

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Physik
der Naturwissenschaftlichen Fakultät II

NMR-spektroskopische Charakterisierung funktioneller Proteinzustände



Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Diplom-Physiker (Medizinphysik)

Michael Kovermann
geboren am 24.04.1980 in Stendal

Halle (Saale), Mai 2011

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 10.05.2011

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.07.2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Jochen Balbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Blume

Drittgutachter: Prof. Dr. Bernd Reif

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Struktur, Faltung, Dynamik und Funktion von Proteinen	1
1.2. Zielstellung dieser Arbeit	2
2. Experimentelle Methoden & untersuchte Proteine	4
2.1. Spektroskopische Methoden	4
2.1.1. NMR-Spektroskopie	4
2.1.1.1. Genutzte NMR-Geräte	4
2.1.1.2. Dynamikaufklärung	5
2.1.1.2.1. ps-bis-ns-Zeitskala	5
2.1.1.2.2. μ s-bis-ms-Zeitskala	10
2.1.1.2.3. min-bis-h-Zeitskala	16
2.1.1.3. Strukturaufklärung	17
2.1.1.3.1. Rückgratzuordnung	19
2.1.1.3.2. Seitenkettenzuordnung	19
2.1.1.3.3. NOEs	20
2.1.1.3.4. Bindungswinkel	23
2.1.1.3.5. Dipolare Kopplung	23
2.1.1.4. Diffusionsexperimente	25
2.1.1.5. Temperaturübergänge	28
2.1.1.6. Bindungsstudien	29
2.1.2. Fluoreszenzspektroskopie	31
2.1.2.1. Gleichgewichtsdetektion	31
2.1.2.2. Zeitaufgelöste Detektion	32
2.1.3. Absorptionsspektroskopie	32
2.2. Lipari & Szabo-Analyse	34
2.3. NMR-Strukturrechnung	36
2.4. Untersuchte Proteine	39
2.4.1. Das Kälteschockprotein CspB	39
2.4.2. Die Prolylisomerase SlyD	40
2.4.3. Die Prolylisomerase SlpA	42
2.4.4. Das amyloide Peptid A β	43
2.5. Weitere verwendete Proben	45
2.5.1. Ribonuklease T1	45
2.5.2. DHPC	45
2.5.3. Tat-Peptide	46
2.5.4. FK506, Rapamycin	46

3. Ergebnisse	48
3.1. Charakterisierung der Prolylisomerase SlpA	48
3.1.1. Zuordnung der NMR-Resonanzsignale	48
3.1.1.1. Rückgratzuordnung	48
3.1.1.2. Seitenkettenuordnung	48
3.1.2. Hochaufgelöste dreidimensionale Struktur	49
3.1.3. Stabilität	52
3.1.3.1. Schutz gegenüber dem Lösungsmittel	52
3.1.3.2. Temperaturstabilität	55
3.1.4. Bindungsstudien zu Substraten	57
3.1.4.1. Interaktion zum Tetrapeptid	57
3.1.4.2. Interaktion zu Ribonuklease T1	59
3.1.5. Rückgratdynamik	61
3.1.5.1. Relaxationsverhalten auf der ps-bis-ns-Zeitskala	61
3.1.6. Zusammenfassende Diskussion	62
3.2. Charakterisierung der Prolylisomerase SlyD	65
3.2.1. Bindungsstudien	65
3.2.1.1. Interaktion zu Tat-Signalpeptiden	65
3.2.1.2. Interaktion zu PPIasen-Inhibitoren	69
3.2.2. Translationsdiffusion	72
3.2.3. Rückgratdynamik	75
3.2.3.1. Freier Zustand auf der ps-bis-ns-Zeitskala	75
3.2.3.2. Lipari & Szabo-Analyse der Relaxationsparameter	76
3.2.3.3. Gebundener Zustand auf der ps-bis-ns-Zeitskala	81
3.2.3.4. Relaxationsverhalten auf der μ s-bis-ms-Zeitskala	83
3.2.4. Zusammenfassende Diskussion	88
3.3. Studium der schnellen Faltung von <i>BsCspB</i> im Gleichgewicht	92
3.3.1. Entwickelte Datenanalyse	92
3.3.2. Globale Anpassung an unterschiedliche Magnetfelder	95
3.3.2.1. Beschränkung auf R_2 -Dispersionsdaten	95
3.3.2.2. Aufnahme eines Hilfsexperimentes	98
3.3.3. Zusammenfassende Diskussion	99
3.4. Einfluß von DHPC auf die Struktur von $A\beta$	102
3.4.1. Charakterisierung von DHPC	102
3.4.2. Strukturelle Charakterisierung von $A\beta$	103
3.4.3. Zusammenfassende Diskussion	105
4. Zusammenfassung	108
Literaturverzeichnis	109
A. Anhang	126
A.1. Koeffizientenmatrix der McConnell-Gleichung	126
A.2. Austauschrate eines Drei-Zustandssystems	127
A.3. Grenzfälle der Austauschrate k_{ex}	128
A.4. Individuelle chemische Verschiebungen	130

A.5.	Aminosäurespezifisch detektierbare Atome	131
A.6.	^1H - ^{15}N -IPAP-HSQC-Spektren von <i>EcSlpA</i>	132
A.7.	Modellauswahl für Lipari & Szabo-Analyse	133
	A.7.1. Modell_evaluate, Hauptprogramm	133
	A.7.2. res_NaN	136
	A.7.3. SSE_mat, SSE_Exp, SSE_ninety	137
	A.7.4. testmod	139
	A.7.5. F-Statistik	139
	A.7.6. testmod2	140
	A.7.7. modell_selection	140
	A.7.8. spin_modnumber	141
A.8.	^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren von <i>EcSlpA</i>	143
	A.8.1. ^1H - ^{13}C - <i>ct</i> HSQC-Spektrum des aliphatischen Bereiches	143
	A.8.2. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum des aromatischen Bereiches	144
A.9.	Komplettzuordnung <i>EcSlpA</i>	145
A.10.	Analyse der RDC-Werte von <i>EcSlpA</i>	150
A.11.	NMR-Titration Tetrapeptid zu <i>EcSlpA</i>	151
	A.11.1. Spektraler Verlauf	151
A.12.	NMR-Titration RCM-T1 zu <i>EcSlpA</i>	152
	A.12.1. Spektraler Verlauf	152
	A.12.2. Änderung der Kreuzsignalintensität	153
	A.12.3. Titrationsverläufe für Bindung	154
	A.12.4. Titrationsverläufe für Nichtbindung	155
	A.12.5. Linienformanalyse	156
A.13.	^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von <i>TtSlyD</i>	157
A.14.	Temperaturabhängige Relaxationsparameter von <i>EcSlyD</i> *	158
A.15.	Temperaturabhängige Relaxationsparameter von <i>TtSlyD</i>	159
A.16.	Lipari & Szabo-Analyse für <i>TtSlyD</i>	160
A.17.	Detektierbare Aminosäuren der transversalen Relaxationsdispersion	161
	A.17.1. <i>EcSlyD</i> *	161
	A.17.2. <i>TtSlyD</i>	161
A.18.	Transversale Relaxationsdispersion von <i>TtSlyD</i>	162
A.19.	Transversale Relaxationsdispersion von <i>EcSlyD</i> *Y68W	163
A.20.	Berechneter Verlauf der transversalen Relaxationsdispersion	164
A.21.	Globale Regressionsanalyse von <i>BsCspB</i>	165
	A.21.1. Optimale Magnetfeldkombination	165
	A.21.2. Größe des Gesamtfehlers	166
	A.21.3. NMR-Harnstofftitration	167
	A.21.3.1. Graphische Extrapolation	167
	A.21.3.2. Ergebnisse der Extrapolation	168
	A.21.4. Feldkombination und Gesamtfehler für festes $\Delta\omega$	169
B.	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	170
C.	Eigene Publikationen	176

D. Tagungsbeiträge & Gastvorträge	178
D.1. Tagungsbeiträge	178
D.2. Gastvorträge	179
D.3. Sonstiges	179
E. Lebenslauf	180
F. Eidesstattliche Erklärung	181
G. Danksagung	182

1. Einleitung

1.1. Proteine & Strukturbiologie

Proteine stellen eine sehr vielfältige Klasse an Biomakromolekülen dar. Sie nehmen in biologischen Systemen zum Beispiel die Rolle des Katalysators, Regulators oder auch eines Bindepartners ein. Ihre Primärsequenz wird aus der spezifischen Abfolge von 20 unterschiedlichen Typen an Aminosäuren gebildet. Allein im menschlichen Genom sind etwa 30000 bis 40000 verschiedene Proteinsequenzen codiert [1]. Die Ausbildung einer dreidimensionalen, funktionellen Proteinstruktur aus der Primärsequenz wird als Proteinfaltung bezeichnet und ist Gegenstand aktueller experimenteller wie auch theoretischer Forschung [2].

Da der native, gefaltete Zustand für die biologische Funktion eines Proteins essentiell ist, besteht großes Interesse, den Mechanismus der Faltung einer Polypeptidkette in diesen nativen Zustand vollständig zu verstehen. Die zentrale Frage lautet daher [3]: Kann die native Struktur allein anhand der Proteinsequenz vorhergesagt werden? Ausgehend von C. Anfinsens thermodynamischer Hypothese im Jahr 1973 ("die native Struktur ist die thermodynamisch stabile Struktur", [4]), hat sich in den folgenden Jahrzehnten das Modell eines Faltungstrichters für die quantitative wie auch für die qualitative Beschreibung der Bildung einer sequenzspezifischen nativen Struktur etabliert [5]. Dieses Modell beschreibt den Konformationsraum, den eine Polypeptidkette, in Abhängigkeit von seiner Energie, einnehmen kann. Höherenergetische Zustände der entfalteten Kette, mit samt intermolekularen und intramolekularen Kontakten, münden in niederenergetischen Zuständen, die entweder nur noch intermolekulare oder intramolekulare Kontakte aufweisen. Zustände minimaler Energie, die durch intermolekulare Kontakte charakterisiert sind, können strukturell als Oligomere, amyloide Fibrillen oder amorphe Aggregate ausgebildet sein [6]. Dagegen stellen Faltungsintermediate, teilweise gefaltete Ketten oder auch die native Konformation Proteinzustände minimaler Energie dar, die nur intramolekulare Kontakte aufweisen [6].

Neben der Röntgenkristallographie und Elektronenmikroskopie bietet die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) eine weitere Möglichkeit, hochaufgelöste dreidimensionale Strukturinformationen zu gewinnen. Die Röntgenkristallographie macht sich die Interferenz von elastisch gestreuten Partialwellen zunutze, die bei Röntgenbestrahlung eines Kristalles von den Hüllenelektronen der Atome gestreut werden, [7]. J. C. Kendrew und M. Perutz erhielten 1962 den Nobelpreis für Chemie für die Strukturbestimmung der Globulinproteine mittels Röntgenkristallographie.

Da Teilchenstrahlung, genau wie Photonenstrahlung, Wellencharakter besitzt (L.-V. De Broglie, Nobelpreis für Physik 1929 für die Beschreibung der Welleneigenschaften von Materiewellen), können auch Elektronen für die Abbildung von Objekten in einem Mikroskop eingesetzt werden, mit einem etwa 1000fach höheren Auflösungsvermögen gegen-

über einem Lichtmikroskop. Damit erhält man Strukturinformationen von biologischen Systemen im Nanometermaßstab.

Die NMR-Spektroskopie stellt auf der einen Seite die experimentellen Methoden zur Berechnung der energieärmsten, somit nativen Struktur bereit [8]. Die Nobelpreise für Chemie der Jahre 1991 für R. R. Ernst und 2002 für K. Wüthrich honorierten die methodischen Arbeiten, die das Ziel dieser hochauflösenden Strukturbestimmung von (Bio)molekülen verfolgten. Auf der anderen Seite können mittels kernmagnetischer Resonanz aber auch Strukturinformationen über intermediäre Zustände hochaufgelöst gewonnen werden [9]. Ferner liefert die NMR-Spektroskopie neben der strukturellen Charakterisierung von Faltungsintermediaten auch spektrale Informationen über die entfaltete Polypeptidkette oder über intrinsisch ungeordnete Proteine. Damit grenzt sie sich stark von der Röntgenkristallographie ab, die auf die Kristallisation bzw. auf das Kristallisationsvermögen des Proteins angewiesen ist. Zudem stellt die NMR-Spektroskopie eine Vielzahl von Methoden bereit, die Proteindynamik in hoher Orstauflösung auf einer breiten Zeitskala zu studieren [10]. Dies ist von hohem Interesse, da, nach aktuellem Kenntnisstand [11], gerade die Dynamik neben der Struktur eines Proteins für dessen Funktion und Aktivität verantwortlich ist.

1.2. Zielstellung dieser Arbeit

Da sowohl die Struktur als auch die Dynamik der Proteinkette deren Funktion bestimmt, sind beide Aspekte eingehend im Rahmen dieser Arbeit anhand verschiedener Proteine beleuchtet worden. Als experimentelle Methode kam hierzu vorrangig die hochauflösende NMR-Spektroskopie zum Einsatz. Eine Aufgabe bestand darin, geeignete Pulsprogramme für das Studium der Dynamik der Proteinkette zu implementieren. Des Weiteren sollten Auswerteprogramme entwickelt werden, die die Basis für die Berechnung von Bewegungsparametern des Proteinrückgrates anhand von NMR-Relaxationsdaten bilden. Weitere methodische Ziele dieser Arbeit bestanden in der Etablierung NMR-spektroskopischer Experimente zur Bestimmung der Translationsdiffusion eines Proteins, auch in zeitaufgelöster Form, und der globalen Regressionsanalyse von Relaxationsdaten, die an verschiedenen Magnetfeldern aufgenommen worden sind.

Für das Zweidomänenprotein SlyD sollte aufbauend auf vorangegangener Röntgen- und NMR-spektroskopischer Strukturbestimmung die Rückgratdynamik intensiv studiert werden. Aus NMR-Relaxationsparametern auf der ps-bis-ns- wie auch der μ s-bis-ms-Zeitskala sollten Rückschlüsse auf die hohe Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität von SlyD gezogen werden. Mit der Untersuchung von verschiedenen substratgebundenen Zuständen wie auch des freien Zustandes einer Variante von SlyD sollte das Verständnis für die Verknüpfung zwischen Aktivität und Dynamik in aminosäurespezifischer Auflösung weiter erhöht werden. Von Interesse waren zusätzlich die Zeitskala und die sequentielle Position für die Interaktion von SlyD mit Inhibitoren der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität. Inhibierungsexperimente des Wildtypproteins und einer Eindomänen-Variante sollten parallel durchgeführt werden. Auch hier sollten NMR-Untersuchungen des inhibierten Zustandes von SlyD weitere Erklärungsmuster für den Arbeitsmechanismus dieses Enzyms liefern.

Darüber hinaus sollte das zu SlyD ähnliche Protein SlpA NMR-spektroskopisch charakterisiert werden. Das Ziel bestand in der Berechnung einer hochaufgelösten dreidimensionalen Struktur in Lösung. Aus der Bestimmung dieser Struktur sollten Rückschlüsse auf die im Vergleich zu SlyD erniedrigte Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität von SlpA gezogen werden. Ferner sollte mittels NMR-Spektroskopie die Stabilität des Wildtypproteins und verschiedener SlpA-Varianten bestimmt und der Vergleich mit anderen spektroskopischen Methoden gezogen werden. Bindungsstudien mit verschiedenen Substraten und darauf folgende Affinitätsbestimmungen sollten weitere Parameter für den Vergleich zu SlyD bilden.

Die Faltung des Kälteschockproteins sollte NMR-spektroskopisch im Gleichgewicht in aminosäurespezifischer Auflösung bestimmt werden. Dazu war eine hohe Datenqualität durch Messungen an möglichst vielen verschiedenen Magnetfeldern anzustreben. Mit einer globalen Datenanalyse sollte ein Modell entwickelt werden, das es erlaubt, einen aminosäurespezifischen Vergleich von thermodynamischen und kinetischen Parametern der Faltungsreaktion der Polypeptidkette zu ziehen.

Abschließend sollte die Interaktion des Alzheimer-Peptides A β mit einer Membranmimik NMR-spektroskopisch aufgeklärt werden. Dazu sollte das Hauptaugenmerk auf die Translationsdiffusion und die etwaige Änderung der Rückgratstruktur des Peptides gelegt werden. Ergänzend bestand das Ziel darin, die Ausbildung einer micellären Struktur NMR-spektroskopisch zu quantifizieren.

2. Experimentelle Methoden & untersuchte Proteine

2.1. Spektroskopische Methoden

2.1.1. NMR-Spektroskopie

Seit den Pionierarbeiten von I. Rabi 1938 [12], F. Bloch [13] sowie E. Purcell 1946 [14] hat sich die NMR-Spektroskopie auf vielen Feldern der experimentellen Naturwissenschaften rasant und breit entwickelt. Neben dem Einsatz in der Chemie und Physik hat sich die NMR-Spektroskopie in den letzten Jahrzehnten auch einen festen Platz in den interdisziplinären Feldern der Biochemie, der Biophysik und der Strukturbiologie erobert. Die Aufklärung der Struktur und der Dynamik von biologischen Makromolekülen im atomaren Maßstab ist ein entscheidender Schritt zum Verständnis für deren Stabilität, Aktivität und Funktion (s. Abb. 2.1). Moderne Methoden der hochauflösenden NMR-Spektroskopie erlauben es, diese Aufklärung zu betreiben und beispielsweise Proteine unter physiologischen Bedingungen *in vitro* zu untersuchen. Der folgende Abschnitt soll dem Leser diese Methoden nahebringen.



Abb. 2.1.: Schlüsselrolle der Struktur und Dynamik zum Verständnis von Aktivität, Stabilität und Funktion des untersuchten Moleküls.

2.1.1.1. Genutzte NMR-Geräte

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-Experimente sind an Bruker-Spektrometern erfolgt. Es sind verschiedene Typen genutzt worden: DRX 500 (MPF der Enzymologie, Halle (Saale)), Avance II 600, Avance III 600 bzw. Avance III 800 (Arbeitsgruppe Jochen Balbach, Universität Halle-Wittenberg), Avance II 700 (Arbeitsgruppe Paul Rösch, Universität Bayreuth) sowie Avance I 900 (Arbeitsgruppe Horst Kessler, Technische Universität München). Alle NMR-Spektren sind mit den Programmen XWIN-NMR bzw. TopSpin der Firma Bruker aufgenommen, mit NMRPipe prozessiert [15] und mit NMRView [16] analysiert worden.

2.1.1.2. Experimente zur Dynamikaufklärung

In der klassischen Mechanik grenzt sich der Begriff der Dynamik von der Kinematik in der Weise ab, dass in der Dynamik nach den Ursachen der Bewegung gefragt wird, den Kräften. In der NMR-Spektroskopie ist das Interesse für die Ursachen der Bewegung sekundär, vielmehr interessiert die Änderung eines definierten Ortes mit der Zeit. Da die NMR-Spektroskopie in der Lage ist, die NMR-aktiven Kerne spektral aufzulösen, besteht die Möglichkeit, die Ortskoordinate jedes einzelnen Kernes zeitlich zu verfolgen. Die Änderung dieser Ortskoordinate der NMR-aktiven Kerne innerhalb eines Proteins läuft, je nach beobachtetem Ereignis, auf unterschiedlichen Zeitskalen ab. Zwischen der Faltung der Polypeptidkette in den nativen Zustand und den Schwingungen einzelner Bindungen oder den Rotationen einzelner Seitenketten, die innerhalb eines Zustandes ablaufen, liegen mehr als 15 Größenordnungen (s. Abb. 2.2). Vor allem der Dynamik

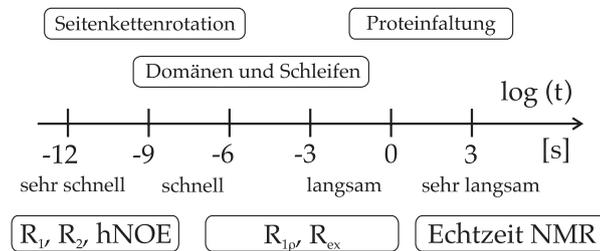


Abb. 2.2.: Die Dynamik bestimmter Bereiche bzw. bestimmter Ereignisse innerhalb eines Proteins (oberhalb des Zeitstrahles) kann mit geeigneten NMR-Experimenten (unterhalb des Zeitstrahles) untersucht werden.

der langsamen Zeitskala (mittlerer Bereich in Abb. 2.2) gilt besonderes Interesse, da in diesem Zeitregime unter anderem die Katalyse von Substraten abläuft. Die Abb. 2.3 soll den molekularen Unterschied zwischen der Dynamik im ps-bis-ns-Bereich und derjenigen im μ s-bis-ms-Bereich verdeutlichen. Der Unterschied der Minima der freien Energie zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen A und B eines Proteins, ΔG_{AB} , definiert das Populationsverhältnis zwischen diesen beiden Zuständen. Die Energiebarriere, die zwischen diesen beiden Zuständen liegt, definiert die Austauschraten $k_{B \rightarrow A}$ bzw. $k_{A \rightarrow B}$ zwischen den Zuständen.

Mit der Wahl eines geeigneten NMR-Experimentes gelingt es nun, diese verschiedenen Ereignisse auf den unterschiedlichen Zeitskalen zu detektieren. Dies soll in den folgenden Punkten näher erläutert werden.

2.1.1.2.1. ps-bis-ns-Zeitskala Die Zeitskala, die sich vom Pico-bis-Nanosekundenbereich erstreckt, wird als schnelle NMR-Zeitskala bezeichnet, und kann mit Relaxationsexperimenten untersucht werden (linker Bereich in Abb. 2.2). Im Rahmen dieser Arbeit stand das Relaxationsverhalten des amidprotongebundenen ^{15}N -Kernes jeder einzelnen Aminosäure verschiedener Proteine im Vordergrund (s. Abb. 2.4). Mit der Aufnahme der R_1 - und R_2 -Raten sowie des heteronuklearen Overhauser-Effektes [17, 18], hNOE,

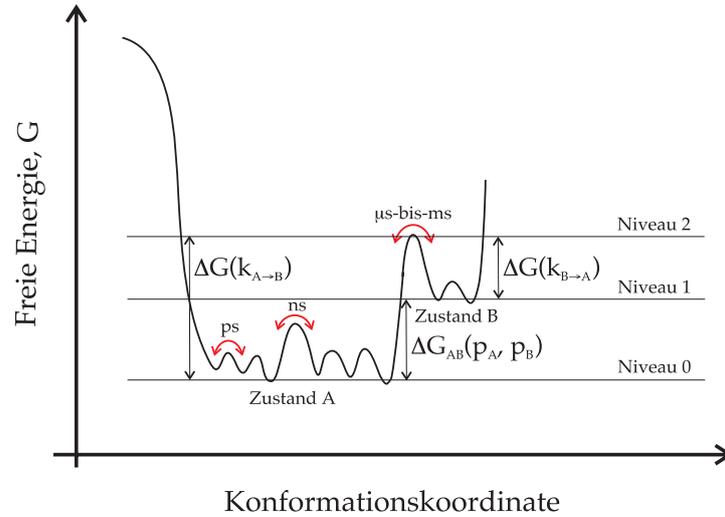


Abb. 2.3.: Konformationsraum von Bewegungen, die auf verschiedenen Zeitskalen ablaufen, nach [11]. Ein Wechsel vom Zustand A in den Zustand B erfolgt deutlich langsamer als der Wechsel zwischen einzelnen Rotations- oder Vibrationszuständen, die innerhalb eines Zustandes liegen.

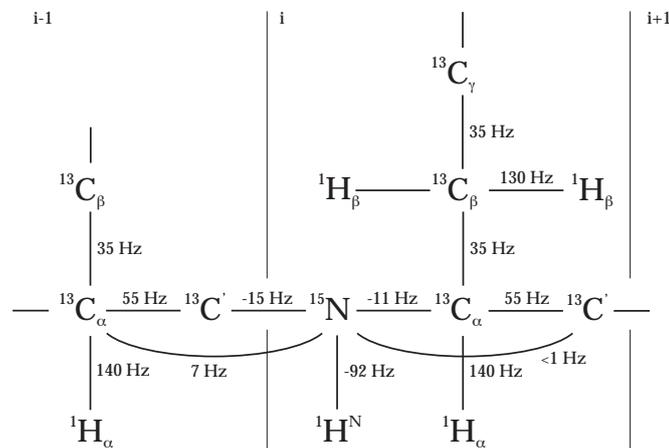


Abb. 2.4.: Schematische Darstellung der durch die Peptidbindung verknüpften Proteinkette von drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren i-1, i und i+1. Die Zahlenwerte geben die Stärke der skalaren Kopplung zwischen den NMR-aktiven Kernen an, die durch ein oder zwei chemische Bindungen miteinander verknüpft sind.

zwischen dem Amidproton und dem ^{15}N -Kern, erfolgte die Charakterisierung der Rückgratdynamik von *TtSlyD*, *EcSlyD** (jeweils temperaturabhängig) und von *EcSlpA*. Die Pulsprogramme sind nach [19, 20] verwendet worden und in Abb. 2.5 - 2.7 dargestellt.

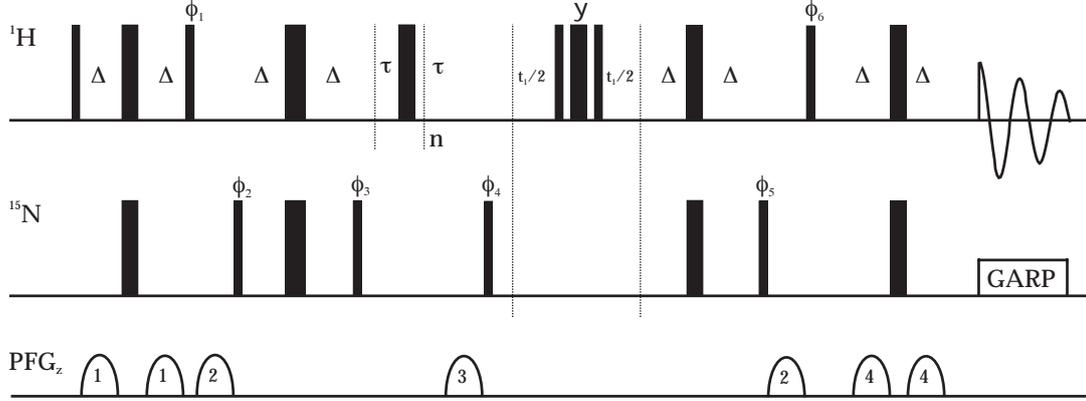


Abb. 2.5.: Verwendete Pulssequenz zur Messung der longitudinalen ^{15}N -Relaxationsrate R_1 eines Proteins [19, 20]. Schmale bzw. breite Rechtecke stellen 90° - bzw. 180° -Pulse dar. Die Phasen der Pulse lauten (falls nicht explizit angegeben: x): $\phi_1=y$, $\phi_2=x$, $-x$, $\phi_3=y$, $\phi_4=-y$, $\phi_5=4x$, $4(-x)$, $\phi_6=-x$ und die Empfängerphase $\phi_{31}=x$, $-x$, x , $-x$, $-x$, x , $-x$, x . Die relativen Gradientenstärken lauten $G_1=50\%$, $G_2=80\%$ und $G_3=5\%$ und $G_4=30\%$, die Gradientenlänge 1 ms. Die Wartezeit Δ wurde mit 2.5 ms, τ mit 5 ms gewählt. Zur Aufnahme der Relaxationskurve wird n schrittweise erhöht (geradzahliges Vielfache). Phasensensitivität in der indirekten Dimension ist durch Inkrementierung von ϕ_4 gemäß STATES-TPPI [21] erreicht worden. Während der Datenaufnahme der direkten Dimension ist auf dem Heterokanal mittels GARP [22] entkoppelt worden. Auf die Darstellung der Vorsättigung und des WATERGATE-Elementes [23] zur Wasserunterdrückung wurde der Einfachheit halber verzichtet.

Für die experimentelle Bestimmung von R_1 und R_2 wird für verschiedene ganzzahlige Vielfache von n (s. Abb. 2.5, 2.6) jeweils ein ^1H - ^{15}N -HSQC aufgenommen und die jeweilige Kreuzsignalintensität I^i über das dazugehörige Relaxationsintervall t aufgetragen. Eine Regression der Gl. (2.1.1) an die Messdaten ergibt die für jedes Kreuzsignal i die individuelle Relaxationsrate R_1^i bzw. R_2^i :

$$I^i = I_0^i \exp(-R_{1,2}^i t). \quad (2.1.1)$$

Der $h\text{NOE}$ wird durch die getrennte Aufnahme eines gesättigten Experimentes (der ^1H - ^{15}N -Übergang wird durch permanente Pulseinstrahlung gesättigt) und eines Referenzexperimentes (Zeitdauer der Sättigung des ^1H - ^{15}N -Überganges wird durch eine äquivalente Wartezeit ersetzt) bestimmt, s. Abb. 2.7. Der Quotient aus den jeweiligen Kreuzsignalintensitäten beider Experimente, I_{sat}^i bzw. I_{ref}^i , ergibt den individuellen $h\text{NOE}^i$:

$$h\text{NOE}^i = \frac{I_{\text{sat}}^i}{I_{\text{ref}}^i}. \quad (2.1.2)$$

Die Relaxationstheorie verknüpft die experimentell zugänglichen Relaxationszeiten mit lokalen Magnetfeldern, die aufgrund von zeitlich veränderlichen Kernspinorientierungen

einer Fluktuation unterliegen. Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ definiert diese Magnetfeldfluktuationen B_i zwischen einer Zeit t und $t + \tau$

$$G(\tau) = \langle B_i(t)B_i(t + \tau) \rangle. \quad (2.1.3)$$

Die Annahme einer Exponentialfunktion gibt den zeitlichen Verlauf der Korrelationsfunktion $G(\tau)$ mit der Korrelationszeit τ_c wieder:

$$G(\tau) = \langle B_i(t)^2 \rangle \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_c}\right). \quad (2.1.4)$$

Die spektrale Leistungsdichtefunktion $\hat{J}(\omega)$ erlaubt es nun, die Frequenzen ω , die dem Fluktionsprozess zugrunde liegen, zu bestimmen:

$$\hat{J}(\omega) = 2 \int_0^\infty G(\tau) \exp(-i\omega\tau) d\tau. \quad (2.1.5)$$

Einsetzen von Gl. (2.1.4) (und deren Normierung) in Gl. (2.1.5) liefert

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2}. \quad (2.1.6)$$

A. Abragam verknüpfte 1961 [25] allgemein die spektrale Leistungsdichtefunktion $J(\omega)$ mit den experimentell zugänglichen Relaxationsparametern R_1 , R_2 und dem h NOE, die aufgrund von Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei koppelnden Kernspins oder über die chemische Verschiebungsanisotropie $\Delta\omega$ eines Kernspins hervorgerufen werden. Die Gl. (2.1.7) - (2.1.9) geben die Relaxationsraten R_1 und R_2 sowie den h NOE für einen ^{15}N -Kern wieder, der eine Bindungslänge von r_{NH} zum benachbarten Proton besitzt.

$$R_1 = \frac{d^2}{4} \{J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}}) + 3J(\omega_{\text{N}}) + 6J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}})\} + \frac{\omega_{\text{N}}^2}{3} \Delta\omega^2 J(\omega_{\text{N}}) \quad (2.1.7)$$

$$R_2 = \frac{d^2}{8} \{4J(0) + J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}}) + 3J(\omega_{\text{N}}) + 6J(\omega_{\text{H}}) + 6J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}})\} + \frac{\omega_{\text{N}}^2}{18} \Delta\omega^2 \{4J(0) + 3J(\omega_{\text{N}})\} + R_{\text{ex}} \quad (2.1.8)$$

$$h\text{NOE} = 1 + \frac{d^2}{4R_1} \frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{N}}} \{6J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}}) - J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}})\}, \quad (2.1.9)$$

$$\text{mit: } d = \frac{\mu_0 h \gamma_{\text{H}} \gamma_{\text{N}}}{8\pi^2} \langle r_{\text{NH}}^{-3} \rangle, \quad (2.1.10)$$

mit der magnetischen Feldkonstante μ_0 , der Planck-Konstante h , dem gyromagnetischen Verhältnis des Protons γ_{H} bzw. des ^{15}N -Kernes γ_{N} , der Larmorfrequenz des Protons ω_{H} bzw. der des ^{15}N -Kernes ω_{N} . Die Differenz der Parallel- und der Senkrechtkomponente der ^{15}N -chemischen Verschiebungsanisotropie $\Delta\omega$, die durch Axialsymmetrie hinreichend beschrieben werden kann, wird im Bereich $(-170 \dots -160)$ ppm angenommen

[26, 27]. Der Parameter d in Gl. (2.1.10) wird als Kopplungskonstante der Dipol-Dipol-Wechselwirkung von zwei über den Raum wechselwirkenden Kernspins bezeichnet. Das am ^{15}N -Kern direkt gebundene Proton dominiert die Relaxationsparameter R_1 , R_2 und $h\text{NOE}$ des ^{15}N -Kernes, da $|\gamma_{\text{H}}| \simeq 10|\gamma_{\text{N}}|$ und γ_{H} wie auch γ_{N} quadratisch in Gl. (2.1.7) - (2.1.9) eingehen. Durch die Aufnahme eines Austauschtermes R_{ex} (siehe auch Abb. 2.2) als Beitrag zu der transversalen Relaxationsrate R_2 , wird möglichem Konformationsaustausch auf der ms-Zeitskala Rechnung getragen.

Die Abb. 2.8 und 2.9 zeigen exemplarisch für einen ^{15}N -Kern, der an einem Proton im Abstand von $r_{\text{NH}} = 0.102 \text{ nm}$ gebunden ist, den Verlauf von T_1 , T_2 (inverse Relaxationsraten) und dem $h\text{NOE}$ -Wert in Abhängigkeit von der Korrelationszeit τ_c der Bewegung.

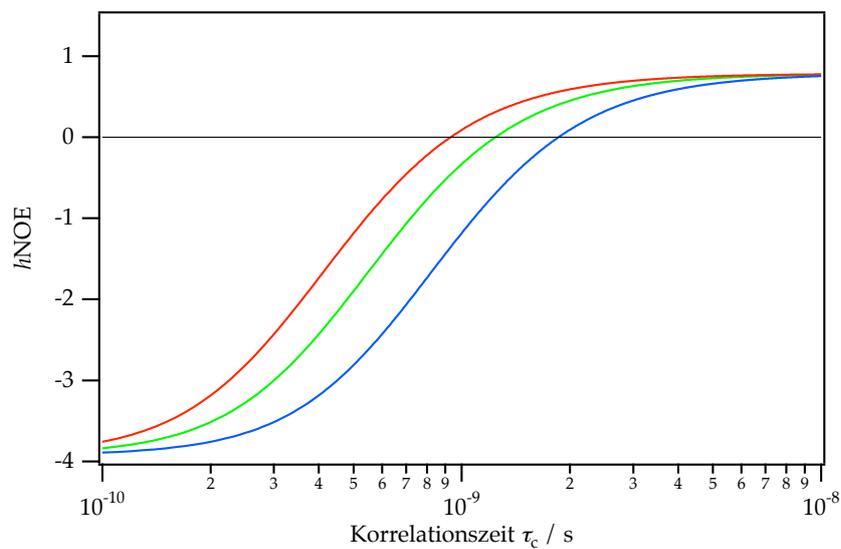


Abb. 2.8.: Doppellogarithmische Darstellung des Verlaufes des heteronuklearen NOEs in Abhängigkeit von der Korrelationszeit τ_c eines ^{15}N -Kernes, der an einem Proton im Abstand von $r_{\text{NH}} = 0.102 \text{ nm}$ gebunden ist (s. Gl. (2.1.9)). Dargestellt ist ferner die Abhängigkeit des $h\text{NOEs}$ von der verwendeten magnetischen Flussdichte B_0 ($B_0 = 9.4 \text{ T}$ (in blau), $B_0 = 14.1 \text{ T}$ (in grün), $B_0 = 18.8 \text{ T}$ (in rot)).

Ferner verdeutlicht die Abb. 2.8 die Abhängigkeit der Relaxation von der verwendeten magnetischen Flussdichte B_0 . Eine entsprechende Feldabhängigkeit wurde in der vorliegenden Arbeit für die transversale Relaxationsrate R_2 zum Studium der Relaxationsdispersion des Kälteschockproteins ausgenutzt (s. Abschnitt 3.3).

Für die temperaturabhängige Relaxationsstudie von *EcSlyD** und *TtSlyD* (s. Abschnitt 3.2.3.1) sind die 10 % getrimmten Mittelwerte von R_1 , R_2 und $h\text{NOE}$ angegeben. Dabei bleiben die kleinsten bzw. größten 10 % eines der Größe nach aufsteigend geordneten Datensatzes bei der Mittelwertbildung unberücksichtigt.

2.1.1.2.2. μs -bis- ms -Zeitskala Das Zeitfenster, das sich vom ns-bis- μs -Bereich erstreckt, bleibt für die NMR unsichtbar, obwohl Versuche unternommen wurden, Bewe-

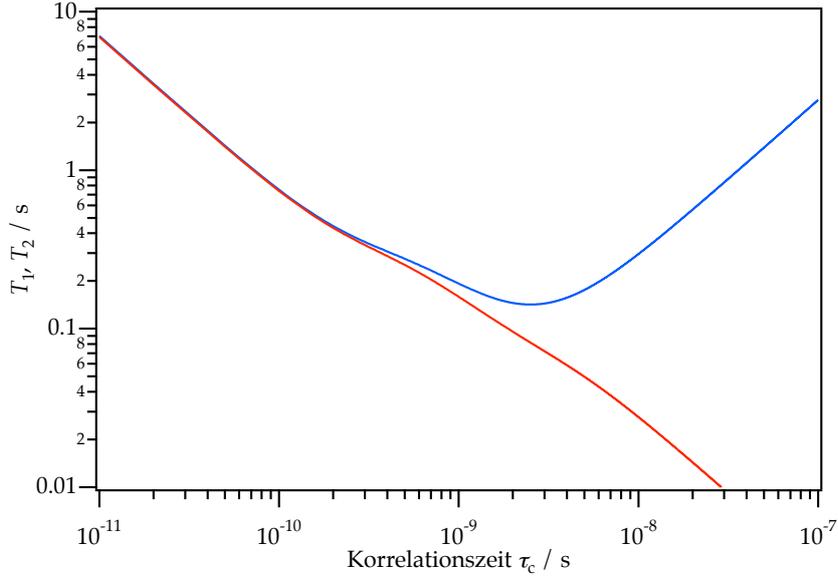


Abb. 2.9.: Doppellogarithmische Darstellung des Verlaufes der longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten T_1 (in blau) und T_2 (in rot) in Abhängigkeit von der Korrelationszeit τ_c eines ^{15}N -Kernes, der an einem Proton im Abstand von $r_{\text{NH}} = 0.102 \text{ nm}$ gebunden ist (s. Gl. (2.1.7) für $T_1 = R_1^{-1}$ und Gl. (2.1.8) für $T_2 = R_2^{-1}$).

gungen, die in diesem Bereich stattfinden, indirekt sichtbar zu machen [28, 29]. Sogenannte Austauschexperimente dominieren die NMR-Zeitskala, die sich vom μs -bis- ms -Bereich erstreckt (mittlerer Bereich in Abb. 2.2). Chemischer (oder auch konformationeller) Austausch ist durch die Änderung der magnetischen Umgebung von Atomen in einem Molekül charakterisiert. In deren Folge trägt die Orts- und Zeitabhängigkeit der Kernspins zum Dephasieren der Kohärenz und zum Magnetisierungstransfer zwischen verschiedenen Zuständen bei. Für einen Zwei-Zustands-Austausch zwischen A und B kann folgende Beziehung angenommen werden [30]:



mit den beiden Ratenkonstanten k_1 und k_{-1} , für die Hin- bzw. für die Rückreaktion. Die Summe aus diesen beiden Ratenkonstanten wird als Austauschrate k_{ex} bezeichnet:

$$k_{\text{ex}} = k_1 + k_{-1}. \quad (2.1.12)$$

Durch die Populationen p_A und p_B der beiden Zustände A und B , besteht folgende Beziehung zwischen der Austauschrate und den beiden Ratenkonstanten:

$$k_1 = p_B k_{\text{ex}}, \quad (2.1.13)$$

$$k_{-1} = p_A k_{\text{ex}}. \quad (2.1.14)$$

Der eingangs beschriebene zeitabhängige Austausch zwischen A und B , kann nun allgemein formuliert werden:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} A(t) \\ B(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_1 & k_{-1} \\ k_1 & -k_{-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A(t) \\ B(t) \end{pmatrix} = k_{\text{ex}} \begin{pmatrix} -p_B & p_A \\ p_B & -p_A \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A(t) \\ B(t) \end{pmatrix}. \quad (2.1.15)$$

Durch chemischen Austausch kann longitudinaler Magnetisierungstransfer (klassisches NOESY-Experiment, siehe auch Abschnitt 2.1.1.3.3) hervorgerufen werden, der mittels ZZ-Austausch-Spektroskopie [31, 32] gemessen werden kann.

Präzidiert die transversale Kohärenz frei unter dem Hamilton Operator der chemischen Verschiebung,

$$\hat{H}_j = \omega_j \hat{I}_{jz}, \quad (2.1.16)$$

mit der Larmorfrequenz ω_j des Kernes j , spricht man von transversaler Relaxation, die auch durch Austauschprozesse hervorgerufen wird. Die Lösung der McConnell-Gleichungen gibt nun an, wie sich die jeweilige Kohärenz des Zustandes A bzw. B ($M_A(t)$, $M_B(t)$), mit der Zeit t entwickelt [33]:

$$\begin{pmatrix} M_A(t) \\ M_B(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{AA}(t) & \alpha_{AB}(t) \\ \alpha_{BA}(t) & \alpha_{BB}(t) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_A(0) \\ M_B(0) \end{pmatrix} \quad (2.1.17)$$

$$\mathbf{M}(t) = \mathbf{A}(t)\mathbf{M}(0) \quad (2.1.18)$$

Die Koeffizientenmatrix $\alpha_{ij}(t)=\mathbf{A}(t)$ ist im Anhang A.1 angegeben (s. Gl. (A.1.1)).

Das Zeitregime des Austausches hängt nun davon ab, in welchem Verhältnis die Austauschrate k_{ex} zur Differenz der chemischen Verschiebungen $\Delta\omega = \omega_A - \omega_B$ der beiden Zustände A (mit ω_A) und B (mit ω_B), steht. Man definiert drei Zeitregimes des Austausches:

$$\begin{array}{ll} \text{langsam} & k_{\text{ex}} < \Delta\omega, \\ \text{intermediär} & k_{\text{ex}} \approx \Delta\omega, \\ \text{schnell} & k_{\text{ex}} > \Delta\omega. \end{array} \quad (2.1.19)$$

Die Abb. 2.10 verdeutlicht die Veränderungen im NMR-Spektrum, die durch unterschiedliche Verhältnisses $k_{\text{ex}}/\Delta\omega$ hervorgerufen werden.

Als weiterer spektroskopisch zu verfolgender Effekt, der durch Austauschprozesse hervorgerufen wird, ist die Relaxation der transversalen Kohärenz anzuführen, die während CPMG-Spin-Echo-Sequenzen (Carr-Purcell-Meiboom-Gill, [34, 35]) abläuft. Da im Rahmen dieser Arbeit vor allem diese CPMG-basierten Methoden für die Dynamikaufklärung im μs -bis- ms Bereich verwendet worden sind, sollen diese hier näher vorgestellt werden. Das folgende Modul:

$$\left(\frac{\tau_{\text{CP}}}{2} - \pi - \frac{\tau_{\text{CP}}}{2} \right),$$

mit einem π -Puls, der durch die Wartezeit τ_{CP} eingerahmt wird, wird als ein Spin-Echo-Modul bezeichnet. Der zentrale π -Puls invertiert die Präzessionsbewegung der einzelnen Kernspins, sodass die Kohärenz am Ende eines Spin-Echos

$$\mathbf{M}(\tau_{\text{CP}}) = \mathbf{A}\mathbf{A}^T\mathbf{M}(0) \quad (2.1.20)$$

beträgt, mit der konjugiert komplexen Matrix $\mathbf{A}^T(t)$ von $\mathbf{A}(t)$. Am Ende einer geradzahlig Anzahl von CPMG-Spin-Echo-Blöcken beträgt die Kohärenz

$$\mathbf{M}(2k\tau_{\text{CP}}) = (\mathbf{A}\mathbf{A}^T\mathbf{A}^T\mathbf{A})^k\mathbf{M}(0), \quad (2.1.21)$$

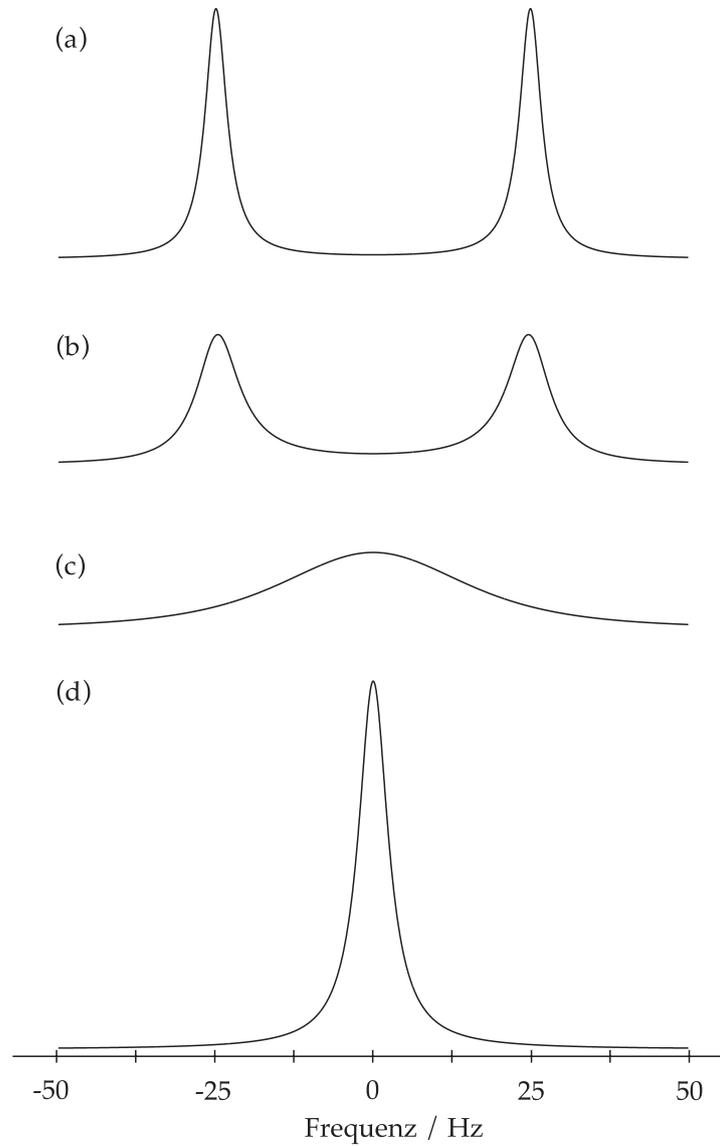


Abb. 2.10.: Nach Gl. (2.1.18) berechnete Spektren für verschiedene Verhältnisse $k_{\text{ex}}/\Delta\omega$. Die Spektren sind jeweils mit $p_A = p_B = 0.5$, $R_{2A}^0 = R_{2B}^0 = 10$ Hz und $\Delta\omega = 50$ Hz simuliert worden. Die Austauschrate k_{ex} nimmt hierbei folgende Werte an: $k_{\text{ex}} = 0$ Hz (a), $k_{\text{ex}} = 5$ Hz (b), $k_{\text{ex}} = 50$ Hz (c) und $k_{\text{ex}} = 500$ Hz (d). Es sind absolute Intensitäten dargestellt.

mit einer ganzen Zahl k .

J. P. Carver & R. E. Richards [36], J. Jen [37] und D. G. Davis, M. E. Perlman und R. E. London [38] haben eine allgemeine Lösung der effektiven transversale Relaxationsrate $R_{2,\text{eff}} = f(\tau_{\text{CP}})$ für die Gl. (2.1.21) angegeben (mit $p_A > p_B$), die für alle Zeitregimes des chemischen Austausches gilt:

$$R_{2,\text{eff}} \left(\frac{1}{\tau_{\text{CP}}} \right) = \frac{1}{2} \left(R_{2A} + R_{2B} + k_{\text{ex}} - \frac{1}{\tau_{\text{CP}}} \cosh^{-1}(D_+ \cosh(\eta_+) - D_- \cos(\eta_-)) \right),$$

mit: (2.1.22)

$$D_{\pm} = \frac{1}{2} \left(\frac{\psi + 2\Delta\omega^2}{\sqrt{\psi^2 + \phi^2}} \pm 1 \right)$$

$$\eta_{\pm} = \frac{\tau_{\text{CP}}}{\sqrt{2}} \sqrt{\sqrt{\psi^2 + \phi^2} \pm \psi}$$

$$\psi = (R_{2A} - R_{2B} - p_A k_{\text{ex}} + p_B k_{\text{ex}})^2 - \Delta\omega^2 + 4p_A p_B k_{\text{ex}}^2$$

$$\phi = 2\Delta\omega(R_{2A} - R_{2B} - p_A k_{\text{ex}} + p_B k_{\text{ex}})$$

$$\Delta\omega = 2\pi\Delta\nu.$$

Für den Grenzfall des schnellen chemischen Austausches, $k_{\text{ex}} \gg \Delta\omega$, konnten Z. Luz & S. Meiboom [39] vor J. P. Carver & R. E. Richards [36] eine analytische Lösung angeben:

$$R_{2,\text{eff}} \left(\frac{1}{\tau_{\text{CP}}} \right) = R_{20} + \frac{p_A p_B \Delta\omega^2}{k_{\text{ex}}} \left(1 - \tanh \left[\frac{k_{\text{ex}} \tau_{\text{CP}}}{2} \right] \frac{2}{k_{\text{ex}} \tau_{\text{CP}}} \right). \quad (2.1.23)$$

Sowohl für den Grenzfall des langsamen chemischen Austausches, $k_{\text{ex}} \ll \Delta\omega$, [40]

$$R_{2A,\text{eff}} \left(\frac{1}{\tau_{\text{CP}}} \right) = R_{2A} + k_1 - k_1 \frac{\sin(\Delta\omega\tau_{\text{CP}}/2)}{\Delta\omega\tau_{\text{CP}}/2}, \quad (2.1.24)$$

als auch für $p_A \gg p_B$, [41]

$$R_{2,\text{eff}} \left(\frac{1}{\tau_{\text{CP}}} \right) = R_{20} + \frac{p_A p_B k_{\text{ex}} \Delta\omega^2}{k_{\text{ex}}^2 + \sqrt{p_A^2 \Delta\omega^4 + 144/\tau_{\text{CP}}^4}}, \quad (2.1.25)$$

existieren Lösungen, die handlicher als Gl. (2.1.22) erscheinen.

In den letzten Jahren hat die Untersuchung der Dynamik auf der μs -bis- ms -Zeitskala in der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie einen enormen Auftrieb erlangt [42, 43, 44]. Da viele biologischen Prozesse wie Enzymkatalyse, Ligandenbindung oder auch Proteinfaltungsprozesse (s. Abschnitt 3.3) auf dieser Zeitskala ablaufen, konnte die enge Verzahnung zwischen Konformationsänderungen in biologischen Molekülen und ihrer Funktion ([45, 46], s. a. Abb. 2.1) experimentell untermauert werden.

Anfangs erfolgte die Messung der effektiven transversalen Relaxationsrate $R_{2,\text{eff}}$ des Amidstickstoffes nach traditionellem Muster, für jeden τ_{CP} -Wert wurde eine komplette Relaxationskurve aufgenommen [47, 48]. Neben HSQC-basierten Sequenzen hat sich

auch die TROSY-Technik [49] in CPMG-basierten Experimenten etabliert [50]. Der große zeitliche Messaufwand zur Bestimmung der ^{15}N -Relaxationsdispersion wurde mit der Verwendung von konstanten Relaxationsperioden überwunden [51, 52]. Dieser Ansatz zur Messung der Relaxationsdispersion ist im Rahmen dieser Arbeit gewählt worden. Die dafür verwendete Pulssequenz ist in Abb. 2.11 dargestellt.

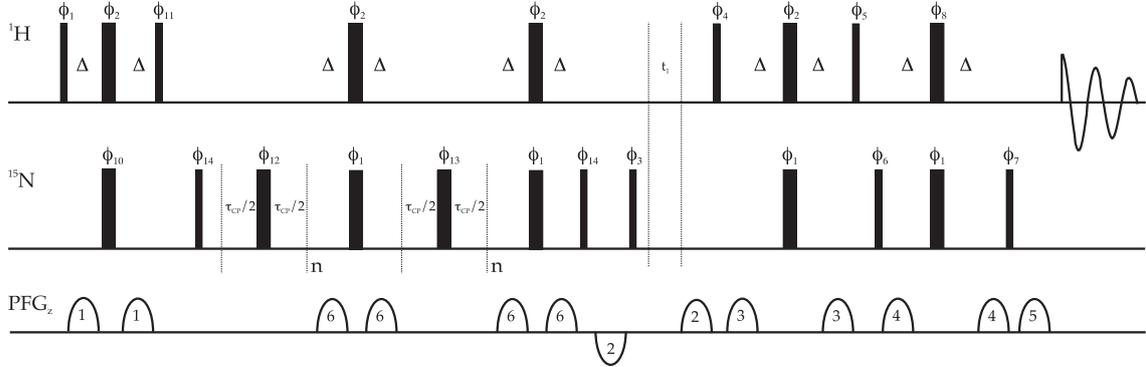


Abb. 2.11.: Verwendete Pulssequenz zur Messung der transversalen ^{15}N -Relaxationsdispersion eines Proteins, nach [51, 53]. Schmale bzw. breite Rechtecke stellen 90° - bzw. 180° -Pulse dar. Die Phasen der Pulse lauten: $\phi_1=\phi_7=\phi_8=\phi_{10}=\text{x}$, x , y , y , $-\text{x}$, $-\text{x}$, $-\text{y}$, $-\text{y}$, $\phi_2=\phi_4=\phi_6=\text{y}$, y , $-\text{x}$, $-\text{x}$, $-\text{y}$, $-\text{y}$, x , x , $\phi_3=\text{y}$, $-\text{y}$, $-\text{x}$, x , $-\text{y}$, y , x , $-\text{x}$, $\phi_5=-\text{x}$, $-\text{x}$, $-\text{y}$, $-\text{y}$, x , x , y , y , $\phi_{11}=-\text{y}$, $-\text{y}$, x , x , y , y , $-\text{x}$, $-\text{x}$, $\phi_{12}=\text{y}$, $\phi_{13}=\text{x}$, $\phi_{14}=\text{x}$, x , $-\text{x}$, $-\text{x}$ und die Empfängerphase $\phi_{31}=\text{x}$, $-\text{x}$, y , $-\text{y}$, $-\text{x}$, x , $-\text{y}$, y . Die relativen Gradientenstärken lauten $G_1=50\%$, $G_2=-80\%$ und $G_3=-30\%$, $G_4=-65\%$, $G_5=0.1013 \cdot G_2$ und $G_6=15\%$, die Gradientenlänge 1 ms. Die Wartezeit Δ wurde mit 2.5 ms, τ_{CP} wird variiert. Zur Aufnahme der Relaxationsdispersionskurve wird n schrittweise erhöht (ganzzahlige Vielfache) und τ_{CP} so verkürzt, dass die Gesamtrelaxationszeit konstant bleibt. Zur Aufnahme des Referenzexperimentes werden die beiden Relaxationsmodule ersatzlos ausgelassen. Die Gesamtrelaxationszeit wird so gewählt, dass die Kreuzsignalintensität im Relaxationsexperiment etwa auf die Hälfte des Wertes des Referenzexperimentes abfällt. Phasensensitivität in der indirekten Dimension ist durch Invertierung von G_2 , Inkrementierung von ϕ_3 , ϕ_4 , ϕ_7 und ϕ_{10} gemeinsam mit ϕ_{31} gemäß Echo-Antiecho [54] erreicht worden. Auf die Darstellung des WATERGATE-Elementes [23] zur Wasserunterdrückung wurde der Einfachheit halber verzichtet.

Die Berechnung der effektiven transversalen Relaxationsrate $R_{2,\text{eff}}^i$ für jeden τ_{CP}^i -Wert erfolgt mit der Gl. (2.1.26):

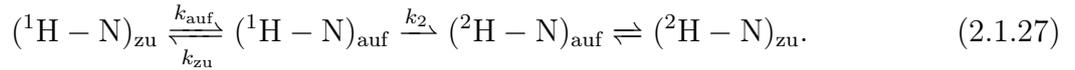
$$R_{2,\text{eff}}^i = \frac{1}{T} \ln \left(\frac{I_0}{I^i} \right), \quad (2.1.26)$$

mit der konstanten Relaxationszeit T (diese berechnet sich aus den beiden Relaxationsintervallen, die n -mal wiederholt werden, s. Abb. 2.11), der Kreuzsignalintensität I^i des i -ten Relaxationsexperimentes und der Kreuzsignalintensität I_0 des Referenzexperimentes. Mit der Auftragung der $R_{2,\text{eff}}^i$ -Werte gegenüber τ_{CP}^i und der Regression der Gl. (2.1.22) an die Messdaten erfolgt die Bestimmung von p_A , p_B , $\Delta\omega$, k_{ex} , R_{2A} und R_{2B} . Die Nutzung von Einquanten-Kohärenzen zur Charakterisierung des Verhaltens der ^{15}N -Relaxationsdispersion [55, 56] ist auch auf Kohärenzordnungen ungleich Eins anwendbar [57, 58]. Das Verfolgen der langsamen Dynamik von Proteinen im Größenmaßstab von 100 kDa mittels CPMG-basierten Relaxationsmethoden konnte von L. E. Kay und Mitarbeitern gezeigt werden [59, 60].

Auch in der Festkörper-NMR haben sich in den letzten Jahren verschiedene Austauschmethoden etabliert [61, 62]. Die Messung der transversalen Relaxationsrate im rotierenden Koordinatensystem, $R_{1\rho}$ [63, 64], stellt eine "dynamische" Methode, die sowohl in der Flüssigkeits- als auch in der Festkörper-NMR anzutreffen ist [65, 66].

Nicht unerwähnt bleiben soll die Linienformanalyse [67] als ein weiteres Beispiel für die Interpretation kinetischer Prozesse auf der μs -bis- ms -Zeitskala. Diese ist im Rahmen dieser Arbeit bei einer Ligand-Bindungsstudie genutzt worden (s. Abschnitt 3.1.4.2 bzw. Abb. A.10 im Anhang A.12.5).

2.1.1.2.3. min-bis-h-Zeitskala Auf der sogenannten Echtzeit-NMR-Zeitskala (rechter Bereich in Abb. 2.2) kommen Experimente zum Einsatz, die, im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Experimenten, strukturelle Änderungen detektieren, die nicht primär während der Dauer des Pulsprogrammes ablaufen. Die zeitliche Änderung der chemischen Verschiebung oder der Intensität im NMR-Spektrum gibt den kinetischen Prozess wieder, den es zu untersuchen gilt. In der Praxis kommen sowohl eindimensionale [68] als auch zweidimensionale [69] Experimente zum Einsatz. Als ein konkretes Beispiel wäre das klassische $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschexperiment zu nennen [70]. Hierbei wird durch die sukzessive Aufnahme von aufeinanderfolgenden NMR-Spektren der Amidprotonenaustausch, der durch die Umpufferung von protoniertem zu deuteriertem Lösungsmittel induziert wird, spektroskopisch verfolgt [71]:



Nur der mit "auf" bezeichnete protonierte Zustand ist zum deuterierten Lösungsmittel austauschfähig [72]. Analog zu dem in Gl. (2.1.15) beschriebenen Zwei-Zustandsaustausch kann nun für Gl. (2.1.27) die Austauschmatrix \mathbf{K} für einen Drei-Zustandsaustausch angegeben werden:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} A(t) \\ B(t) \\ C(t) \end{pmatrix} = \mathbf{K} \begin{pmatrix} A(t) \\ B(t) \\ C(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{\text{auf}} & k_{\text{zu}} & 0 \\ k_{\text{auf}} & -k_{\text{zu}} - k_2 & 0 \\ 0 & k_2 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A(t) \\ B(t) \\ C(t) \end{pmatrix}. \quad (2.1.28)$$

Die zeitabhängigen Zustände $A(t)$, $B(t)$ und $C(t)$ spiegeln hierbei $({}^1\text{H} - \text{N})_{\text{zu}}$, $({}^1\text{H} - \text{N})_{\text{auf}}$ und $({}^2\text{H} - \text{N})_{\text{auf}}$ wider.

Die Berechnung der Eigenwerte der Austauschmatrix \mathbf{K} liefert für dieses Drei-Zustandssystem die Austauschrate k_{ex} (zur Herleitung s. Anhang A.2):

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2) - \sqrt{(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2)^2 - 4k_{\text{auf}}k_2} \right]. \quad (2.1.29)$$

Im NMR-Experiment wird der Proton \rightarrow Deuteron-Austausch durch die zeitliche Intensitätsabnahme der Protonensignale aufgezeichnet. Durch die Anpassung der Gl. (2.1.30) an die Messwerte wird die apparente Austauschrate k_{ex} bestimmt:

$$I = I_0 \exp(-k_{\text{ex}}t). \quad (2.1.30)$$

Folgende Grenzfälle können nun für Gl. (2.1.29) unterschieden werden (zur Herleitung s. Anhang A.3):

1. $k_{zu} \gg k_{auf} \rightarrow k_{ex} = \frac{1}{2} \left(\frac{k_{auf}k_2}{k_{zu}+k_2} \right)$,
2. $k_{zu} \gg k_2 \rightarrow k_{ex} = \frac{1}{2}k_2 \frac{k_{auf}}{k_{zu}} = \frac{1}{2}k_2K \rightarrow SF = K^{-1} \rightarrow \Delta G_{NU}^0 = RT \ln(SF)$,
3. $k_{zu} \ll k_2 \rightarrow k_{ex} = k_2$.

Ein Protein mit sehr hoher Stabilität des nativen Zustandes (o. B. d. A.: $\Delta G_{NU}^0 > 60 \text{ kJmol}^{-1}$) wird durch Fall 1. repräsentiert. Ein H/D-Austausch wird praktisch nicht beobachtet, s. bspw. Abb. 3 in [73].

Der Fall 2. wird in der Literatur mit EX2 beschrieben (k_{ex} ist pH-Wert abhängig, Reaktion zweiter Ordnung).

Der Fall 3. wird als EX1 bezeichnet (k_{ex} ist unabhängig vom pH-Wert, Reaktion erster Ordnung).

Y. W. Bai und Mitarbeiter haben gezeigt, dass sich das Austauschverhalten gefalteter Proteine über einen weiten pH-Bereich unter Annahme der beiden Regimes EX1 und EX2 auswerten lässt [74]. Sind die Messbedingungen so gewählt, dass der Fall EX2 erfüllt wird, lässt sich aus der gemessenen apparenten Rate k_{ex} die Gleichgewichtskonstante K (die inverse Größe wird als Schutzfaktor SF bezeichnet) berechnen. Damit lässt sich ein Wert für die Stabilisierungsenthalpie der Entfaltung ΔG_{NU}^0 angeben [75] (mit der universellen Gaskonstanten R und der verwendeten Temperatur T).

Diese Strategie des EX2-Mechanismus' kam im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der Stabilität der Prolylisomerase *EcSlpA* zum Einsatz (s. Abschnitt 3.1.3.1).

2.1.1.3. Experimente zur Strukturaufklärung

Das Interesse an hochaufgelösten, dreidimensionalen Strukturen von Proteinen schlägt sich vor allem in der Anzahl der veröffentlichten Strukturen in der pdb-Datenbank (*protein data bank*) nieder (s. Abb. 2.12). Neben der NMR-Spektroskopie (Ersteintrag in der pdb-Datenbank im Jahr 1989) trägt auch die Elektronenmikroskopie (Ersteintrag im Jahr 1997) und vor allem die Röntgenkristallographie (Ersteintrag in der pdb-Datenbank überhaupt, im Jahr 1976) zur Gesamtanzahl der publizierten Strukturen bei. Die stark erniedrigte Anzahl der durch NMR-Spektroskopie im Vergleich zur Gesamtanzahl der aufgeklärten und veröffentlichten Strukturen (vgl. Abb. 2.13 mit Abb. 2.12) ist in der Größenlimitation der hochauflösenden NMR-Spektroskopie zu suchen. Durch ausgefeilte Isotopenmarkierungen ist man zwar in der Lage, Proteine in der Größenordnung von 30 kDa für die NMR zugänglich zu gestalten [76]. Im Vergleich zur Größe des Ribosoms ($M \simeq 2.5 \text{ MDa}$), von dem sowohl beide Untereinheiten [77, 78, 79] als auch die Komplexstruktur mit tRNA-Liganden [80] mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt werden konnte, gerät die NMR-Spektroskopie jedoch stark ins Hintertreffen. Misslingt hingegen die für die Röntgenkristallographie notwendige Proteinkristallisation, ist die hochauflösende NMR-Spektroskopie das Mittel der Wahl zur Strukturaufklärung, adäquate Probengröße vorausgesetzt. In den folgenden Abschnitten soll aufgezeigt werden, welche Experimente und Methoden notwendig sind, um eine hochaufgelöste NMR-Struktur zu erhalten.

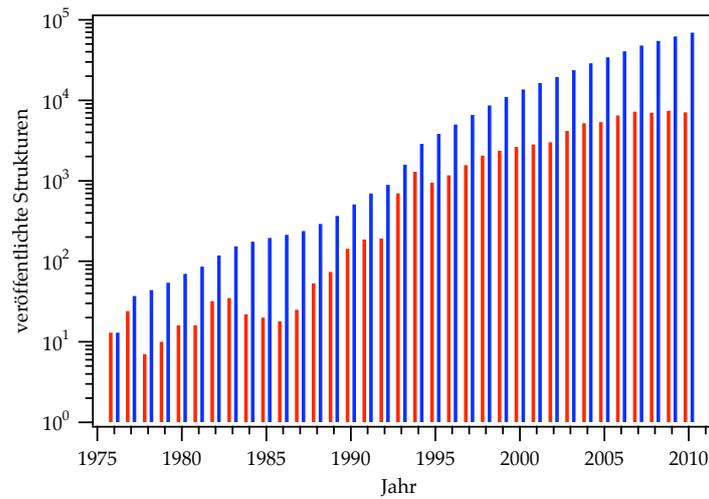


Abb. 2.12.: Unter Nutzung der NMR-Spektroskopie, Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie gelöste Anzahl an dreidimensionalen Strukturen, die in der pdb-Datenbank hinterlegt worden sind (Stand: November 2010). Dargestellt ist die pro Jahr veröffentlichte Anzahl (rot) und die Gesamtanzahl (blau).

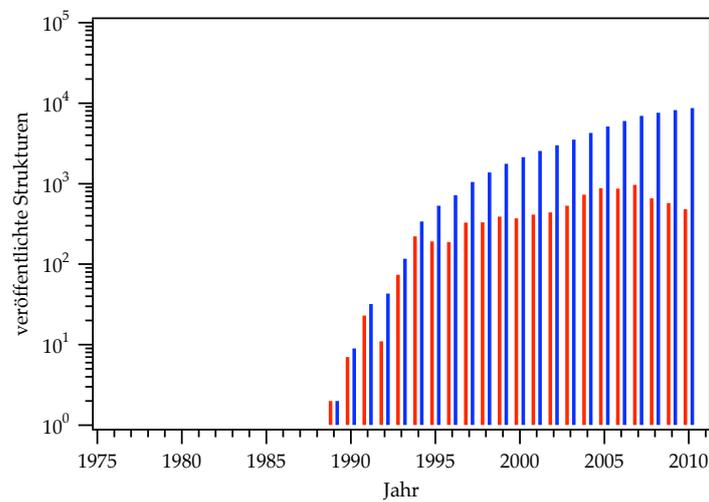


Abb. 2.13.: Unter Nutzung der NMR-Spektroskopie gelöste Anzahl an dreidimensionalen Strukturen, die in der pdb-Datenbank hinterlegt worden sind (Stand: November 2010). Dargestellt ist die pro Jahr veröffentlichte Anzahl (rot) und die Gesamtanzahl (blau).

2.1.1.3.1. Rückgratzuordnung Der entscheidende Parameter bei der Wahl der zur Rückgratzuordnung geeigneten NMR-Experimente ist die Länge der Polypeptidkette, deren Resonanzsignale zugeordnet werden sollen. Bei kleineren Molekülen (etwa bis zu einer Länge von 100 Aminosäuren, je nach spektraler Qualität) liefern Experimente, die Kohärenztransferwege zwischen zwei verschiedenen NMR-aktiven Kerne ausnutzen, ausreichende Ergebnisse. Bei größeren Molekülen versagt diese Methode zusehends, da die spektrale Unterscheidbarkeit zwischen den einzelnen Resonanzsignalen nicht mehr gegeben ist. Es ist auf eine weitere Dimension zurückzugreifen, sogenannte Tripel-Resonanzexperimente kommen in diesen Fällen zum Einsatz.

Die Zuordnung der $^1\text{H}^{\text{N}}$ - und ^{15}N -Resonanzen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des Proteinerückgrates von *EcSlpA* (148 Aminosäuren, s. Abschnitt 3.1.1.1) erfolgte mit Hilfe von Tripel-Resonanzexperimenten, die Kohärenztransferwege vom $^1\text{H}^{\text{N}}$ - über den ^{15}N - bis hin zum $^{13}\text{C}_{\alpha}$ - und $^{13}\text{C}_{\beta}$ -Kern ausnutzen (s. Abb. 2.4). Da die Kopplungsstärken, die über ein oder zwei chemische Bindungen reichen, bekannt sind (s. a. Abb. 2.4), gelingt es, die Kohärenztransferwege zwischen den einzelnen Kernen effizient zu gestalten. Die zur Rückgratzuordnung genutzten Pulssequenzen (*trHNCA*, *trHNCACB*, *trHN(CO)CACB*) [81, 82] folgen in ihrer Notation genau diesen Kohärenztransferwegen.

Das HNCA-Experiment [83, 84] realisiert den Kohärenztransfer vom $^1\text{H}^{\text{N}}$ - über den ^{15}N - zum $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -Kern der eigenen und der Vorgängeraminosäure ($^1\text{J}_{^{15}\text{N}^{13}\text{C}_{\alpha}} \simeq ^2\text{J}_{^{15}\text{N}^{13}\text{C}_{\alpha}}$). Mit diesem Transferweg erhält man eine sequentielle Information innerhalb der Polypeptidkette. Das HNCACB-Experiment [85] liefert zusätzlich zum HNCA-Experiment auch Information über die chemische Verschiebung des $^{13}\text{C}_{\beta}$ -Atoms der eigenen und der Vorgängeraminosäure. Unter Nutzung des HN(CO)CACB-Experimentes [86] gelingt nun, unter Verlust der Konnektivität zur eigenen Aminosäure, die Unterscheidung zwischen den $^{13}\text{C}_{\alpha}$ - und $^{13}\text{C}_{\beta}$ -Resonanzen der eigenen und der Vorgängeraminosäure. Die Tab. A.1 im Anhang A.4 führt die aminosäurespezifischen chemischen Verschiebungen der $^{13}\text{C}_{\alpha}$ - und $^{13}\text{C}_{\beta}$ -Resonanzen einer unstrukturierten Polypeptidkette auf. Diese dienen als Einstieg in die sequentielle Zuordnung.

Bei identischen experimentellen Parametern sinkt mit der Erhöhung der Kohärenztransferwege das Signal-zu-Rausch-Verhältnis beträchtlich. Das HNCACB ist etwa 10fach, das HN(CO)CACB etwa 100fach sensitivitätsschwächer verglichen zum HNCA (s. Abb. 3.2 (a), (b) im Vgl. zur Abb. 3.1 im Abschnitt 3.1.1.1). Das HNCO-Experiment [83, 84], das im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet worden ist, stellt das sensitivste Tripel-Resonanzexperiment dar ($^1\text{J}_{^{15}\text{N}^{13}\text{C}_{\alpha}} < ^1\text{J}_{^{15}\text{N}^{13}\text{C}'}$, s. Abb. 2.4).

