

Charakterisierung von Protein-Ligand-Komplexen und Faltungsintermediaten mittels NMR-Spektroskopie

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

vorgelegt von

Norman Patrick Kachel

aus Wertheim

Regensburg

Juli 2006

Promotionsgesuch eingereicht am: 18.07.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. R. Warth

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Brunner

3. Prüfer: Prof. Dr. R. Sterner

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	4
2 Methodische Grundlagen	8
2.1 NMR-spektroskopische Proteinstrukturbestimmung	8
2.2 Chemischer und konformationeller Austausch	11
2.3 Hochdruck-NMR	14
2.4 Untersuchung von Proteininteraktionen mittels NMR-Spektroskopie	19
2.5 Protein-Ligand-Docking	21
3 Faltungsintermediate des menschlichen Prionproteins	25
3.1 Einleitung	25
3.2 Materialien und Methoden	29
3.3 Ergebnisse	32
3.3.1 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen	33
3.3.2 Druckabhängigkeit der Signalvolumina	43
3.3.3 Identifizierung von Faltungsintermediaten	48
3.3.4 Einfluss der Temperatur	49
3.3.5 Vergleich der Prionproteine von Mensch und Hamster	53
3.4 Diskussion	58
3.4.1 Faltungsintermediate und konformationelle Gleichgewichte	59
3.4.2 Strukturelle Änderungen hervorgerufen durch hohen Druck	61
3.4.3 Strukturelle Basis von Artenbarrieren	64
3.5 Schlussfolgerungen	65

4 Struktur und Ligandwechselwirkungen der PDZ2 von PTP-Bas	66
4.1 Einleitung	66
4.2 Materialien und Methoden	70
4.3 Ergebnisse	74
4.3.1 Struktur der PDZ2b von PTP-Bas	74
4.3.2 Interaktion der PDZ2 mit Proteinen	78
4.3.3 Interaktion der PDZ2 mit Phosphatidylinositolphosphaten	80
4.4 Diskussion	93
4.4.1 Bindung von Proteinen	93
4.4.2 Bindung von Phosphatidylinositolphosphaten	95
4.5 Schlussfolgerungen	97
 5 Interaktion von HPr und HPr-Kinase/Phosphatase	 99
5.1 Einleitung	99
5.2 Materialien und Methoden	102
5.3 Ergebnisse und Diskussion	103
 6 Literaturverzeichnis	 106
 7 Anhang	 116
7.1 Abkürzungen	116
7.2 Korrelationsanalyse der chemischen Verschiebungen von Prionproteinen	117
7.3 Zuordnung der Lipidresonanzen	121
7.4 Ergebnisse der Sättigungstransferexperimente	121
 8 Danksagungen	 123

Zusammenfassung

Die NMR-Spektroskopie zeichnet sich bei der Charakterisierung von Proteinen besonders darin aus, dass sie es erlaubt, das Verhalten von Proteinen bei Änderungen der Umgebungsbedingungen oder Wechselwirkungen mit anderen Molekülen im atomaren Detail zu verfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kombination von hochauflösender NMR-Spektroskopie mit der Anwendung von hohem hydrostatischen Druck dazu genutzt, Faltungsintermediate des menschlichen Prionproteins zu stabilisieren und zu charakterisieren. Zudem wurde die Wechselwirkung von Proteinen mit anderen Proteinen und kleinen Liganden NMR-spektroskopisch charakterisiert. Es wurde die Bindung von Proteinen und Lipiden an die PDZ2-Domäne der Phosphatase PTP-Bas sowie die Wechselwirkung des Proteins HPr mit dem Enzym HPrK/P im Detail analysiert.

Infektiöse Prionen rufen schwere neurodegenerative Erkrankungen hervor, die übertragbare spongiforme Enzephalopathien (TSEs) genannt werden. Gemäß der *protein only* Hypothese bestehen diese Prionen einzig aus PrP^{Sc} , einem Isomer des zellulären Prionproteins PrP^{C} . Die Umfaltung des Wirtsproteins PrP^{C} durch das infektiöse PrP^{Sc} führt zur speziesspezifischen Ausbreitung dieser Krankheiten. Durch Anwendung von Druck bis zu 200 MPa gelang es, Faltungsintermediate des menschlichen Prionproteins *huPrP*(23-230) und des verkürzten *huPrP*(121-230) zu stabilisieren und diese mittels NMR-Experimenten zu charakterisieren. Signifikante Unterschiede in der Druckantwort beider Fragmente weisen nur E186, H187, T192, E207, E211 und Y226 auf, was darauf hindeutet, dass der ungefaltete N-Terminus (Reste 23-120) hier kurzlebige Interaktionen mit dem strukturierten Kern (Reste 121-230) eingeht. Die Hochdruckdaten deuten darauf hin, dass das Prionprotein in zwei Konformationen N_1 und N_2 vorliegt, die eine recht geringe Differenz ihrer molaren freien Enthalpien von 3,0 kJ/mol aufweisen. Bei Normaldruck liegen bereits 29 % des Proteins in der druckstabilisierten Form N_2 vor. Es liegt ein zweiter konformationeller Austauschprozess zu zwei Faltungsintermediaten I_1 und I_2 vor. Die molaren freien Enthalpien des Übergangs liegen bei 10,8 kJ/mol (I_1) und 18,6 kJ/mol (I_2). Weiterhin deutet die Druckantwort des eigentlich ungefalteten N-Terminus (Reste 23-120) auf die Existenz von vier Teilbereichen

hin, die in schnellem konformationellen Austausch mit gefalteten Strukturen stehen, deren Anteil sich mit dem Druck erhöht. Die druckempfindlichsten Regionen des menschlichen Prionproteins sind die Schleife zwischen β -Strang 1 und α -Helix 1 sowie die dem Lösungsmittel zugängliche Seite von α -Helix 3. Hier könnte der Eintrittspunkt des infektiösen Konformers bei der Umwandlung zu PrP^{Sc} liegen. In dieser Arbeit durchgeführte Vergleiche mit der Druckabhängigkeit des Prionproteins aus Hamstern zeigen, dass sich die konformationelle Heterogenität beider Proteine vor allem in diesen Bereichen unterscheidet. Hierin könnte die molekulare Ursache der Artenbarriere für die Übertragung von Prionerkrankungen zwischen Mensch und Hamster liegen. Dies erlaubt allgemeine Rückschlüsse auf die Mechanistik von Artenbarrieren bei TSEs.

PTP-Bas ist als menschliche Proteintyrosinphosphatase Bestandteil zellulärer Signalverarbeitungssysteme. Ihre Proteinbindefähigkeit wird unter anderem durch alternatives Spleißen ihrer PDZ2-Domäne reguliert. Während PDZ2a Proteine wie das Tumorsuppressorprotein APC bindet, zeigt die Spleißvariante PDZ2b diese Fähigkeit nicht mehr. In dieser Arbeit wird die NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur der PDZ2b präsentiert. Die strukturelle Ursache der Änderung der Bindungsspezifität ist eine Reorientierung der Schleife zwischen β -Strang 2 und 3, die in der PDZ2b fünf zusätzliche Aminosäuren enthält. Dies führt zu einer Umstrukturierung der Proteinbindetasche. In NMR-Titrationsstudien konnte dennoch eine schwache Bindung eines C-terminalen APC-Peptids mit einer Dissoziationskonstante von 540 μM detektiert werden. Eine festere Bindung wird allerdings durch den sterischen Anspruch der Insertion verhindert. Neben Proteinen kann die PDZ2-Domäne auch Phosphatidylinositolphosphate (PIPs) binden. In NMR-Titrationsstudien konnte gezeigt werden, dass die PDZ2b Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat mit einer Dissoziationskonstante von 230 μM bindet. Die Bindetasche überlappt in weiten Teilen mit der Proteinbindetasche, was vermuten lässt, dass sich die beiden Bindungen kompetitiv beeinflussen. Durch Bindungsstudien an verschiedenen PIPs gelang es zum ersten Mal, einen strukturellen Mechanismus der PIP-Bindung durch PDZ-Domänen zu identifizieren und ein Modell des Komplexes zu erstellen. Es gibt hierbei nur geringe Spezifität für die Phosphorylierung des Inositolrings. Für die Bindung sind hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den Fettsäureketten essentiell. Die PIP-vermittelte Membranassoziation der PDZ2 wird zusätzlich durch einen negativ geladenen Bereich auf der Proteinoberfläche verstärkt. So kann PTP-Bas in bestimmte PIP-reiche Membranbereiche gelenkt werden.

Als weiteres Beispiel für Protein-Protein-Interaktionen wurde die Wechselwirkung von HPr aus *Staphylococcus aureus* mit der HPr-Kinase/Phosphatase (HPrK/P) aus *Staphylococcus xylosus* quantifiziert. HPr und HPrK/P sind Teile eines Phosphat übertragenden Systems, das zur Aufnahme von Kohlenhydraten in die Zelle dient. Durch NMR-spektroskopische Messungen wurde die Dissoziationskonstante und die Stöchiometrie der Bindung von HPr an die HPrK/P auf 0,10 mM und ein Molekül HPr pro HPrK/P-Monomer bestimmt.

1 Einleitung

Proteine zählen auf Grund ihrer zahlreichen Aufgaben zu den bedeutendsten biologischen Makromolekülen. Sämtliche lebenden Organismen sind von der Funktion und dem korrekten Zusammenspiel vieler verschiedener Proteine abhängig. Als Katalysatoren, Enzyme genannt, beschleunigen Proteine biochemische Reaktionen und ermöglichen so den Ablauf verschiedenster Stoffwechselwege. Zusätzlich erlaubt die Aktivierung beziehungsweise Hemmung dieser Enzyme eine effektive Regulation der von ihnen katalysierten Stoffwechselwege. Je komplexer der Organismus, desto umfangreichere Regulationen werden nötig. Hierbei können Proteine sowohl als Signalgeber als auch als Empfänger dienen, die dann das Signal in Stoffwechselaktivität oder eine bestimmte Genaktivität umsetzen. Durch das Zusammenschalten verschiedener Moleküle lassen sich komplexe Signalleitungs- und Verrechnungsnetzwerke bilden. Diese ermöglichen auf molekularer Ebene die Organisation des Aufbaus und des Stoffwechsels von Zellen und Geweben bis hin zu hoch komplexen Organismen wie Pflanzen, Tieren und Menschen. Zusätzlich dienen Proteine als strukturbildende Moleküle in Zytoskelett und extrazellulärer Matrix. Auch werden Bewegungsvorgänge auf zellulärer Ebene bis hin zur makroskopisch auffälligen Muskelbewegung von Tieren und Menschen von Proteinen ermöglicht. Somit bilden Proteine eine sehr wichtige und äußerst heterogene Gruppe von biologischen Makromolekülen aus hoch spezialisierten Mitgliedern mit jeweils fest definierten Aufgaben.

Jedes einzelne Protein ist aus einer ganz bestimmten Abfolge linear aneinander gereihter Aminosäuren aufgebaut. In dieser Primärstruktur oder Sequenz ist die komplette Information enthalten, die das Molekül und seine Aufgaben definiert. Aber erst die aus der Sequenz der verknüpften Aminosäuren gebildete räumliche Struktur, die Konformation, ermöglicht die Bewältigung einer ganz bestimmten Aufgabe. So bilden sich Substratbindungstaschen oder Interaktionsflächen für Komplexe aus mehreren Einzelmolekülen und es kommen funktionelle Gruppen in räumliche Nähe, wodurch die Katalyse chemischer Reaktionen begünstigt wird. Gezielte Änderungen von einer Konformation in eine andere liegen der Weitergabe von Informationen an Interaktionspartner oder gerichteten

Bewegungen zu Grunde. Kann das Protein sich nicht korrekt falten oder wird es durch äußere Einflüsse entfaltet, verliert es die Fähigkeit, seine Funktion auszuüben. Häufig sind Proteine aus verschiedenen Domänen aufgebaut, die jeweils einen ganz bestimmten Teil der Funktion des ganzen Proteins übernehmen. Domänen sind meist etwa 100 Aminosäuren große Proteinteilstücke, die unabhängige Faltungseinheiten darstellen, die auch abgetrennt ihre natürliche Konformation einnehmen und funktionell aktiv sind. Um gewünschte Wechselwirkungen zu begünstigen und das Finden der Partner zu beschleunigen, werden zusätzlich oft einzelne Moleküle mit Hilfe spezialisierter Interaktionsdomänen oder mit Hilfe spezialisierter Gerüstproteine zu multimeren Komplexen zusammengefasst.

Besonders augenscheinlich wird die Bedeutung der Faltung der Aminosäurekette zu einer definierten räumlichen Struktur im Zusammenhang mit Krankheiten wie beispielsweise der Alzheimerschen oder der Creutzfeldt-Jakob Krankheit. Hierbei nimmt jeweils ein bestimmtes Protein statt seiner funktionellen Konformation eine weitere fehl gefaltete Form ein, die wiederum die Krankheitssymptome hervorruft. Man muss demnach das Bild, nach dem eine bestimmte Aminosäuresequenz nur zu einer definierten Konformation führt, erweitern. Vielmehr kann ein Protein durchaus in verschiedenen Konformationen vorliegen und Faltungszwischen- und Übergangszustände einnehmen. Je nach Umgebungsbedingungen und Anwesenheit von Interaktionspartnern verschieben sich die Populationen dieser Zustände. So kann etwa ein Enzym durch Bindung eines allosterischen Inhibitors von seiner aktiven in eine inaktive Konformation überführt werden. Im Extremfall führt die Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts wie oben beschrieben zu einer krankheitsauslösenden Form.

Zum Verständnis der molekularen Details der vielfältigen Proteinfunktionen ist es also nötig, Kenntnis von der räumlichen Struktur zu haben. Erst damit wird es möglich, gezielt in die entsprechenden Prozesse einzugreifen und beispielsweise Medikamente gegen faltungsbedingte Krankheiten zu entwickeln. Eine Vielzahl biochemischer und biophysikalischer Methoden liefert Informationen über den Zustand von Proteinen, ihre Faltung und Stabilität, die Lage von konformationellen Gleichgewichten sowie die Organisation von Einzelmolekülen zu multimeren Komplexen. Ein vollständiges Bild erhält man allerdings erst, wenn es gelingt, die räumliche Struktur im atomaren Detail zu bestimmen. Die zwei wichtigsten Methoden hierfür sind die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR) und die Röntgenbeugung an Proteineinkristallen. Gelingt

es, das Protein beziehungsweise den Proteinkomplex von Interesse in ausreichender Qualität zu kristallisieren, lassen sich in relativ kurzer Zeit hochaufgelöste Strukturmodelle erhalten. Allerdings besteht trotz des hohen Lösungsmittelgehalts von Proteinkristallen die Gefahr, Artefakte durch die Kristallpackung und die Kristallisierungsbedingungen zu erhalten. Hier liegt der Vorteil der NMR-Spektroskopie, die es erlaubt, Proteinstrukturen in Lösung also nahe den physiologischen Bedingungen zu bestimmen. Allerdings ist die Strukturbestimmung mittels NMR bisher weniger automatisierbar und damit oft zeitaufwendiger als die Kristallographie. Desweiteren stößt die NMR bei großen Molekülen und Komplexen schnell an die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit. Auf der anderen Seite bietet die NMR die Möglichkeit, eine Reihe weiterer Informationen über die Eigenschaften des Proteins zu erhalten, die der Kristallographie nicht oder nur eingeschränkt zugänglich sind. Dazu zählen vor allem dynamische Eigenschaften, das Verhalten bei der Bindung von Liganden und anderen Proteinen sowie die Verschiebung von konformationellen Gleichgewichten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die NMR-spektroskopische Strukturanalyse zur Untersuchung von Protein-Ligand- und Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt. Desweiteren wurde die Vielseitigkeit der NMR zur Untersuchung von Faltungsintermediaten und konformationellen Gleichgewichten genutzt, um die molekularen Grundlagen von durch Proteinfaltung bedingten Krankheiten näher zu ergründen. Die Arbeit gliedert sich in die Beschreibung der methodischen Grundlagen (Kapitel 2), Untersuchungen an Faltungsintermediaten von Prionproteinen (Kapitel 3) und Interaktionsstudien an der Proteindomäne PDZ2 (Kapitel 4) und dem Protein HPr (Kapitel 5).

In Kapitel 3 werden Untersuchungen an Faltungsintermediaten des menschlichen Prionproteins vorgestellt. Das Prionprotein (PrP) kann neben seiner zellulären Form (PrP^C) in einer alternativ gefalteten Form vorliegen (PrP^{Sc}), die verschiedene Formen von neurodegenerativen Erkrankungen, die spongiformen Enzephalopathien, auslöst. PrP^{Sc} ist laut Stanley Prusiners *protein only* Hypothese alleiniger Bestandteil der infektiösen Prionen, die verantwortlich für die Übertragung der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) sind. PrP^C und PrP^{Sc} sind in ihrer Primärstruktur identisch, d.h. der dramatische Unterschied zwischen normaler zellulärer Funktion einerseits und infektiöser Form andererseits muss in ihrer räumlichen Struktur begründet sein. Daher wurde in dieser Arbeit die konformationelle Heterogenität von PrP^C untersucht und versucht Faltungsintermediate des PrP^C→PrP^{Sc} Übergangs zu stabilisieren und strukturell zu charakterisieren. Auf solche konformationellen

Gleichgewichte und Übergänge lässt sich prinzipiell durch Änderung der Umgebungsvariablen chemisches Potential, Temperatur und Druck Einfluss nehmen. Hydrostatischer Druck ist dabei besonders geeignet Proteinaggregationen, wie sie auch bei der PrP-Umfaltung vorkommen, zu untersuchen, da sich Monomere, Multimere und Aggregate stark in ihrem molaren Volumen unterscheiden. So lassen sich im Idealfall präaggregative Formen von Proteinen stabilisieren und charakterisieren.

Kapitel 4 beschreibt die Charakterisierung der Interaktionsmöglichkeiten der PDZ2 von PTP-Bas. PDZ-Domänen sind typische Proteineinheiten zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Sie finden sich oft in membranassoziierten oder -nahen Gerüstproteinen und organisieren ihre Interaktionspartner zu lokalen Netzwerken. Desweiteren können sie Phosphatidylinositolphosphate (PIP) spezifisch binden, wodurch vermutlich ihre Membranlokalisation gefördert wird. In dieser Arbeit werden die strukturellen Grundlagen der Protein- und PIP-Bindung der PDZ2-Domäne der menschlichen Proteintyrosinphosphatase PTP-Bas näher beleuchtet. PDZ2 von PTP-Bas existiert in zwei Spleißalternativen, PDZ2a und PDZ2b. Während PDZ2a bestimmte Proteine und PIP binden kann, ist PDZ2b ausschließlich in der Lage PIP zu binden. Dieser Unterschied in den Bindungseigenschaften wurde durch den Vergleich der räumlichen Strukturen untersucht. Dazu musste zunächst die vorhandene unzureichend aufgelöste Struktur der PDZ2b verbessert werden. Anschließend wurde das Bindungsverhalten NMR-spektroskopisch untersucht und ein Komplex von PDZ2b mit PIP modelliert.

Als weiteres Beispiel einer Protein-Protein-Interaktion wurde die Wechselwirkung des Histidinenthaltenden Phosphotransportproteins (HPr) aus *Staphylococcus aureus* mit der HPr-Kinase/Phosphatase NMR-spektroskopisch quantifiziert (Kapitel 5). HPr ist ein zentrales Protein in der Aufnahme von Kohlenhydraten in Bakterienzellen mittels des Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferasesystems (PTS). In diesem System dient HPr als Teil eines Phosphat-Shuttles, das eine Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat auf Kohlenhydrate transferiert. Eine zweite Funktion von HPr ist die Beteiligung an der Regulation des PTS. Dies wird durch eine ATP-abhängige Phosphorylierung des Ser46 des HPr aus *Staphylococcus aureus* ermöglicht. Die Phosphorylierung erfolgt durch die bifunktionale Kinase/Phosphatase HPrK/P. Eine exakt gesteuerte Interaktion von HPr mit HPrK/P ist demnach für die Regulation des Kohlenhydrathaushaltes der Bakterienzelle von großer Bedeutung.

2 Methodische Grundlagen

2.1 NMR-spektroskopische Proteinstrukturbestimmung

Proteinstrukturen in Lösung lassen sich mit Hilfe von NMR-spektroskopisch gewonnenen Daten in atomarer Auflösung berechnen. Dazu müssen zunächst die Resonanzfrequenzen bzw. chemischen Verschiebungen der einzelnen Atome des Proteins ermittelt werden. Je vollständiger die eindeutige Zuordnung der Signale zu den dazugehörenden Atomen ist, desto einfacher und exakter kann damit dann mit Hilfe spezieller NMR-Spektren die Strukturinformation ermittelt werden. Die Methodik der sequentiellen Zuordnung der Signale der einzelnen Atome der Aminosäurekette eines Proteins wurde maßgeblich von Kurt Wüthrich entwickelt (Wüthrich, 1986), wofür er 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Da mit zunehmender Anzahl der Atome die Zuordnung vor allem auf Grund der Überlagerung von Signalen immer schwieriger und uneindeutiger wird, werden zusätzliche Experimente genutzt, die neben den Protonensignalen die Ermittlung der chemischen Verschiebungen von ^{15}N - und ^{13}C -Kernen erlaubt. Dazu müssen die Proteine allerdings vorher mit diesen Isotopen angereichert werden, da die natürlich häufigsten Isotope ^{14}N und ^{12}C für die NMR-Spektroskopie nicht geeignet sind. Dann kann mit so genannten Tripelresonanzexperimenten, bei denen die Signale der Stickstoff- und Kohlenstoffkerne sowie der Protonen des Proteinrückgrats miteinander verknüpft werden, eine Zuordnung der entsprechenden Atome erfolgen. Mit Hilfe von Spektren, die die Signale dieser Heterokerne mit denen der daran gebundenen Protonen korrelieren, lassen sich dann Uneindeutigkeiten in den Protonensignalen auflösen (Ferentz & Wagner, 2000).

Ist die sequentielle Zuordnung der NMR-Signale zu den entsprechenden Kernen möglichst vollständig bekannt, lassen sich aus speziellen NMR-Experimenten Informationen über die räumliche Struktur des Proteins gewinnen. Dazu zählen vor allem Atom-Atom-Abstandsinformationen aus NOESY-Spektren, die auf der Abstandsabhängigkeit des Kern-

Overhauser-Effekts beruhen. Weiterhin können Diederwinkel aus J-Kopplungsdaten ermittelt werden oder Wasserstoffbrücken mittels NMR detektiert werden. Strukturelle Information erhält man auch aus Restdipolkopplungen und letztlich direkt aus den chemischen Verschiebungen (Hausser & Kalbitzer, 1989; Ferentz & Wagner, 2000). Die experimentellen Daten werden gemeinsam mit empirischen Daten über die chemische Struktur von Aminosäuren und Proteinen (Bindungslängen, Bindungswinkel, van-der-Waals-Radien von Atomen, elektrostatische Wechselwirkungen usw.) zu einem Modell der Proteinstruktur zusammengesetzt. Dies erfolgt meist durch Molekulardynamiksimulationen, bei denen ausgehend von einer Startstruktur versucht wird, die Abweichungen von den experimentellen und empirischen Vorgaben durch Veränderung der Positionen der einzelnen Atome zu minimieren (Nilges, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden Distanzdaten aus mit *KnowNOE* (Gronwald et al., 2002) automatisch zugeordneten NOESY-Spektren verwendet. Zusätzlich kamen mit *TALOS* (Cornilescu et al., 1999) aus den chemischen Verschiebungen berechnete Torsionswinkel der Proteinhauptkette zur Strukturbestimmung zum Einsatz. Berechnet wurden die Modelle mit dem Molekulardynamikpaket *CNS* (Brünger et al., 1998).

Bestimmung von Torsionswinkeln mit *TALOS*

Die Stellung der Proteinhauptkette, die durch ihre Torsionswinkel bestimmt ist, beeinflusst die chemischen Verschiebungen der Hauptkettensignale. Somit kann aus der Verteilung der chemischen Verschiebungen über die Hauptkette auf die Torsionswinkel rück geschlossen werden. Das Programm *TALOS* (*Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and Sequence Similarity* (Cornilescu et al., 1999)) verwendet dabei die Verschiebungen der N^H , C^O , C^α , C^β und der H^α . Dabei vergleicht *TALOS* die entsprechenden chemischen Verschiebungen des zu untersuchenden Proteins mit einer Datenbank von bereits mittels NMR gelöster Strukturen. Durch Vergleich von Sequenz und chemischen Verschiebungen von jeweils drei aufeinander folgenden Aminosäureresten mit der Datenbank, werden die wahrscheinlichsten Torsionswinkel ermittelt.

Automatisierte Auswertung von NOESY-Spektren

Um interatomare Abstände aus Signalen von NOESY-Spektren zu erlangen, ist es notwendig, die das Signal verursachenden Atome an Hand ihrer chemischen Verschiebungen zu identifizieren. Dies ist eine recht zeitraubende Arbeit, weshalb es eine zunehmende Anzahl

von Computerprogrammen gibt, die die Spektrenauswertung (teil-)automatisieren. Erschwerend kommt hinzu, dass die Zuordnung auf Grund von zu ähnlichen Verschiebungen mehrerer Atome oft nicht eindeutig möglich ist. Eine Reihe verschiedener Strategien haben zum Ziel, diese Uneindeutigkeiten aufzulösen und möglichst viele Signale eines NOESY-Spektrums eindeutig zuzuordnen. Viele von ihnen sind in Programmen zur automatisierten Spektrenauswertung umgesetzt (Güntert, 2003; Gronwald & Kalbitzer, 2004). Ein grundlegender Ansatz ist es, zunächst aus einem Strukturmodell zu ermitteln, welche NOE-Kontakte überhaupt mögliche Erklärungen des Signals sein können, um so unplausible Zuordnungsmöglichkeiten auszuschließen. Mit den Daten aus dem neu zugeordneten Spektrum kann dann ein verbessertes Strukturmodell errechnet werden, dass wiederum zur Verbesserung der Auswertung des Spektrums dient. So kann iterativ die Zuordnung des NOESY-Spektrums gemeinsam mit dem Strukturmodell optimiert werden. Bleibende Mehrdeutigkeiten können dann beispielsweise als mehrdeutige experimentelle Beschränkungen in die Modellberechnung einfließen (Nilges, 1995). Eine andere Möglichkeit ist es, durch wissensbasierte Ansätze, d.h. durch Vergleich mit Daten aus schon bekannten Strukturen, aus den vorhandenen Zuordnungsvarianten die wahrscheinlichste auszuwählen. Diesen Weg geht auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Programm *KnowNOE* (Gronwald et al., 2002). Letztlich können die getroffenen Zuordnungen durch wechselseitigen Vergleich verifiziert werden. Im so genannten *network anchoring* wird überprüft, ob eine aus dem Spektrum ermittelte Distanzbeschränkung durch andere in räumlicher Nähe gestützt wird.

Analyse und Qualitätsbewertung von Strukturmodellen

Zur Analyse und Visualisierung der berechneten Strukturmodelle wurde in dieser Arbeit durchgängig *MOLMOL* (Koradi et al., 1996) verwendet. Auch alle Strukturdarstellungen wurden mit diesem Programm erstellt. Die Qualitätsbewertung der Modelle erfolgte durch Vergleich mit den experimentellen Vorgaben und den NMR-Spektren sowie durch Analyse der Geometrie. Hierzu vergleicht *PROCHECK* (Laskowski et al., 1996) die berechneten Strukturen mit empirisch bestimmten Erwartungswerten für Bindungslängen, Bindungswinkel, van-der-Waal-Kontakte usw., um auf mögliche Fehler in der Geometrie schließen zu können. Die Übereinstimmung des Modells mit den NMR-Spektren des Proteins erfolgt durch Berechnung des NMR-spektroskopischen R-Wertes (Gronwald et al., 2000). Zu diesem Zweck wird aus dem Strukturmodell ein NOESY-Spektrum simuliert und dieses mit

dem gemessenen verglichen. Der R-Wert errechnet sich als Maß für die Übereinstimmung zwischen simuliertem und gemessenem Spektrum.

2.2 Chemischer und konformationeller Austausch

Ändert sich die chemische Umgebung eines Atomkerns, so ändert sich seine Resonanzfrequenz bzw. chemische Verschiebung δ . Befindet sich der Kern in einem so genannten chemischen oder konformationellen Austauschprozess zwischen zwei Zuständen, hat er also zwei unterschiedliche chemische Umgebungen, was prinzipiell zu zwei verschiedenen Signalen im NMR-Spektrum führt. Dieser Austauschprozess kann beispielsweise die Bindung eines Liganden oder der Übergang zwischen verschiedenen Konformationen des Proteins sein. Der Übergang zwischen Zustand A und B ist gekennzeichnet durch die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion k_{hin} und $k_{rück}$ und die Austauschrate $k_{ex}=k_{hin}+k_{rück}$.



Im Gleichgewicht ergibt sich Gleichung 2.2 mit der Gleichgewichtskonstanten $K=k_{hin}/k_{rück}$ und den Konzentrationen von A und B c_A bzw. c_B .

$$K = \frac{c_B}{c_A} \quad (2.2)$$

Das Aussehen des resultierenden NMR-Spektrums hängt vom Verhältnis der Austauschrate k_{ex} und dem Abstand der Frequenzen der Zustände A und B $\Delta\omega=\omega_A-\omega_B$ ab. Ist die Austauschrate deutlich kleiner als der Frequenzunterschied der Signale ($k_{ex} \ll \Delta\omega$) ergeben sich zwei getrennte Signale der Zustände A und B. Man spricht dann von langsamem Austausch. Im schnellen Austausch gilt $k_{ex} \gg \Delta\omega$. Dann fallen die beiden Signale zu einem scharfen gemittelten Signal zusammen. Sind Austauschrate und $\Delta\omega$ in etwa gleich groß, dem so genannten intermediären Austausch, ergibt sich ein stark verbreitertes Signal. Bei Übergang vom langsamen zum intermediären Austausch werden die Signale zunächst breiter und fallen schließlich in einem gemittelten Signal zusammen. Nimmt die Austauschrate weiter zu, wird die Linie wieder schmaler bis sich das Bild des schnellen Austauschs ergibt. Die Theorie des chemischen Austauschs in der NMR ist unter anderem in Übersichtsartikeln von Alex Bain sowie Wang und Palmer beschrieben (Bain, 2003; Wang & Palmer III, 2003).

Für den in Gl. 2.1 beschriebenen Vorgang hängen die Wahrscheinlichkeiten, dass sich das Molekül in Zustand A (P_A) bzw. in Zustand B (P_B) befindet wie in Gl. 2.3 beschrieben von der Gleichgewichtskonstanten K ab.

$$P_A = \frac{c_A}{c_A + c_B} = \frac{1}{1 + K} \quad P_B = 1 - P_A = \frac{K}{1 + K} \quad (2.3)$$

Befinden sich A und B im langsamen Austausch, so zeigt das Spektrum zwei Signale mit den chemischen Verschiebungen der Einzelzustände δ_A bzw. δ_B . Die Intensität (I) bzw. die Fläche der Signale hängt dann von dem Anteil des jeweiligen Zustands am chemischen Gleichgewicht ab (Gl. 2.4).

$$I_A = \text{const} \cdot P_A \quad I_B = \text{const} \cdot P_B \quad (2.4)$$

Im schnellen Austausch fallen die Signale der beiden Zustände zu einem zusammen, wobei die chemische Verschiebung des gemittelten Signals einen Wert zwischen δ_A und δ_B einnimmt, in Abhängigkeit der Gleichgewichtslage (Gl. 2.5).

$$\delta = P_A \delta_A + P_B \delta_B \quad (2.5)$$

Für die Bindung eines Liganden B an ein Makromolekül A nach Gl. 2.6 ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit, dass A frei vorliegt (P_A) bzw. dass ein Komplex vorliegt (P_{AB}) Gl. 2.7. Wobei c_A^T und c_B^T die Gesamtkonzentration von A bzw. B darstellt, also die Konzentration von freiem A oder B plus die Komplexkonzentration. K_D ist die Dissoziationskonstante des Komplexes.



$$K_D = \frac{c_A c_B}{c_{AB}} \quad (2.6b)$$

$$P_A = 1 - P_{AB} = 1 - \frac{1}{2c_A^T} (c_A^T + c_B^T + K_D - \sqrt{(c_A^T + c_B^T + K_D)^2 - 4c_A^T c_B^T}) \quad (2.7)$$

Damit lassen sich gemäß Gl. 2.4 und Gl. 2.5 die zu erwartenden Signale für langsamen und schnellen Austausch berechnen.

Betrachtet man die Signalvolumina in zweidimensionalen HSQC-Spektren, so ist zusätzlich zur Verschiebung des Gleichgewichts ein möglicher Signalverlust während des Polarisationstransfers zu berücksichtigen. Dabei sind verschiedene Fälle möglich. Die Korrelationszeit des Austauschprozesses $\tau_{ex} = 1/k_{ex}$ kann viel kleiner oder viel größer als die Wartezeiten 2τ in den n Polarisationstransferperioden sein. Daher kommt es zu unterschiedlichen Auswirkungen der T_2 -Relaxation während des Prozesses, was vor allem

dann ins Gewicht fällt, wenn die beiden Zustände des Austausches deutlich unterschiedliche transversale Relaxationszeiten T_2 haben. Mit den transversalen Relaxationszeiten für freies bzw. gebundenes Molekül A, T_{2A} und T_{2AB} , der für den INEPT relevanten Kopplungskonstante J und den Konstanten C_A' und C_{AB}' ergibt sich für die Magnetisierung M_A in erster Näherung Gl. 2.8. Mit $T_{2A}=aT_{2AB}$ ergibt sich dann für M_{AB} Gl. 2.9.

$$M_A = C_A' P_A (\sin 2\pi J \tau)^n (e^{-\frac{2\tau}{T_{2A}}})^n \quad (2.8)$$

$$M_{AB} = C_{AB}' P_{AB} (\sin 2\pi J \tau)^n (e^{-\frac{2\tau}{T_{2A}}})^n \quad (2.9)$$

Findet zeitliche Mittelung weder während der Mischzeit ($\tau_{ex} \gg \tau$) noch während der Detektion ($\tau_{ex} \gg 1/\Delta\omega$) statt, ergibt sich das Signalvolumen V_A durch Gl. 2.10.

$$V_A = C_A P_A (\sin 2\pi J \tau)^n (e^{-\frac{2\tau}{T_{2A}}})^n \quad (2.10)$$

Bei zeitlicher Mittelung während τ aber weder während der Evolution t_1 noch während der Detektion t_2 ($\tau_{ex} \ll \tau$ und $\tau_{ex} \gg 1/\Delta\omega$) ergibt sich V_A durch Gl. 2.11.

$$V_A = C_A P_A (\sin 2\pi J \tau)^n (e^{-\frac{2\tau}{T_{2A}}(P_A + (1-P_A)a)})^n \quad (2.11)$$

Gl. 2.12 gilt, wenn Mittelung in allen Zeitperioden auftritt ($\tau_{ex} \ll \tau$ und $\tau_{ex} \ll 1/\Delta\omega$).

$$V_A = C_A \sin(2\pi J \tau)^n (e^{-\frac{2\tau}{T_{2A}}(P_A + (1-P_A)a)})^n \quad (2.12)$$

Durch Normierung der Signalvolumina auf das Signalvolumen V_0 in Abwesenheit des Liganden ($P_A=1$) vereinfachen sich die Gleichungen 2.10-12 zu

$$\frac{V_A}{V_0} = P_A \quad (2.13)$$

für $\tau_{ex} \gg \tau$ und $\tau_{ex} \gg 1/\Delta\omega$, zu

$$\frac{V_A}{V_0} = P_A e^{-\frac{2\tau}{T_{2A}}(P_A + (1-P_A)a-1)} \quad (2.14)$$

für $\tau_{ex} \ll \tau$ und $\tau_{ex} \gg 1/\Delta\omega$ sowie zu

$$\frac{V_A}{V_0} = e^{-\frac{2\tau}{T_{2A}}(P_A + (1-P_A)a-1)} \quad (2.15)$$

für $\tau_{ex} \ll \tau$ und $\tau_{ex} \ll 1/\Delta\omega$.

2.3 Hochdruck-NMR

Proteine liegen nicht in einer einzigen Konformation vor, sondern sind dynamische Strukturen, die alternative Konformationen einnehmen können. So können unter anderem Enzymaktivitäten oder Affinitäten zu Bindungspartnern gesteuert werden. Daher ist es nicht ausreichend, nur die am stärksten populierte Hauptkonformation strukturell zu charakterisieren, um ein vollständiges Bild des Proteins und seiner Funktions- und Interaktionsmöglichkeiten zu erhalten. Weiterhin ist die Untersuchung von Faltungsintermediaten von besonderem Interesse, um die Mechanismen der Proteinfaltung zu verstehen. Bei Faltungskrankheiten, bei denen Proteine in fehl gefalteten, aggregierenden Formen vorliegen, ist die Stabilisierung von präaggregativen Intermediaten die einzige Möglichkeit, die fehl gefaltete Form hochauflösenden Strukturanalysen zugänglich zu machen. Die Stabilisierung solcher Intermediate sowie das Verschieben konformationeller Gleichwichte kann prinzipiell durch Variation der Umgebungsbedingungen erreicht werden. Grundsätzlich fallen darunter das chemische Potential, die Temperatur und der Druck. Bei der Untersuchung von Proteinen werden vor allem Variationen von pH-Wert und Salzkonzentrationen sowie chaotrope Agenzien wie Ammoniumchlorid oder Guanidiniumhydrochlorid eingesetzt. Beim Einsatz denaturierender Agenzien ist allerdings zu beachten, dass es je nach Protein zu unterschiedlichen spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen kommen kann. Die häufig angewandte Temperaturvariation bietet den Vorteil, dass sie leicht auch in kleinen Schritten ohne hohen Aufwand experimentell zugänglich ist. Verkompliziert wird die Auswertung von Temperaturreihen durch die Tatsache, dass Temperaturvariationen die Gesamtenergie des Systems und das Volumen beeinflussen. Bei Druckvariationen lassen sich diese Probleme umgehen, da Störungen eines Systems von gelösten Makromolekülen durch Druck einzig von der Volumenänderung des Prozesses abhängen (Silva et al., 2001). Die zur Beeinflussung von Proteinkonformationen nötigen Drücke von bis zu mehreren hundert MPa erfordern aber deutlich höheren experimentellen Aufwand. Dafür bietet hoher hydrostatischer Druck interessante Möglichkeiten zur Beeinflussung vor allem von Proteinfaltung und Proteinaggregation, die so mit anderen Methoden nicht zu erreichen sind. Durch die Kombination verschiedener Methoden lassen sich die Variationsmöglichkeiten und die Anzahl an Konformationen, die Messungen zugänglich sind, noch deutlich erweitern.

Hoher Druck bevorzugt generell Zustände mit niedrigem Volumen. Konformationelle Zustände von Proteinen in Lösung unterscheiden sich voneinander in ihrem Ordnungsgrad und ihrer Solvation/Hydrathülle. Übergänge zwischen verschiedenen Konformationen führen daher zu einer Änderung des molaren Volumens und lassen sich durch Druckänderungen beeinflussen. Teilentfaltete und entfaltete Zustände sowie so genannte *low-lying excited states* (Akasaka & Li, 2001) von Proteinen sind ungeordneter als der native Zustand und somit stärker solvatisiert und haben ein geringeres spezifisches Volumen. Gründe hierfür sind das Aufbrechen von Salzbrücken und die damit verbundene Hydratisierung, die Hydratisierung von zusätzlich dem Lösungsmittel ausgesetzten Aminosäureresten und die Volumenverringerung durch den Verlust von Packungsdefekten in der nativen Struktur (Silva et al., 2001). Solche Packungsdefekte oder Kavitäten im hydrophoben Kern von Proteinen werden unter hohem Druck von Wassermolekülen besetzt. Dies behindert die hydrophoben Wechselwirkungen im Kern, die das Protein stabilisieren, wodurch es letztlich entfaltet wird (Hummer et al., 1998). Dieses Besetzen von hydrophoben Kavitäten durch Wasser unter Druck und die damit einhergehende Destabilisierung des Proteins konnte von Collins und Mitarbeitern anhand von Kristallstrukturen einer Lysozymmutante mit einer großen Kavität unter verschiedenen Drücken direkt nachgewiesen werden (Collins et al., 2005). Da die Änderungen des molaren Volumens bei der Proteinfaltung recht klein sind, lässt sich eine Komplettentfaltung erst bei hohen Drücken von mehreren hundert MPa erreichen. Durch Kombination mit Variation von Temperatur und Lösungsbedingungen lassen sich die benötigten Drücke allerdings reduzieren. Neben der Entfaltung von Proteinmonomeren lässt sich durch Druckeinwirkung auch Einfluss auf Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Interaktionsflächen nehmen. So kann durch hohen Druck beispielsweise die Dissoziation eines dimeren Proteins erreicht werden (Abb. 2.1). Die Effekte, die hoher hydrostatischer Druck auf konformationelle Gleichgewichte ausübt, sind in Abb. 2.2 noch einmal zusammengefasst. Einerseits wird jedes einzelne Konformer des Gleichgewichts durch den Druck beeinflusst und leicht verändert, zum anderen verschiebt sich die Lage des konformationellen Gleichgewichts hin zu dem Konformer mit dem niedrigsten molaren Volumen. So können durch geeignete Wahl des Drucks und der übrigen Bedingungen Zustände eines Proteins Experimenten und Messungen zugänglich gemacht werden, die auf Grund ihrer geringen Population bei Normalbedingungen nicht detektierbar sind (Akasaka, 2003).

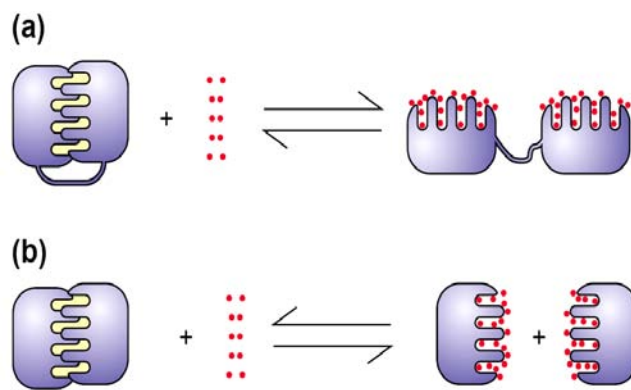
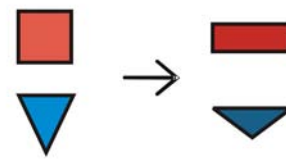


Abb. 2.1: Effekte von hydrostatischem Druck auf Proteindenaturierung (a) und Dissoziation (b). Hydrophobe Wechselwirkungen (gelb) werden durch das Eindringen von Wasser (rot) in Kavitäten des Proteins unterbrochen (nach Silva et al. (Silva et al., 2001)).

a) Druckeffekt auf jedes Konformer



b) Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts

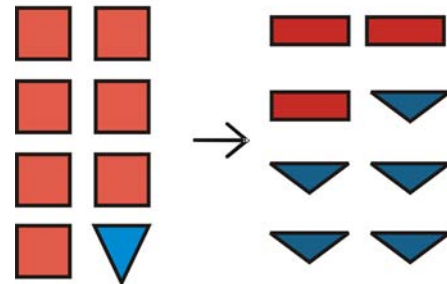


Abb. 2.2: Druck beeinflusst jedes einzelne Konformer in einem Gleichgewicht (a) und verschiebt gleichzeitig die Lage des konformationellen Gleichgewichts (b).

Proteinaggregate wie sie vor allem in faltungsbedingten Krankheiten wie der Alzheimerschen Krankheit, der Creutzfeldt-Jakob Krankheit oder der Parkinsonschen Krankheit auftreten, sind strukturellen Untersuchungen schwer zugänglich. Von besonderem Interesse ist hierbei die Charakterisierung von kurzlebigen Intermediaten der Um- bzw. Fehlfaltung. Auch hier kann die Anwendung von Druck einen wertvollen Beitrag leisten. Es konnte bereits für eine Reihe von Proteinen gezeigt werden, dass ihre Aggregation durch Druck gesteuert werden kann. So kann durch Druckerhöhung unter anderem Transthyretin reversibel in einen präaggregativen Zustand gebracht und dort stabil gehalten werden. Weiterhin lassen sich Aggregate und Fibrillen aus beispielsweise Transthyretin oder α -Synuclein durch bestimmte Druckvariationen dissoziieren. Dies liegt in der nicht optimalen Packung der Aggregationsflächen vieler Proteinaggregate und Proteinfibrillen begründet (Foguel et al., 2003). Die umfangreichen experimentellen Möglichkeiten, die Hochdruckanwendungen zur Untersuchung von Proteinaggregation und Fehlfaltung bieten, sind unter anderem in Übersichtsartikeln von Theodore Randolph und Co-Autoren sowie Debora Foguel und Jerson Silva zusammengefasst (Randolph et al., 2002; Foguel & Silva, 2004).

Die Kombination von Hochdruckanwendungen mit hoch auflösender Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie bietet als einzige Methode die Möglichkeit, die oben beschriebenen

Faltungsintermediate und *low-lying excited states* in atomarer Auflösung zu charakterisieren. Dies konnte in einer Reihe von Studien eindrucksvoll unter Beweis gestellt werden (Jonas et al., 1998; Akasaka, 2003; Kamatari et al., 2004; Kremer, 2006). Hierfür gibt es zwei grundsätzliche experimentelle Ansätze: 1) Die Konstruktion spezieller Hochdruck-Probenköpfe (Ballard et al., 1998) und 2) die so genannte Yamada-Glaszellenmethode (Yamada, 1974; Price & Lüdemann, 1997). Die Glaszellenmethode, bei der sich die Probe in einer druckfesten Kapillare befindet, die in einen Hochdruckautoklaven eingesetzt wird, bietet den Vorteil, in herkömmlichen Probenköpfen und Spektrometern eingesetzt werden zu können. Dies erlaubt im Gegensatz zu den aufwendig zu konstruierenden Hochdruckprobenköpfen, prinzipiell alle gängigen NMR-Experimente durchführen zu können. Limitierend ist hierbei das geringe Probenvolumen in den dickwandigen Hochdruckkapillaren, was zu einem sehr schlechten Signalzurauschverhältnis führt. Die bisher besten Ergebnisse lassen sich in relativ dünnwandigen Saphirzellen mit 1,72 mm Innendurchmesser und 3,14 mm Außendurchmesser erreichen, die für alle Hochdruckexperimente in dieser Arbeit verwendet wurden (Arnold et al., 2003; Kremer et al., 2004). Mit dem verwendeten Saphirzellenhochdruckautoklavensystem lässt sich der Druck in der Probe direkt beim Einsatz in herkömmlichen Spektrometern zwischen Normaldruck und 200 MPa variieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der hydrostatische Druck auf die zu untersuchende Proteinlösung in mehreren Schritten zwischen Normaldruck und 200 MPa variiert. Die dadurch hervorgerufenen Veränderungen wurden durch 1D- ^1H -Spektren und 2D- ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren verfolgt. Es wurden die chemischen Verschiebungen, die Intensität und die Linienbreite der einzelnen Signale betrachtet. Die Änderung der chemischen Verschiebung über den Druck wurde durch ein Polynom zweiter Ordnung angenähert (Gleichung 2.16). $\delta_0(p_0, T)$ stellt die chemische Verschiebung unter Normaldruck bei der Temperatur T dar. B_1 ist der lineare, B_2 der quadratische Druckkoeffizient für die Änderung der chemischen Verschiebung.

$$\delta(p, T) = \delta_0(p_0, T) + B_1(T)(p - p_0) + B_2(T)(p - p_0)^2 \quad (2.16)$$

Um die Druckabhängigkeit der Signale, die durch die Faltung des Proteins verursacht wird, von den generellen Druckeffekten auf die Signale des jeweiligen Aminosäuretyps unterscheiden zu können, wurden B_1 und B_2 entsprechend korrigiert. Hierzu wurden von B_1 und B_2 die linearen bzw. quadratischen Druckkoeffizienten der jeweiligen Aminosäure gemessen an den ungefalteten Standardtetrapeptiden Gly-Gly-X-Ala abgezogen (Arnold et al.,

2002; Kremer et al., 2004). So erhielt man die korrigierten Druckkoeffizienten für das Protein B_1^* und B_2^* .

