

Berechnung der NMR-Struktur der PPAR γ -LBD und Hochdruck-NMR-Messungen an HPr I14A



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät III

- Biologie und Vorklinische Medizin -

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Rainer Hartl

aus

Pfarrkirchen

durchgeführt am

Institut III für Biophysik und physikalische Biochemie

der Universität Regensburg

unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Mai 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.05.2008

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: PD Dr. W. Gronwald
3. Prüfer: Prof. Dr. R. Sterner

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
2 Grundlagen	9
2.1 Der ISIC-Algorithmus	9
2.2 Methoden zur Beurteilung der Qualität von Strukturen	13
2.3 Hochdruck	14
3 Berechnung der NMR-Struktur von PPARγ-LBD	18
3.1 Allgemeines über PPAR und PPAR γ	18
3.2 Material und Methoden	21
3.2.1 Probenherstellung	21
3.2.2 Abstandsberechnung mit REFINER	21
3.2.3 Berechnungen von Proteinstrukturen mit DYANA	22
3.2.4 Waterrefinement	23
3.3 Ergebnisse	23
3.3.1 Zuordnung der Spektren von PPAR γ -LBD	23
3.3.2 Strukturberechnung von PPAR γ -LBD	28
3.3.3 Verbesserung der Struktur von PPAR γ -LBD mit dem ISIC-Algorithmus	43
3.4 Diskussion	50
3.5 Zusammenfassung	58

4 Hochdruck-NMR-Messungen an HPr I14A	59
4.1 Aufbau der Hochdruckanlagen	59
4.1.1 Hochdruckzellen	59
4.1.2 Aufbau für statische Messungen	65
4.1.3 Aufbau der Drucksprunganlage	66
4.2 Materialien und Methoden	73
4.2.1 Materialien	73
4.2.2 Proben	75
4.2.3 Temperatureichung	75
4.3 Ergebnisse	76
4.3.1 Änderungen am Aufbau der Anlagen	76
4.3.2 Statische Hochdruckmessungen	83
4.3.3 Drucksprung-Messungen	104
4.4 Diskussion	123
4.4.1 Änderungen am Aufbau der Anlagen	123
4.4.2 Statische Hochdruckmessungen	125
4.4.3 Drucksprungmessungen	127
4.5 Zusammenfassung	128
5 Zusammenfassung	130
Literaturverzeichnis	132
6 Danksagung	142
7 Anhang	143
7.1 Tabellen der chemischen Verschiebungen von PPAR γ -LBD	143
7.2 Tabelle der chemischen Verschiebungen von HPr I14A	154
7.3 Pulsprogramm für die 2D-Messungen von Histidin	171
7.4 Technische Zeichnungen	172

INHALTSVERZEICHNIS

5

8 Erklärung

180

Kapitel 1

Einleitung

Die Entwicklungen der letzten Jahrzehnte auf dem Gebiet der NMR (nuclear magnetic resonance) machen diese mit zu einer der wichtigsten Forschungsmethoden, um biologische Makromoleküle zu untersuchen. Die Einführung der FT-NMR durch ERNST und ANDERSON [Ern66] und die Entwicklung der multidimensionalen NMR-Spektroskopie durch JEENER [Jee71] brachten den Durchbruch für diese Untersuchungen. Mithilfe der NMR ist es möglich geworden, Proteinstrukturen zu lösen sowie kinetische und dynamische Untersuchungen an Proteinen durchzuführen. Obwohl die Strukturberechnungen von Proteinen mithilfe der NMR mittlerweile ein Standardverfahren darstellen, sind sie in der aktuellen Forschung immer noch von enormer Bedeutung: Die Kenntnis der Struktur eines Proteins gibt wichtige Hinweise über dessen Funktionen. Durch diese Erkenntnis ist es gezielt möglich, in wichtige Prozesse des Proteins einzugreifen, es zu blockieren sowie zu fördern. Dieses Wissen ist vor allem für die Pharmazie im Bereich der Medikamentenentwicklung von sehr großer Bedeutung.

Um die räumliche Struktur von Proteinen darzustellen, werden vorwiegend zwei Methoden verwendet: (1) Die Röntgenbeugung an Kristallen und (2) die NMR. Beide Methoden weisen sowohl Vor- als auch Nachteile auf. Die Vorteile der *Röntgenbeugung* liegen vor allem in der Unabhängigkeit der Proteingröße

und in der relativ kurzen Zeit, die benötigt wird, um Strukturen von Proteinen zu erhalten. Allerdings scheitert diese Methode, wenn es nicht möglich ist, ein Protein zu kristallisieren. Neben der Röntgenbeugung hat die Strukturbestimmung mithilfe der *NMR* den Nachteil, sehr zeitaufwendig zu sein. Nimmt man diesen Aufwand jedoch in Kauf, erhält man den markanten Vorteil, nahe an physiologischen Bedingungen messen zu können. Dies ist allerdings nur möglich, wenn ein biologisches System untersucht wird, dessen Größe auch der *NMR* zugänglich ist.

Mittels der Röntgenkristallographie konnte bereits die Struktur der Ligandbindedomäne (LBD) des Proteins *PPAR γ* ermittelt werden [Gam00]. In dieser Arbeit wird nun auf die Strukturberechnung der LBD des Proteins *PPAR γ* mithilfe der *NMR* eingegangen. Werden die Ergebnisse der beiden Methoden miteinander verglichen, stellt sich die Frage, ob die verschiedenen Vorbedingungen (Kristall vs. Lösung) Unterschiede in der Struktur dieses Proteins zeigen. Es werden somit die Unterschiede, die zwischen der Röntgen- und *NMR*-Struktur bestehen, aufgezeigt.

Nicht nur die Struktur der Proteine ist für die Forschung von Bedeutung, sondern auch deren Faltung und Dynamik sowie die Struktur von möglichen Zwischenzuständen. Diese Zwischenzustände spielen vor allem bei jenen Proteinen eine große Rolle, die durch eine fehlgefaltete Form Krankheiten (z. B. Alzheimer oder Creutzfeldt-Jakob Krankheit) hervorrufen können. Um diese Zwischenzustände zu erzeugen, ist hoher Druck hervorragend geeignet. Durch das Anlegen hohen Drucks entfällt die Notwendigkeit, das Protein durch einen chemischen Eingriff zu stören. Weiterhin sind Änderungen, die hoher Druck hervorruft, für die meisten bekannten Proteine reversibel [Tor03]. Bei dieser Methode des *statischen Hochdrucks* werden vorwiegend Gleichgewichte zwischen verschiedenen Konformationen eingestellt. HATTORI et al. [Hat04] haben bereits Hochdruckmessungen am Protein HPr von *Staphylococcus carnosus* durchgeführt. In dieser Arbeit werden Hochdruckmessungen an der Mutante I14A von HPr *Staphylococcus carnosus* vorgestellt. Im Gegensatz zu den statischen Messungen ist es das Ziel

von *Sprung-Experimenten*, biologische Systeme zu stören und die unmittelbaren Antworten der Systeme zu messen und zu untersuchen. Sprung-Experimente gibt es in den verschiedensten Ausführungen, z. B. Drucksprung, Temperatursprung und Stop-Flow-Technik. Werden Messungen mittels NMR durchgeführt, ist es sehr wichtig, Versuche mit hoher Genauigkeit oft zu reproduzieren. Druck ist in diesem Zusammenhang sehr gut geeignet, da sich hervorgerufene Änderungen meist reversibel verhalten.

Zusammenfassend werden in dieser Dissertation zwei verschiedene Forschungsschwerpunkte mithilfe der NMR vorgestellt. Zum einen wird die Struktur der LBD des Proteins PPAR γ bestimmt, zum anderen werden Hochdruckmessungen am Protein HPr I14A durchgeführt.

Die Grundlagen dieser Forschung werden in **Kapitel 2** ausführlich beschrieben. Die Arbeit geht dabei auf den ISIC-Algorithmus, die Qualitätsbestimmung von Strukturen und die Theorie des Hochdrucks ein. In **Kapitel 3** wird die Strukturberechnung der Ligandbindedomäne von PPAR γ mithilfe der NMR vorgestellt. Das Protein PPAR γ ist für eine Vielzahl von biologischen Funktionen verantwortlich (z. B. Fettbildung, Zellwachstum und Insulinsensitivität). Durch die Bindung von Thiazolidinedione und der dadurch verbundenen Erhöhung der Insulinsensitivität ist dieses Protein ein interessantes Target für die Pharmazie. Die NMR bietet in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, PPAR γ in wässriger Lösung zu vermessen und dessen Struktur zu berechnen. **Kapitel 4** beschreibt im Detail die für die Hochdruckmessungen verwendeten Anlagen. Mithilfe dieser Anlagen wurden sowohl statische Messungen als auch Drucksprungmessungen am Protein HPr I14A durchgeführt. Die Mutante des Histidine-containing phosphocarrier protein (HPr) I14A enthält eine künstliche Kavität mit einem Durchmesser von 4 Å. In diesem Kapitel werden die Auswirkungen des Drucks auf diese Kavität und die Stabilität des Proteins dargestellt. Die Ergebnisse sollen Aufschluss über mögliche vorhandene Zwischenzustände geben. Abschließend werden in **Kapitel 5** die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

Kapitel 2

Grundlagen

In der vorliegenden Arbeit werden mithilfe der NMR die Struktur der Ligandbindedomäne von PPAR γ berechnet (Kapitel 3) sowie Hochdruckmessungen an HPr I14A (Kapitel 4) durchgeführt. Kapitel 2 setzt sich nun mit den dazu nötigen Grundlagen auseinander. Kapitel 2.1 beschäftigt sich mit dem ISIC-Algorithmus zur Verbesserung von Strukturen. Verschiedene Methoden, um die Qualität von Strukturen zu vergleichen, werden in Kapitel 2.2 vorgestellt. Der Einfluss von hohem Druck auf Proteine wird in Kapitel 2.3 näher dargestellt.

2.1 Der ISIC-Algorithmus

Das Ziel jeder Strukturbestimmung von Makromolekülen stellt die Ermittlung einer möglichst genauen Struktur aus den vorhandenen Daten dar. Ist dies allerdings aufgrund von zu wenigen Daten nicht möglich, bietet der ISIC (intelligent structural information combination) Algorithmus [Bru06] einen Weg, NMR-Strukturen (im Folgenden als S₁ bezeichnet) mithilfe von Röntgenstrukturen (im Folgenden als S₂ bezeichnet) zu verbessern. Dabei können auch Strukturen kombiniert werden, die sich im Grunde ähnlich sind, sich aber strukturell unterscheiden.

Abbildung 2.1 zeigt den schematischen Ablauf des ISIC-Algorithmus.

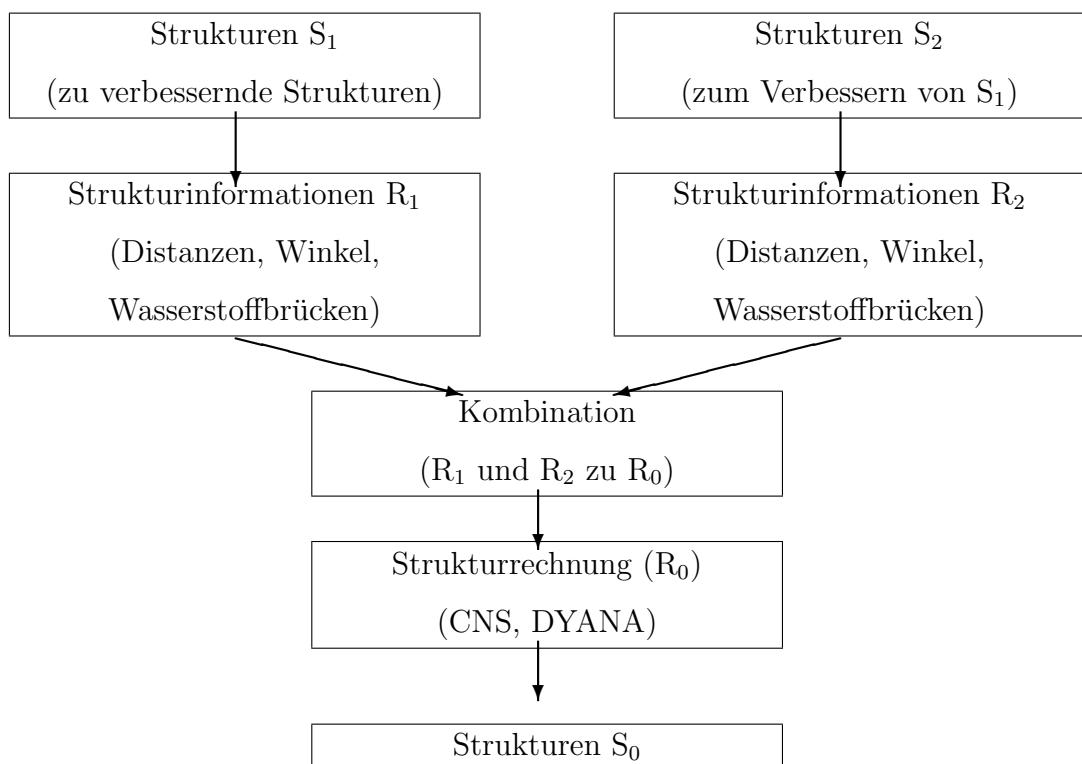


Abbildung 2.1: Schematische Beschreibung des ISIC-Algorithmus

Um den ISIC-Algorithmus anwenden zu können, müssen zunächst einige Berechnungen durchgeführt werden. Aus den Strukturen S_1 und S_2 werden mithilfe des Permol Algorithmus [Mo105, Mo205] die Strukturinformationen (Abstände, Winkel, Wasserstoffbrücken) R_1 und R_2 erzeugt. Während die NMR-Struktur schon als Bündel S_1 vorliegt, muss aus der Röntgenstruktur erst ein Bündel S_2 erzeugt werden. Hierfür wird die Standardabweichung $\sigma^2(d_{m,n})$ der Distanz $d_{m,n}$ zwischen zwei Atomen m und n wie folgt bestimmt:

$$\sigma^2(d_{m,n}) = \sigma(r_m)^2 + \sigma(r_n)^2 + 2\sigma(r_0)^2 \quad (2.1)$$

$\sigma(r_0)$ stellt den durchschnittlichen Fehler der Atomposition dar und wird zu $\frac{1}{3}$ der Auflösung abgeschätzt. Bei $\sigma(r_m)$ handelt es sich um den Fehler des Atoms m, der mithilfe des B-Faktors nach Formel 2.2 berechnet wird:

$$\sigma(r_m) = \sqrt{B_m/8 * \pi^2} \quad (2.2)$$

Aus der Standardabweichung $\sigma^2(d_{m,n})$ wird ein Satz von Strukturinformationen R_2^* erzeugt. Anschließend werden mithilfe eines Moleküldynamikprogramms (DYANA, XPLOR-NIH, CNS) aus den Strukturinformationen R_2^* ein Bündel S_2 berechnet. Der Permol Algorithmus erstellt aus diesem Bündel einen Satz von Strukturinformationen R_2 .

Nach diesen vorangehenden Berechnungen kann nun mithilfe des ISIC-Algorithmus aus den Strukturinformationen R_1 und R_2 ein neuer Satz von Strukturinformationen R_0 generiert werden. Die spezifischen Strukturinformationen von R_0 werden dabei mittels unterschiedlicher Verfahren kombiniert. Die Bestimmung der Abstände und Winkel für R_0 erfolgt unter Anwendung eines t-Tests. Die t_1^k -Werte für Abstände und Winkel werden wie folgt berechnet, wobei L der Anzahl der Messwerte für eine Strukturinformation entspricht:

$$t_1^k = \frac{|\langle R_1^k \rangle - \langle R_i^{k*} \rangle|}{\sqrt{\frac{s^2(R_1^k)}{L_1} + \frac{s^2(R_i^{k*})}{L_i}}} \quad (2.3)$$

Die berechneten t_1^k -Werte werden anschließend mit dem kritischen t-Wert t_c verglichen. Dieser kritische t-Wert wird mithilfe eines Näherungsverfahrens, bei gegebenem Signifikanzniveau und bekanntem Freiheitsgrad df ($df = L_1 - L_i - 1$), bestimmt. Ist t_1^k größer als t_c wird die Null-Hypothese abgelehnt und die Strukturinformation R_i^{k*} nicht verwendet. Im Gegensatz dazu wird die Strukturinformation weiter verwendet, wenn $t_1^k \leq t_c$ ist. In diesem Fall wird auch der Mittelwert $\langle R_0^k \rangle$ nach der Formel 2.4 berechnet, wobei $A_i =$ für alle i mit $t_1^k \leq t_c$ gilt:

$$\langle R_o^k \rangle = \frac{\frac{\langle R_1^k \rangle}{s^2(R_1^k)} + \sum_{i \in A_i} \frac{\langle R_i^{k*} \rangle}{s^2(R_i^{k*})}}{\frac{1}{s^2(R_1^k)} + \sum_{i \in A_i} \frac{1}{s^2(R_i^{k*})}} \quad (2.4)$$

Für die dritte Strukturinformation, die Wasserstoffbrücken, wird ein maximaler Abstand von 0,24 nm und ein Wasserstoffbrückenwinkel von α_{NHO} von $180^\circ \pm 35^\circ$ angenommen. Falls der Wert der bedingten Wahrscheinlichkeit $P(H_0^k | H_1^k, H_i^{k*}, i=2, \dots, N)$ einen vom Benutzer definierten Schwellwert überschreitet, wird die Wasserstoffbrücke als vorhanden definiert und in eine Abstandsinformation umgewandelt.

Die Strukturinformationen R_0 , die durch den ISIC-Algorithmus erzeugt worden sind, können nun verwendet werden, um mithilfe eines Moleküldynamikprogramms eine verbesserte Struktur zu berechnen.

Methoden um die Güte einer Struktur zu beurteilen werden im nachfolgenden Kapitel erläutert.

2.2 Methoden zur Beurteilung der Qualität von Strukturen

Ein Protein ist kein starres Gebilde, sondern ist laufend dynamischen Prozessen unterworfen. Die mithilfe der NMR berechneten Strukturen bieten nur eine Momentaufnahme, die durch Computersimulationen ermittelt wird. Somit sollte nicht nur *eine* Möglichkeit für die Beurteilung von Proteinstrukturen herangezogen werden, sondern *mehrere*. Die Beschränkung auf lediglich eine Methode zur Beurteilung der Qualität würde u. U. zu einem falschen Ergebnis führen. In dieser Arbeit werden folgende drei Methoden verwendet: (1) Der RMSD-Wert (mit MOLMOL berechnet), (2) der Ramachandran-Plot (mit PROCHECK erstellt) und (3) der R-Wert (mit AUREMOL berechnet).

Die Verwendung des *RMSD-Wert* (root mean square deviation) ist die geläufigste Methode zur Beurteilung der Güte einer Struktur. Hierbei werden die Atompositionen der Strukturen mit den Atompositionen einer mittleren Struktur verglichen. Der RMSD-Wert gibt somit die Abweichung der Proteinstruktur von der mittleren Struktur an. Ein niedriger RMSD-Wert allein lässt jedoch noch nicht unbedingt auf eine gute Struktur schließen. Folglich müssen noch andere Kriterien zur Beurteilung herangezogen werden.

Allein durch die Diederwinkel des Rückgrats, Φ und Ψ , kann die Struktur eines Proteins dargestellt werden. Für die verschiedenen Sekundärstrukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt) ergeben sich unterschiedliche Kombinationen der Diederwinkel. Diese Kombinationsmöglichkeiten ergeben im *Ramachandran-Plot* verschiedene Bereiche, abhängig von der Sekundärstruktur des Proteins. Zusätzlich ist nicht jede Kombination der zwei Winkel erlaubt, da dies durch die sterische Interaktion verhindert wird. Je mehr Winkelpaare sich in den erlaubten Bereichen wiederfinden, desto eher kann davon ausgegangen werden, dass die berechnete Struktur die tatsächliche Proteinstruktur wiedergibt.

Ob die simulierte Proteinstruktur mit den gemessenen Daten übereinstimmt, kann mit dem *R-Wert* nachgewiesen werden. AUREMOL simuliert hierfür aus der Proteinstruktur ein NOESY-Spektrum und vergleicht es mit den NMR-Daten. Aus einem niedrigen R-Wert lässt sich schließen, dass die berechnete Struktur und die gemessenen Daten übereinstimmen. In dieser Arbeit wurde der R-PWAUR (probabilty weighted assigned and unassigned resonances) verwendet.

Erst durch Verwendung aller drei Methoden ist es letztendlich möglich die Qualität der berechneten Strukturen zu beurteilen.

2.3 Hochdruck

In wässrigen Lösungen liegen Proteine in verschiedenen Konformationen vor. Meistens ist jedoch *eine* spezifische Konformation vorherrschend, die in NMR-Spektren untersucht wird. Werden die thermodynamischen Parameter geändert, kann sich das Gleichgewicht, das unter den Konformationen eines Proteins entsteht, zu einer anderen Konformation verschieben. Die Modifikation der Temperatur ist beispielsweise eine Möglichkeit, die Faltung und Entfaltung von Proteinen zu untersuchen. Die Veränderung der Temperatur hat aber auch zwei gravierende Nachteile: (1) Werden zu hohe Temperaturen verwendet, läuft die Entfaltung der Proteine meist irreversibel ab; (2) des Weiteren können Untersuchungen unter 0 °C nicht problemlos durchgeführt werden, da die Proteine in wässriger Lösung vorliegen. Sie werden gemeinsam mit der Lösung eingefroren, womit eine Untersuchung nicht mehr möglich ist.

Einen eleganten Ausweg bietet die Änderung des Drucks. Denn wie auch die Erhöhung der Temperatur bewirkt eine Erhöhung des Drucks eine Entfaltung der Proteine. Diese Methode bietet den großen Vorteil, dass sie bei allen bisher untersuchten Proteinen *reversibel* ist. Des Weiteren ermöglicht eine Erhöhung des Drucks auch Messungen, die bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt durchgeführt werden können. Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch folgender: Während

Änderungen der Temperatur sehr leicht zu realisieren sind, setzen Druckänderungen einen hohen technischen Aufwand voraus.

Abbildung 2.2 zeigt auf eine sehr einfache Art und Weise, welche Auswirkungen der Parameter Druck auf eine Proteinprobe hat: (A) eine Volumenänderung des Proteins; (B) eine Gleichgewichtsverschiebung zwischen verschiedenen Konformationen. Im Folgenden werden diese beiden Effekte näher beschrieben.

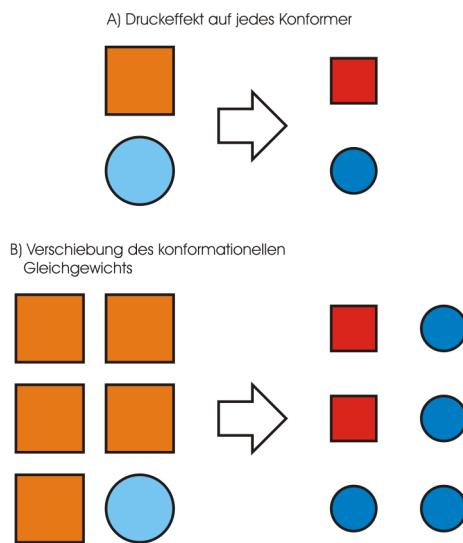


Abbildung 2.2: Bei Anlegen von Druck an die Probe kommen folgende Effekte zum tragen. A: Das Volumen des Proteins ändert sich. B: Der Gleichgewichtszustand zwischen verschiedenen Konformationen ändert sich.

Aufgrund der *Volumenänderung* des Proteins besteht, vereinfacht formuliert, ein Zusammenhang zwischen dem quadratischen Mittel der Volumenänderung und der Komprimierung unter Druck durch folgende Beziehung:

$$\langle (\delta V)^2 \rangle = \beta_T V k T, \quad (2.5)$$

wobei V das Volumen des Systems, β_T den isothermischen Kompressibilitätskoeffizienten, k die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur darstellen. Mithilfe der Formel 2.5 wird folglich die Volumenfluktuation des Systems berechnet, indem die zuvor gemessene Kompressibilität β_T verwendet wird.

Bei einer *Gleichgewichtsverschiebung* findet ein Übergang zwischen der nativen Konformation N zu dem Intermediate I statt. Diese beiden Konformationen unterscheiden sich im Allgemeinen in ihrer Struktur, in ihrem teilmolaren Volumen ($\Delta V = V_I - V_N$) und in ihrer thermodynamischen Stabilität ($\Delta G = G_I - G_N$). In einer Proteinlösung kann sich die Gleichgewichtskonstante K zwischen den Konformationen N und I mit dem Druck nach folgender Formel verschieben:

$$K = \frac{[I]}{[N]} = \left(\frac{-\Delta G}{RT} \right) \quad (2.6)$$

mit

$$\Delta G = G(I) - G(N) = \Delta G^0 + \Delta V^0(p - p^0) - \frac{1}{2}\Delta\beta(p - p^0)^2 \quad (2.7)$$

wobei ΔG und ΔG^0 die Gibbs-Energien bei der Änderung von N nach I unter der Druckänderung von p und p^0 (1 bar) darstellen, ΔV^0 die Teilmolarkontaktionsänderung, $\Delta\beta$ die Änderung des Kompressionskoeffizienten, R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Unter Normalbedingungen wird ΔG^0 positiv und die native Konformation stabiler, als dies bei einem möglichen Zwischenzustand der Fall wäre. Das Anlegen von Druck kann das Verhältnis zwischen diesen beiden Konformationen zugunsten des Zwischenzustandes [Aka01, Ak103, Ak203, Aka05] verschieben und es schließlich ermöglichen, diesen näher zu untersuchen.

Werden sowohl Druck als auch die Temperatur variiert, ändert sich die Formel für ΔG zu:

$$\begin{aligned} \Delta G = G(I) - G(N) = & \\ \Delta G^0 - \Delta S^0(T - T_0) - \Delta C_p[T \ln \frac{T}{T_0} + T_0] + & \\ \Delta V^0(p - p^0) - \frac{1}{2}\Delta\beta(p - p^0)^2 + \Delta\alpha(p - p_0)(T - T_0), & \end{aligned} \quad (2.8)$$

wobei ΔG und ΔG^0 die Gibbs-Energien bei der Änderung von N nach I unter der Druckänderung von p und p^0 (1 bar), T_0 die Schmelztemperatur, ΔV^0 die Teilmolarvolumenänderung, $\Delta\beta$ die Änderung des Kompressionskoeffizienten, ΔC_p die Wärmekapazität und $\Delta\alpha$ den thermischen Expansionskoeffizienten darstellen.

Bis dato sind zwei Möglichkeiten bekannt, hohen Druck an Proben zu übertragen. Ein mögliches Verfahren stellt die Verwendung von *Hochdruckprobenköpfen* dar [Jon72, Jon70, Bal96, Bal98], wobei der gesamte Probenkopf unter Druck gesetzt wird. Im Gegensatz dazu kann der Einfluss des Drucks auch mit speziellen *Kapillaren* und *Röhrchen* aus Quarz, Borosilikat oder Keramik untersucht werden. Diese Kapillaren und Röhrchen finden in einem Standardprobenkopf Verwendung. Die Messungen dieser Arbeit wurden speziell mittels Hochdruck-Kapillaren durchgeführt, wobei in Kapitel 4.1 ausführlich auf diese Technik eingegangen wird.

Kapitel 3

Berechnung der NMR-Struktur von PPAR γ -LBD

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Strukturberechnung der Ligandbinde-domäne von PPAR γ , auf die Kapitel 3 ausführlich eingehen wird. Die allgemeine Bedeutung der Untergruppen von PPAR (α , β/δ und γ) und speziell von PPAR γ beschreibt Kapitel 3.1. Im folgenden Kapitel 3.2 wird näher auf die verwendeten Materialien und Methoden eingegangen. Kapitel 3.3 gibt einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse, wobei eine Diskussion über diese in Kapitel 3.4 folgt. Abschließend wird in Kapitel 3.5 eine kurze Zusammenfassung gegeben.

3.1 Allgemeines über PPAR und PPAR γ

Peroxisom Proliferator Aktivierte Rezeptoren (PPAR) stellen intrazelluläre Rezeptoren dar, die eine Vielzahl von metabolischen und zellulären Prozessen steuern. Drei verschiedene Untergruppen von PPAR, die in Wirbeltieren und Säugetieren vorkommen, sind bekannt: Es handelt sich dabei um PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ [Mic99] (im Folgenden als PPARs zusammengefasst). Obwohl die verschiedenen PPAR-Untergruppen eine ähnliche Sequenz und Struktur vorwei-

sen, unterscheiden sie sich in der Gewebeverteilung, der Liganden-Selektivität sowie in der biologischen Aktivität. Durch eine Vielzahl verschiedener Liganden [Mor98] können die unterschiedlichsten Effekte erzeugt, verstärkt oder gehemmt werden. Liganden treten in unterschiedlichen Ausführungen auf, so z. B. als natürliche Fettsäuren, industrielle Chemikalien oder pharmazeutische Agenten. Spezielle Verbindungen von Liganden stellen die sogenannten Fibrate (z. B. Clofibrate [Wil00, Hen98]) oder auch Thiazolidindione (z. B. Rosiglitazone und Pioglitazone [Wil00, Hen98]) dar, die zur Behandlung von Patienten eingesetzt werden: Fibrate zur Senkung des LDL-Cholesterins, Thiazolidindione zur Sensibilisierung von Insulin.

Die bereits oben genannten Untergruppen von PPAR weisen ähnliche Strukturen auf und bestehen zudem aus vier funktionellen Domänen [Gua01]: (1) Der N-terminalen ligandenunabhängigen Transaktivierungsdomäne, (2) der DNA-Bindedomäne, (3) der Co-Faktor-Andockdomäne und der dazugehörigen C-terminalen Ligandbindedomäne sowie (4) der liganden-abhängigen Transaktivierungsdomäne.

Bild 3.1 zeigt die schematische Darstellung der Wirkungsweise der PPARs, die auf folgende Weise vonstatten geht: Die PPARs werden durch die Bindung von Liganden aktiviert. Nach dieser Aktivierung bilden sie mit dem Retinoic X Rezeptor (RXR) Heterodimere, die anschließend an spezielle PPAR response elements in der Promoterregion ihrer Zielgene binden. Durch diesen Vorgang wird die Genexpression reguliert.

Die vorliegende Arbeit geht im Speziellen auf die Struktur des Proteins PPAR γ ein. In den letzten zehn Jahren wurden bereits zahlreiche Studien an diesem Protein durchgeführt ([Zho08]-[Mar08]), um dessen Wirkungsweise und Struktur zu untersuchen. Die bereits angesprochene Ligandgruppe der Thiazolidindione bietet eine neue Klasse zur Bekämpfung von Diabetes. Durch Bindung an PPAR γ verbessert diese die Insulinsensitivität und reduziert vor allem den Blutzuckerwert bei Typ-2 Diabetes-Patienten. Das PPAR γ spielt darüber hinaus eine sehr wich-

20 KAPITEL 3. BERECHNUNG DER NMR-STRUKTUR VON PPAR γ -LBD

tige Rolle bei der Entstehung von Fett und bei der Hemmung von Entzündungen. Zudem wurde nachgewiesen, dass PPAR γ Agonisten die Abstoßung von bösartigen Zellen fördern sowie das Tumorzellenwachstum hemmen.

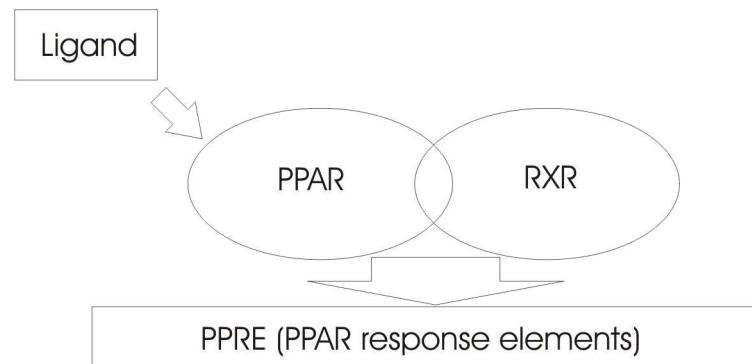


Abbildung 3.1: Modell für die Genexpression von PPAR nach der Bindung eines Liganden und Heterodimerisierung mit RXR.

Um mehr über die spezifische Wirkungsweise von Proteinen wie PPAR γ zu erfahren, ist es notwendig, deren räumliche Struktur zu kennen. Die LBD von PPAR γ besteht aus 270 Aminosäuren sowie einer Molekularmasse von 32 kDa und gehört zu den größten Proteinen, deren Struktur mithilfe der NMR bisher gelöst wurde. In Kapitel 3.3.2 wird ausführlich auf die Strukturberechnung der PPAR γ -LBD mithilfe der NMR eingegangen.

Neben der Methode der NMR können Strukturen wie bereits erwähnt auch mittels Röntgenkristallografie bestimmt werden. Von der PPAR γ -LBD existieren bereits Röntgenstrukturen, die in kristalliner Form als Homodimer vorliegen. Auch NMR Diffusions-Messungen deuten darauf hin, dass die PPAR γ -LBD in wässriger Lösung vorwiegend Monomere bildet, womit deren Struktur mithilfe der NMR untersucht werden kann.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Probenherstellung

Humane PPAR γ -LBD wurde in *E. coli* überexprimiert und isotopenmarkiert. Die Proben enthielten 0,2 mM PPAR γ -LBD, die in einem PBS-Puffer mit 5 mM DTT und 0,1 mM DSS gelöst wurden. Zudem wurden zu den Proben ca. 1 mM in DMSO gelöstes Rosiglitazon zugegeben. Der pH-Wert der Proben betrug 7,4.

3.2.2 Abstandsberechnung mit REFIN

Nach der Zuordnung der NOESY-Spektren konnten die Abstandsinformationen für die Strukturrechnung gewonnen werden. Dafür wurde das Programm REFIN [Tre06] verwendet. REFIN berechnet mithilfe einer Spektrensimulation und den Volumenintegralen die Abstände der zugeordneten NOE-Signale. Um die Abstände zu bestimmen, werden ein Strukturbündel oder eine einzelne Struktur, die Simulationsparameter für RELAX [Goe97] und die chemischen Verschiebungen der Signale benötigt. Mithilfe der Rückrechnung durch RELAX werden die NOE-Volumina der eingegebenen Strukturen ermittelt und mit den gemessenen NOE-Signalen verglichen. Durch einen iterativen Prozess werden für Signale, die keine gute Übereinstimmung zwischen simulierten und gemessenen Volumina aufweisen, die Kreuzrelaxationsraten angepasst und die Volumina neu simuliert. Dieses Verfahren wird so lange durchgeführt, bis simulierte und gemessene Signale eine gute Übereinstimmung aufweisen. Wird keine gute Übereinstimmung für die Signale gefunden, muss ein Abstand aus den experimentellen Volumina mittels einer ISPA-Näherung (isolated spin pair approach) berechnet werden. Abschließend lassen sich die Abstandsinformationen und deren Fehler aus den Relaxationsdaten ermitteln und in eine Datei schreiben. Diese Datei kann anschließend in Moleküldynamikprogrammen zur Berechnung der Strukturen verwendet werden.

3.2.3 Berechnungen von Proteinstrukturen mit DYANA

Bis dato ist es noch nicht möglich, die Struktur aller Proteine *nur* aufgrund ihrer Sequenz vorherzusagen. Die zu hohe Anzahl an Faltungszuständen stellen für heutige Computer einen zu hohen Rechnungsaufwand dar. Lediglich für kleinere Proteine kann die Faltung ansatzweise simuliert werden [Bon01, Har02, Sim99]. Um die möglichen Konformationen und somit den Rechenaufwand zu beschränken, werden experimentelle Daten benötigt. Diese können sich u. a. aus Abständen, Diederwinkel und Wasserstoffbrücken (Strukturinformationen) zusammensetzen.

Für die Berechnungen der Proteinstrukturen von PPAR γ -LBD wurde das Programm DYANA 1.5 [Gue97] verwendet. Durch die Minimierung des Energie-terms des Proteins wird der Konformationsraum nach Strukturen mit geringer Energie durchsucht. DYANA verwendet hierfür die Bewegungsgleichungen der klassischen Mechanik:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{\Theta}_k} \right) - \frac{\partial L}{\partial \Theta_k} = 0 \quad (k = 1, \dots, n) \quad (3.1)$$

wobei $L = E_{kin} - E_{pot}$ die Differenz der kinetischen und potentiellen Energie, Θ die Torsionswinkel und k die einzelnen starren Körper bezeichnet. DYANA rechnet speziell im Torsionswinkelraum. Um die Gefahr zu reduzieren in einem lokalen Minimum des Konformationsraumes zu landen, wird das Verfahren des simulated annealing verwendet. Hierbei wird das System aufgeheizt, wobei sich als Folge die Energie erhöht. Die Erhöhung der Energie gibt dem Protein die Möglichkeit, lokale Minima zu überwinden. Im anschließenden langsamen Abkühlen wird die Energie soweit es möglich ist reduziert. Da es auch bei diesem Verfahren vorkommen kann, in einem lokalem Minimum hängen zu bleiben, werden bei den Rechnungen viele (ca. 1000) Strukturen berechnet und die energieärmsten selektiert.

3.2.4 Waterrefinement

Das verwendete Strukturrechenprogramm DYANA verwendet aus Geschwindigkeitsgründen vereinfachte Annahmen. So wird z. B. eine Interaktion des Proteins mit der wässrigen Lösung nicht mit berücksichtigt. Das CNS-Protokoll *waterrefinement* bietet eine Möglichkeit diese Interaktion mit einzuberechnen. Dabei wird um die Struktur des Proteins eine Wasserbox gelegt und mit einem simulated-annealing-Verfahren die Energie minimiert. Zusätzlich werden mithilfe des CNS-Protokolls die Strukturen, vor und nach dem waterrefinement, einer Analyse (RMSD-Wert und Ramachandran-Plot) unterzogen.

3.3 Ergebnisse

Im ungebundenen Zustand zeigten sich im ^{15}N -HSQC nur etwa die Hälfte der erwarteten Signale. Erst nach dem Binden eines Liganden an die PPAR γ -LBD wurden ca. 90 % der Signale sichtbar, wobei auch die Qualität des Spektrums deutlich zunahm (siehe Abbildungen 3.2, 3.3 und 3.4). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das ungebundene Protein in mehreren Konformationen vorliegt, die untereinander austauschen. Erst aufgrund der Signalverbesserung im gebundenen Zustand wurde es überhaupt möglich, Spektren zuzuordnen (vgl. Kapitel 3.3.1) und Strukturen zu berechnen (vgl. Kapitel 3.3.2). Da manche Regionen der Struktur eine große Ungenauigkeit aufwiesen, wurde eine Strukturverbesserung nach der ISIC-Methode angewendet (vgl. Kapitel 2.1).

3.3.1 Zuordnung der Spektren von PPAR γ -LBD

Die sequentielle Zuordnung der PPAR γ -LBD wurde bereits von RIEPL [Rie05] begonnen und in der vorliegenden Arbeit überprüft und erweitert.

Für die sequentielle Zuordnung eines Proteins dieser Größe müssen Tripelresonanzexperimente durchgeführt werden. Um diese Spektren aufnehmen zu können,

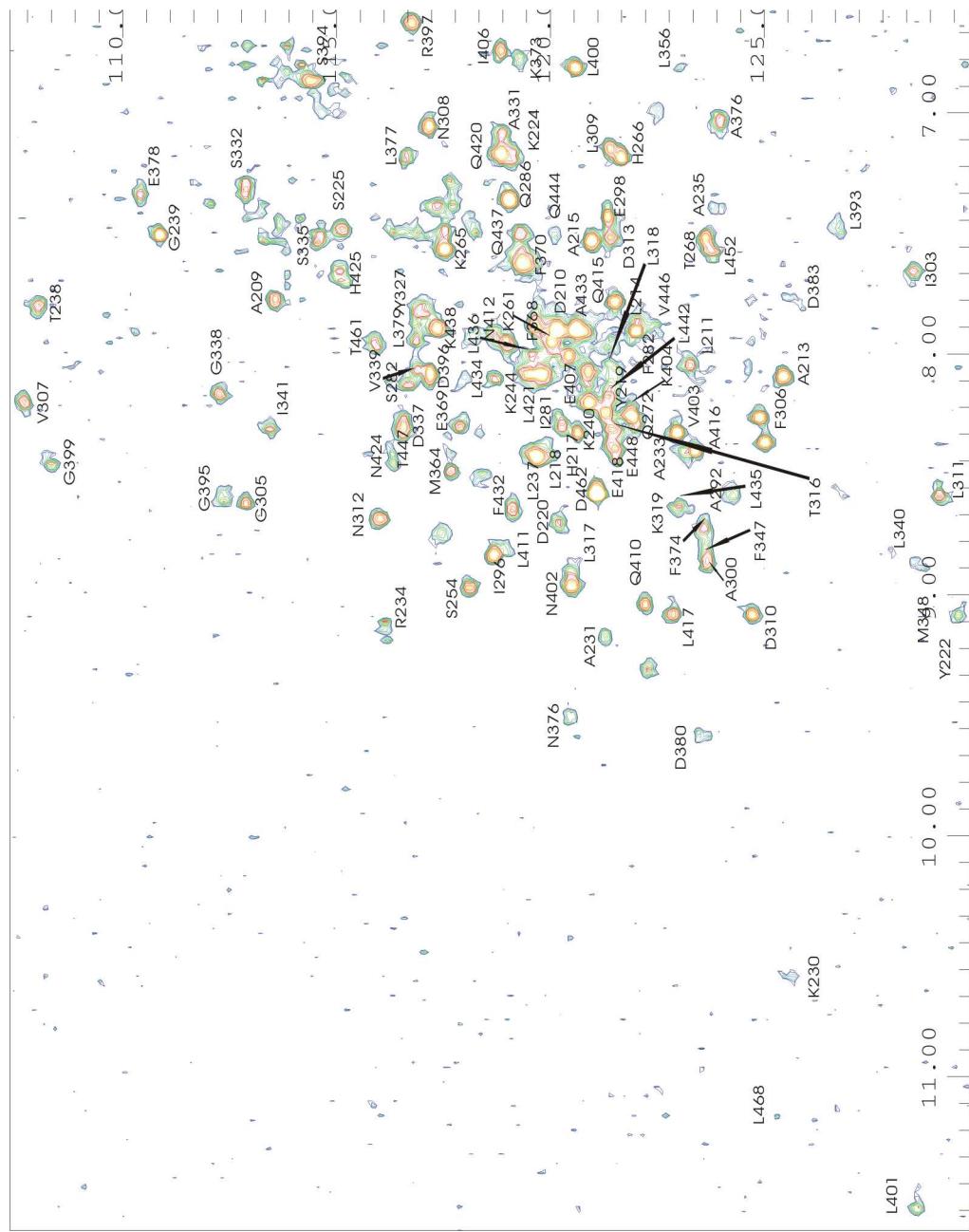


Abbildung 3.2: HSQC-Spektrum von PPAR γ ohne Ligand. Probenzusammensetzung: 0,2 mM PPAR γ -LBD, 0,1 mM DSS, 20 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA und 5 mM DTT, pH von 7,4. Messbedingungen: 600 MHz-Spektrometer, TD: 2048 (^1H), 512 (^{15}N), NS: 64, DS: 128, LB: 1 Hz (^1H), 0,3 Hz (^{15}N).

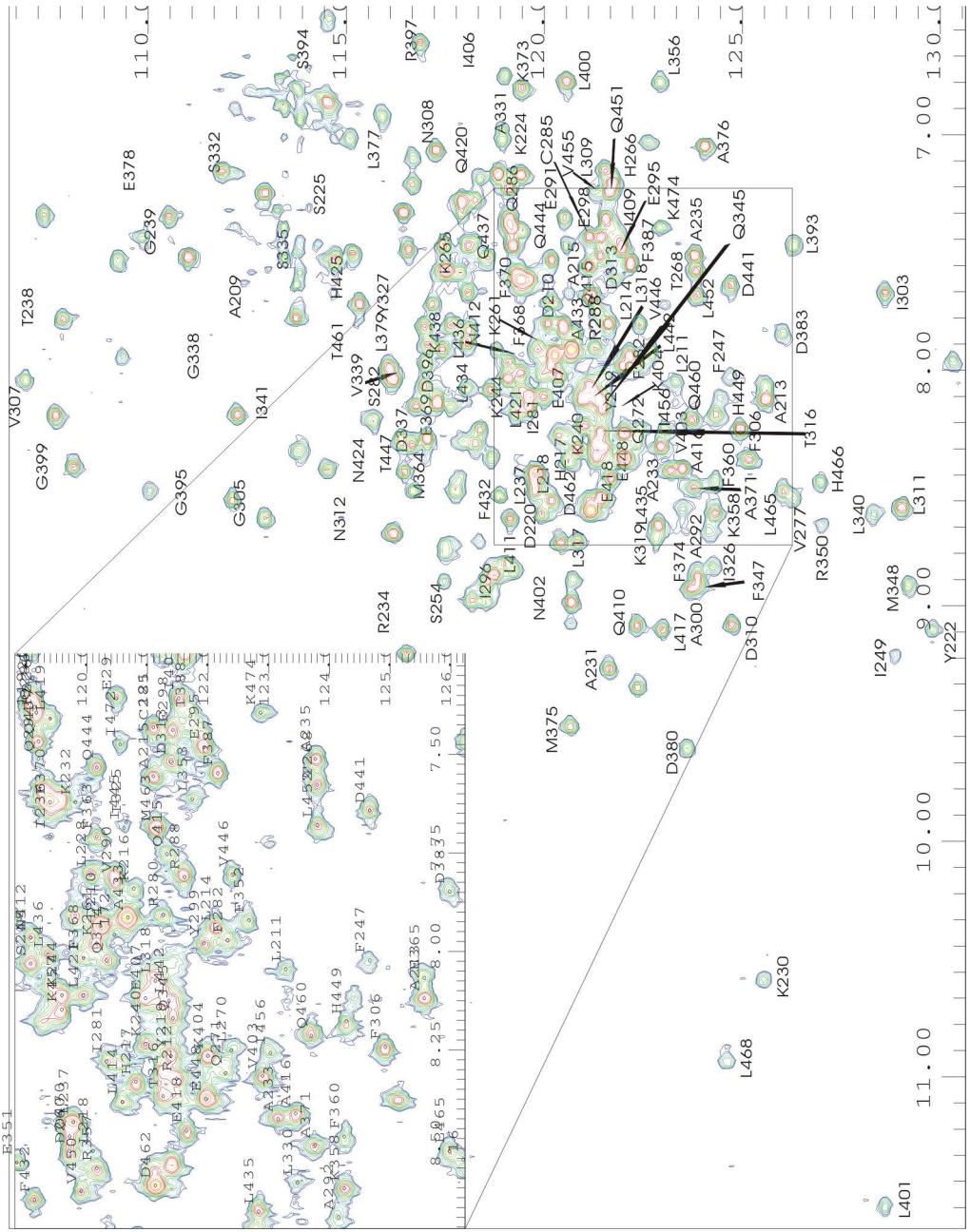


Abbildung 3.3: HSQC-Spektrum von PPAR γ mit Rosiglitazone. Probenzusammensetzung: 0,2 mM PPAR γ -LBD, 0,1 mM DSS, 20 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA und 5 mM DTT, pH von 7,4, mit 1 mM in DMSO gelöstes Rosiglitazone. Messbedingungen: 600 MHz-Spektrometer, TD: 2048 (1H), 512 (^{15}N), NS: 64, DS: 128, LB: 1 Hz (1H), 0,3 Hz (^{15}N).

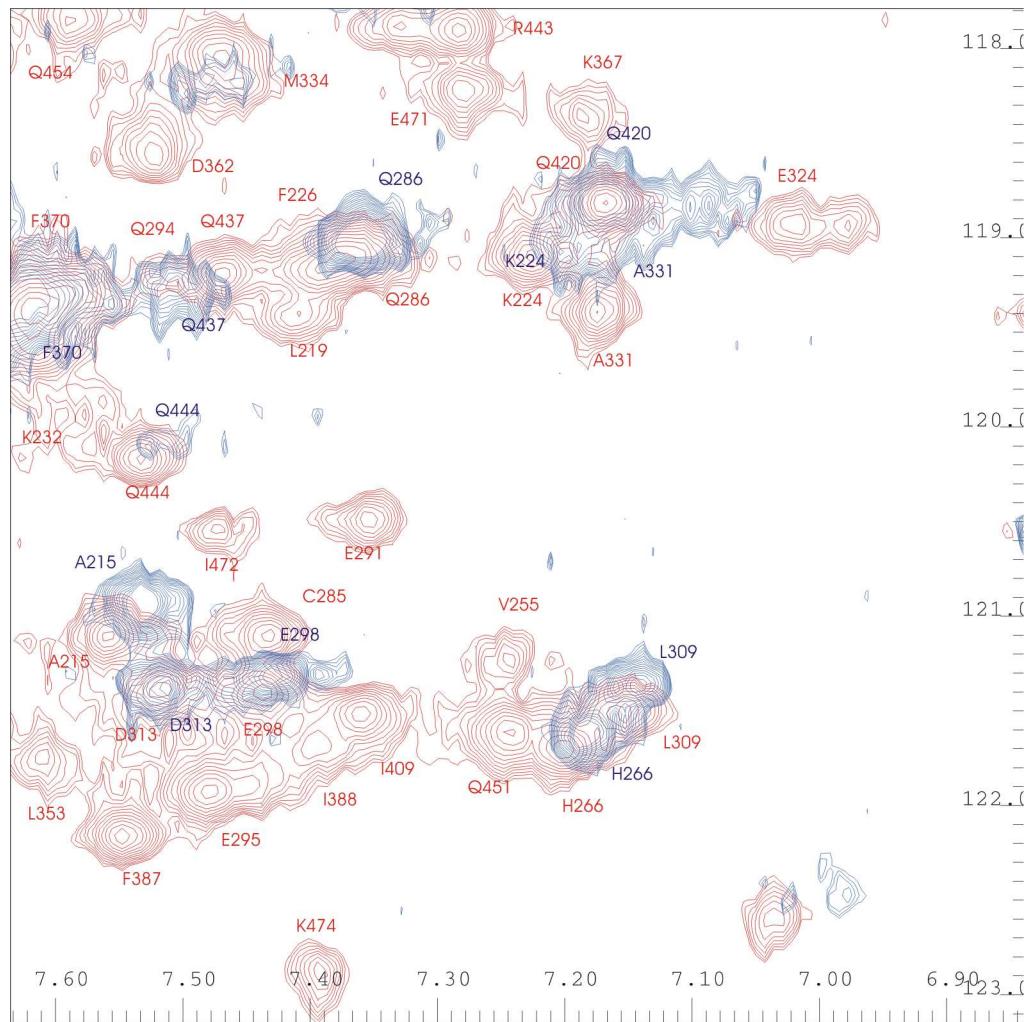


Abbildung 3.4: Überlagerung der HSQC-Spektren mit Rosiglitazone (rot) und ohne Ligand (blau). Im gebundenen Zustand sind wesentlich mehr Signale zu sehen, als im ungebundenen Zustand.

wird dreifach markiertes (^{15}N , ^{13}C , ^2H) Protein benötigt.

Für die sequentielle Zuordnung des Rückgrates von PPAR γ -LBD mit einer Molekülmasse von ca. 32 kDa wurden folgende zwei- und dreidimensionale Spektren aufgenommen:

- ^1H , ^{15}N -TROSY-HSQC
- HCACO
- HNCO
- TROSY-HNCA
- TROSY-HN(CO)CA
- TROSY-CBCA(CO)NH

Die Messung des ^{15}N -TROSY wurde mit einer ^{15}N -markierten Proteinprobe, die Tripelresonanzexperimente mit einer ^{15}N , ^{13}C , ^1H -markierten Proteinprobe von PPAR γ -LBD aufgenommen.

Alle Spektren wurden an einem Bruker DXR600 Spektrometer, ausgestattet mit einem Standard TXI Cryo-Probenkopf, aufgenommen. Die Messungen der Spektren erfolgten mit 1024 Datenpunkten in der Protonen-Dimension, 128 Datenpunkten in der ^{13}C -Dimension und 64 Datenpunkten in der ^{15}N -Dimension. In der ^{13}C -Dimension wurde das States-TPPI [Mar89] Aufnahmeverfahren verwendet, in der ^{15}N -Dimension das Echo-Antiecho Verfahren. Es ließ sich eine Auflösung von 5 Hz/Datenpunkt in der ^1H -Dimension, 23 Hz/Datenpunkt in der ^{13}C und 36 Hz/Datenpunkt in der ^{15}N Dimension erreichen. Die ^{13}C - und ^{15}N -Dimensionen wurden indirekt mithilfe der chemischen Verschiebung der Methylgruppe von DSS in der ^1H -Richtung referenziert, indem die Werte für ^{13}C mit dem Koeffizienten 0,25144953 und die Werte für ^{15}N mit dem Koeffizienten 0,101329118 multipliziert wurden. Die Zuordnung der Spektren entsprach der in Lehrbüchern beschriebenen Vorgehensweise [Cav96, Wue86].

Experiment	Datenpunkte	Anzahl der Scans	Mixing Time
^{15}N -NOESY-HSQC	128x64x1024	16	150 ms
^{13}C -NOESY-HSQC	128x96x1024	16	100 ms
CNH-NOESY	128x64x1024	24	120 ms

Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten NOESY-Experimente.