2.1.1.3.2. Seitenkettenuordnung Die Zuordnung aller Seitenkettenresonanzen ist die notwendige Bedingung, um zu einer hochaufgelösten NMR-Struktur zu gelangen. Für die Komplettzuordnung der Resonanzen von *EcSlpA* sind das HBHA(CO)NH [87], C(CO)NH-TOCSY [88] und das HCCH-TOCSY [89] genutzt worden. Die durch die Verwendung dieser drei Experimente erfolgte Zuordnung wurde durch den Einsatz von NOESY-editierten ^1H - ^{15}N -/ ^1H - ^{13}C -HSQC-Experimenten [90] überprüft und gegebenenfalls ergänzt.

Mit den genannten Experimenten sind die chemischen Verschiebungen aller in Tab. A.2 im Anhang A.5 aufgeführten aminosäurespezifischen Kerne zuordenbar.

2.1.1.3.3. NOEs Der *Nuclear Overhauser Effect* beruht auf magnetischen Wechselwirkungen zwischen räumlich nahen Kernspins eines Moleküls, das der Brownschen Molekularbewegung unterliegt [91]. Diese Wechselwirkungsart unterscheidet sich fundamental von der skalaren Kopplung, die über chemische Bindungen vermittelt wird. Aufgrund der starken Abstandsabhängigkeit (s. Gl. (2.1.38) in Verbindung mit Gl. (2.1.39), (2.1.40) und Gl. (2.1.10)) ist der NOE der klassische Parameter für die Bestimmung der Sekundär- und der Tertiärstruktur eines Proteins (s. Abschnitt 2.3). Die aus NOESY-Spektren gewonnenen NOEs (Abb. 2.14 zeigt das zugrundeliegende Pulsprogramm) sind sensitiv bis zu einem Abstand r von etwa $r \leq 0.5$ nm. Abgrenzend zu diesem transienten NOE existiert der NOE im Gleichgewicht (*hNOE*). Dieser ist in Abschnitt 2.1.1.2.1 beschrieben worden.

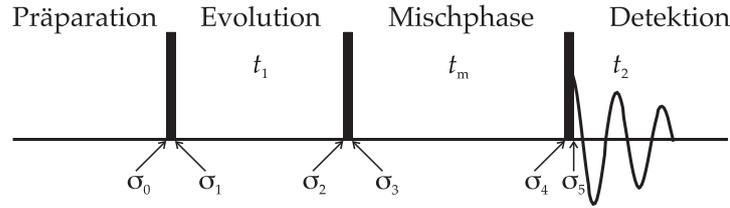


Abb. 2.14.: NOESY-Pulsprogramm zur Aufnahme von intramolekularen Kreuzsignalen [92]. Die Wahl der Länge der Mischzeit t_m ist von entscheidender Bedeutung für den Aufbau des NOEs zwischen Protonen innerhalb des untersuchten Moleküls, s. Abb. 2.15, 2.16. Die jeweilige Größe des Dichteoperators σ_i ist im Text angegeben.

Im folgenden soll das Grundprinzip des NOESY-Experimentes [92] mit Hilfe der Produktoperatoren [93] erläutert werden. Für ein homonukleares Zwei-Spin-System, I_1 und I_2 , das keiner skalaren Kopplung unterliegt, gilt vor dem ersten 90° -Puls:

$$\sigma_0 = I_{1z} + I_{2z}. \quad (2.1.31)$$

Das System wird durch den ersten 90°_x -Puls präpariert:

$$\sigma_1 = -I_{1y} - I_{2y}. \quad (2.1.32)$$

Während der Zeit t_1 entwickelt sich die chemische Verschiebung ω von I_1 und I_2 unter der transversalen Relaxationsrate R_2 :

$$\sigma_2 = [-I_{1y} \cos(\omega_1 t_1) + I_{1x} \sin(\omega_1 t_1)] \exp(-R_2 t_1) + [-I_{2y} \cos(\omega_2 t_1) + I_{2x} \sin(\omega_2 t_1)] \exp(-R_2 t_1). \quad (2.1.33)$$

Der zweite 90°_{-x} -Puls führt zu folgendem Dichteoperator σ_3 vor Beginn der Mischzeit t_m :

$$\sigma_3 = [I_{1z} \cos(\omega_1 t_1) + I_{1x} \sin(\omega_1 t_1)] \exp(-R_2 t_1) + [I_{2z} \cos(\omega_2 t_1) + I_{2x} \sin(\omega_2 t_1)] \exp(-R_2 t_1). \quad (2.1.34)$$

Der Phasenzyklus des Pulsprogrammes in Abb. 2.14 führt zur Unterdrückung der Terme, die während der Mischzeit keinen Beitrag zur longitudinalen Magnetisierung liefern. Mit dieser Überlegung folgt

$$\sigma_3^* = [I_{1z} \cos(\omega_1 t_1) + I_{2z} \cos(\omega_2 t_1)] \exp(-R_2 t_1). \quad (2.1.35)$$

Während der Mischzeit t_m entwickelt sich dieser longitudinale Anteil zu:

$$\begin{aligned}\sigma_4 = & + [I_{1z}a_{11}(t_m) \cos(\omega_1 t_1)] \exp(-R_2 t_1) \\ & + [I_{1z}a_{21}(t_m) \cos(\omega_2 t_1)] \exp(-R_2 t_1) \\ & + [I_{2z}a_{22}(t_m) \cos(\omega_2 t_1)] \exp(-R_2 t_1) \\ & + [I_{2z}a_{12}(t_m) \cos(\omega_1 t_1)] \exp(-R_2 t_1),\end{aligned}\tag{2.1.36}$$

mit den Amplituden a_{ij} , die aus der Lösung der Bewegungsgleichung der longitudinalen Magnetisierungskomponenten (Solomon-Gleichungen) folgen:

$$a_{11}(t_m) = a_{22}(t_m) = \cosh(R_{\text{kreuz}} t_m) \exp(-R_{\text{diag}} t_m),\tag{2.1.37}$$

$$a_{12}(t_m) = a_{21}(t_m) = \sinh(R_{\text{kreuz}} t_m) \exp(-R_{\text{diag}} t_m).\tag{2.1.38}$$

Die Relaxationsrate des Diagonalsignals R_{diag} beträgt:

$$R_{\text{diag}} = \frac{1}{10} d^2 \{J(0) + 3J(\omega) + 6J(2\omega)\},\tag{2.1.39}$$

die Relaxationsrate des Kreuzsignales R_{kreuz} :

$$R_{\text{kreuz}} = \frac{1}{10} d^2 \{J(0) - 6J(2\omega)\},\tag{2.1.40}$$

jeweils mit den in den Gl. (2.1.10) und (2.1.6) definierten Größen d und $J(\omega)$.

Der finale 90_x° -Puls führt zu observablen NMR-Signalen $S^{\cos}(t_1, t_2)$ und $S^{\sin}(t_1, t_2)$, die sich während der Detektionszeit t_2 entwickeln (σ_5 ; auf den Sinusanteil von σ_5 wird hier verzichtet):

$$\begin{aligned}S^{\cos}(t_1, t_2) = & + a_{11}(t_m) \cos(\omega_1 t_1) \exp\{i\omega_1 t_2 - R_2(t_1 + t_2)\} \\ & + a_{21}(t_m) \cos(\omega_2 t_1) \exp\{i\omega_2 t_2 - R_2(t_1 + t_2)\} \\ & + a_{12}(t_m) \cos(\omega_1 t_1) \exp\{i\omega_2 t_2 - R_2(t_1 + t_2)\} \\ & + a_{22}(t_m) \cos(\omega_2 t_1) \exp\{i\omega_1 t_2 - R_2(t_1 + t_2)\}.\end{aligned}\tag{2.1.41}$$

Da sowohl die Diagonal- als auch die Kreuzsignale (s. Gl. (2.1.37), (2.1.38)) von der spektralen Leistungsdichtefunktion $J(\omega)$ (s. Gl. (2.1.6)) abhängen, folgt neben der Mischzeitabhängigkeit eine starke Abhängigkeit des NOEs von dem Abstand r der wechselwirkenden Kernspins ($\text{NOE} \simeq r^{-6}$) und von der Rotationskorrelationszeit τ_c der Molekülbewegung (s. Abb. 2.15, 2.16).

Die longitudinale Magnetisierung kann nicht nur direkt von einem Kernspin auf den anderen übertragen werden, auch über benachbarte Kernspins kann dieser Transport vermittelt werden. Dies wird als Spin-Diffusion bezeichnet [95] und trägt bei längeren Mischzeiten t_m umso stärker zum NOE-Signal bei. Experimentell muss nun ein Kompromiss zwischen der Unterdrückung der Spin-Diffusion und ausreichender NOE-Signalintensität gewählt werden. In der Protein-NMR-Spektroskopie werden Zeiten im Bereich $t_m = (60 \dots 120)$ ms genutzt.

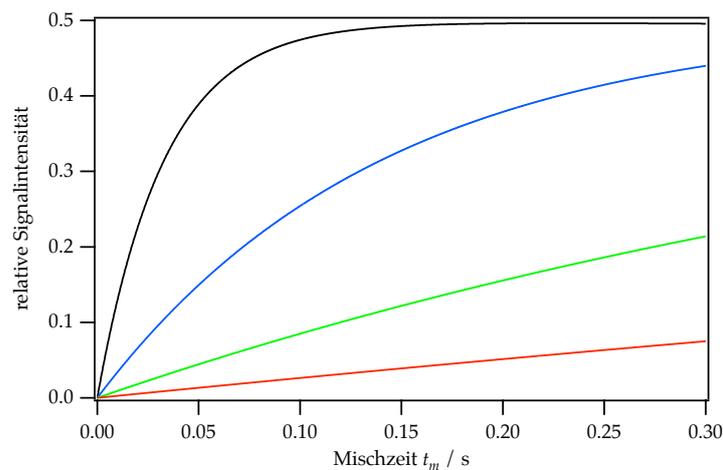


Abb. 2.15.: Starke Amplituden- und Mischzeitabhängigkeit des NOE-Kreuzsignals von dem Abstand r zweier Protonen bei konstanter Rotationskorrelationszeit des Moleküls von $\tau_c = 15 \text{ ns}$. Die Kurven wurden für eine Protonen-Larmorfrequenz von $\omega_L^{1H} = 600 \text{ MHz}$ berechnet. Die Abstände von $r = 2.2 \text{ \AA}$ ($r: H_\alpha-H^N$ (β -Faltblatt), in schwarz), $r = 2.8 \text{ \AA}$ ($r: H^N-H^N$ (α -Helix), in blau), $r = 3.5 \text{ \AA}$ ($r: H_\alpha-H^N$ (α -Helix), in grün) und $r = 4.3 \text{ \AA}$ ($r: H^N-H^N$ (β -Faltblatt), in rot) wurden nach [94] angenommen. Die Relaxation während t_1 ist vernachlässigt worden.

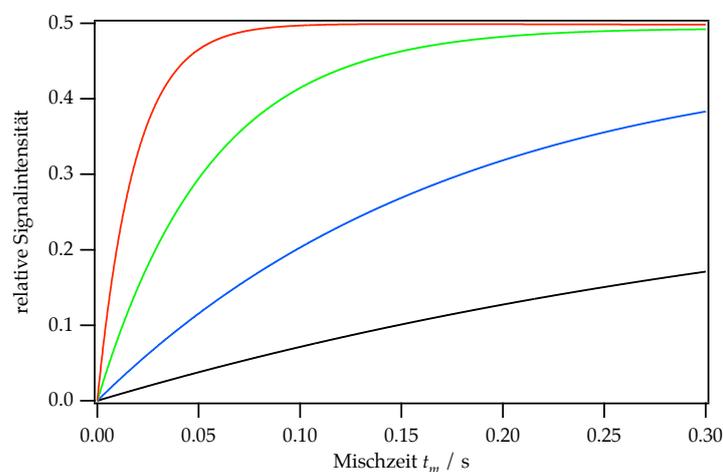


Abb. 2.16.: Starke Amplituden- und Mischzeitabhängigkeit des NOE-Kreuzsignals von der Rotationskorrelationszeit τ_c des Moleküls, bei konstantem Abstand zweier Protonen von $r = 2 \text{ \AA}$. Die Kurven wurden für eine Protonen-Larmorfrequenz von $\omega_L^{1H} = 600 \text{ MHz}$ berechnet. Es sind die Fälle $\tau_c = 1 \text{ ns}$ (in schwarz), $\tau_c = 3 \text{ ns}$ (in blau), $\tau_c = 10 \text{ ns}$ (in grün) und $\tau_c = 30 \text{ ns}$ (in rot) gezeigt. Die Relaxation während t_1 ist vernachlässigt worden.

2.1.1.3.4. Bindungswinkel G. N. Ramachandran und Mitarbeiter konnten 1963 zeigen, dass die beiden dihedralen Winkel ϕ und ψ des Proteinrückgrates (s. Abb. 2.17) sehr gut die lokale Geometrie des untersuchten Moleküls definieren [96]. Die (ϕ, ψ) -Paare können im Ramachandran-Plot aufgetragen werden. Je nach Sekundärstrukturelement der dem (ϕ, ψ) -Paar zugrunde liegenden Aminosäure bilden diese Paare charakteristische Bereiche im Ramachandran-Plot aus. Die chemischen Verschiebungen der Rückgratatome H_α , C_α , C_β , C' und N sind ihrerseits auch sensitiv für die lokale Rückgratgeometrie [97, 98] und können somit für die dihedrale Information herangezogen werden [99, 100]. Das für die Strukturaufklärung von *EcSlpA* verwendete Programm TALOS, *torsion angle likelihood obtained from shifts and sequence similarity* [101], trifft eine Strukturvorhersage unter Nutzung von bekannten chemischen Verschiebungen der H_α -, C_α -, C_β -, C' - und N-Atome und den dazugehörigen Sekundärstrukturelementen. Die erste veröffentlichte Version von TALOS [101] basiert auf 20 hochaufgelösten Röntgenstrukturen. Die aktuellste Version (TALOS+, [102]) arbeitet mit einem neuronalen Netzwerkalgorithmus und basiert auf 200 bekannten Proteinstrukturen.

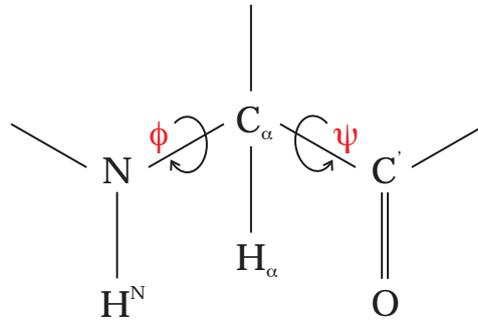


Abb. 2.17.: Definition der beiden dihedralen Winkel ϕ und ψ im Proteinrückgrat. Beide Winkel sind sensitiv für die lokale Molekülgeometrie und können damit zur Sekundärstrukturbestimmung herangezogen werden.

2.1.1.3.5. Dipolare Kopplung (Residual dipolar coupling, RDC) Neben dem NOE-Effekt und der Information über die dihedralen Winkel ϕ und ψ stellen die sogenannten dipolaren Restkopplungen, RDCs, eine weitere Möglichkeit dar, Strukturinformationen unter Nutzung der NMR-Spektroskopie zu gewinnen. Da die Information über die Stärke der dipolaren Kopplung in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie im allgemeinen nicht zur Verfügung steht, ist es durch Nutzung von Phagen, Gelen, Bicellen oder anderen Medien möglich, einen definierten Ausrichtungsgrad des Bindungsvektors von zwei Kernen gegenüber dem äußeren statischen Magnetfeld zu erreichen (s. Abb. 2.18). Diese Ausrichtung wird als dipolare Restkopplung bezeichnet und ist spektroskopisch zugänglich.

Die dipolare Restkopplung zweier wechselwirkender Kerne P und Q besitzt folgende

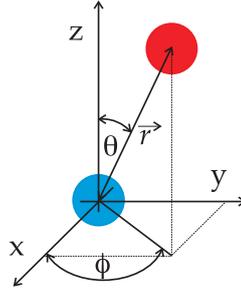


Abb. 2.18.: Definition der dipolaren Restkopplung anhand des Amidprotonenvektors \vec{r} , der die chemische Bindung zwischen dem $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kern (in rot) und dem ^{15}N -Kern (in blau) repräsentiert. Dieser Vektor ist mit den beiden Polarwinkeln ϕ und θ gegenüber dem äußeren Feld B_0 (in z-Richtung orientiert) ausgerichtet.

Größe [103]:

$$\text{RDC}_{\text{P,Q}(\theta,\phi)} = D_{\text{P,Q}}^{\text{max}} \left\{ \frac{1}{2} D_{\text{a}} (3 \cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{4} R \sin^2 \theta \cos(2\phi) \right\} \quad (2.1.42)$$

$$\text{mit: } D_{\text{P,Q}}^{\text{max}} = -\frac{\mu_0 \hbar}{4\pi^2} \gamma_{\text{P}} \gamma_{\text{Q}} \langle r_{\text{PQ}}^{-3} \rangle,$$

mit der Rhombizität R und der Magnitude D_{a} des Ausrichtungstensors D , der magnetischen Suszeptibilität μ_0 , den Polarwinkeln θ und ϕ , den gyromagnetischen Verhältnissen γ_i der an der Bindung beteiligten Kerne, dem Abstand r_{PQ} beider Kerne und der Planck-Konstanten \hbar . Dabei spiegeln R und D_{a} eine globale Molekülinformation, den sogenannten Ausrichtungstensor, wider. Dieser setzt sich aus mehreren individuellen Bindungsvektoren \vec{r}_i zusammen.

G. M. Clore und Mitarbeiter konnten 1998 zeigen, dass Rhombizität R und Magnitude D_{a} des Ausrichtungstensors in folgenden Beziehungen zu den Hauptachsenelementen D_{xx} , D_{yy} , D_{zz} des Ausrichtungstensors D stehen [104]:

$$\begin{aligned} D_{\text{xx}} &= -D_{\text{a}}(1 - 1.5R), \\ D_{\text{yy}} &= -D_{\text{a}}(1 + 1.5R), \\ D_{\text{zz}} &= 2D_{\text{a}}. \end{aligned}$$

Experimentell werden die RDC-Werte eines Bindungsvektors bestimmt, indem man zuerst (unter isotropen Bedingungen) die skalare Kopplung, die zwischen den beiden Kernen existiert, misst, Fall (a). Danach wird durch Ausrichtung der Probe (unter anisotropen Bedingungen) die Kopplung gemessen, die sich nun aus dem skalaren und dem residualen dipolaren Anteil additiv zusammensetzt, Fall (b). Durch Differenzbildung der gemessenen Kopplung aus (b) und (a) ergibt sich die residuale dipolare Kopplung des interessierenden Bindungsvektors. Im Rahmen dieser Arbeit ist die dipolare Restkopplung der Rückgratamide von *EcSlpA* in der ^{15}N -Dimension mittels ^1H - ^{15}N -IPAP-HSQC-Spektren (IPAP: Inphase/Antiphase) bestimmt worden [105]. Ein Ausschnitt dieser Spektren ist für Fall (a) und (b) in Abb. A.1 im Anhang A.6 gezeigt.

Die einfachste Methode, um RDC-Daten in eine Strukturrechnung einfließen zu lassen, besteht darin, die berechnete Orientierung der Bindungsvektoren an die gemessenen RDC-Werte anzupassen [104] (s. Abb. A.4 im Anhang A.10).

2.1.1.4. Diffusionsexperimente

Eine Vielzahl von Prozessen in der Physik, Chemie und auch in der Biologie unterliegen der Diffusion. Die Ursache der Diffusion ist in der thermischen Bewegung jedes einzelnen Teilchens zu suchen. Diese verursacht auch ohne Einwirkung von äußeren Kräften eine Ortstveränderung jedes dieser Teilchen.

Die experimentelle Verfolgung von thermischer (oder auch Brownscher) Bewegung stellt eine Möglichkeit dar, den Diffusionskoeffizienten D der Translation zu bestimmen. Da dieser unter anderem von der Form, der Ladung, der Masse und auch von der Tertiär- bzw. Quartärstruktur des untersuchten Proteins abhängt und diese Größen nicht in den Hamiltonoperatoren der Kernspins enthalten sind, ist der Diffusionskoeffizient ein quantitativer Parameter, das Protein global zu charakterisieren. Die NMR-Spektroskopie stellt mit der Verwendung von gepulsten Feldgradienten [106, 107, 108] eine Methode bereit, den Diffusionskoeffizienten der Translation experimentell zu bestimmen (s. Abb. 2.21 im Vgl. zur Abb. 2.20). Im Rahmen dieser Arbeit kamen stimulierte Echoexperimente [109] mit bipolaren Gradienten [110] zum Einsatz (s. Abb. 2.19).

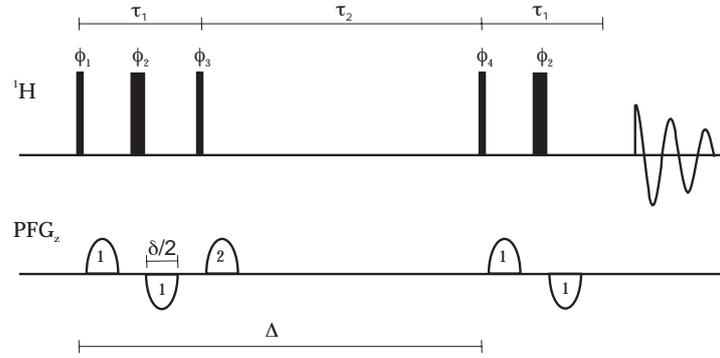


Abb. 2.19.: Verwendete Pulssequenz zur Messung der Translationsdiffusion D eines Proteins. Schmale bzw. breite Rechtecke stellen 90° - bzw. 180° -Pulse dar. Die Phasen der einzelnen Pulse lauten: $\phi_1=x$, $\phi_2=4x$, $\phi_3=8x$, $\phi_4=x, y, -x, -y$ und die Empfängerphase $\phi_{31}=2(x, y, -x, -y), 2(-x, -y, x, y)$. Die Diffusionszeit beträgt Δ , die Gradientenlänge der De- bzw. Rephasierung δ . Die Gradientenstärke G_1 wurde für die Messung einzelner Protonenspektren variiert, $G_2 = -17.13\%$ (Spoilgradient). Auf die Darstellung der Vorsättigung und des WATERGATE-Elementes [23] zur Wasserunterdrückung wurde der Einfachheit halber verzichtet.

Die Anwendung von gepulsten Feldgradienten führt zur Ortsabhängigkeit der Larmorfrequenz ω_{eff} jedes einzelnen Kernspins:

$$\omega_{\text{eff}}(p, z) = p\gamma \{B_0 + (Gz)\} = p \{\omega_0 + \gamma(Gz)\}, \quad (2.1.43)$$

mit der Kohärenzordnung p , der Ortskoordinate in z -Richtung (Gradientenrichtung), dem gyromagnetischen Verhältnis γ , der verwendeten (statischen) magnetischen Flussdichte B_0 und der Gradientenstärke G . Damit einhergehend wird die Phaseninformation ϕ_{eff} jedes einzelnen Kernspins auch zeitabhängig,

$$\phi_{\text{eff}}(t) = \omega_0 t + \gamma \int_0^t G(t') z(t') dt'. \quad (2.1.44)$$

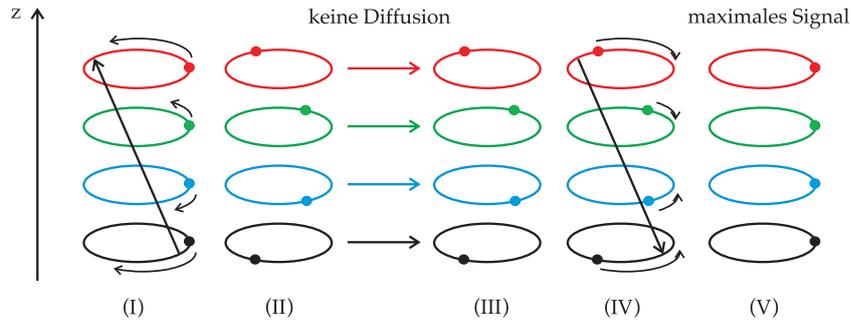


Abb. 2.20.: Die in vier verschiedenen Schichten angeordneten Kernspins (roter, grüner, blauer bzw. schwarzer offener Kreis) erfahren durch den Gradienten in z-Richtung (schwarzer Pfeil, (I)) eine Dephasierung ((I) → (II)). Da in diesem Schema keine Translationsdiffusionsbewegung in Gradientenrichtung angenommen wird ((II) → (III)), werden durch die Invertierung des z-Gradienten alle Kernspins rephasieren ((IV)) und stehen somit zur Signalaufnahme bereit (V). Nach [111].

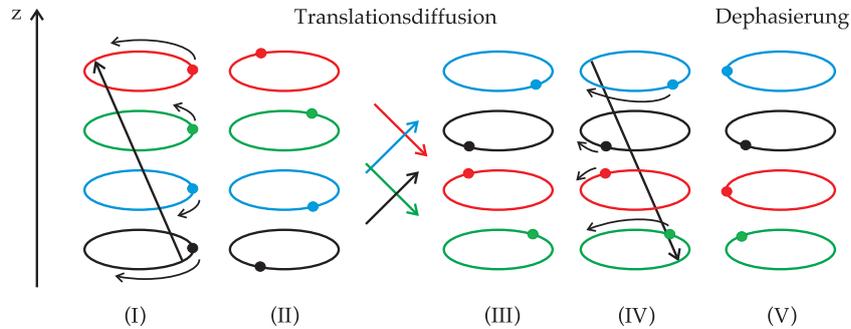


Abb. 2.21.: Im Gegensatz zur Abb. 2.20 wird hier eine Translationsdiffusionsbewegung der Kernspins in Gradientenrichtung angenommen ((II) → (III)), die trotz erfolgter Gradienteninvertierung (IV) zur Dephasierung des Signals beiträgt (V). Nach [111].

Experimentell wird die Gradientenstärke G variiert und eine geeignete Diffusionszeit Δ und Gradientenlänge δ gewählt, sodass eine Signalabnahme von etwa 90 % bei höchster verwendeter Gradientenstärke erreicht wird.

J. E. Tanner hat 1970 für ein stimulierte Echo-Experiment folgende Abhängigkeit des NMR-Signals S von der Gradientenstärke G gezeigt [109]:

$$S(G) = S(0) \underbrace{\exp \left[- \left(\frac{2\tau_1}{T_2} \right) - \left(\frac{\tau_2}{T_1} \right) \right]}_{\text{Relaxationsverlust}} \underbrace{\exp \left[-\gamma^2 G^2 \delta^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right]}_{\text{Diffusionsterm}}. \quad (2.1.45)$$

Aus Gl. (2.1.45) ist ersichtlich, dass bei Molekülen mit kurzen Relaxationszeiten der Signalverlust, der durch Relaxation hervorgerufen wird, unbedingt beachtet werden muss. Da im Rahmen dieser Arbeit Absolutmessungen des Diffusionskoeffizienten vorgenommen wurden und keine internen Referenzmoleküle (wie bspw. in [112] beschrieben) zum Einsatz kamen, muss auf eine exakte Kenntnis der verwendeten Gradientenstärken geachtet werden. Für jeden genutzten Probenkopf ist somit für die Gradientenspulen eine

Kalibrierung vorzunehmen [113].

Bei dieser Gradientenkalibrierung wird eine Pulssequenz genutzt, die auch während der Datenaufnahme mit einer von Null verschiedenen Gradientenstärke arbeitet. Dadurch erhält man im NMR-Spektrum ein spektrales Abbild von der für die Kalibrierung verwendeten Probe. Mit bekannter Abmessung der Probe läßt sich die verwendete absolute Gradientenstärke berechnen [114]:

$$G_z = \frac{\Delta\omega}{\gamma\Delta z}, \quad (2.1.46)$$

dabei ist G_z die für das Experiment verwendete absolute Gradientenstärke in z-Richtung, $\Delta\omega$ der spektrale Bereich, der für die verwendete Probe eine Signalintensität zeigt, γ das gyromagnetische Verhältnis des in der Probe enthaltenen und für die Datenaufnahme ursächlichen NMR-aktiven Kernes und Δz die Länge der Probe in Gradientenrichtung. Die Abb. 2.22 zeigt solch eine Kalibrierkurve. Mittels Extrapolation ergibt sich aus dieser eine maximal zur Verfügung stehende Gradientenstärke von $G_z^{\max} = (0.55 \pm 0.01) \text{ Tm}^{-1}$ (mit einem verwendetem $\Delta z = (2.00 \pm 0.01) \text{ mm}$).

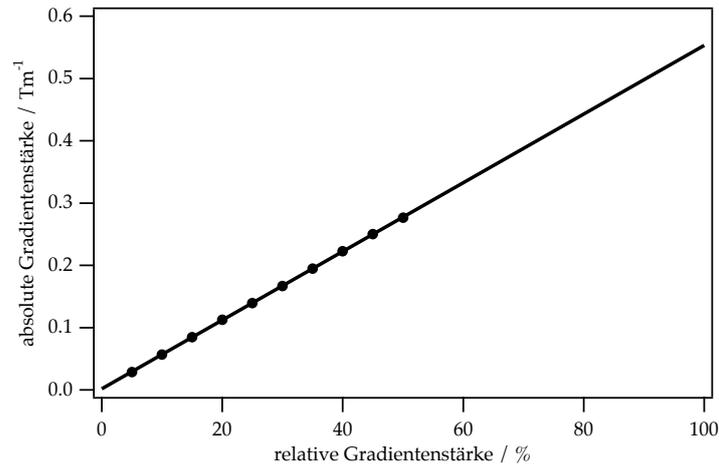


Abb. 2.22.: Kalibrierkurve für die Bestimmung der absoluten Gradientenstärke G_z eines Flüssigkeitsprobenkopfes. Die Abzissenwerte geben die für das Kalibrierexperiment verwendeten relativen Gradientenstärken an. Die Werte der Ordinate spiegeln die absoluten Gradientenstärken wider, die mit Gl. (2.1.46) berechnet worden sind.

Mit dem gemessenen Diffusionskoeffizienten D und mit bekannter Viskosität η des verwendeten Lösungsmittels erhält man nun Zugang zum hydrodynamischen Radius r_H [115]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H}, \quad (2.1.47)$$

mit der Boltzmann-Konstante k_B und der absoluten Temperatur T . Die Größe r_H entspricht dem Radius einer hypothetisch angenommenen Kugel, die dieselben Diffusionseigenschaften besitzt wie das untersuchte Molekül. D. K. Wilkins und Mitarbeiter haben gezeigt, dass zwischen der Größe eines nativen bzw. entfalteten Proteins und dessen

hydrodynamischen Radius' folgender quantitativer Zusammenhang existiert [116]:

$$r_{\text{H}}^{\text{n}} = (4.75 \pm 1.11)N^{0.29 \pm 0.02}, \quad (2.1.48)$$

$$r_{\text{H}}^{\text{u}} = (2.21 \pm 1.07)N^{0.57 \pm 0.02}. \quad (2.1.49)$$

Dabei entspricht r_{H}^{n} dem hydrodynamischen Radius (in Angström) eines Proteins mit N Aminosäuren unter Nativbedingungen, r_{H}^{u} dem unter Kompletzentfaltungsbedingungen.

2.1.1.5. Temperaturübergänge

Die thermodynamische Stabilität von Proteinen ist durch die Differenz der freien Enthalpie ΔG zwischen nativer Struktur und entfalteter Polypeptidkette definiert (s. a. ΔG_{AB} in Abb. 2.3). Die freie Enthalpie dG (eine absolute Größe) ist durch die Gibbs'sche Fundamentalgleichung der Thermodynamik gegeben:

$$dG(T, p, N) = -SdT + Vdp + \mu dN, \quad (2.1.50)$$

mit der Entropie S , der Temperatur T , dem Volumen V , dem Druck p , dem chemischen Potential μ und der Stoffmenge N . Wird Gl. (2.1.50) auf die Proteinfaltung zwischen dem nativen, N , und dem entfalteten Zustand, U , angewendet (in Abb. 2.3 entspricht N dem Zustand A und U dem Zustand B), folgt die freie Standardenthalpie ΔG^0 :

$$\Delta G^0 = -\Delta S^0 dT + \Delta V^0 dp + m d[D], \quad (2.1.51)$$

mit der Differenz der Entropie ΔS^0 und des Volumens ΔV^0 zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand, mit der Kooperativität m des Überganges zwischen N und U und der Konzentration des chemischen Denaturierungsmittels $[D]$.

Die Stabilität des nativen Zustandes N von Proteinen kann nun durch die Änderung der freien Enthalpie ΔG während einer Entfaltungsreaktion bestimmt werden:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K, \quad (2.1.52)$$

mit der universellen Gaskonstanten R , der Temperatur T und der Gleichgewichtskonstanten K (siehe auch Abschnitt 2.1.1.2.3). Unter Gleichgewichtsbedingungen ist die Änderung der freien Enthalpie $\Delta G = 0$. Somit gilt für alle Messungen, die im Gleichgewicht erfolgen, für die freie Standardenthalpie:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K. \quad (2.1.53)$$

Aus Gl. (2.1.51) ist ersichtlich, dass durch die Änderung des Druckes p (mechanisch), der Temperatur T (thermisch) oder der Konzentration des Denaturierungsmittels $[D]$ (chemisch) die freie Standardenthalpie ΔG^0 von Proteinen bestimmt werden kann.

Mit Hilfe von Fluoreszenz-, Absorptions- oder auch Circular dichroismusspektroskopie werden vor allem durch Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid induzierte Entfaltungsvorgänge untersucht, um die freie Standardenthalpie ΔG^0 zu bestimmen. Unter Nutzung von thermischen Entfaltungen erhält man zusätzlich zur freien Standardenthalpie ΔG^0

Zugang zum ΔH^0 -Wert (van't-Hoff-Enthalpie im Übergangsmittelpunkt) und zur spezifischen Wärme ΔC_P [117]:

$$\Delta G^0(T) = \Delta H^0(T_m) \left(\frac{T_m - T}{T_m} \right) - \Delta C_P \left[T_m - T + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right], \quad (2.1.54)$$

mit der Temperatur T_m im Übergangsmittelpunkt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung von ΔG^0 , $\Delta H^0(T_m)$ und ΔC_P unterschiedlicher *EcSlpA*-Varianten durch Temperaturentfaltung und ihrer Detektion unter Nutzung der NMR-Spektroskopie (s. Abschnitt 3.1.3.2).

2.1.1.6. Bindungsstudien

Das große Potential der hochauflösenden NMR-Spektroskopie kommt stark bei Bindungsstudien zum Ausdruck. Proteininteraktionen mit verschiedenartigen Liganden, wie es Peptide, DNA, RNA oder auch Metallionen sein können, sind NMR-spektroskopisch zugänglich und auch strukturell charakterisierbar [118, 119]. Veränderungen sowohl in den Werten der chemischen Verschiebung als auch in der Linienbreite oder der Intensität der Resonanzsignale des detektierten Proteins stellen bei Ligandenzugabe Parameter dar, um die (möglichen) Bindestellen zu lokalisieren.

Anlehnend an die Gl. (2.1.11) (Reaktion erster Ordnung), kann für eine Protein-Ligand-Bindungsstudie als einfachstes Modell ein Austauschschema zweiter Ordnung angenommen werden:



mit dem Protein P und dem Liganden L. Die Ligandenassoziation wird mit der Rate k_{ass} , die der Ligandendissoziation mit k_{diss} beschrieben. Die Rate des chemischen Austausches (vgl. Gl. (2.1.12) für Reaktion erster Ordnung) wird durch

$$k_{\text{ex}} = [L]k_{\text{ass}} + k_{\text{diss}}, \quad (2.1.56)$$

mit der Konzentration [L] des Liganden, definiert. Analog zu Gl. (2.1.19) wird die Zeitskala des Austausches zwischen dem freien Protein P und dem Protein-Ligand-Komplex PL charakterisiert (langsam, intermediär, schnell).

Verändern sich aufgrund der Bindung des Liganden an das Protein dessen chemische Verschiebungen, besteht im Verfolgen der chemischen Verschiebungen der Proteinsignale mit ansteigender Ligandenkonzentration eine Möglichkeit, die Bindung zu charakterisieren. Die bekannte Zuordnung der Resonanzsignale des Proteins kann somit einfach von einem zum nächsten Titrationsschritt übernommen werden (Grenzfall des schnellen chemischen Austausches zwischen P und PL; Linienbreite unbeeinflusst, s. a. Abb. 2.10 (d)). Oft erfolgt dies in gut aufgelösten ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren. Durch die Verwendung einer ^{15}N -markierten Proteinprobe und der Titration eines unmarkierten Liganden kann damit die Bindestelle am Protein aminosäurespezifisch aufgeklärt werden. Für die quantitative Auswertung der Bindung wird die gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung $\Delta\omega^{\text{all}}$ jeder einzelnen Aminosäure berechnet [120]:

$$\Delta\omega^{\text{all}} = \sqrt{\frac{(\Delta^1\text{H})^2 + 1/25(\Delta^{15}\text{N})^2}{2}}, \quad (2.1.57)$$

mit der Änderung der jeweiligen chemischen Verschiebungen der ^1H - und ^{15}N - Resonanzen, $\Delta^1\text{H}$ und $\Delta^{15}\text{N}$. Wird nun die gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung $\Delta\omega^{\text{all}}$ in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration $[\text{L}]$ während des Titrationsexperimentes berechnet, kann die Stöchiometrie n und die Dissoziationskonstante K_{D} der Bindung bestimmt werden (es gilt die Annahme einer Bindestelle):

$$\Delta\omega^{\text{all}}([\text{L}]) = -\Delta\omega_{\text{m}} \frac{(B + n[\text{L}] + K_{\text{D}})^2 - B - n[\text{L}] - K_{\text{D}} + 4n[\text{L}]\sqrt{B}}{2B} \quad (2.1.58)$$

mit: $B = \frac{[\text{P}]^0 - [\text{L}]}{[\text{L}]^0}$.

Dabei stellen $\Delta\omega_{\text{m}}$ das Maximum von $\Delta\omega^{\text{all}}$, $[\text{P}]^0$ die Startkonzentration des Proteins und $[\text{L}]^0$ die Stammkonzentration des titrierten Liganden dar. Nur die Angabe der

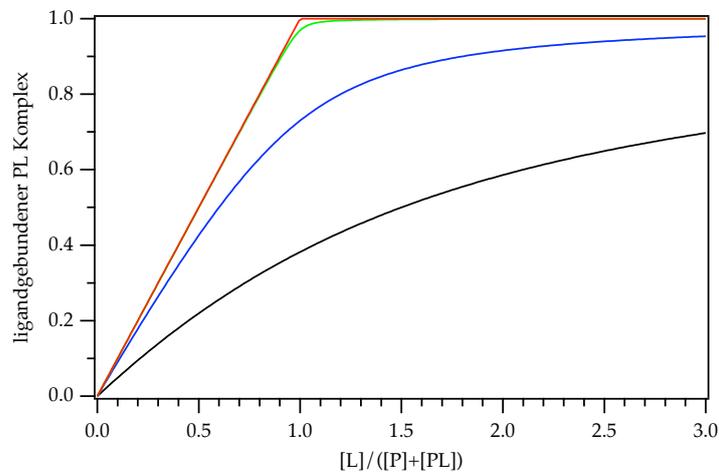


Abb. 2.23.: Abhängigkeit der Bildung des Protein-Ligand-Komplexes PL von dem Konzentrationsverhältnis Ligand-zu-Protein mit einer angenommenen Stöchiometrie von $n = 1$. Alle Kurven wurden mit einer Proteinkonzentration von $c^{\text{Prot}} = 0.5 \text{ mM}$ berechnet. Die Dissoziationskonstante K_{D} der Bindung ist mit $K_{\text{D}} = 1 \text{ mM}$ (in schwarz), $K_{\text{D}} = 0.1 \text{ mM}$ (in blau), $K_{\text{D}} = 1 \mu\text{M}$ (in grün) und $K_{\text{D}} = 1 \text{ nM}$ (in rot) angenommen worden. Die Dissoziationskonstante hochaffiner Bindungen im nanomolaren Bereich ist mit der Verwendung von NMR-typischen Konzentrationen nicht quantifizierbar.

$\Delta\omega^{\text{all}}$ -Werte aus einer NMR-Titration ist im allgemeinen nicht hinreichend für eine Bindungsaussage des Liganden an das Protein. Demgegenüber kann die Existenz oder Nichtexistenz von intermolekularen NOEs zwischen dem Protein und dem Liganden [121] eindeutig unterscheiden, ob die Änderung der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale des Proteins durch Bindung des Liganden verursacht worden ist oder ob es sich "nur" um eine Konformationsänderung handelt, die eine Änderung der chemischen Verschiebung hervorruft, aufgrund von Bindung des Liganden an einer anderen Position der Proteinstruktur.

Im Grenzfall des langsamen chemischen Austausches zwischen P und PL (chemische Verschiebungen der Proteinresonanzen von P ändern sich bei deren gleichzeitiger Intensitätsabnahme mit ansteigender Ligandenkonzentration nicht; Intensitätszunahme der Resonanzsignale von PL mit ansteigender Ligandenkonzentration bei konstanten chemischen

Verschiebungen; Linienbreite der Resonanzsignale unbeeinflusst, s. a. Abb. 2.10 (a)) kann die Zuordnung der Proteinresonanzen während der NMR-Titration nicht übernommen werden. Hierfür sind erneute Zuordnungsexperimente für den PL-Komplex notwendig (s. Abschnitt 2.1.1.3.1). Trotz fehlender Zuordnung der Resonanzsignale des PL-Komplexes kann die (mögliche) Bindung dennoch durch den Signalverlust der Resonanzsignale des freien Proteins charakterisiert werden. Eine belastbare quantitative Angabe der Dissoziationskonstante der Bindung ist für diesen Fall jedoch schwierig.

Eine starke Verbreiterung der Resonanzsignale von P einschließlich deren Verschwinden mit ansteigender Ligandenkonzentration kennzeichnet den intermediären Austausch zwischen P und PL (s. Abb. 2.10 (c)). Die Ligandenbindung kann in diesem Fall nur rein qualitativ ausgewertet werden.

Da relativ hohe Proteinkonzentrationen für die NMR-Spektroskopie notwendig sind, können hochaffine Bindungen schwer quantifiziert werden (s. Abb. 2.23 und [122]). Auf der anderen Seite sind aber durch diese hohen verwendeten Proteinkonzentrationen Bindungen sichtbar und damit auch quantifizierbar, die bspw. durch Fluoreszenzspektroskopie oder biochemische Nachweisreaktionen nicht zugänglich sind.

2.1.2. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie detektiert ausgesendete elektromagnetische Strahlung eines Moleküls, das durch Absorption eines Photons vom Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt worden ist. Die Emission der Strahlung erfolgt auf der ns-Zeitskala. Zur weiteren Erklärung sei hier auf das Jablonski-Diagramm (Erklärung sämtlicher Desaktivierungsprozesse des angeregten Moleküls) und den Franck-Condon-Faktor (Anregung der Fluorophore) verwiesen [7]. Im Vergleich zur NMR-Spektroskopie stellt die Fluoreszenzspektroskopie eine sensitivere Meßmethode dar. Probenkonzentrationen im hohen nanomolaren Bereich sind für die Detektion ausreichend.

Unter Nutzung der intrinsischen Fluoreszenz von *TtSlyD* und von *EcSlyD** (Tyrosin-fluoreszenz) sind sowohl im Gleichgewicht als auch zeitaufgelöst Bindeaffinitäten bestimmt worden (s. Abschnitt 3.2.1.2). Als Liganden sind auf der einen Seite Tat-Peptide (s. Abschnitt 2.5.3) und auf der anderen Seite die beiden Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseinhibitoren FK506 und Rapamycin (s. Abschnitt 2.5.4) genutzt worden.

2.1.2.1. Gleichgewichtsdetektion

Alle Gleichgewichtsmessungen erfolgten an einem JASCO FP-6500 Fluorimeter. Die Temperatur der Probe ist durch ein die Messküvette umgebendes Wasserbad geregelt und durch ständiges Rühren der Probenlösung konstant gehalten worden. Die Probenanregung erfolgte mit elektromagnetischer Strahlung von $\lambda = 280$ nm, die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes bei einer Wellenlänge von $\lambda = 324$ nm. Vor der quantitativen Datenauswertung sind die Messdaten um das Hintergrundsignal des Puffers zu korrigieren. Die durch Ligandenbindung verursachte Fluoreszenzänderung F beträgt:

$$F(c) = q \frac{p + nc + K_D - \sqrt{(p + nc + K_D)^2 - 4npc}}{2p}, \quad (2.1.59)$$

mit der maximalen Fluoreszenzänderung q , der Konzentration p des detektierten Moleküls, der Konzentration c des Liganden, der Stöchiometrie n und der Dissoziationskonstanten K_D der Bindung. Durch Regression der Gl. (2.1.59) an die pufferkorrigierten Messdaten erfolgte die Bestimmung von K_D und n .

2.1.2.2. Zeitaufgelöste Detektion

Die Kinetik der Ligandenbindung kann mit einer *stopped-flow*-Apparatur bestimmt werden, deren Messprinzip 1940 von B. Chance entwickelt wurde [123]. Durch pneumatisch betriebene Spritzen werden zwei Messlösungen A und B rasch in eine Mischkammer gegeben und dort miteinander vermischt. Danach gelangt die gemischte Lösung AB über die Beobachtungsküvette in die Stoppspritze. Der in der Beobachtungsspritze zeitlich ablaufende Bindeprozess zwischen A und B wird über einen Detektor erfasst. Für Reaktionen pseudo-erster Ordnung (starker Ligandenüberschuss gegenüber dem Empfängermolekül, [124]) gilt für die emittierte Fluoreszenzintensität I :

$$I = I_0 \exp(-k_{\text{app}}t), \quad (2.1.60)$$

mit der initialen Fluoreszenzintensität I_0 , der apparanten Reaktionsrate k_{app} und der Detektionszeit t .

Die Inhibierungsexperimente von *TtSlyD* und *TtSlyD* Δ IF durch FK506 und Rapamycin sind temperaturabhängig aufgenommen worden (s. Abschnitt 3.2.1.2). Die daraus ermittelten apparanten Reaktionsraten k_{app} sind mit einer Arrheniusabhängigkeit beschrieben worden, um Aussagen über die Aktivierungsenergie E_A der Inhibierung zu erhalten:

$$k_{\text{app}} = k_{\text{app}}^0 \exp\left(-\frac{E_A}{k_B T}\right), \quad (2.1.61)$$

mit der Boltzmann-Konstante k_B , der absoluten Temperatur T und dem Schnittpunkt mit der Ordinate k_{app}^0 ($T \rightarrow \infty$).

Wird der Fluoreszenzverlauf aus Gl. (2.1.60) mit einer variierenden Ligandenkonzentration gemessen, können Aussagen über das Assoziations- und das Dissoziationsverhalten der Ligandenbindung getroffen werden. Aus der graphischen Auftragung der apparanten Reaktionsrate k_{app} über die Ligandenkonzentration und deren linearen Regression, erhält man Zugang zur Dissoziationsrate k_{diss} (Schnittpunkt mit der Ordinate) und der Assoziationsrate k_{ass} (Anstieg der Regressionsgeraden). Der Quotient aus beiden Raten, $k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$, stellt die Dissoziationskonstante K_D der kinetischen Messung dar (Annahme einer Reaktion pseudo-erster Ordnung, $k_{\text{ass}} \gg k_{\text{diss}}$) und sollte mit demjenigen K_D -Wert aus den Gleichgewichtsmessungen übereinstimmen.

2.1.3. Absorptionsspektroskopie

Im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie wird bei der Absorptionsspektroskopie die Probe mit weißem Licht bestrahlt. Das durch die Probe transmittierte Licht wird nachfolgend unter Nutzung eines Monochromators und Detektors spektral untersucht, sodass die Strahlungsintensität als Funktion der Wellenlänge aufgezeichnet wird [7].

Die transmittierte Strahlungsintensität I nimmt mit steigender Probendicke d exponentiell ab:

$$I = I_0 \exp(-\alpha d), \quad (2.1.62)$$

mit der Eintrittsintensität I_0 und dem Absorptionskoeffizienten α der untersuchten Probe.

Da der Absorptionskoeffizient α durch $\alpha = \epsilon c$ ausgedrückt werden kann (mit dem (wellenabhängigen) Exktinktionskoeffizienten ϵ und der Konzentration c der Probe) gelangt man zur Extinktion E (Gesetz nach Lambert-Beer):

$$E = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon cd. \quad (2.1.63)$$

Im Rahmen dieser Arbeit sind sämtliche Probenkonzentrationen unter Nutzung der Gl. (2.1.63) bestimmt worden. Die dazu notwendigen Exktinktionskoeffizienten ϵ der einzelnen Proben sind in Tab. 2.1 zusammengestellt.

Probe	ϵ_{280}	Referenz	Probe	ϵ_{280}	Referenz
<i>EcSlyD*</i>	5788	[125]	<i>EcSlyD*</i> Δ IF	4470	+
<i>EcSlyD*</i> Y68W	9970	+	<i>TtSlyD</i> Δ IF	4470	[126]
<i>TtSlyD</i>	5960	[126]	<i>EcSlpA</i>	1490	+
RCM-RNase T1	21060	[127]	Tat (1-27)	6990	[126]

Tab. 2.1.: Molare Extinktionskoeffizienten in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für die Wellenlänge $\lambda = 280 \text{ nm}$ aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben.

+: eigenhändig nach [128] berechneter Extinktionskoeffizient.

Alle Proben sind vor der Absorptionsmessung bei $T = 4277\text{K}$ für 10 min und 14000 U min^{-1} zentrifugiert worden. Die experimentelle Bestimmung der Extinktion E erfolgte an einem JASCO V-550 Absorptionsspektrometer (Auflösung $\Delta\lambda = 0.5 \text{ nm}$). Jeder Messwert ist um die Pufferextinktion korrigiert worden.

2.2. Analyse von NMR-Relaxationsparametern nach Lipari & Szabo

Der durch A. Abragam [25] vorgestellte Zusammenhang zwischen der spektralen Leistungsdichtefunktion $J(\omega_i)$ (s. Abschnitt 2.1.1.2.1) und den Relaxationsparametern R_1 , R_2 und $h\text{NOE}$ ist durch G. Lipari & A. Szabo 1982 aufgegriffen worden [129, 130], um aus den Relaxationsdaten Parameter einer Bewegung, wie eine Amplitude, eine Rate oder möglichen chemischen Austausch, zu bestimmen.

Der Ansatz von Lipari & Szabo besteht darin, die globale Gesamtmolekülbewegung (*overall tumbling*) von lokalen Bewegungen zu separieren,

$$G(t) = G_0(t)G_i(t). \quad (2.2.64)$$

Dabei spiegelt $G_0(t)$ die Korrelationsfunktion der Gesamtmolekülbewegung und $G_i(t)$ die individuelle Korrelationsfunktion jedes einzelnen Bindungsvektors i , dessen Bewegung analysiert werden soll, wider.

Lipari & Szabo haben gezeigt [129], dass Gl. (2.2.64) anhand von

$$G(t) = \frac{1}{5}S^2 \exp(-t/\tau_c) + \frac{1}{5}(1 - S^2) \exp(-t/\tau), \quad (2.2.65)$$

mit:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_e}$$

ausgedrückt werden kann. Dabei gibt τ_c die Rotationskorrelationszeit des Gesamtmoleküls, S^2 den Ordnungsparameter (Amplitude) und τ_e die interne Korrelationszeit (Rate) der Bewegung jedes einzelnen Bindungsvektors i an.

In Abb. 2.24 wird die Abhängigkeit der Korrelationsfunktion $G(t)$ von der lokalen Bewegungsamplitude S^2 gezeigt. Das im Rahmen dieser Arbeit genutzte Softwarepaket MODELFREE [131, 132] berechnet nun für verschiedene Kombinationen von S^2 , τ_e und R_{ex} die jeweiligen spektralen Leistungsdichtefunktionen:

$$J_1(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} \right) \rightarrow S^2 \quad (2.2.66)$$

$$J_2(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} + \frac{(1 - S^2)\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \right) \rightarrow S^2, \tau_e \quad (2.2.67)$$

$$J_3(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} \right) \rightarrow S^2, R_{\text{ex}} \neq 0 \quad (2.2.68)$$

$$J_4(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} + \frac{(1 - S^2)\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \right) \rightarrow S^2, \tau_e, R_{\text{ex}} \neq 0 \quad (2.2.69)$$

$$J_5(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} + S_f^2 \frac{(1 - S_s^2)\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \right) \rightarrow S_f^2, S_s^2, \tau_s. \quad (2.2.70)$$

Auch die von M. Clore und Mitarbeitern vorgeschlagene Erweiterung von Gl. (2.2.65) wurde im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt [133] ($J_5(\omega)$: S^2 spaltet hier in einen schnellen, S_f^2 , und einen langsamen Anteil, S_s^2 , auf: $S^2 = S_f^2 S_s^2$).

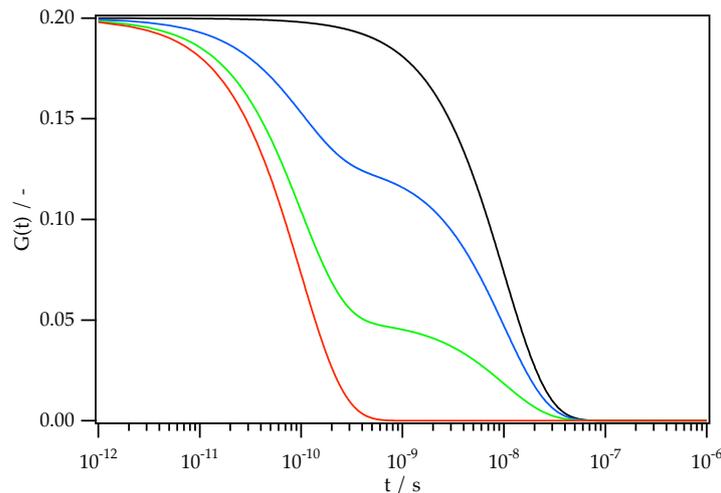


Abb. 2.24.: Verlauf der in Gl. (2.2.65) definierten Korrelationsfunktion $G(t)$ für unterschiedliche Werte des Ordnungsparameter S^2 eines Bindungsvektors. Die Daten sind mit einer globalen Rotationskorrelationszeit von $\tau_c = 10$ ns, einer internen Rotationskorrelationszeit von $\tau_e = 100$ ps und vier unterschiedlichen Ordnungsparametern S^2 des Bindungsvektors berechnet worden: $S^2 = 1$ (in schwarz), $S^2 = 0.8$ (in blau), $S^2 = 0.5$ (in grün) und $S^2 = 0$ (in rot).

Damit ergeben sich für jeden Amidprotonenvektor fünf mögliche Modelle zur Beschreibung der Rückgratdynamik. Die Modellzuordnung zu jedem Vektor erfolgte durch das von A. Mandel und Mitarbeitern vorgeschlagene Auswahlkriterium (s. Abb. 9 in [132]), das auf den kleinsten Abstandsquadraten, SSE (*sum squared error*), beruht. Die auf dieser Publikation basierenden Auswahlprogramme sind in MatLab[®] (The MathWorks, Inc.) geschrieben worden [134] (s. Anhang A.7). Die SSE -Werte sind folgendermaßen definiert (für jede Aminosäure i und jedes der fünf Modelle j separat zu berechnen):

$$SSE_{ij} = \frac{(R_{1i} - R_{1ij}^*)^2}{\sigma^{R_{1i}}} + \frac{(R_{2i} - R_{2ij}^*)^2}{\sigma^{R_{2i}}} + \frac{(hNOE_i - hNOE_{ij}^*)^2}{\sigma^{hNOE_i}}. \quad (2.2.71)$$

Dabei ist R_{1i} die gemessene longitudinale Relaxationsrate des Kernspins i , R_{1ij}^* der aus der spektralen Leistungsdichtefunktion j zurückgerechnete Wert der longitudinalen Relaxationsrate der Aminosäure i und $\sigma^{R_{1i}}$ der experimentelle Fehler von R_{1i} jeder Aminosäure i . Die Notation für R_2 und den $hNOE$ -Wert ist identisch.

Die globale Rotationskorrelationszeit τ_c kann aus dem Verhältnis R_2/R_1 abgeschätzt worden [19]. Eine Korrektur von τ_c mit etwaigen R_{ex} -Beiträgen ist nach Y.-C. Li und G. T. Montelione vorzunehmen (s. Abb. 2 in [135]). Ist die Information über die dreidimensionale Proteinstruktur vorhanden, kann aus dem Diffusionstensor D des Proteins der τ_c -Wert bestimmt werden. Die Elemente dieses Diffusionstensors stehen in direkter Beziehung zu τ_c . Ein isotroper Diffusionstensor ($D_{xx} = D_{yy} = D_{zz} = D$) führt zu $\tau_c^{-1} = 6D$. Für einen axialsymmetrischen Diffusionstensor ($D_{||} = D_{xx} = D_{yy} \neq D_{zz} = D_{\perp}$) konnte D. E. Woessner erstmalig eine Lösung für τ_c zeigen [136]. Für einen total asymmetrischen Diffusionstensor ($D_{xx} \neq D_{yy} \neq D_{zz}$) wird für jeden Bindungsvektor i eine unabhängige lokale Rotationskorrelationszeit τ_c^i angenommen.

2.3. Auf NMR-Daten basierende Strukturrechnung

Die im Abschnitt 2.1.1.3 vorgestellten Experimente zur Strukturaufklärung bilden die Basis für die Berechnung einer hochaufgelösten dreidimensionalen Proteinstruktur in Lösung. Der Arbeitsablauf solch einer Berechnung ist in Abb. 2.25 gezeigt. Zur Strukturrechnung von *EcSlpA* (s. Abschnitt 3.1.2) ist das Softwarepaket ARIA2 (*Ambiguous restraints for Iterative Assignment*, [137, 138]) zum Einsatz gekommen.

Dieses Programm übernimmt die Abstandsbestimmung von ^1H - ^1H -Paaren und wichtet bei identischen chemischen Verschiebungen die Protonenpaare unterschiedlich stark (mehrdeutige Zuordnung, unter Berücksichtigung der berechneten Struktur). ARIA2 benötigt zur Strukturrechnung als zwingende Eingabeparameter die bekannte Proteinsequenz, eine (möglichst) vollständige Zuordnung aller detektierbaren Resonanzsignale und (mindestens) einen Datensatz mit räumlich-strukturellen Informationen. Je mehr NOEs definiert (bspw. NOE-Informationen aus ^{13}C -editiertem NOESY der Aliphaten, ^{13}C -editiertem NOESY der Aromaten, ^{15}N -editiertem NOESY der Rückgratamide) bzw. weitere NMR-zugängliche Parameter zur Strukturrechnung herangezogen werden (wie dipolare Restkopplungen (s. Abschnitt 2.1.1.3.5), dihedrale Winkelinformationen (s. Abschnitt 2.1.1.3.4), J-Kopplungen, Wasserstoffbrückenbindungen), desto zuverlässiger erfolgt die Berechnung des globalen Energieminimums, welches die native Struktur darstellt.

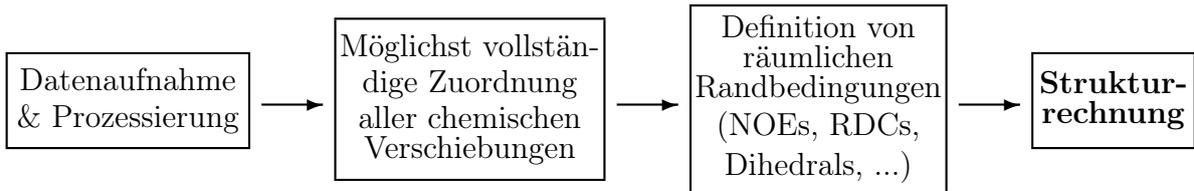


Abb. 2.25.: Arbeitsablauf für die Berechnung einer auf NMR-Daten basierenden hochaufgelösten dreidimensionalen (Protein)Struktur

Das Programm ARIA2 basiert auf molekulardynamischen Simulationen, die die klassischen Newtonschen Bewegungsgleichungen für alle N Atome i der Masse m_i der zu lösenden Proteinstruktur numerisch integrieren:

$$\begin{aligned}
 m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} &= \vec{F}_i \{ \vec{r}_1(t), \vec{r}_2(t), \dots, \vec{r}_N(t) \} \\
 &= -\nabla V \{ \vec{r}_1(t), \vec{r}_2(t), \dots, \vec{r}_N(t) \} \\
 \vec{v}_i(t + \Delta t) &\simeq \vec{v}_i(t) + \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \Delta t \\
 \vec{r}_i(t + \Delta t) &\simeq \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i(t) \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} \Delta t^2.
 \end{aligned} \tag{2.3.72}$$

Mit diesem Ansatz lassen sich für jedes Zeitintervall Δt die Geschwindigkeiten \vec{v}_i und die Ortskoordinaten \vec{r}_i aller Atome berechnen. Jede Randbedingung, die in die Strukturrechnung einfließt, stellt einen Potentialbeitrag V . Damit setzt sich die gesamte potentielle Energie des Proteins additiv aus Energietermen V_i zusammen. Dies sind Beiträge der van-der-Waals-Wechselwirkungen, der Bindungswinkel, der NOEs usw.

Als ein konkretes Beispiel sei hier der Energiebeitrag genannt, der aus RDC-Messungen folgt [104]:

$$V_{\text{RDC}} = k_{\text{RDC}}(\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}})^2, \quad (2.3.73)$$

mit der Kraftkonstanten k_{RDC} und den gemessenen δ_{obs} und den aus der simulierten Struktur zurückgerechneten Werten δ_{calc} der residualen dipolaren Kopplung. Die Kraftkonstante wird so gewählt, dass die Differenz zwischen δ_{calc} und δ_{obs} in etwa dem experimentellen Fehler entspricht [104].

Die Simulationsrechnungen verfolgen das Ziel, dass die berechnete Struktur allen vorgegebenen Randbedingungen genügen muss und die Gesamtenergie V des Moleküls das globale Energieminimum annimmt.

Während einer Strukturrechnung werden typischerweise mehrere Strukturen ($10^1 \dots 10^2$) innerhalb von mehreren Durchläufen (10^1) berechnet. Von Durchlauf zu Durchlauf wird die anfangs erwärmte, elongierte Startstruktur schrittweise abgekühlt (*simulated annealing*, [139]), um auf das globale Energieminimum und einen kleinen rmsd-Wert zwischen den energieärmsten Strukturen (unter den genutzten Randbedingungen) zu stoßen, s. Abb. 2.26. Die Temperatur ist direkt mit der kinetischen Energie und damit mit der Geschwindigkeit der N Atome korreliert (s. Gl. (2.3.72)).



Abb. 2.26.: Schritte, die während einer Strukturrechnung vom Programm ARIA2 abgearbeitet werden. Die Pfeile am mittleren Kasten stellen das schrittweise Abkühlen (*simulated annealing*, [139]) während der Strukturrechnung dar.

Nach erfolgter Strukturrechnung ist größtmöglicher Wert auf die Qualität der Struktur zu setzen. Typischerweise werden die zehn oder zwanzig energieärmsten Strukturen hinsichtlich ihres Erfüllens aller angegebenen Randbedingungen und der Korrektheit ihrer Strukturgeometrie (Bindungswinkel, Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, etc.) untersucht [140]. Auch der Vergleich zu einer evtl. bekannten Röntgenstruktur wird in der Literatur vorgeschlagen [141].

Wird die Qualität der berechneten Struktur als ungenügend beurteilt, ist ein erneuter Strukturdurchlauf mit angepassten Randbedingungen durchzuführen, s. Abb. 2.27. In den Ausgabedateien des Programmes ARIA2 werden alle verletzten Randbedingungen angegeben (*report files*).

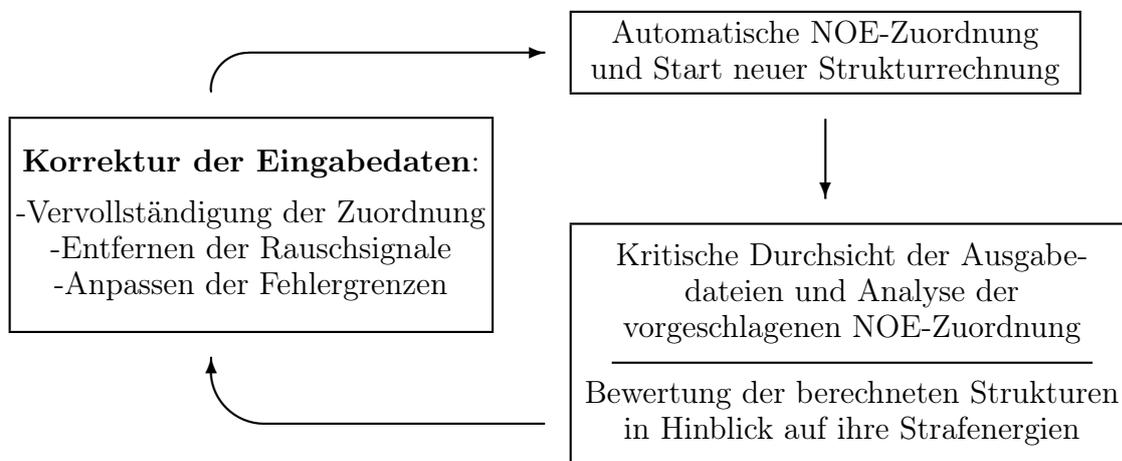


Abb. 2.27.: Falls die berechnete Struktur als ungenügend beurteilt wird, ist eine Korrektur (evtl. Anpassung) der Eingabedaten und eine Wiederholung der Strukturrechnung notwendig.

2.4. Untersuchte Proteine

2.4.1. Das Kälteschockprotein CspB

Bei einem Kälteschockreiz kommt es zu einer vermehrten Expression von Kälteschockproteinen in der Zelle [142]. In *Escherichia coli* Zellen konnten acht verschiedene Kälteschockproteine gefunden werden. In *Bacillus subtilis* sind drei Kälteschockproteine bekannt, von denen besonders das CspB NMR-spektroskopisch untersucht worden ist. *BsCspB* besteht aus 67 Aminosäuren, ist rein β -faltblattsträngig [143, 144] und faltet in eine Domäne (s. Abb. 2.28). Mit kinetischen Fluoreszenzuntersuchungen (s. a. Abschnitt

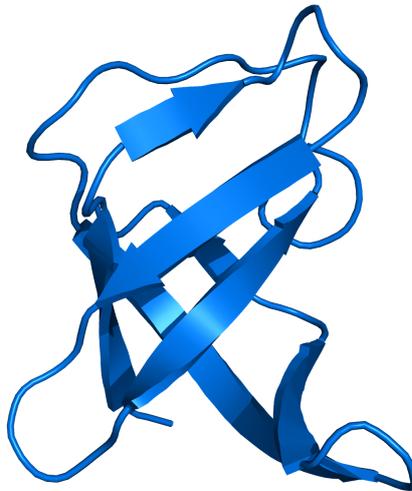


Abb. 2.28.: Dreidimensionale Struktur des Kälteschockproteins B aus *Bacillus subtilis*, *BsCspB*, pdb-Eintrag: 1NMG; gelöst mittels NMR-Spektroskopie [143].

2.1.2.2) ist gezeigt worden, dass *BsCspB* ohne Ausbildung von Intermediatsstrukturen vom entfalteten in den nativen Zustand faltet [145]. Deshalb gilt das Kälteschockprotein als ideales Modellprotein zum Studium von thermodynamischen und strukturellen Parametern der Proteinfaltung, unter Nutzung verschiedenster spektroskopischer Techniken. Der Faltungsprozess von *BsCspB* läuft auf der ms-Zeitskala ab (Faltungsrate $k_f = (815 \pm 5) s^{-1}$ und Entfaltungsrate $k_u = (34 \pm 3) s^{-1}$, bei $T = 298$ K, 20 mM NaCacodylat, 10 % D_2O und $pH = 7.0$ [146]). Da die thermodynamische Stabilität von *BsCspB* relativ gering ist [147] ($\Delta G = 8.9 kJmol^{-1}$ bei $T = 298$ K, 20 mM NaCacodylat und $pH = 7.0$), liegen auch in Abwesenheit jeglichen Denaturierungsmittels etwa 2 % des Proteins permanent im entfalteten Zustand vor.

Mittels NMR-Spektroskopie konnte in atomarer Auflösung nicht nur die Bindestelle von einzelsträngiger DNA an *BsCspB* aufgezeigt werden [148]. Auch die Komplexstruktur des Kälteschockproteins in Anwesenheit der DNA konnte mittels NMR-Spektroskopie [149] und Röntgenkristallographie gelöst werden [150]. Ferner ist die Rückgratdynamik von

BsCspB auf der ps-bis-ns-Zeitskala in verschiedenen Lösungsmittelviskositäten untersucht worden [151] und auch der Vergleich zur Dynamik und zur Stabilität in Anwesenheit der DNA gezogen worden [149]. Unter Nutzung von R_2 -Relaxationsdispersionsexperimenten (s. Abschnitt 2.1.1.2.2) ist die Faltung von *BsCspB* aminosäurespezifisch bestimmt worden [55], da die Faltungs- und Entfaltungsreaktion ebenfalls auf der ms-Zeitskala stattfindet. Bei der Auswertung der Relaxationsdaten ist in [55] dem Zwei-Zustandsmodell (s. a. Gl. (2.1.11)) gefolgt worden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Gültigkeit dieses Zwei-Zustandsmodells für die Faltung des Kältschockproteins überprüft worden. Dazu ist eine globale Datenanalyse für die Austauschrate k_{ex} und die beiden Populationen p_A und p_B vorgenommen worden, da die Relaxationsdispersion an fünf verschiedenen Magnetfeldern gemessen worden ist ($11.8 \text{ T} \leq B_0 \leq 21.2 \text{ T}$) und diese drei Parameter von der Stärke des Magnetfeldes unabhängig sind.

Die oben erwähnte geringe thermodynamische Stabilität von *BsCspB* führt unter rein nativen Bedingungen zu einer signifikanten Population des entfalteten Zustandes. Dieses Verhalten bildet die Basis für die Bestimmung der Faltungsraten im Gleichgewicht ohne den Einsatz von Denaturierungsmitteln. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber konventionellen Methoden zur Bestimmung der Faltungsraten, da bei diesen auf $c = 0 \text{ M}$ Denaturierungsmittel extrapoliert werden muss. Unter Nutzung der R_2 -Relaxationsdispersion kann nun direkt bei einer Konzentration von $c = 0 \text{ M}$ Denaturierungsmittel die Faltungsrate k_f und die Entfaltungsrate k_u bestimmt werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *BsCspB* Wildtyp-Protein ist von Rolf Sachs (Arbeitsgruppe Jochen Balbach, Universität Halle-Wittenberg) rekombinant hergestellt und zur Verfügung gestellt worden.

2.4.2. Die Prolylisomerase SlyD

Das Zweidomänenprotein SlyD (*sensitive-to-lysis D*, s. Abb. 2.29) gehört zu den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) [152, 153]. Diese katalysieren Reaktionen, die wegen einer *cis/trans*-Isomerisierung an der Aminosäure Prolin stark verlangsamt werden (s. Abb. 2.30). Oft ist dieser Isomerisierungsschritt der geschwindigkeitslimitierende Schritt für die Faltung der entfalteten Polypeptidkette in den nativen, funktionstragenden Zustand, da dieser eine sehr hohe Energiebarriere E besitzt ($E \simeq 20 \text{ kcalmol}^{-1}$).

Die Isomerasen werden in drei Klassen eingeteilt:

- Cyclophiline,
- Parvuline,
- FK506 bindende Proteine (FKBPs).

Die Prolylisomerase SlyD gehört dem FKBP-Typ an, da die PPIase-Domäne von SlyD (blau eingefärbt in Abb. 2.29) strukturell dieser Isomeraseklasse entspricht. Die einzelnen Isomeraseklassen unterscheiden sich untereinander hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber potentiellen Substraten, ihrer Aminosäuresequenz, ihrer Proteintopologie und gegenüber der Bindung spezifischer Isomeraseinhibitoren [155].

