eingeschränkt. Dadurch verkürzt sich die transversale Relaxation T_2 der Protein-Kerne, was zu breiteren Linien im Spektrum und damit geringerer Empfindlichkeit führt. Das TROSY-Experiment ist eine neuartige NMR-spektroskopische Methode, bei der durch Kompensation der bei größeren Proteinen wirksamen Relaxationsmechanismen die Linienbreiten dramatisch verbessert werden kann. Dieses sogenannte TROSY-Experiment basiert auf der Tatsache, daß die kreuzkorrelierte Relaxation, die durch Einflüsse der Dipol-Dipol-Kopplung und der Anisotropie der chemischen Verschiebung entsteht, auf verschiedene transversale Relaxationsraten innerhalb der einzelnen Multiplett-komponenten zurückzuführen ist. Bei Protonenfrequenzen nahe 1 GHz verschwindet die transversale Relaxation für eines der vier Multipletts nahezu vollständig. Mit Hilfe der TROSY-Technik wird ausschließlich dieses eine Multiplett aufgenommen, wodurch eine deutliche Verringerung der Linienbreite erreicht wird [Sal99].

Das ^1H - ^{15}N -TROSY-Experiment wurde zur Untersuchung des Bindungsverhaltens vom Komplex (Saratin-Kollagen-Tripelhelix=1:0,39) mit einer Saratin Konzentration von 0,35 mM und einer Konzentration an tripelhelikalem Kollagen von 0,17 mM bei 288 K, 298 K und 308 K ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren an einem 800 MHz-Spektrometer mit Kryo-Probenkopf aufgenommen.

3.3.2 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten

Moleküle diffundieren in Lösung in Abhängigkeit von ihrer Größe und Form mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Für Saratin erwartet man das Verhalten eines globulären Proteins in wässriger Lösung. Der Diffusionskoeffizient ist abhängig von dem Reibungskoeffizienten und damit direkt von der Masse und Form des Moleküls, sowie der Viskosität des Lösungsmittels. Aus diesem Zusammenhang können aus dem Diffusionsverhalten von Makromolekülen Rückschlüsse auf deren Größe, Form und das Bindungsgeschehen bei Komplexen gezogen werden.

Diffusionskoeffizienten von Proteinen in Lösung lassen sich mittels NMR mit Hilfe von Magnetfeldgradienten bestimmen [Ste65]. Auf Grund von Magnetfeldinhomogenitäten, hervorgerufen durch ein das B_0 -Feld überlagerndes Zusatzfeld, tritt nach dem 90° -Puls eine Auffächerung der Magnetisierungsvektoren auf. Ein 180° -Puls nach einer Zeit τ bewirkt eine Refokussierung der Magnetisierungsvektoren, welche nach 2τ abgeschlossen ist. Auf diese Art und Weise kann man Intensitätsverluste aufgrund statischer Magnetfeldinhomogenitäten bei der Messung verhindern.

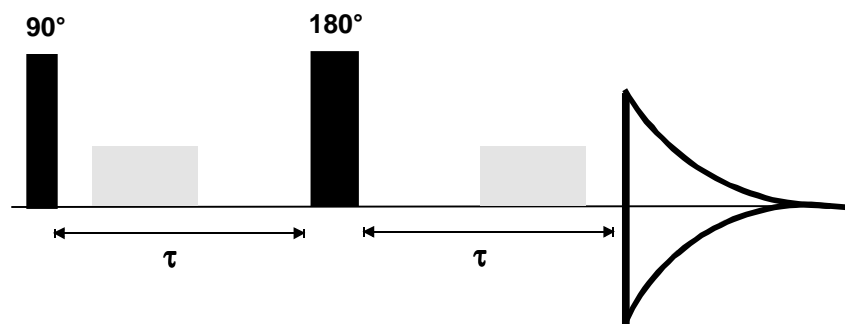


Abbildung 11 Pulsfolge zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten D nach Stejskal und Tanner [Ste65]. Der schmale schwarze Balken symbolisiert einen 90° -Puls und der breite einen 180° -Puls. Die grauen Balken stehen für einen Gradienten-Puls.

Zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten mittels NMR nutzt man gerade diesen Intensitätsverlust auf Grund eines inhomogenen Magnetfeldes aus. Stört man das Magnetfeld B_0 (Gradienten-Puls) und wandert der Kern auf Grund von Diffusion entlang des Magnetfeldgradienten an einen anderen Ort, so kann die Refokussierung nicht mehr vollständig gelingen, da sich das Magnetfeld am neuen Ort des Kerns verändert hat. Die durch Diffusion verringerte Signalintensität A (Amplitude) ist von der Gradientenstärke S abhängig

$$\frac{A}{A_0} = \exp^{-c\gamma DS^2}, \quad (3.13)$$

wobei A_0 die Signalintensität ohne Gradienten, A die Intensität bei einem angelegtem Gradienten S , c die Protein-Konzentration, γ das gyromagnetische Verhältnis und D der Diffusionskoeffizient ist. Dies bedeutet, daß der Diffusionskoeffizient D proportional zum Logarithmus der normalisierten Amplitude (A/A_0) ist.

$$D \sim \log \frac{A}{A_0}. \quad (3.14)$$

Im Rahmen der Arbeit wurden die Diffusionskoeffizienten von Saratin und vom Saratin-Kollagen-Komplex ermittelt. Dazu wurden Diffusionsmessungen in einem linearen Feld-Gradienten (inhomogenes Magnetfeld) aufgenommen.

Die Amplitude des ^1H -NMR-Signals wurde bei verschiedenen Gradientenstärken gemessen. Der Logarithmus der normalisierten Amplitude (A/A_0) wurde gegen die Gradientenstärke (S^2) aufgetragen und die Änderung von A/A_0 mit der Gradientenstärke S^2 $\left(\frac{dA/A_0}{dS^2}\right)$

bestimmt. Mittels $\left(\frac{dA/A_0}{dS^2}\right)$, ermittelt von einem Referenzproteins mit bekanntem Koeffizienten, kann der Diffusionskoeffizient des untersuchten Proteins oder Komplex nach

$$\frac{D_1}{D_2} = \left(\frac{dA/A_0}{dS^2}\right)_1 / \left(\frac{dA/A_0}{dS^2}\right)_2 \quad (3.15)$$

bestimmt werden.

Unter der Annahme, daß die Masse des Moleküls proportional zu dessen Volumen ist, ergibt sich die Proportionalität zwischen Diffusionskoeffizient und molarer Masse zu

$$D \sim \frac{1}{r} \sim \frac{1}{\sqrt[3]{V}} \sim \frac{1}{\sqrt[3]{M_r}}. \quad (3.16)$$

Die molare Masse der Proteine wurde anhand von Referenzproteinen mit Hilfe der Diffusionskoeffizienten durch

$$M_{r2} = \left(\frac{D_1}{D_2} \right)^3 \cdot M_{r1} \quad (3.17)$$

abgeschätzt [Kan01].

Zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten wurden bei 302 K eindimensionale ^1H -Spektren bei zunehmender Gradientenstärke an unmarkierten Proben gemessen. Die Proben waren in 95% H_2O 5% D_2O bei 6,9 pH gelöst. Die Komplex Probe lag bei einem Verhältnis von 1:0,39 (Saratin:Kollagen Tripelhelix) vor. In der Saratin und der Komplex Probe hatte Saratin jeweils einer Konzentration von 0,35 mM. Als Referenzproben wurden D_2O (0,019 kDa), Lysozym/ D_2O (14,4 kDa), Tendamistat (10,8 kDa), und Aprotinin (6,5 kDa) verwendet. Zusätzlich wurde im Probenröhrchen polymerisiertes Polyacrylamid als Referenz für ein stationäres Molekül gemessen, dessen Signalintensitäten idealerweise unabhängig von der Gradientenstärke sein sollte.

3.3.3 Untersuchungen des Kollagen-Peptides

3.3.3.1 Zuordnung der Resonanzen

Die Zuordnung der Resonanzen vom Kollagen-Peptid erfolgte mit einem ein-dimensionalen Spektrum. Von einer unmarkierten Kollagen Probe wurden ein-dimensionale ^1H -Spektren bei 298 K und 600 MHz aufgenommen. Die Probe war in 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ bei pH 6,8 mit einer Molarität von 0,58 mM gelöst. Als Referenz wurde 0,2 mM DSS zugesetzt.

Anhand der 1D Spektren wurden die Resonanzen der Protonen der Kollagen Probe unter Zuhilfenahme von Literatur-Daten zugeordnet.

3.3.3.2 Bindungsstudie des Kollagen-Peptides

Durch die Komplexbildung von Saratin und Kollagen-Peptiden ändert sich die chemische Umgebung der Kerne und damit ihre chemische Verschiebung. Analog zur Bindungsstudie von Saratin wurde versucht durch den direkten Vergleich von Saratin-Kollagen-Komplex Spektren mit Spektren vom Kollagen-Peptid und von ungebindenem Saratin die Änderungen der chemischen Verschiebungen von Kollagen zu identifizieren. Dazu

wurden 1D Spektren und 2D NOESY-Spektren vom Kollagen-Peptid im ungebundenen und komplexiertem Zustand und von Saratin im ungebundenen und komplexiertem Zustand gemessen und miteinander verglichen.

Von unmarkiertem Kollagen und von dem Saratin-Kollagen-Komplex wurden ein-dimensionale ^1H -Spektren und 2D NOESY-Spektren bei 298 K und 600 MHz aufgenommen. Als Referenz wurde jeweils 0,2 mM DSS zugesetzt. Die Probe von ungebundenem Kollagen war in 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ bei pH 6,8 mit einer Molarität von 0,58 mM gelöst. Die Komplex Proben der 1D-Experimente waren in 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ mit 0,35 mM ^{15}N -markiertem Saratin und unmarkiertem Kollagen Tripelhelices in einem Verhältnis von 1:0,13, 1:0,26 und 1:0,39 bei pH 6,8 gelöst. Die Komplex Probe des 2D-NOESY-Experiments war in 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ mit 0,3 mM unmarkiertem Saratin und unmarkiertem tripelhelikalem Kollagen in einem Verhältnis von 1:0,39 gelöst. Die unmarkierte Saratin Probe in einem Puffer von 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer und 50 mM NaCl bei pH 6,5 gelöst. Zusätzlich wurde der Probe 0,2 mM DSS als Standard und 100 mM NaN_3 , 100 μM Leupeptin, 100 μM Pepstatin und 10 μM BPTI als Protease-Inhibitoren beigelegt.

3.4 Modell der Komplexstruktur

Basierend auf den Daten aus der Analyse der Kollagen-Bindungsfläche von Saratin wurde der Kollagen-Saratin-Komplex mit dem Moleküldynamik-Programm HADDOCK [Dom03] auf struktureller Ebene untersucht und ein Modell des Komplex entwickelt. Zusätzlich wurde mit dem Programm The BuScr [Rai04] ein Strukturmodell des Kollagen-Peptides erstellt.

3.4.1 Strukturmodell des Kollagen-Peptides

Die vollständige dreidimensionale NMR- oder Kristallstruktur von tripel-helikalen Kollagen-Molekülen ist bis dato nicht verfügbar, wohl aber Kristallstrukturen von homotrimeren Kollagen-Peptiden mit unterschiedlicher Sequenz [u.a. Bel95, Ber01]. Von dem in dieser Arbeit eingesetztem Kollagen-Peptid mit einer Länge von 35 Aminosäuren existiert keine Struktur. Für die Berechnung der Komplexstruktur mit dem Molekül-Dynamik Programm HADDOCK werden aber die Strukturdaten beider Interaktionspartner benötigt. Daher wurde anhand der Aminosäure-Sequenz des in dieser Arbeit verwendeten Kollagen-Peptides mit dem Programm The BuScr [Rai04] ein tripel-helikales Modell der Struktur erstellt.

3.4.2 Saratin-Kollagen Docking mit HADDOCK

Das Moleküldynamik-Programm HADDOCK (*High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing*) erlaubt die Struktur eines Protein-Peptid-Komplexes unter Berücksichtigung von biochemischen und biophysikalischen Daten vorherzusagen [Dom03]. HADDOCK stellt eine sogenannte *informationsgesteuerte, flexible Docking Methode* dar. Sie ist *informationsgesteuert* da experimentell ermittelte Daten - Änderungen der chemischen Verschiebungen, NOEs, Kopplungsdaten, usw.- die Grundlage des Protein-Docking bilden, und sie ist *flexibel*, da flexible Proteinbereiche und damit auch kleinere Konformationsänderungen bei der Strukturvorhersage berücksichtigt werden.

HADDOCK benötigt für die Strukturvorhersage des Komplexes die 3D Strukturen der beiden Interaktionspartner und die Kenntnis über die jeweiligen Bindungsflächen der Proteine. Dabei werden die an der Bindung beteiligten Aminosäure-Reste als aktive AIRs, sogenannte mehrdeutige Interaktionseinschränkung (*Ambiguous Interaction Restraint*), und Reste die ebenfalls mit einer hohen Oberflächenzugängigkeit direkt benachbart sind als passive AIRs definiert. AIRs sind per definitio vieldeutige Distanzeinschränkungen. Sie legen einen maximalen Abstand von 2-5 Å zwischen jedem Atom eines als aktiv definierten Rest i von Protein A und jedem Atom von allen aktiven und passiven Resten von Protein B fest (Abbildung 12). Der maximale Abstand ist die Distanz, die die Kerne in der mit CNS berechneten Komplexstruktur einnehmen dürfen.

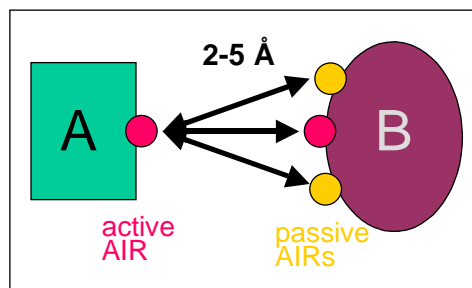


Abbildung 12 Ambiguous Interaction Restraints (AIRs). AIRs sind per definitio vieldeutige Distanzeinschränkungen. Sie geben einen maximalen Wert von 2-5 Å zwischen jedem Atom eines als aktiv definierten Rest i von Protein A und jedem Atom von allen aktiven und passiven Resten von Protein B. Aminosäure-Reste, die an der Komplexbildung beteiligt sind, werden als aktive und Reste, die mit einer hohen Oberflächenzugängigkeit direkt benachbart sind, als passive AIRs definiert.

Das Docking der Proteine an den definierten jeweiligen Bindungsflächen mittels HADDOCK erfolgt prinzipiell in drei Schritten. Im ersten Schritt, dem sogenannten *rigid body minimization*, werden möglichst viele Komplex-Strukturen generiert, in denen die Peptide als starre Körper zufällig zueinander orientiert und die Distanzen zwischen den Molekülen unter Energie-Minimierung möglichst gering sind. Dieser erste Schritt dient dazu, unbeeinflusste Startpunkte, bzw. Startstrukturen für das Proteindocking mit flexiblen Proteinbereichen zu erhalten. In diesem Schritt werden die Moleküle noch als starre Körper behandelt. Im nächsten Schritt erfolgt die erste Verfeinerung der Komplexstruktur, dem *TAD-SA* oder *semi-flexible simulated annealing in torsion angle space*. Hier werden ausgehend von den x-besten Strukturen aus der *rigid body minimization* erst die Seitenketten und anschließend zusätzlich die Hauptkette der Bindungsfläche flexibel und können sich frei bewegen. Durch die Flexibilität der Bindungsbereiche bei der Rechnung wird den realen Geschehnissen bei der Komplexbildung Rechnung getragen, da jedes Bindungsgeschehen bei den direkt betroffenen und ihren benachbarten Aminosäuren zumindest kleinere konformationelle Änderungen hervorruft, die so in der Rechnung berücksichtigt werden können. Im abschließendem Schritt erfolgt eine Verfeinerung der Komplexstrukturen in einer Wasserhülle von 8 Å (*water refinement*) und die automatische Analyse der Komplexstrukturen.

Die automatische Analyse beinhaltet die Bewertung der Strukturen nach Energien in kcal/mol. Die totale Energie (E_{total}) des Strukturmodells ergibt sich aus der Summe der totalen inter- und intramolekularen Energien

$$E_{total} = E_{bond} + E_{angle} + E_{imp} + E_{dihed} + E_{vdw} + E_{elec} , \quad (3.18)$$

wobei für die totale inter- und intramolekularen Protein-Protein Energien gilt

$$E_{total}^{inter} = E_{vdw} + E_{elec} , \quad (3.19)$$

$$E_{total}^{intra} = E_{bond} + E_{angle} + E_{imp} + E_{dihed} . \quad (3.20)$$

Die Bestimmung des Strukturmodells vom Saratin-Kollagen-Komplex basiert auf der experimentellen Lösungsstruktur von Saratin, der mit dem Programm THE BuScr vorhergesagten Struktur des Kollagen-Peptides und der Bindungsfläche von Saratin. Der maximale Wert der AIRs auf 5 Å festgelegt. In der vorgestellten Rechnung wurden bei Saratin die an der Kollagen-Bindung beteiligten Aminosäuren als aktive AIRs und die sequentiell benachbarten Aminosäuren mit einer großen Oberflächenzugänglichkeit als passive AIRs definiert. Bei dem tripelhelikalen Kollagen-Peptid ist bis dato nicht bekannt

welche Aminosäuren an der Bindung mit Saratin beteiligt sind. Daher wurden alle Aminosäuren als passive AIRs definiert und so die gesamte Proteinoberfläche als potentielle Bindungsstelle frei gegeben. Für die Rechenparameter wurden überwiegend die Default-Einstellungen übernommen. Nur die Anzahl der MDs im dritten Abkühlungsschritt wurde auf 1 reduziert. Diese Parametereinstellung ermöglicht die Berechnung von Komplexstrukturen auch mit Peptiden deren Aminosäuren ausschließlich als passive AIRs definiert sind. Es wurden im ersten Schritt der Modellberechnung 500 Strukturen bestimmt. Die 20 energetisch besten Strukturen daraus wurden im zweiten Schritt, dem *TAD-SA*, verfeinert. Abschließend wurden diese 20 Strukturmodelle im Lösungsmittel verfeinert und analysiert. Die Bewertung der Komplexstrukturen erfolgte anhand der von HADDOCK ermittelten totalen Energien E_{total} .

3.4.2.1 Cluster-Analyse

Das Programm HADDOCK führt eine automatische Analyse durch, ob das Peptid A bei der Komplexbildung eine bestimmte Vorzugsorientierung am Peptid B einnimmt und so bei den ermittelten Komplexstrukturen Cluster von dieser Ausrichtung bildet. Im Rahmen dieser Cluster-Analyse werden alle Komplexstrukturen jeweils an den Hauptkettenatomen von Saratin paarweise überlagert und der RMSD-Wert für jede mögliche Paarung in Å ermittelt. Man erhält eine RMSD-Matrix der Komplexstruktur-Paare, anhand derer Cluster-Bildung identifiziert und die beteiligten Strukturen aufgelistet werden. Für die Cluster Parameter wurden die Default Einstellungen übernommen. Demnach ist ein Cluster bei der automatischen Cluster-Analyse definiert, wenn mindestens vier Komplexstrukturen einen maximalen RMSD-Wert, den sogenannten *RMSD-cutoff*, von 1,5 Å aufweisen.

In manchen Fällen ist es nötig den *RMSD-cutoff* zu variieren. Zeigt nur eine kleine oder gar keine Fraktion der Komplexstrukturen eine bestimmte Vorzugsorientierung, ist es sinnvoll den maximalen RMSD-Wert anzuheben. Dies kann der Fall sein, wenn die Strukturen auf denen das Protein-Docking basiert von geringer Qualität sind oder die Bindung zumindest eines Interaktionspartners unspezifisch ist. Für diesen Fall ermöglicht HADDOCK mit dem Skript *cluster_struc* eine manuelle Cluster-Analyse der ermittelten Komplexstrukturen. Analog zur automatischen Analyse werden die Cluster anhand der paarweisen RMSD-Matrix generiert und ausgegeben. Die manuelle Cluster-Analyse der Komplexstrukturen wurden mit verschiedenen RMSD-cutoffs im Bereich von 1,5 Å bis 13 Å in fünf Schritten vorgenommen. Die minimale Cluster-Größe wurde mit zwei Strukturen festgelegt.

3.5 Zuordnung von Cam-HrTH-I

3.5.1 Probenzusammensetzung und Spektrenaufnahme

Das Protein Cam-HrTH-I wurde aus der Corpora Cardata von Stabheuschrecken der Art *Carausius morosus* isoliert und chromatographisch gereinigt. Die Proteinsequenz-Analyse erfolgte massenspektroskopisch und mittels Edman-Abbau. Die Isolierung, Reinigung und Sequenzierung ist vollständig in [Gäd92] beschrieben.

Das Protein Cam-HrTH-I wurde in 5mM Kalium-Phosphat-Puffer und 4mM HCl bei pH 5,4 nach Hofsteenge gelöst [Hof94]. Zur Herstellung der NMR-Proben wurde 0,2 mM DSS als Standard und 100 mM NaN₃, 100 µM Leupeptin, 100 µM Pepstatin und 10 µM BPTI als Protease-Inhibitoren beigefügt. Die durchgeführten Messungen erfolgten sowohl in 95% H₂O/D₂O und als auch nach Lyophilisierung in 99,9% D₂O. Die Beimengung von mindestens 5% D₂O ist erforderlich um mit Hilfe des Deuterium-Locksignals die Homogenität des stationären Feldes sicher zu stellen. Die Proben wurden ausschließlich in 5mm-Glasröhrchen gemessen, was einem Probenvolumen von 500 µl entspricht.

3.5.2 NMR-Experimente zur Zuordnung der Resonanzen

Die NMR Experimente wurden an einem Bruker DRX600 und DRX800 Spektrometer aufgenommen (Protonenresonanzen von 600 MHz, bzw. 800 MHz), die mit Tripelresonanz-Probenköpfen ausgestattet sind und gepulste Feldgradienten erzeugen können. Das Bruker DRX800 Spektrometer ist zusätzlich mit einen Kryo-Probenkopf ausgestattet. Es wurde bei einer Temperatur von 287 K gemessen [Hof94]. Die chemischen Verschiebung der Protonen wurden auf den internen Standard DSS (2,2-Dimethyl-2-Silapentanon-5-Sulfonsäure) referenziert. Die Aufnahme der Messungen und Prozessierung erfolgte mit dem Programm XWINNMR (Bruker, Karlsruhe). Die Daten wurden mit dem Programm AUREMOL [Gro04] ausgewertet.

Für die Zuordnung der Spinsysteme und die Identifikation der Substitutionsstelle der Hexose wurden folgende Experimente verwendet:

- 2D NOESY,

- 2D TOCSY,
- 2D ^{13}C -HSQC,

Die Experimente wurden in 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ und nach Lyophilisierung in 99,9% D_2O als Lösungsmittel aufgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Die Lösungsstruktur von Saratin

4.1.1 Zuordnung der Resonanzen

Das grundsätzliche Prinzip bei der sequenzspezifischen Zuordnung der Resonanzen bestand darin, zunächst die einzelnen Spinsysteme aus geeigneten heteronuklearen Spektren zu isolieren und mit dem Programm AURELIA [Nei95] in Form von Streifen (*strips*) zu dokumentieren. In dieser Form wurden anhand der chemischen Verschiebungen der C $^{\alpha}$ - und C $^{\beta}$ -Atome die sequentiell benachbarten Spinsysteme in Blöcken zusammengefasst und anschließend nach und nach in die Primärsequenz eingepasst.

Auf diese Art konnte durch Kombination der Daten aus 3D HNCA, 2D ^1H - ^{15}N HSQC, 3D NOESY, 3D CBCANH und 3D CBCA(CO)NH die Kerne des Proteinrückgrats vollständig sequentiell zugeordnet werden. In Abbildung 13 ist die sequentielle Abfolge der in *strips* dargestellten Spinsysteme von Glu1 bis Glu52 für das 3D HNCA abgebildet.

Die Zuordnung der Atome der Seitenketten erfolgte mit 3D HCCH-TOCSY, 3D NOESY und 3D TOCSY-HSQC Spektren. Die Daten des 3D HCCH-TOCSY Spektrums korrelieren mit den Daten der sequentiellen Zuordnung und bestätigen die sequentielle Zuordnung. Die Zuordnung der Seitenketten-Atome aromatischer Aminosäuren wurde mit einem 2D ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum vervollständigt.

Die Vollständigkeit der zugeordneten Resonanzen ist in Tabelle 2 geordnet nach den Atomtypen aufgelistet. Es wurden 90,3% aller Resonanzen zugeordnet. In der Regel liegt die Vollständigkeit für die Zuordnung ähnlich großer Proteine im Bereich von ca. 80% - 90%. Eine vollständige Liste der chemischen Verschiebungen befindet sich im Anhang.

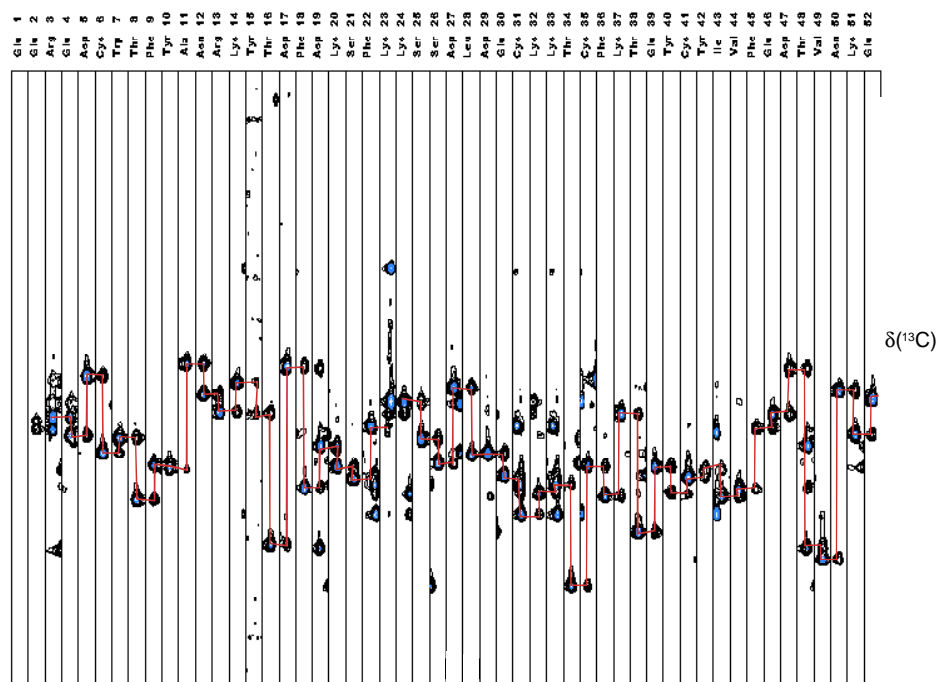


Abbildung 13 Sequentielle Abfolge der Spinsysteme im 3D HNCA-Spektrum. Das HNCA-Spektrum zeigt die Signale der $C^{\alpha i}$ - und $C^{\alpha i-1}$ -Kerne. Dargestellt sind streifenförmige Ausschnitte des HNCA-Spektrums in der sequentiellen Abfolge der Aminosäuren Glu1 bis Glu52. Die Konnektivitäten, wie sie sich aus der Analyse von HNCA- und CBCA(CO)NH-Spektren ergeben, sind rot hervorgehoben.

Atomtyp	Anzahl insgesamt	nicht zugeordnet	Zuordnung in %
H α	108	2	98,1%
H β	176	4	97,7%
H δ	58	0	100,0%
H ϵ	40	0	100,0%
H γ	86	4	95,3%
H η	5	4	20,0%
HN	103	1	99,0%
H ζ	19	10	47,4%
N	103	1	99,0%
N δ	6	0	100,0%
N ϵ	4	0	100,0%
N η	4	4	0,0%
N ζ	10	10	0,0%
C	103	11	89,3%
C α	103	0	100,0%
C β	98	0	100,0%
C δ	52	20	61,5%
C ϵ	26	4	84,6%
C γ	92	26	71,7%
C η	1	1	0,0%
C ζ	18	16	11,1%
Insgesamt	1215	118	90,3%

Tabelle 2 Vollständigkeit der zugeordneten Resonanzen der verschiedenen Atomtypen von Saratin. Es wurden 90,3% aller Resonanzen der verschiedenen Kerntypen zugeordnet. Die Zuordnung erfolgte mit Spektren die bei 600 MHz, 298 K und pH 6,5 aufgenommen wurden.

Das vollständig zugeordnete und beschriftete ^1H - ^{15}N -HSQC (Abbildung 14) gibt einen schnellen Überblick über Resonanzfrequenzen der N- und H^{N} -Atome aller Aminosäuren von Saratin. Das HSQC-Spektrum stellt damit einen charakteristischen Fingerprint der Hauptkette des Proteins dar. Es zeigt 115 gut separierte Signale, von denen 102 durch Amid-Protonen von Saratin erzeugt werden. Die anderen Signale sind auf Signale aus den Seitenketten oder auf Störungen zurückzuführen.

Die ungewöhnlichen chemischen Verschiebungen von zwei H^{N} -Kernen bei 4,4 ppm und 5,6 ppm wurden anhand der entsprechenden Konnektivitäten in den HNCA- und CBCA(CO)NH-Spekten (Abbildung 13) eindeutig den Aminosäuren Tyr15 und Asp17 zugeordnet.

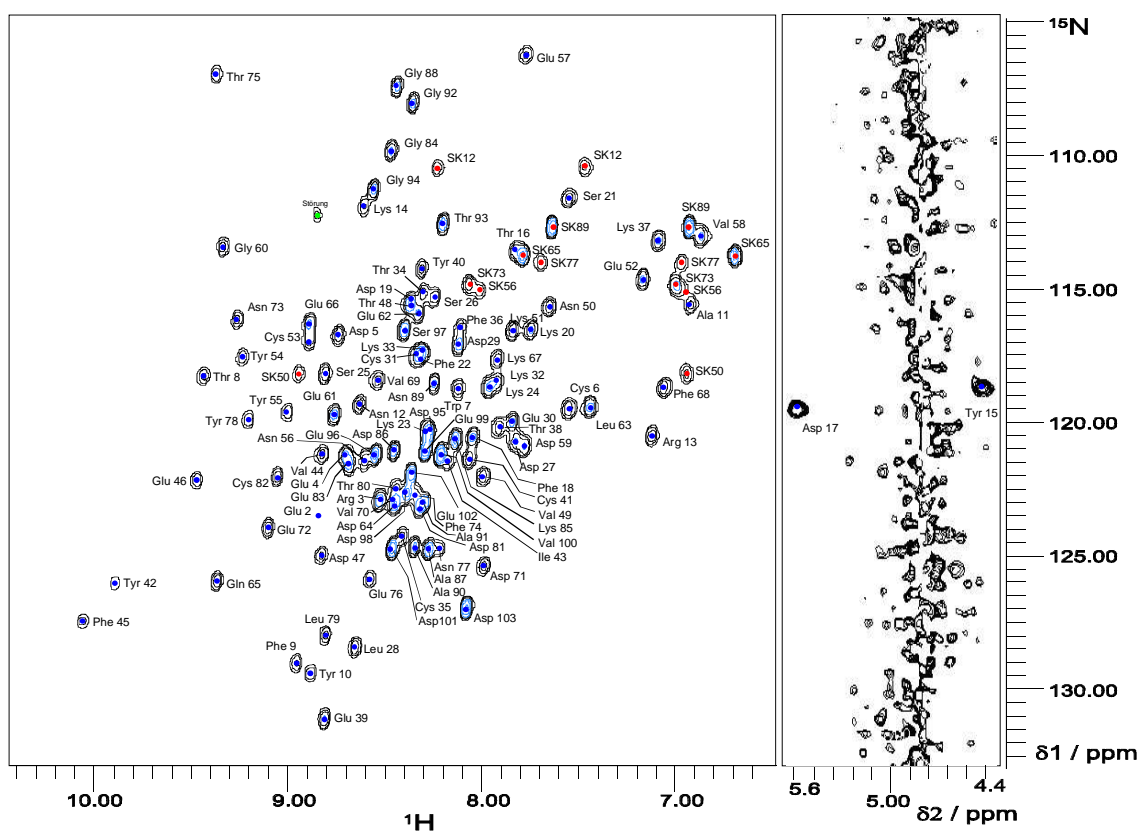


Abbildung 14 Vollständig beschriftetes 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC Spektrum von Saratin. Das Spektrum wurde bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz, pH 6,5 und 298 K von einer ^{15}N -gelabelten Probe aufgenommen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Aminosäuren Asp17 und Tyr15 in einem eigenen Fenster rechts dargestellt. Die gemessenen Resonanzen konnten zu 100% identifiziert werden und sind im Drei-Buchstaben-Code beschriftet.

4.1.2 Sekundärstruktur

4.1.2.1 Vorhersage durch chemische Verschiebung

Die Kerne der Hauptkette H^α , C^α und C^β einer Aminosäure weisen in den jeweiligen Sekundärstrukturelementen typische Abweichungen von ihren *random-coil*-Werten auf. Anhand dieser Abweichungen der chemischen Verschiebungen der Kerne vom *random-coil*-Wert kann somit die Sekundärstruktur eines Proteins vorhergesagt werden. Die *random-coil*-Werte, also die chemischen Verschiebungen dieser Kerne in unstrukturierten Strukturbereichen, wurden von Wishart et al. [Wis95] durch Messung an kurzen Peptiden ermittelt und tabelliert.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur von Saratin erfolgte anhand der zugeordneten chemischen Verschiebung nach Wishart [Wis95] und der Berechnung des *chemical shift index* (CSI) [Wis94]. Diese Verfahren lieferten eine gute Vorhersage der Sekundärstruktur, die durch die Analyse von NOE-Kontakten, Relaxationszeiten und den Daten aus der Analyse der Protein-Dynamik untermauert wurde.

Die Änderungen der chemischen Verschiebungen der H^α -, C^α - und C^β -Kerne jeder Aminosäure ist in Abbildung 15 dargestellt. Auffällig ist, dass sich die Resonanzen aller drei Kerntypen der C-terminalen Aminosäuren von Saratin nahezu *random coil* Werten annähern. Diese Übereinstimmung ist ein starker Hinweis darauf, dass der C-Terminus ab Leu79 frei beweglich ist. Die Resonanzänderungen der Kerne der restlichen Aminosäuren weisen auf ein bis zwei α -Helices und fünf bis sechs β -Stränge hin.

Die graphische Darstellung der Änderungen der chemischen Verschiebungen jeweils eines Kern-Typen jeder Aminosäure gegen die Proteinsequenz (Abbildung 15) liefert nur eine "grobe" Vorhersage. Eine exakte Eingrenzung der Sekundärstrukturbereiche ist in vielen Fällen schwierig, da eventuell auftretende Schwankungen die Grenzen der Strukturelemente verwischen können. Eine aussagekräftigere Darstellung ergibt sich aus dem *chemical shift Index* (Abbildung 16).

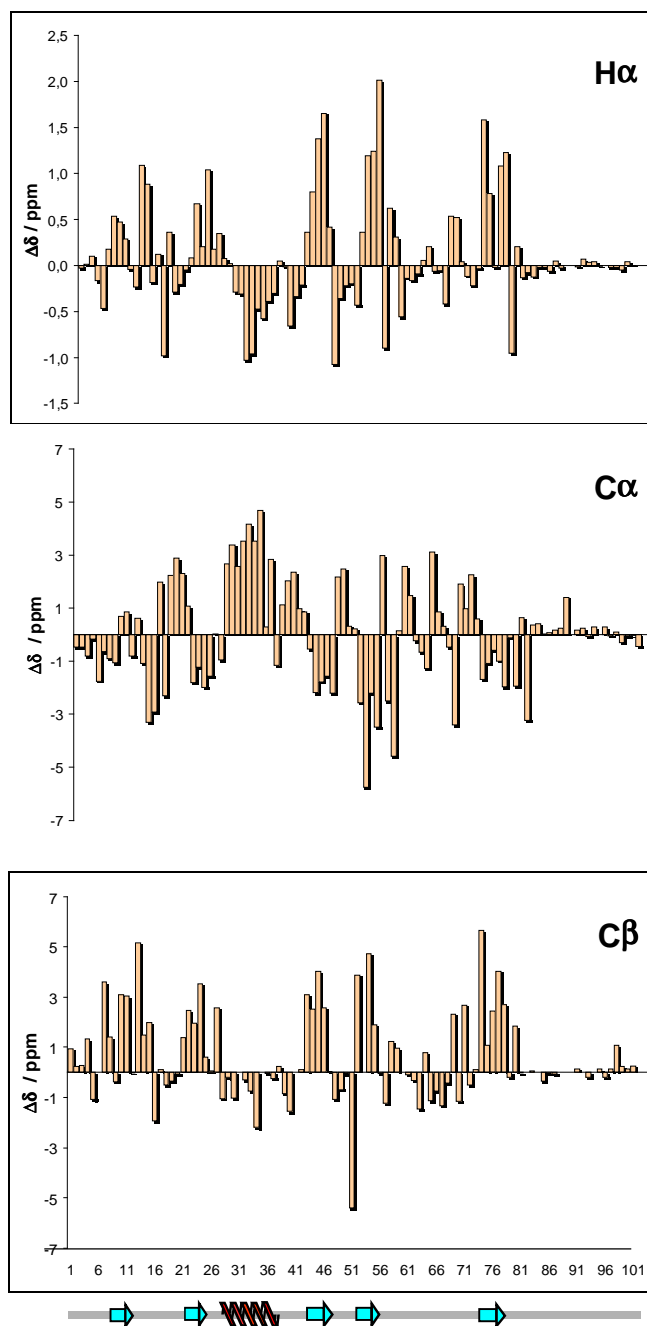


Abbildung 15 Änderung der chemischen Verschiebungen von H α -, C α - und C β -Kernen relativ zum jeweiligen *random coil* Wert (n. Wishart). Der C-Terminus weist, typisch für einen frei beweglichen Bereich, bei den Resonanzen aller drei Kerntypen nahezu *random coil* Werte auf. Die C α -Resonanzen sind bei α -Helices deutlich Tieffeld, also in Richtung größerer ppm-Werte, und bei β -Strängen Hochfeld verschoben. Bei H α - und C β -Resonanzen verhält es sich genau umgekehrt. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen verweisen auf folgende Strukturelemente: einen beweglichen C-Terminus (ab Leu79), ein bis zwei α -Helices und fünf bis sechs β -Stränge hin.

Bei der Berechnung wird der C'-Kern als vierter Kern in die Auswertung mit einbezogen. Die Daten werden so verarbeitet, dass im sogenannten CSI-Plot nicht mehr der jeweilige Wert der Änderung der chemischen Verschiebung jeder Aminosäure für jeden Kern extra aufgetragen wird, sondern die Werte aller Kerne einer Aminosäure auf einem diskreten Wert "zusammengefasst" werden (1 für β -Strang, 0 für *random coil* und -1 für α -Helix). Die graphische Darstellung des CSI-Plots von Saratin ist in Abbildung 16 gezeigt.

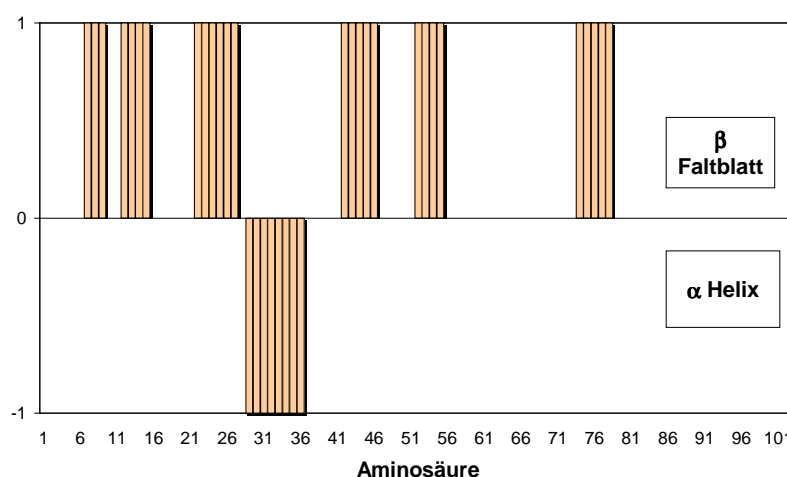


Abbildung 16 Darstellung des *chemical shift index* (CSI). Der *chemical shift Index* verweist auf eine α -Helix (Asp29 - Phe36) und sechs β -Stränge (Trp7 - Phe9, Asn12- Tyr15, Phe22 - Asp27, Tyr42 - Glu46, Glu52 - Tyr55, Phe74 - Tyr78). Der diskrete Wert 1 steht für β -Strang, -1 für α -Helix und 0 für *random coil*.

Der CSI-Plot verweist auf eine α -Helix (Asp29 - Phe36) und 5-6 β -Stränge (Trp7 - Phe9, Asn12 - Tyr15, Phe22 - Asp27, Tyr42 - Glu46, Glu52 - Tyr55, Phe74 - Tyr78). Der C-terminale Bereich ab Leu79 weist kein Sekundärstrukturelement auf.

Ob es sich bei den ersten beiden N-terminalen β -Strängen um zwei getrennte Stränge oder eventuell einen längeren handelt kann alleine anhand der chemischen Verschiebungen nicht eindeutig entschieden werden. Hierfür ist die Analyse der NOE-Kontakte von entscheidender Bedeutung, die für jeden Sekundärelement-Typ ein bezeichnendes Muster aufweisen.

Anhand der chemischen Verschiebungen der Kernresonanzen wurden auch die an Disulfidbrücken beteiligten Cysteine bestimmt. Die C_β -Kerne von oxidierten, wie sie in einer S-S-Bindung vorliegen, und reduzierten, "freien" Cysteinen weisen typische Verschiebungen auf

[Wis94]. In reduzierten Cysteinen liegen die chemischen Verschiebungen der C_β -Kerne im Bereich von 28 ppm, bei oxidierten im Bereich von 41 ppm. Die chemischen Verschiebungen der sechs Cystein C_β -Atome von Saratin liegen im Bereich von 40 bis 46 ppm. Demnach sind alle sechs Cysteine von Saratin in Disulfid-Brücken gebunden. Aus der Strukturrechnung und NOE-Kontakten ergibt sich ihre Lage und Verknüpfung. Zwei Brücken (Cys31 \leftrightarrow Cys53 und Cys35 \leftrightarrow Cys41) verbinden im Kern des Proteins die α -Helix mit B4 und B3. Die Dritte (Cys6 \leftrightarrow Cys82) verbindet an der Protein Oberfläche die Termini miteinander (Abbildung 17).

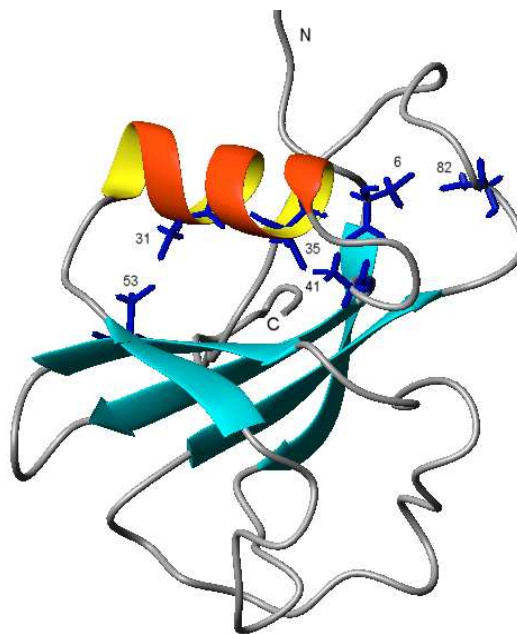


Abbildung 17 Lage der Disulfid-Brücken bei Saratin. Die in einer Disulfid-Brücke gebundenen Cysteine (Nummer der AS nebenstehend) sind dunkelblau hervorgehoben.

