

Strukturelle Charakterisierung von Proteinfaltungsintermediaten mit NMR-Spektroskopie

Dissertation

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

Vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von
Ulrich Weininger
Geboren am 06.05.1978
In Dillingen a.d. Donau

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 21.12.2009

Gutachter: (1) Prof. Dr. Milton T. Stubbs
(2) Prof. Dr. Jochen Balbach
(3) Prof. Dr. Dieter Willbold

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Struktur und Funktion von Proteinen	1
1.2	Proteinfaltung	2
1.3	Proteinfaltungsintermediate	3
1.4	Eindomänenproteine.....	4
1.5	<i>Repeat</i> -Proteine	6
1.6	Zweidomänenproteine	8
1.7	Hochauflösende NMR-Spektroskopie von Proteinen	9
1.8	NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von intermediären Zuständen.....	10
1.9	Problemstellung.....	11
2	Materialien und Methoden	13
2.1	Materialien	13
2.1.1	Proteine.....	13
2.1.2	Geräte	13
2.1.3	Software	13
2.2	Methoden.....	14
2.2.1	Zweidimensionale $^1\text{H}^{15}\text{N}$ Korrelationsexperimente.....	14
2.2.2	Dreidimensionale Experimente zur Rückgratzuordnung	16
2.2.3	Amidprotonenaustausch	17
2.2.4	Millisekundenamidprotonenaustausch	18
2.2.5	<i>Quenched-flow</i> Amidprotonenaustausch.....	20
2.2.6	Faltungsübergänge	21
2.2.7	Echtzeit-NMR	22
2.2.8	Kompetition zwischen Rückfaltung und Amidprotonenaustausch	24
3	Ergebnisse und Diskussion	26
3.1	Charakterisierung von intermediären Faltungszuständen aus dem Ensemble des nativen Zustands.....	26
3.1.1	Das Ankyrin- <i>repeat</i> Protein P19	28
3.1.2	Das Eindomänen Modellprotein Barstar	32
3.2	Restespezifische Entfaltung im Gleichgewichtsübergang	38
3.2.1	Das thermophile Ankyrin- <i>repeat</i> Protein (tANK)	38
3.2.2	Auswirkung einer lokalen chemischen Modifikation auf P19	43
3.3	Kinetische Faltungsintermediate	47
3.3.1	Schnelle Faltung von Onconase	47
3.3.2	Langsame prolinlimitierte Faltung des Zweidomänenproteins G3P aus dem Phagen fd.....	52
4	Zusammenfassende Diskussion	59
4.1	Strukturelle Charakterisierung von transient vorliegenden teilgefalteten Zustände aus dem Ensemble des nativen Zustands	59
4.2	Entfaltung in Gleichgewichtsübergängen aufgelöst für individuelle Reste	60
4.3	Schnelle Faltungsreaktionen mit <i>quenched-flow</i> NMR	61
4.4	Hochaufgelöste Informationen zur Struktur und Stabilität langlebiger kinetischer Intermediate mittels Echtzeit-NMR	62
5	Zusammenfassung	64
6	Abkürzungsverzeichnis	66
7	Literaturverzeichnis	67
8	Anhang	74

Inhaltsverzeichnis

8.1	Verwendete Pulsprogramme	74
8.1.1	$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -fHSQC	74
8.1.2	$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -sgTROSY-HSQC	75
8.1.3	newMEXICO-fHSQC	76
8.1.4	trHNCA	77
8.1.5	trHNCACB	78
8.1.6	trHN(CO)CACB	80
8.2	Zuordnungen und Daten	82
8.2.1	P19	82
8.2.2	Barstar	83
8.2.3	tANK	86
8.2.4	P19 S76E	89
8.2.5	Onconase	90
8.2.6	G3P	92
9	Eigene Publikationen	95
10	Lebenslauf	98
11	Danksagung	99

1 Einleitung

1.1 Struktur und Funktion von Proteinen

Proteine (abgeleitet von dem griechischen Wort protos, „erstes“, „wichtigstes“) nehmen eine der zentralsten Rollen in biologischen Systemen aller Art ein. Sie erfüllen dabei auf spezifische Art und Weise die unterschiedlichsten Funktionen wie z.B. Bindung, Regulation und Katalyse, was sie zu der wohl vielseitigsten Klasse von Bio-Makromolekülen macht. Trotz dieser Vielseitigkeit ist ihr chemischer Aufbau relativ einfach: es handelt sich um Heteropolymere bestehend aus 20 verschiedenen Arten von Aminosäuren, welche in spezifischer Reihenfolge (Aminosäuresequenz) über eine Peptidbindung verknüpft sind. Ihre Funktionalität und Vielseitigkeit erhalten sie über die räumliche Anordnung der Polypeptidkette. In dieser dreidimensionalen Struktur werden die Aminosäuren so positioniert, dass sie eine spezifische Bindung anderer Moleküle ermöglichen, oder auch hocheffiziente, spezifische Reaktivitäten entstehen (Fersht 1998). So stellen Proteine auch als Biokatalysatoren (Enzyme) in vielen Bereichen noch immer das Nonplusultra in der Katalysatortechnik dar, was sie für biotechnologische Anwendungen äußerst interessant macht. Diese Beziehung zwischen Struktur und Funktion führte zu großen Anstrengungen und Fortschritten (verfügbare Strukturen und neue Strukturen pro Jahr) in der Strukturbiologie (Abb. 1), die sich die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur, hauptsächlich mittels Röntgenkristallographie (Geerlof et al. 2006) und NMR-Spektroskopie (Montelione et al. 2000), zum Ziel gesetzt hat.

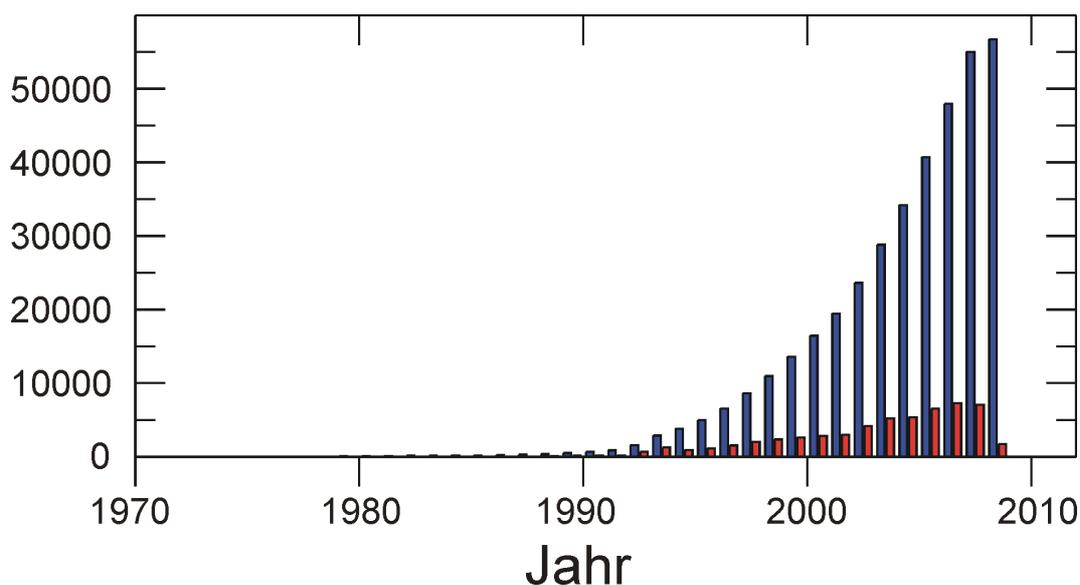


Abb. 1: Dreidimensionale Strukturen in der Proteindatenbank

Gezeigt ist die Gesamtanzahl der gelösten Strukturen (blau) und die gelösten Strukturen pro Jahr (rot) in der Proteindatenbank im Verlauf der Jahre. Quelle: PDB (www.rcsb.org April 2009)