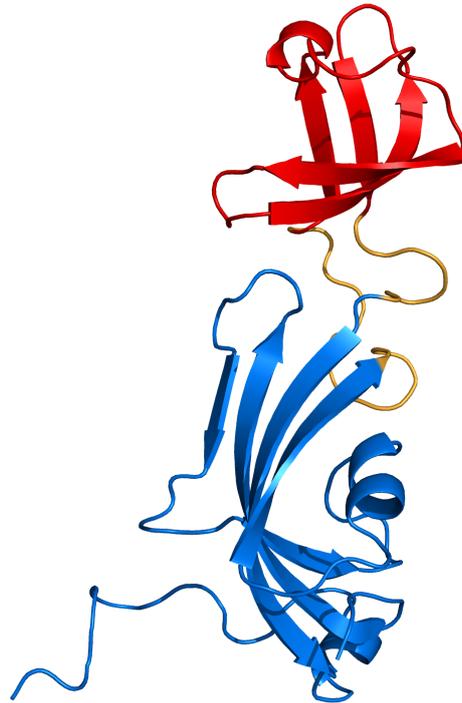


Abb. 2.29.: Dreidimensionale Struktur der Prolyl isomerase SlyD (1-165) aus *Escherichia coli*, *EcSlyD**, pdb-Eintrag: 2K8I; gelöst mittels NMR-Spektroskopie [154]. Eingefärbt ist die Domänenarchitektur von *EcSlyD**: in blau die FKBP-Domäne, in rot die IF-Domäne. Der Domänenlinker ist in orange dargestellt.

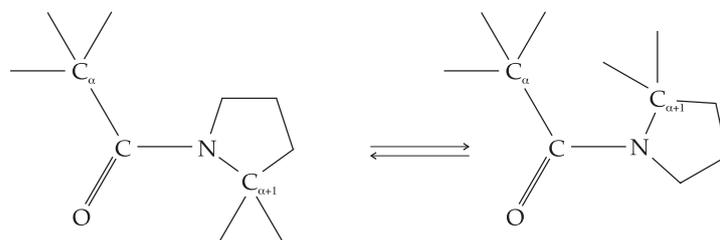


Abb. 2.30.: Isomerisierung zwischen der *cis*- (rechts) und der *trans*-Konformation (links) einer Xaa-Pro-Peptidbindung (sog. Prolylbindung). Die Energiebarriere E zwischen beiden Konformationen beträgt etwa $E \simeq 20 \text{ kcalmol}^{-1}$, nach [71].

SlyD wurde in *Escherichia coli* Zellen als Faktor für den Bakteriophagen- Φ X174-Lysiszyklus entdeckt [156]. Es wurde sowohl (wie oben bereits erwähnt) als Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase [157] als auch als sehr effizientes Chaperone [154, 158] identifiziert. Hochaufgelöste Strukturen sind für zwei mesophile Formen, *EcSlyD** [154] und der Voll-längenvariante *EcSlyD* [159] (jeweils NMR-Struktur), und für eine thermophile Form, *TtSlyD* [126] (Röntgenkristallstruktur), verfügbar.

Strukturbasierte Arbeiten haben gezeigt, dass sich die beiden Domänen des SlyD-Moleküls in ihrer lokalen thermodynamischen Stabilität unterscheiden. Dies äußert sich in einem unterschiedlichen Schutz der Amidprotonen gegenüber dem Austausch mit dem Lösungsmittel [126]. Aus den NMR-basierten Strukturrechnungen der mesophilen Variante von SlyD lässt sich keine definierte Orientierung zwischen der IF- und der FKBP-Domäne ableiten [154, 159]. Ferner konnte gezeigt werden, dass beide Domänen einen klaren Unterschied in den Faltungs- und den Entfaltungsraten zeigen [160] aber auch dass die Chaperone-Domäne die PPIase-Domäne stark bei der Katalyse unterstützt [161]. Auch die hohe Affinität von SlyD gegenüber dem Tat-Signalpeptid (*twin arginine translocation*) konnte auf atomarer Ebene aufgelöst werden [126]. Erstmals gezeigt wurde diese Wechselwirkung zwischen dem unstrukturierten Tat-Signalpeptid und SlyD durch W. Graubner und Mitarbeiter [162]. Während des Tat-Signalpeptid-abhängigen Transportes von gefalteten Substraten vom Cytoplasma zum Periplasma der *E. coli* Zellen, sorgt diese Wechselwirkung für den Schutz des Substrates und bewahrt es vor möglichem proteolytischen Abbau im Cytosol.

Im Rahmen dieser Arbeit stand die lokale und die globale Dynamik der Rückgratome von *EcSlyD** und *TtSlyD* im Mittelpunkt. Sowohl auf der ps-bis-ns- als auch auf der μ s-bis-ms-Zeitskala wurden NMR-Experimente in freier Form als auch in Anwesenheit von verschiedenen Bindungspartnern durchgeführt. Das Ziel bestand darin, durch Bestimmung und Interpretation der intrinsischen Dynamik die Funktion von SlyD genauer zu verstehen. Ergänzt wurden diese Arbeiten durch Fluoreszenzuntersuchungen, die sowohl im Gleichgewicht als auch zeitaufgelöst durchgeführt worden sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *EcSlyD**- und *TtSlyD*-Varianten sind von Caroline Haupt und von Christian Löw (jeweils Arbeitsgruppe Jochen Balbach, Universität Halle-Wittenberg) rekombinant hergestellt und zur Verfügung gestellt worden.

2.4.3. Die Prolylisomerase SlpA

Die Prolylisomerase SlpA (*SlyD like protein A*) gehört, wie SlyD, der Isomeraseklasse der FK506-bindenden Proteine an. Bisher sind Informationen über SlpA rar und das Verständnis über dessen Rolle in der *E. coli* Zelle unklar. Zwar konnte bisher eine geringe Prolyl-Isomeraseaktivität und eine starke Chaperonefunktion von *EcSlpA* gezeigt werden [163]. Auch im Vergleich zu SlyD zeigt SlpA eine stärkere Temperaturstabilität des nativen Zustandes (Mittelpunkt des thermischen Überganges zwischen dem nativen und dem entfaltetem Zustand ist um 14 K auf 56° C verschoben, [163]). Eine Antwort auf die Frage nach der Funktion von SlpA im Cytosol der *E. coli* Zelle konnte mit diesen Ergebnissen aber nicht gegeben werden.

Genau hier setzt die vorliegende Arbeit an. Die hochaufgelöste dreidimensionale Struktur von *EcSlpA* soll vor allem im Vergleich zur *EcSlyD**-Struktur einen Hinweis darauf liefern, warum SlpA trotz starker Sequenzhomologie zu SlyD (s. Abb. 1 in [164]) eine viel

geringere Isomerasefunktion besitzt. Experimente zur Rückgratdynamik und Bindungsstudien mit entfaltenen Substraten sollen weitere Erklärungsmuster für die im Vergleich zu SlyD geringere Isomeraseaktivität von SlpA liefern.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Ec*SlpA-Wildtyp-Protein und die verschiedenen stabilisierenden Varianten von SlpA sind von Anne-Juliane Geitner (Arbeitsgruppe Franz Xaver Schmid, Universität Bayreuth) rekombinant hergestellt und zur Verfügung gestellt worden.

2.4.4. Das amyloide Peptid A β

Obwohl noch nicht endgültig bewiesen, gilt es dennoch als immer wahrscheinlicher, dass die Alzheimer-Krankheit durch das Peptid A β (mit) verursacht wird [165]. In der Pathobiochemie sind mit der Parkinson-Krankheit, die durch α -Synuclein (mit) ausgelöst wird [166], oder mit dem Katarakt (durch γ -Kristallin (mit) hervorgerufen [167]) verwandte zelluläre Ursachen bekannt.

Vom A β -Peptid existieren verschiedene Längen, deren Aminosäureanzahl zwischen 37 und 43 variiert [165]. Die zwei häufigsten Spezies sind das 40er- und das 42er-Peptid [165]. Die Abb. 2.31 zeigt die lösliche Form von A β (1-42) in einer H₂O/Hexafluoroisopropanol (HFIP)-Mischung von 70:30 (v/v). Beiden Peptiden ist eine starke Aggregationsnei-

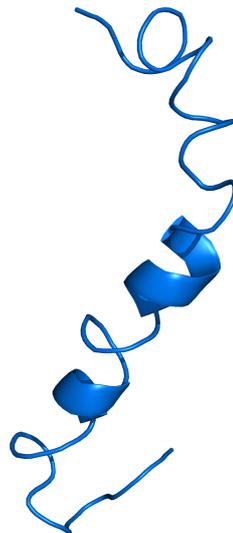


Abb. 2.31.: Dreidimensionale Struktur des löslichen A β -Peptides (1-42) in einer H₂O:Hexafluoroisopropanol (HFIP)-Mischung von 70:30 (v/v), pdb-Eintrag: 1Z0Q; gelöst mittels NMR-Spektroskopie [168].

gung zuzuschreiben, beginnend beim löslichen monomeren Zustand über die Bildung von Oligomeren bis hin zu ausgewachsenen Fibrillen (s. Abb. 2.32). Unter Nutzung von kernmagnetischer Resonanz und Kryoelektronenmikroskopie kann der fibrilläre Zustand

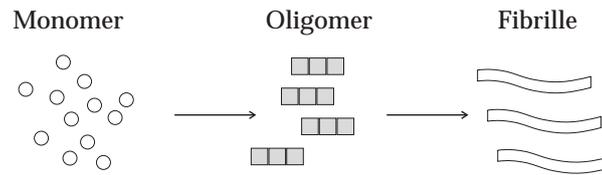


Abb. 2.32.: In der Literatur diskutiertes Modell zur Ausbildung einer fibrillären Struktur von $A\beta$, ausgehend vom löslichen monomeren Zustand über die Bildung von Oligomeren (stark vereinfachtes Schema).

von $A\beta$ sehr gut charakterisiert werden [169, 170]. Bislang sind wenig strukturelle Informationen über den oligomeren Zustand von $A\beta$ und über die Ausbildung sogenannter Protofibrillen (Vorform der Fibrillen) bekannt. Die Kenntnis dieser Strukturen ist von großem Interesse, da sowohl die Oligomere als auch die Protofibrillen als Hauptursache für die Alzheimer-Krankheit vermutet werden [171, 172].

Im Rahmen dieser Arbeit ist das 40er-Peptid genutzt worden. Das Hauptaugenmerk galt der (möglichen) strukturellen Änderung des löslichen monomeren Zustandes in Gegenwart einer Membranmimik, die durch DHPC-Moleküle induziert wurde [173]. Dies erfolgte anknüpfend an bereits vorangegangene Arbeiten, die gezeigt haben, dass $A\beta$ mit Lipiden und verschiedenen Lipidstrukturen wechselwirkt [174, 175].

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete $A\beta$ -Peptid ist rekombinant hergestellt und in lyophilisierter Form von der Arbeitsgruppe Marcus Fändrich (MPF der Enzymologie, Halle (Saale)) zur Verfügung gestellt worden.

2.5. Weitere verwendete Proben

2.5.1. Ribonuklease T1

Das Protein Ribonuklease T1 (Rnase T1) ist ein mikrobielles Enzym, besteht aus 104 Aminosäuren und faltet in eine Domäne [176]. Es reagiert mit RNA nach einem zwei-stufigen Mechanismus. Zuerst erfolgt eine Umesterung der 3',5'-Phosphodiesterbindung zu 2',3'-cyclischem Phosphat. Anschließend wird dieses Phosphat zu terminalem 3'-Phosphat hydrolysiert [176].

Die Aufklärung der Faltung von Rnase T1 von der entfalteten Polypeptidkette in den nativen Zustand erfolgte hauptsächlich durch T. Kiefhaber und Mitarbeiter [177, 178, 179]. Von vier im Wildtypprotein vorliegenden Prolinen (P39, P55, P60, P73) liegen P39 und P55 im nativen Zustand in der *cis*-Konformation vor ([180], s. a. Abb. 2.30). Der Faltungsmechanismus von Rnase T1 kann durch die Mutation der beiden Positionen S54 und P55 zu G54 und N55 (S54G/P55N) somit wesentlich vereinfacht werden ([181]).

Werden die beiden Disulfidbrücken (C2-C10, C6-C103) in Rnase T1 (S54GP55N) durch Reduzierung und anschließende Carboxymethylierung der SH-Gruppen entfernt, tritt eine starke Destabilisierung des Proteins ein, die die Entfaltung der Polypeptidkette zur Folge hat. Im folgenden wird diese Proteinform als RCM-T1 bezeichnet.

Die RCM-T1-Form diente im Rahmen dieser Arbeit als Modellsubstrat für die Prolyl-isomerase *Ec*SlpA (s. Abschnitt 3.1.4.2). Dieses Protein ist von Anne-Juliane Geitner (Arbeitsgruppe Franz Xaver Schmid, Universität Bayreuth) rekombinant hergestellt und zur Verfügung gestellt worden.

2.5.2. DHPC

Das kurzkettige DHPC-Molekül, 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, ist ein in der Literatur gut beschriebenes Modellsystem für Phospholipide. Es besitzt eine molare

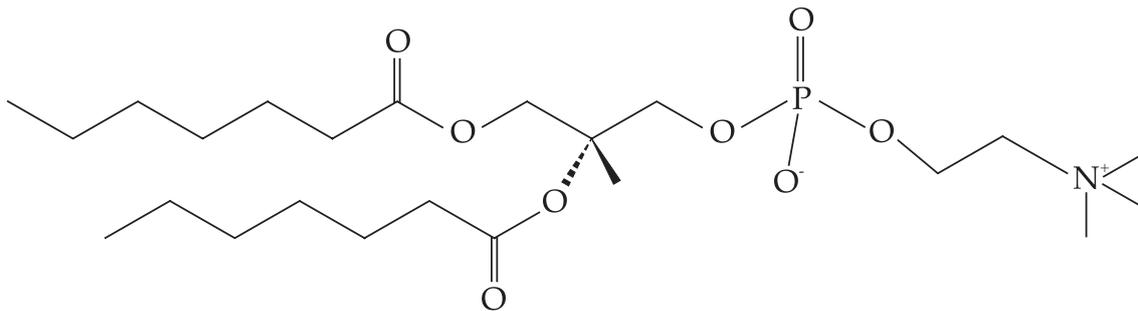


Abb. 2.33.: Chemische Struktur des DHPC-Moleküls.

Masse von $M = 481.3 \text{ g mol}^{-1}$ und ist aus zwei sechskettigen hydrophoben Schwänzen und einer polaren Cholin-Kopfgruppe aufgebaut (s. Abb. 2.33). Bei einem pH-Wert von $\text{pH} = 7.0$ beträgt die Nettoladung Null. Die kritische Micellenkonzentration (*critical micelle concentration*) von DHPC wird in einem Phosphatpuffer im Bereich von $\text{cmc} = (11 \dots 15) \text{ mM}$ angenommen [182, 183].

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete DHPC ist in Pulverform von Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA, bezogen worden.

2.5.3. Tat-Peptide

Die in den Bindungsstudien mit SlyD eingesetzten Tat-Peptide (s. a. Abschnitt 2.4.2) besitzen eine Länge von 17 bzw. 27 Aminosäuren. Das längere Peptid wird durch folgende Sequenz gebildet:



und besitzt eine molare Masse von $M = 3021.6 \text{ gmol}^{-1}$.

Die fluoreszenzspektroskopischen Experimente nutzen die intrinsische Fluoreszenz des Tryptophans an Position 21. Da das 27er-Peptid in Konzentrationen, die für NMR-Experimente notwendig sind, nicht lösbar ist, ist für diese auf ein 17er-Peptid zurückgegriffen worden:



mit der molaren Masse von $M = 1880 \text{ gmol}^{-1}$.

Beide Peptide sind von Activotec, Cambridge, UK bezogen worden.

2.5.4. FK506, Rapamycin

Für die Bindungsstudien mit *Tt*SlyD sind zudem die beiden Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseinhibitoren FK506 ($M = 822.1 \text{ gmol}^{-1}$) und Rapamycin ($M = 914.2 \text{ gmol}^{-1}$) [155] genutzt worden. Die chemische Struktur von FK506 ist in Abb. 2.34, die von Rapamycin in Abb. 2.35 gezeigt. Beide Immunosuppressiva sind von Tecoland, New Jersey, USA bezogen worden.



Abb. 2.34.: Dreidimensionale Struktur des FK506-Moleküls. Der pdb-Eintrag 1FKF ist zur Anfertigung dieser Abbildung genutzt worden.

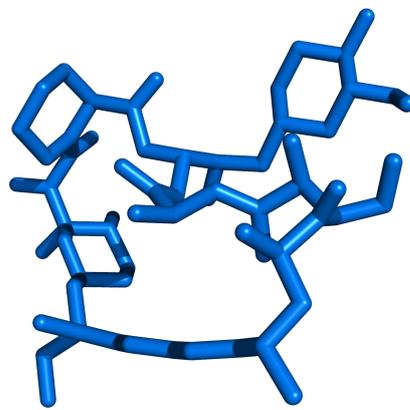


Abb. 2.35.: Dreidimensionale Struktur des Rapamycin-Moleküls. Der pdb-Eintrag 3KZ7 ist zur Anfertigung dieser Abbildung genutzt worden.

3. Ergebnisse

Im folgendem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt.

Für *EcSlpA* konnte die hochaufgelöste NMR-Struktur berechnet werden. Ergänzend dazu ist die Stabilität, die Wechselwirkung zu Substraten und das Relaxationsverhalten auf der ps-bis-ns-Zeitskala untersucht worden.

Die Prolylisomerase SlyD wurde eingehend auf deren Relaxation und Dynamik auf der ps-bis-ns- wie auch der μ s-bis-ms-Zeitskala beleuchtet. Diese Studie ist vom freien auf den Ligand-gebundenen Zustand ausgeweitet worden. Es ist sowohl mit mesophilem als auch mit thermophilem SlyD gearbeitet worden und unter Nutzung verschiedener spektroskopischer Methoden. Eine detaillierte Analyse der Translationsdiffusion ergänzt diese Charakterisierung.

Die Faltung des Kälteschockproteins *BsCspB* wurde im Gleichgewicht in aminosäurespezifischer Auflösung auf die Gültigkeit des Zwei-Zustandsmodelles der Proteinfaltung hin analysiert.

Abschließend werden etwaige Änderungen der Rückgratstruktur des A β -Peptides durch Anwesenheit einer Membranimik vorgestellt und diskutiert.

3.1. Charakterisierung der Prolylisomerase *EcSlpA*

3.1.1. Zuordnung der NMR-Resonanzsignale

3.1.1.1. Rückgratzuordnung

Die Zuordnung der Proteinrückgratssignale von *EcSlpA* erfolgte anhand der Tripel-Resonanzexperimente *trHNCA*, *trHNCACB* und *trHN(CO)CACB* (s. Abschnitt 2.1.1.3.1) und einer ^{15}N - ^{13}C -markierten Probe. Die Abb. 3.1 bzw. 3.2 zeigen diese Zuordnung für den Sequenzbereich A10-H14. Damit konnten alle Aminosäuren (außer Prolin) im Sequenzbereich S4-H148 des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums zugeordnet werden. Die Abb. 3.3 zeigt das komplett zugeordnete ^1H - ^{15}N -HSQC von *EcSlpA*.

3.1.1.2. Seitenkettenzuordnung

Die Zuordnung der Resonanzsignale der ^1H - ^{13}C -HSQCs der Aromaten bzw. der Aliphaten erfolgte hauptsächlich mit NOESY-editierten ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren (NOE-Information innerhalb des aliphatischen bzw. des aromatischen Bereiches) und des HC-CH-TOCSY-Experimentes. Der Einstieg in die jeweilige Seitenkette konnte durch parallele Information aus dem HBHACONH und aus dem C(CO)NH erleichtert werden (s. Abschnitt 2.1.1.3.2). Die beiden ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren sind in Abb. A.2 (aliphatischer

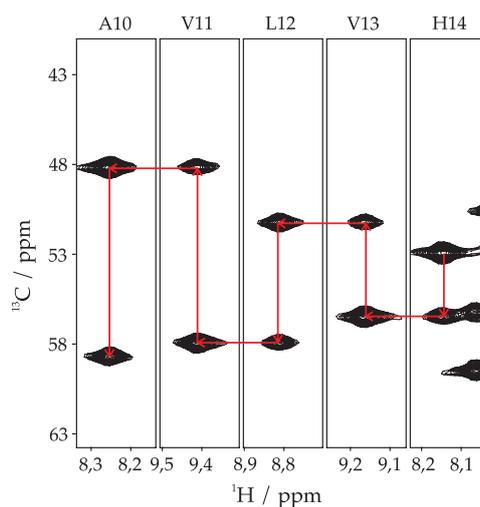


Abb. 3.1.: Sequentielle Zuordnung der chemischen Verschiebungen der C_α -Resonanzen von *EcSlpA* im Sequenzbereich A10-H14 unter Nutzung des HNCA-Experimentes. Die roten Pfeile stellen die für die Rückgratzuordnung notwendige sequentielle Verknüpfung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren dar. Die zugehörigen ^{15}N -chemischen Verschiebungen betragen: 124.22 ppm (A10), 122.58 ppm (V11), 131.37 ppm (L12), 119.76 ppm (V13) bzw. 118.14 ppm (H14).

Bereich) bzw. A.3 (aromatischer Bereich) im Anhang A.8 angegeben. Die Komplettzuordnung aller Resonanzsignale von *EcSlpA* ist dem Anhang A.9 (Tab. A.3 - A.6) zu entnehmen.

3.1.2. Hocho aufgelöste dreidimensionale Struktur

Die hocho aufgelöste dreidimensionale Struktur von *EcSlpA* ist mit der Software ARIA2 [137, 138] berechnet worden. Neben den NOE-Signalen sind dihedrale Winkelinformationen (s. Abschnitt 2.1.1.3.4) und RDC-Werte (s. Abschnitt 2.1.1.3.5) mit in die Strukturrechnung aufgenommen worden. Ein Ausschnitt der IPAP- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren für die Bestimmung der RDC-Werte von *EcSlpA* ist in Abb. A.1 im Anhang A.6 gezeigt. Die gemessenen RDC-Werte können nur mit zwei verschiedenen *Alignment*-Tensoren, die aus den zurückgerechneten RDC-Werten folgen, erklärt werden (s. Abb. A.4 im Anhang A.10). Die Werte für die Rhombizität R und die Magnitude D_a beider Tensoren sind auch im Anhang A.10 angegeben.

EcSlpA faltet als Zwei-Domänenprotein. Die Sequenzbereiche M1-L65 und P128-E148 bilden eine Domäne und können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu FKBP12 als FKBP-Domäne bezeichnet werden (s. Abb. 3.6 (a) im Vgl. mit Abb. 3.4 (b)). Die zweite Domäne kann, analog zu *EcSlyD** [154], als IF- (*inserted-in-flap*) Domäne bezeichnet werden (Sequenzbereich L75-F122, s. Abb. 3.6 (b)). Der Strukturvergleich zwischen *EcSlyD**, FKBP12 und *EcSlpA* ist in Abb. 3.4 gezeigt.

Im Vergleich zu *EcSlyD** und FKBP12 ist bei *EcSlpA* das β_{5a} -Faltblatt nicht ausgebildet. Die C-terminale α_4 -Helix von *EcSlyD** ist weder in FKBP12 noch in *EcSlpA* vorhanden. Die weiteren Sekundärstrukturelemente der FKBP-Domäne, wie das β_2 -, β_3 -, β_4 - und β_{5b} -Faltblatt und die α_4 -Helix, sind bei allen drei Strukturen ausgebildet. Die IF-

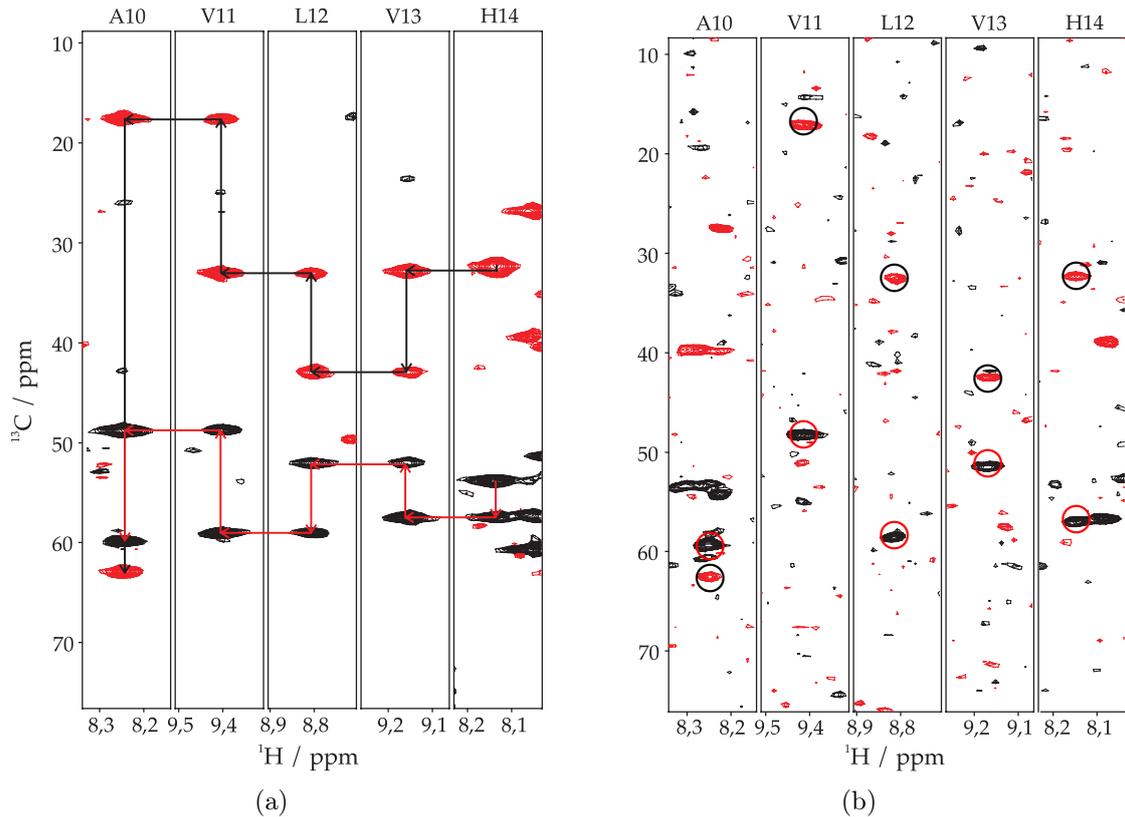


Abb. 3.2.: Sequentielle Zuordnung der chemischen Verschiebungen der C_α - (rote Pfeile) und der C_β - (schwarze Pfeile) Resonanzen von *EcSlpA* im Sequenzbereich A10-H14 unter Nutzung des HNCACB-Experimentes (a). Chemische Verschiebungen der C_α - (positives Kreuzsignal, in schwarz) und der C_β - (negatives Kreuzsignal, in rot) Resonanzen der jeweiligen Vorgängeraminosäure von *EcSlpA* im Sequenzbereich A10-H14 unter Nutzung des HN(CO)CACB-Experimentes (b). Das HN(CO)CACB enthält die sequentielle Information zur Vorgängeraminosäure (innerhalb der schwarzen Kreise: jeweiliges C_β -, innerhalb der roten Kreise: jeweiliges C_α -Resonanzsignal dargestellt), aber keine Konnektivität zur eigenen Aminosäure. Die zugehörigen ^{15}N -chemischen Verschiebungen sind in der Legende der Abb. 3.1 aufgeführt.

Domänen von *EcSlpA* und *EcSlyD** unterscheiden sich strukturell wenig voneinander. Die antiparallelen β -Faltblätter 6, 7 bzw. 8, 9 sind jeweils vorhanden. Die α_3 -Helix ist in *EcSlpA* länger ausgebildet als in *EcSlyD**, auch im Vergleich zu MtFKBP17 (strukturell und funktionell homolog zu *EcSlyD**, [164]).

Die Statistik der Strukturrechnung ist in Tab. 3.1 angegeben. Die zehn Strukturen, die die geringste Gesamtenergie besitzen, sind in der Abb. 3.5 dargestellt.

Die Ausrichtung dieser zehn Strukturen an der FKBP-Domäne zieht ein Bündel an individuellen Orientierungen der IF-Domäne nach sich. Die Notwendigkeit von zwei unterschiedlichen *Alignment*-Tensoren zur korrekten Beschreibung der gemessenen RDC-Werte von *EcSlpA* schlägt sich in diesem strukturellen Verhalten nieder. Anzumerken ist, dass keine langreichweitigen Abstandsinformationen mit in die NMR-Strukturrechnung von *EcSlpA* aufgenommen worden sind (Beschränkung auf $r \leq 0.5$ nm). Sogenannte PRE-Experimente (*paramagnetic relaxation enhancement*, [184]) sind aufgrund ihrer langreichweitigen Wirkung ($r \simeq 2.5$ nm, je nach Wahl des paramagnetischen Zentrums) in der Lage, Abstände zwischen Domänen quantitativ aufzulösen. Die erwähnte

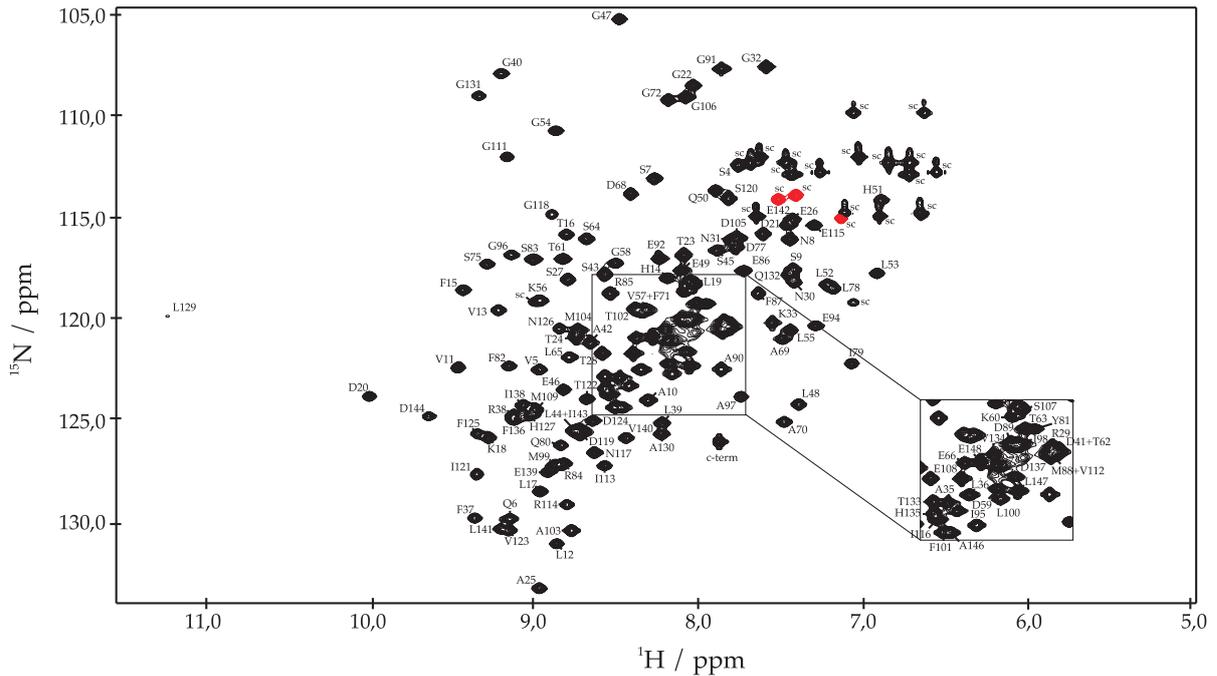


Abb. 3.3.: Zugeordnetes ^1H - ^{15}N -HSQC von *EcSlpA*. Die Aminosäuren sind mit dem Einbuchstaben-code und nachfolgender Sequenzposition markiert. Resonanzen der Seitenkettensignale von Arginin, Glutamin und Asparagin sind mit sc abgekürzt, der C-Terminus mit c-term.

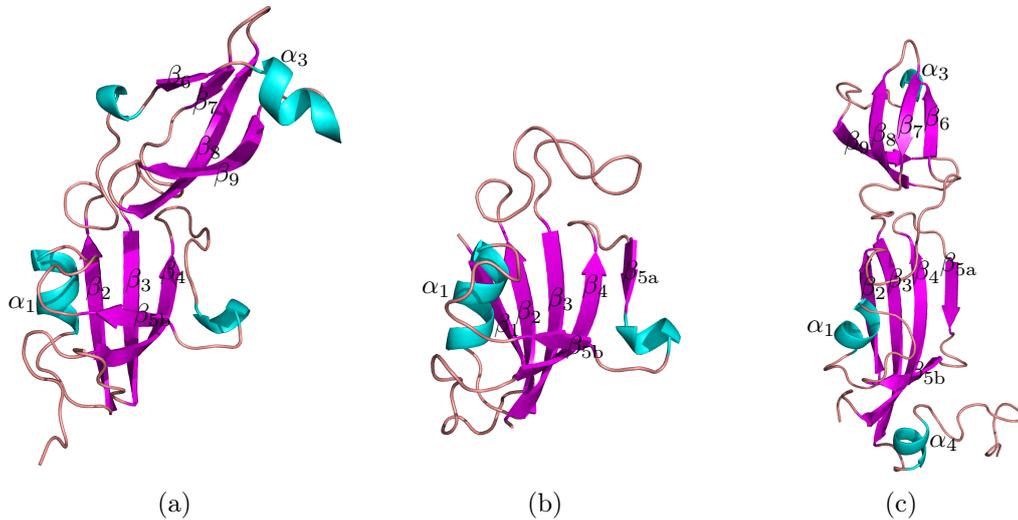


Abb. 3.4.: Vergleich der energieärmsten Strukturen von *EcSlpA* (a), FKBP12 (pdb-Eintrag: 1FKF) (b) und *EcSlyD** (pdb-Eintrag: 2K8I) (c). Die FKBP-Domäne ist für alle drei Proteine ähnlich orientiert. Die Sekundärstrukturelemente sind farblich codiert (α -Helix: in grün; β -Faltblatt: in magenta; unstrukturierte Bereiche: in orange; jeweils *cartoon*-Darstellung). Die Nomenklatur der Sekundärstrukturelemente erfolgte nach [154].

schwach definierte Orientierung zwischen den beiden Domänen in *Ec*SlpA ist ebenfalls für *Ec*SlyD* [154] und MtFKBP17 beobachtet worden [164]. Die Abb. 3.6 verdeutlicht,

- Experimentelle Daten	
NOEs	3658
Dihedrals	244
RDCs	51
- NOE-Verletzungen / Å	
> 0.5	1.43±0.90
> 0.3	5.86±2.47
> 0.1	93.3±6.9
NOE-rmsd	0.041±0.014
- Energien / kcalmol ⁻¹	
E_{tot}	744±208
E_{bond}	30±2
E_{angle}	211±25
E_{improper}	121±24
E_{NOE}	297±166
E_{cdih}	63±17
E_{sani}	22±6
- rmsd-Wert für die Rückgratátome / Å	
FKBP-Domäne	1.32±0.16
IF-Domäne	1.24±0.13
- Ramachandran-Analyse*	
<i>most favored</i>	84.7 %
<i>additionally allowed</i>	9.9 %
<i>generously allowed</i>	3.8 %
<i>disallowed</i>	1.5 %

Tab. 3.1.: Statistik der Strukturrechnung von *Ec*SlpA. *: Die Analyse ist mit Procheck-NMR durchgeführt worden [140].

dass jede Domäne für sich sehr gut definiert ist. Für die Rückgratátome der FKBP-Domäne (Abb. 3.6 (a)) beträgt der rmsd-Wert zwischen den zehn energieärmsten Strukturen (1.32 ± 0.16) Å. Für die IF-Domäne (Abb. 3.6 (b)) kann ein entsprechender Wert von (1.24 ± 0.13) Å angegeben werden.

3.1.3. Stabilität

3.1.3.1. Schutz gegenüber Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel

Mit der Verwendung des klassischen H/D-Austauschexperimentes sind die Schutzfaktoren jedes einzelnen Rückgratámides von *Ec*SlpA berechnet und daraus die freie Standardenthalpie ΔG^0 bestimmt worden (s. Abschnitt 2.1.1.2.3). Es wurden zwei voneinander



Abb. 3.5.: Darstellung der zehn energieärmsten Strukturen von *EcSlpA* (gezeigt ist der Sequenzbereich M1-E148). Das Proteinrückgrat der jeweiligen FKBP-Domäne (M1-L65, P128-E148) ist aneinander ausgerichtet worden und die Sekundärstrukturelemente sind farblich codiert (α -Helix: in grün; β -Faltblatt: in magenta; unstrukturierte Bereiche: in orange; *cartoon*-Darstellung). Die IF-Domäne ist in grau gezeigt (*ribbon*-Darstellung).

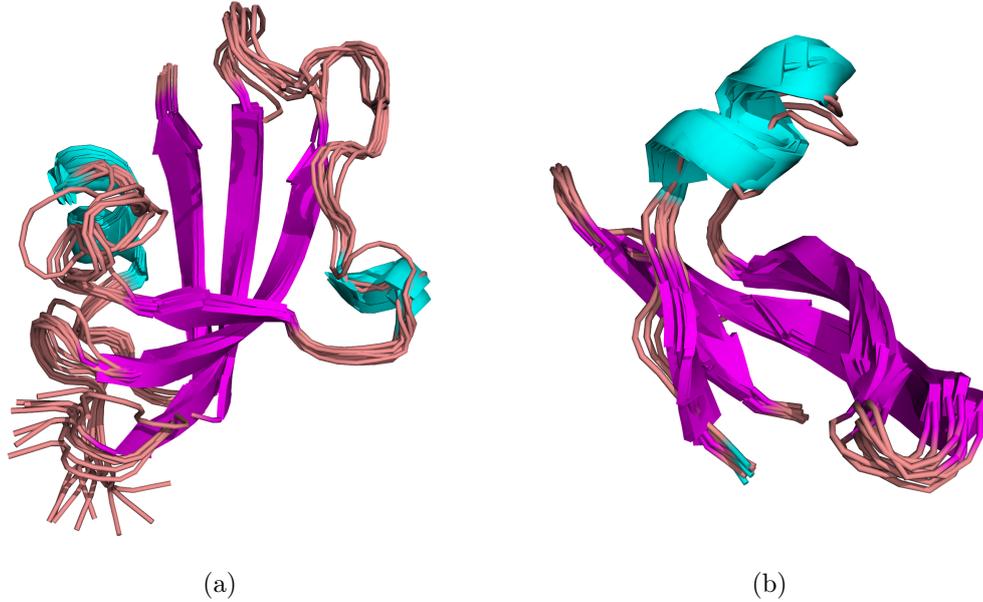


Abb. 3.6.: Individuelle Darstellung der zehn energieärmsten Strukturen der beiden Domänen von *EcSlpA*. Das Proteinrückgrat der zehn energieärmsten Strukturen ist an der FKBP-Domäne (M1-L65, P128-E148, (a)) bzw. der IF-Domäne (L75-F122), (b)) ausgerichtet worden. Die Sekundärstrukturelemente sind farblich codiert (α -Helix: in grün; β -Faltblatt: in magenta; unstrukturierte Bereiche: in orange; *cartoon*-Darstellung).

unabhängige Experimente durchgeführt:

1. $B_0 = 14.1$ T, $T = 298$ K, pH = 7.0,
2. $B_0 = 18.8$ T, $T = 298$ K, pH = 7.5.

Vor beiden Experimenten erfolgte ein Pufferwechsel von H_2O zu D_2O innerhalb von etwa 5 Minuten (Totzeit des Experimentes) über eine NAP-Säule (Größenausschlusschromatographiesäule). Die Proteinendkonzentration betrug jeweils $c = 0.5$ mM. Der Start der Datenaufnahme von aufeinanderfolgenden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren erfolgte nach weiteren 5 (pH = 7.0) bzw. 15 Minuten (pH = 7.5), in 20- (pH = 7.5) bzw. 40- (pH = 7.0) Minuten-Abständen (Zeitauflösung des Experimentes). Die zeitabhängige Intensitätsabnahme der Kreuzsignale ist aufgezeichnet und mit Anpassung der Gl. (2.1.30) an die Messwerte die apparente Austauschrate k_{ex} bestimmt worden. Die damit unter Nutzung von [74] berechneten Schutzfaktoren und daraus abgeleiteten ΔG^0 -Werte sind in Abb. 3.7 dargestellt. Alle Aminosäuren, die im Zeitfenster des H/D-Austausches erfassbar sind, liefern ähnliche Schutzfaktoren und ΔG^0 -Werte für *EcSlpA*. Der mittlere ΔG^0 -Wert, der aus den H/D-Austauschexperimenten folgt, korreliert mit $\Delta G^0 \simeq 18$ kJmol $^{-1}$ sehr gut mit dem ΔG_{CD}^0 -Wert, der mit einem Gleichgewichtsübergang (durch Guanidiniumchlorid induziert) und Circular dichroismus-Spektroskopie bestimmt worden ist ($\Delta G_{\text{CD}}^0 = (19.9 \pm 0.5)$ kJmol $^{-1}$, [185]).

Mit den vorgestellten Ergebnissen ist ein großer Unterschied zum Stabilitätsverhalten

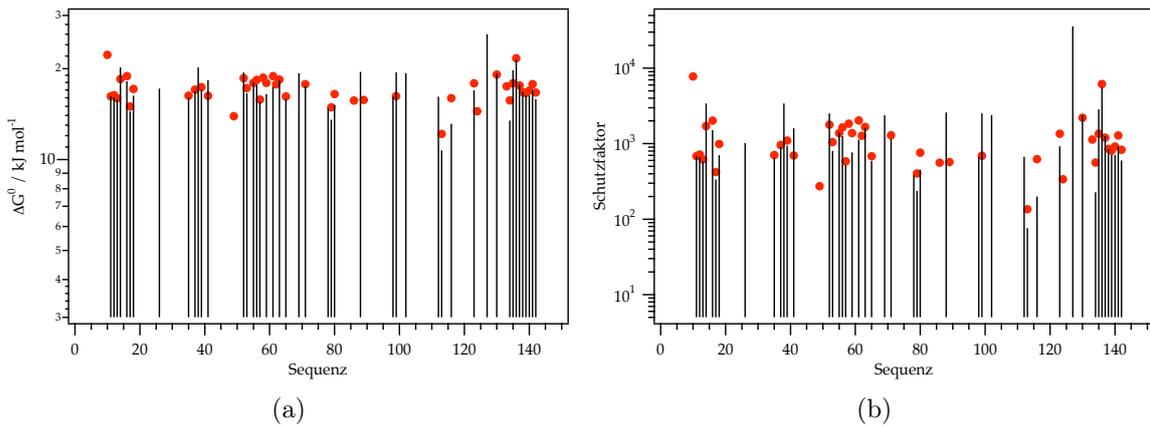


Abb. 3.7.: Halblogarithmische Auftragung der berechneten Schutzfaktoren (a) und der ΔG^0 -Werte (b) von *EcSlpA*, die aus dem klassischen H/D-Austauschexperiment gewonnen wurden. Es erfolgten zwei unabhängige Messungen bei $T = 298$ K: sowohl bei pH = 7.0 und an $B_0 = 14.1$ T (schwarze Linien) als auch bei pH = 7.5 und an $B_0 = 18.8$ T (rote geschlossene Kreise). Alle Proline und die Aminosäuren, die während der Totzeit des Experimentes austauschen, führen zu nicht erfassbaren Schutzfaktoren und damit zu fehlenden ΔG^0 -Werten. Der Sequenzbereich M1-L65 sowie P128-E148 bildet die FKBP-Domäne, die IF-Domäne umfasst den Sequenzbereich L75-F122.

von *EcSlyD* und *TtSlyD* zu sehen. Bei diesen beiden Varianten ist keine einzige Aminosäure innerhalb der IF-Domäne im Zeitfenster des H/D-Austausches aufgrund der geringen thermodynamischen Stabilität erfassbar [126, 181].

3.1.3.2. Temperaturstabilität

Die thermodynamische Stabilität von *EcSlpA* gegenüber Temperaturänderungen ist im Bereich $T = (293 \dots 359)$ K mittels eindimensionaler NMR-Protonenspektroskopie aufgenommen worden (Abb. 3.8 zeigt daraus einen repräsentativen Ausschnitt). Zur Auswertung ist die spektral separate Methylgruppe von V123 bei einer Protonenverschiebung von $^1\text{H} = -0.55$ ppm genutzt worden. Das Verhältnis des Integrals im Bereich $^1\text{H} = (-0.65 \dots -0.45)$ ppm dieses einzelnen Resonanzsignals zum Integral des spektralen Bereiches $^1\text{H} = (0.2 \dots 1.8)$ ppm repräsentiert die globale Proteinstabilität [186].

Eine thermodynamische Analyse dieses temperaturabhängigen Verhältnisses (s. Abb. 3.9) ergibt nach Gl. (2.1.54) einen Mittelpunkt der Entfaltung von $T_m = (330.1 \pm 0.3)$ K. Das Ergebnis der vollen thermodynamischen Analyse ist in Tab. 3.2 aufgeführt.

Ergänzend zum Wildtypprotein sind stabilisierte Varianten von *EcSlpA* bzw. dessen isolierter IF-Domäne hinsichtlich ihrer Temperaturstabilität untersucht worden. Die Detektion erfolgte auch hier mittels eindimensionaler NMR-Protonenspektroskopie und die Auswertung analog zum Wildtypfall. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tab. 3.2 aufgeführt.

Eine Stabilisierung der isolierten IF-Domäne von *EcSlpA* durch Einführung einer Disulfidbrücke führt zu einer Verschiebung des Mittelpunktes der Entfaltung um etwa 30 K

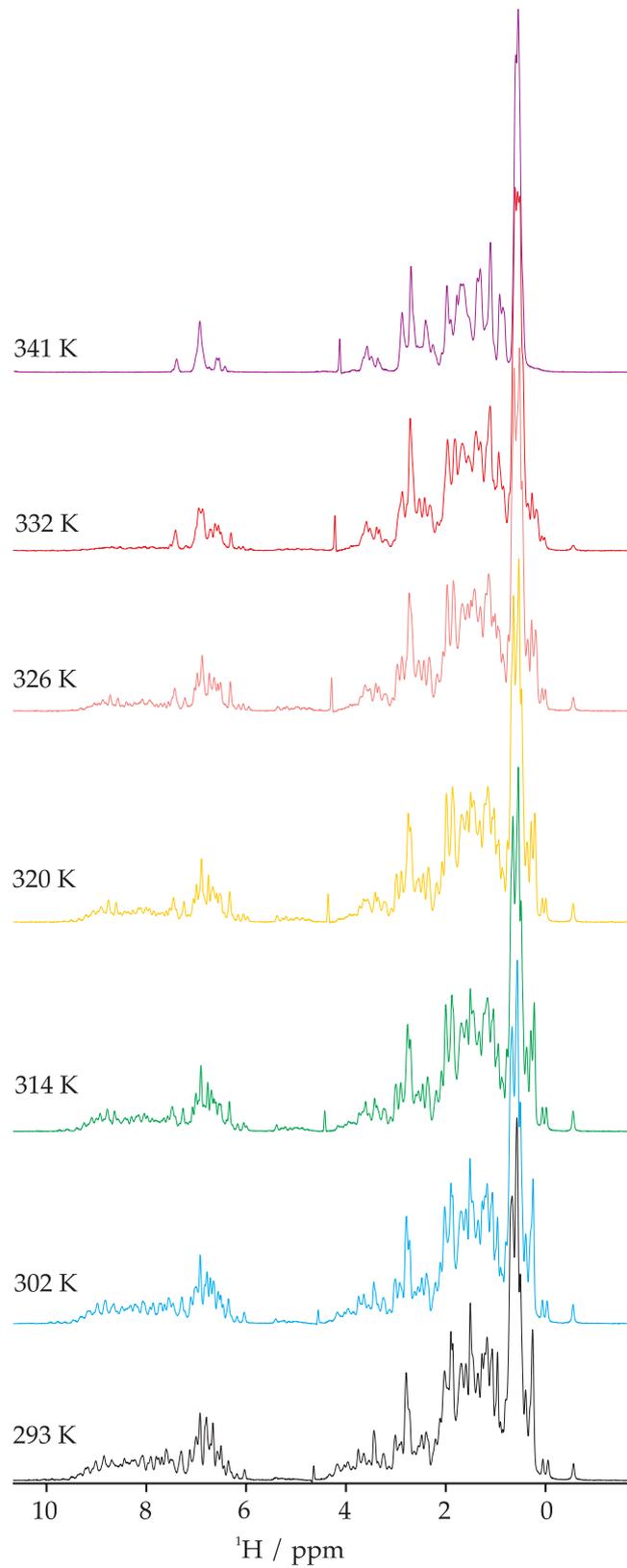


Abb. 3.8.: Temperaturabhängige Protonenspektren von *EcSlpA* im Bereich $T = (293 \dots 341)$ K zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Proteinstabilität. Die Auswertung erfolgte anhand der spektral separaten Methylgruppe von V123 bei einer Protonenverschiebung von $^1\text{H} = -0.55$ ppm.

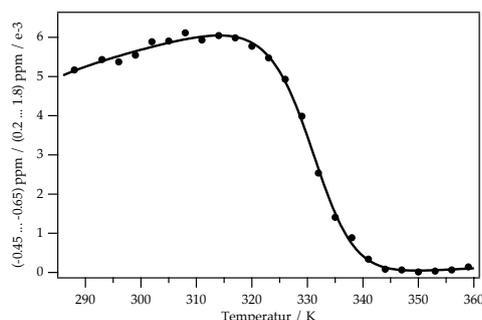


Abb. 3.9.: NMR-spektroskopisch detektierter Temperaturübergang einer nativen Methylgruppe von *EcSlpA*. Das Verhältnis des Integrals der separaten Methylgruppe von V123 ($^1\text{H} = (-0.45 \dots -0.65) \text{ ppm}$, s. Abb. 3.8) zum Integral des aliphatischen Bereiches $^1\text{H} = (0.2 \dots 1.8) \text{ ppm}$ repräsentiert die native Population von *EcSlpA* [186].

auf $T_m \simeq 360 \text{ K}$ im Vergleich zum Vollängen-Wildtypprotein (s. IF, S4 in Tab. 3.2). Dieses Verhalten ist unabhängig von der verwendeten spektroskopischen Methode zu beobachten.

Interessanterweise führt das Einfügen derselben Disulfidbrücke im Vollängenprotein (s. wt, S4 in Tab. 3.2)) zu keiner Verschiebung des Mittelpunktes der Entfaltung (ebenfalls methodenunabhängige Beobachtung).

3.1.4. Bindungsstudien zu Substraten

Aufgrund der in Abschnitt 3.1.2 aufgezeigten hohen Strukturhomologie zwischen *EcSlpA* und *EcSlyD**, sind nachfolgend Bindungsstudien in atomarer Auflösung durchgeführt worden. Es kamen dabei Substrate zum Einsatz, die in früheren Arbeiten an *EcSlyD** verwendet worden und deren Ergebnisse bekannt sind und sich damit zum Vergleich anbieten. Es ist sowohl auf das Tetrapeptid Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (zur Bestimmung der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität [187]) als auch auf die entfaltete Form der Ribonuklease T1 als weiteres Modellsubstrat zurückgegriffen worden.

3.1.4.1. Interaktion zum Tetrapeptid

Die Wechselwirkung des Tetrapeptides Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (Standardsubstrat zur Bestimmung der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität [187]) zu ^{15}N -markiertem *EcSlpA* ist mittels zweidimensionaler heteronuklearer NMR-Spektroskopie untersucht worden, um die Bindestelle an *EcSlpA* zu lokalisieren.

Mit ansteigendem Konzentrationsverhältnis des Peptides zum Protein ist in den ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren eine Änderung der chemischen Verschiebungen der Kreuzsignale von *EcSlpA* (bei annähernd konstanter Intensität) beobachtet worden (s. Abb. A.5). Dies deutet auf schnellen Austausch zwischen dem Liganden und dem Protein-Liganden-Komplex hin (s. Abb. 2.10).

Um das Bindungsplateau sicher zu erreichen, ist bis zu einem zehnfachen Überschuss des Peptides bzgl. der *EcSlpA*-Konzentration titriert worden. Die gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung $\Delta\omega^{\text{all}}$ ist für jede Aminosäure und für jeden Titrationschritt berechnet und mit Gl. (2.1.57) angepasst worden. Bindungskurven für V11 und F37

Variante	T_m / K	$\Delta H / 10^3 \text{ kJmol}^{-1}$	$\Delta C_p / 10^3 \text{ kJmol}^{-1}\text{K}^{-1}$
wt	330.1 ± 0.1	220 ± 10	6.9 ± 1.6
wt*	329.0 ± 0.1	250 ± 20	6.5 ± 1.0
wtY81W, S3	326.5 ± 0.7	320 ± 70	18.7 ± 6.5
wtY81W, S3*	328.1 ± 0.1	210 ± 20	n. b.
wtY81W, S3, red.	320.3 ± 0.9	250 ± 60	15.5 ± 5.7
wtY81W, S3*, red.	325.7 ± 0.1	200 ± 20	n. b.
wt, S4	331.8 ± 0.1	260 ± 10	11.5 ± 0.8
wt, S4*	329.5 ± 0.3	260 ± 20	n. b.
IF, S4	356.4 ± 7.5	220 ± 20	6.3 ± 1.1
IF, S4*	362.2 ± 0.5	160 ± 30	n. b.
IF, S4, red.	308.1 ± 10.5	130 ± 50	4.1 ± 3.1
IF, S4*, red.	322.6 ± 0.5	120 ± 20	n. b.

Tab. 3.2.: Thermodynamische Analyse verschiedener *EcSlpA*-Varianten. Die Detektion erfolgte sowohl mit Circular dichroismus- (*, Detektion bei $\lambda = 230 \text{ nm}$) als auch mit NMR-Spektroskopie. wt: Wildtypprotein, IF: isolierte Sequenz V73-T133 von *EcSlpA* mit LEHHHHHH als ergänzenden C-Terminus, S3: stabilisierende Variante vom Wildtypprotein (Disulfidbrücke I98-V112 (wt-Variante), I26-V40 (isolierte Variante)), S4: stabilisierende Variante vom Wildtypprotein (Disulfidbrücke Y81-T122 (wt-Variante), Y9-T50 (isolierte Variante)), red.: reduzierte Form. Die Reduktion der jeweiligen Disulfidbrücke erfolgte durch etwa einstündige Inkubation in $c = 2.5 \text{ mM}$ -haltigen TCEP-Puffer. Die Daten der Circular dichroismusstudie sind von Anne-Juliane Geitner (Arbeitsgruppe F. X. Schmid, Universität Bayreuth) aufgenommen und zur Verfügung gestellt worden.
n. b.: nicht bestimmt.

(jeweils FKBP-Domäne) sowie für E94 und I121 (jeweils IF-Domäne), die die größten Änderungen der chemischen Verschiebung $\Delta\omega_m$ während der Titration zeigen, sind in Abb. 3.10 (a)-(d) gezeigt. Die durch die Regression der Gl. (2.1.57) erhaltenen aminosäurespezifischen Werte betragen für die Dissoziationskonstante $K_D \simeq (0.5 \pm 0.1) \text{ mM}$ bzw. nehmen für die Stöchiometrie Werte zwischen $n = (0.5 \pm 0.1)$ und $n = (1.0 \pm 0.1)$ an. Die Abb. 3.11 stellt die Endpunktanalyse von $\Delta\omega_m$ über die Aminosäuresequenz von *EcSlpA* dar.

Aus der Abb. 3.11 (a) ist ersichtlich, dass kein bestimmter einzelner Sequenzbereich von *EcSlpA* eine bevorzugte Spezifität zur Bindung des Tetrapeptides besitzt. Jedoch zeigt das Strukturbild in Abb. 3.11 (b), dass vor allem die gefalteten Sekundärstrukturelemente in der IF- wie auch in der FKBP-Domäne an der Bindung zum Tetrapeptid beteiligt sind.

Die aminosäurespezifischen Bindungskurven für V11, F37 (jeweils FKBP-Domäne) und E94, I121 (IF-Domäne) in Abb. 3.10 deuten aufgrund ihrer Ähnlichkeit auf keine be-

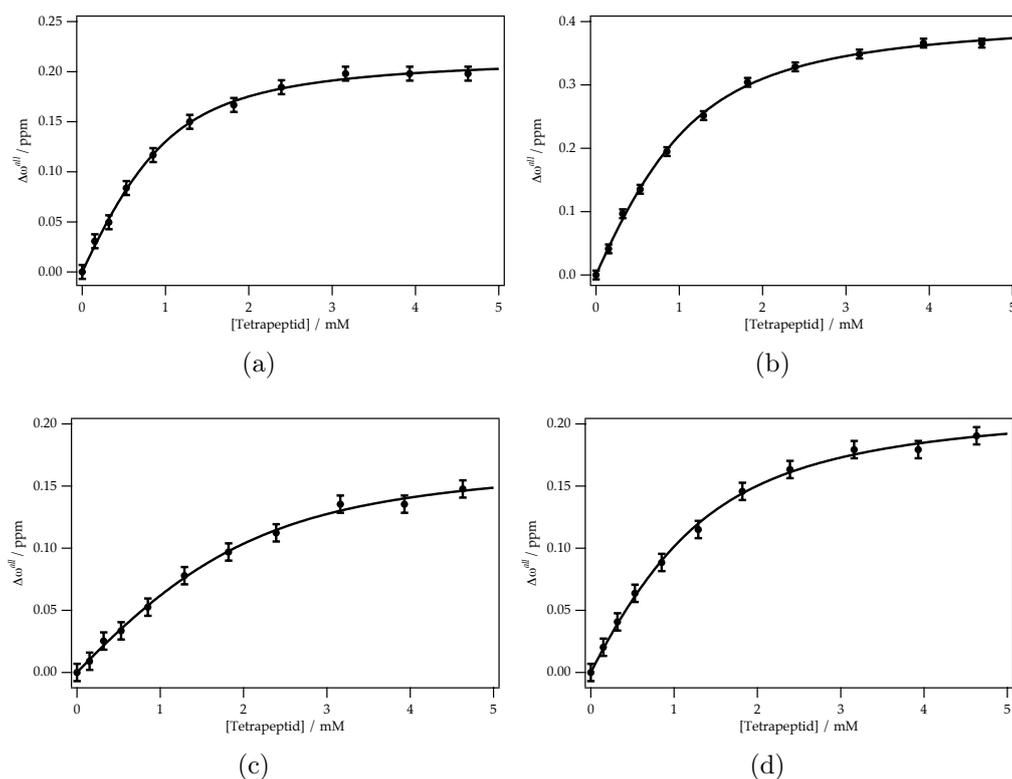


Abb. 3.10.: Aminosäurespezifische Verläufe für die Titration des Tetrapeptides zu *EcSlpA*. Der Fehler der chemischen Verschiebung ist mit 0.007 ppm angenommen worden. Die Regression der Gl. (2.1.57) an die Messwerte ergibt für V11 (a) $n = 1.0 \pm 0.1$ und $K_D = (370 \pm 120) \mu\text{M}$, für F37 (b) $n = 1.0 \pm 0.1$ und $K_D = (490 \pm 130) \mu\text{M}$, für E94 (c) $n = 0.5 \pm 0.1$ und $K_D = (460 \pm 260) \mu\text{M}$ und für I121 (d) $n = 0.9 \pm 0.2$ und $K_D = (620 \pm 270) \mu\text{M}$.

vorzugte Bindestelle des Peptides an *EcSlpA* hin. Sowohl die Stöchiometrie n als auch die Dissoziationskonstante K_D nehmen in keinem Sequenzbereich Werte an, die nicht auch in einem anderen Bereich von *EcSlpA* existieren. Dies ist auch für die Titration des Tetrapeptides an *EcSlyD** beobachtet worden [154].

3.1.4.2. Interaktion zur entfalteten Form der Ribonuklease T1

Die Bindungsstudie von *EcSlpA* ist auf das Modellsubstrat der reduzierten und carboxymethylierten Form der Ribonuclease T1 (s. Abschnitt 2.5.1) ausgeweitet worden. Die Wechselwirkung von ^{15}N -markiertem *EcSlpA* mit der permanent entfalteten Polypeptidkette RCM-T1 ist mit ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren in aminosäurespezifischer Auflösung verfolgt worden. Die Titration erfolgte bis zu einem etwa zweifachen Überschuss des Liganden und ist in Abb. A.6 für drei Konzentrationsverhältnisse des Protein-Liganden-Komplexes dargestellt.

Mit steigendem Konzentrationsverhältnis von RCM-T1 gegenüber *EcSlpA* ist sowohl eine Änderung der chemischen Verschiebung als auch der Intensität der Resonanzsignale im ^1H - ^{15}N -HSQC zu beobachten (s. Abb. 3.12 (a) für die Analyse der Änderung der chemischen Verschiebung und Abb. A.7 im Anhang A.12.2 für die Analyse der Intensitätsänderung). Die Wechselwirkung zwischen RCM-T1 und *EcSlpA* findet somit weder

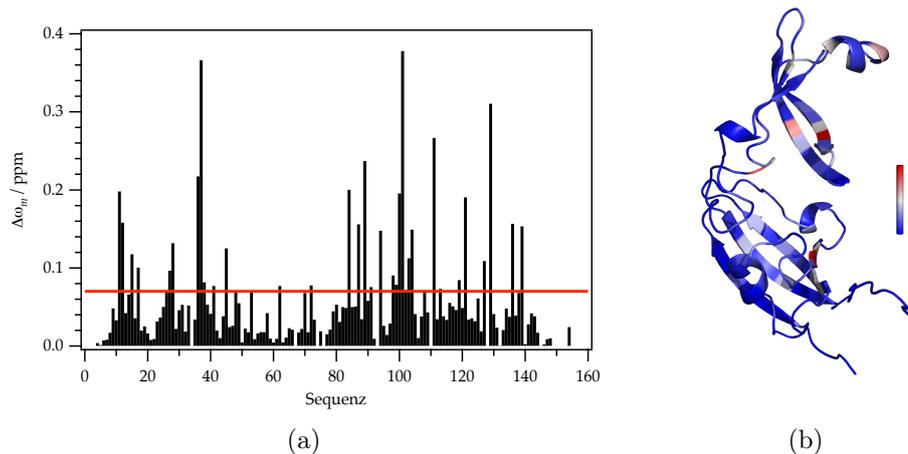


Abb. 3.11.: Endpunktanalyse der NMR-Titration des Tetrapeptides zu *EcSlpA*. Die Titration wurde an $B_0 = 18.8 \text{ T}$ und bei $T = 298 \text{ K}$ durchgeführt. Der Titrationsendpunkt betrug $4.63 \text{ mM} : 0.48 \text{ mM}$, $[\text{Tetrapeptid}]:[\text{EcSlpA}]$. Die rote horizontale Linie in (a) markiert die Trennlinie für diejenigen Aminosäuren, die am stärksten am Bindungsprozess beteiligt sind ($\Delta\omega_m \geq 0.07 \text{ ppm}$). In (b) ist das zugehörige Strukturbild gezeigt, die Farbskala verläuft von blau ($\Delta\omega_m = 0 \text{ ppm}$) über weiß ($\Delta\omega_m = 0.19 \text{ ppm}$) zu rot ($\Delta\omega_m = 0.38 \text{ ppm}$).

auf der langsamen noch auf der schnellen NMR-Zeitskala statt (s. Abschnitt 2.1.1.6). Interessanterweise erfahren diejenigen Aminosäuren von *EcSlpA* die stärksten Änderungen der chemischen Verschiebung, die auch den stärksten Intensitätsverlust während der Titration zeigen (Sequenzposition A35, G72, L100, G111, L129 und D136). Für A35, L100, G111 und L129 ist der Titrationsverlauf für die Änderung der Intensität bzw. der chemischen Verschiebung in Abb. A.8 dargestellt.

Die Änderungen der chemischen Verschiebungen, die nach Gl. (2.1.57) berechnet worden sind, liegen beim höchsten verwendeten Substratüberschuss deutlich unter den Werten, die bei der Titration des Tetrapeptides (s. Abschnitt 3.1.4.1, Abb. 3.11) beobachtet worden sind ($\Delta\omega_m \leq 0.07 \text{ ppm}$).

Während der Titration ist neben der Änderung der Intensität und der chemischen Verschiebung auch eine Veränderung der Linienform der Resonanzsignale von *EcSlpA* zu beobachten (Abb. 3.13 zeigt dies für die spektral isolierte CH_3 -Gruppe von Valin 123). Eine Rückrechnung aus der Linienbreite auf die transversalen Relaxationsrate R_2 ergibt für den RCM-T1-gebundenen Zustand von *EcSlpA* eine Erhöhung der R_2 -Rate um etwa 10 % (s. Abb. A.10 im Anhang A.12.5). Da die transversale Relaxationsrate R_2 mit der Rotationskorrelationszeit τ_c der Molekülbewegung korreliert ist [19], weist dies, neben den Intensitätsverlusten und der leichten Änderung der chemischen Verschiebung der Rückgratamide, auf eine Bindung der entfalteten Peptidkette von RCM-T1 an *EcSlpA* hin. Da sich während der Titration die chemische Verschiebung, die Intensität und auch die Linienform der Resonanzsignale von *EcSlpA* ändert, kann die Zeitskala des chemischen Austausches zwischen *EcSlpA* und dem RCM-T1-*EcSlpA*-Komplex weder mit schnell noch mit langsam angegeben werden (s. a. Abb. 2.10).

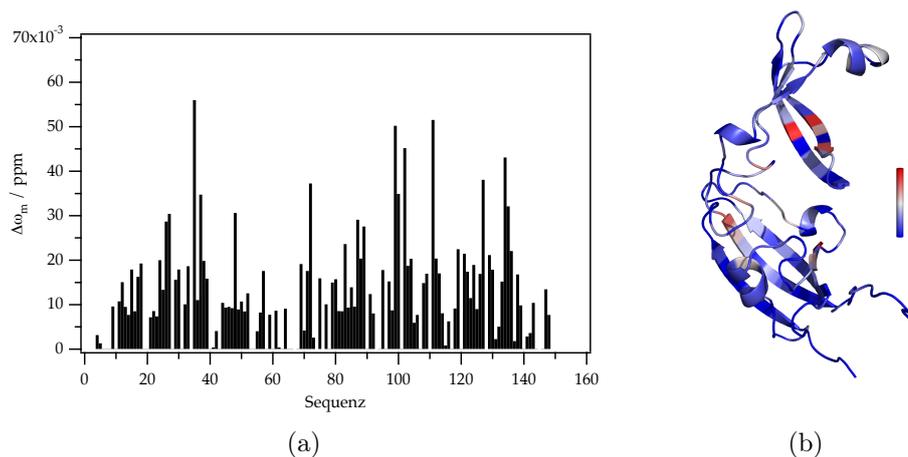


Abb. 3.12.: Endpunktanalyse der NMR-Titration von RCM-T1 zu *EcSlpA*. In (a) ist die maximale Änderung der chemischen Verschiebung der Rückgratamide $\Delta\omega_m$ von *EcSlpA* ($n = 1.9$ zu Gunsten von RCM-T1) dargestellt. Die Titration wurde an $B_0 = 18.8$ T und bei $T = 298$ K durchgeführt. In (b) ist das zugehörige Strukturbild gezeigt. Die Farbskala verläuft von blau ($\Delta\omega_m = 0$ ppm) über weiß ($\Delta\omega_m = 0.03$ ppm) zu rot ($\Delta\omega_m = 0.06$ ppm).

Eine qualitative Analyse der Titrationskurven in Abb. A.8 deutet auf eine 2:1-Stöchiometrie der Bindung hin (zwei *EcSlpA*-Moleküle je RCM-T1-Molekül). Auf eine Regression der Gl. (2.1.59) an die Titrationsdaten zur quantitativen Bestimmung der Bindungsaffinität K_D wurde aufgrund der relativ geringen spektralen Änderungen verzichtet. Die Abb. A.9 im Anhang A.12.4 zeigt vier Aminosäuren (G54 und A146 (jeweils FKBP-Domäne) sowie A90 und E115 (jeweils IF-Domäne)), die nicht an der Bindung zu RCM-T1 beteiligt sind. Sowohl die Intensität als auch die chemische Verschiebung ändern sich für diese Aminosäuren während der Titration wenig bis nicht. Im Vergleich zu *EcSlyD** [154] und *TtSlyD* [126] sind die spektralen Änderungen von *EcSlpA*, die durch RCM-T1 hervorgerufen werden, geringer. Diese schwächere Bindeaffinität von RCM-T1 kann ein Grund für die im Vergleich zu *SlyD* geringere Isomeraseaktivität sein (s. a. Abschnitt 2.4.3).

3.1.5. Rückgratdynamik

3.1.5.1. Relaxationsverhalten auf der ps-bis-ns-Zeitskala

Mit der Bestimmung des heteronuklearen NOE-Wertes jedes Rückgratamides ist die Dynamik von *EcSlpA* bei $T = 298$ K auf der ps-bis-ns-Zeitskala untersucht worden. Besonders die Sequenzbereiche um N30, A90 und D105 zeigen im h NOE-Experiment im Vergleich zum restlichen Protein starke Auffälligkeiten (s. Abb. 3.14). Diese besitzen einen signifikant erniedrigten heteronuklearen NOE-Wert (Minimalwerte zwischen 0.5 und 0.3) verglichen zum theoretischen Maximalwert von 0.78 für ein Protein dieser Größe und $B_0 = 18.8$ T (s. Abb. 2.8). Da der Verlauf des h NOE-Wertes im allgemeinen sehr gut mit dem qualitativen Verlauf des Ordnungsparameters S^2 korreliert, kann für diese Sequenzbereiche von einer erhöhten Bewegungsamplitude des Amidprotonvektors

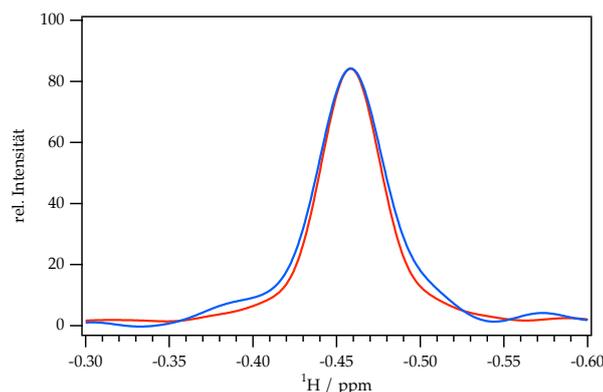


Abb. 3.13.: Linienform der Methylgruppe von Valin 123 von *EcSlpA* in Abwesenheit (rot) und in Anwesenheit eines zweifachen stöchiometrischen Überschusses von RCM-T1 (in blau). Die Halbwertsbreite des Resonanzsignales vergrößert sich um etwa 10 % von FWHM = 34.6 Hz (für $n = 0$) auf FWHM = 38.1 Hz ($n = 1.9$). Beide Protonenspektren sind mit einer qsine-Fensterfunktion prozessiert worden. Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Halbwertsbreiten ist das blaue Spektrum um -5.6 Hz verschoben und mit 2.7 multipliziert worden. Der Verdünnungsfaktor zwischen blauem und rotem Spektrum beträgt 1.9. Die Analyse der Halbwertsbreiten ist im Anhang A.12.5 angegeben.

ausgegangen werden.

Die intrinsische Dynamik der Rückgratamide der IF-Domäne von *EcSlpA* ist mit denen von *EcSlyD** (s. Abb. 3.26 (c) u. Abb. A.12 (c)) und abgeschwächt mit denen von *TtSlyD* (s. Abb. A.13 (c)) vergleichbar. Die erhöhte Rückgratdynamik von *EcSlpA* auf der ps-bis-ns-Zeitskala im Sequenzbereich um N30 (unstrukturierter Bereich direkt vor dem β_{5b} -Faltblatt, zur Nomenklatur s. Abb. 3.4 (a)) ist jedoch weder bei *EcSlyD** noch bei *TtSlyD* zu finden.

3.1.6. Zusammenfassende Diskussion

Für die Prolylisomerase *EcSlpA* konnten die NMR-Resonanzsignale des Proteinrückgrates wie auch der Seitenketten zugeordnet werden. Darauf aufbauend ist die hochaufgelöste NMR-Struktur von *EcSlpA* berechnet worden. Es faltet in zwei strukturell getrennte Domänen (IF- und FKBP-Domäne), die in sich sehr gut definiert sind. Demgegenüber ist eine definierte Orientierung zwischen diesen beiden Domänen im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden worden. Dies spricht für eine Mobilität zwischen den beiden Domänen. Der Strukturvergleich von *EcSlpA* mit den Homologen *EcSlyD** [154] und *TtSlyD* [126] liefert nur für einen Faltblattbereich innerhalb der FKBP-Domäne einen Unterschied.

Das lokale thermodynamische Stabilitätsverhalten von *EcSlpA* unterscheidet sich dagegen stärker von demjenigen von *EcSlyD** [188]. Dieses Ergebnis annähernd gleicher Schutzfaktoren der Amidprotonen beider Domänen von *EcSlpA* gegenüber Deuteronein-tausch liefert einen weiteren strukturellen Hinweis für die im Vergleich zu *EcSlyD** erniedrigte Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität von *EcSlpA*.