Befinden sich zwei Konformationen in schnellem Austausch relativ zur NMR-Zeitskala (siehe Kapitel 2.2), lässt sich die beobachtete chemische Verschiebung als gewichtetes Mittel der chemischen Verschiebungen der beiden Konformationen δ_1 und δ_2 durch Gleichung 2.17 beschreiben. K ist die Gleichgewichtskonstante bei gegebenem Druck und der Temperatur T , R die allgemeine Gaskonstante und ΔG die Differenz der freien Enthalpien beider Zustände.

$$\delta = \frac{1}{1+K} \delta_1 + \frac{K}{1+K} \delta_2 = \frac{\delta_1 + \delta_2 \exp(-\frac{\Delta G}{RT})}{1 + \exp(-\frac{\Delta G}{RT})} \quad (2.17)$$

Die freie Enthalpie bei Normaldruck ΔG_0 lässt sich dann durch Gleichung 2.18 ermitteln, die ΔG als Funktion des Drucks bei konstanter Temperatur beschreibt (Akasaka & Li, 2001). ΔV ist das molare Reaktionsvolumen und $\Delta\beta$ die Kompressibilität. Der quadratische Term von Gl. 2.18 ist für Proteine relativ klein und wurde in der vorliegenden Arbeit vernachlässigt.

$$\Delta G(p) = \Delta G_0 + \Delta V(p - p_0) + \frac{1}{2} \Delta\beta(p - p_0)^2 \quad (2.18)$$

Befinden sich die beiden Konformationen im langsamen Austausch (Kapitel 2.2), dann gilt für die Gleichgewichtskonstante K Gleichung 2.19 und für die Signalintensität bzw. das Signalvolumen I des nativen Zustands Gleichung 2.20. Dabei wird angenommen, dass das Gleichgewicht bei Normaldruck komplett auf Seiten des nativen Zustands liegt. I_0 ist die Intensität bei Normaldruck. Für die Berechnung von ΔG_0 gilt dann wieder Gl. 2.18.

$$K = \frac{1 - \frac{I(p)}{I_0}}{\frac{I(p)}{I_0}} \quad (2.19)$$

$$I(p) = \frac{I_0}{1 + \exp(-\frac{\Delta G}{RT})} \quad (2.20)$$

2.4 Untersuchung von Proteininteraktionen mittels NMR-Spektroskopie

Die Interaktion mit anderen Molekülen ist eine der wichtigsten Aufgaben von Proteinen. Protein-Protein- und Protein-Ligand-Interaktionen dienen der Regulation, der Signalleitung und der Organisation von strukturellen und funktionellen Komplexen. Die NMR-Spektroskopie bietet eine Reihe von Möglichkeiten zur Charakterisierung und Quantifizierung solcher Interaktionen (Zuiderweg, 2002; Meyer & Peters, 2003). So lassen sich die für die Bindung wichtigen strukturellen Elemente sowohl auf Seiten des Proteins als auch des Liganden ermitteln. Dies kann unter anderem zur Entwicklung und Optimierung von möglichen Medikamentmolekülen genutzt werden (Roberts, 2000; Peng et al., 2004). Die umfangreichsten und detailliertesten Informationen dazu lassen sich aus der Komplexstruktur ermitteln. Diese ist mittels NMR-Spektroskopie allerdings oft nicht zu bestimmen, da Proteinkomplexe häufig allein durch ihre Größe die Grenzen der spektroskopischen Techniken erreichen. Des Weiteren lassen sich intermolekulare NOE-Distanzbeschränkungen, die für die Strukturbestimmung nötig sind, nur bei hoch affinen Bindungspartnern messen, die langlebige Wechselwirkungen eingehen. Ein Bild des Komplexes lässt sich dennoch aus Teildaten konstruieren, die durch verschiedene Experimente gewonnen werden können. So kann beispielsweise der Umriss der Interaktionsfläche durch die Änderung der chemischen Verschiebungen der an der Bindung beteiligten Atome ermittelt werden. Weiterhin ändern sich bei Bindung die dynamischen Eigenschaften sowohl der Proteinhauptkette aber vor allem auch der Seitenketten, was sich wiederum NMR-spektroskopisch verfolgen lässt. Auch kann die Übertragung von Anregungsenergie von einem Bindungspartner auf den anderen durch den so genannten transferierten NOE auch bei kurzlebigen Komplexen quantifiziert werden. Weitere Methoden zur Untersuchung von Proteininteraktionen sind unter anderem in Übersichtsartikeln von Bernd Meyer und Thomas Peters, von Erik Zuiderweg sowie von Andrew Atkinson und Bruno Kieffer aufgeführt (Zuiderweg, 2002; Meyer & Peters, 2003; Atkinson & Kieffer, 2004). In dieser Arbeit wurde die Interaktionsfläche des Proteins durch Änderung der Spektren bei Titrationsexperimenten bestimmt. Von Seiten des Liganden aus wurden die Interaktionen durch Sättigungstransferdifferenzspektroskopie untersucht.

Titrationsexperimente

Zu einer definierten Menge eines Proteins wurden in mehreren Schritten bestimmte Mengen des Bindungspartners hinzugegeben und jeweils 1D- ^1H - und 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren aufgenommen, bis der Bindungspartner in möglichst hohem Überschuss vorlag. Dabei verschiebt sich die Lage des chemischen Gleichgewichts zwischen freiem Protein und Protein im Komplex zunehmend auf Seiten des Komplexes. Die dadurch verursachten Änderungen im Spektrum geben Auskunft über die Bindung. Die Theorie zu diesen Änderungen ist in Kapitel 2.2 beschrieben. Eine deutliche Änderung eines Signals im Spektrum zeigt an, dass sich das das Signal verursachende Atom im Komplex in starker räumlicher Nähe zum Liganden befindet, oder der Bereich des Proteins, in dem das Atom liegt, bei der Bindung strukturellen Umorientierungen unterworfen ist. So lässt sich die Lage der Bindungsfläche identifizieren. Durch die Verfolgung der Änderungen im Spektrum bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von Protein und Ligand kann man zusätzlich die Bindungsstärke quantifizieren (siehe Gleichungen 2.6 und 2.7).

Sättigungstransferdifferenzspektroskopie

Sättigungstransferdifferenzspektroskopie (STD) ist eine geeignete Methode, die Bindungsfähigkeit von kleinen Molekülen an ein Protein zu testen. Da meist die Signale des Liganden detektiert werden, sind bei dieser Methode nur kleine Proteinmengen notwendig, was einen nicht zu vernachlässigenden Vorteil darstellt. Desweiteren werden durch STD auch Interaktionsstudien an großen Proteinen der NMR zugänglich (Meyer & Peters, 2003). Grundsätzlich besteht das STD-Experiment aus zwei einzelnen Experimenten, den so genannten *on-resonance* und *off-resonance* Experimenten. Im *on-resonance* Teil werden vor der eigentlichen Messsequenz frequenzselektive Impulse in die Probe eingestrahlt, deren Frequenz in Resonanz mit dem Rezeptorprotein aber in keiner Resonanz mit dem Liganden steht. Das Rezeptorprotein wird somit vorgesättigt. Durch Spindiffusion breitet sich die Vorsättigung über das ganze Makromolekül aus. Tritt ein Ligand mit dem Rezeptor in Wechselwirkung, so nimmt er durch Kreuzrelaxation einen Teil dieser Sättigungsenergie auf. Treten in der Sättigungsphase mehrere Ligandmoleküle nacheinander mit dem Rezeptor in Wechselwirkung, wird der Effekt von wenigen Proteinmolekülen auf viele Ligandmoleküle übertragen, was der geringen notwendigen Proteinmenge zu Grunde liegt. Im *off-resonance* Experiment wird dieselbe Impulsfolge verwendet. Allerdings wird hier bei den

Vorsättigungsimpulsen eine Frequenz verwendet, die weder mit dem Rezeptor noch mit dem Liganden in irgendeiner Resonanz steht. Vergleicht man das *on-resonance* mit dem *off-resonance* Spektrum, haben die Signale, die vorgesättigt wurden, niedrigere Intensitäten. Im vollständigen STD-Experiment wird dann die Differenz von *off*- und *on-resonance* Spektrum gebildet. Für die Signalintensitäten gilt: $I_{STD} = I_{off} - I_{on}$. Im Differenzspektrum sind dann nur noch vorgesättigte Signale sichtbar. STD-Signale zeigen somit an, dass der entsprechende Ligand an das Protein bindet. So kann leicht eine Reihe von Liganden auf ihre Bindungsfähigkeit hin getestet werden. Bei größeren Liganden ist es ferner möglich, die Epitope des Liganden, die an der Interaktion direkt beteiligt sind, zu ermitteln (Mayer & Meyer, 2001). Je näher ein Epitop an den Rezeptor kommt, desto effektiver ist der Sättigungstransfer, was zu größeren STD-Signalen führt (Abb. 2.3).

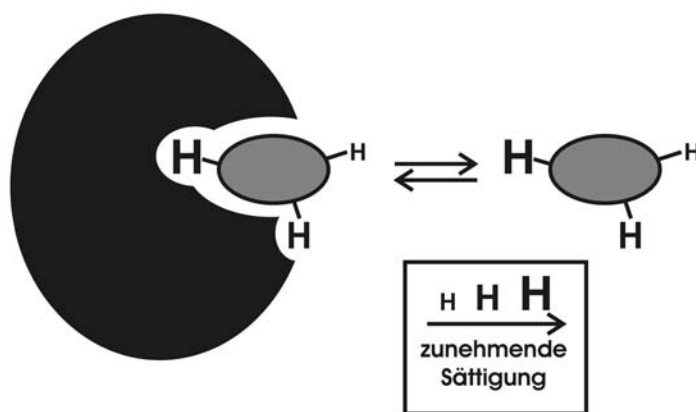


Abb. 2.3: Bestimmung des Bindungs-epitops durch STD. Protonen des Liganden mit direktem Kontakt zum vorgesättigten Rezeptor (großes „H“) erfahren stärkeren Sättigungstransfer als Protonen auf der dem Rezeptor abgewandten Seite des Liganden (kleine „H“).

2.5 Protein-Ligand-Docking

Strukturmodelle von Protein-Protein- und Protein-Ligand-Komplexen sind experimentell oft nicht oder nur mit hohem zeitlichen Aufwand zu bestimmen, vor allem wenn es sich um kurzlebige Komplexe mit geringer Affinität handelt. Zum Verständnis der Proteininteraktion ist aber detaillierte Kenntnis der Komplexstruktur unerlässlich. Hier kann *ab-initio Docking*, also die Vorhersage der Komplexstruktur aus den Strukturen der Einzelkomponenten, einen Ausweg bieten (Taylor et al., 2002; Fradera & Mestres, 2004; van Dijk et al., 2005). Die entscheidenden Punkte dabei sind die Repräsentation des Systems im Rechenalgorithmus, die Methode, mit der der Konformationsraum abgesucht wird und die Bewertung der Ergebnisse.

Die direkte Repräsentation der Moleküle in räumlichen Koordinaten ist die am flexibelsten einsetzbare aber auch die rechenintensivste Methode. Gitter- oder oberflächenbasierende Repräsentationen sind hierzu gängige Alternativen. Nun müssen die einzelnen Moleküle zueinander in Position gesetzt werden, um die möglichst optimale Lage, wie sie im Komplex vorliegt, zu finden. Dieses Absuchen der Molekülorientierungen kann durch systematisches Absuchen des Raumes durch Translation und Rotation der Moleküle in diskreten Schritten erfolgen. Jede dieser Orientierungen muss dann bewertet werden, in wie weit günstige und ungünstige Wechselwirkungen zwischen den Molekülen vorliegen. Die am besten bewertete Orientierung dient als Modell für die Komplexstruktur. Will man dabei gute Ergebnisse erzielen, muss man den Raum in möglichst kleinen Schritten abrastern und umfangreiche Bewertungsberechnungen durchführen. Da dies sehr rechenzeitaufwendig ist, wird das systematische Absuchen oft nur in sehr groben Schritten durchgeführt, um Startmodelle für weitere Modellverfeinerungen zu erhalten. Diese Verfeinerung erfolgt durch Methoden wie Pseudoenergieminimierung, Molekulardynamik, Monte-Carlo Methoden oder genetische Algorithmen. Den Methoden gemein ist, dass sie versuchen, die Pseudoenergie des jeweiligen Modells zu minimieren. Die Pseudoenergie ist ein Bewertungsmaß für die Qualität des Modells und errechnet sich aus den günstigen und ungünstigen Wechselwirkungen der Interaktionspartner in der jeweiligen Orientierung. Diese Bewertung des Strukturmodells, das *scoring*, ist von wesentlicher Bedeutung für ein gutes Dockingergebnis. Hierfür werden je nach Dockingmethode verschiedene Parameter in unterschiedlicher Detailtreue errechnet. Dazu zählen unter anderem intermolekulare van-der-Waals-Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Anzahl von Wasserstoffbrücken und das Bedecken hydrophober Flächen. Je genauer das *scoring* erfolgt, desto besser kann ermittelt werden, welche der Strukturmodelle, die sich aus dem Docking ergeben haben, am wahrscheinlichsten den tatsächlichen Komplex repräsentieren. Allerdings erhöht ein detailliertes *scoring* den Rechenzeitbedarf erheblich.

Treten Rezeptor und Ligand in Wechselwirkung, so verhalten sie sich in aller Regel nicht wie starre Puzzleteile, sondern beeinflussen gegenseitig ihre Konformation. Will man ein möglichst gutes Dockingergebnis erlangen, ist diese Flexibilität sowohl beim Absuchen des Konformationsraums als auch beim *scoring* zu berücksichtigen. Die einfachste Variante hierzu ist das so genannte *soft docking*. Hierbei werden die Atome nicht wie bei einfachen Dockingmethoden als feste Kugeln, sondern als diffuse Sphären mit zunehmender Pseudoenergiebarriere zum Mittelpunkt hin behandelt, was zu einer gewissen Variabilität der

Moleküloberflächen führt. Größere strukturelle Änderungen lassen sich aber nur verwirklichen, wenn in den Pseudoenergieminimierungsschritten des Dockings nicht nur die Orientierung der Moleküle zueinander variiert wird, sondern auch die Koordinaten der einzelnen Atome innerhalb des Moleküls variabel werden. Selbstverständlich sind hierfür wesentlich mehr Koordinatenberechnungen pro Dockingschritt durchzuführen als bei starren Molekülmodellen. Somit erhöht sich der Rechenzeitbedarf auf ein Vielfaches. Ein weiterer Nachteil des flexiblen Dockings ist, dass es deutlich mehr mögliche Lösungen gibt, die sich zudem in ihren Pseudoenergien nur wenig unterscheiden. Das hat zur Folge, dass das *scoring* in aller Regel nicht zu einem eindeutigen Ergebnis führt.

Um Uneindeutigkeiten beim *scoring* zu minimieren und das Dockingergebnis zu verbessern, erlauben einige Dockingprogramme, zusätzliche Daten einzubringen. Im datenbasierten Docking kommen Informationen über die Bindungsflächen der Interaktionspartner zum Einsatz. Diese können beispielsweise aus Analyse homologer Komplexe, Sequenzvergleichen, Mutationsstudien oder NMR-spektroskopischen Bindungsstudien kommen (siehe Kapitel 2.4). Die (experimentellen) Daten können entweder zum Filtern der Ergebnisse, also beim *scoring*, oder direkt während der Modellberechnung mit einbezogen werden. Dazu werden die Vorgaben in Pseudopotentiale umgesetzt und zur Funktion für das *scoring* bzw. für die Pseudoenergieminimierung hinzugefügt.

Docking mit HADDOCK

In der vorliegenden Arbeit wurde das Computerprogramm *HADDOCK* (Dominguez et al., 2003) zur Berechnung von Strukturmodellen von Protein-Ligand-Komplexen verwendet. *HADDOCK* ist ein datengetriebenes Dockingprogramm, d. h. experimentelle Daten werden während der Pseudoenergieminimierung und beim *scoring* eingesetzt. Die Moleküle werden zur Berechnung komplett durch kartesische Koordinaten repräsentiert. Die Pseudoenergieminimierung erfolgt durch Molekulardynamik mit *simulated annealing* basierend auf dem Computerprogramm *CNS* (Brünger et al., 1998). Der Dockinglauf erfolgt in drei Schritten. Zunächst wird ausgehend von zufälligen Startorientierungen der Moleküle eine Pseudoenergieminimierung durch Translation und Rotation starrer Moleküle durchgeführt (*rigid body docking*). In der zweiten Phase werden die am Besten bewerteten Modelle aus dem *rigid body docking* in drei *simulated annealing* Läufen pseudoenergieminimiert. Dabei werden je nach Nutzereinstellung Teile der Bindungspartner

zunehmend flexibler gehandhabt. Im zweiten *annealing* werden zunächst die Seitenketten der Bindungsflächen für Bewegungen frei gegeben, im dritten *annealing* auch die Proteinhauptkette. Als dritte Phase führt *HADDOCK* eine weitere Pseudoenergieminimierung durch, bei der das umgebende Lösungsmittel (Wasser) mit einbezogen wird. Zur Bewertung der Komplexmodelle können dann die unterschiedlichen Pseudoenergien aus dem *CNS*-Kraftfeld sowie die Erfüllung der experimentellen Daten herangezogen werden. In der Gruppe von Harald Schwalbe wurden die Bewertungskriterien speziell für das Docken von kleinen Molekülen an Proteinen untersucht und optimiert (Schieborr et al., 2005). Schieborr et al. folgend ist es ratsam, vor allem die intermolekulare van-der-Waals-Energie und die Erfüllung der experimentellen Daten heranzuziehen.

Experimentelle Daten werden in *HADDOCK* als so genannte *ambiguous interaction restraints* (AIRs) gehandhabt, basierend auf den *ambiguous distance restraints* (ADRs), die von Michael Nilges zur Behandlung uneindeutig zuordenbarer NOE-Signale entwickelt wurden (Nilges, 1995). Wurde durch zusätzliche Daten eine bestimmte Aminosäure als für die Interaktion essentiell identifiziert, so wird sie in *HADDOCK* als *aktiver Rest* definiert. Zusätzlich kann man eine erweiterte Bindungsfläche festlegen, indem man Reste in der Umgebung der *aktiven* als *passive Reste* definiert. Für jeden *aktiven Rest* wird dann ein AIR erzeugt, der vorschreibt, dass im Komplex dieser *aktive Rest* maximal eine bestimmte Entfernung (meist 0,2 nm) zu der Bindungsfläche des anderen Moleküls haben darf, die sich aus den *aktiven* und den *passiven Resten* des Bindungspartners zusammensetzt. Die Abweichungen des jeweiligen Komplexmodells von den AIRs werden dann wiederum als Pseudoenergie bestimmter Höhe angegeben und können so zur Bewertung des Ergebnisses herangezogen werden.

3 Faltungsintermediate des menschlichen Prionproteins

3.1 Einleitung

Spongiforme Enzephalopathien sind schwere Erkrankungen des Zentralnervensystems, mit denen schwammartige Zersetzungen des Gehirns einhergehen. Sie treten entweder spontan auf oder werden durch genetische Disposition verursacht oder zumindest begünstigt. Einige bestimmte Varianten dieser Krankheiten werden durch Infektionen verbreitet. Zu diesen übertragbaren spongiformen Enzephalopathien (TSEs, *Transmissible Spongiform Encephalopathies*) gehören unter anderem die neue Variante der Creutzfeldt Jakob Krankheit (vCJD) und Kuru beim Menschen, der Rinderwahnsinn (BSE), die Traberkrankheit (Scrapie) beim Schaf und die chronische Auszehrung (CWD) bei Elchen und Hirschen (Weissmann et al., 2002). Gemeinsam ist allen spongiformen Enzephalopathien die Ablagerung von amyloiden Fibrillen im Gehirn, die aus einem aggregierenden Protein, PrP^{Sc}, bestehen. PrP^{Sc} (nach der Krankheit Scrapie benannt) ist ein Konformationsisomer des gewebeeigenen harmlosen Prionproteins PrP^C (Prusiner, 1998). Gemäß der von Stanley Prusiner formulierten *protein only* Hypothese ist PrP^{Sc} die alleinige Komponente der infektiösen Prionen, die für die Übertragbarkeit der TSEs verantwortlich sind (Prusiner, 1982). Die Verbreitung von PrP^{Sc} beruht darauf, dass PrP^{Sc} einen Konformationsübergang des wirtseigenen zellulären Prionproteins PrP^C hin zu PrP^{Sc} verursacht, bei dem PrP^{Sc} vermutlich als eine Art Schablone dient (Horiuchi & Caughey, 1999). Eine wesentliche Stütze für diese Annahme ist, dass Mäuse, denen das für das Prionprotein codierende Gen (*PRNP*) entfernt wurde, immun gegen die Erkrankung sind und PrP^{Sc} nicht vermehren können (Bueler et al., 1993; Sailer et al., 1994). Die Wiedereinführung von *PRNP* in diese Mäuse macht sie wieder anfällig für Prionen (Fischer et al., 1996). Der formelle Beweis für die *protein only* Hypothese wäre erbracht, wenn es gelänge, eine Infektion durch komplett *in vitro* aus reinem Protein erzeugtes PrP^{Sc} zu verursachen. Auch in Hefen kommen Proteine vor, die in alternativen

Konformationen vorliegen können und so unterschiedliche Phänotypen in den Hefezellen erzeugen. Für ein solches Hefepreion konnte dieser formelle Beweis erbracht werden (King & Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004). Für das mit Hefepreionen sequentiell nicht verwandte Prionprotein von Säugetieren fehlt dieser endgültige Beweis noch. Allerdings gelang es, genetisch besonders für TSEs anfällige Mäuse mit rekombinant erzeugtem PrP zu infizieren (Legname et al., 2004). Zudem konnten Castilla und Mitarbeiter infektiöses Material erzeugen, indem sie zu rekombinantem reinem PrP aus Versuchstieren präpariertes PrP^{Sc} gaben. Das so erzeugte Material wurde stark verdünnt genutzt, um wiederum rekombinantes Protein umzuwandeln. Nach einer Reihe solcher Verdünnungs- und Amplifikationszyklen bestand das dann noch immer infektiöse Material praktisch nur noch aus dem rekombinant erzeugtem Protein (Castilla et al., 2005). Die *protein only* Hypothese ist demnach kaum mehr angreifbar.

Verkompliziert wird das Prionproblem durch das Auftreten von so genannten *prion strains*. Unterschiedliche *strains* führen zu Prionerkrankungen mit verschiedenen Inkubationszeiten, neuropathologischen Mustern und Eigenschaften der PrP^{Sc}-Aggregate. Mit diesem Phänomen ist das Auftreten von Artenbarrieren, also die Effizienz der Übertragung zwischen verschiedenen Arten, eng verwandt (Collinge, 2001). Allem voran sind Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Prionproteine verschiedener Arten für Auftreten und Ausmaß von Artenbarrieren verantwortlich (Prusiner et al., 1990). Aus diesem Grund sind beispielsweise Hamsterprionen für Wildtypmäuse nicht infektiös und es existiert eine moderate Artenbarriere für die Übertragung von Mausprionen auf Hamster. Überraschenderweise treten *prion strains*, die sich in ihrer Pathologie unterscheiden, auch innerhalb einer Art auf, also auch wenn die Proteine dieselbe Sequenz aufweisen (Chen & Gambetti, 2002). Untersuchungen aus Stanley Prusiners Labor zeigten, dass die Konformation von PrP^{Sc} und die Artenbarriere nicht ausschließlich von der Sequenz und Homologie von Donor und Wirt abhängen. Vielmehr scheint die Artenbarriere die Unfähigkeit des Wirts widerzuspiegeln, eine bestimmte Konformation des infektiösen Isomers replizieren zu können. Sie wird überwunden, indem im Wirt eine neue Konformation, also ein neuer *strain*, entsteht (Peretz et al., 2002). Dieser Mechanismus der Umgehung von Artenbarrieren durch die Entstehung neuer *strains* wurde mittlerweile experimentell bewiesen (Vanik et al., 2004). Die Eigenschaften der verschiedenen *strains* müssen also in der Konformation des Proteins begründet sein. Für Hefepreionen konnte diese Annahme bewiesen werden (King & Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004; Tanaka et al., 2005). Deutliche

Hinweise legen dies auch für das Prionprotein von Säugetieren nahe (Chien et al., 2004; Jones & Surewicz, 2005). Die Sequenz des Prionproteins einer Spezies wiederum legt fest, welche Konformationen dem Protein zugänglich sind und damit welche *strains* es replizieren kann. Je stärker die Überlappung der Konformationsräume der Prionproteine zweier Spezies ist, desto geringer ist die Artenbarriere (Tanaka et al., 2005). Durch diese *strain* Problematik wird offensichtlich, dass detaillierte Kenntnis des gesamten Konformationsraums des Prionproteins unerlässlich ist, um die Auslösemechanismen und Übertragbarkeit von TSEs zu verstehen. Dies macht es erforderlich, die Strukturen von PrP^C und PrP^{Sc} inklusive Faltungswegen und intermediären Strukturen von verschiedenen Spezies zu analysieren und zu vergleichen.

Das zelluläre Prionprotein PrP^C ist ein Glykoprotein, das über einen Glykosylphosphatidylanker an der Außenseite der Zellmembran befestigt ist. Es ist charakterisiert durch einen strukturierten C-terminalen Teil, der die Aminosäuren 121 bis 230 umfasst. Die Cysteine 178 und 213 bilden eine Disulfidbrücke. Der N-Terminus ist weitestgehend unstrukturiert und hoch flexibel. Er enthält mehrere Wiederholungen einer Octapeptidsequenz, die in der Lage ist, Kupferionen zu binden (Zahn, 1999; Wechselberger et al., 2002). Die Sequenzen der Prionproteine verschiedener Säugetiere weisen eine sehr hohe Homologie auf, wurden in der Evolution also stark konserviert. Dennoch ist über die Funktion des Proteins noch wenig bekannt. Mäuse, bei denen das Gen für das Prionprotein ausgeschaltet wurde, zeigen keine offensichtlichen Auffälligkeiten oder Ausfallserscheinungen. Verschiedene Studien legen nahe, dass das PrP an zellulären Signaltransduktionswegen oder der Ausbildung von Komplexen zur Signaltransduktion beteiligt ist, über die Zelladhäsion sowie Lebensdauer und Differentiation von Zellen reguliert werden (Wechselberger et al., 2002; Steele et al., 2006). Die Fähigkeit von PrP^C Kupfer zu binden deutet darauf hin, dass es am Kupferhaushalt von Nervenzellen mitwirken könnte (Zahn, 2003). Neuere zellbiologische Studien haben gezeigt, dass PrP^C ein Marker für hämatopoetische Stammzellen ist und eine wichtige Rolle bei ihrer Selbsterneuerung spielt (Zhang et al., 2006). PrP^C fördert weiterhin die Entstehung neuronaler Vorläuferzellen sowohl in der Entwicklung als auch in der Neurogenese erwachsener Säugetiere (Steele et al., 2006). Die Raumstruktur der PrP^C einer Reihe von Spezies ist bekannt. Unter ihnen sind die Prionproteine von Hamster (James et al., 1997; Donne et al., 1997), Rind (Lopez et al., 2000) und Mensch (Zahn et al., 2000; Knaus et al., 2001; Calzolari & Zahn, 2003). Die Strukturen der PrP^C der verschiedenen Spezies weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. Sie sind gekennzeichnet durch drei α -Helices und ein zweisträngiges β -Faltblatt (Abb. 3.1). Da PrP^{Sc}

stark aggregiert und somit strukturellen Untersuchungen schwer zugänglich ist, ist über dessen Raumstruktur weit weniger bekannt. PrP^{Sc} hat einen deutlich erhöhten Anteil an β -Faltblättern. Es bildet amyloide Fibrillen, von denen aus elektronenkristallographischen Studien bisher nur ein grobes Modell erstellt werden konnte (Wille et al., 2002).

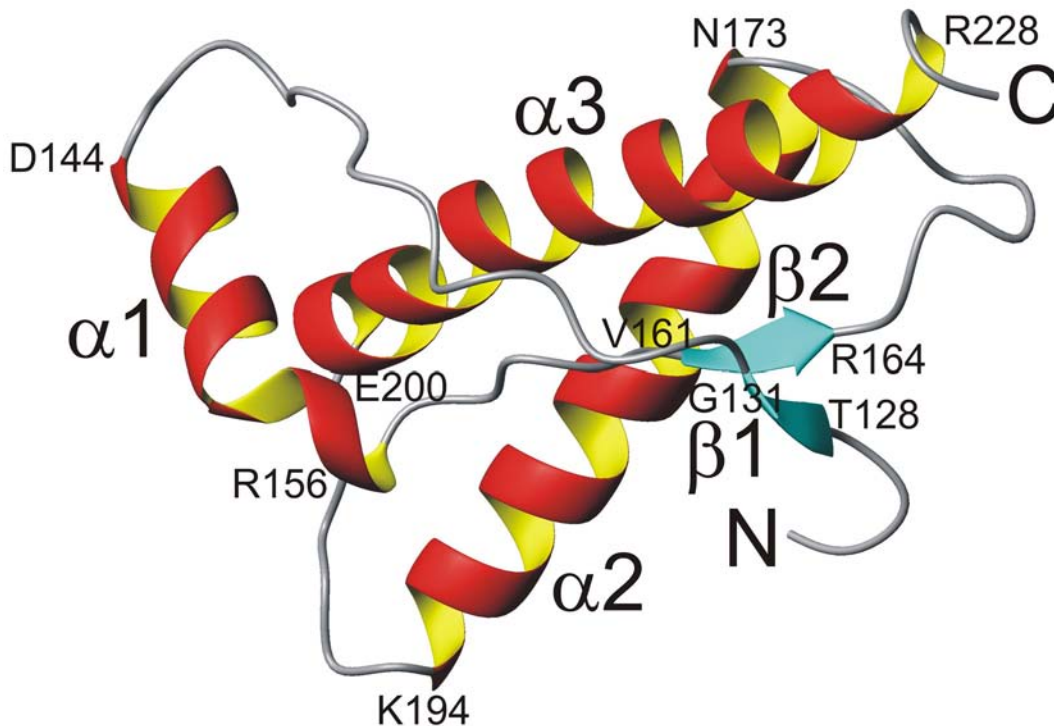


Abb. 3.1: NMR-Struktur des strukturierten Teils (Reste 121-230) des menschlichen Prionproteins huPrP^C (121-230) (PDB: 1QM2). Die jeweils ersten und letzten Reste der Sekundärstrukturelemente sind eingetragen.

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben lässt sich durch Variation des Drucks die Lage von konformationellen Gleichgewichten verschieben. Hoher hydrostatischer Druck erlaubt zudem, Faltungsintermediate und präaggregative Zwischenstufen von Proteinen zu stabilisieren. Dies macht die Anwendung von Druckvariationen zu einer geeigneten Methode zur Untersuchung des Konformationsraums und der Faltungswege von Prionproteinen. So wurde Druck bereits in einer Reihe von Studien an PrP verschiedener Spezies angewendet. Ein Überblick darüber geben Übersichtsartikel von Yraima Codeiro et al. und Joan Torrent et al. (Cordeiro et al., 2005; Torrent et al., 2006). Reinhard Lange und Mitarbeiter zeigten, dass Hochdruck Missfaltungen ähnlich der Scrapieform und die Bildung von amyloiden Fibrillen induzieren kann (Torrent et al., 2004). Ihren Daten zufolge führt Druckanwendung von über 450 MPa zu irreversibler Aggregation des Hamsterprionproteins shPrP(90-231) und Inkubation über Nacht bei 600 MPa erzeugt amyloide Fibrillen (Torrent et al., 2004). Anwendung von Druck bis zu 200 MPa dagegen ist vollkommen reversibel. Behandelt man durch Hitze aggregiertes shPrP

mit Druck von 200 MPa, nimmt das Protein nach Druckwegnahme wieder seine native Konformation ein (Torrent et al., 2003). Vom Prionprotein der Maus *muPrP*(121-230) konnte durch 350 MPa Druck und Temperaturniedrigung auf -9 °C ein teilentfaltetes Intermediat stabilisiert werden (Martins et al., 2003). Aggregiertes *muPrP*, das einen hohen β -Faltblattanteil aufweist, lässt sich ebenfalls durch hohen Druck dissoziieren. Die Aggregate sind deutlich druckempfindlicher als die native Form. Dies deutet darauf hin, dass die umgefaltete β -Form weniger hydratisiert ist und größere Packungsdefekte aufweist (Cordeiro et al., 2004). Das konformationelle Gleichgewicht verschiedener Faltungsformen und Intermediate sowie die Aggregation des Prionproteins lassen sich also auf vielfältige Weise durch Druckvariationen beeinflussen und untersuchen. Aber erst die Kombination von Hochdruckanwendung und hochaufgelöster NMR-Spektroskopie erlaubt es, die verschiedenen Konformationen in atomarem Detail zu charakterisieren. Erste Arbeiten hierzu wurden in der Gruppe von Kazuyuki Akasaka am *shPrP*(90-231) durchgeführt (Kuwata et al., 2002; Kuwata et al., 2004). Ihnen gelang es, ein lokal ungeordnetes Faltungsintermediat zu stabilisieren, bei dem vor allem die Helices $\alpha 2$ und $\alpha 3$ in einen ungeordneten Zustand übergehen.

In der vorliegenden Arbeit werden NMR-spektroskopische Untersuchungen am menschlichen Prionprotein bei pH 4,8 und Drücken zwischen 0,1 und 200 MPa sowie Temperaturen zwischen 293 und 333 K vorgestellt. Untersucht wurden die beiden Fragmente des Proteins *huPrP*(121-230), das den strukturierten Kern umfasst, sowie *huPrP*(23-230), also das komplette Protein nur ohne die N-terminale Zielsteuerungssequenz.

3.2 Materialien und Methoden

Probenvorbereitung

Rekombinantes menschliches Prionprotein *huPrP*(23-230) (Reste 23-230) und *huPrP*(121-230) (Reste 121-230) wurden wie von Ralph Zahn beschrieben hergestellt (Zahn et al., 1997; Zahn et al., 2000). Man beachte, dass auf Grund von Klonierungsartefakten die verwendeten Proteine jeweils zwei zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus haben, nämlich Gly21 und Ser22 im Fall von *huPrP*(23-230) sowie Gly119 und Ser120 in Fall von *huPrP*(121-230). Die Proben wurden von Kurt Wüthrich und Ralph Zahn (Eidgenössische

Technische Hochschule Zürich) zur Verfügung gestellt. Für die NMR-Messungen wurde eine 1,1 mM Lösung ^{15}N -angereichertes huPrP(23-230) und eine 1,2 mM Lösung ^{15}N -angereichertes huPrP(121-230) jeweils in 10 mM Natriumacetatpuffer pH 4,8 verwendet. Die Spektren wurden in H_2O mit 8% D_2O aufgenommen. Es wurden jeweils 0,1 mM DSS als interne Referenz hinzugefügt.

Renaturierung von aggregiertem Prionprotein

Aggregiertes huPrP(23-230) und huPrP(121-230) wurde wie folgt beschrieben für weitere Messungen renaturiert. Das Protein in Natriumacetatpuffer pH 4,8 wurde mit 10 mM Trispuffer pH 8,0 mit 100 mM NaCl und 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) auf 0,05 mM verdünnt. Zum vollständigen Pufferaustausch wurde gegen 10 mM Trispuffer pH 8,0 mit 100 mM NaCl und 6 M GdmCl dialysiert. Zur Renaturierung des Proteins wurde dann der Gehalt an GdmCl durch mehrere Dialyseschritte stufenweise erniedrigt. Es wurde gegen 10 mM Trispuffer pH 8,0 mit 100 mM NaCl und den GdmCl-Konzentrationen 3 M, 2 M, 1 M, 0,5 M und ohne GdmCl dialysiert. Danach folgte eine Dialyse gegen Wasser. Anschließend wurden durch Dialyse gegen Natriumacetatpuffer pH 4,8 die ursprünglichen Pufferbedingungen wiederhergestellt.

Hochdruck-NMR-Messungen

Alle NMR-Experimente wurden an einem Bruker DRX-600 Spektrometer bei 600 MHz Protonenresonanzfrequenz aufgenommen. Um Druck auf die Probenlösung auszuüben wurde ein Hochdruckautoklavensystem verwendet, das es erlaubt, den Druck zwischen 0,1 und 200 MPa zu variieren während sich die Hochdruckzelle im Spektrometer befindet (Yamada, 1974; Price & Lüdemann, 1997). Die Probe befand sich in einer Saphirkapillare mit 1,72 mm innerem und 3,14 mm äußerem Durchmesser (Arnold et al., 2003; Kremer et al., 2004). Es wurden 1D- ^1H -Spektren und 2D- ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren (Pervushin et al., 1997) bei Drücken von 0,1, 50, 100, 125, 150, 175 und 200 MPa und Temperaturen von 293 bis 333 K aufgenommen. Die TROSY-Spektren haben eine digitale Auflösung von $2048 * 512$ Punkten und eine aufgenommene Frequenzweite von $7184 * 1825$ Hz. Die Spektren wurden mit *XWINNMR* (Bruker) aufgenommen und prozessiert. Zur Spektrenanalyse und Auswertung kam *AUREMOL* (Universität Regensburg, <http://www.auremol.de>) zum Einsatz. Die

Zuordnung der Resonanzfrequenzen erfolgte nach der veröffentlichten Zuordnung von Ralph Zahn (Madison NMR-Datenbank, Zugangscodes BMRB-4379 und BMRB-4402).

Analyse der chemischen Verschiebungen und Signalvolumina

Die chemischen Verschiebungen und Signalvolumina der Proteinsignale aus den TROSY-Spektren wurden wie in Kapitel 2.3 beschrieben ausgewertet. Es wurden lineare und quadratische Koeffizienten für die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Amidprotonen $B_1(H)$ bzw. $B_2(H)$ sowie der Amidstickstoffatome $B_1(N)$ bzw. $B_2(N)$ nach Gl. 2.16 errechnet. Für die Protonen wurden durch Abzug der Druckkoeffizienten für Standardtetrapeptide (Arnold et al., 2002; Kremer et al., 2004) die korrigierten Koeffizienten $B_1^*(H)$ und $B_2^*(H)$ ermittelt (siehe Kapitel 2.3). Für Signale im schnellen Austausch auf der NMR-Zeitskala wurde einem Zweizustandsmodell folgend die freie Enthalpie ΔG_0 und das molare Reaktionsvolumen ΔV_0 für den konformationellen Austausch nach Gl. 2.17 berechnet. Für Signale im langsamen Austausch wurden ΔG_0 und ΔV_0 gemäß Gl. 2.20 aus den Signalvolumina ermittelt.

Korrelationsanalyse der chemischen Verschiebungen

Um festzustellen, ob die beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebungen mit dem Druck vom selben oder von unterschiedlichen Prozessen verursacht wurden, wurden die Druckabhängigkeiten einer Korrelationsanalyse unterzogen. Die Änderung der chemischen Verschiebung zweier Kerne A und B als Funktion des Drucks $f(p)$ lässt sich durch die Gleichungen 3.1a und 3.1b beschreiben. Angenommen wird ein druckabhängiger Übergang zwischen zwei Zuständen mit den chemischen Verschiebungen δ^1 und δ^2 .

$$\Delta\delta_A = \delta_A(p) - \delta_A(p_0) = (\delta_A^2 - \delta_A^1)f_A(p) \quad (3.1a)$$

$$\Delta\delta_B = \delta_B(p) - \delta_B(p_0) = (\delta_B^2 - \delta_B^1)f_B(p) \quad (3.1b)$$

Werden die Änderungen der chemischen Verschiebungen beider Kerne durch denselben Prozess verursacht, gilt also $f_A(p) = f_B(p)$, dann folgen sie der linearen Beziehung in Gl. 3.2. Der Korrelationskoeffizient von $\Delta\delta_A$ zu $\Delta\delta_B$ wird dann 1.

$$\Delta\delta_A = \frac{(\delta_A^2 - \delta_A^1)}{(\delta_B^2 - \delta_B^1)} \Delta\delta_B \quad (3.2)$$

Zur genaueren Betrachtung der Korrelationsanalysen sei auf Kapitel 7.2 verwiesen.

3.3 Ergebnisse

Es wurden 1D- ^1H - und 2D- ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren von zwei ^{15}N -angereicherten Konstrukten des menschlichen Prionproteins aufgenommen. Die verwendeten Lösungsbedingungen (Natriumacetatpuffer pH 4,8) sind identisch zu denen der NMR-Strukturbestimmung (Zahn et al., 2000). Das kürzere Konstrukt *huPrP*(121-230) umfasst den C-terminalen gefalteten Teil des Proteins, das längere Konstrukt *huPrP*(23-230) enthält zusätzlich den ungefalteten, flexiblen N-Terminus. Unter den verwendeten Bedingungen zeigten beide Konstrukte fast identische und vollständig reversible Reaktionen auf Druckanwendung im Bereich von 0,1 bis 200 MPa. Zur Reversibilität der Druckeffekte sei auf Abb. 3.18 in Kapitel 3.3.4 verwiesen. Die Druckeffekte auf die NMR-Spektren aufgenommen bei 293 K sind in Abb. 3.2 und 3.3 deutlich zu erkennen. Steigender Druck führt zu einer Verschiebung aller Resonanzfrequenzen. Zusätzlich ist bei einem Teil der Resonanzlinien eine deutliche Verbreiterung zu beobachten. In den TROSY-Spektren ist bei steigendem Druck ein Verlust der Signalvolumina einer Vielzahl von Resonanzen zu beobachten. Einige von ihnen zeigen eine so starke Abnahme, dass sie bei höheren Drücken nicht mehr detektierbar sind, andere dagegen zeigen überhaupt keine signifikante Signalvolumenänderung, wie unten detailliert beschrieben ist.

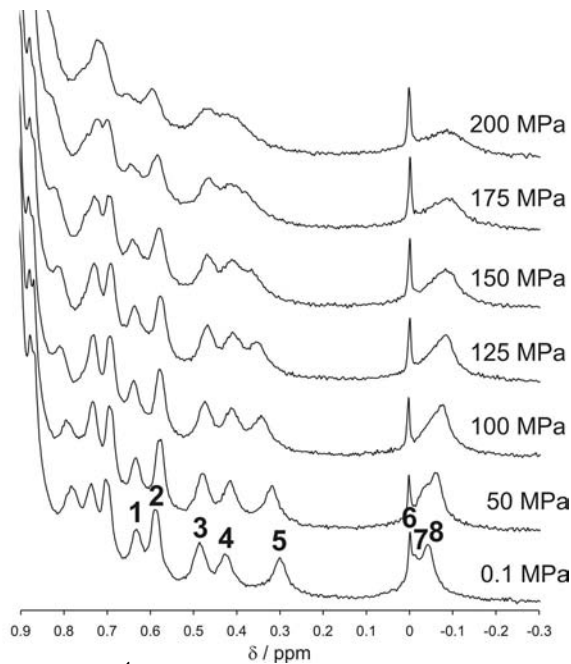


Abb. 3.2: ^1H -Spektren von *huPrP*(23-230) bei 293 K und pH 4,8. Einzelne Resonanzen sind markiert: (1) Leu130 $\text{H}^{\delta 2}$, (2) Leu125 $\text{H}^{\delta 2}$, (3) Ile139 $\text{H}^{\delta 1}$, (4) Ile182 $\text{H}^{\delta 1}$, (5) Ile182 $\text{H}^{\gamma 2}$, (6) DSS (interne Referenz), (7) Leu130 $\text{H}^{\delta 1}$, (8) Ile139 $\text{H}^{\gamma 2}$.

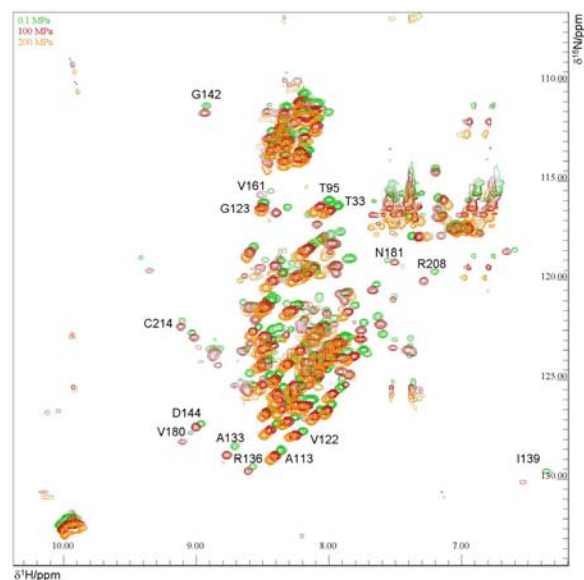


Abb. 3.3: ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren von *huPrP*(23-230) bei 293 K und pH 4,8. Ausgewählte Signale sind beschriftet. Es sind Spektren aufgenommen bei verschiedenen Drücken überlagert: 0,1 MPa (grün), 100 MPa (rot) und 200 MPa (orange).

3.3.1 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen

Die Druckwirkung auf Proteine ist anisotrop und verursacht Änderungen der chemischen Verschiebungen, ausgelöst durch lokale und globale konformationelle Änderungen, die eine nicht-lineare Funktion des Drucks bilden. In Abb. 3.4 ist die Änderung der chemischen Verschiebungen von Protonensignalen aus dem hydrophoben Kern von *huPrP*(23-230) mit dem Druck dargestellt. Die Druckabhängigkeit ist eindeutig nicht-linear. So wird beispielsweise beim $H^{\delta 1}$ von Leu130 der Wert von δ zunächst kleiner, über 100 MPa steigt der Wert aber wieder an. Auch zeigen einige Signale bei 125 MPa eine leichte Delle im δ -p-Diagramm. Da Messartefakte oder -ungenauigkeiten sowie Referenzierungsfehler klar ausgeschlossen werden können, deutet dies auf eine komplexe Druckantwort des Proteins hin. Die beobachteten Nichtlinearitäten können durch die Überlagerung unabhängiger druckabhängiger Prozesse und/oder durch das Auftreten von bei bestimmten Druckwerten stabilen Zwischenzuständen verursacht werden. Klar wird, dass die druckabhängigen Änderungen im *huPrP* nicht ausreichend durch ein einfaches Zweizustandsmodell beschrieben werden können.

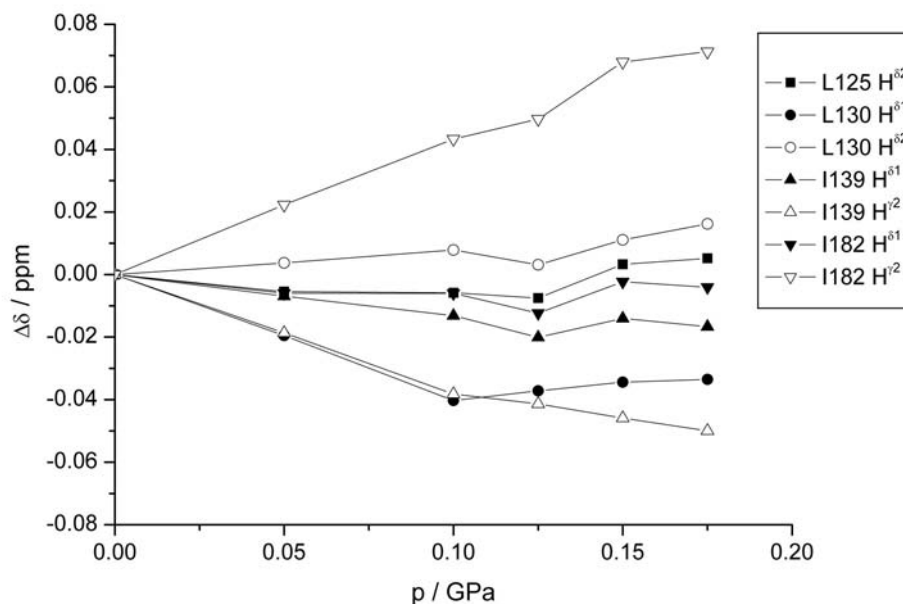


Abb. 3.4: Änderung der chemischen Verschiebung mit dem Druck bezogen auf den Wert bei Normaldruck. Es sind die Werte von Protonen aus dem hydrophoben Kern von *huPrP*(23-230) aus 1H -Spektren bei 293 K (siehe Abb. 3.2) aufgetragen.

Ähnliche Beobachtungen lassen sich auch für die Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen gemessen in ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren treffen. Diese werden in dieser Arbeit durch eine Taylorreihe zweiter Ordnung gemäß Gl. 2.16 beschrieben. Der Druckeffekt setzt sich grundsätzlich aus zwei Beiträgen zusammen, einem unspezifischen Effekt wie er auch an ungefalteten Peptiden beobachtet werden kann und einem proteinspezifischen Effekt, der sich aus der Faltung des Moleküls ergibt. Nimmt man an, dass diese beiden Effekte voneinander unabhängig sind, so lässt sich der spezifische Anteil dadurch separieren, dass man die Taylorkoeffizienten für ungefaltete Standardpeptide von den gemessenen abzieht. So erhält man die proteinspezifischen Taylorkoeffizienten B_1^* und B_2^* (siehe Kapitel 2.3). Druckkoeffizienten für ungefaltete Standardpeptide sind für Protonen aus Studien an Gly-Gly-X-Ala Modellpeptiden vorhanden (Arnold et al., 2002). Leider fehlen sie für Stickstoffkerne.

Die Beträge der konformationsabhängigen Druckkoeffizienten erster Ordnung $|B_1^*(H)|$ der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen aus den TROSY-Spektren aufgenommen bei 293 K und die unkorrigierten Beträge der Druckkoeffizienten $|B_1(N)|$ der Amidstickstoffatome sind in Abb. 3.5 und 3.7 als Funktion der Primär- und Sekundärstruktur gezeigt. Abb. 3.6 und 3.8 zeigen die Koeffizienten zweiter Ordnung $|B_2^*(H)|$ und $|B_2(N)|$ in gleicher Weise. Die Mittelwerte der Druckkoeffizienten erster und zweiter Ordnung von huPrP(23-230) betragen 0,38 ppm/GPa ($|B_1^*(H)|$), 3,35 ppm/GPa ($|B_1(N)|$), 1,23 ppm/GPa² ($|B_2^*(H)|$) und 5,70 ppm/GPa² ($|B_2(N)|$) (siehe Tab. 3.1). Eine sehr ähnliche Verteilung der Druckkoeffizienten über die Sequenz zeigt auch huPrP(121-230). Allerdings sind die Mittelwerte der Druckkoeffizienten erster und zweiter Ordnung mit 0,54 ppm/GPa ($|B_1^*(H)|$), 3,35 ppm/GPa ($|B_1(N)|$), 1,69 ppm/GPa² ($|B_2^*(H)|$) und 7,29 ppm/GPa² ($|B_2(N)|$) höher als beim Protein kompletter Länge. Dies ist darauf zurück zu führen, dass die Druckeffekte im ungefalteten N-Terminus deutlich geringer sind als im strukturierten Teil des Proteins. Vergleicht man nur den Teil, den beide untersuchten Fragmente gemeinsam haben (Reste 121-230), so sind die Unterschiede viel geringer. Die Mittelwerte der Druckkoeffizienten des gefalteten Teils von huPrP(23-230) betragen 0,49 ppm/GPa ($|B_1^*(H)|$), 3,33 ppm/GPa ($|B_1(N)|$), 1,57 ppm/GPa² ($|B_2^*(H)|$) und 6,62 ppm/GPa² ($|B_2(N)|$).