1.2 Proteinfaltung

Die Aminosäuresequenz, welche den Proteinen zugrunde liegt, ist durch die Abfolge der Basenpaare in der DNA bestimmt. Von der DNA wird die Information zunächst in RNA übersetzt (Transkription), dann in eine entsprechende Aminosäuresequenz (Translation). Bis zu diesem Schritt ist die Information in der Abfolge der verschiedenen Bausteine des jeweiligen Makromoleküls enthalten. Damit ein Protein seine Aufgaben erfüllen kann, muss die Aminosäurekette eine bestimmte räumliche Anordnung einnehmen, d.h. es muss aus einer eindimensionalen Polypeptidkette, welche die Sequenzinformation enthält, in eine dreidimensionale funktionelle Konformation falten. Die Proteinfaltung ist deshalb ein zentraler biologischer Prozess und wird auch als zweite Hälfte des genetischen Codes bezeichnet (Goldberg 1985). Dabei ist die Frage nach dem Faltungsmechanismus einer eindimensionalen Polypeptidkette in eine dreidimensionale Proteinstruktur von grundlegendem Interesse.

Anfinsen und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Proteine reversibel falten und entfalten, und dass die dazu benötigte Information in der Sequenz enthalten ist (Anfinsen 1973). Polypeptidketten falten zu ihrem thermodynamisch stabilsten Zustand (nativer Zustand), wobei der Energieunterschied zwischen der gefalteten und entfalteten Konformation im Vergleich zu chemischen Reaktionen vergleichsweise gering ist (Jaenicke 1991; Jaenicke 1996). Levinthal postulierte, dass es sich beim Faltungsprozess nicht um ein zufälliges Absuchen des Konformationsraumes handeln kann (Levinthal 1968), sondern dieser stark eingeschränkt sein muss. Durch zahlreiche experimentelle Untersuchungen wurde gezeigt, dass Proteine schnell und kooperativ falten. Der Faltungsweg von der ungefalteten zur nativen gefalteten Struktur verläuft bei vielen kleinen Proteinen direkt, in den meisten Fällen jedoch über ein oder mehrere Intermediate (Radford et al. 1992; Baldwin 1994; Schindler et al. 1995; Jackson 1998). *In vitro* konnte der Mechanismus zahlreicher Systeme aufgeklärt werden, was zum neuen Konzept der Energielandschaft der verschiedenen konformationellen Zustände eines Proteins führte (Kiefhaber 1995; Fersht 2000; Wolynes 2005). Während der gefaltete Zustand von Proteinen strukturell gut analysiert werden kann, und auch Modelle für den heterogenen entfalteten Zustand entwickelt werden (Bernado et al. 2005; Jha et al. 2005; Wirmer et al. 2006), ist für die nur transient auftretenden Intermediate und Übergangszustände nur wenig strukturelle Information vorhanden.

1.3 Proteinfaltungsintermediate

Sehr viele Proteine falten über ein oder mehrere transient auftretende Intermediate. Intermediate können produktiv sein („*on pathway*“) (Udgaonkar & Baldwin 1990; Radford et al. 1992) und damit auf der Reaktionskoordinate zwischen dem entfalteten und dem nativen Zustand liegen (Abb. 2), oder kinetische Fallen darstellen („*off pathway*“) (Kiefhaber et al. 1992; Baldwin 1996), d. h. lokale Energieminima welche die korrekte Faltung verzögern. Oft werden Intermediate sehr schnell (im Bereich von ms) durchlaufen, sie liegen meist transient und niedrig populiert vor. Langlebige Intermediate können in biologischen Zellen als falsche Konformation abgebaut werden. Zudem besitzen sie einen großen Anteil an exponierter hydrophober Oberfläche und neigen deshalb zur Oligomerisierung (Aggregation, Fibrillierung) (Dobson 2003). Diese thermodynamisch und kinetisch sehr stabilen Zustände sind oft toxisch und werden z.B. für die Alzheimersche Krankheit verantwortlich gemacht (Stefani 2004).

Für das molekulare Verständnis der Proteinfaltung wäre eine Strukturbestimmung von Übergangszuständen (Fersht 2000) (TS1 und TS2 in Abb. 2) äußerst hilfreich. Diese sind aber zu kurzlebig und deshalb ebenso wie der unstrukturierte und heterogene entfaltete Zustand strukturbologisch nicht greifbar. Indirekt lassen sie sich jedoch mittels der ϕ -Wert Analyse (Fersht et al. 1992) als nativ ähnlich oder unähnlich beschreiben. „*On pathway*“ Faltungsintermediate sind deshalb von großem Interesse, da sie neben der nativen Konformation, strukturbologisch analysiert werden können und einen Zeitpunkt auf dem Weg zur nativen Konformation darstellen. Obwohl sie im Verlauf der Faltungsreaktion nur transient auftreten, kann ihre strukturelle Analyse somit wertvolle Erkenntnisse zum Faltungprozess liefern. Mit der dafür notwendigen Auflösung einzelner Atome oder zumindest Aminosäuren, sind Intermediate nur mittels NMR-Spektroskopie zugänglich. Damit können Aussagen getroffen werden, welche räumlichen Kontakte innerhalb des Faltungsvorganges energetisch günstig oder ungünstig sind bzw. wie die Mutation einzelner Aminosäuren den Faltungsmechanismus verändert.

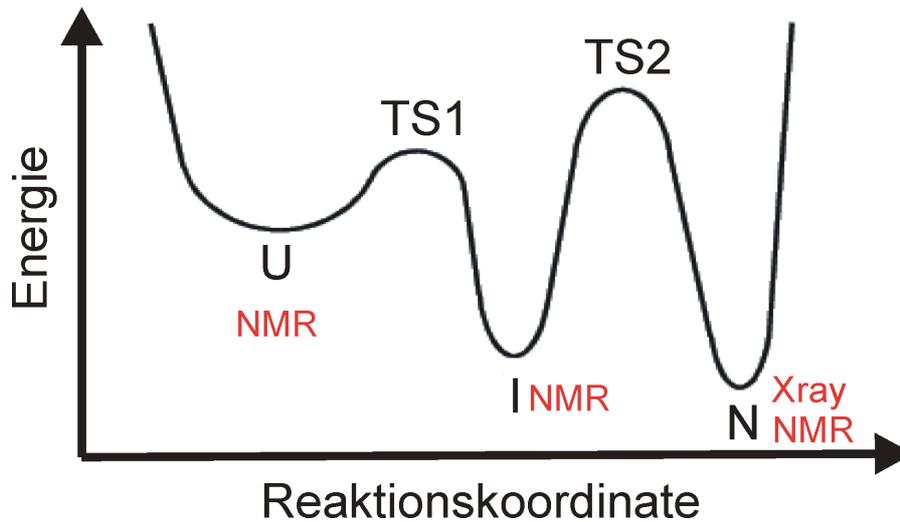


Abb. 2: Reaktionsschema eines „on pathway“ Faltungsintermediates.

Die Energie der verschiedenen Faltungszustände ist gegen die Reaktionskoordinate aufgetragen. Gezeigt sind der entfaltete Zustand (U), ein intermediärer Zustand (I), der native Zustand (N), sowie die beiden Übergangszustände (TS1 und TS2). Zudem ist in roter Schrift angegeben mit welchen Methoden sich die energetisch günstigen Grundzustände strukturbologisch untersuchen lassen.