Um die für die Strukturrechnung sehr wichtigen Abstandsinformationen zu erhalten, standen drei Spektren zur Verfügung: (1) Ein ^{15}N -NOESY-HSQC [Dav92, Pal91, Kay92, Sch93], (2) ein ^{13}C -NOESY-HSQC [Pal91, Dav92, Kay92] und (3) ein CNH-NOESY [Die99]. Die Spektren wurden an einem 900 MHz-Spektrometer mit Cryo-Probenkopf aufgenommen. Die Temperatur wurde auf 298 K eingestellt. Eine Übersicht der verwendeten NOESY-Experimente und der wichtigsten Aquisitions-Parameter bietet Tabelle 3.1.

Für die Zuordnung der Spektren wurde das Programm AUREMOL verwendet. Die Berechnung der Abstände erfolgte mit dem in AUREMOL enthaltenem Programm REFINE.

3.3.2 Strukturberechnung von PPAR γ -LBD

Für die Strukturberechnung der PPAR γ -LBD wurde das Programm DYANA 1.5 verwendet. Insgesamt wurden dafür 3017 Strukturinformationen (Distanzen, Diederwinkel und Wasserstoffbrücken) herangezogen. Diese Daten, wie in Tabelle 3.2 aufgelistet, setzen sich aus 2352 Abstandsinformationen, 439 Winkelinformationen und 225 Wasserstoffbrückeninformationen zusammen. Somit ergeben sich für jeden Aminosäurerest im Mittel 11,2 Strukturinformationen. Im Folgenden wird näher auf die Ergebnisse der Strukturinformationen eingegangen.

Die *NOE-Kontakte* (Abstandsinformationen) wurden durch die Zuordnung der ^{15}N -NOESY-, ^{13}C -NOESY- und CNH-NOESY-Spektren bestimmt. Die 2352 Abstandsinformationen setzen sich aus 1206 intraresiduellen (i,i), 508 sequentiell-

Strukturinformation	Anzahl
NOE-Kontakte	
intraresiduelle (i,i)	1206
sequentielle (i,i+1)	508
kurzreichweitige (i,i+j,2≤j≤4)	337
langreichweitige (i,i+j, j≥5)	301
Wasserstoffbrücken	225
Diederwinkel	439

Tabelle 3.2: Verwendete Strukturinformationen für die Berechnung der PPAR γ -Struktur.

len (i,i+1), 337 kurzreichweitigen (i,i+j,2≤j≤4) und 301 langreichweitigen (i,i+j, j≥5) NOE-Kontakten zusammen.

Die *Winkelinformationen* wurden mithilfe des Programms TALOS (torsion angle likelihood obtained from shift and sequence similarity) [Cor99] erzeugt. Das Programm TALOS vergleicht die Sequenz und die chemischen Verschiebungen der H $^\alpha$ -, Stickstoff- und Kohlenstoffatome mit einer Datenbank und berechnet hieraus die Diederwinkel ϕ und ψ .

Die *Wasserstoffbrückeninformationen* wurden aus der Röntgenstruktur von PPAR γ -LBD [Nol98] (BMRB: 2prg) entnommen und für die Berechnungen weiter verwendet. Diese Auswahl wurde getroffen, da dies bis dato die einzige Röntgenstruktur ist, die im Komplex mit Rosiglitazon bestimmt wurde.

Mit DYANA wurden insgesamt 1024 Strukturen berechnet. Abbildung 3.9 zeigt die Struktur, die auch der Röntgenstruktur der PPAR γ -LBD sehr ähnlich ist [Upp98]. Sie besteht in beiden Fällen aus insgesamt zwölf α -Helices (H1: Ser208 - Ser225, H2a: Lys230 - Thr238, H2b: Met252 - Phe263, H3: Val277 - Ser300, H4: Leu311 - Leu318, H5: Lys319 - Ser332, H6: Lys350 - Lys354, H7: Glu365 - Asn375, H8: Asp381 - Ile392, H9: Val403 - Asn424, H10,H11: Leu431 - Thr459,

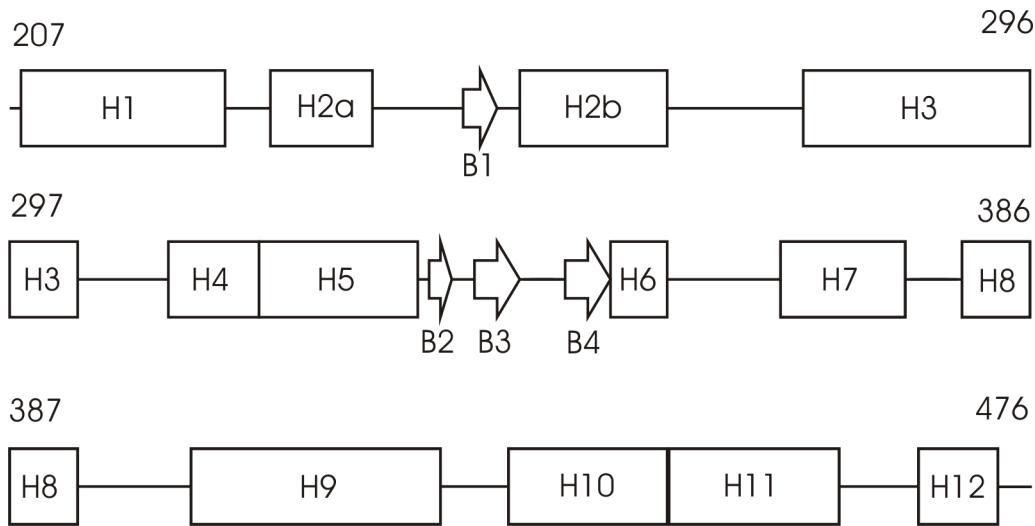


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von $PPAR\gamma$ -LBD nach der Konvention von $RXR\alpha$ -LBD [Bou95] und anderen nuklearen Rezeptoren.

H12: Pro467 - Tyr473) und vier kurzen β -Strängen (B1: Phe247 - Ile249, B2: Met334 - Asn335, B3: Gly338 - Ile 341, B4: Gly 346 - Thr349). Die Benennung der α -Helices und β -Stränge erfolgt nach der Konvention von $RXR\alpha$ -LBD [Bou95] und anderen nuklearen Rezeptoren, wie in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt.

Mithilfe des Programms CSI-Plot [Wis94] und den chemischen Verschiebungen von HA, CA, CB und CO kann eine Sekundärstrukturvorhersage getroffen werden. Die Abbildungen 3.6 - 3.8 zeigen die Vorhersage für die $PPAR\gamma$ -LBD.

Es werden lediglich zwei der vier β -Stränge (B3 und B4) vorhergesagt. Des Weiteren fehlen im CSI-Plot die α -Helices H2b und H8. Abgesehen von dieser Abweichung stimmen die experimentellen Daten gut mit der CSI-Consensus-Vorhersage überein (H1: 213-224, H2a: 230-236, H3: 280-302, H4: 311-319, H5: 322-327, B3: 338-341, B4: 346-349, H6: 350-353, H7: 362-376, H9: 403-422, H10, H11: 431-458, H12: 469-473).

Werden die zehn besten Strukturen überlagert (vgl. Abbildung 3.10), ist ersichtlich, dass die Region der Aminosäure 250-276 nicht gut definiert ist. Diese Ungenauigkeit ist darin begründet, dass in dieser Region einige Zuordnungen in

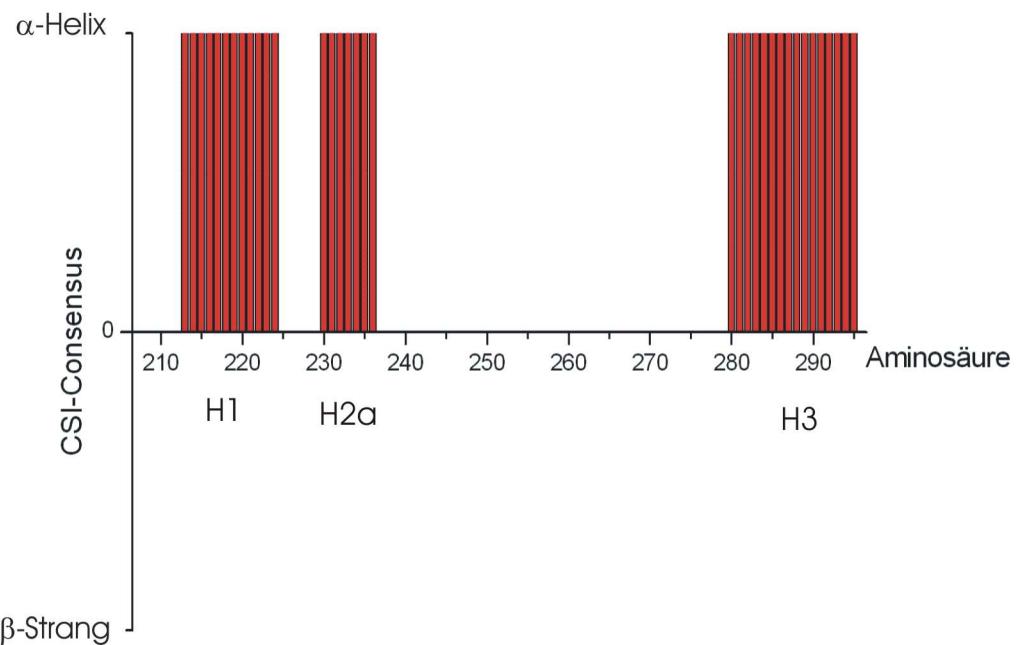


Abbildung 3.6: Sekundärstrukturvorhersage von $PPAR\gamma$ -LBD mithilfe des Programms CSI-Plot. Dargestellt ist die Sekundärstruktur für die Aminosäuren 207-296.

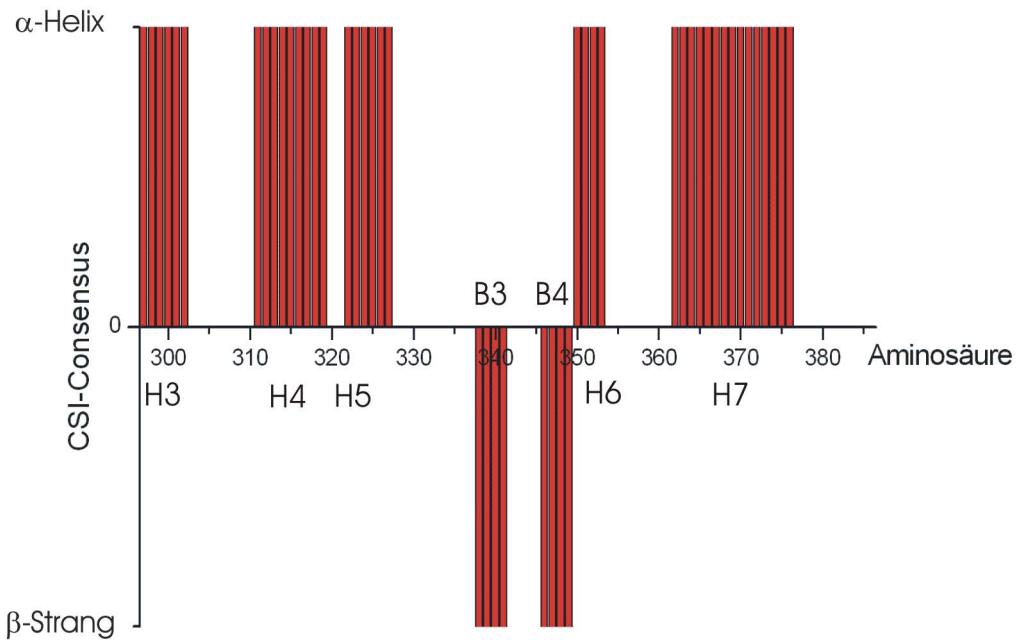


Abbildung 3.7: Sekundärstrukturvorhersage von $PPAR\gamma$ -LBD mithilfe des Programms CSI-Plot. Dargestellt ist die Sekundärstruktur für die Aminosäuren 297-386.

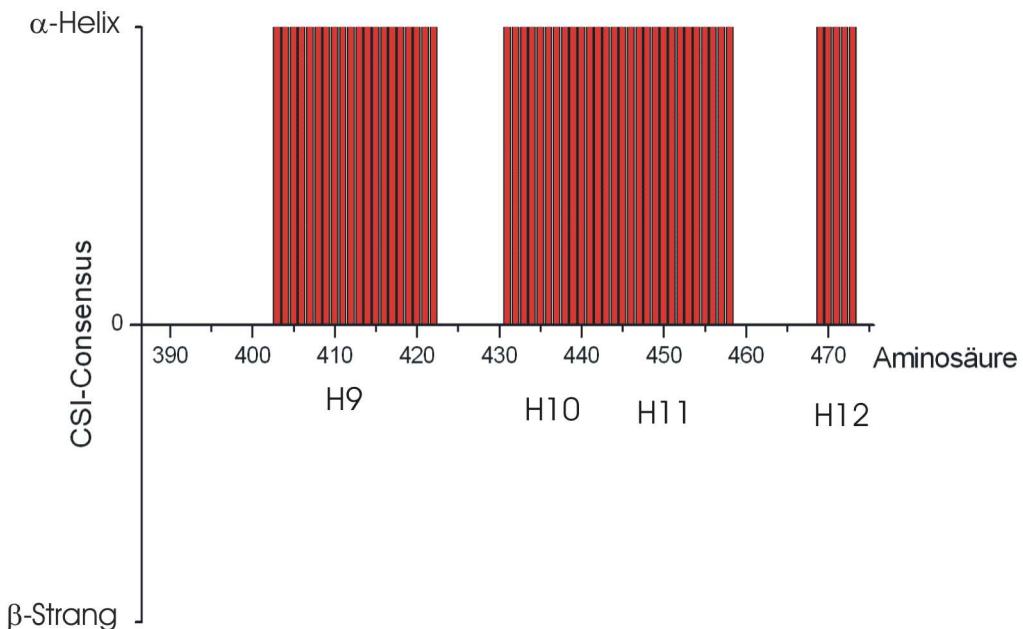


Abbildung 3.8: Sekundärstrukturvorhersage von $PPAR\gamma$ -LBD mithilfe des Programms CSI-Plot. Dargestellt ist die Sekundärstruktur für die Aminosäuren 387-476.

den NMR-Spektren fehlen. Ein Grund dafür liegt wahrscheinlich in der hohen Beweglichkeit dieses Bereiches. Wird dieser Bereich mit der Röntgenstruktur von $PPAR\gamma$ verglichen, so fehlen auch hier Daten (Aminosäure 263-273), da keine Elektronendichte detektiert werden konnte.

Wie in Kapitel 2.2 bereits beschrieben, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Qualität einer Struktur zu bestimmen. Ein Maß zur Beurteilung der Güte einer Struktur ist der RMSD-Wert. Zur Ermittlung dieses Wertes wurde das Programm MOLMOL [Kor96] verwendet. Für das Rückgrat (N, C^α , C) ergab sich ein RMSD von 0,179 nm und für die schweren Atome (N, C, O, S) ein RMSD von 0,249 nm. Ein weiteres Maß für die Güte einer Struktur ist der Ramachandran-Plot, der die Diederwinkel ϕ und ψ des Rückgrates gegeneinander aufträgt. Für diese Winkel ist allerdings nicht jede Kombination erlaubt. Der Ramachandran-Plot wird in vier Bereiche unterteilt: (1) Den bevorzugten Bereich, (2) den zusätzlich erlaubten Bereich, (3) den erweitert erlaubten Bereich und (4) den nichterlaubten Bereich.

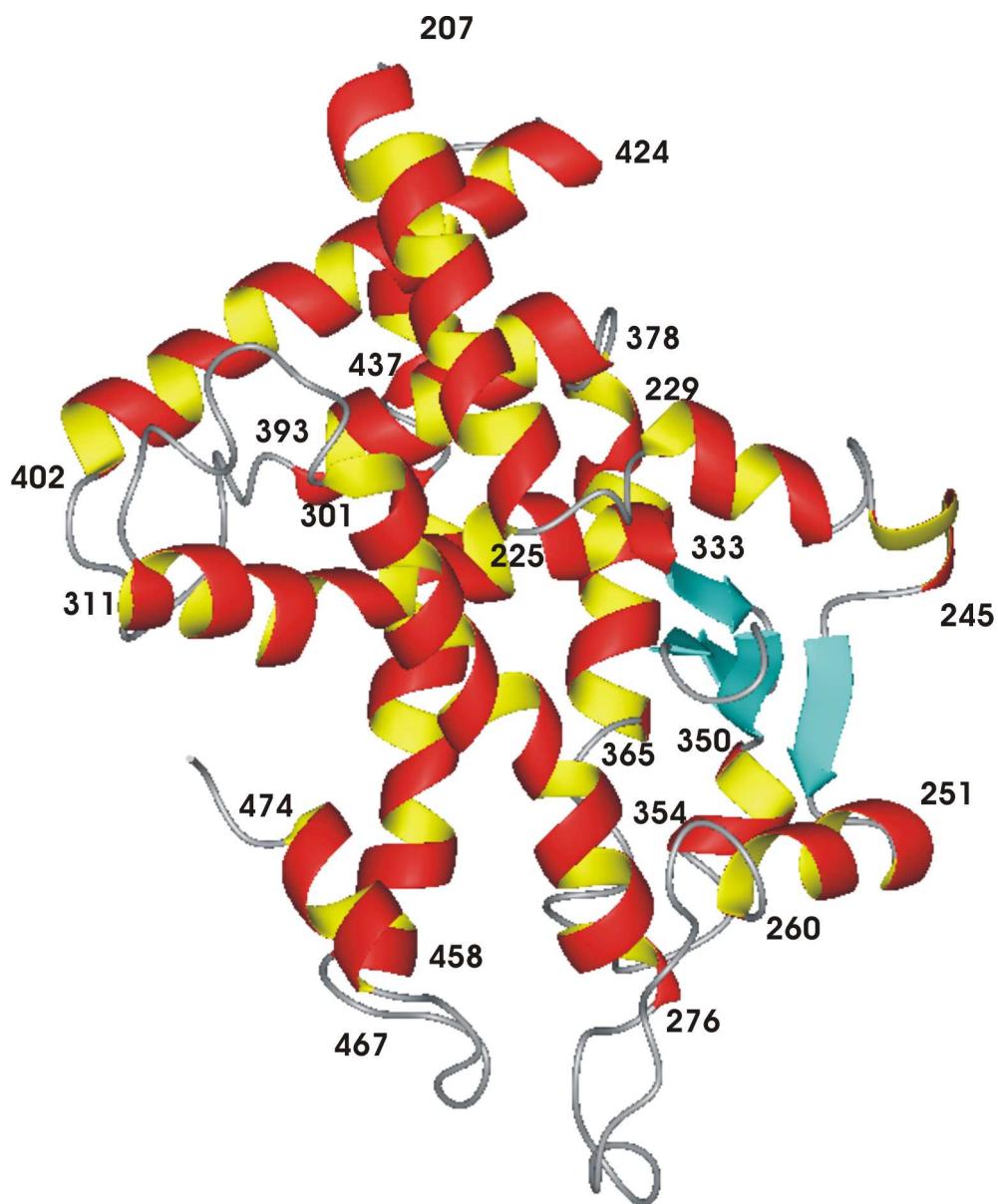


Abbildung 3.9: NMR-Struktur der PPAR γ -LBD mit der niedrigsten Energie.

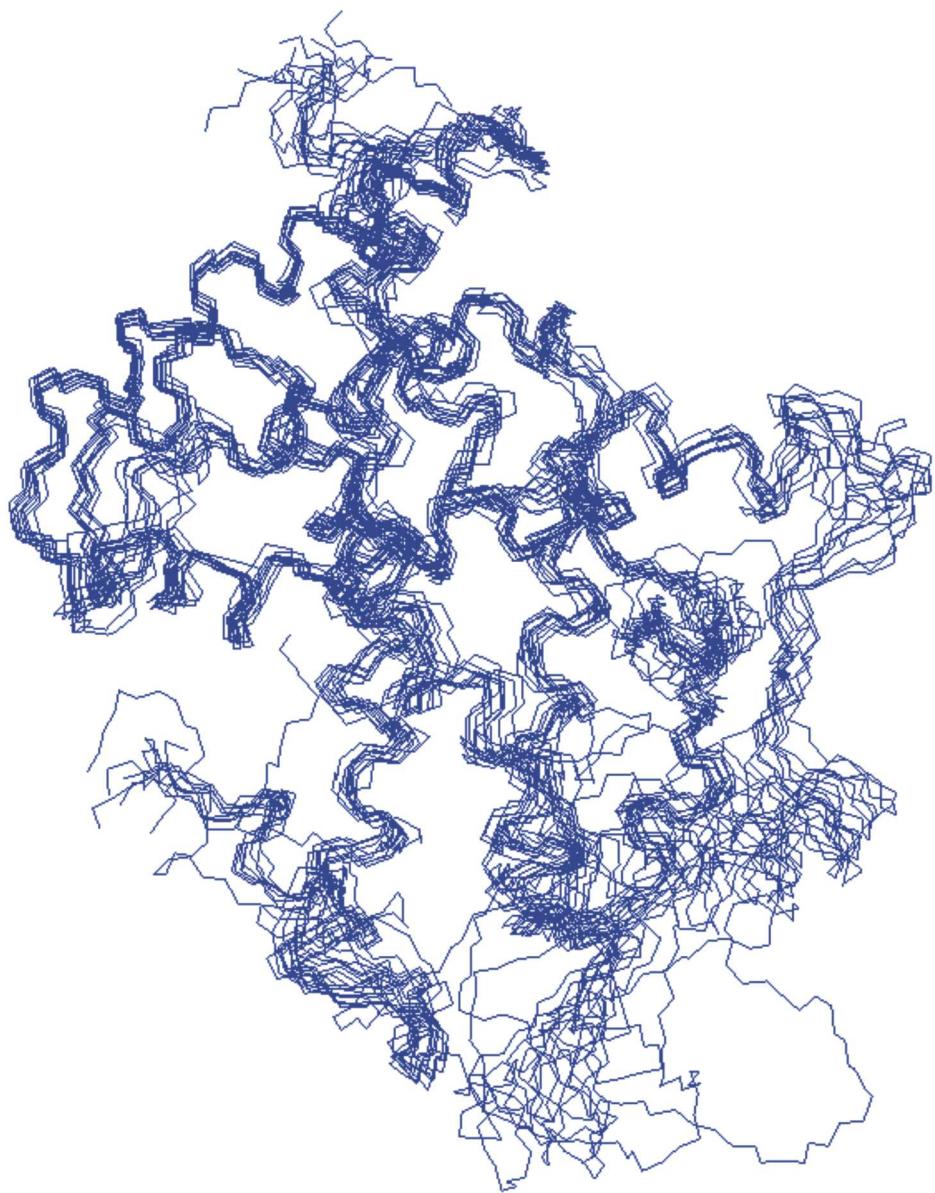


Abbildung 3.10: Überlagerung der zehn energetisch besten Strukturen der $PPAR\gamma$ -LBD, die mit Hilfe der NMR bestimmt worden ist. Geplottet sind nur die Rückgratatome N , C^α und C .

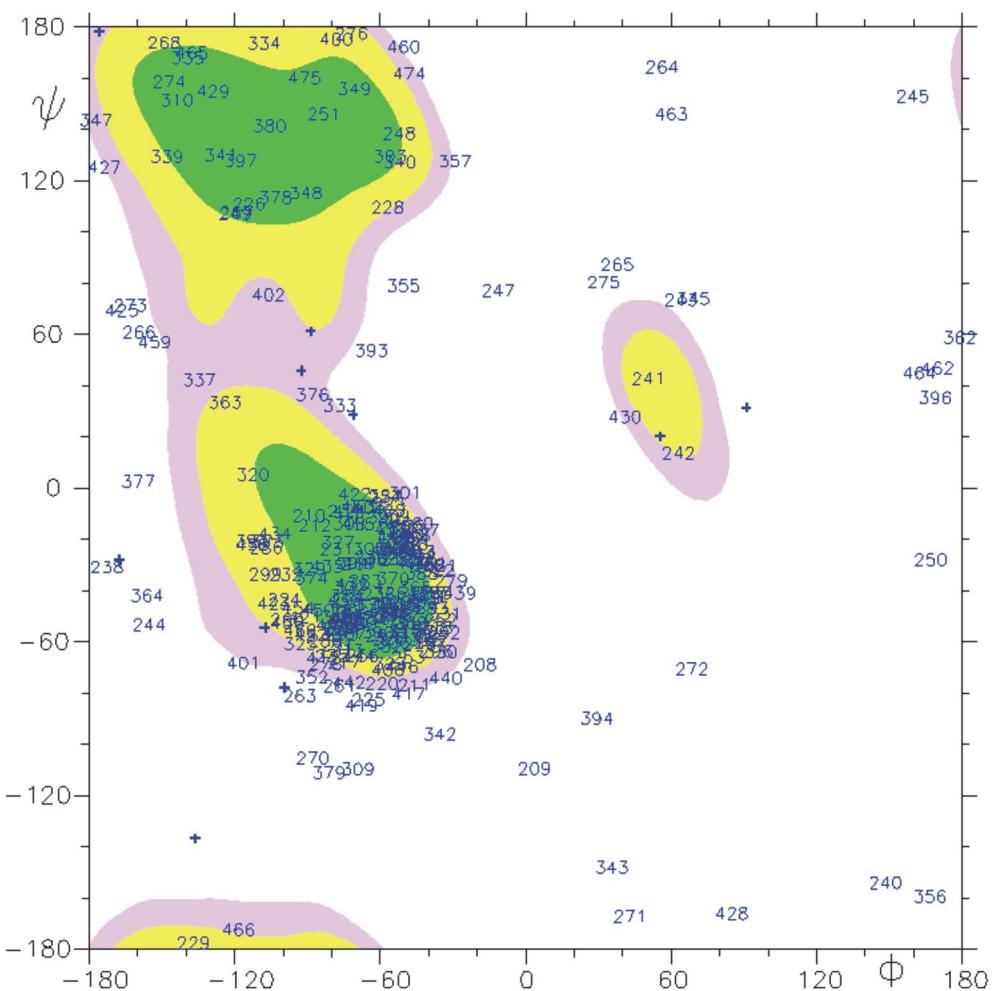


Abbildung 3.11: Ramachandran-Plot der NMR-Struktur von $PPAR\gamma$ mit der niedrigsten Energie (vgl. Abbildung 3.9).

Für die berechnete $PPAR\gamma$ -Struktur liegen 97,8 % im bevorzugten, zusätzlich erlaubten und erweitert erlaubten Bereich (Abbildung 3.11).

Die Berechnungen, die DYANA durchführt, finden im Torsionswinkelraum statt. In diesem Winkelraum wird allerdings jegliche Interaktion des Moleküls mit dem Lösungsmittel vernachlässigt. Eine Möglichkeit solche Interaktionen zu berücksichtigen, stellt das Programm XPLOR-NIH zur Verfügung. Werden diese Parameter berücksichtigt, erfolgt eine Annäherung der Proteine an natürliche Bedingungen, wie auch eine Annäherung an eine natürlichere Struktur. Ergebnis

36 KAPITEL 3. BERECHNUNG DER NMR-STRUKTUR VON PPAR γ -LBD

dieses Verfahrens ist eine Strukturverbesserung (waterrefinement) [Lin99, Xia02], welche auch in vorliegender Arbeit angewendet wurde. Für die Strukturverbesserung wurden die zehn energetisch besten Strukturen aus der Rechnung mit DYANA und die entsprechenden Strukturinformationen verwendet. Die Statistik der Rechenparameter für die Strukturrechnung sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Die Methode (nach LINGE und SPRONK [Lin03]) ergab für das Rückgrat eine leichte Verschlechterung der RMSD-Werte auf 0,188 nm und für alle Atome auf 0,261 nm. Nach dieser Berechnung wurde ersichtlich, dass sich wesentlich mehr Winkel-Kombinationen im bevorzugten Bereich befanden. Der Wert erhöhte sich von 63,5 % auf 84,3 %. Die Abbildungen 3.12 und 3.13 zeigen die verbesserte Struktur sowie das Bündel dieser verbesserten Struktur. Eine Gegenüberstellung der RMSD- und Diederwinkel-Werte vor und nach der Strukturverbesserung (waterrefinement) ist in Tabelle 3.4 zu sehen.

Wie bereits erwähnt, ist der Bereich von Aminosäure 250-276 sowohl in der NMR-Struktur als auch in der Röntgenstruktur schlecht definiert. Dieser schlecht definierte Bereich zeichnet sich im NMR-Struktur-Bündel durch hohe Werte des sequentiellen RMSD aus. Auch die Röntgenstruktur weist hier hohe B-Faktoren sowie fehlende Elektronendichte (Aminosäure 263-273) in diesem Bereich auf (Abbildungen 3.14, 3.15 und 3.16). Die hohen sequentiellen RMSD-Werte und B-Faktoren in dieser Region deuten auf eine hohe Beweglichkeit dieser Aminosäuren hin. Vernachlässigt man diese Region bei der Bestimmung des RMSD-Wertes, verbessert sich dieser für das Rückgrat auf 0,138 nm und für alle Atome auf 0,201 nm.

Der ISIC-Algorithmus stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Struktur zu verbessern. Im folgenden Abschnitt wird näher auf diese Methode eingegangen.

NOE-Kontakte		Anzahl
intraresiduelle (i,i)		1206
sequentielle (i,i+1)		508
kurzreichweitige (i,i+j, 2≤j≤4)		337
langreichweitige (i,i+j, j≥5)		301
Wasserstoffbrücken		225
Diederwinkel		439
Gesamt		3017
RMSD		nm
Bereich 207-249,277-476 (Rückgrat)		0,138
Bereich 207-249,277-476 (alle Atome)		0,207
Gesamt (Rückgrat)		0,188
Gesamt (Rückgrat)		0,261
NOE-Verletzungen		Anzahl
Verletzungen < 0,05 nm		9633
Verletzungen > 0,05 nm		3567
Ramachandran-Plot		
bevorzugter Bereich		84,3 %
erlaubter Bereich		13,1 %

Tabelle 3.3: Statistik der Strukturrechnung für die PPAR γ -LBD gebunden mit Rosiglitazon.

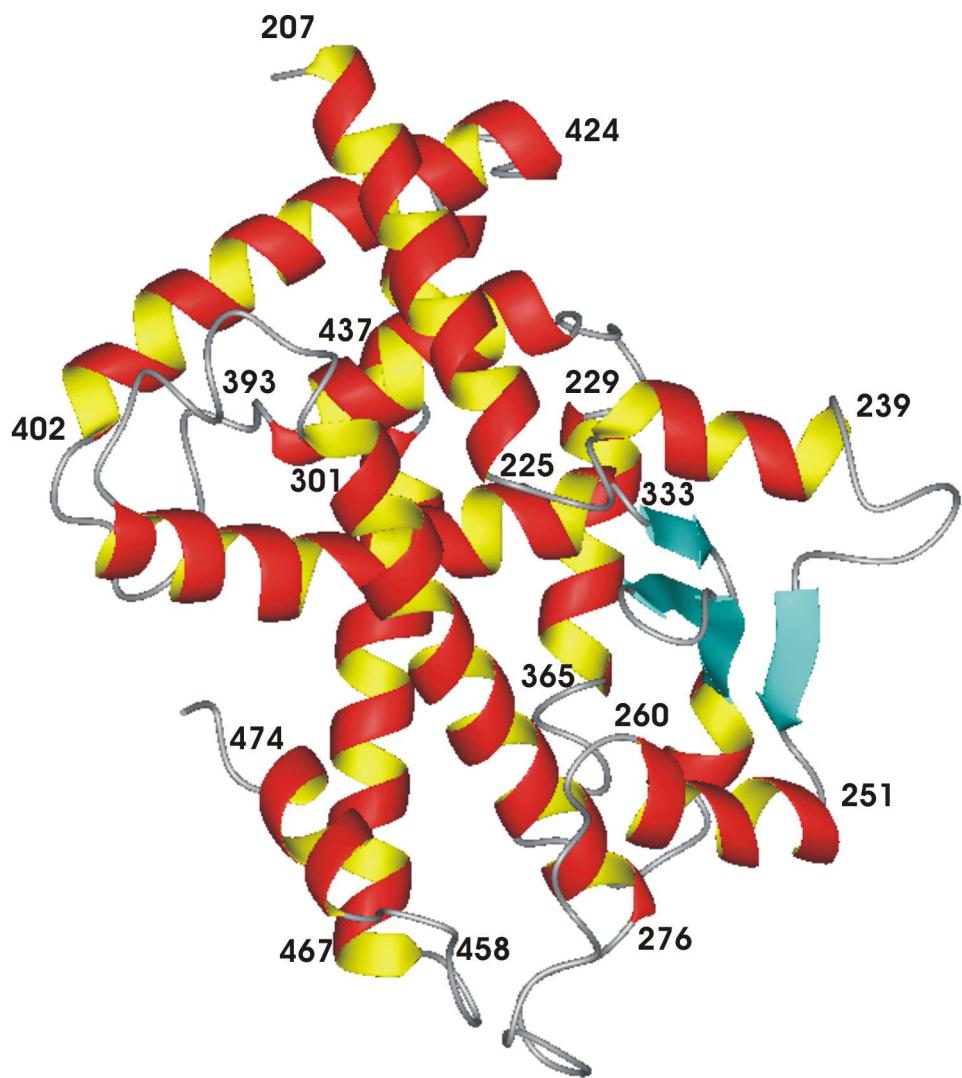


Abbildung 3.12: NMR-Struktur der PPAR γ -LBD, die mithilfe des Waterrefinement verbessert wurde. Dargestellt ist die Struktur mit der niedrigsten Energie.

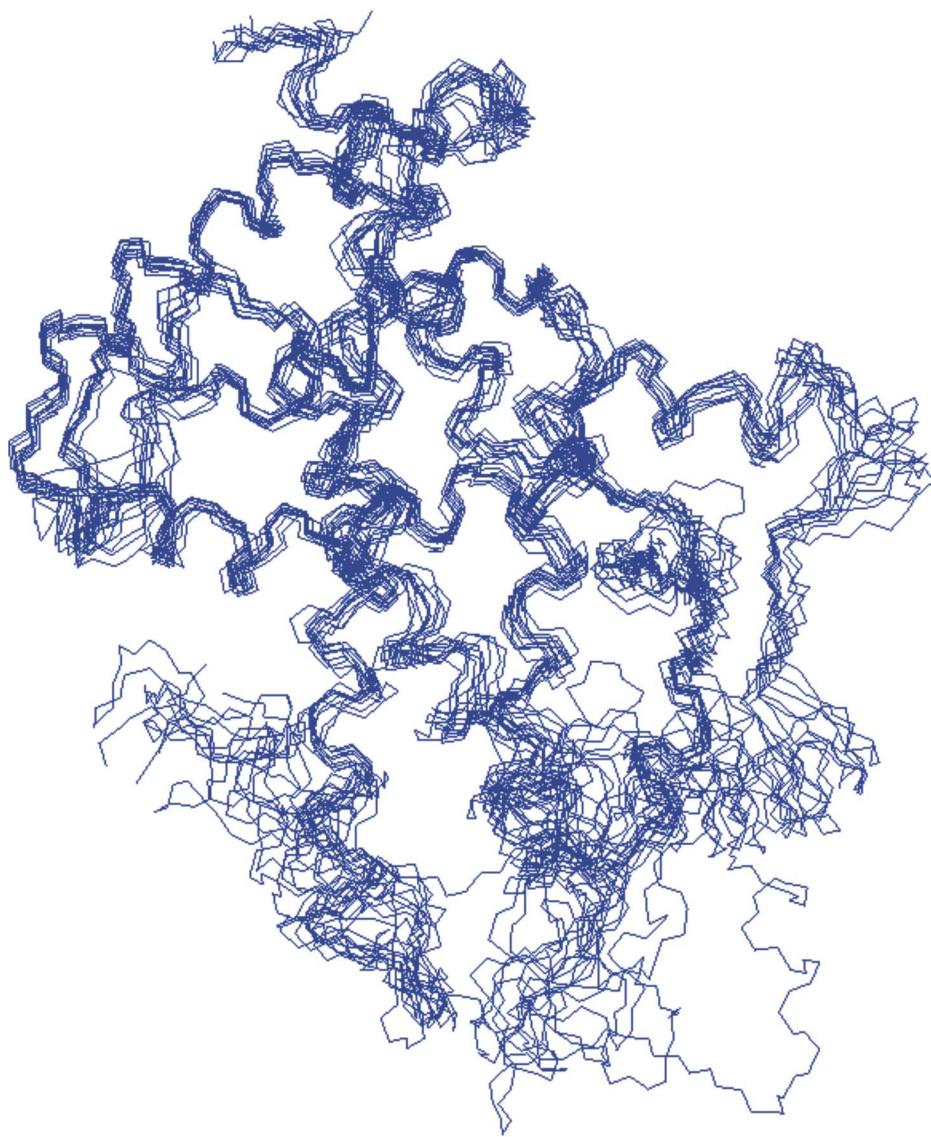


Abbildung 3.13: Bündel der NMR-Struktur der PPAR γ -LBD, das mithilfe des Waterrefinement verbessert wurde. Dargestellt ist eine Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Strukturen.

	DYANA-Rechnung	Waterrefinement
RMSD		
Rückgrat	0,179 nm	0,188 nm
alle Atome	0,249 nm	0,261 nm
Ramachandran		
bevorzugter Bereich	63,5 %	84,3 %
zusätzlich erlaubter Bereich	28,1 %	11,6 %
erweitert erlaubter Bereich	6,2 %	1,5 %
nicht erlaubter Bereich	2,1 %	2,6 %

Tabelle 3.4: Gegenüberstellung von RMSD- und Ramachandran-Werten für die NMR-Struktur vor (links) und nach (rechts) dem Waterrefinement. Die RMSD-Werte erhöhten sich leicht, die Werte für den Ramachandran-Plot im bevorzugten Bereich erhöhten sich um 20 %.

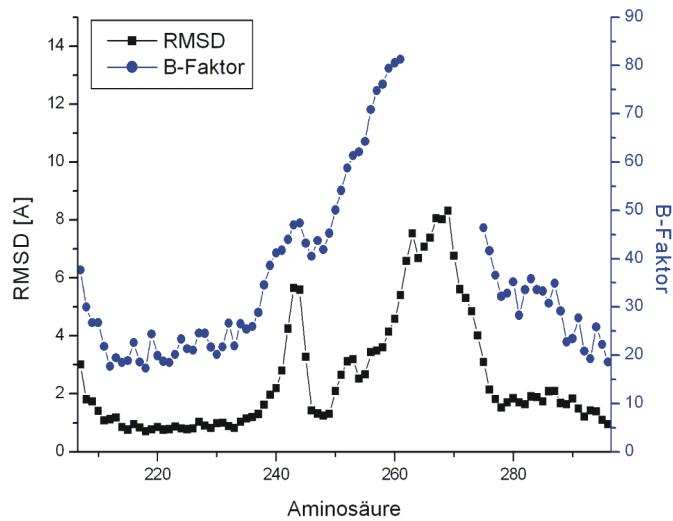


Abbildung 3.14: Sequentieller RMSD des Rückgrats der zehn energetisch günstigsten NMR-Strukturen (nach dem Waterrefinement) und B-Faktoren der Röntgenstruktur aufgetragen gegen die Sequenz von $PPAR\gamma$ -LBD, Aminosäuren 207-296.

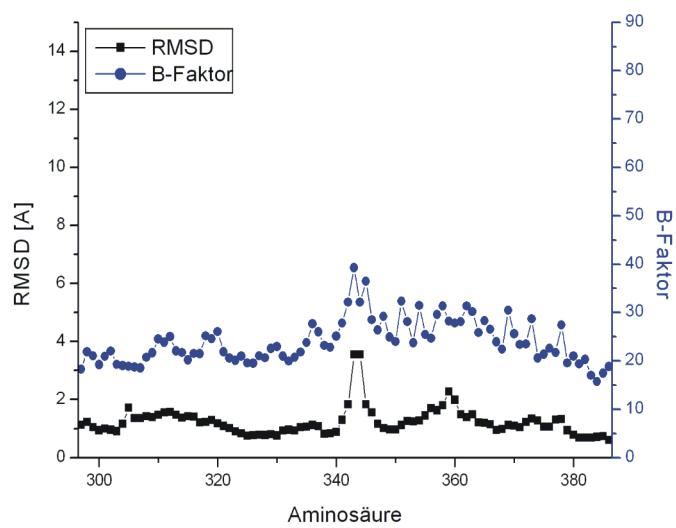


Abbildung 3.15: Sequentieller RMSD des Rückgrats der zehn energetisch günstigsten NMR-Strukturen (nach dem Waterrefinement) und B-Faktoren der Röntgenstruktur RMSD und B-Faktoren aufgetragen gegen die Sequenz von *PPAR γ -LBD*, Aminosäuren 297-386.

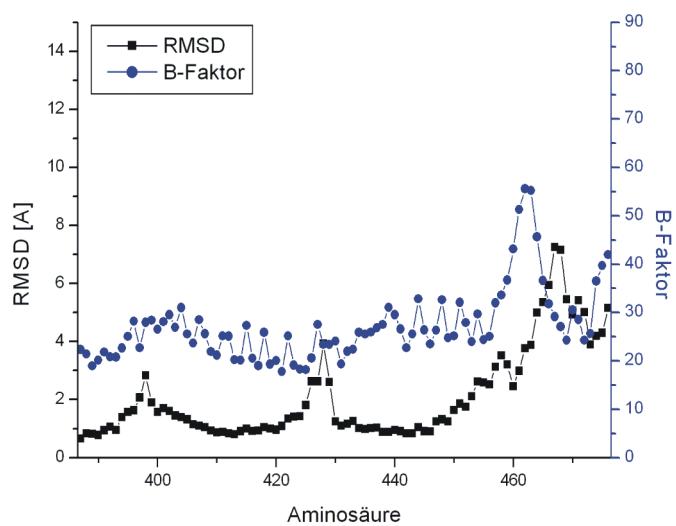


Abbildung 3.16: Sequentieller RMSD des Rückgrats der zehn energetisch günstigsten NMR-Strukturen (nach dem Waterrefinement) und B-Faktoren der Röntgenstruktur RMSD und B-Faktoren aufgetragen gegen die Sequenz von $PPAR\gamma$ -LBD, Aminosäuren 387-476.

Konfidenzniveau	99 %
Abstände	
Abstandsbereich	0,18 nm - 1,50 nm
Ausgewählte Atome	N
Anzahl	5021
Winkel	
Ausgewählte Winkel	$\Phi, \Psi, \chi_1, \chi_2, \chi_{21}, \chi_{22}, \chi_3, \chi_{31}, \chi_{32}, \chi_4, \chi_5, \chi_6$
Anzahl	1180
Wasserstoffbrücken	
Donatoren	HN
Akzeptoren	O
Anzahl	149

Tabelle 3.5: PERMOL-Parameter zur Erzeugung der Distanz- und Winkelinformationen aus der Röntgenstruktur von PPAR γ -LBD, die für die DYANA-Rechnung verwendet wurden, um das Röntgenbündel zu erzeugen.

3.3.3 Verbesserung der Struktur von PPAR γ -LBD mit dem ISIC-Algorithmus

Zur weiteren Strukturverbesserung wurde der ISIC-Algorithmus angewendet, der im Programm Auremol integriert ist. Für die Rechnungen ließ sich eine Röntgenstruktur der PPAR γ -LBD im gebundenen Zustand [Nol98] (BMRB: 2prg) verwenden. Das Ziel bestand darin, das Bündel der zehn NMR-Strukturen weiter zu verbessern. Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, wurden aus der Röntgenstruktur insgesamt 6350 Strukturinformationen erzeugt. Die Strukturinformationen setzten sich wie folgt zusammen (vgl. Tabelle 3.5): 5021 Abstände, 149 Wasserstoffbrücken und 1180 Winkel.

Mithilfe dieser Strukturinformationen wurden mit dem Moleküldynamikpro-

Konfidenzniveau	99 %
Abstände	
Abstandsbereich	0,18 nm - 1,50 nm
Ausgewählte Atome	N
Anzahl NMR	7163
Anzahl Röntgen	6231
Winkel	
Ausgewählte Winkel	$\Phi, \Psi, \chi_1, \chi_2, \chi_{21}, \chi_{22}, \chi_3, \chi_{31}, \chi_{32}, \chi_4, \chi_5, \chi_6$
Anzahl NMR	1303
Anzahl Röntgen	1303
Wasserstoffbrücken	
Donatoren	HN
Akzeptoren	O
Anzahl NMR	125
Anzahl Röntgen	157

Tabelle 3.6: PERMOL-Parameter zur Erzeugung der Strukturinformationssätze R_1^* und R_2^* aus dem NMR-Bündel und dem Röntgenbündel von $PPAR\gamma$, die für die Kombination verwendet wurden.

gramm DYANA 1024 Strukturen berechnet und die acht besten hinsichtlich der DYANA-Zielfunktion ausgewählt. Aus diesem Bündel der Röntgenstrukturen konnte der Satz von Strukturinformationen R_2^* erzeugt werden. R_2^* besteht aus 6231 Abstandsinformationen, 1303 Winkelinformationen und 157 Wasserstoffbrückeninformationen. Aus dem vorher berechneten Bündel der NMR-Strukturen wurden 7163 Abstands-Informationen, 1303 Winkelinformationen und 125 Wasserstoffbrücken-Informationen ermittelt, die den Satz von Strukturinformationen R_1^* definieren. Die Parameter zu den Sätzen der Strukturinformationen R_2^* und R_1^* sind in Tabelle 3.6 aufgelistet.

Parameter	
Winkelfilter	Bevorzugte Regionen, GLY, PRO, CHI1-CHI2: <level 2
Wasserstoffbrücken Grenzwert	0,75 %
Wasserstoffbrücken Austausch	0,90 %
Signifikanzniveau	0,02 %
Anzahl	
Abstände	2769
Winkel	284
Wasserstoffbrücken	41

Tabelle 3.7: Parameter für die Kombination der Strukturinformationssätze R_1^* und R_2^* und die jeweilige Anzahl für PPAR γ -LBD.

Im nächsten Schritt wurden die beiden Strukturinformationssätze R_2^* und R_1^* miteinander kombiniert und der Strukturinformationssatz R_0 erzeugt. Die Parameter von R_0 befinden sich in Tabelle 3.7.

Mithilfe dieses Satzes an Strukturinformationen wurden mit DYANA 1024 Strukturen berechnet und die zehn besten hinsichtlich der DYANA-Zielfunktion ausgewählt. Das Ergebnis war eine in allen Bereichen sehr gut definierte Struktur (Abbildung 3.17). Insbesondere der Bereich zwischen der Helix 2a und Helix 3 konnte durch diese Methode sehr gut charakterisiert werden.

Um die Qualität der berechneten Strukturen (NMR-Struktur, Bündel der Röntgenstruktur und ISIC-Struktur) zu vergleichen, wurden der RMSD-Wert, der Ramachandran-Plot und der Auremol-R-Wert [Gro00] verwendet. Die Werte sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Eine deutliche Verbesserung der Struktur zeigt sich in den Werten des RMSD.

Qualitätskriterium	NMR	Röntgenbündel	ISIC
RMSD (Rückgrat)	0,188 nm	0,184 nm	0,0189
R-Wert (PWAUR)	0,600	0,761	0,633
Ramachandran Plot			
bevorzugte Region	84,3 %	86,3 %	87,4 %
zusätzlich erlaubte Region	11,6 %	12,7 %	10,7 %
erweiterte erlaubte Region	1,5 %	1,0 %	1,4 %
nicht erlaubte Region	2,6 %	0,0 %	0,5 %

Tabelle 3.8: Qualitätsvergleich für die NMR-Struktur, das Röntgenbündel und die ISIC-Struktur von PPAR γ -LBD.

Für das Rückgrat reduzierte sich der Wert von 0,188 nm auf 0,0189 nm. Der prozentuale Anteil der Aminosäuren in den bevorzugten, zusätzlich erlaubten und erweitert erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots konnte von 97,4 % auf 99,5 % erhöht werden. Zusammengefasst ließ sich die Struktur der PPAR γ -LBD nochmals deutlich verbessern.

Mithilfe des ISIC-Algorithmus wurden die NMR-Struktur und die Röntgenstruktur im ungebundenen Zustand [Nol98] (BMRB: 1prg) miteinander kombiniert. Anschließend wurden die zwei Strukturen, die mittels ISIC-Algorithmus berechnet wurden, miteinander verglichen (NMR-Struktur und Röntgenstruktur gebunden vs. NMR-Struktur und Röntgenstruktur ungebunden). Für die Strukturberechnung der NMR-Struktur mit der Röntgenstruktur im ungebundenen Zustand wurden die in Tabelle 3.9 gezeigten Strukturinformationen verwendet.

Abbildung 3.18 zeigt eine Überlagerung der zehn energieärmsten Strukturen, die mit dem Moleküldynamikprogramm DYANA berechnet wurden.

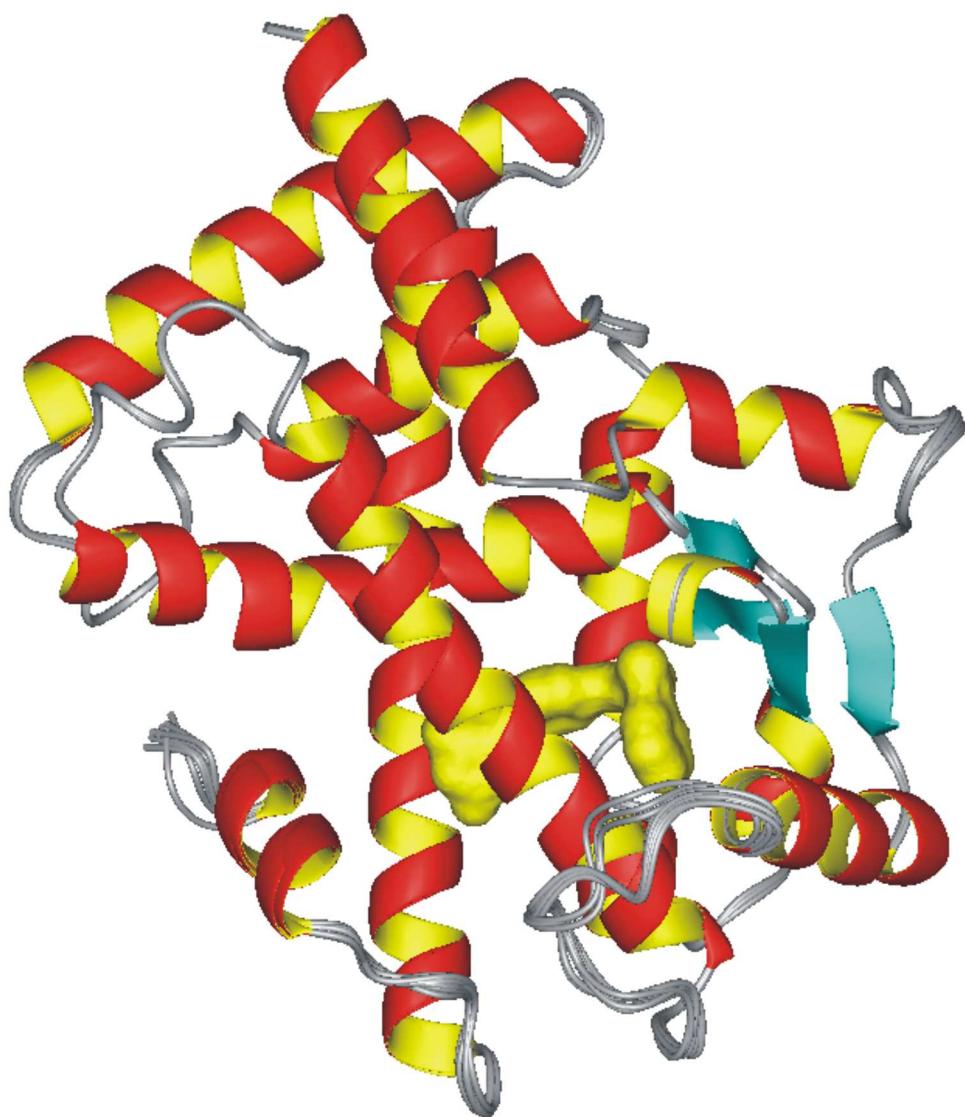


Abbildung 3.17: Berechnete Struktur von PPAR γ -LBD durch die Kombination von NMR- und Röntgenstruktur im gebundenen Zustand mit dem ISIC-Algorithmus. Gezeigt wird die Lage des Liganden Rosiglitazon (gelb) in der Ligandbindetasche der PPAR γ -LBD.

Parameter	
Winkelfilter	Bevorzugte Regionen, GLY, PRO, CHI1-CHI2: <level 2
Wasserstoffbrücken Grenzwert	0,75 %
Wasserstoffbrücken Austausch	0,90 %
Signifikanzniveau	0,02 %
Anzahl	
Abstände	4639
Winkel	545
Wasserstoffbrücken	158

Tabelle 3.9: Parameter für die Kombination der Strukturinformationssätze R_1^* (NMR-Struktur) und R_2^* (Röntgenstruktur im ungebundenen Zustand) und die jeweilige Anzahl für PPAR γ -LBD.