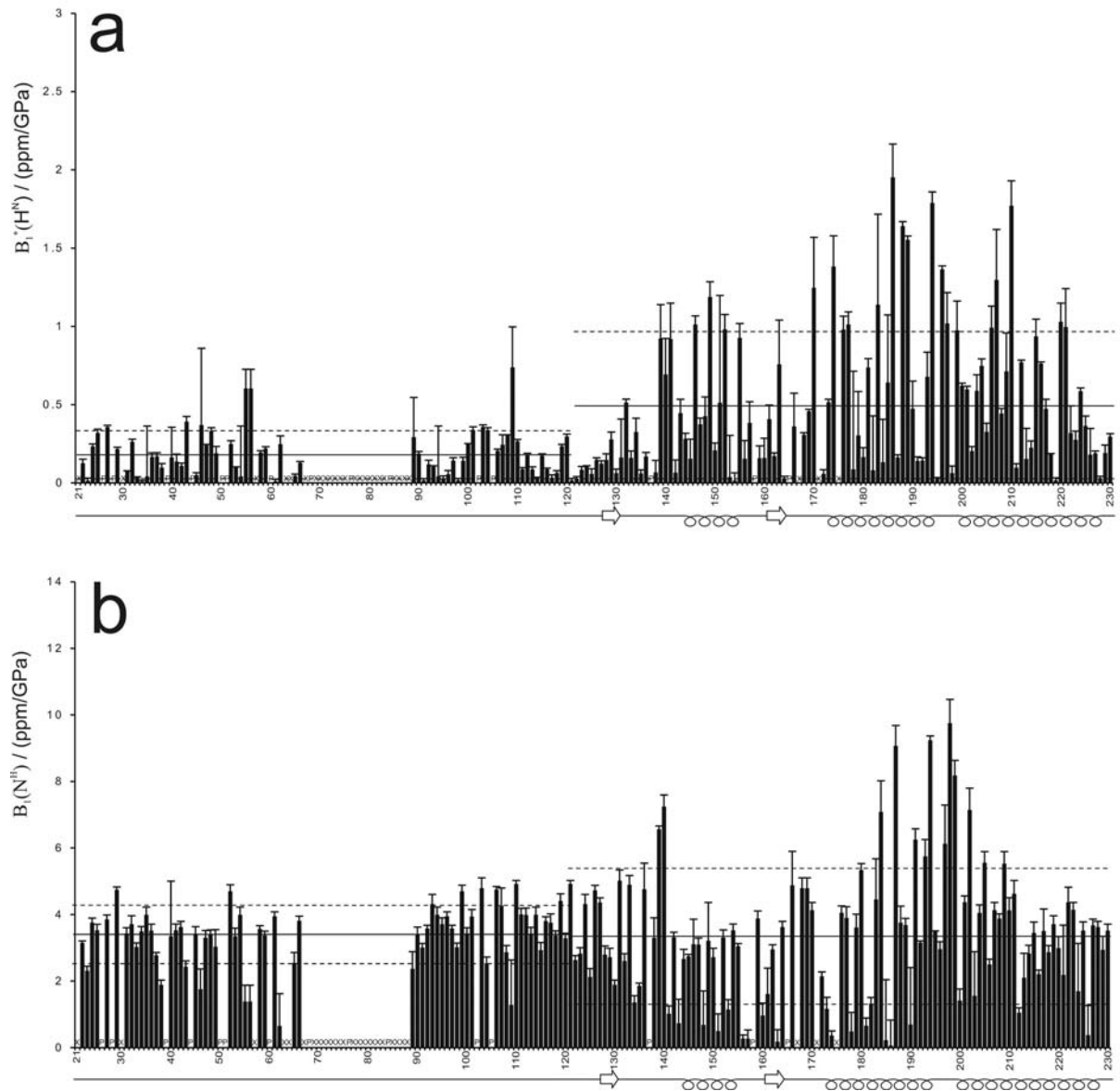


Abb. 3.5: Beträge der Druckkoeffizienten erster Ordnung für die chemischen Verschiebungen von H^N (korrigiert um Standardpeptidwerte) (a) und N^H (b) als Funktion der Primärstruktur. Die Werte stammen aus TROSY-Spektren einer Druckreihe von *huPrP*(23-230) aufgenommen bei 293 K. Die Mittelwerte (durchgezogene Linien) und die Mittelwerte plus/minus einer Standardabweichung (gestrichelte Linien) sind jeweils getrennt für den N-Terminus (Resste 23-120) und den strukturierten Teil (Resste 121-230) eingetragen. Die Sekundärstruktur ist durch Pfeile (β -Faltblätter) und Schleifen (α -Helices) symbolisiert. P markiert Proline, X andere Reste, die in den TROSY-Spektren nicht sichtbar oder nicht zugeordnet sind.

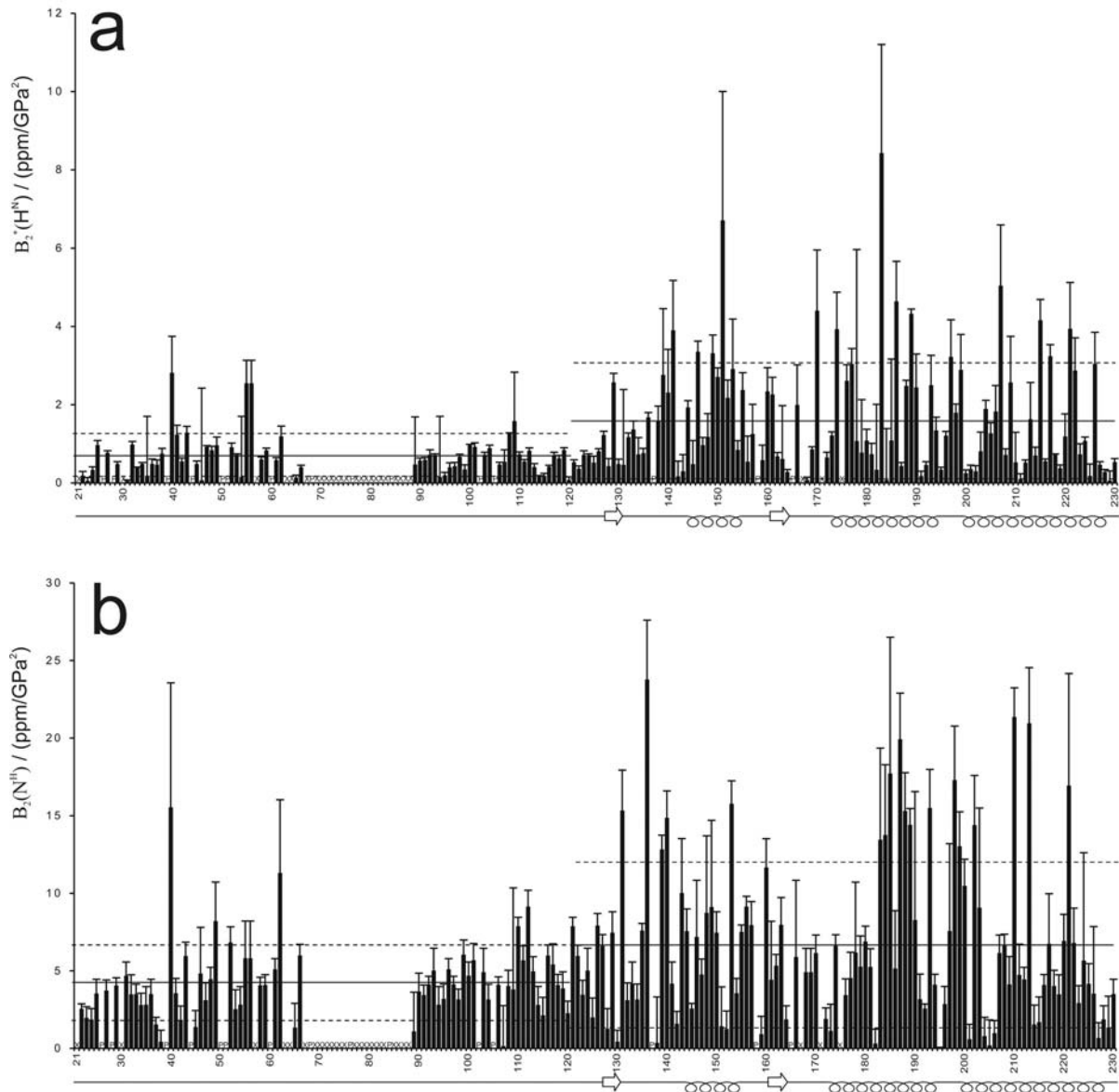


Abb. 3.6: Beträge der Druckkoeffizienten zweiter Ordnung für die chemischen Verschiebungen von H^N (korrigiert um Standardpeptidwerte) **(a)** und N^H **(b)** als Funktion der Primärstruktur. Die Werte stammen aus TROSY-Spektren einer Druckreihe von huPrP(23-230) aufgenommen bei 293 K. Die Mittelwerte (durchgezogene Linien) und die Mittelwerte plus/minus einer Standardabweichung (gestrichelte Linien) sind jeweils getrennt für den N-Terminus (Resste 23-120) und den strukturierten Teil (Resste 121-230) eingetragen. Die Sekundärstruktur ist durch Pfeile (β -Faltblätter) und Schleifen (α -Helices) symbolisiert. P markiert Proline, X andere Reste, die in den TROSY-Spektren nicht sichtbar oder nicht zugeordnet sind.

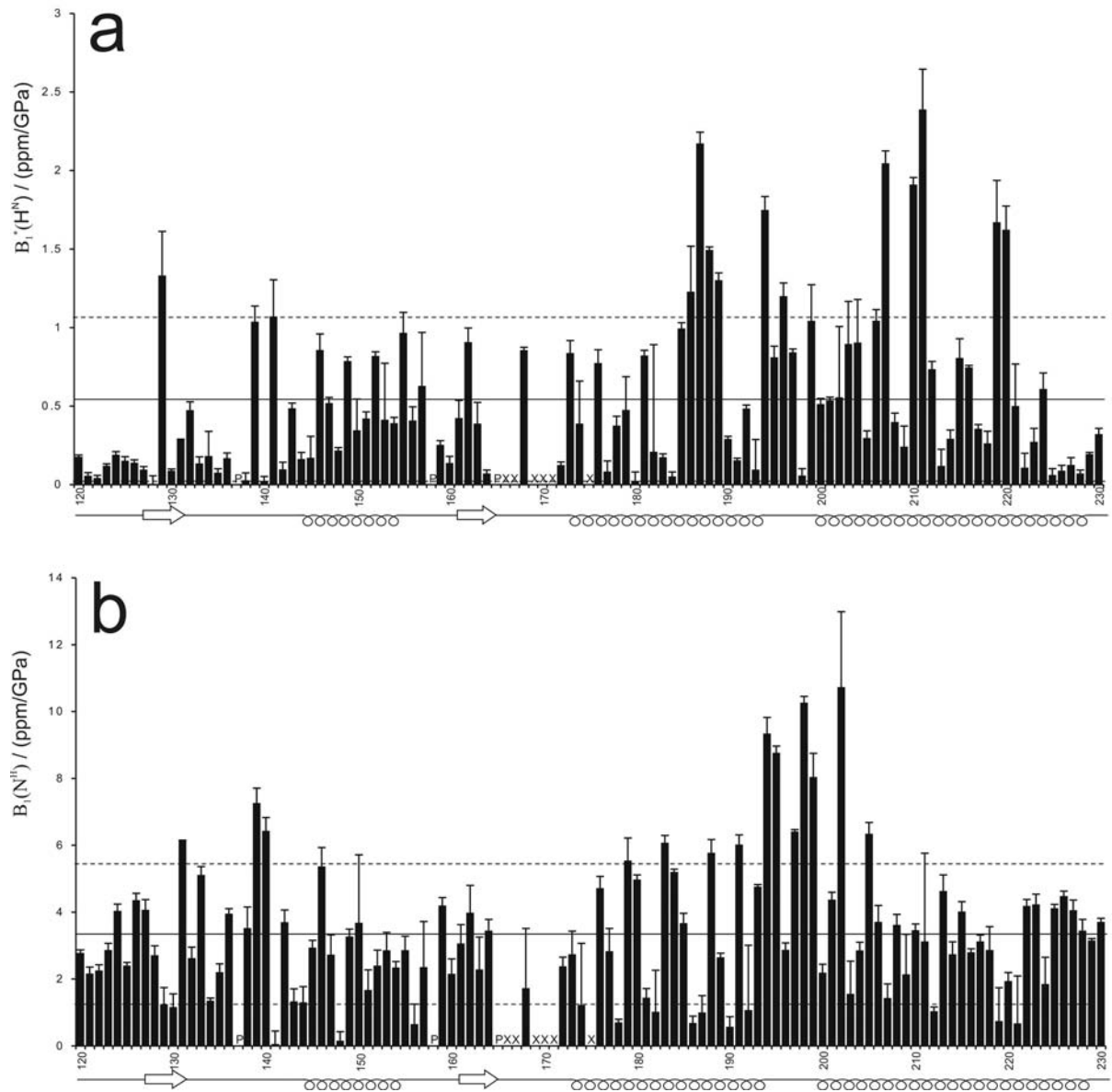


Abb. 3.7: Beträge der Druckkoeffizienten erster Ordnung für die chemischen Verschiebungen von H^N (korrigiert um Standardpeptidwerte) (a) und N^H (b) als Funktion der Primärstruktur. Die Werte stammen aus TROSY-Spektren einer Druckreihe von *huPrP*(121-230) aufgenommen bei 293 K. Die Mittelwerte (durchgezogene Linien) und die Mittelwerte plus/minus einer Standardabweichung (gestrichelte Linien) sind eingetragen. Die Sekundärstruktur ist durch Pfeile (β -Faltblätter) und Schleifen (α -Helices) symbolisiert. P markiert Proline, X andere Reste, die in den TROSY-Spektren nicht sichtbar oder nicht zugeordnet sind.

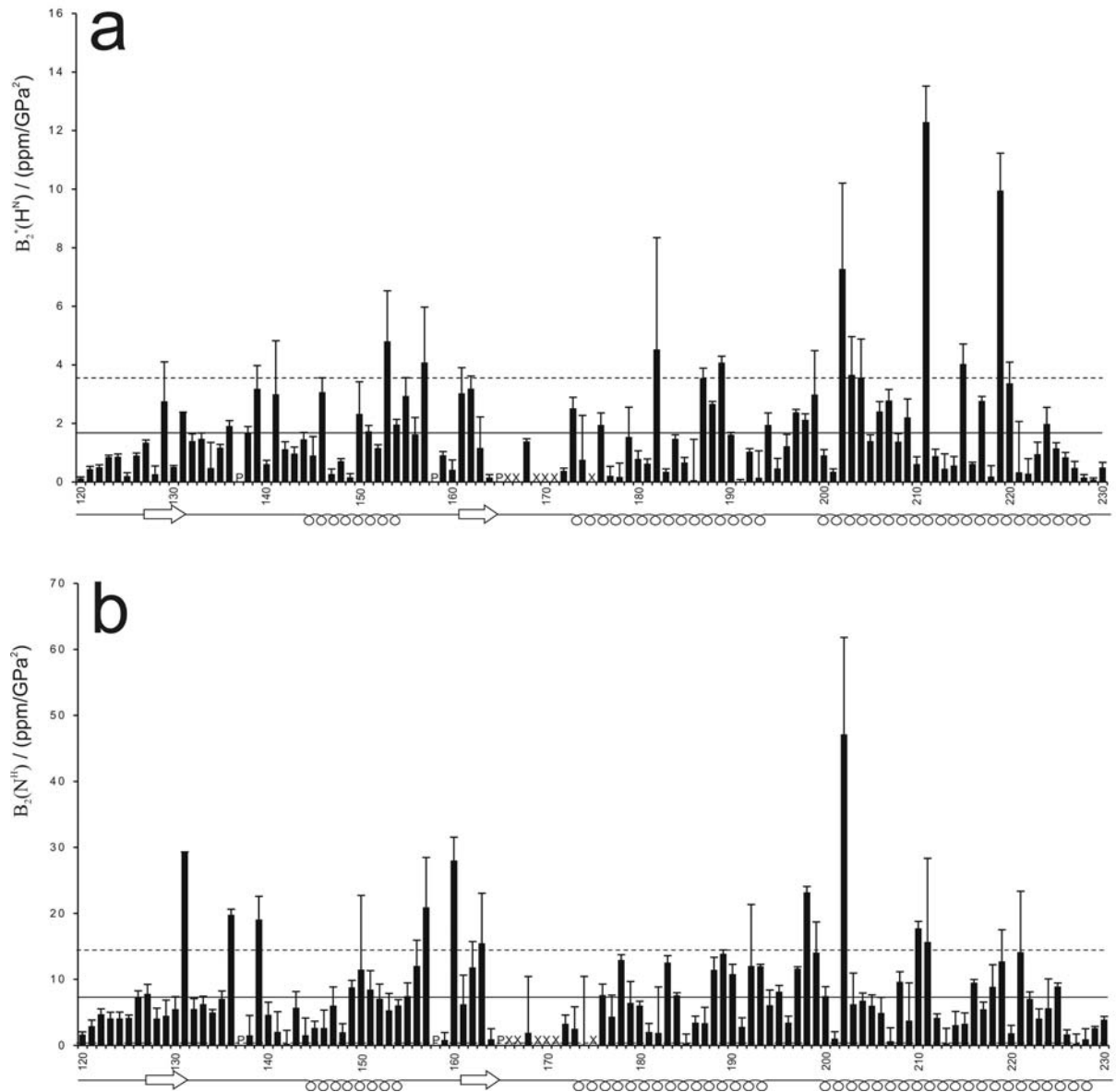


Abb. 3.8: Beträge der Druckkoeffizienten zweiter Ordnung für die chemischen Verschiebungen von H^N (korrigiert um Standardpeptidwerte) (a) und N^H (b) als Funktion der Primärstruktur. Die Werte stammen aus TROSY-Spektren einer Druckreihe von huPrP(121-230) aufgenommen bei 293 K. Die Mittelwerte (durchgezogene Linien) und die Mittelwerte plus/minus einer Standardabweichung (gestrichelte Linien) sind eingetragen. Die Sekundärstruktur ist durch Pfeile (β -Faltblätter) und Schleifen (α -Helices) symbolisiert. P markiert Proline, X andere Reste, die in den TROSY-Spektren nicht sichtbar oder nicht zugeordnet sind.

Protein	Reste	T/K	$\langle B_1^*(H) \rangle$ / ppm GPa ⁻¹	$\langle B_2^*(H) \rangle$ / ppm GPa ⁻²	$\langle B_1(N) \rangle$ / ppm GPa ⁻¹	$\langle B_2(N) \rangle$ / ppm GPa ⁻²
<i>huPrP</i> (23-230)	23-230	293	0,38±0,40	1,23±1,29	3,35±1,69	5,70±4,60
<i>huPrP</i> (23-230)	23-120	293	0,18±0,15	0,68±0,55	3,37±0,89	4,20±2,45
<i>huPrP</i> (23-230)	121-230	293	0,49±0,46	1,57±1,49	3,33±2,04	6,62±5,33
<i>huPrP</i> (121-230)	121-230	293	0,54±0,52	1,69±1,87	3,35±2,10	7,29±7,05
<i>huPrP</i> (121-230)	121-230	313	0,60±0,54	1,75±1,50	3,36±2,11	9,05±7,77
<i>shPrP</i> (90-231) [#]	90-231	303	0,50±0,55	1,03±1,31	3,16±1,80	5,86±5,35
<i>shPrP</i> (90-231) [#]	121-230	303	0,57±0,58	1,18±1,41	3,04±1,97	6,18±5,72

Tab. 3.1: Mittelwerte der Beträge der Druckkoeffizienten für die chemischen Verschiebungen der Amidgruppen gemäß Gl. 2.16 ([#] ermittelt aus den Werten von Kuwata et al. (Kuwata et al., 2002)).

Vergleich der Druckantworten von *huPrP*(23-230) und *huPrP*(121-230)

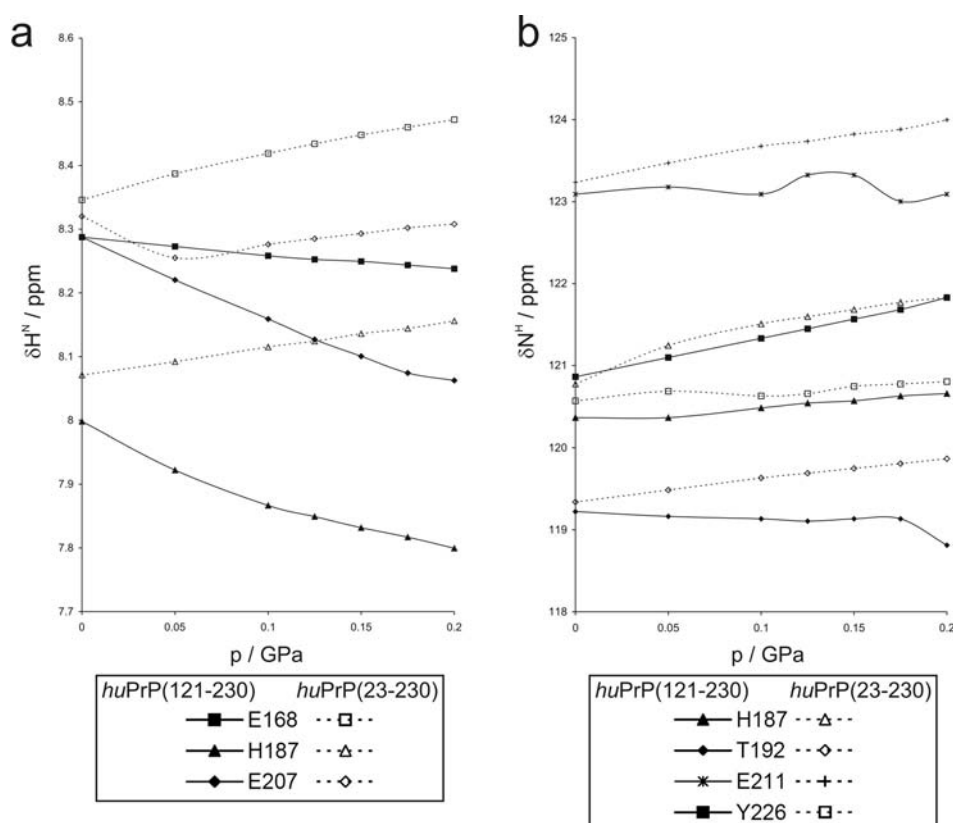


Abb. 3.9: Unterschiede in der Druckantwort von *huPrP*(23-230) (gestrichelte Verbindungslinien) und *huPrP*(121-230) (durchgezogene Verbindungslinien). Die Druckabhängigkeiten ausgewählter ^1H (a) und ^{15}N (b) sind gezeigt. Die Spektren wurden bei 293 K aufgenommen.

Die Ähnlichkeit der Druckkoeffizienten der Reste 121-230 beider untersuchter Proteinfragmente zeigt, dass der N-Terminus die Druckempfindlichkeit des gefalteten Teils nicht signifikant beeinflusst. Die Korrelationskoeffizienten der Druckkoeffizienten erster Ordnung der beiden Proteine zueinander betragen 0,71 ($B_1^*(H)$) und 0,73 ($B_1(N)$). Die

Korrelationskoeffizienten für $B_2^*(H)$ und $B_2(N)$ sind mit 0,37 und 0,63 deutlich niedriger als die ähnliche Druckantwort erwarten lässt. Dies liegt hauptsächlich in dem relativ großen Fehler der Taylorkoeffizienten begründet, vor allem im Fall der zweiten Ordnung. Berechnet man dagegen die Korrelationskoeffizienten direkt aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen (siehe Kapitel 3.2 und Gl. 3.2), ergeben sich deutlich höhere Werte, die auf eine sehr ähnliche Druckempfindlichkeit beider Proteine schließen lassen. Der Mittelwert dieser Korrelationskoeffizienten für jeden Rest von *huPrP*(121-230) zu seinem entsprechenden Rest in *huPrP*(23-230) beträgt 0,86 für die H^N und 0,93 für die N^H . *huPrP*(121-230) ist demnach ein gutes Modell für das Druckverhalten des strukturierten Kerns des gesamten Proteins in voller Länge. Eine detaillierte Aufstellung der verschiedenen Korrelationskoeffizienten befindet sich im Anhang 7.2.

Obwohl die Druckantwort des gefalteten Kerns des Prionproteins dem des gesamten Proteins im Allgemeinen sehr ähnlich ist, fallen doch wenige Reste auf, für die das nicht gilt (siehe Abb. 3.9). Der Unterschied der chemischen Verschiebungen zwischen den beiden Fragmenten, der für Glu168, His187, Thr192, Glu207, Glu211 und Tyr226 schon bei Normaldruck existiert, wird mit zunehmendem Druck sogar noch größer.

Rückschlüsse auf strukturelle Eigenschaften

Im strukturierten Kern von *huPrP*(23-230) und *huPrP*(121-230) (Reste 121-230) ändern sich die chemischen Verschiebungen der Amidgruppen fast aller Reste mit steigendem Druck (Abb. 3.5 bis 3.8). Das Ausmaß dieser Änderung ist zwischen den einzelnen Resten aber recht verschieden. Da große Änderungen der chemischen Verschiebung mit deutlichen strukturellen Änderungen korreliert sind, sind Reste, deren Druckkoeffizienten signifikant über dem Durchschnitt liegen, wahrscheinlich an starken Konformationsänderungen unter Druck beteiligt. Umgekehrt weisen niedrige Druckkoeffizienten auf nur minimale Konformationsänderungen hin. M129, F141, Q186, H187, T188, V189, K194, E196, E207, V210, E211, E219 und R220 aus *huPrP*(121-230) haben Druckkoeffizienten erster Ordnung $|B_I^*(H)|$ über dem Mittelwert plus einer Standardabweichung. Dasselbe gilt für G131, I139, H140, C179, T183, T188, T191, K194, G195, N197, F198, T199, D202 und M205 im Falle von $|B_I(N)|$. Die stärksten druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen finden sich in der Schleife zwischen $\beta 1$ und $\alpha 1$, in der Schleife, die $\alpha 2$ und $\alpha 3$ verbindet, sowie in Teilen von $\alpha 2$ und $\alpha 3$. Die druckempfindlichen Bereiche von H^N und N^H

stimmen recht gut überein, allerdings nicht komplett. Betrachtet man die Druckkoeffizienten zweiter Ordnung ergibt sich praktisch dasselbe Bild. Dies gilt auch für die Reste mit auffallend geringen Änderungen der chemischen Verschiebungen. V121, V122, G123, G126, G127, Y128, L130, A133, S135, I138, H140, G142, Q160, R164, Q172, H177, V180, I184, T193, F198, M213, S222, Y225, Y226, Q227 und R228 von *huPrP*(121-230) weisen $|B_I^*(H)|$ auf, die unter dem Mittelwert abzüglich einer dreiviertel Standardabweichung liegen. $|B_I(N)|$ unter dem Mittelwert abzüglich einer Standardabweichung haben M129, L130, R148, R156, N174, D178, I182, Q186, H187, T190, T192, Q212, E219 und E221.

Der N-terminale Teil von *huPrP*(23-230) (Reste 23-120) ist unter den gegebenen Bedingungen unstrukturiert und flexibel (Zahn, 1999; Zahn et al., 2000). Daher sollte erhöhter Druck in diesem Bereich geringere Auswirkungen als im gefalteten Kern des Proteins haben. Wie zu erwarten sind $|B_I^*(H)|$, $|B_I(N)|$, $|B_2^*(H)|$ und $|B_2(N)|$ mit 0,18 ppm/GPa, 3,37 ppm/GPa, 0,68 ppm/GPa² und 4,20 ppm/GPa² geringer als für den strukturierten Teil (Tab. 3.1). Dennoch zeigen einige Reste erhöhte Druckkoeffizienten. Überraschenderweise gilt das auch für die Koeffizienten der Amidprotonen, die zuvor um die Werte für unstrukturierte Standardpeptide korrigiert wurden (Arnold et al., 2002). K27, S43, G46, G55, G56, K101, S103, K104 und M109 zeigen korrigierte Druckkoeffizienten erster Ordnung ($|B_I^*(H)|$), G40, S43, G55, G56, N108 und M109 zweiter Ordnung ($|B_2^*(H)|$), die signifikant von den Erwartungen abweichen. Im Falle eines tatsächlich komplett unstrukturierten N-Terminus wären nur Druckkoeffizienten in der Größenordnung der unstrukturierten Standardpeptide zu erwarten.

Aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen abgeleitete freie Enthalpie

Einige Reste weisen ein asymptotisches Verhalten ihrer chemischen Verschiebungen über den beobachteten Druckbereich auf (Abb. 3.10). Dieser Druck-Verschiebungs-Kurvenverlauf ist typisch für einen konformationellen Zweizustandsübergang im schnellen Austausch (siehe Kapitel 2.2). Es befinden sich also zwei Konformationen im schnellen Austausch, wobei die Gleichgewichtslage bei 200 MPa komplett auf die Seite eines der beiden Zustände verschoben wird. Bei Normaldruck liegen beide Konformationen vor, es handelt sich also um zwei alternative native Konformationen. N_1 ist die bei Normaldruck am stärksten populierte native Konformation, N_2 eine druckstabilisierte Nebekonformation des Prionproteins. Aus der Änderung der chemischen Verschiebung mit dem Druck lässt sich mit

Gl. 2.17 der Unterschied der freien Enthalpien der beiden Zustände bei Normaldruck (ΔG_0) berechnen. Wie oben beschrieben, setzt sich der Druckeinfluss auf die chemische Verschiebung aus einer unspezifischen Komponente und dem durch die Faltung des Proteins verursachten Anteil zusammen. Um den reinen faltungsbedingten Anteil zu erhalten, wurden für die ΔG_0 -Berechnung die chemischen Verschiebungsänderungen um die Werte der ungefalteten Standardpeptide (Arnold et al., 2002) korrigiert. Für die Reste des strukturierten Kerns (*huPrP*(121-230)) ergibt sich ein ΔG_0 von $3,0 \pm 1,4$ kJ/mol. Dies bedeutet, dass bei Normaldruck etwa 71 % des Proteins im am stärksten populierte native Grundzustand vorliegt (N_1), während 29 % in der durch Druck bevorzugten Konformation N_2 vorliegt. Der ΔG_0 -Wert für den N-terminalen Teil (Reste 23-120) von *huPrP*(23-230) beträgt $3,0 \pm 1,1$ kJ/mol.

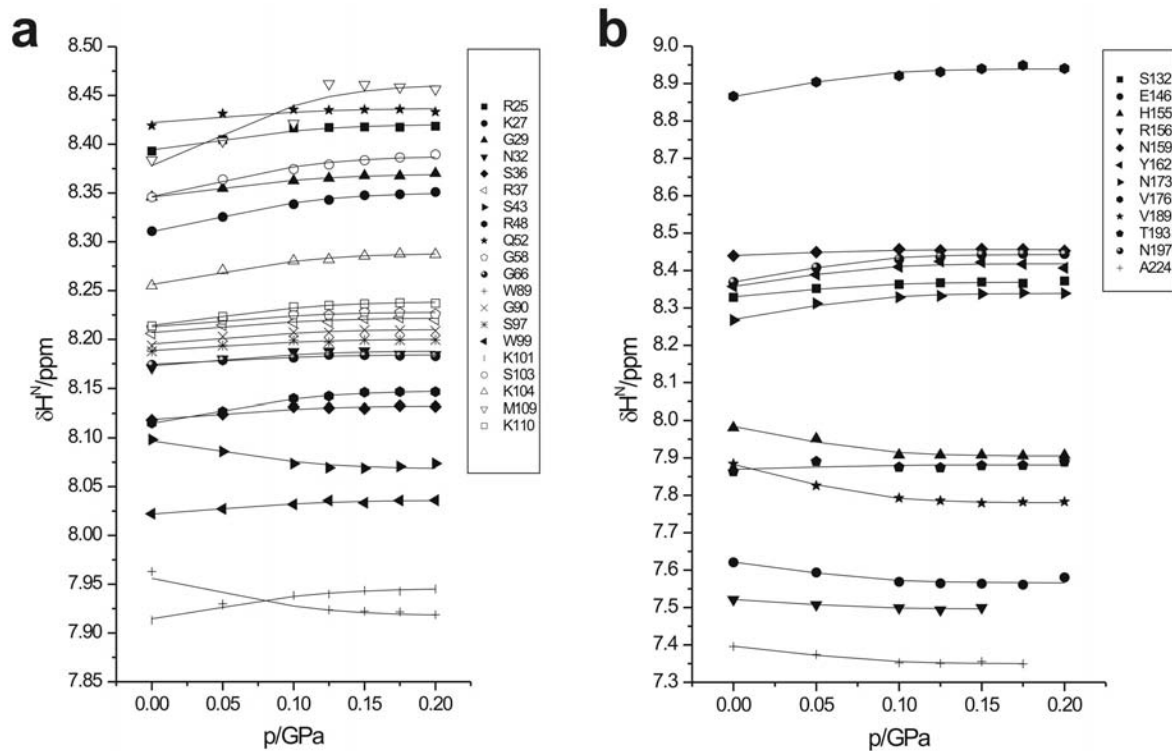


Abb. 3.10: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung δ^N der Amidprotonen aus den TROSY-Spektren bei 293K. Die chemischen Verschiebungen wurden um die Druckantwort der ungefalteten Standardpeptide korrigiert (siehe Kapitel 3.2). Es sind alle Reste mit eindeutig asymptotischen Verhalten im aufgenommenen Druckbereich gezeigt. Die Linien repräsentieren die Anpassung von Gl. 2.17 an die Daten. (a) Daten des N-terminalen Teils von *huPrP*(23-230), (b) vom strukturierten Teil *huPrP*(121-230).

3.3.2 Druckabhängigkeit der Signalvolumina

Druckerhöhung führt bei einem Großteil der Signale in den TROSY-Spektren aufgenommen bei 293 K zu einem Verlust an Signalintensität bzw. Signalvolumen. Im Falle von *huPrP*(121-230) sind bei 200 MPa die Signale von Y128, G131, M134, R136, I139, F141, G142, S143, D144, Y150, R156, Q160, V161, Y163, N174, D178, I182, T199, E200, D202, V210, C214, I215, Q217 und E221 nicht mehr detektierbar. Das Signal von G131 verschwindet schon bei 125 MPa, die von I139, F141, Q160, V161, Y163 und D178 bei 150 MPa. Diese Reste liegen vor allem in der Schleife zwischen β 1 und α 1, nahe α 3 und im Bereich des β -Faltblatts. Im Falle von *huPrP*(23-230) kann für die Signale des strukturierten Teils qualitativ derselbe Prozess beobachtet werden. Auf Grund starker Überlagerung der Signale, die bei steigendem Druck auch noch zunimmt, lässt sich hier allerdings nur das Verschwinden der Signale von G131, I139, F141, R156 und D178 zweifelsfrei feststellen. Der unstrukturierte N-terminale Bereich zeigt keine signifikanten Signalvolumenänderungen mit steigendem Druck (Abb. 3.12a). Bei Rücknahme des Drucks auf den Normalwert (0,1 MPa) erhält man wieder dieselben Spektren wie vor der Drucksteigerung. Alle Druckeffekte bei 293 K bis 200 MPa sind demnach vollkommen reversibel (siehe Abb. 3.18 in Kapitel 3.3.4).

Druckabhängigkeit der Linienbreiten

Wie in Abb. 3.2 zu sehen, zeigen die Linienbreiten der NMR-Signale ein druckabhängiges Verhalten. Die Linienbreiten bei 200 MPa liegen für die in Abb. 3.2 gezeigten Signale beim 2,1- (I139 $H^{\gamma 2}$ und $H^{\delta 1}$), 1,8- (L130 $H^{\delta 1}$), 1,7- (L130 $H^{\delta 2}$ und L125 $H^{\delta 2}$) bzw. 1,3-fachen (I182 $H^{\gamma 2}$ und $H^{\delta 1}$) der Linienbreite bei Normaldruck. Das Ausmaß der Verbreiterung ist also unterschiedlich stark. Einige Signale zeigen überhaupt keine Verbreiterung. In den 1H - ^{15}N -TROSY-Spektren lässt sich derselbe Effekt beobachten (Abb. 3.11). Auffälligerweise zeigen hier Signale, die keine signifikante Druckabhängigkeit ihrer Signalvolumina aufweisen, auch keine Linienverbreiterung mit dem Druck. Bei den anderen Signalen liegt die Verbreiterung bei 200 MPa zwischen 1,2-fach und zweifach. Da sich Effekte in dieser Größenordnung auch bei 1D- 1H -Signalen von Methylgruppen aus dem hydrophoben Kern des Proteins zeigen (Abb. 3.2), scheinen Austauschprozesse mit dem Lösungsmittel nicht der Grund für die Linienverbreiterung zu sein. Die beobachteten

Linienverbreiterungen werden auch nicht durch eine Zunahme der Viskosität des Wassers unter Druck verursacht. Bei 293 K zeigt Druck bis 200 MPa nur einen geringen Einfluss auf die Wasserviskosität. Genau genommen fällt die Viskosität bis 80 MPa auf etwa 98 % des Ausgangswertes ab und steigt dann leicht mit dem Druck an. Bei ca. 140 MPa erreicht sie wieder ihren ursprünglichen Wert. Erst bei Drücken über 200 MPa lässt sich ein linearer Anstieg der Wasserviskosität mit dem Druck feststellen (Stanley & Batten, 1969). Der Ursprung der beobachteten Linienverbreiterungen ist folglich konformationelle Heterogenität und/oder konformationeller Austausch.

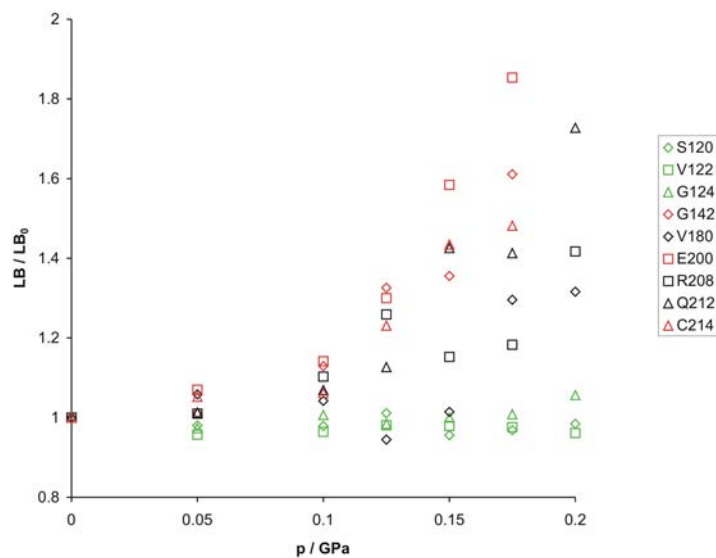


Abb. 3.11: Linienverbreiterung der Amidgruppensignale aus den TROSY-Spektren von huPrP(121-230) bei 293 K mit dem Druck. Aufgetragen ist die Linienbreite relativ zu der bei Normaldruck (LB_0). Grün markiert Reste, deren Signalvolumen über den Druck stabil bleibt, schwarz und rot markiert Reste, die deutlichen Signalvolumenabfall mit steigendem Druck zeigen wobei rot markierte Reste bei 200 MPa überhaupt nicht mehr detektierbar sind.

Ursachen der Signalvolumenänderungen

Der beobachtete Verlust an Signalvolumen kann entweder durch eine Zunahme des Signalverlusts während der INEPT-Periode auf Grund gesteigerter T_2 -Relaxation und/oder durch einen konformationellen Austauschprozess, der langsam auf der NMR-Zeitskala ist, hervorgerufen werden (Maurer et al., 2004). Da in den Spektren bei höheren Drücken keine zusätzlichen Signale detektierbar sind, müssten, läge langsamer Austausch vor, die Signale des zweiten Zustands zu schwach sein, um sie messen zu können. Dies könnte durch eine erhöhte T_2 -Relaxation des zweiten Zustands verursacht werden. Die erhöhte transversale Relaxationsrate, die beiden möglichen Erklärungen zu Grunde liegt, könnte durch Austauschvorgänge oder eine gestiegene Molekülmasse des Proteins durch Aggregation des zweiten Zustands hervorgerufen werden. Liegt schneller Austausch vor, kann die Zunahme der transversalen Relaxationsrate aus der Verbreiterung der Signale abgeschätzt werden. Die

beobachteten Linienverbreiterungen liegen zwischen 1,2-fach bis zweifach. Verwendet man die in Kapitel 2.2 beschriebenen Näherungen des Signalverlusts in der INEPT-Periode (Gl. 2.15), kann maximal ein Signalverlust von 20 % aus der druckabhängigen Linienverbreiterung erklärt werden. Für die meisten Reste liegt dieser Wert noch niedriger. Es muss also ein weiterer Mechanismus für den Signalverlust mitverantwortlich sein. Dies deutet darauf hin, dass es sich um einen langsamen bis langsam-intermediären Austauschprozess handelt.

Aus den Änderungen der Signalvolumina abgeleitete freie Enthalpie

Wie oben ausgeführt, lassen sich die Signalvolumenverluste unter Annahme langsamen Austauschs ausreichend gut beschreiben. Mit Gl. 2.20 lässt sich die Änderung der molaren freien Enthalpie bei Normaldruck (ΔG_0) aus der Druckabhängigkeit der Signalvolumina für einen konformationellen Zweizustandsübergang berechnen. In Abb. 3.12c sind die ΔG_0 -Werte für die einzelnen Reste von *huPrP*(121-230) abgebildet. Starke Überlappungen der Signale in den Spektren von *huPrP*(23-230) bei höheren Drücken verhinderten eine quantitative Auswertung der Signalvolumina für dieses Konstrukt. In Abb. 3.13 ist die Verteilung der für *huPrP*(121-230) ermittelten ΔG_0 dargestellt. Die Verteilung der freien Enthalpien ist eindeutig in zwei Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 umfasst 33 Reste mit einem mittleren ΔG_0 von $10,8 \pm 1,9$ kJ/mol, Gruppe 2 besteht aus 25 Resten mit einem mittleren ΔG_0 von $18,6 \pm 2,9$ kJ/mol. Die beiden Gruppen sind in Abb. 3.14 farblich in der NMR-Struktur von *huPrP*(121-230) hervorgehoben. Reste der Gruppe 1 (rot) finden sich vor allem in der $\beta 1/\alpha 1$ -Schleife und in der dem Lösungsmittel zugewandten Seite von $\alpha 3$. Diese Reste bilden eine Gruppe auf der Oberfläche des Proteins (siehe Abb. 3.14c), die von Resten der Gruppe 2 umrandet wird.

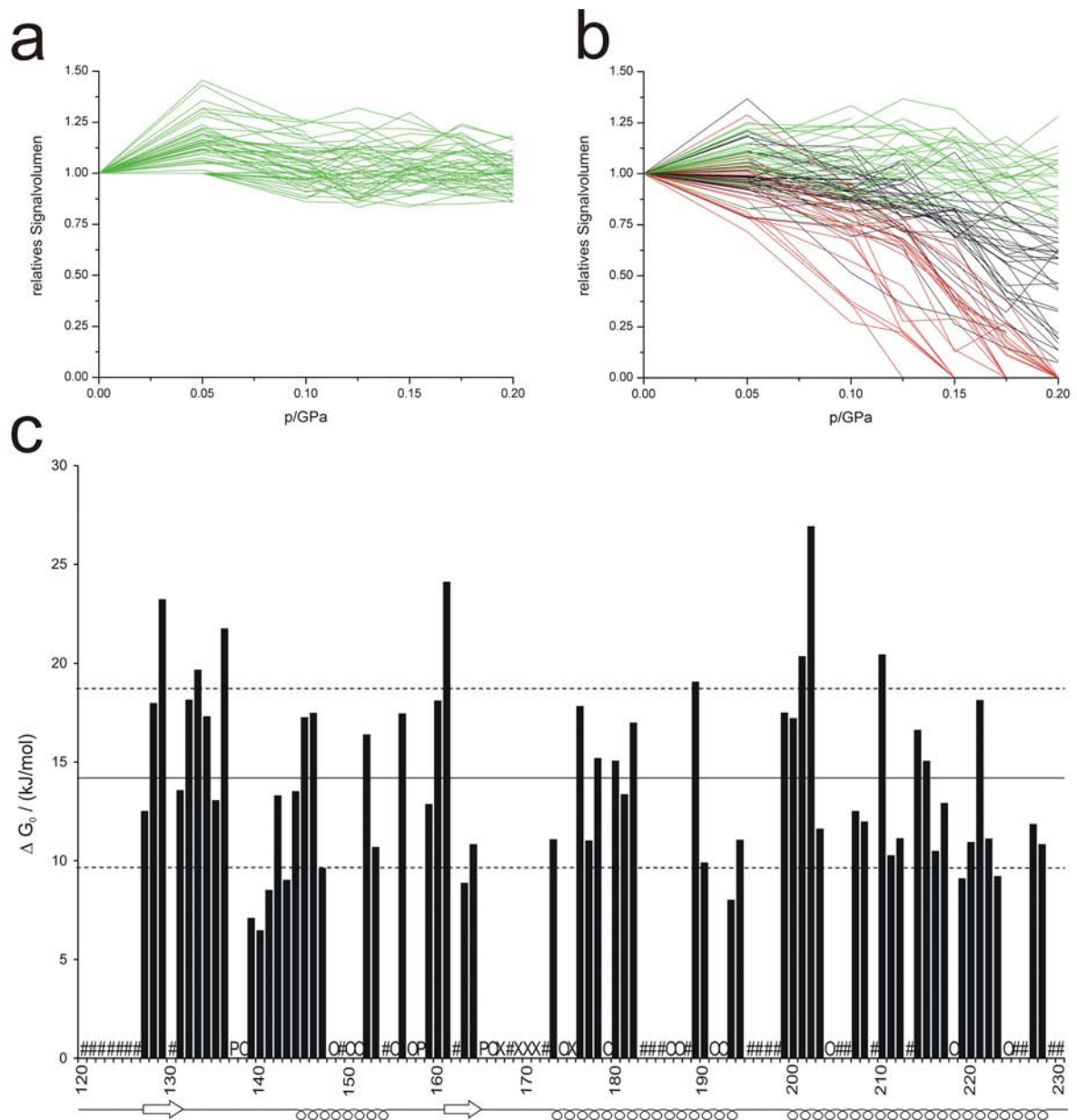


Abb. 3.12: Druckabhängigkeit der Signalvolumina aus den TROSY-Spektren bei 293 K. Die Signalvolumina sind auf den jeweiligen Wert bei 0,1 MPa normiert. (a) Signalvolumina vom N-Terminus (Reste 23-120), (b) vom strukturierten Kern (Reste 121-230). Reste ohne signifikante Änderung der Signalvolumina sind grün und Reste, deren Signale bei höheren Drücken nicht mehr detektierbar sind, sind rot eingezeichnet. (c) Molare freie Enthalpien bei Normaldruck (ΔG_0) für den Übergang zwischen den Konformationen N und I berechnet aus den Signalvolumina unter Annahme langsamen Austauschs. Der Mittelwert (14,2 kJ/mol) ist als durchgezogene Linie, der Mittelwert plus/minus eine Standardabweichung als gestrichelte Linien eingezeichnet. Reste ohne signifikante Signalvolumenänderung sind mit # markiert, auf Grund starker Signalüberlappung nicht auswertbare Signale mit O, Proline mit P und andere nicht sichtbare oder zugeordnete Reste mit X.

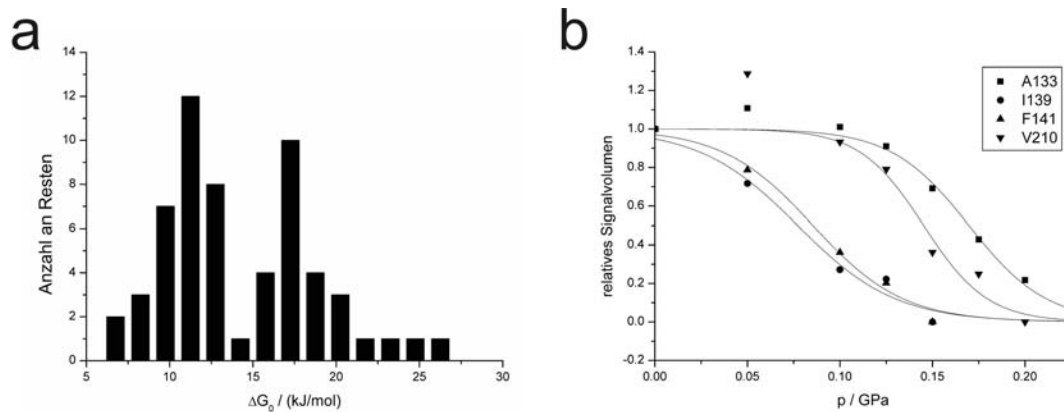


Abb. 3.13: (a) Verteilung der ΔG_0 -Werte bei 293 K der einzelnen Reste für den konformationellen Übergang von N zu I ermittelt aus den druckabhängigen Signalvolumenänderungen von *huPrP*(121-230). (b) Druckabhängigkeit der Signalvolumina mit Kurven aus den ΔG -Berechnungen gemäß Gl. 2.20. Es sind typische Reste für beide Gruppen, I_1 (I139, F141) und I_2 (A133, V210), gezeigt.