1.4 Eindomänenproteine

Im einfachsten Fall sind Proteine nur aus einer einzelnen strukturellen Domäne, d.h. einer globulären Faltungseinheit mit einem hydrophoben Kern, aufgebaut. Aufgrund dieses einfachen Aufbaus und des deshalb zu erwarteten einfachen Faltungsmechanismus, wurden die Prinzipien der Proteinfaltung bisher hauptsächlich anhand dieser Modellproteine *in vitro* untersucht. Tatsächlich falten viele Eindomänenproteine schnell (innerhalb von Millisekunden) und die Faltung der meisten lässt sich im thermodynamischen Gleichgewicht mit dem einfachsten Modell, dem der Zweizustandsfaltung, bei dem das Protein nur im nativen oder im entfalteten Zustand vorliegt, beschreiben (Schindler et al. 1995). Dieser Mechanismus kann durch kinetische Analysen nachgewiesen werden. Auch wenn kinetische Faltungsintermediate auftreten, sind die Faltungsreaktionen von Eindomänenproteinen meist deutlich einfacher als bei Mehrdomänenproteinen oder Oligomeren, so dass sich biophysikalische Proteinfaltungsuntersuchungen nach wie vor zumeist auf Eindomänenproteine konzentrieren.

Zu den in dieser Arbeit untersuchten Eindomänenproteinen gehört Barstar aus *Bacillus amyloliquefaciens* bestehend aus 89 Aminosäuren, welche in 3 parallelen β -Faltblattsträngen und 4 α -Helices zu einer einzigen globulären Domäne falten (Abb. 3) (Lubienski et al. 1994).

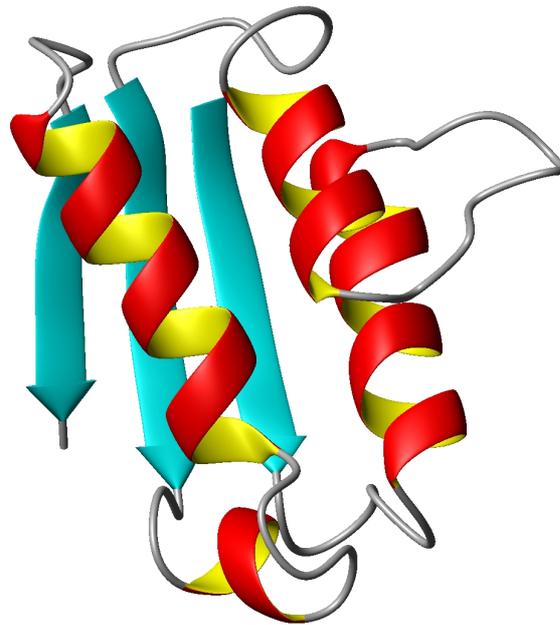


Abb. 3: Dreidimensionale Struktur von Barstar

Gezeigt ist die NMR-Struktur von Barstar (1bta.pdb) (Lubienski et al. 1994) als Bänderdarstellung.

Seine natürliche Funktion ist die Inhibierung der Ribonuklease Barnase innerhalb der Zelle. Im reduzierenden Milieu der Zelle liegen die beiden Cysteine von Barstar reduziert vor, in diesem Zustand besitzt Barstar eine sehr starke Bindungsaffinität zu Barnase. Nach Export dieses Komplexes in das oxidative Milieu des extrazellulären Raumes, werden die Cysteine oxidiert, die Bindungsaffinität stark verringert und Barnase freigesetzt (Buckle et al. 1994; Jucovic & Hartley 1996). Barstar und seine Variante P27A/C40A/C82A wurden ausgiebig auf ihr Faltungsverhalten untersucht (Schreiber & Fersht 1993; Shastry et al. 1994; Nolting et al. 1995; Shastry & Udgaonkar 1995; Golbik et al. 1999).

Das Protein Onconase aus den Oocyten und frühen Embryonen des Nördlichen Leopardfroschs (*Rana pipiens*) besteht aus 104 Aminosäuren, welche eine Rnase A ähnliche Tertiärstruktur einnehmen. Diese besteht aus 6 β -Faltblattsträngen und 3 α -Helices, welche zu einer globulären Domäne falten (Abb. 4) (Mosimann et al. 1994). Als RNase besitzt Onconase cytotoxische und cytotostatische Aktivität (Mikulski et al. 1990; Wu et al. 1993). Da die katalytische Aktivität von Onconase nicht durch den humanen cytosolischen RNase-Inhibitor gehemmt wird, stellt Onconase ein viel versprechendes Tumor-Therapeutikum dar, das sich bereits in Phase IIIb von klinischen Tests befindet (Schulenburg et al. 2007a).

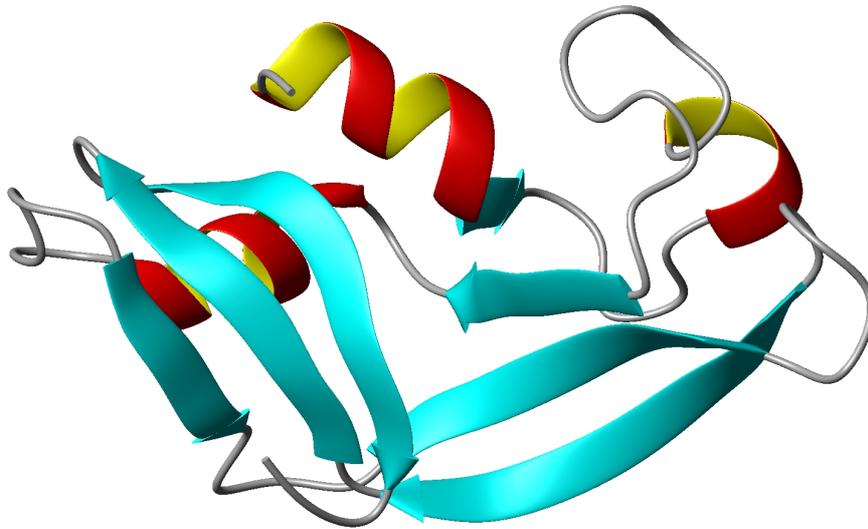


Abb. 4: Dreidimensionale Struktur von Onconase

Gezeigt ist die Kristallstruktur von Onconase (1onc.pdb) (Mosimann et al. 1994) als Bänderdarstellung.

1.5 Repeat-Proteine

Im Gegensatz zu kompakten Eindomänenproteinen sind so genannte *repeat*-Proteine nicht globulär aufgebaut. Vielmehr sind sie sequentiell aus einem strukturellen Motiv aufgebaut, welches allein für sich nicht gefaltet vorliegen kann. Folgen mehrere dieser Motive unmittelbar aufeinander, stabilisieren sie sich gegenseitig und führen somit zu länglichen *repeat*-Proteinen, welchen oft ein hydrophober Kern fehlt (Bork 1993). Ihre biologische Funktion ist die spezifische Erkennung und Bindung anderer Proteine, da sich durch Modifikation der sich wiederholenden strukturellen Einheiten (*repeats*) natürliche Bindungsspezifitäten generieren lassen (Mosavi et al. 2002; Kohl et al. 2003). Dieses Prinzip wird auch in der Biotechnologie ausgenutzt, in der *repeat*-Proteine eine Alternative zu den schwer handhabbaren Antikörpern bilden (Binz et al. 2004). Für die Proteinfaltung sind *repeat*-Proteine vor allem wegen ihres Aufbaus interessant. Aufgrund ihrer sequentiellen Struktur ist ein kooperatives Faltungsverhalten, wie es globuläre Proteine zeigen, nicht zwangsläufig zu erwarten. Die einzelnen strukturellen Motive könnten sich auch unabhängig falten. Zudem wurde aufgrund ihres einfachen Aufbaus prognostiziert, dass sie schnell Falten und Entfalten sollten. Experimentell zeigt sich, dass *repeat*-Proteine im Gleichgewicht kooperativ nach dem Zweizustandsmodell oder in Ausnahmen nach einem linearen

Einleitung

Dreizustandsmodell (L6w et al. 2007) falten. Kinetisch hingegen falten sie deutlich langsamer als man dies erwarten w6rde (Main et al. 2003; Tang et al. 2003; Devi et al. 2004; Bradley & Barrick 2005).