NMR-spektroskopisch detektierte Temperaturentfaltungen vom Wildtypprotein und verschiedener *EcSlpA*-Varianten konnten eine sehr gute Korrelation zu anderen spektrosko-

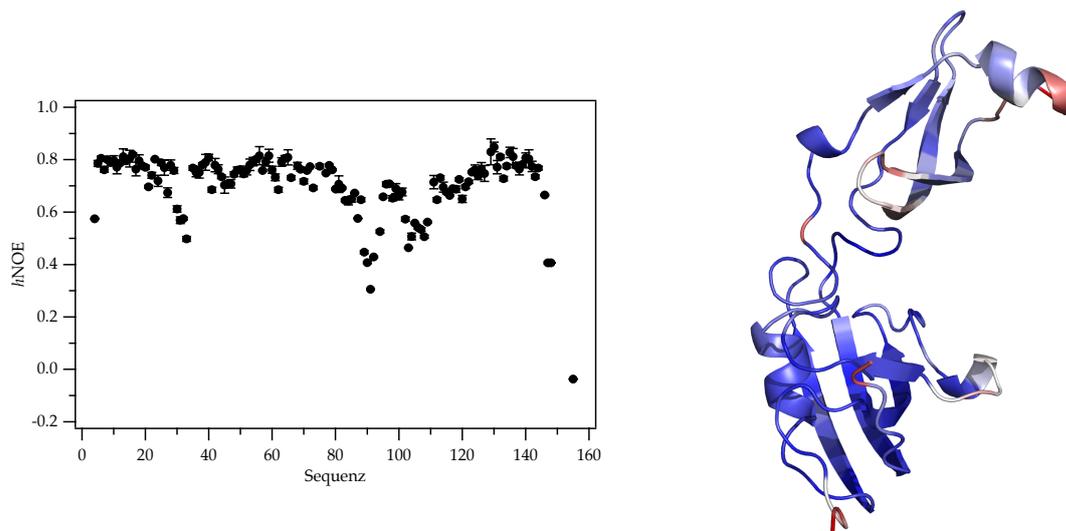


Abb. 3.14.: Heteronuklearer NOE von *EcSlpA*, bei $T = 298\text{ K}$ und an $B_0 = 18.8\text{ T}$. Besonders die Sequenzbereiche um N30, A90 und D105 zeigen einen deutlich reduzierten $h\text{NOE}$ -Wert im Vergleich zum restlichen Protein. Der experimentelle Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung von drei aufeinanderfolgenden Experimenten. Die Farbcodierung des $h\text{NOE}$ -Wertes im Strukturbild verläuft von rot ($h\text{NOE} = 0.2$) über weiß ($h\text{NOE} = 0.5$) zu blau ($h\text{NOE} = 0.8$). Die Struktur von *EcSlpA* ist für den Sequenzbereich M1-E148 gezeigt. Der Sequenzbereich M1-L65 sowie P128-E148 bildet die FKBP-Domäne, die IF-Domäne umfasst den Sequenzbereich L75-F122.

pischen Techniken zeigen. Der Mittelpunkt der Entfaltung der isolierten und stabilisierten IF-Domäne unterscheidet sich stark vom Mittelpunkt der Entfaltung des entsprechenden stabilisierten Volllängenproteins. Damit konnte gezeigt werden, dass beide Domänen von *EcSlpA* in enger struktureller Beziehung zueinander stehen.

Bindungsstudien in atomarer Auflösung konnten keine sequentiell bevorzugte Position in *EcSlpA* für die Interaktion mit Substraten aufklären. Die aus diesen Bindungsstudien gefundene Affinität von *EcSlpA* zum Modells substrat RCM-T1 ist im Vergleich zu den in der Literatur bereits bekannten SlyD-Studien geringer [154, 126]. Ein Grund dafür ist das in *EcSlpA* im Vergleich zu *EcSlyD** fehlende β_{5a} -Faltblatt, welches an der Interaktion von RCM-T1 zu *EcSlyD** beteiligt ist. Dies liefert einen funktionellen Hinweis für die im Vergleich zu *EcSlyD** erniedrigte Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität von *EcSlpA*. Mit geringerer Affinität sinkt entsprechend die katalytische Effizienz k_{kat}/K_M .

Die intrinsische Dynamik von *EcSlpA* auf der ps-bis-ns-Zeitskala ist mit derjenigen von *EcSlyD** und *TtSlyD* grob vergleichbar [189]. Die Amide der IF-Domäne zeigen eine erhöhte Rückgratdynamik verglichen zu denen der FKBP-Domäne. Im Sequenzbereich um das bereits auffällige fehlende Sekundärstrukturelement β_{5a} der FKBP-Domäne von *EcSlpA* ist die Rückgratdynamik im Vergleich zur übrigen Domäne jedoch erhöht, auch verglichen zu sequenzhomologen Aminosäuren der beiden SlyD-Varianten. Damit kann der strukturelle Unterschied mit einer erhöhten Rückgratdynamik auf der schnellen

NMR-Zeitskala untermauert werden.

Die berechnete hochaufgelöste NMR-Struktur von *EcSlpA* ist allein nicht in der Lage, den Unterschied in der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität zu SlyD zu erklären. Es konnten zwar geringe strukturelle, funktionelle und auch dynamische Hinweise für die geringere Aktivität gefunden werden. Dennoch sind Experimente anzustreben, die auf der Zeitskala der Katalyse ablaufen (bekannter k_{kat} von *EcSlyD** für das Tetrapeptid: $k_{\text{kat}} \simeq 1 \text{ s}^{-1}$). Auch sind Dynamikmessungen eines substratgebundenen Komplexes auf der schnellen NMR-Zeitskala in der Lage, mögliche oder ausbleibende Änderungen ("Antwort") der Bewegungsamplituden der Rückgratotope zu detektieren und damit Rückschlüsse auf die Aktivität bzw. Funktion von *EcSlpA* zu ziehen.

3.2. Charakterisierung der Prolylisoimerase SlyD

3.2.1. Bindungsstudien

3.2.1.1. Interaktion zu Tat-Signalpeptiden

Eine Wechselwirkung zwischen dem unstrukturierten Tat-Signalpeptid und SlyD wurde erstmalig durch W. Graubner und Mitarbeiter gezeigt [162]. Während des Tat-Signalpeptid-abhängigen Transportes von gefalteten Substraten vom Cytoplasma zum Periplasma der *E. coli* Zellen, sorgt diese Wechselwirkung für den Schutz des Substrates und bewahrt es vor möglichem proteolytischen Abbau im Cytosol.

Die Wechselwirkung zwischen dem Tat-Signalpeptid (1-27, intrinsisches Fluorophor W an Position 21, s. Gl. (2.5.74)) und *EcSlyD** bzw. der verkürzten Variante *EcSlyD** Δ IF ist mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht worden. Die Abb. 3.15 (ausgefüllte Rechte-

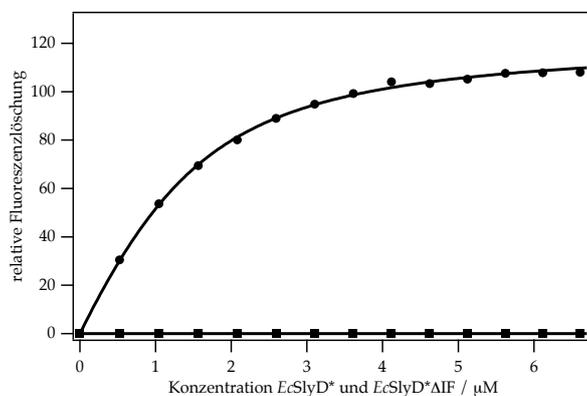


Abb. 3.15.: Fluoreszenztitration des Tat-Peptides (1-27) zu *EcSlyD** (ausgefüllte Kreise) und zu *EcSlyD** Δ IF (ausgefüllte Rechtecke) bei $T = 298$ K. Die Konzentration des Tat-Peptides (1-27) betrug am Titrationsanfang $c = 1 \mu$ M und blieb während des Experimentes nahezu konstant. Die Messwerte sind unter Nutzung der Gl. (2.1.59) angepasst worden, mit $K_D = (400 \pm 80)$ nM und $n = (0.8 \pm 0.1)$.

ecke) zeigt eine starke Affinität des Peptides zu *EcSlyD** mit $K_D = (400 \pm 80)$ nM und einer Bindungsstöchiometrie von $n = (0.8 \pm 0.1)$. Dagegen zeigt das Tat-Peptid (1-27) keine Affinität zu einer Variante ohne IF-Domäne (*EcSlyD** Δ IF, ausgefüllte Rechtecke in Abb. 3.15). Ob tatsächlich nur die IF-Domäne von *EcSlyD** an der Wechselwirkung zum Tat-Peptid beteiligt ist, ist mittels NMR-Spektroskopie untersucht worden. Da das Tat-Peptid (1-27) eine niedrige Löslichkeitsgrenze besitzt, ist für eine vollständige NMR-Titration mit einer verkürzten Variante gearbeitet worden (Tat-Peptid (1-17), s. Gl. (2.5.75)).

Dazu sind mit ansteigender Peptidkonzentration ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -markiertem Protein aufgenommen und analysiert worden. Die Interaktionsstelle des Tat-Peptides (1-17) sowohl mit *EcSlyD** als auch mit *TtSlyD* ist vorrangig in der IF-Domäne beider Proteine zu suchen (Abb. 3.16 und deren strukturelle Wiedergabe in Abb. 3.17).

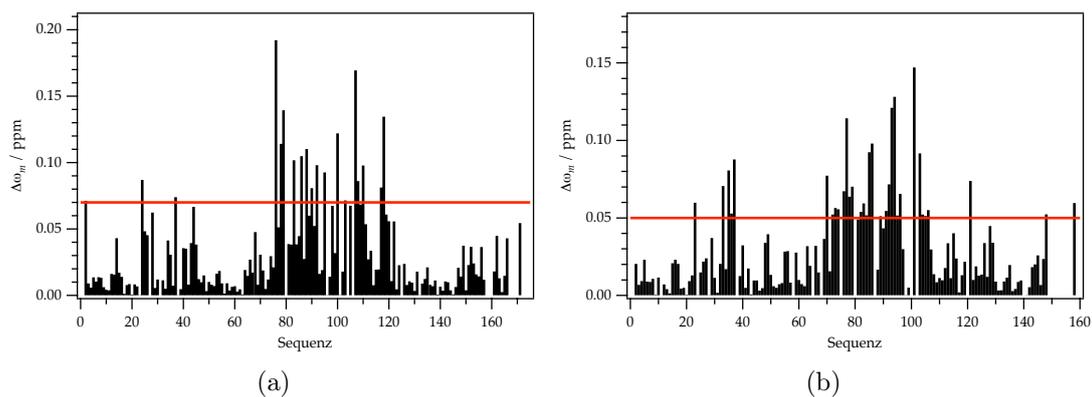


Abb. 3.16.: Endpunktanalyse der NMR-Titration des Tat-Peptides (1-17) zu *EcSlyD** (a) bzw. zu *TtSlyD* (b). Beide Titrations wurden an $B_0 = 14.1$ T und bei $T = 298$ K durchgeführt. Der Titrationsendpunkt betrug $0.73 \text{ mM} : 0.36 \text{ mM}$ (a) bzw. $0.60 \text{ mM} : 0.48 \text{ mM}$ (b), jeweils [Tat-Peptid (1-17)]:[Protein]. Die rote horizontale Linie markiert die Trennlinie für diejenigen Aminosäuren, die signifikant am Bindungsprozess beteiligt sind.

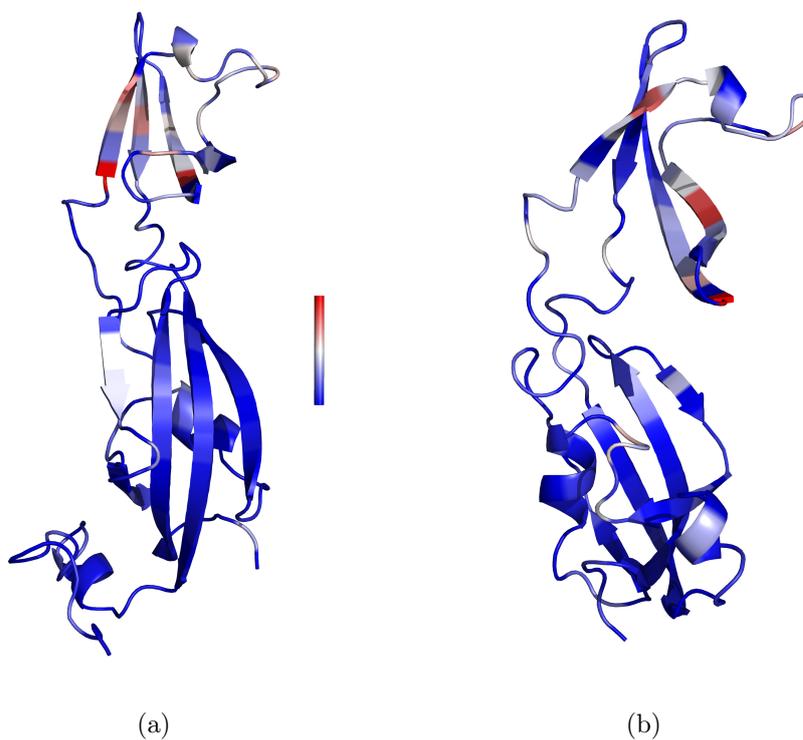


Abb. 3.17.: Strukturelle Wiedergabe des Endpunktes $\Delta\omega_m$ der NMR-Titration des Tat-Peptides (1-17) zu *EcSlyD** (a) bzw. zu *TtSlyD* (b). Die Farbskala verläuft von blau ($\Delta\omega_m=0$ ppm) über weiß ($\Delta\omega_m=0.1$ ppm für (a) bzw. $\Delta\omega_m=0.075$ ppm für (b)) zu rot ($\Delta\omega_m=0.2$ ppm für (a) bzw. $\Delta\omega_m=0.15$ ppm für (b)).

Die Aminosäuren der jeweiligen IF-Domäne zeigen die stärksten Änderungen der chemischen Verschiebungen durch die Zugabe des Tat-Peptides (1-17). Für jeden Titrationspunkt sind die jeweiligen $\Delta\omega^{\text{all}}$ -Werte nach Gl. (2.1.57) berechnet worden. Für die am stärksten im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum verschobenen Aminosäuren von *EcSlyD** und *TtSlyD* sind die von der Peptidkonzentration abhängigen Verläufe von $\Delta\omega^{\text{all}}$ in Abb. 3.18 dargestellt. Mit einer globalen Anpassung der Gl. (2.1.59) an die $\Delta\omega^{\text{all}}$ -Werte konnte die

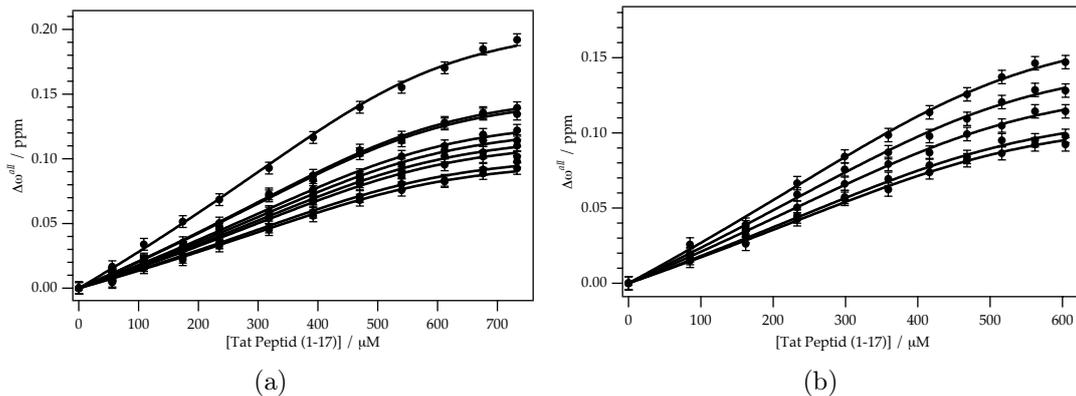


Abb. 3.18.: Verlauf der individuellen $\Delta\omega^{\text{all}}$ -Werte von *EcSlyD** (a) bzw. von *TtSlyD* (b) in Abhängigkeit von der Konzentration des Tat-Peptides (1-17) für die am stärksten im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum beeinflussten Kreuzsignale. Eine globale Datenanalyse nach Gl. (2.1.59) für V76, R78, V79, V83, D88, R95, T100, T110 und A111 aus (a) ergibt $K_D = (50 \pm 20) \mu\text{M}$ und $n = 0.93 \pm 0.01$, für V73, E81, A83, A89 und D95 aus (b) folgt $K_D = (65 \pm 40) \mu\text{M}$ und $n = 1.08 \pm 0.02$.

Affinität des Tat-Peptides (1-17) zu *EcSlyD** mit $K_D = (50 \pm 20) \mu\text{M}$ und einer Bindungsstöchiometrie $n = 0.93 \pm 0.01$ bestimmt werden. Für *TtSlyD* beträgt die Bindungsaffinität $K_D = (65 \pm 40) \mu\text{M}$ und die Bindungsstöchiometrie $n = 1.08 \pm 0.02$. Verglichen zur Fluoreszenztitration von *EcSlyD** zum Tat-Peptid (1-27) ist die Bindungsstöchiometrie n unverändert, die Bindungsaffinität ist für das kürzere Peptid (1-17) im Vergleich zum Peptid (1-27) aber um zwei Größenordnungen herabgesetzt. Trotz dieser unterschiedlichen Bindungsaffinitäten weisen auch die NMR-Titrationsexperimente auf die IF-Domäne als (hauptsächlichen) Wechselwirkungsort zwischen dem Tat-Signalpeptid und *EcSlyD** bzw. *TtSlyD* (s. Abb. 3.16) hin.

Um eine direkte Wechselwirkung zwischen der FKBP-Domäne und dem Signalpeptid auszuschließen, ist als Kontrollexperiment und als Vergleich zur Fluoreszenzmessung (s. Abb. 3.15) eine NMR-Zweipunkttitration des Tat-Peptides (1-27) an ^{15}N -markiertem *TtSlyD* ΔIF durchgeführt worden.

Die Komplexprobe ist bis zu einer Peptid- bzw. Proteinkonzentration von $c^{\text{Pep}} = 73.5 \mu\text{M}$ bzw. $c^{\text{Prot}} = 63.5 \mu\text{M}$ aufkonzentriert und nachfolgend mit einem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum vermessen worden. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Kreuzsignale $\Delta\omega_m$ von *TtSlyD* ΔIF liegen alle unterhalb der Trennlinie von $\Delta\omega_m = 0.05 \text{ ppm}$ (s. Abb. 3.19). Dieser Wert ist für die Auswertung der Tat-Peptid (1-17)- Titration an *TtSlyD* gewählt worden (s. Abb. 3.16 (b)). Damit kann eine Wechselwirkung der zehn zusätzli-

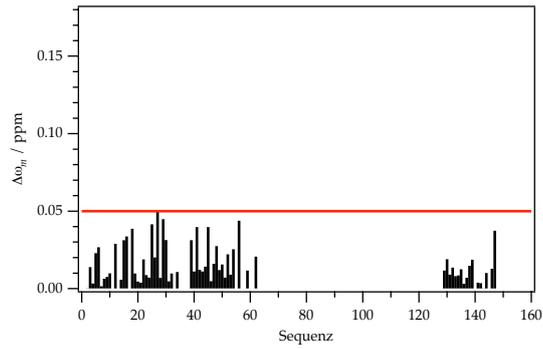


Abb. 3.19.: Endpunktanalyse der NMR-Titration des Tat-Peptides (1-27) zu *TtSlyDΔIF*. Die Titration wurde an $B_0 = 18.8\text{ T}$ und bei $T = 298\text{ K}$ durchgeführt, mit dem Titrationsendpunkt (73.5 : 63.5) μM ([Tat Peptid (1-27)]:[*TtSlyDΔIF*]). Alle Aminosäuren von *TtSlyDΔIF* zeigen eine Änderung der chemischen Verschiebung $\Delta\omega_m \leq 0.05\text{ ppm}$ (rote horizontale Trennlinie).

chen Aminosäuren des längeren Peptides mit der FKBP-Domäne ausgeschlossen werden, trotz erhöhter Bindeaffinität im Vergleich zum Tat-Peptid (1-17).

3.2.1.2. Interaktion zu PPlasen-Inhibitoren

Da die FKBP-Domäne von SlyD strukturell einer typischen PPIase entspricht, ist mittels Fluoreszenz- und NMR-Spektroskopie die Interaktion von Inhibitoren der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität zu *TtSlyD* und *TtSlyD* Δ IF untersucht worden. Temperaturabhängige Fluoreszenztitrationen von FK506 und Rapamycin zu *TtSlyD* und *TtSlyD* Δ IF im Gleichgewicht zeigen eine Affinität $K_D \simeq \mu\text{M}$. Die Δ IF-Variante von *TtSlyD* zeigt eine stärkere Affinität zu den Inhibitoren als die Vollängenvariante, bei gleichbleibender Stöchiometrie von $n = 2$ (Rapamycin) bzw. $n = 1$ (FK506). Die Tab. 3.3 stellt die Ergebnisse für die Affinitäten dieser temperaturabhängigen Bindungsstudie zusammen, die sich aus der Regression der Gl. (2.1.59) an die Messwerte ergeben.

T / K	<i>TtSlyD</i>		<i>TtSlyD</i> Δ IF	
	Rapamycin	FK506	Rapamycin	FK506
285.5	3.7 \pm 0.2	3.3 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1
298.2	9.2 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	0.20 \pm 0.05
323.2	5.7 \pm 0.1	2.7 \pm 0.5	3.3 \pm 0.2	1.3 \pm 1.2

Tab. 3.3.: K_D -Werte (in μM) für die temperaturabhängige Bindungsstudie der PPIase-Inhibitoren an *TtSlyD* und *TtSlyD* Δ IF. Die verwendete Proteinkonzentration betrug $c = 5 \mu\text{M}$. Die Inhibitoren wurden hochkonzentriert in DMSO gelöst, sodass die Proteinverdünnung während des Experimentes weniger als 5 % betrug.

Aus diesen Affinitätswerten lässt sich ein negativer Einfluss der IF-Domäne auf die Bindung der Inhibitoren zum Wildtypprotein *TtSlyD* ableiten, der sich durch ein weiteres Experiment noch verstärken lässt. Dazu ist *TtSlyD* das Tat-Peptid (1-27) als Bindungspartner vorgelegt worden (Wechselwirkung von Tat-Pepitd (1-27) erfolgt nur mit der IF-Domäne von *TtSlyD*, s. Abschnitt 3.2.1.1). Eine Fluoreszenztitration von Rapamycin zu diesem Komplex ergibt eine etwa fünffach erniedrigte Affinität im Vergleich zu freiem *TtSlyD* (s. Abb. 3.20).

Zeitaufgelöste Fluoreszenztitrationen geben die Kinetik des Bindeprozesses wieder (s. Abschnitt 2.1.2.2). Dazu ist mit Hilfe der *stopped-flow*-Technik temperaturabhängig die Fluoreszenzlöschung, die durch Rapamycinbindung an *TtSlyD* und an *TtSlyD* Δ IF hervorgerufen wird, zeitaufgelöst aufgezeichnet worden. Eine Regression der Gl. (2.1.60) an die Fluoreszenzintensitäten ergibt die apparente Bindungsrate k_{app} .

Auch hier zeigen beide *TtSlyD*-Varianten ein unterschiedliches Verhalten. Die Vollängenvariante besitzt eine etwa dreifach geringere apparante Bindungsrate verglichen mit dem *TtSlyD* Δ IF-Konstrukt. Interessanterweise ergibt die Arrhenius-Auftragung der apparenten Bindungsraten für beide Varianten in etwa die gleiche Aktivierungsenergie für die Bindung von $E_A = (60 \pm 3) \text{kJmol}^{-1}$ (s. Abb. (3.21)).

Mit der Veränderung des Konzentrationsverhältnisses zwischen Rapamycin und dem jeweiligen Protein ist das Assoziations- bzw. Dissoziationsverhalten der Inhibitorbindung bestimmt worden. Die Auftragung der apparenten Bindungsraten über die Rapamycin-konzentration (s. Abb. 3.22) ergibt sowohl für *TtSlyD* als auch für *TtSlyD* Δ IF eine

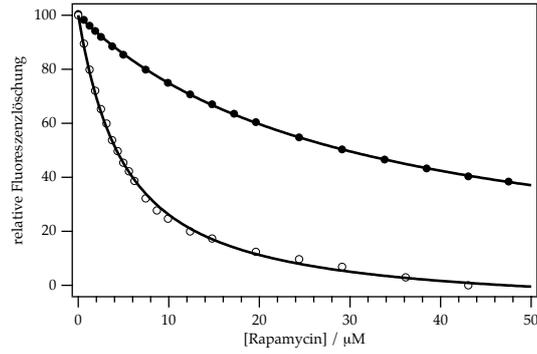


Abb. 3.20.: Fluoreszenztitration von Rapamycin zu *TtSlyD* (offene Kreise) bzw. zu Tat-Peptid (1-27)-gebundenen *TtSlyD*-Komplex (geschlossene Kreise), jeweils bei $T = 298$ K. Die Regression der Gl. (2.1.59) an die Fluoreszenzwerte ergibt: $K_D = (9.2 \pm 0.1) \mu\text{M}$ (freie Form) bzw. $K_D = (58 \pm 1) \mu\text{M}$ (Tat-Peptid (1-27)- gebundener Komplex). Die Bindungsstöchiometrie beträgt jeweils $n = 2$.

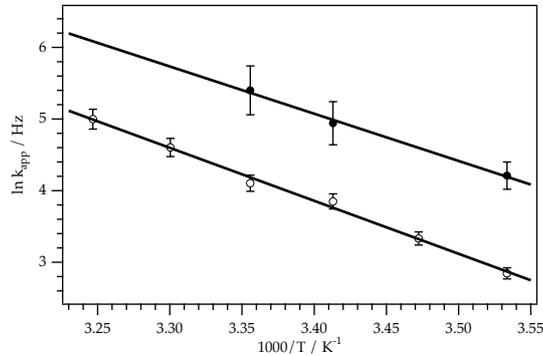


Abb. 3.21.: Halblogarithmische Darstellung der apparenten Bindungsrate k_{app} von Rapamycin zu *TtSlyD* (offene Kreise) und *TtSlyD* Δ IF (geschlossene Kreise) in Abhängigkeit von der inversen Temperatur. Eine Arrhenius-Analyse (s. Gl. (2.1.61)) ergibt für beide Varianten eine Aktivierungsenergie von $E_A = (60 \pm 3) \text{kJmol}^{-1}$. Die Bindungsreaktion ist jeweils mit einem zehnfachen Überschuss der Rapamycinkonzentration bzgl. der Proteinkonzentration ($c^{\text{Prot}} = 2 \mu\text{M}$) initiiert worden.

Dissoziationsrate $k_{\text{diss}} \simeq 25 \text{s}^{-1}$.

Die Rapamycinassoziation k_{ass} ist dagegen sehr sensitiv zu der verwendeten Proteinvariante. Die Rate für das Wildtypprotein ist etwa siebenfach geringer als für die der IF-Domänenfreien Variante (s. Abb. 3.22). Die Annahme einer Reaktion erster Ordnung und einer Bindungsstöchiometrie von $n = 2$ für die Rapamycinbindung an *TtSlyD* bzw. *TtSlyD* Δ IF wird durch den Vergleich der Dissoziationskonstanten K_D zwischen Gleichgewichts- und kinetischer Messung bestätigt. Der Quotient aus $k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$ beträgt für *TtSlyD*: $K_D = (11.4 \pm 0.5) \mu\text{M}$ (die Affinität aus der Gleichgewichtsmessung beträgt $K_D = (9.2 \pm 0.2) \mu\text{M}$, s. Tab. 3.3), für *TtSlyD* Δ IF: $K_D = (1.7 \pm 0.1) \mu\text{M}$ (die Affinität aus der Gleichgewichtsmessung beträgt $K_D = (1.7 \pm 0.1) \mu\text{M}$, s. Tab. 3.3).

Die zeitaufgelösten Experimente bestätigen den negativen Einfluss der IF-Domäne für die Bindung von Rapamycin an das Wildtypprotein *TtSlyD*, der in den Gleichgewichts-

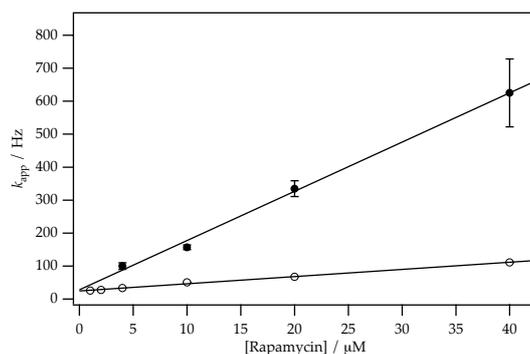


Abb. 3.22.: Auftragung der apparenten Bindungsraten von Rapamycin zu $TtSlyD$ (offene Kreise) bzw. zu $TtSlyD\Delta IF$ (geschlossene Kreise) über die Rapamycinkonzentration. Bei identischer Dissoziation von $k_{\text{diss}} = 25 \text{ s}^{-1}$ beträgt die Rapamycinassoziation $k_{\text{ass}} = (2.2 \pm 0.1) \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($TtSlyD$) bzw. $k_{\text{ass}} = (14.9 \pm 0.7) \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($TtSlyD\Delta IF$). Die Experimente wurden bei $T = 298 \text{ K}$ durchgeführt, die Proteinkonzentration betrug jeweils $c^{\text{Prot}} = 2 \mu\text{M}$.

messungen gefunden wurde. Ferner legen die Ergebnisse nahe, dass die IF-Domäne von $TtSlyD$ keine Bindestelle für die PPIase-Inhibitoren FK506 und Rapamycin besitzt. Ein mögliches Erklärungsmodell besteht darin, dass die IF-Domäne von $TtSlyD$ die Bindestelle für den Inhibitor blockiert, sodass die Assoziation und damit die Affinität für den Inhibitor herabgesetzt wird.

Mit NMR-Titrationsexperimenten ist die Bindestelle von FK506 und Rapamycin zu $TtSlyD$ in atomarer Auflösung untersucht worden. Dazu sind mit ansteigender Inhibitorkonzentration ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -markiertem $TtSlyD$ aufgenommen worden.

Die Abb. 3.23 gibt den Titrationsverlauf zwischen Rapamycin und $TtSlyD$ für einen Ausschnitt des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums wieder. Die Analyse der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren ergibt einen langsamen chemischen Austausch zwischen $TtSlyD$ und dem Rapamycin+ $TtSlyD$ -Komplex (s. Abschnitt 2.1.1.2.2). Für die an der Rapamycinbindung beteiligten Aminosäuren ist somit eine neue Zuordnung notwendig, da diese während der Titration nicht von einem Schritt zum nächsten Schritt übernommen werden kann. Darauf ist im Rahmen dieser Arbeit verzichtet worden.

Alle Aminosäuren von $TtSlyD$, die an der Bindung zu Rapamycin bzw. FK506 beteiligt sind, sind in der Abb. 3.24 rot eingefärbt. Dies sind (bis auf N99) ausschließlich Aminosäuren der FKBP-Domäne von $TtSlyD$. Die beiden durchgeführten NMR-Titrationen können nicht ausschließen, dass N99 mit dem jeweiligen Inhibitor wechselwirkt. Ob dieses einzelne Kreuzsignal durch Bindung an den Inhibitor oder durch eine Konformationsänderung, die durch die Bindung an einer anderen Sequenzposition hervorgerufen wird, verschwindet, kann nur durch die Existenz oder das Fehlen von intermolekularen NOEs geklärt werden [121]. Dennoch kann eine direkte Inhibitorbindung an N99 von $TtSlyD$ als eher unwahrscheinlich gelten, da in der unmittelbaren sequentiellen Nachbarschaft von N99 keine weiteren Aminosäuren auf FK506 bzw. Rapamycin sensitiv sind.

Eine Kontrolltitration von DMSO an $TtSlyD$ zeigte keine Beeinflussung der im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum detektierbaren Kreuzsignale (s. Abb. A.11 im Anhang A.13).

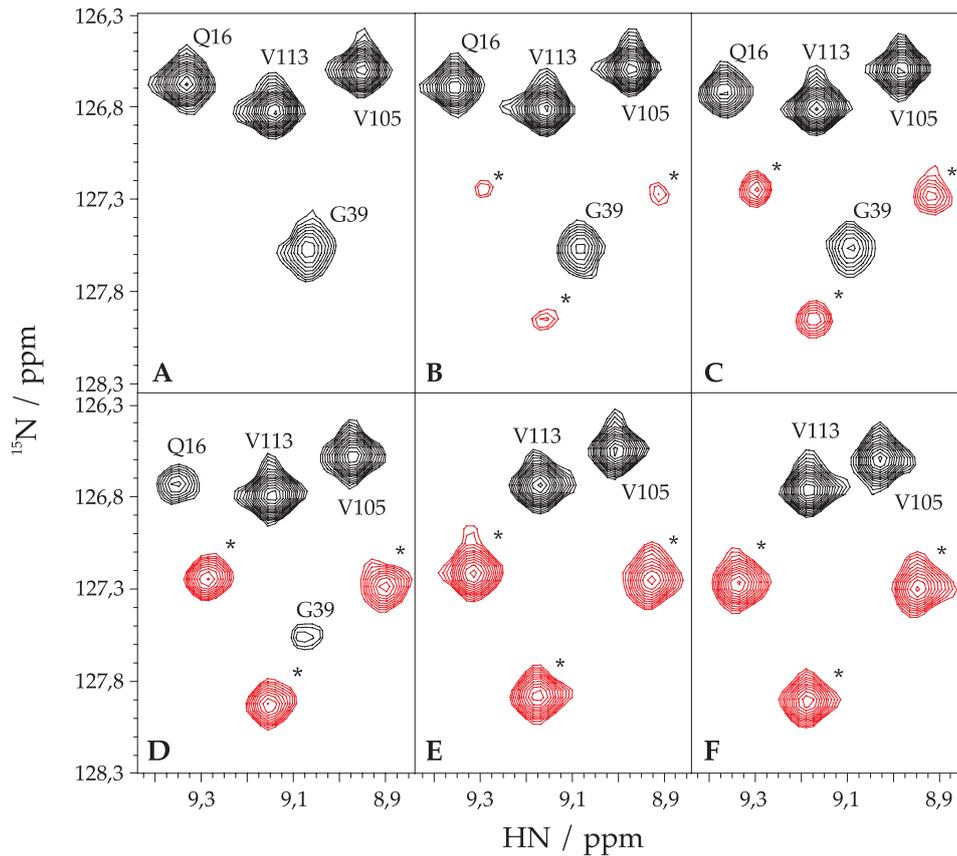


Abb. 3.23.: Repräsentativer Ausschnitt des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums von *TtSlyD* mit ansteigender Rapamycinkonzentration. Die beiden Aminosäuren Q16 und G39 (jeweils FKBP-Domäne) sind an der Rapamycinbindung beteiligt, V105 und V113 (jeweils IF-Domäne) nicht (langsamer chemischer Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand, s. Abschnitt 2.1.1.2.2). Das stöchiometrische Verhältnis zwischen *TtSlyD* und Rapamycin lautet: $n = 0$ (**A**), $n = 0.11$ (**B**), $n = 0.23$ (**C**), $n = 0.45$ (**D**), $n = 0.75$ (**E**) und $n = 1.13$ (**F**). Die roten Kreuzsignale charakterisieren den Rapamycin-gebundenen Zustand von *TtSlyD*. *: keine Zuordnung vorhanden. Die Titration erfolgte an $B_0 = 14.1$ T und bei $T = 298$ K.

3.2.2. Translationsdiffusion

Mit der experimentellen Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D der Translation und damit einhergehend mit dem hydrodynamischen Radius r_H können Aussagen über die Größe und die Form des untersuchten Moleküls getroffen werden [112, 116]. Unter Nutzung des in Abschnitt 2.1.1.4 vorgestellten stimulierten Echo-Experimentes mit bipolaren Gradienten ist der Diffusionskoeffizient von verschiedenen SlyD-Varianten und von humanem FKBP12 (s. Abb. 3.4 (b)) bestimmt worden. Die Abb. 3.25 stellt exemplarisch das Diffusionsprofil für *EcSlyD** (Rechtecke) und *TtSlyD* (Kreise) dar. In der Tab. 3.4 sind die Ergebnisse für alle durchgeführten Diffusionsmessungen aufgelistet.

Interessanterweise zeigen die Zweidomänenproteine auf der einen und die Eindomänenvarianten auf der anderen Seite ein konträres Diffusionsverhalten. Sowohl *EcSlyD** als auch *TtSlyD* besitzen einen kleineren Diffusionskoeffizienten als man für ein globulär gefaltetes

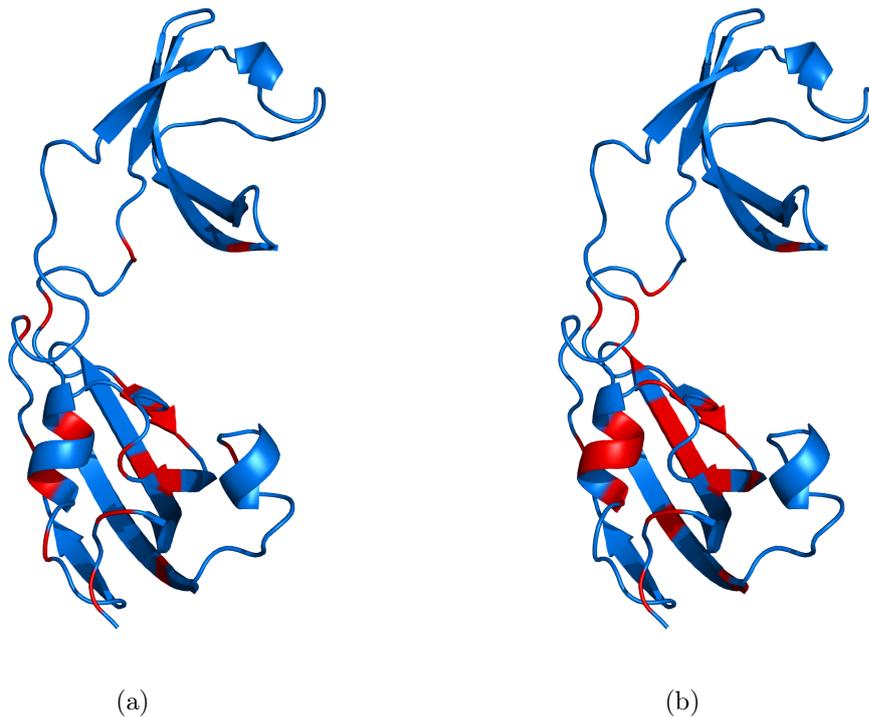


Abb. 3.24.: Strukturelle Wiedergabe der durch die Inhibitorbindung (Rapamycin in (a) und FK506 in (b)) beeinflussten Aminosäuren von *TtSlyD*. Die in rot eingefärbten Aminosäuren zeigen während der NMR-Titration eine Wechselwirkung zum jeweiligen Inhibitor.

Protein dieser Größe erwarten würde (vgl. Gl. (2.1.48)). Dagegen zeigen *EcSlyD** Δ IF, *TtSlyD* Δ IF und das strukturell stark verwandte *hFKBP12* einen jeweils größeren Diffusionskoeffizienten verglichen zum theoretisch zu erwartenden Wert. Die Anwesenheit der IF-Domäne in *EcSlyD** und *TtSlyD* führt somit sehr stark zur Verlangsamung der Translationsdiffusion. Aus dem empirisch in [116] gefundenen Zusammenhang zwischen der Größe und dem hydrodynamischen Radius einer Polypeptidkette (Vergleich zwischen Gl. (2.1.48) und Gl. (2.1.49)) ist ersichtlich, dass eine entfaltete Kette (hohe intrinsische Dynamik) langsamer diffundiert im Vergleich zu einer gefalteten Struktur, die die gleiche Anzahl an Aminosäuren besitzt.

Die Ergebnisse der Diffusionsstudie verschiedener SlyD-Varianten und deren Vergleich zu dem FKBP-Domänen homologen Protein *hFKBP12* lassen eine erhöhte intrinsische Dynamik der Aminosäuren der IF-Domäne im Vergleich zu denen der FKBP-Domäne vermuten. Eine aminosäurespezifische Relaxationsstudie von *EcSlyD** und *TtSlyD* mit anschließender Lipari & Szabo-Analyse ist nun in der Lage, Werte für die lokale Bewegungsamplitude jedes einzelnen Amidprotonenvektors anzugeben. Die Ergebnisse der Diffusionsstudie lassen eine erhöhte intrinsische Dynamik der Aminosäuren der IF-Domäne im Vergleich zu denen der FKBP-Domäne vermuten.

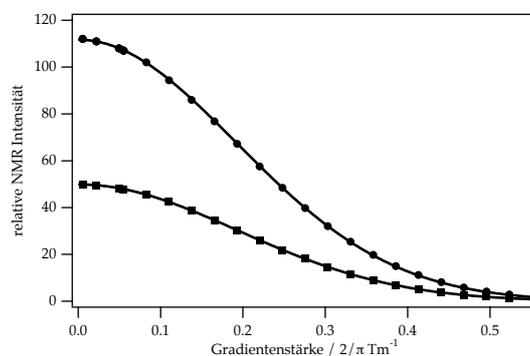


Abb. 3.25.: Abhängigkeit der integrierten NMR-Intensität im Frequenzbereich $^1\text{H} = (0.5 \dots 2.5)$ ppm des Protonenspektrums von der angelegten Gradientenstärke. Ausgefüllte Rechtecke (*EcSlyD**) bzw. Kreise (*TtSlyD*) stellen die jeweiligen Messwerte dar, die durchgezogene Linie die Regression anhand Gl. (2.1.45) unter Vernachlässigung des Relaxationstermes.

Molekül	N	D^{ali}	D^{aro}	D^{th}	D/D^{th}
<i>EcSlyD*</i>	171	9.83 ± 0.04	9.96 ± 0.05	10.3	96 %
<i>EcSlyD*</i> Δ IF	124	11.81 ± 0.36	11.86 ± 0.02	11.4	104 %
<i>TtSlyD</i>	154	9.97 ± 0.09	10.37 ± 0.12	10.6	96 %
<i>TtSlyD</i> Δ IF	111	14.53 ± 0.19	14.89 ± 0.20	11.7	126 %
<i>hFKBP12</i>	113	13.16 ± 0.08	13.20 ± 0.10	11.7	113 %

Tab. 3.4.: Diffusionsanalyse für verschiedene SlyD-Varianten und *hFKBP12*. D ist in $10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ angegeben. Die Integration der Diffusionsprofile erfolgte im aliphatischen Bereich (ali, $^1\text{H} = (0.5 \dots 2.5)$ ppm) bzw. dem der Amidprotonen (aro, $^1\text{H} = (6.5 \dots 8.5)$ ppm). N : Anzahl der Aminosäuren, D^{th} : theoretischer Diffusionskoeffizient eines globulären Proteins, das die gleiche Anzahl an Aminosäuren besitzt [116] (mit Gl. (2.1.47), (2.1.48) berechnet). Die Viskosität der Messlösung ist mit einem Kapillarrheometer zu $\eta = 1.00 \text{ mPas}$ bestimmt worden. Alle Messungen erfolgten an $B_0 = 14.1 \text{ T}$ und bei $T = 298 \text{ K}$.

3.2.3. Rückgratdynamik

Die NMR-Spektroskopie stellt für verschiedene Zeitskalen definierte Experimente zur Verfügung, die die Dynamik des untersuchten Moleküls in atomarer Auflösung detektieren (vgl. Abb. 2.2 u. Abschnitt 2.1.1.2). In den folgenden Punkten steht das Relaxationsverhalten des Amidprotonenvektors jeder einzelnen Aminosäure auf der ps-bis-ns- bzw. der μ s-bis-ms-Zeitskala im Vordergrund. Es sind sowohl Experimente im freien Zustand von *TtSlyD* und *EcSlyD** als auch im Tat-Peptid (1-17)- sowie Inhibitor-gebundenem Zustand durchgeführt worden.

3.2.3.1. Relaxationsverhalten des freien Zustandes auf der ps-bis-ns Zeitskala

Für eine intensive Relaxationsstudie sind sowohl für *EcSlyD** als auch für *TtSlyD* die longitudinalen und transversalen Relaxationsraten der ^{15}N -Kerne sowie der ^1H - ^{15}N -*hNOE*-Wert temperaturabhängig aufgenommen worden, unter Nutzung der in den Abb. 2.5 - 2.7 vorgestellten Pulsprogramme. Für *EcSlyD** konnten 136, 141, 137 und 141 von 159 Aminosäuren (Proline abgezogen) bei $T = 288\text{ K}$, 293 K , 298 K und 303 K ausgewertet werden. Innerhalb dieses Temperaturbereiches ist *EcSlyD** vollständig nativ [125].

Für *TtSlyD* konnten 125, 124, 130, 124 und 121 Amidprotonenvektoren des Proteinerückgrates (Proline abgezogen) bei $T = 288\text{ K}$, 298 K , 303 K , 313 K und 333 K ausgewertet werden. Innerhalb dieses Temperaturbereiches ist *TtSlyD* vollständig nativ [126]. Die Relaxationsstudie beider Proteine erfolgte an $B_0 = 14.1\text{ T}$.

Die Abb. 3.26 stellt den Verlauf aller drei Relaxationsparameter über die Aminosäuresequenz von *EcSlyD** bei $T = 298\text{ K}$ dar. In der Abb. A.12 im Anhang A.14 ist der Verlauf von R_1 , R_2 und dem *hNOE*-Wert für *EcSlyD** bei $T = 288\text{ K}$, 293 K und 303 K gezeigt.

Unter den vier genutzten Temperaturen geben alle drei Relaxationsparameter die Domänenarchitektur von *EcSlyD** wieder. Die longitudinalen Relaxationsraten R_1 (s. Abb. 3.26 (a)) der IF-Domäne sind etwa 1.5fach größer als diejenigen der FKBP-Domäne und des Linkerbereiches (Verbindung zwischen FKBP- und IF-Domäne, in Abb. 2.29 orange eingefärbt). Die größten R_1 -Werte besitzt der unstrukturierte C-Terminus mit etwa $R_1 = 2\text{ Hz}$.

Die transversalen Relaxationsraten R_2 (s. Abb. 3.26 (b)) zeigen ein gegensätzliches Verhalten. Diese sind innerhalb der IF-Domäne niedriger ($R_2 \simeq 10\text{ Hz}$) als innerhalb der FKBP-Domäne und des C-Terminus' ($R_2 \simeq 20\text{ Hz}$).

Die *hNOE*-Werte (s. Abb. 3.26 (c) u. 3.27) zeigen ergänzend zu R_1 und R_2 , dass die beiden Domänen einem unterschiedlichen Relaxationsverhalten unterliegen. Innerhalb der IF-Domäne sinken die *hNOE*-Werte auf 0.2, demgegenüber weist die FKBP-Domäne ausschließlich *hNOE*-Werte ≥ 0.6 auf. Die theoretische Obergrenze des *hNOE*-Wertes für ein Molekül, das eine Rotationskorrelationszeit von $\tau_c = 14\text{ ns}$ besitzt, beträgt $hNOE = 0.83$ an $B_0 = 14.1\text{ T}$ (s. Abb. 2.8). Viele Rückgratamide der FKBP-Domäne besitzen diesen Grenzwert.

Die Tab. 3.5 gibt die 10 % getrimmten Mittelwerte von R_1 , R_2 und des *hNOE*-Wertes für *EcSlyD** für den gesamten Temperaturbereich an. Der Temperaturverlauf von R_1 und

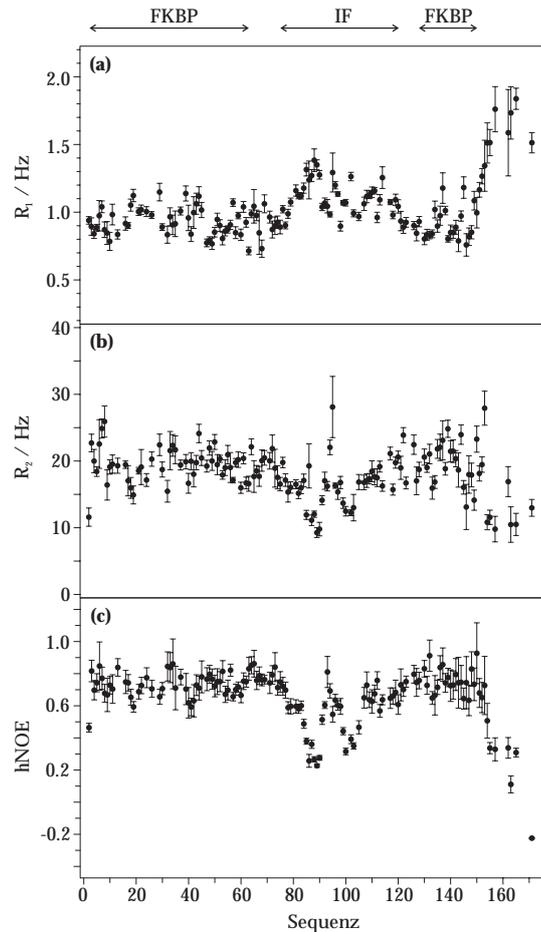


Abb. 3.26.: Longitudinale Relaxationsrate R_1 (a), transversale Relaxationsrate R_2 (b) und heteronuklearer NOE-Wert (c) für *EcSlyD** bei $T = 298$ K und an $B_0 = 14.1$ T. Die Sequenzbereiche der FKBP-Domäne (K2-V62, Q128-G150) und der IF-Domäne (L75-D120) sind oberhalb des Graphen bezeichnet.

R_2 folgt streng der Theorie für ein Molekül der Rotationskorrelationszeit von *EcSlyD** [190]. Der 10 % getrimmte Mittelwert des $hNOE$ -Wertes ist nicht temperaturabhängig. Der Unterschied der $hNOE$ -Werte zwischen der IF- und der FKBP-Domäne von *TtSlyD* (s. Abb. A.13 (c) im Anhang A.15) bestätigt die Zwei-Domänenstruktur, die mittels Röntgenkristallographie gefunden wurde [126]. Jedoch sind die Unterschiede der $hNOE$ -Werte und auch der R_1 -, R_2 -Werte (s. Abb. A.13 (a),(b) in A.15) zwischen den beiden Domänen schwächer als bei *EcSlyD** ausgeprägt.

Der temperaturabhängige Verlauf der 10 % getrimmten Mittelwerte der drei Relaxationsparameter ist qualitativ mit denen von *EcSlyD** vergleichbar und ist in Tab. 3.6. angegeben.

3.2.3.2. Lipari & Szabo-Analyse der Relaxationsparameter

Die Gesamtbewegung eines Proteinmoleküls kann mit der Rotationskorrelationszeit τ_c beschrieben werden. Eine detaillierte Analyse von τ_c und der Rückgratdynamik von

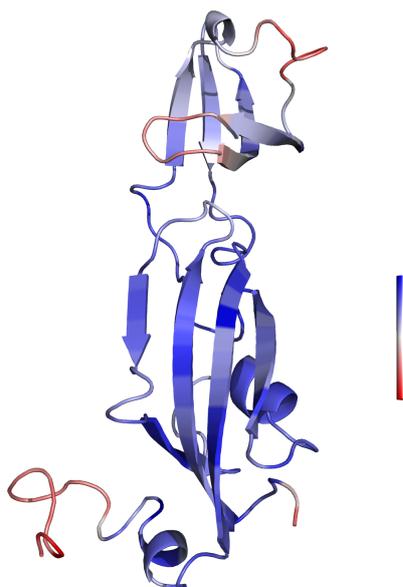


Abb. 3.27.: Strukturelle Wiedergabe des heteronuklearen NOEs von *EcSlyD** bei $T = 298$ K und an $B_0 = 14.1$ T. Die Farbskala verläuft von rot ($h\text{NOE} = 0.1$) über weiß ($h\text{NOE} = 0.55$) zu tiefblau ($h\text{NOE} = 0.9$).

	288 K	293 K	298 K	303 K
R_1 / Hz	0.73	0.83	0.99	1.04
R_2 / Hz	23.5	20.5	17.9	15.8
$h\text{NOE}$	0.64	0.67	0.69	0.68

Tab. 3.5.: 10 % getrimmte Mittelwerte von R_1 , R_2 und $h\text{NOE}$ für *EcSlyD** für vier verschiedene Temperaturen. Die Daten wurden an $B_0 = 14.1$ T aufgenommen.

*EcSlyD** und *TtSlyD* ist mit dem Ansatz von Lipari & Szabo [129] erfolgt (s. Abschnitt 2.2). Dazu sind die gemessenen Relaxationsdaten R_1 , R_2 und $h\text{NOE}$ genutzt und an die fünf Modelle (s. Gl. (2.2.66)–(2.2.70)) der spektralen Leistungsdichtefunktion $J_i(\omega)$ mit dem Softwarepaket MODELFREE 4.22 [131] angepasst worden.

Sowohl für *EcSlyD** als auch für *TtSlyD* ist mit einem axialsymmetrischen Modell für die Beschreibung des Gesamtmoleküls gerechnet worden. Die für diese Rechnung notwendigen Startparameter für τ_c , dem Verhältnis der Diffusionsachsen D_{\parallel}/D_{\perp} sowie den beiden Polarwinkeln θ und ϕ , sind mit der Software TENSOR2 [191] anhand der bekannten Proteinstrukturen bestimmt worden. Die Modellauswahl erfolgte nach dem in [132] beschriebenen Auswahlkriterium. Die an diese Publikation angelehnten Auswahlprogramme sind in MatLab geschrieben worden [134] (s. Anhang A.7). Die globale Rotationskorrelationszeit τ_c ist aus dem Verhältnis R_2/R_1 abgeschätzt worden [19]. Eine Korrektur von τ_c mit etwaigen R_{ex} -Beiträgen ist nach Y.-C. Li und G. T. Montelione vorgenommen worden [135].

Der berechnete Wert für τ_c nimmt mit ansteigender Temperatur (scheinbar) ab (s. Tab.

	288 K	298 K	303 K	313 K	333 K
R_1 / Hz	0.68	0.94	1.03	1.34	1.77
R_2 / Hz	24.4	17.5	15.0	12.3	8.4
$h\text{NOE}$	0.68	0.70	0.71	0.71	0.72

Tab. 3.6.: 10 % getrimmte Mittelwerte von R_1 , R_2 und $h\text{NOE}$ für *TtSlyD* für fünf verschiedene Temperaturen. Die Daten wurden an $B_0 = 14.1$ T aufgenommen.

T / K	τ_c / ns	τ_c/η^0 / ns	η / mPas
288	15.1±0.1	12.8	1.18
293	13.7±0.1	13.2	1.04
298	13.4±0.1	13.4	1.00
303	11.2±0.1	13.3	0.84

Tab. 3.7.: Ergebnisse für die Lipari & Szabo-Analyse von *EcSlyD** bei vier verschiedenen Temperaturen. Die Berechnung von η^0 erfolgte anhand: $\eta^0(T)=\eta(T=298\text{K})/\eta(T)$. Die Viskosität η der Messlösung ist mit einem Kapillarrheometer bestimmt worden.

3.7, 3.8). Bei $T = 288$ K besitzt *EcSlyD** einen Wert von $\tau_c = 15.1$ ns, der sich bei einer

T / K	τ_c / ns	τ_c/η^0 / ns	η / mPas
288	19.3±0.1	16.4	1.18
298	14.81±0.04	14.8	1.00
303	11.0±0.1	13.1	0.84
313	7.74±0.02	11.1	0.70
333	5.63±0.03	10.6	0.53

Tab. 3.8.: Ergebnisse für die Lipari&Szabo-Analyse von *TtSlyD* bei fünf verschiedenen Temperaturen. Die Berechnung von η^0 erfolgte anhand: $\eta^0(T)=\eta(T=298\text{K})/\eta(T)$. Die Viskosität η der Messlösung ist mit einem Kapillarrheometer bestimmt worden.

15 K höheren Temperatur auf $\tau_c = 11.2$ ns verringert. Die Korrektur der Lösungsmittelviskosität führt zu einer Rotationskorrelationszeit von $\tau_c \simeq 13$ ns für den gesamten Temperaturbereich.

Für *TtSlyD* konnte τ_c in einem Temperaturfenster von 45 Kelvin verfolgt werden. Die Rotationskorrelationszeit nimmt in diesem Bereich (scheinbar) etwa 4fach ab, von $\tau_c = 19.3$ ns (für $T = 288$ K) auf $\tau_c = 5.6$ ns (für $T = 333$ K). Hier führt die Viskositätskorrektur des Puffers zu τ_c -Werten, die zu höheren Temperaturen hin, im Gegensatz zu *EcSlyD**, abfallen und erst ab $T = 313$ K auf einem Plateau verharren.

Neben der Analyse der globalen Rotationskorrelationszeit τ_c erfolgte für *EcSlyD** und *TtSlyD* auch eine Analyse der Parameter der lokalen Bewegung der Amidprotonenvektoren des Proteinrückgrates, S^2 , τ_e und R_{ex} , für den gesamten Temperaturbereich. Für *EcSlyD** und $T = 298$ K sind diese drei Größen in Abb. 3.28 (a)-(c) dargestellt.

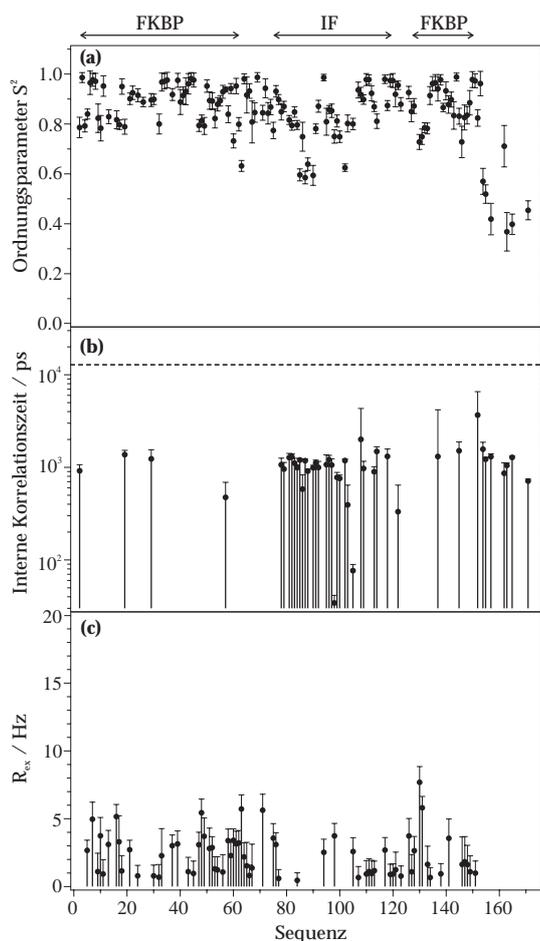


Abb. 3.28.: Ordnungsparameter S^2 (a), interne Korrelationszeit τ_e (b) und chemischer Austauschterm R_{ex} (c) für *EcSlyD** bei $T = 298$ K und an $B_0 = 14.1$ T. Die gestrichelte Linie in (b) gibt die Rotationskorrelationszeit τ_c der Gesamtmolekülbewegung von *EcSlyD** mit $\tau_c = 13.4$ ns an. Die Sequenzbereiche der FKBP-Domäne (K2-V62, Q128-G150) und der IF-Domäne (L75-D120) sind oberhalb des Graphen angegeben.

Über den gesamten Temperaturbereich zeigt die FKBP-Domäne von *EcSlyD** Ordnungsparameter $S^2 \geq 0.8$ und grenzt für die meisten Rückratamide der β -Faltblattbereiche an $S^2 = 1$. Die Amide des C-Terminus' (ab G150) erfahren große Amplituden der Bewegung mit $S^2 \leq 0.4$. Im unstrukturierten Bereich der IF-Domäne erfolgt ein Abfall des Ordnungsparameters von $S^2 = 0.95$ auf $S^2 = 0.6$. Nur einige wenige ^1H - ^{15}N -Vektoren der IF-Domäne zeigen Ordnungsparameter $S^2 \rightarrow 1$. Dies weist auf große Bewegungsamplituden des Proteinrückgrates innerhalb der IF-Domäne von *EcSlyD** hin.

Für *TtSlyD* gibt der Ordnungsparameter S^2 bei $T = 298$ K eine weniger klare Trennung zwischen der IF- und der FKBP-Domäne, im Vergleich zu *EcSlyD**, an. Dennoch besitzen nur zwei Amide der IF-Domäne von *TtSlyD* Werte von $S^2 \geq 0.9$ (s. Abb. A.14 (a) im Anhang A.16).

Die interne Korrelationszeit τ_e gibt Werte für diejenigen Amidprotonenvektoren an, die eine Bewegung zusätzlich zur Korrelationsbewegung τ_c des Gesamtproteins erfahren. Die Mehrheit der Amide innerhalb der IF-Domäne von *TtSlyD* und *EcSlyD** benötigen für eine zuverlässige Dateninterpretation Modelle innerhalb des gesamten genutzten

Temperaturbereiches, die diesen zusätzlichen internen Bewegungsanteil besitzen (s. Gl. (2.2.70)). Fast alle berechneten τ_e -Werte liegen eine Größenordnung unterhalb des Wertes, die die Korrelationszeit τ_c des Gesamtmoleküls angibt (gestrichelte Linie in Abb. 3.28 (b)) für *EcSlyD** u. in Abb. A.14 (b) für *TtSlyD*).

Mehrere Amide von *EcSlyD** zeigen bei $T = 298$ K einen chemischen Austauschanteil R_{ex} , der zusätzlich zur transversalen Relaxationsrate R_2 beiträgt (s. Abb. 3.28 (c) und Gl. (2.1.8)). Diese Beiträge deuten Bewegungen auf der ms-Zeitskala an. Nur wenige Amidprotonenvektoren der IF-Domäne, für deren Beschreibung eine interne Korrelationszeit τ_e notwendig ist (um die Sequenzbereiche V76, A111 und D120), zeigen Bewegungen auf dieser langsameren Zeitskala. Für *TtSlyD* sind im Vergleich zu *EcSlyD** die R_{ex} -Beiträge zur transversalen Relaxationsrate reduziert (bei $T = 298$ K). Für die meisten Amide beträgt der Austauschterm $R_{\text{ex}} \leq 2$ Hz (s. Abb. A.14 (c)). Diese berechneten Werte für R_{ex} von *EcSlyD** und *TtSlyD* stimmen sehr gut mit den direkt gemessenen Werten, die aus den Amplituden der ^{15}N -Relaxationsdispersionsexperimente folgen, überein (s. Abschnitt 3.2.3.4). Der Gesamtverlauf der R_{ex} -Beiträge ist sowohl für *EcSlyD** als auch für *TtSlyD* nicht temperaturabhängig. Dies ist in der Literatur für andere Proteine beschrieben worden, beispielhaft an der B1-Domäne vom *Streptococcal* Protein G [192]. Für die Lipari & Szabo-Analyse werden von *EcSlyD** die Modelle 1 und 3 (s. Gl. (2.2.66) und (2.2.68) in Abschnitt 2.2) innerhalb des gesamten Temperaturbereiches bevorzugt (s. Tab. 3.9). Für *TtSlyD* ist dies für Modell 3 der Fall, mit Ausnahme von Modell 1 für $T = 288$ K (s. Tab. 3.10).

Modell	288 K	293 K	298 K	303K
1	31	46	29	23
2	23	19	11	11
3	55	42	64	76
4	14	22	4	18
5	9	8	27	7

Tab. 3.9.: Modellverteilung der Rückgratamide von *EcSlyD** aus der Lipari & Szabo-Analyse.

Modell	288 K	298 K	303 K	313K	333 K
1	45	24	6	4	2
2	33	4	7	3	0
3	24	66	54	45	75
4	12	15	30	45	25
5	11	15	32	13	0

Tab. 3.10.: Modellverteilung der Rückgratamide von *TtSlyD* aus der Lipari & Szabo-Analyse.

Da in dieser Studie die Relaxation von SlyD sowohl eines thermophilen (*Thermus thermophilus*) als auch eines mesophilen Organismus' (*Escherichia coli*) in einem weiten

Temperaturbereich bestimmt worden ist, kann nun untersucht werden, ob die biochemischen und physiologischen Eigenschaften beider Organismen *in vitro* vergleichbar sind. Dies wird in der Literatur als "Physiologie einander entsprechender Zustände" bezeichnet [193, 194]. Dieser Vergleich kann in dieser Studie gezogen werden, da der in den Experimenten genutzte Temperaturbereich die Temperaturdifferenz überdeckt, die sich aus dem Unterschied zwischen den optimalen Wachstumstemperaturen beider Organismen ergibt ($\Delta T \simeq 30$ K zwischen *E. coli*. und *T. thermophilus*).

Die katalytische Effizienz von *TtSlyD* gegenüber Proteinsubstraten ist bei $T = 288$ K im Vergleich zu $k_{\text{kat}}/K_M = 0.82 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ von *EcSlyD** bei der gleichen Temperatur [154, 158] 2.8fach reduziert [126]. Die katalytische Effizienz von *TtSlyD* nähert sich bei $T = 303$ K derjenigen von *EcSlyD** an [181]. In diesem Temperaturbereich von $T = (288 \dots 303)$ K bleibt die viskositätskorrigierte Rotationskorrelationszeit τ_c/η^0 von *EcSlyD** nahezu konstant (s. Tab. 3.7). Diejenige von *TtSlyD* zeigt hingegen einen signifikanten Abfall und bleibt erst ab einer Temperatur von $T = 313$ K konstant (s. Tab. 3.8). Aus diesem Verhalten kann eine Korrelation zwischen $\tau_c/\eta^0 < 13.5$ ns und einer hoher katalytischen Effizienz abgeleitet werden.

3.2.3.3. Relaxationsverhalten des gebundenen Zustandes auf der ps-bis-ns-Zeitskala

Eine Wiederholung des heteronuklearen NOE-Experimentes im Tat-Peptid (1-17)-gebundenen Zustand sowohl von *EcSlyD** als auch von *TtSlyD* erlaubt den Vergleich zum Relaxationsverhalten des jeweiligen freien Zustandes auf der ps-bis-ns-Zeitskala (s. Abb. 3.29 (a), (b)). Das *h*NOE-Experiment ist für diesen Vergleich sehr aussagekräftig [195]

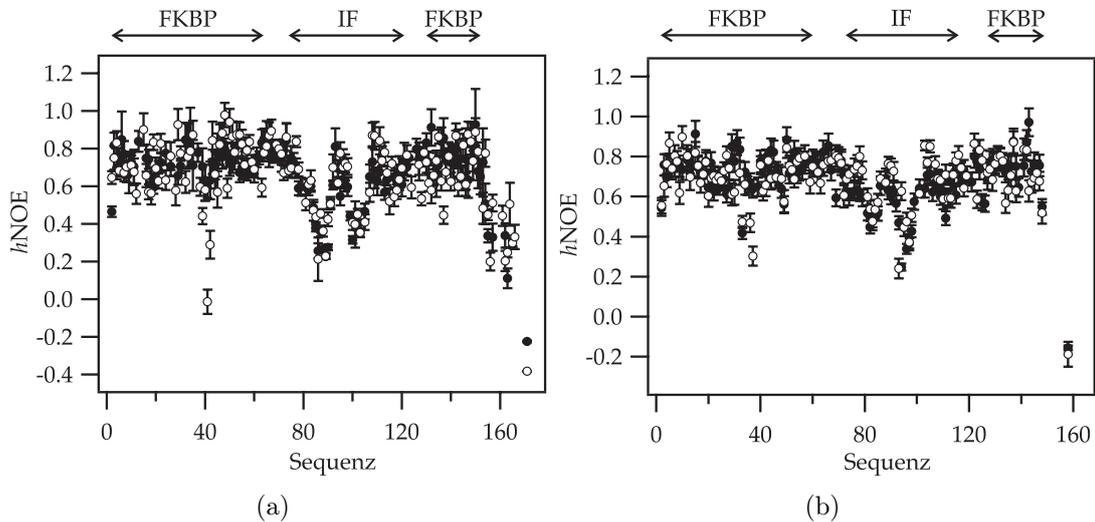


Abb. 3.29.: Vergleich der *h*NOE-Werte für den freien (geschlossene Kreise) bzw. Tat-Peptid (1-17)-gebundenen Zustand (offene Kreise) von *EcSlyD** (a) bzw. *TtSlyD* (b). Alle vier Experimente sind an $B_0 = 14.1$ T und bei $T = 298$ K aufgenommen worden.

und erfordert einen geringeren Messzeitaufwand im Vergleich zur Aufnahme von Relaxationszeiten.

Da die IF-Domäne von *EcSlyD** bzw. von *TtSlyD* die Bindestelle für das Tat-Peptid (1-17) darstellt (s. Abschnitt 3.2.1.1), ist die Rückgratdynamik der Amide in diesem Bereich im Vergleich zum freien Zustand erwartungsgemäß etwas vermindert. Die h NOE-Werte für die Rückgratamide der IF-Domäne sind im gebundenen Zustand durchweg größer verglichen zum freien Zustand. Dies gilt für die mesophile wie auch für die thermophile Variante. Interessanterweise zeigen die Rückgratamide von G39, L41 und I42 von *EcSlyD** im Tat-Peptid (1-17)-gebundenen Zustand niedrigere h NOE-Werte im Vergleich zum freien Zustand. Die letzten beiden Aminosäuren gehören zum aktiven Zentrum von *EcSlyD** [158], das sich innerhalb der FKBP-Domäne befindet. Sowohl L41 als auch I42 zeigen auf der ps-bis-ns-Zeitskala eine erhöhte Rückgratdynamik und gehören im Komplex zu den flexibelsten Aminosäuren (strukturelle Wiedergabe in Abb. 3.30).

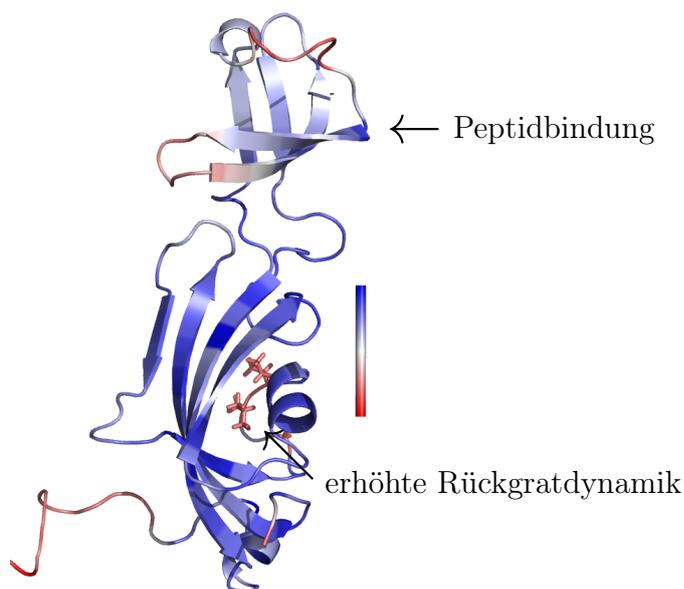


Abb. 3.30.: Strukturelle Wiedergabe des heteronuklearen NOE-Wertes von Tat-Peptid (1-17)-gebundenem *EcSlyD** bei $T = 298$ K und an $B_0 = 14.1$ T. Die Farbskala verläuft von rot (h NOE = 0.1) über weiß (h NOE = 0.55) zu tiefblau (h NOE = 0.9). Die Bindung des Peptides erfolgt an der IF-Domäne, die Rückgratamide G39, L41 und I42 (FKBP-Domäne) werden flexibler auf der ns-bis-ps-Zeitskala.

In *TtSlyD* entsprechen L41 und I42 den beiden Aminosäuren I36 und L37 [126, 158]. Sowohl I36 als auch L37 sind im Sequenzvergleich mit *EcSlyD** um fünf Positionen innerhalb der Primärsequenz verschoben, entsprechen aber innerhalb der Tertiärstruktur der gleichen Position. Die Rückgratamide von I36 und L37 von *TtSlyD* zeigen im Tat-Peptid (1-17)-gebundenen Zustand auch niedrigere h NOE-Werte im Vergleich zum freien Zustand.