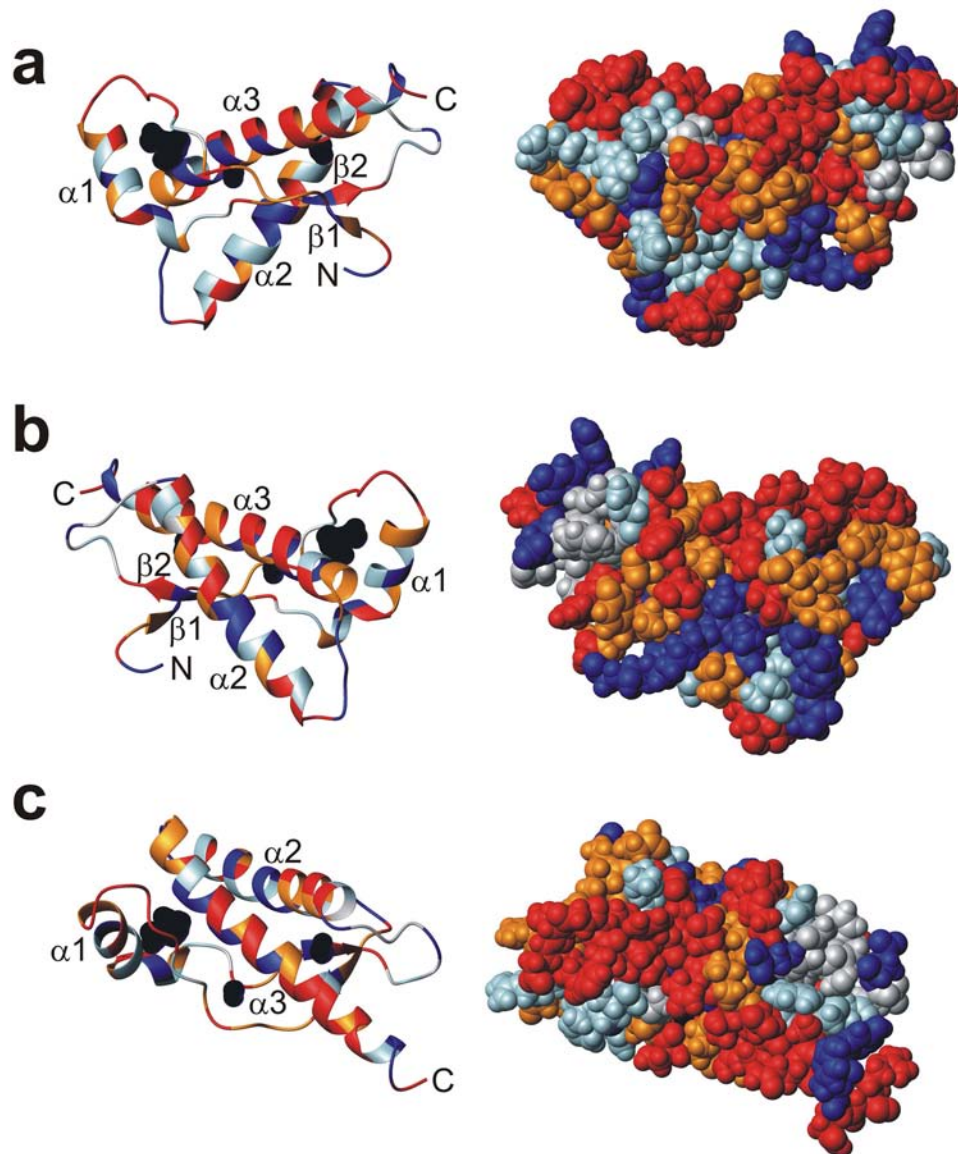


Abb. 3.14: Druckeffekte auf die Signalvolumina. (a) Bänder- und CPK-Modell von *huPrP*(121-230) (PDB: 1QM2) mit Kavitäten (dunkle Oberflächen), berechnet mit einem Abstradius von 0,12 nm. Reste mit ΔG_0 -Werten für den N-I-Übergang der Gruppe 1 (niedrige ΔG_0) sind rot, Reste der Gruppe 2 (höhere ΔG_0) orange, Reste ohne signifikante Änderung der Signalvolumina dunkelblau, Reste, bei denen das Signalvolumen nicht bestimmbar ist, hellblau und nicht sichtbare oder zugeordnete Reste grau eingefärbt. (b) (a) um 180° um die y-Achse gedreht. (c) (a) um 90° um die x-Achse gedreht.

3.3.3 Identifizierung von Faltungsintermediaten

Die Druckantwort von *huPrP* setzt sich zusammen aus: 1) Lineare Änderungen der chemischen Verschiebungen, die wiederum zum Teil aus der unspezifischen Druckwirkung auf Peptide und Proteine bestehen, 2) nicht-lineare Änderungen der chemischen Verschiebungen, die auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen leicht unterschiedlichen Konformationen im schnellen Austausch hindeuten, und 3) ein Verlust an Signalvolumen, der wahrscheinlich von einer Gleichgewichtsverschiebung von Konformationen im langsamen Austausch herrührt. Es treten also mindestens zwei verschiedene Konformationsübergänge zwischen nativen und intermediären Zuständen auf. Die Auswertung der chemischen Verschiebungen deutet darauf hin, dass bei Normaldruck zwei Zustände N_1 und N_2 existieren. Aus den Änderungen der Signalvolumina lässt sich weiterhin auf zwei bei Normaldruck praktisch nicht populierte energetisch höher liegende Intermediate I_1 und I_2 schließen. Die Energiedifferenzen der konformationellen Übergänge sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Starke Druckeffekte treten gewöhnlich in der Nähe von lokalen Packungsdefekten im hydrophoben Kern eines Proteins auf. Dies ist, wie in Abb. 3.14 zu sehen, auch beim *huPrP* der Fall.

Protein	T/K	Übergang	K_0	ΔG_0 /(kJ/mol)	ΔV_0 /(ml/mol)	ΔV_0 /nm
<i>huPrP</i> (23-230)	293					
Reste 23-120		$N_1 \leftrightarrow N_2$	0,292	$3,0 \pm 1,1$	-63 ± 11	$-0,10 \pm 0,02$
		$N \leftrightarrow I$	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Reste 121-230		$N_1 \leftrightarrow N_2$	0,300	$2,9 \pm 1,3$	-79 ± 15	$-0,13 \pm 0,02$
		$N \leftrightarrow I$	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<i>huPrP</i> (121-230)	293					
Reste 121-230		$N_1 \leftrightarrow N_2$	0,292	$3,0 \pm 1,4$	-86 ± 17	$-0,14 \pm 0,03$
		$N \leftrightarrow I_1$	0,012	$10,8 \pm 1,9$	-66 ± 26	$-0,11 \pm 0,04$
		$N \leftrightarrow I_2$	<0,001	$18,6 \pm 2,9$	-125 ± 32	$-0,21 \pm 0,05$
<i>huPrP</i> (121-230)	313					
Reste 121-230		$N_1 \leftrightarrow N_2$	0,292	$3,2 \pm 1,2$	-63 ± 12	$-0,10 \pm 0,02$
		$N \leftrightarrow I$	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<i>shPrP</i> (90-231)*	303					
Reste 90-231		$N_1 \leftrightarrow N_2$	0,270	$3,3 \pm 1,1$	-47 ± 8	$-0,08 \pm 0,01$
		$N \leftrightarrow I_1$	0,008	$12,3 \pm 2,9$	Werte nicht verfügbar	
		$N \leftrightarrow I_2$	<0,001	$23,2 \pm 3,5$		

Tab. 3.2: Molare freie Enthalpie bei Normaldruck und molares Reaktionsvolumen der verschiedenen konformationellen Übergänge (* berechnet aus den Daten von Kuwata et al. (Kuwata et al., 2002), n. b.: Werte nicht bestimmbar).

Abb. 3.15 zeigt schematisch die druckabhängige Faltungsenergielandschaft des menschlichen Prionproteins. Bei Normaldruck sind die beiden nativen Zustände N_1 und N_2 sowie die energetisch ungünstigeren Intermediate I_1 und I_2 zu erkennen. Das Profil ändert sich mit zunehmendem Druck: Zunächst wird N_2 energetisch günstiger und somit die am stärksten populierte Konformation. Bei sehr hohem Druck werden I_1 und I_2 bevorzugt.

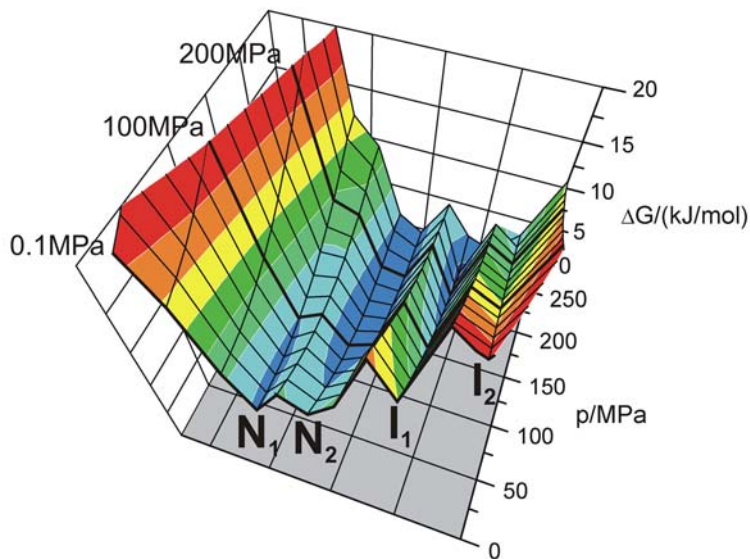


Abb. 3.15: Schematische Darstellung der Energielandschaft von *huPrP* als Funktion des Drucks bei 293 K. Die Abszisse stellt eine abstrakte Repräsentation des Konformationsraums dar.

3.3.4 Einfluss der Temperatur

Es wurden 1D- ^1H -Spektren von *huPrP*(23-230) und *huPrP*(121-230) bei Normaldruck und steigender Temperatur von 293 K bis zu 333 K in Schritten von 10 K aufgenommen. Dabei ändern sich die chemischen Verschiebungen der Resonanzen linear mit der Temperatur. Dasselbe wurde auch für die chemischen Verschiebungen bei einer Reihe von 1D- ^1H -Spektren und ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren bei Normaldruck und Temperaturen zwischen 293 K und 313 K aufgenommen in 5 K-Schritten beobachtet (Abb. 3.16). Bei Temperaturen über 303 K beginnt das Protein zu denaturieren, bei 333 K bleibt nur kurzzeitig ein geringer Anteil in Lösung. Hält man die Temperatur länger über 313 K aggregiert das Protein irreversibel. Dies machte eine Analyse der Signalintensitäten und somit des Übergangs zum Intermediat I bei höheren Temperaturen unmöglich. Ähnliche Beobachtungen wurden von Kuwata und Mitarbeitern (Kuwata et al., 2002) für das Prionprotein aus Hamstern getroffen,

das ebenfalls bei Temperaturen über 313 K zu aggregieren beginnt. Zusätzlich wurde eine Temperaturreihe von *huPrP*(23-230) bei 200 MPa aufgenommen. Es wurden 1D- ^1H -Spektren und ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren zwischen 293 K und 333 K in 10 K-Schritten gemessen (Abb. 3.17 und 3.19). Bei steigender Temperatur geht zunehmend die Dispersion der Signale verloren. Die Spektren bei erhöhtem Druck und erhöhter Temperatur erlauben vor allem hinsichtlich der steigenden Linienbreiten die Vermutung, dass Aggregate aus mehreren PrP-Molekülen entstehen. Nach Druck- und Temperaturniedrigung auf 0,1 MPa und 293 K erhält man das Ausgangsspektrum wieder (Abb. 3.18). Sowohl die Druck- als auch die Temperatureffekte sind demnach reversibel. Allerdings ist durch die Temperaturerhöhung ein Teil des Proteins irreversibel aggregiert, was zu einer deutlichen Abnahme der Signalintensitäten führte. Dieser Effekt ist sofort beim Erhöhen der Temperatur zu erkennen (Abb. 3.19c).

Analog zu der Druckreihe an *huPrP*(121-230) bei 293 K wurden ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren bei 0,1, 50, 100, 125, 150, 175 und 200 MPa und 313 K aufgenommen. Die Mittelwerte der Druckkoeffizienten $|B_1^*(H)|$, $|B_1(N)|$, $|B_2^*(H)|$ und $|B_2(N)|$ bei 313 K liegen mit 0,60 ppm/GPa, 3,36 ppm/GPa, 1,75 ppm/GPa² und 9,05 ppm/GPa² geringfügig höher als bei 293 K (Tab. 3.1). Die Korrelation der Druckeffekte auf die chemischen Verschiebungen von *huPrP*(121-230) bei den beiden Temperaturen ist allerdings recht hoch. Die lokale Druckempfindlichkeit unterscheidet sich also zwischen 293 und 313 K nicht. Die Korrelationskoeffizienten der beiden Temperaturstufen zueinander von $B_1^*(H)$ und $B_1(N)$ liegen bei 0,83 und 0,71. Für die Druckkoeffizienten zweiter Ordnung liegen auf Grund des höheren Fehlers die Korrelationskoeffizienten nur bei 0,24 ($B_2^*(H)$) und 0,37 ($B_2(N)$). Berechnet man allerdings die Korrelationskoeffizienten zwischen den Druckreihen bei den beiden Temperaturen direkt aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen (siehe Gl. 3.2), dann ergeben sich relativ hohe Werte. Der Mittelwert dieser Korrelationskoeffizienten für jeden Rest liegt bei 0,80 für die H^{N} und bei 0,90 für die N^{H} (siehe auch Anhang 7.2). Wie bei 293 K weisen auch bei 313 K die Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen einiger Reste auf einen konformationellen Zweizustandsübergang im schnellen Austausch zwischen zwei nativen Konformationen N_1 und N_2 hin. Bei 313 K liegt ΔG_0 für diesen Übergang bei $3,2 \pm 1,2$ kJ/mol, ist also im Rahmen des Fehlers in Übereinstimmung mit dem Wert bei 293 K (siehe Tab. 3.2).

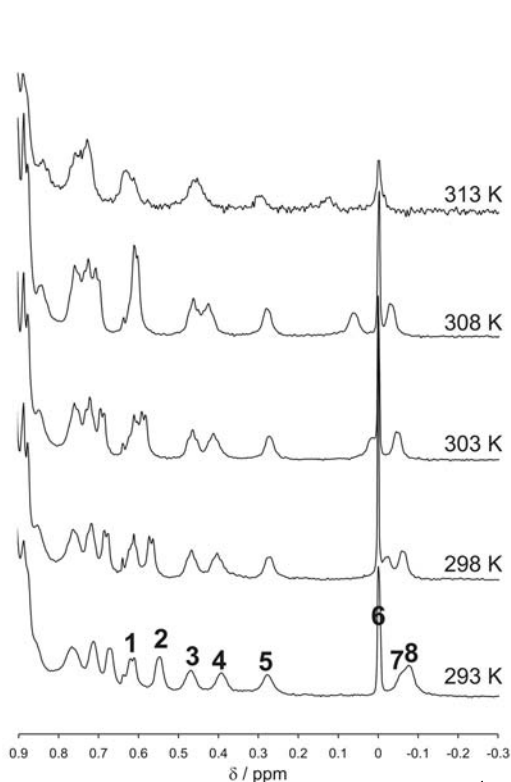


Abb. 3.16: Temperaturabhängigkeit der ^1H -Spektren von *huPrP*(121-230) bei Normaldruck. Einzelne Resonanzen sind markiert: (1) Leu130 H^{δ^2} , (2) Leu125 H^{δ^2} , (3) Ile139 H^{δ^1} , (4) Ile182 H^{δ^1} , (5) Ile182 H^{γ^2} , (6) DSS (interne Referenz), (7) Leu130 H^{δ^1} , (8) Ile139 H^{γ^2} .

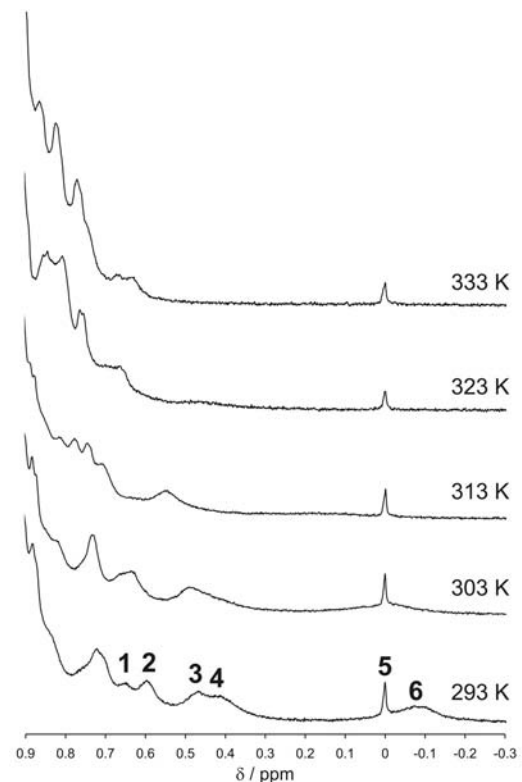


Abb. 3.17: Temperaturabhängigkeit der ^1H -Spektren von *huPrP*(23-230) bei 200 MPa. Einzelne Resonanzen sind markiert: (1) Leu130 H^{δ^2} , (2) Leu125 H^{δ^2} , (3) Ile139 H^{δ^1} , (4) Ile182 H^{δ^1} und Ile182 H^{γ^2} , (5) DSS (interne Referenz), (6) Leu130 H^{δ^1} und Ile139 H^{γ^2} .

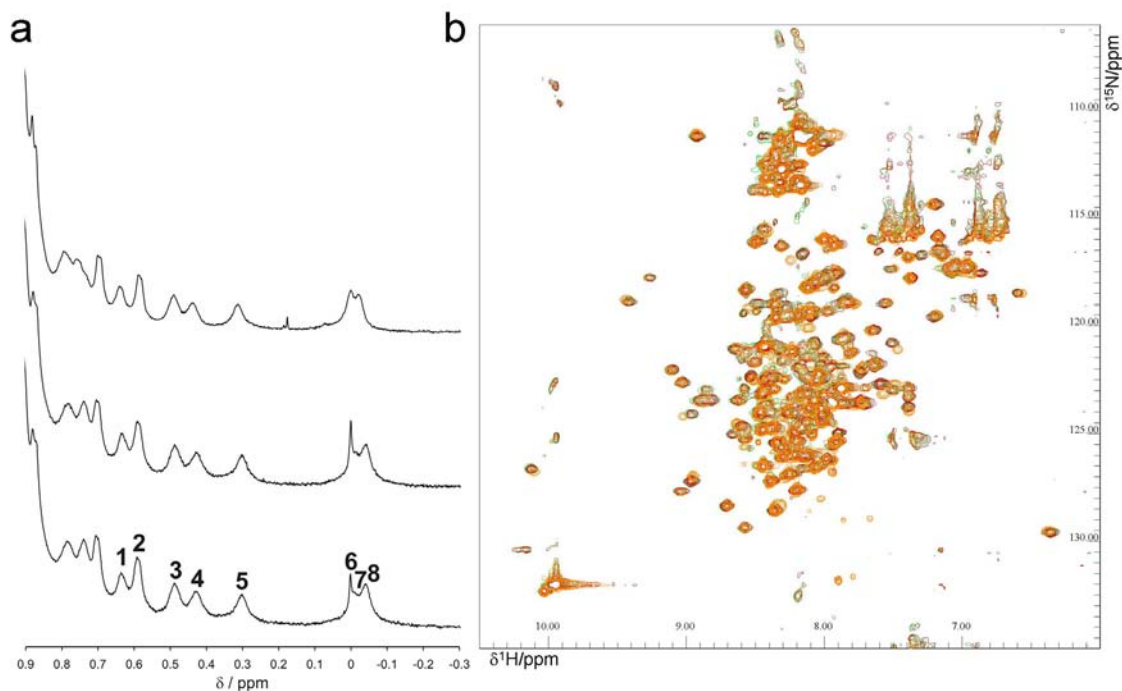


Abb. 3.18: ^1H -Spektren (a) und ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren (b) von *huPrP*(23-230) bei 293 K und Normaldruck. Die Spektren wurden vor Druck- und Temperaturerhöhung (unten/grün), nach Druckerhöhung auf 200 MPa bei 293 K (mittig/rot) und nach Druckerhöhung auf 200 MPa bei gleichzeitiger Temperaturerhöhung auf 333 K (oben/orange) aufgenommen. Einzelne Resonanzen sind markiert: (1) Leu130 H^{δ^2} , (2) Leu125 H^{δ^2} , (3) Ile139 H^{δ^1} , (4) Ile182 H^{δ^1} , (5) Ile182 H^{γ^2} , (6) DSS (interne Referenz), (7) Leu130 H^{δ^1} , (8) Ile139 H^{γ^2} .

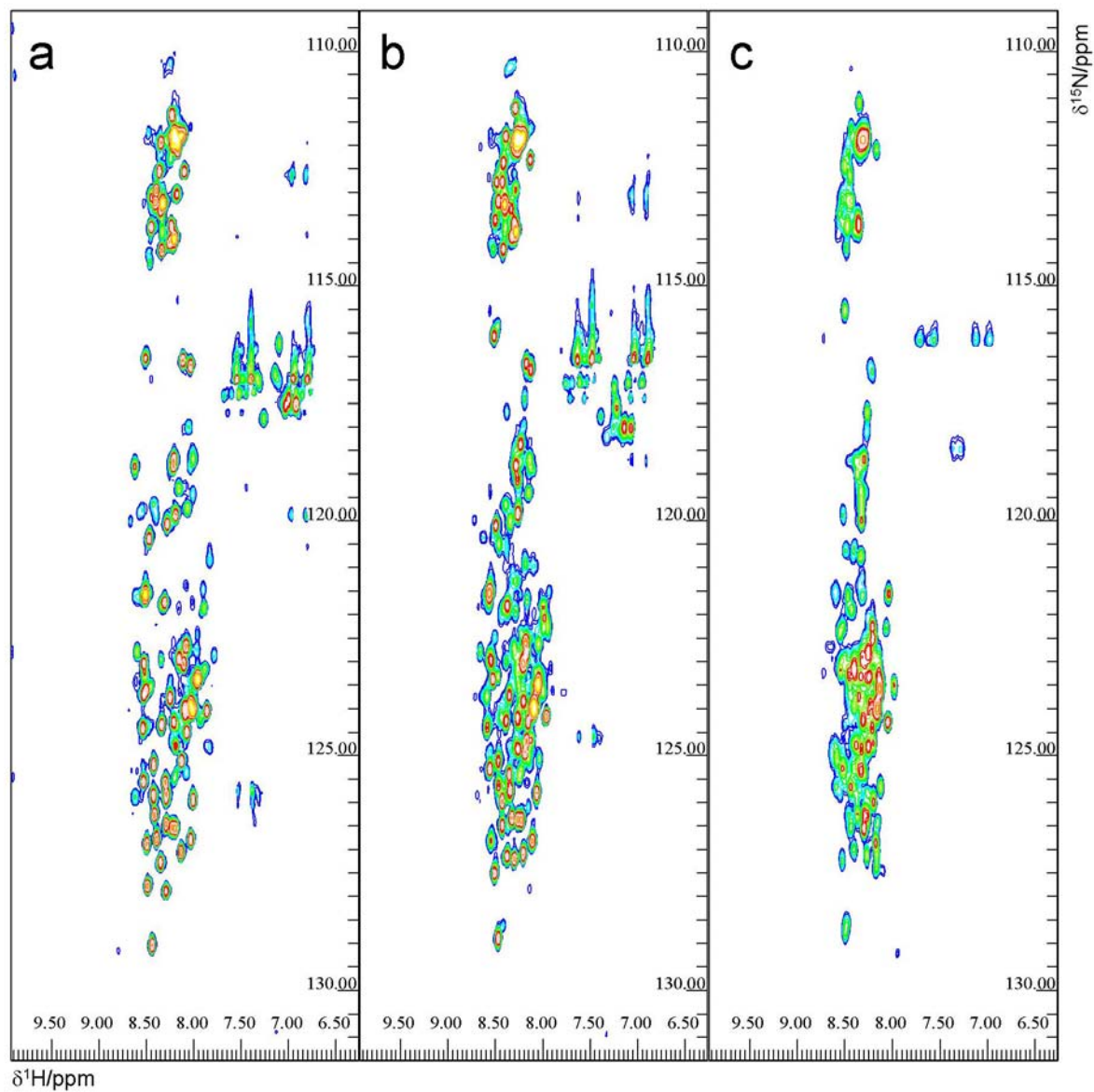


Abb. 3.19: ^1H - ^{15}N -TROSY Spektren von *huPrP*(23-230) bei 200 MPa und verschiedenen Temperaturen: (a) 293 K, (b) 313 K und (c) 333 K.

3.3.5 Vergleich der Prionproteine von Mensch und Hamster

Die Prionproteine von Mensch (*huPrP*) und Hamster (*shPrP*) sind sich sowohl in ihrer Sequenz (Abb. 3.20) als auch in ihrer Struktur (Abb. 3.21) sehr ähnlich. In *in vitro*-Modellen konnte experimentell gezeigt werden, dass humanes Prionprotein nicht durch Hamsterprionprotein zur Fibrillenbildung gebracht werden kann und umgekehrt (Vanik et al., 2004; Jones & Surewicz, 2005). Es existiert demnach wahrscheinlich eine Artenbarriere für die Übertragung von Prionerkrankungen zwischen Mensch und Hamster. Besonders wichtig für die Ausbildung dieser Barriere scheinen vor allem die Aminosäureaustausche I138M und I139M zu sein (Vanik et al., 2004). Um den Einfluss der Aminosäureaustausche zwischen den beiden Spezies auf Druckstabilität und konformationelle Gleichgewichte zu untersuchen, wurden die oben vorgestellten Daten mit den von Kuwata und Mitarbeitern am *shPrP*(90-231) ermittelten (Kuwata et al., 2002) verglichen.

	90	100	110	120	130	140	150	160
Human	GQGGGTHS	QWNKPSKPKTNMKH	MAGAAAAGAVVGG	LGGYMLGS	SMSRPI	IHF	SDYEDRYREN	MHRYPNQ
Hamster	GQGGGTHN	QWNKPSKPKTNMKH	MAGAAAAGAVVGG	LGGYMLGS	SMSRPM	MHFGN	DWEDRYREN	MNRYPNQ
	170	180	190	200	210	220		
Human	VYYRPMDEYS	NQNNFVHDCVNITIKQHTV	TTTTKGENFTETD	VKMERVVEQMC	ITQYERESQAYYQ	--RGS		
Hamster	VYYRPMVDQYN	NQNNFVHDCVNITIKQHTV	TTTTKGENFTETD	IKIMERVVEQMC	TQYQKESQAYYD	GRR-S		

Abb. 3.20: Sequenzvergleich von *huPrP* und *shPrP*. Der nicht gezeigte N-Terminus beider Proteine ist bis auf G56T identisch.

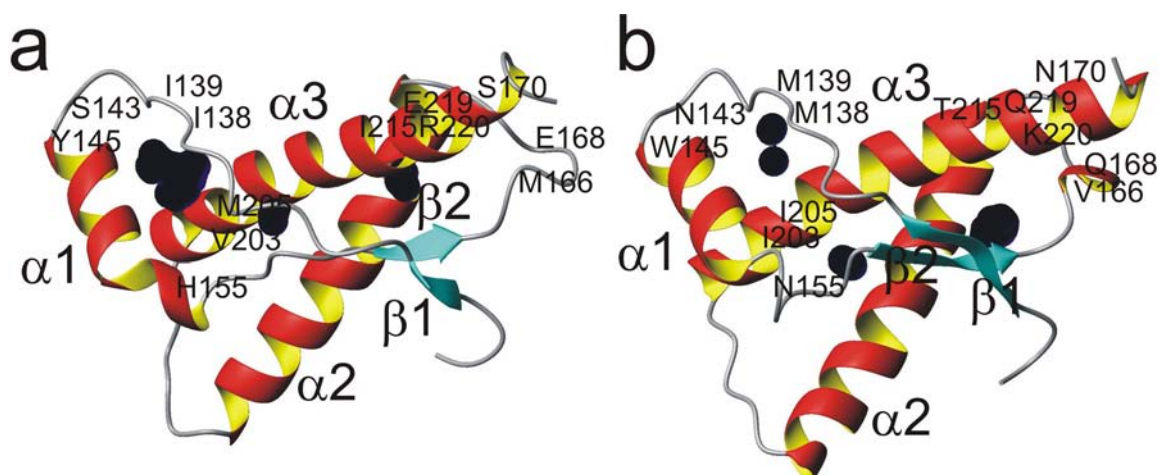


Abb. 3.21: Vergleich des strukturierten Kerns von *huPrP* (a) und *shPrP* (b) (PDB: 1QM2 und 1B10). Die Reste, die sich zwischen den beiden Spezies unterscheiden, sind in den Strukturen markiert. Dunkle Oberflächen zeigen Kavitäten an (Abtastradius 0,12 nm).

Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen

Die Druckdaten des *shPrP*(90-231) bei pH 5,2 und 303 K wurden wie für das menschliche Protein beschrieben ausgewertet. Es wurden Druckkoeffizienten gemäß Gl. 2.16 ermittelt und mit denen von *huPrP*(121-230) bei pH 4,8 und 293 K verglichen. Wie oben beschrieben hat der Temperaturunterschied von 10 K keinen entscheidenden Einfluss auf die Druckkoeffizienten. In den Abb. 3.22 und 3.23 sind die um die Standardpeptidwerte korrigierten Druckkoeffizienten der H^N und die Druckkoeffizienten der N^H für beide Proteine dargestellt. Die Mittelwerte der Druckkoeffizienten erster Ordnung von *shPrP*(90-231) liegen mit 0,50 ppm/GPa ($|B_1^*(H)|$) und 3,16 ppm/GPa ($|B_1(N)|$) (Reste 90-231) bzw. 0,57 ppm/GPa ($|B_1^*(H)|$) und 3,04 ppm/GPa ($|B_1(N)|$) (nur Reste 121-230) recht nahe bei denen von *huPrP*(121-230) (0,54 ppm/GPa ($|B_1^*(H)|$) und 3,35 ppm/GPa ($|B_1(N)|$)) (Tab. 3.1). Bei den Koeffizienten zweiter Ordnung sind die Unterschiede deutlich größer: 1,03 ppm/GPa² ($|B_2^*(H)|$) und 5,86 ppm/GPa² ($|B_2(N)|$) (Reste 90-231) bzw. 1,18 ppm/GPa² ($|B_2^*(H)|$) und 6,18 ppm/GPa² ($|B_2(N)|$) (nur Reste 121-230) im Vergleich zu *huPrP*(121-230) mit 1,69 ppm/GPa² ($|B_2^*(H)|$) und 7,29 ppm/GPa² ($|B_2(N)|$). Dies spiegelt sich auch in den Korrelationskoeffizienten der beiden Proteine (nur Reste 121-230) wider, die bei 0,67 ($|B_1^*(H)|$), 0,52 ($|B_1(N)|$), 0,18 ($|B_2^*(H)|$) und 0,16 ($|B_2(N)|$) liegen. Die Korrelationen sind deutlich schlechter als zwischen *huPrP*(121-230) bei 293 K und 313 K oder zwischen *huPrP*(23-230) und *huPrP*(121-230). Die Korrelationskoeffizienten, die gemäß Gl. 3.2 direkt aus den chemischen Verschiebungen berechnet wurden, sind auch beim Vergleich von *huPrP*(121-230) mit *shPrP*(90-231) deutlich höher. Der Mittelwert der Korrelationskoeffizienten der korrespondierenden Reste beider Proteine ist 0,82 für die H^N und 0,86 für die N^H . Demnach ist das Druckverhalten beider Proteine recht ähnlich. Allerdings liegen die Korrelationskoeffizienten erwartungsgemäß niedriger als zwischen *huPrP*(23-230) und *huPrP*(121-230) (siehe auch Anhang 7.2).

Nimmt man die Vergleiche aller Druckkoeffizienten der beiden Proteine zusammen, fallen einige Reste auf Grund ihrer sehr unterschiedlichen Druckantworten bei Mensch und Hamster besonders ins Auge (Abb. 3.22 und 3.23). Große Unterschiede weisen vor allem G131G (zuerst der Aminosäuretyp beim Menschen, dann die Restnummer, dann der Typ beim Hamster), I138M, I139M, H140H, F141F, Q160Q, Y163Y, D202D, E211W, I215T und E219Q auf.

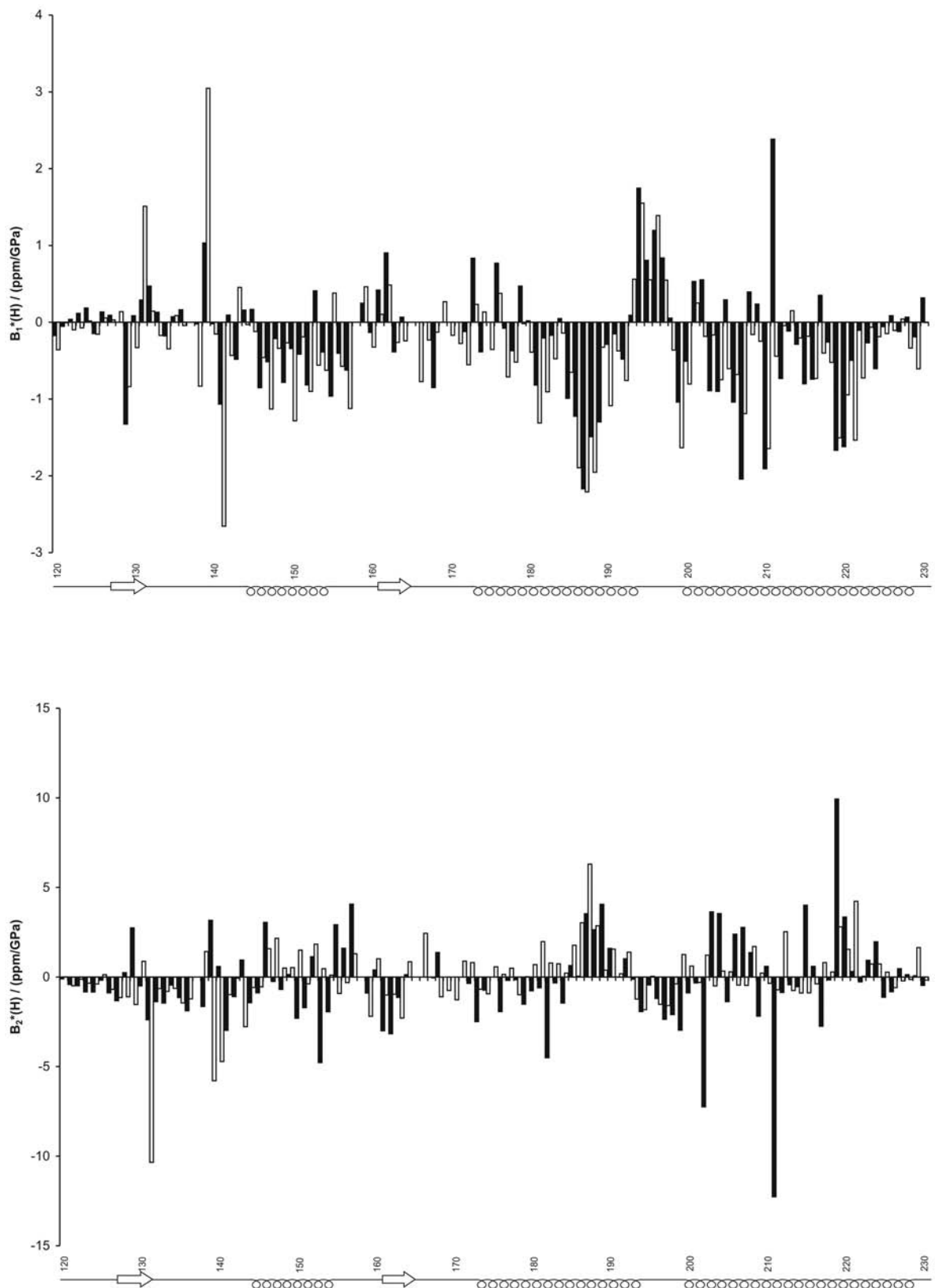


Abb. 3.22: Um die Werte der Standardpeptide korrigierte Druckkoeffizienten erster (oben) und zweiter Ordnung (unten) der chemischen Verschiebungen der H^N aus den TROSY/HSQC-Spektren von *huPrP*(121-230) bei 293 K (schwarze Balken) und *shPrP*(90-231) bei 303 K (weiße Balken).

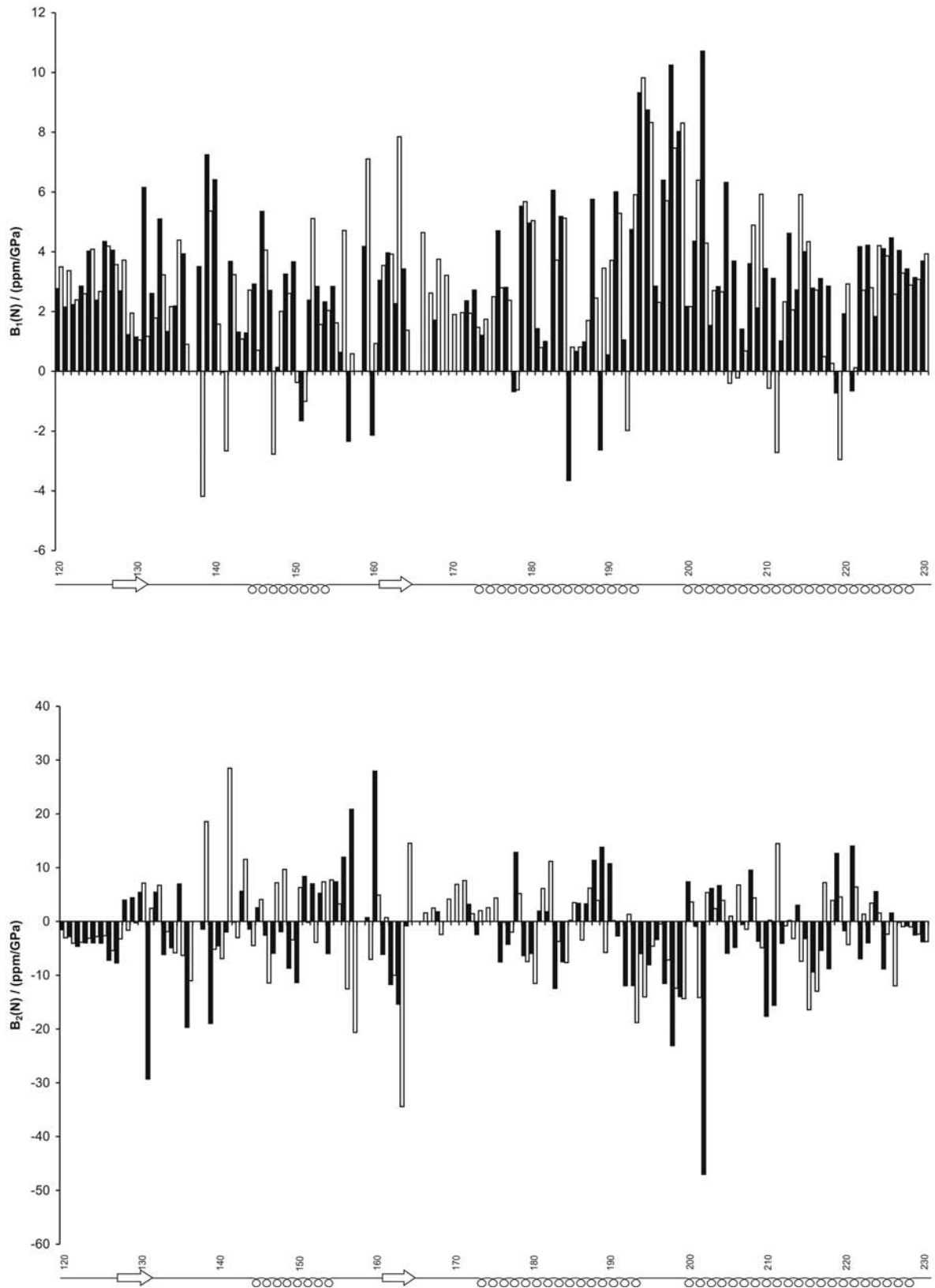


Abb. 3.23: Druckkoeffizienten erster (oben) und zweiter Ordnung (unten) der chemischen Verschiebungen der N^H aus den TROSY/HSQC-Spektren von *huPrP*(121-230) bei 293 K (schwarze Balken) und *shPrP*(90-231) bei 303 K (weiße Balken).

Identifizierung von Faltungsintermediaten

Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen korrigiert um die Druckänderungen von Standardpeptiden (Arnold et al., 2002) zeigt für einige Reste einen Verlauf, der auf einen konformationellen Übergang zwischen zwei Zuständen hinweist wie auch für das menschliche Prionprotein beschrieben (Abb. 3.24). Diese beiden Zustände befinden sich im schnellen Austausch auf der NMR-Zeitskala. Somit lässt sich analog zum *huPrP* die molare freie Enthalpie für diesen $N_1 \leftrightarrow N_2$ Übergang gemäß Gl. 2.17 berechnen. Sie beträgt $3,3 \pm 1,1$ kJ/mol und liegt somit im selben Bereich wie ΔG_0 für den entsprechenden Übergang bei *huPrP*(121-230). Daraus folgt eine Population des Zustands N_2 von 27 % bei Normaldruck.

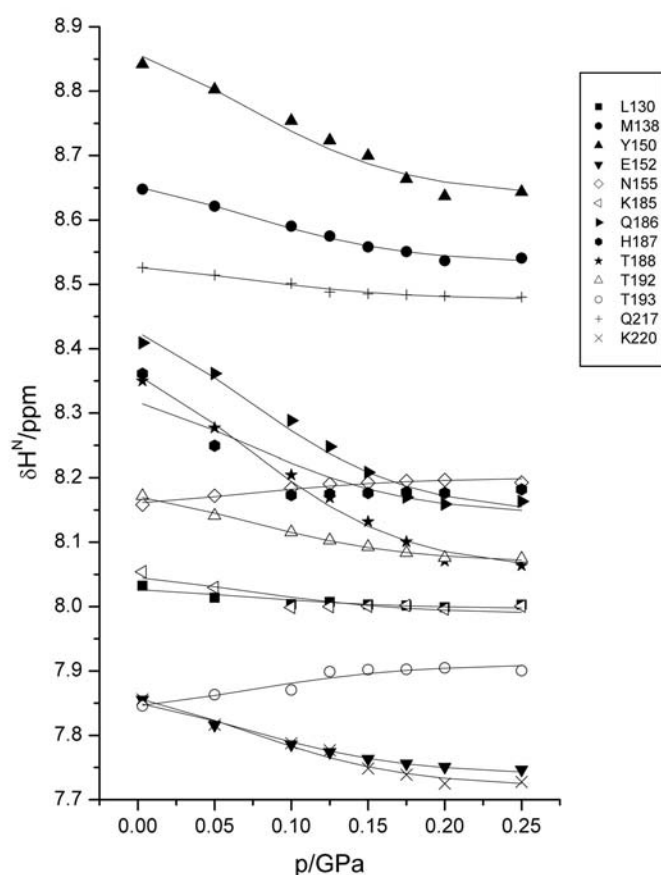


Abb. 3.24: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung $\delta^N H$ der Amidprotonen aus den HSQC-Spektren von *shPrP*(90-231) bei 303K (Kuwata et al., 2002). Die chemischen Verschiebungen wurden um die Druckantwort der ungefalteten Standardpeptide korrigiert (siehe Kapitel 2.3). Es sind alle Reste mit eindeutig asymptotischen Verhalten im aufgenommenen Druckbereich gezeigt. Die Linien repräsentieren die Anpassung von Gl. 2.17 an die Daten.

Aus den Druckabhängigkeiten der Signalvolumina aus den 1H - ^{15}N -HSQC-Spektren wurde von Kuwata und Mitarbeitern eine mittlere ΔG_0 für den konformationellen Übergang zu einem intermediären Zustand I von 15,4 kJ/mol ermittelt (Kuwata et al., 2002). Die Verteilung der ΔG_0 -Werte der einzelnen Reste (Abb. 3.25) deutet wie bei *huPrP*(121-230) auf das Vorhandensein zweier Zustände I_1 und I_2 mit ΔG_0 von $12,3 \pm 2,9$ kJ/mol bzw. $23,2 \pm 3,5$

kJ/mol hin. Die molaren freien Enthalpien haben dieselbe Größenordnung wie beim menschlichen Prionprotein, liegen aber geringfügig höher. Reste aus I_1 mit den niedrigeren ΔG_0 -Werten liegen vor allem im Bereich von $\alpha 2$ und $\alpha 3$ (Abb. 3.26, rot). Diese beiden Helices treten demnach bei *shPrP* bevorzugt in einen ungeordneten intermediären Zustand über (Kuwata et al., 2002). Im menschlichen Prionprotein dagegen treten in $\alpha 2$ und $\alpha 3$ auch druckstabilere Reste auf. Eine Anhäufung von Resten aus I_1 findet sich hier vor allem in der $\beta 1/\alpha 1$ -Schleife (Abb. 3.14).

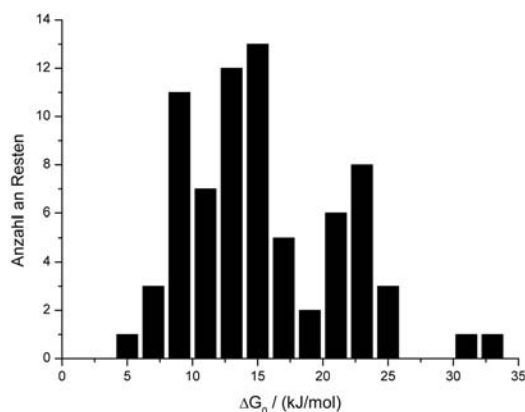


Abb. 3.25: Verteilung der ΔG_0 -Werte der einzelnen Reste von *shPrP*(90-231) für den konformationellen Übergang von N zu I ermittelt aus den druckabhängigen Signallvolumenänderungen (Kuwata et al., 2002).

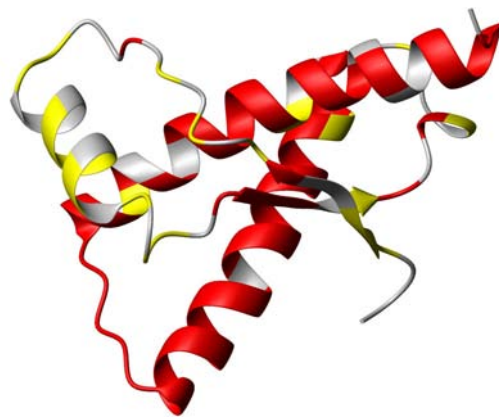


Abb. 3.26: ΔG_0 -Werte für den Übergang von N zu I von *shPrP*(90-231). Reste mit niedrigem ΔG_0 (I_1) sind rot, Reste mit hohem ΔG_0 (I_2) markiert.

3.4 Diskussion

Die Bedeutung der Proteinkonformation für die Übertragbarkeit von Prionerkrankungen, ihre Ausprägungen und die Entstehung von Artenbarrieren und verschiedener *prion strains* konnte mittlerweile eindeutig gezeigt werden (Peretz et al., 2002; Tanaka et al., 2004; Legname et al., 2004; Castilla et al., 2005; Tanaka et al., 2005; Jones & Surewicz, 2005). Gerade im Hinblick auf die *prion strains* wird besonders deutlich, dass die Umfaltungswege von PrP in verschiedene amyloide und infektiöse Konformationen recht vielseitig und komplex sein müssen und vermutlich über eine Reihen von Intermediaten und Nebenkongformationen ablaufen (Baskakov et al., 2002). Dies macht eine möglichst

detaillierte Charakterisierung der Faltungsmöglichkeiten verschiedener Prionproteine unerlässlich. Die Anwendung von hohem hydrostatischen Druck ist eine Möglichkeit, vielseitige Umfaltungs- und Aggregationsprozesse von Prionproteinen auszulösen und zu beeinflussen sowie intermediäre Formen zu stabilisieren (Cordeiro et al., 2005; Torrent et al., 2006). Die in dieser Arbeit verwendete Verknüpfung solcher Hochdruckexperimente mit hoch aufgelöster NMR-Spektroskopie erlaubt es, diese intermediären Formen in atomarem Detail zu charakterisieren. Erste Untersuchungen an druckstabilisierten Intermediaten des Hamsterprionproteins mittels NMR-Spektroskopie wurden in der Gruppe von Kazuyuki Akasaka durchgeführt (Kuwata et al., 2002). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten am menschlichen Prionprotein erlauben im Vergleich dazu, Rückschlüsse auf die molekularen Ursachen von Artenbarrieren bei TSEs zu ziehen.

3.4.1 Faltungsintermediate und konformationelle Gleichgewichte

Aus der Änderung der chemischen Verschiebung und der Signalintensität eines Amidprotonensignals in einer Druckreihe von ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren lässt sich mittels Gl. 2.17 und 2.20 ΔG_0 und ΔV_0 für die jeweilige Amidgruppe berechnen. Prinzipiell sind diese thermodynamischen Größen Eigenschaften eines gesamten Systems. Da die Druckwirkungen sich aber aus einer Reihe unterschiedlicher Komponenten zusammensetzen, kommt es zu den beobachteten lokalen Unterschieden. So sind zunächst einmal verschiedene konformationelle Übergänge des Proteins überlagert. Hinzu kommen lokale Druckwirkungen auf z. B. Wasserstoffbrücken oder die lokalen Wechselwirkungen mit der Hydrathülle des Proteins, die durch Druckänderung besonders stark beeinflusst werden. Im Falle der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen wird das Problem dadurch vereinfacht, dass die unspezifischen Druckeffekte durch Abzug der Standardpeptidwerte (Arnold et al., 2002) herausgerechnet werden können. Es bleiben die Anteile, die durch die Faltung des Proteins verursacht werden. Die verbleibenden Änderungen der chemischen Verschiebungen lassen sich für einen Teil der Signale in ausreichendem Maße durch ein Zweizustandsmodell eines konformationellen Übergangs beschreiben. Es ist anzunehmen, dass dieser $\text{N}_1 \leftrightarrow \text{N}_2$ Übergang auch für die restlichen Signale zu beobachten ist, dort aber von weiteren Druckeffekten überlagert wird, die größere Änderungen der chemischen Verschiebungen verursachen.