4.1.2.2 Sekundärstrukturbestimmung durch NOE-Kontakte

In Abbildung 18 sind die verschiedenen NOE-Kontakte von Saratin dargestellt. Die Definition der Sekundärstrukturen mittels der NOE-Kontakte korreliert mit der Vorhersage aus den chemischen Verschiebungen und den CSI-Werten. Daraus resultieren folgende Sekundärstrukturelemente: eine α -Helix (H: Leu28 - Lys37) und fünf β -Stränge (B1: Trp7 - Ala11, B2: Ser21 - Lys24, B3: Ile43 - Asp47, B4: Glu52 - Asn56 und B5: Phe74 - Leu79).

Dies ergibt einen α -helikalen Anteil an der Struktur von Saratin von 10,3% und 25,7% igen Anteil an β -Strängen. Die Strukturelemente sind durch die für sie charakteristischen NOE-Kontakte sehr gut definiert. Die α -Helix weist das typische Muster an sequentiellen Kontakten der Amid-Protonen $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$ - und $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ -Kontakten auf. Das β -Faltblatt ist durch $d_{\alpha N}(i, i+1)$ - und $d_{\alpha N}(i, j)$ -Kontakte definiert. Außerdem weisen die β -Stränge das für antiparallele β -Stränge typische Kontaktmuster an $d_{\alpha\alpha}(i, j)$ - und $d_{NN}(i, j)$ -Kontakten auf.

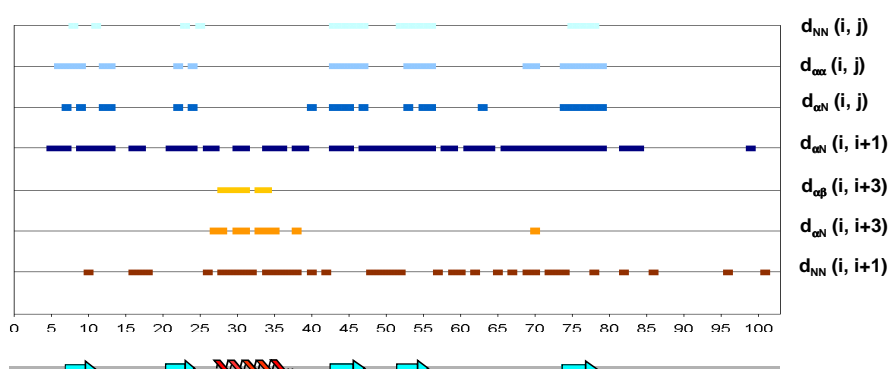


Abbildung 18 Sekundärstrukturdefinierende NOE-Kontakte bei Saratin. Farbige Balken zeigen die Existenz eines NOE-Signals an. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die nachgewiesenen Kontakte die charakteristisch für β -Stränge sind blau und die der α -Helices orange hervorgehoben.

Die langreichweitigen NOE-Kontakte und Wasserstoff-Brücken zwischen den einzelnen β -Strängen geben einen Aufschluß über die Topologie des β -Faltblattes. In Abbildung 20 ist die β -Faltblatt-Region mit allen nachgewiesenen Konnektivitäten graphisch dargestellt. Die fünf Stränge formen ein regelmäßiges β -Faltblatt, indem B1 bis B5 jeweils antiparallel orientiert sind (Abbildung 19).

Die C-terminale Region ist durch NOE-Kontakte kaum definiert. Ab Thr80 werden keine langreichweitigen und nur wenige sequentielle NOEs beobachtet. Da Cys82 über eine Disulfid-Brücke (Cys6 \leftrightarrow Cys82) quasi "fixiert" ist, liegt die Vermutung nahe, dass der C-Terminus ab Glu83 frei beweglich ist und keine definierte Sekundärstruktur aufweist. Spätere Experimente zur Moleküldynamik bestätigen diese Annahme.

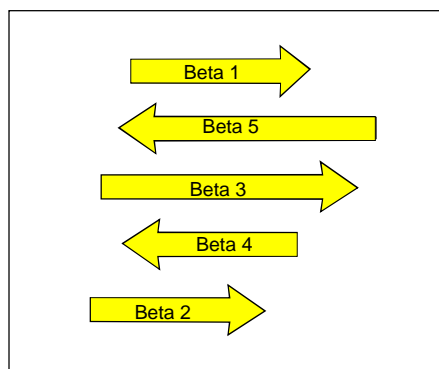


Abbildung 19 Orientierung der fünf β -Stränge von Saratin (B1 bis B5). Die β -Stränge formen ein regelmäßiges antiparalleles β -Faltblatt.

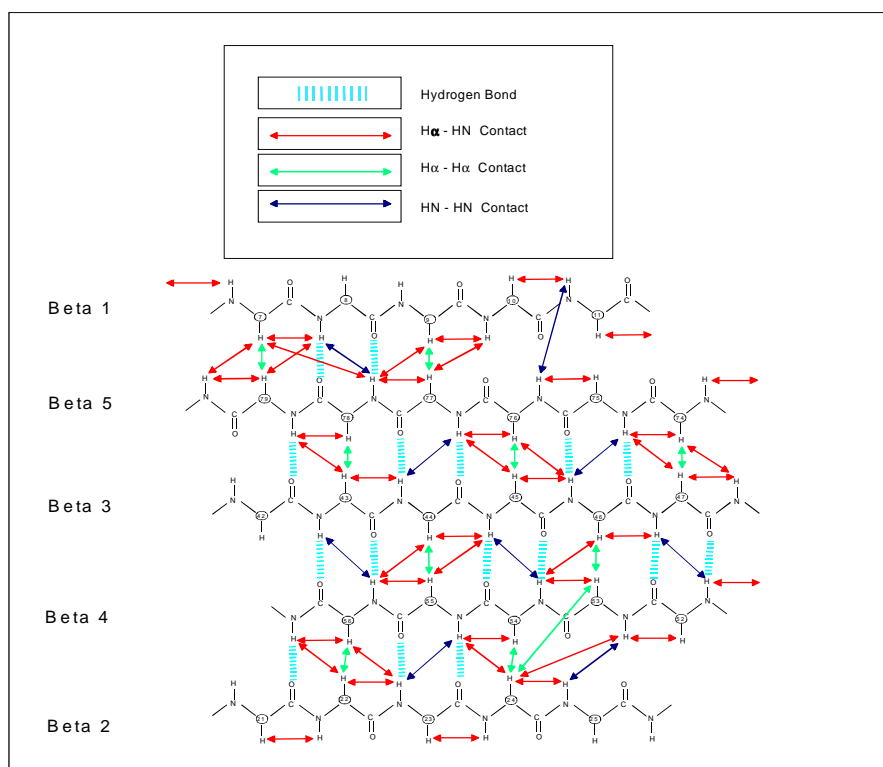


Abbildung 20 β -Faltblatt-Topologie von Saratin. Die langreichweitigen NOE-Kontakte zwischen den β -Faltblattelementen sind farbig hervorgehoben. $d_{\alpha N}$ (i, j): rot, $d_{\alpha\alpha}$ (i, j): grün und Wasserstoff-Brücken: blau.

4.1.2.3 Dynamik des Proteinrückgrats

Die Dynamik des Proteinrückgrats wurde mit ^{15}N - T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten der ^{15}N -Kerne des Proteinrückgrats und heteronukleare ^1H - ^{15}N -NOEs (hetNOEs) charakterisiert.

Abbildung 21 zeigt die T_1 - und T_2 - und hetNOE-Werte der Aminosäuren von Saratin. Die Relaxationszeiten, wobei immer gilt $T_1 > T_2$, und heteronukleare NOEs (hetNOEs) haben über einen weiten Bereich des Moleküls (Glu4 bis Thr80) nahezu konstante Werte. Für diesen zentralen Molekülbereich nehmen die Relaxationsrate R_1 im Mittel ein Wert von 1,24 Hz ($\pm 0,2$), für die transversale Relaxation eine Rate R_2 von 6,62 Hz ($\pm 2,8$) und ein mittlerer hetNOE von 0,74 ($\pm 0,08$) an. Die Daten zeigen, dass diese Region keine Mobilität aufweist.

Die Relaxationszeiten des Proteinrückgrats T_1 und T_2 des C-Terminus weisen ab Gly84 gegenüber dem gefalteten zentralen Bereich höhere Werte auf. Ebenso verhält es sich im N-Terminus bis Glu4. Generell gilt, dass die longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten des Proteinrückgrats in mobilen Bereichen größer sind als die in gefalteten und strukturierten Teilen. Demnach weisen C- und N-Terminus eine höhere Mobilität auf.

Die Werte der heteronuklearen NOEs der Aminosäuren im C- und N-Terminus nehmen im Vergleich zu den Werten im zentralen Bereich der Sequenz ab (Abbildung 21). C-terminal, ab Lys85, nehmen die heteronuklearen NOEs negative Werte an (Abbildung 22). Dies konvergiert mit den Ergebnissen der Relaxationszeiten des Proteinrückgrats. Diese Proteinbereiche weisen, wie bereits aus der Sekundärstrukturvorhersagen hervorgeht eine hohe Mobilität auf. Die Termini sind demnach nicht strukturiert und frei beweglich.

Eine vollständige Liste der die Dynamik von Saratin beschreibenden Relaxationsparameter ist im Anhang aufgeführt.

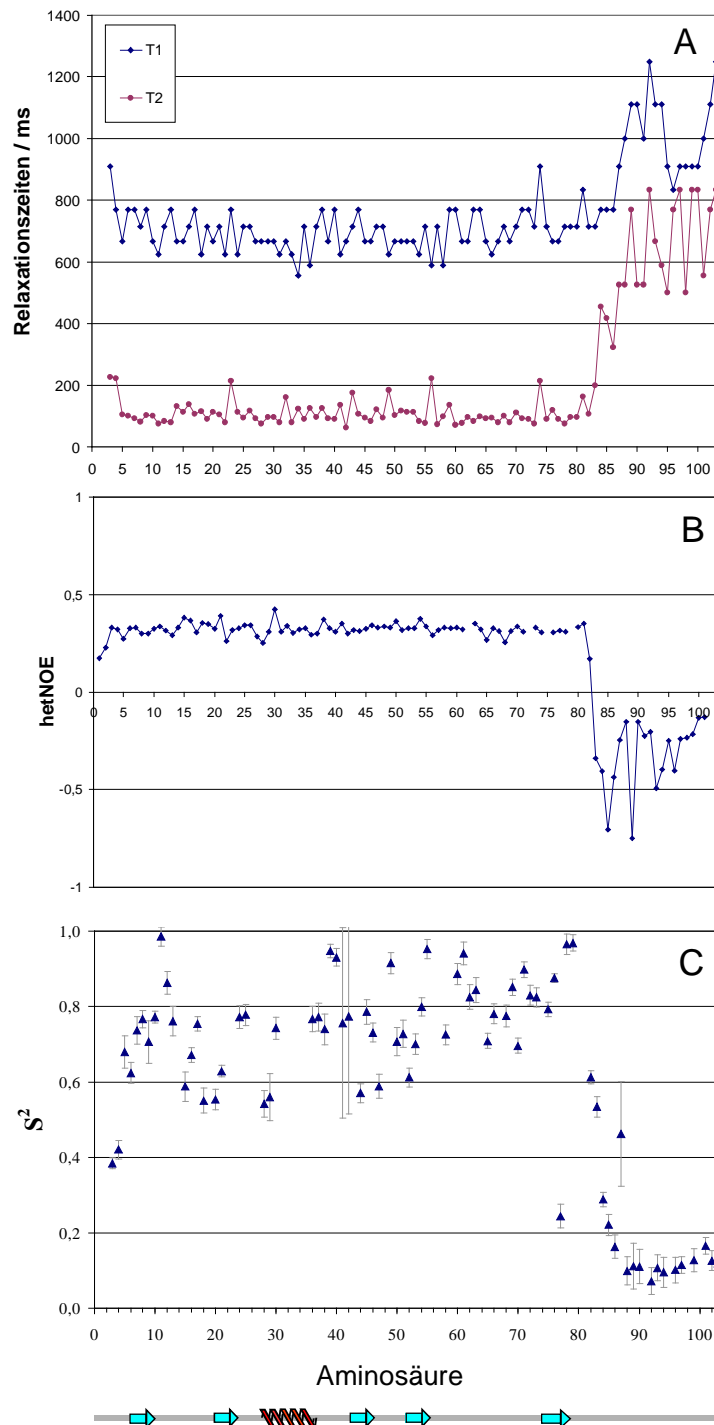


Abbildung 21 Moleküldynamik von Saratin. A) Relaxationszeiten T_1 und T_2 der ^{15}N -Kerne des Proteinerückgrats. B) Heteronukleare NOEs (hetNOE). C) Ordnungsparameter S^2 . Die Relaxationszeiten und heteronuklearen NOEs wurden bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz und 298 K an einer ^{15}N -markierten Saratin Probe (pH 6,5) gemessen. Der Ordnungsparameter S^2 wurde mit dem Programm Dynamics [Fus97] bestimmt. Zunehmende Relaxationszeiten und abnehmende hetNOE-Werte im Bereich der Termini zeigen, dass diese Regionen hohe Mobilität aufweisen.

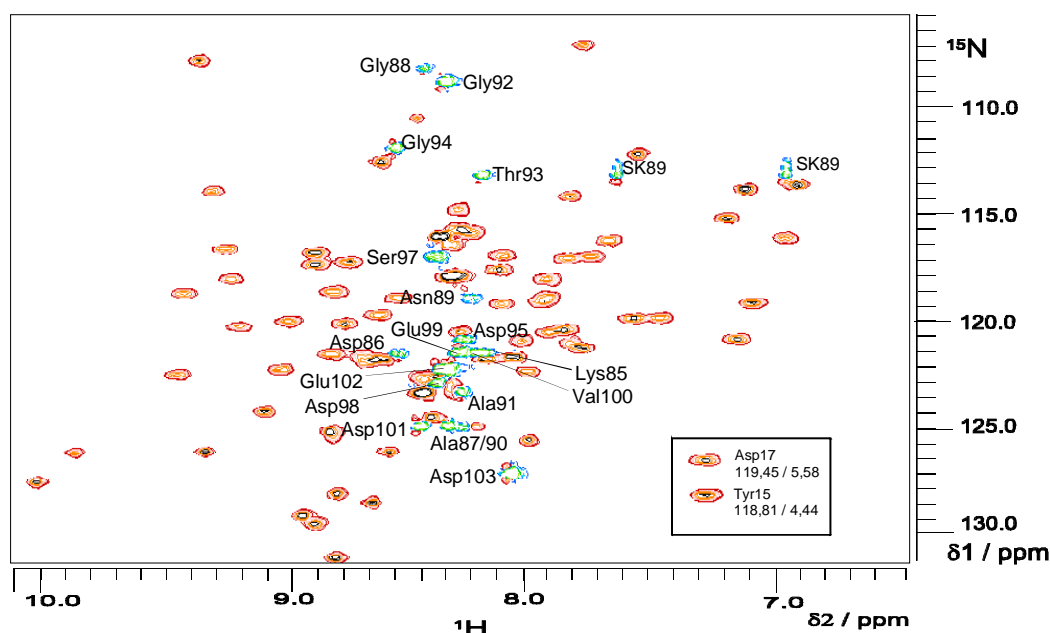


Abbildung 22 Heteronukleares ^1H - ^{15}N NOESY von Saratin, gemessen bei 600 MHz, pH 6,5 und 298 K. Ab Lys85 weisen die Aminosäuren negative (blau) heteronukleare NOEs auf. Sie bilden einen beweglichen Strukturteil. Aminosäuren in unbeweglichen Strukturteilen haben positive (rot) Werte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind Aminosäure Asp17 und Tyr15 zusammen mit ihren Koordinaten in einem eigenen Fenster rechts unten dargestellt.

4.1.3 Restraints für die Strukturrechnung

Strukturbestimmend sind vorallem die Distanz-Einschränkungen gegeben durch NOE-Kontakte. Sie definieren zum Beispiel mittels langreichweitigen Kontakten die räumliche Faltung der Polypeptidkette. Wasserstoff-Brücken definieren zusätzlich zu sequentiellen und mittelreichweitigen NOE-Kontakten die Sekundärstrukturelemente im Protein. Weitere Struktureinschränkungen stellen Rest-Dipolkopplungen und dihedrale Winkel dar. Die dihedralen Winkel ϕ und ψ legen die räumliche Anordnung der Atome in der Protein-Hauptkette, deren Konformation, fest. Die Winkel ϕ und ψ schränken so die Freiheitsgrade des Proteins bei der Strukturrechnung zusätzlich ein.

4.1.3.1 NOE-Kontakte

Zur Strukturanalyse wurden NOE-Daten aus zwei und drei dimensional Spektren herangezogen: ein 2D NOESY gemessen in H₂O und in D₂O, sowie ein 3D NOESY-HSQC. Aufgrund der hohen Qualität der Spektren und der nahezu vollständigen Zuordnung der Resonanzen konnte eine große Zahl an zweifelsfrei zuordbaren Abstandseinschränkungen ermittelt werden. Die hohe Anzahl der NOE-Kontakte erlaubte es die, nach Eliminierung doppelt zugeordneter Signale, noch vorhandenen NOEs, die aufgrund der Größe ihrer Abstände als unwahrscheinlich eingestuft wurden, nicht in die Strukturrechnung miteinfließen zu lassen.

Zweifelsfrei zuordbar waren 1338 NOE-Kontakte. Die Zusammensetzung nach NOE Typen ist in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Die meisten Einschränkungen sind intra-residueller Natur, bezeichnet mit NOE_{i=j} (i und j bezieht sich auf die Aminosäure Nummer in der Sequenz).

NOE-Kontakt	Anzahl
intraresiduelle ($i = j$)	660
sequentielle ($ i - j = 1$)	297
kurzreichweitige ($ i - j \leq 4$)	76
langreichweitige ($ i - j > 4$)	305
Gesamt	1338

Tabelle 3 Statistik der zweifelsfrei zuordbaren NOE-Einschränkungen. Die aufgelisteten NOE-Kontakte sind Bestandteil der Datenbasis für die Strukturrechnung.

In Abbildung 23 ist die Anzahl und Art der erhaltenen NOE-Einschränkungen für jede Aminosäure dargestellt. Deutlich sind die flexiblen Bereiche am N- und C-Terminus zu erkennen. Für diese Sequenzabschnitte wurden kaum Abstandsinformationen erhalten. Die Sekundärstrukturelemente sind durch eine große Anzahl und der für sie typischen NOE-Kontakte charakterisiert (siehe 4.1.2.2). Überraschenderweise sind die Regionen der beiden längeren Loops die B1 mit B2 (im folgenden L1 genannt) und B4 mit B5 (L2) verbinden durch eine Vielzahl von NOEs definiert. Erwartungsgemäß zeichnen sich die

Bereiche von längeren Loops durch eine hohe Beweglichkeit und infolge dessen eine geringe Anzahl an Abstandseinschränkungen aus. L1 und L2 umspannen sich überkreuzend fast eine ganze Seite des β -Faltblatts, und sind so aufgrund dieser Lage in ihrer Mobilität eingeschränkt.

Alle ermittelten NOE-Kontakte sind im Anhang aufgelistet.

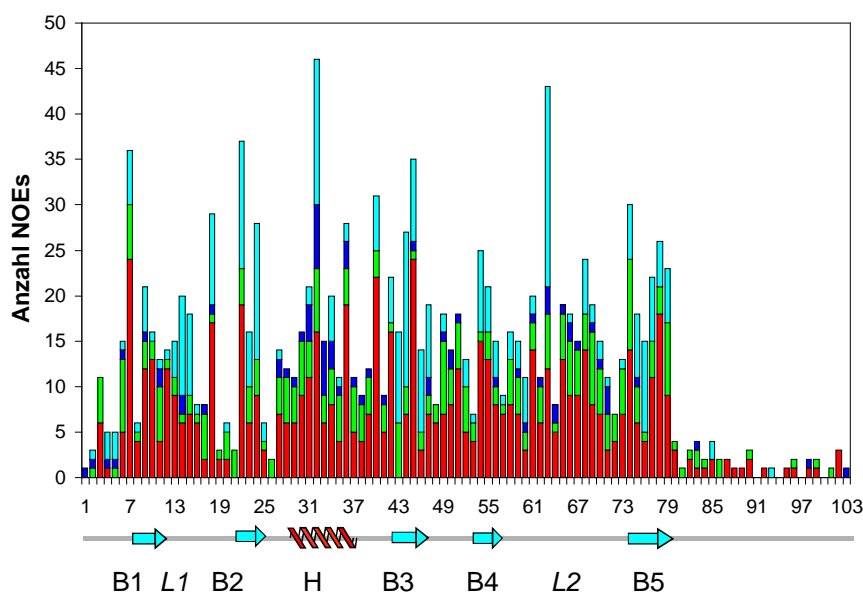


Abbildung 23 Übersicht über alle für die Strukturaufklärung zugängigen NOEs. Die Sekundärstrukturbereiche sind durch NOE-Kontakte gut definiert. Am C-terminalen Ende des Proteins (Glu83 bis Asp103) und N-terminalen (Glu1 bis Arg3) sind nur sehr wenig NOE-Informationen zugänglich. (Rot: intraresiduelle NOEs ($i=j$), grün: sequentiell benachbarte NOEs ($|i-j|=1$), dunkelblau: kurzreichweitige NOEs ($1 < |i-j| \leq 4$), hellblau: langreichweitige NOEs ($|i-j| > 4$)).

4.1.3.2 Wasserstoff-Brücken

Die Sekundärstrukturelemente α -Helix und β -Faltblatt sind in der NMR charakterisiert durch das bereits beschriebene Muster der NOE-Kontakte, aber auch durch das Auftreten von Wasserstoff-Brücken. Wasserstoff-Brücken gehören zu den wichtigsten Wechselwirkungen bei der Ausbildung von Sekundärstrukturen. Bei α -Helices werden die die Sekundärelemente stabilisierenden Wasserstoff-Brücken zwischen dem Amid-Proton der Aminosäure

i und dem Carbonyl-Sauerstoff des Restes i-4 ausgebildet. Die Brücken liegen nahezu parallel zur Hauptachse der α -Helix. Im Fall des β -Faltblatts werden die stabilisierenden Brücken zwischen benachbarten β -Strängen eines Faltblattes ausgebildet.

Experimentell können die Wasserstoff-Brücken-Bindungen und ihre Lage mittels NMR durch direkte und indirekte Methoden nachgewiesen werden. Der direkte Nachweis erfolgt durch ein modifizierte zwei-dimensionales HNCO. Der indirekte Nachweis von Wasserstoff-Brücken erfolgt mit einem Deuterium-Austausch-Experimente. Zur Identifizierung der Wasserstoff-Brücken in Saratin wurden beide Verfahren angewandt.

Um die Wasserstoff-Brücken direkt nachzuweisen, wurde ein zwei dimensionales ^1H - ^{13}C -HNCO-Spektrum mit einem Magnetisierungstransfer von 66,6 ms von einer $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -angereicherten Saratin Probe aufgenommen. Dieses modifizierte HNCO-Experiment erlaubt einen Magnetisierungstransfer "durch die Wasserstoff-Brücke hindurch", daß heißt detektiert werden die Resonanzen beider an der Brücke beteiligten Kerne, die des Amid-Protons und die des Carbonyl-Kohlenstoffkerns. Anhand dieses Spektrums war es leider nicht möglich die Brücken zu definieren. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Größe von Saratin mit 12,06 kDa, und den damit verbundenen kürzeren Relaxationszeiten der ^{13}C -Kerne [Wan99].

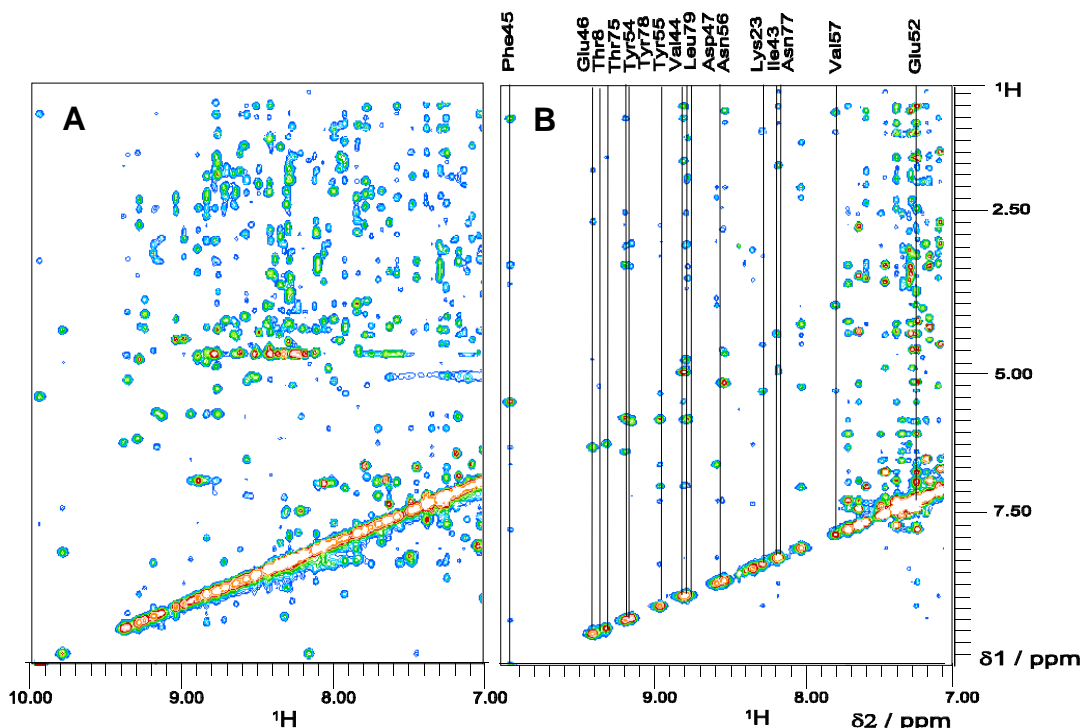


Abbildung 24 Ausschnitt der 2D NOESY-Spektren von Saratin in 95% H₂O/5% D₂O (A) und 99,9% D₂O (B) zur Identifizierung der Wasserstoff-Brücken. Die NOESY-Spektren wurden bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz, pH 6,5 und 298 K aufgenommen. Das 2D NOESY-Spektrum der in 95% H₂O/5% D₂O gelösten Saratin Probe enthält die Resonanzsignale aller Amid-Protonen im Bereich von 10 ppm bis 7 ppm (A). Im 2D NOESY-Spektrum der in 99,9% D₂O gelösten Saratin Probe sind nur mehr H^N-Signale der in Wasserstoff-Brücken gebundenen Amid-Protonen detektierbar (B). Die Resonanzsignale dieser Amid-Protonen sind beschriftet.

Im Deuterium-Austausch-Experiment konnten die Wasserstoff-Brücken identifiziert werden. Dazu wurden zwei 2D NOESY-Spektren von ¹⁵N-markierten Saratin, gelöst in 95% H₂O/5% D₂O (Abbildung 24 A) und zwei Stunden nach Lösung der Probe in 99,9% D₂O (Abbildung 24 B), bei 600 MHz aufgenommen und miteinander verglichen. Amid-Protonen die in Wasserstoff-Brücken gebunden sind tauschen langsamer mit dem Lösungsmittel (D₂O) aus als freie Amid-Protonen. Im 2D NOESY-Spektrum der in 99,9% D₂O gelösten Saratin Probe sind demnach freie Amid-Protonen nicht mehr und in Wasserstoff-Brücken gebundene Amid-Protonen, auch zwei Stunden nach der Überführung der Probe in D₂O, noch detektierbar. Es wurden in diesem Spektrum 16 H^N-Resonanzsignale sicher zugeordnet. Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß diese Amid-Protonen in Wasserstoff-Brücken involviert sind (Tabelle 4).

In unserem Deuterium-Austausch-Experiment wurden weitere H^N -Signale, und damit potentielle Wasserstoff-Brücken, detektiert. Aufgrund von Signal-Überlagerungen konnten sie aber nicht identifiziert werden.

HN	8	zu	O	78
HN	23	zu	O	55
HN	43	zu	O	56
HN	44	zu	O	77
HN	45	zu	O	54
HN	46	zu	O	75
HN	47	zu	O	52
HN	52	zu	O	47
HN	54	zu	O	45
HN	55	zu	O	23
HN	56	zu	O	43
HN	57	zu	O	21
HN	75	zu	O	46
HN	77	zu	O	44
HN	78	zu	O	8
HN	79	zu	O	42

Tabelle 4 Lage der Wasserstoff-Brücken im β -Faltblatt von Saratin. Die Wasserstoff-Brücken wurden in einem Deuterium-Austausch-Experiment mit 2D NOESY-Spektren bestimmt.

4.1.3.3 Dihedrale Winkel

Eine weitere wichtige Struktur-Einschränkung stellen dihedralen Winkel ϕ und ψ dar. Sie legen die Konformation des Protein-Rückgrats fest. Für die jeweiligen Sekundärstrukturelemente nehmen ϕ und ψ charakteristische Werte an. Wie in Abschnitt 3.1.2.2 bereits besprochen sind die Sekundärstrukturelemente anhand der Abweichungen der chemischen Verschiebungen von Referenzwerten vorhersagbar. Analog dazu lassen sich mit den Abweichungen auch die Werte der dihedralen Winkel mit dem Programm TALOS [Cor99b] abschätzen.

Anhand dieses Verfahrens konnten für das Proteinrückgrat von Saratin 96 ϕ und ψ -Winkel vorhergesagt werden. Die so ermittelten Winkel-Informationen gingen als weitere

Einschränkungen in die Strukturrechnung mit ein. Die Winkel von Aminosäuren aus flexiblen Bereichen (N- und C-Terminus) und Winkel für die mittels TALOS nicht genügend Übereinstimmungen gefunden wurden nicht in die Rechnung übernommen.

Die Liste der dihedralen Winkel von Saratin befindet sich im Anhang.

4.1.3.4 Residuale Dipolkopplungen

Zur Bestimmung der dipolaren Kopplungen zwischen den direkt gekoppelten Spins ^1H und ^{15}N von Saratin wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren bei 306 K von einer ^{15}N -angereicherten Probe unter isotropen Bedingungen und nach Zugabe des orientierenden Mediums unter anisotropen in der ^{15}N -Dimension gemessen. Das Vorhandensein und die zeitliche Stabilität von magnetisch orientierten Bicellen wurde anhand der charakteristischen Dublett Aufspaltung des Deuterium-Signals mittels ^2H NMR Spektroskopie überprüft. Die Orientierung der Probe führte zu einer D_2O -Linienaufspaltung von 7,09 Hz. Da sich die residuale Dipolkopplung zur skalaren Kopplung der Spins addiert können die ^1H - ^{15}N -Rest-Dipolkopplungen direkt aus dem Vergleich der Spektren ermittelt werden.

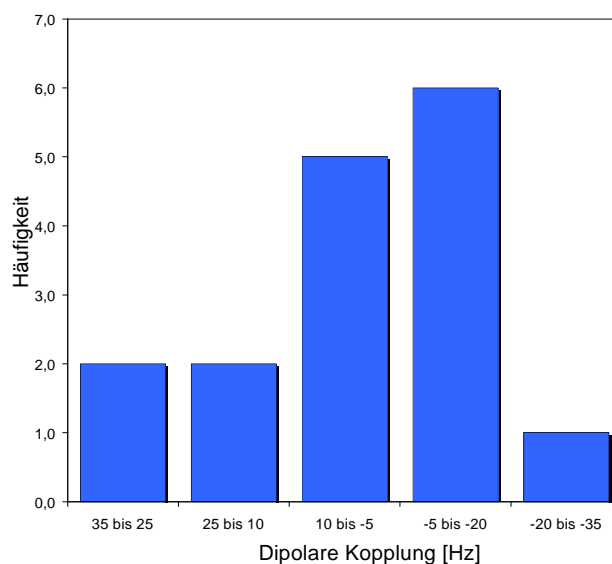


Abbildung 25 Verteilung der residualen dipolaren Kopplungen (Hz) für AS in Sekundärstruktur-bereichen.

Insgesamt konnten Rest-Dipolkopplungen für 40 Aminosäuren sicher bestimmt werden. Anhand der Verteilung der residualen Dipolkopplung (Abbildung 25) wurden die Werte D_{zz}^{AB} , D_{yy}^{AB} und D_{xx}^{AB} für den molekularen Orientierungstensor abgeschätzt [Clo98]. D_{zz}^{AB} , D_{yy}^{AB} und D_{xx}^{AB} stellen die z-, y- und x-Komponenten des Orientierungstensors dar. Sie entsprechen dem größten Zahlenwert, dem des kleinsten und dem häufigsten Kopplungswert. Für Saratin sind die Komponenten $D_{zz}^{AB}=29,9$ Hz, $D_{yy}^{AB}=-34,3$ Hz und $D_{xx}^{AB}=-12,5$ Hz. Damit lässt sich die axiale Komponente des molekularen Orientierungstensors D_a^{AB} auf 23,39 Hz und die Rhombizität auf 0,31 abschätzen. Die vollständigen Liste der residualen Dipolkopplungen finden sich im Anhang.

4.1.4 Tertiärstruktur von Saratin

Die Datengrundlage der Strukturrechnungen mit dem Programm CNS [Brü98] bilden die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Einschränkungen des Konformationsraumes. Jeder Rechnungslauf bestand aus jeweils 1000 Strukturen. Von diesen 1000 gerechneten Strukturen wurden jeweils die zehn energetisch Besten mit dem Skript *cnsstat* ermittelt [Ste01] und zu weiteren Analysen herangezogen. Unter Energie-Minimierung durch Eliminierung falscher Einschränkungen wurde in einem iterativen Prozess letztlich die "energieärmste" und damit "wahrscheinlichste" Struktur ermittelt.

Die abschließende Strukturrechnung basiert auf insgesamt 1450 Einschränkungen, davon 1338 NOE-Kontakte, 16 Wasserstoff-Brücken und 96 dihedrale Winkel (Tabelle 5).

Das Saratin Molekül hat eine globuläre Faltung (Abbildung 26). Es besteht aus einer α -Helix (H: Leu28 bis Lys37), zwei sich überkreuzenden Loops und einem zwischen Helix und Loops liegendem regelmäßigem β -Faltblatt aus fünf antiparallelen β -Strängen (B1: Trp7 bis Ala11, B2: Ser21 bis Lys24, B3: Ile43 bis Asp47, B4: Glu52 bis Asn56 und B5: Phe74 bis Leu79). Der C-Terminus ist ab Gly84 und der N-Terminus bis Asp5 frei beweglich und unstrukturiert.

Die Struktur bestätigt die drei durch die chemische Verschiebung vorhergesagten Disulfid-Brücken. Zwei Brücken verbinden im Kern des Proteins die α -Helix mit dem β -Faltblatt. Die dritte Brücke fixiert die Termini an der Protein-Oberfläche (Abbildung 17).

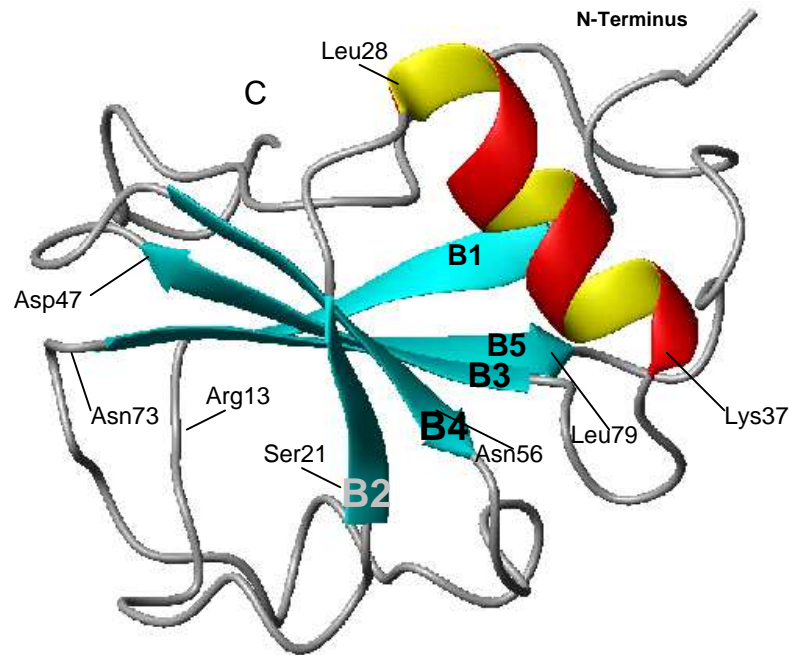


Abbildung 26 Tertiärstruktur von einem Saratin-Molekül. Sie besteht aus einer α -Helix, zwei überkreuz-liegenden Loops und dem dazwischen liegendem β -Faltblatt aus fünf antiparallelen β -Strängen. Der C- (ab Gly84) und N-Termini (bis Asp5) sind frei beweglich. (Die eingezeichneten Aminosäuren dienen der Orientierung.)

Die Beurteilung und Bewertung derart errechneter Strukturen ist generell schwierig. Ein Makromolekül stellt kein starres Gebilde dar. Es ist dynamischen Prozessen unterworfen. So stellt eine auf NMR-Daten basierende und errechnete Struktur generell nur eine "Momentaufnahme" dieses komplexen dynamischen Systems dar. Um diese zu bewerten ist es nötig verschiedene Parameter auf ihre Stimmigkeit und Konvergenz zu überprüfen. Betrachtet man diese Werte in der Gesamtheit der Strukturbeurteilung, erhält man einen Aufschluß über die Qualität der Struktur. Solche Parameter sind vorrangig die Energien und Winkel-Verteilung in der Struktur. Ein weiterer ist der RMSD-Wert. Er gibt Aufschluß über die Konvergenz der errechneten Strukturen. Letztlich liefern auch Vergleiche mit anderen Proteinen wertvolle Hinweise zur Stimmigkeit der ermittelten Struktur (siehe 4.2).

Die vorgestellte Struktur von Saratin ist durch die experimentellen Daten sehr gut definiert. Dies spiegelt sich in den niedrigen Energien, der entsprechenden Verteilung der dihedralen Winkel im Ramachandran-Plot und dem niedrigen RMSD-Wert (*root square deviation*) der energetisch besten zehn Strukturen wieder.

Die NOE-Energien der Saratin Struktur liegen im Bereich von 72,5 - 76 kJ mol⁻¹ bei einer Gesamtenergie von nur 458,3 kJ mol⁻¹ bei insgesamt 1000 gerechneten Strukturen (Tabelle 5). Die niedrigen Energie zeigen, daß es bei der vorgestellten Struktur kaum "intramolekularen Verspannungen" durch verletzte Beschränkungen auftreten.

Anzahl der Beschränkungen		Anzahl
NOE-Kontakte	gesamt	1338
	intraresiduelle ($i = j$)	660
	sequentielle ($ i - j = 1$)	297
	kurzreichweitige ($ i - j \leq 4$)	76
	langreichweitige ($ i - j > 4$)	305
Wasserstoff-Brücken		16
Dihedrale Winkel		96
Gesamt		1450

Energien		[kJ/mol]
$E_{\text{Bindungslängen}}$	19,8038	$\pm 0,40678$
$E_{\text{Bindungswinkeln}}$	156,065	$\pm 5,40028$
E_{imp}	30,7418	$\pm 1,93885$
$E_{\text{van-der-Waals-Wechselwirkungen}}$	124,903	$\pm 4,17424$
$E_{\text{NOE-Kontakte}}$	76,1785	$\pm 1,3429$
$E_{\text{starre dihedrale Winkel}}$	57,533	$\pm 2,03291$
E_{Gesamt}	465,225	$\pm 11,3183$

RMSD		[nm]
Rückgrat-Atome (Cys6-Cys82)		0,034
Rückgrat-Atome (Sekundärstruktur)		0,023

Tabelle 5 Struktur-Parameter von Saratin. Die Datengrundlage der Strukturrechnung mit dem Programm CNS [Brü98] stellen die Art und Anzahl der experimentell ermittelten Beschränkungen dar. Verletzungen dieser Beschränkungen bei der Strukturrechnung führen aufgrund von "intramolekularen Spannungen" zur Erhöhung der jeweiligen Energien. Dementsprechend sind niedrige Energien das Qualitätsmerkmal einer Struktur. In der Tabelle aufgelistet sind die Mittelwerte aus den energetisch 10 besten Strukturen und die jeweilige Standardabweichung bei insgesamt 1000 berechneten Strukturen. Der RMSD-Wert (*root square deviation*) wird aus Überlagerung der 10 energetisch günstigsten Strukturen mit dem Programm MOLMOL [Kor96] ermittelt. Er ist ein Maß für die Konvergenz dieser Strukturen.

Die dihedralen Winkel ϕ und ψ können aus sterischen Gründen nicht jede Kombination annehmen. Nach [Ram68] liegen die Winkel aber für die Sekundärstrukturelemente α -Helix

und β -Faltblatt in bestimmten bevorzugten Bereichen. Die Darstellung der Winkelverteilungen von Saratin im Ramachandran-Plot ist in Abbildung 27 abgebildet. Der Ramachandran-Plot wurde mit dem Programm MOLMOL erstellt [Kor96]. Bei der Darstellung wurde der frei bewegliche N- und C-Terminus nicht berücksichtigt. Wie man im Plot erkennen kann, liegen nur zwei Reste außerhalb des Erwartungs-, bzw. im bevorzugten Bereiches. Hierbei handelt es sich um Ser21 und Asp81. Damit liegen 97,3% Winkel-Kombinationen in den bevorzugten Bereichen.

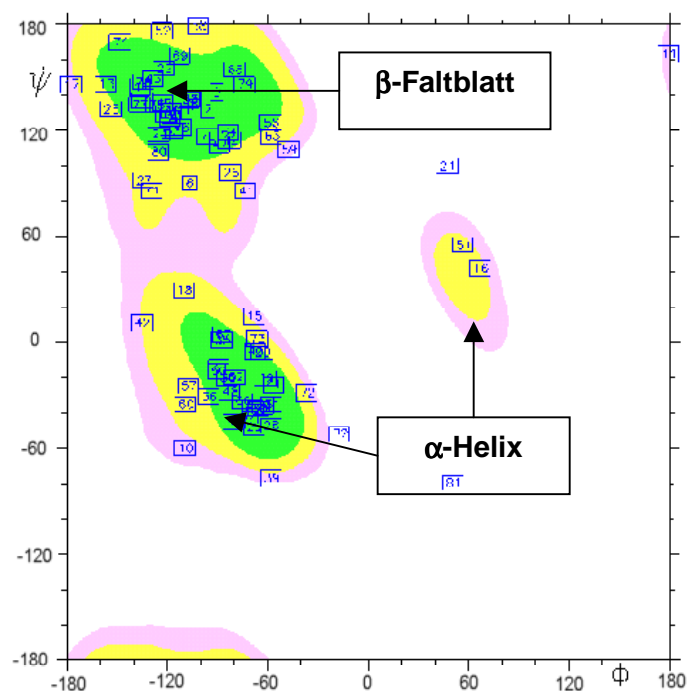


Abbildung 27 Verteilung der dihedralen Winkel ϕ und ψ im Ramachandran-Plot. Der Ramachandran-Plot wurde mit dem Programm MOLMOL [Kor96] erstellt. Dabei wurden die flexiblen Termini außer Acht gelassen. Aus sterischen Gründen können die Winkel ϕ und ψ nicht jeden beliebige Kombination annehmen. In unterschiedlichen Sekundärstruktur-Elementen (α -Helix und β -Faltblatt) liegen die Kombinationen aber in bestimmten bevorzugten Bereichen. Der Ramachandran-Plot veranschaulicht diesen Zusammenhang [Ram68].