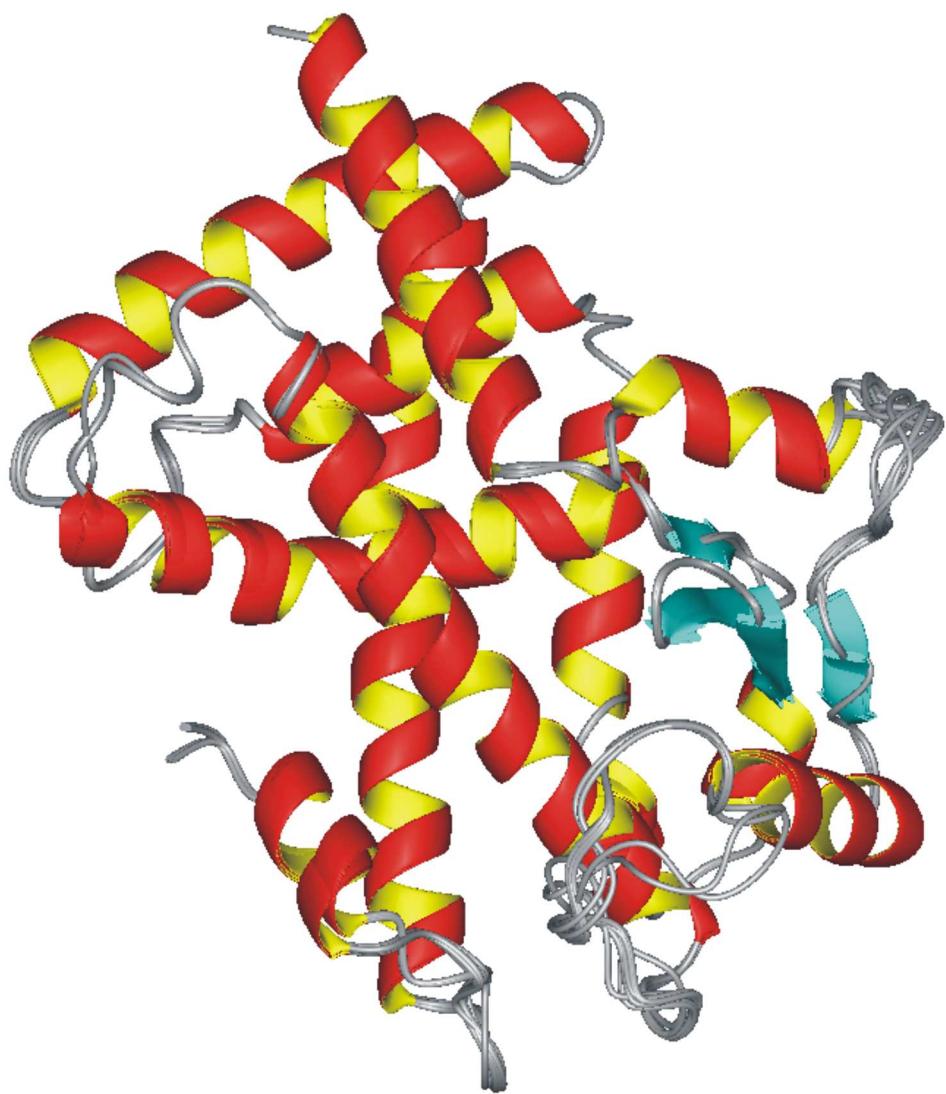


Abbildung 3.18: Berechnete Struktur von PPAR γ -LBD durch die Kombination von NMR- und Röntgenstruktur im ungebundenen Zustand mit dem ISIC-Algorithmus.

3.4 Diskussion

Die Struktur von Proteinen kann vor allem durch zwei Methoden experimentell bestimmt werden: (1) Die Röntgenkristallographie und (2) die NMR.

Mithilfe der *Röntgenkristallographie* wird die Interaktion der Röntgenstrahlen mit den Elektronen von Molekülen, die in einem Kristall angeordnet sind, genutzt, um eine Elektronendichte zu erzeugen. Dadurch lässt sich die mittlere Position der Atome in einem Kristall bestimmen. Der Vorteil der Röntgenkristallographie liegt darin, dass es keine Größenbeschränkung der zu untersuchenden Proteine gibt.

Im Gegensatz dazu hat die *NMR* durchaus ihre Berechtigung und auch Vorteile. Das Kristallisieren von Proteinen kann eine sehr schwierige und zeitintensive Arbeit und für manche Proteine sogar unmöglich sein. Der große Vorteil der NMR liegt darin, dass Proteine in wässriger Lösung und somit in natürlicher Umgebung untersucht werden können.

Bei PPAR γ sind sich Röntgenstruktur und NMR-Struktur sehr ähnlich und unterscheiden sich in der Tertiärstruktur nur geringfügig. Dies zeigt sich bereits in der geringen Erhöhung des RMSD für das Rückgrat (N, C $^\alpha$, C) von 0,188 nm auf 0,204 nm bei der Überlagerung des NMR-Bündels mit der Röntgenstruktur. Große Unterschiede stellt man jedoch bei der Helix 3 und der C-terminalen Helix 12 fest. Diese beiden Helices bilden die beiden Seiten der Ligandbindetasche. Sowohl in der Röntgenstruktur als auch in der NMR-Struktur ist der Bereich zwischen der Helix 2a und Helix 3 schlecht definiert. Dies spiegelt sich auch in den hohen RMSD-Werten der NMR und den hohen B-Faktoren der Röntgenstruktur wider.

Es wurde versucht eine Korrelation zwischen den Röntgenstrukturen des gebundenen und ungebundenen Zustandes und den Voluminaänderungen in den ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren zu finden. Die Volumina der ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren wurden jeweils durch die Aminosäure F370 normiert. Die Voluminaände-

rungen ließen sich durch folgende Beziehung berechnen:

$$\Delta V = \sqrt{\frac{(V_g - V_u)^2}{V_g^2}} \quad (3.2)$$

wobei V_g dem Volumen im gebundenen Zustand und V_u dem Volumen im ungebundenen Zustand entspricht. Die Volumina wurden jeweils durch das Volumen der Aminosäure Phe 370 normiert. Fehlenden Signalen wurde der Wert 0,1 zugeordnet. Anschließend wurden die Röntgenstrukturen anhand der Signale überlagert, deren Volumenänderung kleiner als 10 % war. Der sequentielle RMSD dieser Überlagerung und die Volumenänderung wurden gegen die Sequenz aufgetragen (vgl. Abbildungen 3.19 - 3.21). Eine Korrelation zwischen dem sequentiellen RMSD der Röntgenstrukturen (mit und ohne Ligand) und der Volumenänderung in den HSQC-Spektren könnten einen Hinweis auf einen Austausch zwischen der gebundenen und ungebundenen Struktur geben. Allerdings konnte keine Korrelation festgestellt werden.

Wie aus den Röntgenstrukturen ersichtlich, ändert die Helix 12 ihre Position bei der Aktivierung durch die Bindung eines Liganden. Die Abbildungen 3.22 und 3.23 zeigen die unterschiedlichen Orientierungen der C-terminalen Helix. Sowohl in den berechneten NMR-Strukturen als auch in den Strukturen, die durch den ISIC-Algorithmus verbessert wurden, nimmt die C-terminale Helix von PPAR γ -LBD eine Orientierung ein, die sich zwischen den beiden Orientierungen der Röntgenstruktur befindet (Abbildung 3.24). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass in Lösung beide Konformationen, gebunden wie ungebunden, vorliegen. Eine Erklärung dieses Schlusses besteht darin, dass die Signalvolumina der NOESY-Spektren, und die daraus berechneten Distanzen, Mittelwerte aller in Lösung befindlichen Konformationen darstellen. Durch die Ähnlichkeit der C-terminalen Helix der berechneten Strukturen mit der gebundenen Form der Röntgenstruktur, lässt sich darauf schließen, dass die gebundene Konformation bei der Anwesenheit von Rosiglitazone in Lösung vorherrschend ist.

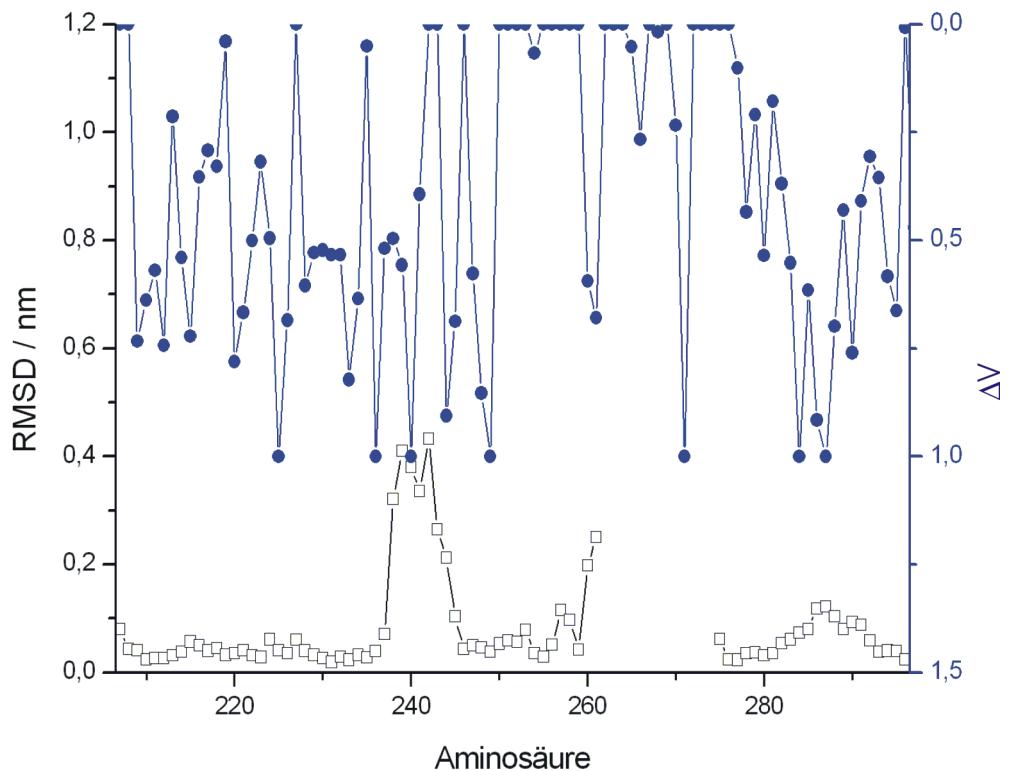


Abbildung 3.19: Auftragung des sequentiellen RMSD der gebundenen und ungebundenen Röntgenstruktur und der Volumenänderung des gebundenen und ungebundenen ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektrums gegen die Aminosäuren 207-296.

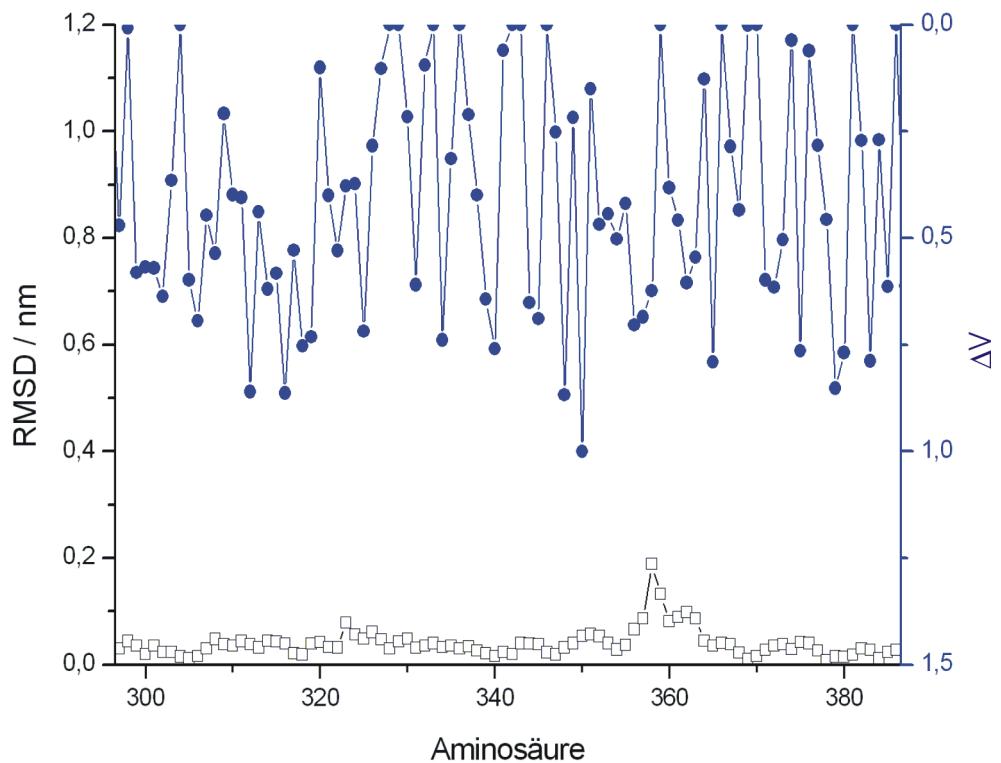


Abbildung 3.20: Auftragung des sequentiellen RMSD der gebundenen und ungebundenen Röntgenstruktur und der Volumenänderung des gebundenen und ungebundenen ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektrums gegen die Aminosäuren 207-296.

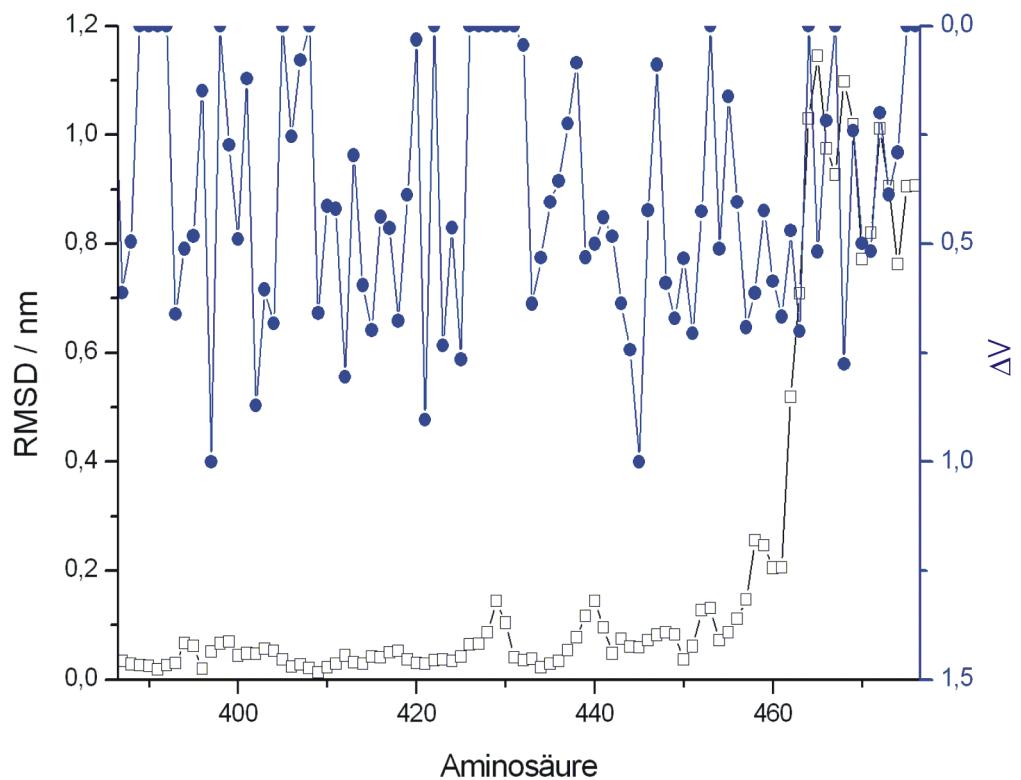


Abbildung 3.21: Auftragung des sequentiellen RMSD der gebundenen und ungebundenen Röntgenstruktur und der Volumenänderung des gebundenen und ungebundenen ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektrums gegen die Aminosäuren 207-296.

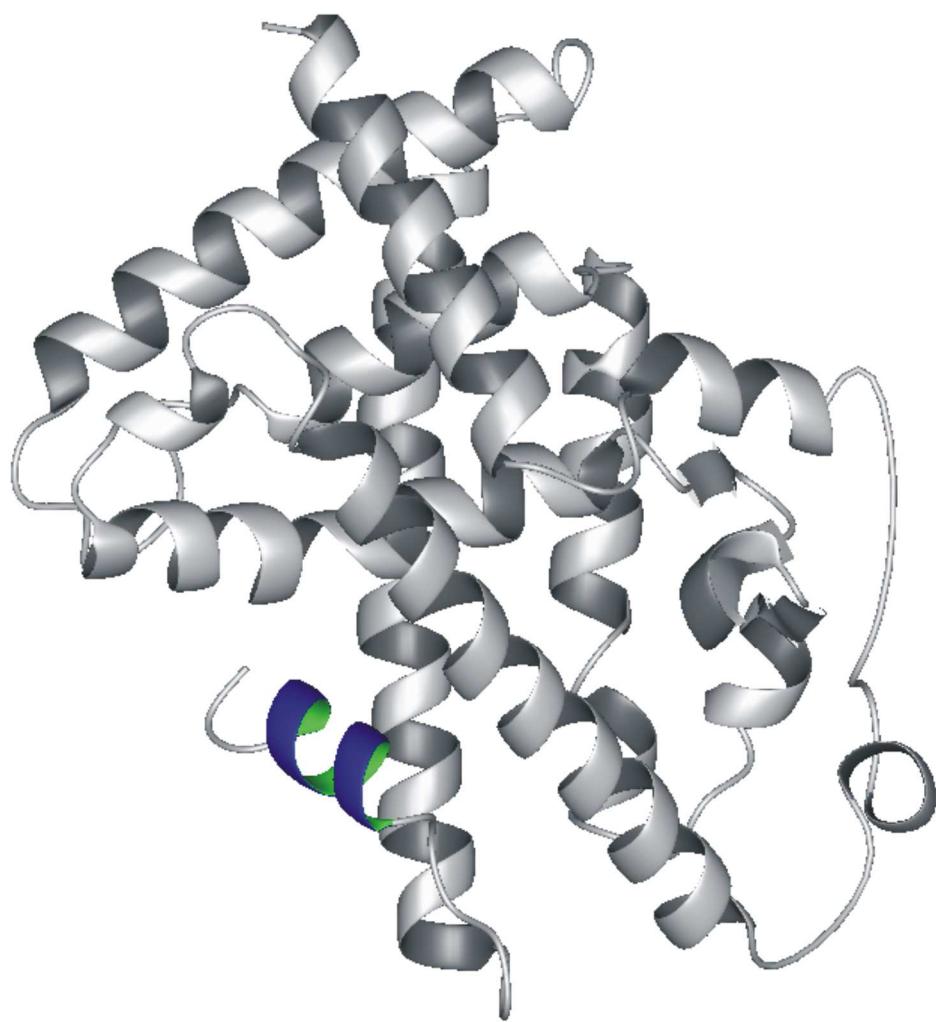


Abbildung 3.22: Stellung der C-terminalen Helix der Röntgenstruktur von PPAR γ -LBD im gebundenen Zustand.

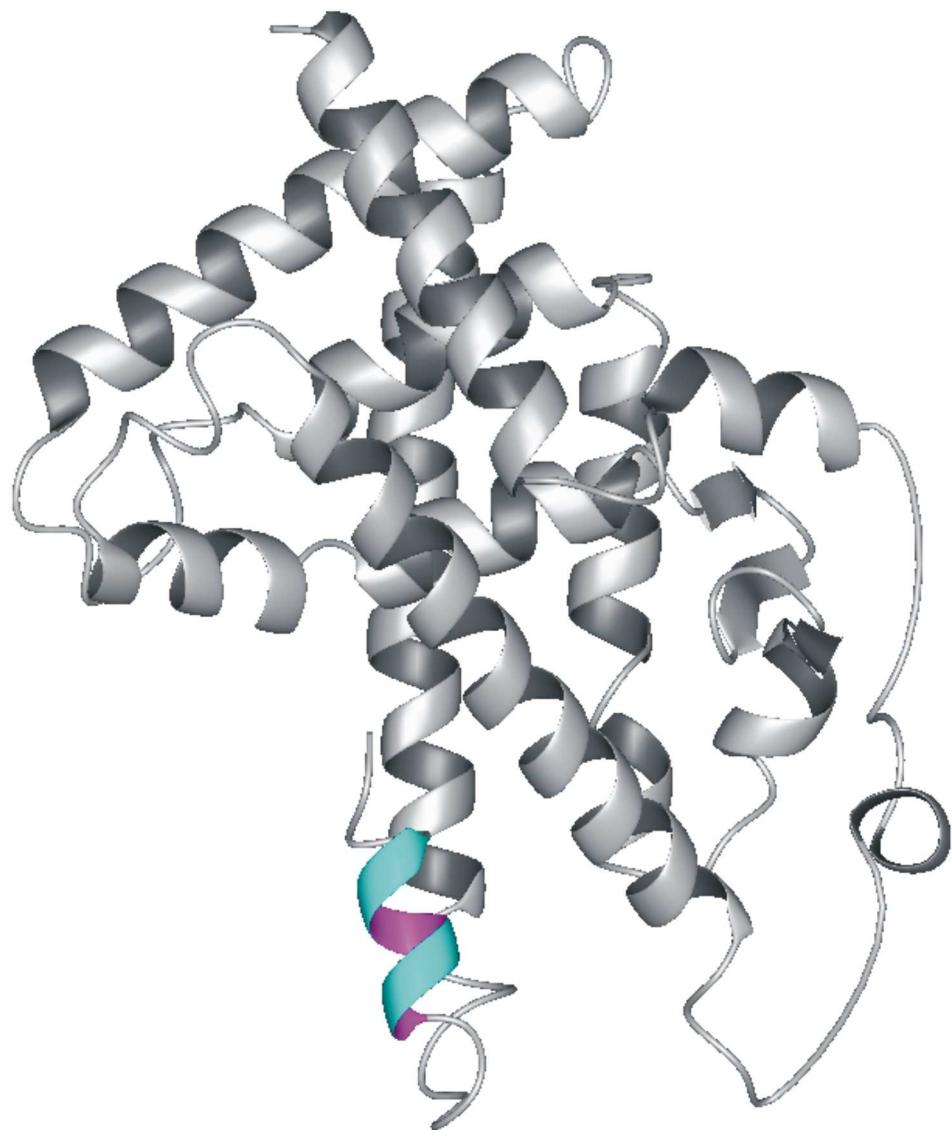


Abbildung 3.23: Stellung der C-terminalen Helix der Röntgenstruktur von $PPAR\gamma$ -LBD im ungebundenen Zustand.

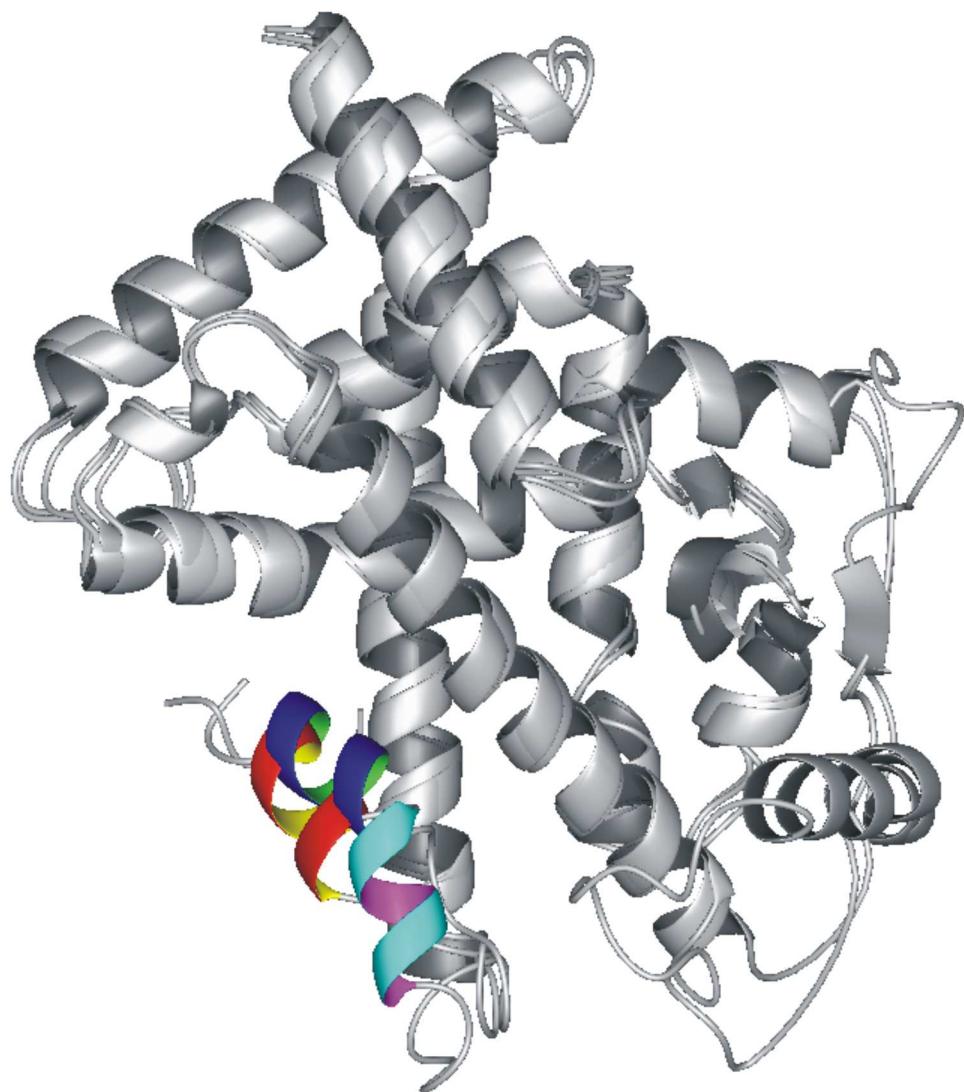


Abbildung 3.24: Stellung der C-terminalen Helix der NMR-Struktur von PPAR γ -LBD im Vergleich mit den Röntgenstrukturen im gebundenen und ungebundenen Zustand.

Mit dem ISIC-Algorithmus wurde die NMR-Struktur jeweils mit der Röntgenstruktur im gebundenen Zustand und mit der Röntgenstruktur im ungebundenen Zustand miteinander kombiniert. Die beiden erhaltenen Strukturbündel weisen nur kleine Unterschiede auf. Am deutlichsten wird ein Unterschied in der C-terminalen AF2-Helix, da sich diese etwas in die Position des ungebundenen Zustandes von PPAR γ -LBD bewegt.

3.5 Zusammenfassung

In Kapitel 3 wurde beschrieben, wie die Strukturberechnung von PPAR γ -LBD mit NMR-Daten realisiert werden konnte. Mit nur 11,2 Strukturinformationen pro Aminosäure wurde eine Struktur berechnet, die noch nicht in allen Bereichen als gut zu bezeichnen war. Dieses Defizit konnte durch zwei Methoden entscheidend verbessert werden: (1) Das Waterrefinement und (2) den ISIC Algorithmus.

Durch das *Waterrefinement* wurde der Großteil (über 84 %) der Diederwinkel in den bevorzugten Bereich des Ramachandran-Plots geschoben. Die erhaltene Struktur entspricht somit einer natürlicheren Struktur, die in wässriger Lösung vorliegt.

Einen entscheidenden Anteil, in allen Bereichen eine definierte Struktur des Proteins zu erhalten, trägt die Methode des *ISIC-Algorithmus* bei. Im Fall von PPAR γ -LBD wurde die Röntgenstruktur verwendet, die NMR-Struktur zu optimieren. Es konnte damit nicht nur der RMSD-Wert deutlich verbessert werden, sondern auch die Anzahl der Diederwinkel im bevorzugten Bereich.

Ein Vergleich des NMR-Strukturbündels mit den Röntgenstrukturen (gebundener und ungebundener Zustand) lässt zudem darauf schließen, dass die PPAR γ -LBD mit Ligand in Lösung sowohl im gebundenen als auch zu einem kleinen Anteil im ungebundenen Zustand vorliegt.

Kapitel 4

Hochdruck-NMR-Messungen an HPr I14A

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit stellen die Hochdruckmessungen an HPr I14A dar, auf die Kapitel 4 ausführlich eingehen wird. Den Aufbau der Anlagen beschreibt Kapitel 4.1. Die verwendeten Materialien und eingesetzten Methoden werden in Kapitel 4.2 vorgestellt. In Kapitel 4.3 wird auf die Ergebnisse näher eingegangen, die anschließend in Kapitel 4.4 diskutiert werden. Abschließend wird in Kapitel 4.5 eine kurze Zusammenfassung gegeben.

4.1 Aufbau der Hochdruckanlagen

4.1.1 Hochdruckzellen

Eine zentrale Rolle für Hochdruckmessungen spielen Hochdruckzellen [Yam74, Yam01, Pri97], denn sie ermöglichen es, Proben nahe am Probenkopf unter Druck zu messen. Dabei müssen diese Zellen enorme Druckbelastungen aushalten und dürfen außerdem die Messergebnisse nicht beeinträchtigen, z. B. durch Artefakte oder durch ein zu geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Abbildung 4.1 zeigt den schematischen Aufbau, der in dieser Arbeit verwendeten Hochdruckzellen. Diese

Zellen bestehen entweder aus Quarz-Glas (Suprasil ®) oder Borosilikat (Duran ®). Der Außendurchmesser der Zellen beträgt am dicken Ende 4,0 mm und er verengt sich nach oben auf ca. 1 mm. Diese Verengung reduziert einerseits die nötige Probenflüssigkeit und andererseits die Scherkräfte, die bei hohem Druck auf die Klebung des Kupfer-Beryllium-Nippels entstehen. In dieser Arbeit kamen Hochdruckzellen mit Innendurchmessern von 0,8 mm und 1,0 mm zum Einsatz. Im folgenden Abschnitt werden die sieben Bestandteile der verwendeten Hochdruckzelle und des Autoklaven näher beschrieben (vgl. auch Abbildung 4.1).

Der Kupfer-Beryllium-Nippel (2) wird mit Hilfe eines 2-Komponenten-Kleber (Eccobond) im oberen Bereich der Kapillare (1) festgeklebt. Anschließend wird ein Teflonschlauch (3) befestigt, der über den oberen Teil des Nippels gezogen wird. Dieser ist bei den Messungen dafür verantwortlich, dass der Druck auf die Probe übertragen wird (Abbildung 4.2). Ein Teflonstopfen (2) verhindert während der Messungen das Vermischen der Druckflüssigkeit mit der Probe. Nach dem Befüllen der Kapillare wird diese mittels einer Schraube (5), die ein sehr flaches Gewinde vorweist, an den Autoklaven (4) gedrückt. Der Nippel an der Kapillare hat einen um 1° Grad kleineren Winkel als das Gegenstück im Autoklaven. Dadurch wird eine sehr dünne Dichtstelle zwischen Autoklav und Kapillare erreicht. Der Berstschutz (7), der zusammen mit dem Spinner (6) an dem Autoklaven befestigt wird, verhindert eine Beschädigung des Probenkopfes. Dieser schützt bei einem Bruch der Hochdruckzelle oder bei undichten Stellen zwischen Hochdruckzelle und Autoklav den Probenkopf.

Bevor ein Drucktest an den Hochdruckzellen durchgeführt werden kann, müssen die Kapillaren auf der Innenseite mit 10 % HF angeätzt werden [Pri97]. Das Anätzen der Zellen entfernt Fehlstellen im Glas, die sich beim Erstarren des Glases bilden und folglich zu einer Verminderung der Zugfestigkeit führen könnten [Vog02].

Ein weiterer Punkt, der *vor* einem Drucktest beachtet werden sollte, sind die auftretenden Spannungen im Glas, wie Abbildung 4.3 darstellt. Diese können

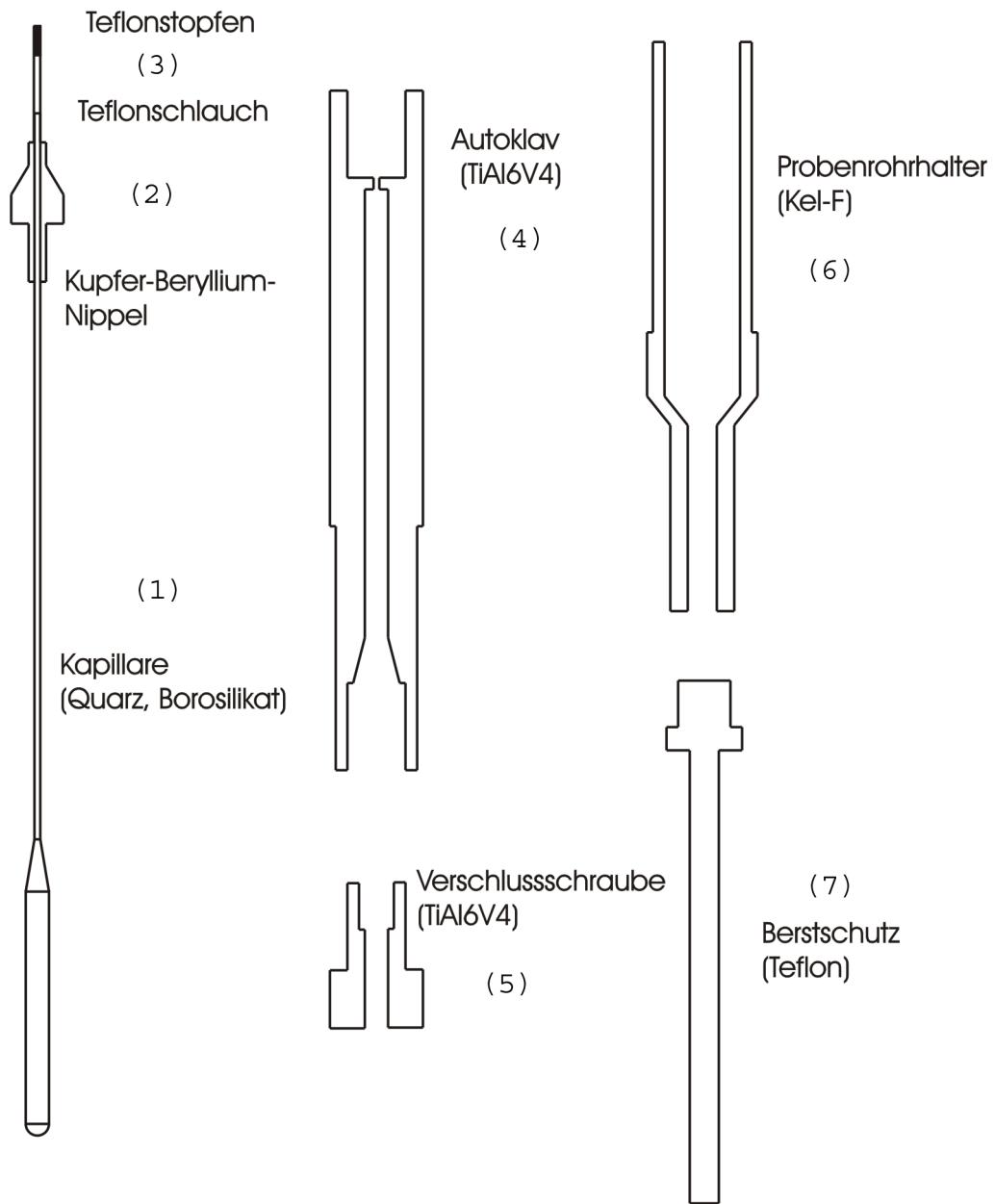


Abbildung 4.1: Links: Hochdruckzelle (1) mit angeklebtem Kupfer-Beryllium-Nippel (2), Teflonschlauch und Teflonstopfen (3). Mitte: Autoklav aus TiAl6V4 (4) mit Feststellschraube (5). Rechts: Probenrohrhalter aus Kel-F (6) und Bersts chutz aus Teflonschlauch (7).

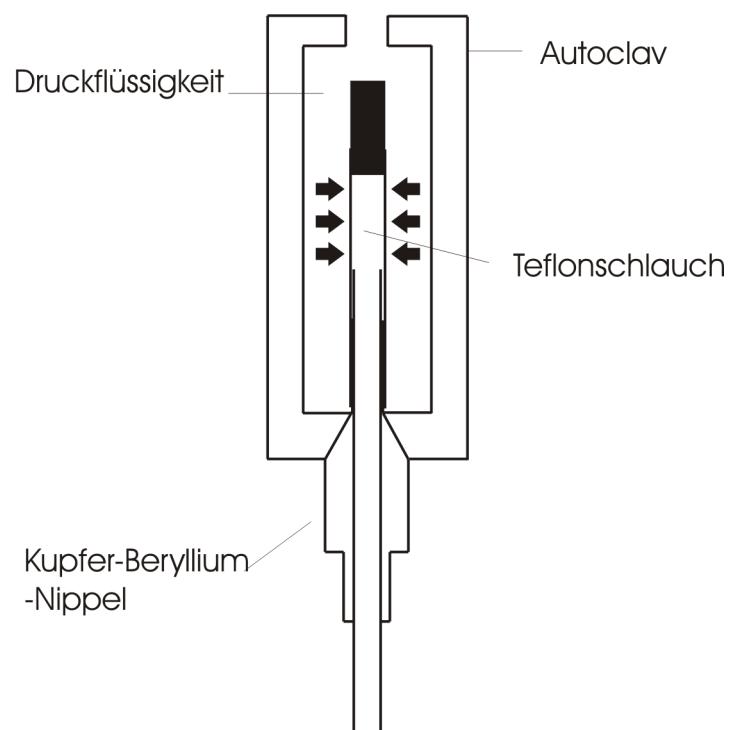


Abbildung 4.2: Der Druckübertrag an die Probe erfolgt durch das Zusammendrücken eines Teflonschlauches.

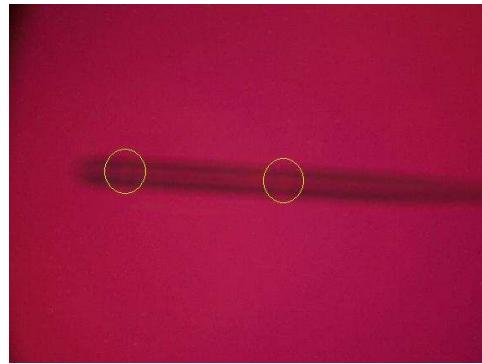


Abbildung 4.3: Die gelben Kreise markieren die Spannungen, die nach dem Ziehen und Abkühlen der Kapillaren vorhanden sind.

beseitigt werden, indem die Hochdruckzellen getempert werden. Die Spannungen entstehen durch ein zu schnelles Abkühlen der Kapillaren, die aufgrund des Wärmekoeffizienten auftreten: Die Außenwände der Kapillaren kühlen schneller ab als der innere Bereich, sie kontrahieren daher auch schneller und erzeugen dadurch Spannungen. Diese Spannungen können die Druckfestigkeit der Kapillaren beeinträchtigen. Durch ein Temperiern (Ausheizen) können die Hochdruckzellen in einen annähernd spannungsfreien Zustand überführt werden. Das Temperiern erfolgt nach einer festen Vorschrift, wird aber für Quarz und Borosilikat unterschiedlich durchgeführt. Die Quarz-Hochdruckzellen werden in einem Ofen auf 1150 °C erhitzt und für 30 Minuten auf dieser Temperatur gehalten. In den nächsten 60 Minuten erfolgt zunächst ein langsames Abkühlen der Kapillaren (1 °C pro Minute), das erst nach dieser Zeit schneller durchgeführt werden kann (Abbildung 4.4). Für die Borosilikat-Hochdruckzellen genügt ein Erhitzen auf ca. 850 °C. Diese Temperatur wird für 30 Minuten gehalten, bevor die Zellen langsam abkühlen. Diese Prozedur vermindert die Spannungen in den Kapillaren wesentlich und erhöht ebenso die Druckbelastung. Eine Testreihe von zehn Quarzkapillaren der selben Charge, von denen fünf getempert und fünf nicht getempert wurden, ergab eine Erhöhung der durchschnittlichen Druckbelastung von 50 MPa (siehe Tabelle 4.1).

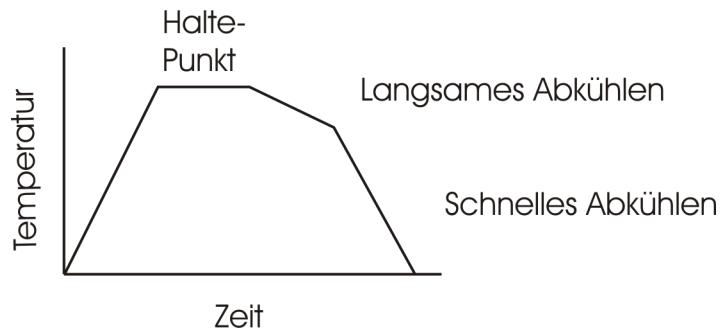


Abbildung 4.4: Vorschrift für das Tempern der Hochdruckzellen, um Spannungen in den Hochdruckzellen zu reduzieren.

Kapillaren	ungetemperte Kapillaren	getemperte Kapillaren
theo. Druckbelastung		140 MPa
Anzahl getestet	5	5
durchschnittlicher Druck	140 MPa	190 MPa
Standardabweichung	21 MPa	32 MPa

Tabelle 4.1: Durch das Tempern der Hochdruckkapillaren konnte die Druckbelastung der Hochdruckzellen gesteigert werden. Getestet wurden jeweils fünf Kapillaren.

Nach dem Ätzen und Temperiern werden die Hochdruckzellen auf Druckbelastung getestet, bevor sie für Messungen weiter verwendet werden können. Das Testen der Hochdruckzellen erfolgt durch schrittweises Erhöhen des Drucks von 25 MPa alle 15 Minuten. Zellen mit einem Innendurchmesser von einem Millimeter werden bis 220 MPa getestet, Zellen mit einem Innendurchmesser von 0,8 Millimeter bis 330 MPa. Diese Tests erlauben Messungen bis 200 MPa bzw. 300 MPa mit einer Sicherheit von 10 %.

Theoretisch kann die maximale Druckbelastung der Hochdruckzellen durch die Formel 4.1 abgeschätzt werden [She87]:

$$p_{max} = \tau \ln \left(\frac{d_o^2}{d_i^2} \right) \quad (4.1)$$

wobei τ den Druckfestigkeitskoeffizienten, d_o den Außendurchmesser und d_i den Innendurchmesser der Kapillaren darstellt. Der Druckfestigkeitskoeffizient τ wird durch die unterschiedlichen Materialen bestimmt: Für Borosilikat $7 \frac{N}{mm^{-2}}$, für Quarz Glas $50 \frac{N}{mm^{-2}}$ und für Sapphire $150 \frac{N}{mm^{-2}}$. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Hochdruckzellen auch für höheren Druck (als den theoretisch bestimmten) verwendet werden können.

Um bei einem Bruch der Kapillare im Spektrometer den Probenkopf zu schützen, werden Berstschutze verwendet. Damit soll verhindert werden, dass Glassplitter und Flüssigkeit in den Probenkopf gelangen und diesen beschädigen. Im Laufe dieser Arbeit wurden Bertschütze aus verschiedenen Materialien eingesetzt. Auf die Ergebnisse der verschiedenen Materialuntersuchungen wird in Kapitel 4.3.1 näher eingegangen.

4.1.2 Aufbau für statische Messungen

Abbildung 4.5 zeigt den schematischen Aufbau der Hochdruckanlage für statische Druckmessungen, der von GAARZ und LANG entwickelt wurde [Gaa76, Lan77]. Der Druckübertrag erfolgt durch die Flüssigkeit Methylcyclohexan. Für die statischen Messungen wird der Druck durch eine handbetriebene Spindelpresse er-

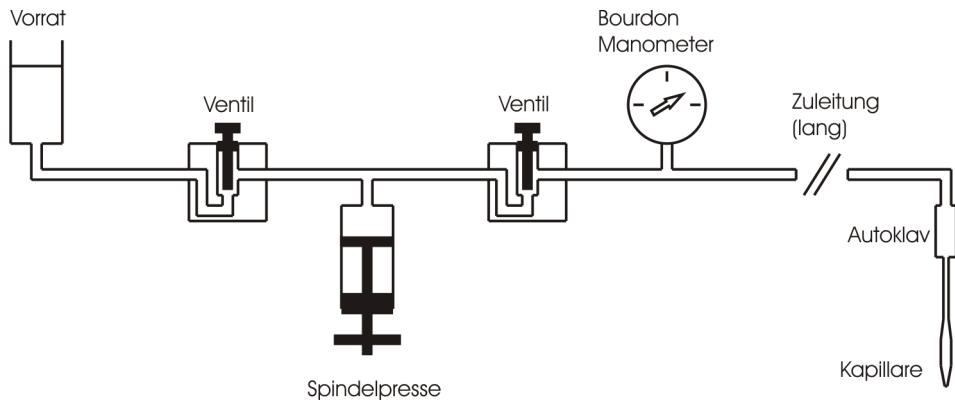


Abbildung 4.5: Schematische Zeichnung der statischen Hochdruckvorrichtung, bestehend aus einer Spindelpresse, einem Bourdon-Manometer und Absperrventilen.

zeugt. Die Druckmessung wird mit einem Bourdon-Manometer durchgeführt, das einen Messbereich von 0-400 MPa und eine Genauigkeit von $\pm 0,5$ MPa aufweist. Nach Einstellen des Drucks muss das Ventil zur Probe geschlossen werden, um einen Druckverlust durch die Spindelpresse zu vermeiden. Zusätzlich wird im Falle eines Bruchs der Hochdruckzelle durch das Schließen dieses Ventils die nachfließende Menge Methylcyclohexan auf ein Minimum reduziert.

Für einen automatischen Drucktest wurde der Aufbau von HAUER [Hau81] durch einen elektromechanischen Antrieb erweitert. In dieser Versuchsanordnung ist es möglich Höchstdruck, Zeitpunkt der Druckerhöhung und die Größe der Druckerhöhung zu variieren.

4.1.3 Aufbau der Drucksprunganlage

Im Gegensatz zu statischen Druckmessungen wird der Druck bei Drucksprungexperimenten sehr schnell verändert. Somit lassen sich bei hinreichend schneller Aufnahme die Antworten des Proteins auf diese Druckänderung kennzeichnen. Bei statischer Druckmessung werden nur Gleichgewichtszustände betrachtet, die aufgrund des eingestellten Drucks sichtbar gemacht werden. Die Umstrukturierung im Protein, die durch die Druckänderung hervorgerufen wird, bleibt jedoch

bei statischen Messungen verborgen. Allerdings könnte, je nach Protein, dieser Bereich mit Drucksprungexperimenten sichtbar gemacht werden. Folglich könnte auch die Dynamik der Faltung und Entfaltung mit diesem System untersucht und besser verstanden werden. Mit diesem Verfahren ist es zudem möglich, Zustände zu bestimmten Zeitpunkten nach der Druckänderung aufzunehmen und so das zeitliche Verhalten der Probe zu untersuchen.

Bereits 1976 benutzten CLEGG und MAXFIELD eine Drucksprungeinrichtung für chemisch-kinetische Studien [Cle76]. 2002 verbesserten PEARSON et al. [Pea02] diese Anlage, um mit einem Probenvolumen von ca. 50 μl und Drucksprüngen im Bereich von 10 MPa Fluoreszenzmessungen an Proteinen im Bereich zwischen 0,01 bis 1000 ms durchzuführen. Auch in der NMR gibt es bereits seit längerem Anlagen, um Sprungexperimente durchzuführen. Zum einen existieren Temperatursprunganlagen, bei denen die Temperatur der Probe sehr schnell geändert werden kann. Zum anderen ließen sich auch Drucksprünge manuell ausführen. Hierbei wurde der Druck über eine Spindelpresse erhöht und durch das Öffnen eines Ventils an die Probe weitergeleitet. Über einen Zeitraum von mehreren Stunden konnte dann die Antwort der Probe gemessen werden. Dafür werden jedoch Proteine benötigt, die entweder ohne irreversible Bereiche hohe Temperaturen aushalten oder deren Entfaltung über einen sehr langen Zeitraum eintritt. Folglich bedeutet dies eine enorme Einschränkung bei der Wahl der zu untersuchenden Proteine, da sich vor allem die Faltung und Entfaltung bei den meisten Proteinen im Bereich von Millisekunden bis hin zu Sekunden abspielt.

ARNOLD [Arn02] gelang es, diese Probleme zu überwinden. Seine Anlage, die er während seiner Dissertation nach dem Vorbild von WOENCKHAUS et al. [Woe00] aufgebaut hat, vereint sowohl die Vorteile von PEARSON et al. [Pea02] (kleines Probenvolumen bei sehr schnellen Drucksprüngen) als auch von AKASAKA [Ak203] (hohe Drucksprungflanken).

In vorliegender Arbeit wurde die Anlage von ARNOLD [Arn02] verwendet und verbessert. Im folgenden Abschnitt wird diese Drucksprunganlage und deren

Funktionsweise näher beschrieben.

Abbildung 4.6 zeigt den schematischen Aufbau der Drucksprunganlage, die aus sechs wichtigen Bestandteilen besteht: (1) Einer pneumatisch betriebenen Druckbank, (2) drei Ventilen, (3) zwei Drucksensoren und (4) den Hochdruckleitungen, die diese Bestandteile untereinander und mit der Probe verbinden. Des Weiteren finden (5) ein Mikrokontroller und (6) ein Computer für Benutzereingaben Anwendung. Mit der pneumatisch betriebenen Druckbank wird die Höhe des gewünschten Drucksprunges eingestellt. Sie liefert einen konstanten Vordruck, der während des Betriebs nachreguliert wird. Die Ventile 1, 2 und 3 führen den eigentlichen Drucksprung durch. Ventil 1 und 2 sind zu Beginn des Drucksprungs geschlossen, wohingegen Ventil 3, das als Notventil dient, offen ist und erst nach Drücken des Notstopps schließt. Durch diesen Vorgang wird ein Nachpumpen von Druckflüssigkeit verhindert. Um einen Drucksprung zu hohem Druck durchzuführen, muss lediglich Ventil 1 geöffnet sein, das den Druck bis zur Probe weiterleitet. Im Anschluss wird das Ventil 1 wieder geschlossen und Ventil 2 geöffnet, das zu einem Druckabbau an der Probe führt. Dieser Druckabbau entsteht durch die Rückführung der Druckflüssigkeit in das Reservoir für die Druckpumpe. Im Gegensatz dazu wird für einen Drucksprung von hohem zu niedrigem Druck, zunächst die Probe unter hohen Druck gesetzt und die Ventile in umgekehrter Reihenfolge geschaltet. Durch diese Einstellungen sind auch Drucksprünge in beide Richtungen möglich. Durch manuelles Schalten der Ventile kann die Anlage auch für statische Druckmessungen verwendet werden. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Ventile für den Drucksprung wird im Folgenden näher auf jene eingegangen.

Bei den Ventilen handelt es sich um Nadelventile der Firma NovaSwiss, die durch Druckluft geöffnet und durch Federkraft geschlossen werden. In der Arbeit von WOENCKHAUS et al. [Woe00] wurden diese Ventile bereits zur Erzeugung von Drucksprüngen eingesetzt. Die Schaltzeiten der Ventile liegen bei 4 ms bei Schließen durch Federkraft und bei ca. 100 ms beim Öffnen durch Druckluft. Aufgrund

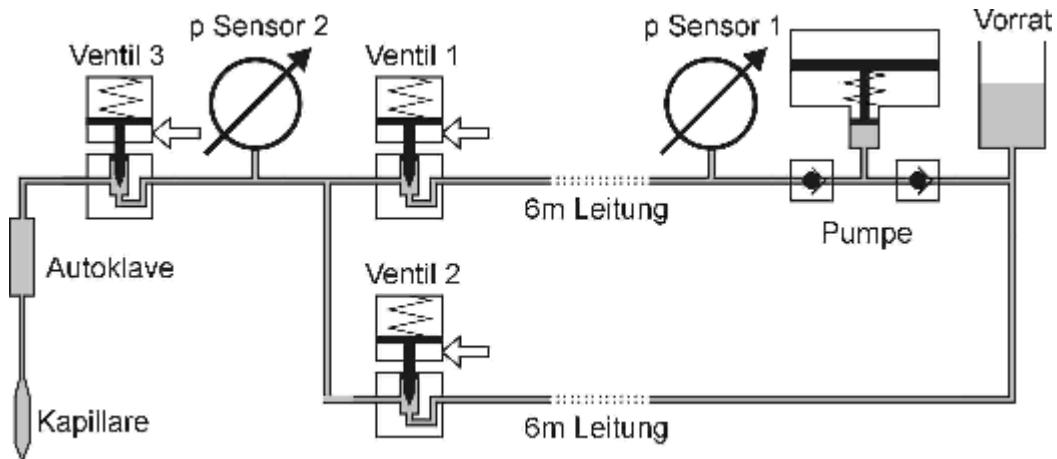


Abbildung 4.6: Schematische Darstellungen der Drucksprunganlage, nach ARNOLD [Arn02]. Die pneumatisch betriebene Druckpumpe erzeugt einen konstanten Vordruck, der durch Öffnen von Ventil 1 an die Probe weitergeleitet wird. Ventil 2 dient dazu Normaldruck an der Probe herzustellen. Ventil 3 ist ein Notventil und kann bei Bedarf geschlossen werden.

der Sicherheit wurden Air-to-open-Ventile verwendet, da sie im Normalzustand geschlossen sind und folglich ein Weiterpumpen der Druckflüssigkeit verhindern. Allerdings benötigen diese Ventile zum Öffnen eine hohe Schaltzeit. Um diese Schaltzeit zu kompensieren, übernimmt ein Steuergerät sowohl das Schalten der Ventile wie auch die Synchronisierung des Drucksprungs mit dem Spektrometer. Abbildung 4.7 zeigt eine schematische Zeichnung der Ansteuerung sowie das Steuergerät, welches eine zentrale Rolle beim Schalten der Ventile einnimmt. Das Steuergerät dient zusätzlich zum Auslesen der durch den Benutzer eingegebenen Parameter.