Neben den strukturellen Änderungen, die durch schnellen Austausch auf der NMR-Zeitskala charakterisiert sind, treten Änderungen auf, die zu einem Verlust an Signalintensität führen. Wie in Kapitel 3.3 ausgeführt, lässt sich dieser Intensitätsverlust nur zu geringem Anteil durch Relaxationsverluste erklären, die durch konformationelle Austauschprozesse verursacht werden. Der größte Anteil der Signalverluste wird durch Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts zu intermediären Zuständen erzeugt, wobei das Auftreten weiterer Zustände nicht zu neuen Signalen in den Spektren führt. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Kuwata und Mitarbeitern für *shPrP*(90-231) gemacht und diese ebenso interpretiert (Kuwata et al., 2002). Die Signale weiterer Zustände sind zu schwach, um sie mit den durchgeführten Experimenten zu detektieren. Dies könnte durch starke Relaxationsverluste auf Grund einer durch Aggregation hervorgerufenen Zunahme der Molekülmasse verursacht werden. Eine denkbare Erklärung wäre auch, dass die weiteren Zustände wiederum an weiteren konformationellen Austauschprozessen beteiligt sind bzw. sie durch starke konformationelle Heterogenität gekennzeichnet sind.

Die berechneten ΔG_0 -Werte für den schnellen und den langsamen Austauschprozess unterscheiden sich sehr deutlich (Tab. 3.2), was nahe legt, dass es sich um zwei unterschiedliche Prozesse handelt. Die Verteilung der ΔG_0 -Werte der einzelnen Reste berechnet aus dem Modell im langsamen Austausch deutet wiederum klar darauf hin, dass es sich hierbei um zwei getrennte Prozesse handelt (Abb. 3.13). Es liegen also zwei intermediäre Konformationen I_1 und I_2 vor, die mit dem nativen Zustand in langsamen Austausch stehen. Ob dieser Übergang vom nativen Zustand N_1 oder N_2 ausgeht, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht ermitteln. Ebenfalls unklar bleibt, ob I_1 und I_2 zwei aufeinander folgende Zustände eines seriellen Konformationsübergangs sind ($N \leftrightarrow I_1 \leftrightarrow I_2$). Hierbei würden zunächst bei steigendem Druck die Teile des Proteins aus der Gruppe mit niedrigen ΔG_0 -Werten einen Konformationswechsel vollziehen, während die restlichen Teile des Proteins stabil bleiben. Bei steigendem Druck findet dann ausgehend von I_1 eine Umstrukturierung im restlichen Teil des Proteins zu I_2 statt. Dieser zweistufige Prozess führt zu den beobachteten zwei Gruppen von ΔG_0 -Werten berechnet aus den Signalvolumenänderungen. I_1 und I_2 könnten aber auch unabhängige Konformationen sein, die jeweils direkt aus N hervorgehen, allerdings unterschiedlich stark durch Druck begünstigt werden, was zu den zwei unterschiedlichen ΔG_0 -Werten führt. Dabei würde sich I_1 strukturell von N in dem Bereich unterscheiden, wo Reste aus Gruppe 1 liegen. Dasselbe gilt für I_2 und Reste der Gruppe 2. Da beide Intermediate I_1 und I_2 unterschiedlich auf Druck reagieren, der Konformationsübergang also mit

verschiedenen molaren Reaktionsvolumina verknüpft ist, führt dann die Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der Intermediate zu den beiden beobachteten ΔG_0 -Werten, jeweils im Bereich des Proteins, der an dem einem oder dem anderen Strukturübergang beteiligt ist.

Die Daten lassen sich also durch die vier Zustände N_1 , N_2 , I_1 und I_2 (Abb. 3.15) ausreichend gut beschreiben. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass weitere strukturelle Zustände existieren, deren freie Enthalpien im Rahme des Fehlers nicht von den anderen zu unterscheiden sind. *huPrP* liegt also bei Normaldruck in zwei Konformationen N_1 und N_2 vor. Der geringe Energieunterschied ($\Delta G_0 = 3,0$ kJ/mol) und die geringe Differenz der chemischen Verschiebungen deuten darauf hin, dass sich beide Konformationen strukturell sehr ähnlich sind. Die Intermediate I_1 und I_2 liegen bei Normaldruck nur in äußerst geringen Anteilen vor (unter 1 %). Da die Signale von I_1 und I_2 zu schwach sind, um sie detektieren zu können, lässt sich auf ihre strukturellen Eigenschaften nur indirekt schließen.

3.4.2 Strukturelle Änderungen hervorgerufen durch hohen Druck

Der N-terminale Bereich von *huPrP*(23-230) zeigt bei den verwendeten Lösungsbedingungen keine definierte dreidimensionale Struktur (Zahn et al., 2000). Eine Analyse der Abweichungen der chemischen Verschiebungen von den Werten für ungefaltete Peptide korrigiert um Nachbareffekte (Schwarzinger et al., 2001) deutet ebenfalls nicht signifikant auf reguläre Sekundärstrukturelemente hin. Unter Druckeinwirkung zeigt der komplette N-Terminus eine leichte Tendenz zu höheren Werten der chemischen Verschiebung, dennoch weist die Analyse weiterhin nicht auf das Auftreten von regulären Sekundärstrukturelementen hin. Für ein unstrukturiertes Protein wären nach Abzug der Druckkoeffizienten für ungefaltete Standardpeptide (Arnold et al., 2002) nur Druckkoeffizienten nahe Null zu erwarten. An einigen Stellen weicht der N-Terminus signifikant von dieser Erwartung ab. Unter Druck wird also zumindest eine Teilstrukturierung erkennbar (siehe unten).

Im Bereich von Rest 90 bis 170, der gemäß Elektronenkristallographiestudien und Molekulardynamiksimulationen bei der Polymerisation des Prionproteins in eine β -Faltblatt-Konformation umgefaltet wird (Wille et al., 2002; Govaerts et al., 2004), zeigt sich eine

starke Heterogenität der Druckantworten. Die β -Stränge 1 und 2 sind recht druckstabil, während die Schleife zwischen β -Strang 1 und α -Helix 1 stärkeren strukturellen Änderungen unter hohem Druck unterworfen zu sein scheint. Der Auswertung der Signalvolumina gemäß einem Modell für langsamen Austausch folgend, bildet die Region um Ile139, His140 und Phe141 einen Bereich mit niedrigen ΔG_0 -Werten, also niedriger Druckstabilität. Dies kann als frühzeitig (schon bei relativ niedrigen Drücken) beginnende lokale Entfaltung/Umfaltung dieser Region interpretiert werden. In diesem Bereich finden sich Kavitäten im hydrophoben Kern des Proteins (Abb. 3.14), die von einer nicht perfekten räumlichen Packung der Aminosäureseitenketten herrühren. Hierdurch kommt es zu einer geringeren Einschränkung der Beweglichkeit der $\beta 1/\alpha 1$ -Schleife und somit zu einer stärkeren konformationellen Variabilität. Wie von Hummer und Mitarbeitern gezeigt, wird druckinduzierte Entfaltung durch das Eindringen von Wasser in solche Kavitäten verursacht (Hummer et al., 1998; Collins et al., 2005). Die lokale Instabilität in diesem Bereich macht ihn besonders anfällig für strukturelle Änderungen. Die Interaktion mit dem infektiösen PrP^{Sc} und die beginnende krankheitsassoziierte Umfaltung würde genau so eine erhöhte konformationelle Freiheit benötigen. Die hier präsentierten Daten liefern somit einen Hinweis, dass die $\beta 1/\alpha 1$ -Schleife der lokale Startpunkt für die $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ Umfaltung sein könnte.

Konformationen des strukturierten Kerns von *huPrP*

Aus den durch Druck induzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen lässt sich die Existenz von zwei nativen Konformationen N_1 und N_2 ableiten, die beide auch bei Normaldruck signifikant populierte sind und in schnellem konformationellen Austausch miteinander stehen. Die relativ geringe Differenz in den molaren freien Enthalpien beider Zustände zusammen mit den kleinen Änderungen der chemischen Verschiebungen beim $N_1 \leftrightarrow N_2$ Übergang legen nahe, dass dieser Übergang nur mit unauffälligen Konformationsänderungen verbunden ist. Vor allem die sehr kleinen Differenzen der chemischen Verschiebungen (Abb. 3.10) weisen darauf hin, dass sich die Strukturen von N_1 und N_2 sehr ähnlich sind. Unglücklicherweise lässt sich aus den vorhandenen Daten keine detaillierte strukturelle Charakterisierung von N_2 durchführen, da andere druckabhängige Effekte diesen Zustand teilweise stark überlagern.

Strukturelle Intermediate des N-terminalen Teils von *huPrP*

Der N-terminale Teil von *huPrP*(23-230) (Reste 23-120) zeigt Druckkoeffizienten für die Änderung der chemischen Verschiebungen, die untypisch für ein unstrukturiertes Protein sind. Dies wird besonders an den Druckkoeffizienten der Amidprotonen deutlich, von denen die Standardpeptidwerte (Arnold et al., 2002) abgezogen wurden. Hier lassen sich vier Gruppen von Resten identifizieren, bei denen die Koeffizienten signifikant abweichen. Bereich A liegt um Lys27 herum, Bereich B um Gly40, Ser43 und Gly46, Bereich C enthält Gly55 und Gly56 und Bereich D wird durch Lys101, Ser103, Lys104, Arg108 und Met109 charakterisiert. Die Druckdaten deuten an, dass diese Bereiche zumindest zu einem gewissen Populationsanteil gefaltete Strukturen einnehmen, die sich mit Druck verändern. Bemerkenswerterweise überlappen die Bereiche B und C mit dem Teil (Reste 45-66), der in Studien von Ralph Zahn als potentielle pH-abhängige Aggregations- bzw. Protein-Protein-Interaktionsstelle identifiziert wurde (Zahn, 2003). Für eine spezifische Interaktion wäre eine solche zumindest kurzzeitig vorhandene Strukturierung zu erwarten. Weiterhin liegt Bereich C innerhalb der so genannten Oktapeptidwiederholungen, die bei der Bindung von Kupferionen eine definierte Struktur einnehmen (Zahn, 2003). Leider war es nicht möglich, die drei Oktapeptidwiederholungen in den Spektren zu unterscheiden. Sie alle scheinen ebenfalls eine identische Druckantwort aufzuweisen. Der Bereich D letztlich wurde schon im Rahmen von Untersuchungen am *shPrP*(90-231) als Bereich identifiziert, der kurzlebige α -Helices bilden könnte (Kuwata et al., 2002).

Die Möglichkeit, dass Teile des beweglichen N-Terminus kurzlebige Kontakte mit dem strukturierten Kern ausbilden, ist recht wahrscheinlich und wurde bereits von Zahn und Mitarbeitern diskutiert (Zahn et al., 2000). Wäre dies der Fall, sollten diese Kontakte auch die Druckantwort des gefalteten Kerns beeinflussen. So eine unterschiedliche Druckantwort zwischen *huPrP*(23-230) und *huPrP*(121-230) wurde für Glu168, His187, Thr192, Glu207, Glu211 und Tyr226 beobachtet (Abb. 3.9). Hier unterscheiden sich auch die chemischen Verschiebungen zwischen den beiden Proteinfragmenten. Aus Unterschieden in den chemischen Verschiebungen der C^α zwischen *huPrP*(23-230) und *huPrP*(121-230) identifizierten Zahn und Mitarbeiter die Reste 187-193 und 219-226 als potentielle Interaktionsstellen des Kerns mit dem N-Terminus (Zahn et al., 2000). Die Druckantworten in diesen Bereichen unterstützen diese Annahme.

3.4.3 Strukturelle Basis von Artenbarrieren

Vanik und Mitarbeiter (Vanik et al., 2004; Jones & Surewicz, 2005) nutzten die Y145Stop-Variante des Prionproteins, um *in vitro* abhängig von spezifischen Aggregationskeimen die Bildung von amyloiden Fibrillen zu untersuchen. Sie fanden, dass sich vor allem die Aminosäureaustausche I138M und I139M dafür verantwortlich zeigen, dass *huPrP* keine Fibrillenbildung von *shPrP* auslösen kann und umgekehrt. Die vorliegenden Druckdaten am menschlichen Prionprotein deuten darauf hin, dass der Bereich um diese Reste herum erhöhte konformationelle Variabilität aufweist und somit eine wichtige Rolle für die Interaktion von PrP^{C} und PrP^{Sc} spielen könnte. Aminosäureaustausche in diesem Bereich könnten diese Interaktion abschwächen und somit zu der Ausbildung einer Artenbarriere führen.

Vergleicht man die in dieser Arbeit präsentierten Druckempfindlichkeiten des menschlichen Prionproteins mit denen des Hamsterprionproteins (Kuwata et al., 2002; Kuwata et al., 2004), so lassen sich weitere Rückschlüsse auf die strukturellen Ursachen der Artenbarriere ziehen. Kuwata und Mitarbeiter fanden, dass vor allem die Helices 2 und 3 einem Umfaltungsprozess im langsamen Austausch in eine intermediäre, lokal entfaltete Konformation unterliegen. Das menschliche Prionprotein zeigt in dem Bereich der Helices 2 und 3 ein differenzierteres Bild. Vor allem der dem Lösungsmittel zugewandte Teil der Helices weist niedrige ΔG_0 -Werte für einen konformationellen Übergang auf, während andere Teile der beiden Helices überdurchschnittlich stabil sind. Die insgesamt druckempfindlichste Region von *huPrP* ist die $\beta 1/\alpha 1$ -Schleife im Bereich der Reste Ile138 und Ile139.

Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen von *huPrP* und *shPrP* sind verhältnismäßig ähnlich. Dennoch weisen einige Reste deutliche Unterschiede in den Druckkoeffizienten erster und zweiter Ordnung der chemischen Verschiebungen auf. Diese Reste liegen alle sequentiell in der näheren Umgebung von Aminosäureaustauschen zwischen den beiden Spezies. Vor allem im Bereich der für die Artenbarriere wichtigen Aminosäuren I138M und I139M (Vanik et al., 2004) tritt eine Häufung von Resten mit großen Differenzen der Druckabhängigkeiten von *huPrP*(121-230) und *shPrP*(90-231) auf. Weiterhin auffällig ist, dass die Reste mit großen Unterschieden in den Druckkoeffizienten räumlich in der Nähe der Kavitäten im hydrophoben Kern der Proteine liegen. Die Größe und Lage dieser Kavitäten ist

bei beiden Arten verschieden (Abb. 3.21), was die unterschiedlichen Druckantworten verursachen könnte.

Die geringfügigen Unterschiede zwischen den Strukturen der Prionproteine von Mensch und Hamster, vor allem in der Packung des hydrophoben Kerns, führen den hier präsentierten Druckdaten zufolge zu Unterschieden in der lokalen konformationellen Variabilität und Heterogenität beider Proteine. Eben diese Variabilitäten scheinen aber entscheidend an den die $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ Umwandlung auslösenden Prozessen beteiligt zu sein. Somit haben durch Aminosäureaustausche bedingte Änderungen dieser lokalen Variabilitäten möglicherweise einen ursächlichen Einfluss auf die Ausbildung von Artenbarrieren.

3.5 Schlussfolgerungen

Hochdruck-NMR-spektroskopische Messungen legen nahe, dass der gefaltete Kern des menschlichen Prionproteins in zwei konformationellen Zuständen N_1 und N_2 mit geringer Differenz ihrer freien Enthalpien (3,0 kJ/mol) vorkommt. Bei Normaldruck liegen etwa 29 % des Proteins in der druckstabilisierten Konformation N_2 vor. Ein zweiter Prozess führt unter Druck zu zwei möglichen Faltungsintermediaten I_1 und I_2 mit Differenzen der freien Enthalpien zum Grundzustand von 10,8 bzw. 18,6 kJ/mol, die möglicherweise einen präaggregativen Zwischenzustand darstellen. Der Bereich der $\beta 1/\alpha 1$ -Schleife von *huPrP* wurde als Region mit erhöhter konformationeller Variabilität identifiziert, was eine Bedeutung dieser Schleife für den infektiösen Umfaltungsprozess nahe legt. Interessanterweise liegen in dieser Region für eine Artenbarriere entscheidende Aminosäureaustausche zwischen den Prionproteinen von Mensch und Hamster. Dies schlägt sich in der durch Druck identifizierten konformationellen Variabilität nieder, die sich hier zwischen *huPrP* und *shPrP* unterscheidet. Hier könnte eine mögliche Ursache der Artenbarriere liegen.

4 Struktur und Ligandwechselwirkungen der PDZ2 von PTP-Bas

4.1 Einleitung

Proteinphosphorylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und dient der Regulation ihrer Aktivität, Interaktionsfähigkeit und subzellulären Lokalisation. Eine wichtige Rolle in Signalleitungswegen von höheren Eukaryoten spielt die Proteintyrosinphosphorylierung. Diese wird katalysiert durch Proteintyrosinkinasen und ihr entgegen steht die Dephosphorylierung durch Proteintyrosinphosphatasen (PTPs). PTPs können in zwei Klassen eingeteilt werden, die Rezeptor-PTPs mit einer Transmembrandomäne und die Nicht-Rezeptor-PTPs, die membranassoziiert sind aber keine Transmembrandomäne aufweisen (Andersen et al., 2001). Die humane Proteintyrosinphosphatase PTP-Bas (auch bekannt als hPTP1e, PTPL1 und FAP-1) und das homologe Protein aus der Maus PTP-BL (auch bekannt als RIP) gehören zu den Nicht-Rezeptor-PTPs. PTP-Bas ist neben ihrer katalytischen Domäne, die C-terminal liegt, aus einer Reihe weiterer Domänen mit meist Protein-Protein-Interaktionsaufgaben zusammengesetzt (Abb. 4.1). Am N-Terminus befindet sich eine KIND-Domäne mit noch unbekannter Funktion. Es folgt eine FERM-Domäne, die Zelloberflächenrezeptoren und Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat bindet und so PTP-Bas an der Zellmembran lokalisiert. C-terminal davon liegen fünf PDZ-Domänen, die mit einer Reihe weiterer Proteine interagieren. So ist PTP-Bas in der Lage, an einer Reihe von Signalleitungswegen mitzuwirken. Variiert werden die Interaktionsmöglichkeiten noch dadurch, dass PTP-Bas durch alternatives Spleißen in unterschiedlichen Isoformen vorkommen kann. Die alternativ gespleißten Isoformen haben gewebespezifische Expressionsmuster und dienen so der Anpassung von PTP-Bas an verschiedene Aufgaben (Erdmann, 2003; van Ham et al., 2005). Eine Reihe von Substraten der Phosphatasedomäne konnten bereits identifiziert werden. Allerdings ist über die funktionellen Konsequenzen dieser Dephosphorylierungen bisher

kaum etwas bekannt. PTP-Bas ist vermutlich an der FAS-vermittelten Apoptose beteiligt, also der Regulation des Zelltodes, sowie in der Regulation der Zytokinese, dem letzten Teil der Mitose. Weiterhin spielt sie eine Rolle im ephrinB-Signalweg. PTP-Bas vermag neben seiner Membranassoziation an das Zytoskelett zu binden. Dies zeigt, dass das Protein vermutlich als Gerüstprotein zur Organisation supramolekularer Komplexe dient, also die einzelnen Teile der jeweiligen Signalleitungswege in räumliche Nähe bringt (Erdmann, 2003; Herrmann et al., 2003).



Abb. 4.1: Schematische Darstellung von PTP-Bas. Vom N- zum C-Terminus folgen eine KIND-, eine FERM-, fünf PDZ- und die katalytische Phosphatase-Domäne. Stellen, an denen alternatives Spleißen vorkommen kann, sind durch gestrichelte Linien und rote Balken gekennzeichnet (Erdmann, 2003).

Die zweite PDZ-Domäne von PTP-Bas bindet an verschiedene Proteine, darunter das zytoskelettassoziierte Protein RIL (van den Berk et al., 2004) sowie das Tumorsuppressorprotein APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), dessen Fehlfunktion an der Entstehung von Dickdarmkrebs beteiligt ist (Erdmann et al., 2000). Die PDZ2-Domäne tritt in zwei alternativ gespleißten Isoformen, PDZ2a und PDZ2b, auf (Abb. 4.2). Dabei verändert die nur fünf Aminosäuren lange Insertion VLFDK in der PDZ2b ihre Bindungseigenschaften deutlich. Durch Hefe-Zweihybrid-Experimente und Oberflächenplasmonenresonanzstudien konnte gezeigt werden, dass die PDZ2b nicht mehr in der Lage ist, die Proteininteraktionspartner der PDZ2a zu binden (Erdmann et al., 2000; Kachel et al., 2003). PTP-Bas mit PDZ2a und PDZ2b wird in den meisten Geweben coexprimiert, wie mRNA-Analysen ergeben haben. Allerdings ist der Anteil an PDZ2b-PTP-Bas gewebe- und zelltypspezifisch. Er reicht von praktisch keiner PDZ2b in der Niere bis hin zu etwa 20 % in der Lunge. Weiterhin ist zu vermuten, dass die subzelluläre Lokalisation beider Isoformen variieren dürfte (Sato et al., 1995; Erdmann et al., 2000; Walma et al., 2004).

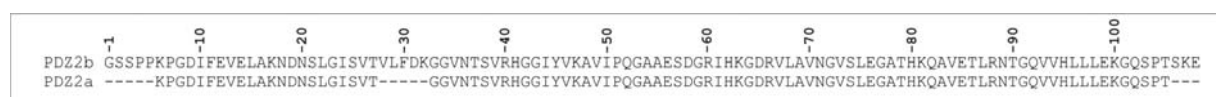


Abb. 4.2: Sequenzvergleich der Spleißvarianten PDZ2b und PDZ2a von PTP-Bas. Gezeigt sind jeweils die Fragmente, wie sie in dieser Arbeit bzw. zur Strukturbestimmung der PDZ2a von Kozlov et al. (Kozlov et al., 2000) verwendet wurden. Die Nummerierung der Aminosäuren folgt in dieser Arbeit durchgehend den Angaben für die PDZ2b in dieser Abbildung.

PDZ-Domänen sind bekannt dafür, Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln. Dabei sind sie unerlässlich für die Ausbildung einer Reihe von Multiproteinkomplexen (Sheng & Sala, 2001; Harris & Lim, 2001). Sie sind benannt nach den Proteinen, in denen sie zuerst charakterisiert wurden, nämlich *Postsynaptic Density Protein-95*, *Discs large* und *Zonula Occludens-1*. PDZ-Domänen vermitteln häufig Protein-Protein-Interaktionen, die der Organisation von Proteinkomplexen an der Plasmamembran dienen. Sie sind beteiligt an der Entstehung von Zellpolarität, der Verknüpfung von Transmembrankomplexen mit intrazellulären Netzwerken und den damit verbundenen Regulationsmechanismen (Fanning & Anderson, 1999). Häufig sind PDZ-Domänen auch Bestandteil von Gerüstproteinen, die Signalleitungskomplexe und Signalverarbeitungskomplexe organisieren (Zhang & Wang, 2003). Auf Grund der vielfältigen Selektivität und Spezifität ihrer Protein-Interaktionen sind PDZ-Domänen sehr geeignet für diese Organisationsaufgaben. Ihre funktionelle Vielfalt wird oft durch alternatives Spleißen noch erhöht (Sierralta & Mendoza, 2004). Gemeinsam ist allen PDZ-Domänen, dass sie ihre Interaktionspartner über ein Bindungsmotiv am äußersten C-Terminus des Partners erkennen (Sheng & Sala, 2001; van Ham & Hendriks, 2003; Kang et al., 2003). Einige PDZ-Domänen haben zudem die Fähigkeit, bestimmte interne Peptidsequenzen zu erkennen (Hillier et al., 1999).

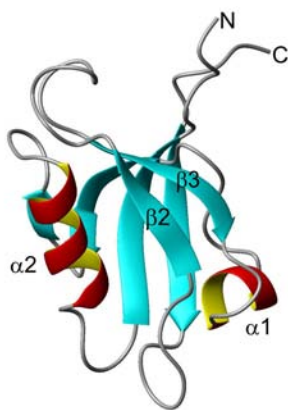


Abb. 4.3: NMR-Struktur der PDZ2a von PTP-Bas (PDB: 3PDZ). Die Termini (N, C) und ausgewählte Sekundärstrukturelemente sind markiert.

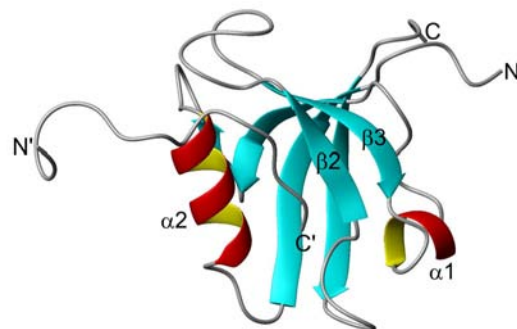


Abb. 4.4: NMR-Struktur der PDZ2a von PTP-Bas mit gebundenem Peptid (PDB: 1D5G). Der N-Terminus (N') und der C-Terminus (C') des in der Grube zwischen $\alpha 2$ und $\beta 2$ gebundenen Peptids sind markiert.

Die dreidimensionale Struktur einer Reihe von PDZ-Domänen wurde bereits röntgenkristallographisch und NMR-spektroskopisch bestimmt. Darunter ist auch die PDZ2a der humanen PTP-Bas (Kozlov et al., 2000) und ihr Maushomolog aus PTP-BL (Walma et al., 2002). Die PDZ-Domänen weisen eine sehr ähnliche Struktur aus sechs β -Strängen und zwei α -Helices auf (Abb. 4.3). Das interagierende Protein wird in einer Grube zwischen $\alpha 2$ und $\beta 2$

gebunden. Einen wichtigen Beitrag zur Spezifität der Bindung leistet zudem die Schleife zwischen $\beta 2$ und $\beta 3$. Die Orientierung eines Peptids in der Bindetasche der PDZ2a von PTP-Bas wurde von Guennadi Kozlov und Mitarbeitern NMR-spektroskopisch bestimmt (Kozlov et al., 2002) und ist in Abb. 4.4 dargestellt.

Neben der Funktion als Proteinbindedomänen können einige PDZ-Domänen, darunter auch die PDZ2 aus PTP-BL, Phosphatidylinositolphosphate (PIPs) binden (Zimmermann et al., 2002). Affinitätschromatographische Experimente ergaben, dass sowohl PDZ2a als auch PDZ2b von PTP-Bas PIPs binden (Kachel et al., 2003). Phosphatidylinositolphosphate kommen als Membranphospholipide oder als Signalmoleküle in der Zelle in verschiedenen Phosphorylierungsstadien der Inositolgruppe vor. Eine Reihe von Proteindomänen kann PIPs spezifisch binden und zudem meist zwischen den verschiedenen Phosphorylierungen unterscheiden. Zu diesen zählen vor allem PH-, PX-, FYVE- und FERM-Domänen (Balla, 2005). Sind PIPs Teil von Membranen, so sind sie in der Regel in bestimmten Membrandomänen lokalisiert. So können PIP-bindende Proteine an Membranen assoziiert und in bestimmten Membranregionen lokalisiert werden (McLaughlin et al., 2002; Balla, 2005). Auch für PDZ-Proteine konnte gezeigt werden, dass Änderungen in der lokalen PIP-Konzentration ihre Assoziation mit bestimmten Rezeptorproteinen an der Plasmamembran fördert (Zimmermann et al., 2002). Desweiteren wurde gezeigt, dass Syntenin-2 durch Bindung seiner PDZ-Domänen an Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) zu bestimmten $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -reichen Regionen der Zellkernmembran (*nuclear speckles*) dirigiert wird (Mortier et al., 2005). Wie PDZ-Domänen fähig sind, PIP zu binden, ist bisher gänzlich unbekannt. Im Gegensatz zu den schon länger bekannten spezialisierten PIP-Bindedomänen (z.B. PH, PX, FYVE), die spezifische basische PIP-Bindesequenzen aufweisen (Balla, 2005), konnte für PDZ-Domänen bisher kein gemeinsames strukturelles PIP-Bindemotiv gefunden werden. Auch Sequenzvergleiche von PDZ-Domänen mit und ohne PIP-Bindefähigkeit führten noch zu keinem gemeinsamen Motiv. Geklärt ist bisher nur, dass die Inositolkopfgruppe alleine nicht ausreicht, sondern dass PDZ-Domänen zur Bindung zusätzlich den Diacylglycerinteil verlangen (Mortier et al., 2005; Yan et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ligandbindungseigenschaften der PDZ2b aus PTP-Bas untersucht. Dazu wurde zunächst das in der vorausgegangenen Diplomarbeit erstellte Strukturmodell (Kachel, 2002) durch weitere NMR-Experimente verbessert. Ausgehend davon wurde durch den Strukturvergleich von PDZ2a und PDZ2b sowie durch

Titrationsexperimente mit einem C-terminalen APC-Peptid untersucht, wie die Insertion von nur fünf Aminosäuren die Proteinbindungsfähigkeit in der PDZ2b blockiert. Weiterhin wurde zum ersten Mal ein Strukturmotiv von PDZ-Domänen zur Bindung verschiedener PIPs charakterisiert und schließlich ein Modell des PDZ-PIP-Komplexes erstellt.

4.2 Materialien und Methoden

Probenvorbereitung

PDZ2a und PDZ2b aus PTP-Bas wurden wie von Kachel et al. beschrieben exprimiert und gereinigt (Kachel et al., 2003). Die Proteinproben wurden von Rolf Heumann und Kai Erdmann (Ruhr-Universität Bochum) sowie Stephan Penzkofer (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Die NMR-Experimente zur Resonanzzuordnung und Strukturbestimmung wurden an einer 2 mM Lösung unmarkierter, ^{15}N -markierter oder ^{13}C - ^{15}N -markierter PDZ2b in 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 150 mM NaCl pH 6,8 durchgeführt. Die Proben enthielten 8 % D_2O und 0,1 mM DSS als interne Referenz. Die APC-Peptid-Interaktionsstudien wurden im selben Puffer aufgenommen. Die PIP-Interaktionsstudien wurden ebenfalls im selben Puffer oder in 50 mM PIPES-Puffer (Piperazin-1,4-bis(2-Ethansulfonsäure)) pH 6,8 mit 150 mM NaCl durchgeführt.

NMR-Messungen zur Resonanzzuordnung und Strukturbestimmung

Alle Messungen wurden bei 293 K Probertemperatur durchgeführt. Sie erfolgten an einem Bruker DRX-600 und einem Bruker DMX-800 Spektrometer bei Protonenresonanzfrequenzen von 600 MHz bzw. 800 MHz. Ein ^{15}N -HSQC und ein ^{13}C -HSQC wurden wie von Bodenhausen und Ruben beschrieben aufgenommen (Bodenhausen & Ruben, 1980). 2D- ^1H - ^1H -NOESY-Spektren (Jeener et al., 1979) wurden bei 600 MHz sowohl in $^1\text{H}_2\text{O}$ als auch in D_2O mit einer Mischzeit von 100 ms gemessen. Ein ^{15}N -aufgelöstes 3D-NOESY-HSQC (Mischzeit 100 ms) und ein 3D-TOCSY-HSQC (Mischzeit 60 ms) wurden bei 600 MHz Protonenresonanz durchgeführt (Schleucher et al., 1994). Zusätzlich wurden zur sequenziellen Zuordnung der Resonanzen HNCA, CBCA(CO)NH, CBCANH und HNCO Spektren aufgenommen. Zur Identifizierung der Spinsysteme dienten ein HCCH-TOCSY und ein ^{13}C -aufgelöstes 3D-NOESY-HSQC gemessen in D_2O . Die Dynamik der Hauptkette

wurde durch Bestimmung der ^1H - ^{15}N -heteronuklearen NOEs analysiert. Dazu wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren wie von Li und Montelione beschrieben bei 600 MHz Protonenfrequenz aufgenommen (Li & Montelione, 1994). Die chemischen Verschiebungen der Protonen wurden mit dem internen Standard DSS referenziert. Die Referenzierung der chemischen Verschiebungen der ^{15}N und ^{13}C erfolgte indirekt auf die Protonenfrequenz des DSS mit den Frequenzverhältnissen wie von Wishart et al. beschrieben (Wishart et al., 1995). Die Spektren wurden mit *XWINNMR* (Bruker Biospin) prozessiert. Das Computerprogramm *AUREMOL* (Universität Regensburg, <http://www.auremol.de>) wurde zur Analyse der Spektren genutzt. Eine Liste der ermittelten chemischen Verschiebungen befindet sich in der Madison NMR Datenbank unter dem Zugangscode BMRB-5937.

Strukturrechnungen

Zur Berechnung der Struktur der PDZ2b wurden NOE-Distanzbeschränkungen eingesetzt, die durch automatische Zuordnung eines 2D-NOESY-Spektrums aufgenommen in $^1\text{H}_2\text{O}$, eines 2D-NOESY aufgenommen in D_2O , eines ^{15}N -NOESY-HSQC und eines ^{13}C -NOESY-HSQC mit *KnowNOE* (Gronwald et al., 2002) gewonnen wurden. Die Distanzen wurden direkt aus den Signalvolumina berechnet. Zusätzlich wurden Winkelbeschränkungen für die Proteinhauptkette eingesetzt, die mit *TALOS* (Cornilescu et al., 1999) aus den chemischen Verschiebungen der Hauptkettenatome berechnet wurden. Die Strukturrechnungen erfolgten durch das *simulated annealing* Protokoll des Computerprogramms *CNS* 1.1 (Brünger et al., 1998) ausgehend von einem ausgestreckten Strang als Startkonformation. Gestartet wurde mit einer Hochtemperaturdynamiksimulation im Torsionswinkelraum mit 1000 Schritten zu 0,015 ps bei 50000 K. In der ersten Abkühlungsphase wurden 1000 Schritte zu 0,015 ps im Torsionswinkelraum berechnet. Die zweite Abkühlungsphase startete bei 3000 K. Es wurden 3000 Schritte zu 0,005 ps im kartesischen Koordinatenraum ausgeführt. Zur finalen Pseudoenergieminimierung wurden 50 Schleifen zu je 300 Schritten durchgeführt. Alle anderen Parameter folgten den Standardwerten des *CNS annealing* Protokolls. Die berechneten Strukturen wurden mit *MOLMOL* (Koradi et al., 1996) und *PROCHECK* (Laskowski et al., 1996) analysiert. Zur Qualitätskontrolle wurden NMR-spektroskopische R-Werte mit *R-FAC* (Gronwald et al., 2000) berechnet. Die Koordinaten eines Bündels der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen aus der finalen Berechnung von 200 Strukturen sind in der Proteindatenbank unter der PDB-ID 1Q7X abgelegt.

NMR-Titrationsexperimente

Zu einer PDZ2b-Lösung in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,8 mit 150 mM NaCl mit einer 0,33 mM Startkonzentration wurde eine 10 mM Lösung des C-terminalen Peptides aus APC mit der Sequenz KRHSGSYLVTSV titriert. Es wurden 1D-¹H- und 2D-¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren bei den molaren Verhältnissen von APC-Peptid zu PDZ2b von 0, 0,25, 0,5, 1, 2 und 5 aufgenommen. Das APC-Peptid wurde chemisch synthetisiert von der Jerini AG (Berlin) erworben. Die HSQC-Spektren haben eine digitale Auflösung von 2048 * 512 Punkten und eine aufgenommene Frequenzbreite von 8389 * 2433 Hz.

Die für die Titrationsstudien verwendeten Phosphatidylinositolphosphate wurden von Echelon Bioscience Inc. (Salt Lake City) erworben. Es wurden Titrationsreihen wie für das APC-Peptid beschrieben durchgeführt und Spektren bei den molaren Verhältnissen PIP zu PDZ2b von 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 und 5 aufgenommen. Jeweils eine Titrationsreihe wurde durchgeführt mit D-*myo*-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) und D-*myo*-phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) jeweils mit C₈ Fettsäuren sowie mit D-*myo*-phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat (PI(3,4)P₂) und D-*myo*-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat (PI(3,5)P₂) jeweils mit C₄ Fettsäuren. Eine weitere Reihe wurde mit Inositol 1,4,5-trisphosphat (I(1,4,5)P₃) aufgenommen. Weiterhin wurden von Stephan Penzkofer in gleicher Weise nur in 50 mM PIPES-Puffer pH 6,8 mit 150 mM NaCl Titrationsreihen mit D-*myo*-phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat (PI(3,4)P₂), D-*myo*-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat (PI(3,5)P₂), D-*myo*-phosphatidylinositol (PI) und Diacylglycerin (DAG) mit jeweils C₈ Fettsäuren durchgeführt (Penzkofer, 2005).

Aus den ¹H-¹⁵N-HSQC-Experimenten wurde ein gewichtetes Mittel der Änderungen der chemischen Verschiebungen in der Protonen- ($\Delta\delta(H)$) und der Stickstoffdimension ($\Delta\delta(N)$) gemäß Gl. 4.1 berechnet. f_H ist ein Wichtungsfaktor für jeden einzelnen Aminosäuretyp, der die unterschiedliche Varianzen der chemischen Verschiebungen von Protonen und Stickstoffkernen wie von Peter Geyer beschrieben ausgleicht (Geyer et al., 2005).

$$\Delta\delta = \frac{1}{2}(f_H |\Delta\delta(H)| + |\Delta\delta(N)|) \quad (4.1)$$

Da alle Titrationsreihen die Charakteristika von schnellem Austausch (siehe Kapitel 2.2) zeigten, konnten die Dissoziationskonstanten (K_D) der einzelnen Bindungsreaktionen

abgeleitet aus Gl. 2.5 und 2.7 durch Gl. 4.2 berechnet werden. $\Delta\delta^{gesamt}$ ist die Gesamtdifferenz der chemischen Verschiebungen von Komplex und freier PDZ, C_A^T die Gesamtkonzentration an PDZ und C_B^T die Gesamtkonzentration an Ligand.

$$\Delta\delta = \Delta\delta^{gesamt} \cdot \frac{1}{2C_A^T} (C_A^T + C_B^T + K_D - \sqrt{(C_A^T + C_B^T + K_D)^2 - 4C_A^T C_B^T}) \quad (4.2)$$

Sättigungstransfer

Von den Endpunktproben der PDZ-PIP-Titrationsreihen wurden jeweils ^1H -Sättigungstransferdifferenzspektren aufgenommen (Mayer & Meyer, 1999). Zum Prinzip der Messungen sei auf Kapitel 2.4 verwiesen. Zur Vorsättigung wurde eine 0,5 – 4 s lange Folge aus selektiven 90° Impulsen verwendet. Im *off-resonance* Teil wurde bei 30 ppm angeregt, im *on-resonance* Fall bei Frequenzen in Resonanz mit der PDZ2b. Um die Sättigung zwischen den einzelnen Experimenten ausreichend abklingen zu lassen, war eine Relaxationswartezeit D1 von 6 s nötig. Der Sättigungstransfer von dem Protein auf die einzelnen Protonen der PIPs wurde quantifiziert. Dazu wurden zunächst die Protonenresonanzen der verschiedenen PIP zugeordnet. Dies geschah basierend auf den NMR-Studien an Phospholipiden und Inositolphosphaten von Neumann et al., Cerdan et al. und Reid et al. (Neumann et al., 1985; Cerdan et al., 1986; Reid & Gajjar, 1987). Die Zuordnung der Resonanzen ist im Anhang aufgeführt (Kapitel 7.3). Alle Spektren wurden bei 600 MHz Protonenresonanzfrequenz aufgenommen. Angegeben wird jeweils die Sättigung definiert als Intensität des Differenzsignals ($I_0 - I_{presat}$) relativ zur *off-resonance* Signalintensität I_0 . Die relative Sättigung ist der Wert für ein Proton des Lipids normiert auf das am stärksten gesättigte Signal des jeweiligen Lipids, d.h. das Proton eines Lipids, das den stärksten Sättigungstransfer erfährt, erhält den Wert 100 % und die anderen Protonen Werte relativ dazu.

Protein-Ligand-Docking

Zur Modellierung des Komplexes bestehend aus PDZ2b und PI(3,4,5)P₃ mit C₈ Fettsäuren sowie des Komplexes aus PDZ2 und PI(3,4,5)P₃ mit C₁₆ Fettsäuren wurde das datengetriebene Dockingprogramm *HADDOCK* 1.3 verwendet (Dominguez et al., 2003). Zum Einsatz kam das Dockingprotokoll wie von Cyril Dominguez und Mitarbeitern beschrieben. Es wurden jeweils 500 Modelle in der *rigid body* Phase berechnet, die 200 pseudoenergieärmsten Modelle wurden im folgenden *simulated annealing* Lauf verfeinert und

die daraus resultierenden 100 pseudoenergieärmsten wurden einer abschließenden Pseudoenergieminimierung unter Berücksichtigung des Wassers unterzogen. In der flexiblen Phase des Dockings wurde volle Beweglichkeit für alle Teile des Proteins und der PIPs zugelassen. Um die korrekte Faltung des Proteins zu bewahren, mussten daher die Distanz- und Winkelbeschränkungen aus der Strukturrechnung (s. o.) eingesetzt werden. Die intermolekularen Beschränkungen für das datengetriebene Docking (die *ambiguous interaction restraints*, AIRs) wurden wie im Ergebnisteil beschrieben aus den Titrationsdaten ermittelt. Die Topologiedaten und Parameter für das Kraftfeld zur Definition der PIPs wurden mit *PRODRG 2* (van Aalten et al., 1996) erzeugt.

Zur Überprüfung des Dockingergebnisses wurde ein 2D- ^1H - ^1H -NOESY einer 0,6 mM PDZ2b-Lösung in 50 mM PIPES-Puffer pH 6,8 mit 150 mM NaCl und PI(3,4,5) P_3 mit C_8 Fettsäuren im molaren Verhältnis 1 zu 3,9 bei 293 K und 600 MHz Protonenresonanzfrequenz aufgenommen. Die Mischzeit betrug 150 ms. Das Spektrum wurde ausgehend von den unterschiedlichen Komplexmodellen mit *KnowNOE* (Gronwald et al., 2002) zugeordnet und der dazugehörige R-Wert mit *R-FAC* (Gronwald et al., 2000) berechnet.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Struktur der PDZ2b von PTP-Bas

Grundlage einer funktionellen Analyse der Bindungseigenschaften der PDZ2b von PTP-Bas ist ein möglichst gut definiertes Modell ihrer räumlichen Struktur. Bereits im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit wurde ein Strukturmodell basierend auf NMR-spektroskopisch gewonnenen Daten bestimmt (Kachel, 2002). Es basiert auf insgesamt 919 NOE-Distanzbeschränkungen und 80 Torsionswinkelbeschränkungen aus *TALOS* (Cornilescu et al., 1999). Das Bündel der 20 pseudoenergieärmsten von 200 gerechneten Strukturen zeigt mit einem *rmsd* der Hauptkettenatome der Reste 9-100 von 0,068 nm noch eine relative hohe Variabilität. Für einen detaillierten Vergleich der Strukturen von PDZ2a und PDZ2b musste zunächst das Modell verbessert werden. Durch tiefer gehende Analyse der NOESY- und TOCSY-Spektren konnten die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen erweitert werden. Vor allem gelang es nun, die Seitenkettenatome der Aromaten zuzuordnen. Diese sind für die

Strukturbestimmung besonders wertvoll, da die aromatischen Ringe sich meist im hydrophoben Kern eines Proteins befinden und so viele NOE-Kontakte zu sequentiell weiter entfernten Resten aufweisen. Insgesamt konnten alle H^N und über 90 % der H^α und H^β eindeutig zugeordnet werden. Von allen Protonen zusammen wurden 79 % eindeutig identifiziert. Die komplette Zuordnung ist in der Madison NMR Datenbank unter dem Zugangscode BMRB-5937 erhältlich. Mit der erweiterten Zuordnung konnte durch iterative Zuordnung der NOESY-Spektren mit *KnowNOE* (Gronwald et al., 2002) die Anzahl der NOE-Distanzbeschränkungen auf 1648 erhöht werden, was eine deutliche bessere Strukturberechnung ermöglichte. Die gefundene NOEs sind in Tabelle 4.1 und in Abb. 4.5 zusammengefasst.

Experimentelle Beschränkungen	Anzahl vor der Verbesserung	Endgültige Anzahl
NOEs gesamt	919	1648
intraresiduell ($i = j$)	356	642
sequentiell ($ i-j = 1$)	323	494
mittlere Reichw. ($1 < i-j < 5$)	92	189
langreichweitig ($ i-j \geq 5$)	148	323
Torsionswinkelbeschränkungen	80	80

Tab. 4.1: Überblick über die experimentellen Beschränkungen für die Strukturrechnung

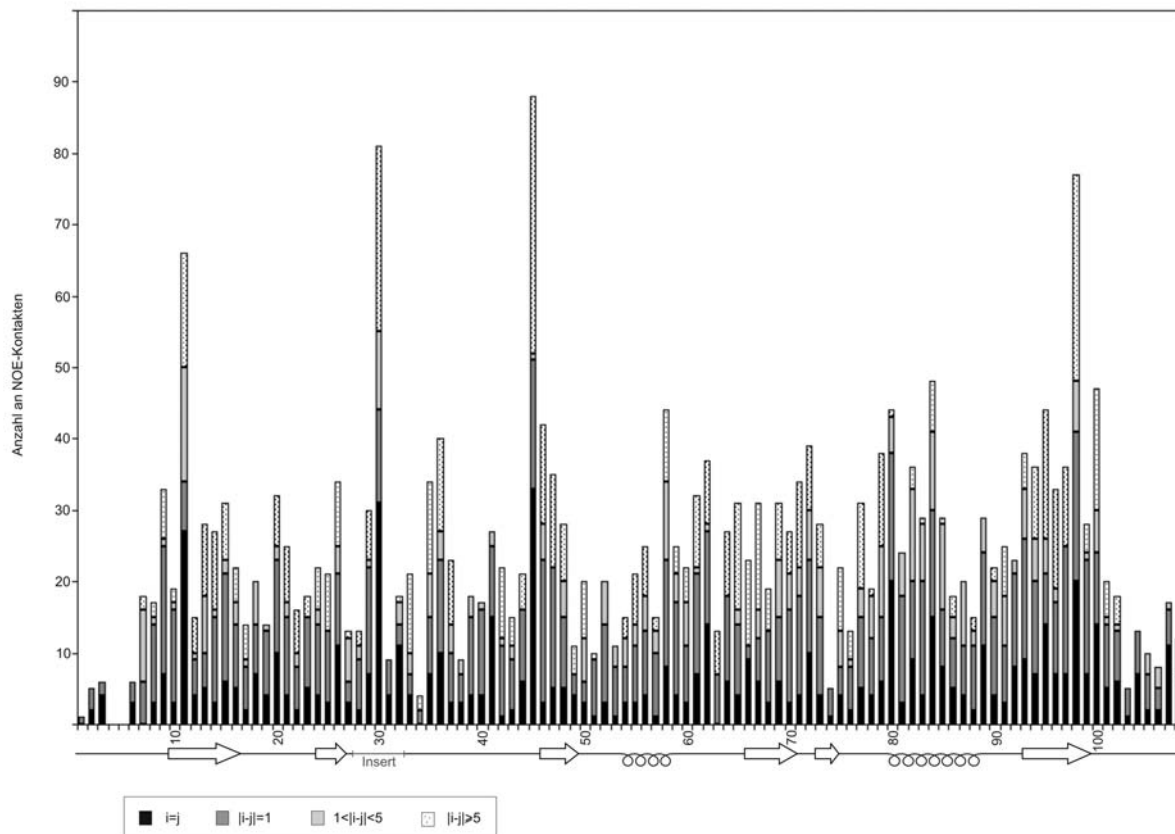


Abb. 4.5: NOE-Kontakte pro Aminosäure der PDZ2b von PTP-Bas. Die Sekundärstrukturelemente sind als Pfeile (β -Stränge) und als Schleifen (α -Helices) symbolisiert.

Es wurde 200 Strukturen mit CNS (Brünger et al., 1998) unter Verwendung der 1648 NOE-Distanzbeschränkungen und der 80 Torsionswinkelbeschränkungen berechnet. Die 20 pseudoenergieärmsten wurden für die Strukturanalyse herangezogen. Sie sind in der RCSB Proteindatenbank unter dem PDB-Eintrag 1Q7X abgelegt. Die Hauptkettenatome der Reste 9-100 weisen eine *rmsd* von 0,019 nm auf (Tabelle 4.2), was eine deutliche Verbesserung gegenüber dem ursprünglichen Modell darstellt (hier sind es 0,068 nm). Die Termini zeigen hohe Flexibilität und wurden daher bei den *rmsd* Berechnungen nicht berücksichtigt. Dies wurde durch Messungen der ^1H - ^{15}N -Heteronuklearen-NOE bestätigt, die eine erhöhte Mobilität für die Termini ausweisen (Abb. 4.6). Zur Validierung des Strukturmodells wurden R-Faktoren berechnet (Tab. 4.2). Diese liegen im Bereich, wie er für eine gut definierte hochauflösende NMR-Struktur zu erwarten ist. Das Ergebnis der Strukturrechnung ist in Abb. 4.7 dargestellt. Es zeigt sich die PDZ-typische Faltung. Die Sekundärstrukturelemente sind $\beta 1$ (Ile10-Ala16), $\beta 2$ (Ile24-Val26), $\beta 3$ (Val46-Val49), $\alpha 1$ (Ala54-Asp58), $\beta 4$ (Arg66-Val70), $\beta 5$ (Val73-Ser74), $\alpha 2$ (His80-Arg88) und $\beta 6$ (Val93-Glu99). Die vier antiparallelen β -Stränge 1, 4, 5 und 6 bilden mit den ebenfalls antiparallelen β -Strängen 2 und 3 ein β -Sandwich. Weiterhin charakterisieren die beiden α -Helices die Faltung der PDZ2b.