Der RMSD-Wert ist ein Maß für die Konvergenz von ausgewählten Strukturen. Da die Termini keine geordnete Faltung annehmen, wurden sie bei der Berechnung des RMSD-Wertes nicht berücksichtigt. Zur Präzisierung der Aussage wurde der RMSD-Wert der zehn energetisch besten Strukturen einmal für den gesamten gefalteten Bereich des Proteins und einmal für die isolierten Sekundärstrukturelemente bestimmt.

Dazu wurden die zehn energetisch besten Strukturen an Rückgrat-Atome (N, C $^{\alpha}$, C) im Bereich von Cys6 und Cys82, bzw. der Sekundärstrukturelemente, mit dem Programm MOLMOL überlagert und der RMSD-Wert zur gemittelten Struktur berechnet. Für die zehn Strukturen ergab sich ein RMSD von 0,034 nm, bzw. 0,023 nm (Abbildung 28).

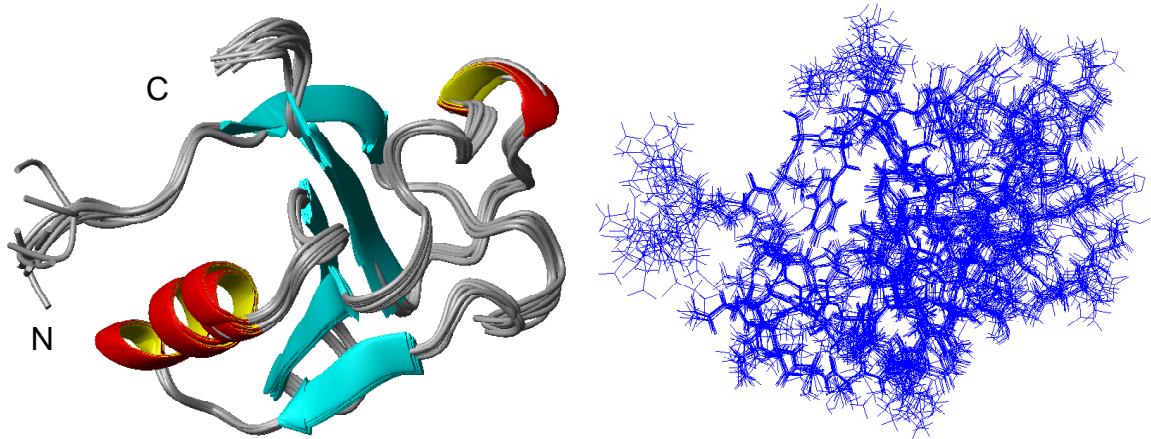


Abbildung 28 Überlagerung der energetisch zehn besten Saratin Strukturen. Die Überlagerung an den Rückgrat-Atomen (N, C $^{\alpha}$,C) von Cys6 bis Cys82 der NMR-Strukturen und die Berechnung des RMSD-Wertes erfolgte mit dem Programm MOLMOL [Brü98]. Der ermittelte RMSD-Wert beträgt 0.034 nm. N- und C-Terminus (Glu1-Asp5; Glu83-Asp103) sind unstrukturiert und wurden nicht in die Berechnung des RMSD-Wertes miteinbezogen. Der C-Terminus (Glu83-Asp103) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

4.1.5 Strukturverbesserung in Wasser

Die Strukturverbesserung erfolgte nach der Methode von Linge und Spronk [Lin03]. Bei diesem Verfahren werden sogenannte "nicht-bindende" Parameter (zum Beispiel schwache NOE-Kontakte mit dem Lösungsmittel) im Moleküldynamik-Kraftfeld höher gewichtet, wodurch in der Strukturrechnung den natürlichen Bedingungen der Proteine Rechnung getragen wird.

Die Daten-Basis der Strukturverbesserung von Saratin bilden die zehn energetisch besten Strukturen aus der Strukturrechnung mit CNS und die experimentell ermittelten Einschränkungen des Konformationsraumes. Unter Berücksichtigung der Einschränkungen wurden die zehn besten Strukturen bei entsprechender Gewichtung der Kraftfelder mit dem

Programm XPLOR-NIH verfeinert. Man erhält nach Linge und Sponk neben den verfeinerten zehn Strukturen zusätzlich die Analyse der in die Rechnung eingebrachten und der verbesserten Strukturen. Diese Analysen ermöglichen eine Quantifizierung der Strukturverbesserung, da aufgrund der unterschiedlichen Kraftfeld-Gewichtungen bei Strukturrechnung und der Verfeinerung ein direkter Vergleich der Energien schwierig ist.

Analysierte Strukturen			Verbesserte Strukturen		
Art der Verletzung	Energie [kJ/mol]		Art der Verletzung	Energie [kJ/mol]	
E _{NOE}	286,2	+/- 78,9	E _{NOE}	237,9	+/- 18,5
E _{dihedralen Winkel}	10327,8	+/- 520,6	E _{dihedralen Winkel}	5050,3	+/- 25,6
E _{Gesamt}	17790,1	+/- 508,4	E _{Gesamt}	-9969,5	+/- 421,5
RMSD / mittleren Struktur			RMSD / mittleren Struktur		
alle schweren Atome	0,4	+/- 0,9	alle schweren Atome	0,4	+/- 0,8
Ramachandran / Region			Ramachandran / Region		
meist favorisiert	65,4	+/- 2,6	meist favorisiert	73,8	+/- 3,7
erlaubt	28,2	+/- 3,3	erlaubt	20,2	+/- 3,6
generell erlaubt	3,8	+/- 1,6	generell erlaubt	4,2	+/- 2,2
nicht erlaubt	2,5	+/- 1,3	nicht erlaubt	1,9	+/- 1,1

Tabelle 6 Parameter der verfeinerten Saratin Struktur. Die Daten-Basis der Strukturverbesserung von Saratin bilden die zehn energetisch besten Strukturen aus der Strukturrechnung mit CNS und die experimentell ermittelten Einschränkungen des Konformationsraumes. Dargestellt sind die Analyse Ergebnisse vor (links) und nach (rechts) der Strukturverfeinerung in explizit Wasser nach dem Verfahren von Linge und Sponk [Lin03]. Durch das Einbeziehen der Interaktionen mit Lösungsmittel in die Strukturverfeinerung werden die Energien als Maß der Verletzung der Einschränkungen erwartungsgemäß geringer. Deutlich zu erkennen ist die Strukturverbesserung auch in der Verteilung der dihedralen Winkel nach Ramachandran. In der verfeinerten Struktur liegen mit 73,8 Kombinationen deutlich mehr ϕ und ψ Winkel-Kombinationen im favorisierten Bereich. (Angabe sind jeweils die Mittelwerte der zehn Eingangs- bzw. verfeinerten Strukturen und die zugehörige Standardabweichung)

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Strukturverbesserung von Saratin graphisch dargestellt. Die Verfeinerung der Struktur nach Linge und Sponk führte zu einer deutlichen Verringerung der Gesamt-Energie des Systems und Verschiebung der Verteilung der dihedralen Winkel ϕ und ψ in den bevorzugten Bereich (Tabelle 6). Von anfänglich 65,4 Winkel-Kombinationen liegen nach der Verfeinerung 73,8 Kombinationen im bevorzugten Bereich. Die geringe Änderung in dem an sich relativ hohem RMSD-Wert ist eine Folge des automatisierten Analyse-Verfahrens mit PROCHECK, bei dem das gesamte Protein einschließlich der frei beweglichen Termini analysiert wird. Um ein verwertbareres Maß für

die Konvergenz der Strukturen zu erhalten wurden die RMSD-Werte der Proteinrückgrat-Atome (N, C $^{\alpha}$, C) mit dem Programm MOLMOL [Kor96], ohne die des frei beweglichen N- und C-Termini, ermittelt. Der RMSD-Wert für den strukturierten Bereich von Cys6 bis Cys82 der Eingangs- und der verbesserten Strukturen beträgt 0,035 nm, bzw. 0,063 nm (Abbildung 29 B). Die geringere Konvergenz der verfeinerten Strukturen ist als Folge der differierenden Kraftfelder-Gewichtungen bei der Strukturrechnung zu verstehen.

Es zeigte sich, dass bei diesem relativ neuem Verfahren zur Strukturverbesserung der RMSD-Wert als Maßstab schwierig zu bewerten und zu vergleichen ist. Eindeutige quantitative Kriterien über das Maß einer Strukturverfeinerung stellen die Werte der Energien und Winkelverteilungen dar.

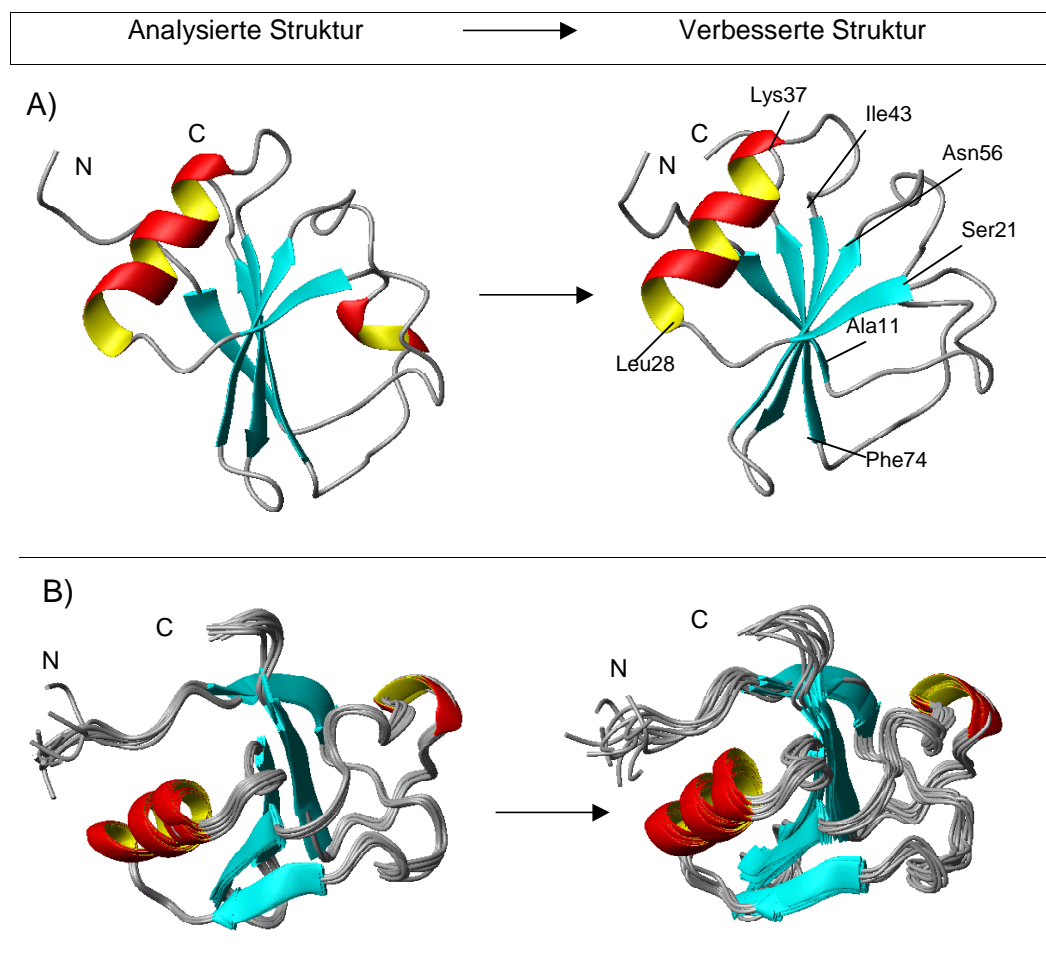


Abbildung 29 Graphische Darstellung der verfeinerte Struktur von Saratin nach dem Verfahren von Linge und Sponk [Lin03]. A) Tertiärstruktur von Saratin vor (links) und nach (rechts) der

Verbesserung der Struktur im Lösungsmittel. Dargestellt sind jeweils die Moleküle mit der niedrigsten $E_{\text{NOE-Kontakte}}$ in gleicher Orientierung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist der C-Terminus ab Glu83 nicht dargestellt. B) Überlagerung der jeweils zehn in die Rechnung eingegangenen (links) und der verfeinerten (rechts) Strukturen. Überlagert wurden die Aminosäuren des Protein-Rückgrats von Cys6 bis Cys82. Der RMSD-Wert vor und nach der Strukturverbesserung in explizit Wasser beträgt 0,035 nm, bzw. 0,063 nm. Die geringere Konvergenz der verfeinerten Strukturen ist eine Folge der Strukturrechnung mit stärker gewichteten "nicht-bindenden" Parametern bei dem angewandten Verfahren. Das verwendete Rechenprogramm erkennt in drei von 10 Strukturen im Loop L1 eine kurze α -Helix. Die graphische Darstellung der Strukturen und Berechnung des RMSD-Wertes erfolgte mit Programm MOLMOL. (Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist der C-Terminus jeweils ab Glu83 nicht dargestellt. Die eingezeichneten Aminosäuren dienen der Orientierung.)

4.2 Vergleich von Saratin mit anderen Proteinen

4.2.1 Die Proteine Saratin, Eglin und LAPP

Von Bedeutung bei der Bewertung einer gelösten Struktur mit NMR- oder Röntgenkristallographischen Methoden stellen Vergleiche mit anderen verwandten Proteinen dar. Proteinen mit gleicher Funktion und Ursprung zeigen auf struktureller Ebene große Übereinstimmungen, da die Funktion und Eigenschaften von Proteinen durch seine räumliche Struktur bestimmt ist.

Saratin ($M_r = 12,06$ kDa) wurde auf sequentielle und strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Blutegel Proteinen Eglin [Hyb92] und LAPP [Hui01] verglichen. LAPP ($M_r = 13,6$ kDa) wurde aus der Saliva von *Haementeria officinalis* und Eglin, wie auch Saratin, von *Hirudo medicinalis* isoliert. LAPP und Saratin haben ähnliche Funktionen. LAPP inhibiert die Adhäsion der Thrombocyten an human Kollagene des Types I, III und IV, Saratin an human Kollagen-Typen I und III [Bar01]. Eglin dagegen ist ein Proteasen-Inhibitor.

Ein Sequenzvergleich mit dem Programm XALIGN [Wis94b] ergab daher bei Saratin und dem 33 Aminosäure-Reste kürzeren Protein Eglin mit nur 28% Sequenzübereinstimmung keine Homologie (Abbildung 30). Saratin und Eglin weisen auch auf struktureller Ebene erhebliche Unterschiede auf (Abbildung 31). So besteht das β -Faltblatt von Eglin nur aus drei Strängen, parallele und antiparallele. Saratin dagegen besitzt ein fünfsträngiges regelmäßiges β -Faltblatt mit antiparallelen Strängen. Eglin hat im Gegensatz zu Saratin

einen strukturierten C-Terminus. Weder die Funktion, Primärsequenz, Proteinlänge noch die Sekundärstrukturelemente von Eglin weisen auf eine Homologie mit Saratin hin.

A)

	SARATIN	LAPP	EGLIN
SARATIN	100 %	46,35 %	28,24 %
LAPP	46,35 %	100 %	32,27 %
EGLIN	28,24 %	32,27 %	100 %

B)

```

SARATIN:                                     EEREDCWIFY
LAPP:    QDEDAGGAGDETSSEGEDITGSDETPSTGGGGDGGNEETITAGNEDCWSKR

SARATIN: ANRKYTFDFKSFKKSSDLDECKKTKCKTEYCYIVFEDT VNKECY
LAPP:    EGWKLDPNLLTKTEFTSVDCKRMCEESAVEPSCYILQINTIETNECY

SARATIN: YNVVDGEELDQEFVVDENFTENYLTDCGKDGAGNAAGTGDESDEVED
LAPP:    RN  NEGDVTWSSLQYDQFNVQWHLHACSK
  
```

Abbildung 30 Sequenzvergleich der Proteine Saratin, LAPP und Eglin mit dem Programm XALIGN [Wis94b]. A) Bei Saratin und dem Protease-Inhibitor Eglin lässt sich mit nur 28% Sequenzübereinstimmung keine Sequenzhomologie finden. Saratin und LAPP dagegen haben mit 46% Übereinstimmung eine große Sequenzähnlichkeit. B) Sequenzvergleich von Saratin und LAPP. Aufgrund der geringen Ähnlichkeit wurde Eglin in dieser Darstellung nicht aufgeführt. Die Sekundärelemente sind farbig hervorgehoben (blau: β -Strang, rot: α -Helix). In beiden Sequenzen übereinstimmende Aminosäure-Reste sind eingerahmt.

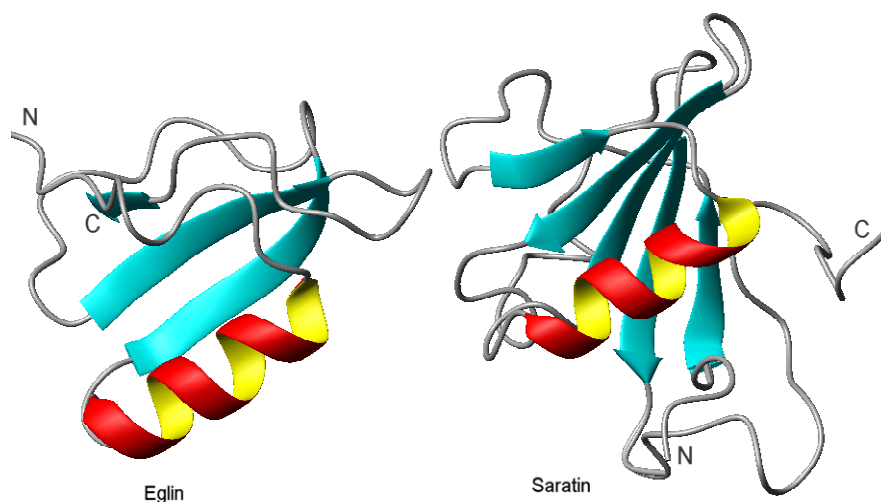


Abbildung 31. Tertiärstruktur von Eglin und Saratin. Die NMR-Struktur von Eglin besitzt ein drei-strängiges β -Faltblatt das sich aus parallelen und antiparallelen β -Strängen aufbaut. Saratin verfügt über ein fünfsträngiges β -Faltblatt aus antiparallelen β -Strängen. Das β -Faltblatt des um 33

Aminosäuren kürzeren Proteins Eglin wird dagegen aus drei antiparallel und parallelen β -Strängen aufgebaut. Der C-Terminus von Eglin ist anders als bei Saratin strukturiert. Die Proteine weisen weder Sequenz- noch Strukturhomologie auf. (Die Strukturen wurden an den übereinstimmenden Aminosäure-Resten der α -Helix überlagert.)

Der Sequenzvergleich von den Proteinen Saratin und LAPP ergab eine Sequenz-übereinstimmung von 46%. Auch strukturell weisen Saratin und LAPP eine hohe Ähnlichkeit auf (Abbildung 32). Ein Unterschied besteht in der Anzahl der β -Stränge. LAPP besitzt am N-Terminus, der bei Saratin einen kurzen, möglicherweise beweglichen Anteil hat, einen sechsten antiparallelen Strang. Ferner ist der β -Strang bei LAPP, der B1 von Saratin entspricht, länger. Ein weiterer Unterschied ist der fehlende bewegliche C-Terminus bei LAPP. Saratin und LAPP weisen sowohl sequentiell wie auch strukturell große Ähnlichkeit auf. Man muß davon ausgehen, daß es sich bei LAPP und Saratin um homologe Proteine handelt.

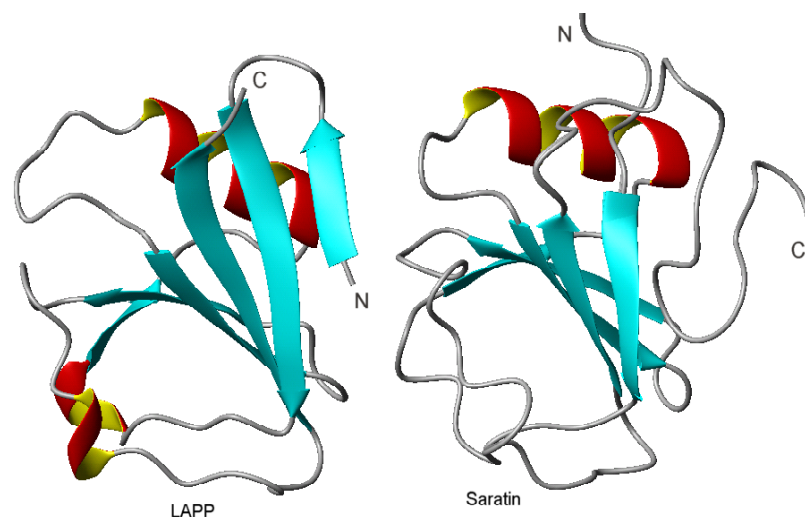


Abbildung 32. Tertiärstruktur von LAPP und Saratin. Der Vergleich der Sekundärstrukturelemente wie auch der Sequenz mit 46% Übereinstimmung weist auf eine große Ähnlichkeit der beiden Proteine hin. Im Unterschied zu Saratin weist die Kristall-Struktur des um 23 Aminosäure-Reste längere Protein LAPP N-terminal eine zusätzlichen antiparallelen β -Strang. (Die Strukturen wurden an den übereinstimmenden Aminosäure-Resten der α -Helix überlagert.)

4.3 Temperaturstabilität von Saratin

Das grundlegende Ziel bei Charakterisierung von Proteinen ist es mehr Informationen über die Funktion des Proteins zu erhalten. Die Struktur an sich gibt Hinweise auf die Funktionsweise. Neben der Struktur sind aber auch die chemischen und physikalischen Eigenschaften für die Charakterisierung - und auch für die praktische Arbeit mit Proteinen - von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde die Temperaturempfindlichkeit von Saratin untersucht. Dazu wurden Temperaturreihen von 1D-Spektren und 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von un-, bzw. ^{15}N -gelabelten Saratin Proben gemessen (Abbildung 34).

Die Temperaturreihe mit eindimensionalen Spektren konnte aufgrund von Signal Überlagerungen nur qualitativ ausgewertet werden. Es zeigte sich, daß Saratin bei einer Temperaturerhöhung von 298 K bis 343 K und anschließendem Abkühlen auf 320 K nicht sichtbar aggregiert und wahrscheinlich seine native Form beibehält.

Um zu klären bei welcher Temperatur Saratin denaturiert wurden in einem Bereich von 298 K bis 348 K auf- und anschließend abwärts in fünf Kelvin Schritten jeweils ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren an einer ^{15}N -gelabelten Probe gemessen.

Mit zunehmender Temperatur ändert sich die chemische Verschiebung der Amid-Protonen aller Aminosäuren und ab einer Temperatur von 333 K sind die Signale größtenteils nicht mehr detektierbar (Abbildung 33). Diese Signale der H^{N} -Kerne tauchen auch bei einer anderen Resonanzfrequenz größtenteils nicht mehr auf, wie es bei einem schnellen konformationellen Austausch der Fall wäre.

Bei der anschließenden Abkühlen auf 298 K sind Signale wieder nachweisbar, aber die chemische Verschiebung der H^{N} -Kerne hat sich in Richtung der, nach Wishart [Wis94] ermittelten, Werte für unstrukturierte Proteinbereiche im Bereich von 8 ppm verschoben (Abbildung 34). Vereinzelt sind H^{N} -Signale nach der Temperaturabsenkung detektierbar, ihre chemischen Verschiebungen können aber aufgrund der geänderten chemischen Umgebungen der Kerne nicht zugeordnet werden.

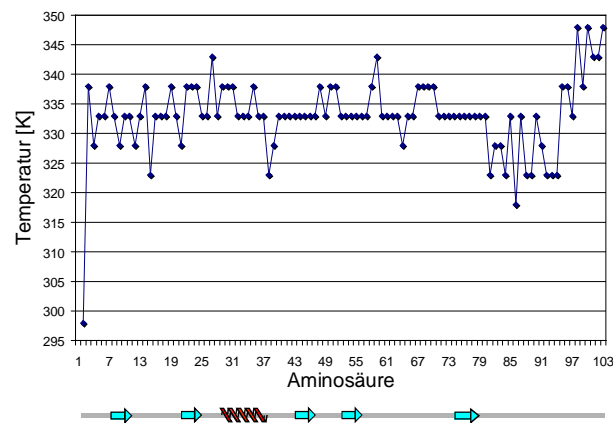


Abbildung 33. Temperaturempfindlichkeit von Saratin. In einer aufsteigenden Temperaturreihe von 298 K bis 348 K wurde ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Saratin aufgenommen. Die Darstellung zeigt bis zu welcher Temperatur die Signale von Amid-Protonen der Aminosäuren im HSQC-Spektrum nachweisbar waren. Der strukturierte Kernbereich von Saratin (Cys6 bis Cys82) ist bis zu einer Temperatur von 335 K stabil.

Die Ergebnisse zeigen, daß Saratin bei einer Temperaturerhöhung auf 348 K größtenteils denaturiert und nicht mehr in seine native Konformation zurückfaltet. Die Detektion einzelner weniger H^{N} -Signale aber nach der Abkühlung der Probe auf 298 K, lässt vermuten, daß einzelne Protein-Bereiche wieder einen strukturierten Zustand einnehmen.

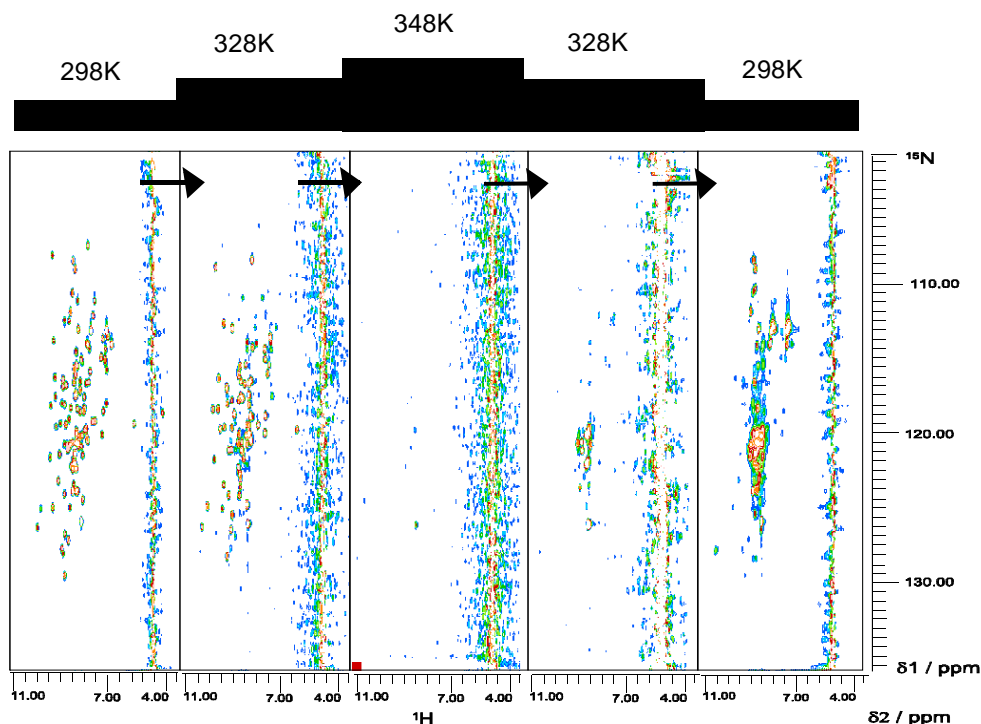


Abbildung 34 Temperaturmessreihe von Saratin. Die ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -markiertem Saratin wurden bei steigender Temperatur von 298K bis 348K, und anschließend fallender Temperatur von 348K bis 298K aufgenommen (600 MHz, pH 6,5). Bei einer Temperatur von 348K ist Saratin denaturiert und kehrt bei anschließender Temperatursenkung nicht mehr in seine native Konformation zurück.

4.4 Interaktion von Saratin und Kollagen

4.4.1 Bestimmung der Bindungsfläche von Saratin

Das Prinzip mittels NMR-Methoden die Bindungsstelle zu identifizieren an der das Protein Saratin mit Kollagen-Peptiden interagiert bestand in einem direkten Vergleich von ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ungebundenem Saratin mit denen im komplexierten Zustand. Änderungen der Resonanzen der Amid-Protonen und Signal-Volumina geben Aufschluß darüber welche Aminosäuren oder Protein-Bereiche entweder direkt von der Bindung betroffen sind oder aufgrund der Bindung eine Konformationsänderung erfahren.

Zur Identifizierung der Kollagen-Bindungsfläche von Saratin wurde eine Titrationsreihe von Saratin und Kollagen ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimente mit zunehmender Kollagen-Konzentration gemessen.

Im ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment sind einige H^{N} -Signale von Saratin in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis von Saratin und tripelhelikalen Kollagen-Peptiden nicht detektierbar (Abbildung 35). Mit zunehmender Konzentration an tripelhelikalem Kollagen nimmt die Nachweisbarkeit der Signale ab. Auffällig ist, daß die Signale der Aminosäuren Thr38 bis Ile43 der Loop-Region die die α -Helix mit dem β -Strang B3 verbindet sequentiell zusammenhängend nur bis zu einem molaren Verhältnis von 1 mmol Saratin zu 0,13 mmol tripelhelikalem Kollagen detektierbar sind. Bei einer Kollagen Konzentration über 0,13 mmol sind die H^{N} -Signale dieser Aminosäuren nicht mehr nachweisbar. Mit steigender Konzentration an tripelhelikalem Kollagen verschwinden Signale einzelner Aminosäure-Reste sowohl in Sekundärstrukturelementen wie auch in Loop-Regionen. Von mehr als 60% der Aminosäuren von Saratin erhält man aber auch bei einem molaren Verhältnis von 0,39 mmol Kollagen im HSQC-Experiment ein H^{N} -Signal. Abbildung 35 zeigt, daß diese Aminosäuren mehr oder weniger große sequentiell zusammenhängende Bereiche darstellen. Neben dem bereits erwähnten Loop stellt besonders der C-Terminus von Glu83 bis Asp103 mit 20 Aminosäuren den größten Bereich dar.

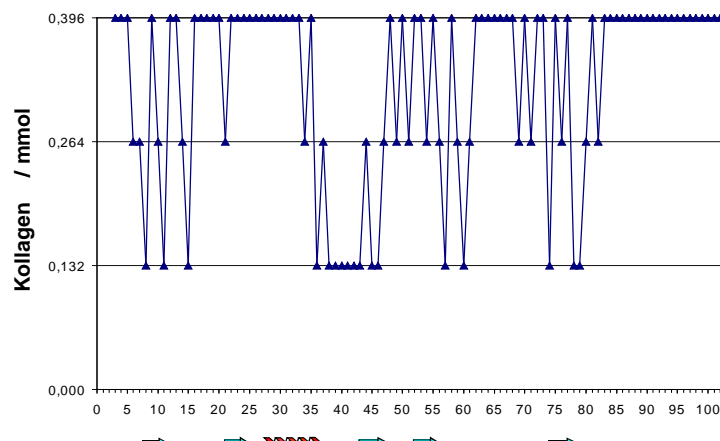


Abbildung 35 Nachweisbarkeitsgrenze der H^{N} -Signale von Saratin in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis von Saratin und tripelhelikalem Kollagen in ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren (600 MHz, pH 6,5, 298K). Die Signale des Loops, der die α -Helix mit dem β -Strang B3 verbindet, sind nur bis zu einem molaren Verhältnis von 1 mmol Saratin zu 0,13 mmol Kollagen detektierbar (Phe36, Thr38 - Ile43, Phe45, Glu46). Wird das molare Verhältnis weiter in Richtung Kollagen verschoben, sind diese Resonanzsignale von Saratin nicht mehr detektierbar. Dies ist ein deutliche Hinweis darauf, daß diese Loop-Region an der Interaktion von Saratin mit Kollagen beteiligt ist. Bei einem molaren

Verhältnis von 0,39 mmol tripelhelikalem Kollagen erhält man aber von mehr als 60% der Aminosäuren von Saratin ein $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Resonanzsignal. Diese Aminosäuren sind wahrscheinlich nicht an der Bindung mit Kollagen beteiligt.

Einige der $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kerne deren Signal bei einem molaren Verhältnis Saratin zu tripelhelikalem Kollagen von 1:0,132 nicht mehr detektierbar sind weisen signifikante Änderungen der chemischen Verschiebungen auf (Abbildung 36). Dabei handelt es sich Thr8, Ser21, Ser25, Lys37, Glu39 bis Cys41, Gly60, Glu76 und Leu79. Auffällig ist der C-terminale Bereich ab Glu83. Hier kommt es durch die Komplex-Bildung zu keinen Änderungen der $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Resonanzen. Am größten ist die Änderung der chemische Verschiebung bei den Aminosäuren Glu39 bis Cys41 und Gly60. Die sequentiell aufeinanderfolgenden Aminosäuren Glu39 bis Cys41 sind Teil des Loops zwischen der α -Helix und B3.

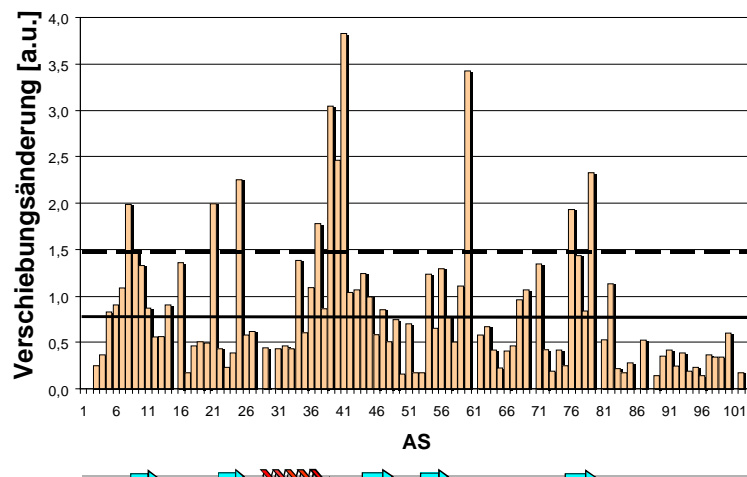


Abbildung 36 Änderung der chemischen Verschiebungen der Amid-Protonen von Saratin induziert durch Komplex-Bildung mit Kollagen. Die Änderung der chemischen Verschiebungen wurden in einer Reihe von $^1\text{H}^{\text{N}}$ -HSQC-Experimenten (600 MHz, pH 6,5, 298K), aufgenommen vom Saratin-Kollagen-Komplex mit zunehmender Kollagen-Konzentration, bestimmt. Der durchgezogene Balken entspricht dem Mittelwert (0,74) und der gestrichelte Balken der einfachen Standardabweichung (0,73). Änderungen die größer sind als die einfache Standardabweichung vom Mittelwert stellen signifikante chemische Verschiebungsänderungen dar. Die Aminosäuren von Saratin, die an der Bindung mit Kollagen beteiligt sind, erfahren, aufgrund der sich bei der Bindung an Kollagen ändernden chemischen Umgebung der Kerne, signifikant große Änderungen der $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Resonanzfrequenzen im $^1\text{H}^{\text{N}}$ -HSQC-Experiment. Signifikante Änderungen weisen die Aminosäuren Thr8, Ser21, Ser25, Lys37, Glu39 bis Cys41, Gly60, Glu76 und Leu79 auf. Sie sind möglicherweise an der Bindung mit Kollagen beteiligt. Im Gegensatz dazu, ist der flexible C-Terminus (Glu83 bis Asp103) wahrscheinlich nicht in der Bindung involviert. Die Skalierung ist willkürlich.

Ser 21 und Ser25 weisen eine große Änderung der chemischen Verschiebung auf, aber ihre H^N -Signale sind bei jedem molaren Verhältnis detektierbar. Die Titrationskurven von Ser 21 und Ser25 zeigen, daß auch bei einem molaren Verhältnis von 1 mmol Saratin zu 0,39 mmol tripelhelikales Kollagen noch keine Sättigung vorliegt (Abbildung 37).

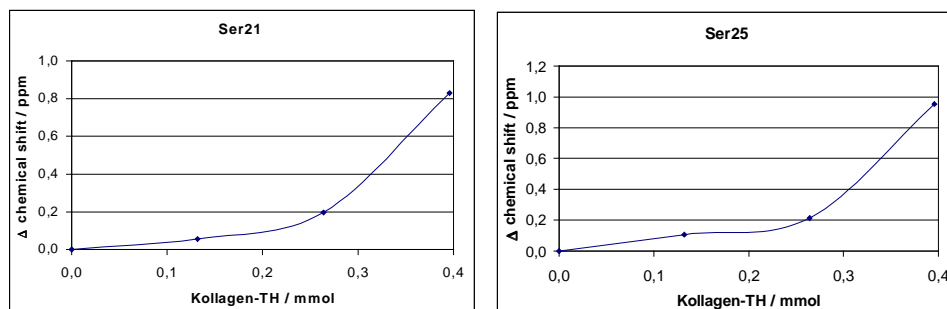


Abbildung 37 Titrationskurven von Ser21 und Ser25 des Proteins Saratin mit Kollagen.

Überraschenderweise zeigen die Titrationskurven aller Aminosäuren von Saratin, deren H^N -Signale im Titrationsexperiment nachweisbar bleiben, drei unterschiedliche Verlaufstypen (Abbildung 38).

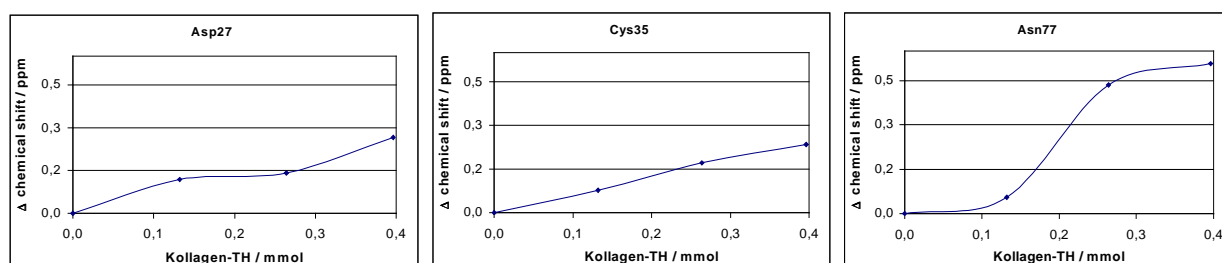


Abbildung 38 Sättigungskurven von Asp27, Cys35 und Asn77 von Saratin.

Die H^N -Signale von an der Bindung direkt beteiligter Aminosäuren erfahren neben einer Änderung der chemischen Verschiebungen auch eine Abnahme der Volumina (Abbildung 39).

Eine signifikante Volumenänderung zeigen unter anderem hier die Aminosäuren Phe36 und Thr38 bis Ile43. Sie bilden den bereits erwähnten Loop zwischen α -Helix und B3. Er scheint ein zentraler Bereich der Interaktionsfläche zu sein. Der C-terminale Bereich ab Glu83 weist

weder Änderungen in der chemischen Verschiebung noch in den Signal-Volumina der H^N -Kerne. Er zeigt sich von der Komplex-Bildung unbeeinflusst.

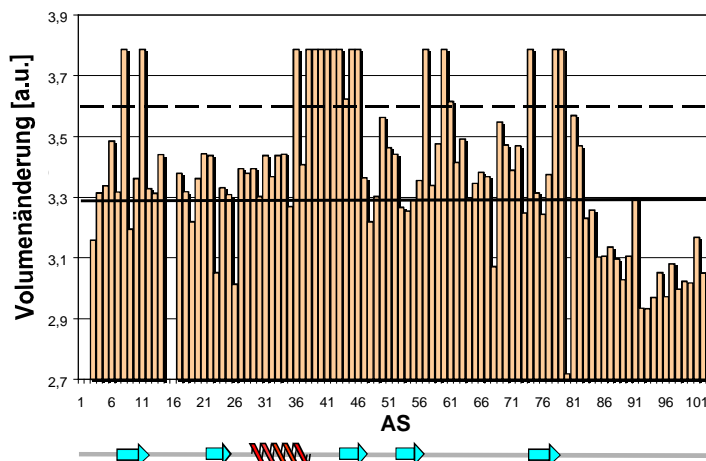


Abbildung 39 Änderung der Signal-Volumina der H^N -Kerne von Saratin durch Komplex-Bildung mit Kollagen. Die Änderung der Signal-Volumina wurden in einer Reihe von 1H - ^{15}N -HSQC-Experimenten (600 MHz, pH 6,5, 298K), aufgenommen vom Saratin-Kollagen-Komplex mit zunehmender Kollagen-Konzentration, bestimmt. Der durchgezogene Balken entspricht dem Mittelwert (3,29) und der gestrichelte Balken der einfachen Standardabweichung (0,29). Änderungen bei den Volumina die größer sind als die einfache Standardabweichung vom Mittelwert stellen signifikante Änderungen dar. Die Resonanzsignale der H^N -Kerne der Hauptketten der Aminosäuren von Saratin, die möglicherweise an der Bindung mit Kollagen beteiligt sind, erfahren signifikante Volumenänderungen. Die Skalierung ist willkürlich.

In Tabelle 7 sind die bei der Komplexierung von Saratin beobachteten Änderungen zusammengefasst. Die Aminosäuren Thr8, Lys37, Glu39 bis Cys41, Gly60 und Leu79 sind direkt an der Kollagen-Bindungen beteiligt. Sie zeigen signifikante Änderungen in den chemischen Verschiebungen und Volumina der H^N -Signale. Sie liegen für Kollagen zugänglich an der Protein-Oberfläche. Ser21, Ser25 und Glu76 weisen zwar eine Änderung der chemischen Verschiebungen der Amid-Protonen auf, aber ihre H^N -Signale sind im HSQC- ohne signifikante Volumen-Änderung nachweisbar. Ihre Oberflächenzugänglichkeit für Kollagen liegt im Bereich von 25% .

Aminosäure		HN-Signale im HSQC nicht detektierbar	Signifikanter		Oberflächen- zugänglich in %	Struktur
			Δ chem. shift	Δ Vol		
Thr	8	X	X	X	41	B1
Tyr	10	X			60	B1
Ala	11	X		X	58	B1
Ser	21		X		26	B1
Ser	25		X		23	Loop
Thr	34	X			44	Helix
Phe	36	X		X	49	Helix
Lys	37		X		46	Helix
Thr	38	X		X	40	L1
Glu	39	X	X	X	58	L1
Tyr	40	X	X	X	52	L1
Cys	41	X	X	X	34	L1
Tyr	42	X		X	56	L1
Ile	43	X		X	34	B3
Phe	45	X		X	40	B3
Glu	46	X		X	35	B3
Asn	56	X			36	L2
Glu	57	X		X	43	L2
Gly	60	X	X	X	50	L2
Phe	74	X		X	34	B5
Glu	76		X		0,4	B5
Tyr	78	X		X	37	B5
Leu	79	X	X	X	37	B5

Tabelle 7 Übersicht über Beobachtungen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment hervorgerufen durch die Komplexierung von Saratin und Kollagen. Aufgelistet sind die Beobachtungen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment hervorgerufen durch die Komplexierung von Saratin und Kollagen bei einem Verhältnis von 1:0,39. Die H^{N} -Signale einiger Aminosäuren sind im HSQC-Experiment nicht detektierbar. Durch die Bindung von Saratin an Kollagen ändert sich ferner die chemische Verschiebung und das Volumen mancher H^{N} -Signale. Diese Aminosäuren liegen an der Proteinoberfläche und ihre Seitenketten zeigen eine Oberflächenzugänglichkeit, errechnet mit MOLMOL [Kor96], von mindestens 35%. Die gelisteten Aminosäuren sind möglicherweise an der Bindung mit Kollagen beteiligt. (Die Sekundärstruktur-Elemente sind farblich hinterlegt, blau für α -Helix und orange für β -Strang.)