Das zur Familie der INK4 Tumorsuppressor Proteine geh6rende humane P19^{INK4d} (im folgenden mit P19 abgek6rzt) besteht aus 166 Aminos6uren, welche in 5 linear angeordneten Ankyrin-*repeats* (ANK) (Bork 1993; Sedgwick & Smerdon 1999) vorliegen (Abb. 5 A) (Baumgartner et al. 1998). Beim ANK handelt es sich um ein weit verbreitetes strukturelles Motiv, bei dem 2 antiparallele α -Helices 6ber einen *loop* miteinander verbunden sind, w6hrend sie 6ber einen α -turn mit dem nachfolgenden ANK verbunden sind. Die Funktion von P19 ist die negative Regulierung des Zellzyklus durch Bindung und Inhibierung der Cyclin D abh6ngigen Kinasen CDK4 und CDK6. Diese Bindung findet auf Seite von P19 haupts6chlich durch ANK1 und ANK2 statt (Morgan 1995; Baumgartner et al. 1998; Brotherton et al. 1998). Ein Ankyrin-*repeat* Protein aus dem thermophilen Bakterium *Thermoplasma volcanium* (tANK) (Abb. 5 B) wies die gr66te Homologie zu P19 in einer Suche mit dem Programm BLAST auf (L6w et al. 2008b). Seine dreidimensionale Struktur ist mit der von P19 vergleichbar, seine Funktion jedoch unbekannt.

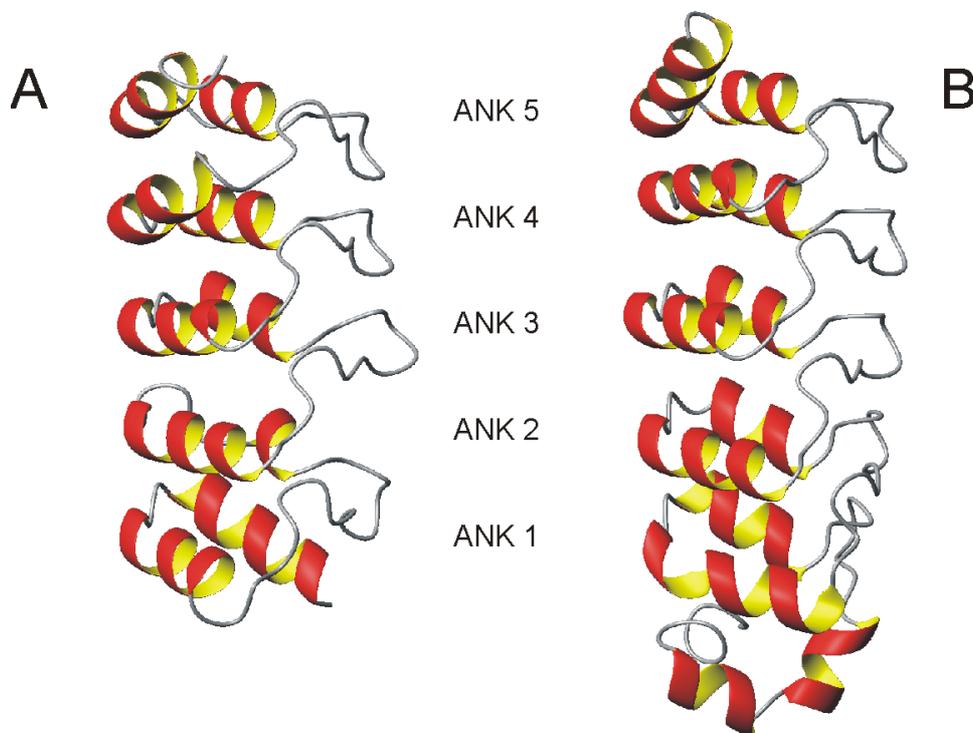


Abb. 5: Dreidimensionale Struktur von P19 und tANK.

Gezeigt sind die Kristallstrukturen von (A) P19 (1bd8.pdb) (Baumgartner et al. 1998) und (B) tANK (2rfm.pdb) (L6w et al. 2008b) als B6nderdarstellung.

1.6 Zweidomänenproteine

Das Faltungsverhalten von Eindomänenproteinen wird bereits seit Jahren eingehend untersucht. Die meisten Proteine bestehen jedoch aus zwei oder mehreren Domänen bzw. liegen als Untereinheit in größeren Komplexen vor. Folgerichtig bringt die Faltungsanalyse von Eindomänenproteinen zwar grundlegende Erkenntnisse, in vielen Fällen wird das Faltungsverhalten von Mehrdomänenproteinen aufgrund zusätzlicher Interaktionen jedoch ein anderes sein. Um sich solchen Systemen zu nähern ist somit das Studium von Zweidomänenproteinen ein erster Schritt. Dass bislang nur relativ wenige Arbeiten zur Faltung von Zweidomänenproteinen vorliegen (Jaenicke 1999; Wilson et al. 2005; Batey et al. 2006), hat hauptsächlich zwei Gründe. Zum einen sind größere Systeme grundsätzlich schwieriger zu handhaben. Zum anderen sind die Faltungsmechanismen deutlich komplexer: So sind für die Faltung von Zweidomänenproteinen mehrere Szenarien möglich und wurden auch experimentell bestätigt. Die beiden Domänen können entweder getrennt voneinander falten und anschließend assoziieren, eine Domäne faltet zuerst und ermöglicht dadurch erst die Faltung der zweiten, instabileren Domäne oder beide Domänen sind isoliert instabil und falten gleichzeitig zum nativen Protein. Eine biophysikalische Analyse dieser komplexen Faltungswege wird zudem dadurch erschwert, dass die gängigen intrinsischen Sonden, z.B. für die Fluoreszenz- oder CD-Spektroskopie, sich nicht eindeutig einzelnen Domänen und Faltungsreaktionen zuordnen lassen.

Die beiden N-terminalen Domänen des Gen-3-Proteins des Phagen fd (G3P) bestehen aus 220 Aminosäuren (Holliger et al. 1999) und sind ein Modell, um die Mechanismen von Domäneninteraktion und Domänenassemblierung zu untersuchen (Martin & Schmid 2003b). Die N1 Domäne ist 67 Aminosäuren groß, welche 5 β -Faltblattsränge und 1 α -Helix bilden (Abb. 6A). Daran schließt sich ein Glycin/Serin reicher Linker an (Aminosäure 68-88). Vor (Aminosäure 89-104) und nach (Aminosäure 205-220) der aus 100 Aminosäuren (105-204), 6 β -Faltblattsträngen und 1 α -Helix bestehenden N2 Domäne befindet sich die 2 β -Faltblattstränge enthaltene *hinge* Region, welche die Hauptinteraktionsstelle mit der N1 Domäne bildet.