Statistik der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen (von 200 berechneten)		
<i>rmsd</i> der Hauptkettenatome der Reste 9-100	0,019 nm	
<i>rmsd</i> aller Schweratome der Reste 9-100	0,067 nm	
E _{gesamt}	2441 ± 7 kJ/mol	
E _{NOE}	1039 ± 9 kJ/mol	
E _{Bindungen}	197 ± 2 kJ/mol	
E _{Bindungswinkel}	499 ± 9 kJ/mol	
E _{vdW-Wechselwirkungen}	499 ± 5 kJ/mol	
R-Faktoren		
	R-Faktor	Anzahl der NOEs
R _{intraresiduell}	0,17	114
R _{sequentiell}	0,24	149
R _{mittlere Reichweite}	0,27	51
R _{langreichweitig}	0,22	77
R _{alle interresiduellen NOEs}	0,24	277

Tab. 4.2: Statistik der Strukturrechnungen. Es ist zu beachten, dass auf Grund von Signalüberlagerungen und Artefakten die Berechnung der R-Faktoren nur für einen Teil der automatisch zugeordneten Signale aus dem ^{15}N -NOESY-HSQC möglich war.

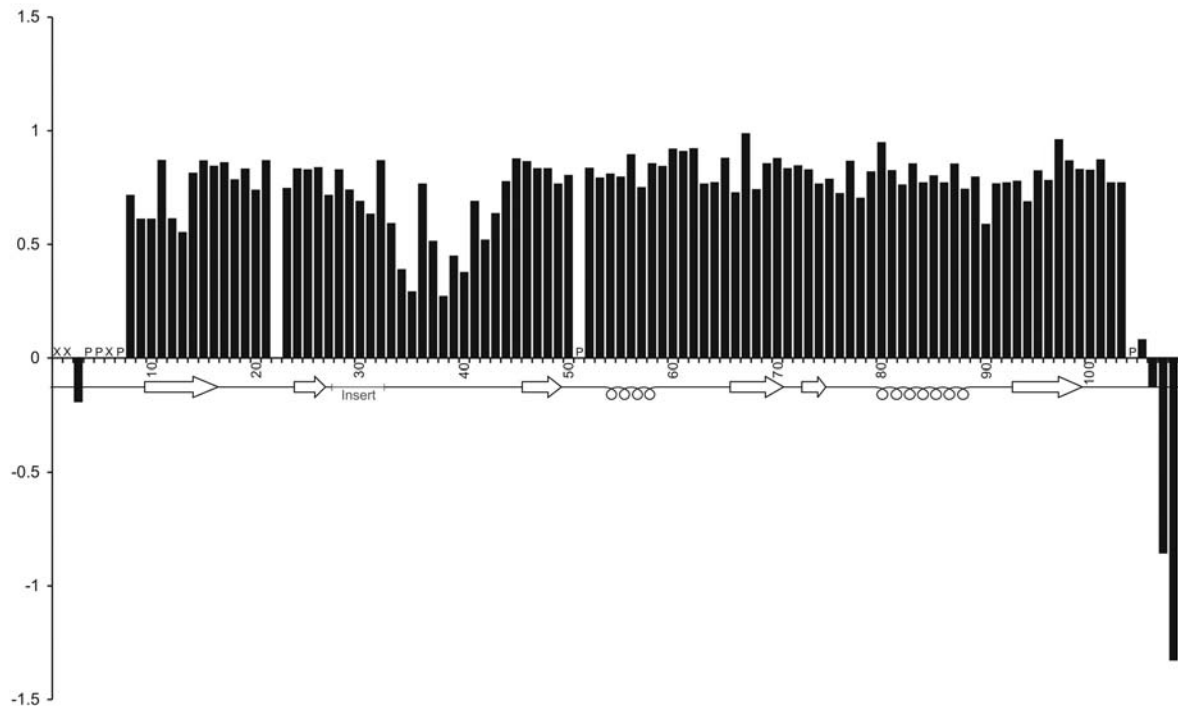


Abb. 4.6: ^1H - ^{15}N -NOEs der PDZ2b als Funktion der Sequenz. Die Sekundärstrukturelemente sind als Pfeile (β -Stränge) und als Schleifen (α -Helices) symbolisiert. P markiert Proline, X andere Reste, die in den HSQC-Spektren nicht sichtbar sind. Niedrige Werte zeigen hohe Flexibilität an.

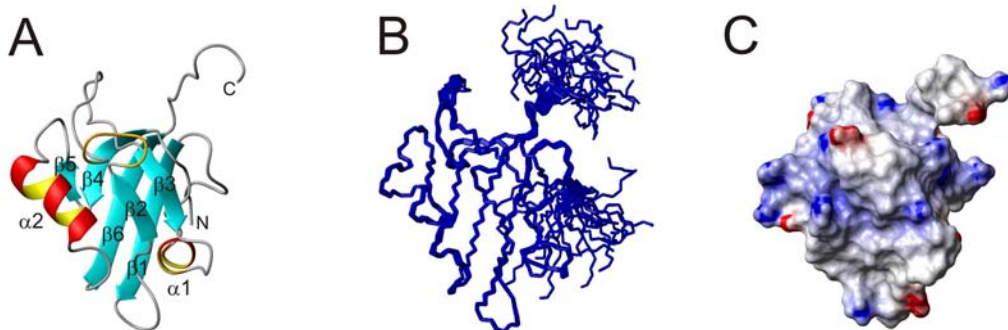


Abb. 4.7: NMR-Struktur der PDZ2b von PTP-Bas. (A) Bänderdarstellung der pseudoenergieärmsten Struktur. Die Insertion ist in orange hervorgehoben. (B) Bündel der Hauptketten der 20 pseudoenergieärmsten Strukturen aus der Strukturrechnung. (C) Oberflächendarstellung und elektrostatisches Potential in derselben Orientierung wie (A). Negativ geladene Regionen sind rot, positiv geladene Regionen blau dargestellt.

Im Vergleich zur PDZ2a (Kozlov et al., 2000) verursacht die Insertion von fünf Aminosäuren (Val28-Lys32) in der PDZ2b einige strukturelle Unterschiede. Zunächst ändert sich die Struktur der $\beta 2/\beta 3$ -Schleife, die die Insertion enthält. Die Insertion bildet eine Schleife, die über $\beta 3$ zu liegen kommt. Die Lage dieser Schleife ist durch mehrere NOEs in dieser Region bestätigt (siehe Abb. 4.5). Dieser Teil der $\beta 2/\beta 3$ -Schleife ist auch in seiner Flexibilität eingeschränkt, während der weiter außen liegende Teil eine erhöhte Beweglichkeit

aufweist, wie es in den heteronuklearen NOE-Messungen gezeigt werden konnte (Abb. 4.6). Die fixierte Lage der Insertion, vor allem die Seitenkette von Phe30, beeinflusst durch ihren sterischen Anspruch die Struktur der $\beta 2/\beta 3$ -Schleife sowie der beiden β -Stränge selbst, die gegenüber der PDZ2a deutlich verkürzt sind. Weiterhin wird die Lage von $\alpha 2$ relativ zum Proteinkern deutlich verändert. Dies wird dadurch verursacht, dass die N-terminale Seite der Helix von der Insertion weiter nach außen geschoben wird. Dadurch ergibt sich eine deutliche sterische Änderung der Peptidbindetasche, die in der PDZ2a zwischen Helix 2 und $\beta 2$ liegt (Kozlov et al., 2002). So wird ein Teil der Proteinbindetasche blockiert. Vor allem die Seitenkette von Lys32 verhindert eine Bindung, wie sie in der PDZ2a möglich ist.

4.3.2 Interaktion der PDZ2 mit Proteinen

Die Bindungseigenschaften der PDZ2b von PTP-Bas gegenüber von Peptidbindungspartnern wurden durch den Vergleich von ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren charakterisiert, die bei zunehmender Konzentration eines zwölf Aminosäuren langen Peptids entsprechend dem C-Terminus von APC aufgenommen wurden. Die beobachteten Änderungen sind typisch für schnellen Austausch auf der NMR-Zeitskala. Von der größten Änderung der chemischen Verschiebung kann somit die Untergrenze für die Austauschrate $1/\tau_{\text{ex}}$ abgeschätzt werden. Sie liegt bei 8200 s^{-1} . Die Differenzen der gewichteten Mittel der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen (siehe Materialien und Methoden) zwischen den Signalen der freien PDZ2b und der PDZ2b in Anwesenheit des APC-Peptids im molaren Verhältnis von 1:5 sind in Abb. 4.8 gezeigt. Die Änderungen in den chemischen Verschiebungen sind insgesamt relativ gering und stark über das Protein verteilt, was auf eine eher unspezifische Bindung hindeutet. Deutliche Effekte auf die chemischen Verschiebungen treten nur bei den Resten Ile24, Ser25, Val28 und Arg88 auf, was hier eine schwache spezifische Bindung impliziert. Diese Reste liegen im Bereich von $\beta 2$, der $\beta 2/\beta 3$ -Schleife und des C-Terminus von $\alpha 2$. Dieser Bereich wurde zuvor als die Peptidbinderegion der PDZ2a identifiziert (Kozlov et al., 2000). Aber nicht alle Reste, die in der PDZ2a an der Interaktion mit dem Peptid beteiligt sind, zeigen in der PDZ2b signifikante Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen. Dies gilt im Besonderen für Val26, Gly33, Gly34, Val35 und Arg36 (benannt in PDZ2b-Nomenklatur, siehe Abb. 4.2), die in den Bindungsstudien mit der PDZ2a starke Änderungen in den chemischen Verschiebungen zeigten und besonders wichtig für die

Peptiderkennung und -bindung sind (Kozlov et al., 2000; Kozlov et al., 2002). Besonders auffällig ist Gly34, das bei der PDZ2a am stärksten reagiert, bei der PDZ2b aber nur sehr gering.

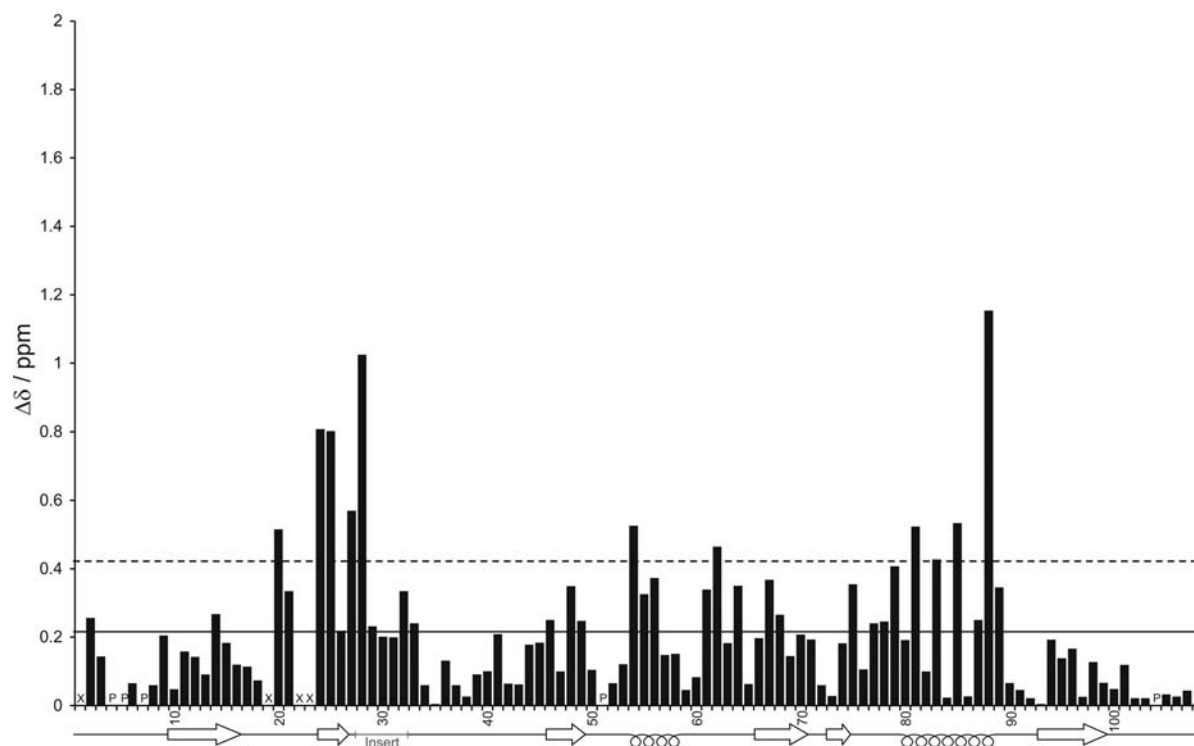


Abb. 4.8: Gewichtetes Mittel der Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen der PDZ2b bei Zugabe eines C-terminalen APC-Peptids im fünffachen molaren Überschuss. Der Mittelwert ist als durchgezogene Linie, der Mittelwert plus einer Standardabweichung als gestrichelte Linie eingezeichnet. Die Sekundärstrukturelemente sind als Pfeile (β -Stränge) und als Schleifen (α -Helices) symbolisiert. P markiert Proline, X andere Reste, die in den HSQC-Spektren nicht sichtbar sind.

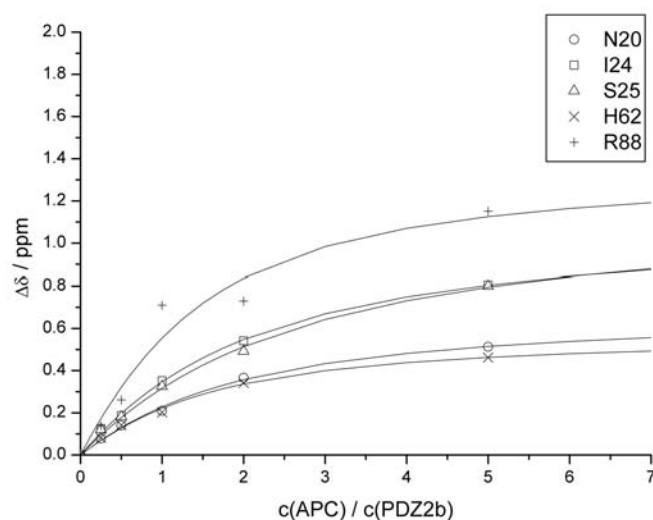


Abb. 4.9: Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen der PDZ2b (gewichtetes Mittel von $\delta(\text{H}^{\text{N}})$ und $\delta(\text{N}^{\text{H}})$) von der APC-Konzentration. Die zugehörigen Bindungskurven gemäß Gl. 4.2 sind dargestellt.

Obwohl in biochemischen Studien keine Interaktion zwischen PDZ2b und Proteinen nachgewiesen werden konnte (Kachel et al., 2003), gelang es aufgrund der hohen Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie für Bindungsereignisse wie oben beschrieben dennoch, eine schwache Interaktion der PDZ2b mit dem APC-Peptid zu beobachten. Für ausgewählte Reste ist die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der APC-Konzentration in Abb. 4.9 beispielhaft dargestellt. Aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen konnte die Dissoziationskonstante bestimmt werden. Sie liegt bei $540 \pm 40 \mu\text{M}$.

4.3.3 Interaktion der PDZ2 mit Phosphatidylinositolphosphaten

NMR-Titrationsexperimente

Um die an der Bindung von Phosphatidylinositolphosphaten beteiligten Reste der PDZ2b zu ermitteln, wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren miteinander verglichen, die bei zunehmender Konzentration von PIP aufgenommen wurden. Durch Messungen mit PIPs in verschiedenen Phosphorylierungszuständen am Inositolring und unterschiedlichen Längen der Fettsäureketten wurde weiter eingegrenzt, welcher Teil des PIP mit welchen Resten der PDZ2b interagiert und welche Teile des PIP für eine spezifische Bindung essentiell sind.

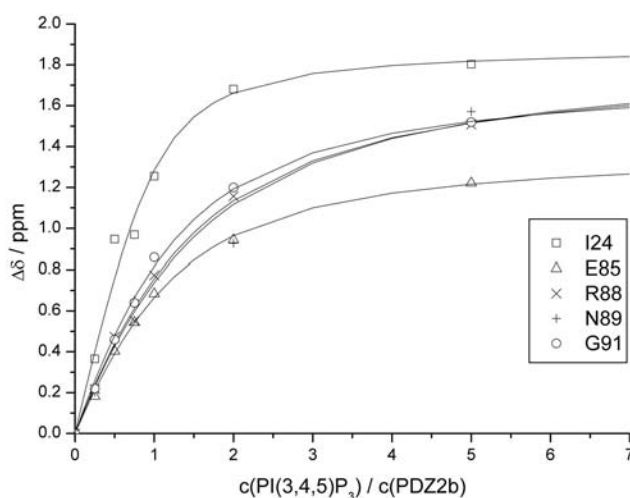


Abb. 4.10: Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen der PDZ2b (gewichtetes Mittel von $\delta(\text{H}^{\text{N}})$ und $\delta(\text{N}^{\text{H}})$) von der PI(3,4,5)P₃-Konzentration. Die zugehörigen Bindungskurven gemäß Gl. 4.2 sind dargestellt.

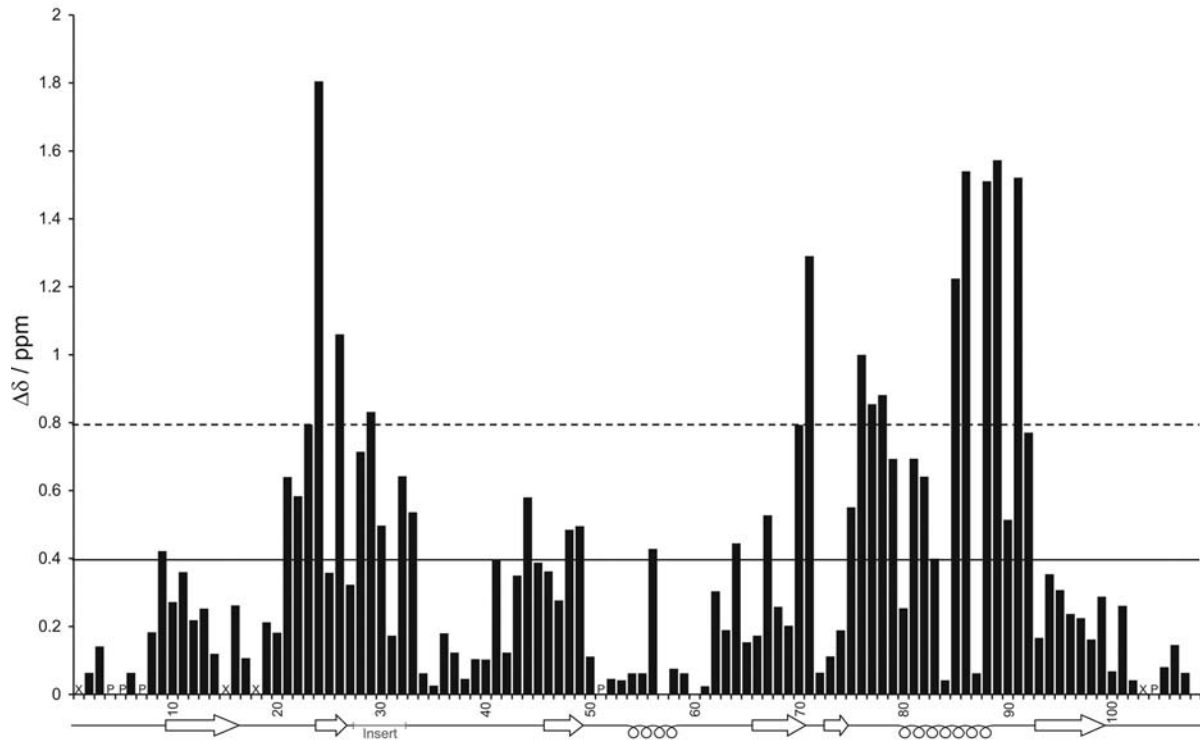


Abb. 4.11: Gewichtetes Mittel der Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen der PDZ2b bei Zugabe von PI(3,4,5)P₃ mit C₈ Fettsäuren im fünffachen molaren Überschuss. Der Mittelwert ist als durchgezogene Linie, der Mittelwert plus einer Standardabweichung als gestrichelte Linie eingezeichnet. Die Sekundärstrukturelemente sind als Pfeile (β-Stränge) und als Schleifen (α-Helices) symbolisiert. P markiert Proline, X andere Reste, die in den HSQC-Spektren nicht sichtbar sind.

Für Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) mit C₈ Fettsäuren konnte eine deutliche Bindung an die PDZ2b detektiert werden. Die in ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren der PDZ2b bei steigender PI(3,4,5)P₃-Konzentration ermittelten Änderungen der einzelnen chemischen Verschiebungen der PDZ-Signale sind charakteristisch für schnellen Austausch. Bei steigender Konzentration an PIP zeigen die Änderungen der chemischen Verschiebungen ein Sättigungsverhalten, was auf eine spezifische Bindung hinweist (Abb. 4.10). Die aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen ermittelte Dissoziationskonstante liegt bei $230 \pm 20 \mu\text{M}$. Die Bindung ist also etwa doppelt so stark wie die an das APC-Peptid. Für die Bindung von PI(4,5)P₂ wurde analog ein K_D von $155 \pm 31 \mu\text{M}$ ermittelt. Das gewichtete Mittel der Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen der PDZ2b bei Zugabe von PI(3,4,5)P₃ in einem molaren Verhältnis von 1:5 ist in Abb. 4.11 gezeigt. Änderungen über dem Mittel plus einer Standardabweichung zeigen G23, I24, V26, L29, V70, N71, E76, G77, A78, E85, T86, R88, N89 und G91. Diese Reste befinden sich im Bereich von β2, β4, β5 und α2. In der räumlichen Struktur der PDZ2b bilden sie eine Tasche, die wahrscheinlich die Bindungstasche für PI(3,4,5)P₃ darstellt (Abb. 4.12).

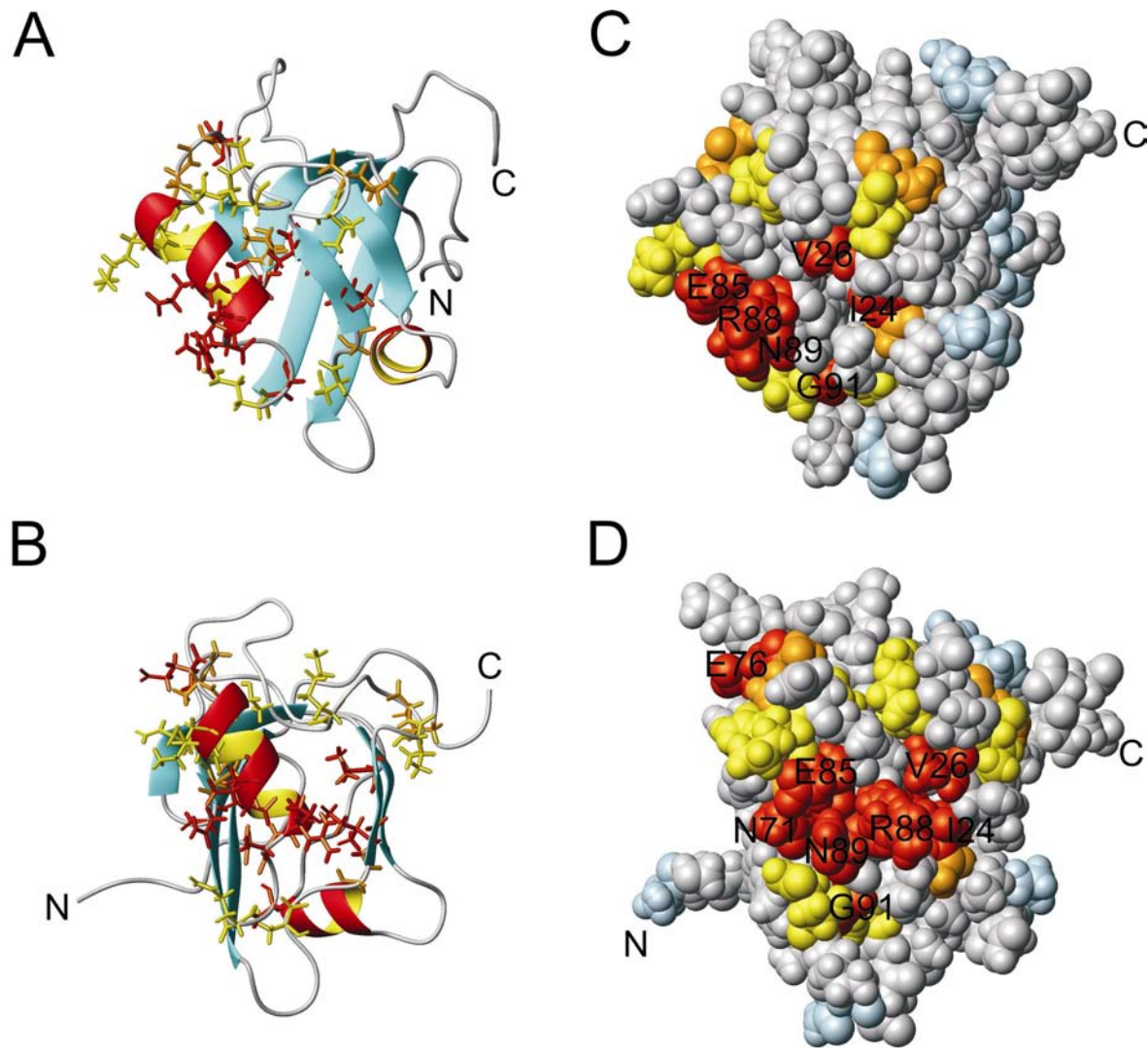


Abb. 4.12: Interaktion der PDZ2b mit PI(3,4,5)P₃. **(A)** PDZ2b von PTP-Bas. Die Seitenketten von Resten, deren Amidgruppen bei Zugabe eines fünffachen molaren Überschusses von PI(3,4,5)P₃ Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen über dem Mittelwert plus eineinhalb Standardabweichungen zeigten, sind rot dargestellt. Änderungen über dem Mittelwert plus einer Standardabweichung sind orange, die über dem Mittelwert sind gelb dargestellt. **(C)** Wie (A) in CPK-Darstellung. Nicht auswertbare Reste sind hellblau eingefärbt. **(B)** (A) nach Rotation um 60° um die y-Achse und -20° um die x-Achse. **(D)** (B) in CPK Darstellung.

Hat die PDZ2b von PTP-Bas eine Spezifität für die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände des Inositolrings? Um diese Frage zu klären und um einzugrenzen, welche Teile des Lipids mit welchen Resten der PDZ interagieren, wurden weitere Titrations mit verschiedenen PIPs durchgeführt. Für PI(4,5)P₂ mit C₈ Fettsäuren ergab sich annähernd dasselbe Muster in den Änderungen der chemischen Verschiebungen der einzelnen Amidgruppen der PDZ2b wie für PI(3,4,5)P₃ (Abb. 4.13). PI(4,5)P₂ bindet demnach in recht ähnlicher Art und Weise in dieselbe Tasche wie PI(3,4,5)P₃. In Titrationsstudien mit PI(3,4)P₂ und PI(3,5)P₂ jeweils mit C₄ Fettsäuren konnte keine Interaktion detektiert werden. Auch Inositol 1,4,5-trisphosphat zeigte keinen messbaren Effekt auf die PDZ2b. Daraus lässt sich schließen, dass Fettsäuren einer gewissen Länge für

die Bindung von PDZ und PIP unerlässlich sind. Hydrophobe Interaktionen spielen demnach eine wesentliche Rolle. Zwischenzeitlich wurde dies auch für andere PDZ-Domänen gezeigt (Mortier et al., 2005; Yan et al., 2005). Ob längere Fettsäureketten durch eine Verstärkung dieser hydrophoben Interaktionen zu einer stärkeren Bindung führen, kann in dem verwendeten experimentellen Ansatz nicht überprüft werden, da die Wasserlöslichkeit der Lipide zu gering für Lösungs-NMR-Messungen ist.

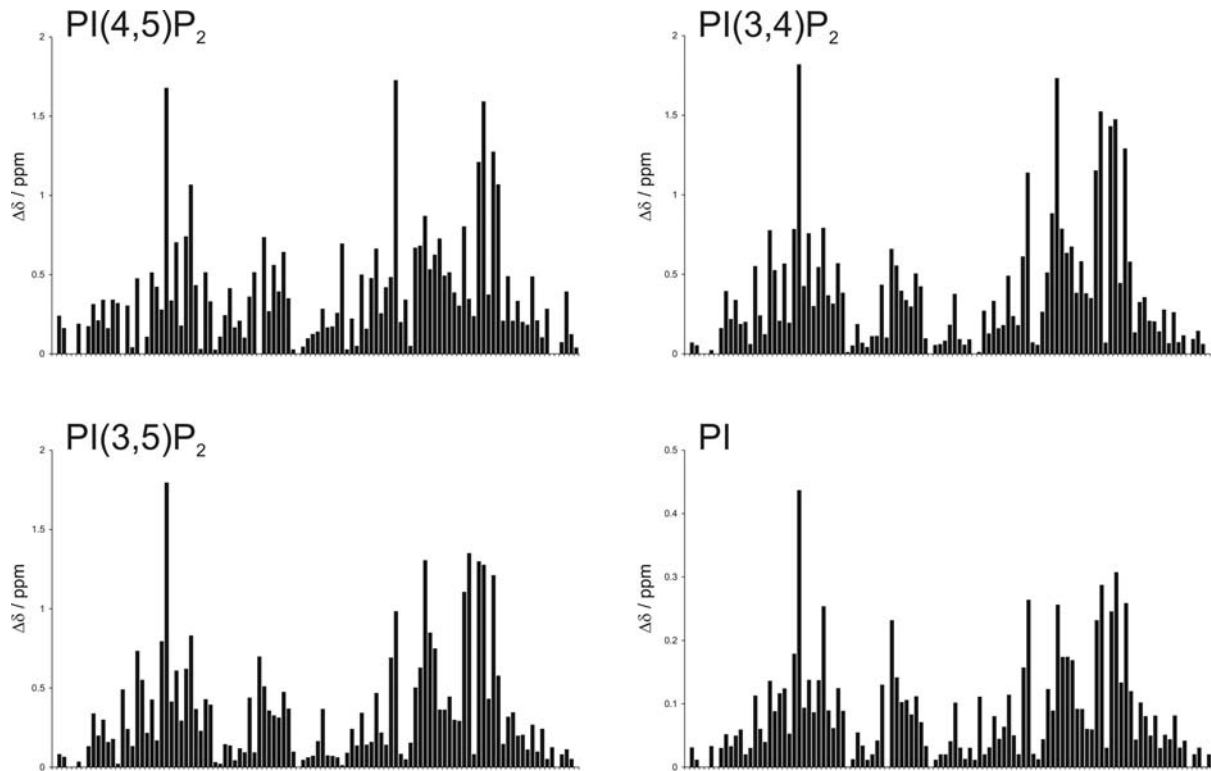


Abb. 4.13: Gewichtetes Mittel der Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen der PDZ2b bei Zugabe von PI(4,5)P₂, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂ und Phosphatidylinositol mit C₈ Fettsäuren im fünffachen molaren Überschuss. Man beachte die geänderte Skalierung im Falle von PI.

In von Stephan Penzkofer (Penzkofer, 2005) durchgeführten Titrations mit PI(3,4)P₂ und PI(3,5)P₂ mit jeweils C₈ Fettsäuren konnten gezeigt werden, dass die Phosphorylierung nur geringe Auswirkung auf die Bindung an die PDZ2 hat (Abb. 4.13). Die PDZ2 von PTP-Bas hat demnach keine hohe Spezifität für ein bestimmtes PIP, wie es oft bei anderen PIP-bindenden Domänen der Fall ist (Balla, 2005). Die PDZ2 ist auch in der Lage Phosphatidylinositol in ähnlicher Weise wie PIPs zu binden. Die Interaktion ohne die negativ geladenen Phosphatgruppen am Inositolring ist aber deutlich schwächer. Eine schwache Interaktion lässt sich auch zwischen der PDZ2b und Diacylglycerin (DAG) mit C₈ Fettsäuren detektieren. Aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen ergibt sich dabei, dass Ile24 und Arg71 mit DAG interagieren. Welche der Phosphatgruppen in der

Nähe welcher PDZ-Reste zu liegen kommt, lässt sich dagegen aus dem Vergleich der verschiedenen Titrationsreihen kaum ermitteln, da die Änderungen der chemischen Verschiebungen sehr ähnlich sind. Durch den Vergleich der Änderungen der chemischen Verschiebungen der einzelnen Amidgruppen relativ zueinander kann nur ausgesagt werden, dass Val70 und Thr77 bei PIP-Bindung in die Nähe des Phosphats an Position drei im Inositolring kommen. Thr81 und Gln82 interagieren wahrscheinlich mit dem Phosphat an Position vier.

Sättigungstransferexperimente

Zur Identifikation der Teilgruppen der PIPs, die mit der PDZ2b in engeren Kontakt treten, wurden von allen Endpunktproben der Titrations Sättigungstransferdifferenzspektren (STD) aufgenommen. Dazu musste zunächst die für den PDZ-PIP-Komplex optimale Vorsättigungsdauer und *on-resonance* Vorsättigungsfrequenz ermittelt werden. Beide sind für STD-Experimente bedeutende Parameter. Je länger die Vorsättigungsdauer, desto mehr PIP-Moleküle erfahren einen Sättigungstransfer. Der messbare Effekt wird also größer. Dagegen erlaubt eine kürzere Dauer der Vorsättigung, besser zwischen den Teilgruppen des PIP zu unterscheiden. Bei der Vorsättigungsfrequenz ist darauf zu achten, dass zwar das Protein effektiv angeregt wird, man aber keinerlei Resonanz zum Lipid hat. Die Ergebnisse der Vorversuche sind in Abb. 4.14 und 4.15 zusammengefasst. Vorsättigungsdauern über 2 s brachten kaum Gewinn im Differenzsignal. Bei Vorsättigungsdauern unter 2 s wurde der Unterschied im Differenzsignal zwischen einzelnen Protonen geringfügig größer. Allerdings wurden dann die Intensitäten der Differenzsignale sehr gering und somit schwer auswertbar. Deshalb wurde für die STD-Experimente eine Vorsättigungsdauer von 2 s gewählt. Die *on-resonance* Einstrahlfrequenz hat wie Abb. 4.15 zeigt im niedrigen ppm-Bereich starken Einfluss auf die Stärke des Differenzsignals der einzelnen Protonen, da in diesem Bereich ebenfalls Resonanzen der Fettsäureketten liegen. Verwendete man Einstrahlfrequenzen im Amid- bzw. Aromatenbereich des Proteins, hatte die Einstrahlfrequenz keinen Einfluss auf das Ergebnis des STD-Experiments. Für die Experimente wurde daher bei 7,05 ppm vorgesättigt. Das entspricht der Resonanz der im hydrophoben Kern der PDZ2b liegenden H^δ von Phe11, was eine gleichmäßige Vorsättigung des gesamten Proteins garantieren sollte. In der Tat konnte durch Einstrahlen bei 7,05 ppm für die Proteinsignale im gesamten Frequenzbereich eine gleichmäßige Sättigung erreicht werden.

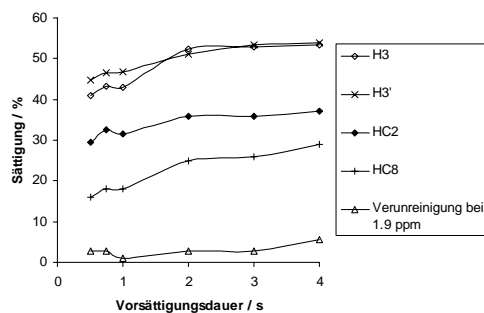


Abb. 4.14: Sättigung einzelner Protonensignale von PI(3,4,5)P₃ mit C₈ Fettsäuren bzw. einer niedermolekularen Verunreinigung bei unterschiedlichen Vorsättigungsdauern auf die PDZ2b (*on-resonance* Einstrahlfrequenz: 7,05 ppm).

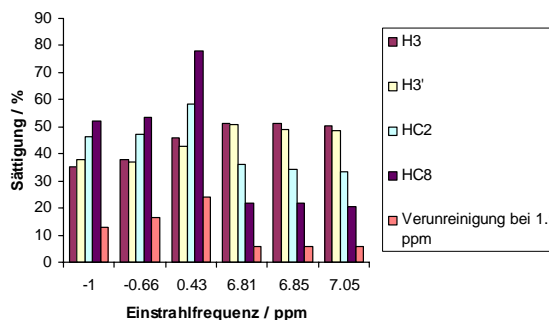


Abb. 4.15: Sättigung einzelner Protonensignale von PI(3,4,5)P₃ mit C₈ Fettsäuren bzw. einer niedermolekularen Verunreinigung bei unterschiedlichen *on-resonance* Vorsättigungsfrequenzen auf die PDZ2b (Vorsättigungsdauer: 2 s).

In Abb. 4.16 ist ein STD-Spektrum von PI(3,4,5)P₃ mit C₈ Fettsäuren und der PDZ2b gezeigt. Man kann deutlich den unterschiedlichen Sättigungseffekt auf die verschiedenen Teile des PIPs erkennen. Das nicht mit der PDZ interagierende DSS und die niedermolekulare Verunreinigung mit einem Signal bei 1,9 ppm erfahren dagegen keinen Sättigungstransfer, ihre Signalfäche im Differenzspektrum wird zu Null. Die relative Sättigung aus den Sättigungstransferexperimenten ausgehend von der PDZ2b von PTP-Bas auf die verschiedenen Lipide, jeweils bezogen auf das am stärksten gesättigte Signal des Lipids sind in Abb. 4.17 angegeben. Die einzelnen Werte sind auch im Anhang (Kapitel 7.4) aufgeführt. Zur Zuordnung der Lipidresonanzen und zur Nomenklatur der Atome sei ebenfalls auf den Anhang verwiesen. Die Zuordnung erfolgte gemäß den bereits veröffentlichten chemischen Verschiebungen von Inositolphosphaten und Phospholipiden (Neumann et al., 1985; Cerdan et al., 1986; Reid & Gajjar, 1987). Im Inositolring ist generell ein starker Sättigungstransfer zu verzeichnen, es findet also eine enge Wechselwirkung mit dem Protein statt. Am Proton in Position 4 lässt sich bei allen Lipiden eine sehr starke Sättigung beobachten. Auf eine besonders enge Wechselwirkung mit der PDZ weist der hohe Wert für das H2' am Glycerinteil hin. Auch die Fettsäuren kommen mit dem Protein in Kontakt, was die in den Titrationsstudien gemachte Beobachtung stützt, dass die Fettsäuren essentiell an der Bindung beteiligt sind. Die zum Ende der Fettsäureketten abnehmenden Werte könnten in der Beweglichkeit der Ketten begründet liegen, die einen effizienten Sättigungstransfer behindert. Im Phosphatidylinositol ist die Sättigung an der Carbonylseite der Fettsäuren relativ zum Inositolring deutlich höher als bei den Lipiden mit phosphorylierten Inositolringen. Auch die absolute Sättigung von 30 bis 40 % ist deutlich geringer als bei den PIPs, wo sie bei 50 bis 70 % liegt (siehe Anhang). Dies unterstreicht die Bedeutung der Phosphatgruppen für die

Bindung an die PDZ. Obwohl $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ mit den kurzen C_4 Fettsäuren und $\text{IP}(1,4,5)\text{P}_3$ in den Titrationsstudien keinen messbaren Effekt auf die PDZ-Spektren zeigte, konnte durch die STD-Experimente eine schwache Interaktion nachgewiesen werden. Allerdings liegen die absoluten Werte der Sättigung hier bei maximal 40 % und somit unter den Werten für die Lipide mit den längeren Fettsäuren. Vor allem beim $\text{IP}(1,4,5)\text{P}_3$ zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Sättigungswerte der einzelnen Protonen im Ring. Dies deutet auf eine eher unspezifische Bindung hin.

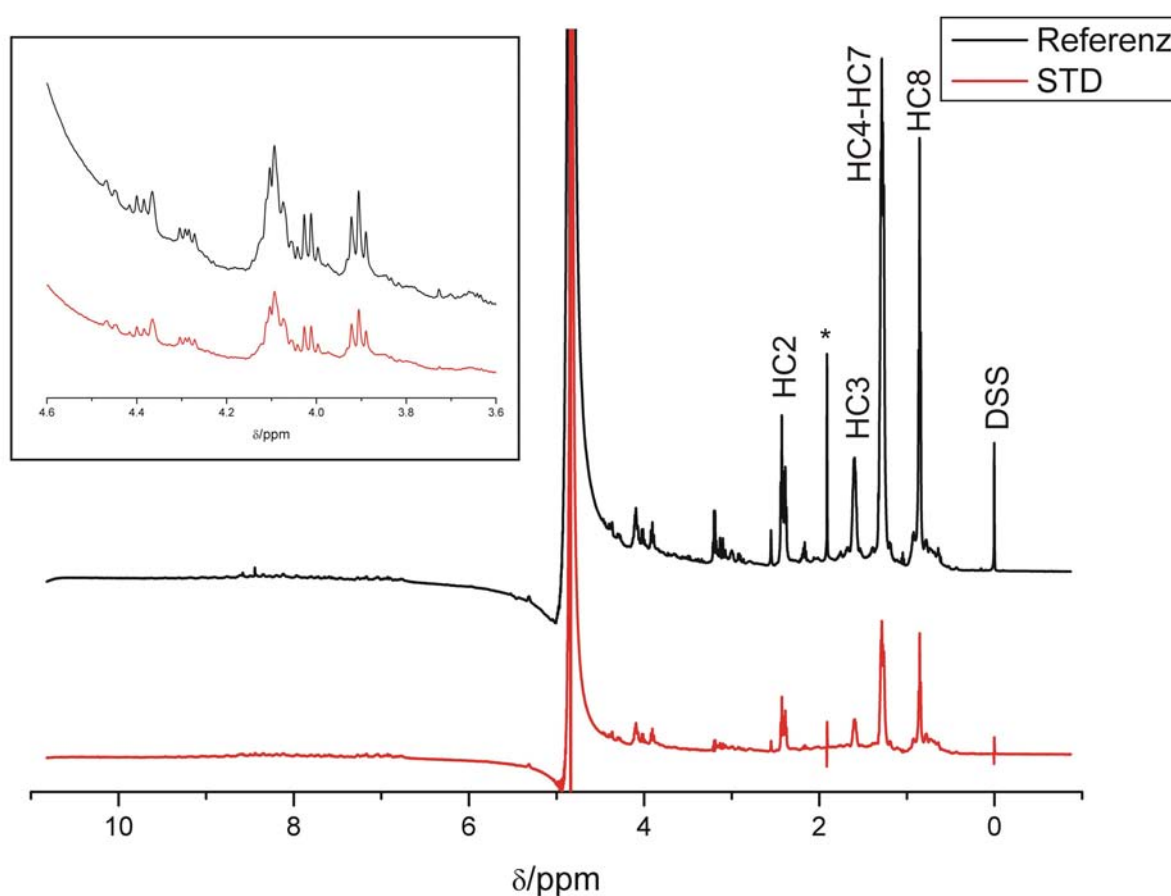


Abb. 4.16: STD-Spektrum von $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ mit C_8 Fettsäuren und PDZ2b. Differenzspektrum (rot) und das *off-resonance* Referenzspektrum (schwarz) sind dargestellt. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Signale des Inositolrings. * markiert eine niedermolekulare Verunreinigung der Probe.

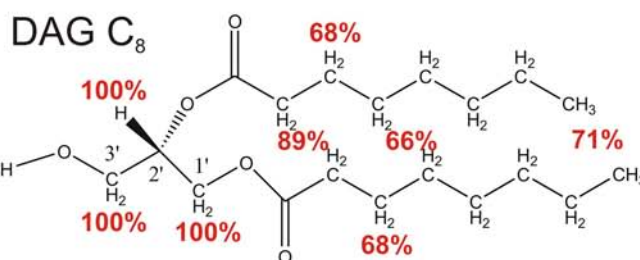
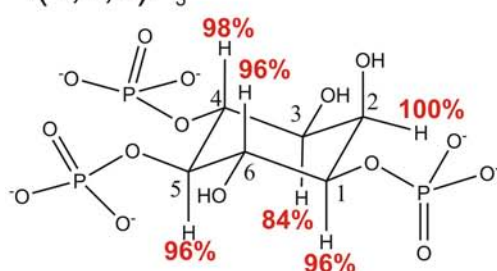
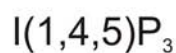
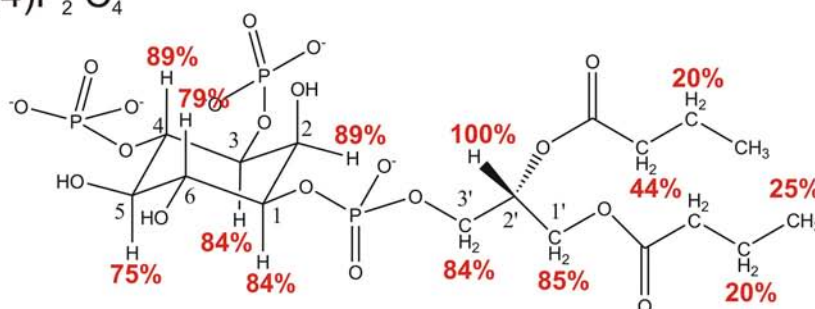
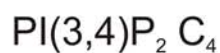
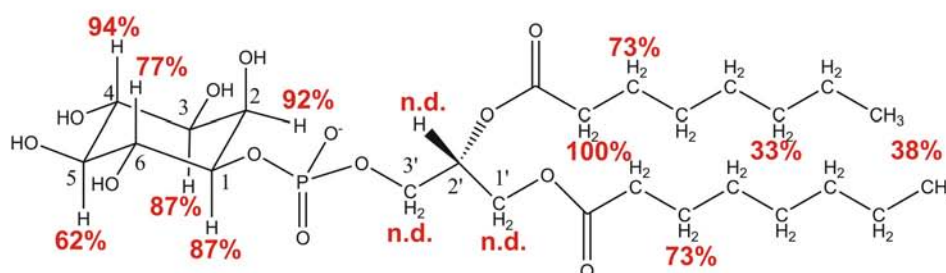
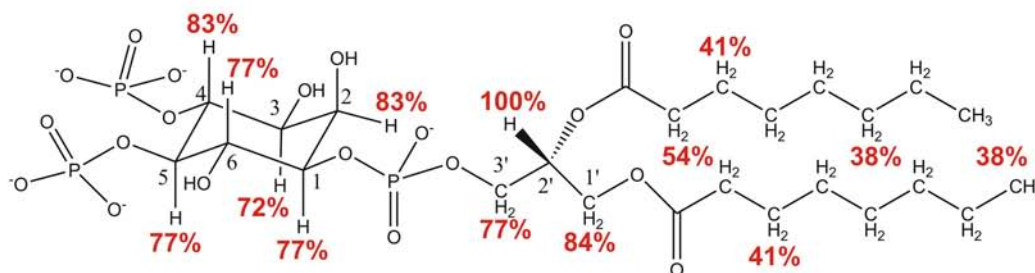
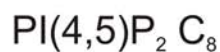
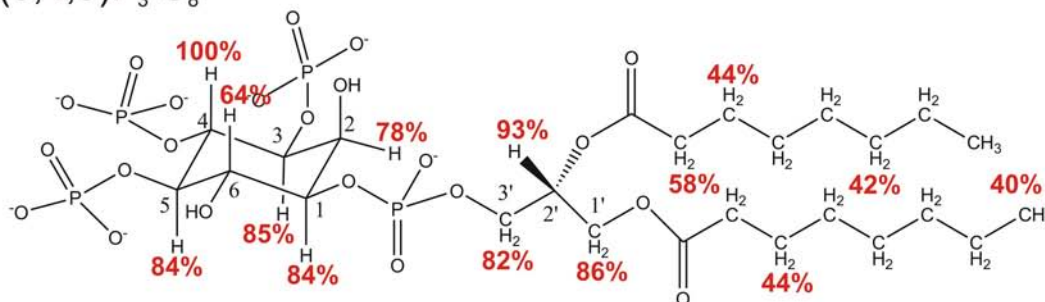


Abb. 4.17: Relative Sättigung der Protonen verschiedener Lipide durch Sättigungstransfer bei Bindung an die PDZ2b.

Modellierung des PDZ-PIP-Komplexes

Zur genauen Analyse der Bindung von Phosphatidylinositolphosphaten an die PDZ2b von PTP-Bas wurde der Komplex aus PI(3,4,5)P₃ mit C₈ Fettsäuren und der PDZ2b mit Hilfe des datengetriebenen Dockingprotokolls von *HADDOCK* (Dominguez et al., 2003) modelliert. Dazu wurden die oben beschriebenen Daten aus den NMR-Experimenten eingesetzt. Reste, deren Amidgruppen nach Zugabe von PI(3,4,5)P₃ im molaren Verhältnis PIP:PDZ 5:1 Änderungen ihrer chemischen Verschiebung über dem Mittelwert aller Reste plus einer Standardabweichung zeigen (Abb. 4.11), wurden als *aktive Reste* für das Docking definiert. Dies sind G23, I24, V26, L29, V70, N71, E76, G77, A78, E85, T86, R88, N89 und G91. Reste, deren Änderung der chemischen Verschiebung über dem Mittelwert plus einer halben Standardabweichung liegt, wurden als *passive Reste* definiert. Es sind S21, V28, K32, T79, K81, Q82 und Q92. Zusätzlich wurden aus dem Vergleich der Titrationsreihen identifizierte Kontakte als experimentelle Einschränkungen für das Docking verwendet. Für I24 und N71 wurde jeweils eine uneindeutige Abstandsbeschränkung von 0,2 nm zu irgendeinem der Atome des Diacylglycerinteils festgelegt, für V70 und G77 entsprechend zu dem Phosphat in Position drei und für K81 und Q82 zu dem Phosphat in Position vier. Damit wurde das in Materialien und Methoden beschriebene Dockingprotokoll durchgeführt. Um die optimale Interaktion der Fettsäuren mit den hydrophoben Bereichen des Proteins zu gewährleisten, wurden sowohl das komplette PIP als auch alle Reste der PDZ während allen Molekulardynamikstadien des Dockings als voll flexibel gehandhabt.