Um eine schnelle Druckflanke an der Probe zu erhalten, sind zwei Punkte von besonderer Bedeutung. Erstens müssen die Ventile, die den Druck an die Probe weiterleiten oder abführen, so nah wie möglich an der Probe befestigt sein. Dies wird allerdings durch das Spektrometer eingeschränkt, da die Ventile außerhalb der Bohrung angebracht werden müssen. Zweitens sind für die Weiterleitung des

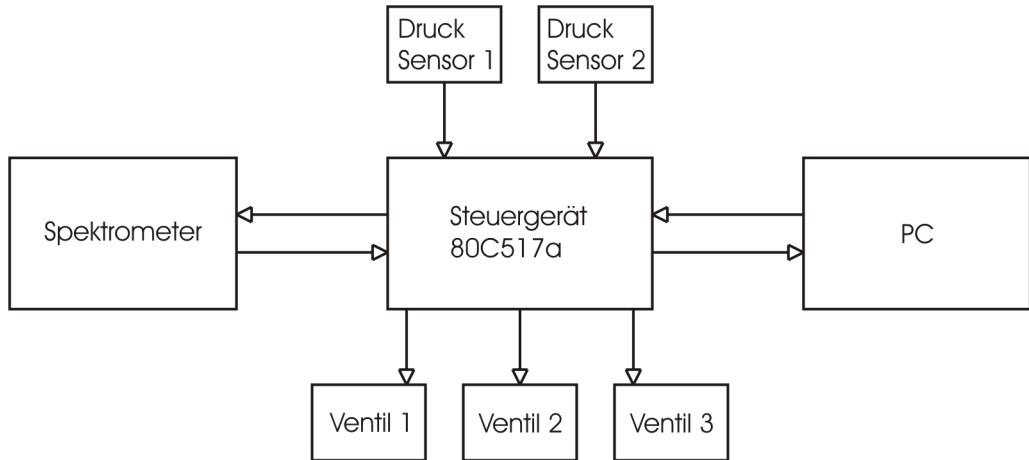


Abbildung 4.7: Schematische Zeichnung der Komponenten für die Drucksprungsteuerung. Das Steuergerät (80C517a) ist das zentrale Gerät der Anlage und steuert die Ventile, liest die Werte der Drucksensoren aus, kommuniziert mit dem Spektrometer zur Synchronisation des Pulsprogrammes mit der Druckflanke und überträgt Daten auf den PC für die Benutzersteuerung.

Drucks Leitungen mit einem ausreichend dicken Innendurchmesser nötig, da der Innendurchmesser R in der vierten Potenz in den Druckanstieg eingeht:

$$p(t) = p_2 \left(1 - e^{(\frac{-t\pi R^4}{8\alpha\eta l})} \right) \quad (4.2)$$

wobei p den Druckverlauf an der Kapillare, p_2 den Vordruck, t die Zeit, R den Innendurchmesser des Druckrohres, α die Kompressibilität von Wasser bei 25 °C, η die Viskosität der Druckflüssigkeit und l die Weglänge vom Ventil zur Probe darstellen. Für einen Druckanstieg von 100 MPa, einer Weglänge von 1 m und einem Innendurchmesser von 0,5 mm ergibt sich eine Kurve wie in Abbildung 4.8 rot dargestellt wird. Die schwarze Kurve zeigt den Druckverlauf bei Verwendung einer Druckleitung mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm.

Mithilfe eines PC's kann der Benutzer die Parameter, die Delays 1 bis 4, anpassen. Diese Delays steuern die Öffnungs- und Schließzeiten der Ventile 1 und 2. Zusätzlich können auf dem PC die Druckdaten ausgegeben und auch gespeichert

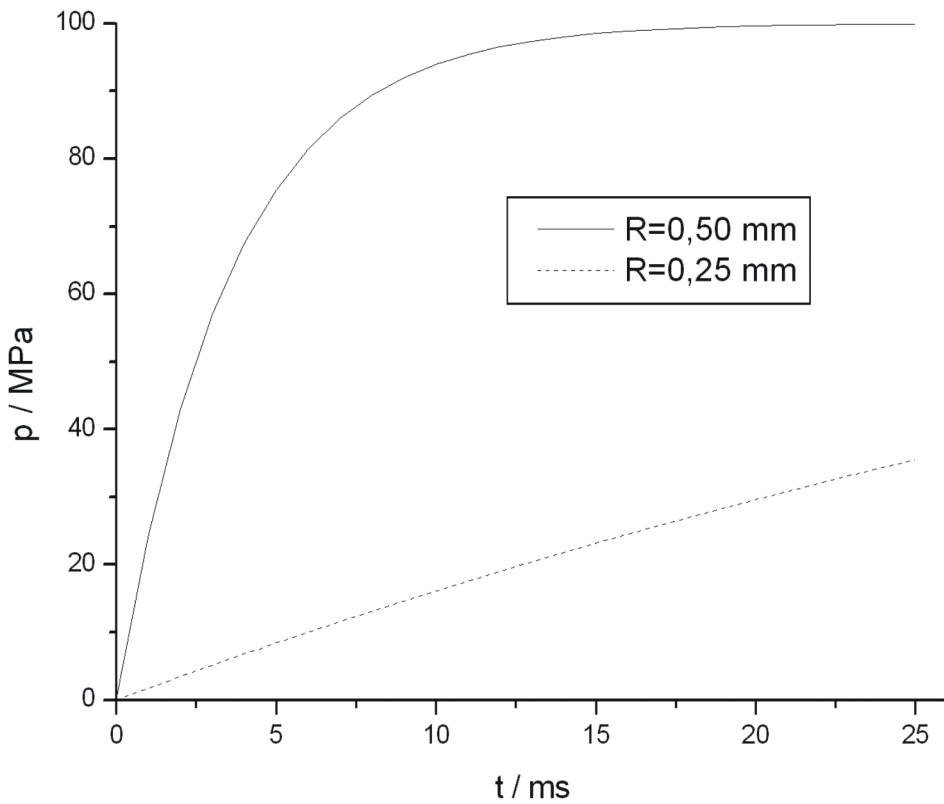


Abbildung 4.8: Simulation des Druckanstiegs an der Hochdruckkapillare für einen Drucksprung von 0 auf 100 MPa bei einer Temperatur für 298 K. Der Druck wird durch Öffnen von Ventil 2 (vgl. Abbildung 4.6) an die Hochdruckzelle, in 1 m Entfernung, weitergeleitet. Für den Druckanstieg ist der Innendurchmesser der Zuleitung von entscheidender Bedeutung, der mit der 4. Potenz in die Formel eingeht (siehe Formel 4.2).

werden. Die Daten werden über die Com1-Schnittstelle an das Steuergerät übertragen. Die Verbindung zwischen Steuergerät und Spektrometer läuft über zwei Signalleitungen. Zum Start eines Drucksprungs sendet das Spektrometer einen Puls, welcher der Länge des gewünschten Pretriggers entspricht. Das Steuergerät registriert die Länge dieses Pulses und beginnt die Ausführung des Drucksprungs wie in Abbildung 4.9 dargestellt; allerdings kann die zeitliche Lage des Drucksprungs relativ zum auslösenden Puls aufgrund der mechanischen Ungenauigkeit des Systems nicht genau eingestellt werden. Aus vorhergehenden Messungen ist dem Steuergerät die Reaktionszeit des Systems bekannt, so dass an das Spektrometer ein Pretriggersignal mit genauer zeitlicher Lage (Fehler < 1 ms) relativ zum Drucksprung gesendet werden kann. Dieser Pretrigger wird über die zweite Leitung zum Spektrometer zurückgesendet und löst dort das eigentliche Pulsprogramm aus. Die Länge des Pretriggers errechnet sich aus der Länge des Pulses vom Spektrometer zum Steuergerät, multipliziert mit 1000.

Zur Steuerung der Drucksprungeinrichtung muss jedes Pulsprogramm um die folgenden Zeilen erweitert werden:

- 1u trigpl3
- 1u setnmr5|13
- d2
- 1u setnmr5^13
- 1u trigpe3

Dabei haben die Befehle folgende Bedeutung:

1u trigpl3: Das Spektrometer wartet auf eine positive Flanke vom Steuergerät. Dieses Signal wird von der Drucksprungeinrichtung gesendet sobald diese zum Drucksprung bereit ist.

1u setnmr5|13: Das Spektrometer sendet eine fallende Flanke an das Steuergerät.

d2: Abwarten des in d2 gespeicherten Delays.

1u setnmr5^13: Das Spektrometer wartet eine μs und sendet eine steigende Flanke an das Steuergerät. Somit verlängert sich d2 um eine μs . Nach dem Senden dieses Pulses beginnt das Steuergerät mit der Ausführung des Drucksprungs.

1u trigpe3: Das Spektrometer wartet auf das Pretrigger-Signal von der Drucksprungeinrichtung. Sobald die fallende Flanke des Pretriggers empfangen wurde, beginnt das Pulsprogramm mit der gewohnten Ausführung der Pulsssequenz.

4.2 Materialien und Methoden

4.2.1 Materialien

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Materialien verwendet.

Material	Firma
Eccobond	Emerson & Cuming
Teflonschlauch	Bürklin
Suprasil	Heraeus
Duran	Schott
Methylcyclohexan	J. T. Baker
Kegeldichtnippel	Werkstatt der Universität Regensburg

Tabelle 4.2: Diese Tabelle stellt einen Auszug der wichtigsten Materialien dar, die für die Hochdruckmessungen verwendet wurden.

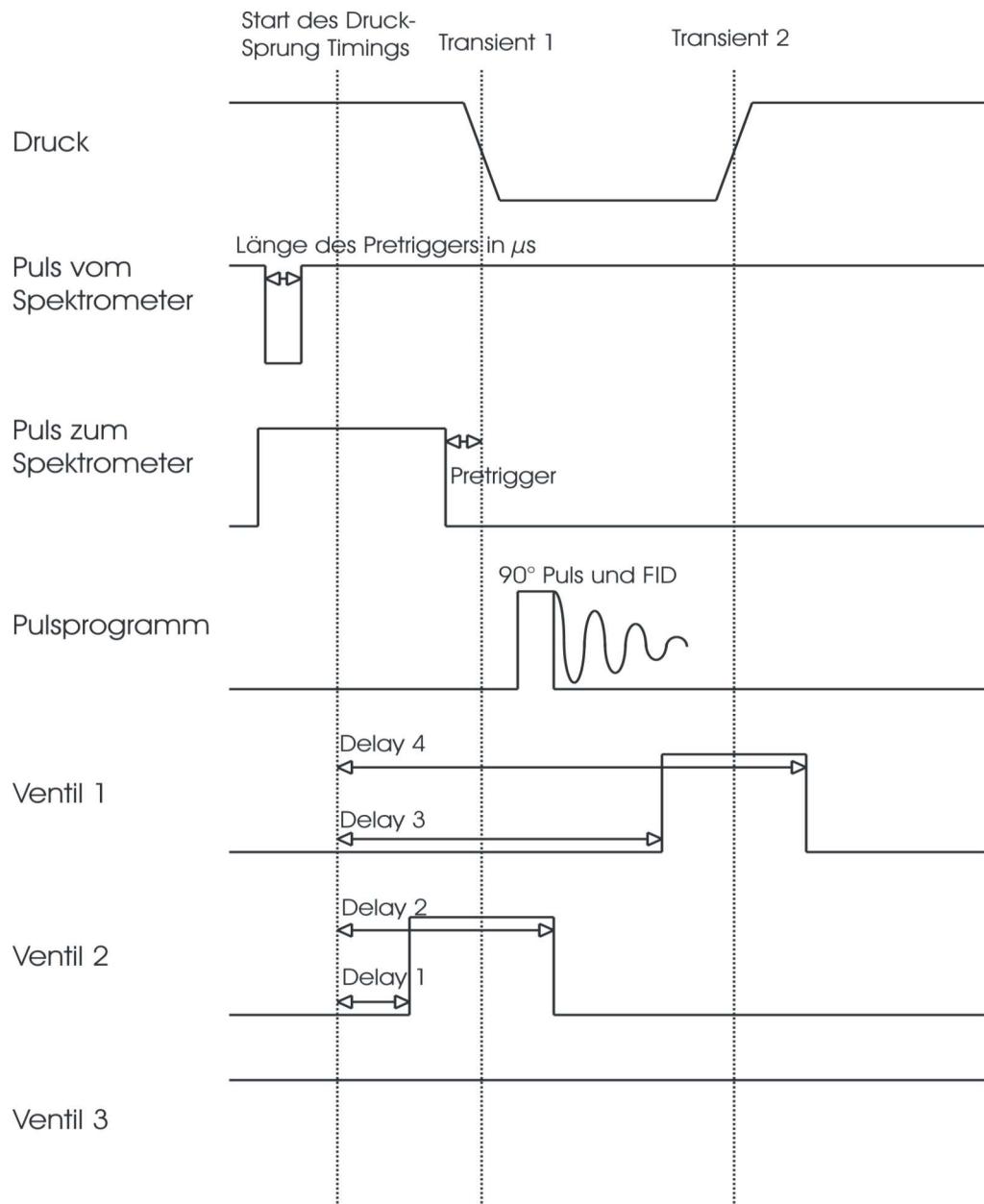


Abbildung 4.9: Zeigt den zeitlichen Ablauf für einen Drucksprung von hohem zu niedrigem Druck. Die Synchronisation erfolgt durch die Kommunikation zwischen Spektrometer und Steuergerät. Die Öffnungs- und Schließzeiten für die Ventile 1 und 2 (Delay 1-4) bestimmen den Zeitpunkt für die Druckflanken. Der Pretrigger bestimmt den Zeitpunkt, an dem das Pulsprogramm, nach der Kommunikation zwischen Steuergerät und Spektrometer, weiter ausgeführt wird.

4.2.2 Proben

Histidin

Für die Charakterisierung der Hochdruckanlage wurden Messungen mit der Aminosäure Histidin aufgenommen. Histidin zeigt starke Druckeffekte und ist somit für Messungen sehr gut geeignet. Für die Proben wurden 1 M Histidin in D₂O gelöst und mit 1 M Kaliumphosphat-Puffer und 1 mM DSS versetzt. Der pH-Wert betrug 7,25.

DSS

Um den Einfluss des Berstschutzes auf die Spektren zu ermitteln, wurden 0,05 mM DSS in 50 % H₂O/50 % D₂O gelöst.

HPr-Proben

Die Druckmessungen an HPr wurden mit der Mutante I14A aus *Staphylococcus carnosus* durchgeführt. Für die 1D-Messungen wurden 1 mM HPr I14A unmarkiertes Protein in 10 mM Tris-Puffer in D₂O aufgelöst. Zusätzlich enthielt die Lösung 0,5 mM NaN₃, 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Der pH-Wert der Lösung betrug 7,0. Für die ¹⁵N-HSQC-Messungen wurden 1 mM HPr I14A zusammen mit 10 mM Tris, 0,5 mM NaN₃, 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS in 90 % H₂O/10 % D₂O gelöst. Der pH-Wert betrug 7,0.

4.2.3 Temperatureichung

Für die Untersuchung der Auswirkungen der Drucksprünge auf die Temperatur (vgl. Kapitel 4.3.3) wurde eine Probe mit Ethylenglycol verwendet. Ethylenglycol wird u. a. als chemisches Thermometer verwendet. Die chemische Verschiebungsdifferenz zwischen dem Methylen- und dem Hydroxyl-Signal ist abhängig von der Temperatur, nach der Formel $T_{Probe} = 465,8 - 102,24\Delta\delta_{EG}$ [Kap75].

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Änderungen am Aufbau der Anlagen

Berstschatz

In der Hochdruck-NMR werden Berstschatze verwendet, um die empfindlichen Probenköpfe bei einer Explosion der Hochdruckzelle vor Glassplittern und Druckflüssigkeit zu schützen. Diese Berstschatze müssen so konstruiert sein, dass sie zum einen Explosionen bei 300 MPa standhalten und zum anderen keine Artefakte in den NMR-Spektren erzeugen. Für vorliegende Arbeit wurden Berstschatze aus Kel-F sowie Teflon angefertigt und verwendet, wobei jeweils deren Einfluss auf die Spektren untersucht wurde. Die Messungen wurden (1) ohne Schutz, (2) mit einem Kel-F-Schutz und (3) einem Teflon-Schutz durchgeführt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Um den genauen Einfluss des Berstschatzes auf die entsprechenden Spektren zu erkennen, wurde zunächst eine Referenz *ohne Schutz* aufgenommen. Dabei wurde eine Hochdruckzelle mit einer Probe, bestehend aus 50 % H₂O, 50 % D₂O und DSS gefüllt und anschließend vermessen. Als Güte für das Spektrum wurde die Linienbreite des DSS verwendet. Abbildung 4.10 zeigt das Spektrum ohne Berstschatz: Dabei kann festgestellt werden, dass bei dieser Konstruktion eine sehr gute Linienbreite (ca. 1 Hz) erreicht wurde. Somit hat die Kapillarenform keinen Einfluss auf das Spektrum.

Die *Kel-F-Stäbe*, mit einem Außendurchmesser von 5 mm, wurden ausgebohrt, so dass die Kapillaren exakt hinein passten. Der Nachteil der Berstschatze aus gebohrtem Kel-F zeigte sich in einem wesentlich breiteren DSS-Signal, das sich nicht beseitigen lies. Abbildung 4.11 zeigt ein breites DSS-Signal von 5 Hz bei Verwendung eines Kel-F Schutzes. Das gleiche Problem betraf Berstschatze, die aus Teflon gebohrt wurden. Als Ursache hierfür wird eine feine Struktur im Schutz vermutet, die durch das Bohren der Berstschatze entsteht.

Ganz anders sieht es bei dem *Teflon-Schutz* aus, der aus einem Teflonschlauch besteht. Mit diesem konnte eine Linienbreite von DSS erzeugt werden, was einer nicht schlechteren Linienbreite ohne Berstschutz entsprach. In Abbildung 4.12 ist ein Spektrum mit einem Berstschutz aus einem Teflonschlauch abgebildet. Ein Nachteil des Teflonschlauches ist allerdings dessen Herstellung, da er auf Rollen gewickelt wird und somit eine Krümmung vorweist, die durch Erhitzen und Geraudeziehen ausgeglichen werden muss. Ein nicht gerade gezogener Schutz könnte aufgrund der Krümmung die Wand des Probenkopfes berühren und dadurch die Messung beeinträchtigen oder sogar den Probenkopf beschädigen.

Autoklav

Der Autoklav wurde nur geringfügig verändert. Das Gewinde der Feststellschraube, welche die Hochdruckzelle gegen den Konus des Autoklaven drückt, wurde durch ein flacheres Gewinde ersetzt. Durch diese Änderung kann die Feststellschraube feiner festgedreht werden, wodurch ein Bruch der Hochdruckzelle verhindert werden kann. Dieser Bruch könnte bei einem zu festen Anziehen der Schraube auftreten.

Statische Hochdruckanlage

An der statischen Hochdruckanlage, die am 800 MHz-Spektrometer aufgebaut worden ist, wurden ebenfalls einige Anpassungen vorgenommen. Die Zuleitungen zur Hochdruckzelle wurden durch dickere Leitungen ersetzt, um ein Verstopfen der Leitungen zu verhindern. Des Weiteren wurde am höchsten Punkt der Anlage ein zusätzlicher Vorratsbehälter angebracht. Dieser Vorratsbehälter dient dazu, die Luft aus den Zuleitungen zu entfernen, um so für einen gleichmässigen Druckaufbau zu sorgen. Abbildung 4.13 zeigt einen schematischen Aufbau der statischen Anlage mit der Erweiterung durch einen zusätzlichen Vorratsbehälter.

Aufgrund der Größe des Magneten musste auch die Zuleitung zum Autoklaven

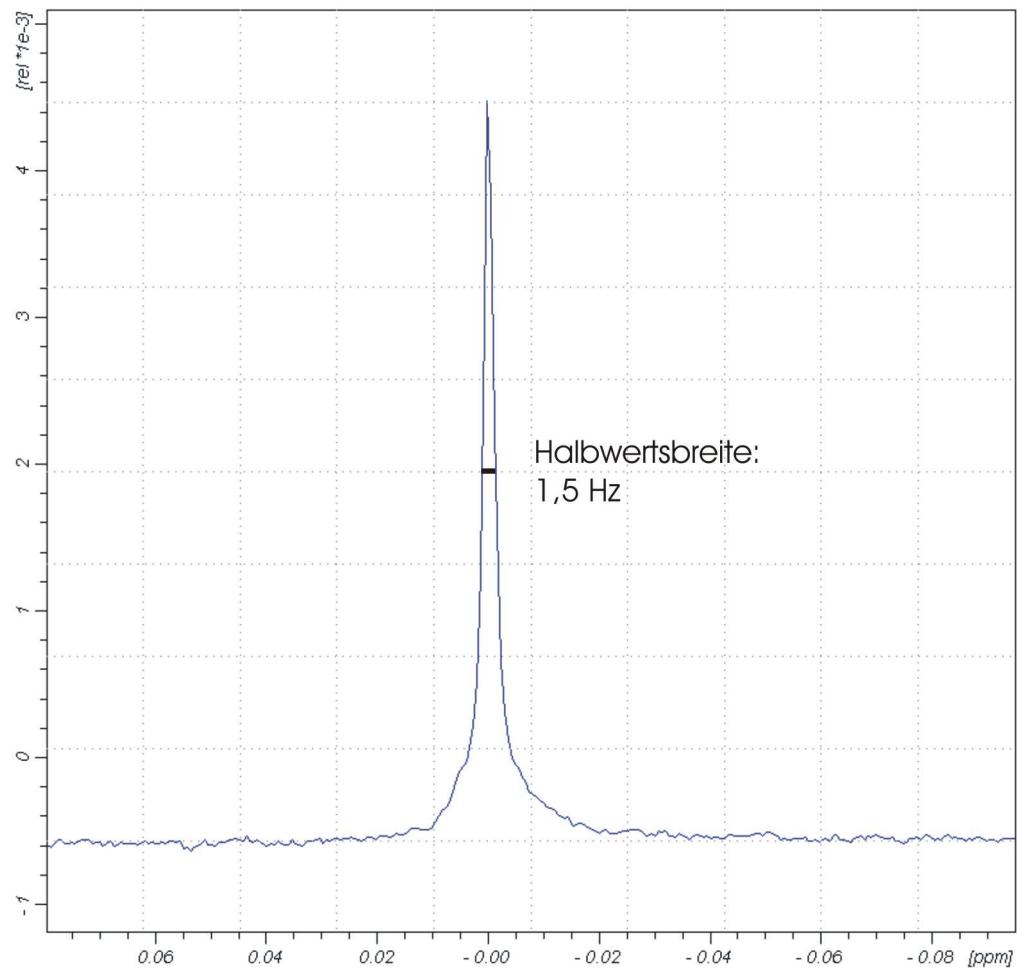


Abbildung 4.10: Spektrum einer Eichprobe (50 % H_2O , 50 % D_2O und DSS) in einer Hochdruckzelle ohne Berstschutz bei einer Temperatur von 298 K. Die Linienbreite beträgt 1,5 Hz.

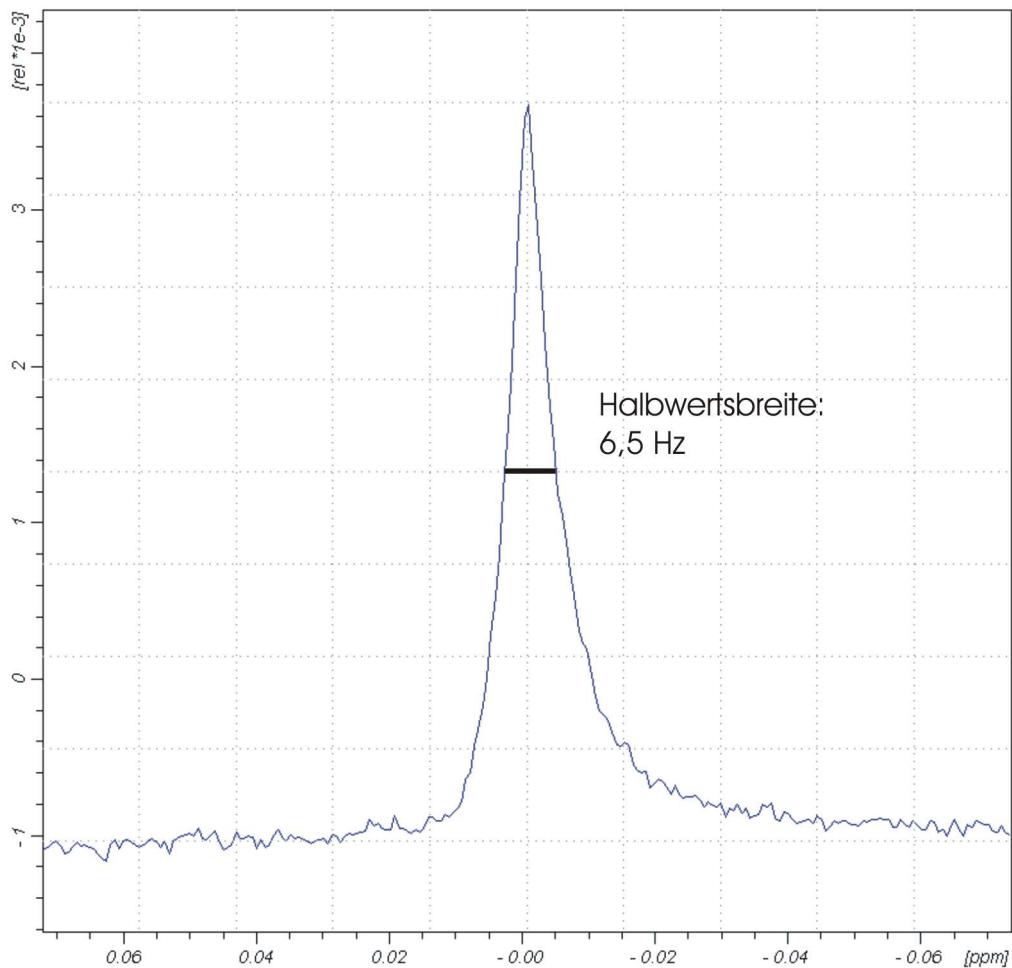


Abbildung 4.11: Spektrum einer Eichprobe (50 % H_2O , 50 % D_2O und DSS) in einer Hochdruckzelle mit einem Berstschutz aus Kel-F bei einer Temperatur von 298 K. Die Linienbreite beträgt 6,5 Hz.

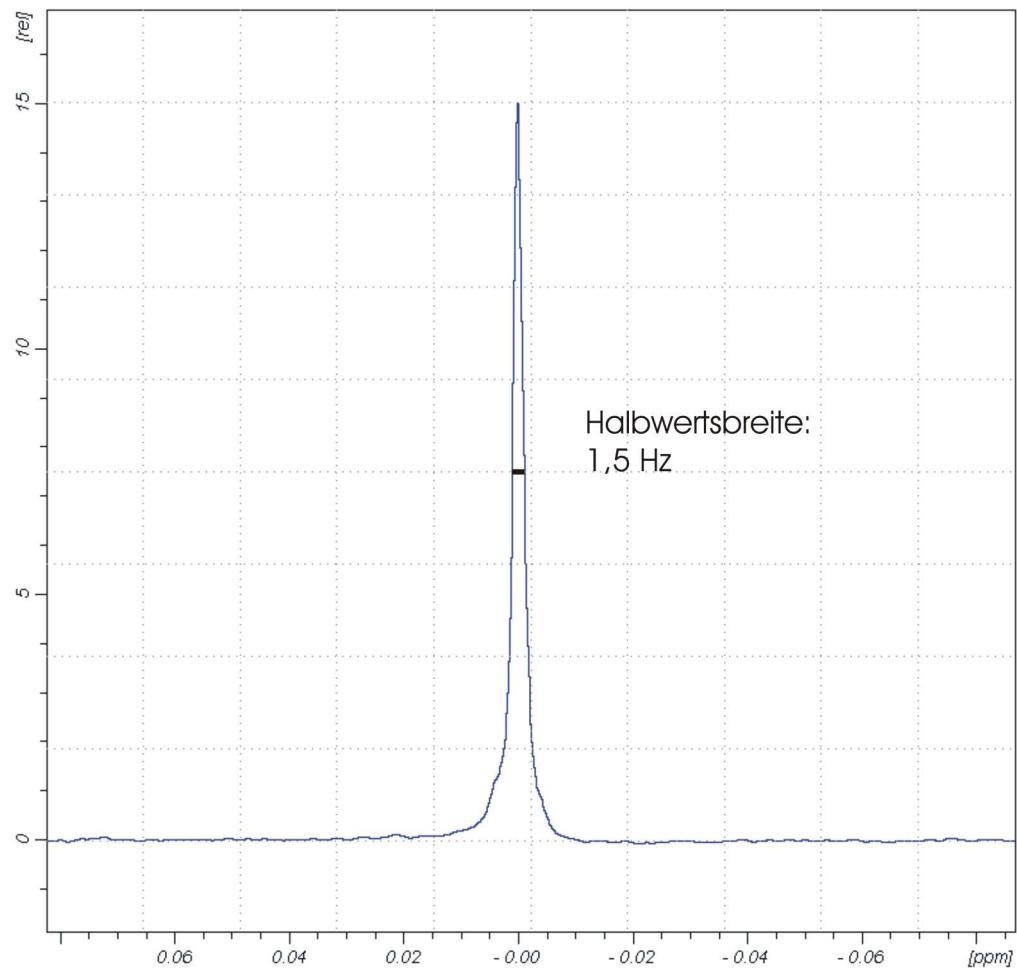


Abbildung 4.12: Spektrum einer Eichprobe (50 % H_2O , 50 % D_2O und DSS) in einer Hochdruckzelle mit einem Berstschutz aus einem Teflonschlauch bei einer Temperatur von 298 K. Die Linienbreite beträgt 1,5 Hz.

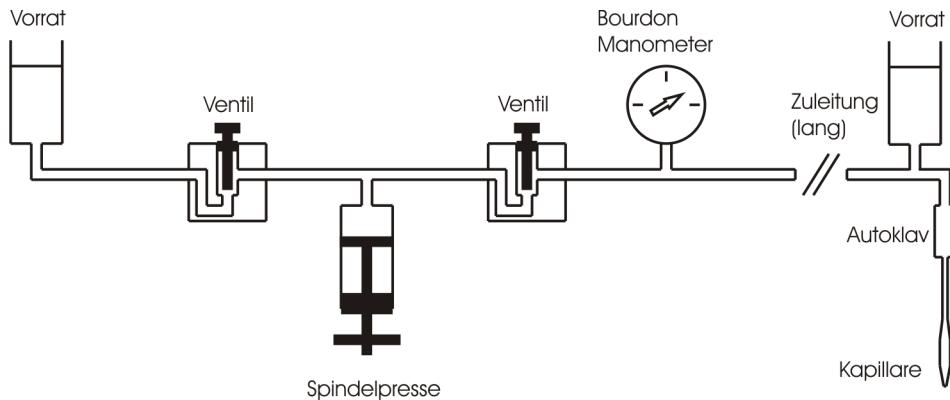


Abbildung 4.13: Schematische Zeichnung der statischen Hochdruckanlage, die durch einen weiteren Vorratsbehälter erweitert wurde. Der zweite Vorratsbehälter ist am höchsten Punkt der Anlage montiert und dient zur Entlüftung der Zuleitungen zu den Hochdruckzellen.

verlängert werden. Dafür wurde ebenfalls ein längeres Halterungsrohr benötigt und angefertigt. Diese Veränderungen erhöhten jedoch das Gesamtgewicht, das auf dem Probenkopf lastete. Um dies auszugleichen, wurden die Halterungsrohre, die aus Messing bestehen, durch Rohre aus Aluminium ersetzt. Eine weitere Entlastung des Probenkopfes wurde durch eine spezielle Halterung auf dem Magneten erreicht. Durch diese neue Halterung verteilt sich das Gewicht gleichmäßig auf das Gehäuse des Magneten (vgl. Abbildung 4.14).

Drucksprunganlage

Im Laufe der Arbeit wurden Änderungen an der Drucksprunganlage vorgenommen. Wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, ist ein schneller Druckanstieg für die Qualität der Anlage sehr wichtig. Aus Sicherheitsgründen wurde beim ursprünglichen Aufbau der Anlage eine dünne Zuleitung zur Probe gewählt, was allerdings zu einem langsamen Druckanstieg an der Probe führte. Der Vorteil dieser Zuleitung stellt eine geringere Belastung für die Hochdruckzelle bei Druckanstieg dar. Dadurch ließen sich jedoch nur Druckexperimente von hohem zu niedrigem Druck in einer ausreichend schnellen Zeitskala messen. Um allerdings auch Proben bei

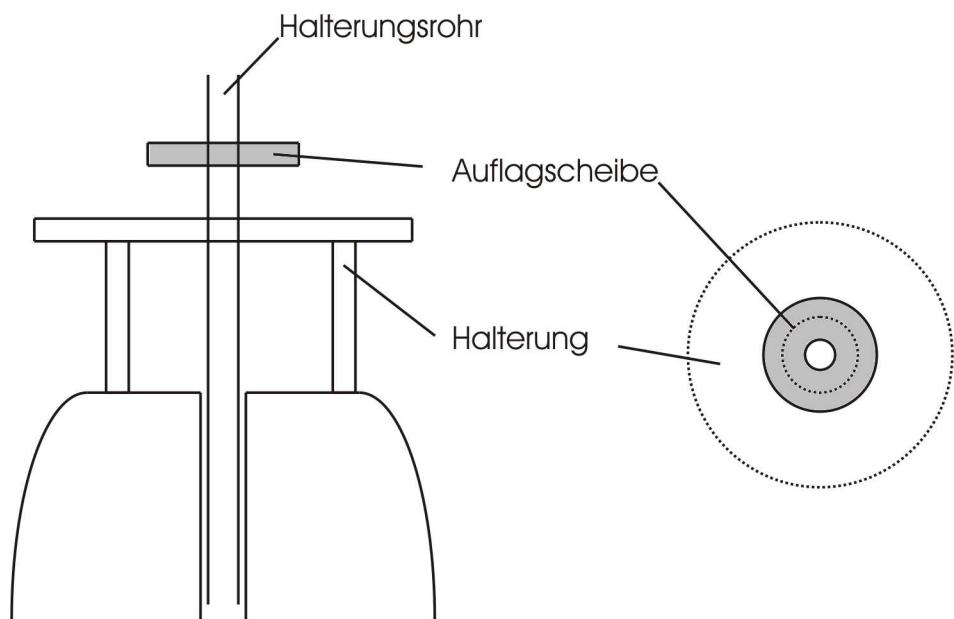


Abbildung 4.14: Schematische Zeichnung der Halterung für das 800 MHz-Spektrometer von der Seite (links) und von oben (rechts). Dieser Aufbau dient zur Entlastung des Probenkopfes. Ohne diesen Aufbau würde das gesamte Gewicht der Zuleitung und des Einsatzrohres auf dem Probenkopf liegen.

einem schnellen Druckanstieg vermessen zu können, wurde die dünne Zuleitung (Innendurchmesser: 0,25 mm) durch eine dickere Leitung (Innendurchmesser: 0,35 mm) ausgetauscht. Der daraus resultierende Druckanstieg wurde von 150 ms auf 50 ms reduziert. Dies entspricht in etwa den theoretischen berechneten Werten nach Formel 4.2.

Für die Messungen ist es sehr wichtig, dass die Leitungen frei von Luft sind. Luft in den Leitungen verhindert einen definierten Druckübertrag an die Probe, was sich auch auf die Qualität der Spektren auswirkt. Somit muss vor jeder Inbetriebnahme der Anlage soviel Luft wie möglich aus den Leitungen entfernt werden. Um dies zu optimieren, wurde eine Pumpe an die Leitungen angeschlossen, die ein Vakuum erzeugt. Nach dem Fluten der Leitungen mit Druckflüssigkeit kann mit den Messungen unter optimalen Bedingungen begonnen werden.

4.3.2 Statische Hochdruckmessungen

Im Laufe der Arbeit wurden statische Hochdruckmessungen an dem Protein HPr I14A durchgeführt. Ein Strukturbündel dieses Proteins ist in Abbildung 4.17 zu sehen. Am Protein HPr I14A wurden 1D-Messungen mit einer Probe in D₂O durchgeführt und 2D-HSQC-Messungen an einer ¹⁵N markierten Probe.

Die 1D-Messungen wurden von 278 K bis 318 K in einem Abstand von 10 K und einem Druckbereich von Normaldruck bis 200 MPa in einem Abstand von 20 MPa durchgeführt. Der Messbereich für die 2D-HSQC-Messungen lag bei 268 K bis 328 K in einem Abstand von 10 K und Normaldruck bis 200 MPa in einem Abstand von 20 MPa.

1D-Messungen an HPr I14A

Die 1D-Messungen an dem Protein HPr I14A wurden an einem 800 MHz-Spektrometer mit Cryo-Probenkopf durchgeführt. Verwendet wurde die Watergate-Pulssequenz „zggpw5“. Es wurde jeweils für die Temperaturen von 278 K bis 318

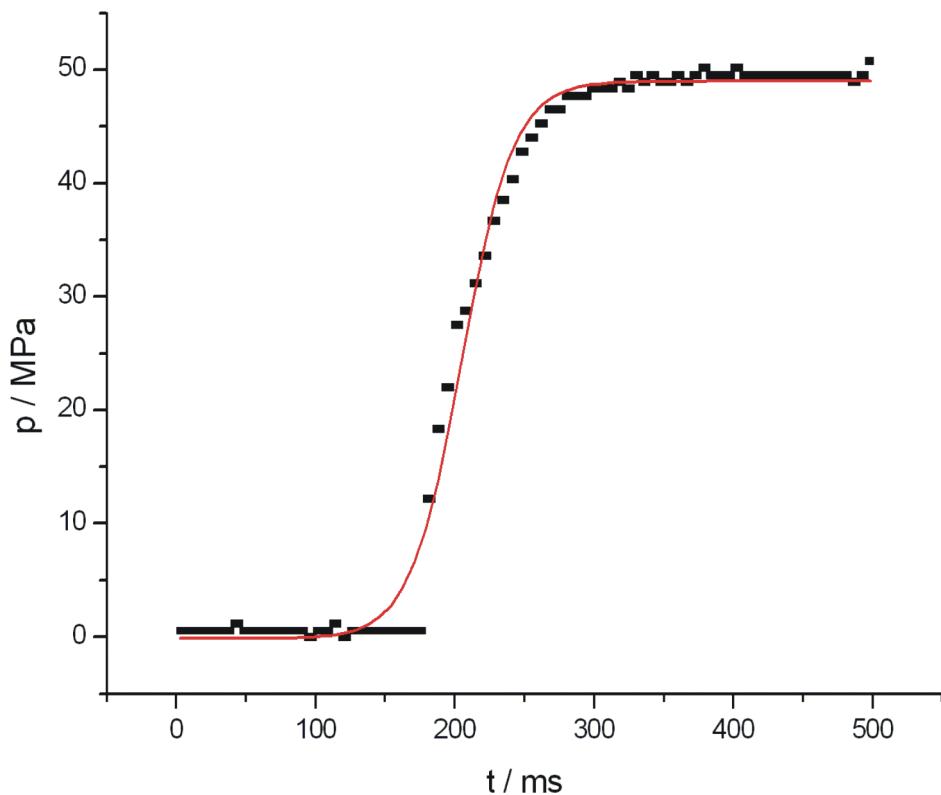


Abbildung 4.15: Druckanstieg von Normaldruck auf 50 MPa mit einer Zuleitung von ca. 1 m Länge und einer Dicke von 0,25 mm. Gemessen wurde mithilfe des Drucksensors 2 (vgl. Abbildung 4.6). Die Kurve wurde mit einer Sigmoidalfunktion angefittet ($y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp\left(\frac{(t - t_0)}{dt}\right)}$, mit den Werten $A_1 = -0,146 \pm 0,032$, $A_2 = 48,99 \pm 0,025$, $t_0 = 205,153 \pm 0,096$ und $dt = 18,457 \pm 0,083$). Zu sehen ist ein Druckanstieg von 0 auf 50 MPa innerhalb von 150 ms ($8 \cdot dt$)).

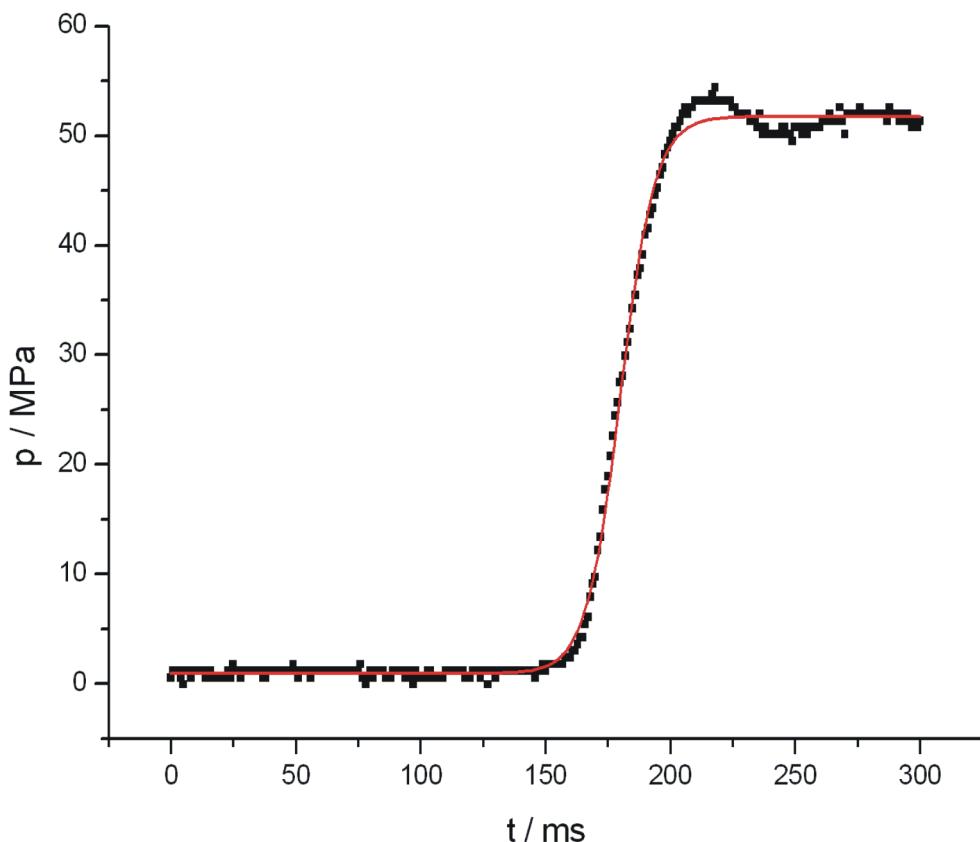


Abbildung 4.16: Druckanstieg von Normaldruck auf 50 MPa mit einer Zuleitung von ca. 1 m Länge und einer Dicke von 0,35 mm. Gemessen wurde mithilfe des Drucksensors 2 (vgl. Abbildung 4.6). Die Kurve wurde mit einer Sigmoidalfunktion angefittet ($y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp\left(\frac{(t - t_0)}{dt}\right)}$, mit den Werten $A_1 = 0,901 \pm 0,067$, $A_2 = 51,746 \pm 0,086$, $t_0 = 180,08 \pm 0,11$ und $dt = 6,93 \pm 0,10$). Zu sehen ist ein Druckanstieg von 0 auf 50 MPa innerhalb von 55 ms ($8 * dt$)).

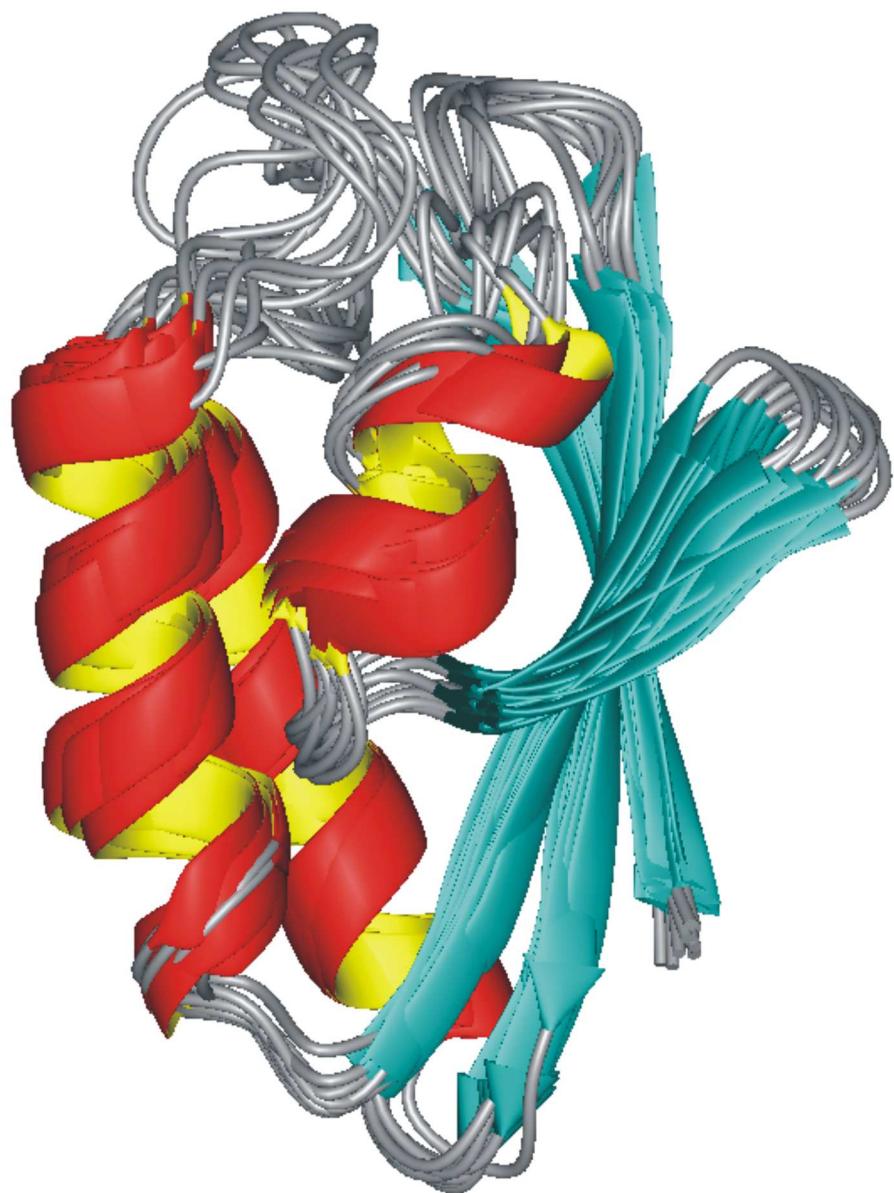


Abbildung 4.17: Überlagerung von zehn Strukturen des Proteins HPr I14A [Moe01] (BMRB: 1txe).

K eine Druckreihe bis 200 MPa durchgeführt. Der Abstand der Druckmessungen betrug 20 MPa, wobei die Messungen bei Normaldruck 60 MPa, 140 MPa und 200 MPa mit der doppelten Anzahl an „Scans“ gemessen wurden. Nach jeder Messreihe bis 200 MPa wurde nochmals ein Spektrum bei Normaldruck aufgenommen, um zu zeigen, dass die durch den Druck hervorgerufenen Änderungen reversibel sind. Abbildung 4.18 zeigt den Aromatenbereich von HPr I14A bei verschiedenen Temperaturen unter Normaldruck. Zu sehen sind vor allem die Ringprotonen der drei Tyrosine des Phenylalanins sowie eine Linie des Histidins. Hin zu höheren Temperaturen zeigt sich zusätzlich eine Aufspaltung der Signale H^δ und H^ϵ in $\delta 1$ und $\delta 2$ und $\epsilon 1$ und $\epsilon 2$. Die Linien der Ringprotonen wurden nach MÖGLICH et al. [Moe01] bei einer Temperatur von 298 K zugeordnet. Im Spektrum sind folgende Signale dargestellt: H^δ und H^ϵ von Tyr 6 bei 6,87 ppm und 6,55 ppm, Tyr 37 bei 7,24 ppm und 6,95 ppm, Tyr 64 bei 7,00 ppm und 6,71 ppm, H^δ und H^ϵ von His 15 bei 7,17 ppm und 8,11 ppm (nicht im Bild) und H^δ , H^ϵ und H^ζ von Phe 29 bei 7,39 ppm, 7,19 ppm und 7,09 ppm.

Bei einer Erniedrigung der Temperatur zeigt sich für die meisten Ringprotonen kaum eine Änderung der Position und Intensität. Nur die Signale von Tyrosin 6 verbreitern sich mit geringerer Temperatur bis sie bei 278 K nicht mehr zu sehen sind.

Für jede der oben genannten Temperaturen wurde eine Druckreihe bis 200 MPa aufgenommen. In allen aufgenommenen Druckreihen konnte eine Denaturierung des Proteins festgestellt werden: Die Signale der Ringprotonen verlieren an Intensität und erfahren zusätzlich eine Änderung ihrer Position. Des Weiteren entstehen an den Random-Coil-Positionen Denaturierungssignale, die mit zunehmendem Druck an Intensität gewinnen. Der Grad der Denaturierung wurde aus dem Verhältnis von Denaturierungs- zu Ringprotonensignal von H^ϵ der Aminosäure Phe 29 bestimmt (gefittet mit dem Programm DM-Fit [Mas02]). Tabelle 4.3 zeigt das Ergebnis für die Temperaturen von 278 K bis 318 K.

Für die verschiedenen Temperaturen wurde aus den Druckreihen die Gleichge-

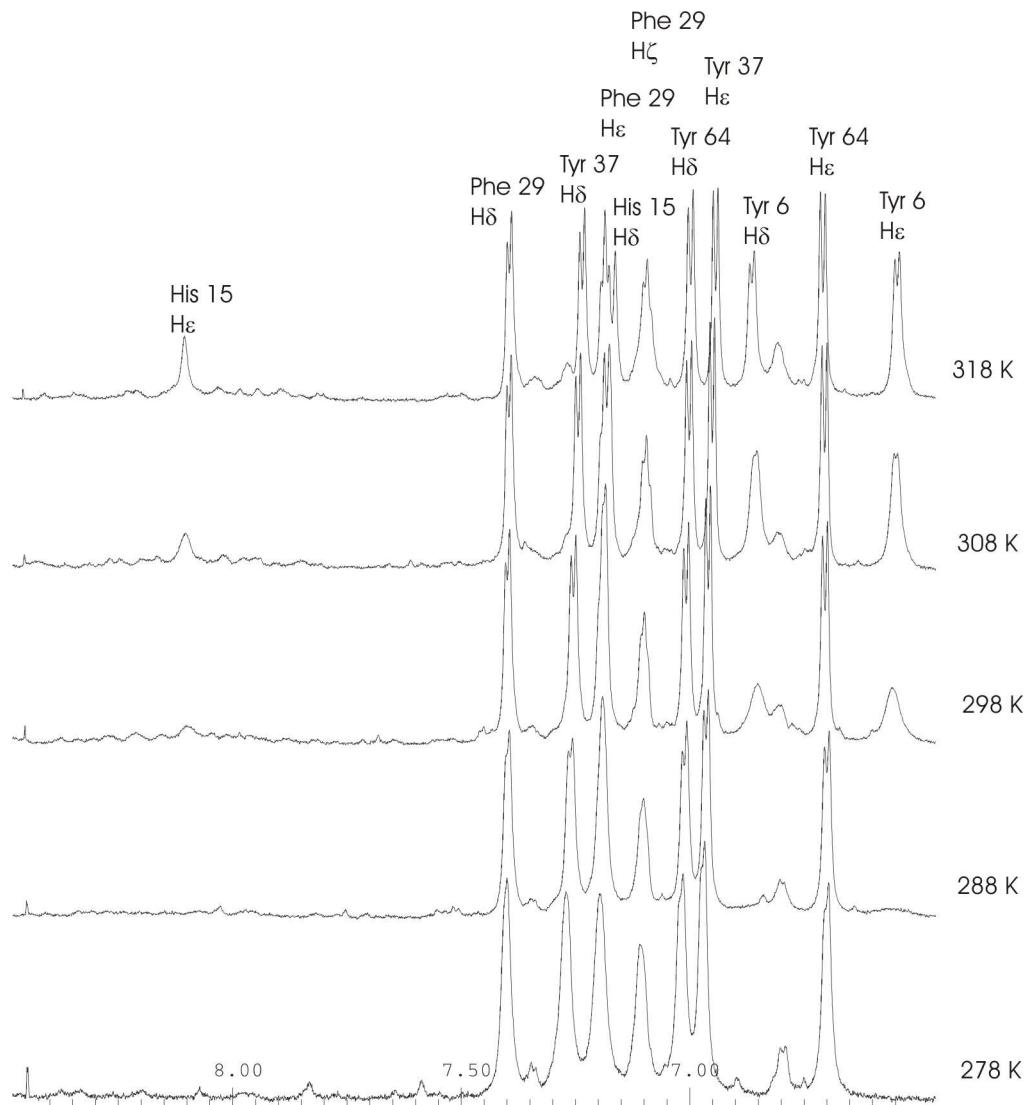


Abbildung 4.18: Temperaturreihe von HPr I14A bei Normaldruck. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innen durchmesser, 800 MHz-Spektrometer, 1D-Watergate(w5)-Pulsprogramm, NS: 128, DS: 4, LB: 0,5 Hz. Die Zuordnung der Signale erfolgte nach MÖGLICH et al. [Moe01].