Beide N-terminalen Domänen sind an der frühen Phase der Infektion von *E. coli* beteiligt (Chatellier et al. 1999; Deng et al. 1999; Deng & Perham 2002). Die N2 Domäne interagiert dabei zuerst mit dem F-Pilus, was zu einer Dissoziation der Domänen und somit zu einer Aktivierung führt. Anschließend bindet die N1 Domäne an die C-terminale Domäne des TolA Rezeptors. Die Bindungsstelle der N1 Domäne ist im nativen Zustand von der N2 Domäne blockiert (Lubkowski et al. 1999). Je länger der geöffnete, aktive Zustand vorliegt, desto

Einleitung

infektiöser ist der Phage (Holliger & Riechmann 1997). Mutationsstudien zusammen mit Untersuchungen zur Infektion pilusfreier *E. coli* Zellen zeigten, dass der infektiöse Zustand dem Rückfaltungsintermediat mit Pro213 in *trans* entspricht (Abb. 6B), und die langsame Rückfaltung (Martin & Schmid 2003b; Martin & Schmid 2003c), bzw. der langsame Verlust der Infektiösität an die Isomerisierung des Pro213 von *trans* nach *cis* gekoppelt ist (Eckert et al. 2005).

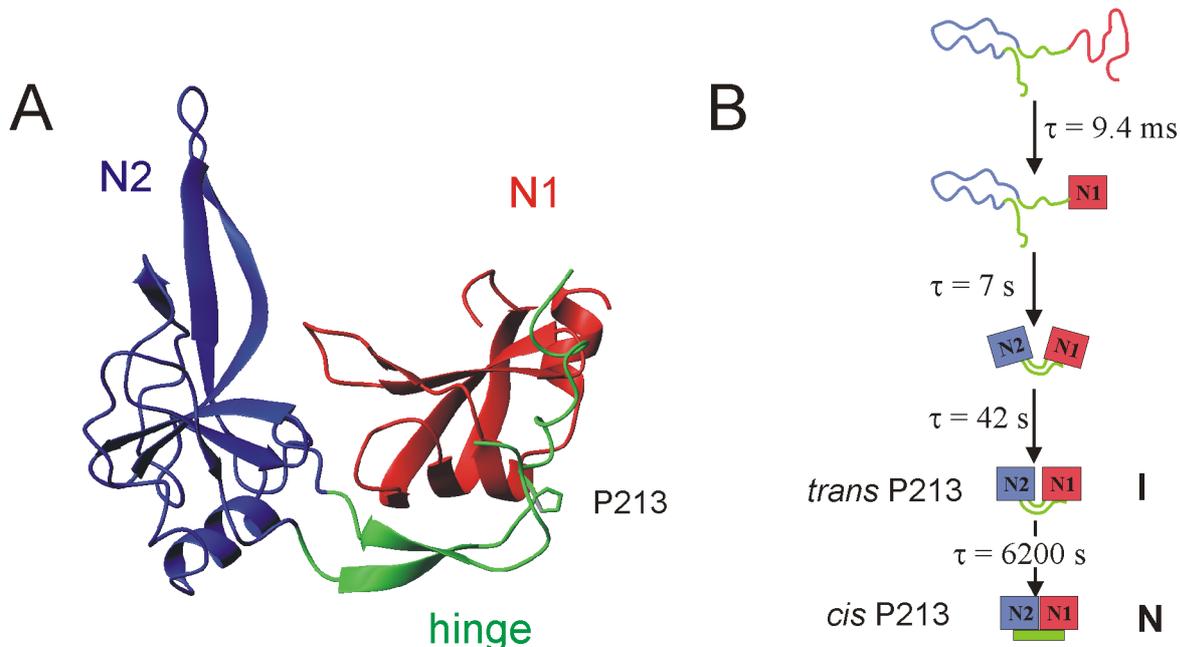


Abb. 6: Dreidimensionale Struktur und Faltungsmechanismus der beiden N-terminalen Domänen des Gen-3-Proteins des Phagen fd.

Gezeigt ist (A) die Kristallstruktur von den N-terminalen Domänen des G3P (2g3p.pdb) (Holliger et al. 1999) als Bänderdarstellung. Die N1 Domäne ist rot, die N2 Domäne blau und die *hinge* Subdomäne grün eingefärbt. Pro213 ist beschriftet und die Seitenkette gezeigt. In (B) ist schematisch gezeigt in welchen einzelnen Schritten die Rückfaltung des G3P abläuft (Martin & Schmid 2003b). Die Farbcodierung der einzelnen Bereiche ist analog zu (A). Das Faltungsintermediat (I) mit inkorrektem *trans* Pro213 reagiert in einer sehr langsamen Reaktion ($\tau = 6200$ s) weiter zum nativen Zustand (N) mit korrektem *cis* Pro213.

1.7 Hochauflösende NMR-Spektroskopie von Proteinen

Hochauflösende NMR-Spektroskopie in Flüssigkeiten (Wider & Wüthrich 1999) ist aufgrund ihrer hohen spektralen Auflösung eine extrem leistungsstarke spektroskopische Methode. Aufgrund der äußerst geringen Energieunterschiede des Grund- und angeregten Zustandes, sind diese nach Boltzmann annähernd gleich besetzt, was zu einem äußerst geringen Signal führt. NMR-Spektroskopie ist deshalb eine sehr insensitive Methode, die viel höhere Stoffmengen erfordert als z.B. Fluoreszenzspektroskopie. Während andere spektroskopische Methoden (z.B. UV/VIS- oder Fluoreszenzspektroskopie) aber weitestgehend nur globale Informationen zu den zu untersuchenden Molekülen liefern, ermöglicht die NMR-

Einleitung

Spektroskopie es Signale einzelner Atome bzw. Atomgruppen individuell im Spektrum aufzulösen. Dies liegt vor allem daran, dass die Frequenz (bzw. die daraus erhaltene chemische Verschiebung) eines Kernes nicht nur vom Kern (wie z.B. ^1H , ^{13}C oder ^{15}N) selbst und seiner Elektronendichte abhängt, sondern auch sehr empfindlich von seiner chemischen Umgebung. Im Idealfall, z.B. bei kleineren Molekülen, sind die Resonanzfrequenzen aller detektierbaren Atome unterschiedlich. In Proteinen kommt es zu einer starken Signalüberlagerung. Zur Lösung des Problems überträgt man gezielt die NMR-Magnetisierung von einem Kern auf einen anderen, entweder durch die skalare Kopplung über die chemische Elektronenpaarbindung oder durch die Dipol-Dipol Kopplung über den Raum. In mehrdimensionalen Experimenten (Sattler et al. 1999) können Atome bzw. Atomgruppen dadurch getrennt beobachtet und über chemische oder räumliche Nachbarschaft in Beziehung zueinander gebracht werden, d.h. jeder Resonanz kann eindeutig ein Atom zugeordnet werden. Aus zahlreichen Abstands- (NOE) bzw. Geometrieinformationen lässt sich schließlich die dreidimensionale Struktur von Proteinen oder anderen Bio-Makromolekülen in hochaufgelöster Form durch Moleküldynamikrechnungen bestimmen (Wüthrich 1990). Die Mehrzahl der in Abb. 1 gezeigten hochaufgelösten Proteinstrukturen wurde mittels Röntgenbeugung an Proteinkristallen gelöst. Die NMR-Spektroskopie ist eine dazu komplementäre Methode, die Proteinstrukturen in ihrer natürlichen wässrigen Umgebung untersucht. Zusätzlich zu den dreidimensionalen Strukturen der Grundzustände von Proteinen lassen sich mit der NMR-Spektroskopie jedoch auch Informationen zur Dynamik (Kay 2005) bzw. zeitaufgelöste Veränderungen eines Proteins auf der Ebene einzelner Atome oder Aminosäuren erhalten (Balbach et al. 1996).