Damit zeigt sowohl die mesophile als auch die thermophile Variante von SlyD eine Änderung der Dynamik (auf der ns-bis-ps-Zeitskala) des aktiven Zentrums bei Substratbindung an die IF-Domäne. Dies ist ein starkes Argument für einen Kommunikationsmechanismus zwischen den beiden Domänen von SlyD. Die beiden entsprechenden Aminosäuren Leucin und Isoleucin zeigen während der NMR-Titration mit dem Tat-

Peptid (1-17) keine (für *EcSlyD** s. Abb. 3.16 (a)) bzw. kleine Änderungen (für *TtSlyD* s. Abb. 3.16 (b)) der chemischen Verschiebungen. Der Unterschied der h NOE-Werte der Rückgratamide, die zum aktiven Zentrum gehören, zwischen freien und Tat-Peptid (1-17)-gebundenen Zustand, ist viel stärker ausgeprägt als die Änderungen, die durch Temperaturänderungen von 15 Kelvin für mesophiles *SlyD* (vgl. Tab. 3.5) oder von 45 Kelvin für thermophiles *SlyD* (vgl. Tab. 3.6) verursacht werden.

3.2.3.4. Relaxationsverhalten auf der μ s-bis-ms Zeitskala

Dem Relaxationsverhalten auf der μ s-bis-ms-Zeitskala gilt besonderes Interesse, da die Prozesse, die für die Funktion eines Proteins essentiell sind, zum großen Teil auf dieser Zeitskala ablaufen [45]. Sie wird auch als Zeitskala der Katalyse bezeichnet [43].

Die NMR-Spektroskopie stellt mit der experimentellen Bestimmung der Relaxationsdispersion eine Möglichkeit dar, den Konformationsaustausch und damit die Beiträge des chemischen Austausches R_{ex} zur transversalen Relaxationsrate sowohl des Proteinrückgrates als auch der Seitenkettenresonanzen direkt zu messen (s. Abschnitt 2.1.1.2.2). Mit der im Abschnitt 2.2 vorgestellten Lipari & Szabo-Analyse wird dagegen dieser (mögliche) chemische Austauschbeitrag anhand der gemessenen Relaxationsraten berechnet. Es sind für die freien Zustände von *EcSlyD**, *TtSlyD* und *EcSlyD*Y68W* ^{15}N -Relaxationsdispersionsexperimente bei $T = 298\text{ K}$ und an $B_0 = 14.1\text{ T}$ bzw. $B_0 = 18.8\text{ T}$ durchgeführt worden. Diese Studie ist auf den Rapamycin-gebundenen Zustand von *TtSlyD* ausgedehnt worden.

Für jeden ^{15}N -Kern des Proteinrückgrates von *EcSlyD** und von *TtSlyD* kann nun die Amplitude der Relaxationsdispersion mit den R_{ex} -Beiträgen verglichen werden, die mit der Lipari & Szabo-Analyse berechnet worden sind (s. Abb. 3.28 (c) für *EcSlyD** und A.14 (c) für *TtSlyD*).

Die Differenz der effektiven transversalen Relaxationsraten $R_{2,\text{eff}}$ zwischen hoher und niedriger CPMG-Pulsfrequenz zeigt Amplituden an, die in etwa den R_{ex} -Termen der Lipari & Szabo-Analyse entsprechen (s. Abb. 3.31 (a)-(d)). Alle Rückgratamide von *EcSlyD**, die einen direkt messbaren Beitrag zum Konformationsaustausch auf der μ s-bis-ms-Zeitskala zeigen, sind in Tab. A.8 im Anhang A.17.1 angegeben. Eine Regression der Gl. (2.1.22) an die Messwerte gestaltet sich als äußerst schwierig, da die jeweilige Amplitude der Relaxationsdispersion sehr klein ist ($R_{\text{ex}} \leq 3\text{ Hz}$). Ungeklärt ist, ob die messbare Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kernes von *EcSlyD** mit einem Zwei-Zustandsmodell (s. Gl. (2.1.11)) hinreichend beschrieben werden kann. Auch eine spektrale Information über das $\Delta\omega$ und über die Populationsgröße der (beiden möglichen) austauschenden Konformationen A und B liegt nicht vor. Die im nächsten Abschnitt vorgestellte Studie zur schnellen Faltung des Kälteschockproteins im Gleichgewicht überwindet dagegen diese Limitationen zur quantitativen Beschreibung der transversalen Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kernes (s. Abschnitt 3.3).

Führt man dennoch eine Regression sowohl der Gl. (2.1.22) als auch der Gl. (2.1.24) mit der Annahme eines Zwei-Zustands-Konformationsaustausches an die Messdaten der ^{15}N -Kerne von *EcSlyD** mit variierenden Startparametern durch, ergibt diese Anpassung eine Austauschrate von $k_{\text{ex}} \simeq 10^1\text{ Hz}$ (durchgezogene Linien in Abb. 3.31 (a)-(d)). Die Annahme des Grenzfalles $k_{\text{ex}} \ll \Delta\omega$ (s. Gl. (2.1.24) bzw. [40]), der durch ein oszil-

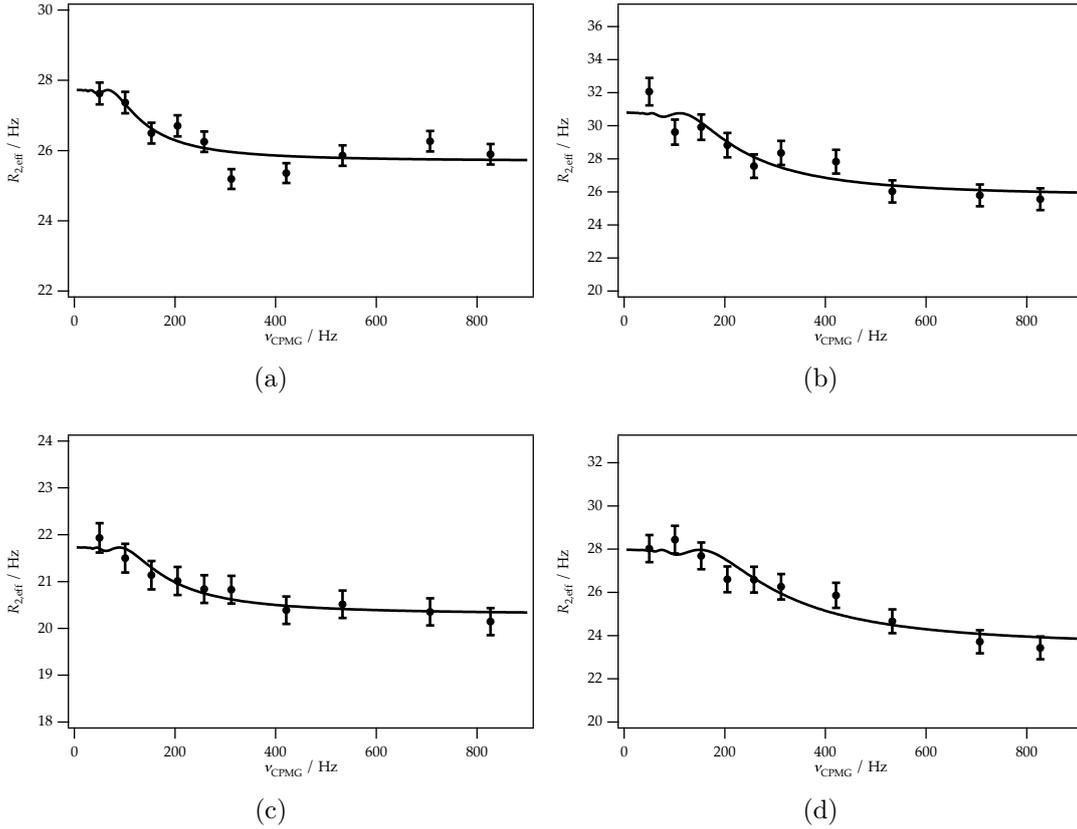


Abb. 3.31.: Relaxationsdispersion ausgewählter ^{15}N -Kerne von *EcSlyD** bei $T = 298\text{ K}$ und an $B_0 = 14.1\text{ T}$. Gezeigt sind die Verläufe von D24 (a), V76 (b), V87 (c) und E108 (d).

Die Regression der Gl. (2.1.22) an die Messdaten ist aufgrund der geringen Dispersionsamplitude stark fehlerbehaftet. Die Standardabweichungen für p_A , k_{ex} und $\Delta\omega$ sind größer als die Regressionsparameter. Als grobe Abschätzung des Konformationsaustausches kann $k_{\text{ex}} \simeq 10^1\text{ Hz}$, $p_A \simeq 0.95$ und $\Delta\omega \simeq 10^3\text{ Hz}$ angegeben werden.

latorisches Verhalten bei niedrigen CPMG-Pulsfrequenzen und einen langsamen Abfall der $R_{2,\text{eff}}$ -Werte über die CPMG-Pulsfrequenz gekennzeichnet ist, erscheint im Vergleich zu den experimentellen Daten als sinnvoll.

Neben dem kinetischen Parameter der Austauschrate k_{ex} ergibt die Analyse der thermodynamischen Regressionsparameter p_A und p_B in Gl. (2.1.22) für *EcSlyD** ein Verhältnis von etwa 95 % zu 5 %. Da auch im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum kein Kreuzsignal der Konformation *B* auffindig gemacht werden kann, erscheint die Populationsabschätzung für Konformation *B* von $p_B \leq 5\%$ als NMR-spektroskopisch sinnvoll (ähnliche transversale Relaxationsraten R_2 von *A* und *B* vorausgesetzt). Unter Nutzung von Gl. (2.1.24) ist keine Populationsaussage für Zustand *A* und *B* möglich [40].

Der strukturelle Parameter der Relaxationsdispersionsanalyse von *EcSlyD** liefert Werte in der Größenordnung $\Delta\omega \simeq 10^3\text{ Hz}$. Wie eingangs formuliert, ist aufgrund der geringen Amplitude der $R_{2,\text{eff}}$ -Werte eine quantitative Analyse aller Regressionsparameter stark fehlerbehaftet. Auch die Nutzung von verschiedenen Magnetfeldern liefert hier keinen Ausweg. Dennoch bildet die Größenordnung von k_{ex} im Vergleich zur Rate der Katalysfunktion von *EcSlyD** ($k_{\text{kat}} \simeq 1\text{ s}^{-1}$, [158]) eine sinnvolle Größenordnung ab. Der von

D. Kern und Mitarbeitern postulierte Zusammenhang zwischen der intrinsischen Dynamik eines Enzyms und der Zeitskala der Katalyse [43, 56] kann somit auch bei *EcSlyD** vermutet werden.

Die Bestimmung der transversalen Relaxationsdispersion von *TtSlyD* unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie für *EcSlyD** führt qualitativ zum selben Ergebnis. Vier repräsentative Verläufe der effektiven transversalen Relaxationsrate über die CPMG-Pulsfrequenz sind im Anhang A.18 angegeben (Abb. A.15). Alle Rückgratamide von *TtSlyD*, die einen direkt messbaren Beitrag zum Konformationsaustausch auf der μs -bis- ms -Zeitskala zeigen, sind in Tab. A.9 im Anhang A.17.2 angegeben.

In [154] konnte gezeigt werden, dass sich die Orientierung der Seitenkette der Position Y68 des aktiven Zentrums von *EcSlyD** im Vergleich zu der jeweiligen sequenzhologen Aminosäure von *hFKBP12* [196] und *MtFKBP17* [164] stark unterscheidet. Der Aromatenring des Tyrosins zeigt deutlich in das aktive Zentrum der FKBP-Domäne hinein und füllt den hydrophoben Raum stark aus (s. Abb. 3.32). Dieses strukturelle

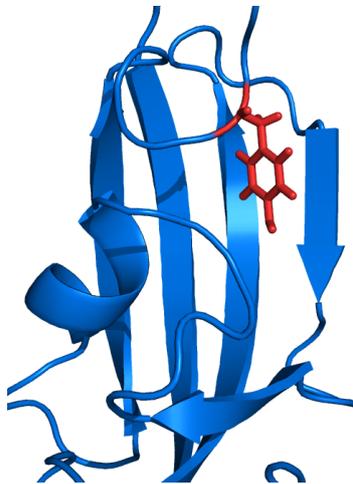


Abb. 3.32.: Orientierung der Seitenkette von Tyrosin 68 (rot eingefärbt) innerhalb der FKBP-Domäne von *EcSlyD** [154]. Die Seitenkette zeigt deutlich in das aktive Zentrum hinein und füllt den hydrophoben Raum stark aus.

Verhalten kann ein Grund dafür sein, dass die FKBP-Domäne von *EcSlyD** eine um drei Größenordnungen verminderte Affinität zu FK506 im Vergleich zu *hFKBP12* besitzt und auch die PPIase-Aktivität reduziert ist [154]. Eine Mutation des Tyrosins 68 zu einem Tryptophan sollte diesen Effekt noch verstärken.

C. Haupt konnte in ihrer Dissertation zeigen, dass die enzymatische Aktivität dieser Y68W-Variante von *EcSlyD** im RCM-T1(S54G/P55N)-Rückfaltungsansatz um den Faktor 15 im Vergleich zum Wildtypprotein reduziert ist (Tab. 3.11, [181]). Die Affinität K_M für das Substrat RCM-T1 bleibt durch die Mutation unbeeinflusst. Die verminderte Aktivität von *EcSlyD**Y68W im Vergleich zu *EcSlyD** ist somit in der erniedrigten katalytischen Umsatzrate k_{kat} und nicht in einer schwächeren Affinität für das Substrat zu suchen.

Die Relaxationsdispersionsstudie von *EcSlyD** ist auf diese Y68W-Variante ausgedehnt

Protein	$k_{\text{kat}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{M}} / \mu\text{M}$	$k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} / \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Wildtyp	0.51 ± 0.04	0.38 ± 0.01	1.33 ± 0.16
Y68W	0.021 ± 0.002	0.27 ± 0.01	0.08 ± 0.01

Tab. 3.11.: Aktivität und Substrataffinität von *EcSlyD** und dessen Variante Y68W im Rückfaltungsansatz von RCM-T1(S54G/P55N) [181].

worden, um die Änderung der enzymatischen Aktivität mit einer eventuellen Veränderung der intrinsischen Dynamik auf der ms-bis- μs -Zeitskala zu korrelieren. Die beiden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des Wildtypproteins und der Y68W-Variante sehen nahezu identisch aus ([181]). Dies ist ein starkes Indiz für die Konservierung der Tertiärstruktur des Wildtypproteins. Die vom Wildtypprotein übernommene Rückgratzuordnung auf die Y68W-Variante ist mit einer ^{13}C -, ^{15}N -gelabelten Probe und der Verwendung von Triple-Resonanzexperimenten (s. Abschnitt 2.1.1.3.1) überprüft worden [181]. Die Rückgratamide der Aminosäuren des aktiven Zentrums und innerhalb der IF-Domäne zeigen in den Relaxationsdispersionsexperimenten einen viel stärkeren chemischen Austausch R_{ex} im Vergleich zum Wildtypprotein (rote Kreise im Vgl. zu blauen Kreisen in Abb. 3.33). Eine einzelne Seitenkettenmutation innerhalb der FKBP-Domäne ist da-

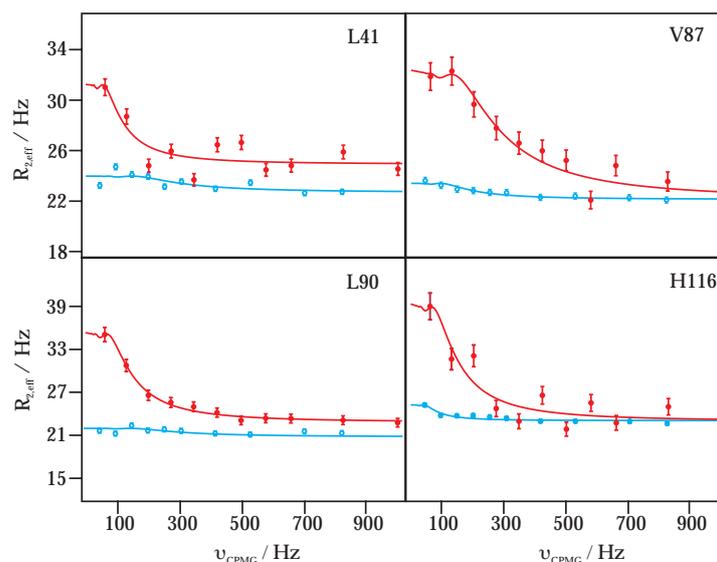


Abb. 3.33.: Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kernes ausgewählter Aminosäuren von *EcSlyD** (blaue Kreise) bzw. von *EcSlyD**Y68W (rote Kreise). Die Daten wurden an $B_0 = 14.1\text{ T}$ und bei $T = 298\text{ K}$ aufgenommen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einer Regression der Gl. (2.1.22) an die Messdaten. Eine Abschätzung der Regressionsparameter für ausgewählte Aminosäuren von *EcSlyD** ist in der Legende zu Abb. 3.31 angegeben. Die Ergebnisse einer globalen Regressionsanalyse ausgewählter Aminosäuren von *EcSlyD** ΔIF ist in der Abb. A.16 im Anhang A.19 angegeben.

mit in der Lage, den Konformationsaustausch nicht nur in der FKBP-Domäne sondern auch in der räumlich entfernten IF-Domäne sehr stark zu beeinflussen. Da die effektive transversale Relaxationsrate $R_{2,\text{eff}}$ abhängig von der verwendeten Stärke des

Magnetfeldes ist (s. Gl. (2.1.8)) und *EcSlyD**Y68W einen starken chemischen Austausch zeigt, sind mit der Messung an zwei verschiedenen Magnetfeldern die Austauschrate k_{ex} und die Populationen p_A , p_B global unter Nutzung der Gl. (2.1.22) angepasst worden. Die Austauschrate steigt im Vergleich zum Wildtypprotein stark an, auf $k_{\text{ex}} \simeq (500 \dots 1000)$ Hz. Die Populationen können mit $p_A \simeq 0.95$ bzw. $p_B \simeq 0.05$ angegeben werden. Im Anhang A.19 sind für *EcSlyD**Y68W für vier ausgewählte Aminosäuren die ^{15}N -Relaxationsdispersionskurven gezeigt, die simultan an $B_0 = 14.1$ T und $B_0 = 18.8$ T angepasst worden sind (s. Abb. A.16).

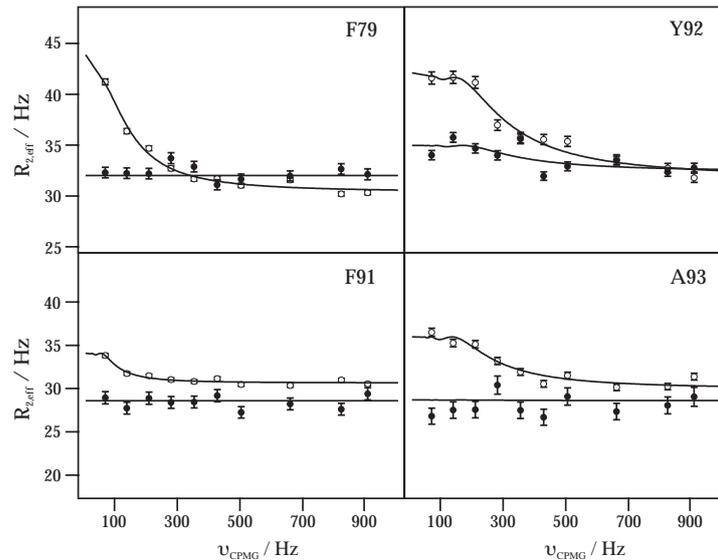


Abb. 3.34.: Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kernes ausgewählter Aminosäuren von *TtSlyD* (offene Kreise) bzw. im Rapamycin-gebundenen *TtSlyD*-Komplex (geschlossene Kreise). Die Daten wurden an $B_0 = 18.8$ T und bei $T = 298$ K aufgenommen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einer Regression der Gl. (2.1.22) an die Messdaten. Eine Abschätzung der Regressionsparameter ausgewählter Aminosäuren für den freien Zustand von *TtSlyD* ist in der Legende zu Abb. A.15 im Anhang A.18 angegeben.

In Abschnitt 3.2.1.2 konnte gezeigt werden, dass der PPIase-Inhibitor Rapamycin nur mit der FKBP-Domäne von *TtSlyD* wechselwirkt. Die Relaxationsdispersionsstudie von *TtSlyD* ist auf diesen Rapamycin-gebundenen Zustand ausgeweitet worden. Da die mit Rapamycin wechselwirkenden Aminosäuren der FKBP-Domäne des gebundenen Zustand im Rahmen dieser Arbeit nicht zugeordnet worden sind, ist das Relaxationsverhalten der Rückgratamide der IF-Domäne untersucht und der Vergleich zum freien Zustand gezogen worden. Die Abb. 3.34 (geschlossene Kreise) gibt den Verlauf der ^{15}N -Relaxationsdispersion ausgewählter Aminosäuren der IF-Domäne wieder, die im freien Zustand auf der μs -bis- ms -Zeitskala einen Konformationsaustausch gezeigt haben (s. Abb. A.15 im Anhang A.18). Die relativ kleine Größe des chemischen Austausches R_{ex} der Rückgratamide der IF-Domäne, die im freien Zustand beobachtet wird, wird durch die Interaktion von Rapamycin mit der räumlich entfernten FKBP-Domäne unterdrückt. Die Inhibierung der PPIase-Funktion des aktiven Zentrums der FKBP-Domäne führt somit parallel zum Ausschalten des Konformationsaustausches einzelner Aminosäuren innerhalb der IF-Domäne auf der μs -bis- ms -Zeitskala.

3.2.4. Zusammenfassende Diskussion

Für die Zweidomänen-Prolylisomerase SlyD konnte in atomarer Auflösung die Bindestelle zu einem physiologischen Substrat aufgeklärt werden. Das Tat-Peptid bindet nur an die IF-Domäne, eine Interaktion mit der FKBP-Domäne von SlyD kann ausgeschlossen werden. Die Affinität der Bindung wird durch die Länge des Peptides beeinflusst. Auf der anderen Seite konnten NMR-Bindungsstudien von SlyD zu Inhibitoren der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität (FK506, Rapamycin) die FKBP-Domäne als alleinige Bindestelle lokalisieren. Kinetische Fluoreszenzuntersuchungen haben gezeigt, dass die Rate der Inhibitorassoziation durch die IF-Domäne verringert wird. Auch die Affinität von SlyD zu FK506 bzw. zu Rapamycin wird durch die Anwesenheit der IF-Domäne reduziert.

Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten verschiedener SlyD-Varianten konnte einen signifikanten Unterschied der Translation zwischen dem Wildtypprotein und einer IF-Domänenfreien Variante auflösen. Die IF-Domäne reduziert die Translationsdiffusion von SlyD stärker als man es für ein globulär gefaltetes Protein dieser Größe erwarten würde. Gründe hierfür können in einer erhöhten Rückgratdynamik der Amide innerhalb der IF-Domäne im Vergleich zu denen der FKBP-Domäne oder an der geänderten Molekülform beim Vergleich zwischen Eindomänen- und Zweidomänenprotein liegen.

Untersuchungen der Dynamik auf der schnellen NMR-Zeitskala konnten für eine mesophile wie für eine thermophile Variante von SlyD temperaturunabhängig eine erhöhte Bewegungsamplitude für die Rückgratamide der IF-Domäne aufzeigen. Die Amidprotonenvektoren der IF-Domäne benötigen zur vollständigen Beschreibung ihrer Rückgratdynamik eine interne Korrelationszeit ergänzend zur globalen Rotationskorrelationszeit, im Gegensatz zu den Rückgratamiden innerhalb der FKBP-Domäne. Der temperaturabhängige Verlauf der globalen Rotationskorrelationszeit unterscheidet sich stark zwischen thermophilem und mesophilem SlyD. Dieser Parameter ändert sich für *EcSlyD** mit der Temperatur nicht, wohingegen *TtSlyD* erst bei einer höheren Temperatur, die in etwa der Wachstumstemperatur von *Thermus thermophilus* entspricht, einen konstanten Wert zeigt. Da auch die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität von *TtSlyD* in Richtung der Wachstumstemperatur ansteigt [181], kann eine Korrelation zwischen der Moleküldynamik und der Katalysefunktion von *TtSlyD* festgestellt werden.

Eine Ausweitung der Studie der Rückgratdynamik auf der ps-bis-ns-Zeitskala auf den Tat-Peptid-gebundenen Zustand von SlyD legt einen Kommunikationsmechanismus zwischen beiden Domänen nahe. Sowohl für *EcSlyD** als auch für *TtSlyD* steigt die Rückgratdynamik der Aminosäuren des Zentrums der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität (innerhalb der FKBP-Domäne) auf der schnellen NMR-Zeitskala bei Substratbindung an die IF-Domäne an. Somit kann auch hier eine starke Verzahnung zwischen der Funktion (Bindung einer unstrukturierten Peptidkette) und der Dynamik von SlyD gezogen werden.

Die Studie der μ s-bis-ms-Dynamik von SlyD konnte einen Konformationsaustausch in-

nerhalb von *EcSlyD** und *TtSlyD* zeigen, der in der Größenordnung 10^1 Hz liegt. Neben Rückgratamiden der IF-Domäne nehmen auch Aminosäuren der FKBP-Domäne, die als Zentrum der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität identifiziert worden sind [158], an diesem Austausch teil. Eine Verringerung der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums von *EcSlyD** für potentielle Substrate durch das Einbringen einer Punktmutation resultiert nicht nur im Herabsetzen der katalytischen Umsatzrate k_{kat} . Auch der Konformationsaustausch auf der μs -bis- ms -Zeitskala ist davon stark beeinflusst, nicht nur in der sequentiellen Nachbarschaft zur eingefügten Mutationsstelle, sondern auch innerhalb der IF-Domäne. Die starke Verknüpfung zwischen der Aktivität, Struktur und Dynamik von SlyD kommt hier tragkräftig zum Ausdruck.

Die bereits mehrfach erwähnte enge Verzahnung zwischen Funktion und Dynamik des Zweidomänenproteins SlyD wird letztlich auch beim Vergleich der Konformationsdynamik zwischen dem freien und dem Rapamycin-gebundenen Zustand von *TtSlyD* sichtbar. Die Inhibierung der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität in der FKBP-Domäne zieht gleichzeitig das Ausschalten des Konformationsaustausches innerhalb der IF-Domäne von *TtSlyD* nach sich.

Bislang sind in der Literatur nur strukturelle Gründe innerhalb der FKBP-Domäne für die relativ schwache Affinität von SlyD zu FK506 diskutiert worden [154]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten hingegen auf weitere Ursachen hin. Da die IF-Domäne die Affinität der Inhibitoren zur FKBP-Domäne von *EcSlyD** im Vergleich zur isolierten FKBP-Domäne weiter herabsetzt (im Gleichgewicht wie auch kinetisch), ist in der Orientierung beider Domänen zueinander ein weiterer Grund für diese schwache Affinität zu suchen. Dies wird durch die NMR-Strukturrechnung von *EcSlyD** (keine definierte Orientierung zwischen IF- und FKBP-Domäne feststellbar, [154]) und dem Strukturvergleich zwischen verschiedenen Kristallen von *TtSlyD* (drei verschiedene Kristallformen sind mit unterschiedlicher Orientierung zwischen IF- und FKBP-Domäne gefunden worden, [126]) bestätigt.

Die aus der Diffusionsstudie vermutete erhöhte Rückgratdynamik der Amide innerhalb der IF-Domäne im Vergleich zur FKBP-Domäne kann mit den Ergebnissen der Lipari & Szabo-Analyse bestätigt werden. Die große Bewegungsamplitude und die zur Molekülbewegung additive Korrelationsbewegung der Rückgratamide führt zu einem Konformationsraum, der breiter ist als der für die Amide der FKBP-Domäne. Damit steigt in der Summe der hydrodynamische Radius von *EcSlyD** und *TtSlyD* an und ist damit im Vergleich größer als man es für globulär gefaltete Proteine mit gleicher Anzahl an Aminosäuren erwarten würde [116]. Ferner ist die Annahme einer im zeitlichen Mittel vorliegenden elongierten Molekülform von *EcSlyD** bzw. von *TtSlyD* eine weitere mögliche Ursache für die verlangsamte Translationsdiffusion (s. dazu explizit Abb. 11-3 auf S. 371 in [197]).

Die Interpretation des Konformationsaustausches auf der μs -bis- ms -Zeitskala kann nur qualitativ gegeben werden, da aufgrund der relativ kleinen Dispersionsamplituden exakte quantitative Angaben von kinetischen, strukturellen und thermodynamischen Parametern nicht möglich sind. Ferner ist zu betonen, dass der NMR-spektroskopisch messbare

chemische Austausch nicht in der Lage ist, Domänenbewegungen zu detektieren, da sich dabei die chemische Umgebung der einzelnen Aminosäure innerhalb der jeweilige Domäne nicht verändert. Hierzu sind PRE-Messungen (*paramagnetic relaxation enhancement*, [184]) oder FRET-Untersuchungen (*Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer*) [198] anzustreben. Mit Hilfe von FRET-Einzelmoleküluntersuchungen an SlyD [199], die im Rahmen dieser Arbeit nicht im Einzelnen besprochen worden sind, gelingt es, ein mögliches Modell für den Funktionsmechanismus von SlyD anzugeben (s. Abb. 3.35). Der NMR-detektierte Konformationsaustausch einzelner Aminosäuren der FKBP-Domäne und der IF-Domäne lässt sich mit einem isomerasefähigen aktiven Zustand A (s. Abb. 3.35 (d)) und einem inaktiven Zustand B (s. Abb. 3.35 (a), (b), (c)) interpretieren. Nur der Zustand A ist in der Lage, ein gebundenes Substrat katalytisch umzusetzen. Die Zeitskala des Austausches $A \leftrightarrow B$ (s. Abb. 3.35 (a) \leftrightarrow (d)), $k_{\text{ex}} \simeq (1 \dots 10) \text{ Hz}$ ist der limitierende Faktor für die katalytische Umsatzrate k_{kat} . Diese wird in der Literatur in der gleichen Größenordnung angegeben, mit $k_{\text{kat}} \simeq 1 \text{ s}^{-1}$ [158]. Eine detaillierte Beschreibung des Modells zum Funktionsmechanismus von SlyD ist in der Legende zu Abb. 3.35 angegeben.

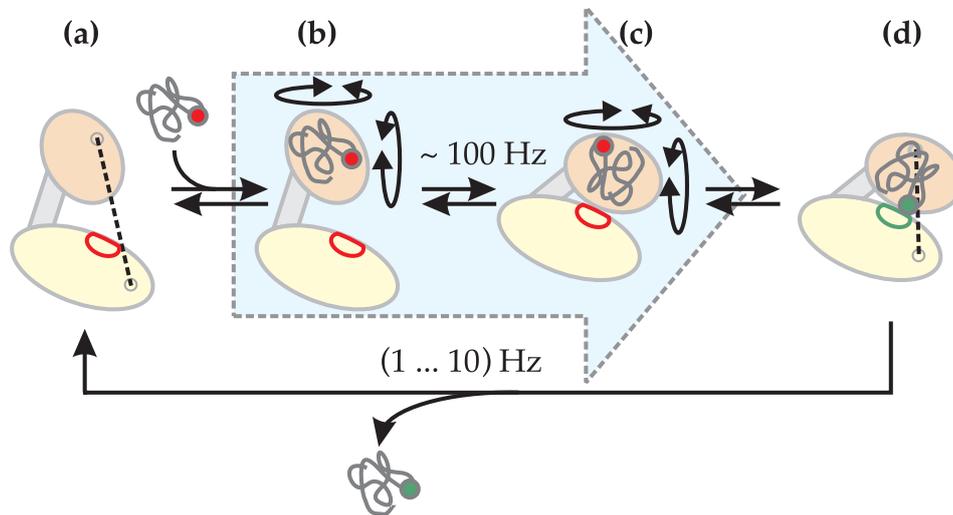


Abb. 3.35.: Modell für den Funktionsmechanismus von SlyD. Das Ergebnis einer FRET-Einzelmolekülstudie an *Tt*SlyD [199] ist in (b) und (c) mit einem hellblauen Pfeil unterlegt. Die beiden Positionen der dabei gewählten Farbstoffmoleküle sind mit einer gestrichelten Linie verbunden (in (a) und (d)). Die FKBP-Domäne ist in gelb, die IF-Domäne in orange und der Domänenlinker in grau gezeichnet. Das aktive Zentrum von SlyD ist im inaktiven Zustand mit einer roten, im aktiven Zustand mit einer grünen Ellipse innerhalb der FKBP-Domäne gekennzeichnet.

Das von SlyD umzusetzende Substrat (Xaa-Pro ist mit einem roten Kreis markiert) wird an der IF-Domäne gebunden ((a) \rightarrow (b)) und erfährt aufgrund der hohen intrinsischen Dynamik der IF-Domäne eine hohe Umorientierung. Beide Domänen von SlyD tauschen etwa mit einer Rate von 100 Hz zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation aus, sowohl in freier als auch in substratgebundener Form ((b) \rightarrow (c)). Dennoch kann nur in (d) das Substrat umgesetzt werden, da Substrat (an IF-Domäne gebunden) und das Zentrum der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Aktivität (in der FKBP-Domäne) aufeinander abgestimmt sind. Dies ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt für die Katalyse des Substrates durch SlyD. Nach [199].

Die klare strukturelle Trennung beider Domänen von SlyD resultiert **nicht** in einer funktionellen Trennung zwischen IF- und FKBP-Domäne:

- Eine Substratbindung an die IF-Domäne ruft eine Erhöhung der Rückgratdynamik auf der ps-bis-ns-Zeitskala des Zentrums der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität in der FKBP-Domäne hervor und
- die Bindung eines Inhibitors der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität an die FKBP-Domäne resultiert im Ausschalten des Konformationsaustausches auf der μ s-bis-ms-Zeitskala innerhalb der IF-Domäne.

Diese beiden beobachteten Rückkopplungen zwischen Bindung und Dynamik innerhalb des Enzyms legen einen ausgeklügelten Kommunikationsmechanismus für SlyD nahe, der es erlaubt, einen vielfach höheren katalytischen Umsatz im Vergleich zur isolierten FKBP-Domäne von SlyD oder zu *hFKBP12* zu betreiben. Ähnliche Kommunikationsstudien sind in der Literatur für die RI Untereinheit der Proteinkinase A [200] sowie innerhalb des katalytischen Zyklus' der Phosphoglyceratekinase [201] beschrieben.

Als ergänzendes Experiment zur Charakterisierung der Domänenkommunikation in SlyD kann die Bestimmung der Substrataffinität im inhibierten Zustand der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität vorgeschlagen werden. Auch die Bestimmung der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität im Tat-Peptid-gebundenen Zustand der IF-Domäne kann lohnenswert für das weitere Verständnis der Funktionsweise von SlyD sein.

3.3. Studium der schnellen Faltung von *BsCspB* im Gleichgewicht

Das Kälteschockprotein B aus *Bacillus subtilis* wird in der Literatur als Modellprotein für die Zwei-Zustandsfaltung beschrieben [145]. Die Messung der Dispersion der transversalen Relaxationsrate von *BsCspB* erlaubt es, die Faltungs- und Entfaltungsraten des Kälteschockproteins in Abwesenheit jeglichen Denaturierungsmittels zu bestimmen, da diese auf einer ms-Zeitskala abläuft und eine signifikante Population des entfaltenen Zustandes aufweist. Dies hat zwei entscheidende Vorteile gegenüber den kinetischen Fluoreszenzexperimenten:

1. keine Beschränkung auf lokale Fluoreszenzsonden und
2. für die Bestimmung der Faltungsrate k_f ist keine Extrapolation auf eine Konzentration von $c = 0$ M des Denaturierungsmittels notwendig.

M. Zeeb & Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Chevron-Auftragung (apparente Faltungs- und Entfaltungsraten werden gegenüber der Konzentration des Denaturierungsmittels aufgetragen) der NMR-spektroskopisch detektierten Faltungs- und Entfaltungsraten einzelner Aminosäuren sehr gut mit den kinetischen Fluoreszenzexperimenten korreliert [55]. In [55] erfolgte die Regression von Gl. (2.1.22) an die Messdaten unter Nutzung weiterer Experimente. So ist der Strukturparameter $\Delta\omega$ mittels zweidimensionaler ZZ-Austauschspektroskopie [202] für jede Aminosäure ermittelt worden, das Populationsverhältnis p_A/p_B (mit dem nativen Zustand *A* und dem entfaltenen Zustand *B*) ist aus kinetischen Fluoreszenzuntersuchungen [145] übernommen worden. Während der Regression der Gl. (2.1.22) an die Messwerte sind diese übernommenen Daten nicht variiert worden. Nur die Austauschrate k_{ex} (Summe aus Faltungs- und Entfaltungsraten) und die transversalen Relaxationsraten für verschwindenden chemischen Austausch $R_{2A} = R_{2B}$ sind angepasst worden. Als Ergebnis wurden Austauschraten gefunden, die für jede genutzte Harnstoffkonzentration keine Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz zeigen.

3.3.1. Entwickelte Datenanalyse

Mit der Aufnahme der R_2 -Relaxationsdispersionskurven an fünf verschiedenen Magnetfeldern bei $T = 298$ K ist eine globale Regression der Austauschrate k_{ex} , des Unterschiedes der chemischen Verschiebung in der ^{15}N -Dimension zwischen gefalteten und entfaltenen Zustand $\Delta\omega$ und der beiden Populationen p_A bzw. p_B für jeden detektierten ^{15}N -Kern anhand der Gl. (2.1.22) durchgeführt worden. Die dadurch vorliegende hohe Datenmenge erlaubt es nun, auf ergänzende Fluoreszenz- oder NMR-spektroskopische Experimente zur Regressionsanalyse zu verzichten. Da Gl. (2.1.22) eine Vielzahl von Variablen enthält, führt eine globale Regression zu einer vertrauenswürdigen Anpassung dieser Variablen.

Der Term $\Delta\omega$ kann mit folgendem Ansatz global angepasst werden:

$$\Delta\omega^b = \frac{b}{a}\Delta\omega^a, \quad (3.3.1)$$

mit den beiden Magnetfeldern a und b. Nur die transversale Relaxationsrate in Abwesenheit jeglichen chemischen Austausches, $R_{2A} = R_{2B}$, ist für jedes Magnetfeld individuell angepasst worden. Die Abb. 3.36 verdeutlicht die genannten NMR-Parameter schematisch anhand des nativen wie entfalteten Zustandes einer beliebigen Aminosäure von *BsCspB*. Das komplette ^1H - ^{15}N -*tr*HSQC-Spektrum von *BsCspB* gibt die Abb. 3.37 wieder.

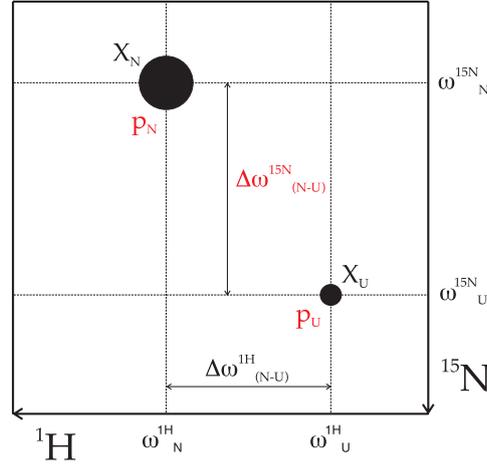


Abb. 3.36.: Schematische Darstellung des gefalteten (X_N) und des entfalteten Zustandes (X_U) einer beliebigen Aminosäure von *BsCspB* im ^1H - ^{15}N -HSQC. Global sind mit der Messung an verschiedenen Magnetfeldern und anschließender Regression anhand Gl. (2.1.22) die Parameter $\Delta\omega^{15\text{N}}$, p_N , p_U (jeweils rot markiert) sowie k_{ex} und für jedes Magnetfeld individuell $R_{2N} = R_{2U}$ angepasst worden.

Für die globale Datenanalyse sind alle möglichen Magnetfeldkombinationen für jede einzelne Aminosäure berücksichtigt worden (s. Tab. 3.12). Mit diesem Ansatz ist eine individuelle Magnetfeldkombination jeder einzelnen Aminosäure von *BsCspB* gewährleistet. Da der Verlauf der Relaxationsdispersion $R_{2,\text{eff}} = f(\nu_{\text{CPMG}})$ stark vom Verhältnis $k_{\text{ex}}/\Delta\omega$ und $R_{2,\text{eff}}$ zudem von dem verwendeten Magnetfeld abhängt [30], ist damit ein modellfreier Zugang zur globalen Relaxationsanalyse gewährleistet.

Die Regression der Gl. (2.1.22) an die Messdaten ist für zwei, drei, vier als auch alle fünf Magnetfelder erfolgt. Es ist diejenige Magnetfeldkombination $^{\text{ab}}$ (Fall von zwei Magnetfeldern) für die Aminosäure i ausgewählt worden, die den kleinsten Gesamtfehler $\text{err_ges}_i^{\text{ab}}$ ergibt:

$$\text{err_ges}_i^{\text{ab}} = \sqrt{\left(\frac{\Delta p_{N,i}}{p_{N,i}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta k_{\text{ex},i}}{k_{\text{ex},i}}\right)^2} + \alpha, \quad (3.3.2)$$

$$\text{mit: } \alpha = \sum_{j=a}^b \left\{ \left(\frac{\Delta R_{2,i}^j}{R_{2,i}^j}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\Delta\omega_i^j}{\Delta\omega_i^j}\right)^2 \right\},$$

mit den Standardabweichungen $\Delta p_{N,i}$, $\Delta k_{\text{ex},i}$, $\Delta R_{2,i}^j$ und $\Delta\Delta\omega_i^j$ der i -ten Aminosäure und dem Magnetfeld j . Für die Kombination von zwei unterschiedlichen Magnetfeldstärken

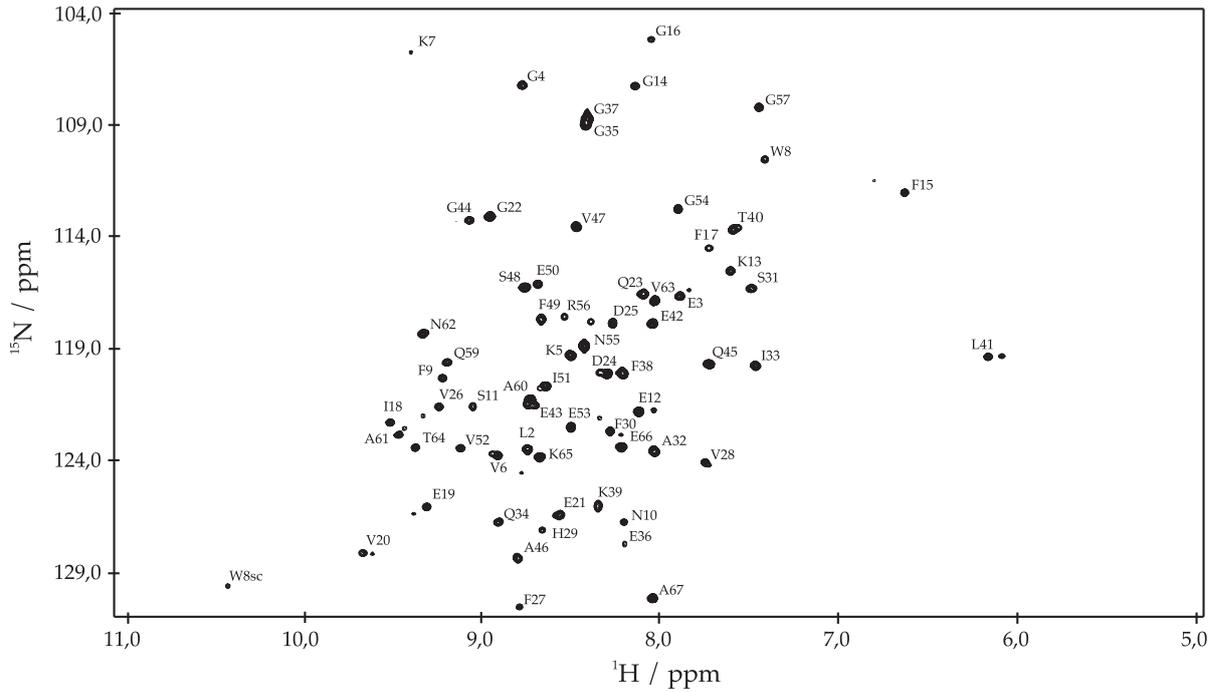


Abb. 3.37.: ^1H - ^{15}N -*tr*HSQC-Spektrum des Kälteschockproteins aus *Bacillus subtilis*. Die Aufnahme erfolgte an $B_0 = 21.1$ T bei $T = 298$ K, $c = 1$ mM, $\text{pH} = 7.5$, 10 % (v/v) D_2O . Die Zuordnung wurde aus [148] übernommen und nachfolgend überprüft [203]. Sie ist im Einbuchstabencode angegeben (sc=Seitenkette). Der entfaltete Zustand ist unter den gewählten Bedingungen mit $p_U \simeq 2\%$ populiert.

ergeben sich bei fünf genutzten Magnetfeldern zehn verschiedene Kombinationen (s. Tab. 3.12).

Zusätzlich zur globalen Regression ist eine voneinander unabhängige Variation der Startparameter für p_N , k_{ex} und $\Delta\omega$ genutzt worden, $0.95 \leq p_N \leq 0.99$, $200 \text{ Hz} \leq k_{\text{ex}} \leq 1400 \text{ Hz}$ und $200 \leq \Delta\omega \leq 3000 \text{ Hz}$ (Angabe von $\Delta\omega$ für $B_0 = 14.1$ T). Für die letztendliche Anpassung sind jeweils diejenigen Startparameter gewählt worden, die den kleinsten Gesamtfehler ergeben.

Die sechs freien Regressionsparameter in Gl. (2.1.22) sind durch die Annahme von $p_N + p_U = 1$ (Arbeitsmodell der Zwei-Zustandsfaltung von *BsCspB*) und $R_{2N} = R_{2U} = R_2$ auf vier reduziert worden.

Die Abb. A.17 im Anhang A.20 veranschaulicht die Gültigkeit der Annahme von $R_{2N} = R_{2U} = R_2$. Aufgrund des relativ starken Populationsunterschiedes zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand von *BsCspB* führen selbst grobe Abweichungen von $R_{2N} = R_{2U}$ zu sehr kleinen Änderungen des Verlaufes der Relaxationsdispersion.

Magnetfeldkombination			
II	III	IV	V
5,6	5,6,7	5,6,7,8	5,6,7,8,9
5,7	5,6,8	5,6,7,9	
5,8	5,6,9	5,6,8,9	
5,9	5,7,8	5,7,8,9	
6,7	5,7,9	6,7,8,9	
6,8	5,8,9		
6,9	6,7,8		
7,8	6,7,9		
7,9	6,8,9		
8,9	7,8,9		

Tab. 3.12.: Verschiedene Kombinationen für zwei, drei, vier oder fünf unterschiedliche Magnetfelder. Die Ziffern stehen stellvertretend für die Daten, die bei $\omega_L^{\text{1H}} = 500$ MHz (5), $\omega_L^{\text{1H}} = 600$ MHz (6), $\omega_L^{\text{1H}} = 700$ MHz (7), $\omega_L^{\text{1H}} = 800$ MHz (8) oder $\omega_L^{\text{1H}} = 900$ MHz (9) aufgenommen worden sind.

3.3.2. Regressionsparameter für die globale Anpassung an unterschiedliche Magnetfelder

3.3.2.1. Ausschließliche Nutzung des R_2 -Dispersionsexperimentes

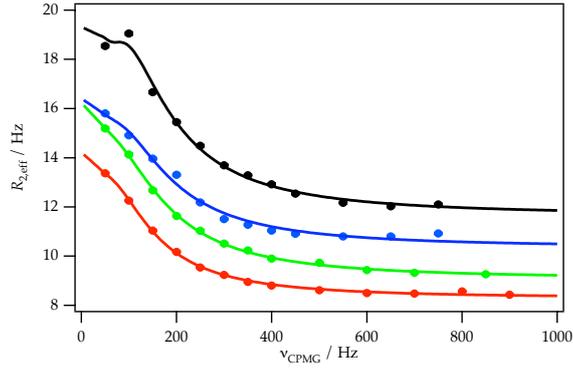
Mit der in Abschnitt 3.3.1 vorgestellten Datenanalyse ist für jede Aminosäure von *BsCspB* diejenige Magnetfeldkombination ausgewählt worden, die den kleinsten Gesamtfehler err_ges ergibt (s. Gl. (3.3.2)). Die Tab. A.10 gibt die jeweilige aminosäurespezifische Kombination wieder. Der dieser Auswahl zugehörige Gesamtfehler err_ges ist in Tab. A.11 (ebenfalls im Anhang A.21) angegeben.

Die globale Regression der Gl. (2.1.22) an die transversale Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kernes von Q23, S48 und E50 von *BsCspB*, die an je vier unterschiedlichen Magnetfeldern aufgenommen worden sind, ist in Abb. 3.38 gezeigt. In der Tab. 3.13 sind die Regressionsparameter dieser Anpassung angegeben. Die aus der globalen Datenanalyse angepassten Werte für k_{ex} , p_A und $\Delta\omega$ sind in der Abb. 3.39 für diejenigen Aminosäuren angegeben, die der Bedingung $\text{err_ges} \leq 1$ genügen (s. Gl. (3.3.2)).

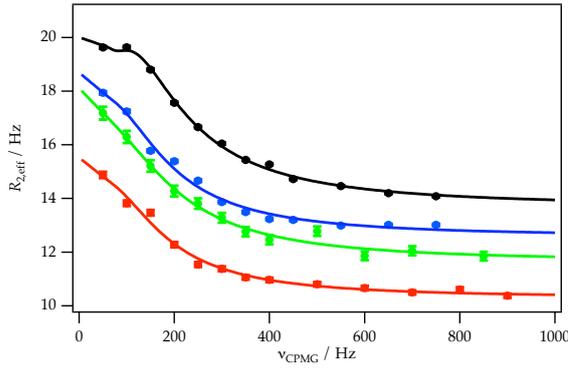
Die Population des nativen Zustandes von *BsCspB* variiert zwischen 97.5 % (um D25, E53, G54, N55, R56) und etwa 99.5 % (K5, F17, T40, E43), s. Abb. 3.39 (a). Die aufgezählten Aminosäuren finden sich sowohl in β -Faltblattelementen (K5, F17, D25 und E53) als auch in unstrukturierten *Loop*-Bereichen (T40, E43, G54, N55, R56) wieder.

Die Austauschrate k_{ex} nimmt Werte zwischen 300 Hz (K5, N55), 1000 Hz (F17, T40, F49, E50) und 1700 Hz (W8) an. Auch hier kann keine Korrelation zwischen der Größe der Austauschrate und der ausgebildeten Sekundärstruktur des nativen Zustandes des Kälteschockproteins (s. Abb. 2.28 in Abschnitt 2.4.1) festgestellt werden.

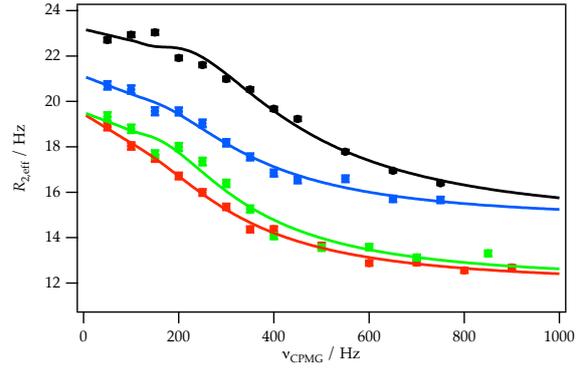
Da der ^{15}N -Kern von Tryptophan 8 einen zuverlässigen Datensatz besitzt, kann nun ein



(a)



(b)



(c)

Abb. 3.38.: Transversale Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kernes von Q23 (a), S48 (b) und E50 (c) von *BsCspB*. Die einzelnen Magnetfelder sind farblich unterschiedlich dargestellt: $\omega_L^{1\text{H}} = 500$ MHz (rot), $\omega_L^{1\text{H}} = 600$ MHz (in grün), $\omega_L^{1\text{H}} = 700$ MHz (in blau) und $\omega_L^{1\text{H}} = 900$ MHz (in schwarz). Die Ergebnisse der globalen Anpassung der Gl. (2.1.22) an die experimentellen Daten sind in Tab. 3.13 angegeben.

Aminosäure	Anzahl*	$k_{\text{ex}} / \text{Hz}$	$p_A / \%$	$\Delta\omega / \text{Hz}$
Q23	II	610 ± 40	98.22 ± 0.06	665 ± 20
	III	470 ± 50	98.07 ± 0.11	645 ± 25
	IV	490 ± 70	98.21 ± 0.12	650 ± 35
S48	II	530 ± 70	98.60 ± 0.10	755 ± 35
	III	550 ± 65	98.62 ± 0.08	765 ± 35
	IV	540 ± 65	98.61 ± 0.08	745 ± 35
E50	II	1020 ± 125	98.98 ± 0.06	1410 ± 80
	III	1010 ± 135	98.98 ± 0.06	1395 ± 85
	IV	945 ± 160	99.02 ± 0.08	1375 ± 105

Tab. 3.13.: Ergebnisse der globalen Regressionsanalyse von drei Aminosäuren von *BsCspB*. *: Anzahl der genutzten Magnetfelder. Die ausgewählte Magnetfeldkombination ist in Tab. A.10 im Anhang A.21.1, der Strukturparameter $\Delta\omega$ für $B_0 = 11.8$ T angegeben.

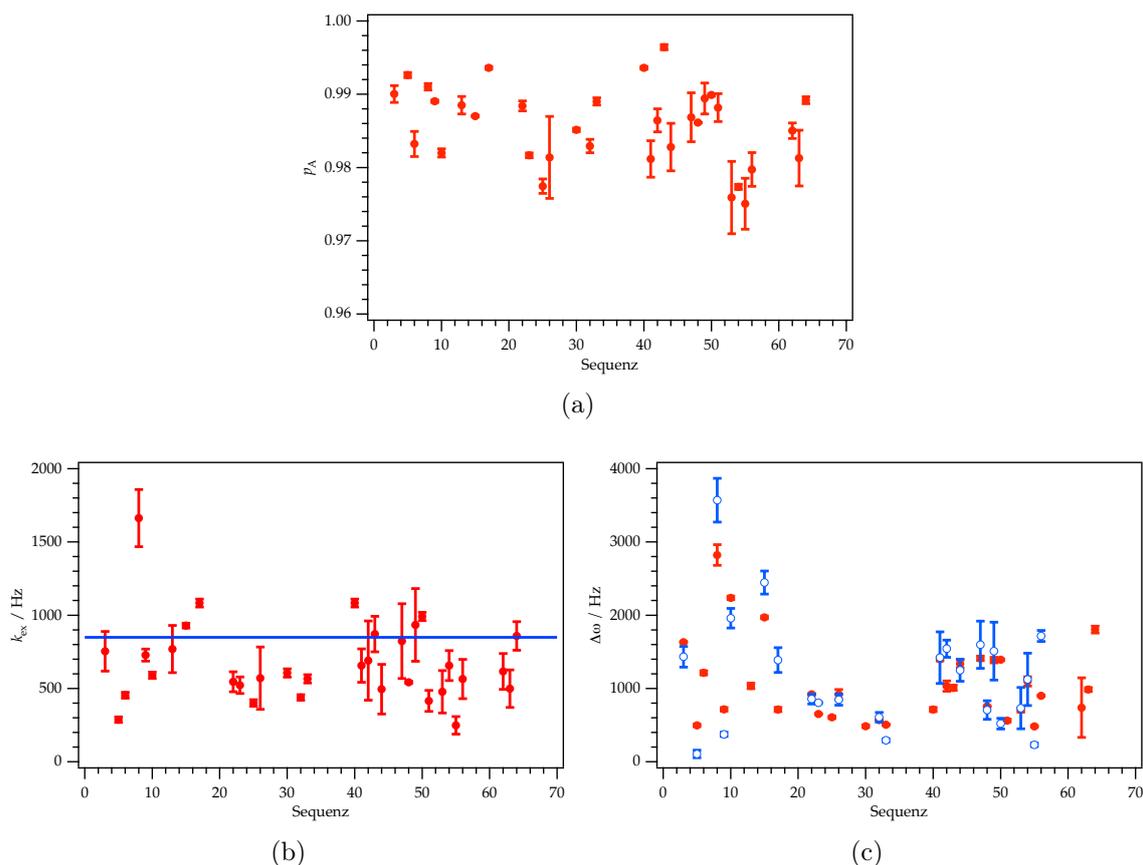


Abb. 3.39.: Ergebnisse der globalen Regression anhand Gl. (2.1.22) für p_A (a), k_{ex} (b) und $\Delta\omega$ (c), die der Bedingung $\text{err_ges} \leq 1$ genügen (s. Gl. (3.3.2)). Dargestellt ist der Mittelwert aus der Anpassung an zwei, drei oder vier Magnetfelder. Der Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung zwischen diesen drei Anpassungen. In (b) ist als Vergleich die Austauschrate k_{ex} , die aus der kinetischen Fluoreszenzspektroskopie folgt [146], mit einer blauen horizontalen Linie eingezeichnet. In (c) erfolgt der Vergleich zwischen dem individuell angepassten $\Delta\omega$ -Wert (aus der Dispersionsanalyse, rote geschlossene Kreise, $\Delta\omega^{\text{Dispersion}}$) und dem aus einer NMR-Harnstofftitration extrapolierten Wert [204] (blaue offene Kreise, $\Delta\omega^{\text{Titration}}$), jeweils an $B_0 = 11.8$ T. Eine Korrelationsanalyse zwischen $\Delta\omega^{\text{Dispersion}}$ und $\Delta\omega^{\text{Titration}}$ ist in Abb. 3.40 angegeben.

Vergleich zwischen der Faltungsrate von *BsCspB*, die aus der globalen NMR-Relaxationsanalyse, und derjenigen, die aus der Fluoreszenzspektroskopie folgt, gezogen werden. Der k_{ex} -Wert des Rückgratamides von W8, der mittels transversaler Relaxationsdispersion bestimmt worden ist, weicht stark von dieser Austauschrate ab (W8 als Fluoreszenzsonde: $k_{\text{ex}} = (849 \pm 6)$ Hz [146]; NMR-spektroskopisch bestimmte Austauschrate für W8: $k_{\text{ex}} = (1660 \pm 200)$ Hz; jeweils identische Pufferzusammensetzung, Proteinkonzentration dagegen unterschiedlich: $c^{\text{Fl}} = 1.2 \mu\text{M}$, $c^{\text{NMR}} = 1.0 \text{ mM}$).

Der Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand von *BsCspB* variiert über die Aminosäuresequenz um etwa eine Größenordnung. Sowohl $\Delta\omega = 500$ Hz (K5, F30, A32, I33, N55) als auch $\Delta\omega = 2000$ Hz (N10, F15, T64) und $\Delta\omega = 3000$ Hz (W8) folgen aus der globalen Regressionsanalyse.

In einer vorangegangenen Arbeit konnte Ulrich Weininger die Änderung des Unterschie-

des der chemischen Verschiebung zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand vom Kälteschockprotein direkt im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum verfolgen [204]. Da im Übergangsbereich zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand vom *BsCspB* die Rückgratzuordnung beider Konformationen für viele Aminosäuren vorliegt, kann direkt aus dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum der aminosäurespezifische Wert für $\Delta\omega$ abgelesen werden. Eine Extrapolation auf die Harnstoffkonzentration $c = 0$ M liefert den erwarteten Wert für $\Delta\omega$ für die Messung der transversalen Relaxationsdispersion in Abwesenheit jeglichen Denaturierungsmittels. Die Abb. A.18 im Anhang A.21 gibt diese Extrapolation beispielhaft für N10, V26, G44 und N55 an, die Tab. A.12 für alle Aminosäuren, deren native und entfaltete Konformation im Übergangsbereich zugeordnet werden konnte. In Abb. 3.39 (c) ist dieser Vergleich zwischen angepassten (geschlossene Kreise) und extrapolierten $\Delta\omega$ -Werten (offene Kreise) gezeigt. Die grobe visuelle Übereinstimmung zwischen beiden Werten kann mit einem Korrelationskoeffizient von $r = (90.6 \pm 0.3)\%$ bestätigt werden (s. Abb. 3.40).

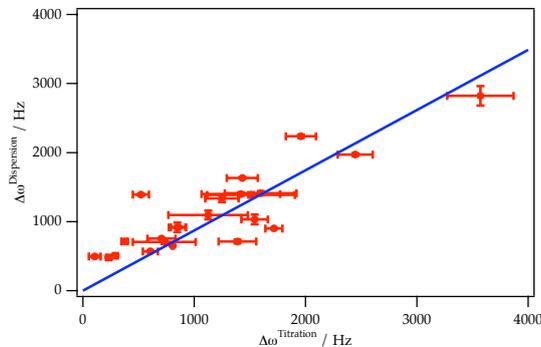


Abb. 3.40.: Korrelation zwischen dem $\Delta\omega$ -Wert, der aus der globalen Regressionsanalyse folgt ($\Delta\omega^{\text{Dispersion}}$) und dem Wert, der aus der Extrapolation der Harnstoffabhängigkeit folgt ($\Delta\omega^{\text{Titration}}$), jeweils an $B_0 = 11.8$ T. Eine Regression dieser Abhängigkeit ergibt einen Korrelationskoeffizienten $r = (90.6 \pm 0.3)\%$.

Die globale Regressionsanalyse der schnellen Faltung von *BsCspB*, der Messungen der transversalen Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kernes an fünf Magnetfeldern zugrunde liegen, legt ein komplexeres Modell der Faltung zwischen der entfalteten und gefalteten Polypeptidkette als das Zwei-Zustandsmodell nahe. Sowohl der thermodynamische Parameter p_A als auch der kinetische Parameter k_{ex} variieren über die Aminosäuresequenz stark. Es ist weder für p_A noch für k_{ex} möglich einen globalen Wert für das Kälteschockprotein anzugeben. Im Abschnitt 3.3.3 schließt sich eine Diskussion dieser Ergebnisse an.

3.3.2.2. Nutzung des R_2 -Dispersionsexperimentes und eines Hilfsexperimentes

Der spektrale Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand $\Delta\omega$ vom Kälteschockprotein kann aminosäurespezifisch bestimmt werden ([204], s. a. Tab. A.12). Die Regressionsanalyse der Daten der R_2 -Relaxationsdispersion von *BsCspB* ist im Folgenden mit einem vorgegebenen und während der Regression konstant gesetztem $\Delta\omega$ -Wert durchgeführt worden. Die Auswahl der optimalen

Magnetfeldkombination jeder einzelnen Aminosäure erfolgte analog zu Abschnitt 3.3.2.1. Der Fall von zwei Magnetfeldern ist in Abb. 3.41 wiedergegeben. Sowohl der aminosäure-

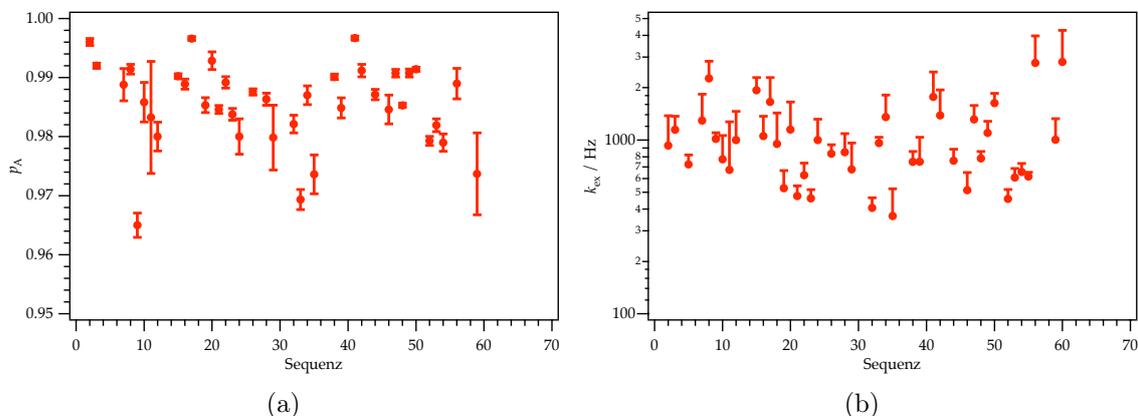


Abb. 3.41.: Ergebnisse der globalen Regression anhand Gl. (2.1.22) für p_A (a) und k_{ex} (b) für zwei verschiedene Magnetfelder, die der Bedingung $err_ges \leq 1$ genügen (s. Gl. (3.3.2)). Der Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen nativem und entfaltetem Zustand von $BsCspB$ ist anhand [204] angenommen und während der Regression konstant gesetzt worden. Die zugrundeliegende Magnetfeldkombination ist im Anhang A.21.4 angegeben (s. Tab. A.13).

spezifische Verlauf der Population des nativen Zustandes p_A (Abb. 3.41 (a)) als auch der Austauschrate k_{ex} (Abb. 3.41 (b)) variiert über die Sequenz stark. Nur Sequenzbereiche von drei bis maximal vier aufeinanderfolgenden Aminosäuren besitzen ähnliche p_A - bzw. k_{ex} -Werte. Für E21, G22 und Q23: $p_A \simeq 98.5\%$, $k_{ex} \simeq 500$ Hz, für V47, S48 und F49: $p_A \simeq 99.0\%$, $k_{ex} \simeq 1000$ Hz, für V52, E53 und G54: $p_A \simeq 98.0\%$, $k_{ex} \simeq 600$ Hz. Im Anhang A.21.4 ist die jeweilige aminosäurespezifische Magnetfeldkombination angegeben (s. Tab. A.13).

3.3.3. Interpretation der Ergebnisse der globalen Regression

In den Abschnitten 3.3.2.1 und 3.3.2.2 konnte gezeigt werden, dass für das Kälteschockprotein weder die Population p_A des nativen Zustandes noch die Austauschrate k_{ex} zwischen dem nativen und dem entfaltetem Zustand einen konstanten Wert über die Aminosäuresequenz annehmen. Da eine hohe Korrelation des Strukturparameters $\Delta\omega$ aus R_2 -Dispersionsexperimenten mit den extrapolierten Werten aus einer Harnstofftitration vorliegt, sind die Ergebnisse sowohl für p_A als auch für k_{ex} als zuverlässig einzustufen. Die Nutzung von verschiedenen Magnetfeldern und deren Kombination ist für die ausschließliche Nutzung der Daten des R_2 -Dispersionsexperimentes unabdingbar.

Die Aufnahme der aminosäurespezifischen $\Delta\omega$ -Werte aus der Harnstofftitration und deren Konstanthalten während der globalen Regressionsanalyse führt weder zu einer Änderung von p_A noch von k_{ex} verglichen zur freien Variation aller Regressionsparameter (Vgl. zw. Abb. 3.39 (a) bzw. (b) und Abb. 3.41 (a), (b)).

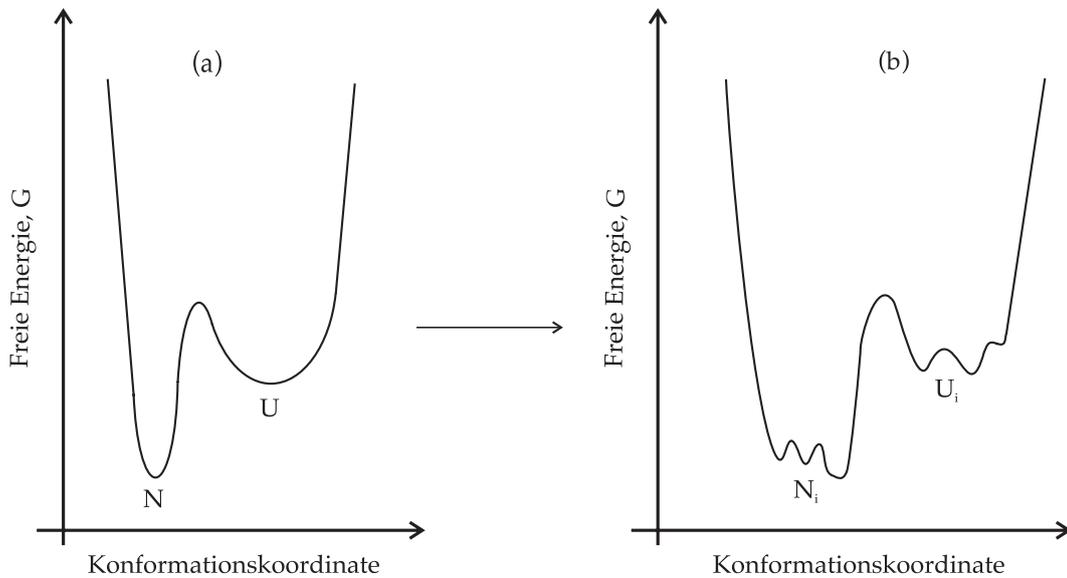


Abb. 3.42.: (a) Zwei-Zustandsmodell der Faltung zwischen dem nativen (N) und dem entfalteten Zustand (U) einer Polypeptidkette. (b) Eine detaillierte Analyse der Faltung des Kälteschockproteins im Gleichgewicht mittels Dispersionsexperimenten der transversalen Relaxationsrate in atomarer Auflösung ergibt eine Abweichung von dem in (a) gezeigten Modell. Ob die aminosäurespezifischen Verschiebungen der freien Energie in N oder in U vorliegen, kann nicht bestimmt werden.

Die Abb. 3.42 fasst modellhaft das Ergebnis der globalen Regressionsanalyse zur Aufklärung der Faltung des Kälteschockproteins im Gleichgewicht zusammen. Die detaillierte Analyse der Dispersionsexperimente der transversalen Relaxationsrate ergibt eine Abweichung von dem in Abb. 3.42 (a) gezeigten Zwei-Zustandsmodell zwischen nativer und entfalteter Konformation. Die im Abschnitt 3.3.2.1 und 3.3.2.2 angeführten Ergebnisse deuten auf eine rauere Energielandschaft innerhalb (und damit auch zwischen) N und U hin als für das Modellprotein *BsCspB* zu erwarten ist (s. Abb. 3.42 (b)), obwohl das Kälteschockprotein in der Literatur als Musterbeispiel für ein Protein angegeben wird, welches einem Zwei-Zustandsmechanismus folgt. Die Datenqualität der individuellen Relaxationsdispersionsverläufe, die in dieser Arbeit gezeigt worden sind, lässt diesen Schluss zu (s. Abb. 3.38). Ob die Verschiebungen der freien Energie innerhalb von N oder von U vorliegen, kann nicht bestimmt werden.

Aus der globalen Regressionsanalyse der Faltung des Kälteschockproteins im Gleichgewicht folgt, dass die Austauschrate $k_{\text{ex}}^{\text{global}}$, die dem idealen Zwei-Zustandsmodell entspricht, um einen Korrekturterm $k_{\text{ex}}^{\text{lokal},i}$, der zusätzlichen Fluktuationen in U und/oder in N Rechnung trägt, für jede Aminosäure i zu modifizieren ist:

$$k_{\text{ex}}^{\text{apparent},i} = k_{\text{ex}}^{\text{global}} + k_{\text{ex}}^{\text{lokal},i}. \quad (3.3.3)$$

Anlehnend an dieses Ergebnis konnten C. Magg und Mitarbeiter 2004 in einer Ensemble-FRET-Studie am Kälteschockprotein aus *Bacillus caldolyticus* zeigen, dass die Faltungsreaktion zwar auf der einen Seite einem kinetischen Zwei-Zustandsprozess (ohne Ausbildung jeglicher Faltungsintermediate) entsprechen kann. Auf der anderen Seite muss jedoch dieser Zwei-Zustandsprozess nicht notwendigerweise auch der Ausbildung der Se-

kundärstruktur der gefalteten Polypeptidkette entsprechen [205]. Ferner konnte eine weitere Arbeit mittels Φ -Wert-Analyse [206] zeigen, dass die N- und C-terminalen Regionen der Kälteschockproteine CspB aus *Bacillus subtilis* sowie Csp aus *Bacillus caldolyticus* in einem unterschiedlichen Maße zur Faltungskinetik beitragen, obwohl sie in der gefalteten Struktur eng benachbart ausgebildet sind [207].

Die globale Regressionsanalyse der NMR-Relaxationsdaten zum Studium der Faltung des Kälteschockproteins *BsCspB* im Gleichgewicht legt einen aminosäurespezifischen und **keinen** der gesamten Polypeptidkette entsprechenden Faltungsprozess nahe. Die vorgelegte Studie lässt aber keine Korrelation zwischen dem sequenzspezifischen thermodynamischen und kinetischen Parametern der Proteinfaltung und den in der nativen Konformation zugehörigen ausgebildeten Sekundärstrukturelementen erkennen.