	Temperatur				
	278 K	288 K	298 K	308 K	318 K
Druck					
0 MPa	5,99 %	3,28 %	3,95 %	12,3 %	21,4 %
60 MPa	32,2 %	14,3 %	11,1 %	17,0 %	44,1 %
140 MPa	88,6 %	66,3 %	51,1 %	54,2 %	80,5 %
200 MPa	100 %	84,7 %	79,2 %	86,7 %	92,5 %

Tabelle 4.3: Anteil des denaturierten HPr I14A bei verschiedenen Temperaturen. Berechnung aus dem Verhältnis von Denaturierungs- zu Ringprotonensignal von H^ϵ der Aminosäure Phe 29.

wichtskonstante K (vgl. Formel 2.6), aus dem Verhältnis zwischen nativem Signal und Denaturierungssignal für die Protonen von Phe29 H^δ , Phe29 H^ϵ und H^ϵ von Tyrosin 6, 37 und 64 berechnet. In den folgenden Abbildungen (4.19 - 4.23) ist jeweils $\ln(K)$ gegen den Druck aufgetragen. Die erhaltenen Kurven wurden linear gefittet. Hieraus wurden mithilfe der Formel $\Delta G = \Delta G_0 + p\Delta V = -RT\ln(K)$ die Werte für ΔV und ΔG_0 bestimmt.

Abbildung 4.24 zeigt eine Auftragung von K gegen die Temperatur und den Druck. Die dadurch entstehende Fläche wurde mithilfe der Formel 2.8 gefittet. Dadurch wurden die Parameter, bei der Temperatur T_0 von 298 K, bestimmt für Gibbs-Energie bei Normaldruck ΔG_0 (kJ/mol) ($10,6 \pm 0,3$), die Wärmekapazität ΔC_p (kJ/mol K) ($12,5 \pm 1,2$), die Entropie ΔS^0 (kJ/mol K) ($0,16 \pm 0,03$), die teilmolare Volumenänderung ΔV^0 (mL/mol) ($-69,0 \pm 10,5$), der termische Ausdehnungskoeffizient $\Delta\alpha$ (mL/mol K) ($3,1 \pm 1,7$) und die isoterme Kompressibilitätsänderung $\Delta\beta$ (mL/mol bar) ($0,019 \pm 0,006$).

Eine mit diesen Parametern simulierte Fläche ist in Abbildung 4.25 zu sehen. Die Simulation wurde im Temperaturbereich erweitert. Es ist der Bereich von 278 K bis 318 K im Abstand von 5 K aufgetragen. Abbildung 4.26 zeigt für denselben Bereich eine Auftragung von $\ln(K)$ gegen den Druck und die Temperatur.

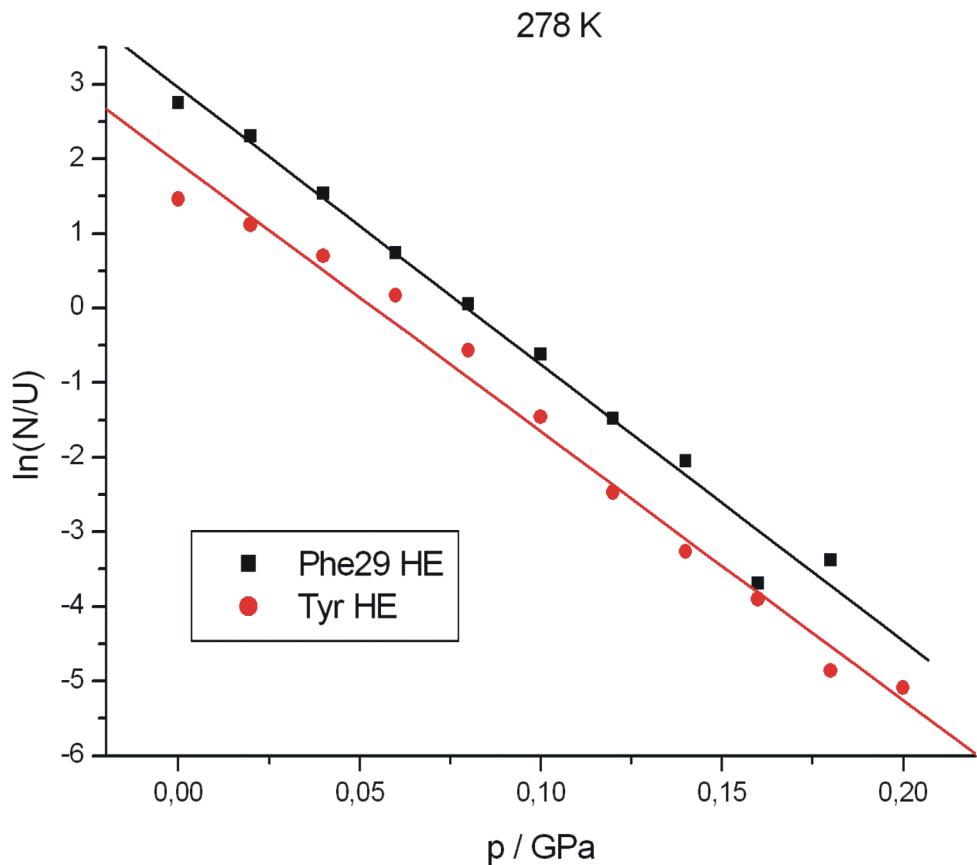


Abbildung 4.19: Auftragung von $\ln(K)$ gegen den Druck von HPr I14A bei 278. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, 1D-Watergate(w5)-Pulsprogramm, NS: 128, DS: 4, LB: 0,5 Hz. Aufgetragen sind die Werte für H^e von Phe29 und H^e von Tyr 6, 37 und 64. Der lineare Fit ergab für $\Delta G_0 = 10,6 \text{ kJ/mol}$ und für $\Delta V = -158 \text{ mL/mol}$.

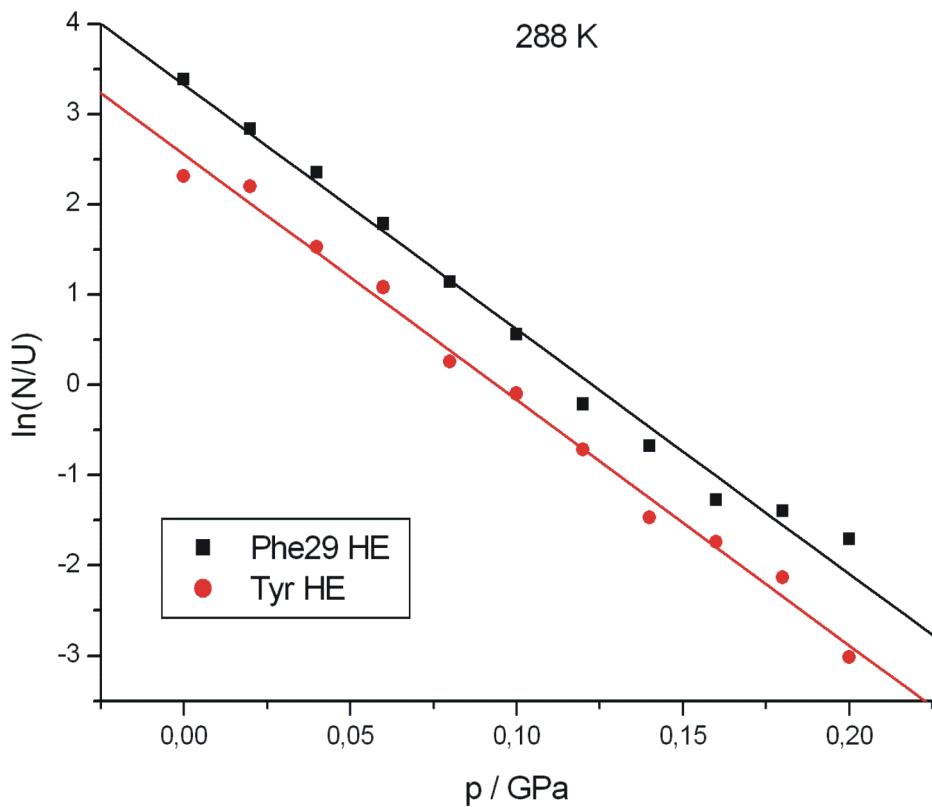


Abbildung 4.20: Auftragung von $\ln(K)$ gegen den Druck von HPr I14A bei 288. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, 1D-Watergate(w5)-Pulsprogramm, NS: 128, DS: 4, LB: 0,5 Hz. Aufgetragen sind die Werte für H^e von Phe29 und H^e von Tyr 6, 37 und 64. Der lineare Fit ergab für $\Delta G_0 = 12,3 \text{ kJ/mol}$ und für $\Delta V = -113 \text{ mL/mol}$.

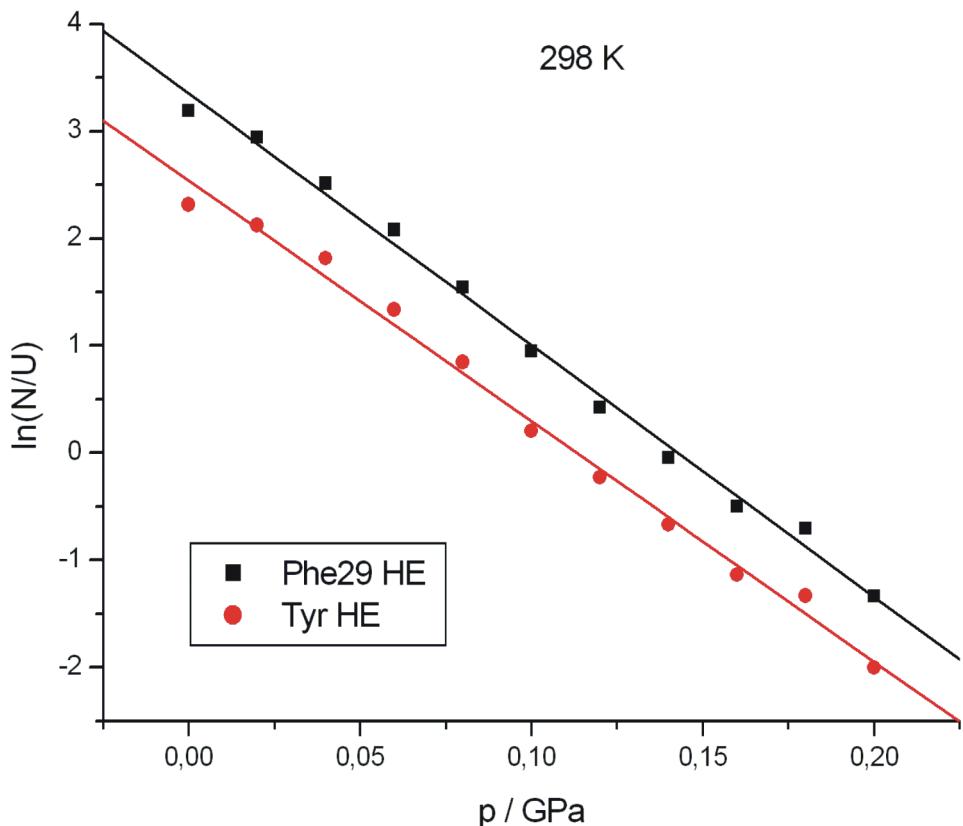


Abbildung 4.21: Auftragung von $\ln(K)$ gegen den Druck von HPr I14A bei 298. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, 1D-Watergate(w5)-Pulsprogramm, NS: 128, DS: 4, LB: 0,5 Hz. Aufgetragen sind die Werte für H^ϵ von Phe29 und H^ϵ von Tyr 6, 37 und 64. Der lineare Fit ergab für $\Delta G_0 = 11,9 \text{ kJ/mol}$ und für $\Delta V = -92,6 \text{ mL/mol}$.

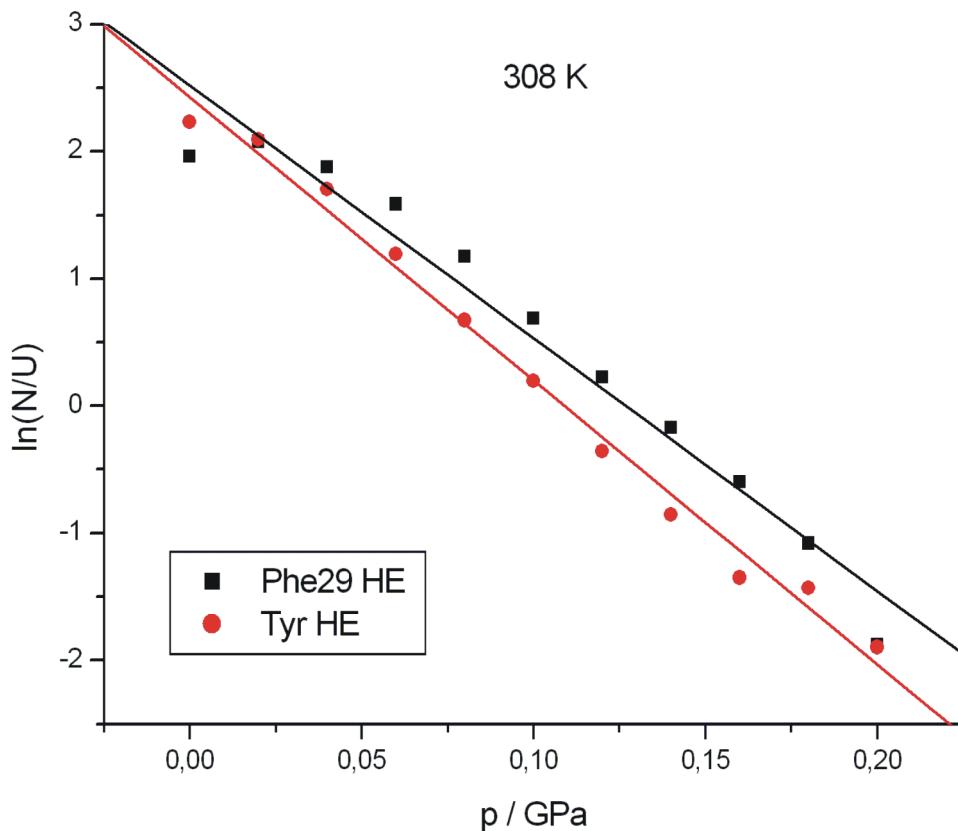


Abbildung 4.22: Auftragung von $\ln(K)$ gegen den Druck von HPr I14A bei 308. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, 1D-Watergate(w5)-Pulsprogramm, NS: 128, DS: 4, LB: 0,5 Hz. Aufgetragen sind die Werte für H^ϵ von Phe29 und H^ϵ von Tyr 6, 37 und 64. Der lineare Fit ergab für $\Delta G_0 = 9,66 \text{ kJ/mol}$ und für $\Delta V = -82,3 \text{ mL/mol}$.

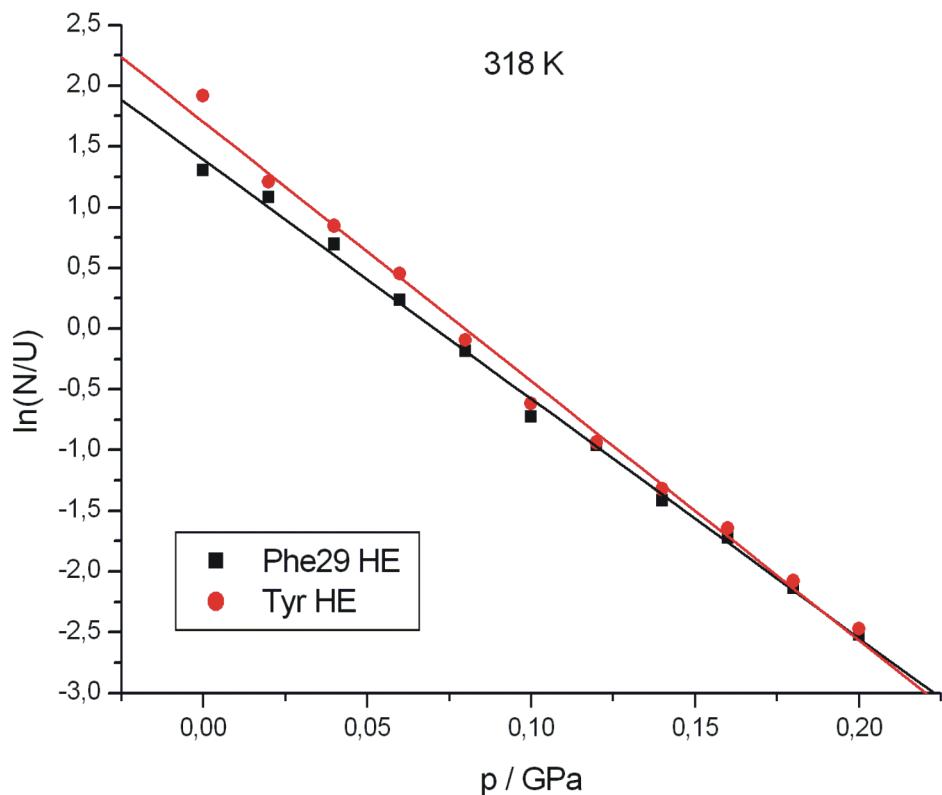


Abbildung 4.23: Auftragung von $\ln(K)$ gegen den Druck von HPr I14A bei 318. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, 1D-Watergate(w5)-Pulsprogramm, NS: 128, DS: 4, LB: 0,5 Hz. Aufgetragen sind die Werte für H^ϵ von Phe29 und H^ϵ von Tyr 6, 37 und 64. Der lineare Fit ergab für $\Delta G_0 = 5,86$ kJ/mol und für $\Delta V = -77,6$ mL/mol.

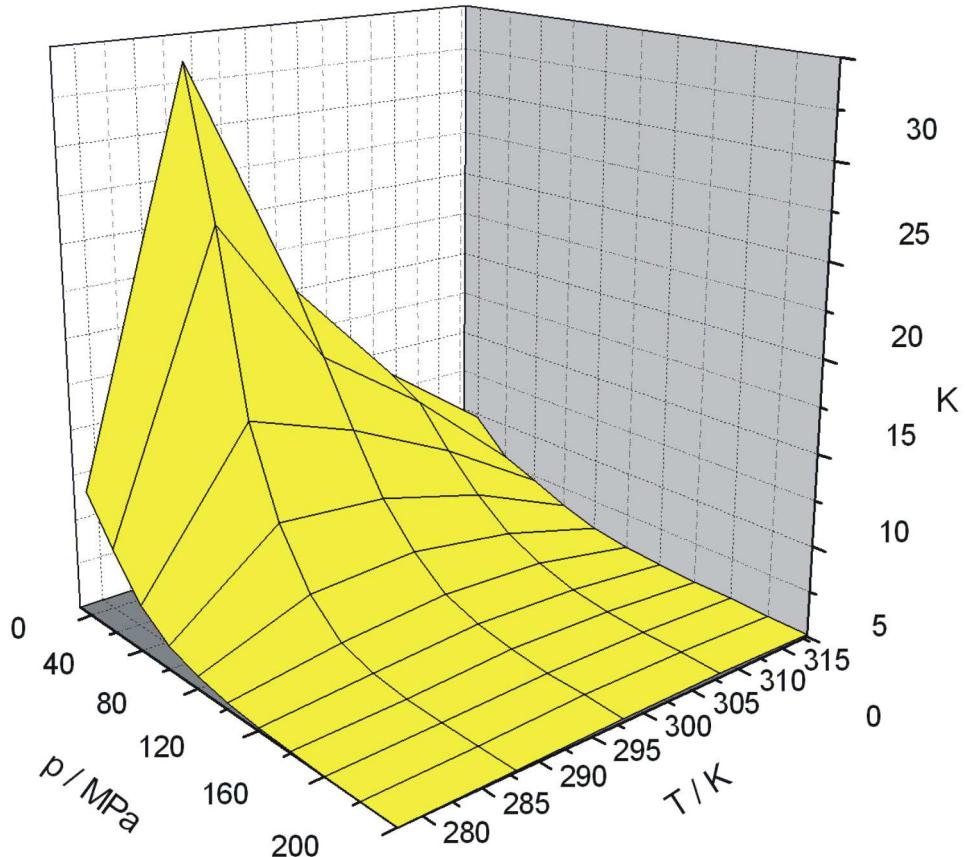


Abbildung 4.24: Auftragung der Gleichgewichtskonstante gegen den Druck und die Temperatur von HPr I14A. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, 1D-Watergate(w5)-Pulsprogramm, NS: 128, DS: 4, LB: 0,5 Hz. Die Kurve wurde mit Hilfe der Formel 2.8 gefittet und die Parameter, bei der Temperatur T_0 von 298 K, mit folgenden Werten bestimmt: ΔG_0 (kJ/mol) = $10,6 \pm 0,3$, ΔC_p (kJ/mol K) = $12,5 \pm 1,2$, ΔS^0 (kJ/mol K) = $0,16 \pm 0,03$, ΔV^0 (mL/mol) = $-69,0 \pm 10,5$, $\Delta\alpha$ (mL/mol K) = $3,1 \pm 1,7$ und $\Delta\beta$ (mL/mol MPa) = $0,019 \pm 0,06$.

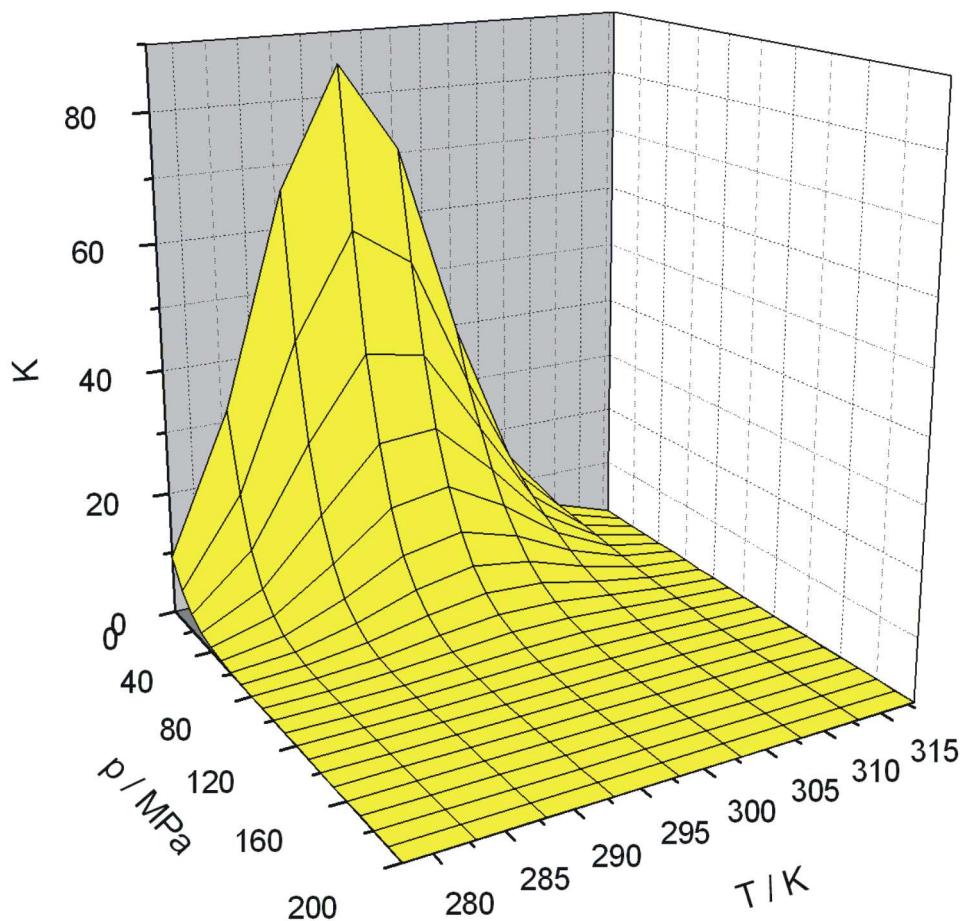


Abbildung 4.25: Simulierte Kurve der Abbildung 4.24 mithilfe der Formel 2.6 und den Parametern aus Tabelle 4.4.

Parameter	Wert	Fehler
Gibbs-Energie bei Normalsdruck ΔG_0 (kJ/mol)	10,6	0,3
Wärmekapazität ΔC_p (kJ/mol K)	12,5	1,2
Entropie ΔS^0 (kJ/mol K)	0,16	0,03
teilmolare Volumenänderung ΔV^0 (mL/mol)	-69,0	10,5
termische Ausdehnungskoeffizient $\Delta \alpha$ (mL/mol K)	3,1	1,7
isoterme Kompressibilitätsänderung $\Delta \beta$ (mL/mol bar)	0,019	0,006

Tabelle 4.4: Parameter erhalten aus dem p - T - K -Diagramm durch den Fit mit der Formel 2.6.

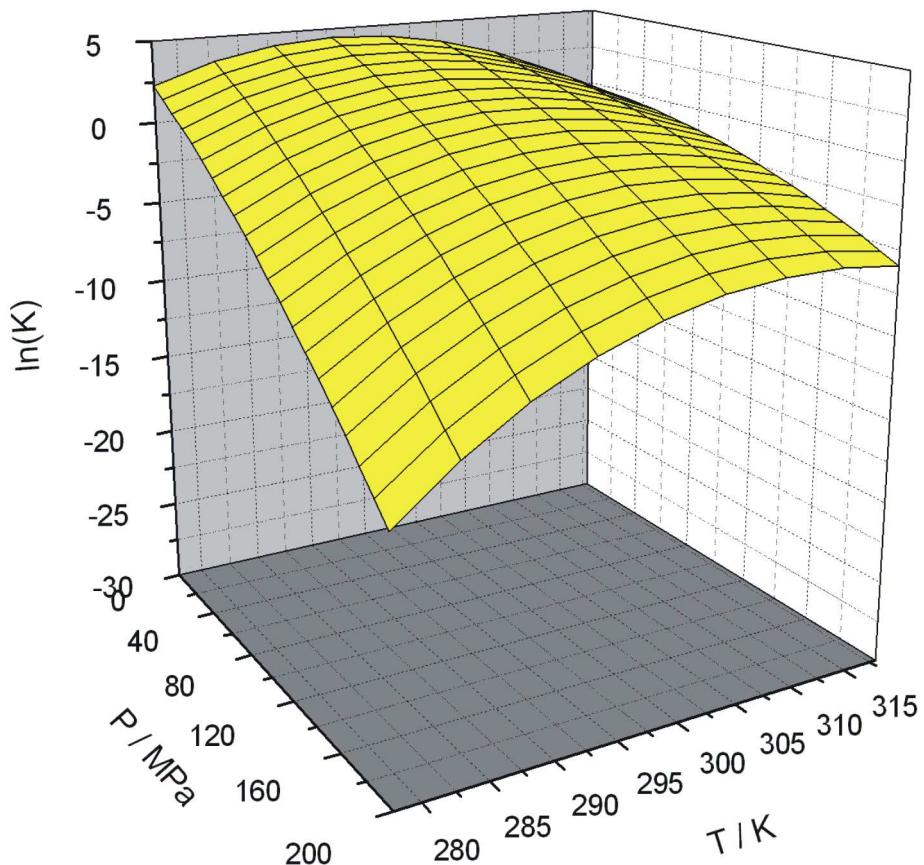


Abbildung 4.26: Auftragung von $\ln(K)$ gegen den Druck und die Temperatur. Simulierte Kurve mit den Parametern aus Tabelle 4.4.

Zusätzlich zum Bereich der Ringprotonen zwischen 6,6 ppm und 7,5 ppm wurde der Bereich um 0 ppm näher betrachtet. In Abbildung 4.27 sind vier Linien zu sehen: (1) die Methylgruppe δ_1 von Leu 81 bei -0,15 ppm, (2) eine Linie die nicht sicher identifiziert werden konnte bei -0,087 ppm, (3) DSS bei -0,020 ppm und (4) eine Verunreinigung bei 0,16 ppm. Die Linie des DSS verbreiterte sich für manche Spektren so stark, dass das Signal nicht mehr zu sehen war. DSS war somit ungeeignet als Referenzierung. Die Referenzierung wurde mithilfe des Tris durchgeführt. Das DSS-Signal, dass bei der Messung bei 278 K und 200 MPa eine scharfe Linie hat, wurde für diese Messung auf 0 ppm gesetzt. Tris hat für dieses Spektrum ein Signal bei 3,702 ppm und mithilfe dieses Signals wurden die restlichen Spektren referenziert.

In Abbildung 4.27 ist eine Temperaturreihe bei Normaldruck aufgetragen. Für alle Linien bleiben die Intensitäten annähernd gleich, jedoch verbreitern sie sich hin zu niedrigeren Temperaturen. Zusätzlich ist eine Verschiebung, relativ zu der Verunreinigung, zu beobachten.

Die gleiche Temperaturauftragung ist in Abbildung 4.28 bei 200 MPa zu sehen. Wie auch bei Normaldruck bleibt bei 200 MPa die Intensität des DSS-Signals gleich. Zu niedrigeren Temperaturen hin nimmt die Linienbreite wieder zu, jedoch nur bis ca. 298 K. Bei einer weiteren Erniedrigung der Temperatur verringert sich die Linienbreite wieder sehr stark. Für das Methylsignal ergibt sich ein etwas anderes Bild. Bei einer Erniedrigung der Temperatur von 318 K auf 298 K nimmt die Intensität zu, bevor sie bei weiterer Absenkung der Temperatur wieder abnimmt.

2D-Messungen an HPr I14A

Mit einer ^{15}N markierten Probe wurden HSQC-Messungen durchgeführt. Die Spektren wurden in einem Temperaturbereich von 268 K bis 328 K in einem Abstand von 10 K aufgenommen. Für die Temperaturen von 278 K bis 308 K wurden Messungen bis 200 MPa im Abstand von 20 MPa durchgeführt. Die dop-

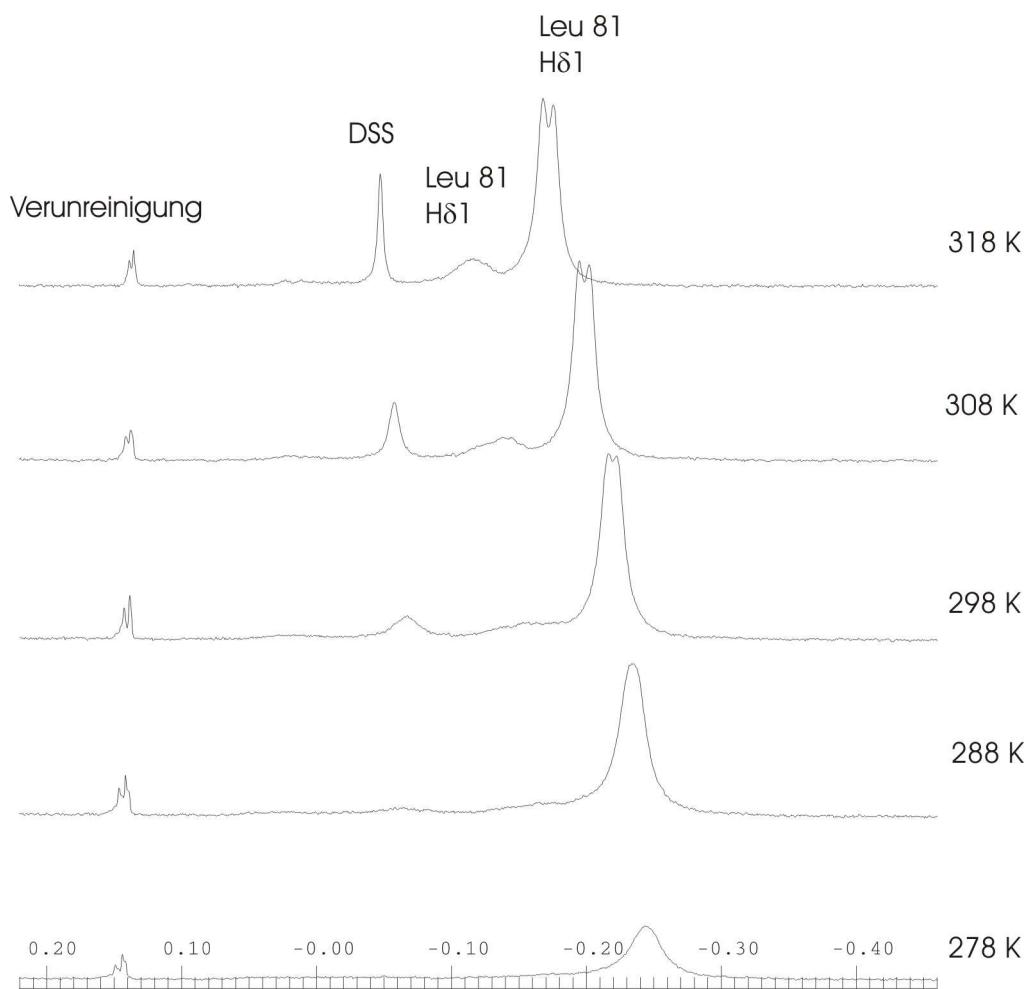


Abbildung 4.27: Temperaturreihe von 318 K (oben) bis 278 K (unten) bei Normaldruck im Bereich um 0 ppm. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, 1D-Watergate(w_5)-Pulsprogramm, NS: 128, DS: 4, LB: 0,5 Hz.

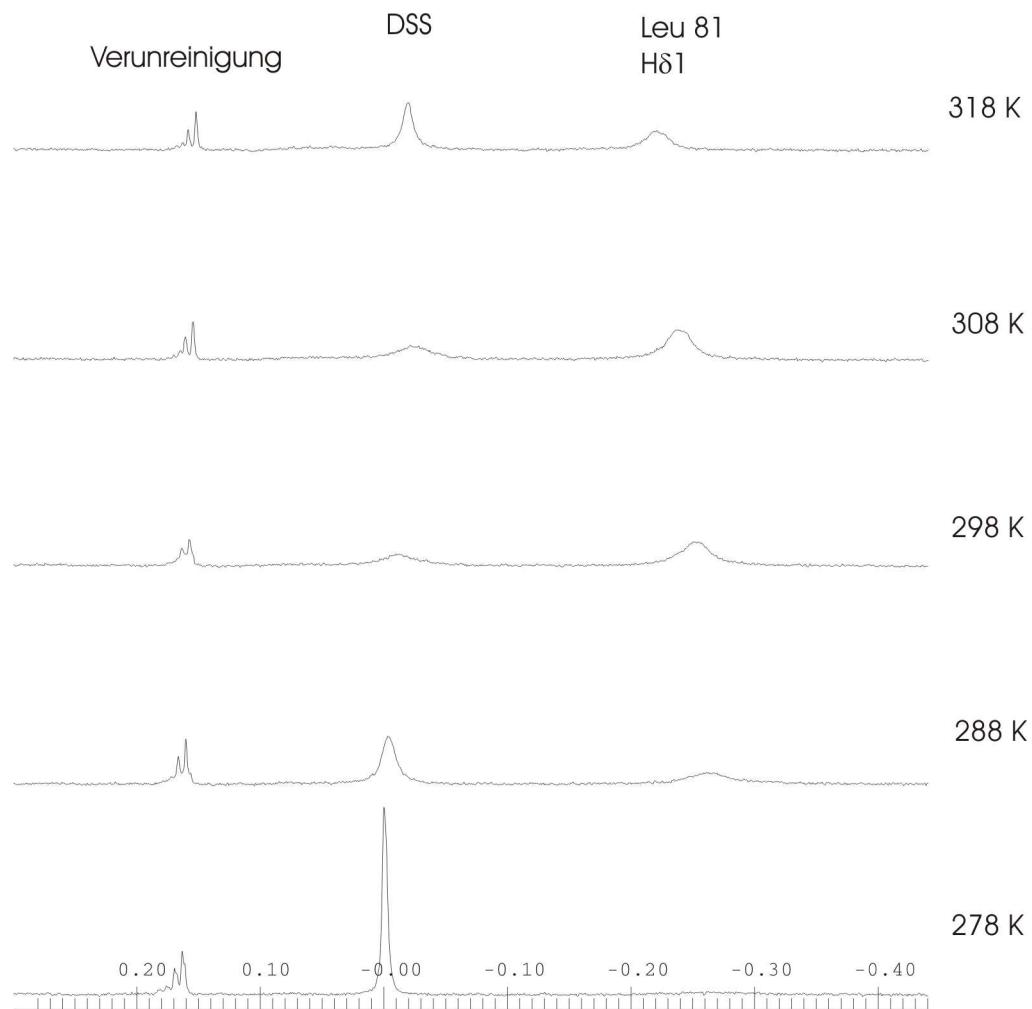


Abbildung 4.28: Temperaturreihe von 318 K (oben) bis 278 K (unten) bei 200 MPa im Bereich um 0 ppm. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, 1D-Watergate(w5)-Pulsprogramm, NS: 128, DS: 4, LB: 0,5 Hz.

pelte Anzahl an „Scans“ wurde für die Spektren bei den Drücken 0 MPa, 60 MPa, 140 MPa und 200 MPa verwendet. Um ein Einfrieren der Probe zu verhindern, wurde ein Spektrum bei 268 K ausschließlich bei 200 MPa aufgenommen [Jon82]. Bei 318 K wurden Spektren bis 80 MPa aufgenommen, bei 328 K nur ein Spektrum unter Normaldruck. In den folgenden Abschnitten werden die Spektren näher erklärt.

Abbildung 4.29 zeigt eine Überlagerung der HSQC-Spektren von 0 MPa, 60 MPa, 140 MPa und 200 MPa bei 298 K. Die Zuordnung dieses Spektrums bei Normaldruck und 298 K wurde von MÖGLICH et al. [Moe01] übernommen. Die Signale zeigen eine reversible Änderung der chemischen Verschiebungen. Durch Vergleiche der Spektren, die bei unterschiedlichen Druck aufgenommen wurden, konnten diese zugeordnet werden. Bei Erhöhung des Drucks entstehen im Bereich zwischen 8,0 und 8,5 ppm in der Protonendimension und zwischen 120 und 125 ppm in der ^{15}N -Dimension zusätzliche Signale. Dies entspricht typischen Werten für „random coil“ Verschiebungen. Mit zunehmendem Druck nehmen diese Signale an Intensität zu. Im Gegensatz dazu verlieren die Signale der zugeordneten Aminosäuren mit zunehmendem Druck an Intensität und sind nicht mehr detektierbar.

Die Aminosäuren His 15 bis Met 21 konnten aufgrund fehlender Signale nicht zugeordnet werden. Nach Erhöhen des Drucks verschwinden zunächst in unmittelbarer Nähe der Kavität weitere Signale. Bei Erreichen des höchsten Drucks sind für die meisten Temperaturen mehr als 90 % der Anfangssignale verschwunden.

Gly 13, das in der Sequenz genau eine Position vor der Mutation I14A steht, zeigt bei höherem Druck einen Übergang von einem Signal in ein Doppelsignal. Diese Aufspaltung des Signals Gly 13 ist für jede Temperatur ab einem Druck von 60 MPa zu beobachten (vgl. Abbildung 4.30).

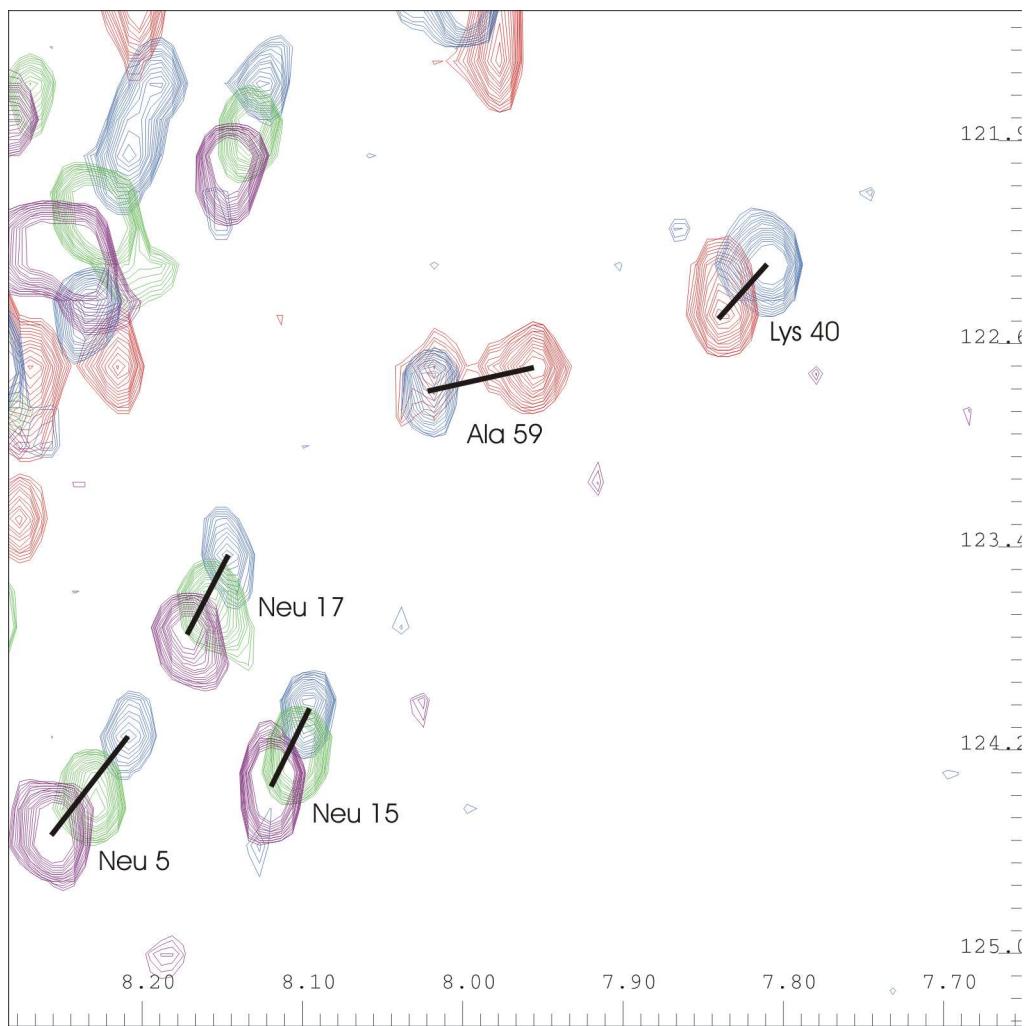


Abbildung 4.29: Ausschnitt einer Druckreihe von HPr I14A bei 298 K. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris, 0,5 mM NaN₃, 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS in 90 %H₂O/10 %D₂O. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, TD: 2048 (¹H), 512 (¹⁵N), NS: 64, DS: 128, LB: 1 Hz (¹H), 0,3 Hz (¹⁵N). Die Spektren wurden aufgenommen bei Normaldruck (rot), 60 MPa (blau), 140 MPa (grün) und 200 MPa (violett). Die Signale der Aminosäuren verschwinden mit zunehmenden Druck und es entstehen neue Signale an „Random Coil“-Positionen.

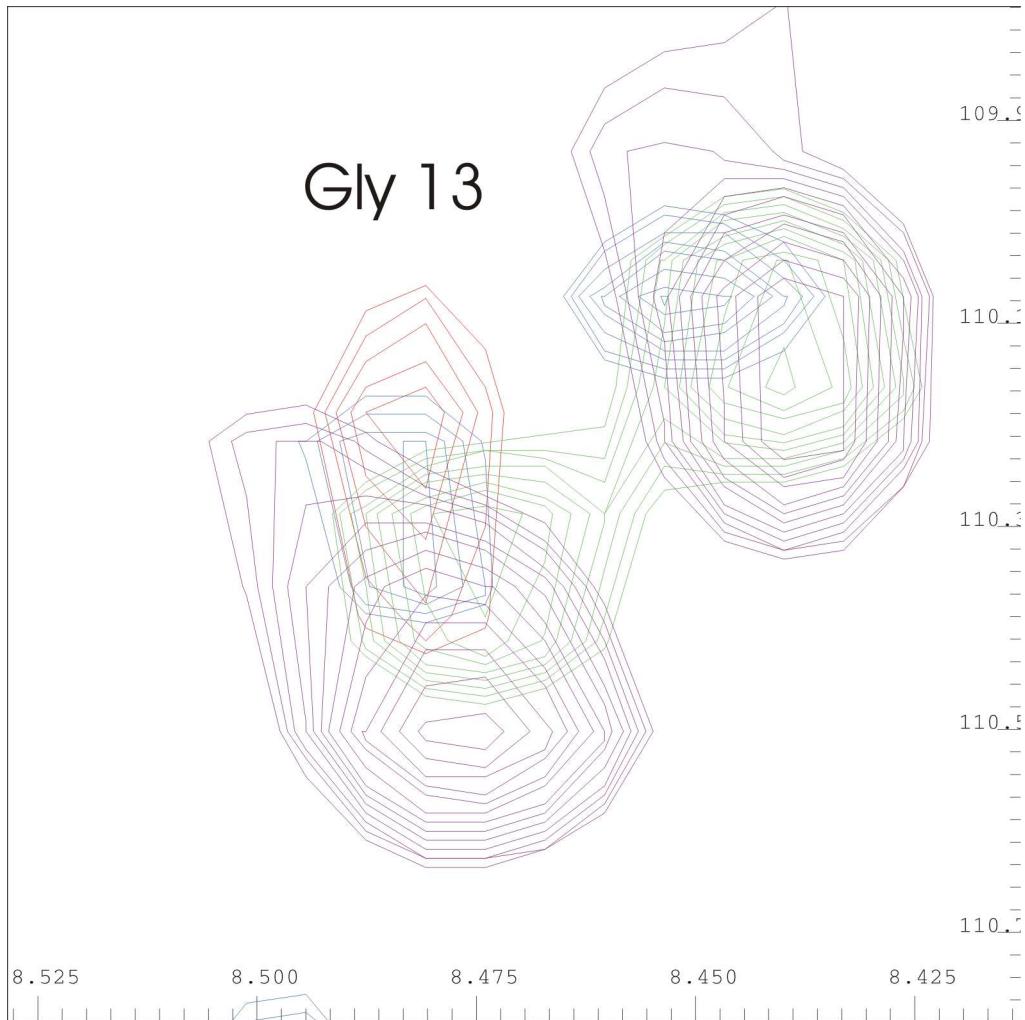


Abbildung 4.30: Aufspaltung des Signals von Gly 13 bei 298 K. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris, 0,5 mM NaN₃, 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS in 90 %H₂O/10 %D₂O. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 800 MHz-Spektrometer, TD: 2048 (¹H), 512 (¹⁵N), NS: 64, DS: 128, LB: 1 Hz (¹H), 0,3 Hz (¹⁵N). Die Spektren wurden aufgenommen bei Normaldruck (rot), 60 MPa (blau), 140 MPa (grün) und 200 MPa (violett).

4.3.3 Drucksprung-Messungen

Die theoretische Abschätzung des Druckanstiegs (Formel 4.2) wurde durch zwei Messungen kontrolliert und bestätigt. An die Position der Probe wurde zunächst ein *Drucksensor* angebracht und der Druckverlauf gemessen. Abbildung 4.15 zeigt den Druckverlauf, der durch den Messsensor aufgezeichnet wurde. Der langsame Druckanstieg von mehr als 100 ms ist durch die Verwendung einer Druckleitung mit geringem Innendurchmesser zu erklären. Nach dem Einbau einer Druckleitung mit größerem Innendurchmesser steigt der Druck schneller an, wie bereits in Abbildung 4.16 zu erkennen ist. Der Druckanstieg wurde durch diesen Umbau von 150 ms auf 55 ms reduziert.

Neben den Aufnahmen durch den Messsensor wurden zusätzlich an Histidin *1D-Messungen* vorgenommen, um die Druckflanke zu beschreiben. Bei diesen Messungen wurde der FID durch die Druckflanke an der Probe geschoben. Die Aufnahme des FID während der Druckänderung bewirkte allerdings starke Phasenstörungen im Spektrum, die nicht korrigiert werden konnten. Durch diese Messungen konnte festgestellt werden, wann wieder stabile Druckverhältnisse an der Probe herrschen. Abbildung 4.31 zeigt eine Auftragung der Verschiebung von Histidin gegen die Zeit während der Druckänderung bis hin zu einem stabilen Druck. Der etwas langsamere Druckverlauf, der durch die Histidin-Messungen abgeleitet werden kann, lässt sich durch die Kapillarenform erklären: Die Kapillaren bestehen aus einem sehr dünnen Hals, woraus sich ein langsamerer Druckanstieg nach Formel 4.2 ergibt.

Abbildung 4.32 zeigt den Bereich zwischen zwei Druckflanken bei einem Drucksprung von niedrigem zu hohem Druck. Es wurde festgestellt, dass sich der Druck in diesem Zwischenbereich um 5 MPa erhöht. Diese Erhöhung des Drucks ist auf das Schließen des Ventils 2 zurückzuführen. Das Schließen von Ventil 2 führt zu einer Verdrängung der Druckflüssigkeit und erhöht somit den Druck, der durch die Drucksensoren aufgezeichnet werden kann.

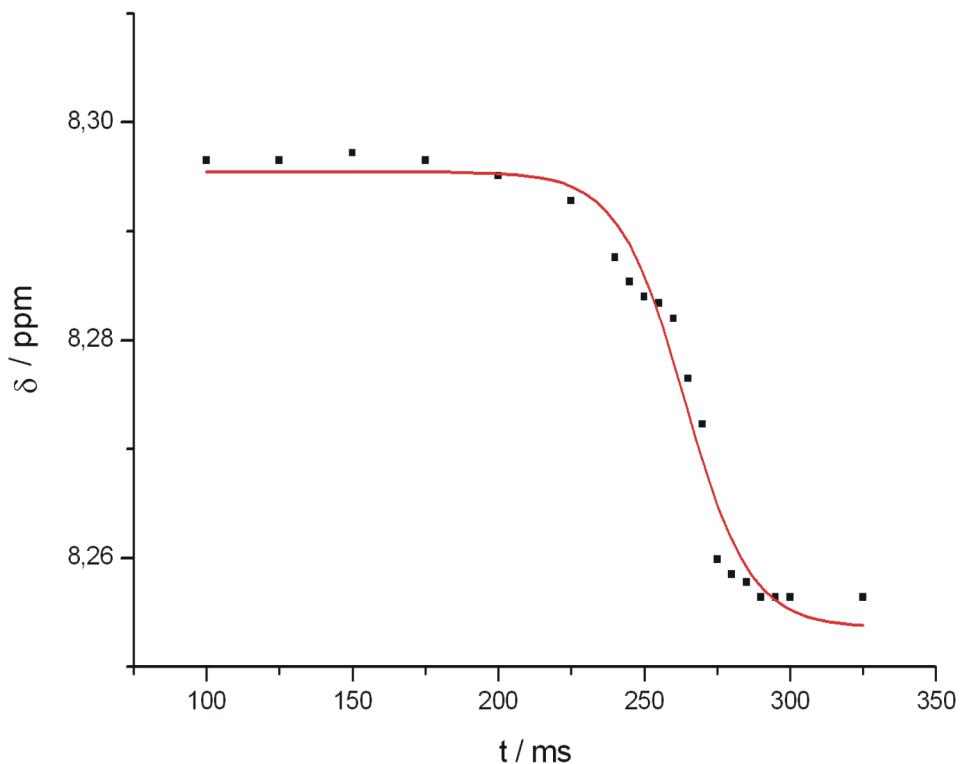


Abbildung 4.31: Drucksprungmessung an Histidin am 500 MHz-Spektrometer. Probenzusammensetzung: 1 M Histidin in D_2O , 1 M Kaliumphosphat-Puffer, 1 mM DSS. Drucksprung von hohem zu niedrigem Druck, der FID wird durch die fallende Druckflanke geschoben. Auftragung der chemischen Verschiebung von $H^{\epsilon 1}$ gegen die Zeit. Die Kurve wurde mit einer Sigmoidalfunktion gefittet. $(y = A_2 + \frac{A-1-A_2}{1+\exp(\frac{(t-t_0)}{dt})})$, mit den Werten $A_1=8,295 \pm 0,001$, $A_2=8,254 \pm 0,002$, $t_0 = 263,8 \pm 2,0$ und $dt = 11,3 \pm 1,7$).

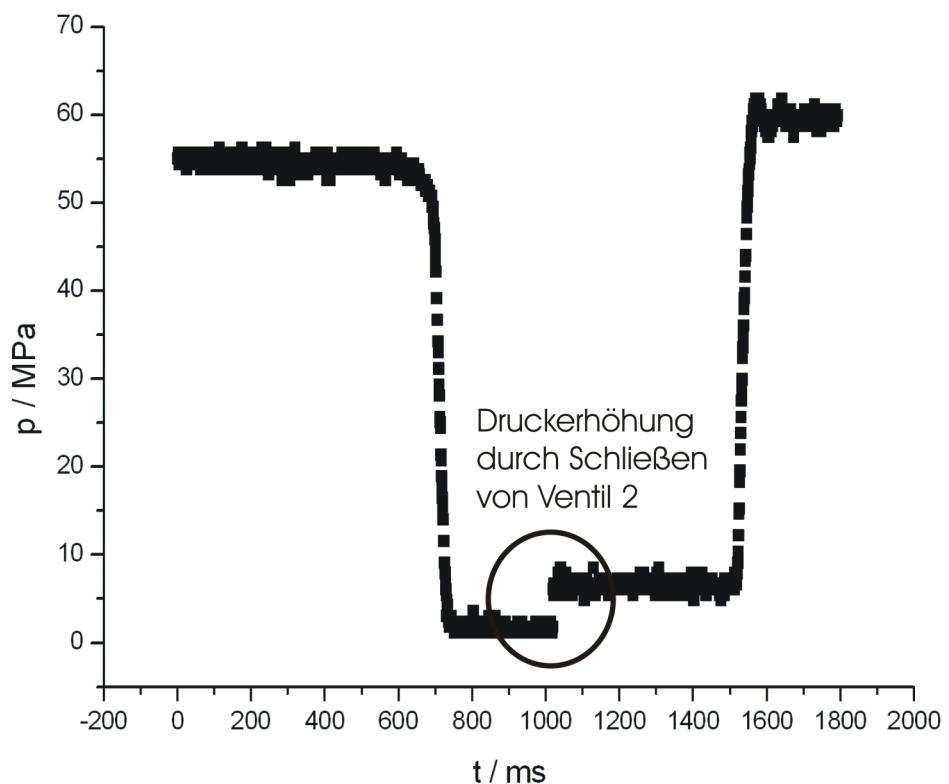


Abbildung 4.32: Beim Schließen von Ventil 2 ist eine leichte Druckerhöhung von 5 MPa zu sehen.