Mit den hundert pseudoenergieärmsten Komplexmodellen des Dockings wurde eine Pseudoenergieminimierung unter Einbeziehung des Lösungsmittels Wasser durchgeführt. Anschließend wurden die Modelle einer Clusteranalyse unterzogen, d.h. es wurde ermittelt, welche Ligandorientierungen gehäuft als Lösung des Dockings auftreten. Auf Grund der zu erwartenden erhöhten Beweglichkeit der Fettsäureketten wurden nur der Inositolring und der Glycerinteil des PIPs, also die Kopfgruppe des Lipids, hierfür herangezogen. Zunächst wurden die von der Bindung nicht beeinflussten Teile des Proteins der 100 Komplexmodelle überlagert (Reste 9-20, 45-69 und 94-100). Dann wurde der *rmsd* der Atompositionen der PIP-Kopfgruppen berechnet. Ligandorientierungen mit einem *rmsd* unter 0,2 nm wurden in einem gemeinsamen Cluster zusammengefasst. Für das Docking von PI(3,4,5)P₃ mit C₈ Fettsäuren an die PDZ2b wurden sechs Cluster erhalten (Cluster 1 bis 6). Ihre Pseudoenergien sind in Abb. 4.18 und die pseudoenergieärmsten Strukturen in Abb. 4.19 dargestellt. In allen

Clustern kommt das PIP in nur geringfügig unterschiedlicher Weise in der Bindetasche des Proteins zu liegen. Betrachtet man die Pseudoenergien aus dem Docking, besonders die Gesamtenergie des Komplexes E_{tot} , die intermolekulare Energie und die Verletzungsenergie der experimentellen Beschränkungen E_{AIR} , sind Cluster 2 und 4 die günstigsten. Berechnet man aus den jeweils pseudoenergieärmsten Strukturmodellen der einzelnen Cluster den NMR-spektroskopischen R-Wert für die Übereinstimmung zu einem 2D- ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von PDZ2b mit PI(3,4,5) P_3 , wird deutlich, dass Cluster 4 das gemessene Spektrum am besten erklärt (Tab. 4.3). Das pseudoenergieärmste Modell aus Cluster 4 ist demnach am besten geeignet, den Komplex aus PDZ2b und PI(3,4,5) P_3 zu beschreiben. Es ist in Abb. 4.20 dargestellt.

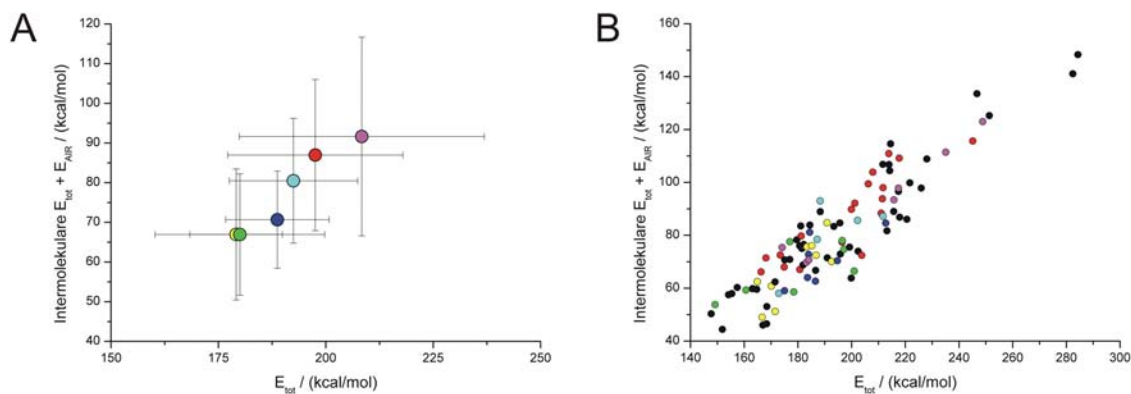


Abb. 4.18: Auftragung der Pseudoenergien aus der Komplexmodellierung von PDZ2b mit PI(3,4,5) P_3 mit C_8 Fettsäuren. (A) Mittelwert der Cluster der PIP-Orientierungen, (B) die 100 pseudoenergieärmsten Strukturen aus der abschließenden Pseudoenergieminimierung. Die einzelnen Cluster sind farblich markiert: Cluster 1 rot, Cluster 2 gelb, Cluster 3 dunkelblau, Cluster 4 grün, Cluster 5 violett und Cluster 6 hellblau.

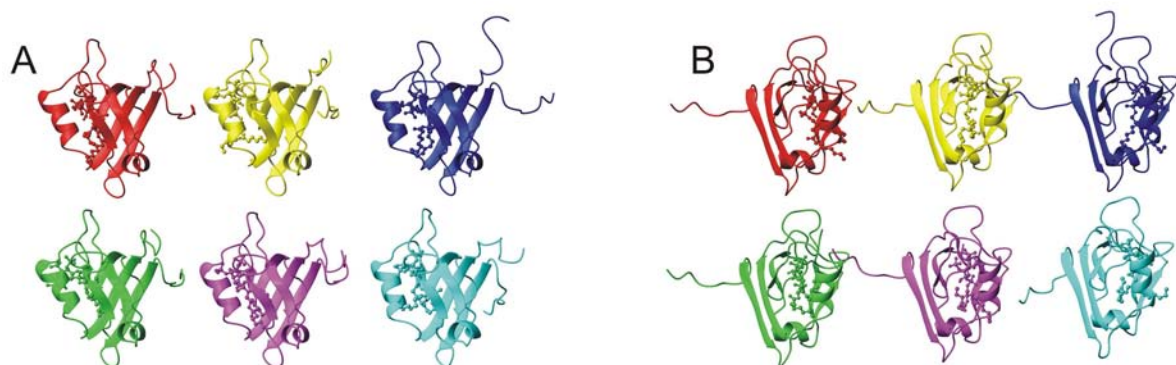


Abb. 4.19: Pseudoenergieärmstes Strukturmodell der einzelnen Cluster aus der Komplexmodellierung von PDZ2b mit PI(3,4,5) P_3 (A). (B) wie (A) nur 90° um die y-Achse gedreht. Die einzelnen Cluster sind farblich markiert: Cluster 1 rot, Cluster 2 gelb, Cluster 3 dunkelblau, Cluster 4 grün, Cluster 5 violett und Cluster 6 hellblau.

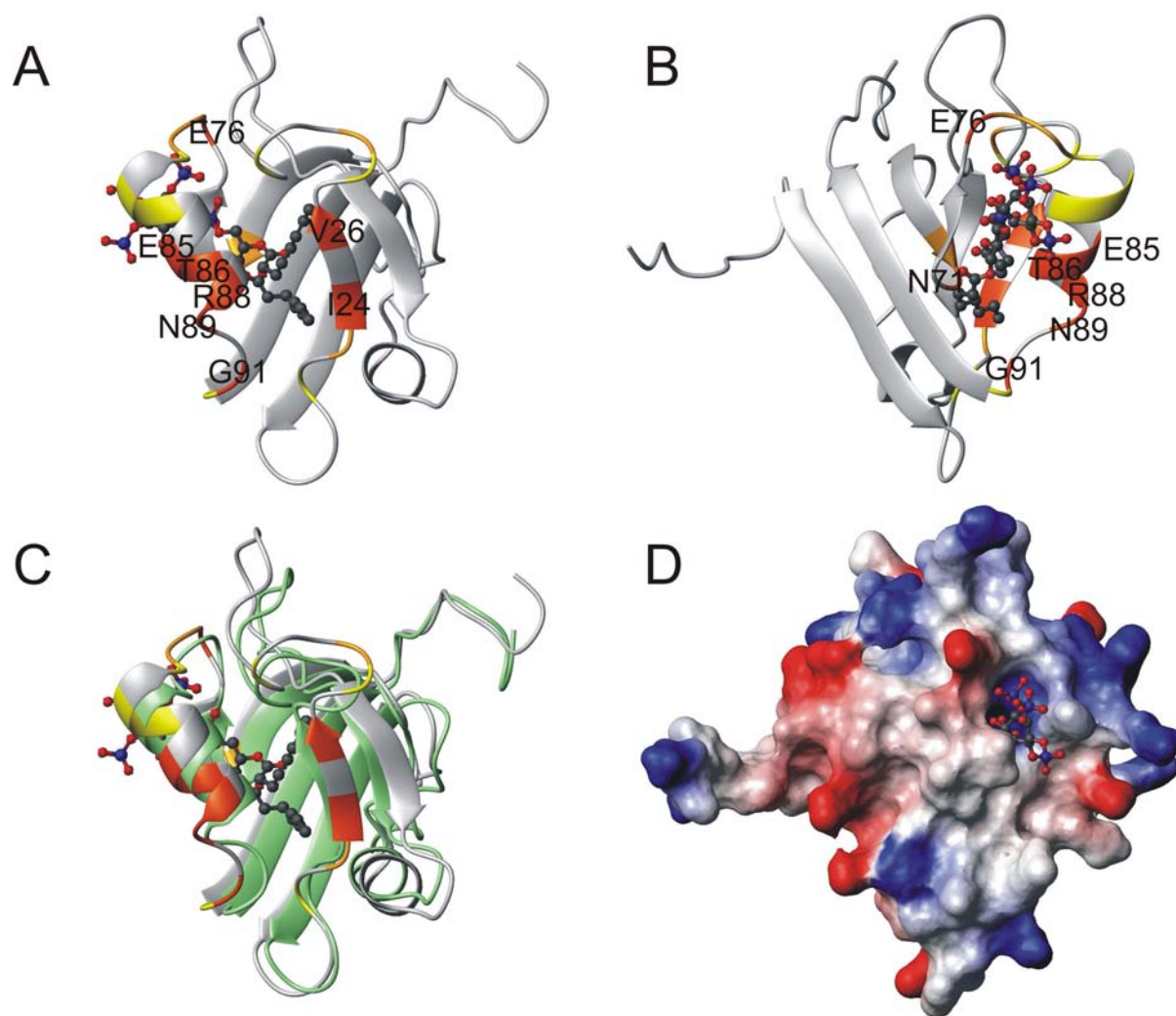


Abb. 4.20: Strukturmodell für den Komplex aus PDZ2b mit PI(3,4,5)P₃ mit C₈ Fettsäuren (**A**). Reste mit Änderungen der chemischen Verschiebungen ihrer Amidgruppen bei Zugabe von PI(3,4,5)P₃ über dem Mittelwert plus 1,5 Standardabweichungen sind rot, über Mittelwert plus einer Standardabweichung orange und über Mittel plus einer halben Standardabweichung gelb markiert. (**B**) wie (**A**) 120° um die y-Achse gedreht. (**C**) wie (**A**) überlagert mit der Struktur der freien PDZ2b in grün (PDB: 1Q7X). (**D**) Oberflächendarstellung und elektrostatisches Potential von (**B**). Negativ geladene Regionen sind rot, positiv geladene Regionen blau dargestellt.

	1Q7X	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6
R _{intraresiduell}	0,20	0,23	0,23	0,24	0,22	0,23	0,23
R _{sequentiell}	0,20	0,19	0,19	0,20	0,18	0,22	0,20
R _{mittlere Reichweite}	0,26	0,18	0,17	0,30	0,22	0,23	0,22
R _{langreichweitig}	0,27	0,28	0,25	0,25	0,19	0,23	0,22
R _{alle interresiduellen NOEs}	0,23	0,22	0,21	0,23	0,19	0,23	0,21

Tab. 4.3: R-Werte für die Übereinstimmung verschiedener Strukturmodelle von freier PDZ2b (PDB: 1Q7X) und den jeweils pseudoenergieärmsten Modellen der einzelnen Cluster aus dem Docking zu einem 2D-¹H-¹H-NOESY-Spektrum von PDZ2b mit PI(3,4,5)P₃. Berücksichtigt wurden nur die Signale im Amidbereich der direkten Dimension.

Das erstellte Komplexmodell der PDZ2b mit PI(3,4,5)P₃ ist in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Alle Reste, deren Änderung der chemischen Verschiebung ihrer Amidgruppen bei Zugabe von PI(3,4,5)P₃ höher als der Mittelwert plus einer Standardabweichung ist, liegen in räumlicher Nähe zu mindestens einem Lipidatom. Die einzigen Reste mit deutlicher Änderung der chemischen Verschiebung und minimalen Distanzen zum Lipid von über 0,4 nm sind Glu85, Arg88 und Asn89. Sie sind Teil von α 2, die bei der Bindung ihre Position verändert (Abb. 4.20C). Die Signaländerung könnte also durch den strukturellen Einfluss der Bindung auf die Helix und nicht direkt durch Nähe des Liganden verursacht werden. Umgekehrt zeigen alle Reste, die in räumlicher Nähe des Liganden liegen, Änderungen in den chemischen Verschiebungen ihrer Amidgruppen. Ausnahmen hiervon sind nur Val73, Ser74 und Leu87. Ihre Interaktion mit dem Lipid wird aber jeweils durch Seitenkettenatome vermittelt, weswegen ein Effekt auf die Amidgruppe nicht zwingend zu erwarten ist.

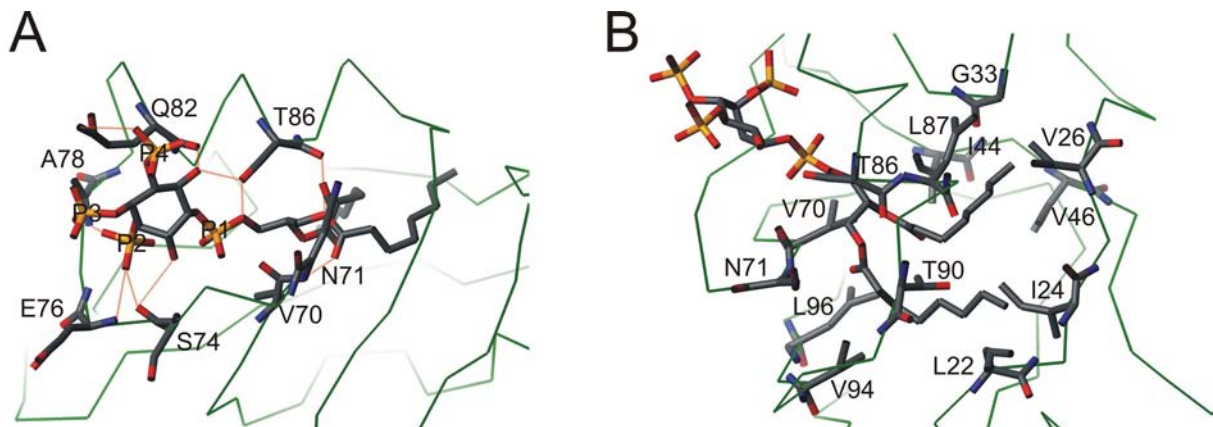


Abb. 4.21: Komplexmodell von PDZ2b und PI(3,4,5)P₃ mit C₈ Fettsäuren. **(A)** Hydrophile Kontakte zwischen Lipid und Protein (gestrichelte orange Linien, siehe Tab. 4.4). **(B)** Hydrophobe Seitenketten in Wechselwirkung mit dem Diacylglycerinteil des Lipids. Die Proteinhauptkette ist als grüne Linie symbolisiert, ausgewählte Reste und das Lipid sind als Stäbe dargestellt. Die Protonen sind der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt.

Atom des PI(3,4,5)P ₃	Atom der PDZ2b
Carboxylsauerstoff einer Fettsäure	Asn71 N
OH-Gruppe am C1'	Thr86 O
Phosphatgruppe 1	Thr86 O ^γ
OH-Gruppe am C2	Ser74 O
Phosphatgruppe 3	Ser74 O, Glu76 N, Ala78 N
Phosphatgruppe 4	Gln82 N ^{ε2}
OH-Gruppe am C6	Gln82 O, Thr86 O ^{γ1}

Tab. 4.4: Hydrophile Kontakte im Komplexmodell von PI(3,4,5)P₃ und PDZ2b mit Atom-Atom-Abständen von 0,25-0,33 nm.

PI(3,4,5)P₃ wird vor allem durch hydrophile Kontakte zwischen der Inositolgruppe und der PDZ2b sowie durch hydrophobe Kontakte zwischen den Fettsäuren und lipophilen Aminosäureresten an das Protein gebunden. Hydrophile Kontakte mit Atom-Atom-Abständen von 0,25-0,33 nm sind in Tab. 4.4 aufgeführt und in Abb. 4.21A im Komplexmodell dargestellt. Es bestehen also Kontakte zwischen der PDZ2b und allen Teilen des Inositolrings, außer an Position fünf. Der Glycerinteil des Lipids liegt tief in der Bindetasche. Die Fettsäureketten weisen eine Reihe von hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Protein auf (Abb. 4.21B), wodurch die Bindung deutlich verstärkt wird. Dies gilt im besonderen Maße für die Kohlenstoffe 4 bis 8, die hydrophobe Kontakte von unter 0,3 nm zu Leu22, Ile24, Val26, Gly33, Ile44, Val46 und Thr90 bilden. Wie oben gezeigt, sind diese hydrophoben Wechselwirkungen für die Bindung essentiell.

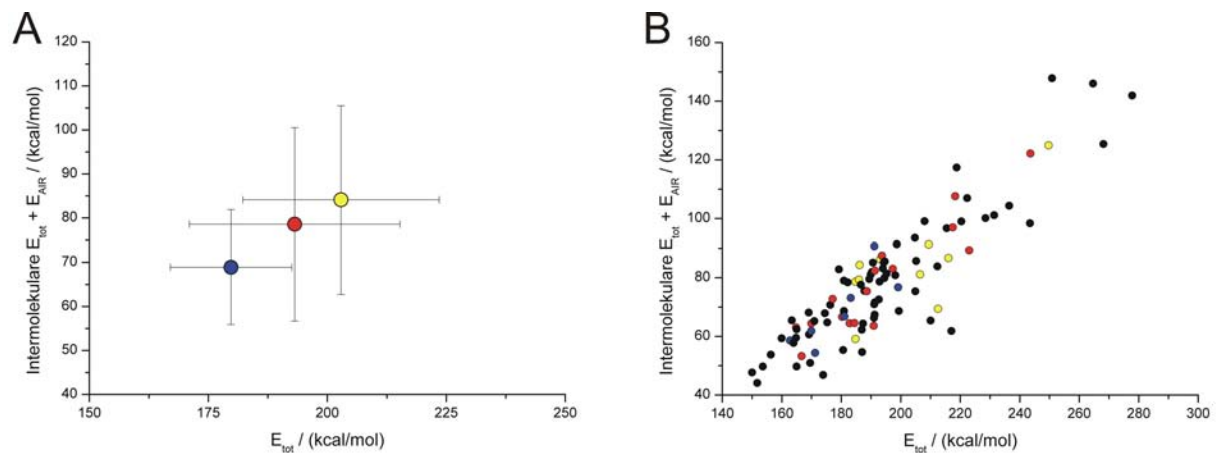


Abb. 4.22: Auftragung der Pseudoenergien aus der Komplexmodellierung von PDZ2b mit PI(3,4,5)P₃ mit C₁₆ Fettsäuren. (A) Mittelwert der Cluster der PIP-Orientierungen, (B) die 100 pseudoenergieärmsten Strukturen aus der abschließenden Pseudoenergieminimierung. Die einzelnen Cluster sind farblich markiert: Cluster 1 rot, Cluster 2 gelb, Cluster 3 dunkelblau.

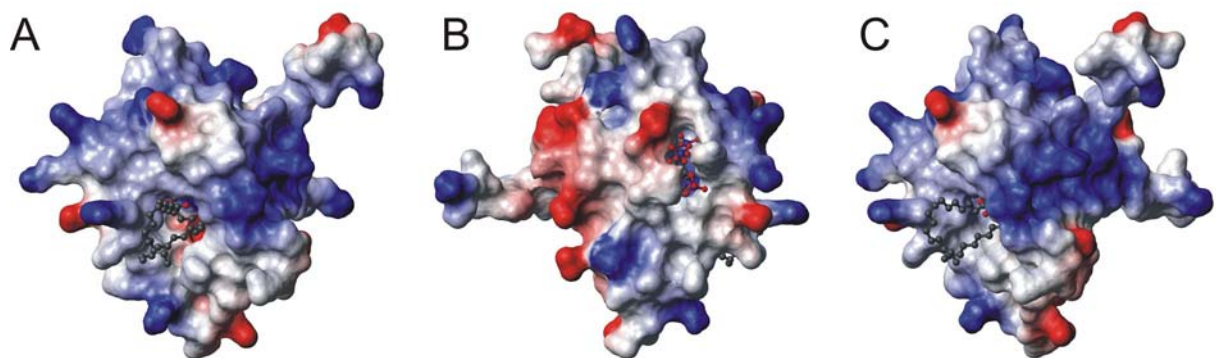


Abb. 4.23: Komplexmodell von PDZ2b mit PI(3,4,5)P₃ mit C₁₆ Fettsäureketten. (A) Oberflächendarstellung und elektrostatisches Potential in derselben Proteinorientierung wie in Abb. 4.18A. Negativ geladene Regionen sind rot, positiv geladene Regionen blau dargestellt. (B) wie (A) 120° um die y-Achse gedreht (entspricht Abb. 4.20D). (C) wie (A) -20° um die y-Achse gedreht.

Um ein Bild davon zu erhalten, wie die in Zellmembranen vorkommenden Inositollipide mit längeren Fettsäureketten mit der PDZ2b interagieren, wurde eine Dockingrechnung genau wie oben beschrieben für $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ mit C_{16} Fettsäuren durchgeführt. Die Energie- und Clusteranalyse der 100 final erhaltenen Strukturen identifiziert eindeutig die PIP-Lage in Cluster 3 als die pseudoenergetisch günstigste (Abb. 4.22). Das pseudoenergieärmste Komplexmodell aus dem pseudoenergieärmsten Cluster ist in Abb. 4.23 gezeigt. Die Lage der Lipidkopfgruppe aus Inositolphosphat- und Glycerinteil hat einen *rmsd* der Atompositionen von 0,18 nm zum Modell für die kurzen Fettsäureketten. Die Ergebnisse sind also sehr ähnlich. Die Bindung wird durch die längeren Kohlenwasserstoffketten nicht wesentlich beeinflusst. Die längeren Fettsäureketten ragen in einem Bereich aus der Proteinoberfläche heraus, der positiv geladen ist (Abb. 4.23C). Dies kann eine Interaktion der Proteinoberfläche mit einer negativ geladenen Membranfläche erleichtern.

4.4 Diskussion

4.4.1 Bindung von Proteinen

Die Schleife zwischen den β -Strängen 2 und 3 ist bei PDZ-Domänen von großer Bedeutung für die spezifische Bindung an andere Proteine und Peptide, was auch für die PDZ2a von PTP-Bas gilt (Kozlov et al., 2000; Kozlov et al., 2002). In der hier untersuchten Spleißvariante PDZ2b führt eine Insertion von fünf Aminosäuren in eben dieser Schleife zum Verlust der Bindefähigkeit von Proteinen (Erdmann et al., 2000; Kachel et al., 2003). Wie in Kapitel 4.3.1 dargestellt, führen diese fünf zusätzlichen Aminosäuren zu deutlichen strukturellen Änderungen verglichen zur PDZ2a (Kozlov et al., 2000), vor allem im Bereich der $\beta 2/\beta 3$ -Schleife sowie in der Peptidbindetasche, die von $\alpha 2$ und $\beta 2$ umrahmt wird (Kozlov et al., 2002). Die Insertion bildet eine fixierte Schleife im Peptiderkennungsbereich, die zusätzlich zu einer Reorientierung von $\alpha 2$ führt. Somit ist die Peptidbindetasche in der PDZ2b sterisch blockiert. Diese durch das alternative Spleißen verursachten strukturellen Veränderungen führen zu dem beobachteten Verlust der Proteinbindefähigkeit.

In den durchgeführten NMR-Peptidbindungsstudien konnte dennoch eine schwache Bindung eines C-terminalen APC-Peptids an die PDZ2b nachgewiesen werden. Allerdings sind die durch das Peptid hervorgerufenen Änderungen der chemischen Verschiebungen der PDZ2b relativ gering und über das gesamte Protein verstreut und es liegt schneller Austausch auf der NMR-Zeitskala vor. Dies spricht für eine relativ schwache Interaktion zwischen der PDZ2b und dem Peptid. Im Gegensatz dazu konnten Kozlov und Mitarbeiter bei ähnlichen Peptidbindungsstudien an der Spleißvariante PDZ2a von PTP-Bas (Kozlov et al., 2000) für einige Reste intermediären chemischen Austausch feststellen, was auf eine deutlich stärkere Bindung hinweist. Die Änderungen der Spektren der PDZ2a zeigen eine lokalisierte Interaktion des Peptids mit $\beta 2$ und $\alpha 2$ an (Kozlov et al., 2000). In den hier präsentierten Studien an der PDZ2b kann keine so auffällige Lokalisierung beobachtet werden.

Die stärksten beobachteten Unterschiede zwischen PDZ2a und PDZ2b bei Interaktion mit dem Peptid liegen in dem Teil der Bindetasche, in dem die PDZ2b durch alternatives Spleißen ihre fünf zusätzlichen Aminosäuren enthält. Diese Tatsache wird selbsterklärend, wenn man sich die Struktur der PDZ2b ansieht. Die Interaktion dieser Reste mit dem Peptid ist wie oben beschrieben durch den sterischen Anspruch der Insertion blockiert. Allerdings zeigen die deutlichen Änderungen der chemischen Verschiebung einiger Reste der PDZ2b, die mit $\beta 2$ und dem C-Terminus von $\alpha 2$ einen Teil der Peptidbindetasche umrahmen, dass zumindest eine schwache spezifische Wechselwirkung stattfindet. Das APC-Peptid scheint also weiterhin diesen strukturell konservierten Teil der Bindetasche zu erkennen. Eine starke Wechselwirkung wie in der PDZ2a wird dann allerdings durch die fehlenden Interaktionsmöglichkeiten mit der $\beta 2/\beta 3$ -Schleife und die strukturelle Änderung der Bindetasche verhindert. Dies ist in Übereinstimmung mit den biochemischen Studien, die zeigen, dass die PDZ2a APC bindet, die PDZ2b aber nicht (Erdmann et al., 2000; Kachel et al., 2003).

Die hier beschriebenen Beobachtungen konnten im Nachhinein unabhängig durch NMR-spektroskopische Strukturbestimmung und Bindungsstudien an der PDZ2b von PTP-BL, dem homologen Protein aus der Maus, bestätigt werden (Walma et al., 2004).

4.4.2 Bindung von Phosphatidylinositolphosphaten

Wie die NMR-Titrationsstudien mit Phosphatidylinositolphosphaten an der PDZ2b von PTP-Bas gezeigt haben, findet die PIP-Bindung in derselben Tasche statt, die auch für die Interaktion mit C-terminalen Peptiden verantwortlich ist (Kozlov et al., 2000). Allerdings zeigen die Titrationsexperimente mit $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ keine Interaktion mit der $\beta 2/\beta 3$ -Schleife, die für die Peptidbindung von großer Bedeutung ist. Dagegen sind Reste am C-Terminus von $\beta 4$ und der Schleife zwischen $\beta 5$ und $\alpha 2$, nämlich Val70, Arg71, Glu76, Gly77 und Ala78 an der PIP-Bindung beteiligt, die bei der Peptiderkennung keine Rolle spielen. Dies erklärt, warum sowohl die PDZ2a als auch die PDZ2b PIP binden können. Die Insertion, die bei der PDZ2b die Peptidbindung verhindert, stört die PIP-Bindung nicht, da PIP auf der Seite der β -Stränge 4 und 5 zu liegen kommt. Dennoch überlappen die Bindungsregionen für PIP und Peptide in weiten Teilen. Das legt die Vermutung nahe, dass PIP und die Proteinbindungspartner um die PDZ2 von PTP-Bas konkurrieren. So könnte die Interaktion von PTP-Bas mit Proteinen durch die lokale PIP-Konzentration reguliert werden. Diese Vermutung wird unterstützt durch Kompetitionsstudien an Syntetin, bei denen PDZ-Proteininteraktionen durch steigende PIP-Konzentrationen blockiert werden konnten (Zimmermann et al., 2002).

In den Titrationsstudien mit verschiedenen phosphorylierten PIPs zeigt die PDZ sehr ähnliche Änderungen der chemischen Verschiebungen der einzelnen Reste. Auch die Bindungsstärke ist sehr ähnlich (Penzkofer, 2005). Die Effizienz des Sättigungstransfers von der PDZ auf die Lipide wird nicht signifikant durch die Position der Phosphatgruppen am Inositolring beeinflusst. Vermutlich hat demnach der Phosphorylierungszustand des Rings kaum Einfluss auf die Orientierung des Lipids in der Bindetasche am Protein. Die Ausrichtung des PIPs in der Bindetasche wird wohl eher aus dem Zusammenspiel des phosphorylierten Inositolrings mit dem Glycerinteil und den für die Bindung essentiellen Fettsäureketten gemeinsam bestimmt.

Mit Hilfe der experimentellen Daten aus den NMR-Titrationsreihen konnte erstmals ein Modell des Komplexes aus PDZ2b von PTP-Bas und $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ erstellt werden. Dies ist das erste strukturelle Modell für die PIP-Bindung durch PDZ-Domänen. $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ wird vor allem durch hydrophile Kontakte zwischen der Inositolgruppe und der PDZ2b sowie durch hydrophobe Kontakte zwischen den Fettsäuren und lipophilen Aminosäureresten an das

Protein gebunden. Alle Teile des Inositolrings weisen spezifische Kontakte zum Protein auf, außer an Position fünf des Rings. Das Proton an Position fünf zeigt auch in den STD-Experimenten relativ geringe Sättigungswerte. Weiterhin scheint keine der Phosphatgruppen in herausragendem Maße an der Bindung beteiligt zu sein. So lässt sich keine spezifische Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen einer der negativen Phosphatgruppen und einer positiv geladenen Aminosäureseitenkette feststellen, wie es bei den meisten anderen PIP-Bindedomänen zu beobachten ist (Balla, 2005). Dies erklärt den geringen Einfluss der unterschiedlichen Phosphatgruppen auf die Bindungsstärke und Spezifität. Vielmehr liegt die Bedeutung der negativen Phosphatgruppen eher in einer weniger spezifischen Wechselwirkung mit der positiven Ladung auf der Proteinoberfläche in dem Bereich der Inositolgruppe. Dies verstärkt die Bindung der PIPs im Vergleich zu PI, dem die negativen Phosphatgruppen fehlen. Der Glycerinteil des Lipids liegt tief in der Bindetasche, was sich auch in dem hohen Sättigungstransfer in den STD-Experimenten widerspiegelt. Die Fettsäureketten weisen eine Reihe von hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Protein auf. Wie oben gezeigt, sind diese hydrophoben Wechselwirkungen für die Bindung essentiell. Der Grund, warum bisher für PDZ-Domänen noch kein einheitliches PIP-Bindemotiv gefunden werden konnte (Mortier et al., 2005), liegt dem hier präsentierten Komplexmodell folgend darin, dass keine hoch spezifischen Interaktionen zwischen dem Protein und bestimmten Phosphatgruppen vorliegen. Vielmehr wird das Lipid durch das Zusammenspiel des hydrophilen und positiv geladenen Oberflächenbereichs am N-Terminus von $\alpha 2$ und der hydrophoben Tasche zwischen $\alpha 2$ und $\beta 2$ gebunden.

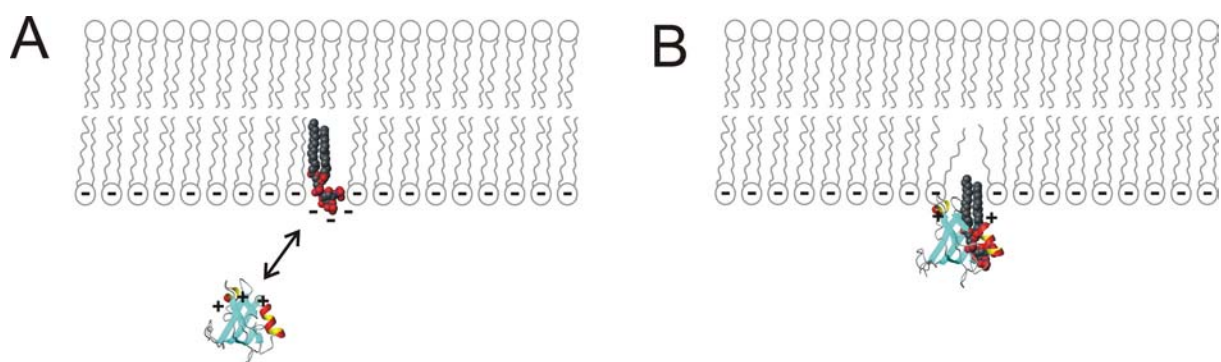


Abb. 4.24: Skizze des möglichen Zusammenspiels von spezifischer PIP-Bindung durch die PDZ und ladungsvermittelter Membranassoziation. Zunächst wird die PDZ mit ihrem positiv geladenen Oberflächenbereich an negativ geladenen Membranen schwach gebunden, was durch die Wechselwirkung mit PIPs verstärkt wird (A), dann erfolgt die feste Bindung durch hydrophobe Kontakte mit dem Diacylglycerinteil des PIPs (B). Dargestellt ist PI(3,4,5)P₃ mit C₁₆ Fettsäuren. In Membranen treten auch PIPs mit anderen und längeren Fettsäuren auf.

In dem erstellten Komplexmodell der Bindung von PI(3,4,5)P₃ mit C₁₆ Fettsäuren an die PDZ2b kommt das Lipid in gleicher Weise in der Bindetasche des Proteins zum Liegen wie im Modell mit dem kürzeren Lipid. Die Enden der Kohlenwasserstoffketten stehen aus der Proteinoberfläche hervor. An dieser Stelle ist die Proteinoberfläche positiv geladen. So kann die Wechselwirkung mit einer negativ geladenen Membranfläche erleichtert werden. Möglicherweise bindet die PDZ-Domäne die PIP-Kopfgruppe schwach. Wird das Lipid dann weiter aus der Membran herausgezogen kommt es zu der Verstärkung der Bindung durch die hydrophoben Wechselwirkungen. So kann die PDZ2 und mit ihr PTP-Bas an die Membran assoziiert werden. Diese Bindung wird dann durch die positiv geladene Proteinoberfläche an der Membraninteraktionsseite weiter stabilisiert (Abb. 4.24). Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die Bindung an PIP in Micellen deutlich stärker ist als an freies PIP. Für die Bindung von PI(4,5)P₂ wurde NMR-spektroskopisch in Lösung ein K_D von 155 μ M ermittelt. In Bindungsstudien an PI(4,5)P₂-enthaltenden Micellen wurde zuvor ein K_D von 21 μ M bestimmt (Kachel et al., 2003). Das Fehlen der Stabilisierung der Bindung durch die Membrenumgebung könnte zu der höheren Dissoziationskonstante für PIP in Lösung führen. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für die PIP-vermittelte Membranassoziation durch FYVE-Domänen postuliert (Kutateladze, 2006). Durch diese PIP-vermittelte Membranassoziation könnte somit PTP-Bas über seine PDZ2 in bestimmten PIP-reichen Membranamikrodomänen lokalisiert werden.

4.5 Schlussfolgerungen

Alternatives Spleißen verändert die Bindeeigenschaften von PTP-Bas. Eine Insertion von nur fünf Aminosäuren in der β 2/ β 3-Schleife der PDZ2-Domäne des Proteins verhindert die Wechselwirkung der Domäne mit ihren Zielproteinen. Durch Vergleich der Strukturen der beiden Spleißvarianten wird in dieser Arbeit gezeigt, wie die Insertion an der für die Bindung wichtigen Stelle kleine aber entscheidende Änderungen hervorruft. Der sterische Anspruch der zusätzlichen Aminosäuren verhindert in der Spleißvariante PDZ2b die Proteininteraktion. So kann durch gewebe- und zellspezifisches alternatives Spleißen PTP-Bas an verschiedene Aufgaben angepasst werden. Die zweite Funktion der PDZ2, nämlich die Interaktion mit Phosphatidylinositolphosphaten wird durch das alternative Spleißen nicht wesentlich beeinflusst. Bisher konnte kein gemeinsames PIP-Bindemotiv von PDZ-Domänen gefunden werden. Hier wird zum ersten Mal in atomarem Detail gezeigt, wie PDZ-Domänen PIPs

binden. Interessanterweise überlappen die Bindestellen für Proteine und PIPs in weiten Teilen. Der PIP-Gehalt der Zelle bzw. der Zellmembran und ihrer Teilbereiche könnte so durch einen kompetitiven Mechanismus die Proteinbindefähigkeit von PTP-Bas regulieren. Eine weitere Funktion der PIP-Bindung könnte darin liegen, dass PTP-Bas in bestimmte Membranmikrodomänen der Zelle geleitet wird, die besonders reich an Phosphatidylinositolphosphaten sind. Dort trifft dann PTP-Bas auf bestimmte Interaktionspartner, die ebenfalls in diesen Membranbereichen angereichert werden, um so seine Funktionen als Organisations- und Gerüstprotein auszuüben.

5 Interaktion von HPr und HPr-Kinase/Phosphatase

5.1 Einleitung

Ein zentrales Protein im bakteriellen Kohlenhydrathaushalt ist das Histidinenthaltende Phosphotransportprotein HPr (*histidine-containing phosphocarrier protein*). Es spielt eine wesentliche Rolle in der Aufnahme von Kohlenhydraten in die Zelle durch das Phosphoenolpyruvatabhängige Phosphotransportsystem (PTS) und in der Regulation des Kohlenhydrathaushaltes, indem es die Expression entsprechender Gene hemmt (Viana et al., 2000). Beide Funktionen von HPr werden durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen gesteuert. Im Kohlenhydrattransportsystem PTS fungiert HPr als Teil eines Phosphatshuttles, das eine Phosphatgruppe vom Phosphoenolpyruvat über mehrere Proteine auf den jeweiligen Zucker überträgt, der daraufhin in die bakterielle Zelle transportiert wird. Hierbei wird HPr am Histidin 15 vom Enzym I phosphoryliert und überträgt dann diese Phosphatgruppe auf Enzym IIA. Der Enzym II Komplex wiederum phosphoryliert den Zucker, der dann aufgenommen wird. In den meisten Gram-positiven und einigen Gram-negativen Bakterien hat HPr eine zweite regulatorische Phosphorylierungsstelle am Serin 46. Der Phosphorylierungszustand von Ser46 wird ATP-abhängig von der bifunktionalen HPr-Kinase/Phosphatase HPrK/P moduliert (Deutscher & Saier, Jr., 1983; Kravanja et al., 1999; Russell et al., 2002). Ist HPr an Ser46 phosphoryliert, wird seine Funktion als Phosphatshuttle im PTS blockiert, indem die Interaktion mit Enzym I gestört wird (Reizer et al., 1998). Weiterhin fungiert das an Ser46 phosphorylierte HPr zusammen mit dem CcpA-Protein als Repressor für gluconeogene Systeme (Jones et al., 1997; Stulke & Hillen, 1999). Da die HPr-Kinase durch Fructose 1,6-Bisphosphat aktiviert wird, wird so über HPr bei ausreichender Zuckerversorgung der Zelle sowohl die Zuckeraufnahme als auch die Zuckersynthese gehemmt. Sinkt der Energiegehalt der Zelle, wobei freies Phosphat als Signal dient, wird die Phosphatasefunktion der HPrK/P aktiviert. So wird durch Dephosphorylierung

von HPr das PTS wieder in Gang gesetzt. Das am Ser46 phosphorylierte HPr scheint auch noch in weiteren regulatorischen Systemen eine Rolle zu spielen (Viana et al., 2000; Dossonnet et al., 2000).

Eine Reihe von HPr Proteinen aus verschiedenen Mikroorganismen wurden bereits NMR-spektroskopisch und röntgenkristallographisch charakterisiert. Sie haben eine konservierte Struktur aus einem viersträngigen β -Faltblatt und drei α -Helices (siehe z.B. Herzberg et al., 1992; Kalbitzer & Hengstenberg, 1993; Maurer et al., 2001; Maurer et al., 2004 und Abb. 5.1). Auch von der HPrK/P gibt es Kristallstrukturen, sowohl frei als auch im Komplex mit HPr (Fieulaine et al., 2001; Marquez et al., 2002; Fieulaine et al., 2002). Mit Hilfe dieser Daten lassen sich Rückschlüsse auf die Interaktion der beiden Proteine ziehen und Einblicke in den katalytischen Mechanismus gewinnen. Studien dazu wurden unter anderem von Lavergne et al. durchgeführt (Lavergne et al., 2002).

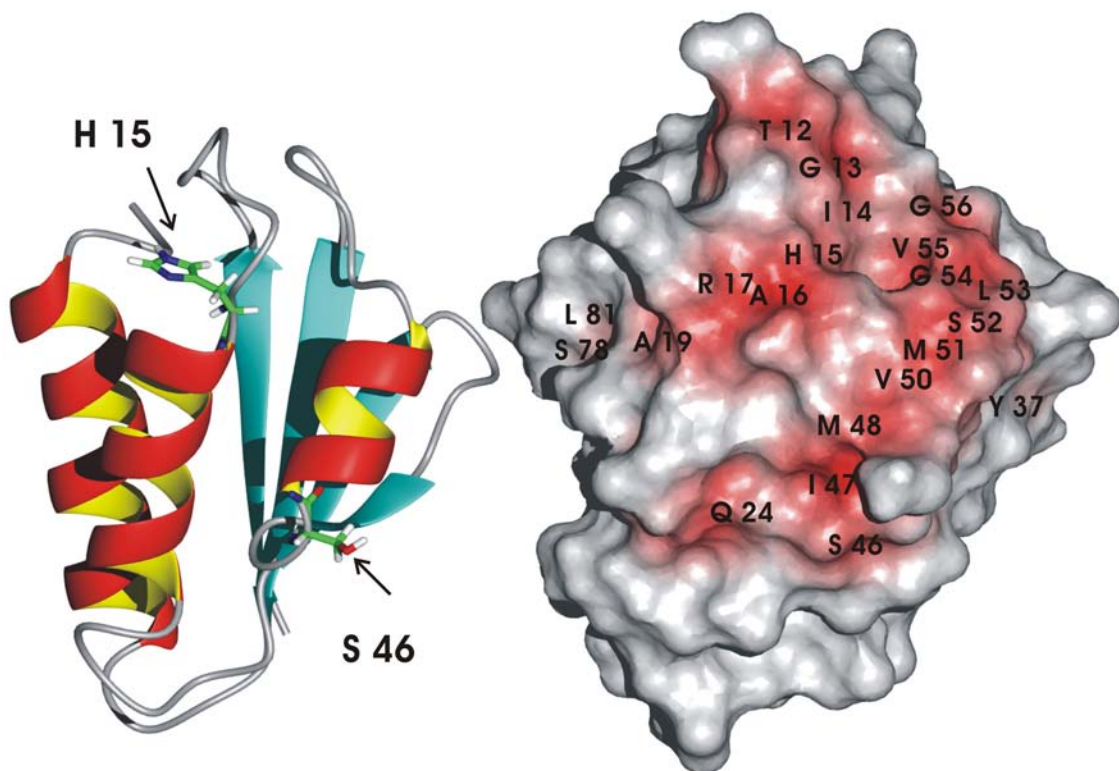


Abb. 5.1: NMR-Struktur von HPr aus *S. aureus* mit den beiden Phosphorylierungsstellen His15 und Ser46 (links). Rechts: Oberflächendarstellung von HPr in derselben Orientierung wie links. Die potentielle Interaktionsfläche mit der HPrK/P aus *S. xylosus*, ermittelt aus NMR-Titrationsstudien, ist rot eingefärbt (nach Maurer et al. (Maurer et al., 2004)).

Die Interaktion von HPr aus *Staphylococcus aureus* mit der HPrK/P aus *Staphylococcus xylosus* wurde mit NMR-spektroskopischen Methoden untersucht (Maurer et al., 2004). Hierzu wurde HPr mit HPrK/P titriert und die Bindung durch 1D- ^1H -, 2D- ^1H - ^{15}N -TROSY- und 2D-HNCO-TROSY-Spektren verfolgt. Die Spektren wiesen die Charakteristik von langsamem Austausch (siehe Kapitel 2.2) auf, d.h. Signale des freien HPr zeigten eine Intensitäts-/Volumenabnahme mit steigender HPrK/P-Konzentration aber keine Änderung der chemischen Verschiebung. Signale des an die HPrK/P gebundenen HPr konnten nicht detektiert werden. Dies liegt vermutlich in der Größe des Komplexes und der damit verbundenen raschen Relaxation begründet. In der Tat konnte in der Kristallstruktur von HPrK/P aus *L. casei* im Komplex mit HPr aus *B. subtilis* ein recht großes Aggregat aus sechs Molekülen HPr gebunden an die hexamere Kinase beobachtet werden (Fieulaine et al., 2002). Bei den NMR-Titrationsexperimenten zeigte sich, dass die Signale des freien HPr unterschiedlich stark auf die Zugabe von HPrK/P reagieren. Durch Vergleich der verschiedenen Experimente konnte aus den Signalen mit den stärksten Änderungen die potentielle Interaktionsfläche der beiden Moleküle ermittelt werden. Die Bindungsfläche von HPr umfasst, wie zu erwarten war, den Bereich der Phosphorylierungsstelle durch die Kinase, nämlich Ser46, aber auch Aminosäuren in der Nähe der anderen Phosphorylierungsstelle, His15 (Abb. 5.1).

Zur Vollständigen Charakterisierung der Bindung von HPr aus *S. aureus* an die HPrK/P aus *S. xylosus* wurde in der vorliegenden Arbeit durch zusätzliche Titrationsexperimente die Bindungsaffinität quantifiziert. Weiterhin wurde die Stöchiometrie des Komplexes ermittelt. Dies diente vor allem der Überprüfung, ob der in der Kristallstruktur (Fieulaine et al., 2002) gefundene Komplex aus sechs Monomeren HPr und sechs Monomeren HPrK/P auch unter Lösungsbedingungen existiert. Neben der grundsätzlichen Möglichkeit von Kristallisierungsartefakten ist zu beachten, dass für die Kristallstruktur HPr aus *B. subtilis* und HPrK/P aus *L. casei* verwendet wurde. Allerdings hat HPr von *B. subtilis* zu dem von *L. casei* nur 64 % Sequenzidentität. Das für die vorliegenden NMR-Studien verwendete System ist deutlich näher verwandt. Die HPr von *S. xylosus* und *S. aureus* haben 94 % Identität.

5.2 Materialien und Methoden

HPr aus *S. aureus* und HPrK/P aus *S. xylosus* wurden wie von Maurer et al. beschrieben exprimiert und gereinigt (Maurer et al., 2004). Die gefriergetrockneten Proteinproben wurden von Wolfgang Hengstenberg (Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt. HPrK/P wurde in D₂O mit 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 gelöst. Zur Referenzierung der chemischen Verschiebungen enthielt die Probe 0,1 mM DSS als internen Standard. Zu einer Startkonzentration von 0,2 mM HPrK/P wurde eine 4 mM HPr-Lösung im selben Puffer titriert. Es wurden 1D-¹H-Spektren bei 303 K bei molaren HPr zu HPrK/P Verhältnissen von 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 3,5 und 4 aufgenommen. Zur besseren Vergleichbarkeit und um experimentelle Instabilitäten auszugleichen, wurden die Intensitäten der Spektren auf die Intensität des Tris-Signals normiert. Die Intensität eines allein stehenden Methylsignals von HPr, nämlich Leu81 bei -0,18 ppm, wurde genutzt, um die Konzentration an freiem HPr zu bestimmen. Die absolute Signalintensität wurde zuvor im Spektrum ohne HPr anhand der Intensität von gut aufgelösten Methylsignalen und der bekannten Konzentration der HPrK/P kalibriert. So konnte die Signalintensität in Proteinkonzentration umgerechnet werden. Alle Spektren wurden auf einem Bruker DRX-600 Spektrometer aufgenommen. Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit XWINNMR (Bruker Biospin).