AS	AS-Nr.	Strukturelement
Thr	8	B1
Lys	37	Helix
Glu	39	L1
Tyr	40	L1
Cys	41	L1
Gly	60	L2
Leu	79	B5

Tabelle 8 Aminosäuren von Saratin, deren H^{N} -Resonanzsignale eine signifikant große Änderung ihrer chemischen Verschiebungen aufweisen. Sie sind an der Saratin-Kollagen-Bindung beteiligt. Die Sekundärstruktur-Elemente sind zusätzlich farblich hinterlegt (blau: α -Helix, orange: β -Strang).

AS	AS-Nr.	Strukturelement
Thr	8	B1
Tyr	10	B1
Ala	11	B1
Thr	34	Helix
Phe	36	Helix
Thr	38	Loop
Glu	39	Loop
Tyr	40	Loop
Cys	41	Loop
Tyr	42	Loop
Ile	43	B3
Phe	45	B3
Glu	46	B3
Asn	56	Loop
Glu	57	Loop
Gly	60	Loop
Phe	74	B5
Tyr	78	B5
Leu	79	B5

Tabelle 9 Aminosäuren von Saratin, die möglicherweise an der Saratin-Kollagen-Bindung beteiligt sind. Ihre H^N -Resonanzsignale sind 1H - ^{15}N -HSQC-Experiment nicht detektierbar und weisen teilweise eine große Änderung ihrer chemischen Verschiebungen auf. Die Sekundärstrukturelemente sind zusätzlich farbig hinterlegt (blau: α -Helix, orange: β -Strang).

Die an der Bindung von Saratin und Kollagen direkt oder indirekt beteiligten Aminosäuren sind in Tabelle 9 aufgelistet und in Abbildung 40 graphisch dargestellt.

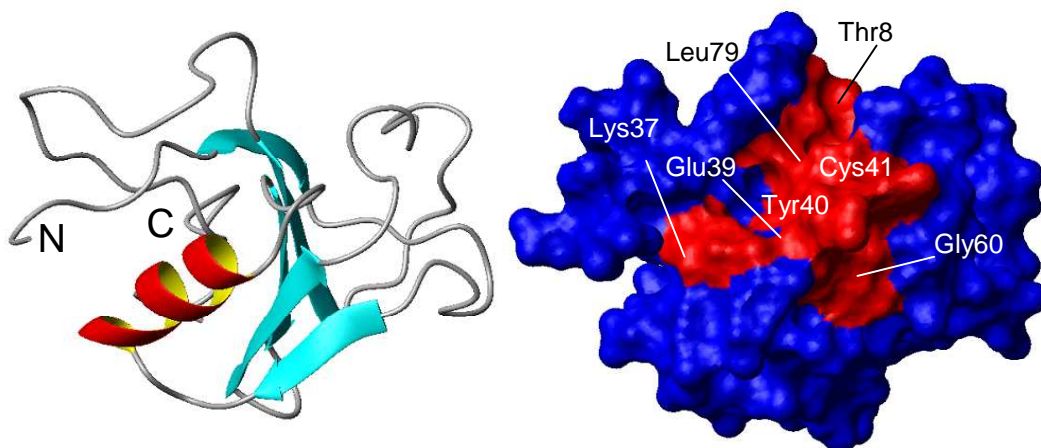


Abbildung 40 Bindungsfläche von Saratin und tripelhelikalem Kollagen. Die Struktur von Saratin ist in zwei unterschiedlichen Darstellung in gleicher Orientierung gezeigt, links als Bänder- und rechts als raumfüllendes Modell. In der raumfüllenden Darstellung ist die Kollagen-Bindungsfläche von Saratin rot eingefärbt.

Die Verteilung der elektrostatischen Oberflächen-Partialladung von Saratin wurde mit dem Programm MOLMOL [Kor96] ermittelt und graphisch dargestellt (Abbildung 41). Die Bindungsfläche von Saratin mit Kollagen ist überwiegend negativ geladen. Sie wird von zwei positiv geladenen Bereichen flankiert. Drei Lysin-Seitenketten der α -Helix (Lys32, Lys33 und Lys37) bilden die eine Flanke und zwei Lysin-Seitenketten des β -Strangs B2 (Lys23 und Lys24) die andere. Die zur negativen Oberflächen-Partialladung beitragende Aminosäure Lys37 ist an der Bindung mit Kollagen beteiligt. Die auffällige Ladungsverteilung gewährleistet möglicherweise die Ausrichtung der Moleküle zueinander.

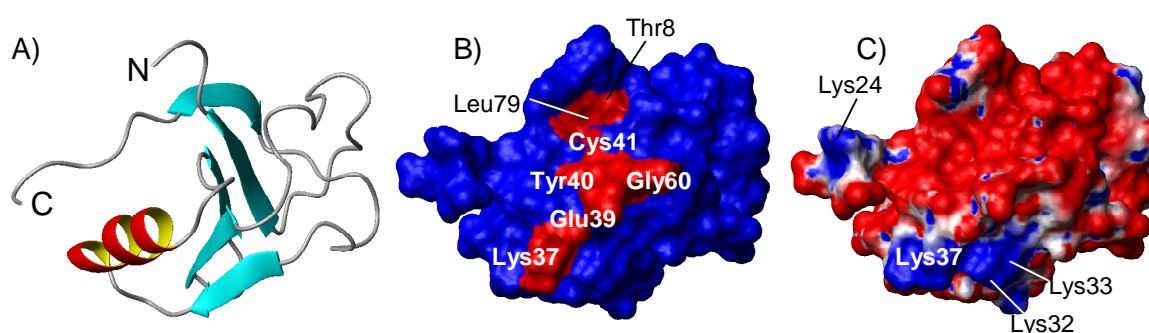


Abbildung 41 Verteilung der Oberflächen-Partialladung der Bindungsfläche von Saratin. Die dargestellten Strukturen von Saratin besitzen alle die gleiche Orientierung. A) Bänder-Modell. B) Raupfüllendes Modell von Saratin, die Bindungsfläche ist rot eingefärbt. C) Raupfüllendes Modell von Saratin, die Verteilung der Oberflächen-Partialladung von Saratin ist farblich markiert (rot: negativ, blau: positiv). Die Strukturen wurden mit dem Programm MOLMOL [Kor96] dargestellt.

4.4.2 Das ^1H - ^{15}N -TROSY-Experiment

Das TROSY-Experiment ist bei größeren Molekülen oder Komplexen empfindlicher als das bereits beschriebene HSQC-Experiment. Bei Komplexen mit einer Größe über 30 kDa stößt das HSQC-Experiment an seine Grenzen. Im Fall des Komplexes von Saratin und tripelhelikalem Kollagen mit einer Molekülmasse von 12,06 kDa, bzw. 9,4 kDa kann die Grenze abhängig von der Anzahl der gebundenen Saratin- und Kollagen-Moleküle überschritten werden, was zu dem beobachteten Signalverlust im HSQC-Experiment führen kann.

Um sicher zu stellen, daß die beobachteten Signalverluste im ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum nicht auf die zunehmenden Molekülgröße bei der Komplex-Bildung zurückzuführen sind wurden

von ungebundenen und komplexiertem Saratin (Saratin zu tripelhelikalem Kollagen 1:0,39) ^1H - ^{15}N TROSY-Spektren aufgenommen.

Auch im ^1H - ^{15}N TROSY-Spektren vom Komplex sind, im Gegensatz zu freiem Saratin, keine Amid-Proton-Signale der Aminosäuren Thr8, Tyr10, Glu39 bis Ile43, Gly60 und Phe74 nachweisbar (Tabelle 10). Die fehlende Detektierbarkeit der H^{N} -Signale im Saratin-Kollagen-Komplex (1:0,39) im ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum ist demnach keine Folge der Komplex-Größe. Das Verschwinden der H^{N} -Signale in den ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren, aufgenommen vom Komplex mit zunehmender Kollagen-Konzentration, und die fehlende Detektierbarkeit der H^{N} -Signale im ^1H - ^{15}N TROSY-Spektrum, zeigt, daß sich das System Saratin und Kollagen im intermediären Austausch befindet.

Aminosäure		HN-Signale verschwinden	
		HSQC	TROSY
Thr	8	X	X
Tyr	10	X	X
Ala	11	X	
Ser	21		
Ser	25		
Thr	34	X	
Phe	36	X	
Lys	37		
Thr	38	X	
Glu	39	X	X
Tyr	40	X	X
Cys	41	X	X
Tyr	42	X	X
Ile	43	X	X
Phe	45	X	
Glu	46	X	
Asn	56	X	X
Glu	57	X	
Gly	60	X	X
Phe	74	X	X
Glu	76		
Tyr	78	X	
Leu	79	X	

Tabelle 10 Verschwinden der H^{N} -Signale vom Saratin-Kollagen-Komplex (1:0,39) im ^1H - ^{15}N -TROSY-Experiment. Das Ergebnis aus dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment (600 MHz, pH 6,5, 298 K) sind zusätzlich aufgelistet. Die mit X gekennzeichneten Aminosäuren sind, im Vergleich zu den Messungen an freiem Saratin, in den Komplex Messungen in den jeweiligen Experimenten nicht detektierbar. Die fehlende Detektierbarkeit der H^{N} -Signale im Saratin-Kollagen-Komplex im ^1H - ^{15}N -TROSY-Experiment (800 MHz, pH 6,5, 308 K) zeigt, daß das Verschwinden der Signale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment nicht auf die zunehmende Komplex-Größe zurückzuführen ist. Sie zeigt, daß sich das System Saratin-Kollagen im intermediären Austausch befindet. Die Sekundärstruktur-Elemente sind farbig hinterlegt, blau für α -Helix und orange für β -Strang

4.4.3 Diffusionskoeffizienten von Saratin und Komplex

Das Diffusionsverhalten von Makromolekülen in Lösung erlaubt Rückschlüsse auf deren Größe und Form. So diffundieren größere oder nicht globuläre Proteine in Lösung langsamer als kleine oder globuläre Moleküle. Die Diffusion lässt sich mittels NMR-Methoden untersuchen. Erzeugt man mit einem Magnetfeldgradienten ein inhomogenes Magnetfeld so führt dies zu Intensitätsverlusten der Signale im NMR-Spektrum, anhand derer sich die Diffusionskoeffizienten bestimmen lassen (Abbildung 42).

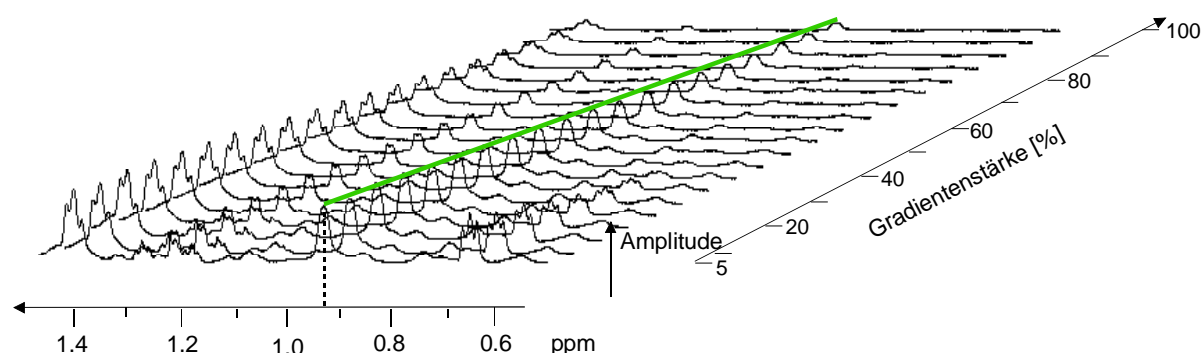


Abbildung 42 Ausschnitt von 1D NMR-Spektren des Saratin-Kollagen-Komplex (1:0,39), aufgenommen mit steigender Gradientenstärke, 600 MHz, pH 6,5 und 302 K. Der grüne Balken veranschaulicht die Amplituden-Abnahme des Resonanzsignals der beobachteten Methylgruppe von Saratin bei 0,93 ppm) bei steigender Gradientenstärke. Anhand der Amplitudenabnahme des Resonanzsignals der Methylgruppe wurde der Diffusionskoeffizient Saratins und des Komplex bestimmt.

Um die Diffusionskoeffizienten von Saratin und vom Saratin-Kollagen-Komplex zu ermitteln, wurden bei 600 MHz, pH 6,5, 302 K und steigenden Gradienten eindimensionale ^1H -Spektren aufgenommen, und die Amplitudenabnahme des Resonanzsignals der Methylgruppe von Saratin (0,93 ppm) zur Analyse herangezogen. Abbildung 43 zeigt die Signalreduktion für die normalisierten Amplituden (A/A_0) von Saratin ($M_{\text{rSaratin}}=12,06$ kDa) und Saratin-Kollagen-Komplex ($M_{\text{rtripelhelikales Kollagen}}=9,5$ kDa). Als Referenzproteine für die Bestimmung der Diffusionskonstanten wurden D_2O (0,019 kDa), Polyacrylamid (stationär), Lysozym in H_2O und in D_2O (14,4 kDa), Tendamistat (10,8 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) gemessen. Als Referenz für ein "stationäres Molekül" wurde im NMR-Röhrchen polymerisiertes Polyacrylamid verwendet. Idealerweise sollte die Signalintensität für

Polyacrylamid unabhängig von der Gradientenstärke sein. Bei starkem Gradienten war bei Polyacrylamid aber ein leichter Amplitudenabfall zu beobachten. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Messartefakte.

Im Fall von Lysozym ergaben sich abhängig vom Lösungsmittel unterschiedliche Werte. Für Lysozym in D_2O wurde ein Diffusionskoeffizienten von $D=1,10 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und damit eine Molekülmasse von $M_r=13,79 \text{ kDa}$ ermittelt. Dies entspricht den angegebenen Werten in der Literatur [Alt95]. Anders verhält es sich für Lysozym in H_2O . Für in H_2O gelöstes Lysozym wurde ein Diffusionskoeffizient von $D=1,26 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und einer Molekülmasse von $M_r=9,36 \text{ kDa}$ ermittelt. In beiden Fällen wurde Tendamistat als Referenz bei der Berechnung verwendet. Die Ursache für das unterschiedliche Diffusionsverhalten von Lysozym in den beiden Lösungsmitteln H_2O und D_2O liegt vermutlich in der Viskosität der jeweiligen Lösungsmittel.

Für Aprotinin wurde ein Diffusionskoeffizient von $D=1,43 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ermittelt. Daraus resultiert rechnerisch eine Molekülmasse von $6,31 \text{ kDa}$. Dieser Wert konvergiert mit dem in der Literatur angegebenen Wert von $6,5 \text{ kDa}$ [Fri88].

Die Diffusionsmessungen ergaben für ungebundenes Saratin einen Koeffizienten von $D=1,12 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Die Molekülmasse von Saratin wurde auf $M_r=13,36 \text{ kDa}$ bestimmt und liegt damit unwesentlich höher als der theoretische Wert von $12,06 \text{ kDa}$.

Der Komplex aus Saratin und tripelhelikalem Kollagen (1:0,39), mit einem ermitteltem Diffusionskoeffizienten von $D=1,05 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, diffundiert überraschenderweise mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit, wie in D_2O gelöstes Lysozym mit einer Masse von $14,4 \text{ kDa}$ (Abbildung 43). Die Bestimmung der Molekülmasse ergab einen Wert von $M_r=14,67 \text{ kDa}$.

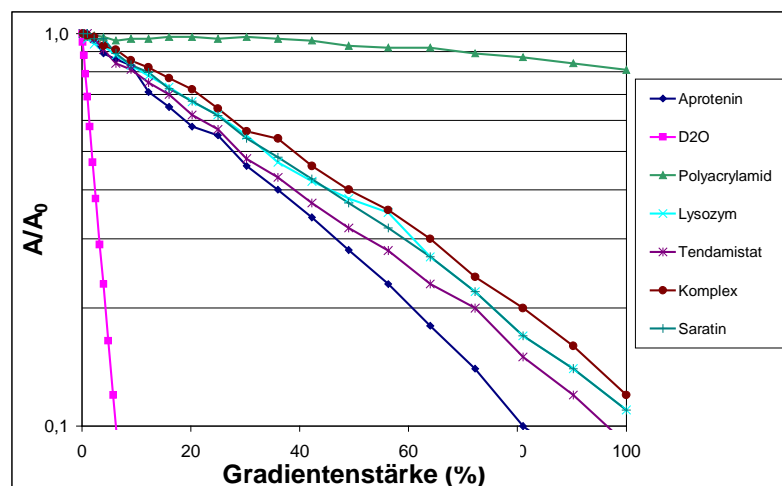


Abbildung 43 Logarithmische Darstellung des Signalabfalls von Saratin und dem Saratin-Kollagen-Komplex in Abhängigkeit von der Gradientenstärke. Saratin (12,06 kDa) und Komplex (Saratin zu tripelhelikalem Kollagen 1:0,39) waren bei pH 6,9 in 95% H₂O/ 5% D₂O gelöst ($M_{r,\text{Saratin}} = 12,06$ kDa; $M_{r,\text{tripelhelikales Kollagen}} = 9,5$ kDa). Die Messungen erfolgten bei 302 K und 600 MHz. Als Referenzproben wurden Aprotinin (6 kDa), D₂O (0,019 kDa), Lysozym/D₂O (14,4 kDa), Tendamiostat (10,8 kDa) und polymerisiertes Polyacrylamid verwendet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde Lysozym/H₂O nicht aufgeführt.

4.4.4 Untersuchungen des Kollagen-Peptids

Die Komplexbildung von Saratin und homotrimeren Kollagen-Peptiden führt bei beiden Proteinen zu Änderungen in den für die NMR zugängigen Parametern. Die Kerne der Aminosäuren, die an der Bindung beteiligt sind, erfahren eine Änderung der chemischen Verschiebungen und der Signal-Volumina. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch die mittels NMR-Methoden meßbaren Auswirkungen der Komplexbildung auf Kollagen-Peptide untersucht. Zusätzlich wurde das verwendete Kollagen-Peptid auf NMR-Basis durch die Zuordnung seiner Resonanzen näher charakterisiert.

4.4.4.1 Vorläufige Zuordnung

Das in dieser Arbeit untersuchte Kollagen-Peptid baut sich vorrangig aus den repetitiven Aminosäure Triplets (Gly-Pro-Hyp) auf. Bedingt durch die Gleichsinnigkeit der Einzel-

stränge und Tripel-Helix des Kollagen-Peptids ist eine sequentielle Zuordnung anhand von ein- oder mehrdimensionalen Spektren von unmarkierten Proben, wie sie in dieser Arbeit vorlagen, nicht möglich. Sie erlaubt aber zumindest teilweise eine Identifizierung der Kern- und Aminosäure-Typen anhand der durchschnittlichen chemischen Verschiebungen [Wis95] und anderen publizierten Daten von Kollagen-Peptiden.

Die Resonanzen des unmarkierten homotrimeren Kollagen-Peptids wurden mit ein-dimensionalen Spektren zugeordnet. Die 1D Spektren wurden von einer in 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ bei pH 6,8 gelösten Probe bei 600 MHz gemessen.

Anhand der durchschnittlichen chemischen Verschiebungen nach Wishart et al. konnten die Resonanzen der H^{N} -Kerne von Lys und Gly nicht eindeutig zugeordnet werden. Die chemische Verschiebung dieser Kerne liegt im Bereich von 8,1 bis 8,8 ppm. Die Kern-Resonanzen der Lysin-Reste konnte größtenteils zugeordnet werden. Abbildung 44 zeigt das 1D Spektrum des Kollagen-Peptids ohne den Frequenzbereich der Amid-Protonen. Die zugeordneten Kern-Resonanzen sind im 1D Spektrum beschriftet. Die Resonanzen der H^{α} -Kerne von Gly und H^{δ} -Kerne von Prolin wurden anhand der Daten von Long et al. [Lon93] identifiziert.

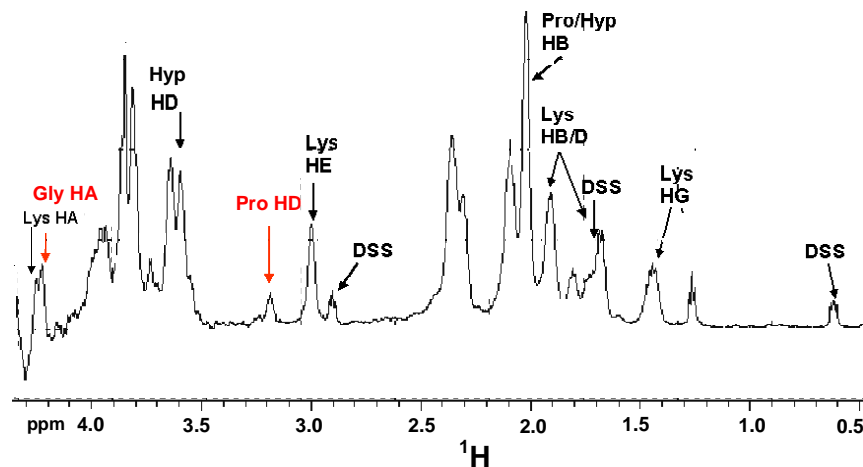


Abbildung 44 Protonen-Spektrum des Kollagen-Peptides. Das Spektrum wurde von einer unmarkierten Kollagen-Peptid-Probe bei 298 K, 600 MHz und einem pH von 6,8 aufgenommen. Das Kollagen-Peptid war mit 0,58 mM in 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ gelöst. Als Referenz wurde 0,2 mM DSS zugesetzt. Die, anhand der durchschnittlichen Verschiebungen zugeordneten Protonen-Resonanzen, sind schwarz beschriftet. Die Zuordnung der H^{α} -Kerne der Glycine und H^{δ} -Kerne der Proline wird anhand der Daten nach Long et al. [Lon93] vermutet und sind rot beschriftet. Die Resonanzen der Amid-Protonen von Lys und Gly, im Bereich von 8,1 bis 8,8 ppm, und der H_{ζ} -Kerne von Lysin, bei 7,5 ppm, sind in der Abbildung nicht dargestellt.

4.4.4.2 Bindungsstudie vom Kollagen-Peptid

Durch die Komplexierung von Saratin und Kollagen-Peptiden ändert sich die chemische Umgebung der Kerne und damit ihre chemische Verschiebung. Analog zur Bindungsstudie von Saratin wurde versucht durch den direkten Vergleich der Spektren vom Saratin-Kollagen-Komplex, von Saratin und vom ungebundenem Kollagen-Peptid diese Änderungen beim Kollagen-Peptid zu identifizieren. Dazu wurden 1D Spektren und 2D NOESY-Spektren vom homotrimeren Kollagen-Peptid im ungebundenen und komplexiertem Zustand und von Saratin im ungebundenen Zustand bei 600 MHz gemessen und qualitativ miteinander verglichen.

Anhand der 2D NOESY-Spektren konnten aufgrund der enormen Signal-Menge und den damit verbundenen Signal-Überlagerungen in den Saratin- und Komplex-Spektren keine Auffälligkeiten oder Änderungen der Kern-Resonanzen des Kollagen-Peptids isoliert und identifiziert werden. Die Signal-Überlagerungen machten auch die Auswertung der ein-dimensionalen Vergleichsspektren nahezu unmöglich.

Das Experiment zeigte, daß es anhand von ein- und zwei-dimensionalen Spektren gemessen bei 600 MHz von einer unmarkierten Probe nicht möglich mit NMR messbare Effekte am Kollagen-Peptid verursacht durch die Komplexierung mit Saratin zu beobachten.

4.5 Modell der Komplexstruktur

4.5.1 Strukturmodell des Kollagen-Peptids

Das Strukturmodell des homotrimeren Kollagen-Peptides wurde mit dem Programm The BuScr [Rai04] anhand der Aminosäure-Sequenz erstellt. Die drei Einzelstränge des tripel-helikalen Kollagen-Peptides haben eine identische Sequenz (Gly-Lys-Hyp-(Gly-Pro-Hyp)₁₀-Gly-Lys-OH). N-terminal ist in der Dreier-Wiederholungssequenz Gly-Pro-Hyp das Prolin durch einen Lysin-Rest ersetzt. Am C-Terminus ist ebenfalls ein Prolin durch ein Lys ausgetauscht. Dieses Lys terminiert jeweils den Aminosäure-Strang.

Die Einzel-Stränge der Tripel-Helix sind entlang der Hauptachse um die sich die Einzel-Stränge winden leicht gegeneinander verschoben (Abbildung 45 A). Die Prolin- und Hydroxy-Prolin-Reste orientieren sich in der rechtsgängigen α -Helix so, daß ihre Seitenketten möglichst senkrecht von der Windungsachse wegreichen. Die Glycin-Reste befinden sich zentral der Achsen. Die Ladungsverteilung an der Oberfläche des Kollagen-Peptids ist in Abbildung 45 C dargestellt, sie erfolgte mit dem Programmen MOLMOL [Kor96]. Deutlich erkennt man die positive (blau) elektrostatische Oberflächenladung, die N-terminal von den, in Position zwei befindlichen, Lysin-Resten und C-terminal durch den Strang terminierende Lysin-Reste, kommt. Die positive Partialladung am N-Terminus in der Darstellung mit dem Programm MOLMOL kommt vermutlich von den Carbonyl-Gruppen der Glycin-Reste, die in den gegeneinander verschobenen Einzel-Strängen ebenfalls gegeneinander versetzten Glycin-Resten. Die entsprechende Verteilung der Oberflächen-Partialladung an den Termini ist in Abbildung 45 C dargestellt. In den "Windungsfurchen", die die drei Einzelstränge bei der Windung um die Hauptachse bilden, rührt die negative Partialladung (rot) von den Hydroxyl-Gruppen der Hydroxy-Prolin-Resten und die positive Partialladung (blau) von den Amid-Protonen der Hauptketten.

Die Verteilung der Aminosäuren im tripelhelikalem Kollagen-Strang spiegelt sich auch in der Lösungsmittelzugängigkeit der Reste an der Proteinoberfläche wieder. Die zentral gelegenen Glycin-Reste sind mit einer Oberflächenzugängigkeit von 20,5% kaum dem Lösungsmittel exponiert. Im Gegensatz dazu sind die Prolin- und Hydroxy-Prolin-Reste des tripelhelikalen Kollagen-Peptids zu 51,6%, bzw. 35,7% für das Lösungsmittel zugänglich.

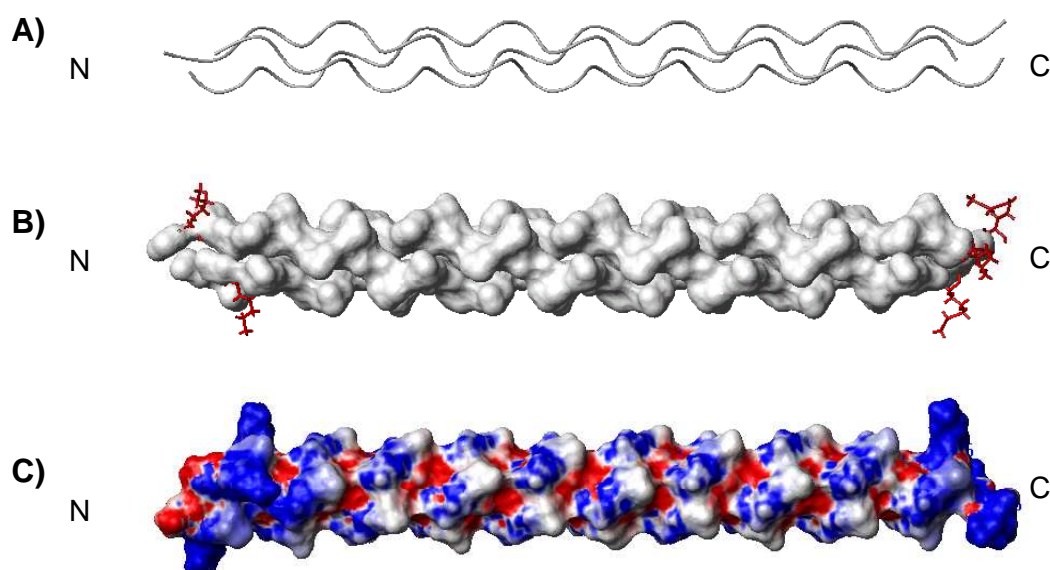


Abbildung 45 Strukturmodell des Kollagen-Peptides. Die drei Einzel-Stränge haben jeweils die identische Sequenz Gly-Lys-Hyp-(Gly-Pro-Hyp)₁₀-Gly-Lys-OH. A) Bänder-Darstellung. B) Raumfüllendes Modell. Die terminalen Lys-Reste sind rot hervorgehoben. C) Verteilung der Oberflächen-Partialladung (rot: negativ, blau: positiv). Die terminalen blauen Bereichen entsprechen den positiven Partialladungen der Lysin-Reste in Position 2 und 35. Die roten Bereiche kennzeichnen die negativen Oberflächen-Partialladungen, am tripelhelikalem Strang hervorgerufen durch die Hydroxy-Prolin-Reste und am N-Terminus vermutlich durch die Carbonyl-Gruppen der, in den gegeneinander verschobenen Einzel-Strängen ebenfalls gegeneinander versetzten Glycin-Reste. (Das Strukturmodell wurde mit dem Programm THe BuScr erstellt [Rai04]. Die graphische Darstellung erfolgte mit MOLMOL [Kor96].)

4.5.2 Modell der Komplexstruktur

Das Strukturmodell vom Saratin-Kollagen-Komplex wurde mit dem Moleküldynamik Programm HADDOCK [Dom04] basierend auf der Lösungsstruktur von Saratin, des Modells der Kollagen-Struktur und den Titrationsdaten erstellt. Dabei wurden in dem Docking-Experiment mit HADDOCK bei Saratin die, im Titrationsexperiment ermittelten Aminosäuren, und bei Kollagen alle Aminosäuren als potentielle Bindungspartner definiert. Die Definition der gesamten Tripelhelix als mögliche Bindungsfläche erfolgte unter der Annahme, daß aufgrund der repetitiven primären und tertiären Struktur von Kollagen mehrere Bindungsstellen für Saratin existieren.

Die nachstehende Analyse beruht auf den 20 Strukturen, die automatisch im Wasserkasten verfeinert wurden. Von den insgesamt zwanzig bestimmten Komplexstruktur-Modellen ist die Bindungsfläche von Saratin bei 65% der Komplexstrukturen, entsprechend den

Vorgaben, richtig orientiert. Die Lage der Saratin Moleküle aber an der Tripelhelix ist unterschiedlich (Tabelle 11). Die Saratin Moleküle binden die in der Region des N-Terminus der Tripelhelix frontal oder lateral, in der Mitte der Helix oder lateral am C-Terminus. Bei 15,4% der Komplexstrukturen bindet Saratin am N-Terminus und verdeckt diesen halbseitig (Abbildung 46). Bei 38,5% bindet Saratin lateral in der Region N-Terminus der Tripelhelix, bei 7,6% lateral am C-Terminus und bei 38,5% in der Mitte der Kollagen-Tripelhelix (Abbildung 47).

Bei 35% der ermittelten Komplexstruktur-Modellen war, aufgrund keine direkte Auswertung möglich. Der Grund hierfür liegt in der, aufgrund des hohen Rechenaufwandes, gering gewählten Anzahl von 500 Strukturen im ersten Schritt des Protein-Docking mit HADDOCK, dem *rigid body minimization*. (Der Rechenaufwand für 20 Komplexstruktur-Modelle betrug ~2 Tage für eine abschließendes Komplexstruktur-Modell.)

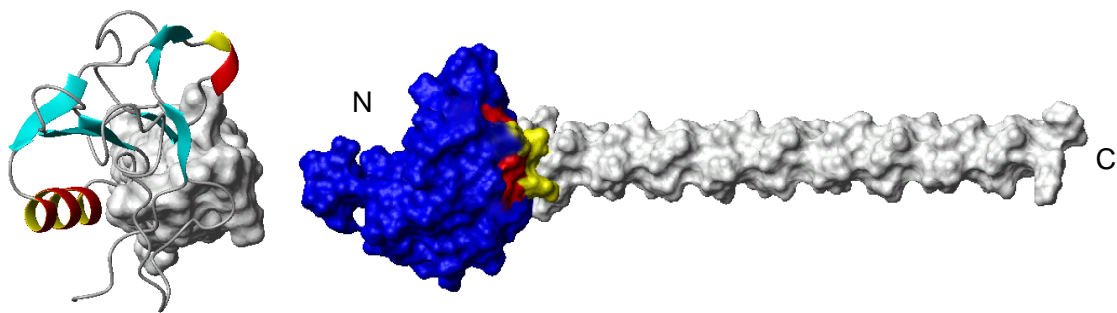


Abbildung 46 Saratin-Kollagen-Komplexmodell mit einem N-terminal gebundenem Saratin Molekül. Das Modell der Komplexstruktur wurde mit dem Programm HADDOCK [Rai04] bestimmt. Die Kollagen Tripelhelix ist weiß, Saratin blau, die aktiven AIRs gelb und die passiven AIRs rot eingefärbt. Die zwei kurzen β -Stränge und die kurze α -Helix in den Loops L1 und L2 von Saratin finden in der Strukturrechnung von Saratin keine Bestätigung. Die linke Darstellung zeigt den Komplex mit Aufsicht auf den N-Terminus. In der Darstellung links ist der Komplex um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Die Energie der Komplexstruktur E_{total} beträgt -7451,36 kcal/Mol.

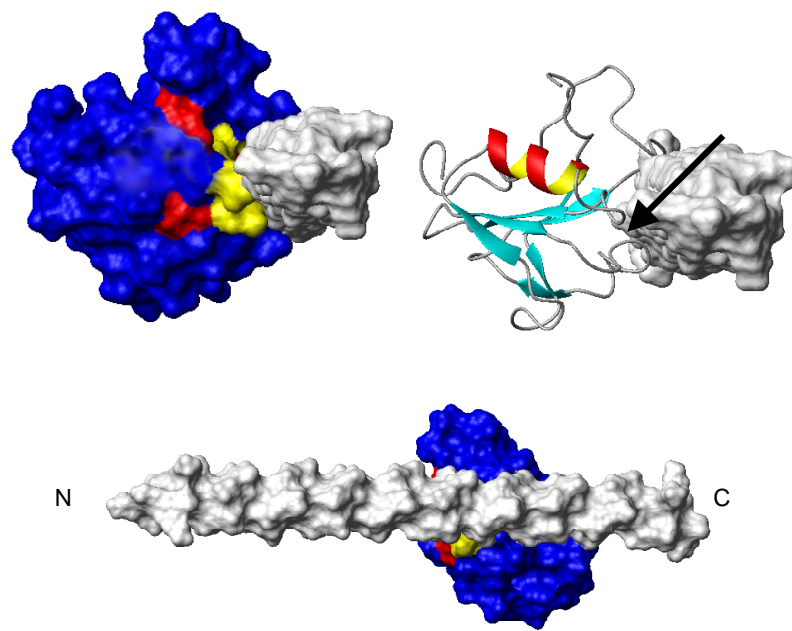


Abbildung 47 Saratin-Kollagen-Komplexmodell mit einem zentral gebundenem Saratin Molekül. Das Modell der Komplexstruktur wurde mit dem Programm HADDOCK [Rai04] bestimmt. Die Kollagen Tripelhelix ist weiß, Saratin blau, die aktiven AIRs gelb und die passiven AIRs rot eingefärbt. Die oberen Darstellungen zeigen den Komplex als raumfüllendes Modell mit Aufsicht auf den N-Terminus der Tripelhelix. Links ist das Saratin Molekül zur besseren Orientierung als Bändermodell abgebildet. Der kleine Loop zwischen der α -Helix von Saratin und B3, der nach HADDOCK direkt an der Interaktion beteiligt ist, ist mit einem Pfeil markiert. Die zwei kurzen β -Stränge in den Loops L1 und L2 von Saratin finden in der Strukturrechnung von Saratin keine Bestätigung. In der Darstellung unten ist das Komplexmodell um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Die Energie der Komplexstruktur E_{total} beträgt $-7036,81$ kcal/Mol.

Die unterschiedliche Lage der Saratin Moleküle an der Tripelhelix ist eine Folge daraus, daß alle Aminosäuren der Kollagen-Tripelhelix als passive AIRs, also als potentielle Bindungsstelle, definiert wurden. Dies erklärt auch, daß in der automatischen Cluster-Analyse keine Cluster gefunden wurden. Die Energie der 20 berechneten Komplexstrukturen E_{total} betragen im Mittel $-7159,56$ kcal mol $^{-1}$ mit einer Standardabweichung von $98,7$ kcal mol $^{-1}$ (Tabelle 11).

Komplex-file	Komplex E_{tot} [kcal/Mol]	Protein-Protein intermolekular E_{tot} [kcal/Mol]	Protein-Protein verborgene Oberfläche	Orientierung des Saratin Molekül
sara-col_12w.pdb	-7451,36	-710,81	955,93	Nt
sara-col_11w.pdb	-7374,07	-631,87	1014,06	Nt
sara-col_4w.pdb	-7452,17	-585,38	1269,54	Nt (lateral)
sara-col_16w.pdb	-7145,36	-425,56	1213,00	Nt (lateral)
sara-col_1w.pdb	-7264,28	-412,12	1433,41	Nt (lateral)
sara-col_2w.pdb	-7235,13	-357,03	1387,09	Nt (lateral)
sara-col_17w.pdb	-7086,00	-373,13	1011,03	Nt (lateral)
sara-col_10w.pdb	-7141,42	-254,52	1297,62	N ?
sara-col_9w.pdb	-7192,33	-239,31	1320,99	Ct (lateral)
sara-col_6w.pdb	-7134,37	-215,16	1110,91	C ?
sara-col_8w.pdb	-7126,66	-217,38	1274,84	C ?
sara-col_5w.pdb	-7009,62	-178,65	1360,92	N falsch
sara-col_15w.pdb	-7036,81	-173,01	1268,14	mittig
sara-col_20w.pdb	-7099,06	-168,11	1185,27	mittig
sara-col_3w.pdb	-7025,04	-158,66	1269,56	mittig
sara-col_7w.pdb	-7092,73	-156,91	1291,29	mittig
sara-col_13w.pdb	-7032,82	-144,39	1367,59	mittig
sara-col_18w.pdb	-7158,60	-137,33	1207,09	Saratin falsch
sara-col_14w.pdb	-6949,40	-130,05	1069,83	mittig ?
sara-col_19w.pdb	-7183,98	-134,50	1228,20	mittig ?
Mittelwert	-7159,56	-290,19	1226,82	
Mittelwertabweichung	98,70	139,48	99,75	

Tabelle 11 Statistik der Energien der Saratin-Kollagen-Komplexstrukturen. Aufgelistet sind die totalen Energien des Komplex, die intermolekularen Protein-Protein-Energien und die Orientierung des Saratin Moleküls zur Kollagen Tripelhelix jeder Komplexstruktur nach der Strukturverbesserung in explizit Wasser. Die Reihenfolge der Komplexstrukturen entspricht der Bewertung nach HADDOCK, wobei die erste Struktur die oberste die energetisch beste ist. Zusätzlich ist die Orientierung des Saratin Moleküls zur Kollagen-Tripelhelix aufgelistet (Nt: N-terminal, Ct:: C-terminal, nicht eindeutig auswertbare Strukturen sind mit einem ? gekennzeichnet).

Sie liegen damit in einem kleinen Wertefenster. Aussagekräftiger sind die intermolekularen Protein-Protein Energien $E_{\text{total}}^{\text{inter}}$. Sie geben Aufschluß über die "Stärke" der intermolekulare Interaktion der Proteine. Dabei gilt, je geringer die Energie, umso "stärker" die Interaktion. Die intermolekulare Energie $E_{\text{total}}^{\text{inter}}$ des Komplex betragen im Mittel $-290,19 \text{ kcal mol}^{-1}$ mit einer Standardabweichung von $139,48 \text{ kcal mol}^{-1}$. Die große Standardabweichung zeigt, daß die intermolekularen Energien der Komplexstrukturen stark divergieren. Die Komplexstrukturen mit den niedrigsten Energien sind dabei die Komplexe bei denen Saratin in der N-terminalen Region der Kollagen-Tripelhelix und die höchsten bei denen Saratin in der Mitte der Tripelhelix bindet. Demnach ist die N-terminale Region der Kollagen-Tripelhelix der bevorzugte Bindungsbereich von Saratin ist.

Bei allen Strukturen bei denen die Bindungsfläche von Saratin richtig orientiert ist wird aus der Orientierung des Saratin Moleküls zur Tripelhelix deutlich, daß vorallem der kurze Loop, der die α -Helix von Saratin mit dem β -Faltblattstrang B3 verbindet, direkt an der Interaktion von Saratin und Kollagen beteiligt ist (Abbildung 47). Dieser Loop kommt direkt an der Tripelhelix zu liegen und die α -Helix weist von ihr weg. Dieses Ergebnis korreliert mit den Bindungsdaten aus dem Titrationsexperiment und verdeutlicht, daß die Aminosäuren von Saratin die diesen Loop bilden (Lys37, Glu39, Tyr40 und Cys41) direkt mit der Tripelhelix agieren.

Energien	[kcal/mol]		
$E_{\text{Bindungslängen}}$	88,24	\pm	1,63
$E_{\text{Bindungswinkeln}}$	295,86	\pm	5,68
E_{imp}	82,03	\pm	1,90
$E_{\text{dihedrale Winkel}}$	848,55	\pm	9,20
$E_{\text{van-der-Waals-Wechselwirkungen}}$	-735,12	\pm	15,30
E_{elec}	-7739,13	\pm	141,65
E_{total}	-7159,56	\pm	135,42

Tabelle 12 Struktur-Parameter des Saratin-Kollagen-Komplex. Die Datengrundlage der Komplexstrukturberechnung mit dem Programm HADDOCK [Dom04] bilden die Strukturen von Saratin und Kollagen-Tripelhelix und die im Titrationsexperiment ermittelte Bindungsfläche von Saratin. In der Tabelle aufgelistet sind die Mittelwerte der jeweiligen Energien und die Standardabweichung der 20 im Wasserkasten verfeinerten Strukturen.

4.5.2.1 Cluster-Analyse

Das Programm HADDOCK führt bei der Berechnung der Komplexstruktur abschließend eine automatische Cluster-Analyse durch. HADDOCK bestimmt für jede Komplexstruktur den RMSD-Wert. Anhand dieser RMSD-Matrix wird bei der Cluster-Analyse ermittelt, ob die Komplexstrukturen Cluster von gleich orientierten Interaktionspartnern bilden. Ein Cluster war bei der Analyse definiert, wenn mindestens 4 Strukturen einen RMSD $< 1,5 \text{ \AA}$ haben.

Der RMSD der Strukturen ist mit Werten von $0,8 \text{ \AA}$ bis $72,9 \text{ \AA}$ und einem Mittelwert von $41,13 \text{ \AA}$ ($\pm 11,4 \text{ \AA}$) sehr hoch. Folglich wurden bei der automatischen Analyse der 20 errechneten Strukturen vom Saratin-Kollagen-Komplex mit den gewählten Cluster-Parametern keine Cluster gefunden.

Die automatische Cluster-Analyse mit HADDOCK wird im letzten Schritt der Berechnung der Komplexstrukturen durchgeführt. Die Cluster-Parameter, RMSD-cutoff und Cluster-Größe, werden zu Beginn der Rechnung definiert und können nachträglich nicht geändert werden. In bestimmten Fällen, wenn zum Beispiel nur eine kleine Fraktion oder keine der Komplexstrukturen Cluster bilden, ist es sinnvoll die Cluster-Parameter zu variieren. Mit dem Zusatz-Script *cluster_struc* von HADDOCK ist es möglich auch nach abgeschlossener Strukturberechnung eine manuelle Cluster-Analysen mit variablen Cluster-Parametern durchzuführen. Das Prinzip ist hierbei das gleiche wie in der automatischen Variante. Die Wahl größerer RMSD-cutoffs oder kleinerer Cluster-Größen kann unter der Voraussetzung, daß die Strukturen generell Cluster bilden, dazu führen, daß auch kleine oder weniger gut definierte Cluster gefunden werden.