1.8 NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von intermediären Zuständen

Aufgrund ihrer hohen Ortsauflösung (das Beobachten getrennter Signale, die bestimmten Atome oder Atomgruppen zugeordnet werden können) ist die NMR-Spektroskopie dazu geeignet in verschiedenen Zeitbereichen transiente Zustände wie Proteinfaltungsintermediate strukturell zu untersuchen. Dies kann im Gleichgewicht mit Hilfe des Amidprotonenaustausches (Bai et al. 1993; Bai et al. 1995) erfolgen, der von ent- oder teilgefalteten Zuständen dominiert wird, selbst wenn diese im zeitlichen Mittel nur sehr niedrig populiert vorliegen. Durch Millisekundenaustauschspektroskopie (Korzhnev & Kay 2008) lassen sich auch niedrig populierte Zustände indirekt detektieren. Mit NMR-

detektierten Temperatur- oder Denaturierungsmittel-induzierten Gleichgewichtsübergängen (Zeeb et al. 2002) lassen sich Faltungsvorgänge auf Ebene einzelner Atome oder Reste verfolgen. Bei langsameren Reaktionen (min bis h) sind Intermediate oder deren Zerfall mit Echtzeit-NMR beobachtbar (Balbach et al. 1995; Balbach et al. 1996).

Somit stehen eine Fülle von Möglichkeiten zur Verfügung, Intermediate orts aufgelöst zu untersuchen und strukturelle Erkenntnisse zu gewinnen, bzw. bei extrem langlebigen Intermediaten analog zum Gleichgewicht evtl. sogar hochaufgelöste dreidimensionale Strukturen zu bestimmen. Die NMR-Spektroskopie erweitert somit den Informationsgehalt von in der Proteinfaltung standardmäßig angewandten Untersuchungsmethoden, wie z. B. Fluoreszenzspektroskopie oder Circular dichroismus. Zusätzlich vermag sie die Gebiete der Proteinfaltung und der Strukturbiologie zusammenzuführen.

1.9 Problemstellung

In den Faltungsvorgängen vieler Proteine sind Intermediate beteiligt. Handelt es sich bei diesen teilgefalteten Zwischenstufen um produktive Faltungsintermediate, d.h. liegen sie auf der Reaktionskoordinate zwischen dem entfalteten und dem nativen Zustand, stellen sie wichtige Kontrollpunkte dar, die das Faltungsverhalten bestimmen. Eine hochaufgelöste strukturelle Kenntnis dieser Intermediate ermöglicht ein umfassenderes molekulares Verständnis der Proteinfaltung. Zudem sind langlebige Intermediate auch der Startpunkt zur Aggregation und Fibrillierung und der damit verbundenen Krankheiten.

Ziel dieser Arbeit ist es mit unterschiedlichen hochauflösenden zweidimensionalen NMR-Techniken verschiedene produktive Proteinfaltungsintermediate strukturell zu charakterisieren und das Verständnis ihres Faltungsverhaltens zu komplettieren. Dabei kommt zum Tragen, dass NMR-Spektroskopie, im Gegensatz zu anderen spektroskopischen Methoden, Informationen zu einzelnen Aminosäureresten bzw. Atomgruppen liefert. Dies sollte zum einen über NMR-detektierte Amidprotonenaustauschexperimente erfolgen, welche es ermöglichen unter nativen Bedingungen teilgefaltete und entfaltete Zustände zu beschreiben, da diese das Austauschverhalten dominieren. Ein spezielles Augenmerk sollte im Falle von Barstar dabei auf der Entwicklung und Anwendung von Techniken zur Detektion von Amidprotonenaustausch im Millisekundenbereich liegen. Anhand dieser Techniken sollte erstmals eine vollständige Analyse von Öffnungs- und Schließreaktionen durchgeführt werden, und diese mit konventionell bestimmten Entfaltungs- und Faltungsraten verglichen werden. Die bei P19 und tANK gut voneinander getrennten Gleichgewichtsübergänge ($N \rightleftharpoons I$

Einleitung

bzw. I \rightleftharpoons U) sollten auf Basis einzelner Reste charakterisiert werden. Des Weiteren sollte ein kurzlebiges transientes Rückfaltungsintermediat der Onconase mit *quenched-flow* Amidprotonenaustausch charakterisiert und diese Methode in der Gruppe neu etabliert werden. Ein langlebiges transientes Rückfaltungsintermediat von G3P sollte mit hochauflösender zweidimensionaler Echtzeitspektroskopie strukturell charakterisiert werden, und darüber hinaus durch ein verbessertes Konkurrenzexperiment zwischen Rückfaltung und Amidprotonenaustausch quantitativ bezüglich seiner Stabilität untersucht werden.

Prinzipiell sollte die Anwendung der NMR-Spektroskopie von relativ kleinen, gut zu untersuchenden Proteinen auf größere, NMR-spektroskopisch anspruchsvollere Proteinen in der Arbeitsgruppe ausgebaut werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Proteine

Folgende Proteine wurden in dieser Arbeit untersucht: Humanes P19 sowie dessen Variante F86W/S76E, das thermophile Ankyrin-repeat Protein (tANK) aus *Thermoplasma volcanium*, Barstar P27A/C40A/C82A aus *Bacillus amyloliquefaciens*, Onconase aus *Rana pipiens* und das Gen-3-Protein (G3P) aus dem Phagen fd. Alle Proteine wurden in ^{15}N markierter Form zur Verfügung gestellt, tANK und G3P zur Rückgratzuordnung zusätzlich in $^{15}\text{N}^{13}\text{C}^2\text{H}$ markierter Form. P19, seine Mutante sowie tANK wurden von Christian Löw (Zeeb et al. 2002; Löw et al. 2008b), Barstar von Hagen Hofmann (Golbik et al. 1999), Onconase von Cindy Schulenburg (Arnold et al. 2006) und G3P von Roman Jakob (Martin & Schmid 2003a) dankenswerterweise erhalten.

2.1.2 Geräte

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden an NMR-Spektrometern der Firma Bruker (Bruker, Rheinstetten, D) durchgeführt. Für diese Arbeit wurden Spektrometer des Typs Avance 800 und Avance 700 jeweils mit Cryoprobekopf ausgestattet sowie Avance 900, Avance II 600, DRX 600 und DRX 500 jeweils mit Raumtemperaturprobekopf verwendet. Experimente zum *quenched-flow* Amidprotonenaustausch wurden mit einer Biologic SFM 400 Mischeinrichtung (Biologic, Claix, F) durchgeführt.

2.1.3 Software

Alle Spektren wurden mit Hilfe der Programme Xwinnmr oder Topspin der Firma Bruker (Bruker, Rheinstetten, D) gemessen. Spektren wurden mit NMRPIPE (Delaglio et al. 1995) prozessiert und mit NMRVIEW (Johnson 2004) analysiert, oder mit Felix 2000 (Accelrys, San Diego, CA) prozessiert und analysiert. Austauschkinetiken wurden quantitativ mit GraFit 5 (Erithacus Software, Staines, UK) ausgewertet. Das Programm MOLMOL diente zur Abbildung von Proteinstrukturen (Koradi et al. 1996).