Ebenso wichtig wie die Druckflanke selbst ist die Wiederholbarkeit derselben, da bei Drucksprungexperimenten eine einzige Aufnahme nicht ausreichend ist. Bei den Messungen müssen mehrere Aufnahmen addiert werden, um ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Um die Wiederholbarkeit der Druckflanke zu testen, wurden mehrere tausend Druckflanken am Stück aufgenommen und gespeichert. Zum Vergleich wurden aus diesen tausend Aufnahmen zufällig zehn Druckflanken ausgewählt und miteinander verglichen. Bei diesem Vergleich zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung sowohl in der Höhe als auch in der Form der Druckflanken. Tabelle 4.5 zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichung. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Pulsprogramm mit der Druckflanke gut durch das Steuergerät synchronisiert wird. Der Fehler beträgt nach der Arbeit von ARNOLD [Arn02] 1 ms.

Drucksprungmessungen stellen sehr hohe Ansprüche an das Material. Des Weiteren lassen die häufigen Kompressionen und Entspannungen der Probe, die in kurzer Zeit stattfinden, auch vermuten, dass sich die Temperatur während den Messungen ändert. Um dies zu untersuchen, wurden in der Drucksprunganlage Proben mit Ethylenglycol vermessen. Ethylenglycol dient zur Temperatureichung des Spektrometers und ist somit sehr gut geeignet, Änderungen in der Temperatur zu registrieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Temperaturabhängigkeit durch die Gleichung $T_{Probe} = 465,8 - 102,24(\Delta\delta_{EG})$ beschrieben werden kann [Kap75]. Sie wurde zur Temperatureichung des Spektrometers verwendet. Bei dieser Untersuchung wurden zunächst Eichkurven aufgenommen, welche die Einflüsse der Parameter Druck und Temperatur auf Ethylenglycol aufzeigten. Als Maß für die Temperatur wurde die Shiftdifferenz zwischen dem Methyl- und Hydroxyl-Signal verwendet. Abbildung 4.33 zeigt diesen Druckverlauf, wonach bis 100 MPa ein linearer Zusammenhang zwischen dem Druck und dem Abstand der beiden Signale zu erkennen ist. Diese Shiftänderungen sind nicht auf die Temperatur zurückzuführen, sondern werden lediglich durch den Druck hervorgerufen. Der Druckkoeffizient für Ethylenglycol konnte zu $-4,6 \cdot 10^{-4}$ ppm/MPa bestimmt wer-

ansteigende Druckflanke		
Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
A1	5,9	0,1
A2	58,9	0,2
t ₀	512,2	0,6
dt	6,99	0,03
fallende Druckflanke		
Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
A1	53,5	0,2
A2	1,8	0,1
t ₀	3587,7	0,1
dt	7,39	0,02

Tabelle 4.5: Mittelwerte und Standardabweichung der Wiederholbarkeit der Druckflanken (ansteigende und fallende Druckflanke). Für die Berechnungen wurden zufällig zehn Druckflanken aus mehreren Tausend ausgewählt. Die Kurven wurden mit einer Sigmoidalfunktion angefittet: $(y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp(\frac{(t - t_0)}{dt})})$.

den. Somit könnte die Gleichung für die Temperaturabhängigkeit um eine Druckabhängigkeit erweitert werden: $T_{Probe} = 465,8 - 102,24(\Delta\delta_{EG}) + 0,047(p - p_0)$. Bei den statischen Messungen wurden zwei Temperaturkurven aufgenommen: (1) Bei Normaldruck und (2) bei 60 MPa. Dies entspricht genau der Druckdifferenz, die auch bei den Drucksprungexperimenten verwendet wurde. Diese Messungen (Abbildung 4.34 und Abbildung 4.35) zeigen wieder einen linearen Zusammenhang: Die Erhöhung der Temperatur führt zu einer höheren Differenz der Referenzsignale. Beide Kurven, sowohl bei Normaldruck als auch bei 60 MPa, haben dieselbe Steigung von 0,015 ppm/K.

Bei vorliegender Arbeit wurde sowohl die *steigende* als auch die *fallende* Druckflanke untersucht (Abbildung 4.36 und Abbildung 4.37). Die Wiederholrate mit $0,2 \text{ s}^{-1}$ wurde so gewählt, dass vor dem nächsten Experiment die Temperatur wieder auf ihren Ausgangswert zurückgegangen war. Für den Drucksprung zu hohem Druck ergibt sich zuerst eine Erhöhung und anschließend ein exponentieller Abfall der Shiftdifferenz zwischen dem Methyl- und Hydroxyl-Signal. Da diese Shiftdifferenz ein Maß für die Temperatur ist, gibt diese Kurve auch den Temperaturverlauf wieder: Zu Beginn ist eine Temperaturerhöhung festzustellen, die mit der Zeit wieder abnimmt. Mithilfe des Steigungskoeffizienten, der aus den zwei Temperaturreihen berechnet wurde, ergibt sich eine maximale Temperaturerhöhung von 0,73 K. Für den umgekehrten Fall, den Drucksprung von hohem zu niedrigem Druck, konnte eine Erniedrigung der Temperatur festgestellt werden, die bei 0,59 K liegt. Der Temperaturverlauf kann in beiden Fällen durch dieselbe exponentielle Funktion erklärt und beschrieben werden. Diese Drucksprungmessungen erfolgten bei 50 MPa. Die Abbildungen 4.36 und 4.37 zeigen für Drucksprünge nur eine kleine Temperaturänderung. Hier wurden sowohl Drucksprünge zu hohem Druck als auch zu niedrigem Druck untersucht. Zusammenfassend kann sichergestellt werden, dass während der Drucksprungexperimente kein großer Temperatureffekt auftritt und dieser Effekt vernachlässigt werden kann.

Wie ERNST [Ern06] in seiner Diplomarbeit zeigt, ist es auch möglich, mit die-

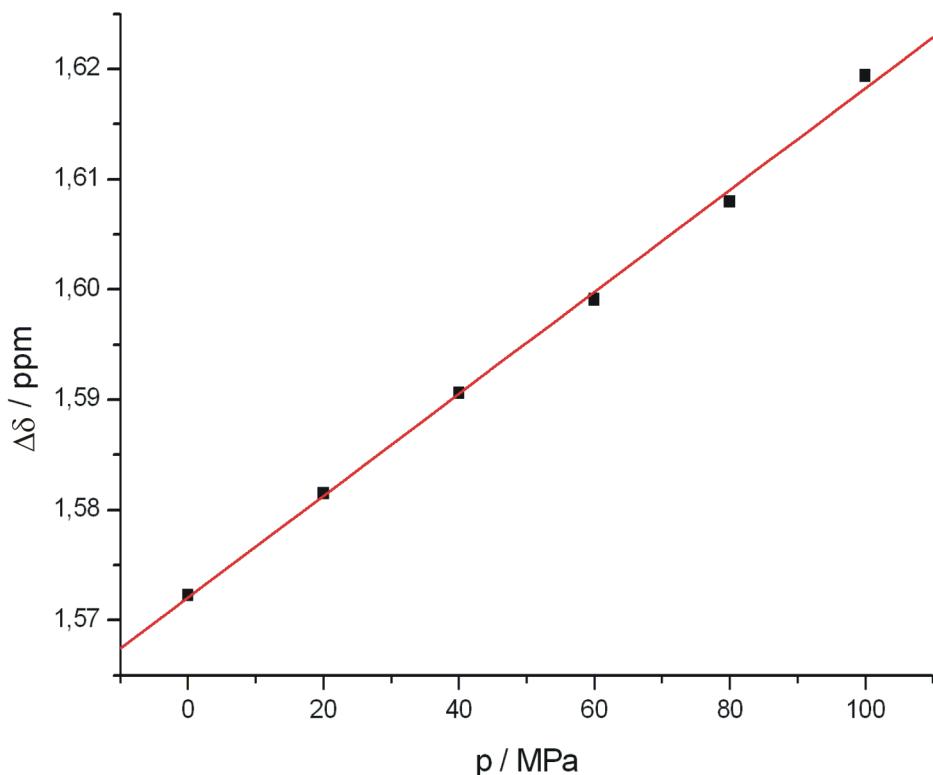


Abbildung 4.33: Auftragung der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen dem Methyl- und Hydroxylsignal von Ethylenglycol gegen den Druck bei 278 K aufgenommen bei 500 MHz. Für den Druckbereich bis 100 MPa besteht ein linearer Zusammenhang. Der Druckkoeffizient wurde zu $4,6 \cdot 10^{-4} \text{ ppm/MPa}$ bestimmt.

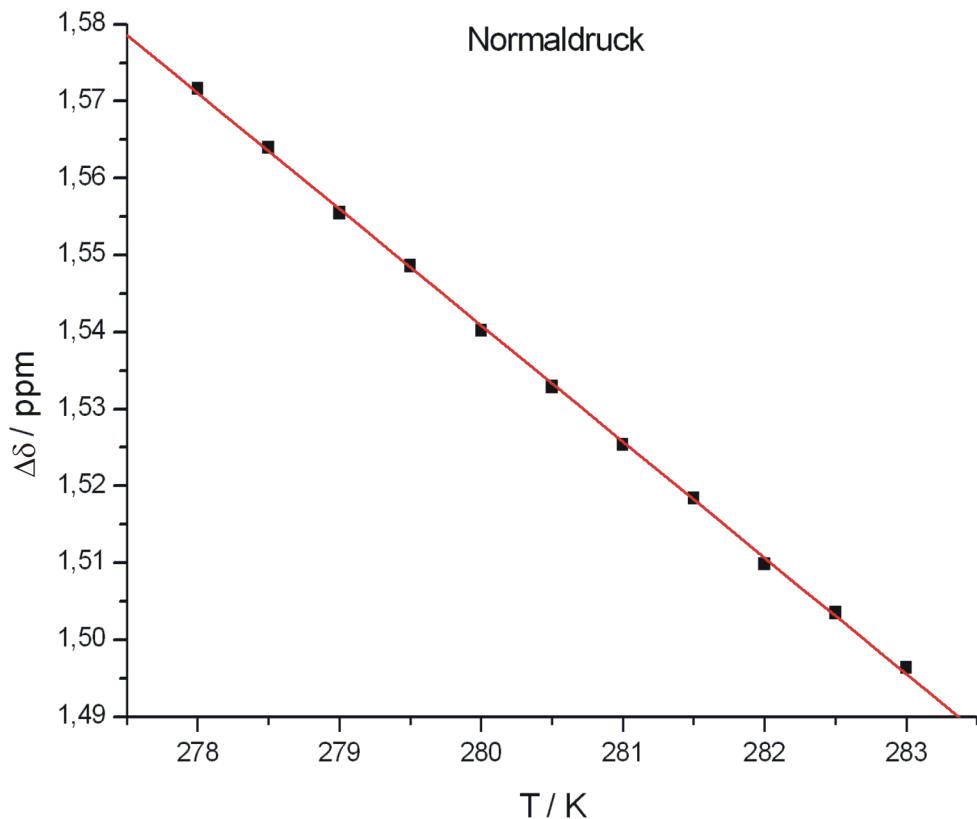


Abbildung 4.34: Auftragung der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen dem Methyl- und Hydroxylsignal von Ethylenglycol gegen die Temperatur bei Normaldruck aufgenommen bei 500 MHz. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Shiftdifferenz zwischen dem Methyl- und Hydroxylsignal von Ethylenglycol mit einer Steigung von -0,015 ppm/K.

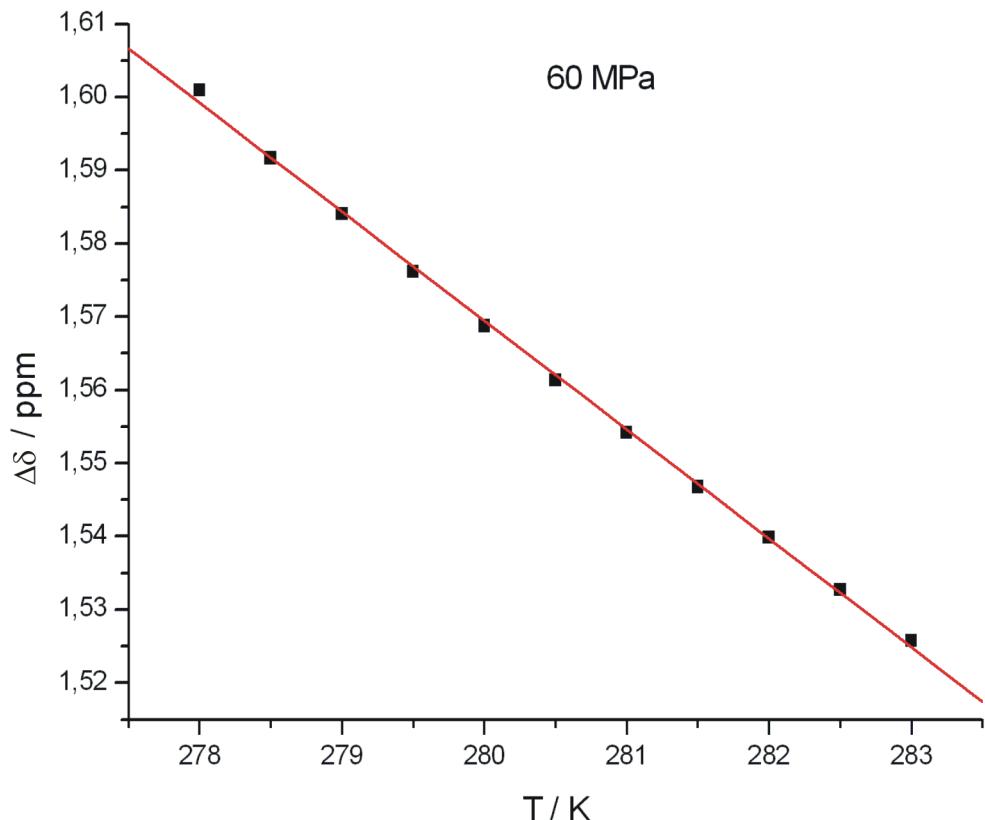


Abbildung 4.35: Auftragung der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen dem Methyl- und Hydroxylsignal von Ethylenglycol gegen die Temperatur bei 60 MPa aufgenommen bei 500 MHz. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Shiftdifferenz zwischen dem Methyl- und Hydroxylsignal von Ethylenglycol mit einer Steigung von -0,015 ppm/K.

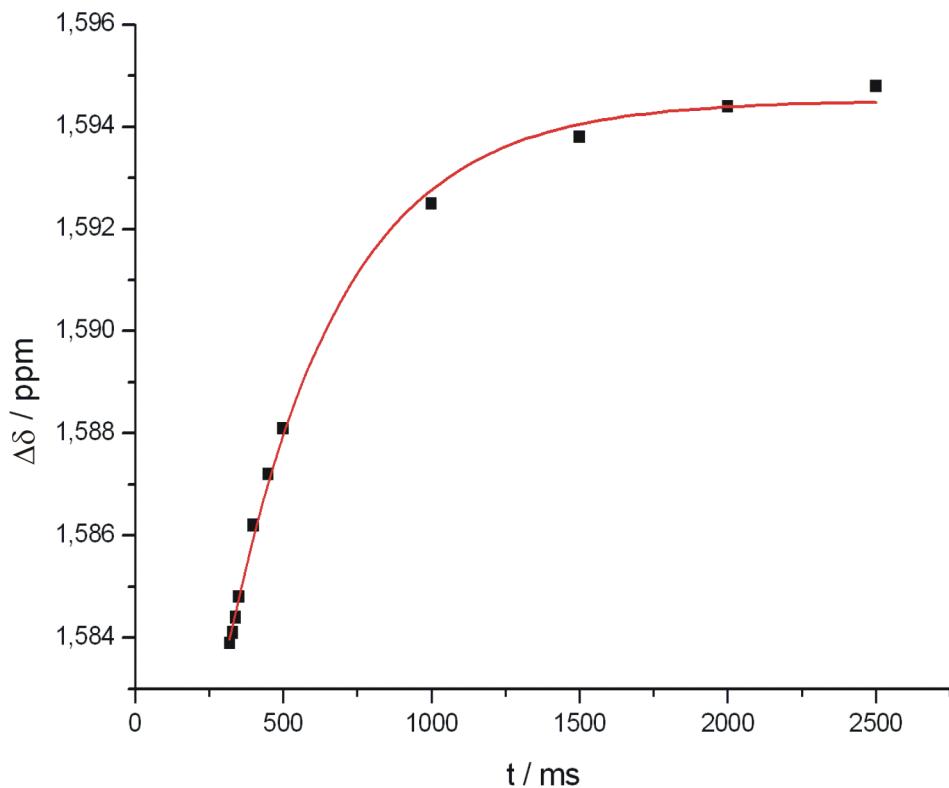


Abbildung 4.36: Auftragung der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen dem Methyl- und Hydroxylsignal von Ethylenglycol gegen die Zeit bei 278 K aufgenommen bei 500 MHz für einen Drucksprung von niedrigem zu hohem Druck. $t = 0$ entspricht dem Start des Drucksprungtimings (vgl. Abbildung 4.9). Die Delayzeiten 1-4 waren: 1 ms, 700 ms, 3100 ms und 3800 ms. Die d_2 Zeit betrug 300 μ s und d_5 betrug 250 ms. Die gesamte Wiederholrate für das Experiment betrug $0,2\text{ s}^{-1}$. Die Kurve wurde mit einer Exponentialfunktion gefittet. ($y = A + n * \exp(-\frac{x}{\tau})$, mit den Werten $A = 3,4705 \pm 0,0001$, $n = 379 \pm 22$ und $\tau = 0,025 \pm 0,001$.) Es konnte eine Temperaturerhöhung um 0,73 K festgestellt werden.

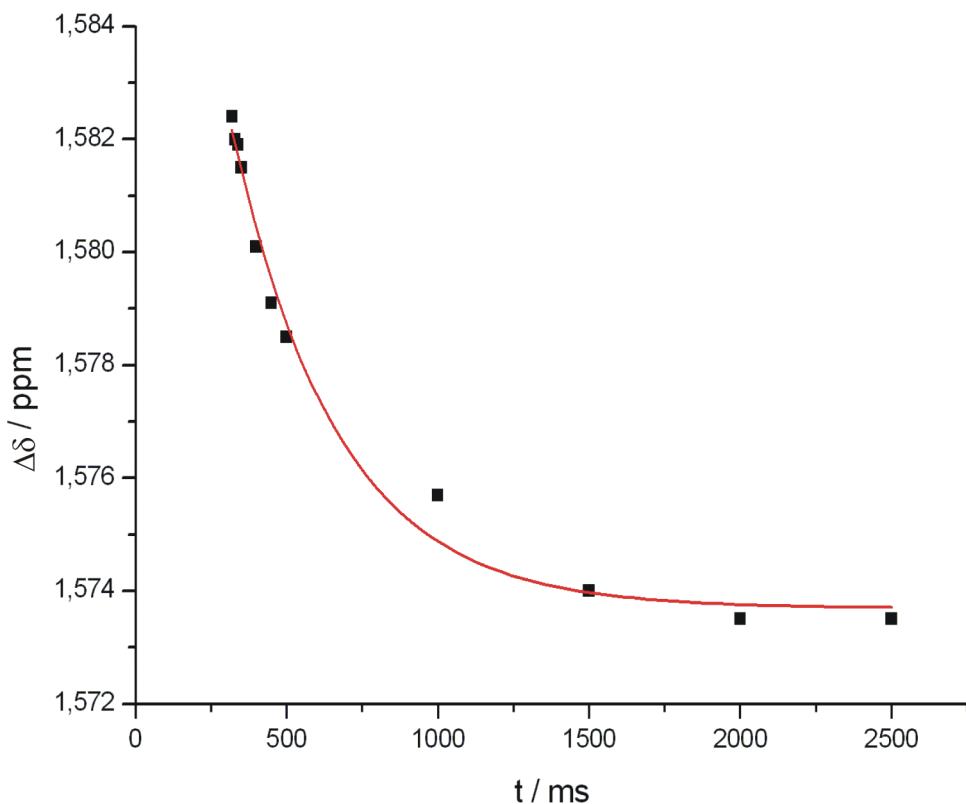


Abbildung 4.37: Auftragung der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen dem Methyl- und Hydroxylsignal von Ethylenglycol gegen die Zeit bei 278 K aufgenommen bei 500 MHz für einen Drucksprung von hohem zu niedrigem Druck. $t = 0$ entspricht dem Start des Drucksprungtimings (vgl. Abbildung 4.9). Die Delayzeiten 1-4 waren: 1 ms, 700 ms, 3100 ms und 3800 ms. Die d2 Zeit betrug 300 μ s und d5 betrug 250 ms. Die gesamte Wiederholrate für das Experiment betrug $0,2 \text{ s}^{-1}$. Die Kurve wurde mit einer Exponentialfunktion gefittet. ($y = A + n * \exp(-\frac{x}{\tau})$, mit den Werten $A = 3,47 \pm 0,03$, $n = 346 \pm 44$ und $\tau = 0,021 \pm 0,003$.) Es konnte eine Temperaturerniedrigung um 0,59 K festgestellt werden.

ser Drucksprung-Anlage *partielle Drucksprünge* durchzuführen. Für den Ablauf partieller Drucksprünge werden die Ventile nur solange geöffnet, bis ein Teil des Drucks aufgebaut bzw. abgebaut wird. Der Vorteil der partiellen Drucksprünge liegt in der niedrigeren Belastung für das gesamte System. Es können auch Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen der niedrigere Druck höher als der Normaldruck ist. Die Druckniveaus der partiellen Drucksprünge unterliegen kleinen Schwankungen. Diese Schwankungen hatten jedoch bei Testmessungen an Histidin, keinen Einfluss auf die Linienbreite.

Nach diesen Vormessungen, welche die Anlage charakterisieren, wurden die ersten Messungen mit der Drucksprunganlage an einem einfachen System durchgeführt. Histidin ist für folgende Messungen sehr gut geeignet, da es zwei druckabhängige Linien (die Ringprotonen $H^{\delta 2}$, $H^{\varepsilon 1}$) vorweist, die sehr signalstark und gut zu unterscheiden sind. Die Druckabhängigkeit der Ringprotonen wurde bereits in der Arbeit von ARNOLD [Arn02] an dem Modell-System H-Gly-Gly-X-Ala-OH mit Histidin an Position 3 untersucht. Als Referenz-Signal wurde in dieser Studie DSS zu der Probe gegeben und zunächst eine statische Druckreihe von Histidin aufgenommen. Wie in den Abbildungen 4.38 und 4.39 zu sehen ist, zeigt Histidin für die zwei Ringprotonen einen linearen Verlauf, der für $H^{\delta 2}$ bei ca. 7,3 ppm und für $H^{\varepsilon 1}$ bei ca. 8,4 ppm bis 200 MPa liegt. Diese lineare Druckabhängigkeit der Ringprotonen lässt sich damit als Eichung für den eingestellten Druck verwenden.

Die Eichung des Drucks durch Histidin wurde bereits, wie weiter oben im Text beschrieben, verwendet, um die Antwortzeiten des Drucksprungs zu testen. Zugleich konnte mit dieser Messung gezeigt werden, dass die Verschiebungen der Drucklinien mindestens im Bereich von Millisekunden oder schneller stattfinden. Ziel dieser 1D-Messungen ist es, Systeme zu finden, in denen es Bereiche gibt, die unterschiedlich schnell auf Druckänderungen reagieren. Somit könnte man mit dieser Drucksprunganlage die Bereiche identifizieren, bei denen der Druck zuerst Änderungen hervorruft. Darüber hinaus könnten auch mögliche Zwischenzustände von Proteinen sichtbar gemacht werden.

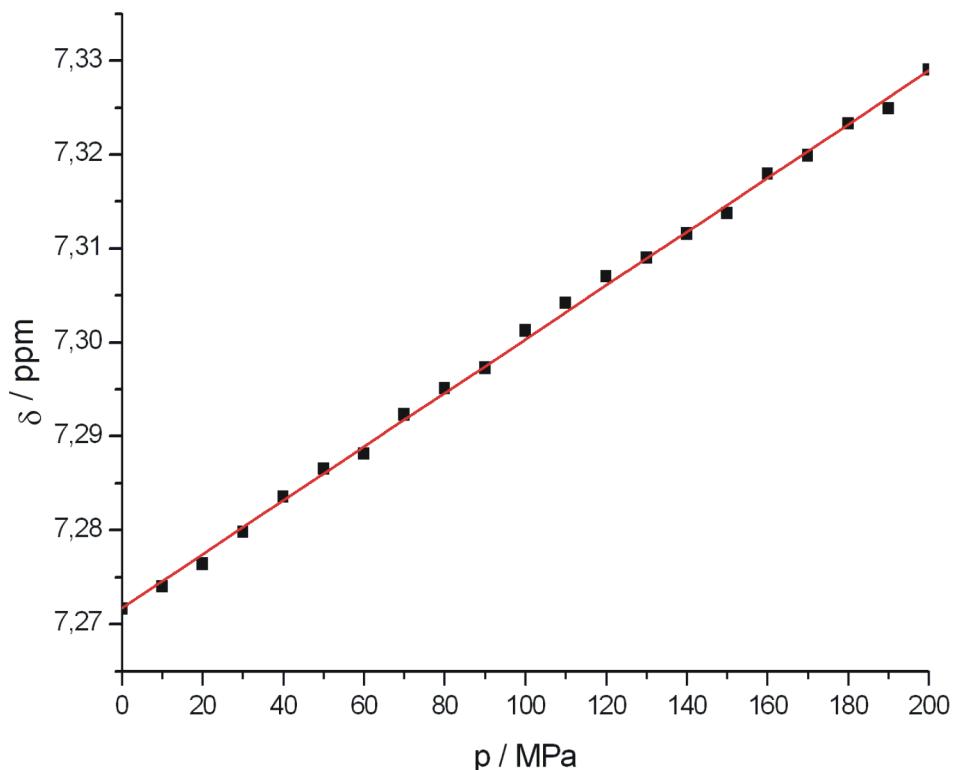


Abbildung 4.38: Auftragung der chemischen Verschiebung der Linie H^1 von Histidin gegen Druck bei 298 K aufgenommen bei 500 MHz. Bis zu einem Druck von 200 MPa wurde ein lineares Verhalten festgestellt mit einer Steigung von $2,86 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-6}$ ppm/MPa. Probenzusammensetzung: 1 M Histidin in D_2O , 1 M Kaliumphosphat-Puffer, 1 mM DSS.

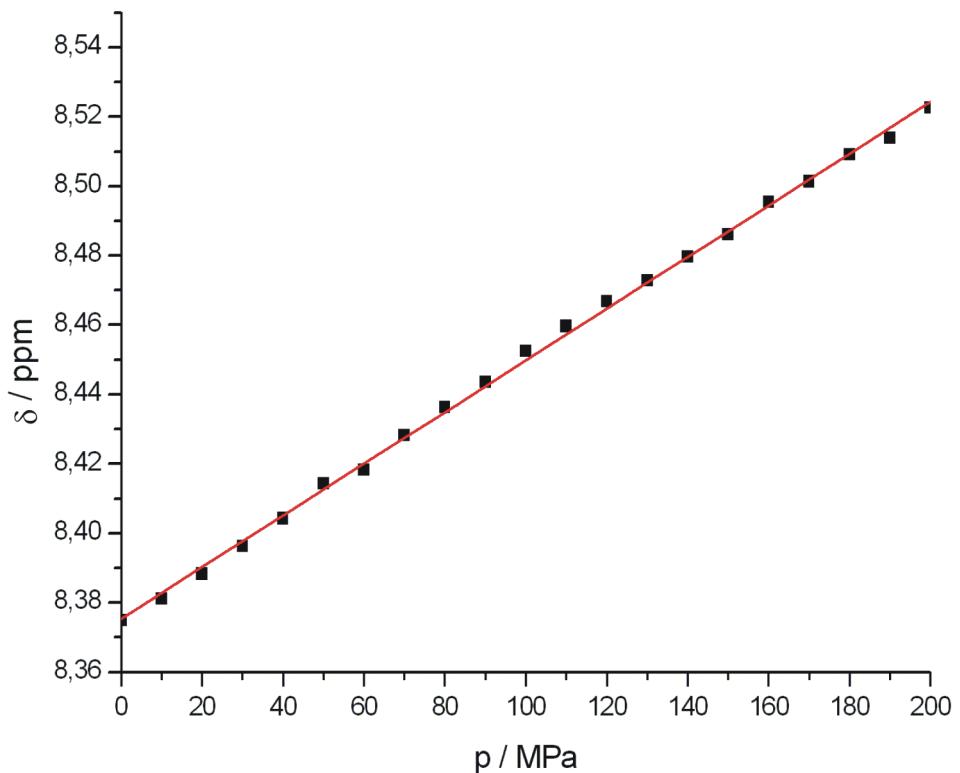


Abbildung 4.39: Auftragung der chemischen Verschiebung der Linie $H^δ$ von Histidin gegen Druck bei 298 K aufgenommen bei 500 MHz. Bis zu einem Druck von 200 MPa wurde ein lineares Verhalten festgestellt mit einer Steigung von $7,45 \times 10^{-4} \pm 5 \times 10^{-6}$ ppm/MPa. Probenzusammensetzung: 1 M Histidin in D_2O , 1 M Kaliumphosphat-Puffer, 1 mM DSS.

Nachdem Histidin durch die statischen Messungen charakterisiert wurde, ist für die vorliegende Arbeit ein Pulsprogramm entwickelt worden, mit dem es möglich war, Drucksprungexperimente als zweidimensionales Spektrum aufzunehmen. Dafür wurde ein NOESY-Pulsprogramm durch die Kommunikation des Mikroprozessors mit dem Spektrometer und den Wartezeiten erweitert (dieses Pulsprogramm befindet sich auch im Anhang 7.3). Nachfolgend wird ein Drucksprung von hohem zu niedrigem Druck beschrieben, wobei es genauso möglich ist einen Drucksprung von niedrigem zu hohem Druck durchzuführen.

Das Pulsprogramm wurde so konzipiert, dass während der Evolution hoher Druck an der Probe anliegt. Während der Mischzeit erfolgte der Drucksprung zu Normaldruck. Abbildung 4.40 zeigt das Pulsprogramm und die Lage der Druckflanke. Erst nach Erreichen und Stabilisieren des Normaldrucks wurde detektiert. Bei dieser Messung wurde darauf geachtet, dass die Detektion abgeschlossen wurde, bevor erneut eine Druckflanke erfolgte. Das Ergebnis dieser Messung ist die Aufnahme von beiden Druckniveaus in ein und demselben Experiment. Der hohe Druck wurde in der indirekten Dimension aufgenommen, der Normaldruck in der direkten Dimension. Wird dieses Experiment zusammen mit statischen 2D-Messungen bei Normaldruck und hohem Druck in ein Spektrum eingetragen ergibt sich ein Bild, wie es Abbildung 4.41 zeigt. Auf der Diagonalen sind die beiden statischen Druckmessungen der Linie 1 zu sehen, die bei 8,347 ppm bei 50 MPa und bei 8,406 ppm bei Normaldruck liegen. Unterhalb der Diagonalen befindet sich das zugehörige Kreuzsignal.

Nachdem das System durch Messungen charakterisiert und die ersten erfolgreichen Testmessungen mit Histidin durchgeführt worden sind, wurde dazu übergangen, Proteine zu messen. HPr ist für diese Untersuchungen gut geeignet, da bereits einige statische Hochdruckdaten zu diesem Protein existieren. Wie in den Arbeiten von KALBITZER et al. [Kal00] beschrieben ist, zeigt HPr aus *Staphylococcus carnosus* verschiedene Effekte bei der Anwendung von hohem Druck. Für die Messungen fand die HPr-Mutante I14A Verwendung, bei der das an Po-

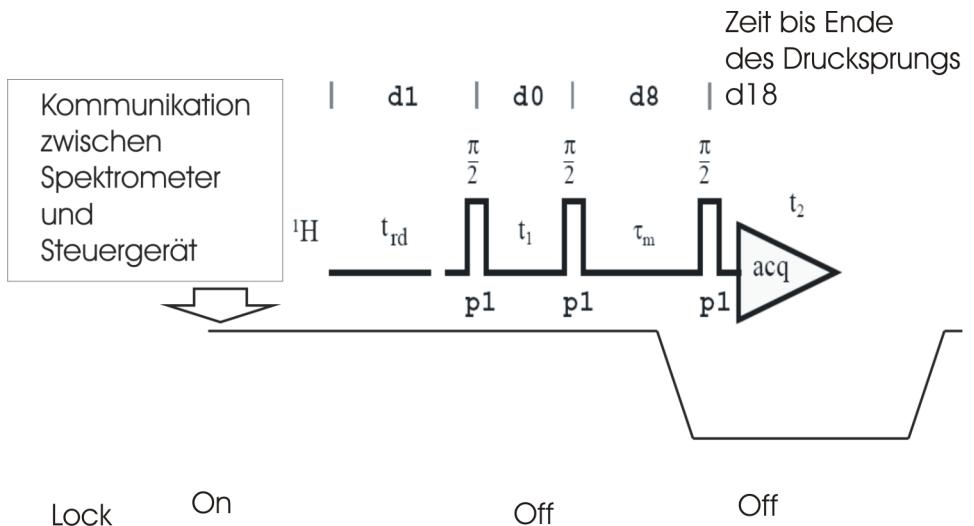


Abbildung 4.40: Schematische Darstellung des Pulsprogramms und die zeitliche Lage der Druckflanke für einen Drucksprung von hohem zu niedrigem Druck. Der Delay $d8$ entspricht der Länge der Druckänderung. Delay $d18$ ist die Summe aller Zeiten (Delays und Pulse) nach der Kommunikation minus Delay 4 (vgl. Abbildung 4.9).

sition 14 befindliche Isoleucin durch einen Alaninrest ausgetauscht wurde (HPr I14A). Dadurch konnte eine künstliche Kavität mit ca. 0,4 nm Durchmesser geschaffen werden. Es wurden 1D-Spektren von HPr I14A bei einer Temperatur von 285 K aufgenommen. Ebenso wurden statische Messungen bei Normaldruck und 80 MPa durchgeführt. Die Drucksprungmessungen fanden von 0 auf 80 MPa mit 64 Wiederholungen statt. Für das Pulsprogramm wurde das Watergate(w5)-Pulsprogramm zggpw5 verwendet, das für die Drucksprungexperimente angepasst wurde (vgl. Abbildung 4.42). Die Delayzeiten 1 und 2 zum Öffnen und Schließen von Ventil 1 lagen bei 1700 ms und 2400 ms. Die Delayzeiten 3 und 4 zum Öffnen und Schließen von Ventil 2 lagen bei 3200 ms und 3900 ms. Die $d2$ Zeit betrug 2,1 ms, was einem Pretrigger von 2,1 Sekunden entspricht.

Wie Abbildung 4.43 zeigt, fehlt im Drucksprungexperiment die Linie bei 7,0 ppm. Bei statischen 80 MPa ist diese Linie jedoch vorhanden.

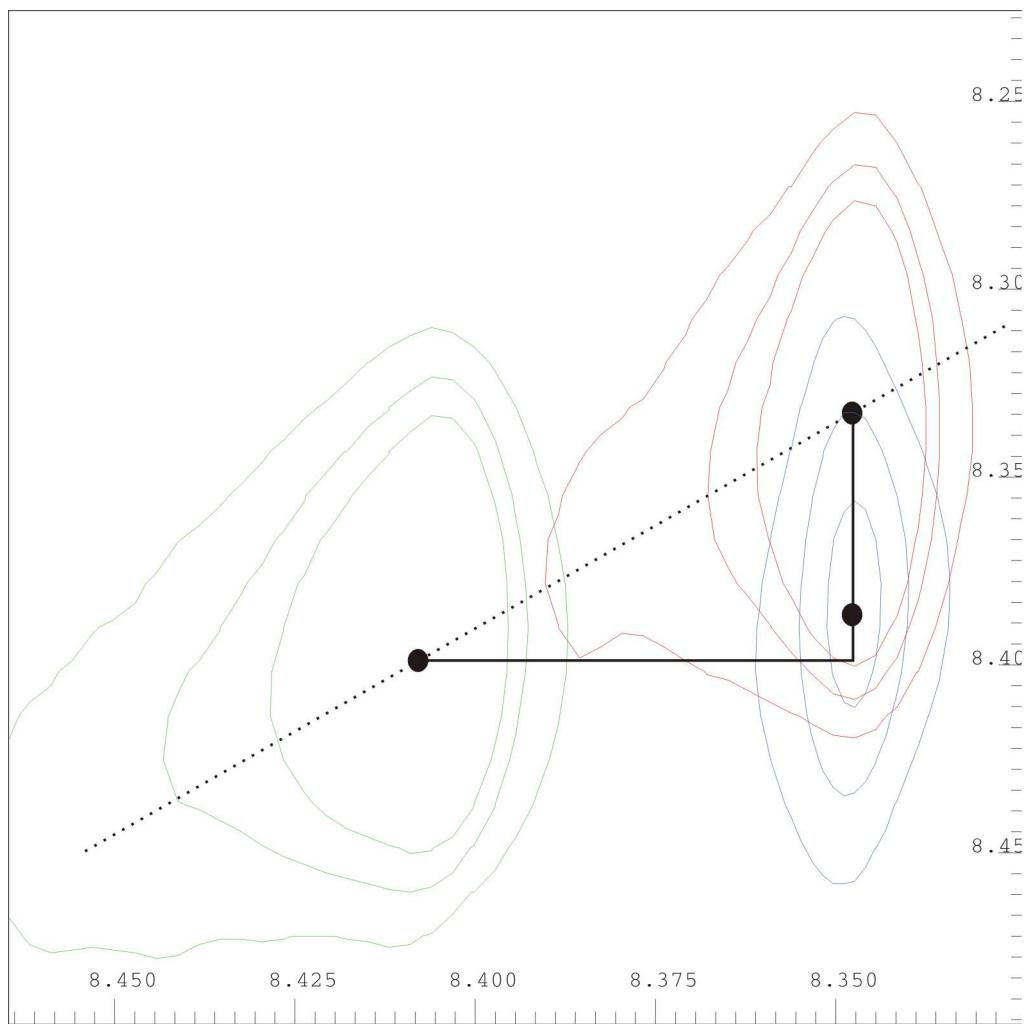


Abbildung 4.41: Zu sehen sind die zwei statischen Messungen bei 80 MPa (rot) und Normaldruck (grün) und die Drucksprungmessung (violett) von 80 MPa auf Normaldruck. Probenzusammensetzung: 1 M Histidin in 99,5 % D_2O , 1 M Kaliumphosphat-Puffer, 1 mM DSS, $pH = 7,25$. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 500 MHz-Spektrometer, TD: 4096, 256 1H), NS: 16, DS: 4. Die Drucksprungmessung stimmt bei Normaldruck exakt mit der statischen Messung bei Normaldruck überein. Zwischen der statischen Messung bei hohem Druck und Drucksprungmessung ist ein Unterschied feststellbar, der aufgrund der Drucknachregulierung durch die Druckpumpe auftritt.

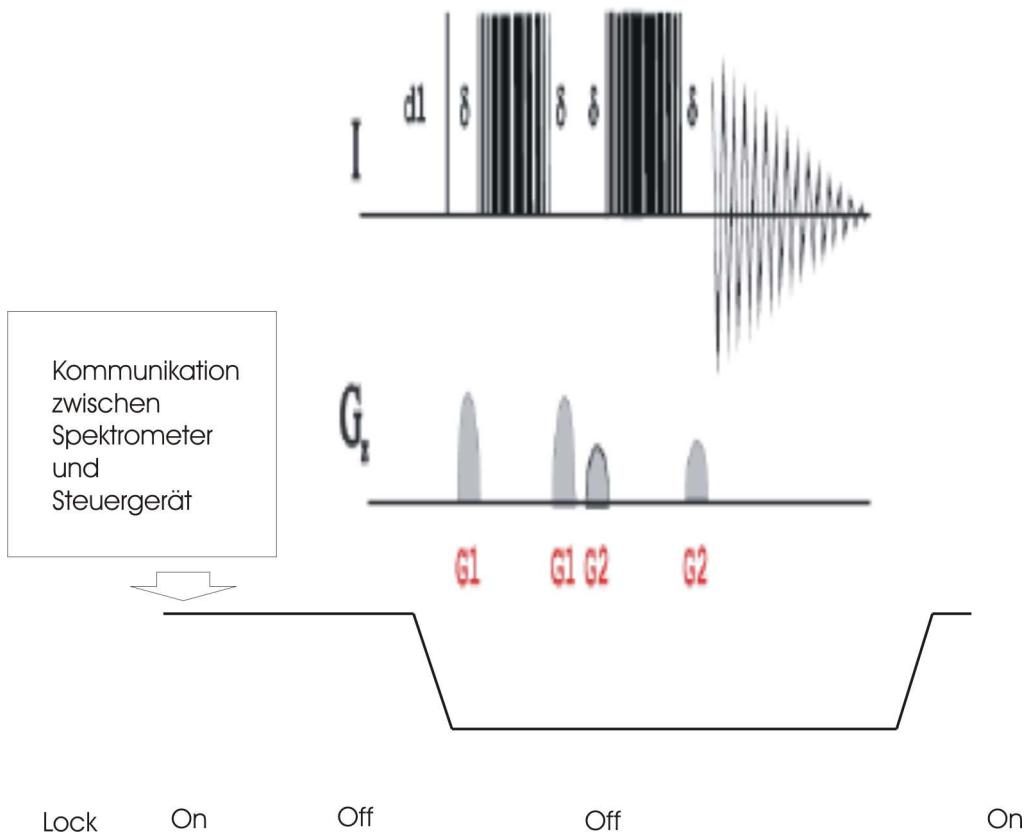


Abbildung 4.42: Schematische Darstellung des Pulsprogramms zggpw5 und die zeitliche Lage der Druckflanke für einen Drucksprung von hohem zu niedrigem Druck. Die Delayzeiten 1 und 2 zum Öffnen und Schließen von Ventil 1 lagen bei 1700 ms und 2400 ms. Die Delayzeiten 3 und 4 zum Öffnen und Schließen von Ventil 2 bei 3200 ms und 3900 ms. Die d_2 Zeit betrug 2,1 ms, was einem Pretrigger von 2,1 Sekunden entspricht.

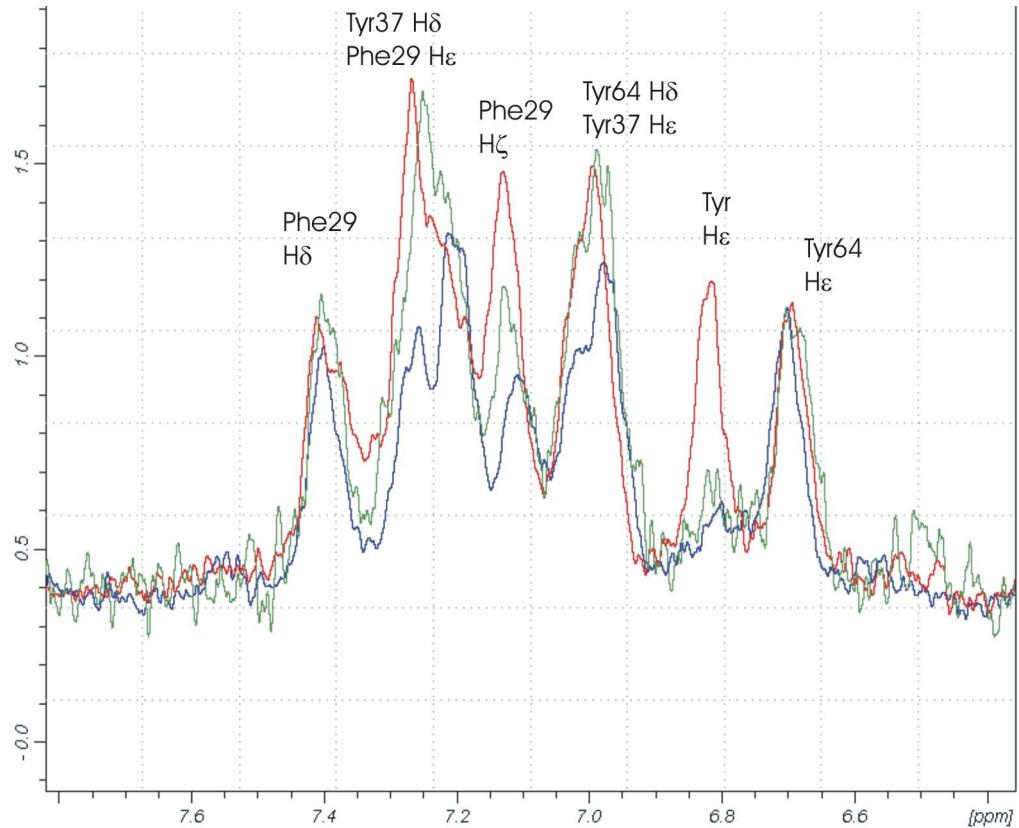


Abbildung 4.43: Überlagerung statischer Messungen bei Normaldruck (blau) und hohem Druck (80 MPa, rot) mit einer Drucksprungmessung von niedrigem zu hohem Druck (grün) von HPr I14A bei 285 K. Probenzusammensetzung: 1 mM HPr I14A, 10 mM Tris-Puffer in D_2O gelöst, 0,5 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA und 0,05 mM DSS. Messbedingungen: Quarzhochdruckzelle mit 0,8 mm Innendurchmesser, 500 MHz-Spektrometer, TD: 16k (1H), NS: 256, DS: 0, LB: 3Hz (statische Messungen); TD: 16k (1H), NS: 64, DS: 1, LB: 3Hz (Drucksprungmessung). Gezeigt ist der Bereich der Ringprotonen um 7 ppm. Das Denaturierungssignal von Tyr Hε bei 6,8 ppm, ist nur bei hohem Druck zu sehen. Für die statische Messung bei Normaldruck und für die Drucksprungmessung von niedrigem zu hohem Druck fehlt das Signal.

4.4 Diskussion

4.4.1 Änderungen am Aufbau der Anlagen

Im Laufe der Arbeit wurden einige Änderungen am Aufbau der Hochdruckanlagen vorgenommen, auf die nachfolgend in der Diskussion nochmals eingegangen wird.

Berstschutz

Wie bereits in dieser Arbeit gezeigt wurde, konnten mithilfe eines gebohrten Berstschutzes keine besseren Linienbreiten für DSS als 5 Hz erzeugt werden (vgl. Kapitel 4.3.1). Bei der Verwendung von Sapphirzellen [Pri97, Arn03] (die z. B. für die Untersuchungen des Prion-Proteins verwendet wurden [Kac06]) spielte der Berstschutz keine Rolle, da die Sapphirzellen schon für eine solche Linienverbreiterung verantwortlich waren. Bei der Verwendung von Quarz- oder Duran-Hochdruckzellen war diese Linienverbreiterung jedoch ein enormer Nachteil. Um diesen zu umgehen, wurden Berstschutze aus einem Teflonschlauch entwickelt. Diese haben zum einen keinen messbaren Einfluss auf die Linienbreite, zum anderen sind sie auch sehr widerstandsfähig gegen Explosionen und können somit den Probenkopf schützen.

Autoklav

Der Autoklav der Hochdruckmessungen wurde nur geringfügig verändert. Die Schraube, die die Hochdruckzelle an den Autoklaven drückt, wurde mit einem flacheren Gewinde angefertigt. Durch diese Änderung kann, wenn die Schraube mit zu hohem Kraftaufwand festgedreht wird, ein Bruch der Kapillare verhindert werden.

Statische Hochdruckanlage

Für den Aufbau der statischen Hochdruckanlage am 800 MHz-Spektrometer mussten diverse Änderungen im Gegensatz zum Aufbau am 600 MHz-Spektrometer vorgenommen werden.

Die Zuleitungen zur Probe wurden durch Leitungen mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm (vorher 0,1 mm) ersetzt. Dadurch konnte die Gefahr reduziert werden, dass kleine Partikel, die durch den Abrieb innerhalb des Leitungssystems der Anlage entstehen, die sehr dünnen Leitungen verstopfen. Der Druck, der sich innerhalb der Leitungen aufbaut, wurde am Manometer richtig angezeigt, jedoch nicht an die Probe weitergeleitet. Eine Verstopfung ist nur durch eine fehlende Druckantwort des zu messenden Systems festzustellen.

Der geometrische Unterschied zwischen dem 800 MHz- und 600 MHz-Spektrometer machte es nötig, längere Zuleitungen und Rohre zu verwenden. Dadurch erhöhte sich das Gewicht, das auf den Probenkopf lastete enorm. Ein Ersetzen des Messingrohres durch ein Rohr aus Aluminium alleine reichte nicht für die nötige Entlastung des Probenkopfes aus. Aus diesem Grund wurde für das Spektrometer ein Aufsatz entwickelt, der das Gewicht der Zuleitung inklusive Rohr auf das Gehäuse des Spektrometers verteilt.

Luftleere Zuleitungen sind für einen definierten Druckübertrag sehr wichtig. Deshalb wurde zusätzlich zur Entlüftungsvorrichtung, die an der Druckbank befestigt ist, ein Vorrat am höchsten Punkt der Anlage angebracht. Durch diesen Vorrat können Luftblasen, die sich in dem System durch das An- und Abschrauben der Proben gebildet haben, entfernt werden.

Drucksprunganlage

Um die Möglichkeit der Drucksprunganlage zu nutzen nämlich in beide Richtungen (zu niedrigem Druck und zu hohem Druck) ausreichend schnell messen zu können, wurde die Leitung von der Druckbank zu den Ventilen durch ein

dickes Rohr (Innendurchmesser 0,35 mm) ersetzt. Die Testmessungen belegen, dass durch diese Änderung die Geschwindigkeit für den Druckanstieg deutlich erhöht werden konnte.

Ebenso wie bei den statischen Hochdruckmessungen, ist es bei den Drucksprungmessungen sehr wichtig, die Leitungen von Luftbläschen zu befreien. Aus diesem Grund wurde an die Leitungen der Drucksprunganlage eine Vakuumpumpe angeschlossen. Durch diese Pumpe wird in sämtlichen Zuleitungen ein Vakuum erzeugt. Die Leitungen werden anschließend mit der Druckflüssigkeit geflutet.

4.4.2 Statische Hochdruckmessungen

Am Protein HPr I14A wurden statische Hochdruckmessungen durchgeführt. 1D-Messungen wurden an einer Probe in D₂O aufgenommen. Für die 2D-Messungen wurde ¹⁵N markiertes Protein in 90 % H₂O/10 % D₂O verwendet.

1D-Messungen an HPr I14A

Wie HATTORI et al. [Hat04] für HPr von *Staphylococcus carnosus* gezeigt haben, verschwinden die Signale von Tyr 6 (H^δ und H^ε) bei tieferen Temperaturen aufgrund einer Austauschverbreiterung. Derselbe Effekt ist auch für die Mutante I14A von HPr zu beobachten. Dieser Effekt kann durch eine geringere Flip-Rate mit sinkender Temperatur erklärt werden.

Durch die Aufnahme von Druckreihen bei verschiedenen Temperaturen wurde, wie auch zu erwarten war, eine Denaturierung bei hohem Druck festgestellt. Quantitativ wurde die Denaturierung durch das Verhältnis der Intensität des Signals im nativ gefalteten Zustand zum Denaturierungssignal des Ringprotons H^δ von Phe 29 bestimmt. Aus diesen Denaturierungswerten ist zusätzlich zu hohen und niedrigen Temperaturen eine Temperaturdenaturierung abzulesen. Somit ist das Protein bei einer Temperatur zwischen 288 K und 298 K am stabilsten und liegt nur zu einem Bruchteil von weniger als 5 % in denaturierter Form vor.

Wie auch für das Tyr 6 wird für das DSS bei Normaldruck hin zu niedrigen Temperaturen eine Austauschverbreiterung beobachtet. Eine Erklärung für diese Austauschverbreiterung stellt die Kavität von HPr I14A dar, in die das DSS binden könnte. Verstärkt wird diese Vermutung durch die Druckreihe bis 200 MPa bei 278 K. Bei Erhöhung des Drucks konnte der Übergang in eine schmale Linie beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass durch die Denaturierung des Proteins ein Übergang in einen schnellen Austausch vorliegt. Zusätzlich wird bei 200 MPa für die Temperaturreihe hin zu hohen und niedrigen Temperaturen ein Übergang in den schnellen Austausch beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Austauschverbreiterung des DSS-Signals und der Denaturierung besteht.

2D-Messungen an HPr I14A

Ebenso wie bei den 1D-Messungen an HPr I14A wurden bei den 2D-HSQC-Messungen Druckreihen bei verschiedenen Temperaturen gemessen.

Für jede Druckreihe entstehen im zentralen Bereich des Spektrums (zwischen 8,0 ppm und 8,5 ppm in der Protonenrichtung und 120 ppm und 125 ppm in der ¹⁵N-Dimension) neue Signale. Diese Signale nehmen mit Erhöhung des Drucks an Intensität zu und sind durch die Denaturierung des Proteins zu erklären.

Zu Beginn jeder Druckerhöhung verschwinden zuerst die Signale von HPr I14A in unmittelbarer Nähe der Kavität. Daraus lässt sich schließen, dass die Kavität zuerst von der Denaturierung betroffen ist. Diese Reaktion ist dadurch zu erklären, dass Wassermoleküle in die Kavität eindringen, die hydrophoben Wechselwirkungen im Kern unterbinden und dadurch das Protein destabilisieren [Hum98].