Aus den in diesem Titrationsexperiment ermittelten Konzentrationen von freiem HPr (c_A) und den bekannten Gesamtkonzentrationen von HPr (c_A^T) und HPrK/P (c_B^T) bei jedem Titrationsschritt wurde die Dissoziationskonstante K_D und die Zahl der Bindungsplätze N für HPr an der HPrK/P in Erweiterung von Gleichung 2.7 (siehe Kapitel 2.2) durch Gleichung 5.1 ermittelt. Dabei wurde angenommen, dass die HPrK/P N unabhängige identische Bindungsplätze für HPr hat. Das legen die Daten aus der Kristallstruktur des Komplexes nahe (Fieulaine et al., 2002).

$$P_A = \frac{c_A}{c_A^T} = 1 - \frac{1}{2c_A^T} (c_A^T + Nc_B^T + K_D - \sqrt{(c_A^T + Nc_B^T + K_D)^2 - 4Nc_A^T c_B^T}) \quad (5.1)$$

Die Signalvolumina aus den von Till Maurer aufgenommenen TROSY-Spektren (Maurer et al., 2004) lassen sich wie in Kapitel 2.2 beschrieben durch Gl. 2.13-15 berechnen. Hierfür wurde zu einer 0,5 mM HPr-Lösung gefriergetrocknete HPrK/P zu jeweils den molaren

Verhältnissen HPrK/P zu HPr 0, 0,5, 1 und 2 zugegeben und jeweils ein 2D- ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum aufgenommen.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Zur Quantifizierung der Bindung von HPr aus *S. aureus* an HPrK/P aus *S. xylosus* wurden homonukleare 1D-Spektren herangezogen, da ihre Interpretation einfacher ist als die von heteronuklearen 2D-Spektren, bei denen mehr Variablen zu beachten sind (siehe Kapitel 2.2). Abb. 5.2 zeigt als Beispiel Methylgruppen von Methioninen. Es wurde keine Änderungen der chemischen Verschiebungen beobachtet. Allerdings nimmt die Signalfäche bei steigender HPrK/P-Konzentration deutlich ab oder die Linien verbreitern sehr stark. Der erste Fall ist typisch für langsamen chemischen Austausch von Gruppen, die bei der Bindung mit der Kinase interagieren. Die zweite Gruppe sind Reste, die nicht direkt an der Bindung beteiligt sind. Für die Quantifizierung der Bindung sind nur Reste der ersten Gruppe von Nutzen, da sie die Berechnung der Konzentration von freiem HPr in Gegenwart der Kinase erlauben. So konnte mit Gl. 5.1 anhand des Methylsignals von Leu81 die Dissoziationskonstante K_D des Komplexes sowie die Zahl der Bindungsplätze N für HPr pro HPrK/P-Monomer berechnet werden (Abb. 5.3). Für die Bindungsplätze wurde eine unabhängige Bindung der HPr-Moleküle an die Kinase angenommen. Bei 303 K ergibt sich für den K_D ein Wert von $0,10 \pm 0,02$ mM und für N $1,02 \pm 0,05$. Dies ist in Einklang mit der in der Kristallstruktur (Fieulaine et al., 2002) beobachteten Stöchiometrie von sechs Molekülen HPr pro hexamerer HPrK/P.

Um die in Abb. 5.1 dargestellte potentielle Bindungsfläche von HPr für die Kinase genauer beschreiben und eingrenzen zu können, wurden die Konzentrationsabhängigkeiten der Signalvolumina aus den ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren von HPr bei steigender HPrK/P-Konzentration genauer analysiert. Mit den oben ermittelten Werten für K_D und N lässt sich die Konzentrationsabhängigkeit der Signalvolumina gemäß Gl. 2.13-15 unter Annahme verschiedener Bindungsmodelle vorhersagen. Für Reste, die direkt an der Bindung beteiligt sind, wird ein großer Unterschied der chemischen Verschiebungen der Signale von freiem und gebundenem Zustand erwartet, $\Delta\omega$ wird also groß. Bei Resten, die nicht an der Bindung beteiligt sind, ist dagegen ein kleineres $\Delta\omega$ zu erwarten. Daher sollten die beobachteten Signalintensitätsverluste für die bindenden Reste am besten durch Gl. 2.13 oder 2.14

beschrieben werden können. Nichtbindende Reste sollten eher das durch Gl. 2.15 vorhergesagte Verhalten zeigen. Im Idealfall lässt sich also durch diese Modellunterscheidung die Interaktionsfläche bestehend aus den bindenden Resten exakt eingrenzen.

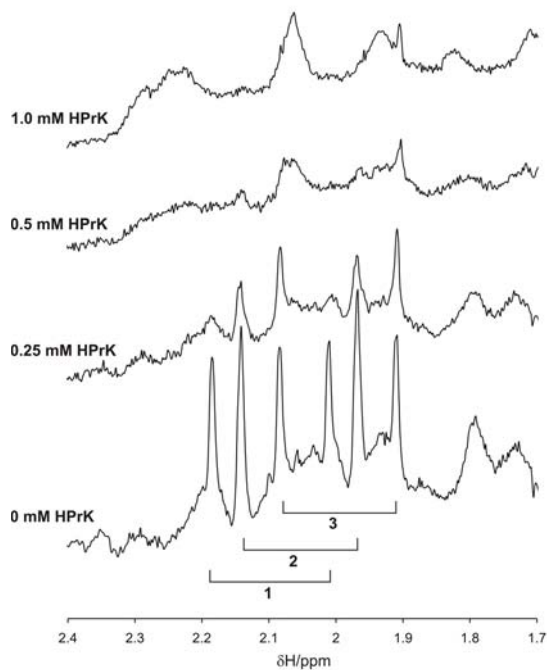


Abb. 5.2: Änderung der 1D-Spektren einer 0,5 mM HPr-Lösung bei steigender HPrK/P-Konzentration. Die Methylsignale von vier Methioninresten sind markiert: **1** Met21, **2** Met1 und Met51, **3** Met48. Man beachte, dass die Probe mit ^{13}C angereichert ist, was zu einer Dupletttaufspaltung der Methylsignale führt.

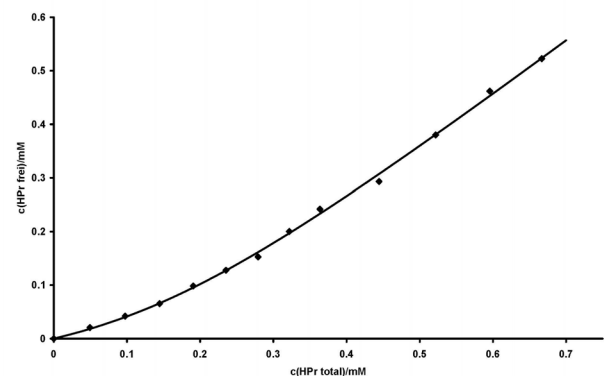


Abb. 5.3: Titration einer 0,2 mM HPrK/P-Lösung mit HPr. Es ist die Konzentration an freiem HPr, ermittelt aus der 1D- ^1H -Signalintensität der H^δ von Leu81, gegen die Gesamtkonzentration an HPr aufgetragen. Die schwarze Kurve zeigt die Anpassung von Gl. 5.1 an die Messdaten. Es ergibt sich $K_D = 0,10 \pm 0,02$ mM und $N = 1,02 \pm 0,05$.

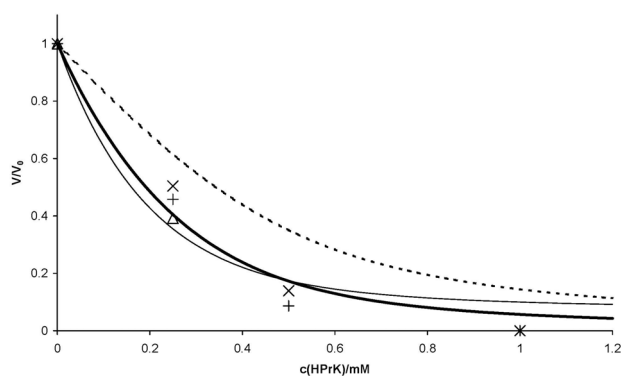


Abb. 5.4: Anpassung der Signalvolumenänderungen in Abhängigkeit der HPrK/P-Konzentration ausgewählter Reste von HPr aus den ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren mit verschiedenen Modellen. Die Anpassung erfolgte mit $N = 1,02$, $K_D = 0,10$ mM und $a = 28,3$ gemäß Gl. 2.13 (gestrichelte Linie), Gl. 2.14 (fette Linie) und 2.15 (dünne Linie). Die Messwerte von Leu53 (+), Gly54 (X) und Val55 (Δ) sind exemplarisch dargestellt. Das Signal von Val55 ist bei höheren HPrK/P-Konzentrationen nicht detektierbar.

Die Signalvolumina aus den TROSY-Spektren wurden mit den oben ermittelten Werten für K_D und N gemäß Gl. 2.13-15 berechnet. Der Faktor a , der das Verhältnis der transversalen Relaxationszeiten von freiem und gebundenen HPr definiert, wurde auf 28,3 gesetzt. Dieser Wert ergibt sich aus dem Verhältnis der Molekülmassen von freiem HPr und dem Komplex aus sechs HPr-Molekülen gebunden an der hexameren HPrK/P. Dies ist natürlich nur eine grobe Abschätzung. Simulationen haben allerdings ergeben, dass der Einfluss abweichender Werte für a über einen weiten Bereich vernachlässigbar ist. Beispielhaft für drei Reste ist das Ergebnis in Abb. 5.4 dargestellt. Es zeigte sich, dass Gl. 2.13 in keinem der Fälle das System ausreichend gut beschreiben kann. Diese Beobachtung passt zu der relativ schwachen Bindung der beiden Proteine, was zu einer hohen Abdissoziationsrate und damit zu kleiner τ_{ex} führt. Die Abweichungen der Vorhersagen aus Gl. 2.14 und 2.15 von den Messwerten sind ungefähr gleich groß. So ist es mit den vorhandenen Daten nicht möglich eine Entscheidung für eines der beiden Modelle zu treffen.

6 Literaturverzeichnis

Andersen, J.N., Mortensen, O.H., Peters, G.H., Drake, P.G., Iversen, L.F., Olsen, O.H., Jansen, P.G., Andersen, H.S., Tonks, N.K. & Moller, N.P. (2001). Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol*, **21**, 7117-7136.

Akasaka, K. (2003). Highly fluctuating protein structures revealed by variable-pressure nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, **42**, 10875-10885.

Akasaka, K. & Li, H. (2001). Low-lying excited states of proteins revealed from nonlinear pressure shifts in ^1H and ^{15}N NMR. *Biochemistry*, **40**, 8665-8671.

Arnold, M.R., Kalbitzer, H.R. & Kremer, W. (2003). High-sensitivity sapphire cells for high pressure NMR spectroscopy on proteins. *J Magn Reson*, **161**, 127-131.

Arnold, M.R., Kremer, W., Lüdemann, H.D. & Kalbitzer, H.R. (2002). ^1H -NMR parameters of common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides Gly-Gly-X-Ala at pressures between 0.1 and 200 MPa. *Biophys Chem*, **96**, 129-140.

Atkinson, R.A. & Kieffer, B. (2004). The role of protein motions in molecular recognition: Insights from heteronuclear NMR relaxation measurements. *Progr Nucl Magn Reson Spect*, **44**, 141-187.

Bain, A.D. (2003). Chemical exchange in NMR. *Progr Nucl Magn Reson Spect*, **43**, 63-103.

Balla, T. (2005). Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci*, **118**, 2093-2104.

Ballard, L., Yu, A., Reiner, C. & Jonas, J. (1998). A High-Pressure, High-Resolution NMR Probe for Experiments at 500 MHz. *J Magn Reson*, **133**, 190-193.

Baskakov, I.V., Legname, G., Baldwin, M.A., Prusiner, S.B. & Cohen, F.E. (2002). Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem*, **277**, 21140-21148.

Bodenhausen, G. & Ruben, D.J. (1980). Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem Phys Lett*, **69**, 185-189.

Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54 (Pt 5)**, 905-921.

- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339-1347.
- Calzolari, L. & Zahn, R. (2003). Influence of pH on NMR Structure and Stability of the Human Prion Protein Globular Domain. *J Biol Chem*, **278**, 35592-35596.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C. & Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, **121**, 195-206.
- Cerdan, S., Hansen, C.A. & Johanson, R. (1986). Nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of myo-inositol phosphates including inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate. *J Biol Chem*, **261**, 14676-14680.
- Chen, S.G. & Gambetti, P. (2002). A journey through the species barrier. *Neuron*, **34**, 854-856.
- Chien, P., Weissman, J.S. & DePace, A.H. (2004). Emerging Principles of Coformation-Based Prion Inheritance. *Annu Rev Biochem*, **73**, 617-656.
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 519-550.
- Collins, M.D., Hummer, G., Quillin, M.L., Matthews, B.W. & Gruner, S.M. (2005). Cooperative water filling of a nonpolar protein cavity observed by high-pressure crystallography and simulation. *PNAS*, **103**, 16668-16671.
- Cordeiro, Y., Kraineva, J., Ravindra, R., Lima, L.M., Gomes, M.P.B., Foguel, D., Winter, R. & Silva, J.L. (2004). Hydration and Packing Effects on Prion Folding and {beta}-Sheet Conversion: High Pressure Spectroscopy and Pressure Perturbation Calometry Studies. *J Biol Chem*, **279**, 32354-32359.
- Cordeiro, Y., Kraineva, J., Winter, R. & Silva, J.L. (2005). Volume and energy folding landscape of prion protein revealed by pressure. *Braz J Med Biol Res*, **38**, 1195-1201.
- Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR*, **13**, 289-302.
- Deutscher, J. & Saier, M.H., Jr. (1983). ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *PNAS*, **80**, 6790-6794.
- Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A.M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *JACS*, **125**, 1731-1737.
- Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E. & Dyson, H.J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *PNAS*, **94**, 13452-13457.
- Dossonnet, V., Monedero, V., Zagorec, M., Galinier, A., Perez-Martinez, G., & Deutscher, J. (2000). Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr Kinase/P-ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *J Bacteriol*, **182**, 2582-2590.

- Erdmann, K.S., Kuhlmann, J., Lessmann, V., Herrmann, L., Eulenburg, V., Muller, O. & Heumann, R. (2000). The Adenomatous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain. *Oncogene*, **19**, 3894-3901.
- Erdmann, K.S. (2003). The protein tyrosine phosphatase PTP-Basophil/Basophil-like. *Eur J Biochem*, **270**, 4789-4798.
- Fanning, A.S. & Anderson, J.M. (1999). PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest*, **103**, 767-772.
- Ferentz, A.E. & Wagner, G. (2000). NMR spectroscopy: a multifaceted approach to macromolecular structure. *Q Rev Biophys*, **33**, 29-65.
- Fieulaine, S., Morera, S., Poncet, S., Mijakovic, I., Galinier, A., Janin, J., Deutscher, J. & Nessler, S. (2002). X-ray structure of a bifunctional protein kinase in complex with its protein substrate HPr. *PNAS*, **99**, 13437-13441.
- Fieulaine, S., Morera, S., Poncet, S., Monedero, V., Gueguen-Chaignon, V., Galinier, A., Janin, J., Deutscher, J. & Nessler, S. (2001). X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide-binding domain. *EMBO J*, **20**, 3917-3927.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J*, **15**, 1255-1264.
- Foguel, D. & Silva, J.L. (2004). New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. *Biochemistry*, **43**, 11361-11370.
- Foguel, D., Suarez, M.C., Ferrao-Gonzales, A.D., Porto, T.C.R., Palmieri, L., Einsiedler, C.M., Andrade, L.R., Lashuel, H.A., Lansbury, P.T., Kelly, J.W. & Silva, J.L. (2003). Dissociation of amyloid fibrils of {alpha}-synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and the formation of water-excluded cavities. *PNAS*, **100**, 9831-9836.
- Fradera, X. & Mestres, J. (2004). Guided docking approaches to structure-based design and screening. *Curr Top Med Chem*, **4**, 687-700.
- Geyer, J.P., Doker, R., Kremer, W., Zhao, X., Kuhlmann, J. & Kalbitzer, H.R. (2005). Solution structure of the Ran-binding domain 2 of RanBP2 and its interaction with the C terminus of Ran. *J Mol Biol*, **348**, 711-725.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B. & Cohen, F.E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed {beta}-helices into trimers. *PNAS*, 0402254101.
- Gronwald, W. & Kalbitzer, H.R. (2004). Automated structure determination of proteins by NMR spectroscopy. *Progr Nucl Magn Reson Spect*, **44**, 33-96.
- Gronwald, W., Kirchhöfer, R., Görler, A., Kremer, W., Ganslmeier, B., Neidig, K.P. & Kalbitzer, H.R. (2000). RFAC, a program for automated NMR R-factor estimation. *J Biomol NMR*, **17**, 137-151.

Gronwald, W., Moussa, S., Elsner, R., Jung, A., Ganslmeier, B., Trenner, J., Kremer, W., Neidig, K.P. & Kalbitzer, H.R. (2002). Automated assignment of NOESY NMR spectra using a knowledge based method (KNOWNOE). *J Biomol NMR*, **23**, 271-287.

Güntert, P. (2003). Automated NMR protein structure calculation. *Progr Nucl Magn Reson Spect*, **43**, 105-125.

Harris, B.Z. & Lim, W.A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci*, **114**, 3219-3231.

Hausser, K.H. & Kalbitzer, H.R. (1989). *NMR in Medicine and Biology*. Springer Verlag.

Herrmann, L., Erdmann, K.S. & Dittmar, T. (2003). The protein tyrosine phosphatase PTP-BL associates with the midbody and is involved in the regulation of cytokinesis. *Mol Biol Cell*, **14**, 230-240.

Herzberg, O., Reddy, P., Sutrina, S., Saier, M.H., Jr., Reizer, J. & Kapadia, G. (1992). Structure of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Bacillus subtilis* at 2.0-Å resolution. *PNAS*, **89**, 2499-2503.

Hillier, B.J., Prehoda, K.E., Lim, W.A., Christopherson, K.S. & Bretz, D.S. (1999). Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science*, **284**, 812-815.

Horiuchi, M. & Caughey, B. (1999). Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Struct Fold Des*, **7**, R231-R240.

Hummer, G., Garde, S., Garcia, A.E., Paulaitis, M.E. & Pratt, L.R. (1998). The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *PNAS*, **95**, 1552-1555.

James, T.L., Liu, H., Ulyanov, N.B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D.G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S.B. & Cohen, F.E. (1997). Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *PNAS*, **94**, 10086-10091.

Jeener, J., Meier, B.H., Bachmann, P. & Ernst, R.R. (1979). Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J Chem Phys*, **71**, 4546-4553.

Jonas, J., Ballard, L. & Nash, D. (1998). High-Resolution, High-Pressure NMR Studies of Proteins. *Biophys J*, **75**, 445-452.

Jones, B.E., Dossonnet, V., Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J. & Kleit, R.E. (1997). Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem*, **272**, 26530-26535.

Jones, E.M. & Surewicz, W.K. (2005). Fibril Conformation as the Basis of Species- and Strain-Dependent Seeding Specificity of Mammalian Prion Amyloids. *Cell*, **121**, 63-72.

Kachel, N. (2002) NMR-spektroskopische Charakterisierung der PDZ2b-Domäne von PTP-Bas und des menschlichen Prionproteins. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.

- Kachel, N., Erdmann, K.S., Kremer, W., Wolff, P., Gronwald, W., Heumann, R. & Kalbitzer, H.R. (2003). Structure Determination and Ligand Interactions of the PDZ2b Domain of PTP-Bas (hPTP1E): Splicing-induced Modulation of Ligand Specificity. *J Mol Biol*, **334**, 143-155.
- Kalbitzer, H.R. & Hengstenberg, W. (1993). The solution structure of the histidine-containing protein (HPr) from *Staphylococcus aureus* as determined by two-dimensional ¹H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem*, **216**, 205-214.
- Kamatari, Y.O., Kitahara, R., Yamada, H., Yokoyama, S. & Akasaka, K. (2004). High-pressure NMR spectroscopy for characterizing folding intermediates and denatured states of proteins. *Methods*, **34**, 133-143.
- Kang, B.S., Cooper, D.R., Devedjiev, Y., Derewenda, U. & Derewenda, Z.S. (2003). Molecular roots of degenerate specificity in syntenin's PDZ2 domain: Reassessment of the PDZ recognition paradigm. *Structure*, **11**, 845-853.
- King, C.Y. & Diaz-Avalos, R. (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature*, **428**, 319-323.
- Knaus, K.J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W.K. & Yee, V.C. (2001). Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol*, **8**, 770-774.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph*, **14**, 51-32.
- Kozlov, G., Banville, D., Gehring, K. & Ekiel, I. (2002). Solution Structure of the PDZ2 Domain from Cytosolic Human Phosphatase hPTP1E Complexed with a Peptide Reveals Contribution of the [beta]2-[beta]3 Loop to PDZ Domain-Ligand Interactions. *J Mol Biol*, **320**, 813-820.
- Kozlov, G., Gehring, K. & Ekiel, I. (2000). Solution structure of the PDZ2 domain from human phosphatase hPTP1E and its interactions with C-terminal peptides from the Fas receptor. *Biochemistry*, **39**, 2572-2580.
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Bluggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N. & Hengstenberg, W. (1999). The hprK gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol*, **31**, 59-66.
- Kremer, W., Arnold, M.R., Kachel, N. & Kalbitzer, H.R. (2004). The use of high-sensitivity sapphire cells in high pressure NMR spectroscopy and its application to proteins. *Spectroscopy*, **18**, 271-278.
- Kremer, W. (2006). High-Pressure NMR Studies on Proteins. In Webb, G.A. (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Academic Press, pp. 177-203.
- Kutateladze, T.G. (2006). Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, im Druck.
- Kuwata, K., Kamatari, Y.O., Akasaka, K. & James, T.L. (2004). Slow conformational dynamics in the hamster prion protein. *Biochemistry*, **43**, 4439-4446.

- Kuwata, K., Li, H., Yamada, H., Legname, G., Prusiner, S.B., Akasaka, K. & James, T.L. (2002). Locally disordered conformer of the hamster prion protein: a crucial intermediate to PrPSc? *Biochemistry*, **41**, 12277-12283.
- Laskowski, R.A., Rullmannn, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R. & Thornton, J.M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*, **8**, 477-486.
- Lavergne, J.P., Jault, J.M., & Galinier, A. (2002). Insights into the functioning of *Bacillus subtilis* HPr kinase/phosphatase: affinity for its protein substrates and role of cations and phosphate. *Biochemistry*, **41**, 6218-6225.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. & Prusiner, S.B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science*, **305**, 673-676.
- Li, Y.C. & Montelione, G.T. (1994). Overcoming solvent saturation-transfer artifacts in protein NMR at neutral pH. Application of pulsed field gradients in measurements of ¹H-¹⁵N Overhauser effects. *J Magn Reson B*, **105**, 45-51.
- Lopez, G.F., Zahn, R., Riek, R. & Wuthrich, K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *PNAS*, **97**, 8334-8339.
- Marquez, J.A., Hasenbein, S., Koch, B., Fieulaine, S., Nessler, S., Russell, R.B., Hengstenberg, W., & Scheffzek, K. (2002). Structure of the full-length HPr kinase/phosphatase from *Staphylococcus xylosus* at 1.95 Å resolution: Mimicking the product/substrate of the phospho transfer reactions. *PNAS*, **99**, 3458.
- Martins, S.M., Chapeaurouge, A. & Ferreira, S.T. (2003). Folding Intermediates of the Prion Protein Stabilized by Hydrostatic Pressure and Low Temperature. *J Biol Chem*, **278**, 50449-50455.
- Maurer, T., Doker, R., Gorler, A., Hengstenberg, W. & Kalbitzer, H.R. (2001). Three-dimensional structure of the histidine-containing phosphocarrier protein (HPr) from *Enterococcus faecalis* in solution. *Eur J Biochem*, **268**, 635-644.
- Maurer, T., Meier, S., Kachel, N., Munte, C.E., Hasenbein, S., Koch, B., Hengstenberg, W. & Kalbitzer, H.R. (2004). High-Resolution Structure of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein (HPr) from *Staphylococcus aureus* and Characterization of Its Interaction with the Bifunctional HPr Kinase/Phosphorylase. *J Bacteriol*, **186**, 5906-5918.
- Mayer, M. & Meyer, B. (1999). Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed*, **38**, 1784-1788.
- Mayer, M. & Meyer, B. (2001). Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *JACS*, **123**, 6108-6117.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A. & Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **31**, 151-175.

Meyer, B. & Peters, T. (2003). NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed*, **42**, 864-890.

Mortier, E., Wuytens, G., Leenaerts, I., Hannes, F., Heung, M.Y., Degeest, G., David, G. & Zimmermann, P. (2005). Nuclear speckles and nucleoli targeting by PIP2-PDZ domain interactions. *EMBO J*, **24**, 2556-2565.

Neumann, J.M., Zachowski, A., Tran-Dinh, S. & Devaux, P.F. (1985). High resolution proton magnetic resonance of sonicated phospholipids. *Eur Biophys J*, **11**, 219-223.

Nilges, M. (1995). Calculation of Protein Structures with Ambiguous Distance Restraints. Automated Assignment of Ambiguous NOE Crosspeaks and Disulphide Connectivities. *J Mol Biol*, **245**, 645-660.

Nilges, M. (2001). Applications of Molecular Modelling in NMR Structure Determination. In Becker, O.M. (Ed.), *Computational biochemistry and biophysics*, Marcel Dekker, pp. 253-274.

Peng, J.W., Moore, J. & Abdul-Manan, N. (2004). NMR experiments for lead generation in drug discovery. *Progr Nucl Magn Reson Spect*, **44**, 225-256.

Penzkofer, S. R. (2005) Charakterisierung der PDZ2-PIP-Interaktion mit NMR-spektroskopischen Bindungsstudien. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.

Peretz, D., Williamson, R.A., Legname, G., Matsunaga, Y., Vergara, J., Burton, D.R., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. & Scott, M.R. (2002). A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron*, **34**, 921-932.

Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. & Wuthrich, K. (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *PNAS*, **94**, 12366-12371.

Price, W.E. & Lüdemann, H.D. (1997). NMR and diaphragm cell techniques for the study of molecular dynamics in fluids. In W.B.Holzappel and N.S.Isaacs (Eds.), *High Pressure Techniques in Chemistry and Physics: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, pp. 225.

Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144.

Prusiner, S.B. (1998). Prions. *PNAS*, **95**, 13363-13383.

Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.L., Serban, D., Carlson, G.A. & Weite. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, **63**, 673-686.

Randolph, T.W., Seefeldt, M. & Carpenter, J.F. (2002). High hydrostatic pressure as a tool to study protein aggregation and amyloidosis. *BBA*, **1595**, 224-234.

Reid, D.G. & Gajjar, K. (1987). A proton and carbon 13 nuclear magnetic resonance study of neomycin B and its interactions with phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem*, **262**, 7967-7972.

- Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stulke, J., Karamata, D., Saier, M.H., Jr. & Hillen, W. (1998). A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol*, **27**, 1157-1169.
- Roberts, G.C. (2000). Applications of NMR in drug discovery. *Drug Discov Today*, **5**, 230-240.
- Russell, R.B., Marquez, J.A., Hengstenberg, W., & Scheffzek, K. (2002). Evolutionary relationship between the bacterial HPr kinase and the ubiquitous PEP-carboxykinase: expanding the P-loop nucleotidyl transferase superfamily. *FEBS Lett*, **517**, 1-6.
- Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*, **77**, 967-968.
- Sato, T., Irie, S., Kitada, S. & Reed, J.C. (1995). FAP-1: A protein tyrosine phosphatase that associates with fas. *Science*, **268**, 411-415.
- Schieberr, U., Vogtherr, M., Elshorst, B., Betz, M., Grimme, S., Pescatore, B., Langer, T., Saxena, K. & Schwalbe, H. (2005). How much NMR data is required to determine a protein-ligand complex structure? *Chembiochem*, **6**, 1891-1898.
- Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletsky, O., Glaser, S.J., Sorensen, O.W. & Griesinger, C. (1994). A General Enhancement Scheme in Heteronuclear Multidimensional Nmr Employing Pulsed-Field Gradients. *J Biomol NMR*, **4**, 301-306.
- Schwarzinger, S., Kroon, G.J., Foss, T.R., Chung, J., Wright, P.E. & Dyson, H.J. (2001). Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *JACS*, **123**, 2970-2978.
- Sheng, M. & Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1-29.
- Sierralta, J. & Mendoza, C. (2004). PDZ-containing proteins: alternative splicing as a source of functional diversity. *Brain Res Brain Res Rev*, **47**, 105-115.
- Silva, J.L., Foguel, D. & Royer, C.A. (2001). Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem Sci*, **26**, 612-618.
- Stanley, E. & Batten, R. (1969). Viscosity of Water at high Pressures and Moderate Temperatures. *J Phys Chem*, **73**, 1187-1191.
- Steele, A.D., Emsley, J.G., Ozdinler, P.H., Lindquist, S. & Macklis, J.D. (2006). Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *PNAS*, 0511290103.
- Stulke, J. & Hillen, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 195-201.
- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R. & Weissman, J.S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature*, **428**, 323-328.

- Tanaka, M., Chien, P., Yonekura, K. & Weissman, J.S. (2005). Mechanism of Cross-Species Prion Transmission: An Infectious Conformation Compatible with Two Highly Divergent Yeast Prion Proteins. *Cell*, **121**, 49-62.
- Taylor, R.D., Jewsbury, P.J. & Essex, J.W. (2002). A review of protein-small molecule docking methods. *J Comput Aided Mol Des*, **16**, 151-166.
- Torrent, J., Alvarez-Martinez, M.T., Harricane, M.C., Heitz, F., Liautard, J.P., Balny, C. & Lange, R. (2004). High Pressure Induces Scrapie-like Prion Protein Misfolding and Amyloid Fibril Formation. *Biochemistry*, **43**, 7162-7170.
- Torrent, J., Alvarez-Martinez, M.T., Heitz, F., Liautard, J.P., Balny, C. & Lange, R. (2003). Alternative prion structural changes revealed by high pressure. *Biochemistry*, **42**, 1318-1325.
- Torrent, J., Alvarez-Martinez, M.T., Liautard, J.P. & Lange, R. (2006). Modulation of prion protein structure by pressure and temperature. *BBA - Proteins & Proteomics*, **1764**, 546-551.
- van Aalten, D.M., Bywater, R., Findlay, J.B., Hendlich, M., Hooft, R.W. & Vriend, G. (1996). PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. *J Comput Aided Mol Des*, **10**, 255-262.
- van den Berk, L.C., van Ham, M.A., te Lindert, M.M., Walma, T., Aelen, J., Vuister, G.W. & Hendriks, W.J. (2004). The interaction of PTP-BL PDZ domains with RIL: an enigmatic role for the RIL LIM domain. *Mol Biol Rep*, **31**, 203-215.
- van Dijk, A.D., Boelens, R. & Bonvin, A.M. (2005). Data-driven docking for the study of biomolecular complexes. *FEBS J*, **272**, 293-312.
- van Ham, M. & Hendriks, W. (2003). PDZ domains-glue and guide. *Mol Biol Rep*, **30**, 69-82.
- van Ham, M., Kemperman, L., Wijers, M., Fransen, J. & Hendriks, W. (2005). Subcellular Localization and Differentiation-Induced Redistribution of the Protein Tyrosine Phosphatase PTP-BL in Neuroblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol*, **25**, 1225-1244.
- Vanik, D.L., Surewicz, K.A. & Surewicz, W.K. (2004). Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol Cell*, **14**, 139-145.
- Viana, R., Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Perez-Martinez, G., & Deutscher, J. (2000). Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol Microbiol*, **36**, 570-584.
- Walma, T., Aelen, J., Nabuurs, S.B., Oostendorp, M., van den Berk, L., Hendriks, W. & Vuister, G.W. (2004). A Closed Binding Pocket and Global Destabilization Modify the Binding Properties of an Alternatively Spliced Form of the Second PDZ Domain of PTP-BL. *Structure*, **12**, 11-20.
- Walma, T., Spronk, C.A., Tessari, M., Aelen, J., Schepens, J., Hendriks, W. & Vuister, G.W. (2002). Structure, dynamics and binding characteristics of the second PDZ domain of PTP-BL. *J Mol Biol*, **316**, 1101-1110.

- Wang, C. & Palmer III, A.G. (2003). Solution NMR methods for quantitative identification of chemical exchange in ^{15}N -labeled proteins. *Magn Reson Chem*, **41**, 866-876.
- Wechselberger, C., Wurm, S., Pfarr, W. & Hoglinger, O. (2002). The physiological functions of prion protein. *Exp Cell Res*, **281**, 1-8.
- Weissmann, C., Enari, M., Klohn, P.C., Rossi, D. & Flechsig, E. (2002). Transmission of prions. *PNAS*, **99 Suppl 4**, 16378-16383.
- Wille, H., Michelitsch, M.D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F.E., Agard, D.A. & Prusiner, S.B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *PNAS*, **99**, 3563-3568.
- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L. & Sykes, B.D. (1995). ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR*, **6**, 135-140.
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons Inc.
- Yamada, H. (1974). Pressure-resisting glass cell for high pressure, high resolution NMR measurement. *Rev Sci Instrum*, **45**, 640-642.
- Yan, J., Wen, W., Xu, W., Long, J.F., Adams, M.E., Froehner, S.C. & Zhang, M. (2005). Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin. *EMBO J*, **24**, 3985-3995.
- Zahn, R. (1999). Prion propagation and molecular chaperones. *Q Rev Biophys*, **32**, 309-370.
- Zahn, R. (2003). The Octapeptide Repeats in Mammalian Prion Protein Constitute a pH-dependent Folding and Aggregation Site. *J Mol Biol*, **334**, 477-488.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez, G.F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. & Wuthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *PNAS*, **97**, 145-150.
- Zahn, R., von Schroetter, C. & Wuthrich, K. (1997). Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett*, **417**, 400-404.
- Zhang, C.C., Steele, A.D., Lindquist, S. & Lodish, H.F. (2006). Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *PNAS*, **103**, 2184-2189.
- Zhang, M. & Wang, W. (2003). Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Acc Chem Res*, **36**, 530-538.
- Zimmermann, P., Meerschaert, K., Reekmans, G., Leenaerts, I., Small, J.V., Vandekerckhove, J., David, G. & Gettemans, J. (2002). PIP2-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol Cell*, **9**, 1215-1225.
- Zuiderweg, E.R. (2002). Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **41**, 1-7.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

ADR	ambiguous distance restraint
AIR	ambiguous interaction restraint
APC	Adenomatous Polyposis Coli
<i>boPrP</i>	Rinderprionprotein
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CJD	Creutzfeldt Jakob Disease
CWD	Chronic Wasting Disease
DAG	Diacylglycerin
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonsäure
HPr	Histidine-Containing Phosphocarrier Protein
HPrK/P	HPr-Kinase/Phosphatase
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<i>huPrP</i>	humanes Prionprotein
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
IP(1,4,5)P ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
<i>muPrP</i>	Mausprionprotein
n.b.	nicht bestimmbar
n.d.	nicht bestimmbar
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement/Effect
PI	Phosphatidylinositol
PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat
PI(3,5)P ₂	Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat

PIP	Phosphatidylinositolphosphat
<i>PRNP</i>	Gen des Prionproteins
PrP	Prionprotein
PrP ^C	zelluläres Prionprotein
PrP ^{Sc}	infektiöses Prionprotein
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PTS	Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferasesystem
rmsd	root mean square deviation
<i>shPrP</i>	(Syrian) Hamsterprionprotein
STD	Sättigungstransferdifferenzspektroskopie
TROSY	Transversal Relaxation Optimized Spectroscopy
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
vCJD	variant Creutzfeldt Jakob Disease

7.2 Korrelationsanalyse der chemischen Verschiebungen von Prionproteinen

Zum Vergleich der Druckreihen von *huPrP*(23-230), *huPrP*(121-230) und *shPrP*(90-231) wurden Korrelationsanalysen der Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen und Amidstickstoffatome durchgeführt, die aus ¹H-¹⁵N-TROSY-Spektren ermittelt wurden. Durch Korrelation der H^N-Daten mit den N^H-Daten aus jeweils derselben Druckreihe wurde zudem untersucht, ob die Änderungen der chemischen Verschiebungen beider Kerne vom selben Prozess verursacht werden oder ob die Kerne Sensoren für unabhängige Effekte sind. Die Interpretationen der Korrelationsanalysen im Hinblick auf die Ähnlichkeit der Druckantworten der verschiedenen Prionproteine sind in Kapitel 3 ausgeführt. Im Folgenden wird die Methodik der Analyse genauer betrachtet.

Für einen ersten Vergleich wurden die Korrelationskoeffizienten der Druckkoeffizienten der chemischen Verschiebungen $B_1^*(H)$, $B_2^*(H)$, $B_1(N)$ und $B_2(N)$ aus der Beschreibung der Druckabhängigkeiten durch ein Polynom zweiter Ordnung (Gl. 2.16) bestimmt.

Korrelationskoeffizienten der Druckkoeffizienten der einzelnen Druckreihen

	$r(B_1^*(H))$	$r(B_2^*(H))$	$r(B_1(N))$	$r(B_2(N))$
<i>huPrP</i> (121-230) zu <i>huPrP</i> (23-230) 293 K	0,71	0,37	0,73	0,63
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K zu 313 K	0,83	0,24	0,71	0,37
<i>shPrP</i> (90-231) zu <i>huPrP</i> (121-230) 293 K	0,67	0,18	0,52	0,16
<i>shPrP</i> (90-231) zu <i>huPrP</i> (121-230) 313 K	0,81	0,31	0,53	0,25
<i>shPrP</i> (90-231) zu <i>huPrP</i> (23-230) 293 K	0,55	0,11	0,40	0,17

Korrelationskoeffizienten der Druckkoeffizienten von H^N und N^H einer Druckreihe

	$r(B_1)$	$r(B_2)$
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	0,45	0,49
<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	0,47	0,38
<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	0,36	0,27
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	0,46	0,20

Die Korrelationskoeffizienten, vor allem die der Druckkoeffizienten zweiter Ordnung, sind niedriger als man erwarten würde, wenn man die Rohdaten betrachtet. Vergleicht man direkt die δ -p-Diagramme für die entsprechenden Kerne in den Druckreihen, so stimmen diese meist recht gut überein. Die Korrelationskoeffizienten für die tatsächlichen Änderungen der chemischen Verschiebungen bei einer bestimmten Druckstufe bezogen auf Normaldruck, also die Korrelation von $\delta(p)-\delta(p_0)$ z. B. aller H^N einer Druckreihe zu ihren korrespondierenden Kernen in einer anderen Druckreihe, unterstützen diesen Eindruck. Hierbei erhält man deutlich höhere Korrelationskoeffizienten, so wie man es auch nach Betrachtung der Änderungen der chemischen Verschiebungen erwarten würde. Dass die Druckkoeffizienten aus dem Polynom zweiter Ordnung schlechter korrelieren, liegt vermutlich daran, dass diese Näherung den δ -p-Verlauf nur unzureichend beschreibt.

Korrelationskoeffizienten für die chemischen Verschiebungen konkreter Druckstufen

	$\delta(100 \text{ MPa})-\delta(p_0)$		$\delta(200 \text{ MPa})-\delta(p_0)$	
	$r(H^N)$	$r(N^H)$	$r(H^N)$	$r(N^H)$
<i>huPrP</i> (121-230) zu <i>huPrP</i> (23-230) 293 K	0,82	0,74	0,80	0,76
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K zu 313 K	0,85	0,72	0,81	0,72
<i>shPrP</i> (90-231) zu <i>huPrP</i> (121-230) 293 K	0,81	0,60	0,73	0,55
<i>shPrP</i> (90-231) zu <i>huPrP</i> (121-230) 313 K	0,79	0,59	0,64	0,49
<i>shPrP</i> (90-231) zu <i>huPrP</i> (23-230) 293 K	0,69	0,48	0,65	0,51

Die Betrachtung der chemischen Verschiebung bei einer bestimmten Druckstufe lässt sich wie folgt auf eine gesamte Druckreihe ausdehnen (siehe auch Kapitel 3.2). Die Änderung der chemischen Verschiebung zweier Kerne A und B als Funktion des Drucks $f(p)$ lässt sich

durch die Gleichungen 3.1a und 3.1b beschreiben. Angenommen wird ein druckabhängiger Übergang zwischen zwei Zuständen mit den chemischen Verschiebungen δ^1 und δ^2 .

$$\Delta\delta_A = \delta_A(p) - \delta_A(p_0) = (\delta_A^2 - \delta_A^1)f_A(p) \quad (3.1a)$$

$$\Delta\delta_B = \delta_B(p) - \delta_B(p_0) = (\delta_B^2 - \delta_B^1)f_B(p) \quad (3.1b)$$

Werden die Änderungen der chemischen Verschiebungen beider Kerne durch denselben Prozess verursacht, gilt also $f_A(p) = f_B(p)$, dann folgen sie der linearen Beziehung in Gl. 3.2. Der Korrelationskoeffizient von $\Delta\delta_A$ zu $\Delta\delta_B$ wird dann 1.

$$\Delta\delta_A = \frac{(\delta_A^2 - \delta_A^1)}{(\delta_B^2 - \delta_B^1)} \Delta\delta_B \quad (3.2)$$

Bildet man den Mittelwert der Korrelationskoeffizienten der korrespondierenden Kerne aus zwei Druckreihen, so lassen sich diese Druckreihen miteinander vergleichen. Hierbei ergeben sich recht hohe Korrelationskoeffizienten.

Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten $\Delta\delta_A$ zu $\Delta\delta_B$

Messreihe 1	Messreihe 2	Kern	r
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	H ^N	0,86
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	N ^H	0,93
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	H ^N	0,80
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	N ^H	0,90
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	H ^N	0,82
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	N ^H	0,86
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	H ^N	0,81
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	N ^H	0,87
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	H ^N	0,82
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	N ^H	0,90
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	-	H ^N zu N ^H	0,85
<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	-	H ^N zu N ^H	0,82
<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	-	H ^N zu N ^H	0,86
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	-	H ^N zu N ^H	0,85

Die hierbei erhaltenen sehr hohen Korrelationskoeffizienten deuten darauf hin, dass den durch Druck verursachten Änderungen der chemischen Verschiebungen in allen Messreihen ein gemeinsamer Prozess zugrunde liegt. Allerdings sind sich die Werte so ähnlich, dass sie kaum geeignet scheinen, Detailunterschiede herauszuarbeiten, die zwischen den einzelnen Messreihen auftreten. Dasselbe gilt auch, wenn man die Druckabhängigkeit einzelner Reste einer Messreihe miteinander korreliert. Auch hier ergeben sich sehr hohe Korrelationskoeffizienten, die es nicht erlauben, Bereiche im Protein zu identifizieren, die eine außergewöhnliche Druckantwort aufweisen. Sortiert man Reste aus, die nur eine sehr

geringe druckabhängige Änderung der chemischen Verschiebung oder stark überlagerte Signale aufweisen, so werden die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten sogar noch höher.

Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten $\Delta\delta_A$ zu $\Delta\delta_B$, niedrige $\Delta\delta$ und überlagerte Signale aussortiert

Messreihe 1	Messreihe 2	Kern	r
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	H^N	0,97
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	N^H	0,97
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	H^N	0,95
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	N^H	0,96
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	H^N	0,94
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	N^H	0,97
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	H^N	0,96
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	N^H	0,95
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	H^N	0,95
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	N^H	0,97
<i>huPrP</i> (121-230) 293 K	-	H^N zu N^H	0,95
<i>huPrP</i> (121-230) 313 K	-	H^N zu N^H	0,96
<i>huPrP</i> (23-230) 293 K	-	H^N zu N^H	0,97
<i>shPrP</i> (90-231) 303 K	-	H^N zu N^H	0,93

7.3 Zuordnung der Lipidresonanzen

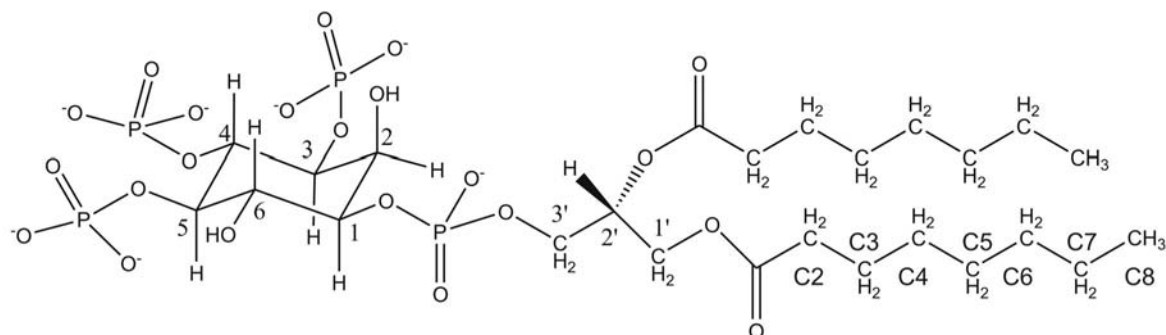


Abb. 7.1: PI(3,4,5)P₃ mit Benennung der Kohlenstoffatome.

$\delta(^1\text{H})$ der verschiedenen Lipide (angegeben in ppm)

	PI(3,4,5)P ₃	PI(4,5)P ₂	PI(3,4)P ₂	PI(3,5)P ₂	PI	I(1,4,5)P ₃	DAG
H1	3,91	3,9-4,04	4,03	3,99	3,96	3,90	-
H2	3,39	4,24	4,37	4,26	4,25	4,29	-
H3	4,01	4,28	4,03	4,07	3,55	3,71	-
H4	3,37	3,70	4,37	3,64	3,65	4,24	-
H5	3,91	3,9-4,04	3,52	3,90	3,33	3,90	-
H6	3,82	3,9-4,04	3,83	3,90	3,75	3,90	-
H1'a	4,44	4,45	4,45	4,45	n.b.	-	3,64, 4,08
H1'b	4,27	4,28	4,26	4,26	n.b.	-	3,64, 4,08
H2'	5,30	5,30	5,31	5,30	n.b.	-	3,64, 4,08
H3'	4,09	4,09	4,09	4,10	n.b.	-	3,64, 4,08
HC2	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	-	2,29
HC3	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	-	1,60
HC4	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	-	1,25
HC5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	-	1,25
HC6	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	-	1,25
HC7	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	-	1,25
HC8	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	-	0,82

7.4 Ergebnisse der Sättigungstransferexperimente

Ergebnisse der STD-Experimente aus Kapitel 4.3.3

Angegeben ist die relative Intensitätsabnahme der Lipidsignale durch Sättigungstransfer von der PDZ2b von PTP-Bas. Gemessen wurde bei einer *on-resonance* Vorsättigung bei 7,05 ppm und einer Sättigungsdauer von 2 s. C₄/C₈ gibt die Länge der jeweiligen Fettsäuren an.

Sättigung der Lipidsignale in % $((I_0 - I_{\text{presat}})/I_0)$

	PI(3,4,5)P ₃ C ₈	PI(4,5)P ₂ C ₈	PI(3,4)P ₂ C ₄	PI C ₈	I(1,4,5)P ₃	DAG C ₈
H1	51,92	47,37	38,27	38,27	40,12	-
H2	48,45	51,22	40,48	40,12	41,86	-
H3	52,38	44,44	38,27	38,27	35,06	-
H4	61,83	51,22	40,48	41,18	40,83	-
H5	51,92	47,37	34,21	27,01	40,12	-
H6	39,39	47,37	35,90	33,77	40,12	-
H1'	53,46	51,80	38,39	n.b.	-	60,00
H2'	57,45	61,54	45,36	n.b.	-	60,00
H3'	50,98	47,37	38,27	n.b.	-	60,00
HC2	35,90	33,33	20,00	43,82	-	53,49
HC3	27,01	25,37	9,09	31,97	-	40,83
HC4	25,93	23,66	11,50	14,53	-	39,39
HC5	25,93	23,66	-	14,53	-	39,39
HC6	25,93	23,66	-	14,53	-	39,39
HC7	25,93	23,66	-	14,53	-	39,39
HC8	24,81	23,08	-	16,67	-	42,86

Relative Sättigung der Lipidsignale bezogen auf das Signal mit stärkster Sättigung in %
 Stärkste Sättigung auf 100 % gesetzt, Angaben der Sättigung der anderen Signale relativ dazu.

	PI(3,4,5)P ₃ C ₈	PI(4,5)P ₂ C ₈	PI(3,4)P ₂ C ₄	PI C ₈	I(1,4,5)P ₃	DAG C ₈
H1	83,97	76,97	84,38	87,34	95,84	-
H2	78,36	83,23	89,24	91,56	100,00	-
H3	84,71	72,22	84,38	87,34	83,77	-
H4	100,00	83,23	89,24	93,97	97,53	-
H5	83,97	76,97	75,43	61,63	95,84	-
H6	63,71	76,97	79,15	77,08	95,84	-
H1'	86,47	84,18	84,65	n.b.	-	100,00
H2'	92,91	100,00	100,00	n.b.	-	100,00
H3'	82,45	76,97	84,38	n.b.	-	100,00
HC2	58,06	54,17	44,10	100,00	-	89,15
HC3	43,68	41,23	20,04	72,96	-	68,05
HC4	41,93	38,45	25,37	33,16	-	65,66
HC5	41,93	38,45	-	33,16	-	65,66
HC6	41,93	38,45	-	33,16	-	65,66
HC7	41,93	38,45	-	33,16	-	65,66
HC8	40,13	37,50	-	38,03	-	71,43

8 Danksagungen

Allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei herzlich gedankt. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die Themenstellung und die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. PD Dr. Werner Kremer möchte ich für Einweisung in die Aufnahme und Auswertung von NMR-Experimenten und die stete Unterstützung während meiner Arbeit am Institut danken.

Prof. Dr. Kurt Wüthrich und Dr. Ralph Zahn von der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich danke ich für die Unterstützung des Prionprojekts sowie die Bereitstellung von humanem Prionprotein.

Für die Kooperation bei der Untersuchung der PDZ-Domäne und die Bereitstellung von PDZ-Proteinproben und cDNA danke ich Prof. Dr. Rolf Heumann und Dr. Kai Erdmann von der Ruhr-Universität Bochum. Stephan Penzkofer gilt für die Herstellung von PDZ-Proben sowie für seine Mithilfe bei den PDZ-PIP-Titrationsexperimenten mein besonderer Dank.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei Prof. Dr. Wolfgang Hengstenberg von der Ruhr-Universität Bochum für HPr- und HPrK/P-Proben.

Bei Peter Geyer und Dr. Michael Spörner bedanke ich mich für das Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit.

Nicht zuletzt schulde ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Instituts, die mir stets mit fachlichen Ratschlägen zur Seite standen, besondere Anerkennung.