Um ein noch tieferes Verständnis für die Faltung von *BsCspB* in atomarer Auflösung im Gleichgewicht zu erhalten, können Experimente vorgeschlagen werden, die ergänzend zu den bisherigen die Konformationsdynamik der C_α -Resonanzen und der Seitenkettsignale jeder Aminosäure von *BsCspB* in die Datenanalyse mit einbeziehen. Die im Rahmen dieser Arbeit diskutierte globale Regressionsanalyse kann problemlos auf diese Experimente übertragen werden um vertrauenswürdige Ergebnisse zu erhalten.

3.4. Einfluß von DHPC auf die Struktur von $A\beta$

In Abschnitt 2.4.4 ist dargelegt worden, dass das Peptid $A\beta$ als Mitverursacher der Alzheimer-Krankheit gilt [165]. Da $A\beta$ als Spaltprodukt bspw. über membranständige Sekretasen entsteht, ist die Rückgratstruktur von $A\beta$ in Abhängigkeit von der Konzentration an DHPC-Molekülen in einem "Membraniumfeld" untersucht worden. Dabei ist anfangs die freie Form von DHPC charakterisiert worden. Anschließend erfolgte die Aufnahme von Protonenspektren und des Diffusionskoeffizienten von $A\beta$ in Abhängigkeit der DHPC-Konzentration.

3.4.1. Charakterisierung von DHPC

Als amphiphiles Molekül bildet DHPC oberhalb einer kritischen Konzentration von $c \geq (11 \dots 15)$ mM molekulare Aggregate [183], sogenannte Micellen. Das Ausbilden der micellären Struktur der DHPC-Moleküle ist mittels NMR-spektroskopischen Diffusionsmessungen anhand der ^1H - als auch der ^{31}P -Kerne verfolgt worden. Die Abb. 3.43 zeigt das eindimensionale ^1H - (a) bzw. ^{31}P -Spektrum (b) von DHPC.

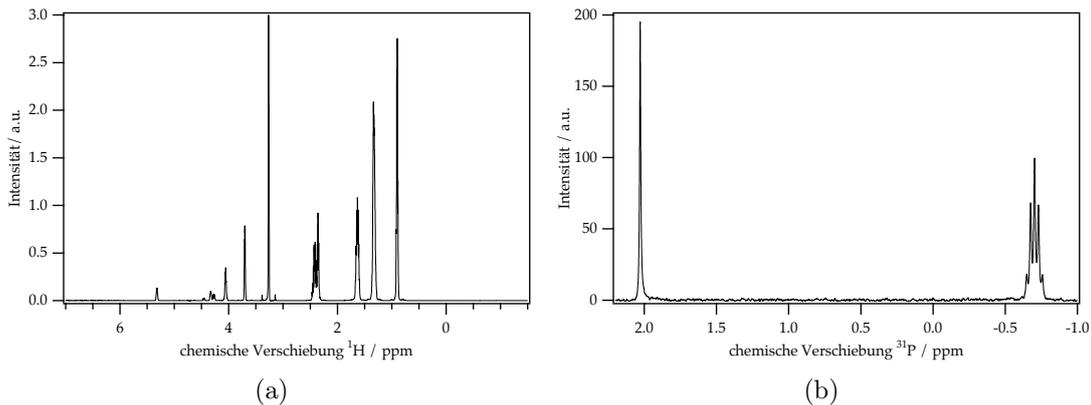


Abb. 3.43.: Eindimensionales ^1H - (a) bzw. ^{31}P -Spektrum (b) von DHPC der Konzentration $c^{\text{DHPC}} = 75$ mM. Das Phosphorspektrum ist während der Aufnahme nicht protonenentkoppelt worden. Das tieffeldverschobene Signal stellt das Resonanzsignal des Puffers dar, das hochfeldverschobene das der Kopfgruppe von DHPC. Die Daten wurden an $B_0 = 14.1$ T bei $T = 310$ K und 50 mM NaP, pH = 7.4, 10 % (v/v) D_2O aufgenommen.

Wie in Abschnitt 2.1.1.4 beschrieben, sind mit variabler Gradientenstärke eindimensionale Spektren aufgenommen und damit der Diffusionskoeffizient von DHPC im Konzentrationsbereich von $c^{\text{DHPC}} = (4 \dots 100)$ mM bestimmt worden (s. Abb. 3.44). Beginnend ab einer Konzentration von $c^{\text{DHPC}} = 12$ mM sinkt der Diffusionskoeffizient von $D \simeq 6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ auf einen Plateauwert $D \simeq 2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ bei $c^{\text{DHPC}} = 75$ mM hinab. Sowohl bei $c^{\text{DHPC}} = 4$ mM als auch bei $c^{\text{DHPC}} = 75$ mM korreliert der mittels Protonenspektroskopie bestimmte Diffusionskoeffizient sehr gut mit dem mittels ^{31}P -Spektroskopie bestimmten Wert.

Die in der Literatur durch Oberflächenspannung gemessene Größenordnung des Wertes

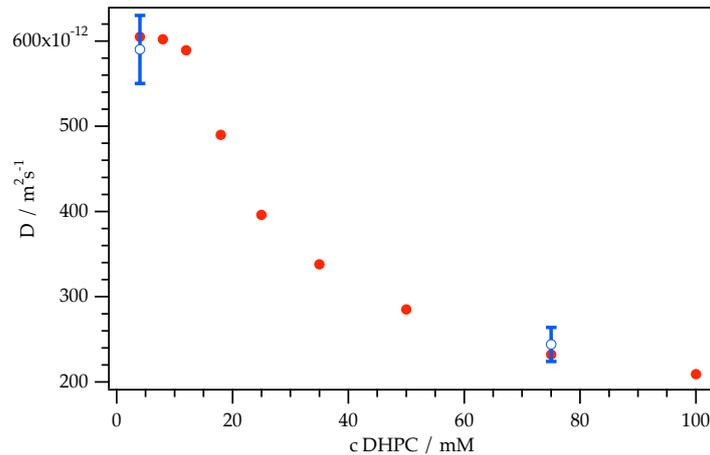


Abb. 3.44.: Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von DHPC in Abhängigkeit von der Konzentration an DHPC-Molekülen. Die Integration des Protonenspektrums (rote ausgefüllte Kreise, s. a. Abb. 3.43 (a)) erfolgte von $^1\text{H} = (2.98 \dots 3.50)$ ppm, die des ^{31}P -Spektrums (blaue offene Kreise, s. a. Abb. 3.43 (b)) von $^{31}\text{P} = (-0.41 \dots -1.04)$ ppm. Die Daten wurden an $B_0 = 14.1$ T bei $T = 310$ K und 50 mM NaP, pH = 7.4, 10% (v/v) D_2O aufgenommen.

für die kritische Mizellenkonzentration cmc von $cmc \simeq 10$ mM kann mit der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten bestätigt werden. Eine exakte quantitative Angabe für den cmc -Wert, basierend auf den NMR-Diffusionsdaten, erweist sich jedoch als nicht praktikabel.

3.4.2. Strukturelle Charakterisierung von $A\beta$ mit ansteigender DHPC-Konzentration

Im vorherigen Abschnitt wurde die starke Abhängigkeit der Konformation der DHPC-Moleküle im Konzentrationsbereich $c^{\text{DHPC}} = (0 \dots 100)$ mM gezeigt. Da im Bereich $c^{\text{DHPC}} = (0 \dots 25)$ mM der stärkste Abfall des Diffusionskoeffizienten von DHPC beobachtet wurde (s. Abb. 3.44), sind für diesen Bereich Protonenspektren aufgenommen und Diffusionsmessungen des löslichen $A\beta$ -Peptides durchgeführt worden.

Da DHPC keine Resonanzsignale mit Werten der chemischen Verschiebung $^1\text{H} \geq 6$ ppm besitzt (s. Abb. 3.43 (a)), ist auf die Auswertung des Amidprotonenbereiches von $A\beta$ der Fokus gelegt worden. In diesem chemischen Verschiebungsbereich ($^1\text{H} = (6 \dots 9)$ ppm) zeigt das lösliche $A\beta$ -Peptid ausgehend von $c^{\text{DHPC}} = 0$ mM bis $c^{\text{DHPC}} = 8$ mM keine Veränderungen (obere vier Spektren in Abb. 3.45). Jedoch reduziert sich oberhalb von $c^{\text{DHPC}} = 8$ mM bei einer chemischen Verschiebung von etwa $^1\text{H} = 6.5$ ppm bzw. $^1\text{H} = 7.5$ ppm die Signalanzahl der Amidprotonen von $A\beta$. Ab $c^{\text{DHPC}} = 12$ mM bildet sich ein Amidprotonensignal von $A\beta$ bei etwa $^1\text{H} = 8.5$ ppm aus, das in DHPC-freier Lösung nicht vorhanden ist. Die Spektren von $A\beta$ in höchster DHPC Konzentration ($c^{\text{DHPC}} = 18$ mM bzw. $c^{\text{DHPC}} = 25$ mM) sind nahezu identisch. Die beiden Amidprotonenspektren von $A\beta$, die in Gegenwart von $c^{\text{DHPC}} = 0$ mM bzw. $c^{\text{DHPC}} = 25$ mM aufgenommen wurden, sind in der Anzahl, der chemischen Verschiebung und der Signalstärke der Resonanzsignale nicht mehr vergleichbar. Da die Amidprotonenregion die

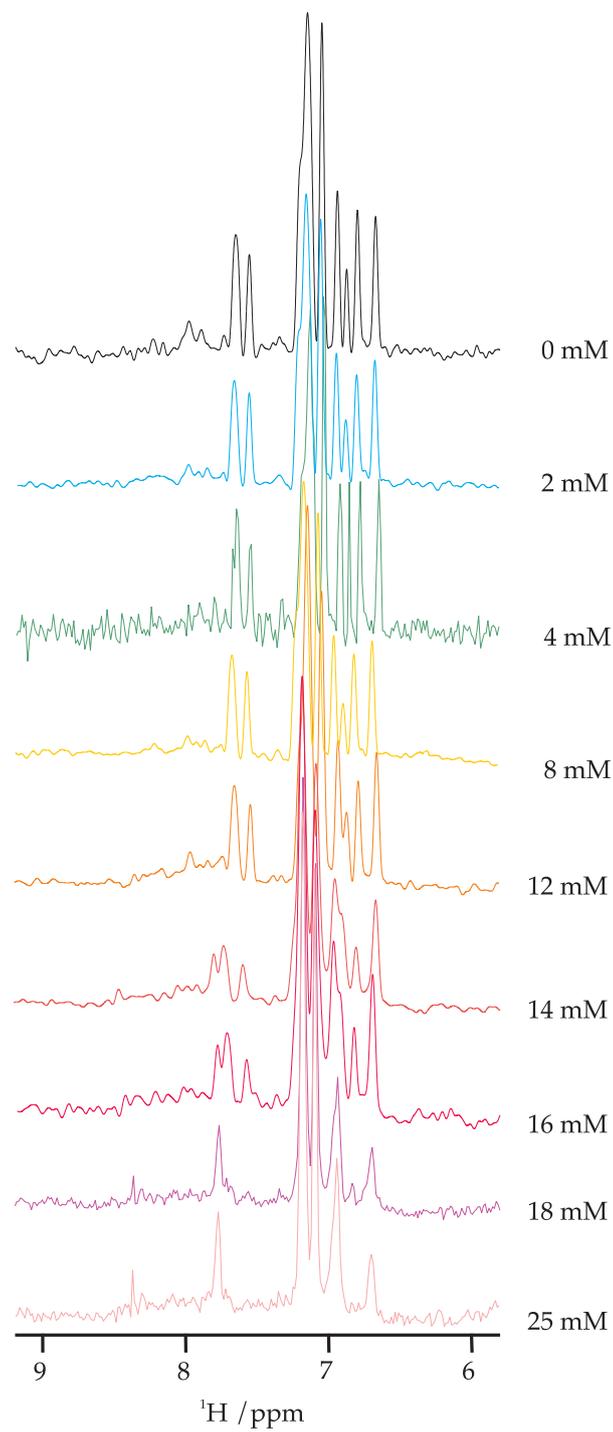


Abb. 3.45.: Amidprotonenspektren des A β -Peptides mit $c^{\text{A}\beta} = 50 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit von der DHPG-Konzentration, in 50 mM NaP, pH = 7.4, 10% (v/v) D $_2$ O und bei $T = 310 \text{ K}$. Zwischen $c^{\text{DHPG}} = 8 \text{ mM}$ und $c^{\text{DHPG}} = 18 \text{ mM}$ sind starke Änderungen im A β -Protonenspektrum zu beobachten.

Rückgratstruktur von $A\beta$ repräsentiert, weisen die gemessenen Änderungen in diesem Bereich auf Veränderungen in der Sekundärstruktur des $A\beta$ -Peptides hin, die sich aufgrund einer DHPC-Konzentration, die oberhalb des *cmc*-Wertes liegt, ergibt.

Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von $A\beta$ in Abhängigkeit von der DHPC-Konzentration erlaubt es nun, die anhand der Protonenspektren vermutete Veränderung der $A\beta$ -Struktur zu quantifizieren. Der mittels stimuliertem Echo gemessene Diffusionskoeffizient von $A\beta$ besitzt bei $c^{\text{DHPC}} = 0 \text{ mM}$ einen Wert von $D = (2.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (Regression des Diffusionstermes der Gl. (2.1.45) an die schwarzen Punkte in Abb. 3.46). Dies korreliert sehr gut mit dem theoretisch zu erwartenden Wert einer unstruk-

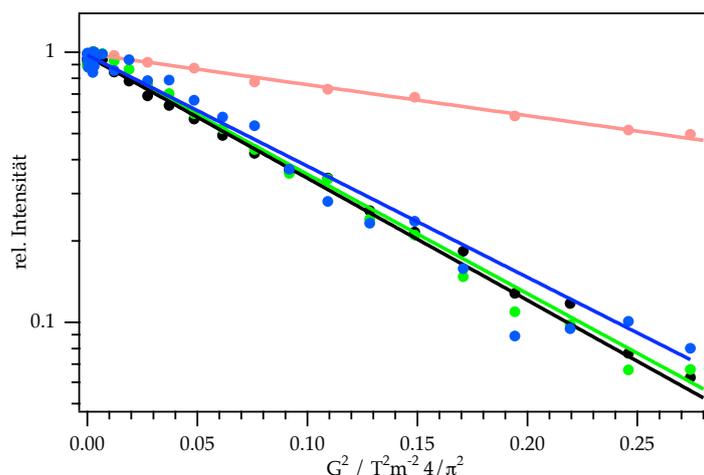


Abb. 3.46.: Halblogarithmische Auftragung der NMR-Signalintensität der Amidprotonen von $A\beta$ in Abhängigkeit des Quadrates der Gradientenstärke G und für unterschiedliche DHPC-Konzentrationen. Der Anstieg der durchgezogenen Linien korreliert linear mit dem Diffusionskoeffizienten (s. Gl. (2.1.45)). Für $c^{\text{DHPC}} = 0 \text{ mM}$ (in schwarz), $c^{\text{DHPC}} = 2 \text{ mM}$ (in blau) und $c^{\text{DHPC}} = 4 \text{ mM}$ (in grün) sind keine Veränderungen des Diffusionskoeffizienten zu beobachten ($D = (2.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$). In $c^{\text{DHPC}} = 25 \text{ mM}$ (in pink) sinkt der Diffusionskoeffizient von $A\beta$ auf $D = (0.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$.

turierten Polypeptidkette der Größe $M = 4.3 \text{ kDa}$ [116]. Eine DHPC-Konzentration von $c^{\text{DHPC}} = 2 \text{ mM}$ oder von $c^{\text{DHPC}} = 4 \text{ mM}$ führt zu keiner Veränderung der Translationsdiffusion von $A\beta$. Dagegen zeigt die höchste verwendete Konzentration von $c^{\text{DHPC}} = 25 \text{ mM}$ einen starken Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten von $A\beta$. Dieser sinkt um etwa 80 % auf $D = (0.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (Punkte in pink in Abb. 3.46). Im Konzentrationsbereich $c^{\text{DHPC}} = (6 \dots 18) \text{ mM}$ zeigt $A\beta$ eine starke Aggregationsneigung. Somit ist dieser Bereich für Diffusionsmessungen nicht zugänglich (s. Abb. 3.47).

3.4.3. Zusammenfassende Diskussion

Für die Wechselwirkung zwischen $A\beta$ und DHPC konnten verschiedene Effekte NMR-spektroskopisch beobachtet werden. Sowohl strukturelle Änderungen als auch Einflüsse auf das Oligomerisierungsverhalten von $A\beta$ werden durch DHPC induziert.

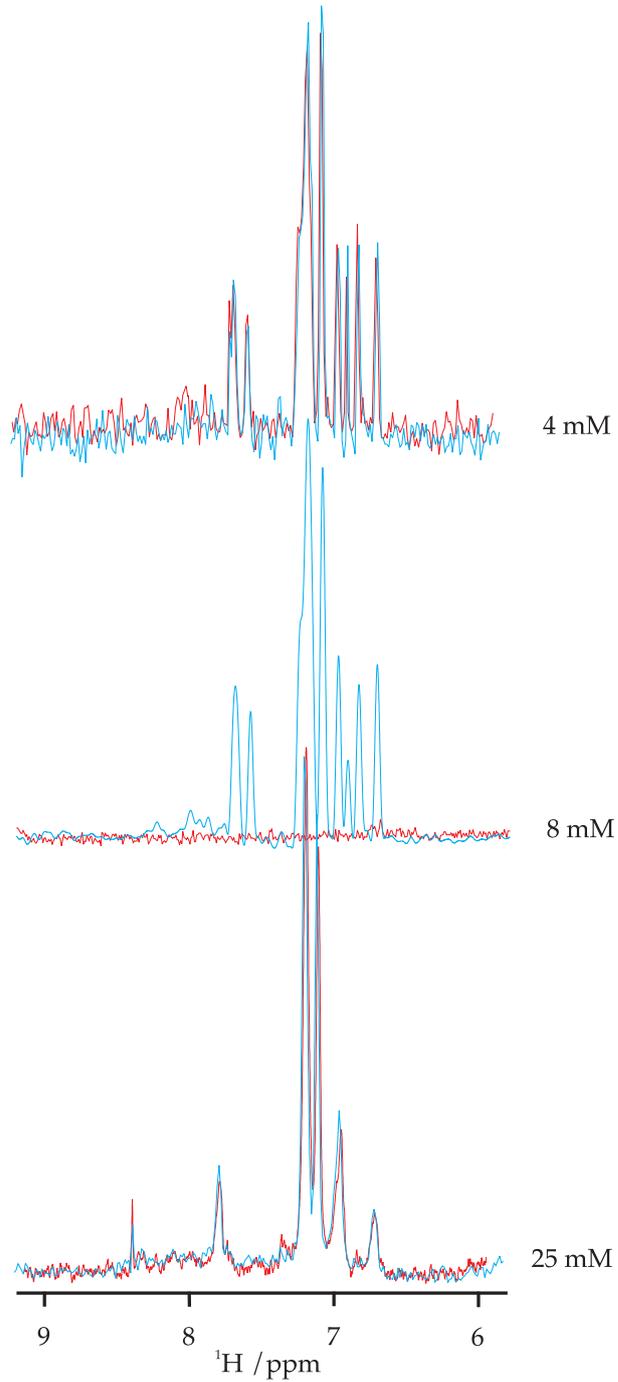


Abb. 3.47.: Amidprotonenspektren des A β -Peptides mit $c^{A\beta} = 50 \mu\text{M}$ in unterschiedlichen DHPc-Konzentrationen und in Abhängigkeit einer Wartezeit, in 50 mM NaP, pH = 7.4, 10 % (v/v) D₂O und bei $T = 310 \text{ K}$. Die Spektren in blau sind direkt im Anschluss an die jeweilige Probenpräparation und vor den Diffusionsmessungen aufgenommen worden (s. Abb. 3.46). Diejenigen in rot wurden nach weiteren vier Stunden aufgenommen (direkt nach den jeweiligen Diffusionsmessungen). Bei $c^{\text{DHPc}} = 8 \text{ mM}$ ist nach vier Stunden keine Protonenresonanz mehr detektierbar.

In Abwesenheit von DHPC zeigen die Amidprotonen des $A\beta$ -Peptides chemische Verschiebungen, die einer entfalteten Polypeptidkette entsprechen. Auch der unter den gleichen Bedingungen gemessene Diffusionskoeffizient von $A\beta$ gleicht dem Wert, den man für ein komplett entfaltetes Protein gleicher Größe erwartet [116] und ist in der Literatur bereits beschrieben worden [208]. Dieses strukturelle Verhalten von $A\beta$ bleibt bis $c^{\text{DHPC}} \leq 8 \text{ mM}$ erhalten. Auch der Diffusionskoeffizient von $A\beta$ ändert sich in diesem DHPC-Konzentrationsbereich nicht.

Nahe des cmc -Wertes von DHPC ($cmc^{\text{DHPC}} \simeq 15 \text{ mM}$) unterliegt das $A\beta$ -Peptid starken strukturellen Änderungen. Der Amidprotonenbereich von $A\beta$ zeigt eine größere Dispersion im Vergleich zum Spektrum in Abwesenheit von DHPC und deutet damit auf eine Strukturierung des Proteinrückgrates von $A\beta$ an. Oberhalb des cmc -Wertes von DHPC ist keine weitere Veränderung der Proteinrückgratstruktur von $A\beta$ anhand der Amidprotonenspektren messbar.

Die Interaktion zwischen DHPC-Micellen und $A\beta$ kann mit der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten bestätigt werden. Dieser sinkt für $A\beta$ um den Faktor fünf im Vergleich $c^{\text{DHPC}} = 0 \text{ mM}$ mit $c^{\text{DHPC}} = 25 \text{ mM}$.

Obwohl unterhalb des cmc -Wertes von DHPC keine strukturellen Änderungen des $A\beta$ -Peptides zu beobachten sind, ist dennoch eine Wechselwirkung zwischen nicht micellärer DHPC-Konformation und $A\beta$ zu schlussfolgern. In diesem Konzentrationsbereich von DHPC ($c^{\text{DHPC}} \simeq 8 \text{ mM}$) ist das Oligomerisierungs- bzw. Aggregationsverhalten von $A\beta$ stark erhöht. Für $c^{A\beta} = 50 \mu\text{M}$ ist nach vier Stunden keine NMR-Resonanz mehr detektierbar, gegensätzlich zum Verhalten in DHPC-freier bzw. $c^{\text{DHPC}} = 25 \text{ mM}$ -haltiger Lösung. Frühere Studien haben dagegen eine generelle Inhibierung der Aggregation von $A\beta$ in lipidhaltiger Umgebung vorgeschlagen [209]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten dagegen eher auf eine Wechselwirkung zwischen $A\beta$ und DHPC hin, die von der exakten DHPC-Konzentration und der verwendeten experimentellen Methode abhängt.

Die vorgestellte $A\beta$ -DHPC-Studie weist auf ein starkes Wechselspiel zwischen einer Membrenumgebung und dem Struktur- bzw. Oligomerisierungsverhalten eines pathogenen Peptides hin [210]. Die Berechnung einer hochaufgelösten Struktur des $A\beta$ -Peptides in solch einem Membraniumfeld könnte das Verständnis für diese Interaktion weiter erhöhen, möglicherweise auch in Hinsicht auf Therapieansätze gegen die Alzheimer-Krankheit.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit kam für die Charakterisierung von funktionellen Proteinzuständen vor allem die hochauflösende NMR-Spektroskopie zum Einsatz. Die einzelnen Proteinzustände wurden strukturell charakterisiert und bezüglich ihrer Dynamik auf verschiedenen Zeitskalen untersucht. Desweiteren sind Auswerteprogramme zur Datenanalyse entwickelt worden, die kinetische, thermodynamische und strukturelle Parameter an die aufgenommenen Messdaten anpassen.

So konnte die Dynamik der Zwei-Domänen-Prolylisomerase SlyD in atomarer Auflösung mittels NMR-Spektroskopie auf einer breiten Zeitskala detailliert studiert werden. Mit dem Vergleich zwischen freiem und verschiedenen gebundenen Zuständen konnten eindeutige Rückschlüsse auf die Funktion und auf die Aktivität von SlyD gezogen werden. Neben der bereits bekannten strukturellen Trennung beider Domänen zeigt auch die Dynamik signifikante Unterschiede zwischen den Domänen an. Es konnte gezeigt werden, dass das Zusammenspiel beider Domänen und auch deren Kommunikation für die Funktion von SlyD von großer Bedeutung sind. Mit Hilfe dieser Ergebnisse ist ein Modell für den Funktionsmechanismus von SlyD vorgeschlagen worden.

In einem weiteren Schritt konnte die hochaufgelöste Struktur der Prolylisomerase *EcSlpA* berechnet werden. Der Strukturvergleich zum sequenzhomologen *EcSlyD** konnte erste Anhaltspunkte für die im Vergleich zu *EcSlyD** erniedrigte Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität von *EcSlpA* aufzeigen. Sowohl der Vergleich der Rückgratdynamik beider Proteine auf der ps-bis-ns-Zeitskala als auch einer Bindungsstudie zu einem Modells substrat für die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomeraseaktivität ergeben Unterschiede, die strukturell begründet werden können.

Mit einer detaillierten Analyse der Faltung des Kälteschockproteins B aus *Bacillus subtilis* in aminosäurespezifischer Auflösung konnten Abweichungen vom Modell der idealen Zwei-Zustandfaltung zwischen gefalteter und entfalteter Konformation beobachtet werden. Mit der vorgestellten Auswerteprozedur ist es möglich, die Energielandschaft von *BsCspB* in atomarer Auflösung zu beschreiben.

Eine strukturelle Charakterisierung des pathogenen Peptides $A\beta$ ist in einer Membranimik erfolgt. Es konnten auf der einen Seite ausgeprägte strukturelle Änderungen des Peptidrückgrates und eine starke Verlangsamung der Translationsdiffusion von $A\beta$ in micellärer Umgebung gezeigt werden. Auf der anderen Seite beschleunigt sich das Oligomerisierungsverhalten des Peptides in Anwesenheit sub-micellärer DHPC-Moleküle signifikant.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und auf funktionelle Proteinzustände angewendeten Methoden konnten in einer großen Breite das starke gegenseitige Wechselspiel zwischen Struktur, Funktion, Dynamik und Aktivität der gefalteten wie auch der entfalteten Polypeptidkette aufzeigen.

Literaturverzeichnis

- [1] International Human Genom Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860–921, 2001. 1
- [2] D. Baker. A surprising simplicity to protein folding. *Nature*, 405:39–42, 2000. 1
- [3] K. A. Dill, S. B. Ozkan, M. S. Shell, and T. R. Weikl. The Protein Folding Problem. *Ann. Rev. Biophys.*, 37:289–316, 2008. 1
- [4] C. B. Anfinsen. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*, 181:223–230, 1973. 1
- [5] P. E. Leopold, M. Montal, and J. N. Onuchic. Protein folding funnels: A kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89:8721–8725, 1992. 1
- [6] T. R. Jahn and S. E. Radford. The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.*, 272:5962–5970, 2005. 1
- [7] R. Winter and F. Noll. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. B. G. Teubner Stuttgart, 1998. 1, 31, 32
- [8] K. Wüthrich. Protein Structure Determination in Solution by NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 265:22059–22062, 1990. 2
- [9] D. M. Korzhnev, T. L. Religa, W. Banachewicz, A. R. Fersht, and L. E. Kay. A Transient and Low-Populated Protein-Folding Intermediate at Atomic Resolution. *Science*, 329:1312–1316, 2010. 2
- [10] L. E. Kay. NMR studies of protein structure and dynamics. *J. Magn. Reson.*, 173:193–207, 2005. 2
- [11] K. A. Henzler-Wildman and D. Kern. Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450:964–972, 2007. 2, 6
- [12] I. I. Rabi. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Phys. Rev.*, 53:318, 1938. 4
- [13] F. Bloch. Nuclear Induction. *Phys. Rev.*, 70:460–473, 1946. 4
- [14] E. M. Purcell, H. C. Torrey, and R. V. Pound. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.*, 69:37–38, 1946. 4

- [15] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR*, 6:277–293, 1995. 4
- [16] B. A. Johnson and R. A. Blevins. A computer program for visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR*, 4:603–614, 1994. 4
- [17] A. W. Overhauser. Polarization of nuclei in metals. *Phys. Rev.*, 92, 1953. 5
- [18] F. A. L. Anet and A. J. R. Bourn. Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 87:5250–5251, 1965. 5
- [19] L. E. Kay, D. A. Torchia, and A. Bax. Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 28:8972–8979, 1989. 7, 8, 35, 60, 77
- [20] K. T. Dayie and G. Wagner. Relaxation-rate measurements for ^{15}N - ^1H groups with pulsed-field gradients and preservation of coherence pathways. *J. Magn. Reson. A*, 111:121–126, 1994. 7, 8
- [21] D. Marion, M. Ikura, R. Tschudin, and A. Bax. Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J. Magn. Reson.*, 85:393–399, 1989. 7, 8
- [22] A. J. Shaka, P. B. Barker, and R. Freeman. Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J. Magn. Reson.*, 64:547–552, 1985. 7, 8
- [23] M. Piotto, V. Saudek, and V. Sklenar. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR*, 2:661–665, 1992. 7, 8, 15, 25
- [24] D. Marion and K. Wuethrich. Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 113:967–974, 1983. 8
- [25] A. Abragam. *Principles of Nuclear Magnetism*. Clarendon Press, 1961. 9, 34
- [26] Y. Hiyama, C. H. Niu, J. V. Silverton, A. Bavoso, and D. A. Torchia. Determination of ^{15}N chemical shift tensor via ^{15}N - ^2H dipolar coupling in Boc-glycylglycyl[^{15}N glycine]benzyl ester. *J. Am. Chem. Soc.*, 110(8):2378–2383, April 1988. 10
- [27] D. Canet, P. Barthe, P. Mutzenhardt, and C. Roumestand. A Comprehensive Analysis of Multifield ^{15}N Relaxation Parameters in Proteins: Determination of ^{15}N Chemical Shift Anisotropies. *J. Am. Chem. Soc.*, 123:4567–4576, 2001. 10

- [28] O. F. Lange, N.-A. Lakomek, C. Fares, G. F. Schroder, K. F. A. Walter, S. Becker, J. Meiler, H. Grubmuller, C. Griesinger, and B. L. de Groot. Recognition Dynamics Up to Microseconds Revealed from an RDC-Derived Ubiquitin Ensemble in Solution. *Science*, 320:1471–1475, 2008. 11
- [29] C. Fares, N.-A. Lakomek, K. Walter, B. Frank, J. Meiler, S. Becker, and C. Griesinger. Accessing ns-us side chain dynamics in ubiquitin with methyl RDCs. *J. Biomol. NMR*, 45:23–44, 2009. 11
- [30] D.E. Woessner. Brownian motion and its effects in NMR chemical exchange and relaxation in liquids. *Concepts in Magnetic Resonance*, 8:385–436, 1996. 11, 93
- [31] G. Bodenhausen, G. Wagner, M. Rance, O. W. Sorensen, K. Wüthrich, and R. R. Ernst. Longitudinal two-spin order in 2D exchange spectroscopy (NOESY). *J. Magn. Reson.*, 59:542 – 550, 1984. 12
- [32] G. Wagner, G. Bodenhausen, N. Mueller, M. Rance, O. W. Soerensen, R. R. Ernst, and K. Wuethrich. Exchange of two-spin order in nuclear magnetic resonance: separation of exchange and cross-relaxation processes. *J. Am. Chem. Soc.*, 107:6440–6446, 1985. 12
- [33] H. M. McConnell. Reaction rates by nuclear magnetic resonance. *The Journal of Chemical Physics*, 28:430–431, 1958. 12
- [34] H.Y. Carr and E.M. Purcell. Effets of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Phys. Rev.*, pages 630–638, 1954. 12
- [35] S. Meiboom and D. Gill. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev. Sci. Instrum.*, 29:688–691, 1958. 12
- [36] J. P. Carver and R. E. Richards. A general two-site solution for the chemical exchange produced dependence of T2 upon the carr-Purcell pulse separation. *J. Magn. Reson.*, 6:89 – 105, 1972. 14
- [37] J. Jen. Chemical exchange and NMR T2 relaxation-The multisite case. *J. Magn. Reson.*, 30:111 – 128, 1978. 14
- [38] D. G. Davis, M. E. Perlman, and R. E. London. Direct Measurements of the Dissociation-Rate Constant for Inhibitor-Enzyme Complexes via the T1(rho) and T2 (CPMG) Methods. *J. Magn. Reson. B*, 104:266–275, 1994. 14
- [39] Z. Luz and S. Meiboom. Nuclear Magnetic Resonance Study of the Protolysis of Trimethylammonium Ion in Aqueous Solution—Order of the Reaction with Respect to Solvent. *The Journal of Chemical Physics*, 39:366–370, 1963. 14
- [40] M. Tollinger, N. R. Skrynnikov, F. A. A. Mulder, J. D. Forman-Kay, and L. E. Kay. Slow Dynamics in Folded and Unfolded States of an SH3 Domain. *J. Am. Chem. Soc.*, 123:11341–11352, 2001. 14, 83, 84

- [41] R. Ishima and D. A. Torchia. Estimating the time scale of chemical exchange of proteins from measurements of transverse relaxation rates in solution. *J. Biomol. NMR*, 14:369–372, 1999. 10.1023/A:1008324025406. 14
- [42] E. Z. Eisenmesser, D. A. Bosco, M. Akke, and D. Kern. Enzyme dynamics during catalysis. *Science*, 295:1520–1523, 2002. 14
- [43] E. Z. Eisenmesser, O. Millet, W. Labeikovsky, D. M. Korzhnev, M. Wolf-Watz, D. A. Bosco, J. J. Skalicky, L. E. Kay, and D. Kern. Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature*, 438:117–121, 2005. 14, 83, 85
- [44] D. D. Boehr, D. McElheny, H. J. Dyson, and P. E. Wright. The Dynamic Energy Landscape of Dihydrofolate Reductase Catalysis. *Science*, 313:1638–1642, 2006. 14
- [45] H. Frauenfelder, S. G. Sligar, and P. G. Wolynes. The Energy Landscapes and Motions of Proteins. *Science*, 254:1598–1603, 1991. 14, 83
- [46] A. G. Palmer. Probing molecular motion by NMR. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7:732–737, 1997. 14
- [47] J. P. Loria, M. Rance, and A. G. Palmer. A Relaxation-Compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequence for Characterizing Chemical Exchange by NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:2331–2332, 1999. 14
- [48] C. Wang, M. Grey, and A. G. Palmer. CPMG sequences with enhanced sensitivity to chemical exchange. *J. Biomol. NMR*, 21:361–366, 2001. 14
- [49] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wüthrich. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94:12366–12371, 1997. 15
- [50] J. P. Loria, M. Rance, and A. G. Palmer. A TROSY CPMG sequence for characterizing chemical exchange in large proteins. *J. Biomol. NMR*, 15:151–155, 1999. 15
- [51] F. A. A. Mulder, A. Mittermaier, B. Hon, F. W. Dalquist, and L. E. Kay. Studying excited states of proteins by NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 8:932–935, 2001. 15
- [52] N. R. Skrynnikov, F. A. A. Mulder, B. Hon, F. W. Dahlquist, and L. E. Kay. Probing Slow Time Scale Dynamics at Methyl-Containing Side Chains in Proteins by Relaxation Dispersion NMR Measurements: Application to Methionine Residues in a Cavity Mutant of T4 Lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 123:4556–4566, 2001. 15
- [53] J. Weigelt. Single Scan, Sensitivity- and Gradient-Enhanced TROSY for Multidimensional NMR Experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:10778–10779, 1998. 15

- [54] G. Kontaxis, J. Stonehouse, E. D. Laue, and J. Keeler. The Sensitivity of Experiments Which Use Gradient Pulses for Coherence-Pathway Selection. *J. Magn. Reson. A*, 111:70–76, 1994. 15
- [55] M. Zeeb and J. Balbach. NMR Spectroscopic Characterization of Millisecond Protein Folding by Transverse Relaxation Dispersion Measurements. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:13207–13212, 2005. 15, 40, 92
- [56] K. A. Henzler-Wildman, V. Thai, M. Lei, M. Ott, M. Wolf-Watz, T. Fenn, E. Pozharski, M. A. Wilson, G. A. Petsko, M. Karplus, C. G. Hubner, and D. Kern. Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature*, 450:838–844, 2007. 15, 85
- [57] V. Y. Orekhov, D.M. Korzhnev, and L. E. Kay. Double- and Zero-Quantum NMR Relaxation Dispersion Experiments Sampling Millisecond Time Scale Dynamics in Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:1886–1891, 2004. 15
- [58] D. M. Korzhnev, K. Kloiber, and L. E. Kay. Multiple-Quantum Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy Probing Millisecond Time-Scale Dynamics in Proteins: Theory and Application. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:7320–7329, 2004. 15
- [59] D. M. Korzhnev, K. Kloiber, V. Kanelis, V. Tugarinov, and L. E. Kay. Probing Slow Dynamics in High Molecular Weight Proteins by Methyl-TROSY NMR Spectroscopy: Application to a 723-Residue Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:3964–3973, 2004. 15
- [60] V. Tugarinov, J. E. Ollerenshaw, and L. E. Kay. Probing Side-Chain Dynamics in High Molecular Weight Proteins by Deuterium NMR Spin Relaxation: An Application to an 82-kDa Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:8214–8225, 2005. 15
- [61] E. R. deAzevedo, T. J. Bonagamba, and K. Schmidt-Rohr. Pure-Exchange Solid-State NMR. *J. Magn. Reson.*, 142:86–96, 2000. 16
- [62] A. Krushelnitsky, E. R. deAzevedo, R. Linser, B. Reif, K. Saalwächter, and D. Reichert. Direct Observation of Millisecond to Second Motions in Proteins by Dipolar CODEX NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 131:12097–12099, 2009. 16
- [63] C. Deverell, R. E. Morgan, and J. H. Strange. Studies of chemical exchange by nuclear magnetic relaxation in the rotating frame. *Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics*, 18:553–559, 1970. 16
- [64] H. Desvaux and P. Berthault. Study of dynamic processes in liquids using off-resonance rf irradiation. *Prog. in Nucl. Magn. Res. Spec.*, 35:295–340, 1999. 16
- [65] U. Brath, M. Akke, D. Yang, L. E. Kay, and F. A. A. Mulder. Functional Dynamics of Human FKBP12 Revealed by Methyl ¹³C Rotating Frame Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:5718–5727, 2006. 16

- [66] A. Krushelnitsky, T. Zinkevich, D. Reichert, V. Chevelkov, and B. Reif. Microsecond Time Scale Mobility in a Solid Protein As Studied by the ^{15}N R1p Site-Specific NMR Relaxation Rates. *J. Am. Chem. Soc.*, 132:11850–11853, 2010. 16
- [67] B. D. N. Rao. [14] Nuclear magnetic resonance line-shape analysis and determination of exchange rates. In Norman J. Oppenheimer and Thomas L. James, editors, *Nuclear Magnetic Resonance Part A: Spectral Techniques and Dynamics*, volume 176 of *Methods in Enzymology*, pages 279 – 311. Academic Press, 1989. 16
- [68] J. Balbach, V. Forge, N. A. J. van Nuland, S. L. Winder, P. J. Hore, and C. M. Dobson. Following protein folding in real time using NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.*, 2:865–570, 1995. 16
- [69] J. Balbach, V. Forge, W. S. Lau, N. A. J. van Nuland, K. Brew, and C. M. Dobson. Protein folding monitored at individual residues during a two - dimensional NMR experiment. *Science*, 274:1161–1163, 1996. 16
- [70] Y. W. Bai, T. R. Sosnick, L. Mayne, and S. W. Englander. Protein folding intermediates: Native-state hydrogen exchange. *Science*, 269:192–197, 1995. 16
- [71] R. H. Pain, editor. *Mechanisms of Protein Folding*. Oxford University Press, 2000. 16, 41
- [72] A. Berger and K. Linderstrom-Lang. Deuterium exchange of poly-alanine in aqueous solution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 69:106–118, 1957. 16
- [73] U. Weininger, Markus Zeeb, P. Neumann, C. Löw, M. T. Stubbs, G. Lipps, and J. Balbach. Structure-Based Stability Analysis of an Extremely Stable Dimeric DNA Binding Protein from *Sulfolobus islandicus*. *Biochemistry*, 48:10030–10037, 2009. 17
- [74] Y. W. Bai, J. S. Milne, L. Mayne, and S. W. Englander. Protein stability parameters measured by hydrogen exchange. *Proteins: Structure Function and Genetics*, 20:4–14, 1994. 17, 54
- [75] Y. W. Bai, J. S. Milne, L. Mayne, and S. W. Englander. Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange. *Proteins: Structure Function and Genetics*, 17:75–86, 1993. 17
- [76] K. H. Gardner and L. E. Kay. The use of ^2H , ^{13}C , ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 27:357–406, 1998. 17
- [77] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science*, 289:905–920, 2000. 17
- [78] B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch, and V. Ramakrishnan. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407:327–339, 2000. 17

- [79] F. Schluenzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, and A. Yonath. Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *Cell*, 102:615–623, 2000. 17
- [80] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. D. Cate, and H. F. Noller. Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science*, 292:883–896, 2001. 17
- [81] M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, and K. Wüthrich. TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95:13585–13590, 1998. 19
- [82] M. Salzmann, G. Wider, K. Pervushin, H. Senn, and K. Wüthrich. TROSY-type Triple-Resonance Experiments for Sequential NMR Assignments of Large Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:844–848, 1999. 19
- [83] M. Ikura, L. E. Kay, and A. Bax. A novel approach for sequential assignment of proton, carbon-13, and nitrogen-15 spectra of larger proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry*, 29(19):4659–4667, 1990. 19
- [84] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, and A. Bax. Three-Dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.*, 89:496–514, 1990. 19
- [85] M. Wittekind and L. Mueller. HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. *J. Magn. Reson. B*, 101:201–205, 1993. 19
- [86] S. Grzesiek and A. Bax. Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:6291–6293, 1992. 19
- [87] S. Grzesiek and A. Bax. Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ^{13}C , ^{15}N -enriched proteins. *J. Biomol. NMR*, 3:185–204, 1993. 19
- [88] K. H. Gardner, R. Konrat, M. K. Rosen, and L. E. Kay. An (H)C(CO)NH-TOCSY pulse scheme for sequential assignment of protonated methyl groups in otherwise deuterated ^{15}N , ^{13}C -labeled proteins. *J. Biomol. NMR*, 8:351–356, 1996. 19
- [89] A. Bax, G. M. Clore, and A. M. Gronenborn. ^1H - ^1H correlation via isotropic mixing of ^{13}C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning ^1H and ^{13}C spectra of ^{13}C -enriched proteins. *J. Magn. Reson.*, 88:425–431, 1990. 19
- [90] S. Talluri and G. Wagner. An Optimized 3D NOESY-HSQC. *J. Magn. Reson. B*, 112:200–205, 1996. 19

- [91] S. Macura and R. R. Ernst. Elucidation of cross relaxation in liquids by 2D NMR spectroscopy. *Molecular Physics*, 41:95–117, 1980. 20
- [92] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, and R. R. Ernst. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics*, 71:4546–4553, 1979. 20
- [93] O. W. Soerensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, and R. R. Ernst. Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spec.*, 16:163–192, 1984. 20
- [94] K. Wüthrich. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. WILEY (New York), 1986. 22, 130
- [95] A. Kalk and H. J. C. Berendsen. Proton magnetic relaxation and spin diffusion in proteins. *J. Magn. Reson.*, 24:343–366, 1979. 21
- [96] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.*, 7:95–109, 1963. 23
- [97] D. Sitkoff and D. A. Case. Theories of chemical shift anisotropies in proteins and nucleic acids. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spec.*, 32:165–190, 1998. 23
- [98] D. S. Wishart and D. A. Case. *Use of chemical shifts in macromolecular structure determination*, volume Volume 338. Academic Press, 2002. 23
- [99] D. S. Wishart, B. D. Sykes, and F. M. Richards. The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 31:1647–1651, 1992. 23
- [100] D. S. Wishart and B. D. Sykes. The ^{13}C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR*, 4:171–180, 1994. 23
- [101] G. Cornilescu, F. Delaglio, and A. Bax. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR*, 13:289–302, 1999. 23
- [102] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, and A. Bax. TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR*, 44:213–223, 2009. 23
- [103] C. Gayathri, A. A. Bothner-By, P. C. M. Van Zijl, and C. Maclean. Dipolar magnetic field effects in NMR spectra of liquids. *Chemical Physics Letters*, 87:192–196, 1982. 24
- [104] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, and N. Tjandra. Direct Structure Refinement against Residual Dipolar Couplings in the Presence of Rhombicity of Unknown Magnitude. *J. Magn. Reson.*, 131:159–162, 1998. 24, 37

- [105] M. Ottiger, F. Delaglio, and A. Bax. Measurement of J and Dipolar Couplings from Simplified Two-Dimensional NMR Spectra. *J. Magn. Reson.*, 131:373–378, 1998. 24
- [106] E. O. Stejskal and J. E. Tanner. Spin diffusion measurements - spin echos in presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.*, 42:288–292, 1965. 25
- [107] E. O. Stejskal. Use of Spin Echoes in a Pulsed Magnetic-Field Gradient to Study Anisotropic, Restricted Diffusion and Flow. *The Journal of Chemical Physics*, 43:3597–3603, 1965. 25
- [108] J. E. Tanner and E. O. Stejskal. Restricted Self-Diffusion of Protons in Colloidal Systems by the Pulsed-Gradient, Spin-Echo Method. *The Journal of Chemical Physics*, 49:1768–1777, 1968. 25
- [109] J. E. Tanner. Use of the Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies. *The Journal of Chemical Physics*, 52:2523–2526, 1970. 25, 26
- [110] D. H. Wu, A. D. Chen, and C. S. Johnson. An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses. *J. Magn. Reson. A*, 115:260 – 264, 1995. 25
- [111] A. Dehner and H. Kessler. Diffusion NMR Spectroscopy: Folding and Aggregation of Domains in p53. *ChemBioChem*, 6:1550–1565, 2005. 26
- [112] J. A. Jones, D. K. Wilkins, L. J. Smith, and C. M. Dobson. Characterisation of protein unfolding by NMR diffusion measurements. *J. Biomol. NMR*, 10:199–203, 1997. 26, 72
- [113] S. Berger. *200 NMR Experiments*. WILEY-VCH, Weinheim, 2002. 27
- [114] M. I. Hrovat and C. G. Wade. NMR pulsed-gradient diffusion measurements. I. Spin-echo stability and gradient calibration. *J. Magn. Reson.*, 44(1):62 – 75, 1981. 27
- [115] A. Einstein. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Phys.*, 17:549–560, 1905. 27
- [116] D. K. Wilkins, S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson, J. A. Jones, and L. J. Smith. Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry*, 38:16424–16431, 1999. 28, 72, 73, 74, 89, 105, 107
- [117] P. L. Privalov and S. J. Gill. Stability of Protein Structure and Hydrophobic Interaction. *Adv. Prot. Chem.*, 39:191–234, 1988. 29
- [118] A. J. Wand, J. H. Short, T. L. James, and N. J. Oppenheimer. *Nuclear magnetic resonance studies of protein-peptide complexes*, volume 239, pages 700–717. Academic Press, 1994. 29

- [119] G. M. Clore and A. M. Gronenborn. NMR structure determination of proteins and protein complexes larger than 20 kDa. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:564–570, 1998. 29
- [120] S. Grzesiek, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, and A. Bax. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry*, 35:10256–10261, 1996. 29
- [121] G. Otting and K. Wüthrich. Heteronuclear filters in two-dimensional ^1H , ^1H -NMR spectroscopy: combined use with isotope labelling for studies of macromolecular conformation and intermolecular interactions. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 23:39–96, 1990. 30, 71
- [122] L. Fielding. Determination of Association Constants from Solution NMR Data. *Tetrahedron*, 56:6151–6170, 2000. 31
- [123] B. Chance. The accelerated flow method for rapid reactions. *J. of the Frankl. Inst.*, 229:455–476, 613–640, 737–766, 1940. 32
- [124] C. F. Bernasconi. *Relaxation kinetics*. Academic Press, New York., 1976. 32
- [125] C. Scholz, P. Schaarschmidt, A. M. Engel, H. Andres, U. Schmitt, E. Faatz, J. Balbach, and F. X. Schmid. Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules. *J. Mol. Biol.*, 345:1229–1241, 2005. 33, 75
- [126] C. Löw, P. Neumann, H. Tidow, U. Weininger, C. Haupt, B. Friedrich-Epler, C. Scholz, M. T. Stubbs, and J. Balbach. Crystal Structure Determination und Functional Characterization of the Metallochaperone SlyD from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.*, 398:375–390, 2010. 33, 42, 55, 61, 62, 63, 75, 76, 81, 82, 89
- [127] N. Takahashi, T. Uchida, and F. Egami. Ribonuclease T1: structure and function. *Adv. Biophysics*, 1:53–98, 1970. 33
- [128] S. C. Gill and P. H. von Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 182:319–326, 1989. 33
- [129] G. Lipari and A. Szabo. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.*, 104:4546–4559, 1982. 34, 77
- [130] G. Lipari and A. Szabo. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.*, 104:4559–1470, 1982. 34
- [131] A. G. Palmer, M. Rance, and P. E. Wright. Intramolecular motions of a zinc finger DNA-binding domain from xfn characterized by proton detected natural abundance C-13 heteronuclear NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 113:4371–4380, 1991. 34, 77

- [132] A. M. Mandel, M. Akke, and A. G. Palmer. Backbone dynamics of Escherichia coli ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme. *J. Mol. Biol.*, 246:144–163, 1995. 34, 35, 77
- [133] G. M. Clore, A. Szabo, A. Bax, L. E. Kay, P. C. Driscoll, and A. M. Gronenborn. Deviations from the Simple Two-Parameter Model-Free Approach to the Interpretation of Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Relaxation of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 112:4989–4991, 1990. 34
- [134] R. Zierold. *Forschungspraktikum: Untersuchung zu schnellen Dynamiken in Proteinen und Bestimmung der dynamischen Parameter aus verschiedenen Modellen*. 35, 77
- [135] Y. C. Li and G. T. Montelione. Human type-alpha transforming growth factor undergoes slow conformational exchange between multiple backbone conformations as characterized by nitrogen-15 relaxation measurements. *Biochemistry*, 34:2408–2423, 1995. 35, 77
- [136] D. E. Woessner. Nuclear Spin Relaxation in Ellipsoids Undergoing Rotational Brownian Motion. *J. Chem. Phys.*, 37:647–654, 1962. 35
- [137] M. Nilges, M. J. Macias, S. I. O’Donoghue, and H. Oschkinat. Automated NOE-SY interpretation with ambiguous distance restraints: the refined NMR solution structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin. *J. Mol. Biol.*, 269:408–422, 1997. 36, 49
- [138] W. Rieping, M. Habeck, B. Bardiaux, A. Bernard, T. E. Malliavin, and M. Nilges. ARIA2: Automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics*, 23:381–382, 2007. 36, 49
- [139] M. Nilges, G. M. Clore, and A. M. Gronenborn. Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms Circumventing problems associated with folding. *FEBS Letters*, 239:129–136, 1988. 37
- [140] R. A. Laskowski, J. A. C. Rullmann, M. W. MacArthur, R. Kaptein, and J. M. Thornton. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR*, 8:477–486, 1996. 37, 52
- [141] C. A. E. M. Spronk, S. B. Nabuurs, E. Krieger, G. Vriend, and G. W. Vuister. Validation of protein structures derived by NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spec.*, 45:315–337, 2004. 37
- [142] P. G. Jones, R. A. VanBogelen, and F. C. Neidhardt. Induction of proteins in response to low temperature in Escherichia coli. *The Journal of Bacteriology*, 169:2092–2095, 1987. 39
- [143] A. Schnuchel, R. Wiltschek, M. Czisch, M. Herrler, G. Willmsky, P. Graumann, M. A. Marahiel, and T. A. Holak. Structure in solution of the major cold-shock protein from Bacillus subtilis. *Nature*, 364:169–171, 1993. 39

- [144] H. Schindelin, M. A. Marahiel, and U. Heinemann. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature*, 364:164–168, 1993. 39
- [145] T. Schindler, M. Herrler, M. A. Marahiel, and F. X. Schmid. Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2:663–673, 1995. 39, 92
- [146] R. Sachs. *Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an bakteriellen Kälteschockproteinen: Charakterisierung eines durch Kälte denaturierenden Proteins und Bindung einzelsträngiger RNA*. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2010. 39, 97
- [147] T. Schindler and F. X. Schmid. Thermodynamic Properties of an Extremely Rapid Protein Folding Reaction. *Biochemistry*, 35:16833–16842, 1996. 39
- [148] M. Zeeb and J. Balbach. Single-stranded DNA binding of the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*: NMR mapping and mutational characterization. *Protein Science*, 12:112–123, 2003. 39, 94
- [149] M. Zeeb, K. E. A. Max, U. Weininger, C. Löw, H. Sticht, and J. Balbach. Recognition of T-rich single-stranded DNA by the cold shock protein Bs-CspB in solution. *Nucleic Acids Research*, 34:4561–4571, 2006. 39, 40
- [150] R. Bienert, M. Zeeb, L. Dostal, A. Feske, C. Magg, K. Max, H. Welfle, J. Balbach, and U. Heinemann. Single-stranded DNA bound to bacterial cold-shock proteins: preliminary crystallographic and Raman analysis. *Acta Crystallographica Section D*, 60:755–757, 2004. 39
- [151] M. Zeeb, M. H. Jacob, T. Schindler, and J. Balbach. ¹⁵N relaxation study of the cold shock protein CspB at various solvent viscosities. *J. Biomol. NMR*, 27:221–234, 2003. 40
- [152] G. Fischer, H. Bang, and C. Mech. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta*, 43:1101–1111, 1984. 40
- [153] G. Fischer and H. Bang. Slow conformational changes in protein folding can be accelerated by enzymes. *Biomed. Biochim. Acta*, 50:137–142, 1991. 40
- [154] U. Weininger, C. Haupt, K. Schweimer, W. Graubner, M. Kovermann, T. Brueser, C. Scholz, P. Schaarschmidt, G. Zoldak, F. X. Schmid, and J. Balbach. NMR solution structure of SlyD from *Escherichia coli*: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function. *J. Mol. Biol.*, 387:295–305, 2009. 41, 42, 49, 51, 52, 59, 61, 62, 63, 81, 85, 89
- [155] G. Fischer. Über Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angew. Chem.*, 106:1479–1501, 1994. 40, 46

- [156] W. D. Roof, S. M. Horne, Young K. D., and Young R. SlyD, a host gene required for phi X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerases. *J. Biol. Chem.*, 269:2902–2910, 1994. 42
- [157] S. Hottenrott, T. Schumann, A. Plückthun, G. Fischer, and J. U. Rahfeld. The Escherichia coli SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J. Biol. Chem.*, 272:15697–15701, 1997. 42
- [158] C. Scholz, B. Eckert, F. Hagn, P. Schaarschmidt, J. Balbach, and F. X. Schmid. SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry*, 45:20–33, 2006. 42, 81, 82, 84, 89, 90
- [159] L. Martino, Y. He, K. L. D. Hands-Taylor, E. R. Valentine, G. Kelly, C. Giancola, and M. R. Conte. The interaction of the Escherichia coli protein SlyD with nickel ions illuminates the mechanism of regulation of its peptidyl-prolyl isomerase activity. *FEBS J.*, 276:4529–4544, 2009. 42
- [160] G. Zoldak, L. Carstensen, C. Scholz, and F. X. Schmid. Consequences of Domain Insertion on the Stability and Folding Mechanism of a Protein. *J. Mol. Biol.*, 386:1138–1152, 2009. 42
- [161] R. P. Jakob, G. Zoldak, T. Aumüller, and Schmid F. X. Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106:20282–20287, 2009. 42
- [162] W. Graubner, A. Schierhorn, and T. Brueser. DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *J. Biol. Chem.*, 282:7116–7124, 2007. 42, 65
- [163] C. Scholz, E. Faatz, P. Schaarschmidt, and U. Schmitt. Slpa as a tool for recombinant protein and enzyme technology. Technical Report EP 2 127 678 A1, EUROPEAN PATENT APPLICATION, 2009. 42
- [164] R. Suzuki, K. Nagata, F. Yumoto, M. Kawakami, N. Nemoto, M. Furutani, K. Adachi, T. Maruyama, and M. Tanokura. Three-dimensional Solution Structure of an Archaeal FKBP with a Dual Function of Peptidyl Prolyl cis-trans Isomerase and Chaperone-like Activities. *J. Mol. Biol.*, 328:1149–1160, 2003. 42, 50, 52, 85
- [165] R. Jakob-Roetne and H. Jacobsen. Alzheimer’s Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angew. Chem.*, 48:3030–3059, 2009. 43, 102
- [166] A. Jowaed, I. Schmitt, O. Kaut, and U. Wullner. Methylation Regulates Alpha-Synuclein Expression and Is Decreased in Parkinson’s Disease Patients’ Brains. *Journal of Neuroscience*, 30(18):6355–6359, 2010. 43
- [167] J Graw. The crystallins: genes, proteins and diseases. *Biological chemistry*, 378, 1997. 43

- [168] S. Tomaselli, V. Esposito, P. Vangone, N. A. J. van Nuland, A. M. Bonvin, R. Guerini, T. Tancredi, P. A. Temussi, and D. Picone. The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's A β (1-42) peptide in aqueous media is reversible: a step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding. *ChemBioChem*, 7:257–267, 2006. 43
- [169] R. Tycko. Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 39:1–55, 2006. 44
- [170] C. Sachse, N. Grigorieff, and M. Fändrich. Nanoscale Flexibility Parameters of Alzheimer Amyloid Fibrils Determined by Electron Cryo-Microscopy. *Angew. Chem.*, 49:1321–1323, 2010. 44
- [171] D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, and D. J. Selkoe. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416:535–539, 2002. 44
- [172] B. Caughey and P. T. Lansbury. Protofibrils, Pores, Fibrils, and Neurodegeneration: Separating the Responsible Protein Aggregates from The Innocent Bystanders*. *Annual Review of Neuroscience*, 26:267–298, 2003. 44
- [173] H. Hauser. Short-chain phospholipids as detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 1508:164–181, 2000. 44
- [174] P. K. Mandal and J. W. Pettegrew. Alzheimer's Disease: Soluble Oligomeric A β (1-40) Peptide in Membrane Mimic Environment from Solution NMR and Circular Dichroism Studies. *Neurochemical Research*, 29:2267–2272, 2004. 44
- [175] N. Sureshbabu, R. Kirubakaran, and R. Jayakumar. Surfactant-induced conformational transition of amyloid beta-peptide. *European Biophysics Journal*, 38:355–367, 2009. 44
- [176] N. C. Pace, U. Heinemann, U. Hahn, and W. Saenger. Ribonuclease T1: Struktur, Funktion und Stabilität. *Angew. Chem.*, 103:351–369, 1991. 45
- [177] T. Kiefhaber, H. P. Grunert, U. Hahn, and F. X. Schmid. Replacement of a cis proline simplifies the mechanisms of ribonuclease T1 folding. *Biochemistry*, 29:6475–6480, 1990. 45
- [178] T. Kiefhaber, R. Quaas, U. Hahn, and F. X. Schmid. Folding of Ribonuclease T1. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry*, 29:3053–3061, 1990. 45
- [179] T. Kiefhaber, R. Quaas, U. Hahn, and Schmid F. X. Folding of Ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions. *Biochemistry*, 29:3061–3070, 1990. 45

- [180] U. Heinemann and W. Saenger. Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex: an x-ray structure. *Nature*, 299:27–31, 1982. 45
- [181] C. Haupt. *Enzyme-Substrat-Erkennung in katalysierten Proteinfaltungsreaktionen*. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2009. 45, 55, 81, 85, 86, 88
- [182] R. J. M. Tausk, J. Karmiggelt, C. Oudshoorn, and J. T. G. Overbeek. Physical chemical studies of short-chain lecithin homologues. I. : Influence of the chain length of the fatty acid ester and of electrolytes on the critical micelle concentration. *Biophysical Chemistry*, 1:175–183, 1974. 45
- [183] A. Kabalnov, J. Weers, R. Arlauskas, and T. Tarara. Phospholipids as Emulsion Stabilizers. 1. Interfacial Tensions. *Langmuir*, 11:2966–2974, 1995. 45, 102
- [184] J. Iwahara, C. Tang, and G. M. Clore. Practical aspects of 1H transverse paramagnetic relaxation enhancement measurements on macromolecules. *J. Magn. Reson.*, 184:185–195, 2007. 50, 90
- [185] A.-J. Geitner. Persönliche Kommunikation. Bayreuth, 2009. 54
- [186] T. Szyperski, J. L. Mills, D. Perl, and J. Balbach. Combined NMR-observation of cold denaturation in supercooled water and heat denaturation enables accurate measurement ΔC_P of protein unfolding. *European Biophysics Journal*, 35:363–366, 2006. 55, 57
- [187] G. Fischer, H. Bang, E. Berger, and A. Schellenberger. Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 791:87–97, 1984. 57
- [188] C. Haupt, U. Weininger, M. Kovermann, and J. Balbach. Local and coupled thermodynamic stability of the two domain and bifunctional enzyme SlyD from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2011, in revision. 62
- [189] M. Kovermann, R. Zierold, C. Haupt, C. Löw, and J. Balbach. NMR relaxation unravels interdomain crosstalk of the two domain prolyl isomerase and chaperone SlyD. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, in press. 63
- [190] N. Bloembergen, E.M. Purcell, and R. V. Pound. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Phys. Rev.*, 73:679, 1948. 76
- [191] P. Dosset, J.-C. Hus, M. Blackledge, and D. Marion. Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J. Biomol. NMR*, 16:23–28, 2000. 77
- [192] M. J. Seewald, K. Pichumani, C. Stowell, B. V. Tibbals, L. Regan, and M. J. Stone. The role of backbone conformational heat capacity in protein stability: temperature dependent dynamics of the B1 domain of Streptococcal protein G. *Protein Science*, 9:1177–1193, 2000. 80

- [193] R. Jeanicke. Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J. Biotechnol.*, 79:193–203, 2000. 81
- [194] G. N. Somero. Proteins and Temperature. *Ann. Rev. Physiol.*, 57:43–68, 2003. 81
- [195] S. Ramboarina and C. Redfield. Probing the Effect of Temperature on the Backbone Dynamics of the Human α -Lactalbumin Molten Globule. *J. Am. Chem. Soc.*, 130:15318–15326, 2008. 81
- [196] G. D. Van Duyne, R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber, and J. Clardy. Atomic structure of fkbp-fk506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science*, 252:839–842, 1991. 85
- [197] H.-G. Elias. *Macromolecules: Volume 3: Physical Structures and Properties*. WILEY-VCH Verlag, 2008. 89
- [198] B. Schuler, E. A. Lipman, and W. A. Eaton. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature*, 419:743–747, 2002. 90
- [199] D. Kahra, M. Kovermann, C. Löw, V. Hirschfeld, C. Haupt, J. Balbach, and C. G. Hübner. Conformational plasticity and dynamics in the generic protein folding catalyst SlyD unraveled by single-molecule FRET. *J. Mol. Biol.*, accepted, 2011. 90
- [200] I. J.-L. Byeon, K. K. Dao, J. Jung, J. Keen, I. Leiros, S. O. Doskeland, A. Martinez, and A. M. Gronenborn. Allosteric Communication between cAMP Binding Sites in the RI Subunit of Protein Kinase A Revealed by NMR. *J. Biol. Chem.*, 285:14062–14070, 2010. 91
- [201] J. P. Marston, M. J. Cliff, M. A. C. Reed, G. M. Blackburn, A. M. Hounslow, and J. P. Craven, C. J. Waltho. Structural Tightening and Interdomain Communication in the Catalytic Cycle of Phosphoglycerate Kinase. *J. Mol. Biol.*, 396:345–360, 2010. 91
- [202] G. T. Montelione and G. Wagner. 2D chemical exchange spectroscopy by proton-detected heteronuclear correlation. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:3096–3098, 1989. 92
- [203] U. Weininger. Rückgratzuordnung BsCspB. Persönliche Kommunikation. 94
- [204] U. Weininger. Extrapolation der $\Delta\omega$ -Werte auf eine Harnstoffkonzentration von $c = 0$ M. Persönliche Kommunikation. 97, 98, 99, 167, 168
- [205] C. Magg and Schmid F. X. Rapid Collapse Precedes the Fast Two-state Folding of the Cold Shock Protein. *J. Mol. Biol.*, 335:1309–1323, 2004. 101
- [206] A. R. Fersht. Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5:79–84, 1995. 101

- [207] D. Perl, G. Holtermann, and Schmid F. X. Role of the Chain Termini for the Folding Transition State of the Cold Shock Protein. *Biochemistry*, 40:15501–1511, 2001. 101
- [208] E. Terzi, G. Hölzemann, and J. Seelig. Interaction of Alzheimer β -Amyloid Peptide(1-40) with Lipid Membranes. *Biochemistry*, 36:14845–14852, 1997. 107
- [209] S. S.-S. Wang, Y. T. Chen, and S. W. Chou. Inhibition of amyloid fibril formation of β -amyloid peptides via the amphiphilic surfactants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1741:307–313, 2005. 107
- [210] I. C. Martins, I. Kuperstein, H. Wilkinson, E. Maes, M. Vanbrabant, and W. Jonckheere. Lipids revert inert A β amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.*, 27:224–233, 2008. 107

A. Anhang

A.1. Koeffizientenmatrix $\alpha_{ij}(t)$ der Gl. (2.1.18)

$$\begin{aligned}
 \alpha_{AA}(t) &= \frac{1}{2} \left\{ 1 - \frac{-i\Delta\omega + R_{2A}^0 - R_{2B}^0 + k_{\text{ex}}(p_A - p_B)}{\lambda_+ - \lambda_-} \right\} \exp(-\lambda_- t) \\
 &\quad + \frac{1}{2} \left\{ 1 + \frac{-i\Delta\omega + R_{2A}^0 - R_{2B}^0 + k_{\text{ex}}(p_A - p_B)}{\lambda_+ - \lambda_-} \right\} \exp(-\lambda_+ t) \\
 \alpha_{BB}(t) &= \frac{1}{2} \left\{ 1 + \frac{-i\Delta\omega + R_{2A}^0 - R_{2B}^0 + k_{\text{ex}}(p_A - p_B)}{\lambda_+ - \lambda_-} \right\} \exp(-\lambda_- t) \\
 &\quad + \frac{1}{2} \left\{ 1 - \frac{-i\Delta\omega + R_{2A}^0 - R_{2B}^0 + k_{\text{ex}}(p_A - p_B)}{\lambda_+ - \lambda_-} \right\} \exp(-\lambda_+ t) \\
 \alpha_{AB}(t) &= \frac{k_{\text{ex}} p_A}{\lambda_+ - \lambda_-} \{ \exp(-\lambda_- t) - \exp(-\lambda_+ t) \} \\
 \alpha_{BA}(t) &= \frac{k_{\text{ex}} p_B}{\lambda_+ - \lambda_-} \{ \exp(-\lambda_- t) - \exp(-\lambda_+ t) \}
 \end{aligned} \tag{A.1.1}$$

mit:

$$\begin{aligned}
 \lambda_{\pm} &= \frac{1}{2} \{ -i\Omega_A - i\Omega_B + R_{2A}^0 + R_{2B}^0 + k_{\text{ex}} \} \\
 &\quad \pm \frac{1}{2} \sqrt{(-i\Delta\omega + R_{2A}^0 - R_{2B}^0 + k_{\text{ex}}(p_B - p_A))^2 + 4p_A p_B k_{\text{ex}}^2}
 \end{aligned}$$

A.2. Austauschrate eines Drei-Zustandssystems

Berechnung der Eigenwerte der in Gl. (2.1.28) definierten Austauschmatrix \mathbf{K} :

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} -k_{\text{auf}} & k_{\text{zu}} & 0 \\ k_{\text{auf}} & -k_{\text{zu}} - k_2 & 0 \\ 0 & k_2 & 0 \end{pmatrix}. \quad (\text{A.2.2})$$

Die Eigenwertgleichung lautet:

$$\begin{vmatrix} -k_{\text{auf}} - \lambda & k_{\text{zu}} & 0 \\ k_{\text{auf}} & -k_{\text{zu}} - k_2 - \lambda & 0 \\ 0 & k_2 & 0 - \lambda \end{vmatrix} = 0. \quad (\text{A.2.3})$$

Daraus folgt die charakteristische Gleichung:

$$-\lambda(-k_{\text{auf}} - \lambda)(-k_{\text{zu}} - k_2 - \lambda) + \lambda k_{\text{zu}} k_{\text{auf}} = 0. \quad (\text{A.2.4})$$

Die Eigenwerte λ_i für Gl. (A.2.4) lauten:

$$\lambda_1 = 0, \quad (\text{A.2.5})$$

$$\lambda_{2,3} = -\frac{1}{2} \left[(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2) \pm \sqrt{(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2)^2 - 4k_{\text{auf}}k_2} \right]. \quad (\text{A.2.6})$$

Hiermit kann nun die apparente Austauschrate k_{ex} angegeben werden (s. Gl. (2.1.29)):

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2) - \sqrt{(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2)^2 - 4k_{\text{auf}}k_2} \right]. \quad (\text{A.2.7})$$

A.3. Grenzfälle der Austauschrate k_{ex}

Diskussion der Grenzfälle für die Austauschrate k_{ex} der Gl. (A.2.7):

1. $k_{\text{zu}} \gg k_{\text{auf}}$

$$\begin{aligned} k_{\text{ex}} &= \frac{1}{2} \left[(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2) - \sqrt{(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2)^2 - 4k_{\text{auf}}k_2} \right] \\ k_{\text{ex}} &= \frac{1}{2} \left[(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2) - \sqrt{(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2)^2 - 4k_{\text{auf}}k_2} \right] \\ k_{\text{ex}} &= \frac{1}{2} \left[(k_{\text{zu}} + k_2) \left(\frac{k_{\text{auf}}}{k_{\text{zu}} + k_2} + 1 \right) - (k_{\text{zu}} + k_2) \sqrt{\frac{(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2)^2 - 4k_{\text{auf}}k_2}{(k_{\text{zu}} + k_2)^2}} \right] \\ k_{\text{ex}} &= \frac{1}{2} (k_{\text{zu}} + k_2) \left[\left(\frac{k_{\text{auf}}}{k_{\text{zu}} + k_2} + 1 \right) - \sqrt{1 + \frac{k_{\text{auf}}}{(k_{\text{zu}} + k_2)^2} (k_{\text{auf}} + 2k_{\text{zu}} - 2k_2)} \right] \end{aligned}$$

mit der Taylor-Abschätzung $\sqrt{1+x} \approx 1 + \frac{1}{2}x$ folgt:

$$\begin{aligned} k_{\text{ex}} &= \frac{1}{2} (k_{\text{zu}} + k_2) \left[\left(\frac{k_{\text{auf}}}{k_{\text{zu}} + k_2} + 1 \right) - 1 - \frac{1}{2} \left(\frac{k_{\text{auf}}}{(k_{\text{zu}} + k_2)^2} (k_{\text{auf}} + 2k_{\text{zu}} - 2k_2) \right) \right] \\ k_{\text{ex}} &= \frac{1}{2} (k_{\text{zu}} + k_2) \left[\frac{k_{\text{auf}}}{k_{\text{zu}} + k_2} - \frac{1}{2} \left(\frac{k_{\text{auf}}}{(k_{\text{zu}} + k_2)^2} (k_{\text{auf}} + 2k_{\text{zu}} - 2k_2) \right) \right] \\ k_{\text{ex}} &= \frac{1}{2} \left[k_{\text{auf}} - \frac{1}{2} \left(\frac{k_{\text{auf}}}{k_{\text{zu}} + k_2} (k_{\text{auf}} + 2k_{\text{zu}} - 2k_2) \right) \right] \\ k_{\text{ex}} &= \frac{1}{2} \left[k_{\text{auf}} - \frac{1}{2} \left(\frac{k_{\text{auf}}^2 + 2k_{\text{auf}}k_{\text{zu}} - 2k_{\text{auf}}k_2}{k_{\text{zu}} + k_2} \right) \right] \end{aligned}$$

mit der Berücksichtigung des Grenzfalles $k_{\text{zu}} \gg k_{\text{auf}}$ folgt:

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[\frac{k_{\text{auf}}k_2 - k_{\text{auf}}k_{\text{zu}}}{k_{\text{zu}} + k_2} \right]$$

unter nochmaliger Berücksichtigung des Grenzfalles $k_{\text{zu}} \gg k_{\text{auf}}$ folgt:

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[\frac{k_{\text{auf}}k_2}{k_{\text{zu}} + k_2} \right]. \quad (\text{A.3.8})$$

2. $k_{\text{zu}} \gg k_2$

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2) - \sqrt{(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2)^2 - 4k_{\text{auf}}k_2} \right]$$

aus Gl. (A.3.8) folgt unter Berücksichtigung des Grenzfalles $k_{\text{zu}} \gg k_2$:

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[\frac{k_{\text{auf}}k_2}{k_{\text{zu}}} \right]. \quad (\text{A.3.9})$$

3. $k_{\text{zu}} \ll k_2$

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2) - \sqrt{(k_{\text{auf}} + k_{\text{zu}} + k_2)^2 - 4k_{\text{auf}}k_2} \right]$$

Vernachlässigung vom k_{zu} in den Summentermen führt zu:

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[(k_{\text{auf}} + k_2) - \sqrt{(k_{\text{auf}} + k_2)^2 - 4k_{\text{auf}}k_2} \right]$$

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[(k_{\text{auf}} + k_2) - \sqrt{(k_{\text{auf}} - k_2)^2} \right]$$

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} [(k_{\text{auf}} + k_2) - (k_{\text{auf}} - k_2)]$$

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} [2k_2]$$

$$k_{\text{ex}} = k_2.$$

(A.3.10)

A.4. Individuelle chemische Verschiebungen

Kern	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L
CA	50.8	57.9	52.7	54.9	57.4	43.5	53.7	59.6	54.4	53.6
HA	4.35	4.69	4.76	4.29	4.66	3.97	4.63	4.23	4.36	4.38
CB	17.7	26.0	39.8	28.9	37.0		28.0	36.9	27.5	40.5
HB	1.39	3.11	2.80	2.05	3.11		3.23	1.90	1.81	1.65
CG3				34.6				25.4	23.1	25.2
HG3				2.29				1.33	1.45	1.64
CG2								15.7		
HG2								0.95		
CD					130.3		135.2	11.3	31.8	22.4
HD					7.30		8.12	0.89	1.70	0.92
CE					130.3		118.7		40.5	
HE					7.39		7.14		3.02	
CZ					128.6					
HZ					7.34					
	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
CA	53.9	51.5	61.6	54.1	54.6	56.6	60.2	60.7	56.7	57.4
HA	4.52	4.75	4.44	4.37	4.38	4.50	4.35	4.18	4.70	4.60
CB	31.0	37.7	30.6	28.1	28.8	62.3	68.3	30.8	27.4	37.0
HB	2.08	2.79	2.15	2.07	1.84	3.88	4.22	2.13	3.25	3.03
CG3	30.7		25.5	32.2	25.7					
HG3	2.64		2.03	2.38	1.70					
CG2							20.0	18.9		
HG2							1.23	0.96		
CD			48.2		41.7				126.0	130.0
HD			3.67		3.32				7.24	7.15
CE	15.0								120.3	117.0
HE	2.13								7.65	6.86
CZ2									122.9	
HZ2									7.17	
CZ3									119.3	
HZ3									7.24	
HH2									7.50	

Tab. A.1.: Aminosäurespezifische chemische Verschiebungen einer unstrukturierten Polypeptidkette [94] (Aminosäuren sind im Einbuchstabencode abgekürzt, alle Zahlenwerte sind in ppm angegeben). In rot: negatives Vorzeichen im ^1H - ^{13}C -*ct*HSQC (s. Abb. A.2). In blau: Seitenkettentome der Aromaten (s. Abb. A.3).