Dazu wurden die Saratin-Kollagen-Komplexe mit einem RMSD-cutoff in einem Bereich von 1,0 Å - 10,0 Å in fünf Schritten bei einer Cluster-Größe von mindestens zwei Strukturen manuellen auf Cluster-Bildung untersucht. Auch bei der manuellen Cluster-Analyse wurden keine Struktur-Cluster gefunden. Zwar werden rechnerisch Cluster ab einem RMSD-cutoff > 5 Å gefunden, aber die Lage der Saratin Moleküle an Kollagen-Tripelhelix entspricht diesem Ergebnis nicht.

Nach den Cluster-Analysen bilden die Saratin-Kollagen-Komplexe keine Cluster. Die Saratin-Moleküle binden an unterschiedlichen Regionen der Kollagen-Tripelhelix.

4.6 Modifizierung von Cam-HrTH-I

4.6.1 Zuordnung der Resonanzen

Cam-HrTH-I ist ein Peptid mit 10 Aminosäuren. In der Sequenz sind die Aminosäure Threonin dreimal, alle anderen Aminosäure-Typen einmal vertreten. Demnach bestand das grundsätzliche Prinzip der sequentiellen Zuordnung darin zunächst die Aminosäuretypen anhand ihres charakteristischen Spinsystemmusters im 2D TOCSY-Spektrum zu identifizieren und anschließend die sequentielle Zuordnung über NOE-Kontakte im 2D NOESY-Spektrum zu vervollständigen.

Die sequentielle Zuordnung der Resonanzen erfolgte anhand von 2D NOESY- und 2D TOCSY-Spektren von der in 95% H₂O/D₂O Cam-HrTH-I-Probe. Die Zuordnung der Seitenketten-Atome erfolgte mit 2D NOESY- und 2D TOCSY-Spektren der in 99% D₂O und 95% H₂O/D₂O gelösten Proben. Für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der C-Atome und zur Vervollständigung der Zuordnung der Seitenketten der aromatischen Aminosäuren wurde das ¹³C-HSQC-Spektrum der in 99% D₂O gelösten Probe verwendet.

Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats erfolgte, bis auf die Stickstoff- und die C^α-Kerne von Asn7, vollständig. In Tabelle 14 sind die zugeordneten Resonanzfrequenzen aufgelistet. Es wurden 76% der, mittels TOCSY-, NOESY- und ¹H-¹³C-HSQC-Spektren detektierbaren, Kohlenstoff- und Wasserstoff-Kerne und insgesamt 67,8% aller Kerntypen zugeordnet (Tabelle 13). Anhand der genannten Spektren erhält man keine Resonanzfrequenzen der Stickstoff-Kerne. Sie sind folglich nicht Teil der Zuordnung.

Atomtyp	Anzahl insgesamt	nicht zugeordnet	Zuordnung
H α	11	0	100,0%
H β	14	1	92,9%
H δ	8	0	100,0%
H γ	11	0	100,0%
H η	1	0	100,0%
HN	9	1	88,9%
H ζ	3	0	100,0%
N	10	10	0,0%
N δ	1	1	0,0%
N ϵ	1	1	0,0%
C	10	10	0,0%
C α	10	1	90,0%
C β	9	2	77,8%
C δ	7	2	71,4%
C ϵ	3	3	0,0%
C γ	9	6	33,3%
C η	1	1	0,0%
C ζ	3	0	100,0%
Insgesamt	121	39	67,8%

Tabelle 13 Vollständigkeit der zugeordneten Resonanzen der verschiedenen Atomtypen von Cam-HrTH-I. Es wurden anhand von TOCSY-, NOESY- und ¹H-¹³C-HSQC-Spektren 76% aller Kohlenstoff- und Wasserstoff-Kerne und 67,8% aller Resonanzfrequenzen der verschiedenen Kerntypen zugeordnet (800 MHz, 295 K und pH 5,4).

Chemische Verschiebungen von Cam-HrTH-I [ppm]														
pGlu 1	H		HA	4,350	HB3	2,390	HG3	2,023						
					HB2	2,527	HG2	2,023						
	N		CA	56,550	C									
					CB	29,127	CG	29,030	CD					
Leu 2	H	8,420	HA	4,393	HB3	1,614	HG	1,512	MD1	0,908	MD2	0,865		
					HB2	1,614								
	N		CA	52,260	C									
					CB	39,638	CG	39,405	CD1	21,946	CD2	20,546		
Thr 3	H	8,077	HA	4,282	HB	4,106	MG	1,115						
	N		CA	58,557	C									
					CB	67,420	CG	18,461						
Phe 4	H	8,288	HA	4,658	HB3	2,984								
					HB2	3,045								
	N		CA	54,550	C									
					CB	37,104	CG		CD1/2		CE1/2		CZ	
Thr 5	H	8,129	HA	4,511	HB	4,020	MG	1,166						
	N		CA	56,395	C									
					CB	61,781	CG	18,381						
Pro 6			HA	4,190	HB3	1,869	HG3	1,487	HD3	3,603				
					HB2	2,035	HG2	1,487	HD2	3,603				
	N		CA	60,197	C									
					CB		CG	28,979	CD	48,150				
Asn 7	H	8,390	HA	4,538	HB3	2,662								
					HB2	2,764								
	N		CA		C									
					CB	35,622	CG		ND2					
Trp(hex) 8	H	8,037	HA	4,677	HB3	3,291								
					HB2	3,357	HZ2	7,535	HH2	7,268	HZ3	7,175	HE3	7,674
	N		CA	54,433	C		CD1		CD2		NE1		CE2	
			CB	26,613	CG		CZ2		CH2		CZ3		CE3	
Gly 9	H	8,278	HA3	3,842										
			HA2	3,908										
	N		CA	42,458	C									
Thr-NHR 10	H	7,981	HA	4,287	HB		MG	1,187						
	N		CA	66,743	C									
					CB		CG2							

Tabelle 14 Resonanzfrequenzen der Spinsysteme von Cam-HrTH-I relativ zu DSS (IUPAC Format). Trp8 hat zwei Zustände, mit einer Hexose modifiziert oder unmodifiziert. Die chemische Verschiebung der H^{e1}-Kerne in der modifizierten Form ist in der Tabelle mit HE1_{hex} und in der unmodifizierten mit HE1 bezeichnet. Die in der Tabelle aufgeführten weiteren Resonanzfrequenzen von Trp8 beziehen sich auf die unmodifizierte Form von Cam-HrTH-I.

In Abbildung 48 ist das zugeordnete und beschriftete ¹H-¹³C-HSQC Spektrum (pH 5,4, 800 MHz und 295 K), der in 99,9% D₂O gelösten Cam-HrTH-I Probe dargestellt. Im ¹H-¹³C - HSQC Spektrum bekommt man für jedes an ein Kohlenstoff-Atom gebundenes Proton ein Signal. Es liefert damit eine Übersicht über die Kohlenstoff-Kerne der Haupt- und Seitenketten des Proteins die Wasserstoff-Kerne gebunden haben.

Der Bereich der Resonanzsignale der Kohlenstoff-Kerne der aromatischen Ringsysteme (120 bis 140 ppm) von Phe4 und Trp8 ist in Abbildung 48 nicht dargestellt. Die chemische Verschiebung dieser Kerne konnte anhand der zur Verfügung stehenden ¹H-¹³C-HSQC

Spektren von in 99,9% D₂O und 95% H₂O/D₂O Cam-HrTH-I-Proben nicht zugeordnet werden.

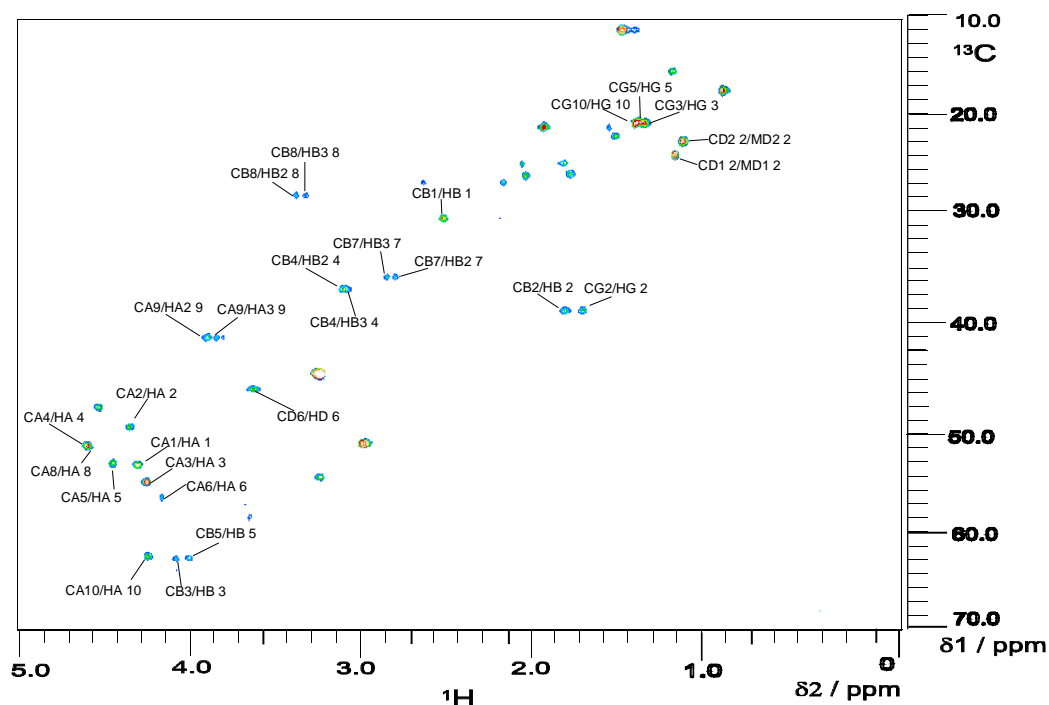


Abbildung 48 ¹³C-HSQC Spektrum von Cam-HrTH-I (99,9% D₂O, 295 K, 800 MHz und pH 5,4). Die zugeordneten Resonanzsignale der Kohlenstoff-Kerne sind beschriftet. Bei den nicht zugeordneten Resonanzsignalen handelt es sich vermutlich um Signale der Hexose des modifizierten Tryptophan-Restes Trp8.

Die chemischen Verschiebungen der Protonen des Indolrings von Trp8 konnten vollständig zugeordnet werden. Im Bereich von 10 (δ₂/ppm), der charakteristischen Verschiebung der Amid-Protonen H^{ε1} des Indolrings, gibt es im TOCSY-Spektrum (95% H₂O/D₂O) zwei Diagonalsignale, die anhand der chemischen Verschiebung eindeutig den Amid-Protonen H^{ε1} zugeordnet werden können (Abbildung 49 A). Bei der Verschiebung von 10,19 (δ₂/ppm) gibt es ein Diagonal- und ein Kreuzsignal zu H^{δ1}, dessen Zuordnung durch NOE-Kontakten zu den H^β-Kernen von Trp8 abgesichert ist. Die Existenz des Kreuzsignals H^{δ1}/H^{ε1} zeigt, daß der Kohlenstoff-Kern C^{δ1} protoniert ist. Auf der Resonanzfrequenz des zweiten Diagonalsignals von H^{ε1}, bei 10,58 ppm, gibt es kein Kreuzsignal. Da demnach zwischen H^{δ1}- und H^{ε1}-Kernen von Trp8 kein Magnetisierungstransfer stattfindet, bedeutet das, daß

$C^{\delta 1}$ -Atom unprotoniert und damit substituiert ist. Das Vorhandensein von zwei Zuständen von $C^{\delta 1}$ Trp8 zeigt, daß Cam-HrTH-I in zwei Formen vorliegt.

Anhand des Quotienten der Volumina der beiden Diagonalsignale der Amid-Protonen $H^{\epsilon 1}$ des Indolrings im TOCSY-Spektrum (95% H_2O/D_2O) kann das Vorkommen der modifizierten Form auf 30,5% festgelegt werden.

Die vollständige Zuordnung der Resonanzfrequenzen der Protonen des Indolrings von Trp8 (Tabelle 14 und Abbildung 49) bezieht sich folglich auf die unmodifizierte Form von Cam-HrTH-I, mit einer Resonanzfrequenz des Amidprotons $H^{\epsilon 1}$ von 10,19 ppm. Die Resonanzfrequenzen der entsprechenden Protonen bei der modifizierten Form des Proteins konnten, bis auf das Amidproton $H_{hex}^{\epsilon 1}$ mit einer Resonanzfrequenz von 10,58 ppm, nicht zugeordnet werden. Möglicherweise sind die Resonanzsignale im 2D TOCSY (Abbildung 49 B) bei 7,6 (δ_2 /ppm) und 7,2 (δ_2 /ppm) zu den Indolprotonen zu zählen. Für sie konnte keine Zuordnung zu anderen Kernen getroffen werden. Die Signalform der zugeordneten Indolprotonen lässt aber auch vermuten, daß Signale überlagert sind.

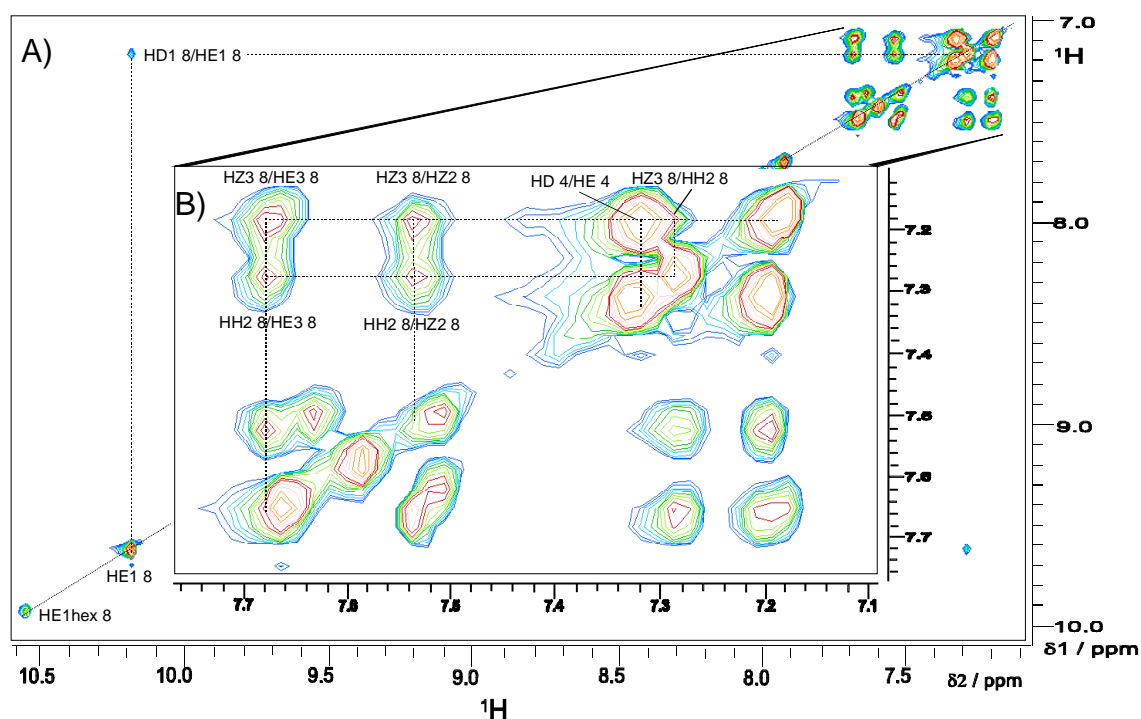


Abbildung 49 Resonanzsignale der Protonen des aromatischen Ringsystems von Trp8 bei dem Protein Cam-HrTH-I. Die Abbildungen A) und B) zeigen Ausschnitte aus dem 2D TOCSY (95% H_2O/D_2O , 800 MHz, pH 5,4 und 295 K) von Cam-HrTH-I. A) Im TOCSY-Spektrum gibt es zwei

Diagonalsignale von $H^{\epsilon 1}$ (im Spektrum benannt mit HE1 8 und HE1_{hex} 8). Das bedeutet, daß Cam-HrTH-I in zwei Formen, modifiziert und unmodifiziert, vorliegt. B) Beschriftete Resonanzsignale der Protonen des Indolrings von Trp8 und Phe4. Die zugeordneten Resonanzfrequenzen von Trp8 beziehen sich nur auf die unmodifizierte Form des Proteins.

Das 2D TOCSY-Spektrum der in 99% D₂O gelösten Cam-HrTH-I-Probe zeigt im Bereich von 5,0-5,5 (δ_2 /ppm), der typische Resonanzsignalbereich von H^{α} -Kernen, drei auffällige Spinsysteme (Abbildung 50 A, B). Anhand der von Hofsteenge et al. publizierten chemischen Verschiebungen und des charakteristischen Signalmusters der Hexose des modifizierten Trp-Restes Trp7 der RNase U_s [Hof94] können diese Spinsysteme vermutlich der Hexose von Cam-HrTH-I zugeordnet werden. Die Protonen-Resonanzsignale der Spinsysteme bei 5,2 ppm und 5,4 ppm besitzen ein nahezu symmetrisches Signalmuster. Sie weisen fünf Resonanzsignale im Bereich von 3,3-4,0 (δ_1 /ppm) auf (Abbildung 50 A). Mit hoher Wahrscheinlichkeit stellen sie zwei Formen des Zuckers dar. Bei 5,1 (δ_2 /ppm) befindet sich ein weiteres Spinsystem, das allerdings nur drei Signale im Bereich von 3,9-4,4 (δ_1 /ppm) besitzt, die möglicherweise überlagert sind (Abbildung 50 B). Möglicherweise handelt es sich auch bei diesem Spinsystem um eine weitere Form der Hexose.

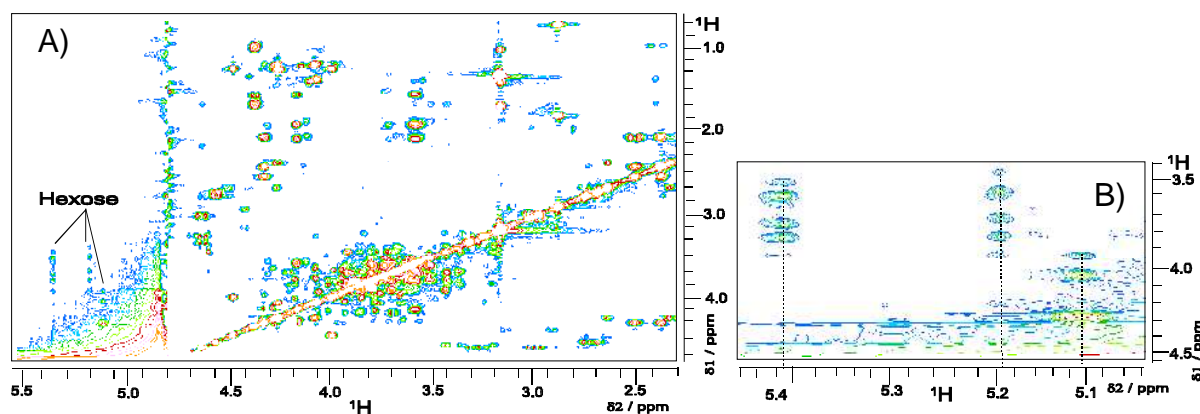


Abbildung 50 Potentielle Spinsysteme der Hexose von Cam-HrTH-I. A) Das 2D TOCSY-Spektrum von Cam-HrTH-I (99,9% D₂O, 800 MHz, pH 5,4, 287 K) weist im Bereich von 5,0-5,5 (δ_2 /ppm) drei Spinsysteme auf, die anhand der charakteristischen Signalmuster und chemischen Verschiebungen nach Hofsteenge et al. [Hof94] vermutlich der Hexose zugeordnet werden. In B) sind diese Spinsysteme vergrößert dargestellt.

5 Diskussion

Bei Gefäßwandverletzungen, infolge mechanischer Einwirkung oder Erkrankungen, wie zum Beispiel der Atherosklerose, wird die subendotheliale Matrix der Gefäße beschädigt. Kollagenfasern der Matrix werden dem Blut und den darin zirkulierenden Bestandteilen, im besonderen den Thrombozyten, ausgesetzt. Die Exposition von Kollagen ist ein entscheidender Schritt bei der Initialisierung und Ausbildung von Thrombosen. Im folgendem binden die Thrombozyten sowohl abhängig von vWF, als auch vWF-unabhängig an Kollagen. Weitere Interaktionen verschiedener Thrombozyten Rezeptoren führen zur Aktivierung und anschließenden Aggregation der Thrombozyten. Saratin, ein aus dem Speichel (Saliva) des Blutegels *Hirudo medicinalis* isoliertem Protein, inhibiert dosis-abhängig die vWF-abhängige und unabhängige Bindung von Thrombozyten an Kollagen [Bar01]. Hier stellen wir die dreidimensionale NMR-Struktur von Saratin vor. Wir beschreiben die Charakterisierung der Saratin-Kollagen Interaktion und stellen ein Modell der Interaktion und der Komplexstruktur vor.

5.1 Tertiärstruktur von Saratin

Die dreidimensionale Struktur von Saratin wurde mit homo- und heteronuklearen NMR-Spektren gelöst. Mit einer Zuordnung der Resonanzfrequenzen von 90,3% der Proteinkerne von Saratin liegen wir im oberen Bereich der Vollständigkeit für die Zuordnung ähnliche großer Proteine. Die gelöste Struktur ist durch eine hohe Anzahl von Einschränkungen, als Datenbasis der Strukturrechnung (1338 Abstandseinschränkungen, 16 Wasserstoff-Brücken und 96 dihedrale Winkel), sehr gut definiert. Die dreidimensionale Struktur des globulären Proteins Saratin wird von einem regelmäßigem β -Faltblatt, einer α -Helix und zwei sich kreuzenden Loops bestimmt. Das β -Faltblatt baut sich aus fünf antiparallel orientierten β -Strängen auf. Es bildet den zentralen Bereich des Proteins, und wird einerseits durch die α -Helix und andererseits durch die sich kreuzenden Loops abgeschirmt (Abbildung 51).

Die Sekundärstrukturelemente sind durch das entsprechende charakteristische Muster an NOE-Kontakten ebenfalls sehr gut definiert. Die Vorhersage der Sekundärstruktur von Saratin anhand der chemischen Verschiebungen und das Fehlen von mittel- und langreichweitigen NOE-Kontakten im C-terminalen Bereich (Glu83 bis Asp103) lassen vermuten, daß der C-Terminus flexible und unstrukturiert ist. Zunehmende Relaxationszeiten T_1 und T_2 der ^{15}N -Kerne des Proteinrückgrats ab Aminosäure Gly84 und negative heteronukleare NOEs ab Lys85 bestätigen diese Vermutung. Auch N-terminal bis Glu4 wird anhand der chemischen Verschiebungen keine Sekundärstruktur vorhergesagt und NOE-Kontakte fehlen. Die Relaxationszeiten T_1 und T_2 erfahren zwar in diesem Bereich, im Vergleich zu dem strukturiertem Protein-Kern, nur eine schwache Erhöhung und es fehlen negative heteronukleare NOEs, aber man muß auch hier davon ausgehen, daß dieser kurze N-terminale Bereich flexibel ist.

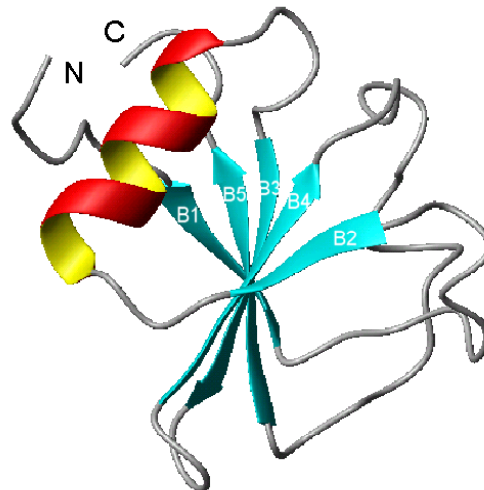


Abbildung 51 Lösungsstruktur von Saratin. Der flexibler C-Terminus ist aus Gründen der Übersichtlichkeit ab Glu83 nicht dargestellt.

Das ebenfalls die Hämostase inhibierenden Blutegelproteins LAPP [Hui01] weist eine ähnliche Tertiärstruktur auf. Strukturelle Unterschiede zwischen Saratin ($M_r = 12,0 \text{ kDa}$) und LAPP ($M_r = 13,6 \text{ kDa}$), die eine Sequenzidentität von 46% aufweisen, zeigen sich an den beiden Termini. N-terminal besitzt LAPP einen weiteren, sechsten antiparallelen β -Strang und der flexible und unstrukturierte C-Terminus von Saratin (Glu83 bis Asp103) dagegen fehlt. Saratin und LAPP weisen nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Unterschiede auf. Beide inhibieren zwar die vWF-vermittelte und Thrombozyten-vermittelte Bindung an Kollagen durch direkte Interaktion mit Kollagen. Dieser Effekt ist aller-

dings bei LAPP dosis-unabhängig [Dep99] und bei Saratin dagegen dosis-abhängig. Niedrige Konzentrationen an Saratin inhibieren die vWF-abhängige Thrombozyten Anheftung, haben aber keinen Effekt auf die vWF-unabhängige Aggregation. Im Gegensatz dazu inhibieren hohe Konzentrationen beide Mechanismen, die vWF-vermittelte und die Kollagen-vermittelte Aggregation der Thrombozyten [Bar01].

5.2 Interaktion von Saratin und Kollagen

Die Ergebnisse aus Titrations- und Saratin-Kollagen Docking-Experimenten zeigen, daß Saratin eine einzige Bindungsstelle, bzw. -fläche für Kollagen besitzt und immer in der gleichen Orientierung an die Kollagen Tripelhelix binden. Die Analyse von heteronukleare NMR-Spektren von dem Saratin-Kollagen-Komplex mit unterschiedlicher Konzentration an Kollagen ergab, daß das Saratin Molekül die Kollagen Tripelhelix spangenartig umfaßt (Abbildung 52). Saratin orientiert sich derart, daß die Kollagen Tripelhelix parallel am Rand des β -Faltblatts zu liegen kommt, der die Scherachse der Spange bildet. Auf der einen Seite des β -Faltblatts steht die parallel zur β -Faltblatt Ebene liegende α -Helix von Saratin senkrecht zur Tripelhelix, und auf der anderen Seite des β -Faltblatts liegen die sich überkreuzenden Loops L1 und L2. Die Loops und das N-terminale Ende der α -Helix mit dem anschließendem kleinen Loop zu dem β -Strang B3 bilden die Arme der Spange.

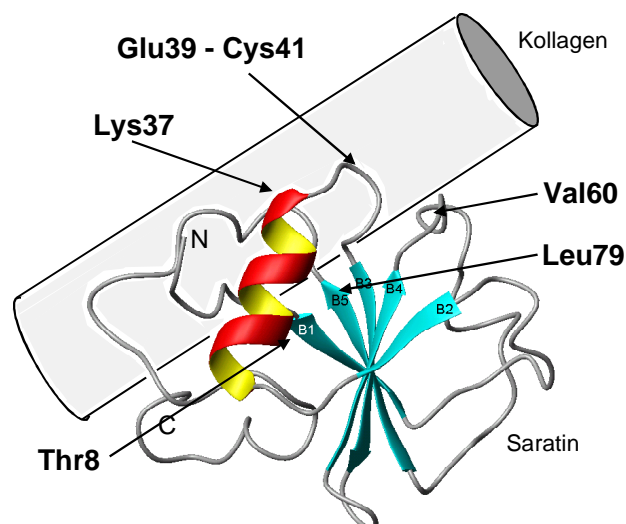


Abbildung 52 Orientierung eines Saratin Moleküls bei Bindung an Kollagen. Die Aminosäuren Thr8, Lys37, Glu39, Tyr40, Val60 und Leu79 sind an der Bindung beteiligt. Ihre Lage in der Saratin Struktur ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Beteiligung von Cys41 an der Bindung kann

nicht eindeutig geklärt werden. Sie ist wahrscheinlich und wurde daher in die Abbildung mit aufgeführt. Die schematische Darstellung der Kollagen Tripelhelix entspricht dem Größenverhältnis zu Saratin.

An der Bindung mit Kollagen sind die Aminosäuren Thr8, Lys37, Glu39, Tyr40, Val60 und Leu79 beteiligt. Sie zeigen die zu erwartenden signifikanten Änderung der chemischen Verschiebungen und Volumina der Resonanzsignale, und ihre Seitenketten liegen für Kollagen frei zugänglich an der Proteinoberfläche. Thr8 und Leu79 liegen am Rand des β -Faltblatts und bilden bei der Interaktion die Achse der Spange. Lys37, Glu39 und Tyr40 befinden sich am N-terminalen Ende der α -Helix (Lys37) und in dem anschließendem kurzen Loop (Glu39, Tyr40). Sie stellen zusammen einen Arm der Spange dar. Den zweite Arm bildet der Loop L2 mit der an die Kollagen Tripelhelix bindenden Aminosäure Val60.

Die Beteiligung von vier weiteren Aminosäuren (Cys41, Ser25, Asn77 und Ser21) an der Kollagen Bindung kann anhand der Daten nicht eindeutig geklärt werden. Die Aminosäure Cys41 weist zwar eine große Änderungen der chemischen Verschiebungen und Volumina auf, aber seine Oberflächenzugänglichkeit für Kollagen ist gering. Ferner ist Cys41 in eine Disulfid-Brücke gebunden. Demnach ist eine direkte Interaktion der Seitenketten mit Kollagen unwahrscheinlich. Aufgrund der nahen räumlichen und sequentiellen Lage von Cys41 zur Bindungsfläche ist eine Beteiligung an der Bindung mit Kollagen denkbar. Cys41 schließt unmittelbar an die Bindungsfläche an, die aus Lys37, Glu39 und Tyr40 besteht. Diese Aminosäuren bilden einen an der Proteinoberfläche exponierten kurzen Loop, der die α -Helix mit B3 verbindet. Es wäre also möglich, daß die Bindung von Saratin an Kollagen Konformationsänderungen des Loops induziert, die eine direkte Interaktion von Cys41 mit Kollagen zulässt.

Auch das Amid-Proton-Signal von Ser25 erfährt im Titrationsexperiment eine signifikante Änderung der chemischen Verschiebung. Dies wäre ein Indiz dafür, daß die Aminosäure an Kollagen bindet, aber das H^N -Signal erfährt keine Volumenänderung. Ferner ragt die Seitenkette von Ser25 in der Struktur in den Bereich zwischen der α -Helix und dem β -Strang B2, und wird in dieser Position von beiden Strukturelementen so abgeschirmt, daß die Seitenkette an der Proteinoberfläche für Kollagen nicht zugänglich ist (Abbildung 53). Eine Bindung von Ser25 an Kollagen ist folglich unwahrscheinlich.

Die H^N -Signale der Aminosäuren Asn77 und Ser21 erfahren im Titrationsexperiment ebenfalls signifikante Änderungen der chemischen Verschiebungen, und ihre Seitenketten liegen für Kollagen frei zugänglich an der Proteinoberfläche (Abbildung 53). Die

Resultate der Titrationsexperimente lassen vermuten, daß Asn77 und Ser21 weitere Bindungsstellen für Kollagen darstellen. Die Ergebnisse der Saratin-Kollagen-Docking Versuche zeigen aber, daß die Saratin Moleküle immer mit der beschriebenen Orientierung an Kollagen binden. Bei den beobachteten Änderungen der Resonanzsignale der H^N -Kerne von Asn77 und Ser21 handelt es sich folglich wahrscheinlich um sekundäre Effekte, hervorgerufen durch die Interaktion von Saratin und Kollagen.

Die Titrationsexperimente und Daten zur Molekül Dynamik von Saratin zeigen eindeutig, daß der flexible C-Terminus von Saratin nicht an der Bindung Teil nimmt. So konnten keine signifikanten Änderungen der chemischen Verschiebungen und Volumina bei den Resonanzsignalen der C-terminalen Aminosäuren von komplexiertem Saratin beobachtet werden. Ferner ergab sich aus den Docking Experimenten von Saratin und Kollagen keine Beteiligung des flexiblen C-Terminus.

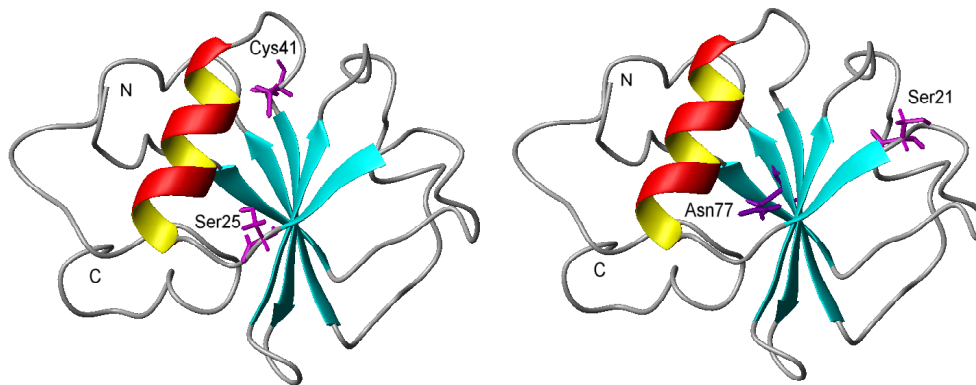


Abbildung 53 Räumliche Lage der Aminosäuren Ser25 und Cys41 (links) und Ser21 und Asn77 (rechts) in der Saratin Struktur. Die Seitenketten sind farbig hervorgehoben.

Die Titrationsexperimente von Saratin mit Kollagen zeigen ferner, daß sich das System Saratin-Kollagen auf der NMR-Zeitskala im intermediären Austausch befindet. Der intermediärer Austausch zwischen den beiden Bindungsmodi von Saratin (gebundener und freier Zustand) führt zur Linienverbreiterung und zum Verschwinden der Resonanzsignale der austauschenden Kerne von Saratin in den HSQC-Spektren. Diese Beobachtungen könnten aber auch auf die Größe des Komplexes zurückzuführen sein, da im HSQC-Experiment mit Protein, bzw. Komplex-Größe über 30 kDa aufgrund der Linienverbreiterungen der gleiche Effekt auftritt. In dem, Größen-unabhängigen, TROSY-HSQC-Experiment mit dem Saratin-Kollagen-Komplex zeigte sich, daß auch hier einige der bereits in den HSQC-Spektren an ihre Nachweisbarkeitsgrenze gestoßenen Kerne

nicht detektierbar waren. Zumindest bei diese Kernen, bzw. Aminosäuren muß man davon ausgehen, daß sie sich im intermediären Austausch befinden.

Die Diffusionsmessungen ergaben, daß freies Saratin und der Saratin-Kollagen-Komplex ein ähnliches Diffusionsverhalten aufweisen. Der Komplex diffundiert, mit einem Diffusionskoeffizienten $D=1,05 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, nur gering langsamer als Saratin, mit $D=1,12 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Eine eindeutige Interpretation dieser Ergebnisse ist schwierig. Unter der einfachen Annahme, daß der Komplex als sphärischer Körper vorliegt und entsprechend den Titrationsdaten, vermutlich drei Saratin-Moleküle an eine Tripelhelix binden, würde man erwarten, daß der Diffusionskoeffizient des Komplex um den Faktor $3^{1/3}$ (a.u.) kleiner wäre und der Komplex demnach deutlich langsamer diffundieren müßte als freies Saratin.

Eine denkbare Erklärung für das Diffusionsverhalten des Komplex könnte sein, daß die, in dieser Arbeit verwendeten Kollagen-Peptide, in Lösung als Mischung aus Mono- und Trimeren vorliegen. Ein Komplex aus Saratin und einzelsträngigem Kollagen-Peptid kann von der Form als sphärisch angesehen werden und würde, der molaren Masse entsprechend, nur gering langsamer diffundieren als freies Saratin. Die Tripelhelix ist gegenüber dem Einzelstrang allerdings energetisch begünstigt und es existiert bis dato kein Nachweis von einzelsträngigen Kollagen-Peptiden unter den verwendeten Lösungsbedingungen (pH 6,5, 298 K). Da die Einzelstränge von den Lysin-Resten Lys2 und Lys35 terminiert werden, ist es vorstellbar, daß ihre positive Partialladung, Größe der Seitenketten und ihre sequentielle Position an den Termini die Zusammenlagerung der Einzelstränge zur Tripelhelix erschweren, und dafür verantwortlich sind, daß in der Lösung neben Tripelhelices auch Einzelstränge auftreten.

Vermutlich aber sehen wir in den eindimensionalen Spektren der Diffusionsmessungen gar nicht den Komplex, sondern nur Signale von freien Saratin Molekülen. Die Resonanzlinien des Komplex könnten aufgrund seiner Größe derart verbreitert sein, daß die Signale von komplexiertem Saratin, im Spektrum nicht sichtbar wären. Dies wäre durch einen schnellen Austausch des Systems Saratin und Kollagen und eine schwache Bindung erklärbar.

Das vermutliche Auftreten von schnellem und intermediärem Austausch bei der Interaktion von Saratin und Kollagen und die Beobachtung unterschiedlicher Sättigungsverläufe im Titrationsexperiment legen nahe, daß Saratin spezifisch und unspezifisch, mit unterschiedlichen Affinitäten an Kollagen bindet. Die Titrationsdaten zeigten auch, daß die Bindung von Saratin und Kollagen keiner eindeutigen Stöchiometrie folgt. Sie lassen aber vermuten, daß bei der Interaktion von Saratin und tripelhelikalem Kollagen

eine Stöchiometrie von mindestens 2,5 : 1 vorliegt. Oberflächen Plasmon-Resonanz (SPR) Studien mit dem homotrimeren human Kollagen III und Saratin stützen diese Annahme. Sie zeigen, daß Kollagen möglicherweise mehrere Bindungsstellen für Saratin mit signifikant unterschiedlichen Affinitäten besitzt [Bar01]. Auch die Docking Experimente des Saratin-Kollagen-Komplex mit HADDOCK, nach denen Saratin, mit einer 53%igen Bevorzugung der N-terminalen Kollagen-Region, über die gesamte Tripelhelix verteilt docken kann, lassen das Vorhandensein mehrere Saratin-Bindungsstellen an der Tripelhelix vermuten. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß die Kollagen Tripelhelix durch die Bindung von mehreren Saratin Molekülen abgedeckt wird, und so die Anheftung des vWF und der Thrombozyten an Kollagen erschwert, bzw. verhindert wird (Abbildung 54).

Bis heute ist noch nicht in allen Punkten geklärt auf welche Weise die Inhibierung der vWF-induzierten und Kollagen-vermittelten Adhesion der Thrombozyten an Kollagen funktioniert. Die vermutete Existenz von mehr als einer Bindungsstelle von Kollagen für Saratin und der repetitive Aufbau der Kollagen Tripelhelix sprechen aber für das vorgestellte Modell. Weitere Studien werden klären, ob eine derartige Absättigung von exponierten Kollagen Tripelhelices strukturell und auch unter physiologischen Bedingungen nachweisbar ist.

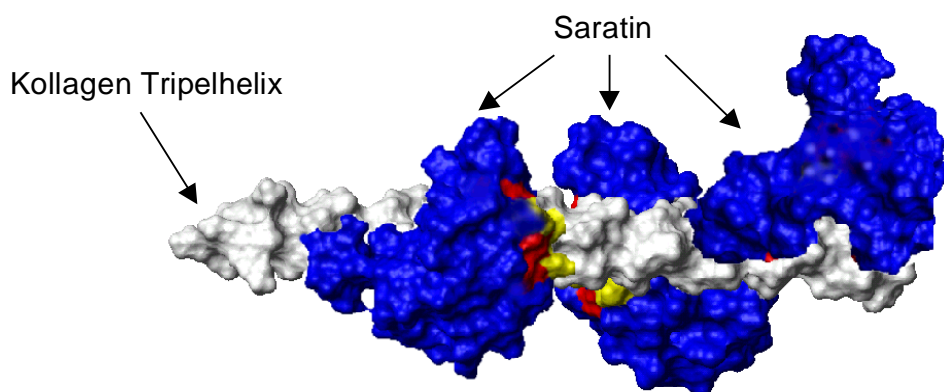


Abbildung 54 Illustration der Interaktion von Saratin und Kollagen. Mehrere Saratin Moleküle (blau) binden an die Tripelhelix (weiß) und decken so potentielle Bindungsstellen für vWF und Thrombozyten ab. Die Anheftung des vWF und der Thrombozyten an Kollagen wird erschwert, bzw. verhindert und die Thrombozyten-Aggregation wird unterbunden. Die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren von Saratin sind farbig hervorgehoben (rot: Änderungen der Kern-Resonanz-Signale induziert durch Kollagen-Bindung; gelb: Änderungen der Kern-Resonanz-Signale aufgrund direkter Bindung an Kollagen). Die einzelnen Strukturmodelle der dimeren Saratin-Kollagen-Komplexe wurden mit dem Moleküldynamik-Programm HADDOCK [Dom03] ermittelt und für das Interaktionsmodell graphisch überlagert. Die Struktur der Tripelhelix, die auch in die Komplex-Bestimmung mit HADDOCK eingegangen ist, wurde mit dem Programm The Bu Scr erstellt [Rai04].

Saratin inhibiert die Bindung von vWF an Kollagen, und somit die Aktivierung, und Aggregation von Thrombozyten, und infolge die Ausbildung von Thromben. Rekombinantes Saratin erwies sich bereits in pathophysiologischen Studien als wirkungsvoller Inhibitor der vWF-vermittelten Thrombozyten-Aggregation [Bar01]. In klinischen Studien mit Ratten konnte durch die lokale Anwendung von Saratin bei gefäßchirurgischen Eingriffen die Thrombozyten-Aggregation an der Operationsstelle signifikant reduziert und dadurch die Gefahr einer post-operativen Thrombose deutlich gesenkt werden [Cru01]. Saratin hat demzufolge ein großes therapeutisches Potential in der Prävention von Thrombozyten-Aggregation und deren Konsequenzen.

5.3 Cam-HrTH-I: Modifikation von Trp8

Das Neuropeptid Cam-HrTH-I, das aus der Stabheuschrecke *Carausius morosus* isoliert wurde, verfügt über eine seltene Modifikation. Bei diesem Protein ist die in Position 8 befindliche essentielle aromatische Aminosäure Tryptophan mit einer Hexose modifiziert [Gäd92]. 1994 publizierte Hofsteenge et al. eine Tryptophan Modifikation durch Glykosylierung bei der human RNase U_s [Hof94]. Hofsteenge wies als erster, und bis dato einziger, mit NMR-Methoden nach, daß der Aldohexopyranosyl-Rest über eine C-glykosidische Bindung an das C^{δ1}-Atom des Indolrings von Tryptophan gebunden ist. Zucker binden unterschiedlich an Aminosäure-Seitenketten von Proteinen. Sie können N-glykosidisch an die Seitenketten von Asparagin-Resten oder O-glykosidisch an Serin und Threonin binden. Die C-glykosidischen Bindung des Aldohexopyranosyl-Rests an den aromatischen Rest Trp7 der RNase U_s stellt einen neuen Bindungstyp dar.

Die Zuordnung der Resonanzsignale und die Untersuchung der Substitutionsstelle Trp8 von Cam-HrTH-I mit NMR-Methoden wurde, bis auf die Feldstärke, unter den experimentellen Bedingungen nach Hofsteenge durchgeführt.