2.2 Methoden

2.2.1 Zweidimensionale $^1\text{H}^{15}\text{N}$ Korrelationsexperimente

Alle NMR-basierten Experimente zur Gewinnung struktureller Information bezüglich der Proteinfaltungsintermediate wurden mit Hilfe von 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperimenten detektiert. In diesen sind stickstoffgebundene Protonen in der direkten Dimension mit dem entsprechenden Stickstoffkern in der indirekten Dimension korreliert. Dies sorgt dafür, dass die daraus resultierenden Kreuzsignale sehr gut in zwei Dimensionen getrennt beobachtbar sind. Dies gilt für alle Amidprotonen der Rückgratpeptidbindungen, sowie für die stickstoffgebundenen Protonen der Seitenketten von Tryptophan, Asparagin, Glutamin, Arginin und Lysin. Letztere können bei den verwendeten pH-Werten und Temperaturen aufgrund von Linienverbreiterung, hervorgerufen von Austausch der stickstoffgebundenen Protonen der Seitenkette mit dem Lösungsmittel, jedoch nicht detektiert werden. Ausgewertet wurden nur die Amidprotonen des Proteinrückgrates, womit sich ein Signal pro Aminosäure (außer bei Prolinen) ergibt. Als Korrelationsexperimente wurden zum einen fHSQCs (fast hetero single quantum coherence) (Mori et al. 1995) (Abb. 7) oder sgTROSY-HSQC (sensitivity and gradient enhanced transverse relaxation optimized spectroscopy) (Weigelt 1998) (Abb. 8) verwendet. Im TROSY-HSQC sind die Kreuzsignale in beiden Dimensionen relativ zum HSQC um 45 Hz (das entspricht der halben $^1J_{\text{H}^{15}\text{N}}$ Kopplungskonstante) verschoben. Zusätzlich sind Signale von Asparagin- und Glutaminseitenketten unterdrückt. TROSY-Spektren wurden aufgrund des verbesserten Relaxationsverhaltens für größere Proteine verwendet: Hier wird nicht wie im HSQC über die 4 verschiedenen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ Kohärenzen des Multipletts, die ein jeweils unterschiedliches Relaxationsverhalten zeigen, gemittelt sondern diejenige mit dem günstigsten Relaxationsverhalten selektiert und die anderen unterdrückt. Zusätzlich wurden TROSY-Experimente bei Messungen in Harnstoff und Guanidiniumchlorid eingesetzt. Hier wurde die im TROSY implementierte Kohärenzselektion nach der Doppelquantenkohärenz $2I_xS_y$ ausgenutzt, welche nur ^{15}N -gebundene Proteinprotonen selektiert, wohingegen alle anderen Protonen wie die des Wassers oder der Denaturierungsmittel unterdrückt werden.

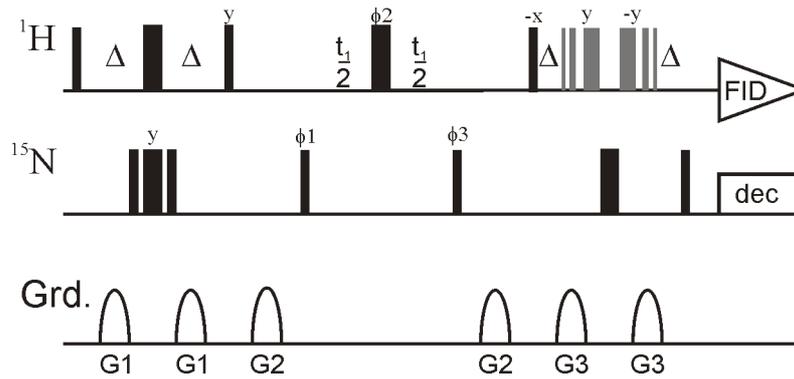


Abb. 7: Pulssequenz des $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ fHSQC (Mori et al. 1995)

Schmale und breite ausgefüllte schwarze Rechtecke repräsentieren 90° - bzw. 180° -Pulse. Graue Rechtecke stellen die Pulse des 3-9-19 WATERGATE (Piotto et al. 1992) dar. Offene Halbellipsen stehen für z-Gradienten. Die relativen Gradientenstärken betragen 50%, 80% und 30%. Δ beträgt 2,5 ms. Für die indirekte Dimension wird t_1 inkrementiert. Während der Aufnahme des freien Induktionsverfalls (FID) wird mit GARP (Shaka et al. 1985) auf dem ^{15}N Kanal entkoppelt (dec). Alle nicht genannten Phasen der Pulse besitzen die Phase x. Die Phasenzyklen lauten $\phi_1=(x, -x)$, $\phi_2=(x, x, -x, -x)$, $\phi_3=(x, x, x, x, -x, -x, -x, -x)$ und für den Empfänger $(x, -x, x, -x, -x, x, -x, x)$. Die Quadraturdetektion erfolgte durch Inkrementierung von ϕ_1 im States-TPPI Modus (Marion et al. 1989).

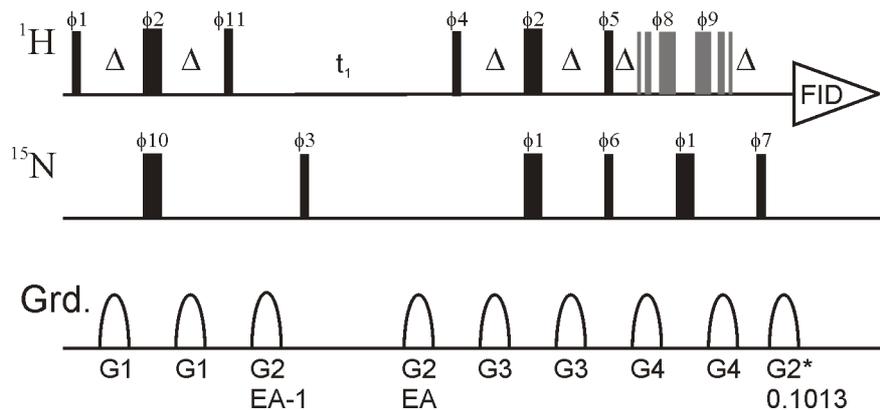


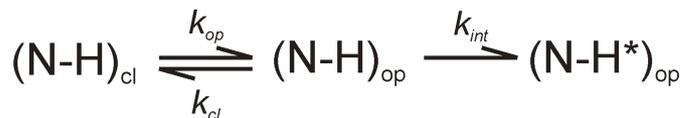
Abb. 8: Pulssequenz des $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ sgTROSY-HSQC (Weigelt 1998)

Schmale und breite ausgefüllte schwarze Rechtecke repräsentieren 90° - bzw. 180° -Pulse. Graue Rechtecke stellen die Pulse des 3-9-19 WATERGATE (Piotto et al. 1992) dar. Die Aufnahme während des freien Induktionsverfalls ist mit FID gekennzeichnet. Offene Halbellipsen stehen für z-Gradienten. Die relativen Gradientenstärken betragen 50%, -80%, -30% und -65%. Der letzte Gradient beträgt das 0,1013 fache der Gradientenstärke 2. Δ beträgt 2,65 ms. Für die indirekte Dimension wird t_1 inkrementiert. Die Phasenzyklen lauten $\phi_1=(x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$, $\phi_2=(y, y, -x, -x, -y, -y, x, x)$, $\phi_3=(y, -y, -x, x, -y, y, x, -x)$, $\phi_4=(y, y, -x, -x, -y, -y, x, x)$, $\phi_5=(-x, -x, -y, -y, x, x, y, y)$, $\phi_6=(y, y, -x, -x, -y, -y, x, x)$, $\phi_7=(x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$, $\phi_8=(x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$, $\phi_9=(-x, -x, -y, -y, x, x, y, y)$, $\phi_{10}=(x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$, $\phi_{11}=(-y, -y, x, x, y, y, -x, -x)$ und für den Empfänger $(x, -x, y, -y, -x, x, -y, y)$. Die Quadraturdetektion erfolgte durch Inkrementierung von ϕ_3 , ϕ_4 , ϕ_7 , ϕ_{10} , des Empfängers und der mit EA gekennzeichneten Gradienten im Echo-Antiecho Modus, wobei EA-1 ein zu EA invertierter Gradient ist.