A.5. Aminosäurespezifisch detektierbare Atome

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	
Kern	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HN	
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	HA	HA	HA	HA	HA	HA1	HA	HA	HA	HA	
	CA	CA	CA	CA	CA	HA2	CA	CA	CA	CA	
	HB*	HB3	HB3	HB3	HB3	HB3	CA	HB3	HB	HB3	HB3
	CB	HB2	HB2	HB2	HB2	HB2		HB2	CB	HB2	HB2
		CB	CB	CB	CB	CB		CB	HG13	CB	CB
				HG3	HD*			HE1	HG13	HG3	HG
				HG2	CD1			CE1	CG1	HG2	CG
				CG	HE*			HD2	HG2*	CG	HD1*
					CE1			CD2	CG2	HD3	CD1
					HZ				HD1*	HD2	HD2*
					CZ				CD1	CD	CD2
										HE*	
									CE		
									HZ*		
	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	
Kern	HN	HN		HN	HN	HN	HN	HN	HN	HN	
	N	N		N	N	N	N	N	N	N	
	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	HA	
	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	
	HB3	HB3	HB3	HB3	HB3	HB3	HB3	HB	HB3	HB3	
	HB2	HB2	HB2	HB2	HB2	HB2	CB	CB	HB2	HB2	
	CB	CB	CB	CB	CB	CB	HG2*	HG1*	CB	CB	
	HG3	HD21	HG3	HG3	HG3		CG2	CG1	HD1	HD*	
	HG2	HD22	HG2	HG2	HG2			HG2*	CD1	CD1	
	CG	ND2	CG	CG	CG			CG2*	HE1	HE*	
	HE*		HD3	HE21	HD3				NE1	CE1	
	CE		HD2	HE22	HD2				HE3		
			CD	NE2	CD				CE3		
					HE				HZ2		
				NE				CZ2			
								HZ3			
								CZ3			
								HH2			

Tab. A.2.: Aminosäurespezifisch detektierbare Atome (Aminosäuren sind im Einbuchstabencode abgekürzt). In rot: negatives Vorzeichen im ^1H - ^{13}C -*ct*HSQC (s. Abb. A.2). In blau: Seitenkettentome der Aromaten (s. Abb. A.3).

A.6. ^1H - ^{15}N -IPAP-HSQC-Spektren von *EcSlpA*

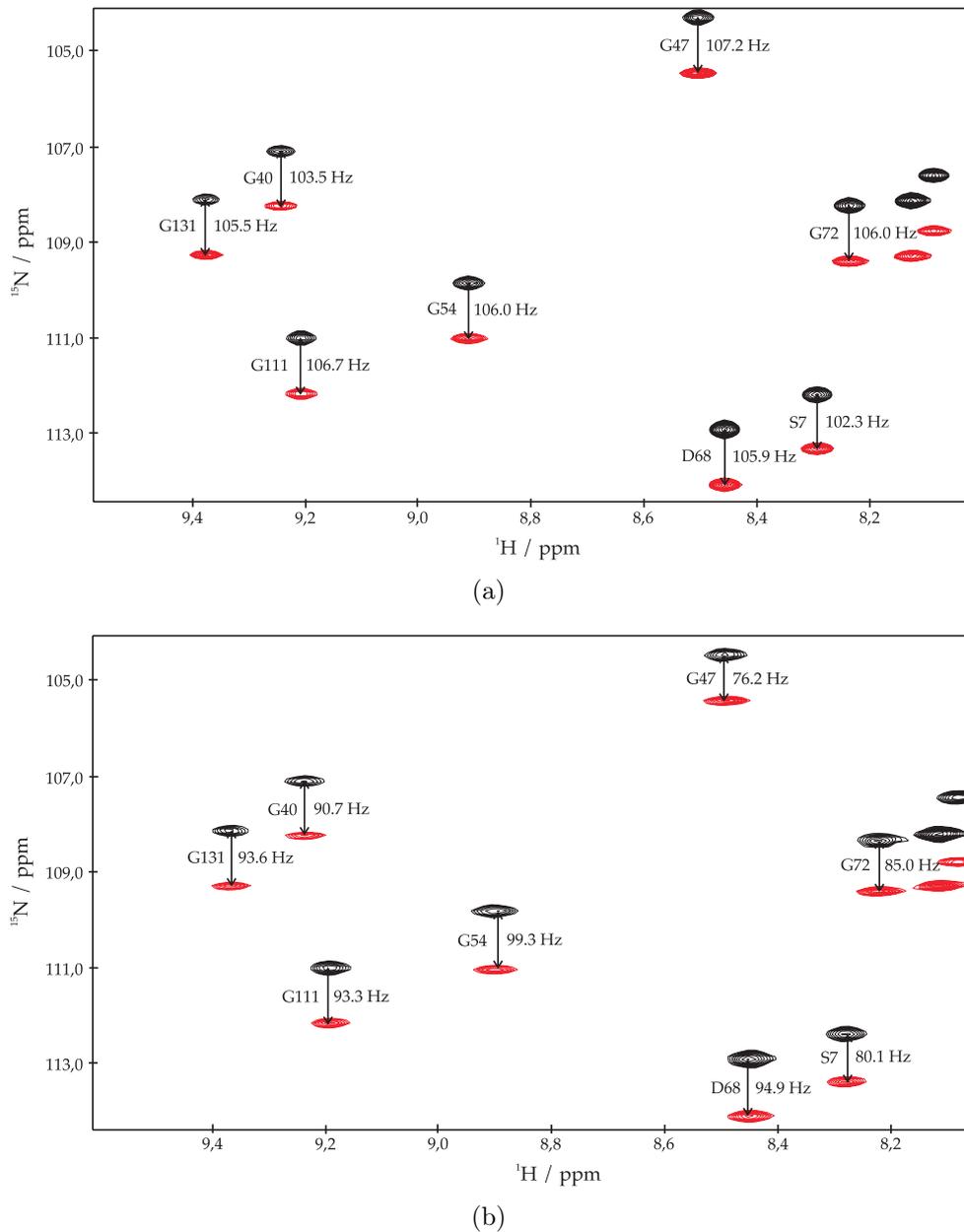


Abb. A.1.: Ausschnitt der ^1H - ^{15}N -IPAP-HSQC-Spektren von *EcSlpA*, unter isotropen Bedingungen (a) bzw. unter anisotropen Bedingungen (b). Die Ausrichtung erfolgte mit Pf1-Phagen einer Konzentration von etwa $c \approx 15 \text{ mg ml}^{-1}$. Die in Antiphase aufgenommenen Spektren sind in schwarz, die in Inphase aufgenommenen Spektren sind in rot dargestellt, unter Angabe der individuellen J-Kopplung (a) bzw. der Summe aus J-Kopplung und der dipolaren Restkopplung (b). Die Differenz der Kopplung aus (b) und (a) ergibt die aminosäurespezifische residuale Restkopplung. Die Messung dieser vier Spektren erfolgte bei $T = 298 \text{ K}$ und an $B_0 = 18.8 \text{ T}$.

A.7. Modellauswahl für Lipari & Szabo-Analyse

A.7.1. Modell_evaluate, Hauptprogramm

Mit dem Aufruf dieses Programms wird die Modellauswahl begonnen. Es werden zudem verschiedene Unterprogramme aufgerufen. Die Variablenübergabe erfolgt durch Verwendung globaler Variablen.

```
function modell_evaluate(a,b,c,d,e,f,g)
global mod SSE SSEmat SSE0100 SSE0110 SSE0101 SSEeighty res ModellMat
res_NaN(a);
SSE_Mat(a);
SSE0100=SSE;
SSE0100.Mat=SSEmat;
testmod;
mod1=mod';
SSE_Mat(b)
SSE0110=SSE;
SSE0110.Mat=SSEmat;
testmod;
mod21=mod;
i=1;
F12=[];
for i=1:length(SSE0100.Mat(:,1));
F12(i,:)=(SSE0100.Mat(i,2)-SSE0110.Mat(i,2))/SSE0110.Mat(i,2);
end
SSE_eighty(a);
eighty1=[res',SSEeighty'];
eighty1(any(isnan(eighty1),2),:)= [];
SSE_eighty(f);
eighty12=[res',SSEeighty'];
eighty12(any(isnan(eighty12),2),:)= [];
i=1;
F122=[];
for i=1:length(eighty1(:,1));
F122(i,:)=(eighty1(i,2)-eighty12(i,2))/eighty12(i,2);
end
mod22=[];
j=1;
for i=1:length(SSEmat(:,1))
if F12(i,1)>F122(i,1)
mod22(j)=SSEmat(i,1);
for k=1:length(mod21)
if mod21(k)==mod22(j)
mod2(k,1)=mod21(k);
k=k+1;
end
end
```

```

end
j=j+1;
end
end
SSE_Mat(c)
SSE0101=SSE;
SSE0101.Mat=SSEmat;
testmod;
mod31=mod;
i=1;
F13=[];
for i=1:length(SSE0100.Mat(:,1));
F13(i,:)=(SSE0100.Mat(i,2)-SSE0101.Mat(i,2))/SSE0101.Mat(i,2) ;
end
SSE_eighty(a);
eighty1=[res',SSEeighty'];
eighty1(any(isnan(eighty1),2),:)= [];
SSE_eighty(g);
eighty13=[res',SSEeighty'];
eighty13(any(isnan(eighty13),2),:)= [];
i=1;
F132=[];
for i=1:length(eighty1(:,1));
F132(i,:)=(eighty1(i,2)-eighty13(i,2))/eighty13(i,2);
end
mod32=[];
j=1;
for i=1:length(SSEmat(:,1))
if F13(i,1)>F132(i,1)
mod32(j)=SSEmat(i,1);
for k=1:length(mod31)
if mod31(k)==mod32(j)
mod3(k,1)=mod31(k);
k=k+1;
end
end
j=j+1;
end
end
j=1;
for i=1:length(SSE0100.Mat(:,1))
if SSE0100.Mat(i,2)<5*SSE0100.Mat(i,3)
mod1nes(j,1)=SSE0100.Mat(i,1);
j=j+1;
end
end
end

```

```

j=1;
for i=1:length(SSE0101.Mat(:,1))
if SSE0101.Mat(i,2)<5*SSE0101.Mat(i,3)
mod3nes(j,1)=SSE0101.Mat(i,1);
j=j+1;
end
end
j=1;
for i=1:length(SSE0110.Mat(:,1))
if SSE0110.Mat(i,2)<5*SSE0110.Mat(i,3)
mod2nes(j,1)=SSE0110.Mat(i,1);
j=j+1;
end
end
SSE_Mat(d)
SSE0111=SSE;
SSE0111.Mat=SSEmat;
testmod2;
mod4=mod';
SSE_Mat(e)
SSE1110=SSE;
SSE1110.Mat=SSEmat;
testmod2;
mod5=mod';
ModellMat(:,1)=SSEmat(:,1);
for i=1:length(ModellMat(:,1))
ModellMat(i,2)=NaN;
end
for i=1:length(mod5)
for j=1:length(ModellMat(:,1))
if mod5(i)==ModellMat(j,1)
ModellMat(j,2)=5;
end
end
end
for i=1:length(mod4)
for j=1:length(ModellMat(:,1))
if mod4(i)==ModellMat(j,1)
ModellMat(j,2)=4;
end
end
end
for i=1:length(mod3nes)
for j=1:length(ModellMat(:,1))
if mod3nes(i)==ModellMat(j,1)
ModellMat(j,2)=3;

```

```

end
end
end
for i=1:length(mod2nes)
for j=1:length(ModellMat(:,1))
if mod2nes(i)==ModellMat(j,1)
ModellMat(j,2)=2;
end
end
end
for i=1:length(mod1nes)
for j=1:length(ModellMat(:,1))
if mod1nes(i)==ModellMat(j,1)
ModellMat(j,2)=1;
end
end
end
for i=1:length(mod3)
for j=1:length(ModellMat(:,1))
if mod3(i)==ModellMat(j,1)
ModellMat(j,2)=3;
end
end
end
for i=1:length(mod2)
for j=1:length(ModellMat(:,1))
if mod2(i)==ModellMat(j,1)
ModellMat(j,2)=2;
end
end
end
for i=1:length(mod1)
for j=1:length(ModellMat(:,1))
if mod1(i)==ModellMat(j,1)
ModellMat(j,2)=1;
end
end
end
modell_selection
spin_modnumber

```

A.7.2. res_NaN

Mit diesem Unterprogramm werden diejenigen Kernspins erkannt und nicht weiter beachtet, die vorher vom Nutzer ausgeschlossen worden sind.

```

function res_Nan(x)
global res
fid=fopen(x);
values=[];
res=[];
while (feof(fid) == 0) & (isequal(sscanf(fgetl(fid),'%s %*s')
,'data_relaxation') == 0)
end
i=1;
for i=1:6
zeile=fgetl(fid);
i=i+1;
end
while feof(fid) == 0
zeile=fgetl(fid);
Daten2=sscanf(zeile,'%f %*f %*f %f ');
if strcmp(zeile,' stop_'), break, end;
values=[values,Daten2(2)];
res=[res,Daten2(1)];
end;
fclose(fid);
i=1;
for i=1:length(res)
if values(i)==0;
res(i)=NaN;
end
i=i+1;
end

```

A.7.3. SSE_mat, SSE_Exp, SSE_ninety

Weitere Unterprogramme, die eine Matrix erstellen, die in drei Spalten die jeweilige Kernspinnnummer, den experimentellen SSE- bzw. den simulierten SSE-Wert enthält (s. Gl. (2.2.71) in Abschnitt 2.2).

```

function SSE_Mat(x)
global SSE res SSEmat
SSE_Exp(x)
SSE_ninety(x)
SSEmat=[];
SSEmat=[res',SSE.Exp',SSE.ninety'];
SSEmat(any(isnan(SSEmat),2),:) = [];
function SSE_Exp(x)
global SSE
fid=fopen(x);
SSE.Rest=[]; n

```

```

SSE.Exp=[];
while (feof(fid) == 0) & (isequal(sscanf(fgetl(fid),'*s %s')
, '_simulated_SSE') == 0)
end
while feof(fid) == 0
zeile=fgetl(fid);
Daten2=sscanf(zeile,'%f %f');
i=1;
for i=1:22
zeile2=fgetl(fid);
i=i+1;
if strcmp(zeile2,' stop_'), break, end;
end;
if strcmp(zeile,''),break,end;
SSE.Rest=[SSE.Rest,Daten2(1)];
SSE.Exp=[SSE.Exp,Daten2(2)];
end;
fclose(fid);
function SSE_ninety(x)
global SSE
fid=fopen(x);
SSE.ninety=[];
while (feof(fid) == 0) & (isequal(sscanf(fgetl(fid),'*s %s'),
'_simulated_SSE') == 0)
end
while feof(fid) == 0
zeile=fgetl(fid);
if strcmp(zeile,''), break, end;
i=1;
for i=1:18
zeile=fgetl(fid);
- 24 -
i=i+1;
end;
Daten2=sscanf(zeile,'%*f %f');
i=1;
for i=1:6
zeile=fgetl(fid);
i=i+1;
if strcmp(zeile,' stop_'), break, end;
end;
SSE.ninety=[SSE.ninety,Daten2];
end;
fclose(fid);

```

A.7.4. testmod

Dieses Unterprogramm vergleicht für jeden Kernspin den experimentellen SSE-Wert mit dem zurückgerechneten SSE[90%]-Wert (s. Gl. (2.2.71) in Abschnitt 2.2) und schreibt in die Matrix mod genau diejenigen Kernspins, die diese Bedingung erfüllen.

```
function testmod
global SSEmat mod
mod=[];
j=1;
for i=1:length(SSEmat(:,1))
if SSEmat(i,2)<SSEmat(i,3)
mod(j)=SSEmat(i,1);
j=j+1;
end
end
```

A.7.5. F-Statistik

Mit diesem Unterprogramm werden die Modelle 2 und 3 (s. Gl. (2.2.67) und (2.2.68) in Abschnitt 2.2) mittels F-Statistik getestet. Mit der Rechenvorschrift SSE_eighty wird anlehnd an Abschnitt A.7.3 der SSE[80%] ausgelesen.

```
function SSE_eighty(x)
global SSEeighty
fid=fopen(x);
SSEeighty=[];
while (feof(fid) == 0) & (isequal(sscanf(fgetl(fid),'%*s %s'),
'_simulated_SSE') == 0)
end
while feof(fid) == 0
zeile=fgetl(fid);
if strcmp(zeile,''), break, end;
i=1;
for i=1:16
zeile=fgetl(fid);
i=i+1;
end;
Daten2=sscanf(zeile,'%*f %f');
i=1;
for i=1:8
zeile=fgetl(fid);
i=i+1;
- 25 -
if strcmp(zeile,' stop_'), break, end;
end;
SSEeighty=[SSEeighty,Daten2];
```

```
end;  
fclose(fid);
```

A.7.6. testmod2

Überprüfung der Kernspins auf Modell 4 und 5 (s. Gl. (2.2.69) und (2.2.70) in Abschnitt 2.2).

```
function testmod2  
global SSEmat mod  
mod=[];  
j=1;  
for i=1:length(SSEmat(:,1))  
if SSEmat(i,2)==0;  
mod(j)=SSEmat(i,1);  
j=j+1;  
end  
end
```

A.7.7. modell_selection

Hiermit wird die erste Ausgabedatei geschrieben.

```
function modell_selection  
global ModellMat  
fd = fopen('Dateiname', 'w');  
for i=1:length(ModellMat)  
w=0;x=0;y=0;z=0;a=0;b=0;c=0;d=0;  
if ModellMat(i,2)==1  
w=0;  
x=1;  
y=0;  
z=0;  
b=1000;  
end  
if ModellMat(i,2)==2  
w=0;  
x=1;  
y=1;  
z=0;  
b=33;  
c=33;  
end  
if ModellMat(i,2)==3  
w=0;  
x=1;  
y=0;
```

```

z=1;
b=33;
d=33;
end
if ModellMat(i,2)==4
w=0;
x=1;
y=1;
z=1;
- 26 -
b=10;
c=10;
d=10;
end
if ModellMat(i,2)==5
w=1;
x=1;
y=1;
z=0;
a=10;
b=10;
c=10;
end
if (ModellMat(i,1)<10);
fprintf(fd,'spin %d\n',ModellMat(i,1));
end
if ((ModellMat(i,1)<100)&& (ModellMat(i,1)>9));
fprintf(fd,'spin %d\n',ModellMat(i,1));
end
if ModellMat(i,1)>99;
fprintf(fd,'spin %d\n',ModellMat(i,1));
end
fprintf(fd,'M1 tloc 8.0 %d 2 0.000 18.4000 0\n',0);
fprintf(fd,'M1 Theta 0.0 %d 2 0.000 90.000 0\n',0);
fprintf(fd,'M1 S2f 1.0 %d 2 0.000 1.000 %d\n',w,a);
fprintf(fd,'M1 S2s 1.0 %d 2 0.000 1.000 %d\n',x,b);
fprintf(fd,'M1 te 0.0 %d 2 0.000 10000.000 %d\n',y,c);
fprintf(fd,'M1 Rex 0.0 %d 2 0.000 20.000 %d\n',z,d);
fprintf(fd,'\n');
i=i+1;
end
fclose(fd);

```

A.7.8. spin_modnumber

Schreiben der zweiten Ausgabedatei.

```

function spin_modnumber
global ModellMat
a=0;b=0;c=0;d=0;e=0;f=0;g=0;
for i=1:length(ModellMat)
if ModellMat(i,2)==1
a=a+1;
end
if ModellMat(i,2)==2
b=b+1;
end
if ModellMat(i,2)==3
c=c+1;
end
if ModellMat(i,2)==4
d=d+1;
end
if ModellMat(i,2)==5
e=e+1;
end
end
f=a+b+c+d+e;
g=length(ModellMat)-f;
- 27 -
fd = fopen('Dateiname', 'w');
fprintf(fd,'Spin Modell\n');
for i=1:length(ModellMat)
fprintf(fd,' %d %d \n',ModellMat(i,1),ModellMat(i,2));
i=i+1;
end
fprintf(fd,' \n');
fprintf(fd,' \n');
fprintf(fd,'Gesamtzahl aller Spins: %d \n',length(ModellMat));
fprintf(fd,'Anzahl, die dem jeweiligen Modell zugeordnet werden\n');
fprintf(fd,'Modell 1: %d \n',a);
fprintf(fd,'Modell 2: %d \n',b);
fprintf(fd,'Modell 3: %d \n',c);
fprintf(fd,'Modell 4: %d \n',d);
fprintf(fd,'Modell 5: %d \n',e);
fprintf(fd,'Anzahl der zugeordneten Spins: %d \n',f);
fprintf(fd,'Anzahl der nichtzuordbaren Spins: %d \n',g);
fclose(fd);

```

A.8. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren von *EcSlpA*

A.8.1. ^1H - ^{13}C -*ct*HSQC-Spektrum des aliphatischen Bereiches

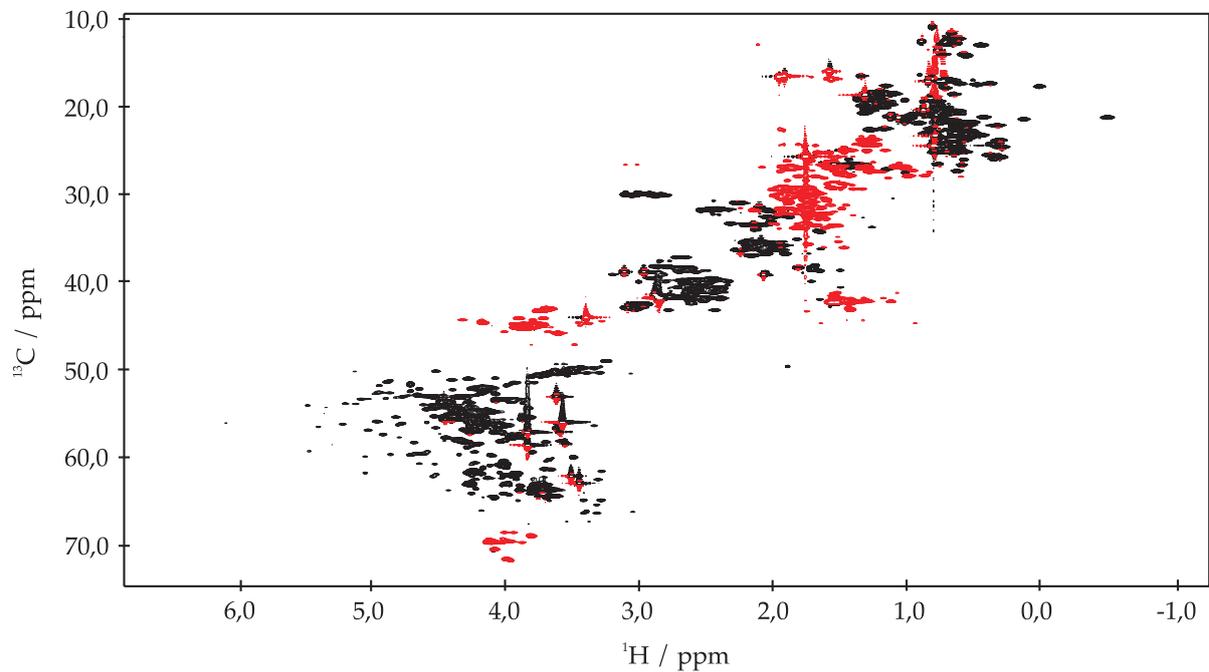


Abb. A.2.: ^1H - ^{13}C -*ct*HSQC-Spektrum des aliphatischen Bereiches von *EcSlpA*. Auf die Beschriftung der Kreuzsignale wurde der Übersicht halber verzichtet. Die Datenaufnahme erfolgte im *constant-time*-Modus, sodass negative Kreuzsignale (in rot) diejenigen ^{13}C -Kerne kennzeichnen, die zu keinem oder zu zwei anderen benachbarten aliphatischen Kohlenstoffen gekoppelt sind. Die Messung dieses Spektrums erfolgte bei $T = 298\text{ K}$ und an $B_0 = 18.8\text{ T}$.

A.8.2. ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum des aromatischen Bereiches

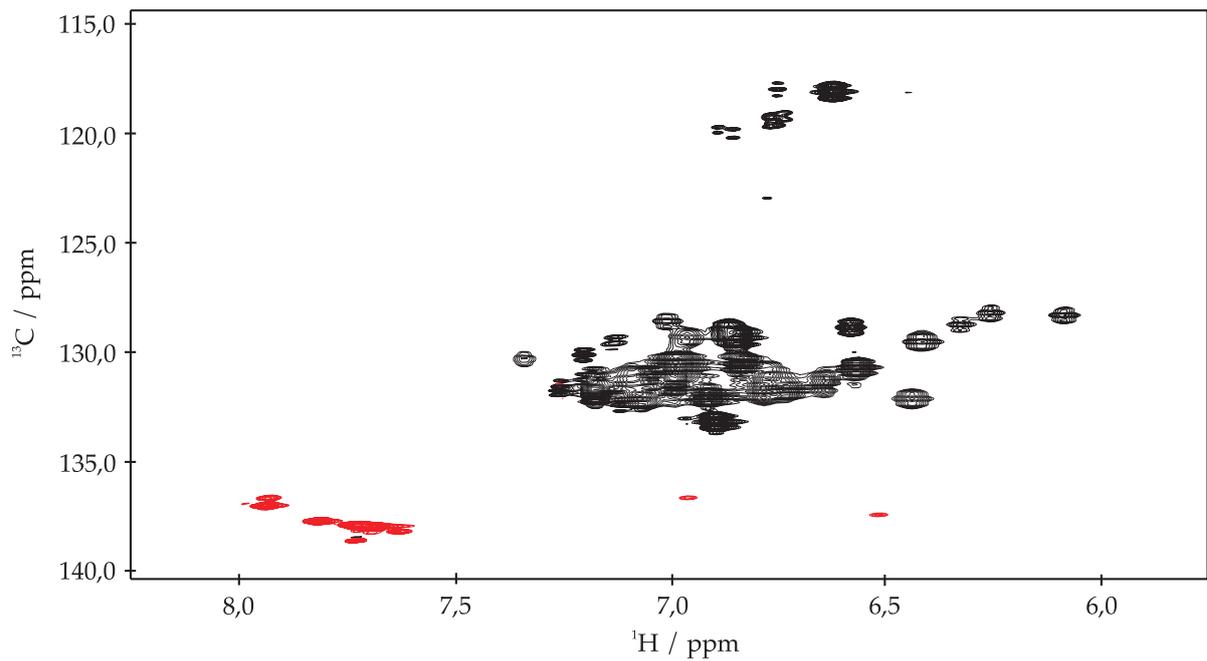


Abb. A.3.: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum des aromatischen Bereiches von *EcSlpA*. Auf die Beschriftung der Kreuzsignale wurde der Übersicht halber verzichtet. Die Datenaufnahme in der indirekten ^{13}C -Dimension erfolgte im nicht entkoppelten Modus. Die (C,2-H,2)-Korrelation der Histidine ist negativ (in rot) dargestellt. Die Messung dieses Spektrums erfolgte bei $T = 298\text{ K}$ und an $B_0 = 18.8\text{ T}$.

A.9. Komplettzuordnung *EcSlpA*

AS	Atom	CS / ppm									
2	HN	7.7812	10	HB*	1.311	17	CG	27.44	26	HN	7.437
2	N	999	10	CB	20.796	17	HD1*	0.297	26	N	115.239
2	HA	4.367	11	HN	9.468	17	CD1	24.99	26	HA	4.357
2	CA	999	11	N	122.584	17	HD2*	0.37	26	CA	55.973
2	HB3	3.789	11	HA	4.611	17	CD2	24.692	26	HB3	1.801
2	HB2	3.906	11	CA	60.416	18	HN	9.268	26	HB2	1.802
2	CB	63.355	11	HB	1.825	18	N	126.083	26	CB	33.979
3	HN	8.005	11	CB	35.435	18	HA	5.346	26	HG3	1.985
3	N	999	11	HG1*	0.724	18	CA	54.735	26	HG2	2.092
3	HA	4.216	11	CG1	23.474	18	HB3	1.494	26	CG	33.65
3	CA	57.245	11	HG2*	0.771	18	HB2	1.641	27	HN	8.798
3	HB3	1.866	11	CG2	23.5	18	CB	37.547	27	N	118.257
3	HB2	1.994	12	HN	8.869	18	HG3	0.887	27	HA	4.954
3	CB	30.683	12	N	131.368	18	HG2	1.32	27	CA	56.192
3	HG3	2.176	12	HA	5.025	18	CG	999	27	HB3	3.425
3	HG2	2.32	12	CA	53.716	18	HD3	1.242	27	HB2	3.802
3	CG	999	12	HB3	0.946	18	HD2	1.242	27	CB	64.349
4	HN	7.765	12	HB2	1.643	18	CD	999	28	HN	8.583
4	N	112.627	12	CB	44.976	18	HE*	2.679	28	N	121.82
4	HA	4.971	12	HG	1.094	18	CE	42.07	28	HA	4.122
4	CA	56.265	12	CG	27.44	18	HZ*	7.869	28	CA	64.932
4	HB3	3.326	12	HD1*	0.544	19	HN	8.089	28	HB	4.653
4	HB2	3.426	12	CD1	23.892	19	N	118.525	28	CB	66.461
4	CB	66.752	12	HD2*	0.582	19	HA	4.866	28	HG2*	0.775
5	HN	8.967	12	CD2	25.535	19	CA	52.987	28	CG2	19.794
5	N	122.697	13	HN	9.226	19	HB3	1.774	29	HN	7.847
5	HA	3.326	13	N	119.755	19	HB2	1.862	29	N	120.35
5	CA	65.806	13	HA	5.298	19	CB	42.573	29	HA	3.577
5	HB	2.292	13	CA	58.959	19	HG	1.4	29	CA	59.761
5	CB	31.867	13	HB	1.948	19	CG	27.42	29	HB3	2.047
5	HG1*	0.824	13	CB	35.435	19	HD1*	0.654	29	HB2	2.048
5	CG1	19.464	13	HG1*	0.016	19	CD1	21.99	29	CB	34.634
5	HG2*	0.694	13	CG1	18.139	19	HD2*	0.73	29	HG3	1.763
5	CG2	18.291	13	HG2*	0.528	19	CD2	24.85	29	HG2	1.764
6	HN	9.138	13	CG2	22.245	20	HN	9.989	29	CG	999
6	N	130.084	14	HN	8.199	20	N	123.989	29	HD3	999
6	HA	4.417	14	N	118.135	20	HA	4.218	29	HD2	999
6	CA	54.007	14	HA	5.362	20	CA	57.503	29	CD	999
6	HB3	1.908	14	CA	55.391	20	HB3	2.564	29	HE	6.985
6	HB2	1.908	14	HB3	2.596	20	HB2	2.719	29	NE	115.109
6	CB	31.648	14	HB2	2.665	20	CB	41.043	30	HN	7.428
6	HG3	2.257	14	CB	34.926	21	HN	7.616	30	N	118.348
6	HG2	2.318	14	HE1	6.963	21	N	116.02	30	HA	4.282
6	CG	33.728	14	CE1	136.79	21	HA	4.326	30	CA	55.464
6	HE21	6.667	14	HD2	6.722	21	CA	53.497	30	HB3	2.655
6	HE22	7.113	14	CD2	999	21	HB3	2.448	30	HB2	2.728
6	NE2	114.955	15	HN	9.421	21	HB2	2.918	30	CB	37.62
7	HN	8.28	15	N	118.759	21	CB	39.951	30	HD21	6.849
7	N	113.297	15	HA	6.094	22	HN	8.025	30	HD22	7.681
7	HA	3.698	15	CA	56.483	22	N	108.639	30	ND2	112.51
7	CA	61.654	15	HB3	2.848	22	HA1	3.471	31	HN	7.813
7	HB3	3.694	15	HB2	3.186	22	HA2	4.171	31	N	116.255
7	HB2	3.79	15	CB	44.539	22	CA	45.049	31	HA	4.543
7	CB	63.402	15	HD*	6.779	23	HN	8.09	31	CA	53.497
8	HN	7.45	15	CD1	131.931	23	N	116.995	31	HB3	2.797
8	N	116.264	15	HE*	7.096	23	HA	3.883	31	HB2	2.889
8	HA	4.864	15	CE1	131.58	23	CA	63.621	31	CB	38.713
8	CA	51.604	15	HZ	7.337	23	HB	3.896	31	HD21	7.028
8	HB3	2.615	15	CZ	130.403	23	CB	70.175	31	HD22	7.631
8	HB2	2.798	16	HN	8.813	23	HG2*	0.957	31	ND2	112.193
8	CB	38.713	16	N	116.015	23	CG2	21.295	32	HN	7.593
8	HD21	6.725	16	HA	4.699	24	HN	8.752	32	N	107.719
8	HD22	7.468	16	CA	62.383	24	N	121.178	32	HA1	3.684
8	ND2	112.484	16	HB	3.972	24	HA	4.268	32	HA2	4.01
9	HN	7.455	16	CB	72.215	24	CA	63.475	32	CA	46.069
9	N	117.902	16	HG2*	1.163	24	HB	3.938	33	HN	7.563
9	HA	4.53	16	CG2	22.94	24	CB	69.01	33	N	120.459
9	CA	61.144	17	HN	8.98	24	HG2*	0.92	33	HA	4.764
9	HB3	3.585	17	N	128.802	24	CG2	22.25	33	CA	53.424
9	HB2	3.81	17	HA	4.906	25	HN	8.965	33	HB3	1.557
9	CB	64.13	17	CA	53.716	25	N	133.477	33	HB2	1.681
10	HN	8.308	17	HB3	1.33	25	HA	4.227	33	CB	33.833
10	N	124.222	17	HB2	1.453	25	CA	53.279	33	HG3	1.265
10	HA	5.136	17	CB	44.83	25	HB*	1.148	33	HG2	1.342
10	CA	50.584	17	HG	1.065	25	CB	19.922	33	CG	24.165

Tab. A.3.: Komplettzuordnung von *EcSlpA* für den Sequenzbereich S2-K33.
CS: chemische Verschiebung.

Komplettzuordnung *Ec*SlpA (Fortsetzung)

AS	Atom	CS / ppm									
33	HD3	1.473	39	HD2*	0.64	49	HN	8.134	55	CD1	22.03
33	HD2	1.512	39	CD2	23.07	49	N	118.015	55	HD2*	0.761
33	CD	999	40	HN	9.202	49	HA	3.286	55	CD2	22.32
33	HE*	2.853	40	N	108.053	49	CA	62.018	56	HN	8.969
33	CE	42.191	40	HA1	3.816	49	HB3	1.778	56	N	119.325
33	HZ*	6.957	40	HA2	4.123	49	HB2	1.779	56	HA	4.615
34	HA	4.026	40	CA	46.651	49	CB	29.609	56	CA	54.371
34	CA	62.819	41	HN	7.865	49	HG3	2.5	56	HB3	1.519
34	HB3	1.034	41	N	120.755	49	HG2	2.551	56	HB2	1.717
34	HB2	1.303	41	HA	4.648	49	CG	38.13	56	CB	35.362
34	CB	32.158	41	CA	52.623	50	HN	7.976	56	HG3	1.286
34	HG3	1.112	41	HB3	2.154	50	N	113.9	56	HG2	1.384
34	HG2	1.539	41	HB2	2.803	50	HA	3.596	56	CG	24.715
34	CG	999	41	CB	41.116	50	CA	58.523	56	HD3	1.551
34	HD3	3.512	42	HN	8.665	50	HB3	1.695	56	HD2	1.552
34	HD2	3.512	42	N	121.385	50	HB2	1.825	56	CD	999
34	CD	50.78	42	HA	3.937	50	CB	28.444	56	HE*	2.882
35	HN	8.488	42	CA	53.716	50	HG3	2.148	56	CE	41.805
35	N	123.167	42	HB*	1.347	50	HG2	2.149	56	HZ*	6.741
35	HA	4.529	42	CB	16.936	50	CG	33.8	57	HN	8.337
35	CA	50.505	43	HN	8.579	50	HE21	6.563	57	N	119.835
35	HB*	1.275	43	N	117.944	50	HE22	7.289	57	HA	3.059
35	CB	23.08	43	HA	4.041	50	NE2	112.952	57	CA	66.607
36	HN	8.344	43	CA	60.78	51	HN	6.921	57	HB	1.763
36	N	122.708	43	HB3	3.942	51	N	113.828	57	CB	31.284
36	HA	4.832	43	HB2	3.68	51	HA	3.869	57	HG1*	0.78
36	CA	53.623	43	CB	62.528	51	CA	58.377	57	CG1	21.328
36	HB3	1.052	44	HN	8.734	51	HB3	1.828	57	HG2*	0.847
36	HB2	1.754	44	N	125.72	51	HB2	2.141	57	CG2	23.386
36	CB	43.813	44	HA	4.408	51	CB	29.39	58	HN	8.513
36	HG	1.162	44	CA	52.56	51	HE1	7.962	58	N	117.426
36	CG	27.572	44	HB3	1.015	51	CE1	136.801	58	HA1	3.814
36	HD1*	0.577	44	HB2	1.745	51	HD2	6.72	58	HA2	4.321
36	CD1	24.308	44	CB	44.16	51	CD2	117.765	58	CA	44.83
36	HD2*	0.651	44	HG	1.011	52	HN	7.247	59	HN	8.171
36	CD2	25.671	44	CG	27.902	52	N	118.722	59	N	122.373
37	HN	9.365	44	HD1*	0.13	52	HA	4.23	59	HA	4.539
37	N	129.97	44	CD1	21.846	52	CA	55.172	59	CA	55.755
37	HA	4.992	44	HD2*	0.351	52	HB3	1.17	59	HB3	2.482
37	CA	53.296	44	CD2	26.412	52	HB2	1.69	59	HB2	3.005
37	HB3	2.798	45	HN	7.875	52	CB	44.029	59	CB	42.209
37	HB2	3.039	45	N	116.732	52	HG	1.437	60	HN	8.094
37	CB	40.052	45	HA	4.085	52	CG	26.36	60	N	118.821
37	HD*	6.831	45	CA	57.503	52	HD1*	0.459	60	HA	5.479
37	CD1	130.667	45	HB3	3.678	52	CD1	23.66	60	CA	54.444
37	HE*	6.845	45	HB2	3.981	52	HD2*	0.6	60	HB3	1.552
37	CE1	129.48	45	CB	64.64	52	CD2	27	60	HB2	1.809
37	HZ	6.085	46	HN	8.83	53	HN	6.912	60	CB	35.872
37	CZ	128.43	46	N	123.756	53	N	118.011	60	HG3	1.163
38	HN	9.127	46	HA	3.812	53	HA	3.336	60	HG2	1.417
38	N	125.125	46	CA	59.833	53	CA	56.775	60	CG	25.396
38	HA	4.628	46	HB3	1.831	53	HB3	1.184	60	HD3	1.541
38	CA	55.245	46	HB2	1.905	53	HB2	1.331	60	HD2	1.542
38	HB3	1.463	46	CB	29.746	53	CB	42.209	60	CD	29.844
38	HB2	1.574	46	HG3	2.062	53	HG	1.447	60	HE*	2.771
38	CB	31.575	46	HG2	2.184	53	CG	26.357	60	CE	42.069
38	HG3	1.245	46	CG	36.56	53	HD1*	0.462	60	HZ*	999
38	HG2	1.287	47	HN	8.5	53	CD1	23.615	61	HN	8.841
38	CG	27.837	47	N	105.309	53	HD2*	0.626	61	N	117.298
38	HD3	2.981	47	HA1	3.526	53	CD2	25.246	61	HA	4.862
38	HD2	3.045	47	HA2	3.675	54	HN	8.874	61	CA	59.979
38	CD	42.902	47	CA	46.942	54	N	110.875	61	HB	4.021
38	HE	7.144	48	HN	7.418	54	HA1	3.44	61	CB	69.666
38	NE	115.287	48	N	124.642	54	HA2	4.105	61	HG2*	1.148
39	HN	8.226	48	HA	3.708	54	CA	45.267	61	CG2	20.609
39	N	125.298	48	CA	58.741	55	HN	7.441	62	HN	7.846
39	HA	4.222	48	HB3	1.078	55	N	120.722	62	N	120.755
39	CA	57.576	48	HB2	1.51	55	HA	4.26	62	HA	5.475
39	HB3	1.493	48	CB	41.626	55	CA	55.755	62	CA	59.906
39	HB2	1.749	48	HG	1.025	55	HB3	1.479	62	HB	3.994
39	CB	41.99	48	CG	999	55	HB2	1.646	62	CB	71.905
39	HG	1.378	48	HD1*	0.316	55	CB	42.791	62	HG2*	1.131
39	CG	19.501	48	CD1	26.205	55	HG	1.178	62	CG2	21.52
39	HD1*	0.351	48	HD2*	0.585	55	CG	22.95	63	HN	8.031
39	CD1	26.41	48	CD2	26.3	55	HD1*	0.684	63	N	119.424

Tab. A.4.: Komplettzuordnung von *Ec*SlpA für den Sequenzbereich K33-F63.
CS: chemische Verschiebung.

Komplettzuordnung *Ec*SlpA (Fortsetzung)

AS	Atom	CS / ppm									
63	HA	4.808	71	HB3	1.983	79	HA	4.646	85	HB2	1.765
63	CA	56.775	71	HB2	2.565	79	CA	61.144	85	CB	29.973
63	HB3	2.515	71	CB	38.057	79	HB	1.752	85	HG3	1.567
63	HB2	3.178	71	HD*	6.731	79	CB	37.183	85	HG2	1.568
63	CB	39.514	71	CD1	131.886	79	HG13	0.832	85	CG	27.23
63	HD*	6.435	71	HE*	6.955	79	HG12	1.285	85	HD3	3.088
63	CD1	132.272	71	CE1	130.582	79	CG1	27.856	85	HD2	3.089
63	HE*	6.411	71	HZ	6.8	79	HG2*	0.38	85	CD	43.45
63	CE1	129.651	71	CZ	999	79	CG2	17.76	85	HE	7.195
63	HZ	6.255	72	HN	8.185	79	HD1*	0.616	85	NE	114.82
63	CZ	128.35	72	N	109.338	79	CD1	12.684	86	HN	7.732
64	HN	8.694	72	HA1	3.567	80	HN	8.838	86	N	117.835
64	N	116.163	72	HA2	4.189	80	N	126.448	86	HA	4.091
64	HA	5.402	72	CA	44.539	80	HA	4.302	86	CA	57.576
64	CA	56.92	73	HN	8.24	80	CA	53.716	86	HB3	1.987
64	HB3	3.293	73	N	117.266	80	HB3	1.507	86	HB2	1.988
64	HB2	3.423	73	HA	4.237	80	HB2	1.766	86	CB	29.9
64	CB	65.223	73	CA	59.761	80	CB	33.979	86	HG3	2.159
65	HN	8.756	73	HB	2.008	80	HG3	2.043	86	HG2	2.16
65	N	121.877	73	CB	32.376	80	HG2	2.129	86	CG	37.302
65	HA	4.724	73	HG1*	0.778	80	CG	999	87	HN	7.644
65	CA	63.352	73	CG1	999	80	HE21	6.633	87	N	118.936
65	HB3	1.267	73	HG2*	0.868	80	HE22	7.061	87	HA	4.456
65	HB2	1.519	73	CG2	999	80	NE2	110.075	87	CA	58.013
65	CB	46.287	74	HA	3.979	81	HN	7.951	87	HB3	2.828
65	HG	1.109	74	CA	63.256	81	N	119.494	87	HB2	3.209
65	CG	19.005	74	HB3	1.84	81	HA	5.226	87	CB	39.587
65	HD1*	0.578	74	HB2	2.14	81	CA	56.629	87	HD*	7.17
65	CD1	26.45	74	CB	31.867	81	HB3	2.514	87	CD1	132.088
65	HD2*	0.73	74	HG3	1.735	81	HB2	2.703	87	HE*	7.054
65	CD2	21.2	74	HG2	1.736	81	CB	39.878	87	CE1	131.765
66	HN	8.392	74	CG	26.613	81	HD*	6.892	87	HZ	6.862
66	N	121.187	74	HD3	3.553	81	CD1	133.313	87	CZ	129.077
66	HA	4.416	74	HD2	3.671	81	HE*	6.619	88	HN	7.879
66	CA	55.027	74	CD	50.694	81	CE1	118.218	88	N	120.753
66	HB3	1.789	75	HN	9.282	82	HN	9.161	88	HA	4.241
66	HB2	2.13	75	N	117.459	82	N	122.579	88	CA	56.993
66	CB	28.225	75	HA	5.083	82	HA	4.774	88	HB3	1.877
66	HG3	2.219	75	CA	53.716	82	CA	56.483	88	HB2	1.959
66	HG2	2.292	75	HB3	3.683	82	HB3	2.519	88	CB	32.595
66	CG	36.288	75	HB2	3.91	82	HB2	3.181	88	HG3	2.412
67	HA	4.183	75	CB	65.369	82	CB	43.738	88	HG2	2.465
67	CA	66.388	76	HA	4.266	82	HD*	6.99	88	CG	32.087
67	HB3	1.66	76	CA	64.422	82	CD1	131.65	88	HE*	1.93
67	HB2	1.905	76	HB3	1.943	82	HE*	7.049	88	CE	17.1
67	CB	32.012	76	HB2	2.249	82	CE1	131.217	89	HN	8.11
67	HG3	1.497	76	CB	32.085	82	HZ	6.96	89	N	120.234
67	HG2	1.498	76	HG3	1.633	82	CZ	129.452	89	HA	4.395
67	CG	27.26	76	HG2	1.633	83	HN	9.009	89	CA	55.391
67	HD3	3.567	76	CG	33.063	83	N	117.269	89	HB3	2.421
67	HD2	3.622	76	HD3	3.793	83	HA	5.034	89	HB2	2.564
67	CD	49.719	76	HD2	3.926	83	CA	57.357	89	CB	41.116
68	HN	8.416	76	CD	51.787	83	HB3	3.815	90	HN	7.867
68	N	114.053	77	HN	7.778	83	HB2	4.022	90	N	122.71
68	HA	4.067	77	N	116.66	83	CB	64.495	90	HA	4.231
68	CA	56.702	77	HA	4.421	84	HN	8.819	90	CA	52.528
68	HB3	2.442	77	CA	55.682	84	N	127.375	90	HB*	1.232
68	HB2	2.468	77	HB3	2.342	84	HA	4.603	90	CB	19.777
68	CB	40.242	77	HB2	2.62	84	CA	59.761	91	HN	7.865
69	HN	7.498	77	CB	40.242	84	HB3	1.674	91	N	107.832
69	N	121.272	78	HN	7.194	84	HB2	1.848	91	HA1	3.908
69	HA	4.408	78	N	118.72	84	CB	30.41	91	HA2	3.72
69	CA	51.531	78	HA	4.415	84	HG3	1.506	91	CA	44.539
69	HB*	1.329	78	CA	54.444	84	HG2	1.507	92	HN	8.188
69	CB	21.161	78	HB3	1.621	84	CG	28.015	92	N	121.294
70	HN	7.485	78	HB2	1.66	84	HD3	2.529	92	HA	4.275
70	N	125.277	78	CB	42.063	84	HD2	2.634	92	CA	54.226
70	HA	4.08	78	HG	1.426	84	CD	42.492	92	HB3	1.683
70	CA	51.458	78	CG	27	84	HE	7.415	92	HB2	1.786
70	HB*	1.104	78	HD1*	0.65	84	NE	114.114	92	CB	30.119
70	CB	18.83	78	CD1	22.667	85	HN	8.539	92	HG3	2.096
71	HN	8.306	78	HD2*	0.799	85	N	118.944	92	HG2	999
71	N	119.747	78	CD2	25.63	85	HA	4.039	92	CG	999
71	HA	4.19	79	HN	7.077	85	CA	58.523	93	HA	4.136
71	CA	58.814	79	N	122.393	85	HB3	1.764	93	CA	62.747

Tab. A.5.: Komplettzuordnung von *Ec*SlpA für den Sequenzbereich F63-P93.
CS: chemische Verschiebung.

Komplettzuordnung *Ec*SlpA (Fortsetzung)

AS	Atom	CS / ppm									
93	HB3	1.483	100	HG	0.71	109	N	124.698	116	HN	8.546
93	HB2	1.486	100	CG	999	109	HA	4.951	116	N	123.985
93	CB	32.012	100	HD1*	0.567	109	CA	52.987	116	HA	4.249
93	HG3	1.66	100	CD1	23.488	109	HB3	1.739	116	CA	61.8
93	HG2	1.367	100	HD2*	0.653	109	HB2	1.95	116	HB	1.504
93	CG	27.19	100	CD2	24.7	109	CB	36.236	116	CB	40.898
93	HD3	3.429	101	HN	8.467	109	HG3	2.268	116	HG13	1.191
93	HD2	3.503	101	N	124.569	109	HG2	2.268	116	HG12	1.192
93	CD	50.152	101	HA	4.527	109	CG	31.408	116	CG1	27.857
94	HN	7.285	101	CA	56.993	109	HE*	1.59	116	HG2*	0.666
94	N	120.544	101	HB3	2.842	109	CE	16.65	116	CG2	17.344
94	HA	4.273	101	HB2	2.871	110	HA	5.057	116	HD1*	0.585
94	CA	54.663	101	CB	42.573	110	CA	62.091	116	CD1	14.461
94	HB3	1.625	101	HD*	6.906	110	HB3	1.736	117	HN	8.636
94	HB2	1.775	101	CD1	132.1	110	HB2	1.932	117	N	126.815
94	CB	32.595	101	HE*	6.565	110	CB	31.939	117	HA	4.888
94	HG3	2.024	101	CE1	130.827	110	HG3	1.865	117	CA	51.822
94	HG2	2.096	101	HZ	6.565	110	HG2	1.866	117	HB3	2.537
94	CG	35.794	101	CZ	129.003	110	CG	27.403	117	HB2	2.604
95	HN	8.427	102	HN	8.398	110	HD3	3.634	117	CB	40.096
95	N	123.515	102	N	119.655	110	HD2	3.766	117	HD21	6.906
95	HA	3.317	102	HA	4.534	110	CD	50.97	117	HD22	7.651
95	CA	62.892	102	CA	62.528	111	HN	9.167	117	ND2	115.145
95	HB	1.643	102	HB	3.814	111	N	112.135	118	HN	8.89
95	CB	36.673	102	CB	69.52	111	HA1	2.561	118	N	115.018
95	HG13	0.985	102	HG2*	1.066	111	HA2	4.328	118	HA1	3.491
95	HG12	1.438	102	CG2	21.702	111	CA	44.685	118	HA2	3.815
95	CG1	28.263	103	HN	8.777	112	HN	7.879	118	CA	47.525
95	HG2*	0.735	103	N	130.657	112	N	120.753	119	HN	8.721
95	CG2	17.49	103	HA	4.282	112	HA	4.232	119	N	125.794
95	HD1*	0.675	103	CA	51.458	112	CA	59.833	119	HA	4.598
95	CD1	12.105	103	HB*	1.229	112	HB	2.001	119	CA	52.696
96	HN	9.143	103	CB	20.432	112	CB	32.595	119	HB3	2.527
96	N	117.075	104	HN	8.734	112	HG1*	0.779	119	HB2	2.624
96	HA1	3.304	104	N	120.712	112	CG1	21.412	119	CB	44.029
96	HA2	4.19	104	HA	4.038	112	HG2*	0.625	120	HN	7.823
96	CA	44.83	104	CA	58.523	112	CG2	21.455	120	N	114.265
97	HN	7.747	104	HB3	1.944	113	HN	8.57	120	HA	4.914
97	N	124.048	104	HB2	1.945	113	N	127.489	120	CA	57.721
97	HA	4.183	104	CB	32.085	113	HA	3.913	120	HB3	3.623
97	CA	52.332	104	HG3	2.462	113	CA	62.164	120	HB2	3.763
97	HB*	1.34	104	HG2	2.539	113	HB	2.154	120	CB	64.859
97	CB	20.287	104	CG	32.227	113	CB	36.164	121	HN	9.352
98	HN	8.031	104	HE*	1.96	113	HG13	1.001	121	N	127.857
98	N	120.131	104	CE	17.31	113	HG12	1.457	121	HA	4.613
98	HA	4.723	105	HN	7.772	113	CG1	28.163	121	CA	59.979
98	CA	60.052	105	N	116.253	113	HG2*	0.476	121	HB	1.72
98	HB	1.505	105	HA	4.371	113	CG2	17.8	121	CB	40.388
98	CB	39.004	105	CA	53.497	113	HD1*	0.735	121	HG13	0.959
98	HG13	1.463	105	HB3	2.445	113	CD1	13.22	121	HG12	1.285
98	HG12	0.866	105	HB2	2.921	114	HN	8.803	121	CG1	27.71
98	CG1	28.252	105	CB	40.024	114	N	129.39	121	HG2*	0.657
98	HG2*	0.612	106	HN	8.071	114	HA	4.232	121	CG2	18.999
98	CG2	17.748	106	N	109.239	114	CA	55.973	121	HD1*	0.457
98	HD1*	0.658	106	HA1	3.389	114	HB3	1.566	121	CD1	13.413
98	CD1	13.253	106	HA2	4.172	114	HB2	1.735	122	HN	8.68
99	HN	8.875	106	CA	45.049	114	CB	32.886	122	N	124.222
99	N	127.388	107	HN	8.037	114	HG3	1.415	122	HA	4.529
99	HA	4.489	107	N	118.52	114	HG2	1.416	122	CA	62.31
99	CA	53.934	107	HA	4.212	114	CG	32.75	122	HB	3.815
99	HB3	1.472	107	CA	58.959	114	HD3	2.96	122	CB	69.156
99	HB2	1.635	107	HB3	3.685	114	HD2	3.051	122	HG2*	0.758
99	CB	36.601	107	HB2	3.758	114	CD	43.321	122	CG2	22.118
99	HG3	2.053	107	CB	64.13	114	HE	7.525	123	HN	9.157
99	HG2	2.054	108	HN	8.404	114	NE	114.325	123	N	130.67
99	CG	32.232	108	N	121.889	115	HN	7.303	123	HA	4.234
99	HE*	1.58	108	HA	4.823	115	N	115.554	123	CA	61.072
99	CE	17.45	108	CA	55.755	115	HA	4.383	123	HB	1.272
100	HN	8.165	108	HB3	1.724	115	CA	55.755	123	CB	34.124
100	N	122.917	108	HB2	1.789	115	HB3	1.829	123	HG1*	-0.492
100	HA	5.054	108	CB	31.721	115	HB2	1.831	123	CG1	21.654
100	CA	54.226	108	HG3	1.917	115	CB	34.27	123	HG2*	0.335
100	HB3	1.126	108	HG2	2.057	115	HG3	2.009	123	CG2	22.545
100	HB2	1.412	108	CG	37.157	115	HG2	2.097	124	HN	8.646
100	CB	42.573	109	HN	8.997	115	CG	36.74	124	N	125.276

Tab. A.6.: Komplettzuordnung von *Ec*SlpA für den Sequenzbereich P93-D124.
CS: chemische Verschiebung.

Komplettzuordnung *Ec*SlpA (Fortsetzung)

AS	Atom	CS / ppm									
124	HA	4.948	132	N	117.754	139	N	127.858	146	HA	4.139
124	CA	52.113	132	HA	4.515	139	HA	5.12	146	CA	52.478
124	HB3	2.02	132	CA	54.735	139	CA	54.298	146	HB*	1.204
124	HB2	2.816	132	HB3	1.761	139	HB3	1.146	146	CB	18.634
124	CB	44.029	132	HB2	1.928	139	HB2	1.645	147	HN	8.047
125	HN	9.339	132	CB	29.318	139	CB	33.615	147	N	122.468
125	N	125.846	132	HG3	2.044	139	HG3	1.778	147	HA	4.108
125	HA	4.691	132	HG2	2.045	139	HG2	1.932	147	CA	55.258
125	CA	58.595	132	CG	32.921	139	CG	35.4	147	HB3	1.208
125	HB3	2.946	132	HE21	6.727	140	HN	8.448	147	HB2	1.418
125	HB2	3.416	132	HE22	7.44	140	N	126.105	147	CB	42.669
125	CB	39.368	132	NE2	113.091	140	HA	3.719	147	HG	1.303
125	HD*	7.066	133	HN	8.585	140	CA	64.276	147	CG	26.717
125	CD1	132.274	133	N	123.051	140	HB	2.251	147	HD1*	0.64
125	HE*	6.985	133	HA	4.439	140	CB	31.648	147	CD1	23.487
125	CE1	130.893	133	CA	64.13	140	HG1*	0.439	147	HD2*	0.709
125	HZ	6.322	133	HB	4.014	140	CG1	21.85	147	CD2	25.259
125	CZ	128.869	133	CB	68.937	140	HG2*	0.685	148	HN	8.239
126	HN	8.846	133	HG2*	0.809	140	CG2	22.112	148	N	121.173
126	N	120.703	133	CG2	20.815	141	HN	9.202	148	HA	4.019
126	HA	4.245	134	HN	8.213	141	N	130.567	148	CA	56.73
126	CA	55.172	134	N	120.732	141	HA	4.416	148	HB3	1.687
126	HB3	2.169	134	HA	4.595	141	CA	56.41	148	HB2	1.744
126	HB2	3.13	134	CA	59.833	141	HB3	1.401	148	CB	30.08
126	CB	39.587	134	HB	1.671	141	HB2	1.494	148	HG3	1.94
126	HD21	7.067	134	CB	34.634	141	CB	43.01	148	HG2	2.021
126	HD22	8.993	134	HG1*	0.557	141	HG	1.275	148	CG	36.318
126	ND2	119.401	134	CG1	22.523	141	CG	999			
127	HN	9.02	134	HG2*	0.737	141	HD1*	0.395			
127	N	124.877	134	CG2	20.895	141	CD1	25.931			
127	HA	4.308	135	HN	8.587	141	HD2*	0.63			
127	CA	57.357	135	N	123.4	141	CD2	22.23			
127	HB3	2.71	135	HA	4.721	142	HN	7.478			
127	HB2	3.223	135	CA	55.245	142	N	115.578			
127	CB	31.43	135	HB3	2.63	142	HA	4.24			
127	HE1	6.512	135	HB2	2.868	142	CA	56.556			
127	CE1	137.554	135	CB	31.284	142	HB3	1.623			
127	HD2	7.082	135	HE1	7.623	142	HB2	1.789			
127	CD2	118.21	135	CE1	138.34	142	CB	34.343			
128	HA	4.088	135	HD2	6.473	142	HG3	1.974			
128	CA	64.798	135	CD2	118.45	142	HG2	2.092			
128	HB3	2.096	136	HN	9.12	142	CG	36.73			
128	HB2	2.097	136	N	124.965	143	HN	8.75			
128	CB	32.186	136	HA	4.799	143	N	125.566			
128	HG3	1.51	136	CA	58.013	143	HA	4.26			
128	HG2	1.594	136	HB3	1.279	143	CA	61.217			
128	CG	27.811	136	HB2	1.94	143	HB	1.419			
128	HD3	2.01	136	CB	43.301	143	CB	39.732			
128	HD2	3.293	136	HD*	6.641	143	HG13	0.049			
128	CD	50.71	136	CD1	131.538	143	HG12	1.202			
129	HN	11.208	136	HE*	6.771	143	CG1	28.375			
129	N	120.037	136	CE1	131.339	143	HG2*	0.559			
129	HA	4.321	136	HZ	6.566	143	CG2	14.67			
129	CA	53.497	136	CZ	999	143	HD1*	0.72			
129	HB3	1.215	137	HN	8.087	143	CD1	13.078			
129	HB2	1.265	137	N	121.841	144	HN	9.65			
129	CB	41.189	137	HA	5.204	144	N	125.051			
129	HG	1.284	137	CA	54.226	144	HA	4.426			
129	CG	999	137	HB3	2.435	144	CA	55.755			
129	HD1*	0.535	137	HB2	2.785	144	HB3	2.611			
129	CD1	23.199	137	CB	43.519	144	HB2	2.715			
129	HD2*	0.324	138	HN	9.072	144	CB	40.096			
129	CD2	25.943	138	N	124.469	145	HA	4.225			
130	HN	8.233	138	HA	5.052	145	CA	62.819			
130	N	125.872	138	CA	60.27	145	HB3	1.721			
130	HA	4.008	138	HB	1.646	145	HB2	1.92			
130	CA	53.789	138	CB	42.573	145	CB	32.741			
130	HB*	1.162	138	HG13	1.142	145	HG3	1.483			
130	CB	18.102	138	HG12	1.143	145	HG2	1.484			
131	HN	9.332	138	CG1	28.542	145	CG	27.706			
131	N	109.16	138	HG2*	0.627	145	HD3	3.067			
131	HA1	3.652	138	CG2	21.185	145	HD2	3.394			
131	HA2	4.13	138	HD1*	0.725	145	CD	50.792			
131	CA	45.559	138	CD1	17.435	146	HN	8.504			
132	HN	7.434	139	HN	8.927	146	N	124.536			

Tab. A.7.: Komplettzuordnung von *Ec*SlpA für den Sequenzbereich D124-E148.
CS: chemische Verschiebung.

A.10. Analyse der RDC-Werte von *EcSlpA*

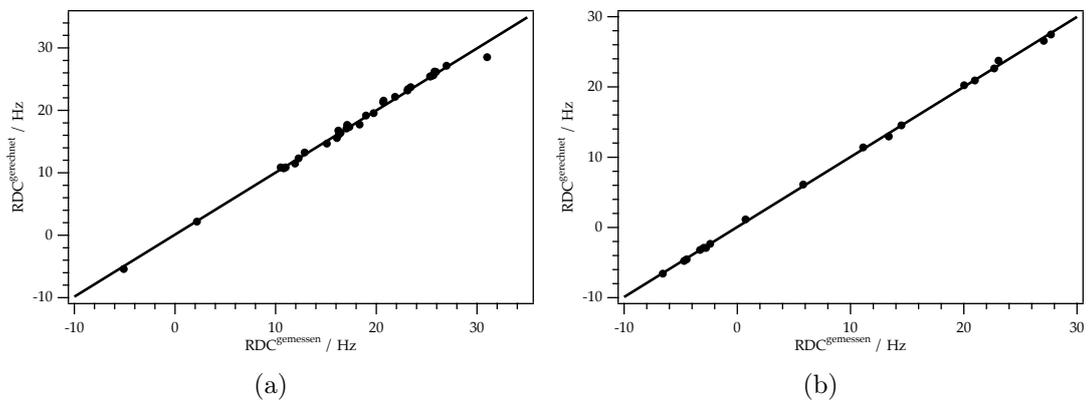


Abb. A.4.: Analyse der RDC-Werte für die FKBP-Domäne (a) und für die IF-Domäne (b) von *EcSlpA*. Die Rhombizität R und die Magnitude D_a des Ausrichtungstensors besitzen die folgenden Werte: $R = 0.102$ (a) bzw. $R = 0.339$ (b), $D_a = -24.48$ (a) bzw. $D_a = -24.48$ (b). Der Korrelationskoeffizient zwischen den gemessenen ($\text{RDC}^{\text{gemessen}}$) und den zurückgerechneten RDC-Werten ($\text{RDC}^{\text{gerechnet}}$) beträgt $r = (99.4 \pm 1.4)\%$ (a) bzw. $r = (99.7 \pm 0.6)\%$ (b).

A.11. NMR-Titration Tetrapeptid zu *Ec*SlpA

A.11.1. Spektraler Verlauf

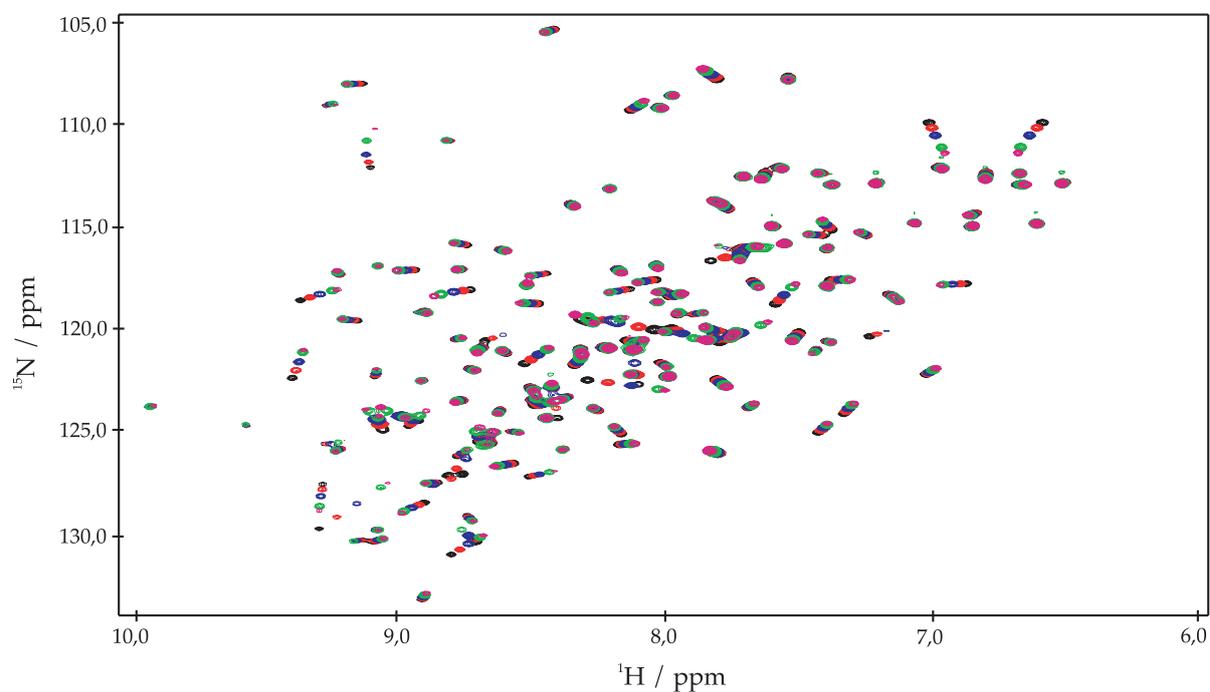


Abb. A.5.: ^1H - ^{15}N -HSQC-Ausschnitt des detektierten Verlaufes der Titration des Tetrapeptides zu *Ec*SlpA. Folgende stöchiometrische Verhältnisse n sind dargestellt: $n = 0$ (in schwarz), $n = 0.4$ (in rot), $n = 1.0$ (in blau), $n = 3.5$ (in grün) und $n = 9.7$ (in magenta); jeweils $[\text{Tetrapeptid}]/[\text{EcSlpA}]$.

A.12. NMR-Titration RCM-T1 zu *Ec*SlpA

A.12.1. Spektraler Verlauf

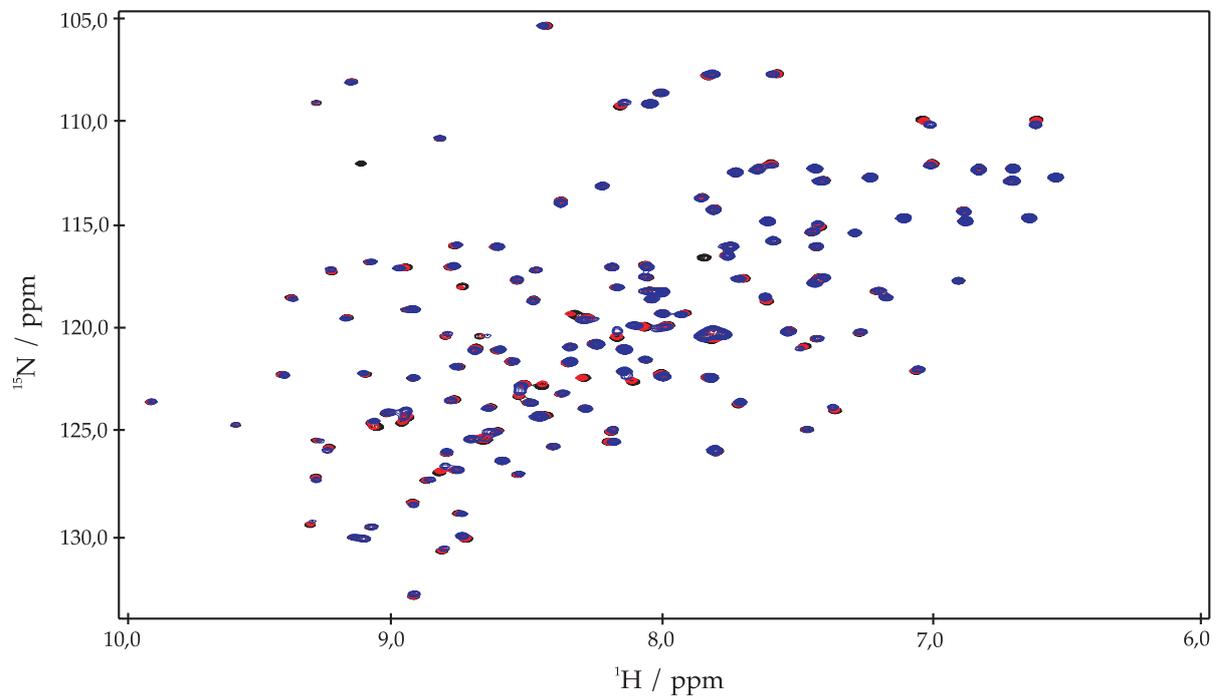


Abb. A.6.: ^1H - ^{15}N -HSQC-Ausschnitt des detektierten Verlaufes der Titration der reduzierten und carboxylierten Form der Ribonuklease T1 zu *Ec*SlpA. Folgende stöchiometrische Verhältnisse n sind dargestellt: $n = 0$ (in schwarz), $n = 0.3$ (in rot) und $n = 1.9$ (in blau); jeweils $[\text{RCM-T1}]/[\text{EcSlpA}]$.