In den 2D TOCSY-Spektren der in 95% H₂O/D₂O gelösten Probe wurden zwei Diagonalsignale des Amid-Protons H^{ε1} des Indolrings von Trp8 identifiziert. Dies, wie auch die Aufspaltung der Amid-Protonen-Resonanzsignale im TOCSY-Spektrum der in 99,9% D₂O gelösten Probe, zeigt eindeutig, daß Cam-HrTH-I in zwei Konformationen vorliegt. Die Existenz von zwei Signalen der Amid-Protonen des Indolrings zeigt aber auch, daß H^{ε1} nicht substituiert ist und folglich keine N-Glykosylierung vorliegt. Das stärkere Diagonalsignal besitzt ein Kreuzsignal H^{δ1} 8/ H^{ε1} 8, das bedeutet, daß hier Magnetisier-

ung zwischen den Kernspins der Protonen $H^{\delta 1}$ und $H^{\epsilon 1}$ transferiert wird und folglich der Kohlenstoff-Kern $C^{\delta 1}$ protoniert ist. Da alle Protonen-Signale des Indolrings detektierbar sind, handelt es sich bei diesem Spinsystem um Signale von unmodifiziertem Cam-HrTH-I-Peptid. Das schwächere Diagonalsignal von $H^{\epsilon 1}$ hat kein Kreuzsignal. Das bedeutet, daß bei diesem System kein Magnetisierungstransfer zwischen dem Amid-Proton $H^{\epsilon 1}$ und dem einzig möglichem Proton $H^{\delta 1}$ stattfindet. Demnach handelt es sich bei diesem System um die Trp8 Protonen-Signale von modifiziertem Cam-HrTH-I. Das Fehlen des Kreuzsignals $H^{\delta 1}$ 8/ $H^{\epsilon 1}$ 8, und damit des Protons $H^{\delta 1}$, in diesem System, wie auch die Nachweisbarkeit aller anderen Protonen im Indolring, belegt die Substitution von $H^{\delta 1}$ durch die Hexose. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß Cam-HrTH-I am Kohlenstoff-Kern $C^{\delta 1}$ des Tryptophan-Restes Trp8 durch die Hexose modifiziert ist. Sie belegen ferner, daß das Neuropeptid als Konformationsgemisch von modifiziertem und unmodifiziertem Peptid vorliegt. Die Zusammensetzung des Konformationsgemisches kann anhand der unterschiedliche Intensität der $H^{\epsilon 1}$ -Diagonalsignale auf 30,5% modifiziertes und 69,5% unmodifiziertes Cam-HrTH-I Peptid festgesetzt werden. Die Modifikation von Cam-HrTH-I durch eine Hexose wird anhand der NMR-Daten bestätigt. Im 2D TOCSY der in 99% D_2O gelösten Probe kommen im Bereich der Protonen-Resonanzsignale 3.9-4.4 (δ_2 /ppm) drei Spinsysteme vor, die vermutlich der Hexose zugeordnet werden können. Die chemischen Verschiebung der Protonen-Signale konnten aufgrund von fehlenden NOE-Kontakten im 2D NOESY-Spektrum nicht zugeordnet werden. Zwei der Spinsysteme, mit jeweils sechs Protonen-Resonanzsignalen (5 Kreuz- und 1 Diagonalsignal), entsprechen dem Signal-Muster der Protonen-Resonanzsignale der Hexose des Trp-Restes Trp7 der RNase U_s nach Hofsteenge überein. Das dritte Spinsystem bei 5,1 (δ_2 /ppm) besitzt allerdings nur vier Protonen-Signale. Möglicherweise sind die Signale in diesem Bereich überlagert und auch dieses System besteht aus sechs Protonen-Signalen der Hexose.

Das Auftreten von vermutlich drei Zucker-Spinsystemen im TROSY-Experiment ist überraschend. Unter der Annahme, daß es sich bei den drei beobachteten Systemen im Rahmen der Mutarotation um die α -, β - und offenkettige Aldehydform handelt, würde man nur zwei Spinsysteme erwarten, da der Anteil der offenkettigen Form gering ist. Sie ist im NMR-Spektrum nicht erkennbar. Um die Frage zu klären, ob es sich um drei Systeme der Hexose, um welche Hexose und Anomer es sich handelt, bedarf es eine vollständige Zuordnung der Kohlenstoff-Kerne und Protonen der Hexose, die, aber mit den zur Verfügung stehenden Spektren nicht aufklärbar ist. Anhand der J-Kopplungen der Kohlenstoff-Protonen der Hexose lässt sich klären, um welches Diastereomer es sich

bei der Modifikation von Cam-HrTH-I handelt [Gey03]. Weitere Untersuchungen werden zeigen, welche Hexosen den Tryptophan-Rest Trp8 modifiziert.

Grundsätzlich erhöht die Entdeckung von Hexose-modifizierten Tryptophan-Resten in einem Insekten Peptid und in einem human Enzym die Möglichkeit, daß diese Art der posttranslationalen Modifikation auf Protein und auch phylogenetischer Ebene weit verbreitet sind.

6 Zusammenfassung

Nach vaskulären Verletzungen sind Kollagen der Typen I und III dem Blut und seinen Bestandteilen exponiert. Die bei Gefäßverletzungen induzierte Hämostase führt an der Expositionsstelle zur Ausbildung von Thrombozyten reichen Thromben, die generell das Risiko von akuten thrombotischen Ereignissen, wie Embolien und Infakte, mit sich bringen. Saratin, ein rekombinantes Protein, das aus der Saliva des Blutegel *Hirudo medicinalis* isoliert wurde, greift durch Bindung an Kollagen I und III inhibierend in die Hämostase ein. Es reduziert bei Ratten in vivo bei lokaler Anwendung auf geöffnete Carotis Arterien die Aggregation von Thrombozyten, und damit das Thrombose Risiko [Van03]. Derartige Resultate lassen auf das großes therapeutisches Potential von Saratin, besonders bei invasiven Gefäßeingriffen, schließen. Die Wirkung von Saratin ist weitgehend bekannt und weiterhin Gegenstand von Untersuchungen, von dem Wirkungsmechanismus aber ist nur wenig erschlossen. Einen Zugang zu dem Wirkungsmechanismus erhalten wir über die dreidimensionale Struktur von Saratin, die die Funktion von Proteinen determiniert.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des rekombinanten Proteins Saratin mit mehrdimensionaler Lösungs-NMR-Spektroskopie.

Unter Verwendung von 2D ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren und 3D ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC-, HNCA-, CBCANH- und CBCA(CO)NH-Spektren konnten die Resonanzfrequenzen der Kerne des Proteinrückgrats vollständig sequentiell zugeordnet werden. Die Zuordnung der Resonanzfrequenz der Seitenketten-Kerne erfolgte mit 3D ^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC-, ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC-, HCCH-TOCSY-Spektren und 2D NOESY- und ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren. Mit einer Zuordnung der Resonanzfrequenzen von 90,3% der Proteinkerne von Saratin liegen wir im oberen Bereich der Vollständigkeit für die Zuordnung ähnliche großer Proteine.

Als Struktur einschränkende Parameter wurden experimentell 1338 NOEs, 16 Wasserstoff-Brücken und residuale dipolare Kopplungen für 40 Aminosäuren bestimmt. Ferner konnten 96 dihedrale ϕ und ψ Winkel mit dem Programm TALOS vorhergesagt werden.

Die Bestimmung und Analyse der T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten der ^{15}N -Kerne des Proteinrückgrats und der heteronuklearen ^1H - ^{15}N -NOEs zeigt, daß der C-Terminus von Saratin (Glu83 bis Asp103) flexibel ist. Zu erwartender Weise sind im unstrukturiertem C-terminalen Bereich des Proteins nur wenige NOE-Informationen zugänglich.

Unter Verwendung von NOE-Abstandseinschränkungen, Wasserstoff-Brücken, residualer dipolarer Kopplungen und ϕ und ψ Winkel-Einschränkungen konnte mit dem Programm CNS die Lösungsstruktur von Saratin gewonnen werden. Sie wurde nach der Methode von Linge und Sponk verfeinert. Bis auf den flexiblen C-Terminus weist Saratin eine wohl definierte Faltung auf. Sie wird von einem regelmäßigem β -Faltblatt, einer α -Helix und zwei sich überkreuzenden Loops bestimmt. Das β -Faltblatt baut sich aus fünf antiparallel orientierten β -Strängen auf und bildet den zentralen Bereich des Proteins. Es wird einerseits durch die α -Helix und andererseits durch zwei sich kreuzenden Loops abgeschirmt. Die Tertiärstruktur wird durch drei Disulfid-Brücken stabilisiert, die sich in der Analyse der chemischen Verschiebungen durch charakteristische Werte der C β -Kerne der Cysteine hervorheben.

Die Untersuchung der Temperaturempfindlichkeit von Saratin mittels 2D ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren zeigte, daß Saratin bei einer Temperatur von 335 K denaturiert und über 340 K vermutlich irreversibel geschädigt wird und nicht mehr in seine native Konformation zurück faltet.

Die Lösungsstruktur von Saratin ähnelt im Kernbereich der Kristallstruktur des rekombinanten Proteins LAPP (*Leech Platelet Protein*), das aus der Saliva des Blutegels *Haementeria officinalis* isoliert wurde. Saratin und LAPP weisen strukturelle, funktionelle und, mit einer Sequenzübereinstimmung von 46%, sequentielle Ähnlichkeiten auf, so daß man davon ausgehen muß, daß es um homologe Proteine handelt.

Die Untersuchung des Saratin-Kollagen-Komplex mit 2D ^1H - ^{15}N HSQC- und ^1H - ^{15}N TROSY-Spektren ergab, daß Saratin eine spezifische Bindungsstelle für Kollagen besitzt und das System Saratin-Kollagen sich auf der NMR-Zeitskala im intermediären Austausch befindet. An der Bindung sind die Aminosäuren Tyr8, Lys37, Glu39, Tyr40, Val60, Leu79 und möglicherweise Cys41 beteiligt.

Die identifizierte Bindungsstelle von Saratin diente neben der, mittels dem Programm The BuScr modellierten, Kollagen-Struktur und der Lösungsstruktur von Saratin als Datenbasis für die Komplex-Struktur Untersuchungen mit dem Programm HADDOCK. Es zeigte sich, daß Saratin die Kollagen Tripelhelix spangenartig umfaßt. Dabei bildet der Rand des β -Faltblatts die Scherachse der Spange (Thr8 und Leu79), das N-terminalen Ende der α -Helix (Lys37) und der anschließende Loop (Glu39, Tyr40) einen

Arm und der Loop L2 (Val60) den zweiten Arm der Spange. Die Cluster-Analyse der mittels HADDOCK generierten Komplex-Strukturen, ergab, daß Saratin über die ganze Kollagen Tripelhelix verteilt dockt, wobei möglicherweise die N-terminale Region der Tripelhelix bevorzugt ist.

Anhand der Ergebnisse konnten wir ein Modell der Interaktion von Saratin und Kollagen bei der Hämostase erstellen, nachdem Saratin wahrscheinlich mit dem vWF und den Thrombozyten um die Kollagen Bindungsstellen konkurriert. Vermutlich binden, entsprechend der an der Tripelhelix zur Verfügung stehende Bindungsfläche, mehrere Saratin Moleküle an die Tripelhelix und verdecken so die möglichen Bindungsstellen an der Tripelhelix für den vW-Faktor und die Thrombozyten. Dies würde zu einer Reduktion der Adhesion und Aggregation der Thrombozyten und infolge zu einer Verminderung des Thrombose Risikos führen.

Die human RNase U_s ist am Tryptophan-Rest Trp7 durch eine Hexose, gebunden an den Kohlenstoff-Kern C^{δ1} des Indolrings, modifiziert. Diese Art der Modifikation wurde bis dato nur der RNase U_s beschrieben. Es wird vermutet, daß der Tryptophan-Rest Trp8 des Neuropeptids Cam-HrTH-I der Stabheuschrecke *Carausius morosus* ebenfalls durch eine Hexose modifiziert ist. Ein weiterer Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung dieser Trp-Modifikation von Cam-HrTH-I mittels NMR-Methoden.

Die Zuordnung der Resonanzfrequenzen von Cam-HrTH-I erfolgte mit 2D TOCSY-, 2D NOESY- und ¹³C-HSQC-Spektren. Insgesamt konnten 68% aller Kern-Typen zugeordnet werden. Die Zuordnung der Protonen von Trp8 erfolgte zu 100%.

Anhand von 2D TOCSY-, 2D NOESY- und ¹³C-HSQC-Spektren können wir zeigen, daß Trp8 am Kohlenstoff-Kern C^{δ1} modifiziert ist und N-glykosidische Bindung ausgeschlossen werden kann. Das Vorhandensein des typischen Signalmuster von Hexosen im TOCSY-Spektrum (99% D₂O) belegt die Modifikation durch eine Hexose. Anhand der Spektren kann nicht geklärt werden, um welche Hexose und Anomer es sich dabei handelt. Die Existenz von zwei Diagonalsignalen der Amid-Protonen H^{ε1} des Indolrings im TOCSY-Spektrum (95% H₂O/D₂O) zeigt, daß Cam-HrTH-I in zwei Formen, 30,5% modifiziert und 69,5% unmodifiziert, vorliegt. Anhand der Daten konnten wir zeigen, daß es bei der Tryptophan-Modifikation des Insekten-Peptids Cam-HrTH-I um den selben Modifikationstyp wie bei der human RNase U_s handelt. Diese Tryptophan-Modifikation konnte nun, neben dem human Protein, auch bei einem Insekten-Peptid nachgewiesen werden.

Verzeichnis der Abkürzungen

AS	Aminosäure
ASS	AcetylSalicylSäure
B ₀	statisches, magnetisches Hauptfeld
Cam-HrTH-I	<i>Carausius morosus</i> -HyperThrehalosaemic Hormone
CNS	Crystallography & NMR System
CS	chemische Verschiebung
CSA	Anisotropie der chemischen Verschiebung
CSI	Chemical Shift Index
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DHPC	Dihexanoyl-Phosphatidylcholin
DMPC	Dimyristoyl- Phosphatidylcholin
DSS	2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonsäure
HADDOCK	High Ambiguity Driven DOCKing
hetNOE	heteronuklearer NOE
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kDa	Kilodalton
LAPP	Leech Anti Platelet Protein
MHz	10 ⁶ Hertz
Mr	relatives Molekülgewicht
NMR	Nuklear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
ppm	parts per million
R	Rhombizität
R ₁	logitudinale Relaxationsrate
R ₂	transversale Relaxationsrate
T ₁	longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit
T ₂	transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit
TALOS	Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity
The BuScr	Tripel-HElical collagen Building Script
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TROSY	Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy
vWF	von Willebrandt Faktor

Literaturverzeichnis

- [Alt95] Altieri, A. S., Hinton, D. P., Byrd, R. A. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7566-7 90
- [Bar01] Barnes, C. S., Krafft, B., Ferch, M., Hofmann, U. R., Papendiek, A., Dahlems, U., Gellissen, G., Hoylaerts, M. F. (2001) *Semin Thromb Hemost* **27** (4), 337 - 348 21
- [Bel95] Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., Berman, H. M. (1995) *Science* **267**, 5195-258 44
- [Ber01] Berisio, R., Vitagliano, L., Mazzarella, L., Zagari, A. (2002) *Protein Science* **11**, 262-7044
- [Bru00] Brunner, E., Ogle, J., Wenzler, M., Kalbitzer, H. R. (2000) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**, 694-698 30
- [Brü98] Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nigels, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L. (1998) *Acta Cryst.* **D54**, 905-21 33, 68
- [Clo98] Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Bax, A. (1998) *J. Magn. Reson.* **133**, 216-221 30, 68
- [Cor99] Cordier, F., Grzesiek, S. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1601 -2 28
- [Cor99b] Cornilescu, G., Delaglio, F., Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR* **13**, 289-302 31, 66
- [Cru01] Cruz, C. P., Eidt, J., Drouilhet, J., Brown, A. T., Wang, Y. F., Barnes, C. S., Moursi, M. M. (2001) *J. Vasc. Surg.* **34**, 724-9 15
- [Dom03] Dominguez, C., Boelens, R., Bovin, A. M. J. J. (2003) *J. am. chem. soc.* **125**, 1731-37 44
- [Far94] 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. und Kay, L. E. (1994) *Biochem.*, **33**, 5984 - 6003 32
- [Fen98] Feng, W., Tejero R., Zimmerman, D. E., Inouye, M., Montelione, G. T. (1998) *Biochem.*, **37**, 10881 - 10896 33
- [Fri88] Fritz, H., Dietze, G. (1988) *International Symposium* 90
- [Fur00] Furmanek, A., Hofsteenge, J. (2000) *Acta Biochimica Polonica* , **47**, 781-9 9
- [Fus97] Fushman, D., Cahill, S., Cowburn, D. (1997) *J. Mol. Biol.* **266**, 173-194 33
- [Gäd92] Gäde, G., Kellner, R., Rinehart, K. L., Proefke, R. (1992). *Biochemical and Biophysical research communications* **189** (3), 1303-1309 48
- [Gey03] Geyer, M., Wilde, C., Selzer, J., Aktories, K., Kalbitzer, H. R. 2003 *Biochemistry* **42**, 11951-9 115
- [Gro04] Gronwald, W., Kalbitzer, H.R. (2004) *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **44**, 1-2, 33-96 22, 48
- [Hof94] Hofsteenge, J., Müller, D. R., de Beer, T., Löffler, T., Richter, W. J., Vliegenthart, J. F. G. (1994) *Biochemistry* **33**, 13524-30 48, 113
- [Hoo96] Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., Abola, E. E. (1996) *Nature*, **381**, 272 36
- [Hui01] Huizinga, E. G., Schouten, A., Connolly, T. M., Kroon, J., Sixma, J. J., Gros, P. (2001) *Acta. Cryst.* **D57**, 1071-78 75
- [Hyb92] Hyberts, S. G. et al. (1992) *Protein Sci.* **1** (6), 736-51 75
- [Kan01] Kany, H. (2001) Dissertation, Universität Regensburg 43

[Köl00]	Köllisch, G. V., Lorenz, M. W., Kellner, R., Verhaert, P. D., Hoffmann, K. H. (2000) <i>Eur. J. Biochem.</i> 267 , 5502-8.....	17
[Kor96]	Koradi, R., Billeter, M., Wuthrich, K. (1996) <i>J. Mol. Graph.</i> 14 (1), 51-5, 29-32	70
[Kui04]	Kuijpers, M. J. E., Schulte, V., Oury, C., Lindhout, T., Broers, J., Hoylaerts, M. F., Nieswandt, B., Heemskerk, J. W. M. (2004) <i>J. Physiol.</i> 558.2 , 403-15.....	12
[Las93]	Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993) <i>J. Appl. Cryst.</i> , 26 , 283-291	36
[Lin03]	Linge, J. P., Williams, M. A., Spronk, C. A. E. M., Bonvin, A. M. J. J., Nilges, M. (2003) <i>Proteins</i> , 50 , 496-506	36
[Lin99]	Linge, J. P., Nilges, M. (1999) <i>J. Biomol. NMR</i> , 13 , 51-59	35
[Löf98]	Löffler, G., Petrides, P. E. (1998) <i>Springer Verlag</i> 6. Auflage, 922.....	14
[Lon93]	Long, C. G., Braswell, E., Zhu, D., Apigo, J., Baum, J., Brodsky, B. (1993) <i>Biochemistry</i> 32 , 11688-11695.....	92
[Los98]	Losonczi, J. A., Prestegard, J. H. (1998) <i>J. Biol. NMR</i> 12 , 447-451	30
[Nab04]	Nabuurs, S. B., Nederveen, A. J., Vranken, W., Doreleijers, J. F., Bonvin, A. M. J. J., Vuister, G. W., Vriend, G., Spronk, C. A. E. M. (2004) <i>Proteins</i> , 55 , 483-486	36
[Nei95]	Neidig, K.-P., Geyer M., Görler, A., Antz, C., Saffrich, R., Beneike, W., Kalbitzer, H.-R. (1995) <i>J. Biomol. NMR</i> , 6 , 255-270	24, 50
[Ols97]	Olsen, B. R. (1997) <i>J. Biochem. Cell. Biol.</i> 29 , 555-8	11
[Ott98]	Ottinger, M., Bax, A. (1998) <i>J. Biol. NMR.</i> 12 , 361-372.....	30
[Per00]	Riek, R., Pervushin, K., Wuthrich, K. (2000) <i>Trends Biochem. Sci.</i> (10), 462-8.....	19
[Rai04]	Rainey, J. K., Goh, M. C. (2004) <i>Bioinformatics</i> 20 , 2458-59	44
[Ram68]	Ramachandran, G. N., Sasisekharan, V. (1968) <i>Adv. Protein Chem.</i> 23 , 283-437	71
[Rap99]	Papp, A., Ermolaev, K., Fung, B. M. (1999) <i>J. Phys. Chem. B</i> 103 , 1705-1711	30
[Sad98]	Sadler, J. E. (1998) <i>Annu. Rev. Biochem.</i> 67 , 395-424	7, 12
[Sal98]	Salzmann, M., Pervushin K., Wider, G., Senn, H., Wüthrich, K. (1998) <i>Biophysics</i> 95 (23), 13585-13590	40
[Sal99]	Salzmann, M., Wider, G., Pervushin, K., Wuthrich, K. (1999) <i>J. Biomol. NMR</i> 15 , 181-440	
[San92]	Sanders, C. R., Schwonek, J. P., (1992) <i>Biochemistry</i> 34 , 8898-8905	30
[Six97]	Sixma, J. J., van Zanten, G. H., Huizinga, E. G., van der Plas, R. M., Verkley, M., Wu, Y. P., Gros, P., de Groot, P. G. (1997) <i>Thromb. Haemost.</i> 78 , 434-438	7
[Ste01]	Steiner, G. (2001) Dissertation, Universität Regensburg.....	34, 68
[Ste65]	Stejskal, E. O., Tanner, J. E. (1965) <i>J. chem. Phys.</i> 42 , 288-292	41
[Str96]	Stryer, L. (1996) <i>Spektrum</i> 4. Aufl.,	11
[Van03]	Vanhoorelbeke, K., Deckmyn, H. (2003) <i>Grugs of the future</i> 28(1) , 61-7.....	15
[Vil04]	Vilahur, G., Duran, X., Juan-Babot, O., Casani, L., Badimon, L. (2004) <i>Thrombosis and Haemostasis</i> 92/1 , 191-200.....	8
[Wan99]	Wang, Y.-X., Jacob, J., Cordier, F., Wingfield, P., Stahl, S. J., Lee-Huang, S., Torchia, D., Grzesiek, S., Bax, A. (1999) <i>J. Biomol. NMR</i> , 14 , 181-184	28
[Wis94]	Wishart, D. S., Sykes, B. D. (1994) <i>J. Biomol. NMR</i> , 4 , 171-180.....	53

[Wis94b]	Wishart, D. S., Boyko, R. F., Sykes, B. D. (1994) <i>Comput Appl Biosci.</i> 10 (6), 687-8..75	
[Wis95]	Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S., Sykes, B. D. (1995) <i>J. Biomol. NMR</i> , 5 , 67-81	53
[Xia02]	Xia, B., Tsui, V., Case, D. A., Dyso, H. J., Wright, P. E. (2002) <i>J. Biomol. NMR</i> , 22 , 317-331	35
[Zee04]	Zeeb, M., Lipps, G., Lilie, H., Balbach, J. (2004) <i>J. Mol. Biol.</i> 336 (1), 227-240	36
[Zwe00]	Zweckstetter, M., Bax, A. (2000) <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 122 , 3791-3792.....	30

Anhang

(1) Zuordnung der Resonanzen von Saratin

Chemische Verschiebungen von Saratin [ppm]																								
Glu 1	H		HA		HB3		HG3																	
					HB2		HG2																	
	N		CA	55,51	C																			
					CB	30,22	CG		CD															
Glu 2	H	8,81	HA	4,29	HB3	1,97	HG3	2,47																
					HB2	2,00	HG2	2,40																
	N	123,31	CA	56,12	C																			
					CB	30,33	CG	36,00	CD															
Arg 3	H	8,49	HA	4,41	HB3	1,88	HG3	1,65	HD3	3,25	HE	8,87	QH1											
					HB2	1,84	HG2	1,58	HD2	3,13			QH2											
	N	122,99	CA	55,23	C	176,36					CZ	160,30	NH1											
					CB	31,20	CG	26,47	CD	42,48	NE	85,41	NH2											
Glu 4	H	8,68	HA	4,21	HB3	2,04	HG3	2,20																
					HB2	1,71	HG2	2,21																
	N	121,06	CA	56,46	C	174,36																		
					CB	31,31	CG	36,67	CD															
Asp 5	H	8,73	HA	4,14	HB3	2,14																		
					HB2	1,65																		
	N	116,56	CA	52,43	C	174,31																		
					CB	40,05	CG																	
Cys 6	H	7,54	HA	4,74	HB3	3,34																		
					HB2	2,70																		
	N	119,45	CA	57,56	C	171,85																		
					CB	46,83																		
Trp 7	H	8,11	HA	5,19	HB3	3,12			HD1	6,96	HE1	11,68												
					HB2	2,77	HZ2	6,95	HH2	7,55	HZ3	7,54	HE3	7,03										
	N	118,81	CA	56,67	C	176,68	CD1	126,35	CD2	127,00	NE1	132,96	CE2	135,01										
				CB	33,39	CG		CZ2		CH2		CZ3		CE3	122,20									
Thr 8	H	9,42	HA	4,83	HB	4,02	MG	1,34																
	N	118,17	CA	60,77	C	174,13																		
					CB	71,53	CG2	20,92																
Phe 9	H	8,93	HA	4,94	HB3	3,33			QD	7,04	QE	6,92	HZ	6,94										
					HB2	2,94																		
	N	129,09	CA	58,44	C	174,25																		
					CB	39,40	CG		CD1/2	134,17	CE1/2		CZ											
Tyr 10	H	8,87	HA	4,50	HB3	2,79			QD	7,01	QE	6,64												
					HB2	2,44																		
	N	129,41	CA	58,72	C	174,10																		
					CB	41,91	CG		CD1/2	131,65	CE1/2	116,68	CZ											
Ala 11	H	6,91	HA	4,13	QB	1,18																		
	N	115,60	CA	51,68	C	175,13																		
					CB	22,24																		
Asn 12	H	8,60	HA	5,86	HB3	3,62			HD21	7,51														
					HB2	2,70			HD22	8,28														
	N	119,13	CA	53,73	C	174,57																		
					CB	38,96	CG	179,06	ND2	110,43														
Arg 13	H	7,12	HA	5,21	HB3	2,70	HG3	1,82	HD3	3,35	HE	10,80	QH1											
					HB2	1,76	HG2	1,63	HD2	2,80			QH2											
	N	120,42	CA	54,82	C	172,51					CZ	160,55	NH1											
					CB	36,12	CG	26,47	CD	43,99	NE	84,56	NH2											
Lys 14	H	8,58	HA	4,15	HB3	0,35	HG3	0,69	HD3	0,96	HE3	2,44	QZ											
					HB2	0,10	HG2	-0,02	HD2	0,88	HE2	2,38												
	N	111,75	CA	52,91	C																			
					CB	34,81	CG	22,66	CD	29,17	CE	41,97	NZ											
Tyr 15	H	4,44	HA	4,70	HB3	1,36			QD	5,49	QE	6,84												
					HB2	0,97																		
	N	118,81	CA	54,89	C	176,67																		
					CB	40,93	CG		CD1/2	132,96	CE1/2	118,07	CZ											
Thr 16	H	7,81	HA	3,35	HB	4,03	MG	0,83																
	N	113,35	CA	63,77	C	174,09																		
					CB	68,03	CG2	21,90																
Asp 17	H	5,68	HA	4,99	HB3	2,84																		
					HB2	2,13																		
	N	119,45	CA	51,82	C	175,83																		
					CB	41,36	CG	180,38																

Phe 18	H	8,03	HA	4,36	HB3	2,87	QD 6,02 QE 6,01 HZ 5,78									
					HB2	2,64										
	N	120,42	CA	59,95	C	178,02										
					CB	39,29	CG		CD1/2	132,26	CE1/2	132,26	CZ			
Asp 19	H	8,35	HA	4,43	HB3	2,79										
					HB2	2,72										
	N	115,28	CA	57,08	C	178,06										
					CB	40,82	CG									
Lys 20	H	7,71	HA	4,30	HB3	2,06	HG3	1,49	HD3	1,75	HE3	3,04	QZ			
					HB2	1,91	HG2	1,49	HD2	1,75	HE2	3,04				
	N	116,56	CA	58,58	C	179,10										
					CB	33,06	CG	24,68	CD	28,72	CE	42,06	NZ			
Ser 21	H	7,53	HA	4,56	HB3	3,83										
					HB2	3,67										
	N	111,42	CA	59,40	C	172,06										
					CB	65,41										
Phe 22	H	8,32	HA	5,29	HB3	3,57	QD 7,19 QE 6,67 HZ 6,88									
					HB2	3,04										
	N	117,53	CA	55,85	C	175,38										
					CB	41,15	CG		CD1/2	130,63	CE1/2	130,37	CZ			
Lys 23	H	8,28	HA	4,51	HB3	1,61	HG3	1,38	HD3	1,77	HE3	2,97	QZ			
					HB2	0,85	HG2	1,38	HD2	1,77	HE2	3,04				
	N	120,42	CA	55,03	C	173,84										
					CB	35,24	CG	26,03	CD	29,10	CE	42,20	NZ			
Lys 24	H	7,95	HA	5,34	HB3	1,58	HG3	1,05	HD3	1,44	HE3	2,82	QZ			
					HB2	1,37	HG2	0,68	HD2	1,43	HE2	2,63				
	N	118,49	CA	54,14	C	177,33										
					CB	36,77	CG	23,88	CD	29,39	CE	42,01	NZ			
Ser 25	H	8,79	HA	4,66	HB3	3,94										
					HB2	3,86										
	N	118,17	CA	56,67	C	173,61										
					CB	64,42										
Ser 26	H	8,23	HA	4,84	HB3	4,03										
					HB2	4,03										
	N	115,28	CA	58,31	C	173,01										
					CB	63,99										
Asp 27	H	7,80	HA	4,75	HB3	2,68										
					HB2	2,47										
	N	120,74	CA	53,18	C	175,52										
					CB	43,77	CG	180,24								
Leu 28	H	8,64	HA	4,35	HB3	1,61	HG	1,22	MD1	0,68	MD2	0,66				
					HB2	1,35										
	N	128,45	CA	57,76	C	178,39										
					CB	41,47	CG	26,55	CD1	24,20	CD2	23,60				
Asp 29	H	8,09	HA	4,36	HB3	2,66										
					HB2	2,56										
	N	116,88	CA	57,62	C	178,49										
					CB	40,93	CG	180,60								
Glu 30	H	7,82	HA	4,02	HB3	2,38	HG3	2,27								
					HB2	2,13	HG2	2,27								
	N	119,78	CA	59,13	C	177,98										
					CB	28,90	CG	36,25	CD							
Cys 31	H	8,28	HA	3,53	HB3	3,40										
					HB2	3,13										
	N	117,21	CA	61,72	C	175,69										
					CB	45,63										
Lys 32	H	7,90	HA	3,37	HB3	1,77	HG3	0,87	HD3	1,10	HE3	1,90	QZ			
					HB2	1,56	HG2	-0,98	HD2	0,63	HE2	1,84				
	N	118,17	CA	60,42	C	180,72										
					CB	32,95	CG	25,35	CD	29,84	CE	41,52	NZ			
Lys 33	H	8,29	HA	3,88	HB3	1,82	HG3	1,59	HD3	1,59	HE3	2,86	QZ			
					HB2	1,82	HG2	1,38	HD2	1,59	HE2	2,86				
	N	117,21	CA	59,74	C	180,42										
					CB	32,51	CG	25,65	CD	29,17	CE	42,05	NZ			
Thr 34	H	8,29	HA	3,78	HB3	3,46	MG	1,00								
	N	114,96	CA	66,50	C	178,27										
					CB	67,81	CG2	21,31								
Cys 35	H	8,39	HA	4,15	HB3	3,15										
					HB2	3,12										
	N	124,27	CA	58,44	C	176,66										
					CB	39,62										

Phe 36	H	8,07	HA	4,32	HB3	3,28			QD	7,22	QE	7,33	HZ	7,20
					HB2	3,19								
	N	116,24	CA	60,49	C	175,62								
					CB	39,62	CG		CD1/2	131,34	CE1/2	131,48	CZ	
Lys 37	H	7,06	HA	4,37	HB3	2,08	HG3	1,64	HD3	1,72	HE3	3,01	QZ	
					HB2	1,86	HG2	1,64	HD2	1,72	HE2	3,01		
	N	113,03	CA	54,96	C	176,02								
					CB	32,95	CG	24,40	CD	28,81	CE	41,94	NZ	
Thr 38	H	7,89	HA	4,31	HB	4,27	MG	1,22						
	N	120,10	CA	62,95	C	173,69								
					CB	70,32	CG2	21,24						
Glu 39	H	8,79	HA	3,68	HB3	1,71	HG3	1,71						
					HB2	1,47	HG2	1,35						
	N	131,02	CA	58,58	C	176,45								
					CB	29,01	CG	35,00	CD					
Tyr 40	H	8,29	HA	4,21	HB3	3,14			QD	7,10	QE	6,83		
					HB2	3,00								
	N	114,32	CA	60,36	C	176,52								
					CB	37,43	CG		CD1/2	131,65	CE1/2	118,31	CZ	
Cys 41	H	8,04	HA	4,33	HB3	4,17								
					HB2	3,49								
	N	121,38	CA	59,26	C	175,10								
					CB	43,77								
Tyr 42	H	9,88	HA	4,92	HB3	3,46			QD	7,40	QE	6,67		
					HB2	3,14								
	N	125,88	CA	58,79	C	171,11								
					CB	38,96	CG		CD1/2		CE1/2		CZ	
Ile 43	H	8,15	HA	5,02	HB	1,48	HG11	0,31	MG	0,44	MD	0,74		
							HG12	0,23						
	N	121,38	CA	60,56	C	175,27								
					CB	41,91	CG1	25,70	CG2	17,72	CD1	14,35		
Val 44	H	8,80	HA	5,39	HB	1,38	MG1	0,63						
							MG2	0,63						
	N	121,06	CA	60,08	C	177,53								
					CB	35,68	CG1	23,78	CG2	21,98				
Phe 45	H	10,04	HA	6,27	HB3	3,51			QD	7,67	QE	7,19	HZ	7,32
					HB2	3,13								
	N	127,48	CA	55,98	C	176,34								
					CB	43,77	CG		CD1/2		CE1/2	130,66	CZ	
Glu 46	H	9,45	HA	4,76	HB3	2,42	HG3	1,99						
					HB2	1,58	HG2	1,79						
	N	122,02	CA	54,96	C	174,47								
					CB	32,51	CG	36,50	CD					
Asp 47	H	8,82	HA	3,60	HB3	2,82								
					HB2	2,25								
	N	124,91	CA	51,89	C	178,08								
					CB	41,15	CG	180,06						
Thr 48	H	8,37	HA	4,00	HB	4,29	MG	1,20						
	N	115,28	CA	63,98	C	175,70								
					CB	68,90	CG2	20,95						
Val 49	H	7,97	HA	3,88	HB	1,96	MG1	0,94						
							MG2	0,87						
	N	122,02	CA	64,73	C	177,44								
					CB	32,40	CG1	21,76	CG2	20,41				
Asn 50	H	7,63	HA	4,52	HB3	2,63			HD21	7,00				
					HB2	2,25			HD22	8,99				
	N	115,60	CA	53,39	C	174,26								
					CB	38,96	CG	177,04	ND2	118,25				
Lys 51	H	7,83	HA	3,88	HB3	2,06	HG3	1,31	HD3	1,55	HE3	3,00	QZ	
					HB2	1,85	HG2	1,19	HD2	1,59	HE2	3,00		
	N	116,56	CA	56,46	C	175,11								
					CB	27,92	CG	24,00	CD	28,50	CE	42,19	NZ	
Glu 52	H	7,17	HA	4,74	HB3	1,74	HG3	2,21						
					HB2	1,70	HG2	2,04						
	N	114,64	CA	54,00	C	174,13								
					CB	33,82	CG	36,48	CD					
Cys 53	H	8,87	HA	5,78	HB3	3,18								
					HB2	2,89								
	N	116,88	CA	52,50	C	170,74								
					CB	46,72								

Tyr 54	H	9,23	HA	5,76	HB3	2,52	QD 6,34 QE 6,48							
					HB2	2,24								
	N	117,53	CA	55,71	C	175,59								
					CB	43,66	CG	174,59	CD1/2	132,61	CE1/2		CZ	
Tyr 55	H	8,98	HA	6,56	HB3	3,70	QD 6,93 QE 6,39							
					HB2	2,81								
	N	119,45	CA	54,35	C	174,83								
					CB	40,60	CG		CD1/2		CE1/2	116,28	CZ	
Asn 56	H	8,58	HA	3,83	HB3	2,08	HD21 7,04							
					HB2	1,85	HD22 8,05							
	N	121,38	CA	56,12	C	173,69								
					CB	39,07	CG		ND2	115,12				
Val 57	H	7,74	HA	4,78	HB3	2,57	HG3	0,85						
					HB2		HG2	0,51						
	N	106,29	CA	59,74	C	175,79								
					CB	31,96	CG	22,54	CD	17,55				
Val 58	H	6,84	HA	4,42	HB	2,05	MG1	0,90						
							MG2	0,74						
	N	113,03	CA	57,56	C	173,49								
					CB	34,37	CG1	21,20	CG2	17,49				
Asp 59	H	7,76	HA	4,11	HB3	2,28								
					HB2	1,84								
	N	120,74	CA	54,28	C	178,05								
					CB	42,02	CG	179,43						
Gly 60	H	9,30	HA3	4,31										
			HA2	3,82										
	N	113,35	CA	47,65	C	177,02								
Glu 61	H	8,74	HA	4,17	HB3	2,04	HG3	2,38						
					HB2	1,91	HG2	2,23						
	N	119,78	CA	58,03	C	178,10								
					CB	29,23	CG	36,28	CD					
Glu 62	H	8,30	HA	4,28	HB3	2,20	HG3	2,26						
					HB2	1,97	HG2	2,26						
	N	115,92	CA	56,33	C	177,77								
					CB	29,67	CG	36,58	CD					
Leu 63	H	7,42	HA	4,37	HB3	2,18	HG	1,74	MD1	0,87	MD2	0,44		
					HB2	1,31								
	N	119,45	CA	54,41	C	176,00								
					CB	41,04	CG	26,47	CD1	26,03	CD2	22,43		
Asp 64	H	8,42	HA	4,87	HB3	2,80								
					HB2	2,62								
	N	122,99	CA	52,91	C	178,51								
					CB	41,91	CG							
Gln 65	H	9,34	HA	4,29	HB3	2,25	HG3	2,53	HE22 6,74					
					HB2	2,12	HG2	2,57	HE21 7,84					
	N	125,88	CA	58,79	C	178,67								
					CB	28,47	CG	33,66	CD	179,90	NE2	113,87		
Glu 66	H	8,87	HA	4,30	HB3	2,14	HG3	2,37						
					HB2	2,02	HG2	2,25						
	N	116,24	CA	57,42	C	177,67								
					CB	29,12	CG	36,35	CD					
Lys 67	H	7,90	HA	3,93	HB3	1,47	HG3	1,22	HD3	1,45	HE3	2,90	QZ	
					HB2	1,14	HG2	0,89	HD2	1,19	HE2	2,85		
	N	117,53	CA	56,53	C	174,41								
					CB	31,96	CG	26,54	CD	29,15	CE	42,12	NZ	
Phe 68	H	7,05	HA	5,14	HB3	3,32	QD 7,57 QE 7,33 HZ 7,19							
					HB2	2,51								
	N	118,49	CA	57,21	C	175,84								
					CB	39,29	CG		CD1/2		CE1/2	131,44	CZ	
Val 69	H	8,54	HA	4,64	HB	1,85	MG1	0,68						
							MG2	0,48						
	N	118,49	CA	58,72	C	174,86								
					CB	35,46	CG1	20,64	CG2	19,65				
Val 70	H	8,42	HA	4,14	HB	1,99	MG1	1,11						
							MG2	1,05						
	N	122,99	CA	64,04	C	176,63								
					CB	31,96	CG1	20,77	CG2	20,35				
Asp 71	H	7,97	HA	4,50	HB3	2,60								
					HB2	2,37								
	N	125,24	CA	55,10	C	176,06								
					CB	43,88	CG	179,56						

Glu 72	H	9,08	HA	4,13	HB3	2,15	HG3	2,34										
					HB2	2,04	HG2	2,27										
	N	123,95	CA	58,79	C	176,60												
					CB	29,45	CG	35,45	CD									
Asn 73	H	9,24	HA	4,72	HB3	3,02							HD21	7,04				
					HB2	2,88							HD22	8,06				
	N	115,92	CA	53,73	C	174,56												
					CB	39,29	CG	177,27	ND2	115,12								
Phe 74	H	8,32	HA	6,21	HB3	3,45							QD	7,20	QE	7,29	HZ	7,43
					HB2	2,95												
	N	122,67	CA	55,98	C	177,32												
					CB	45,41	CG		CD1/2	131,74	CE1/2	131,74	CZ					
Thr 75	H	9,35	HA	5,13	HB	4,17	MG	1,32										
	N	106,93	CA	60,70	C	171,87												
					CB	71,20	CG2	21,62										
Glu 76	H	8,60	HA	4,36	HB3	2,20	HG3	2,68										
					HB2	2,20	HG2	2,54										
	N	125,88	CA	55,98	C	174,68												
					CB	32,40	CG	33,32	CD									
Asn 77	H	8,21	HA	5,81	HB3	2,94							HD21	7,04				
					HB2	2,53							HD22	7,76				
	N	124,59	CA	52,09	C	173,08												
					CB	43,11	CG	177,05	ND2	113,87								
Tyr 78	H	9,19	HA	5,78	HB3	3,21							QD	7,11	QE	6,46		
					HB2	2,76												
	N	119,78	CA	55,71	C	176,22												
					CB	41,69	CG		CD1/2	131,60	CE1/2	119,16	CZ					
Leu 79	H	8,79	HA	3,37	HB3	1,67	HG	1,22	MD1	0,87	MD2	0,48						
					HB2	0,97												
	N	127,81	CA	54,96	C	176,81												
					CB	42,35	CG	26,54	CD1	26,54	CD2	23,21						
Thr 80	H	8,42	HA	4,58	HB3	3,81	MG	1,08										
	N	122,34	CA	59,81	C	172,87												
					CB	71,85	CG2	19,96										
Asp 81	H	8,33	HA	4,53	HB3	2,67												
					HB2	2,67												
	N	123,31	CA	54,82	C	177,79												
					CB	41,15	CG											
Cys 82	H	9,03	HA	4,47	HB3	3,08												
					HB2	2,85												
	N	122,02	CA	54,82	C	175,83												
					CB	41,58												
Glu 83	H	8,66	HA	4,23	HB3	2,10	HG3	2,30										
					HB2	2,10	HG2	2,30										
	N	121,38	CA	56,80	C	177,23												
					CB	30,11	CG	36,00	CD									
Gly 84	H	8,46	HA3	3,92														
			HA2	3,94														
	N	109,82	CA	45,47	C	174,73												
Lys 85	H	8,12	HA	4,32	HB3	1,85	HG3	1,37	HD3	1,71	HE3	3,01	QZ					
					HB2	1,78	HG2	1,41	HD2	1,71	HE2	3,01						
	N	120,42	CA	56,33	C	176,65												
					CB	32,84	CG	24,26	CD	28,86	CE	42,09	NZ					
Asp 86	H	8,47	HA	4,64	HB3	2,68												
					HB2	2,68												
	N	121,06	CA	54,21	C	176,18												
					CB	41,25	CG											
Ala 87	H	8,28	HA	4,33	MB	1,37												
	N	124,59	CA	52,77	C													
					CB	19,29												
Gly 88	H	8,44	HA3	4,27														
			HA2	3,97														
	N	107,25	CA	45,33	C													
Asn 89	H	8,24	HA	4,73	HB3	2,82							HD21	6,96				
					HB2	2,82							HD22	7,67				
	N	118,49	CA	52,98	C													
					CB	39,07	CG	178,53	ND2	112,62								

Ala	90	H	8,33	HA	4,31	MB	1,42					
		N	124,59	CA	52,57	C						
						CB	19,18					
Ala	91	H	8,29	HA	4,26	MB	1,44					
		N	122,99	CA	52,57	C						
						CB	19,29					
Gly	92	H	8,34	HA3	4,00							
				HA2	4,04							
		N	107,89	CA	45,19	C	174,86					
Thr	93	H	8,19	HA	4,41	HB	4,28	MG	1,22			
		N	112,39	CA	61,72	C						
						CB	69,89	CG2	20,92			
Gly	94	H	8,56	HA3	4,03							
				HA2	4,03							
		N	111,10	CA	45,26	C	174,90					
Asp	95	H	8,27	HA	4,66	HB3	2,66					
							HB2	2,66				
		N	120,42	CA	54,21	C	175,82					
						CB	41,36	CG				
Glu	96	H	8,50	HA	4,37	HB3	2,04	HG3	2,25			
							HB2	2,06	HG2	2,26		
		N	121,06	CA	56,67	C	176,83					
						CB	30,00	CG	35,46	CD		
Ser	97	H	8,37	HA	4,47	HB3	3,86					
							HB2	3,86				
		N	116,24	CA	58,24	C	174,56					
						CB	63,99					
Asp	98	H	8,38	HA	4,66	HB3	2,72					
							HB2	2,60				
		N	122,67	CA	54,21	C	176,08					
						CB	41,15	CG				
Glu	99	H	8,28	HA	4,31	HB3	2,08	HG3	2,31			
							HB2	1,92	HG2	2,88		
		N	121,06	CA	56,26	C	176,54					
						CB	30,33	CG	35,80	CD		
Val	100	H	8,20	HA	4,18	HB	2,08	MG1	0,93			
							MG2	0,93				
		N	121,06	CA	61,72	C	175,90					
						CB	33,06	CG1	20,77	CG2	20,77	
Asp	101	H	8,47	HA	4,66	HB3	2,73					
							HB2	2,62				
		N	124,59	CA	54,14	C	176,09					
						CB	41,25	CG				
Glu	102	H	8,35	HA		HB3		HG3				
							HB2		HG2			
		N	121,70	CA	56,05	C						
						CB	30,87	CG		CD		
Asp	103	H	8,06	HA	4,66	HB3	2,72					
							HB2	2,60				
		N	126,84	CA	55,92	C						
						CB	41,36	CG				

Tabelle 15 Resonanzen der Spinsysteme von Saratin relativ zu DSS (IUPAC Format).