Zusätzlich zu der Denaturierung wird zu hohem Druck hin für die Aminosäure Gly 13 eine Aufspaltung in zwei Signale beobachtet. Dieser Übergang lässt auf einen langsamen Austausch zwischen zwei Konformationen schließen.

4.4.3 Drucksprungmessungen

Die Drucksprunganlage wurde von ARNOLD [Arn02] während seiner Dissertation aufgebaut. In vorliegender Arbeit wurde die Anlage getestet und daran erste Messungen an Histidin und HPr durchgeführt. Jedoch anders als in der Dissertation von ARNOLD [Arn02] beschrieben, bestimmt die Länge des Delays d2 (siehe auch Abbildung 4.9) vom Spektrometer zum Steuergerät nicht die Höhe des Drucksprungs. Der Delay d2 gibt nur die Länge des Pretriggers wieder und somit den Zeitpunkt für den Start des Pulsprogrammes vor der ersten Druckflanke.

Die Höhe eines Drucksprunges wird durch den eingestellten Druck an der pneumatisch betriebenen Druckbank festgelegt. Eine Ausnahme bilden die partikulären Drucksprünge, bei denen die Ventilöffnungszeiten je nach Drucksprunghöhe angepasst werden müssen. Diese Drucksprünge unterliegen einer Schwankung von ca. 10 %, die bei Messungen an Histidin jedoch keinen Einfluss auf die Linienbreite hatte [Ern06].

Der Druckanstieg wurde mithilfe von zwei verschiedenen Methoden gemessen: Zum einen direkt über den Drucksensor am Ort der Probe und zum anderen indirekt über das Reaktionsverhalten von Histidin. Das Ergebnis war jeweils ein Druckanstieg im Bereich von 50 ms der schneller vonstatten geht als der von jeder anderen bekannten Methode die es für NMR gibt. Dies trägt maßgeblich zur Qualität der Anlage bei.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Qualität der Anlage ist die Wiederholbarkeit der Druckkurve. Die Aufnahme von mehreren 1000 Druckkurven hintereinander ergab eine sehr gute Wiederholbarkeit derselben. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass durch lange Messungen in den Spektren Artefakte in Folge der mechanischen Ausführung der Anlage auftreten.

Ein Nachteil dieser Anlage soll aber nicht verschwiegen werden. Momentan ist es nur möglich Druckflanken mit bis zu einer Länge von 3,3 Sekunden zu produzieren. Dies wird durch die Software im Mikroprozessor und der Software,

die auf dem PC zum Einsatz kommt, beschränkt.

Für die Messungen an Histidin wurden zunächst 1D-Messungen aufgenommen. Durch das Inkrementieren des Delays d5 wurde die Aufnahme des FID durch die Druckflanke, von hohem zu niedrigem Druck, geschoben. Wie bereits Abbildung 4.31 zeigte, schiebt sich die drucksensitive Linie mit größer werdendem Delay d5 zu höheren ppm Werten hin, was einem höheren Druck entspricht. Aufgrund der Linearität der Drucklinie wäre es durchaus möglich, Histidin als internen Drucksensor zu verwenden.

Durch das Anpassen eines geeigneten Pulsprogramms mit der Kommunikation zwischen Spektrometer und Mikroprozessor konnten 2D-Spektren aufgenommen werden. Für statische Druckmessungen sind 2D-Spektren keine Neuheit mehr und werden in der Forschung dazu verwendet, die Druckantwort von Proteinen zu untersuchen. 2D-Drucksprungexperimente werden allerdings erst durch die Steuerung eines Mikroprozessors ermöglicht, der die Drucksprungflanken mit dem Pulsprogramm synchronisiert.

In dieser Arbeit wurden für die 2D-Histidin-Messungen zunächst statische Messungen durchgeführt. Die 2D-Drucksprungmessung fügte sich fast optimal in die statischen Messungen ein (vgl. Abbildung 4.41).

Die Drucksprungmethode wird erst durch Messungen an Proteinen ausgereizt. Mit dieser Methode ist es möglich, bei geeigneten Proteinen die zeitlichen Änderungen (wann bewirkt wo der Druck die ersten Änderungen) mitzuverfolgen. Die ersten Messungen, bei denen unterschiedliche Bereiche vorhanden sind, wurden an HPr I14A durchgeführt (Abbildung 4.43).

4.5 Zusammenfassung

In Kapitel 4 wurden zum einen die Änderungen an den Hochdruckanlagen beschrieben und zum anderen die Messungen am Protein HPr I14A.

Die Änderungen, die an den Hochdruckanlagen durchgeführt wurden, können

in zwei Kategorien unterteilt werden: (1) Verbesserung der Handhabung und (2) Erhöhung der Sicherheit.

Durch die statischen Hochdruckmessungen an HPr I14A konnten folgende Parameter, bei der Temperatur T_0 (K) von 298 K, bestimmt werden: die Gibbs-Energie bei Normaldruck ΔG_0 (kJ/mol) ($10,6 \pm 0,3$), die Wärmekapazität ΔC_p (kJ/mol K) ($12,5 \pm 1,2$), die Entropie ΔS^0 (kJ/mol K) ($0,16 \pm 0,03$), die teilmolare Volumenänderung ΔV^0 (mL/mol) ($-69,0 \pm 10,5$), der termische Ausdehnungskoeffizient $\Delta\alpha$ (mL/mol K) ($3,1 \pm 1,7$) und die isoterme Kompressibilitätsänderung $\Delta\beta$ (mL/mol bar) ($0,019 \pm 0,006$).

Die 2D-HSQC-Messungen zeigten für Gly 13 bei hohem Druck eine Aufspaltung in zwei Signale. Dies lässt auf einen Austausch zwischen zwei Konformationen schließen.

Die Drucksprunganlage wurde durch eine Reihe von Testmessungen mit Eichproben charakterisiert. Anschließend zeigten Messungen an HPr I14A, dass durch Drucksprung, in verschiedenen Bereichen des Proteins, unterschiedlich schnell Änderungen hervorgerufen werden.

Kapitel 5

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Projekte durchgeführt. Zum einen wurde die Struktur der Ligandbindedomäne (LBD) von PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ) mithilfe der NMR bestimmt und zum anderen die schon existierende Hochdruck-NMR-Apparatur weiterentwickelt und zur Untersuchung von HPr I14A, einer Mutante von HPr (histidine containing protein) von *S. carnosus*, verwendet.

Strukturen von PPAR γ -LBD sind bis dato nur durch die Methode der Röntgenbeugung bestimmt worden. Um eine Struktur in nativer Umgebung zu erhalten, wurde die Ligandbindedomäne von PPAR γ mithilfe der NMR in Ab- und Anwesenheit des Liganden Rosiglitazon untersucht. In Abwesenheit des Liganden sind sie NMR-Spektren von PPAR γ austauschverbreitert und von so geringer Qualität, dass eine NMR-Strukturbestimmung nicht möglich ist. Nach Bindung von Rosiglitazon nimmt die Qualität der Spektren durch eine Verringerung der Linienbreite beträchtlich zu, so dass ca. 90 % der erwarteten Signale detektierbar werden. Für die Strukturrechnungen wurden 2352 Abstandsinformationen (gewonnen aus NOESY-Spektren), 439 Winkelinformationen (mithilfe des Programmes TALOS) und 225 Wasserstoffbrückeninformationen (entnommen aus den Röntgenstrukturen) verwendet. Eine Überlagerung der zehn energieärmsten

Strukturen, von 1024 gerechneten, ergab für das Rückgrat einen RMSD von 0,179 nm und für alle Atome einen RMSD von 0,249 nm. Eine Verbesserung der Struktur konnte mithilfe einer Strukturverfeinerung in Wasser erreicht werden, welche die Interaktion zwischen Protein und Lösung berücksichtigt. Diese Verbesserung konnte vor allem in den Werten der Diederwinkel nachgewiesen werden. Um die NMR-Struktur weiter zu verbessern, wurde der in Regensburg entwickelte ISIC-Algorithmus eingesetzt, mit dessen Hilfe Informationen aus der Röntgenstruktur verwendet werden konnten. Durch die Anwendung dieses Algorithmus konnte eine in allen Bereichen gut definierte Struktur erhalten werden. Sowohl der RMSD (0,0189 nm für das Rückgrat) als auch die Diederwinkel (99,5 % in den erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plotes) zeigten eine deutliche Verbesserung. Die aus der Literatur bekannten Röntgenstrukturen von freiem und ligandierten PPAR γ -LBD unterscheiden sich vor allem durch die Stellung der C-terminalen Helix H12. In der Struktur von PPAR γ -LBD, die mithilfe der NMR ermittelt wurde, nimmt diese Helix eine besondere Position ein: Sie befindet sich zwischen den beiden Positionen der Röntgenstruktur.

Im Laufe dieser Arbeit wurden an den Hochdruckanlagen Umbauten und Weiterentwicklungen vorgenommen, um die Qualität der Anlagen zu verbessern. Diese betrafen u. a. den Berstschutz, den Autoklaven, die Behandlung der Quarzhochdruckzellen und Methoden zur Entlüftung der Anlagen. Durch diese Umbauten konnten sowohl die Sicherheit als auch die Handhabung der Anlagen gesteigert werden. Neben den statischen Druckuntersuchungen wurden erste Experimente mit einer NMR-Drucksprunganlage durchgeführt.

Für Hochdruckmessungen wurde die Mutante von HPr I14A verwendet. Diese zeigte eine fast vollständige Denaturierung bei einem Druck von 2000 bar bei 318 K. Zusätzlich konnte eine Kältedenaturierung für HPr I14A bei 278 K und Normaldruck festgestellt werden. Bei 278 K und Normaldruck verschwindet in den Spektren das Signal der Referenzsubstanz DSS, was bei höheren Temperaturen gut beobachtbar ist. Dies legt nahe, dass im thermischen Gleichgewicht DSS in

die durch die Mutation erzeugte Kavität bindet. Ein ähnliches Verhalten konnte bei der Druckreihe bei 278 K bis 200 MPa festgestellt werden. Auch hier ist ein scharfes DSS-Signal bei 200 MPa zu sehen. Aus den experimentellen Daten konnte die Gleichgewichtskonstante K für das Gleichgewicht zwischen nativ gefalteten und denaturierten Protein in Abhängigkeit von Druck und Temperatur bestimmt werden. Eine Anpassung der experimentellen Daten an ein Zweizustandsmodel erlaubte die Bestimmung der Änderung der freien Enthalpie ΔG_0 , der Entropie ΔS^0 , Wärmekapazität ΔC_p , des molaren partiellen Volumens ΔV^0 , des thermischen Ausdehnungskoeffizienten $\Delta\alpha$ und des Produktes aus isobaren Kompressibilitätsänderung $\Delta\beta$ und dem partiellen Volumen V_0 . Bei 298 K erhält man ein ΔG_0 von $10,6 \pm 0,3$ kJ/mol, ein ΔC_p von $12,5 \pm 1,2$ kJ/mol K, ein ΔS^0 von $0,16 \pm 0,03$ kJ/mol K, ein ΔV^0 von $-69,0 \pm 10,5$ mL/mol, ein $\Delta\alpha$ von $3,1 \pm 1,7$ mL/mol K und ein $\Delta\beta$ von $0,019 \pm 0,006$ mL/mol bar. Bei den 2D- ^1H , ^{15}N -HSQC-Experimenten an HPr I14A konnte für die Aminosäure Gly 13 zu hohem Druck hin (bei den gemessenen Temperaturen zwischen 278 K bis 318 K) eine Aufspaltung in zwei Signale beobachtet werden. Dies deutet auf einen langsamem Austausch mit einem gefalteten Zwischenzustand hin.

Die Drucksprunganlage, die von ARNOLD [Arn02] entwickelt und aufgebaut wurde, konnte in dieser Arbeit in den wichtigsten Punkten charakterisiert werden: So war es möglich, sowohl der Druckanstieg (55 ms) wie auch die Wiederholbarkeit der Druckflanke zu bestimmen. Es wurden erste Testmessungen mit der Aminosäure Histidin durchgeführt, sowohl 1D-Messungen als auch 2D-Messungen. Messungen an HPr I14A zeigten ein unterschiedliches Druckverhalten für unterschiedliche Bereiche des Proteins.

Literaturverzeichnis

- [Aka01] Akasaka K., Li H., Low-Lying Excited States of Proteins Revealed from Nonlinear Pressure Shifts in ^1H and ^{15}N NMR, *Biochemistry*, 40 (2001) 8665-8671
- [Ak103] Akasaka K., Exploring the entire conformational space of proteins by high-pressure NMR, *Pure Appl. Chem.*, 75 (2003) 927-936
- [Ak203] Akasaka K., Highly Fluctuating Protein Structures Revealed by Variable-Pressure Nuclear Magnetic Resonance, *Biochemistry*, 42 (2003) 10875-10885
- [Aka05] Akasaka K., Probing Conformational Fluctuation of Proteins by Pressure Perturbation, *Chem. Rev.*, (2005) 1814 - 1835
- [Arn02] Arnold R. M., Hochdruck NMR, Dissertation, (2002)
- [Arn03] Arnold M. R., Kalbitzer H. R., Kremer W., High-sensitivity sapphire cells for high pressure NMR spectroscopy on proteins., *J. Magn. Reson.*, 61 (2003) 127-131
- [Bal96] Ballard L., Reiner C., Jonas J., High-Resolution NMR Probe for Experiments at High Pressures, *J. Magn. Reson.*, 123 (1996) 87-94
- [Bal98] Ballard L., Yu A., Reiner C., Jonas J., A High-Pressure, High-Resolution NMR Probe for Experiments at 500 MHz, *J. Magn. Reson.*, 133 (1998) 190-193

- [Bon01] Bonneau R., Baker D., Ab initio protein structure prediction: progress and prospects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 30 (2001) 173-189
- [Bou95] Bourguet W., Ruff M., Chambon P., Gronemeyer H., Moras D., Crystal structure of the ligand-bindung domain of the human nuclear receptor RXR- α , *Natur*, 375 (1995) 377-382
- [Bru06] Brunner K., Gronwald G., Trenner J. M., Neidig K.-P., Kalbitzer H. R., A general method for the unbiased improvement of solution NMR structures by the use of related X-Ray data, the AUREMOL-ISIC algorithm, *BMC Structural Biology*, 6 (2006)
- [Cav96] Cavanagh J., Fairbrother W. J., Palmer A. G., Skelton N. J., *Protein NMR Spectroscopy*, Academic Press, (1996)
- [Cle76] R. M. Clegg, B. W. Maxfield, Chemical kinetic studies by a new small pressure perturbation method, *Review Scientific Instrument*, 47 (1976) 1383-1393
- [Cor99] Cornilescu G., Delagio F., Bax A., Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homolgy, *J. Biomol. NMR*, 13 (1999) 289-302
- [Dav92] Davis A. L., Keeler J., Laue E. D., Moskau D., Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients., *J. Magn. Reson.*, 98 (1992) 207-216
- [Die99] Diercks T., Cole M., Kessler H., An efficient strategy for assignment of cross-peaks in 3D heteronuclear NOESY experiments, *J. Biom. NMR*, 15 (1999) 177-180
- [Ern66] Ernst R. R., Anderson W. A., Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance, *Rev. Sci. Instr.*, 37 (1966) 93-102

- [Ern06] Ernst T., Drucksprung-NMR, Diplomarbeit, (2006)
- [Gaa76] Gaarz u., Lüdemann H.-D., Druckabhängigkeit der Selbstassoziation von 9-Methylpurin in wässriger Lösung, Ber. Bunsenges. phys. Chem., 80 (1976) 607-614
- [Gam00] Gampe R. T. Jr., Montana V. G., Lampert M. H., Miller A. B., Bledsoe R. K., Milburn M. V., Kliewer S. A., Willson T. M., Xu H. E., Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors., Mol. Cell, 5 (2000) 545-555
- [Goe97] Görler A., Kalbitzer H. R., Relax, a Flexible Program for the Back Calculation of NOESY Spectra Based on Complete-Relaxation-Matrix Formalism, J. Magn. Reson., 124 (1997) 177-188
- [Goe99] Görler A., Hengstenberg W., Kravanja M., Beneicke W., Maurer T., Kalbitzer H. R., Solution structure of the histidine-containing phosphocarrier protein from *Staphylococcus carnosus*, Appl. Magn. Reson., 17 (1999) 465-480
- [Gro00] Gronwald W., Kirchhofer R., Gorler A., Kremer W., Ganslmeier B., Neidig K.-P., Kalbitzer H. R., RFAC, a program for automated NMR R-factor estimation, J. Biomol. NMR, 17 (2000) 137-151
- [Gua01] Guan Y., Breyer M. D., Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Novel therapeutic targets in renal disease, Kidney Int., 60 (2001) 14-30
- [Gue97] Güntert P., Mimenthaler C., Wüthrich K., Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA., J. Mol. Biol., 273 (1997) 283-298
- [Har02] Hardin C., Pogorelov T.V., Luthey-Schulten Z., Ab initio protein structure prediction., Curr. Opin. Struct. Biol., 12 (2002) 176-181

- [Hau81] Hauer J., Hochauflösungs NMR Spektroskopie unter hohem hydrostatischen Druck an Amiden und monomeren biologischen Molekülen. Dissertation an der Universität Regensburg (1981)
- [Hat04] Hattori M., Li H., Yamada H., Akasaka K., Hengstenberg W., Gronwald W., Kalbitzer H. R., Infrequent cavity-forming fluctuations in HPr from *Staphylococcus carnosus* revealed by pressure- and temperature-dependent tyrosine ring flips, *Prot. Sci.*, 13 (2004) 3104-3114
- [Hen98] Henke B. R., Blanchard S. G., Brackeen M. F., Brown K. K., Cobb J. E., Collins J. L., Harrington W. W., Hashim M. A., Hull-Ryde E. A., Kaldor I., Kliewer S. A., Lake D. H., Leesnitzer L. M., Lehmann J. M., Lenhard J. M., Orban-Miller L. A., Miller J. F., Mook R. A., Noble S. A., Oliver W. J., Parks D. J., Plunket K. D., Szewczyk J. R., Willson T. M., N-(2-Benzoylphenyl)-l-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents., *J. Med. Chem.*, 41 (1998) 5020-5036
- [Hum98] Hummer G., Garde S., Garcia A. E., Paulaitis M. E., Pratt L. R., The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins, *PNAS*, 95 (1998) 1552-1555
- [Jee71] Jeener J., Lecture, Ampere Summer School, Basko Polje (Jugoslawien), (1971)
- [Jon70] Jonas J., Bull T. E., Eckert C. A., High Pressure Sample Cell for the NMR Relaxation Time Measurements in Liquids, *Rev. Sci. Instr.*, 41 (1970) 1240-1241
- [Jon72] Jonas J., Nuclear magnetic resonance measurements at high pressure, *Rev. Sci. Instr.*, 43 (1972) 643-649

- [Jon82] Jonas J., Nuclear Magnetic Resonance at High Pressure, 216 (1982) 1179-1184
- [Kac06] Kachel N.P., Charakterisierung von Protein-Ligand-Komplexen und Faltungsintermediaten mittels NMR-Spektroskopie, Dissertation, (2006)
- [Kap75] Kaplan M. L., Bovey F. A., Cheng H. N., Anal. Chem., 47 (1975) 1703
- [Kay92] Kay L. E., Keifer P., Saarinen T., Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity., J. Am. Chem. Soc., 114 (1992) 10663-10665
- [Kor96] Loradi R., Billeter M., Wüthrich K., MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, J. Mol. Graph., 14 (1996) 51-55
- [Kal00] Kalbitzer H. R., Görler A., Li H., Dubovskii P. V., Hengsteenberg W., Kowolik C., Yamada H., Akasaka K., ^{15}N and ^1H NMR study of histidine containing protein (HPr) from *Staphylococcus carnosus* at high pressure, Prot. Sci., 9 (2000) 693-703
- [Lan77] Lang E., Untersuchung untermühlter wässriger Emulsionen bei hohen Drücken mittels der magnetischen Kernresonanz, Diplomarbeit, (1977)
- [Lin99] Linge J. P., Nilges M., Influence of non-bonded parameters on the quality of NMR structures: a new force field for NMR structure calculation, J. Biomol NMR, 13 (1999) 51-59
- [Lin03] Linge J. P., Williams M. A., Spronk C. A., Bonvin A. M., Nilges M., Refinement of protein structures in explicit solvent., Proteins, 50 (2003) 496-506
- [Mar89] Marion D., Ikura M., Tschudin R., Bax A., Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins, J. Magn. Reson., 85 (1989) 393-399

- [Mar08] Marion-Letellier R., Butler M., Dechelotte P., Playford R. J., Ghosh S., Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells—potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in intestinal inflammation., *Am. J. Clin. Nutr.*, 87 (2008) 939-948
- [Mas02] Massiot D., Fayon F., Capron M., King I., Le Calvé S., Alonso B., Durand J.-O., Bujoli B., Gan Z., Hoatson G., Modelling one and two-dimensional solid-state NMR spectra., *Mag. Reson. Chem.*, 40 (2002) 70-76
- [Mat07] Matsuo K., Arai H., Muto K., Fukaya M., Sato T., Mizuno A., Sakuma M., Yamanaka-Okumura H., Sasaki H., Yamamoto H., Taketani Y., Doi T., Takeda E., The Anti-Obesity Effect of the Palatinose-Based Formula Inslow is Likely due to an Increase in the Hepatic PPAR-alpha and Adipocyte PPAR-gamma Gene Expressions., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 40 (2007) 234-241
- [Mic99] Michalik L., Wahli W., Peroxisome proliferator-activated receptors: Three isotypes for a multitude of functions., *Curr. Opin. Biotech.*, 10 (1999) 564-570
- [Mo105] Möglich A., Weinfurtner D., Maurer T., Gronwald W., Kalbitzer H. R., A Restraint Molecular Dynamics and Simulated Annealing Approach for Protein Homology Modeling Utilizing Mean Angles, *BMC Bioinformatics*, 6 (2005)
- [Mo205] Möglich A., Weinfurtner D., Gronwald W., Maurer T., Kalbitzer H. R., PERMOL: Restraint-Based Protein Homology Modeling Using DYANA or CNS, *Bioinformatics*, 21 (2005) 2110-2111

- [Moe01] Möglich A., Strukturbestimmung der Ile14→Ala-Austauschmutante des Histidine-Containing Phosphocarrier Protein aus *Staphylococcus carnosus* unter Verwendung von Restdipolkopplungen, Diplomarbeit (2001)
- [Mor98] Moras D., Gronemeyer H., The nuclear receptor ligand-binding domain: Structure and function., *Curr. Opin Cell Biol.*, 3 (1998) 384-391
- [Nol98] Nolte R. T., Wisely G. B., Westin S., Cobb J. E., Lambert M. H., Kurokawa R., Rosenfeldk M. G., Willson T. M., Glass C. K., Milburn M. V., Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , *Nature*, 395 (1998) 137-143
- [Pal91] Palmer A. G., Cavanagh J., Wright P. E., Rance M., Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 93 (1991) 151-170
- [Pea02] D. S. Pearson, G. Holtermann, P. Ellision, C. Cremo, M. A. Greeves, A novel pressure-jump apparatus for the microvolume analysis of protein-ligand and protein-protein interactions: its applications to nucleotide binding to skeletal-muscle and smooth-muscle myosin subfragment-1
- [Pri97] Price W.E., Lüdemann H.-D., NMR and Diaphragm Cell Techniques for the Study of Molecular Dynamics in Fluids. In: High Pressure Techniques in Chemistry and Physics : A Practical Approach. Holzapfel W.B., Isaacs N.S., eds. Oxford University Press, Oxford Chapter 5 (1997), 225
- [Rie05] Riepl H., Hartl R., Bauer M., Nar H., Kauschke S. G., Kalbitzer H. R., Maurer T., Sequential backbone assignment of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand binding domain, *J. Biomol. NMR*, 32 (2005) 259

- [Sch93] Schleucher J., Sattler M., Griesinger C., Coherence selection by gradients without signal attenuation: application to three-dimensional HNCO experiments., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32 (1993) 1489-1491
- [She87] Sherman W. F., Stadtmuller A. A., *Experimental Techniques in High-Pressure Research*, Wiley & Sons Ltd., (1987)
- [Sim99] Simons K. T., Bonneau R., Ruczinski I., Baker D., Ab initio protein structure prediction of CASP III targets using ROSETTA., *Proteins Suppl.*, 3 (1999) 171-176
- [Tor03] Torrent J., Alvarez-Martinez M. T., Heitz F., Liautard J.-P., Balny C., Lange R., Alternative Prion Structural Changes Revealed by High Pressure, *Biochemistry*, 42 (2003) 1318-1325
- [Tre06] Trenner J., Accurate proton-proton distance calculation and error estimation from NMR data for automated protein structure determination in AUREMOL., *Dissertation*, (2006)
- [Upp98] Uppenberg J., Svensson C., Jaki M., Bertilsson G., Jendeberg L., Berkenstam A., Crystal Structure of the Ligand Binding Somain of the Human Nuclear Receptor PPAR γ , *J. Biol. Chem.*, 273(47) (1998) 31108-31112
- [Vog02] Vogel W., *Glaschemie*, 3.Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1992) 411-422
- [Wil00] Willson T. M., Brown P. J., Sternbach D. D., Henke B. R., The PPARs: From orphan receptors to drug discovery., *J. Med. Chem.*, 43 (2000) 527-550
- [Wis94] Wishart D. S., Sykes B. D., The ^{13}C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data, *J. Biomol. NMR*, 4 (1994) 171-180

- [Woe00] Woenckhaus J., Köhling R., Winter R., High pressure-jump apparatus for kinetic studies of protein folding reactions using the small-angle synchrotron x-ray scattering technique, *Rev. Sci. Instr.*, 71 (2000) 3895-3899
- [Wue86] Wüthrich K., *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, (1986)
- [Xia02] Xia B., Tsui V., Case D. A., Dyson H.J., Wright P. E., Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation on vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water, *J. Biomol NMR*, 22 (2002) 317-331
- [Yam74] Yamada H., Pressure-resisting glass cell for high pressure, high-resolution NMR measurements, *Review Scientific Instrument*, 45 (1974) 540-542
- [Yam01] Yamada H., Nishikawa K., Honda M., Shimura T., Akasaka K., Tabayashi K., Pressure-resisting cell for high-pressure, high-resolution nuclear magnetic resonance measurement at very high magnetic fields, *Review Scientific Instrument*, 72 (2001) 1463-1471
- [Zho08] Zhou Y. M., Wen Y. H., Kang X. Y., Qian H. H., Yang J. M., Yin Z. F., Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, induces growth inhibition and apoptosis of HepG2 human liver cancer cells., *World J. Gastr.*, 14 (2008) 2168-2173

Kapitel 6

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen. In zahlreichen Gespräche und Diskussionen ergaben sich hilfreiche und konstruktive Ideen, die zum Entstehen dieser Arbeit beitrugen.

Bei PD Dr. Wolfram Gronwald und PD Dr. Werner Kremer möchte ich mich für die Hilfestellungen bei allen fachspezifischen Problemen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dörte Rochelt für die Herstellung von NMR-Proben, die Unterstützung bei vielen alltäglichen Problemen und die hervorragende Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Hochdrucks.

Robert Bobardt und Gunnar Schmid gilt mein Dank für die Hilfe bei allen technischen Problemen mit den Hochdruckanlagen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen langjährigen Zimmerkollegen Dr. Daniela Baumer und Dr. Christian Gröger für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Bereitschaft für fachliche als auch nicht-fachliche Diskussionen.

Ein weiterer Dank gilt dem AUREMOL-Entwickler-Team, insbesondere Dr. Konrad Brunner, für die schnellen Lösungen bei Software-Problemen.

Und zuletzt bedanke ich mich bei meiner Famile für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht und bei meiner Freundin, die immer für mich da war.

Kapitel 7

Anhang

7.1 Tabellen der chemischen Verschiebungen von PPAR γ -LBD

Aminosäure	N ¹⁵	C ¹³ α	C ¹³ β	C ¹³ ,
GLU207	-	-	-	-
SER208	-	58,54	62,05	176,76
ALA209	113,11	53,20	17,33	179,35
ASP210	120,07	54,23	39,43	178,38
LEU211	122,92	56,22	40,57	181,05
ARG212	121,16	56,21	26,26	178,78
ALA213	125,30	53,66	16,68	180,56
LEU214	121,87	56,51	40,05	177,77
ALA215	120,84	54,81	17,97	177,44
LYS216	120,40	58,00	30,92	177,28
HIS217	120,54	58,53	30,14	179,22
LEU218	119,46	56,22	38,22	177,28
TYR219	121,07	59,55	36,18	176,34
ASP220	120,12	56,32	38,44	179,48
SER221	115,80	59,98	38,68	176,11
TYR222	129,51	59,98	37,64	176,14
ILE223	118,37	60,53	34,80	178,66
LYS224	118,82	57,42	31,43	177,85
SER225	114,93	60,27	63,22	178,33
PHE226	118,91	52,56	36,87	-
PRO227	-	63,12	30,86	177,26
LEU228	120,01	52,19	39,46	174,61
THR229	115,63	59,15	68,92	173,52
LYS230	125,24	59,43	31,43	178,72
ALA231	121,33	53,95	16,37	181,39
LYS232	119,24	57,99	31,22	174,36
ALA233	122,81	53,95	18,24	179,55
ARG234	116,12	56,78	26,78	179,27

Aminosäure	N ¹⁵	C ¹³ α	C ¹³ β	C ¹³ ,
ALA235	123,51	53,95	16,42	173,21
ILE236	119,20	63,99	40,24	-
LEU237	119,46	56,44	41,01	178,41
THR238	107,61	60,87	70,00	175,35
GLY239	110,76	44,95	-	174,52
LYS240	121,10	54,93	30,88	176,60
THR241	113,11	59,99	68,65	174,52
THR242	121,92	59,11	68,61	-
ASP243	-	56,41	40,70	177,97
LYS244	119,29	54,26	31,53	178,18
SER245	118,92	55,77	61,79	-
PRO246	-	61,40	30,01	175,47
PHE247	124,39	57,45	39,00	174,74
VAL248	130,06	61,64	30,69	174,39
ILE249	128,55	59,96	37,65	-
TYR250	-	-	-	-
ASP251	-	-	-	-
MET252	-	-	-	-
ASN253	-	57,19	40,00	177,31
SER254	117,39	57,10	60,64	-
LEU255	-	-	-	-
MET256	-	-	-	-
MET257	-	56,15	26,20	175,69
GLY258	104,24	43,51	-	-
GLU259	-	53,93	30,92	-
ASP260	119,49	57,68	40,75	179,75
LYS261	119,85	58,00	27,81	-
ILE262	-	-	-	-
LYS263	-	-	-	-
PHE264	-	56,31	39,66	178,93
LYS265	117,93	57,13	26,78	178,57
HIS266	121,37	65,15	29,72	-
ILE267	122,92	64,85	36,04	-
THR268	124,18	57,71	68,46	-
PRO269	-	61,94	30,66	-
LEU270	122,59	54,01	40,67	177,24
GLN271	121,98	54,11	28,53	175,38
GLU272	128,30	56,72	29,80	-
GLN273	-	-	-	-
SER274	-	-	-	-
LYS275	-	-	-	-
GLU276	-	54,42	28,58	176,76
VAL277	125,97	65,40	30,01	176,84
ALA278	120,55	54,52	17,33	177,97
ILE279	114,29	61,68	35,32	179,51
ARG280	120,98	58,80	28,85	180,11
ILE281	120,08	63,12	34,88	178,23
PHE282	121,93	59,75	37,91	177,81
GLN283	118,25	58,25	27,03	177,65
GLY284	109,12	46,10	-	175,17
CYS285	120,55	62,54	23,83	75,85
GLN286	118,80	58,83	-	176,97
PHE287	117,77	59,75	36,35	178,44
ARG288	121,06	56,50	27,03	177,89
SER289	118,09	60,84	62,40	175,33

7.1. TABELLEN DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON PPAR γ -LBD145

Aminosäure	N ¹⁵	C ¹³ α	C ¹³ β	C ¹³ ,
VAL290	120,19	65,96	29,36	178,15
GLU291	120,22	57,96	29,62	178,94
ALA292	123,87	53,28	16,43	179,80
VAL293	118,96	65,96	30,01	179,46
GLN294	119,02	58,10	26,11	175,69
GLU295	121,45	57,96	27,67	-
ILE296	118,40	63,99	37,33	172,53
THR297	117,34	66,34	67,46	177,89
GLU298	120,81	57,67	27,55	175,46
TYR299	121,68	60,27	37,85	178,46
ALA300	123,43	53,09	15,99	177,94
LYS301	111,56	57,42	30,66	179,01
SER302	117,38	57,68	62,50	174,74
ILE303	128,29	59,10	36,87	-
PRO304	-	63,70	29,74	175,95
GLY305	112,67	43,80	-	176,27
PHE306	124,64	61,76	39,46	176,71
VAL307	107,41	61,93	29,88	175,64
ASN308	116,99	51,73	37,91	175,59
LEU309	121,24	53,06	40,50	177,26
ASP310	124,44	54,23	41,79	177,25
LEU311	128,71	57,37	40,50	-
ASN312	115,91	55,47	36,87	177,73
ASP313	121,12	55,66	38,17	177,65
GLN314	120,06	59,12	27,55	176,22
VAL315	117,18	65,38	30,03	174,70
THR316	121,13	65,76	67,05	176,37
LEU317	120,42	56,79	38,68	182,10
LEU318	120,84	57,08	39,98	176,95
LYS319	122,50	59,15	32,21	175,88
TYR320	109,57	59,12	38,42	176,58
GLY321	106,64	44,95	-	175,80
VAL322	115,42	66,53	29,87	177,08
HIS323	118,21	63,13	28,55	180,09
GLU324	118,66	58,53	28,33	179,27
ILE325	120,07	63,49	35,49	177,08
ILE326	123,95	64,85	35,55	-
TYR327	116,67	59,12	34,54	178,33
THR328	119,03	67,49	68,36	-
MET329	-	57,35	30,92	176,19
LEU330	123,21	56,10	40,75	178,88
ALA331	119,11	54,81	15,63	179,30
SER332	112,65	59,98	62,09	179,46
LEU333	119,17	53,34	40,39	174,57
MET334	117,80	53,91	36,09	76,53
ASN335	118,72	50,58	39,20	-
LYS336	112,80	57,00	30,01	175,54
ASP337	116,09	53,88	42,05	177,78
GLY338	112,00	46,68	-	180,32
VAL339	116,69	55,89	35,32	172,15
LEU340	128,00	53,92	42,57	175,17
ILE341	113,54	57,37	40,24	-
SER342	-	-	-	-
GLU343	-	56,80	31,71	178,26
GLY344	109,76	45,24	-	175,80

Aminosäure	N ¹⁵	C ¹³ α	C ¹³ β	C ¹³ ,
GLN345	121,00	58,25	28,32	176,61
GLY346	136,67	42,08	-	170,80
PHE347	123,64	55,44	41,27	172,55
MET348	128,88	52,47	34,54	175,14
THR349	116,41	60,87	68,63	174,12
ARG350	126,74	57,65	29,88	-
GLU351	118,60	57,67	28,07	179,01
PHE352	122,06	59,75	37,39	178,96
LEU353	121,47	57,08	40,07	177,29
LYS354	116,89	56,56	31,43	180,14
SER355	114,44	57,97	62,24	174,02
LEU356	122,62	53,34	40,50	179,20
ARG357	119,80	53,91	28,33	176,22
LYS358	124,00	54,26	30,14	-
PRO359	-	62,55	31,02	175,33
PHE360	124,00	60,33	37,65	176,42
GLY361	107,12	45,53	-	174,44
ASP362	118,28	53,36	40,75	177,97
PHE363	119,90	59,46	38,42	175,98
MET364	117,47	52,76	29,62	178,86
GLU365	125,30	59,68	26,52	-
PRO366	-	64,23	30,30	-
LYS367	118,09	59,72	29,74	177,97
PHE368	119,68	61,76	37,62	177,10
GLU369	117,95	57,96	28,07	178,46
PHE370	119,07	60,04	37,42	176,60
ALA371	123,48	54,52	19,79	178,70
VAL372	116,74	65,10	28,26	179,38
LYS373	119,14	57,42	31,18	178,41
PHE374	123,58	60,61	39,20	179,22
ASN375	120,37	53,45	35,84	178,78
ALA376	123,80	52,51	16,68	177,84
LEU377	116,39	54,49	38,68	175,75
GLU378	110,24	55,08	25,48	175,17
LEU379	116,72	53,63	39,98	178,14
ASP380	123,31	50,16	41,79	178,78
ASP381	116,47	57,49	42,65	175,88
SER382	116,46	60,55	-	177,49
ASP383	125,70	57,68	38,42	176,61
LEU384	117,23	57,37	38,11	177,65
ALA385	117,81	-	-	-
ILE386	-	54,45	38,63	174,65
PHE387	122,14	55,39	41,27	175,82
ILE388	121,62	58,52	39,72	-
ALA389	-	51,86	-	-
VAL390	-	-	-	-
ILE391	-	-	-	-
ILE392	-	64,54	35,00	177,33
LEU393	126,00	50,47	34,54	173,00
SER394	114,19	57,39	62,76	173,89
GLY395	111,85	44,38	-	168,50
ASP396	117,02	51,06	38,42	176,45
ARG397	116,57	51,03	26,00	-
PRO398	-	61,68	-	177,10
GLY399	107,61	44,09	-	175,80

7.1. TABELLEN DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON PPAR γ -LBD147

Aminosäure	N ¹⁵	C ¹³ α	C ¹³ β	C ¹³ ,
LEU400	120,27	53,53	41,53	176,92
LEU401	128,55	55,64	41,01	178,52
ASN402	120,42	50,00	37,13	176,24
VAL403	122,65	65,10	31,18	175,80
LYS404	121,68	59,72	27,81	-
PRO405	-	64,15	29,31	179,20
ILE406	118,73	63,99	36,98	176,74
GLU407	120,64	57,96	27,81	178,49
ASP408	119,28	56,24	38,61	177,94
ILE409	121,29	64,27	37,01	178,80
GLN410	122,03	58,83	27,03	178,05
ASP411	118,46	56,81	39,98	177,08
ASN412	118,82	56,91	37,91	177,81
LEU413	117,47	56,80	41,27	178,23
LEU414	120,34	56,51	40,75	179,24
GLN415	121,32	57,97	27,81	178,46
ALA416	122,88	53,95	18,23	179,69
LEU417	122,68	56,79	39,98	176,27
GLU418	121,38	59,39	27,55	172,32
LEU419	119,01	56,51	39,98	179,41
GLN420	118,51	55,38	26,00	177,31
LEU421	119,80	56,51	39,46	-
LYS422	-	-	30,92	178,33
LEU423	117,12	55,36	40,50	178,96
ASN424	116,17	52,02	39,46	176,82
HIS425	115,06	51,05	28,33	-
PRO426	-	-	30,55	-
GLU427	-	-	26,92	-
SER428	-	62,90	55,31	-
SER429	-	62,90	55,51	-
GLN430	-	-	26,72	-
LEU431	-	56,79	39,98	177,08
PHE432	118,87	60,33	37,13	175,46
ALA433	120,26	53,95	16,68	181,29
LYS434	118,35	58,28	31,18	179,46
LEU435	122,56	56,51	39,46	178,54
LEU436	119,10	56,79	38,68	181,34
GLN437	118,93	57,10	27,03	177,89
LYS438	116,77	55,41	29,62	178,31
MET439	117,74	59,09	31,43	178,46
THR440	116,28	64,90	67,18	176,68
ASP441	124,41	56,24	39,20	178,73
LEU442	120,97	56,79	41,79	177,97
ARG443	117,61	57,65	27,81	180,11
GLN444	119,90	57,39	26,26	177,73
ILE445	120,04	62,05	34,95	179,35
VAL446	122,13	66,53	29,60	177,52
THR447	116,35	65,76	67,10	175,98
GLU448	121,73	58,20	28,33	178,94
HIS449	124,01	59,39	29,88	176,06
VAL450	119,64	65,96	-	178,99
GLN451	121,36	57,39	26,52	178,70
LEU452	123,55	56,51	39,10	178,86
LEU453	120,32	56,51	39,72	176,76
GLN454	117,73	57,10	26,78	179,33

Aminosäure	N ¹⁵	C ^{13α}	C ^{13β}	C ¹³ ,
VAL455	121,01	65,10	29,72	179,43
ILE456	122,74	64,85	36,04	177,03
LYS457	119,02	57,42	30,92	177,50
LYS458	116,16	56,84	31,43	177,65
THR459	108,97	62,02	69,13	174,66
GLU460	123,44	53,07	27,03	176,27
THR461	115,89	59,53	67,67	174,93
ASP462	121,14	52,79	38,29	174,96
MET463	120,87	54,48	31,98	180,14
SER464	120,50	56,14	63,61	173,28
LEU465	125,73	51,90	42,34	176,27
HIS466	126,68	55,08	30,66	-
PRO467	-	64,64	30,33	179,03
LEU468	124,31	57,08	40,50	180,01
LEU469	116,39	55,36	39,72	176,06
GLN470	119,47	58,25	27,03	177,88
GLU471	117,95	57,67	27,81	179,04
ILE472	120,28	64,56	37,35	175,78
TYR473	114,19	59,40	36,87	-
LYS474	122,55	57,64	30,15	-
ASP475	-	-	-	-
LEU476	-	-	-	-

Tabelle 7.1: Zuordnung der chemischen Verschiebungen der ¹⁵N und ¹³C-Kerne von PPAR γ -LBD

Aminosäure	HN-Shift	HA-Shift	HB-Shift	HD-Shift	HG-Shift
GLU207					
SER208	6,84	4,10	3,83		
ALA209	7,58	3,95	1,63		
ASP210	7,71	4,54	2,98		
LEU211	7,88	3,99	1,92	0,87	0,70
ARG212	8,14	4,65	1,87		
ALA213	7,94	4,09	1,20		
LEU214	7,76	4,12	1,95	0,76	1,50
			1,78	0,91	
ALA215	7,38	3,78	1,58		
LYS216	7,73	3,80	1,92	1,58	1,66
HIS217	8,15	4,28	3,27		
LEU218	8,26	3,97	1,57	0,85	
			1,27	0,35	
TYR219	8,09	4,09	3,21		
			2,80		
ASP220	8,55	4,35	2,63		
			2,51		
SER221	7,81		4,03		
TYR222	8,92	3,74	3,10		
			2,98		
ILE223	8,18	3,98	1,87		1,40
LYS224	7,04	3,97	1,81	2,83	1,56
SER225	7,32	4,28	4,03		

7.1. TABELLEN DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON PPAR γ -LBD149

Aminosäure	HN-Shift	HA-Shift	HB-Shift	HD-Shift	HG-Shift
PHE226	7,20	4,49	2,88		
PRO227	-	4,18	2,19	1,81	
LEU228	7,60	4,68	1,60	0,77	
THR229	6,74	4,33	4,33		1,28
LYS230	10,40	4,10	1,78		
ALA231	9,08	4,00	1,37		
LYS232	7,46	4,28	1,78	1,60	1,40
ALA233	8,23	4,09	1,43		
ARG234	9,02	4,25	1,71	2,98	
ALA235	7,33	3,75	1,43		
ILE236	7,45	3,63	1,88		0,98 0,94
LEU237	8,26	4,20	1,55	0,93 0,73	
THR238	7,60	4,68			1,05
GLY239	7,34	4,33			
LYS240	8,01	4,20	1,89	1,77	
THR241	7,58	4,30	4,28		1,07
THR242	7,93	4,43	4,12		1,06
ASP243	-	4,43	2,88 2,68		
LYS244	7,93	3,68	2,12		0,92 0,73
SER245	8,03	4,55	3,79		
PRO246	-	4,13	1,85 1,70		1,83 1,61
PHE247	7,84	4,21	2,98		
VAL248	7,78	4,35			0,97
ILE249	9,02	4,75			0,75
TYR250			3,04		
ASP251					
MET252					
ASN253		4,23	1,70		
SER254	8,64	4,10	3,89		
LEU255					
MET256					
MET257		4,13	1,84		1,57
GLY258	7,63	3,85			
GLU259	-	4,23	2,05 1,85		
ASP260	8,35	3,90	2,81		
LYS261	7,80	4,09	1,77	1,69	1,54
ILE262					0,88
LYS263					
PHE264		3,89	2,83		
LYS265	7,47	4,05	2,39 2,16		
HIS266	7,15	4,31	3,10		
ILE267	8,06	3,56	2,12	0,86	0,83
THR268	7,77	4,33	4,33		1,13
PRO269		4,16	2,20 1,83	3,53	1,75
LEU270	8,07	3,83	2,00 1,55	0,83	1,56
GLN271	8,04	4,21	2,05 1,85		2,23

Aminosäure	HN-Shift	HA-Shift	HB-Shift	HD-Shift	HG-Shift
GLU272	7,79	4,07	2,05		2,51
GLN273					
SER274					
LYS275					
GLU276		4,15	2,13 1,98		2,29
VAL277	8,36	3,47	2,04		1,07 0,79
ALA278	8,54	4,11	1,33		
ILE279	6,34	3,86	1,78		
ARG280	7,72	4,35	1,78	2,95	1,65
ILE281	8,10	3,90	1,82		1,43 1,20 0,90
PHE282	7,76	3,95	2,95 2,8		
GLN283	8,72	3,95	2,15		2,38
GLY284	7,76	4,88			
CYS285	7,27		3,20		
GLN286	7,17		2,28		
PHE287	7,89	3,93	2,09		
ARG288	7,57	4,28	2,10		
SER289	8,07		4,15		
VAL290	7,63	3,97	2,09		1,10 0,84
GLU291	7,17	3,94	2,22		2,24
ALA292	8,49	4,23	1,66		
VAL293	8,66	3,85	2,28		1,15 0,78
GLN294	7,37		2,16		2,76
GLU295	7,24	4,09	1,98		2,65
ILE296	8,67	4,40	1,92	0,88	0,89
THR297	7,97	5,05	5,05		1,19
GLU298	7,25	3,91	1,98		
TYR299	7,79	4,00	2,93		
ALA300	8,75	3,75	1,57		
LYS301	6,97	3,80			1,84
SER302	7,62	4,35	3,70		
ILE303	7,48	3,86	1,92	0,56	1,55 0,84
PRO304	-	4,33	2,20 1,95		1,56
GLY305	8,45	4,27			
PHE306	8,06	3,78	3,33 2,80		
VAL307	8,01	3,86	2,48		0,87
ASN308	6,89	4,68	2,92 2,47		
LEU309	6,97	4,27	1,92	0,77	1,72
ASP310	8,89	4,21	3,10		
LEU311	8,40	4,21	1,87	0,84	1,57
ASN312	8,51	4,25	3,01 2,74	7,69 7,02	
ASP313	7,33	4,33	2,80		
GLN314	7,84	4,32	1,92		2,33
VAL315	7,28	3,56	2,10		0,97

7.1. TABELLEN DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON PPAR γ -LBD151

Aminosäure	HN-Shift	HA-Shift	HB-Shift	HD-Shift	HG-Shift
THR316	8,14		4,28		1,26
LEU317	8,70			0,90	
LEU318	7,91	3,95	1,83	0,75	1,60
LYS319	8,52	4,28	1,85		1,38
TYR320	7,25	4,11	2,68		
GLY321	7,86	3,53			
VAL322	8,04	3,57			
HIS323	8,79	4,55	2,92		
GLU324	6,83	3,95	2,05 1,88		
ILE325	7,62	3,53	1,85	0,69 1,20 0,83	
ILE326	8,65	3,59	1,92		1,23 1,14
TYR327	7,63	3,90	2,90		
THR328	7,22	4,90	4,90		1,434
MET329		3,82	1,81		2,13
LEU330	8,40	4,04	1,80	0,85	1,38
ALA331	6,99	4,18	1,55		
SER332	7,07	4,10	3,87		
LEU333	7,41	4,05	1,87	0,72	
MET334	7,29		1,98 1,69		
ASN335	8,63	5,05	3,23		
LYS336	8,15	3,86	1,93		1,56
ASP337	8,12	4,92	2,86		
GLY338	8,01	4,45			
VAL339	7,89	4,21	2,20		0,86
LEU340	8,42	4,15	1,46 1,39	0,97 0,41	
ILE341	8,16	4,60	1,39	0,72	0,80
SER342		3,52			
GLU343		4,15	2,05		2,63
GLY344	8,33				
GLN345	8,01	3,75	1,98		
GLY346	7,72	3,73			
PHE347	8,74	4,38	2,75 2,70	6,90	
MET348	8,73	4,83	2,15 1,87		
THR349	8,33	3,97	4,01		1,12
ARG350	8,48	4,68	1,85		1,55
GLU351	8,36	4,05	1,57		2,30
PHE352	7,79				
LEU353	7,43	3,74	1,56	0,80	1,65
LYS354	7,54	3,95	1,59	1,45	1,81
SER355	7,34	4,40	3,75		
LEU356	6,59	4,04	1,78	0,92	1,70
ARG357	8,36	4,06	1,73 1,55	3,02	
LYS358	8,42	4,00	1,90	1,56	1,63 1,75
PRO359	-	4,15	2,20		1,83
PHE360	8,30	4,33	2,67		
GLY361	7,16	3,32			
ASP362	7,34	4,33	2,87		

Aminosäure	HN-Shift	HA-Shift	HB-Shift	HD-Shift	HG-Shift
PHE363	7,52	4,30	3,21		
MET364	8,52	4,03	1,98		
GLU365	7,88	3,90	2,28 2,13		2,38
PRO366		4,19	2,33 1,94		2,25
LYS367	7,00	4,10	1,69		
PHE368	7,83		2,74	7,22	
GLU369	8,12		2,39		
PHE370	7,40	3,51	2,70		
ALA371	8,31	4,28	1,19		
VAL372	8,11	3,80	1,93		1,00 0,71
LYS373	6,62	3,93	1,90	1,38	1,50
PHE374	8,69	4,03	2,98		
ASN375	9,32	3,93	2,34	6,87	
ALA376	6,88	4,20	1,40		
LEU377	7,02	3,97		0,44	1,40
GLU378	7,16	4,15	2,13		2,24
LEU379	7,79	4,62	1,98	1,24 0,81	1,45
ASP380	9,42	4,33	2,78		
ASP381	8,58	4,33	3,23 2,74		
SER382	7,97	3,98	3,93		
ASP383	7,66	3,96	2,88 2,86		
LEU384	8,57	3,92	2,04	0,97	0,96
ALA385	7,65	4,21			
ILE386	-	4,22	1,69		1,30 1,30
PHE387	7,37	4,32	2,90		
ILE388	7,29	4,09	1,78		1,20 1,20
ALA389		4,20	1,35		
VAL390					
ILE391					1,19
ILE392		3,93	1,88		1,20 1,08
LEU393	7,29	4,18	2,14 1,81	0,94 0,75	1,50
SER394	6,67	4,33	3,63		
GLY395	8,37	3,56			
ASP396	7,95	4,50	2,86		
ARG397	6,43	4,56	2,80		
PRO398		3,84	1,78	3,33	
GLY399	8,19	4,33			
LEU400	6,59	4,05	1,75	0,88 0,87	
LEU401	11,54	4,18	1,86	0,79	1,56
ASN402	8,80	4,88	2,57		
VAL403	8,14	3,42	2,80		1,03
LYS404	8,07	4,27	1,88	1,55	1,41
PRO405		4,13	2,13 1,82	3,57	0,85
ILE406	6,57	3,52	1,78	0,85	0,93

7.1. TABELLEN DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON PPAR γ -LBD153

Aminosäure	HN-Shift	HA-Shift	HB-Shift	HD-Shift	HG-Shift
					0,93 0,81
GLU407	7,94	3,79	2,15		2,15
ASP408	8,24	4,30	2,67		
ILE409	7,28	4,33	1,98		1,05 1,05 0,83
GLN410	8,90	4,06	1,87		2,25
ASP411	8,69	3,91	2,85		
ASN412	7,78	4,44	2,88 2,69		
LEU413	8,33		1,87	0,83 0,78	1,20
LEU414	8,20	4,05	1,47	0,79	
GLN415	7,62	4,05	1,87		2,30
ALA416	8,24	4,09	1,38		
LEU417	8,92	4,20	1,52	0,95 0,65	1,57
GLU418	8,28	3,89	1,94		
LEU419	7,23		2,03 1,55	0,86	
GLN420	6,99	4,15	1,80		2,21
LEU421	8,08				
LYS422		3,88			
LEU423	7,72	4,16	1,63	0,80 0,61	1,48
ASN424	8,25	4,62	2,66	7,84	
HIS425	7,54	5,09	3,21		
PRO426			2,33	3,92	
GLU427					
SER428		4,50	3,64		
SER429		4,50	3,70		
GLN430		3,86	1,92		
LEU431					
PHE432	8,45	3,52	3,08 2,88	7,15	
ALA433	7,71	4,15	1,48		
LYS434	7,90	4,10	1,93		1,28
LEU435	8,47		1,42	0,50	1,61
LEU436	7,82	3,93	1,56	0,68	1,38
GLN437	7,28	4,15	2,16		2,51
LYS438	7,71	4,33	1,59		
MET439	7,70	4,03	1,93		2,25
THR440	7,31	3,85	3,84		
ASP441	7,46	4,33	2,80		
LEU442	7,95	3,90	1,84	0,84 0,74	
ARG443	7,10	4,03	2,40		1,99
GLN444	7,35	4,03	2,22 2,10		2,33
ILE445	7,61	3,65	1,81	0,68	0,85
VAL446	7,62	3,27	2,28		0,70
THR447	8,13	4,25	4,20		1,08
GLU448	8,19	3,97	1,78		
HIS449	8,00	4,55	2,92		
VAL450	8,43	3,29	2,30		1,11

Aminosäure	HN-Shift	HA-Shift	HB-Shift	HD-Shift	HG-Shift
					0,78
GLN451	7,04	3,87	2,28		2,38
LEU452	7,50	3,92			0,98
LEU453	8,20	4,66		1,25	
GLN454	7,44	4,15			
VAL455	7,15	3,58	2,22		0,77
ILE456	8,07	3,53	1,98		1,40 1,23 0,82
LYS457	7,99				1,70
LYS458	7,15	4,09		1,57	1,96
THR459	7,35	4,28	4,10		1,10
GLU460	8,02	4,55	1,92		
THR461	7,85	3,93	4,13		1,14
ASP462	8,36	4,58	2,63		
MET463	7,50	4,28	2,04		2,22
SER464	8,18	4,49	3,68		
LEU465	8,33				1,54
HIS466	8,29	3,60	2,08		
PRO467		3,60	2,08		
LEU468	10,73		2,65		1,75
LEU469	6,92		1,81		1,51
GLN470	8,35		2,33		
GLU471	7,10	4,03	1,92		1,35 0,77
ILE472	7,29	3,97			1,40 1,40 0,76
TYR473	8,23		2,63		
LYS474	7,22	3,95	1,87	1,35	1,45
ASP475					
LEU476					

Tabelle 7.2: Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Protonen von PPAR γ -LBD

7.2 Tabelle der chemischen Verschiebungen von HPr I14A

Nachfolgend die Zuordnungen für die 2D-HSQC-Messung von HPr I14A für die Temperaturen 278 K, 288 K, 298 K, 308 K und 318 K.

p/MPa	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
M1											
E2	127,3 9,376	127,3 9,374	127,2 9,385	127,2 9,379							
Q3	118,8 8,770	118,9 8,789	118,9 8,806	119,0 8,828							

7.2. TABELLE DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON HPR I14A155

Q4	121,4 8,627	121,4 8,625	121,4 8,636	121,5 8,637							
S5	120,6 8,218	120,7 8,230	120,7 8,241	120,8 8,249	120,8 8,256	120,8 8,255	120,9 8,270	120,9 8,269	120,9 8,268	120,9 8,280	121,1 8,291
Y6	119,3 9,008	119,3 9,013		119,4 8,998							
T7											
I8											
I9											
A10											
E11											
T12											
G13	110,3 8,586	110,3 8,584	110,4 8,588	110,5 8,589	110,4 8,583	110,5 8,582	110,6 8,590	110,7 8,589	110,7 8,581	110,7 8,594	110,8 8,597
A14											
H15											
A16											
R17											
P18											
A19											
T20											
M21											
L22	123,3 8,368										
V23											
Q24	120,4 8,463	120,3 8,448	120,4 8,452	120,5 8,460	120,5 8,467	120,5 8,466	120,5 8,481	120,7 8,480	120,7 8,479	120,7 8,498	120,7 8,502
T25	116,0 7,946										
A26	121,7 8,463	121,8 8,469	121,6 8,486	121,8 8,487	121,8 8,521	121,8 8,535	121,9 8,563	121,9 8,569	121,9 8,574	122,0 8,600	122,0 8,617
S27	107,4 8,041			107,5 8,031							
K28	119,5 7,414	119,5 7,413	119,5 7,417	119,5 7,411							
F29	118,1 7,482	118,1 7,488	118,2 7,498	118,3 7,500							
D30	125,2 11,405	125,2 11,404		125,4 11,422							
S31	116,9 9,294	116,9 9,293		117,0 9,318							
D32	122,3	122,3	122,3	122,4	122,6						

	8,191	8,196	8,200	8,194	8,167						
I33	128,6 9,205										
Q34	124,9 9,178			125,1 9,195							
L35	124,0 9,240										
E36	128,5 9,968			128,6 9,958							
Y37	125,5 8,926			125,7 8,930							
N38	129,3 9,532	129,4 9,531									
G39	103,2 8,913	103,2 8,918		103,4 8,937							
K40	122,5 7,816	122,5 7,808	122,5 7,791	122,5 7,779							
K41											
V42	116,3 9,117	116,3 9,109		116,6 9,093							
N43	120,8 8,470	120,8 8,482	120,5 8,479	120,6 8,487	120,7 8,487	120,7 8,494	120,7 8,508	120,7 8,514	120,8 8,513	120,8 8,532	120,8 8,543
L44	129,7 9,117										
K45	110,3 7,959	110,4 7,958		110,6 7,963							
S46	114,0 7,571			114,0 7,506							
I47											
M48	120,8 8,320	120,8 8,325	121,0 8,336	121,0 8,337	121,1 8,344	121,2 8,344	121,2 8,358	121,2 8,351	121,3 8,350	121,4 8,355	121,4 8,359
G49	108,4 8,266										
V50	121,9 8,232										
M51											
S52	114,1 7,837										
L53											
G54											
V55	119,9 8,123		119,9 8,159	119,9 8,167	120,0 8,174	120,0 8,174	120,0 8,195	120,0 8,194	120,1 8,193	120,1 8,212	120,1 8,223
G56	116,6 7,367										
K57	119,9 8,327										
D58											
A59											
E60	121,9 8,504	122,1 8,509	122,2 8,540	122,4 8,555	122,3 8,562	122,4 8,562	122,4 8,583	122,4 8,583	122,6 8,581	122,6 8,600	122,6 8,617

7.2. TABELLE DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON HPR I14A157

Tabelle 7.3: Zuordnung bei 278 K.

p/MPa	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
M1											
E2	127,3 9,400	127,3 9,403	127,3 9,397	127,3 9,388	127,3 9,367						
Q3	118,6 8,890	118,7 8,906	118,8 8,913	118,8 8,918	118,9 8,903	118,9 8,926					
Q4	121,4 8,631	121,4 8,647	121,6 8,634	121,5 8,625	121,5 8,604						
S5	120,6 8,297	120,8 8,307	120,7 8,307	120,9 8,292	120,8 8,277	121,0 8,300	121,0 8,301	121,0 8,306	121,1 8,312	121,1 8,310	121,1 8,310
Y6	119,4 9,026	119,4 9,029	119,4 9,016	119,4 8,993							
T7	118,3 8,658	118,4 8,674	118,6 8,675	118,5 8,687							
I8	128,1 9,114	128,3 9,124									
I9	121,4 8,719										
A10											
E11											
T12											
G13	110,5 8,542	110,5 8,565			110,3 8,515						
A14											
H15											
A16											
R17											
P18											
A19											
T20											
M21											
L22											
V23	120,2 8,079										
Q24	120,2 8,508	120,2 8,491	120,2 8,450	120,2 8,407	120,3 8,386	120,3 8,409		120,4 8,415	120,4 8,421	120,4 8,419	120,4 8,425
T25	116,1 7,943	116,1 7,939	116,1 7,926	116,1 7,903							

7.2. TABELLE DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON HPR I14A159

7.2. TABELLE DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON HPR I14A161

K83									
E84									
G85									
L86	117,5 8,195	117,6 8,211			117,7 8,279				
T87									
E88	124,7 8,597		125,0 8,646						

Tabelle 7.4: Zuordnung bei 288 K.