A.12.2. Änderung der Kreuzsignalintensität

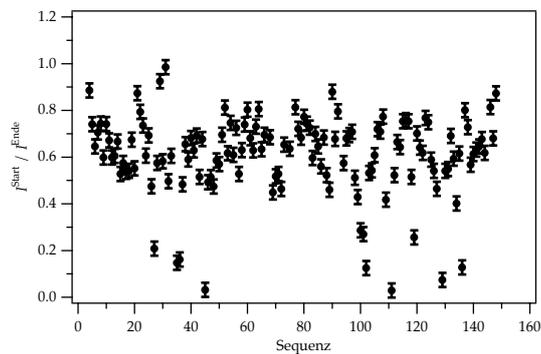


Abb. A.7.: Endpunktanalyse der NMR-Titration von RCM-T1 zu *EcSlpA*. Es ist das Intensitätsverhältnis des ersten Spektrums ($c^{\text{RCM-T1}} = 0 \mu\text{M}$, $c^{\text{EcSlpA}} = 220 \mu\text{M}$) zum letzten Spektrum gezeigt ($c^{\text{RCM-T1}} = 215 \mu\text{M}$, $c^{\text{EcSlpA}} = 115 \mu\text{M}$). Der Verdünnungsfaktor der Größe 1.9 zwischen beiden Spektren ist berücksichtigt worden.

A.12.3. Individuelle Titrationsverläufe für Bindung

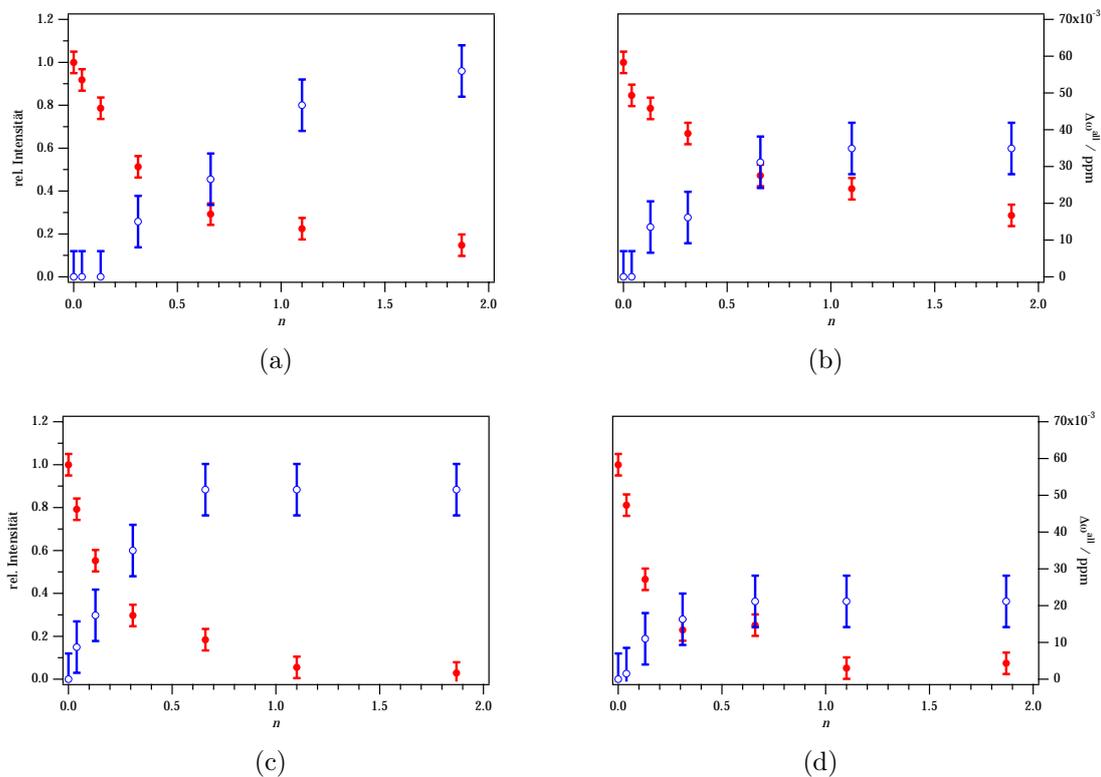


Abb. A.8.: Individueller Verlauf der NMR-Titration von RCM-T1 zu *EcSlpA* bzgl. der Intensität (geschlossene rote Kreise, linke Ordinate) und der Änderung der chemischen Verschiebung (offene blaue Kreise, rechte Ordinate). Der Fehler für die Intensitätsbestimmung ist mit 5%, der für die Bestimmung der Änderung der chemischen Verschiebung mit 0.007 ppm angenommen worden. Dargestellt sind die Titrationsverläufe von A35 (a), L100 (b), G111 (c) und L129 (d). Diese zeigen die stärksten detektierbaren Änderungen während der NMR-Titration.

A.12.4. Individuelle Titrationsverläufe für Nichtbindung

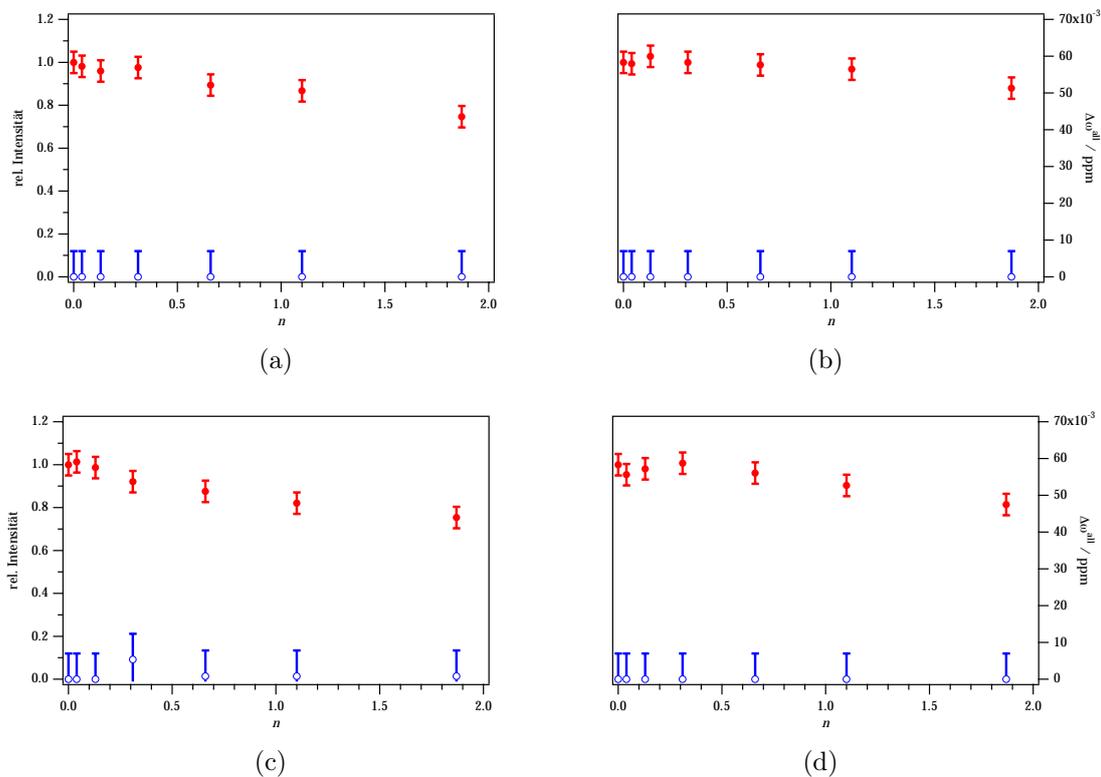


Abb. A.9.: Individueller Verlauf der NMR-Titration von RCM-T1 zu *EcSlpA* bzgl. der Intensität (geschlossene rote Kreise) und der Änderung der chemischen Verschiebung (offene blaue Kreise). Der Fehler für die Intensitätsbestimmung ist mit 5%, der für die Bestimmung der Änderung der chemischen Verschiebung mit 0.007 ppm angenommen worden. Dargestellt sind die Titrationsverläufe von G54 (a), A90 (b), E115 (c) und A146 (d). Diese zeigen wenig bis keine detektierbaren Änderungen während der NMR-Titration.

A.12.5. Linienformanalyse

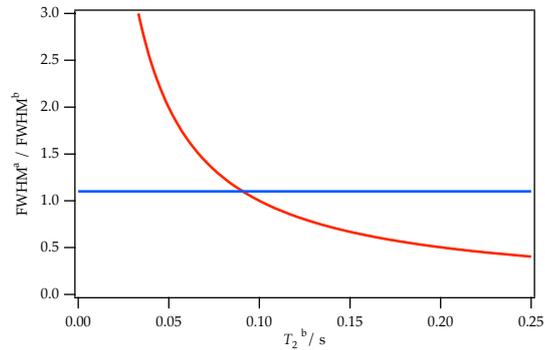


Abb. A.10.: Abhängigkeit des Verhältnisses der Halbwertsbreiten (FWHM) zweier Resonanzsignale a und b von der transversalen Relaxationszeit T_2^b des Resonanzsignals b (in rot). Das Verhältnis $\text{FWHM}^a / \text{FWHM}^b$ ist mit Gl. (A.12.11) bestimmt worden. Für die dargestellte Berechnung ist eine transversale Relaxationszeit des Resonanzsignals a von $T_2^a = 0.1$ s angenommen worden. Die blaue horizontale Linie gibt das experimentelle Verhältnis für die CH_3 -Gruppe von V123 wieder ($\text{FWHM}^a = 34.6$ Hz, $\text{FWHM}^b = 38.1$ Hz; s. Abb. 3.13). Das Resonanzsignal a ist in Abwesenheit von RCM-T1, das Resonanzsignal b mit 1.9fachen Überschuss aufgenommen worden. Die Verbreiterung des Resonanzsignals um etwa 10 % beim Übergang $a \rightarrow b$ schlägt sich auch in einer etwa 10 % erhöhten transversalen Relaxationsrate nieder ($R_2^a = 10$ Hz, $R_2^b = 11$ Hz).

Lorentzlinie $L(\nu)$ des zeitabhängigen FID-Signals $A(t) = A_0 e^{-(i\nu t/T_2)}$ bei der chemischen Verschiebung 0:

$$L(\nu) = \frac{T_2}{1 + (2\pi\nu T_2)^2}. \quad (\text{A.12.11})$$

A.13. ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von *TtSlyD*

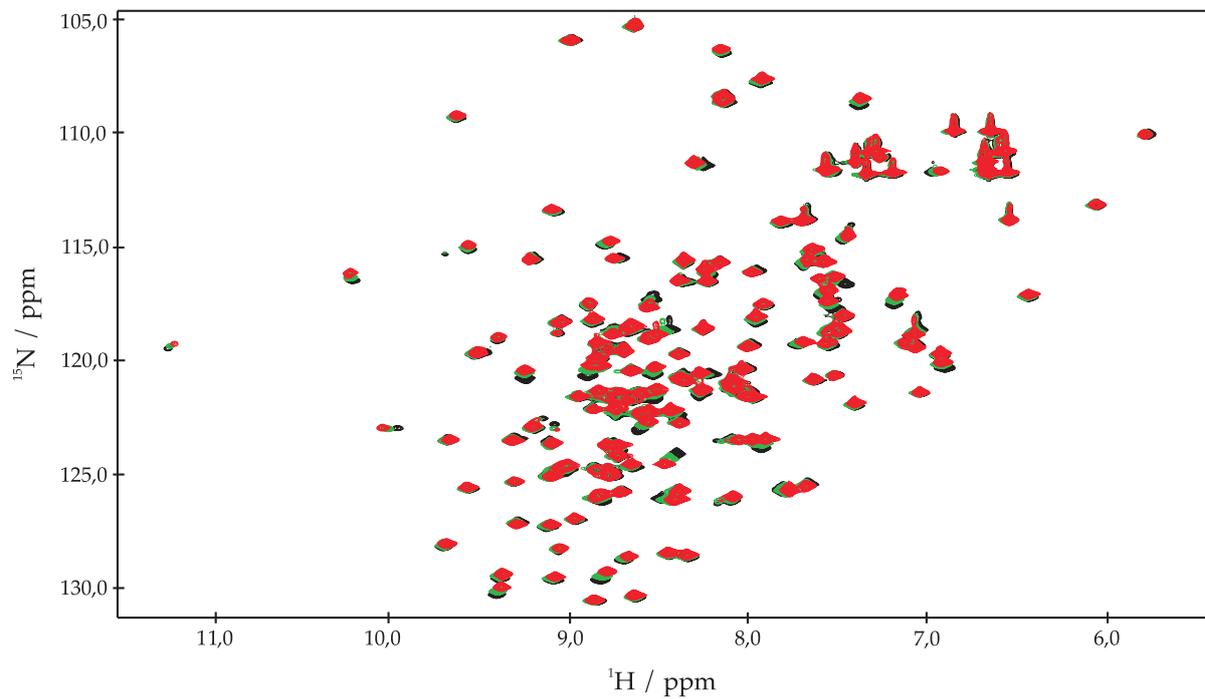


Abb. A.11.: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von *TtSlyD* mit ansteigender DMSO-Konzentration. Die Farbskala verläuft von schwarz (0% v/v DMSO) über grün (4% v/v DMSO) zu rot (10% v/v DMSO). Auf die Beschriftung der Kreuzsignale wurde der Übersicht halber verzichtet. Die Messung dieser drei Spektren erfolgte bei $T = 298 \text{ K}$ und an $B_0 = 14.1 \text{ T}$.

A.14. Temperaturabhängige Relaxationsparameter von *EcSlyD**

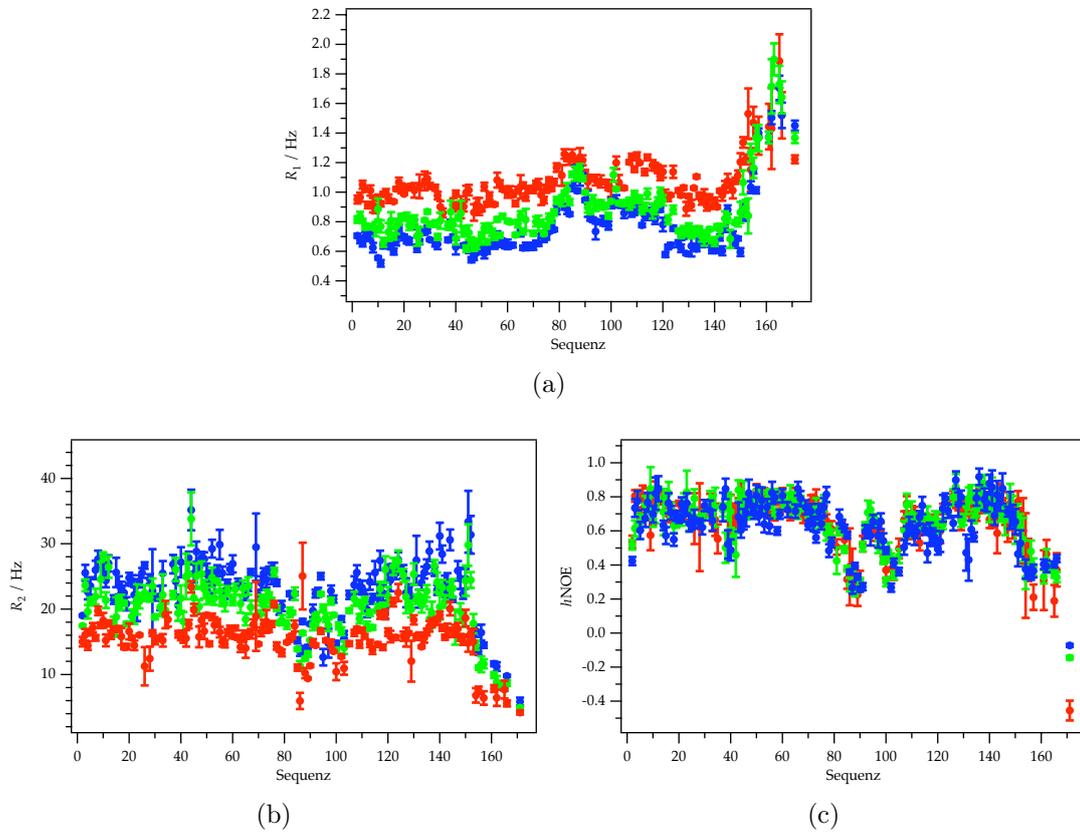


Abb. A.12.: Relaxationsdaten für *EcSlyD** bei $T = 288$ K (in blau), $T = 293$ K (in grün) und $T = 303$ K (in rot). Dargestellt sind die longitudinale Relaxationsrate R_1 (a), die transversale Relaxationsrate R_2 (b) und der h NOE-Wert (c). Alle Daten sind an $B_0 = 14.1$ T aufgenommen worden.

A.15. Temperaturabhängige Relaxationsparameter von *TtSlyD*

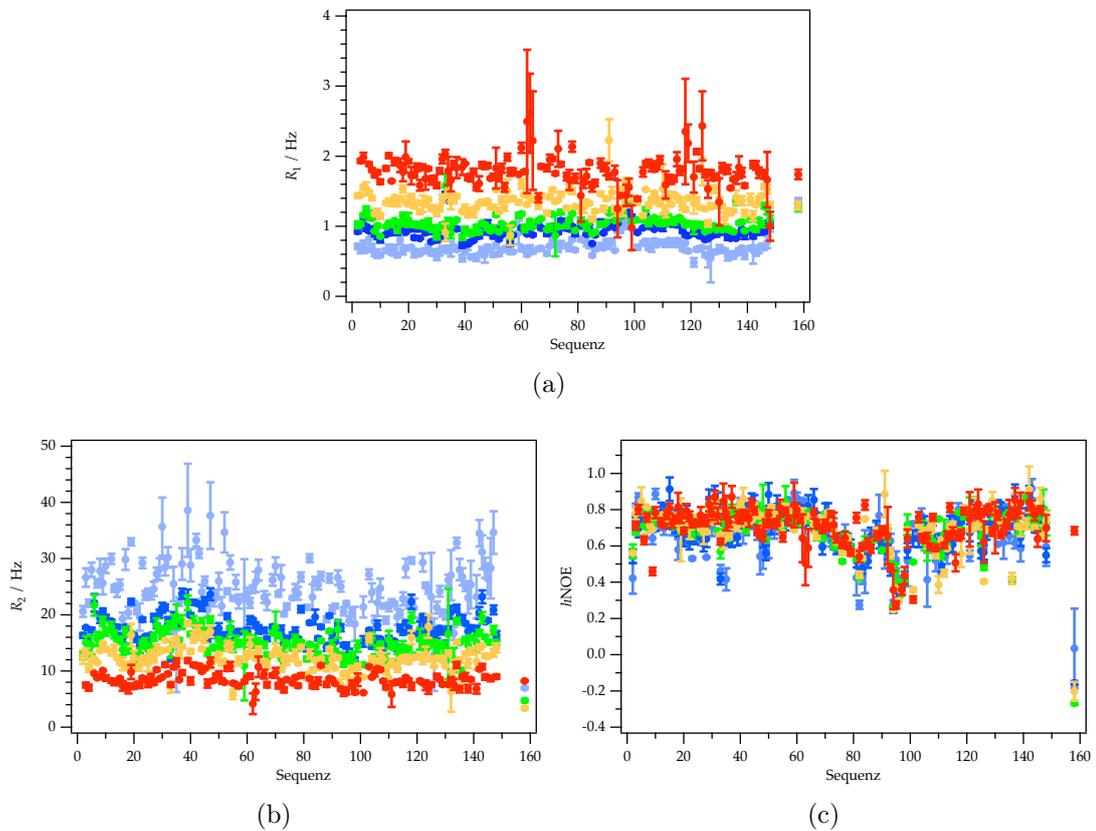


Abb. A.13.: Relaxationsdaten für *TtSlyD* bei $T = 288$ K (in hellblau), $T = 298$ K (in blau), $T = 303$ K (in grün), $T = 313$ K (in orange) und $T = 333$ K (in rot). Dargestellt sind die longitudinale Relaxationsrate R_1 (a), die transversale Relaxationsrate R_2 (b) und der h NOE-Wert (c). Alle Daten sind an $B_0 = 14.1$ T aufgenommen worden.

A.16. Lipari & Szabo-Analyse für *TtSlyD*

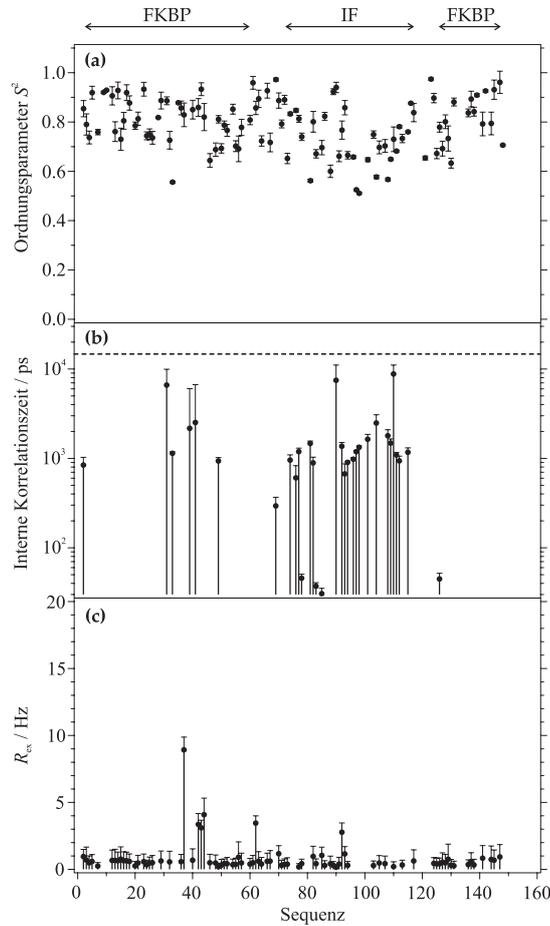


Abb. A.14.: Ordnungsparameter S^2 (a), interne Korrelationszeit τ_e (b) und chemischer Austauschterm R_{ex} (c) für *TtSlyD* bei $T = 298$ K und an $B_0 = 14.1$ T. Die gestrichelte Linie in (b) gibt die Rotationskorrelationszeit der Molekülbewegung von *TtSlyD* mit $\tau_c = 14.8$ ns wieder. Die Sequenzbereiche der FKBP-Domäne (K2-E60, D125-H147) sowie der IF-Domäne (Q72-F117) sind oberhalb des Graphen bezeichnet.

A.17. Detektierbare Aminosäuren der transversalen Relaxationsdispersion von *EcSlyD** und *TtSlyD*

A.17.1. *EcSlyD**

Aminosäure			
A12	L75	Q91	V107
Y13	V76	V92	E108
D24	R78	G93	A111
E25	D82	F96	H116
V28	V83	A98	V117
G37	F84	E99	D120
H38	V87	Q102	G121
E46	E89	V105	V134

Tab. A.8.: Aminosäuren von *EcSlyD**, die eine $R_{2,\text{eff}} = f(\nu_{\text{CPMG}})$ -Abhängigkeit des ^{15}N -Kernes zeigen. Die FKBP-Domäne von *EcSlyD** umfasst K2-V62 sowie Q128-G150, die IF-Domäne L75-D120.

A.17.2. *TtSlyD*

Aminosäure		
D23	V74	Q94
L27	L76	D95
S28	S77	M101
R34	F79	L103
L36	V86	T104
I37	F91	V106
E69	Y92	E137
Q72	A93	

Tab. A.9.: Aminosäuren von *TtSlyD*, die eine $R_{2,\text{eff}} = f(\nu_{\text{CPMG}})$ -Abhängigkeit des ^{15}N -Kernes zeigen. Die FKBP-Domäne von *TtSlyD* umfasst K2-E60 sowie D125-H147, die IF-Domäne Q72-F117.

A.18. Transversale Relaxationsdispersion von *TtSlyD*

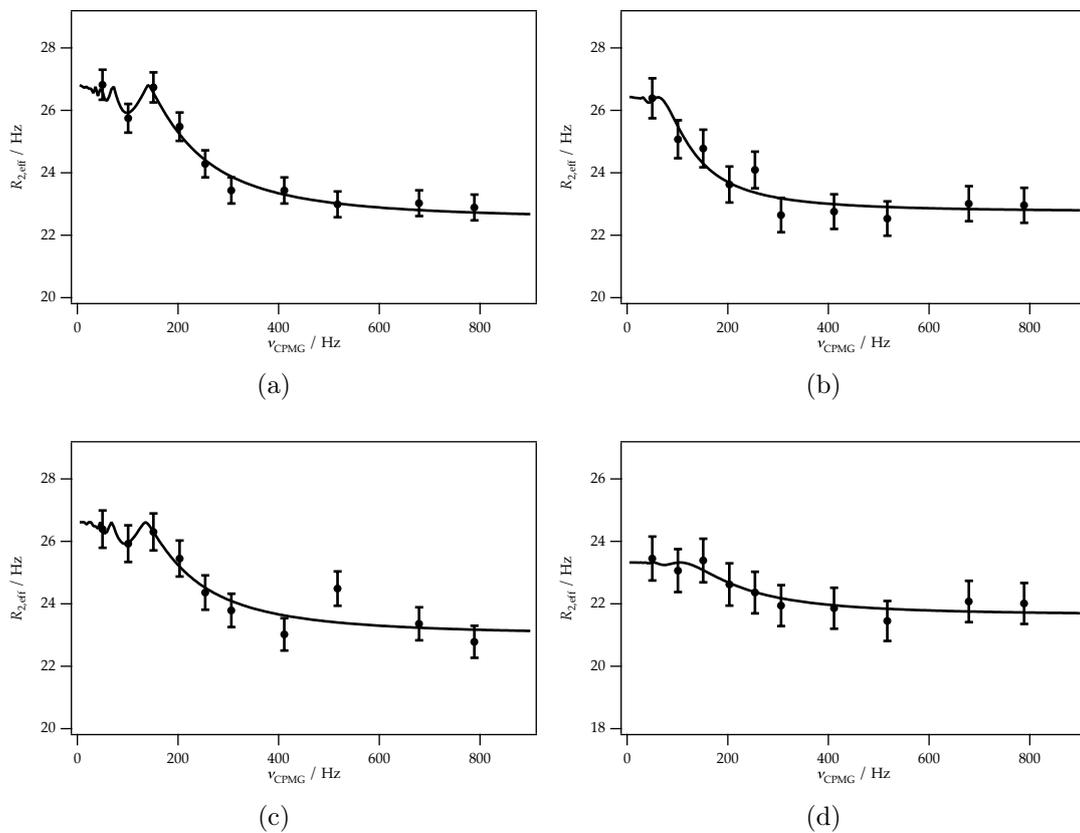


Abb. A.15.: Relaxationsdispersion ausgewählter ^{15}N -Kerne von *TtSlyD* bei $T = 298\text{ K}$ und an $B_0 = 14.1\text{ T}$. Gezeigt sind die Verläufe von V74 (a), F91 (b), A93 (c) sowie M101 (d). Die Regression der Gl. (2.1.22) an die Messdaten ist aufgrund der geringen Dispersionsamplitude stark fehlerbehaftet. Die Standardabweichungen für p_A , k_{ex} und $\Delta\omega$ sind größer als die Regressionsparameter. Als grobe Abschätzung des Konformationsaustausches kann $k_{\text{ex}} \simeq 10^1\text{ Hz}$, $p_A \simeq 95\%$ und $\Delta\omega \simeq 10^3\text{ Hz}$ angegeben werden.

A.19. Transversale Relaxationsdispersion von *EcSlyD**Y68W

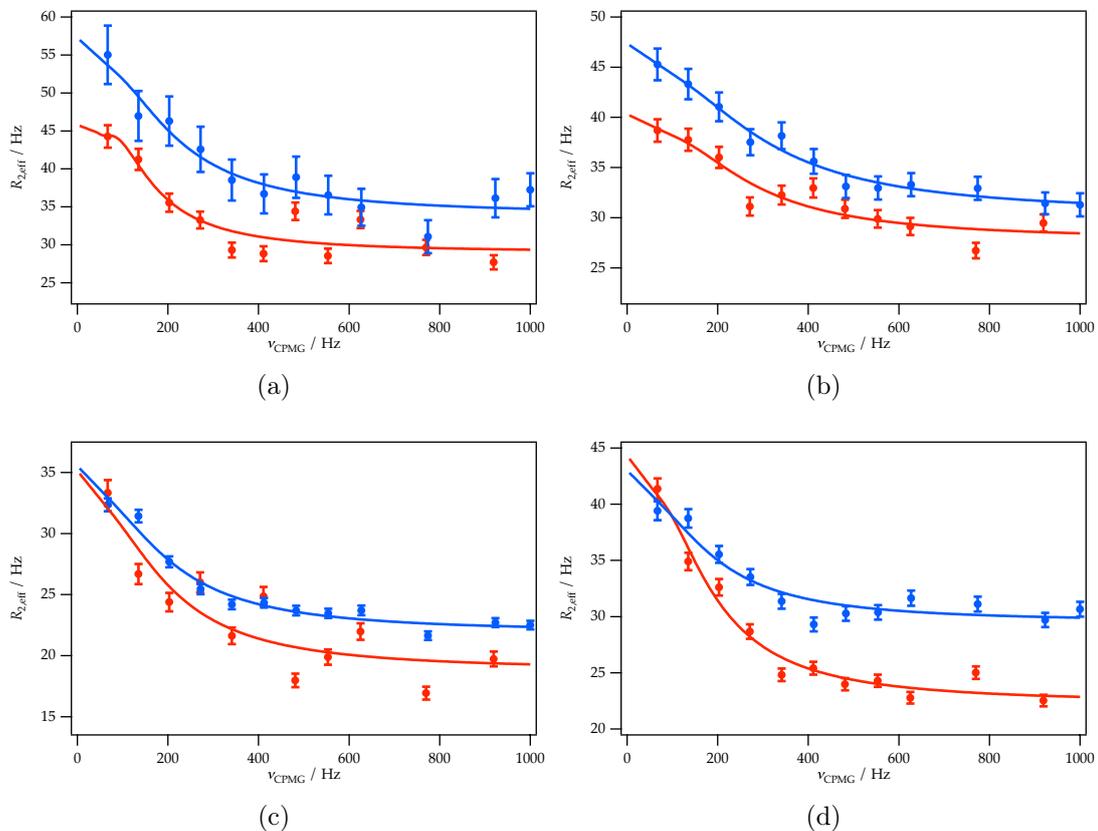
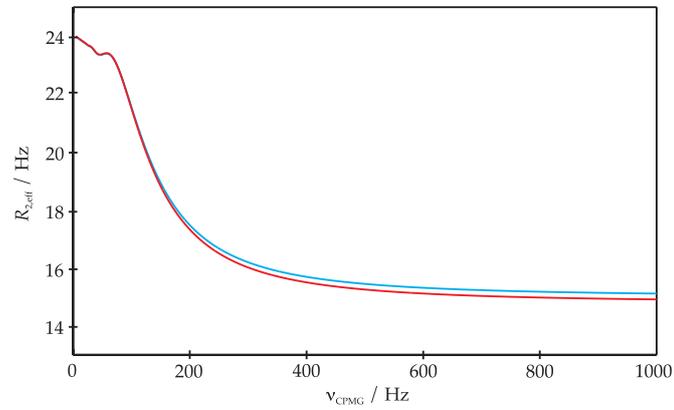


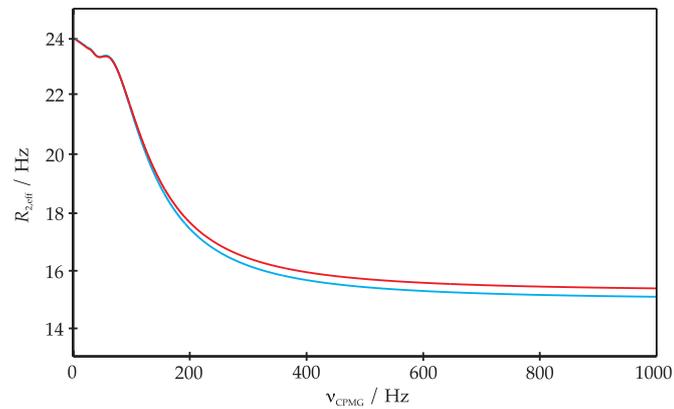
Abb. A.16.: Relaxationsdispersion ausgewählter ^{15}N -Kerne von *EcSlyD**Y68W bei $T = 298 \text{ K}$ und an $B_0 = 14.1 \text{ T}$ (in rot) bzw. $B_0 = 18.8 \text{ T}$ (in blau). Gezeigt sind die Verläufe von V79 (a), V87 (b), E89 (c) sowie L90 (d). Eine globale Regression der Gl. (2.1.22) an die aufgenommenen Relaxationsdaten an beiden Magnetfeldern ergibt folgende Ergebnisse:

- (a): $k_{\text{ex}} = (1050 \pm 600) \text{ Hz}$, $p_A = (93.5 \pm 9.8) \%$, $\Delta\omega = (600 \pm 400) \text{ Hz}$,
- (b): $k_{\text{ex}} = (950 \pm 350) \text{ Hz}$, $p_A = (97.8 \pm 2.4) \%$, $\Delta\omega = (1200 \pm 150) \text{ Hz}$,
- (c): $k_{\text{ex}} = (250 \pm 420) \text{ Hz}$, $p_A = (94.9 \pm 5.3) \%$, $\Delta\omega = (1150 \pm 500) \text{ Hz}$,
- (d): $k_{\text{ex}} = (150 \pm 100) \text{ Hz}$, $p_A = (91.6 \pm 8.2) \%$, $\Delta\omega = (900 \pm 500) \text{ Hz}$.

A.20. Berechneter Verlauf der transversalen Relaxationsdispersion



(a)



(b)

Abb. A.17.: Simulierte Verläufe der transversalen Relaxationsdispersion für den Fall $R_{2N} \neq R_{2U}$.

(a) $R_{2N} = 15$ Hz (in blau), $R_{2U} = 5$ Hz (in rot). Beide Verläufe sind mit $p_A = 98\%$, $p_B = 2\%$, $k_{\text{ex}} = 500$ Hz und $\Delta\omega = 1500$ Hz berechnet worden.

(b) $R_{2N} = 15$ Hz (in blau), $R_{2U} = 30$ Hz (in rot). Beide Verläufe sind mit $p_A = 98\%$, $p_B = 2\%$, $k_{\text{ex}} = 500$ Hz und $\Delta\omega = 1500$ Hz berechnet worden.

A.21. Globale Regressionsanalyse von *BsCspB*

A.21.1. Optimale Magnetfeldkombination jeder Aminosäure von *BsCspB*

AS	II	III	IV	AS	II	III	IV
E3	6,7	5,6,7	5,6,7,9	E42	5,6	7,8,9	6,7,8,9
K5	5,8	5,6,8	5,6,7,8	E43	5,8	5,6,8	5,6,7,8
V6	5,9	5,6,9	6,7,8,9	G44	5,6	5,6,7	5,6,7,9
W8	5,7	5,6,9	5,6,7,9	V47	6,9	6,7,9	5,6,7,9
F9	6,9	5,6,9	5,6,8,9	S48	5,9	5,6,9	5,6,7,9
N10	5,6	5,6,7	5,6,7,9	F49	7,9	6,7,9	5,6,7,9
K13	6,9	6,7,9	5,6,7,9	E50	5,9	5,6,9	5,6,7,9
F15	5,6	5,6,7	5,6,7,9	I51	5,9	5,6,9	5,6,7,9
F17	5,8	5,6,8	5,6,7,8	V52	7,8	7,8,9	5,6,7,9
G22	5,9	5,6,9	5,6,7,9	E53	7,9	6,7,9	5,6,7,9
Q23	5,6	5,6,9	5,6,7,9	G54	5,6	5,6,9	5,6,7,9
D25	5,9	5,6,9	5,7,8,9	N55	5,7	5,6,7	5,6,7,9
V26	7,9	6,7,9	5,6,7,9	R56	7,9	5,7,9	5,7,8,9
H29	5,6	5,6,9	5,6,7,9	N62	5,9	7,8,9	5,6,7,9
F30	5,9	5,6,9	5,6,7,9	V63	6,7	6,7,9	5,6,7,9
A32	5,9	5,6,9	5,6,7,9	T64	5,7	5,6,7	5,6,7,9
I33	6,9	6,7,9	6,7,8,9				
F38	7,9	7,8,9	6,7,8,9				
T40	5,8	5,6,8	5,6,7,8				
L41	6,9	6,7,9	5,6,7,9				

Tab. A.10.: Optimale Magnetfeldkombination für die Aminosäuren von *BsCspB*. Es sind diejenigen Aminosäuren in die Tabelle aufgenommen worden, die der Bedingung $err_ges \leq 1$ genügen (s. Gl. (3.3.2)). II: zwei genutzte Magnetfelder, III: drei genutzte Magnetfelder bzw. IV: vier genutzte Magnetfelder.

A.21.2. Mit Gl. (3.3.2) berechnete Größe des Gesamtfehlers

AS	err_II	err_III	err_IV	err_V	AS	err_II	err_III	err_IV	err_V
E3	0.23	0.24	0.28	1.16	F38	0.58	0.49	0.65	1.77
K5	0.51	0.45	0.48	1.33	T40	0.42	0.42	0.58	1.49
V6	0.22	0.31	0.75	1.95	L41	0.26	0.23	0.35	1.60
W8	0.58	0.53	0.59	0.64	E42	0.19	0.25	0.50	0.90
F9	0.25	0.20	0.25	0.35	E43	0.50	0.46	0.66	1.07
N10	0.52	0.69	0.98	1.97	G44	0.22	0.44	0.71	2.01
K13	0.18	0.23	0.35	2.39	V47	0.22	0.27	0.50	1.32
F15	0.21	0.23	0.28	0.47	S48	0.15	0.14	0.16	0.56
F17	0.42	0.42	0.58	1.49	F49	0.19	0.21	0.32	0.98
G22	0.23	0.25	0.36	1.97	E50	0.15	0.18	0.24	0.46
Q23	0.08	0.13	0.18	0.86	I51	0.23	0.30	0.37	0.87
D25	0.11	0.16	0.28	0.53	V52	0.12	0.12	0.28	0.34
V26	0.17	0.30	0.64	2.23	E53	0.14	0.19	0.32	1.11
H29	0.54	0.67	0.66	2.09	G54	0.13	0.16	0.30	1.15
F30	0.33	0.32	0.44	0.85	N55	0.21	0.18	0.35	1.45
A32	0.20	0.23	0.29	2.23	R56	0.40	0.43	0.59	1.07
I33	0.21	0.20	0.26	0.78	N62	0.32	0.25	0.38	0.39
					V63	0.16	0.18	0.36	1.20
					T64	0.30	0.39	0.44	1.02

Tab. A.11.: Gesamtfehler err_ges (mit $err_$ abgekürzt) der globalen Regression des Kälteschockproteins an zwei (II), drei (III), vier (IV) oder fünf (V) verschiedenen Magnetfeldern. Es sind diejenigen Aminosäuren aufgeführt, die der Bedingung $err_ges \leq 1$ genügen (s. Gl. (3.3.2)).

A.21.3. NMR-Harnstofftitration

A.21.3.1. Graphische Extrapolation

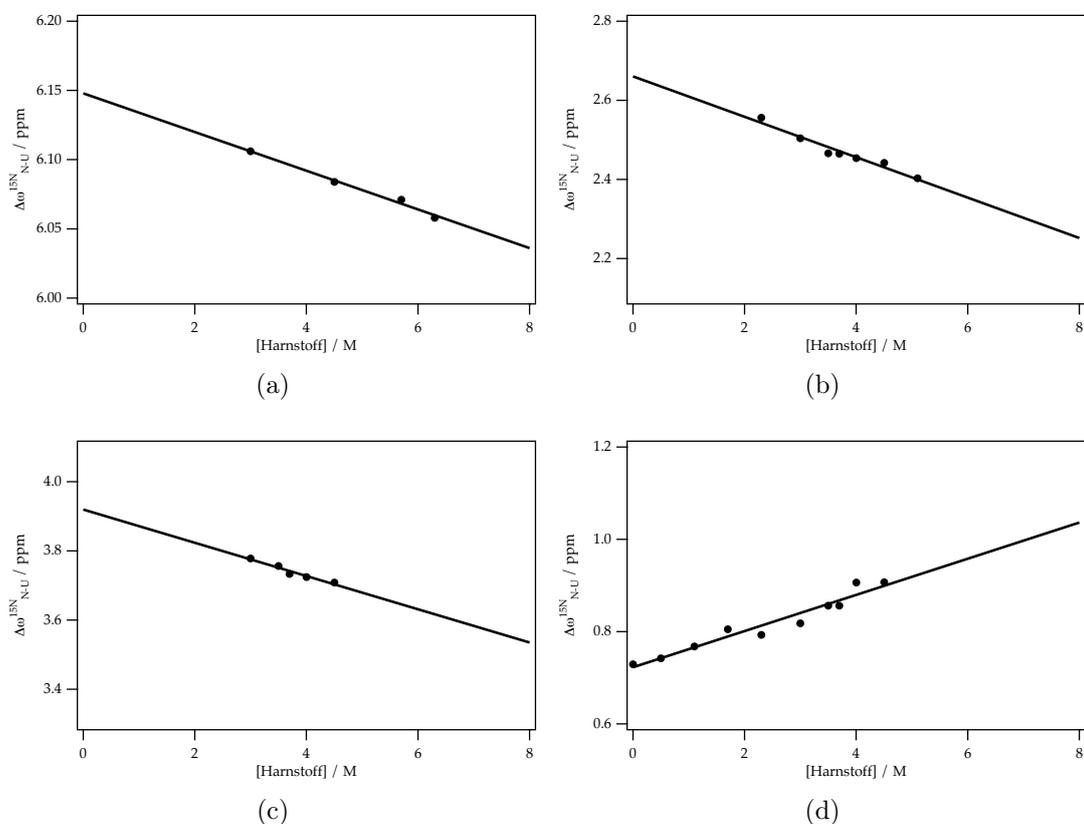


Abb. A.18.: Extrapolation des Unterschiedes der chemischen Verschiebung zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand von *BsCspB* auf die Harnstoffkonzentration $c = 0$ M für vier Aminosäuren. Die Extrapolation ergibt für N10 (a): $\Delta\omega = (1960 \pm 135)$ Hz, für V26 (b): $\Delta\omega = (845 \pm 75)$ Hz, für G44 (c): $\Delta\omega = (1250 \pm 150)$ Hz und für N55 (d): $\Delta\omega = (230 \pm 55)$ Hz. Alle Angaben beziehen sich auf die Messung an $B_0 = 11.8$ T und $T = 298$ K. Die Rohdaten sind von U. Weininger zur Verfügung gestellt worden [204].

A.21.3.2. Aminosäurespezifische Ergebnisse der Extrapolation

AS	$\Delta\omega$ / Hz	$\Delta(\Delta\omega)$ / Hz	AS	$\Delta\omega$ / Hz	$\Delta(\Delta\omega)$ / Hz
L2	-1750	65	I33	290	-20
E3	-1430	140	Q34	925	-75
K5	-105	50	G35	-190	-5
K7	3205	190	E36	2115	105
W8	-3570	300	G37	15	10
F9	-375	30	F38	400	25
N10	1960	135	K39	975	140
S11	1625	285	L41	-1420	355
E12	-370	-15	E42	-1540	120
G14	-195	230	G44	1250	-150
F15	-2445	-155	A46	1100	-55
G16	-1410	230	V47	-1595	320
F17	-1390	170	S48	-705	125
I18	-60	25	F49	-1510	395
E19	365	-20	E50	520	75
V20	2270	-180	V52	-400	20
E21	530	50	E53	-730	285
G22	855	70	G54	1125	-355
Q23	-805	10	N55	230	25
D24	-170	25	R56	-1715	75
V26	845	-75	G57	-335	15
V28	960	-150	Q59	-130	5
H29	1695	-165	A60	-160	15
A32	-605	70	A61	-675	40

Tab. A.12.: Ergebnisse der Extrapolation des Unterschiedes der ^{15}N -chemischen Verschiebung zwischen dem nativen und dem entfalteten Zustand von *BsCspB* auf die Harnstoffkonzentration $c = 0\text{ M}$. Alle Angaben beziehen sich auf die Messung an $B_0 = 11.8\text{ T}$ und bei $T = 298\text{ K}$. Die Rohdaten sind von U. Weininger zur Verfügung gestellt worden [204]. Das Vorzeichen von $\Delta\omega$ kann mit der in Abschnitt 2.1.1.2.2 beschriebenen Pulssequenz nicht bestimmt werden. Auch die in Abschnitt 3.3.1 beschriebene Auswerteprozedur für das Studium der schnellen Faltung von *BsCspB* im Gleichgewicht ist nicht auf das Vorzeichen von $\Delta\omega$ sensitiv.

A.21.4. Feldkombination und Gesamtfehler für festes $\Delta\omega$

AS	Feldkombination	err_ges	AS	Feldkombination	err_ges
L2	5,9	0.49	I33	6,7	0.08
E3	6,7	0.20	Q34	6,7	0.35
K5	7,8	0.13	G35	5,6	0.43
K7	5,6	0.43	F38	7,8	0.15
W8	5,7	0.37	K39	5,6	0.38
F9	5,6	0.09	L41	5,8	0.39
N10	5,6	0.37	E42	6,9	0.42
S11	5,6	0.89	G44	5,6	0.17
E12	7,9	0.46	A46	5,6	0.27
F15	5,7	0.24	V47	6,9	0.21
G16	5,6	0.31	S48	5,6	0.10
F17	5,8	0.38	F49	6,9	0.17
I18	5,7	0.52	E50	5,9	0.15
E19	5,6	0.26	V52	5,6	0.13
V20	5,6	0.44	E53	7,9	0.13
E21	5,6	0.15	G54	5,9	0.12
G22	5,9	0.18	N55	6,7	0.06
Q23	5,6	0.12	R56	5,9	0.45
D24	6,9	0.32	G57	5,7	1.20
V26	7,9	0.13	Q59	7,9	0.32
V28	6,7	0.28	A60	5,6	0.52
H29	5,6	0.42			
A32	5,9	0.14			

Tab. A.13.: Feldkombination und Gesamtfehler für zwei unterschiedliche Magnetfelder und festen $\Delta\omega$ -Wert (aus extrapolierte Harnstoffabhängigkeit gewonnen, s. Tab. A.12). Es sind diejenigen Aminosäuren aufgeführt, die der Bedingung $\text{err_ges} \leq 1$ genügen (s. Gl. (3.3.2)).

B. Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

BsCspB: Cold shock protein B from Bacillus subtilis

cmc: critical micelle concentration

CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill

DHPC: 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

*EcSlyD**: Sequenzbereich (1-165) von SlyD aus *Escherichia coli*

*EcSlyD*ΔIF*: isolierte FKBP-Domäne von *EcSlyD**, mit kürzerer *flap*-Sequenz von *hFKBP12* verknüpft

FKBP: FK506 bindung protein

FRET: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

GARP: Globally optimized Alternating-phase Rectangular Pulse

H/D: Proton→Deuteron-Austausch

HSQC: Hetero Single Quantum Coherence

IF: Inserted-in-Flap

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY

PPIase: Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase

RCM-T1: Reduzierte und CarboxyMethylierte Form der Rnase T1

pdb: protein data bank

RDC: Residual Dipolar Coupling

rmsd: root mean square deviation

SlpA: SlyD like protein A

SlyD: Sensitive to lysis D

Tat: *T*win *a*rginine *t*ranslocation

TOCSY: *T*O*t*a*l* *C*o*r*r*e*l*a*t*i*o*n* *S*p*e*c*t*r*o*s*c*o*p*y**

TPPI: *T*i*m*e-*P*r*o*p*o*r*t*io*n**a*l-*P*h*as*e-*I*n*creme*n*t*a*t*io*n*******

TROSY: *T*r*an*s*v*e* *R*el*ax*at*io*n* *O*p*timiz*e*d *S*p*e*c*tr*o*s*copy*******

*Tt*SlyD: SlyD aus *Thermus thermophilus*

*Tt*SlyD Δ IF: isolierte FKBP-Domäne von *Tt*SlyD, mit kürzerer *flap*-Sequenz von *h*FKBP12 verknüpft

WATERGATE: *W*A*T*E*R* *s*u*p*p*r*es*s*io*n* *b*y *G*r*ad*ie*n*t-*T*ailo*r*e*d* *E*xcitat*io*n****

Abbildungsverzeichnis

2.1. Struktur & Dynamik im Kontext der Proteinfunktion	4
2.2. Definition der NMR-Zeitskala	5
2.3. Konformationsraum der Proteindynamik	6
2.4. Stärke der ^1J - bzw. ^2J -Kopplung in Proteinen	6
2.5. Pulssequenz zur Messung der longitudinalen Relaxationsrate	7
2.6. Pulssequenz zur Messung der transversalen Relaxationsrate	8
2.7. Pulssequenz zur Messung des heteronuklearen NOEs	8
2.8. $h\text{NOE} = f(\tau_c)$	10
2.9. $T_1 = f(\tau_c)$, $T_2 = f(\tau_c)$	11
2.10. Änderung der Linienform in Folge chemischen Austausches	13
2.11. Pulssequenz zur Messung der transversalen Relaxationsdispersion	15
2.12. Anzahl an Strukturen in der Proteindatenbank	18
2.13. Anzahl an NMR-Strukturen in der Proteindatenbank	18
2.14. Pulssequenz des NOESY-Experimentes	20
2.15. $\text{NOE} = f(t_m)$, I	22
2.16. $\text{NOE} = f(t_m)$, II	22
2.17. Bindungswinkel ϕ und ψ des Proteinrückgrates	23
2.18. Definition der dipolaren Restkopplung	24
2.19. Pulssequenz zur Messung der Translationsdiffusion	25
2.20. Schema der Translationsdiffusion, I	26
2.21. Schema der Translationsdiffusion, II	26
2.22. Gradientenkalibrierung	27
2.23. Titrationskurven in Abhängigkeit von der Affinität	30
2.24. $G(t) = f(S^2)$, mit festem τ_e bzw. τ_c	35
2.25. Ablauf einer NMR-Strukturrechnung	36
2.26. Strukturrechnung in ARIA2	37
2.27. Evaluation der Strukturrechnung	38
2.28. NMR-Struktur von <i>BsCspB</i>	39
2.29. NMR-Struktur von <i>EcSlyD*</i>	41
2.30. Isomerisierung einer Xaa-Pro Peptidbindung	41
2.31. NMR-Struktur von $\text{A}\beta$ (1-42) in HFIP	43
2.32. Modell zur Aggregation bzw. Fibrillierung von $\text{A}\beta$	44
2.33. Chemische Struktur von DHPC	45
2.34. Dreidimensionale Struktur von FK506	46
2.35. Dreidimensionale Struktur von Rapamycin	47
3.1. Projektionen des HNCA-Experimentes	49
3.2. Projektionen des HNCACB- bzw. HN(CO)CACB-Experimentes	50

3.3.	Zuordnung des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums von <i>EcSlpA</i>	51
3.4.	Strukturvergleich zwischen <i>EcSlpA</i> , FKBP12 und <i>EcSlyD*</i>	51
3.5.	Strukturensemble von <i>EcSlpA</i>	53
3.6.	Strukturensemble der isolierten Domänen von <i>EcSlpA</i>	54
3.7.	Stabilität gegenüber dem Lösungsmittel von <i>EcSlpA</i>	55
3.8.	Temperaturabhängige Protonenspektren von <i>EcSlpA</i>	56
3.9.	NMR-detektierter Temperaturübergang von <i>EcSlpA</i>	57
3.10.	NMR-Titration des Tetrapeptides zu <i>EcSlpA</i> , I	59
3.11.	NMR-Titration des Tetrapeptides zu <i>EcSlpA</i> , II	60
3.12.	NMR-Titration von RCM-T1 zu <i>EcSlpA</i> , I	61
3.13.	NMR-Titration von RCM-T1 zu <i>EcSlpA</i> , II	62
3.14.	Verlauf des <i>hNOE</i> von <i>EcSlpA</i>	63
3.15.	Fluoreszenztitration Tat-Peptid (1-27) zu <i>EcSlyD*</i> bzw. <i>EcSlyD*ΔIF</i>	65
3.16.	NMR-Titration Tat-Peptid (1-17) zu <i>EcSlyD*</i> , <i>TtSlyD</i> , I	66
3.17.	NMR-Titration Tat-Peptid (1-17) zu <i>EcSlyD*</i> , <i>TtSlyD</i> , II	66
3.18.	NMR-Titration Tat-Peptid (1-17) zu <i>EcSlyD*</i> , <i>TtSlyD</i> , III	67
3.19.	NMR-Titration Tat-Peptid (1-27) zu <i>TtSlyDΔIF</i>	68
3.20.	Fluoreszenztitration Rapamycin zu <i>TtSlyD</i> , <i>TtSlyD</i> +Tat-Peptid (1-27)	70
3.21.	Fluoreszenztitration Rapamycin zu <i>TtSlyD</i> , <i>TtSlyDΔIF</i> , I	70
3.22.	Fluoreszenztitration Rapamycin zu <i>TtSlyD</i> , <i>TtSlyDΔIF</i> , II	71
3.23.	NMR-Titration Rapamycin zu <i>TtSlyD</i>	72
3.24.	Strukturelle Wiedergabe NMR-Titration Rapamycin, FK506 zu <i>TtSlyD</i>	73
3.25.	Translationsdiffusion von <i>EcSlyD*</i> , <i>TtSlyD</i>	74
3.26.	R_1 , R_2 und <i>hNOE</i> für <i>EcSlyD*</i> bei $T = 298$ K	76
3.27.	Strukturelle Wiedergabe des <i>hNOEs</i> für <i>EcSlyD*</i> bei $T = 298$ K	77
3.28.	S^2 , τ_e und R_{ex} für <i>EcSlyD*</i> bei $T = 298$ K	79
3.29.	<i>hNOE</i> -Vergleich frei bzw. Tat-Peptid (1-17)-gebundenes <i>SlyD</i>	81
3.30.	Änderung <i>hNOE</i> von <i>EcSlyD*</i> durch Bindung von Tat-Peptid (1-17)	82
3.31.	Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kerns von <i>EcSlyD*</i>	84
3.32.	Seitenkettenorientierung von Y68 innerhalb von <i>EcSlyD*</i>	85
3.33.	Vgl. Relaxationsdispersion zwischen <i>EcSlyD*</i> und <i>EcSlyD*Y68W</i>	86
3.34.	Vgl. Relaxationsdispersion zwischen <i>TtSlyD</i> und <i>TtSlyD</i> +Rapamycin	87
3.35.	Modell für den Funktionsmechanismus von <i>SlyD</i>	90
3.36.	Definition der Parameter der Relaxationsdispersionsanalyse	93
3.37.	Zugeordnetes ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von <i>BsCspB</i>	94
3.38.	$R_{2,eff} = f(\nu_{CPMG})$ für Q23, S48 und E50 von <i>BsCspB</i>	96
3.39.	Global angepasste Werte von p_A , k_{ex} und $\Delta\omega$ für <i>BsCspB</i> , I	97
3.40.	Korrelationsanalyse für $\Delta\omega$ von <i>BsCspB</i>	98
3.41.	Global angepasste Werte von p_A und k_{ex} für <i>BsCspB</i> , II	99
3.42.	Diskussion des Faltungsmodells von <i>BsCspB</i>	100
3.43.	^1H - bzw. ^{31}P -Spektrum von DHPC	102
3.44.	Abhängigkeit des DHPC-Diffusionskoeffizienten von c^{DHPC}	103
3.45.	Amidprotonenspektren von $A\beta$ in Abhängigkeit von c^{DHPC}	104
3.46.	Diffusionskoeffizient von $A\beta$ in Abhängigkeit von c^{DHPC}	105
3.47.	Amidprotonenspektren von $A\beta$ in Abhängigkeit von t und c^{DHPC}	106

A.1.	^1H - ^{15}N -IPAP-HSQC-Spektren von <i>EcSlpA</i>	132
A.2.	^1H - ^{13}C - <i>ct</i> HSQC-Spektrum der Aliphaten von <i>EcSlpA</i>	143
A.3.	^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum der Aromaten von <i>EcSlpA</i>	144
A.4.	Analyse der RDC-Werte von <i>EcSlpA</i>	150
A.5.	NMR-Titration des Tetrapeptides zu <i>EcSlpA</i>	151
A.6.	NMR-Titration von RCM-T1 zu <i>EcSlpA</i> , I (Spektren)	152
A.7.	NMR-Titration von RCM-T1 zu <i>EcSlpA</i> , II (Intensitätsänderung)	153
A.8.	NMR-Titration von RCM-T1 zu <i>EcSlpA</i> , III (Bindung)	154
A.9.	NMR-Titration von RCM-T1 zu <i>EcSlpA</i> , IV (Nichtbindung)	155
A.10.	NMR-Titration von RCM-T1 zu <i>EcSlpA</i> , V (Linienform)	156
A.11.	NMR-Titration von DMSO zu <i>TtSlyD</i>	157
A.12.	R_1 , R_2 , $h\text{NOE}$ für <i>EcSlyD*</i> bei $T = (288 \dots 303)$ K	158
A.13.	R_1 , R_2 , $h\text{NOE}$ für <i>TtSlyD</i> bei $T = (288 \dots 333)$ K	159
A.14.	S^2 , τ_e , R_{ex} für <i>TtSlyD</i> bei $T = 298$ K	160
A.15.	Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kernes von <i>TtSlyD</i>	162
A.16.	Relaxationsdispersion des ^{15}N -Kernes von <i>EcSlyD*Y68W</i>	163
A.17.	Berechneter Verlauf der Relaxationsdispersion mit $R_{2\text{N}} \neq R_{2\text{U}}$	164
A.18.	Extrapolation des $\Delta\omega$ -Wertes von <i>BsCspB</i>	167

Tabellenverzeichnis

2.1. Extinktionskoeffizient aller verwendeten Proben	33
3.1. Statistik der Strukturrechnung von <i>EcSlpA</i>	52
3.2. Thermodynamische Parameter verschiedener <i>EcSlpA</i> -Varianten	58
3.3. Affinität von FK506 und Rapamycin zu <i>TtSlyD</i> , <i>TtSlyD</i> Δ IF	69
3.4. Diffusionskoeffizienten verschiedener <i>SlyD</i> -Varianten	74
3.5. Temperaturabhängige Mittelwerte von R_1 , R_2 , h NOE für <i>EcSlyD</i> *	77
3.6. Temperaturabhängige Mittelwerte von R_1 , R_2 , h NOE für <i>TtSlyD</i>	78
3.7. Lipari & Szabo-Analyse für <i>EcSlyD</i> *	78
3.8. Lipari & Szabo-Analyse für <i>TtSlyD</i>	78
3.9. Modellverteilung der Lipari & Szabo-Analyse für <i>EcSlyD</i> *	80
3.10. Modellverteilung der Lipari & Szabo-Analyse für <i>TtSlyD</i>	80
3.11. Vgl. der PPIase-Aktivität zwischen <i>EcSlyD</i> * und <i>EcSlyD</i> *Y68W	86
3.12. Magnetfeldkombination für globale Regressionsanalyse	95
3.13. Ergebnisse der globalen Regressionsanalyse von <i>BsCspB</i>	96
A.1. Aminosäurespezifische chemische Verschiebungen	130
A.2. NMR-Resonanzen der einzelnen Aminosäuren	131
A.3. Komplettzuordnung <i>EcSlpA</i> (S2-K33)	145
A.4. Komplettzuordnung <i>EcSlpA</i> (K33-F63)	146
A.5. Komplettzuordnung <i>EcSlpA</i> (F63-P93)	147
A.6. Komplettzuordnung <i>EcSlpA</i> (P93-D124)	148
A.7. Komplettzuordnung <i>EcSlpA</i> (D124-E148)	149
A.8. AS von <i>EcSlyD</i> *, die $R_{2,\text{eff}} = f(\nu_{\text{CPMG}})$ -Abhängigkeit zeigen	161
A.9. AS von <i>TtSlyD</i> , die $R_{2,\text{eff}} = f(\nu_{\text{CPMG}})$ -Abhängigkeit zeigen	161
A.10. Aminosäurespezifisch gewählte Magnetfeldkombination von <i>BsCspB</i>	165
A.11. Gesamtfehler der globalen Regressionsanalyse von <i>BsCspB</i>	166
A.12. Extrapolation des $\Delta\omega$ -Wertes von <i>BsCspB</i>	168
A.13. Magnetfeldkombination und Gesamtfehler für festen $\Delta\omega$ -Wert	169

C. Eigene Publikationen

- [1] D. Reichert, M. Kovermann, N. Hunter, D. Hughes, O. Pascui, P. Belton. Slow dynamics in glassy methyl- α -L-rhamnopyranoside studied by 1D NMR exchange experiments. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10:542-549, 2008.
- [2] U. Weininger, C. Haupt, K. Schweimer, W. Graubner, M. Kovermann, T. Brüser, C. Scholz, P. Schaarschmidt, G. Zoldak, F. X. Schmid, J. Balbach. NMR solution structure of SlyD from *Escherichia coli*: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function. *J. Mol. Biol.*, 387:295-305, 2009.
- [3] P. Pornsuriyasak, C. Vetter, S. Kaeothip, M. Kovermann, J. Balbach, D. Steinborn, A. V. Demchenko. Coordination chemistry approach to the long-standing challenge of stereocontrolled chemical glycosylation. *Chem. Commun.*, 14:6379-6381, 2009.
- [4] U. Weininger, R. P. Jakob, M. Kovermann, J. Balbach, F. X. Schmid. The prolyl isomerase domain of PpiD from *Escherichia coli* shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity. *Protein Sci.*, 19:6-18, 2010.
- [5] K. Dahse, M. Garvey, M. Kovermann, A. Vogel, J. Balbach, M. Fändrich, A. Fahr. DHPC strongly affects the structure and oligomerization propensity of Alzheimer's A β (1-40) peptide. *J. Mol. Biol.*, 403:643-649, 2010.
- [6] S. Theisgen, L. Thomas, T. Schröder, C. Lange, M. Kovermann, J. Balbach, D. Huster. The presence of membranes or micelles induces structural changes of the myristoylated guanylate-cyclase activating protein-2. *Euro. Biophys. J.*, 40:565-576, 2011.
- [7] M. Kovermann, R. Zierold, C. Haupt, C. Löw, J. Balbach. NMR relaxation unravels interdomain crosstalk of the two domain prolyl isomerase and chaperone SlyD. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814:873-881, 2011.
- [8] C. Haupt, R. Patzschke, U. Weininger, S. Gröger, M. Kovermann, J. Balbach. Transient enzyme-substrate recognition monitored by real-time NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, 133:11154-11162, 2011.
- [9] D. Kahra, M. Kovermann, C. Löw, V. Hirschfeld, C. Haupt, J. Balbach, C. G. Hübner. Conformational plasticity and dynamics in the generic protein folding catalyst SlyD unraveled by single-molecule FRET. *J. Mol. Biol.*, in press, 2011.
- [10] C. Haupt, U. Weininger, M. Kovermann, J. Balbach. Local and coupled thermodynamic stability of the two domain and bifunctional enzyme SlyD from *Escherichia coli*.

Biochemistry, accepted, 2011.

[11] A. Hoffmann, M. Kovermann, H. Lilie, U. Fiedler, R. Rudolph, J. Balbach, S. Pfeifer. New Binding Mode to TNF-alpha Revealed by Ubiquitin-Based Artificial Binding Protein. *PLoS ONE*, in revision, 2011.

D. Tagungsbeiträge & Gastvorträge

D.1. Tagungsbeiträge

03.-06.09.2007

"¹⁵N-NMR spectroscopy to investigate the dynamics of the FKBP-like protein SlyD in solution", Poster.

12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Paris, Frankreich.

28.02.-01.03.2008

"¹⁵N-NMR spectroscopy to investigate the dynamics of the FKBP-like protein SlyD in solution", Poster.

1st International Meeting GRK 1026, Halle/Saale.

28.07.2008

"Dynamic behaviour of a two domain protein - observed by NMR", Vortrag.
Bayreuter Strukturtagung, Thurnau.

26.-28.09.2008

"Folding of the cold shock protein - monitored by NMR", Poster.

20th Faltertage, Lutherstadt Wittenberg.

23.03.-27.03.2009

"To spot biopolymer motion by NMR", Vortrag.

Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Dresden.

29.03.-03.04.2009

"How does a two domain protein work?", Poster.

50th ENC (*Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference*), Asilomar, USA.

25.01.-27.01.2010

"How does a two domain protein work?", Poster.

9th NMR conference: a tool for biology, Paris, Frankreich.

22.-26.03.2010

"Protein folding monitored at different magnetic fields strengths", Vortrag.

Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Regensburg.

15.10.-17.10.2010

"Communication within an enzyme", Vortrag.

21st Faltertage, Regensburg.

03.03.-05.03.2011

"How does a two domain protein work?", Vortrag.
2nd International Meeting GRK 1026, Halle/Saale.

10.04.-15.04.2011

"Monitoring protein folding in equilibrium", Poster.
52nd ENC (*Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference*), Asilomar, USA.

D.2. Gastvorträge

31.12.2007

"Dynamics of the FKBP-like protein SlyD in solution"
Weizmann Institut, Gruppe J. Anglister, Rehovot, Israel.

17.07.2008

"Characterization of the folding helper protein SlyD - in a dynamic manner"
Universität Lübeck, Gruppe C. G. Hübner, Lübeck.

04.12.2009

"Quantitative analysis of molecule diffusion - in an NMR tube"
Universität Lübeck, Gruppe C. G. Hübner, Lübeck.

D.3. Sonstiges

03.08.-08.08.2008

EMBO-Kurs "Multidimensional NMR in Structural Biology"
Organisator: C. Griesinger, Il Ciocco, Italien.

seit März 2010

assoziiertes Mitglied im GRK 1026 "Conformational transitions in macromolecular interactions"

27.06.-02.07.2010

Teilnahme "60th The Nobel Laureate Meetings at Lindau"

E. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kovermann
Vorname: Michael
Geburtsdatum: 24.04.1980
Geburtsort: Stendal
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig, 1 Kind

Ausbildung

07/1998 Abitur, Jan-Amos-Comenius-Gymnasium Stendal
08/1998-08/1999 Zivildienst
10/1999-09/2001 Universität Leipzig
Studiengang "Bauingenieurwesen"
Abschluss: Vordiplom
10/2001-11/2006 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studiengang "Medizinische Physik"
Abschluss: Diplom-Physiker (Medizinphysik)
Thema der Diplomarbeit: "Untersuchungen zur molekularen
Dynamik in Methyl- α -L-rhamnopyranoside im kristallinen
und glasartigen Zustand mittels dynamischer
Festkörper-NMR"
seit 12/2006 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Fachgruppe Biophysik
Fachgruppenleiter: Prof. Dr. Jochen Balbach

F. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 Abs. 2b der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät II der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vom 03.02.2004, dass ich die vorliegende Arbeit

NMR-spektroskopische Charakterisierung funktioneller Proteinzustände

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich erkläre die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die vorliegende Dissertation an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Bewerbung eines Doktorgrades eingereicht zu haben.

Halle (Saale),

Michael Kovermann

G. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die vorliegende Dissertation wurde in der Fachgruppe Biophysik am Institut für Physik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Jochen Balbach angefertigt. Im besonderen Maße möchte ich mich bei ihm für die exzellente wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit bedanken. Erst durch den Eintritt in seine Fachgruppe ist mir die unglaubliche Vielfalt und Breite der NMR-Spektroskopie bewusst geworden, die mir durch die Überlassung vielfältigster Projekte immer vertrauter geworden ist. Wichtig zu betonen sind mir auch die gewährten wissenschaftlichen Freiheiten und vor allem das Vertrauen, das er in mich im Bereich der Lehre gesetzt hat. Auch für die Möglichkeit meiner aktiven Teilnahme an vielen wissenschaftlichen Tagungen und Arbeitstreffen möchte ich mich bei ihm ausdrücklich bedanken.

Ulrich Weininger hat durch seine extrem hohe Diskussionsbereitschaft und sein breites Wissen in der Anwendung der hochauflösenden NMR-Spektroskopie sich sehr an der Entwicklung der vorliegenden Arbeit verdient gemacht. Uli, durch dich ist der lange Weg von der Aufnahme der NMR-Daten bis zur letztendlichen hochaufgelösten NMR-Struktur fühlbar kürzer geworden.

Bei Christian Löw und Caroline Haupt möchte ich mich für das unermüdliche Beantworten von Fragen zur Proteinchemie bedanken, die wahrscheinlich nur aus der Sichtweise eines Physikers gestellt werden können. Durch euch sind mir viele biochemische Dinge klarer geworden. Ihr beide habt mir auch gezeigt, dass biophysikalische und auch biochemische Methoden, die neben der NMR-Spektroskopie existieren, ihre totale Daseinsberechtigung besitzen.

Dem Institut der Physik der Universität zu Lübeck unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Hübner möchte ich für die äußerst produktive Zusammenarbeit danken. Ausgehend von der Idee von FRET-Experimenten an einzelnen SlyD-Molekülen bis zur Publikation der Ergebnisse war es ein langer, aber durchaus lehrreicher Weg. Verena Hirschfeld, und vor allem Dana Kahra möchte ich für diese fruchtbare Kooperation danken. Dana, Danke für dein akribisches und kritisches Lesen der vorliegenden Arbeit. Dieses war für mich sehr sehr wertvoll.

Für die NMR-Messzeit und die Unterstützung beim Aufsetzen der Experimente möchte ich mich bei Horst Kessler und Gerd Gemmecker (Technische Universität München), Paul Rösch und Kristian Schweimer (Universität Bayreuth), Gunter Fischer und Christian Lücke (Max-Planck-Forschungsstelle Halle (Saale)) und bei Carmen Mrestani-Klaus (Universität Halle-Wittenberg) bedanken.

Frank Lange und Stefan Gröger haben durch ihren mitunter kurzfristigen Einsatz die Betriebsbereitschaft des NMR-Strukturrechners immer ermöglicht.

Rolf Sachs möchte ich für seine Ratschläge danken, die er mir in Fragen zum Kälteschockprotein gegeben hat.

Tobias Gruber und Katrin Waldheim gilt mein Dank für die gewährte Laborunterstützung.

Der gesamten Fachgruppe Biophysik danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Der Arbeitsgruppe von Franz Xaver Schmid an der Universität Bayreuth gilt mein Dank der Diskussionsbereitschaft und dem Hinterfragen vieler Daten und Ergebnisse während unserer zahlreichen Laborseminare. Besonders möchte ich mich bei Anne-Juliane Geitner, Roman Jakob und bei Christian Scholz (Roche Diagnostics) bedanken.

Nicht unerwähnt sollen die zahlreichen Forschungspraktikanten bleiben, mit denen ich während der letzten Jahre, wenn auch jeweils nur für eine kurze Zeit, zusammengearbeitet habe. Nur durch eure Neugier und das Fragen nach dem "Warum" sind mir viele Dinge erst bewusst geworden. Dafür möchte ich mich besonders bei Robert Zierold, Mathies Breithaupt, Martin Schöne und Matthias Altenstein bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei Mirjam Klepsch, Stephan Theisgen & Daniel Huster, Marcus Fändrich, Andreas Hoffmann & Sven Pfeifer, Stefan Reich & Ralph Golbik, Stephan Zimmermann & Milton T. Stubbs und bei Werner Kremer für die Kooperationen bedanken, bei denen ich unglaublich viel lernen durfte.

Dem Graduiertenkolleg 1026 "Conformational transitions in macromolecular interactions" unter dem Sprecher Prof. Dr. Milton T. Stubbs danke ich für die gelungenen Seminare, inner- sowie außerhalb von Halle.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Doktorarbeit (SFB 610, GRK 1026).

Last but not least möchte ich mich bei meinen Eltern, Großvater und meiner kleinen Familie bedanken. Dana und Maja, ihr habt mich immer unterstützt und vor allem gezeigt, dass es auch noch ein Leben außerhalb der Wissenschaft gibt.

Danke!