(2) NOE-Kontakte von Saratin

HA	1	→	HH1*	3	3,6	Å	HB1	7	→	HD1	7	3,1	Å
HB2	2	→	HN	3	3,7	Å	HB1	7	→	HE3	7	3,1	Å
HB1	2	→	HN	4	3,5	Å	HA	7	→	HE3	7	3,2	Å
HA	2	→	HE*	36	2,9	Å	HZ2	7	→	HH2	7	3,2	Å
HB2	3	→	HN	2	3,7	Å	HH2	7	→	HZ2	7	2,8	Å
HD2	3	→	HN	2	3,8	Å	HH2	7	→	HE3	7	3,5	Å
HN	3	→	HB2	3	3,6	Å	HA	7	→	HN	8	3,4	Å
HG2	3	→	HD2	3	3,7	Å	HB*	7	→	HN	8	2,9	Å
HG2	3	→	HD1	3	3,8	Å	HA	7	→	HN	8	2,2	Å
HH1*	3	→	HH2*	3	3,9	Å	HB*	7	→	HN	8	3,0	Å
HG2	3	→	HN	3	3,7	Å	HZ2	7	→	HD2	32	3,3	Å
HB2	3	→	HN	3	3,4	Å	HZ2	7	→	HZ*	32	3,0	Å
HB2	3	→	HN	4	3,8	Å	HH2	7	→	HN	32	3,6	Å
HG1	3	→	HN	4	3,5	Å	HZ2	7	→	HZ*	32	3,2	Å
HA	3	→	HN	4	3,2	Å	HA	7	→	HN	78	3,6	Å
HG*	4	→	HN	4	3,6	Å	HA	7	→	HN	80	2,8	Å
HB1	4	→	HE1	7	3,6	Å	HG2*	8	→	HB	8	3,9	Å
HG2	4	→	HD1	32	3,6	Å	HG2*	8	→	HN	8	3,6	Å
HB1	4	→	HZ	36	3,5	Å	HB	8	→	HN	8	2,8	Å
HB2	4	→	HZ	36	3,5	Å	HG*	8	→	HN	8	3,2	Å
HA	5	→	HN	6	2,2	Å	HG2*	8	→	HN	9	3,5	Å
HB2	5	→	HD1	7	3,9	Å	HG2*	8	→	HN	78	3,7	Å
HN	5	→	HB2	32	3,8	Å	HB1	9	→	HB2	9	3,7	Å
HA	5	→	HZ	36	3,8	Å	HN	9	→	HB2	9	3,9	Å
HB2	5	→	HE*	36	3,1	Å	HB2	9	→	HB1	9	3,3	Å
HB2	6	→	HB1	6	3,2	Å	HB1	9	→	HD*	9	3,8	Å
HB2	6	→	HN	6	3,8	Å	HB2	9	→	HN	9	3,6	Å
HB1	6	→	HN	6	3,6	Å	HB1	9	→	HN	9	3,8	Å
HB*	6	→	HN	6	2,8	Å	HB*	9	→	HD*	9	3,2	Å
HA	6	→	HN	6	3,2	Å	HE*	9	→	HD*	9	2,6	Å
HB2	6	→	HD1	7	3,6	Å	HB*	9	→	HN	9	3,4	Å
HA	6	→	HD1	7	3,1	Å	HA	9	→	HN	9	3,7	Å
HA	6	→	HN	7	3,0	Å	HB*	9	→	HN	9	5,0	Å
HA	6	→	HE1	7	3,6	Å	HB2	9	→	HD*	9	3,7	Å
HN	6	→	HE1	7	4,0	Å	HA	9	→	HN	10	3,5	Å
HB*	6	→	HN	7	5,0	Å	HD*	9	→	HN	10	3,6	Å
HA	6	→	HN	7	2,5	Å	HA	9	→	HN	10	2,4	Å
HA	6	→	HD1	7	3,2	Å	HZ	9	→	HN	13	3,0	Å
HB2	6	→	HN	8	4,0	Å	HA	9	→	HA	77	3,6	Å
HN	6	→	HD2*	79	3,8	Å	HD*	9	→	HN	78	4,0	Å
HD1	7	→	HN	6	3,3	Å	HA	9	→	HN	78	3,4	Å
HE1	7	→	HN	6	4,0	Å	HN	9	→	HN	92	3,8	Å
HD1	7	→	HB1	7	3,8	Å	HE*	9	→	HN	94	3,8	Å
HB2	7	→	HD1	7	3,5	Å	HD*	10	→	HE*	10	3,3	Å
HH2	7	→	HZ2	7	3,6	Å	HB1	10	→	HD*	10	3,6	Å
HE1	7	→	HD1	7	3,6	Å	HA	10	→	HD*	10	3,7	Å
HB1	7	→	HE3	7	3,7	Å	HE*	10	→	HD*	10	3,0	Å
HA	7	→	HE3	7	4,1	Å	HB1	10	→	HN	10	3,7	Å
HZ3	7	→	HE3	7	3,9	Å	HE*	10	→	HD*	10	2,6	Å
HD1	7	→	HE1	7	3,6	Å	HA	10	→	HN	10	2,9	Å
HB*	7	→	HE3	7	2,5	Å	HB*	10	→	HD*	10	2,7	Å
HD1	7	→	HN	7	2,4	Å	HB*	10	→	HE*	10	4,1	Å
HB*	7	→	HN	7	5,0	Å	HB*	10	→	HD*	10	2,8	Å
HB*	7	→	HA	7	2,4	Å	HB1	10	→	HD*	10	2,9	Å
HB*	7	→	HE3	7	2,9	Å	HE*	10	→	HD*	10	2,5	Å
HA	7	→	HE3	7	2,7	Å	HD*	10	→	HE*	10	2,9	Å
HA	7	→	HN	7	2,9	Å	HA	10	→	HN	11	3,5	Å
HB*	7	→	HA	7	2,6	Å	HB*	10	→	HN	11	3,2	Å
HB2	7	→	HD1	7	3,3	Å	HB1	10	→	HB2	65	3,9	Å
HB2	7	→	HE3	7	3,2	Å	HA	11	→	HZ	9	3,1	Å

HB*	11	→	HD*	10	3,0	Å	HD*	15	→	HE*	15	3,4	Å
HN	11	→	HN	10	2,4	Å	HB*	15	→	HD*	15	2,7	Å
HB*	11	→	HE*	10	3,9	Å	HA	15	→	HD*	15	3,3	Å
HB*	11	→	HD*	10	2,9	Å	HD*	15	→	HE*	15	2,8	Å
HB*	11	→	HN	11	3,9	Å	HB*	15	→	HA	15	5,0	Å
HB*	11	→	HA	11	2,4	Å	HD*	15	→	HE*	15	2,7	Å
HA	11	→	HN	11	3,1	Å	HE*	15	→	HD*	15	3,3	Å
HB*	11	→	HN	11	3,1	Å	HB1	15	→	HN	16	3,8	Å
HB*	11	→	HN	12	3,3	Å	HD*	15	→	HN	16	3,8	Å
HA	11	→	HN	12	2,4	Å	HE*	15	→	HZ*	20	3,7	Å
HB*	11	→	HH1*	13	4,0	Å	HD*	15	→	HZ*	20	4,0	Å
HN	11	→	HN	76	3,1	Å	HD*	15	→	HE*	45	3,6	Å
HN	12	→	HB2	12	3,9	Å	HE*	15	→	HE*	45	2,6	Å
HB1	12	→	HB2	12	3,6	Å	HB1	15	→	HD*	68	3,8	Å
HB2	12	→	HB1	12	3,6	Å	HD*	15	→	HE*	68	3,6	Å
HB1	12	→	HD21	12	4,1	Å	HD*	15	→	HD*	68	3,7	Å
HN	12	→	HD22	12	3,6	Å	HE*	15	→	HE*	68	3,0	Å
HB*	12	→	HD21	12	3,3	Å	HB1	15	→	HN	69	3,8	Å
HD21	12	→	HD22	12	2,0	Å	HN	16	→	HG2*	16	3,7	Å
HB*	12	→	HD22	12	3,0	Å	HG2*	16	→	HA	16	3,5	Å
HA	12	→	HD22	12	2,7	Å	HA	16	→	HB	16	3,9	Å
HB*	12	→	HD21	12	3,0	Å	HG2*	16	→	HB	16	4,0	Å
HB2	12	→	HA	12	3,7	Å	HG2*	16	→	HN	16	3,3	Å
HB1	12	→	HA	12	4,2	Å	HA	16	→	HN	16	4,1	Å
HA	12	→	HN	13	2,3	Å	HA	16	→	HN	17	3,1	Å
HA	12	→	HN	76	3,1	Å	HG2*	16	→	HN	69	3,8	Å
HB2	13	→	HD2	13	3,5	Å	HB2	17	→	HE*	15	3,2	Å
HG2	13	→	HD1	13	3,9	Å	HN	17	→	HN	16	3,0	Å
HD2	13	→	HD1	13	3,6	Å	HA	17	→	HN	17	2,9	Å
HB1	13	→	HH1*	13	3,8	Å	HB*	17	→	HN	17	2,8	Å
HD2	13	→	HH1*	13	3,7	Å	HB1	17	→	HN	18	3,9	Å
HB2	13	→	HN	13	3,7	Å	HA	17	→	HN	18	3,5	Å
HB*	13	→	HA	13	2,8	Å	HN	17	→	HN	18	3,5	Å
HA	13	→	HN	13	2,9	Å	HA	17	→	HN	18	2,5	Å
HB*	13	→	HA	13	2,6	Å	HA	18	→	HE*	15	3,9	Å
HB2	13	→	HN	14	3,5	Å	HE*	18	→	HZ	18	4,1	Å
HA	13	→	HN	14	2,4	Å	HB1	18	→	HD*	18	4,1	Å
HA	13	→	HN	71	3,8	Å	HA	18	→	HD*	18	3,6	Å
HB2	13	→	HN	71	3,7	Å	HZ	18	→	HE*	18	3,5	Å
HN	13	→	HN	71	3,8	Å	HD*	18	→	HN	18	4,3	Å
HA	13	→	HN	71	2,4	Å	HB1	18	→	HN	18	3,8	Å
HN	14	→	HB2	13	3,8	Å	HZ	18	→	HE*	18	2,4	Å
HD2	14	→	HE2	14	3,8	Å	HA	18	→	HN	18	5,0	Å
HD2	14	→	HZ*	14	3,8	Å	HB*	18	→	HD*	18	2,8	Å
HE1	14	→	HZ*	14	3,6	Å	HB*	18	→	HN	18	2,9	Å
HA	14	→	HZ*	14	3,9	Å	HA	18	→	HD*	18	2,5	Å
HD2	14	→	HN	14	3,7	Å	HB*	18	→	HD*	18	2,7	Å
HA	14	→	HN	14	5,0	Å	HD*	18	→	HN	18	3,4	Å
HG1	14	→	HN	16	3,7	Å	HB*	18	→	HN	18	2,8	Å
HD2	14	→	HE*	18	3,8	Å	HB1	18	→	HD*	18	3,5	Å
HZ*	14	→	HE*	45	3,7	Å	HZ	18	→	HD*	18	3,1	Å
HG1	14	→	HZ	45	3,5	Å	HD*	18	→	HZ	18	3,1	Å
HB*	14	→	HD*	45	3,7	Å	HN	18	→	HN	19	5,0	Å
HG1	14	→	HD*	45	3,9	Å	HE*	18	→	HE*	45	3,9	Å
HD2	14	→	HD*	45	3,9	Å	HE*	18	→	HD*	45	3,2	Å
HG1	14	→	HZ	68	3,4	Å	HZ	18	→	HD*	45	3,6	Å
HD2	14	→	HB2	71	3,5	Å	HD*	18	→	HE*	54	3,8	Å
HD2	14	→	HN	71	3,3	Å	HZ	18	→	HE*	74	4,1	Å
HD2	14	→	HD*	74	3,6	Å	HE*	18	→	HE*	74	3,8	Å
HZ*	14	→	HN	76	3,4	Å	HZ	18	→	HE*	74	3,3	Å
HZ*	14	→	HN	77	3,1	Å	HE*	18	→	HD*	74	3,0	Å

HE*	18	→	HE*	74	3,0	Å	HB2	23	→	HE*	55	3,4	Å
HE*	18	→	HZ	74	3,3	Å	HN	23	→	HN	55	2,7	Å
HB2	19	→	HN	19	3,4	Å	HB2	23	→	HE*	55	2,9	Å
HA	19	→	HN	19	3,6	Å	HG1	23	→	HD*	55	3,3	Å
HB2	19	→	HN	20	3,9	Å	HB1	23	→	HE*	55	4,1	Å
HB2	20	→	HA	20	4,3	Å	HD2	23	→	HE*	55	3,8	Å
HB2	20	→	HN	20	3,7	Å	HN	24	→	HB2	23	3,8	Å
HG2	20	→	HN	21	3,8	Å	HE2	24	→	HD2	24	4,7	Å
HD*	20	→	HN	21	3,9	Å	HE1	24	→	HD1	24	3,7	Å
HB1	20	→	HN	21	3,5	Å	HN	24	→	HB1	24	3,9	Å
HG1	20	→	HZ	68	3,2	Å	HG1	24	→	HE1	24	3,4	Å
HB1	21	→	HD*	22	3,8	Å	HD1	24	→	HE1	24	3,3	Å
HA	21	→	HD*	22	3,6	Å	HB2	24	→	HN	24	3,2	Å
HA	21	→	HN	22	2,5	Å	HB1	24	→	HN	24	3,6	Å
HN	22	→	HN	21	4,2	Å	HG2	24	→	HZ*	24	3,7	Å
HB2	22	→	HB1	22	3,8	Å	HA	24	→	HN	24	2,8	Å
HZ	22	→	HE*	22	4,3	Å	HA	24	→	HN	25	3,4	Å
HE*	22	→	HZ	22	3,2	Å	HD*	24	→	HN	25	5,0	Å
HE*	22	→	HD*	22	3,6	Å	HA	24	→	HN	25	2,2	Å
HN	22	→	HD*	22	4,3	Å	HB2	24	→	HN	53	3,4	Å
HB1	22	→	HD*	22	3,7	Å	HA	24	→	HN	53	3,5	Å
HD*	22	→	HN	22	3,4	Å	HA	24	→	HA	53	3,5	Å
HB*	22	→	HA	22	2,7	Å	HB2	24	→	HD*	54	3,7	Å
HB*	22	→	HD*	22	2,8	Å	HG2	24	→	HE*	54	3,9	Å
HB*	22	→	HN	22	2,8	Å	HB2	24	→	HE*	54	3,4	Å
HA	22	→	HD*	22	3,9	Å	HA	24	→	HA	54	2,4	Å
HA	22	→	HN	22	2,9	Å	HG2	24	→	HE*	54	3,7	Å
HB*	22	→	HD*	22	2,9	Å	HB2	24	→	HD*	54	3,4	Å
HB*	22	→	HA	22	2,9	Å	HD2	24	→	HE*	54	3,0	Å
HB2	22	→	HD*	22	2,9	Å	HE2	24	→	HE*	54	4,1	Å
HA	22	→	HD*	22	4,2	Å	HE1	24	→	HE*	54	3,8	Å
HE*	22	→	HD*	22	2,9	Å	HB2	24	→	HE*	55	3,8	Å
HZ	22	→	HE*	22	2,7	Å	HB2	24	→	HN	55	3,6	Å
HD*	22	→	HE*	22	2,8	Å	HA	24	→	HN	55	3,1	Å
HA	22	→	HN	23	3,8	Å	HB2	25	→	HN	25	4,0	Å
HB*	22	→	HN	23	2,6	Å	HA	25	→	HN	25	3,2	Å
HA	22	→	HN	23	2,4	Å	HB*	25	→	HN	25	3,3	Å
HZ	22	→	HG2*	43	3,7	Å	HB*	25	→	HN	26	3,7	Å
HZ	22	→	HZ	45	3,6	Å	HN	25	→	HN	53	5,0	Å
HZ	22	→	HD*	45	3,1	Å	HB2	25	→	HE*	55	3,8	Å
HE*	22	→	HD*	45	4,3	Å	HN	26	→	HN	27	4,4	Å
HE*	22	→	HZ	45	4,3	Å	HA	26	→	HN	27	3,5	Å
HZ	22	→	HD*	45	3,3	Å	HN	27	→	HN	26	3,5	Å
HD*	22	→	HA	55	3,4	Å	HN	27	→	HB2	27	3,7	Å
HD*	22	→	HG2*	57	3,7	Å	HN	27	→	HB1	27	3,9	Å
HA	22	→	HN	57	4,2	Å	HA	27	→	HN	27	2,8	Å
HE*	22	→	HN	57	2,8	Å	HB2	27	→	HN	27	3,6	Å
HD*	22	→	HN	57	3,3	Å	HB*	27	→	HN	27	2,6	Å
HA	22	→	HN	57	2,6	Å	HA	27	→	HN	27	5,0	Å
HD*	22	→	HG2*	58	3,7	Å	HB*	27	→	HN	27	2,5	Å
HZ	22	→	HD1*	63	3,8	Å	HA	27	→	HN	28	2,8	Å
HN	23	→	HB2	23	3,9	Å	HB1	27	→	HN	28	3,8	Å
HN	23	→	HB1	23	3,6	Å	HA	27	→	HN	28	3,1	Å
HG2	23	→	HZ*	23	3,7	Å	HB2	27	→	HN	29	3,7	Å
HE1	23	→	HZ*	23	3,4	Å	HA	27	→	HN	30	3,1	Å
HB2	23	→	HN	23	3,3	Å	HB2	27	→	HE*	55	3,9	Å
HA	23	→	HN	23	3,2	Å	HN	28	→	HB1	28	3,7	Å
HZ*	23	→	HZ*	24	3,3	Å	HB1	28	→	HN	28	3,5	Å
HA	23	→	HN	24	3,4	Å	HA	28	→	HN	28	3,8	Å
HB1	23	→	HN	24	3,7	Å	HD**	28	→	HA	28	2,4	Å
HA	23	→	HN	24	2,2	Å	HA	28	→	HN	28	3,2	Å

HB*	28	→	HN	28	2,9 Å	HD2	32	→	HE1	7	3,9 Å
HD2*	28	→	HN	29	3,8 Å	HB1	32	→	HE1	7	3,8 Å
HB1	28	→	HN	29	3,6 Å	HD2	32	→	HZ2	7	3,1 Å
HN	28	→	HN	29	4,2 Å	HG1	32	→	HZ2	7	2,8 Å
HB2	28	→	HN	29	3,6 Å	HG1	32	→	HH2	7	4,1 Å
HB*	28	→	HN	29	2,9 Å	HD1	32	→	HZ2	7	4,0 Å
HA	28	→	HN	31	2,7 Å	HB2	32	→	HH2	7	3,6 Å
HN	29	→	HB2	27	3,9 Å	HE2	32	→	HZ2	7	3,4 Å
HN	29	→	HN	28	3,2 Å	HA	32	→	HH2	7	2,9 Å
HN	29	→	HB1	29	3,5 Å	HA	32	→	HZ2	7	2,8 Å
HB1	29	→	HN	29	3,2 Å	HB*	32	→	HA	29	3,8 Å
HA	29	→	HN	29	2,3 Å	HD2	32	→	HB2	31	3,3 Å
HB*	29	→	HN	29	2,6 Å	HN	32	→	HN	31	2,4 Å
HB*	29	→	HA	29	2,4 Å	HB1	32	→	HA	32	3,8 Å
HB*	29	→	HN	29	2,2 Å	HD2	32	→	HA	32	3,4 Å
HB1	29	→	HN	30	3,5 Å	HG1	32	→	HZ*	32	3,7 Å
HN	29	→	HN	30	4,6 Å	HD2	32	→	HZ*	32	3,8 Å
HB*	29	→	HN	30	2,7 Å	HD1	32	→	HZ*	32	3,9 Å
HN	30	→	HN	29	2,5 Å	HD2	32	→	HN	32	3,6 Å
HN	30	→	HB2	30	3,6 Å	HD1	32	→	HN	32	3,5 Å
HA	30	→	HN	30	3,6 Å	HB1	32	→	HN	32	3,8 Å
HG*	30	→	HN	30	3,6 Å	HA	32	→	HN	32	3,8 Å
HB*	30	→	HA	30	5,0 Å	HB*	32	→	HN	32	2,9 Å
HG*	30	→	HN	30	3,2 Å	HD*	32	→	HN	32	2,5 Å
HB*	30	→	HA	30	2,6 Å	HB*	32	→	HN	32	2,5 Å
HB*	30	→	HN	30	2,4 Å	HB*	32	→	HA	32	2,9 Å
HA	30	→	HN	30	2,5 Å	HB*	32	→	HD*	32	2,4 Å
HB*	30	→	HA	30	2,3 Å	HB*	32	→	HA	32	2,6 Å
HA	30	→	HN	31	4,0 Å	HD*	32	→	HN	32	2,7 Å
HN	30	→	HN	31	3,8 Å	HD2	32	→	HN	33	3,6 Å
HA	30	→	HN	31	2,6 Å	HB2	32	→	HN	33	3,3 Å
HB*	30	→	HN	31	2,9 Å	HB1	32	→	HN	33	3,2 Å
HN	30	→	HN	31	2,5 Å	HN	32	→	HN	33	2,4 Å
HA	30	→	HN	33	5,0 Å	HB*	32	→	HN	33	3,4 Å
HB2	31	→	HH2	7	3,3 Å	HD2	32	→	HN	35	3,9 Å
HB*	31	→	HA	28	2,6 Å	HG1	32	→	HZ	36	3,3 Å
HN	31	→	HB2	29	3,6 Å	HB2	32	→	HZ	36	3,5 Å
HN	31	→	HB2	31	3,9 Å	HA	32	→	HZ	36	3,4 Å
HB1	31	→	HB2	31	3,0 Å	HG1	32	→	HZ	36	2,7 Å
HB2	31	→	HB1	31	3,1 Å	HA	32	→	HZ	36	3,7 Å
HN	31	→	HB1	31	3,7 Å	HB1	33	→	HN	30	3,7 Å
HB2	31	→	HA	31	3,6 Å	HB*	33	→	HA	30	3,3 Å
HN	31	→	HA	31	3,7 Å	HA	33	→	HN	32	3,8 Å
HB1	31	→	HN	31	3,4 Å	HG2	33	→	HN	32	3,3 Å
HA	31	→	HN	31	2,6 Å	HD1	33	→	HE2	33	3,4 Å
HB*	31	→	HN	31	2,5 Å	HA	33	→	HN	33	2,5 Å
HB*	31	→	HA	31	2,2 Å	HB*	33	→	HN	33	2,4 Å
HB*	31	→	HN	31	2,4 Å	HB*	33	→	HA	33	2,2 Å
HB1	31	→	HZ*	32	3,6 Å	HB*	33	→	HN	33	2,4 Å
HB2	31	→	HN	32	4,0 Å	HB*	33	→	HA	33	2,6 Å
HA	31	→	HN	32	3,0 Å	HB*	33	→	HN	34	5,0 Å
HB*	31	→	HN	32	2,7 Å	HG2	33	→	HN	35	3,7 Å
HA	31	→	HN	33	3,3 Å	HA	33	→	HN	36	3,2 Å
HA	31	→	HN	34	2,6 Å	HA	33	→	HD*	36	3,1 Å
HB1	31	→	HB2	53	3,6 Å	HG1	33	→	HN	37	3,6 Å
HB2	32	→	HN	5	3,6 Å	HG*	34	→	HA	31	3,6 Å
HG1	32	→	HZ2	7	3,3 Å	HB	34	→	HA	31	5,0 Å
HA	32	→	HZ2	7	3,8 Å	HG2*	34	→	HB	34	3,6 Å
HE2	32	→	HZ2	7	3,9 Å	HG2*	34	→	HA	34	3,7 Å
HZ*	32	→	HH2	7	3,2 Å	HA	34	→	HN	34	3,5 Å
HG1	32	→	HH2	7	3,8 Å	HG2*	34	→	HN	34	3,8 Å

HB	34	→	HN	34	2,5	Å	HB*	37	→	HN	38	3,1	Å
HG*	34	→	HA	34	2,4	Å	HN	37	→	HN	38	5,0	Å
HG*	34	→	HN	34	3,9	Å	HG*	37	→	HN	38	4,1	Å
HA	34	→	HN	34	2,6	Å	HN	38	→	HN	37	3,5	Å
HA	34	→	HN	35	3,0	Å	HB	38	→	HN	38	3,3	Å
HN	34	→	HN	35	2,2	Å	HG1	38	→	HN	38	3,2	Å
HG*	34	→	HN	35	3,7	Å	HA	38	→	HN	38	2,4	Å
HB	34	→	HN	35	2,6	Å	HB	38	→	HN	38	2,3	Å
HA	34	→	HN	37	3,0	Å	HA	38	→	HN	39	3,2	Å
HG2*	34	→	HE*	55	3,9	Å	HG2*	38	→	HN	39	3,7	Å
HB	34	→	HD*	55	4,0	Å	HA	38	→	HN	39	2,8	Å
HG2*	34	→	HE*	55	3,1	Å	HA	38	→	HN	41	2,4	Å
HB	34	→	HE*	55	3,6	Å	HN	39	→	HB2	39	3,5	Å
HB	34	→	HD*	55	3,1	Å	HB1	39	→	HA	39	3,8	Å
HN	35	→	HN	34	3,8	Å	HB2	39	→	HN	39	3,3	Å
HB*	35	→	HN	35	3,5	Å	HA	39	→	HN	39	4,0	Å
HA	35	→	HN	35	4,0	Å	HG2	39	→	HN	39	3,2	Å
HB*	35	→	HN	35	2,8	Å	HA	39	→	HN	39	3,9	Å
HA	35	→	HN	35	2,7	Å	HB*	39	→	HN	39	2,6	Å
HB1	35	→	HD*	36	3,3	Å	HA	39	→	HN	40	2,2	Å
HA	35	→	HN	36	3,8	Å	HB2	39	→	HD*	40	3,9	Å
HB1	35	→	HN	36	3,3	Å	HB1	39	→	HE*	40	4,0	Å
HA	35	→	HN	36	3,0	Å	HB1	39	→	HD*	40	3,1	Å
HA	35	→	HN	38	2,8	Å	HA	39	→	HN	41	3,3	Å
HB2	35	→	HB2	55	3,1	Å	HN	40	→	HA	39	3,7	Å
HZ	36	→	HN	3	3,8	Å	HN	40	→	HB2	40	3,9	Å
HZ	36	→	HZ2	7	3,3	Å	HD*	40	→	HB1	40	3,7	Å
HZ	36	→	HG1	32	3,6	Å	HB2	40	→	HD*	40	3,5	Å
HB*	36	→	HA	33	3,0	Å	HB1	40	→	HD*	40	3,3	Å
HN	36	→	HN	34	3,7	Å	HA	40	→	HD*	40	3,4	Å
HD*	36	→	HN	35	3,7	Å	HE*	40	→	HD*	40	2,9	Å
HN	36	→	HN	35	2,7	Å	HB2	40	→	HN	40	3,6	Å
HN	36	→	HB2	36	3,8	Å	HB1	40	→	HN	40	3,6	Å
HD*	36	→	HB2	36	3,7	Å	HA	40	→	HN	40	3,2	Å
HD*	36	→	HB1	36	3,9	Å	HB*	40	→	HN	40	5,0	Å
HN	36	→	HB1	36	3,8	Å	HA	40	→	HN	40	2,4	Å
HA	36	→	HD*	36	3,3	Å	HA	40	→	HD*	40	2,6	Å
HA	36	→	HE*	36	3,7	Å	HB*	40	→	HD*	40	2,7	Å
HZ	36	→	HE*	36	2,3	Å	HB*	40	→	HA	40	2,4	Å
HA	36	→	HN	36	3,7	Å	HB*	40	→	HN	40	2,5	Å
HE*	36	→	HN	36	3,9	Å	HB*	40	→	HD*	40	2,6	Å
HD*	36	→	HN	36	3,5	Å	HB2	40	→	HD*	40	3,3	Å
HB1	36	→	HN	36	3,5	Å	HB1	40	→	HE*	40	3,9	Å
HA	36	→	HN	36	3,4	Å	HA	40	→	HE*	40	3,9	Å
HB*	36	→	HN	36	2,3	Å	HA	40	→	HD*	40	3,1	Å
HD*	36	→	HN	36	3,3	Å	HE*	40	→	HD*	40	2,4	Å
HB*	36	→	HN	36	2,3	Å	HD*	40	→	HE*	40	2,7	Å
HB2	36	→	HE*	36	3,6	Å	HB2	40	→	HN	41	3,7	Å
HB1	36	→	HD*	36	2,7	Å	HB*	40	→	HN	41	3,1	Å
HB1	36	→	HE*	36	3,6	Å	HB*	40	→	HA	59	2,4	Å
HA	36	→	HD*	36	2,8	Å	HB*	40	→	HN	59	3,5	Å
HA	36	→	HN	37	5,0	Å	HA	40	→	HN	60	5,0	Å
HB*	36	→	HN	37	2,7	Å	HB*	40	→	HN	60	3,1	Å
HB*	37	→	HA	34	3,1	Å	HD*	40	→	HN	60	4,2	Å
HN	37	→	HN	36	2,8	Å	HB*	40	→	HN	60	3,6	Å
HA	37	→	HN	37	3,8	Å	HN	41	→	HN	40	2,6	Å
HB2	37	→	HN	37	3,7	Å	HB1	41	→	HB2	41	3,6	Å
HA	37	→	HN	37	2,6	Å	HB2	41	→	HN	41	3,8	Å
HG*	37	→	HN	37	2,8	Å	HB1	41	→	HN	41	3,5	Å
HB*	37	→	HN	37	2,5	Å	HB*	41	→	HN	41	2,4	Å
HN	37	→	HN	38	3,3	Å	HA	41	→	HN	41	2,4	Å

HA	41	→	HN	42	3,5 Å	HG1*	44	→	HA	55	3,3 Å
HA	41	→	HD*	42	3,9 Å	HG2*	44	→	HN	56	3,5 Å
HA	41	→	HN	43	3,6 Å	HB	44	→	HN	56	3,8 Å
HD*	42	→	HE*	42	3,2 Å	HA	44	→	HN	56	3,5 Å
HB2	42	→	HD*	42	3,5 Å	HB	44	→	HD22	77	3,8 Å
HE*	42	→	HD*	42	3,0 Å	HG1*	44	→	HD22	77	3,7 Å
HN	42	→	HD*	42	4,1 Å	HB**	44	→	HN	77	3,8 Å
HD*	42	→	HN	42	4,0 Å	HZ	45	→	HG1	14	4,0 Å
HB*	42	→	HE*	42	3,7 Å	HZ	45	→	HZ*	14	3,5 Å
HA	42	→	HD*	42	3,3 Å	HE*	45	→	HZ*	14	3,4 Å
HB*	42	→	HD*	42	2,6 Å	HZ	45	→	HZ*	14	3,6 Å
HE*	42	→	HD*	42	2,6 Å	HE*	45	→	HD*	15	3,8 Å
HB*	42	→	HD*	42	2,6 Å	HE*	45	→	HE*	18	4,7 Å
HB*	42	→	HE*	42	3,6 Å	HD*	45	→	HE*	18	3,5 Å
HB2	42	→	HD*	42	2,8 Å	HZ	45	→	HG2*	43	4,0 Å
HB1	42	→	HD*	42	3,2 Å	HD*	45	→	HE*	45	3,2 Å
HA	42	→	HD*	42	4,2 Å	HZ	45	→	HD*	45	3,2 Å
HE*	42	→	HD*	42	2,7 Å	HB2	45	→	HD*	45	3,9 Å
HD*	42	→	HE*	42	2,7 Å	HE*	45	→	HD*	45	2,9 Å
HN	42	→	HN	43	3,3 Å	HA	45	→	HD*	45	4,2 Å
HE*	42	→	HD21	56	3,3 Å	HB2	45	→	HN	45	4,0 Å
HD*	42	→	HD22	56	3,3 Å	HD*	45	→	HN	45	4,1 Å
HE*	42	→	HD22	56	3,7 Å	HB*	45	→	HN	45	2,7 Å
HB2	42	→	HN	79	3,9 Å	HB*	45	→	HA	45	2,9 Å
HA	42	→	HN	79	3,4 Å	HB*	45	→	HD*	45	2,9 Å
HG2*	43	→	HE*	22	3,8 Å	HB*	45	→	HN	45	3,0 Å
HG2*	43	→	HZ	22	3,6 Å	HB*	45	→	HA	45	2,6 Å
HG2*	43	→	HE*	22	3,2 Å	HB*	45	→	HD*	45	2,9 Å
HN	43	→	HN	42	2,1 Å	HA	45	→	HD*	45	3,1 Å
HG12	43	→	HD*	42	3,6 Å	HE*	45	→	HD*	45	2,7 Å
HD1*	43	→	HE*	42	3,2 Å	HA	45	→	HN	45	3,1 Å
HD1*	43	→	HD*	42	3,6 Å	HZ	45	→	HD*	45	3,1 Å
HG2*	43	→	HN	44	3,5 Å	HB2	45	→	HD*	45	3,1 Å
HA	43	→	HN	44	2,2 Å	HB1	45	→	HA	45	3,4 Å
HB	43	→	HD22	56	3,9 Å	HB1	45	→	HD*	45	3,0 Å
HN	43	→	HN	56	3,2 Å	HA	45	→	HD*	45	3,3 Å
HG2*	43	→	HN	77	3,3 Å	HE*	45	→	HD*	45	2,6 Å
HA	43	→	HA	78	2,7 Å	HD*	45	→	HA	45	3,5 Å
HG2*	43	→	HD*	78	3,9 Å	HD*	45	→	HE*	45	2,7 Å
HD1*	43	→	HE*	78	4,2 Å	HA	45	→	HN	46	2,3 Å
HA	43	→	HN	79	5,0 Å	HD*	45	→	HD*	74	3,4 Å
HG2*	44	→	HZ2	7	3,2 Å	HA	45	→	HN	77	3,1 Å
HG2*	44	→	HE3	7	3,7 Å	HG2	46	→	HZ3	7	3,6 Å
HB	44	→	HZ3	7	3,8 Å	HB2	46	→	HD22	12	3,1 Å
HG2*	44	→	HZ3	7	3,9 Å	HN	46	→	HA	45	3,8 Å
HG2*	44	→	HE3	7	3,5 Å	HB1	46	→	HB2	46	3,8 Å
HG2*	44	→	HH2	7	3,3 Å	HG2	46	→	HB1	46	3,7 Å
HB	44	→	HE3	7	4,1 Å	HB2	46	→	HB1	46	3,2 Å
HN	44	→	HG2*	43	3,8 Å	HA	46	→	HN	47	2,5 Å
HN	44	→	HG2*	44	3,8 Å	HA	46	→	HA	53	3,8 Å
HG2*	44	→	HN	44	3,4 Å	HA	46	→	HN	54	3,2 Å
HB	44	→	HA	44	2,4 Å	HB*	46	→	HN	75	3,2 Å
HB	44	→	HN	44	2,3 Å	HG1	46	→	HD22	77	3,5 Å
HG*	44	→	HN	44	2,8 Å	HG2	46	→	HD22	77	3,3 Å
HA	44	→	HN	44	3,0 Å	HG1	46	→	HD22	77	3,4 Å
HG**	44	→	HA	44	2,4 Å	HA	46	→	HD22	77	3,3 Å
HG1*	44	→	HN	45	3,5 Å	HB2	47	→	HB1	47	3,2 Å
HA	44	→	HN	45	2,2 Å	HN	47	→	HB1	47	3,8 Å
HG1*	44	→	HN	54	3,7 Å	HB2	47	→	HN	47	3,6 Å
HG1*	44	→	HA	55	3,8 Å	HB1	47	→	HN	47	3,6 Å
HA	44	→	HA	55	2,6 Å	HB*	47	→	HN	47	2,6 Å

HA	47	→	HN	47	3,1 Å	HG2	51	→	HN	51	3,7 Å
HB*	47	→	HN	47	2,5 Å	HD*	51	→	HN	51	4,0 Å
HB*	47	→	HN	48	3,4 Å	HA	51	→	HN	51	3,1 Å
HA	47	→	HN	48	2,3 Å	HB1	51	→	HN	51	3,2 Å
HA	47	→	HN	49	3,3 Å	HB*	51	→	HN	51	2,9 Å
HB*	47	→	HN	49	3,4 Å	HD*	51	→	HN	51	3,7 Å
HB2	47	→	HE*	74	3,6 Å	HB*	51	→	HN	51	3,1 Å
HA	47	→	HA	74	2,7 Å	HA	51	→	HN	51	2,0 Å
HB2	47	→	HE*	74	3,2 Å	HB1	51	→	HN	52	3,9 Å
HB2	47	→	HZ	74	3,3 Å	HA	51	→	HN	52	3,5 Å
HB1	47	→	HZ	74	4,0 Å	HN	51	→	HN	52	4,0 Å
HA	47	→	HA	74	3,6 Å	HA	51	→	HN	52	2,3 Å
HA	47	→	HD*	74	2,9 Å	HG2	52	→	HB1	47	3,1 Å
HA	47	→	HN	75	3,5 Å	HN	52	→	HN	47	2,9 Å
HG2*	48	→	HA	48	4,1 Å	HN	52	→	HN	51	2,6 Å
HG2*	48	→	HN	48	3,5 Å	HG2	52	→	HB2	52	3,0 Å
HB	48	→	HN	48	3,6 Å	HN	52	→	HB2	52	3,7 Å
HA	48	→	HN	48	2,7 Å	HN	52	→	HG1	52	3,9 Å
HB	48	→	HN	48	2,8 Å	HB2	52	→	HN	52	3,5 Å
HG*	48	→	HN	48	2,7 Å	HG1	52	→	HN	52	3,8 Å
HA	48	→	HN	49	2,9 Å	HB2	52	→	HN	53	3,3 Å
HG*	48	→	HN	49	4,2 Å	HB*	52	→	HN	53	2,4 Å
HN	49	→	HN	48	2,6 Å	HA	52	→	HN	53	2,6 Å
HN	49	→	HB	49	3,4 Å	HN	52	→	HN	53	3,3 Å
HA	49	→	HN	49	3,7 Å	HB2	52	→	HZ	74	3,5 Å
HB	49	→	HN	49	3,2 Å	HA	53	→	HN	47	5,0 Å
HA	49	→	HN	49	2,5 Å	HB1	53	→	HB2	53	3,4 Å
HG*	49	→	HN	49	3,0 Å	HA	53	→	HN	53	2,9 Å
HB	49	→	HN	49	2,2 Å	HB*	53	→	HN	53	3,5 Å
HG*	49	→	HN	49	2,7 Å	HB1	53	→	HA	53	3,4 Å
HN	49	→	HN	50	3,7 Å	HB1	53	→	HN	54	3,7 Å
HB	49	→	HN	50	3,5 Å	HA	53	→	HN	54	2,4 Å
HA	49	→	HN	50	2,8 Å	HD*	54	→	HD*	18	3,6 Å
HB	49	→	HN	50	2,5 Å	HE*	54	→	HD*	18	3,6 Å
HB**	49	→	HN	50	3,1 Å	HB1	54	→	HD*	22	3,1 Å
HG2*	49	→	HD22	50	3,7 Å	HB1	54	→	HN	23	3,4 Å
HN	49	→	HD21	50	2,8 Å	HN	54	→	HN	45	2,9 Å
HA	49	→	HN	51	5,0 Å	HB2	54	→	HD*	45	3,4 Å
HG2*	49	→	HB1	73	3,7 Å	HB1	54	→	HD*	45	3,9 Å
HG*	49	→	HN	73	4,0 Å	HB2	54	→	HD*	54	3,6 Å
HN	50	→	HN	48	3,6 Å	HE*	54	→	HD*	54	3,5 Å
HN	50	→	HN	49	2,3 Å	HA	54	→	HD*	54	3,8 Å
HB2	50	→	HN	50	3,5 Å	HN	54	→	HD*	54	4,1 Å
HB1	50	→	HN	50	4,0 Å	HB2	54	→	HE*	54	3,7 Å
HA	50	→	HN	50	4,2 Å	HD*	54	→	HE*	54	3,0 Å
HD21	50	→	HD22	50	2,0 Å	HA	54	→	HN	54	3,3 Å
HB*	50	→	HN	50	2,6 Å	HD*	54	→	HN	54	4,0 Å
HN	50	→	HD22	50	3,0 Å	HB2	54	→	HN	54	3,6 Å
HA	50	→	HN	50	2,7 Å	HB*	54	→	HD*	54	2,7 Å
HA	50	→	HD21	50	3,0 Å	HB2	54	→	HD*	54	3,3 Å
HN	50	→	HN	51	3,2 Å	HA	54	→	HD*	54	3,2 Å
HB*	50	→	HN	51	5,0 Å	HA	54	→	HE*	54	3,9 Å
HA	50	→	HN	51	3,0 Å	HD*	54	→	HE*	54	2,6 Å
HN	50	→	HN	51	2,3 Å	HE*	54	→	HD*	54	2,6 Å
HB1	50	→	HB1	52	3,5 Å	HA	54	→	HN	55	2,3 Å
HN	51	→	HN	49	2,7 Å	HE*	54	→	HE*	74	3,2 Å
HN	51	→	HN	50	4,1 Å	HE*	54	→	HZ	74	3,6 Å
HB1	51	→	HD1	51	3,0 Å	HN	55	→	HD*	22	4,1 Å
HG2	51	→	HZ*	51	3,9 Å	HA	55	→	HD*	22	3,6 Å
HB1	51	→	HZ*	51	3,7 Å	HN	55	→	HN	23	3,6 Å
HG1	51	→	HZ*	51	3,7 Å	HD*	55	→	HN	25	3,7 Å