T20											
M21											
L22	123,4 8,276	123,1 8,283	123,1 8,276	123,1 8,257							
V23	120,2 8,018	120,1 8,025	120,1 8,024								
Q24	120,2 8,481	119,9 8,461	119,9 8,433	119,9 8,406	120,1 8,357	120,0 8,365	120,3 8,350	120,2 8,358	120,2 8,362	120,2 8,363	120,3 8,370
T25	116,1 7,888	116,0 7,902	116,0 7,895	116,0 7,889	116,1 7,873	116,1 7,867					
A26	122,0 8,528	121,9 8,542	121,9 8,549	122,0 8,549	122,0 8,541	121,9 8,562					
S27	107,5 8,018	107,5 8,032	107,5 8,031	107,5 8,032	107,5 8,016						
K28	119,5 7,391	119,4 7,398	119,4 7,398	119,5 7,398	119,5 7,376	119,5 7,391	119,5 7,363	119,5 7,371			
F29	117,9 7,459	117,9 7,480	117,9 7,479	117,9 7,487	118,0 7,471	118,0 7,486					
D30	125,7 11,389	125,6 11,409	125,6 11,409	125,6 11,410	125,7 11,401						
S31	116,9 9,250	116,7 9,278	116,8 9,284	116,8 9,292	116,8 9,283	116,7 9,298	116,9 9,290				
D32	122,8 8,215	122,5 8,236	122,5 8,235	122,5 8,229	122,5 8,221	122,5 8,235	122,5 8,214				
I33	128,6 9,216	128,6 9,237	128,7 9,257	128,7 9,258	128,7 9,222						
Q34	125,1 9,148	125,0 9,169	125,1 9,175	125,1 9,183	125,1 9,174	125,1 9,182					
L35	124,1 9,216	124,1 9,230	124,1 9,230	124,1 9,224	124,0 9,208	124,0 9,216					
E36	128,6 9,945	128,4 9,966	128,4 9,958	128,6 9,959	128,5 9,950	128,5 9,951	128,5 9,930				
Y37	125,7 8,896	125,7 8,910	125,7 8,910	125,7 8,910	125,7 8,895	125,8 8,916					
N38	129,0 9,434	129,1 9,455	129,1 9,461	129,2 9,469	129,4 9,460	129,3 9,468					
G39	103,4 8,815	103,3 8,842	103,4 8,855	103,4 8,863	103,4 8,847	103,5 8,875					
K40	122,6 7,841	122,4 7,841	122,4 7,820	122,4 7,807	122,4 7,778	122,3 7,779	122,4 7,737				
K41	122,2 8,385	122,1 8,413	122,3 8,426	122,4 8,440	122,4 8,438	122,5 8,460	122,5 8,452	122,5 8,460	122,5 8,457	122,7 8,465	122,7 8,466
V42	116,9 9,148	116,9 9,148	116,9 9,141	116,9 9,128	116,9 9,113	117,0 9,107					
N43	120,8 8,467	120,6 8,488	120,6 8,487	120,5 8,488	120,5 8,472						
L44	129,6 9,032	129,7 9,073	129,7 9,100	129,8 9,121	129,8 9,126	129,9 9,155	130,0 9,133				
K45	110,7 7,970	110,5 7,984	110,7 7,983	110,7 7,984	110,6 7,969	110,7 7,976	110,9 7,962				
S46	114,0 7,568	113,8 7,562	113,8 7,541	113,8 7,528	113,8 7,485	113,7 7,486	113,6 7,458				
I47	128,6 8,978										
M48	120,4	120,5	120,6	120,6	120,9	121,0	121,0	121,2	121,2	121,3	121,3

7.2. TABELLE DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON HPR I14A163

	8,345	8,379	8,406	8,427	8,452	8,473	8,459	8,474	8,471	8,479	8,479
G49	108,1 8,181	108,2 8,209	108,2 8,222	108,3 8,222	108,3 8,221	108,4 8,235					
V50	122,8 8,270										
M51	118,3 8,549	118,3 8,590	118,6 8,610								
S52	113,8 7,786	113,8 7,807	113,9 7,813	113,9 7,827	114,1 7,812						
L53	121,2 7,371	121,0 7,391	121,0 7,398	121,0 7,405							
G54	106,4 7,698										
V55	119,5 8,140	119,4 8,188	119,5 8,215	119,7 8,250							
G56	116,1 7,405	116,1 7,432	116,3 7,445	116,5 7,439							
K57	119,8 8,229	119,8 8,256	119,9 8,269	120,1 8,291	120,2 8,289	120,2 8,310	120,2 8,316				
D58	120,8 8,774	120,8 8,794	120,8 8,780	120,8 8,781	120,9 8,759						
A59	122,8 7,956	122,7 7,984	122,8 8,004	122,8 8,018	122,8 8,023						
E60	122,4 8,494	122,4 8,522	122,4 8,528	122,5 8,536	122,5 8,568	122,5 8,582					
I61	117,5 8,951	117,4 8,965	117,4 8,957	117,4 8,958	117,2 8,942	117,3 8,943	117,3 8,909				
T62	118,1 8,685	117,9 8,706	117,9 8,712	118,0 8,713	118,0 8,697	118,0 8,712	118,0 8,691				
I63	127,3 9,087	127,1 9,101	127,2 9,100	127,2 9,108	127,2 9,092	127,3 9,100	127,3 9,079				
Y64	123,7 8,903	123,5 8,910	123,6 8,910	123,6 8,904	123,6 8,888	123,6 8,889	123,6 8,875				
A65	124,9 9,509	124,9 9,543	124,9 9,557	124,9 9,571	125,0 9,562	124,9 9,584					
D66	122,6 8,937	122,4 8,958	122,4 8,964	122,5 8,978	122,5 8,963	122,5 8,977					
G67	118,5 10,401	118,4 10,429	118,4 10,428	118,6 10,443	118,6 10,427	118,5 10,448	118,6 10,427				
S68	115,3 9,046	115,3 9,067	115,4 9,073	115,4 9,081	115,6 9,065	118,5 7,540					
D69	118,5 7,548	118,4 7,555	118,4 7,554	118,4 7,555	118,6 7,539		118,6 7,513				
E70	118,5 7,173	118,4 7,187	118,4 7,173	118,4 7,167	118,3 7,144	118,4 7,152	118,3 7,111				
A71	122,8 8,290	122,5 8,304	122,7 8,303	122,8 8,297	122,8 8,282	122,8 8,290	122,8 8,262	122,9 8,276			
D72	119,6 7,650	119,7 7,691	119,8 7,718	119,9 7,746	120,1 7,757	120,0 7,786	120,2 7,792	120,3 7,820			
A73	123,9 8,311	123,9 8,338	123,9 8,344	124,1 8,359	124,0 8,357	124,1 8,371					
I74	115,7 7,527	115,6 7,541	115,6 7,541	115,7 7,541	115,7 7,526	115,6 7,527					
Q75	120,6 7,418	120,4 7,446	120,4 7,452	120,4 7,467	120,3 7,465	120,2 7,479					
A76	121,6 7,977	121,5 7,997	121,5 7,997	121,5 7,998	121,4 7,982	121,4 7,990	121,4 7,969	121,4 7,977			

I77	121,4 8,202	121,5 8,209	121,6 8,201	121,7 8,188	121,8 8,166						
T78	118,5 8,644	118,4 8,678	118,6 8,705	118,6 8,726	118,7 8,731	118,7 8,753	118,8 8,745	118,8 8,767			
D79	120,2 8,065	120,1 8,106	120,2 8,133	120,2 8,154	120,1 8,125	120,2 8,140	120,2 8,126	120,3 8,140	120,3 8,144	120,3 8,152	120,5 8,152
V80	120,6 8,106	120,5 8,127	120,6 8,133	120,6 8,141	120,5 8,132	120,4 8,147	120,5 8,132	120,6 8,147	120,6 8,151	120,6 8,158	120,7 8,166
L81	120,8 8,038	120,8 8,032	120,9 8,017	120,9 8,005	120,9 7,996	120,8 8,004	121,0 7,989	121,0 8,004	121,0 8,001	121,0 8,009	121,2 8,009
S82	112,0 7,473	112,2 7,507	112,2 7,513	112,3 7,548	112,4 7,526						
K83	123,6 8,692										
E84	115,0 8,208	115,0 8,215									
G85	107,5 7,895	107,6 7,929	107,8 7,942	107,8 7,957							
L86	117,5 8,147	117,6 8,181	117,8 8,181	118,0 8,195							
T87	107,9 7,480	108,1 7,507	108,2 7,486								
E88	124,9 8,501	125,0 8,522	125,1 8,528	125,3 8,529	125,4 8,513						

Tabelle 7.5: Zuordnung bei 298 K.

7.2. TABELLE DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON HPR I14A165

A14	122,7 7,997									
H15										
A16										
R17										
P18										
A19										
T20										
M21										
L22	123,0 8,242	123,0 8,248								
V23	119,9 7,949	120,0 7,955	120,0 7,954							
Q24	119,8 8,426	119,8 8,412	119,8 8,390	119,8 8,365						
T25	115,8 7,840	115,9 7,853	115,9 7,845	116,0 7,847						
A26	121,7 8,501	121,7 8,514	121,9 8,519	121,9 8,521						
S27	107,4 7,969	107,4 7,983	107,5 7,988	107,5 7,990	107,4 7,988					
K28	119,4 7,350	119,4 7,363	119,4 7,362	119,4 7,357						
F29	117,6 7,418	117,6 7,431	117,8 7,443	117,8 7,445						
D30	125,7 11,347	125,7 11,361		125,7 11,375						
S31	116,7 9,202	116,7 9,222	116,7 9,235	116,7 9,243						
D32	122,3 8,181	122,4 8,207	122,4 8,220	122,4 8,215						
I33	128,4 9,107	128,4 9,134	128,6 9,146	128,6 9,155						
Q34	125,0 9,114	125,0 9,127	125,0 9,139	125,0 9,141						
L35	124,0 9,175	124,1 9,188	124,1 9,187	124,1 9,189	123,9 9,180					
E36	128,4 9,910	128,4 9,924	128,4 9,929	128,4 9,931						
Y37	125,5 8,841	125,7 8,861	125,7 8,860	125,7 8,862	125,7 8,867					
N38	128,7 9,359		128,9 9,398	129,0 9,400						
G39	103,3 8,746	103,3 8,773	103,4 8,778	103,4 8,787						
K40	122,3 7,813	122,3 7,812	122,3 7,804	122,3 7,793	122,3 7,777					
K41	122,1 8,303	122,2 8,330	122,3 8,342	122,3 8,358	122,4 8,370					
V42	117,1	117,1	117,1	117,2						

	9,127	9,134	9,126	9,114							
N43	120,9 8,405			120,7 8,426							
L44	129,2 8,957			129,5 9,053							
K45	110,6 7,942	110,7 7,955	110,8 7,954	110,8 7,956							
S46	113,7 7,527	113,7 7,526	113,7 7,512	113,7 7,493							
I47											
M48	120,1 8,255	120,2 8,296	120,4 8,322	120,5 8,337							
G49	107,9 8,119										
V50	122,7 8,208	122,7 8,221	122,7 8,220	122,7 8,222	122,7 8,220						
M51	118,2 8,467										
S52	113,5 7,745	113,7 7,765		113,8 7,786							
L53	121,2 7,377	121,2 7,390									
G54	106,3 7,704										
V55	118,8 7,990	119,0 8,044									
G56	115,3 7,329	115,6 7,356		116,0 7,370							
K57	119,7 8,153	119,7 8,180		120,0 8,208							
D58	120,5 8,719	120,6 8,732	120,7 8,737								
A59	122,5 7,922	122,6 7,942	122,6 7,954	122,7 7,976							
E60	122,3 8,405	122,3 8,425	122,4 8,438	122,6 8,446							
I61	117,3 8,923	117,4 8,929	117,4 8,935	117,4 8,923							
T62	117,9 8,650	117,9 8,664	117,9 8,669	117,9 8,678							
I63	127,1 9,052	127,1 9,072	127,1 9,064	127,2 9,066							
Y64	123,5 8,862	123,5 8,875	123,5 8,880	123,7 8,869							
A65	124,6 9,427	124,7 9,454	124,8 9,480								
D66	122,4 8,896	122,4 8,916	122,4 8,921	122,6 8,930							
G67	118,2 10,319	118,3 10,339	118,3 10,358	118,3 10,360							
S68	115,2 8,957		115,3 8,996								
D69	118,3 7,520	118,3 7,533	118,5 7,532	118,5 7,527							
E70	118,4 7,159	118,5 7,166	118,5 7,157	118,3 7,152	118,3 7,144						

7.2. TABELLE DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON HPR I14A167

A71	122,5 8,249	122,6 8,255	122,6 8,261	122,7 8,263	122,7 8,261	122,8 8,252					
D72	119,4 7,581	119,6 7,608	119,7 7,641	119,7 7,656	119,8 7,675						
A73	123,6 8,255	123,8 8,282	123,8 8,295	123,9 8,303	123,9 8,315	124,1 8,320	124,1 8,325				
I74	115,6 7,506	115,6 7,513	115,6 7,518	115,6 7,513	115,7 7,512						
Q75	120,8 7,411	120,6 7,431	120,7 7,443	120,7 7,445							
A76	121,4 7,949	121,5 7,962	121,5 7,968	121,5 7,970							
I77	120,8 8,160	121,1 8,167	121,2 8,165	121,3 8,154	121,5 8,145	121,6 8,123	121,7 8,128	121,7 8,133	121,9 8,141	121,9 8,148	121,9 8,150
T78	118,2 8,562	118,3 8,602	118,3 8,622	118,5 8,644							
D79											
V80	120,2 8,044	120,2 8,071	120,2 8,090	120,4 8,099							
L81	120,2 7,990	120,4 7,990	120,5 7,975	120,5 7,949	120,7 7,941	120,7 7,946	120,6 7,944	120,8 7,949	120,8 7,951	120,8 7,957	120,8 7,959
S82	112,0 7,493	112,2 7,506	112,3 7,518	112,4 7,513	112,6 7,518	112,7 7,517	112,9 7,515	113,0 7,513	113,1 7,515	113,3 7,515	113,4 7,517
K83	123,4 8,637										
E84	115,2 8,160	115,3 8,167	115,5 8,172								
G85	107,4 7,881	107,5 7,901		107,8 7,929							
L86	117,5 8,099	117,6 8,126	117,8 8,138	118,1 8,140							
T87	107,9 7,459										
E88	125,0 8,392	125,2 8,412	125,3 8,424	125,3 8,433							

Tabelle 7.6: Zuordnung bei 308 K.

p/MPa	0	20	40	60	80
M1					
E2	127,4 9,301				
Q3					
Q4	121,5 8,525				
S5	120,4 8,123	120,3 8,109			
Y6	119,4 8,954				
T7	118,1 8,490				

I8	127,6 8,926				
I9					
A10					
E11	122,0 8,777				
T12	113,0 8,286				
G13	110,0 8,347				
A14	122,6 7,952				
H15					
A16					
R17					
P18					
A19					
T20					
M21					
L22	123,5 8,211	123,5 8,225	123,5 8,234	123,7 8,234	123,8 8,239
V23	119,8 7,959				
Q24	119,6 8,375				
T25	115,7 7,803				
A26	121,8 8,477				
S27	107,4 7,918				
K28	119,3 7,319				
F29	117,5 7,380				
D30	125,9 11,317				
S31	116,6 9,165				
D32	122,7 8,204				
I33	128,2 9,001				
Q34	125,0 9,076				
L35	124,1 9,137				
E36	128,3				

7.2. TABELLE DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNGEN VON HPR I14A169

	9,880			
Y37	125,6 8,790			
N38	128,3 9,301			
G39	103,3 8,681			
K40	122,2 7,809			
K41	122,2 8,320			
V42	117,4 9,117			
N43	121,2 8,361			
L44	129,0 8,879			
K45	110,8 7,932			
S46	114,6 7,292			
I47				
M48	121,1 8,238			
G49				
V50	122,4 8,211	122,6 8,212	122,7 8,207	
M51	118,2 8,382			
S52				
L53	121,3 7,414	121,5 7,422		
G54				
V55	119,4 8,089			
G56				
K57	120,0 8,184			
D58	120,2 8,661			
A59	122,4 7,891			
E60	122,2 8,402			
I61	117,5 8,899			
T62	117,9 8,620			
I63	126,9 9,028			
Y64	123,5 8,845			

A65	124,5 9,342				
D66	122,4 8,851	122,7 8,743			
G67	117,9 10,227				
S68					
D69	118,2 7,517				
E70	118,3 7,149	118,3 7,149			
A71	122,0 8,232				
D72	119,3 7,517	119,3 7,551			
A73	124,1 8,157	124,1 8,171	124,2 8,180		
I74	115,5 7,489				
Q75	120,9 7,408				
A76	121,5 7,932	121,5 7,953	121,5 7,969	121,6 7,968	121,6 7,973
I77	121,8 8,102				
T78	118,6 8,599				
D79	119,7 8,000				
V80	120,1 8,034				
L81	120,4 8,007				
S82	112,0 7,544				
K83	123,1 8,545				
E84	115,6 8,116				
G85	107,4 7,864				
L86	117,6 8,041				
T87	108,1 7,462				
E88	125,2 8,279				

Tabelle 7.7: Zuordnung bei 318 K.

7.3 Pulssprogramm für die 2D-Messungen von Histidin

```

;pjump-noesyprtp.har
;amx-version
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive using TPPI
;with presaturation during relaxation delay and mixing time
#include ;Avance.incl;
#include ;Grad.incl;
#include ;Delay.incl;
;;d0=3u
;;d11=30m
;;d12=20u
;;d13=4u
,,in5=in0“
1 ze
2 d11
3 d12 pl9:f1 ;fq=-1698:f1
4u UNBLKGRAD

;*****
; wait for p-jump unit and send pulsleghth as parameter for pretrigger

1u trigpl3 ;wait for ready signal from p-jump unit

1u setnmr4|13 ;send pulse to p-jump unit
d2 ;p-jump unit measures d2 + 2usec due to
1u setnmr4^13 ;lusec length of setnmr instructions

1u trigpe3 ;wait for negative edge of pretrigger from p-jump unit

; end of p-jump header, standard pulsprogram starts here
;*****

d5 ;delay needed for pressure balance

d1 cw:f1 ph29
d13 do:f1
d12 pl1:f1 ;fq=0:f1

p1 ph1
d0
p1 ph2

d13
d12 pl9:f1 ;fq=-1698:f1
d8 cw:f1
d13 do:f1
d12 pl1:f1 ;fq=0:f1

p1 ph3
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1PH(id0, ip1, zd, dd5)

```

```

exit

ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0
2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 1 1 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
2 0 0 2 3 1 1 3

;hl1: ecoupler high power level
;hl2: ecoupler power level for presaturation
;p1 : 90 degree transmitter high power pulse
;p18: presaturation during relaxation delay
;p19: presaturation during mixing time
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay (e.g. to compensate delay line) [3 usec]
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 2 or 4
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI

```

7.4 Technische Zeichnungen

Im Folgenden werden die technischen Zeichnungen des Autoklaven, der Druckschraube, des Dichtkegels, des Teflon-Stopfens, des Spinners und des Einsatzrohres dargestellt. Zusätzlich befindet sich am Ende eine Zeichnung eines zusammengebauten Systems.

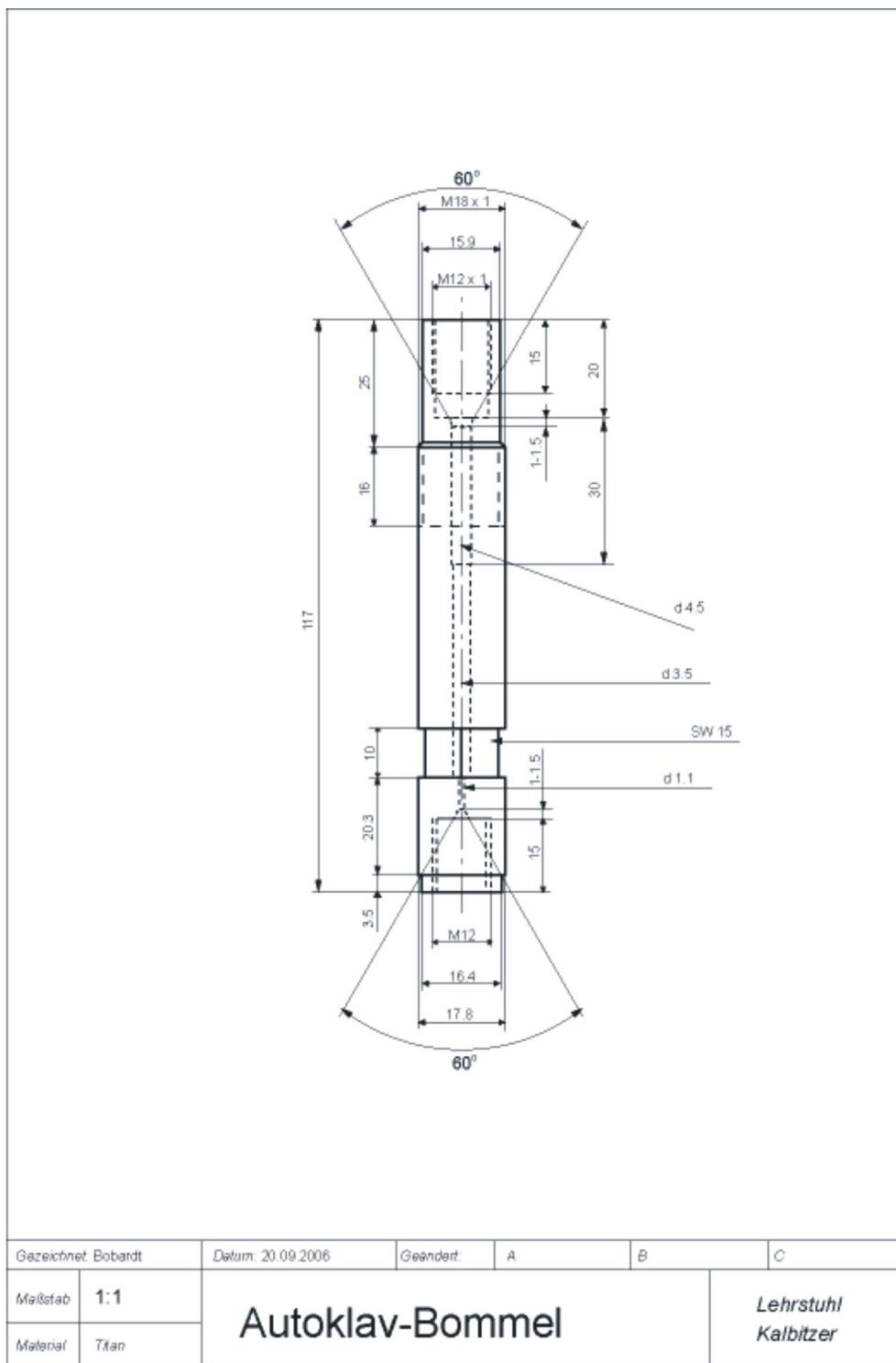


Abbildung 7.1: Maßstabsgetreue Zeichnung des Autoklaven für die Hochdruckkapillaren.

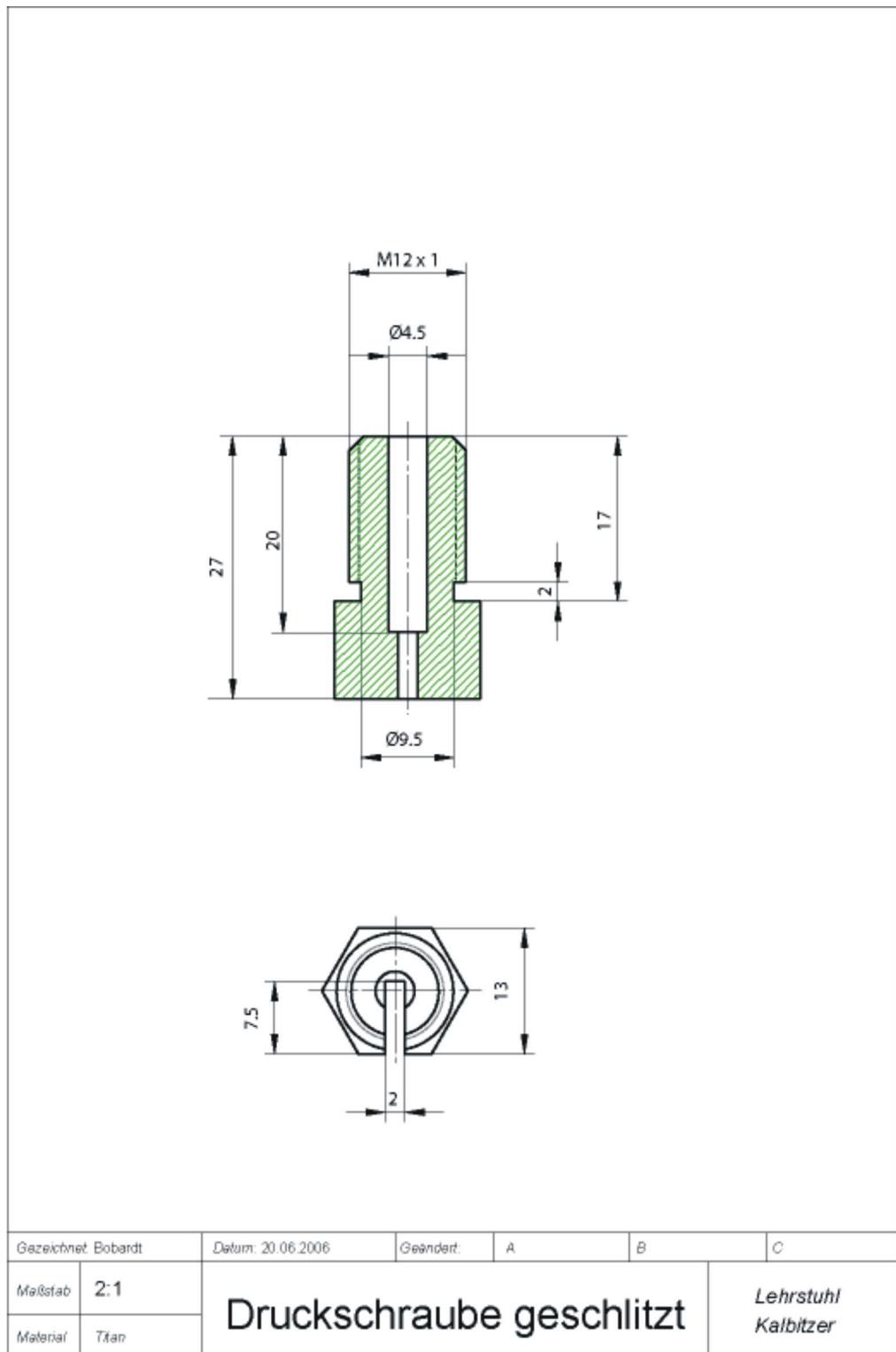


Abbildung 7.2: Maßstabsgetreue Zeichnung der Druckschraube.

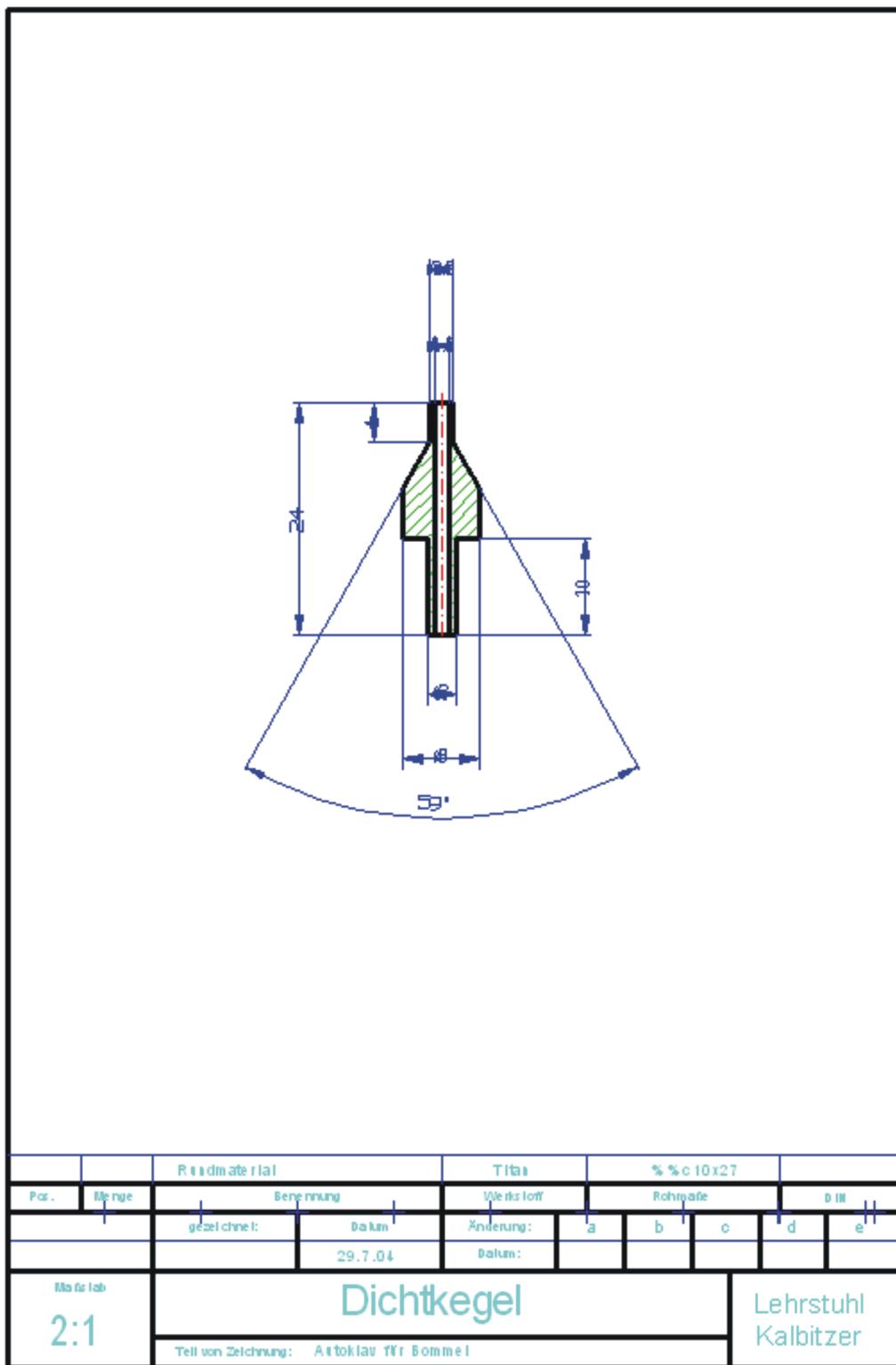


Abbildung 7.3: Maßstabsgetreue Zeichnung des Dichtkegels.

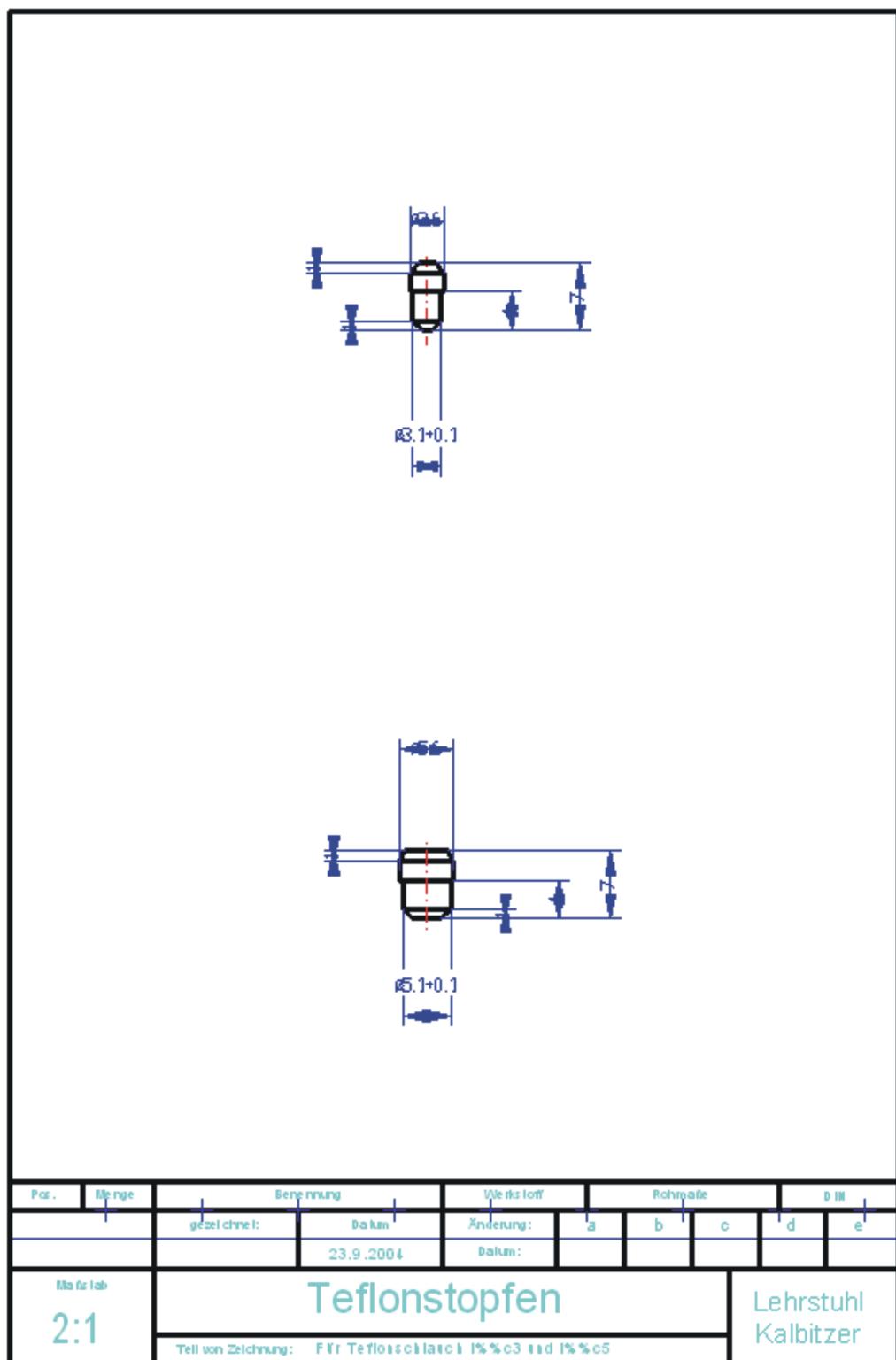


Abbildung 7.4: Maßstabsgetreue Zeichnung des Teflonstopfens für den Berstschutz.

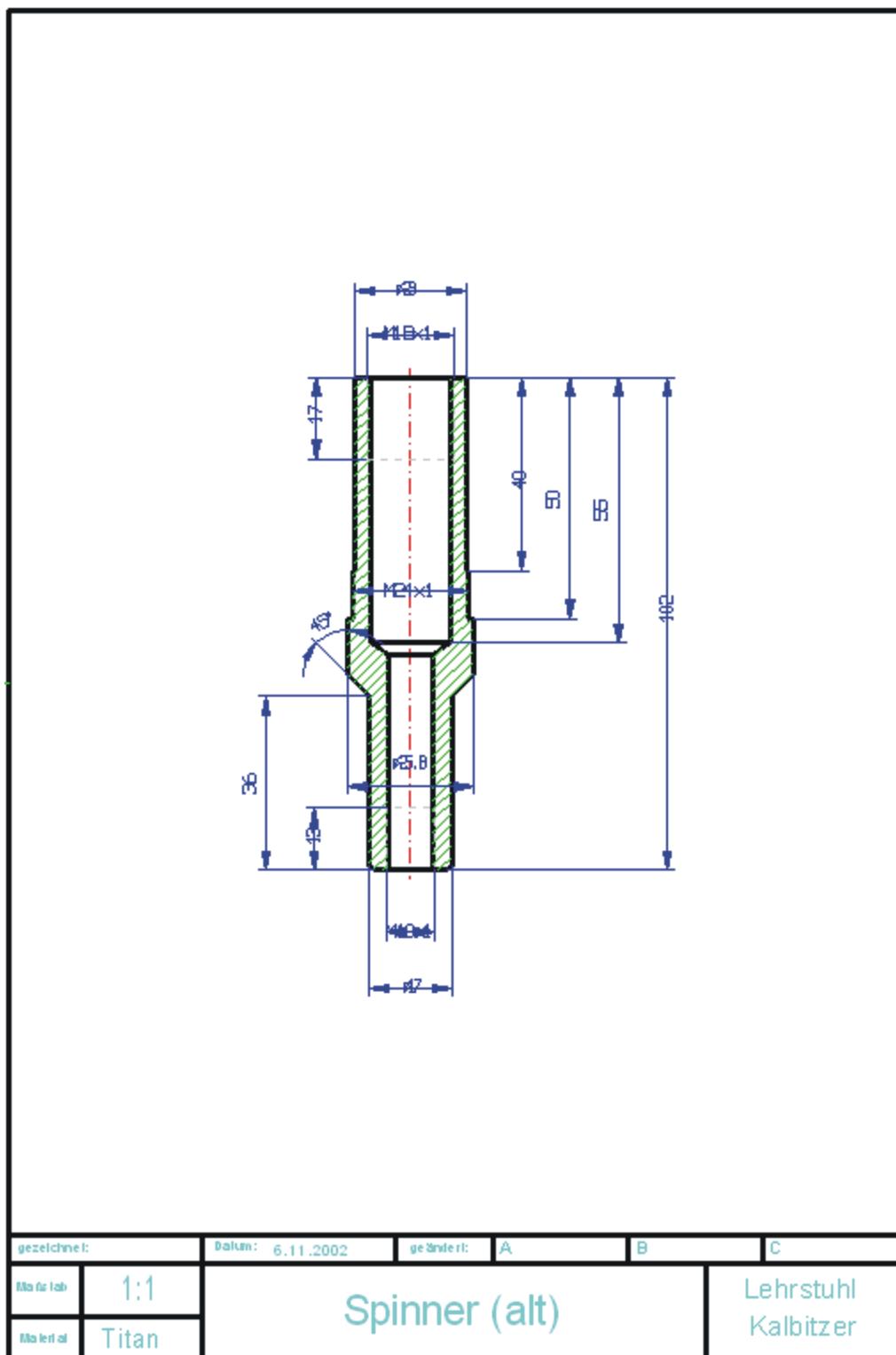


Abbildung 7.5: Maßstabsgetreue Zeichnung des Spinners.

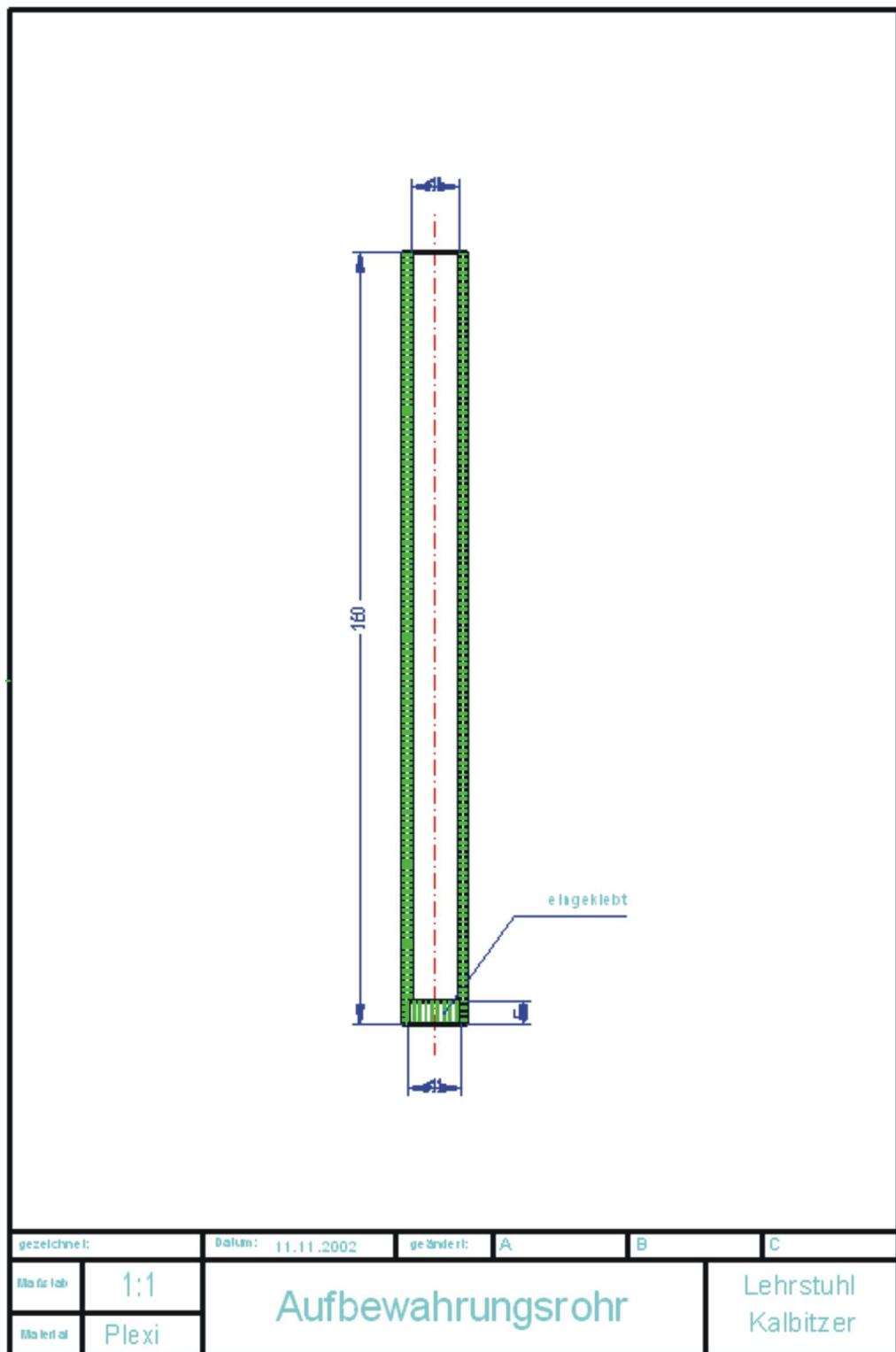


Abbildung 7.6: Maßstabsgetreue Zeichnung des Einsatzrohres.

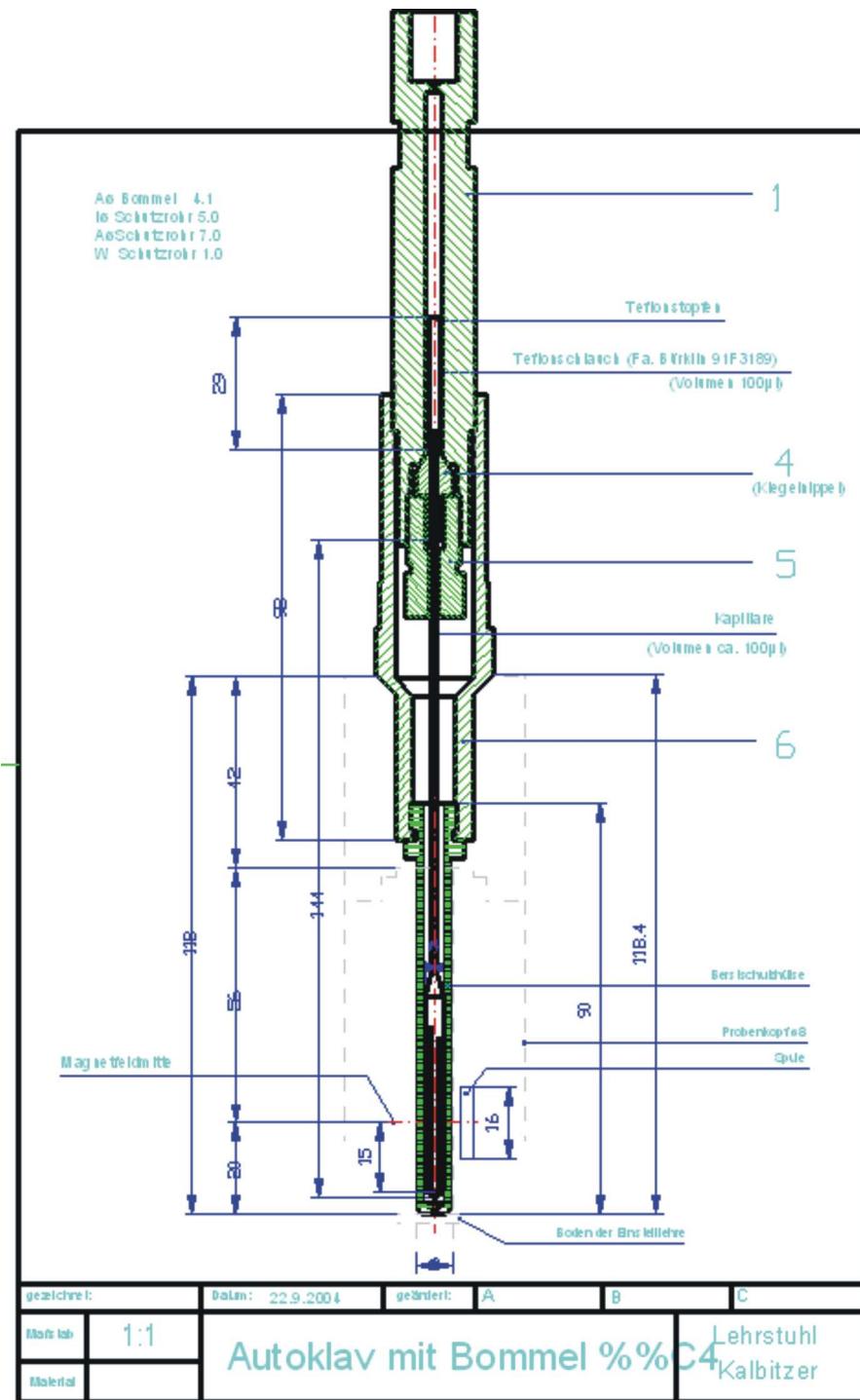


Abbildung 7.7: Maßstabsgetreue Zeichnung des Autoklaven mit Hochdruckzelle und Berstschutz.

Kapitel 8

Erklärung

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

Regensburg, Mai 2008

Rainer Hartl