HA	55	→	HN	45	3,3	Å	HN	59	→	HB2	59	3,6	Å
HD*	55	→	HE*	55	3,5	Å	HN	59	→	HB1	59	3,8	Å
HB1	55	→	HA	55	4,0	Å	HB*	59	→	HA	59	2,2	Å
HB1	55	→	HD*	55	3,8	Å	HB*	59	→	HN	59	2,4	Å
HE*	55	→	HD*	55	3,2	Å	HA	59	→	HN	59	2,7	Å
HD*	55	→	HN	55	3,2	Å	HB*	59	→	HN	59	2,4	Å
HE*	55	→	HD*	55	2,7	Å	HB*	59	→	HA	59	2,3	Å
HB2	55	→	HE*	55	4,0	Å	HB*	59	→	HN	60	3,2	Å
HB1	55	→	HA	55	3,2	Å	HN	59	→	HN	60	3,4	Å
HB1	55	→	HD*	55	3,0	Å	HA	59	→	HN	60	2,2	Å
HE*	55	→	HD*	55	2,5	Å	HB*	59	→	HN	60	3,1	Å
HA	55	→	HD*	55	3,5	Å	HA	59	→	HN	61	3,5	Å
HD*	55	→	HE*	55	2,7	Å	HA1	60	→	HE*	22	3,9	Å
HD*	55	→	HA	55	3,4	Å	HA2	60	→	HE*	42	4,2	Å
HB2	55	→	HB1	56	4,0	Å	HA*	60	→	HE*	42	2,9	Å
HA	55	→	HN	56	2,4	Å	HA2	60	→	HE*	42	3,3	Å
HB*	55	→	HN	56	2,9	Å	HA1	60	→	HE*	42	3,4	Å
HN	56	→	HD*	22	3,8	Å	HA2	60	→	HN	60	3,8	Å
HA	56	→	HA	22	2,2	Å	HA1	60	→	HN	60	3,5	Å
HA	56	→	HN	23	5,0	Å	HA*	60	→	HN	60	2,4	Å
HD21	56	→	HD*	42	3,0	Å	HN	60	→	HN	61	4,2	Å
HN	56	→	HA	55	3,1	Å	HA*	60	→	HN	61	2,9	Å
HB1	56	→	HB2	56	2,6	Å	HA*	60	→	HN	63	3,0	Å
HB1	56	→	HD22	56	3,9	Å	HN	61	→	HN	60	2,7	Å
HA	56	→	HN	56	4,0	Å	HN	61	→	HB2	61	3,7	Å
HA	56	→	HD22	56	5,0	Å	HN	61	→	HB1	61	3,8	Å
HB*	56	→	HD21	56	2,8	Å	HB1	61	→	HA	61	3,9	Å
HB*	56	→	HD22	56	2,6	Å	HA	61	→	HN	61	3,2	Å
HD21	56	→	HD22	56	2,1	Å	HB2	61	→	HN	61	3,4	Å
HA	56	→	HN	56	2,9	Å	HB1	61	→	HN	61	3,4	Å
HA	56	→	HN	57	2,3	Å	HG2	61	→	HN	61	3,7	Å
HA	56	→	HN	58	2,8	Å	HB*	61	→	HA	61	2,4	Å
HN	57	→	HE*	22	2,9	Å	HB*	61	→	HN	61	2,3	Å
HN	57	→	HG2*	57	3,6	Å	HB*	61	→	HA	61	2,0	Å
HN	57	→	HG1*	57	3,9	Å	HB*	61	→	HN	61	3,0	Å
HG2*	57	→	HB	57	3,2	Å	HA	61	→	HN	61	2,5	Å
HG1*	57	→	HB	57	3,2	Å	HB*	61	→	HA	61	2,6	Å
HG2*	57	→	HN	57	3,3	Å	HB*	61	→	HN	61	2,6	Å
HG1*	57	→	HN	57	3,4	Å	HN	61	→	HN	62	3,5	Å
HA	57	→	HN	57	3,2	Å	HA	61	→	HN	62	5,0	Å
HN	57	→	HN	58	3,6	Å	HA	61	→	HN	63	5,0	Å
HN	58	→	HD*	22	3,1	Å	HG2	61	→	HD*	78	3,9	Å
HG1*	58	→	HD*	40	3,8	Å	HG1	61	→	HD*	78	3,7	Å
HA	58	→	HD*	40	3,6	Å	HN	62	→	HN	60	3,4	Å
HN	58	→	HN	57	2,3	Å	HN	62	→	HN	61	2,4	Å
HN	58	→	HG2*	58	3,8	Å	HN	62	→	HB2	62	3,8	Å
HB	58	→	HN	58	3,7	Å	HN	62	→	HB1	62	3,5	Å
HG1*	58	→	HN	58	3,5	Å	HB1	62	→	HN	62	3,3	Å
HA	58	→	HN	58	4,0	Å	HB2	62	→	HN	62	3,4	Å
HB**	58	→	HN	58	3,1	Å	HB*	62	→	HN	62	2,2	Å
HB	58	→	HN	58	2,7	Å	HA	62	→	HN	62	2,3	Å
HA	58	→	HN	58	2,6	Å	HN	62	→	HN	63	3,8	Å
HB**	58	→	HN	58	2,5	Å	HA	62	→	HN	63	2,8	Å
HA	58	→	HN	59	3,3	Å	HB*	62	→	HN	63	4,3	Å
HB**	58	→	HN	59	2,7	Å	HD2*	63	→	HZ*	20	3,7	Å
HA	58	→	HN	59	2,2	Å	HD1*	63	→	HE*	22	3,6	Å
HB	58	→	HN	59	2,3	Å	HB2	63	→	HZ	22	3,7	Å
HA	59	→	HE*	40	4,3	Å	HD1*	63	→	HZ	22	3,9	Å
HA	59	→	HD*	40	3,5	Å	HD1*	63	→	HE*	22	3,1	Å
HA	59	→	HE*	42	4,5	Å	HD1*	63	→	HD*	42	3,4	Å
HN	59	→	HB	58	3,5	Å	HB2	63	→	HZ	45	3,6	Å

HD1*	63	→	HZ	45	2,9	Å	HB*	65	→	HN	66	2,4	Å
HB2	63	→	HZ	45	3,1	Å	HA	65	→	HD*	68	3,3	Å
HB1	63	→	HZ	45	3,1	Å	HG1	66	→	HD*	10	3,6	Å
HD1*	63	→	HD21	56	3,8	Å	HN	66	→	HB2	65	3,7	Å
HD1*	63	→	HD22	56	3,5	Å	HN	66	→	HN	65	3,0	Å
HG	63	→	HA2	60	3,9	Å	HN	66	→	HB2	66	3,7	Å
HN	63	→	HN	60	3,8	Å	HN	66	→	HG1	66	3,8	Å
HN	63	→	HN	61	3,0	Å	HB2	66	→	HN	66	3,3	Å
HN	63	→	HN	62	2,4	Å	HG2	66	→	HN	66	3,6	Å
HB1	63	→	HB2	63	3,3	Å	HG1	66	→	HN	66	3,8	Å
HN	63	→	HG	63	3,9	Å	HA	66	→	HN	66	3,4	Å
HN	63	→	HB1	63	3,9	Å	HB*	66	→	HN	66	2,7	Å
HD2*	63	→	HN	63	3,8	Å	HA	66	→	HN	66	2,5	Å
HB1	63	→	HN	63	3,5	Å	HG*	66	→	HN	66	2,8	Å
HA	63	→	HN	63	3,9	Å	HB2	66	→	HD1	67	3,5	Å
HD1*	63	→	HN	63	3,5	Å	HB2	66	→	HN	67	3,7	Å
HB2	63	→	HN	63	3,6	Å	HN	66	→	HN	67	3,8	Å
HB*	63	→	HN	63	2,5	Å	HA	66	→	HN	67	5,0	Å
HA	63	→	HN	63	2,6	Å	HB2	66	→	HN	68	3,8	Å
HG*	63	→	HN	63	2,8	Å	HA	66	→	HN	68	3,0	Å
HB*	63	→	HN	63	2,8	Å	HD2	67	→	HN	65	3,8	Å
HB1	63	→	HN	64	3,9	Å	HD2	67	→	HN	66	3,8	Å
HA	63	→	HN	64	3,5	Å	HN	67	→	HN	66	2,6	Å
HB*	63	→	HN	64	3,1	Å	HG2	67	→	HE1	67	3,8	Å
HD**	63	→	HN	64	5,0	Å	HB2	67	→	HE1	67	4,0	Å
HA	63	→	HN	64	2,4	Å	HD1	67	→	HZ*	67	3,8	Å
HB2	63	→	HZ	68	3,3	Å	HE2	67	→	HZ*	67	3,9	Å
HD2*	63	→	HZ	68	3,3	Å	HB1	67	→	HN	67	3,5	Å
HB2	63	→	HZ	68	3,3	Å	HB*	67	→	HN	67	5,0	Å
HD2*	63	→	HZ	68	3,3	Å	HD*	67	→	HN	67	2,7	Å
HD2*	63	→	HE*	68	3,5	Å	HE*	67	→	HN	67	3,3	Å
HD2*	63	→	HZ	68	2,7	Å	HA	67	→	HN	67	2,7	Å
HB2	63	→	HZ	68	2,7	Å	HB*	67	→	HN	68	3,5	Å
HG	63	→	HZ	68	3,2	Å	HA	67	→	HN	68	3,1	Å
HB1	63	→	HZ	68	2,9	Å	HB*	67	→	HN	68	3,6	Å
HB2	63	→	HD*	78	3,6	Å	HB1	68	→	HB1	13	3,5	Å
HN	64	→	HB2	64	3,8	Å	HB1	68	→	HD2	13	3,7	Å
HB1	64	→	HN	64	3,7	Å	HA	68	→	HH2*	13	4,0	Å
HB2	64	→	HN	64	3,4	Å	HB2	68	→	HH2*	13	3,8	Å
HA	64	→	HN	64	3,3	Å	HE*	68	→	HE*	15	3,0	Å
HB*	64	→	HN	64	2,7	Å	HZ	68	→	HD2*	63	3,5	Å
HA	64	→	HN	65	2,5	Å	HN	68	→	HN	67	2,2	Å
HA	64	→	HN	66	5,0	Å	HB1	68	→	HB2	68	3,3	Å
HB1	64	→	HD*	68	4,1	Å	HB2	68	→	HN	68	3,7	Å
HG1	65	→	HB2	65	3,4	Å	HD*	68	→	HE*	68	3,0	Å
HB2	65	→	HG1	65	2,8	Å	HE*	68	→	HD*	68	3,2	Å
HA	65	→	HN	65	3,6	Å	HB1	68	→	HD*	68	3,6	Å
HB2	65	→	HN	65	3,5	Å	HN	68	→	HD*	68	3,4	Å
HB1	65	→	HN	65	3,6	Å	HZ	68	→	HD*	68	3,1	Å
HG*	65	→	HN	65	3,5	Å	HE*	68	→	HD*	68	2,8	Å
HB*	65	→	HG*	65	2,2	Å	HA	68	→	HN	68	5,0	Å
HB*	65	→	HN	65	2,9	Å	HB*	68	→	HN	68	2,4	Å
HA	65	→	HN	65	2,8	Å	HB2	68	→	HD*	68	2,8	Å
HE21	65	→	HE22	65	2,3	Å	HB1	68	→	HD*	68	2,9	Å
HB*	65	→	HN	65	2,7	Å	HA	68	→	HD*	68	4,0	Å
HB*	65	→	HG*	65	2,5	Å	HD*	68	→	HE*	68	2,4	Å
HG*	65	→	HE22	65	2,9	Å	HA	68	→	HN	69	3,3	Å
HG2	65	→	HG1	66	3,2	Å	HB*	68	→	HN	69	5,0	Å
HN	65	→	HN	66	3,9	Å	HA	68	→	HN	69	5,0	Å
HB*	65	→	HN	66	2,7	Å	HG2*	69	→	HH2*	13	3,6	Å
HG*	65	→	HN	66	3,5	Å	HA	69	→	HA	13	5,0	Å

HN	69	→	HG2*	69	3,7	Å	HN	73	→	HN	74	3,5	Å
HG1*	69	→	HN	69	3,7	Å	HA	73	→	HN	74	3,5	Å
HG2*	69	→	HN	69	3,4	Å	HB2	73	→	HE*	74	3,3	Å
HA	69	→	HN	69	3,6	Å	HE*	74	→	HE*	18	4,5	Å
HB**	69	→	HN	69	3,0	Å	HD*	74	→	HE*	18	3,1	Å
HA	69	→	HN	69	2,5	Å	HD*	74	→	HZ	18	3,7	Å
HB**	69	→	HN	69	3,5	Å	HB1	74	→	HD*	45	3,9	Å
HB	69	→	HN	69	2,6	Å	HA	74	→	HN	48	2,8	Å
HG2*	69	→	HN	70	3,4	Å	HE*	74	→	HE*	54	3,3	Å
HG1*	69	→	HN	70	3,7	Å	HD*	74	→	HB2	73	3,7	Å
HB	69	→	HN	70	3,5	Å	HN	74	→	HB2	73	3,8	Å
HA	69	→	HN	70	3,3	Å	HN	74	→	HN	73	2,4	Å
HN	69	→	HN	70	3,4	Å	HD*	74	→	HD22	73	3,8	Å
HB**	69	→	HN	70	3,6	Å	HD*	74	→	HB2	74	3,7	Å
HA	69	→	HN	70	2,2	Å	HB2	74	→	HD*	74	3,3	Å
HB	69	→	HN	70	2,6	Å	HN	74	→	HD*	74	4,2	Å
HG*2	69	→	HN	71	3,6	Å	HZ	74	→	HE*	74	3,3	Å
HA	70	→	HA	13	2,3	Å	HE*	74	→	HZ	74	2,7	Å
HB	70	→	HN	14	3,7	Å	HB2	74	→	HN	74	3,8	Å
HN	70	→	HG2*	69	3,8	Å	HB*	74	→	HN	74	2,8	Å
HN	70	→	HN	69	5,0	Å	HB*	74	→	HA	74	2,7	Å
HN	70	→	HG1*	70	3,5	Å	HA	74	→	HN	74	2,9	Å
HG2*	70	→	HN	70	3,2	Å	HB*	74	→	HN	74	2,5	Å
HB	70	→	HN	70	3,3	Å	HB*	74	→	HA	74	2,8	Å
HA	70	→	HN	70	3,6	Å	HB2	74	→	HD*	74	2,8	Å
HB	70	→	HN	70	2,3	Å	HB1	74	→	HA	74	3,6	Å
HB**	70	→	HN	70	2,5	Å	HE*	74	→	HZ	74	2,4	Å
HA	70	→	HN	70	2,5	Å	HB2	74	→	HN	75	4,0	Å
HG2*	70	→	HN	71	3,6	Å	HA	74	→	HN	75	3,4	Å
HA	70	→	HN	71	2,2	Å	HB*	74	→	HN	75	2,9	Å
HB	70	→	HN	71	5,0	Å	HD*	74	→	HN	75	3,5	Å
HG*1	70	→	HN	71	2,8	Å	HN	74	→	HN	75	3,2	Å
HG*1	70	→	HN	72	3,6	Å	HA	74	→	HN	75	2,2	Å
HB2	71	→	HN	16	3,6	Å	HA	75	→	HD21	12	3,3	Å
HN	71	→	HG2*	70	4,0	Å	HA	75	→	HA	12	2,5	Å
HB*	71	→	HN	71	3,1	Å	HA	75	→	HD22	12	3,1	Å
HA	71	→	HN	71	2,6	Å	HA	75	→	HA	12	4,0	Å
HB*	71	→	HN	71	3,2	Å	HA	75	→	HN	13	3,1	Å
HA	71	→	HN	72	3,1	Å	HN	75	→	HN	46	5,0	Å
HB*	71	→	HN	72	3,4	Å	HN	75	→	HA	74	3,7	Å
HA	71	→	HN	72	2,2	Å	HG2*	75	→	HN	75	3,7	Å
HB1	71	→	HD22	73	3,7	Å	HB	75	→	HN	75	3,7	Å
HA	71	→	HN	73	3,2	Å	HB	75	→	HA	75	2,3	Å
HB2	71	→	HD21	73	3,0	Å	HG*	75	→	HN	75	3,1	Å
HB2	72	→	HA	72	4,0	Å	HG*	75	→	HA	75	2,7	Å
HB2	72	→	HN	72	3,4	Å	HA	75	→	HN	75	3,0	Å
HG2	72	→	HN	72	3,6	Å	HG2*	75	→	HN	76	3,5	Å
HA	72	→	HN	72	2,6	Å	HA	75	→	HN	76	2,0	Å
HB2	72	→	HN	73	3,7	Å	HG*	75	→	HN	76	3,7	Å
HN	72	→	HN	73	2,8	Å	HG2*	75	→	HN	77	3,8	Å
HA	72	→	HN	73	3,1	Å	HA	75	→	HN	94	3,3	Å
HB*	73	→	HN	49	3,3	Å	HB*	76	→	HE*	9	3,7	Å
HB2	73	→	HN	73	3,8	Å	HA	76	→	HZ	9	3,1	Å
HB1	73	→	HN	73	3,7	Å	HB*	76	→	HZ*	14	3,8	Å
HD22	73	→	HN	73	3,4	Å	HB2	76	→	HZ*	14	3,8	Å
HB*	73	→	HN	73	2,6	Å	HB*	76	→	HZ*	14	3,4	Å
HA	73	→	HN	73	2,8	Å	HA	76	→	HA	45	2,7	Å
HB*	73	→	HN	73	2,5	Å	HG2	76	→	HZ	45	4,0	Å
HD21	73	→	HD22	73	2,1	Å	HA	76	→	HA	45	3,5	Å
HB2	73	→	HD*	74	3,4	Å	HA	76	→	HN	46	3,5	Å
HB2	73	→	HN	74	3,7	Å	HG1	76	→	HZ	68	3,6	Å

HG2	76	→	HN	76	3,8	Å	HN	79	→	HB1	79	3,3	Å
HG1	76	→	HN	76	3,5	Å	HD2*	79	→	HA	79	3,6	Å
HB*	76	→	HN	76	2,9	Å	HB2	79	→	HN	79	3,5	Å
HA	76	→	HN	76	5,0	Å	HB1	79	→	HN	79	3,2	Å
HB*	76	→	HN	77	4,1	Å	HA	79	→	HN	79	3,9	Å
HA	76	→	HN	77	2,2	Å	HB*	79	→	HN	79	2,3	Å
HB2	77	→	HE*	9	3,9	Å	HG*	79	→	HN	79	4,2	Å
HB1	77	→	HZ	9	3,9	Å	HA	79	→	HN	79	2,9	Å
HB2	77	→	HN	9	3,8	Å	HG	79	→	HN	80	3,7	Å
HA	77	→	HN	10	2,8	Å	HD1*	79	→	HN	80	3,5	Å
HN	77	→	HZ*	14	3,2	Å	HA	79	→	HN	80	3,1	Å
HN	77	→	HN	44	2,9	Å	HD**	79	→	HN	80	2,7	Å
HB1	77	→	HB2	77	3,9	Å	HA	79	→	HN	80	2,1	Å
HB2	77	→	HD22	77	3,6	Å	HG	79	→	HN	80	3,0	Å
HA	77	→	HN	77	2,9	Å	HB*	79	→	HN	80	3,3	Å
HB*	77	→	HN	77	2,8	Å	HD1*	79	→	HN	84	3,7	Å
HD22	77	→	HN	77	2,9	Å	HN	80	→	HA	79	3,5	Å
HD21	77	→	HN	77	2,4	Å	HN	80	→	HG2*	80	3,6	Å
HD21	77	→	HD22	77	2,1	Å	HA	80	→	HN	80	2,8	Å
HB*	77	→	HN	77	2,7	Å	HB	80	→	HN	80	2,9	Å
HB2	77	→	HA	77	3,9	Å	HB*	81	→	HN	82	3,7	Å
HB2	77	→	HD21	77	3,2	Å	HB1	82	→	HN	82	4,1	Å
HA	77	→	HD21	77	3,6	Å	HA	82	→	HN	82	3,1	Å
HB2	77	→	HN	78	4,0	Å	HA	82	→	HN	83	3,5	Å
HB*	77	→	HN	78	3,2	Å	HN	83	→	HN	81	3,6	Å
HA	77	→	HN	78	2,3	Å	HN	83	→	HN	82	3,7	Å
HB*	77	→	HN	78	2,9	Å	HA	83	→	HN	83	3,7	Å
HB2	77	→	HN	94	3,7	Å	HA	83	→	HN	84	3,3	Å
HN	78	→	HN	8	2,6	Å	HA1	84	→	HN	84	3,4	Å
HD*	78	→	HD*	42	3,7	Å	HA*	84	→	HN	85	3,9	Å
HD*	78	→	HN	63	5,0	Å	HG1	85	→	HN	5	3,7	Å
HB*	78	→	HN	63	5,0	Å	HD2	85	→	HD1	7	3,7	Å
HA	78	→	HN	63	3,3	Å	HB2	85	→	HN	85	3,7	Å
HN	78	→	HA	78	3,9	Å	HG*	85	→	HN	85	3,7	Å
HD*	78	→	HE*	78	3,2	Å	HN	86	→	HN	87	3,8	Å
HB2	78	→	HE*	78	4,1	Å	HB1	86	→	HN	87	3,6	Å
HB2	78	→	HD*	78	3,5	Å	HB*	87	→	HA	87	3,9	Å
HE*	78	→	HD*	78	2,9	Å	HB*	87	→	HN	87	3,3	Å
HB2	78	→	HN	78	3,6	Å	HA1	88	→	HN	88	3,3	Å
HA	78	→	HN	78	3,3	Å	HD22	89	→	HD21	89	3,3	Å
HB*	78	→	HN	78	2,5	Å	HA	90	→	HD22	89	3,3	Å
HA	78	→	HN	78	5,0	Å	HB*	90	→	HN	90	3,4	Å
HB*	78	→	HN	78	2,7	Å	HA	90	→	HN	90	3,5	Å
HD*	78	→	HN	78	3,6	Å	HA*	92	→	HN	92	3,9	Å
HD*	78	→	HE*	78	2,4	Å	HG2*	93	→	HE3	7	3,5	Å
HB2	78	→	HD*	78	3,1	Å	HB	93	→	HD22	77	3,6	Å
HB1	78	→	HA	78	3,3	Å	HN	95	→	HB2	95	3,8	Å
HB1	78	→	HD*	78	3,1	Å	HA	96	→	HN	96	3,2	Å
HA	78	→	HD*	78	3,0	Å	HN	96	→	HN	97	3,6	Å
HE*	78	→	HD*	78	2,8	Å	HB2	98	→	HN	98	3,6	Å
HD*	78	→	HE*	78	2,7	Å	HB1	98	→	HN	100	3,9	Å
HA	78	→	HN	79	3,3	Å	HG1	99	→	HN	99	4,0	Å
HB*	78	→	HN	79	2,8	Å	HA	99	→	HN	100	3,3	Å
HA	78	→	HN	79	2,1	Å	HN	101	→	HN	102	3,5	Å
HD1*	79	→	HN	6	3,7	Å	HG1	102	→	HB1	102	3,7	Å
HD1*	79	→	HN	7	3,7	Å	HG2	102	→	HA	102	3,8	Å
HA	79	→	HA	7	2,6	Å	HG1	102	→	HA	102	4,1	Å
HD2*	79	→	HD1	7	3,4	Å	HN	103	→	HN	100	3,1	Å
HA	79	→	HN	8	3,3	Å	HN	103	→	HN	101	3,7	Å
HN	79	→	HA	78	3,9	Å							
HN	79	→	HB2	79	3,7	Å							

(3) ¹⁵N-Relaxationsdaten von Saratin

		XEASY/RELAXFIT/DYNAMICS							
AS	AS-NR	R1/s-1	abs.Fehler	R2/s-1	abs.Fehler	NOE	abs. Fehler	S ²	abs. Fehler
Glu	1								
Glu	2								
Arg	3	1,1408	0,4859	4,0870	0,1521	0,5748	0,0141	0,3847	0,0143
Glu	4	1,2922	0,5555	4,4110	0,2571	0,7744	0,0229	0,4205	0,0242
Asp	5	1,3393	0,7131	7,1626	0,4754	0,7577	0,0177	0,6791	0,0435
Cys	6	1,3219	0,5370	6,5633	0,2956	0,7779	0,0181	0,6240	0,0276
Trp	7	1,2056	0,5096	7,7775	0,4126	0,9206	0,0282	0,7370	0,0368
Thr	8	1,3582	0,9559	8,0910	0,2370	0,7626	0,0224	0,7664	0,0233
Phe	9	1,3331	0,6190	7,4483	0,6546	0,7570	0,0148	0,7062	0,0570
Tyr	10	1,4990	0,9431	8,1283	0,1743	0,8381	0,0175	0,7716	0,0156
Ala	11	1,4491	0,9676	10,3945	0,3696	0,7939	0,0241	0,9859	0,0252
Asn	12	1,4454	0,9594	9,0978	0,3044	0,7721	0,0204	0,8634	0,0303
Arg	13	1,1742	0,5650	8,0612	0,3929	0,7425	0,0169	0,7613	0,0387
Lys	14	0,0000	0,0000	8,2532	1,4934	0,8018	0,0170	0,2109	0,1510
Tyr	15	1,3538	0,9318	6,1830	0,4256	0,8617	0,0245	0,5879	0,0390
Thr	16	1,4687	0,6939	7,0875	0,1985	0,7604	0,0178	0,6717	0,0194
Asp	17	1,1556	0,5977	8,0000	0,2113	0,6618	0,0161	0,7541	0,0193
Phe	18	1,2996	0,7904	5,8266	0,3358	0,6815	0,0196	0,5509	0,0328
Asp	19	1,2963	0,6883	7,8802	0,3391	0,7840	0,0096	0,7469	0,0313
Lys	20	1,5121	0,8748	5,8509	0,3024	0,7030	0,0185	0,5539	0,0270
Ser	21	1,4554	0,6586	6,6516	0,1523	0,7133	0,0145	0,6291	0,0148
Phe	22	1,4676	0,7292	9,6562	0,3479	0,8052	0,0078	0,9159	0,0321
Lys	23	0,8725	0,4111	1,6661	0,1943	0,5276	0,0112	0,0538	0,0511
Lys	24	1,3768	0,6825	8,1822	0,3163	0,6794	0,0160	0,7721	0,0307
Ser	25	1,5511	1,0455	8,1911	0,3045	0,7849	0,0215	0,7777	0,0275
Ser	26	1,4660	0,7151	7,6620	0,1618	0,7353	0,0157	0,7251	0,0159
Asp	27	1,3982	0,6990	8,5312	0,1595	0,6942	0,0161	0,8058	0,0157
Leu	28	1,7049	0,8220	5,6994	0,3779	0,7461	0,0127	0,5420	0,0346
Asp	29	1,3765	0,6848	8,0099	0,3262	0,8988	0,0198	0,7649	0,0623
Glu	30	1,3764	0,7698	7,8263	0,3035	0,8622	0,0176	0,7430	0,0295
Cys	31	1,4676	0,7326	9,6562	0,3593	0,8052	0,0078	0,9159	0,0329
Lys	32	1,4929	1,0535	8,1299	0,3325	0,9387	0,0282	0,7719	0,0320
Lys	33	1,4676	0,7087	9,6562	0,3595	0,8052	0,0078	0,9158	0,0330
Thr	34	1,4660	0,7313	7,6620	0,1627	0,7353	0,0157	0,7251	0,0156
Cys	35	0,0000	0,0000	8,6251	0,5715	0,8308	0,0175	0,0442	0,1188
Phe	36	1,4801	1,0732	8,0809	0,3596	0,7868	0,0216	0,7673	0,0337
Lys	37	1,4523	0,7019	8,1452	0,4021	0,7629	0,0127	0,7719	0,0364
Thr	38	1,3269	0,5760	7,7905	0,4506	0,8012	0,0207	0,7395	0,0403
Glu	39	1,6298	0,7615	9,9766	0,1907	0,8300	0,0129	0,9469	0,0177
Tyr	40	1,2843	0,6739	9,8878	0,3575	0,6793	0,0202	0,9303	0,0232
Cys	41	1,3637	0,7901	16,2196	0,7706	0,7708	0,0162	0,7562	0,2527
Tyr	42	1,3951	0,8667	11,4905	0,2069	0,8109	0,0244	0,7736	0,2585
Ile	43	0,9052	0,4717	28,1379	0,9279	0,4877	0,0109	0,4642	0,1804
Val	44	1,2447	0,3719	5,9909	0,2593	0,8313	0,0214	0,5704	0,0244
Phe	45	1,6413	1,0000	8,2711	0,3613	0,7822	0,0162	0,7855	0,0324
Glu	46	1,4780	0,9838	7,7000	0,2554	0,8007	0,0236	0,7311	0,0249
Asp	47	1,5892	0,9217	6,1838	0,3462	0,7724	0,0158	0,5882	0,0323
Thr	48	1,2963	0,6849	7,8802	0,3468	0,7840	0,0096	0,7469	0,0302
Val	49	1,4553	0,7572	9,6699	0,2908	0,7567	0,0219	0,9153	0,0277
Asn	50	1,4168	0,6965	7,4593	0,3820	0,7599	0,0198	0,7072	0,0373

Lys	51	1,4964	0,6816	7,6744	0,3990	0,7664	0,0212	0,7280	0,0366
Glu	52	1,4327	0,6506	6,4725	0,2586	0,6880	0,0140	0,6120	0,0244
Cys	53	1,4365	0,6097	7,3699	0,2886	0,7842	0,0165	0,7002	0,0274
Tyr	54	1,4714	0,9062	8,4181	0,2499	0,7664	0,0261	0,7991	0,0237
Tyr	55	1,3900	0,8576	10,0631	0,3172	0,7596	0,0189	0,9523	0,0256
Asn	56	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,8041	0,0184	0,0000	0,0000
Glu	57	1,5039	0,9227	10,5328	0,2126	0,7406	0,0208	0,9995	0,0120
Val	58	1,6504	0,8326	7,6334	0,2864	0,8518	0,0153	0,7252	0,0267
Asp	59	1,3982	0,6924	8,5312	0,1573	0,6942	0,0161	0,8058	0,0153
Gly	60	1,3360	0,6223	9,3708	0,2863	0,7570	0,0215	0,8865	0,0279
Glu	61	1,3327	0,6679	9,9462	0,3575	0,7728	0,0164	0,9408	0,0308
Glu	62	1,3208	0,6632	8,7507	0,3536	0,6863	0,0174	0,8253	0,0333
Leu	63	1,1971	0,6685	8,9006	0,3681	0,7831	0,0198	0,8433	0,0337
Asp	64	0,9028	0,4563	2,1773	0,2386	0,1216	0,0078	0,2024	0,0219
Gln	65	1,5352	0,7343	7,4872	0,2243	0,7215	0,0123	0,7084	0,0197
Glu	66	1,4099	0,7611	8,2414	0,2860	0,7484	0,0158	0,7802	0,0262
Lys	67	1,4929	1,0468	8,1299	0,3337	0,9387	0,0282	0,7719	0,0304
Phe	68	1,3885	0,8986	8,1623	0,3258	0,8065	0,0185	0,7748	0,0290
Val	69	1,4869	0,8702	8,9650	0,2368	0,7984	0,0220	0,8509	0,0217
Val	70	1,3322	0,5447	7,3257	0,2301	0,7943	0,0086	0,6956	0,0202
Asp	71	1,3243	0,6011	9,4684	0,2210	0,7987	0,0174	0,8981	0,0208
Glu	72	1,3128	0,6186	8,7747	0,2751	0,7458	0,0160	0,8299	0,0258
Asn	73	1,2203	0,6307	8,6932	0,2710	0,8212	0,0257	0,8244	0,0261
Phe	74	1,0382	0,4146	1,9662	0,2150	0,2665	0,0071	0,1852	0,0199
Thr	75	1,5326	1,0004	8,3729	0,2031	0,7565	0,0174	0,7931	0,0193
Glu	76	1,6074	0,9488	9,2310	0,1227	0,8282	0,0185	0,8763	0,0112
Asn	77	1,1297	0,5414	2,5864	0,3559	0,2558	0,0072	0,2442	0,0310
Tyr	78	1,3922	0,8982	10,1743	0,3503	0,8259	0,0285	0,9649	0,0265
Leu	79	1,5588	0,9639	10,2056	0,2881	0,7893	0,0161	0,9684	0,0218
Thr	80	1,4091	0,7419	0,3078	0,8868	0,3728	0,0084	0,0000	0,0000
Asp	81	0,9028	0,4577	2,1773	0,2366	-0,5185	0,0088	0,1939	0,0209
Cys	82	1,3047	0,6262	6,4626	0,1927	0,7573	0,0195	0,6124	0,0177
Glu	83	1,3055	0,6193	5,6395	0,2920	0,7177	0,0163	0,5344	0,0265
Gly	84	1,4257	0,6502	3,0921	0,2177	0,3453	0,0078	0,2891	0,0195
Lys	85	1,1444	0,5751	2,3944	0,3231	-0,1004	0,0119	0,2209	0,0274
Asp	86	1,0745	0,5406	1,7382	0,3585	-0,1013	0,0125	0,1634	0,0312
Ala	87	0,0000	0,0000	3,3177	1,6272	-0,0240	0,0133	0,4629	0,1387
Gly	88	1,1003	0,5794	0,9934	0,4920	-0,5728	0,0096	0,0995	0,0371
Asn	89	0,8302	0,4369	0,6161	1,0293	-0,9261	0,0356	0,1120	0,0606
Ala	90	0,8310	0,3563	0,7962	0,8228	-1,6359	0,0235	0,1108	0,0450
Ala	91	0,9028	0,4585	2,1773	0,2385	-0,5185	0,0088	0,1939	0,0211
Gly	92	0,8315	0,3858	0,5418	0,5860	-1,6791	0,0213	0,0721	0,0360
Thr	93	0,8765	0,3680	1,0692	0,4576	-1,1033	0,0152	0,1075	0,0345
Gly	94	0,9107	0,3834	0,8149	0,5589	-1,2302	0,0151	0,0956	0,0394
Asp	95	0,8725	0,4136	1,6661	0,1955	-0,7325	0,0125	0,1463	0,0176
Glu	96	0,9062	0,3974	0,9692	0,4494	-0,6191	0,0132	0,1013	0,0346
Ser	97	0,8825	0,4175	1,3369	0,2612	-1,1448	0,0226	0,1153	0,0223
Asp	98	1,0382	0,4202	1,9662	0,2163	-0,5451	0,0080	0,1759	0,0183
Glu	99	0,9249	0,4194	1,4150	0,3459	-0,9494	0,0148	0,1279	0,0306
Val	100	0,9052	0,4767	2,1527	0,3040	-0,9678	0,0135	0,1849	0,0250
Asp	101	1,0073	0,3957	1,9370	0,2905	-1,1472	0,0102	0,1661	0,0220
Glu	102	0,7819	0,3787	1,2906	0,3719	-1,8964	0,0200	0,1262	0,0264
Asp	103	0,7728	0,3376	1,3870	0,3512	-1,9643	0,0110	0,1196	0,0220

(4) TALOS-Winkel von Saratin

Nr.	AS	φ	$\delta \varphi$	ψ	$\delta \psi$
7	W	-125.000	29.000	147.000	14.000
8	T	-113.000	8.000	126.000	7.000
9	F	-88.000	22.000	134.000	7.000
11	A	-149.000	29.000	147.000	14.000
12	N	-104.000	19.000	138.000	13.000
13	R	-141.000	9.000	155.000	8.000
14	K	-132.000	29.000	154.000	16.000
19	D	-67.000	11.000	-34.000	13.000
20	K	-76.000	16.000	-24.000	21.000
22	F	-118.000	21.000	141.000	14.000
23	K	-127.000	26.000	151.000	13.000
24	K	-129.000	14.000	138.000	18.000
25	S	-123.000	28.000	150.000	17.000
26	S	-93.000	16.000	129.000	24.000
27	D	-99.000	28.000	117.000	24.000
28	L	-64.000	10.000	-34.000	13.000
29	D	-62.000	4.000	-42.000	7.000
30	E	-72.000	20.000	-33.000	24.000
31	C	-64.000	6.000	-42.000	7.000
32	K	-63.000	5.000	-39.000	5.000
33	K	-62.000	6.000	-42.000	5.000
34	T	-65.000	11.000	-44.000	8.000
36	F	-83.000	12.000	-16.000	14.000
38	T	-93.000	15.000	116.000	21.000
40	Y	-86.000	18.000	-3.000	20.000
43	I	-120.000	17.000	138.000	11.000
44	V	-125.000	11.000	133.000	13.000
45	F	-127.000	16.000	145.000	12.000
46	E	-135.000	17.000	139.000	17.000
49	V	-68.000	11.000	-35.000	10.000
50	N	-85.000	18.000	-2.000	21.000
54	Y	-132.000	10.000	145.000	15.000
55	Y	-125.000	13.000	142.000	15.000
61	E	-63.000	6.000	-36.000	15.000
62	E	-83.000	20.000	-13.000	16.000
63	L	-70.000	12.000	134.000	29.000
64	D	-82.000	13.000	123.000	28.000
65	Q	-61.000	9.000	-32.000	10.000
66	E	-74.000	15.000	-23.000	20.000
68	F	-105.000	25.000	136.000	10.000
69	V	-133.000	11.000	150.000	14.000
70	V	-81.000	18.000	126.000	9.000
74	F	-126.000	22.000	153.000	17.000
75	T	-133.000	12.000	146.000	11.000
76	E	-100.000	22.000	138.000	14.000
77	N	-121.000	22.000	136.000	13.000
78	Y	-114.000	23.000	132.000	15.000
80	T	-109.000	16.000	132.000	24.000

(5) Residuale 1H-15N-Dipolkopplungskonstanten von Saratin

Aminosäure	Nr.	W2 [ppm]	W1 [ppm]	Kopplung [Hz]
Cys	6	7,53	119,63	-27,2
Trp	7	8,17	118,81	-5,8
Thr	8	9,40	118,67	-2,2
Tyr	10	8,83	129,45	19,2
Ala	11	6,89	116,18	29,9
Tyr	15	4,37	119,19	-16,5
Asp	17	5,63	120,10	22,7
Lys	20	7,69	116,70	-12,9
Ser	21	7,49	111,93	-2,2
Lys	24	7,89	118,99	8,5
Ser	26	8,19	115,77	1,3
Cys	35	8,34	124,20	-34,3
Lys	37	7,04	113,57	-16,5
Thr	38	7,80	120,31	-9,3
Val	44	8,72	121,24	-2,2
Phe	45	9,97	127,60	-5,8
Glu	46	9,76	121,68	1,3
Asn	50	7,65	115,94	-27,2
Glu	52	7,11	114,92	-9,3
Cys	53	8,85	117,52	22,7
Asn	56	8,43	121,42	-2,2
Gln	65	9,26	126,11	-30,7
Phe	68	7,00	118,87	-27,2
Val	69	8,47	118,78	-16,5
Glu	72	9,02	124,50	29,9
Phe	74	8,29	122,80	-5,8
Thr	75	9,33	107,41	-16,5
Asp	81	8,17	123,09	-27,2
Cys	82	8,75	121,86	1,3
Asp	86	8,33	121,27	-5,8
Gly	88	8,34	107,71	-2,2
Asn	89	8,14	118,81	-5,8
Gly	92	8,25	108,23	-2,2
Gly	94	8,46	111,46	-2,2
Asp	95	8,43	120,63	29,9
Glu	96	8,47	121,42	-2,2
Val	100	8,06	120,89	-2,2
Asp	101	8,35	124,79	-5,8
Glu	102	8,24	122,06	-9,3
Asp	103	7,99	127,08	-5,8

Tabelle 16 Ermittelte Kopplungskonstanten [Hz]

Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Hans-Robert Kalbitzer, Institut für Biophysik und physikalische Biophysik an der Universität Regensburg, unter dessen Anleitung ich meine Promotionsarbeit über die Proteine Saratin, Kollagen und Cam-HrTH-I anfertigen konnte.

Dr. Fritz Huber, der mir den Einstieg in die NMR erleichterte, und Dr. Werner Kremer, der als mein Betreuer, eine große Hilfe bei den NMR-Messungen war, bin ich ebenfalls zu Dank verpflichtet.

Für die Bereitstellung der Protein-Proben von Saratin und Kollagen bedanke ich mich herzlich bei der Firma Merck (Darmstadt), insbesondere bei Dr. Matthias Frech und Dr. Jörg Bomke für die nette Zusammenarbeit.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls Prof. Dr. Kalbitzer und des Lehrstuhls Prof. Dr. Brunner danke ich außerordentlich für die entspannte, freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre, die ich dort während meiner Promotionszeit erleben durfte.

Ein ganz spezieller Dank gilt meinen Zimmerkollegen Renate "Ich-bin-nicht-da" Kirchhöfer, Dr. Fritz "Lord-Flat-Screenchen" Huber und Ralph "Magic-Man" Elsner, die mir über lange Zeit die Zusammenarbeit zum Vergnügen machten. Ralph Elsner danke ich insbesondere für manch sinnige und unsinnige Diskussion über Wissenschaft, Forschung und die Bedeutung von Trinkflaschen im Triathlon. "Go, Ralph Go!", möge der "Iron Man" mit dir sein!

Meinen Zimmernachbarn Daniela „La Grisu“ Baumer, Christian „Groggy“ Gröger und Rainer „Feuerspucker“ Hartl, kurz "Die Brunnitz", danke ich herzlichst für manche Anregung und Klärung, auch von außer-physikalischen Fragen. Möge Daniela Baumer den Schicksalsberg (hyperpolarisiertes Xenon) über 80% ü.N. anheizen, Christian Gröger ihn erklimmen und Rainer Hartl, als zugereister "Kalbitz", mit seinem Feuer die Brücke zwischen den Welten sichern. Danken möchte ich auch Ingrid "Kuno" Cuno, der schützenden Hand über allen Brunnitz.

Einen ganz besonderen Dank richte ich an Dörte „Wir-tun´s!“ Rochelt, die mich - wie auch viele andere - mit ihrer Art ab und zu an das Wesentliche erinnerte: Freude.

Außerordentlich danke ich Christina „Karate-Kid“ Schreier für die Hilfsbereitschaft und Mühe, mir den Zugang in ihre Arbeitswelt zu eröffnen.

Peter-Normen Geier-Kachel danke ich dafür, daß seine Tür für leichte Antworten auf schwerer Fragen und für schwere Antworten auf leichten Fragen immer offenstand.

Mein Dank gilt auch Michael „Spermy“ Spörner für die nette experimentelle Zusammenarbeit und die Erkenntnis, daß das Leben auch im Alter schön ist.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Wolfram „Die-Option oder Darf-der-Pappa-auch-mal“ Gronwald für die Hilfsbereitschaft und Beantwortung zahlreicher - auch doppelt gestellter - Fragen.

Mit einer tiefen Verbeugung danke ich auch Thorsten „Na, Naa, Na, Na, Naa“ Graf, dessen Rücken meine Fahrt bremste, Jochen „Der-Fall-ARCOR“ Trenner, dank dem meine Telefon-Rechnung vielleicht nie mehr das wird was sie einmal war, Konrad „Handy-Man“ Brunner, der lehrte, daß Hochzeiten, Taufen und andere Familienfeiern auch ihre guten Seiten haben, und Alexander „Der-Wieland-sei-mit-dir“ Fink, für verborgene Sichtweisen.

Mein größter Dank aber gilt meinem lieben Mann Klaus für Klaus.

Erklärung

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

Regensburg, 31.03.2005

(Barbara Domogalla)