2.2.3 Amidprotonenaustausch

Die N-H Bindungen sind im Gegensatz zu C-H Bindungen aufgrund der unterschiedlichen Elektronegativität stark polarisiert was dazu führt, dass die Protonen mit denen des Lösungsmittels (Wasser) austauschen. Dieser Austausch im wässrigen Lösungsmittel ist sowohl säure- (H_3O^+) als auch basenkatalysiert (OH^-). Dabei ist die Basenkatalyse deutlich effizienter. Dies führt zu einer starken pH-Abhängigkeit mit einem Minimum bei einem pH-Wert von 4, bei größeren pH-Werten dominiert eindeutig der basenkatalysierte Amidprotonenaustausch. Zusätzlich hängt der Austausch der Amidprotonen noch von der Temperatur sowie von der Natur der eigenen Seitenkette und der der Vorgängerringaminosäure ab. In entfalteten Peptiden und Proteinen findet der Austausch auf einer Millisekunden- bis Sekundenzeitskala statt. Sind die Amidprotonen hingegen in Wasserstoffbrücken involviert und/oder vom Lösungsmittel abgeschirmt verlangsamt er sich dramatisch (Stunden bis Wochen). In gefalteten Proteinen läuft der Austausch vorrangig innerhalb transient vorliegende ent- oder teilgefaltete Konformationen des Proteins ab. Wie schnell der Austausch stattfindet, hängt daher davon ab, wie oft solche austauschkompetenten Konformationen vorliegen. Aus der Kinetik des Amidprotonenaustauschs kann somit auf solche Konformationen geschlossen werden (Bai et al. 1995). Experimentell wird der Amidprotonenaustausch dadurch bestimmt, dass zunächst protoniertes Protein in D_2O Puffer gebracht wird. Da an Stickstoff gebundenes Deuterium zu keinem Kreuzsignal im ^{15}N -HSQC führt, ist ein fortschreitender Austausch des Amidprotons gegen Deuterium mit einem zeitabhängigen Intensitätsverlust der Amidkreuzsignale verbunden. Die Rate des Austausches lässt sich nach dem Schema in Abb. 10 analysieren.

Gefaltete Proteine lassen sich fast über den gesamten pH-Bereich entweder nach dem EX2 oder dem EX1 Mechanismus auswerten (Bai et al. 1994). Im EX2 Mechanismus (Reaktion zweiter Ordnung abhängig von der Konzentration an Protein und OH^-) lassen sich (wegen $k_U \gg k_{int}$) bei Kenntnis des Austauschverhaltens entfalteter Peptide (Bai et al. 1993) somit Informationen zum Quasigleichgewicht zwischen der geschützten nativen und der austauschkompetenten lokal bzw. global entfalteten Konformation erhalten. Der so erhaltene Schutzfaktor (PF) lässt sich gemäß $\Delta G_{\text{NU}}^0 = R \cdot T \cdot \ln(\text{PF})$ in thermodynamische Stabilität der Entfaltung umrechnen. Dagegen ist der Austausch im EX1-Regime unabhängig vom pH-Wert und ermöglicht eine Aussage über die Rate (k_{op}) mit der die austauschkompetente Konformation eingenommen wird.



mit $k_{\text{cl}} \gg k_{\text{op}}$ (gefaltetes Protein) $k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}} k_{\text{int}}}{k_{\text{cl}} + k_{\text{int}}}$

EX2 $k_{\text{cl}} \gg k_{\text{int}}$ $k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}} k_{\text{int}}}{k_{\text{cl}}} = K_{\text{op}} k_{\text{int}}$ $\text{PF} = \frac{1}{K_{\text{op}}}$

$$\Delta G_{\text{NU}}^0 = RT \ln(\text{PF})$$

EX1 $k_{\text{cl}} \ll k_{\text{int}}$ $k_{\text{ex}} = k_{\text{op}}$

Abb. 10: Schema und Gleichungen zur Analyse des Amidprotonenaustausches

Angenommen wird ein geschlossener, gefalteter Zustand (cl), der mit einem offenen, austauschkompetenten (op) im Gleichgewicht steht. In diesem kann das Amidproton (N-H) mit dem Lösungsmittel austauschen (zu NH*). Dabei werden die Öffnungsrate mit k_{op} , die Schließrate mit k_{cl} und die intrinsische Austauschrate mit k_{int} bezeichnet. Unter Annahme eines gefalteten Proteins lässt sich für die Fälle EX2 und EX 1 die gemessene Austauschrate (k_{ex}) folgendermaßen interpretieren: Im EX2-Fall (k_{ex} ist pH-abhängig) als Produkt der Gleichgewichtskonstante (K_{op}) und der intrinsischen Austauschrate (k_{int}). Bei deren Kenntnis (Bai et al. 1993) lässt sich somit die Gleichgewichtskonstante bzw. der Schutzfaktor (PF) berechnen und in die thermodynamische Stabilität der Entfaltung (ΔG_{NU}^0) umrechnen (T: Temperatur in Kelvin, R: ideale Gaskonstante). Im EX1-Fall (k_{ex} ist pH-unabhängig) repräsentiert die Austauschrate direkt die Öffnungsrate (k_{op}).

2.2.4 Millisekundenamidprotonenaustausch

Der in 2.2.3 beschriebene klassische H/D Austausch ist durch das Lösen bzw. Umpuffern in D₂O-haltigen Puffer und anschließendes sequentielles Aufnehmen mehrerer Spektren auf Austauschprozesse beschränkt, die mindestens im Bereich einer oder mehrerer Stunden liegen. Austauschreaktionen im Millisekundenbereich lassen sich mit Hilfe anderer Techniken, wie das newMEXICO Amidprotonenaustauschexperiment verfolgen. Bei diesem wird der Austausch nicht mittels zweier Kerne mit unterschiedlichen Eigenschaften (H→D) detektiert, sondern die Protonen werden durch die Pulssequenz vor jedem scan zu detektierbaren und nicht detektierbaren Protonen präpariert (Gemmecker et al. 1993; Koide et al. 1995; Mori et al. 1997), während sich das Protein die ganze Zeit über im chemischen Gleichgewicht befindet (Abb. 11). Dabei werden zunächst sämtliche Protonen (Stickstoff und Kohlenstoff gebundene Protonen des Proteins, sowie Wasser) in die transversale Ebene gebracht. Während einer Zeit von 55 ms baut sich die longitudinale Magnetisierung des Wassers durch den Effekt des *radiation dampings* (Bloembergen & Pound 1954) wieder auf, während Protonen des Proteins weiterhin dephasiert bleiben. Dabei wirkt die Präzession der durch Wasser hervorgerufenen Magnetisierung in der transversalen Ebene, d.h. eine Radiofrequenz im

Magnetfeld als Puls, der die Magnetisierung des Wassers zurück in z-Richtung (longitudinale Magnetisierung) bringt. Dann wird jegliche Magnetisierung in der transversalen Ebene durch einen Gradienten dephasiert, sie ist im Folgenden nicht mehr detektierbar. Nur Magnetisierung in z-Richtung (also die des Wassers) kann noch angeregt werden. Zusätzlich werden alle Stickstoff-gebundenen Protonen durch einen ^{15}N -Filter erneut dephasiert. Somit wird sichergestellt, dass zum Zeitpunkt null (Beginn von T_{mix} in Abb. 11) keine detektierbaren Protonen an den Amidstickstoffen sitzen, sei es durch longitudinale Relaxation oder Austausch mit Wasser während der 55 ms. Nach einer variablen Wartezeit (in denen der Austausch zwischen den Amididen und dem Lösungsmittel stattfinden kann) wird ein fHSQC Spektrum (siehe 2.2.1) gemessen. Nur Protonen führen zu detektierbaren Amidkreuzsignalen, für die ein Austausch mit dem Wasser stattgefunden hat.

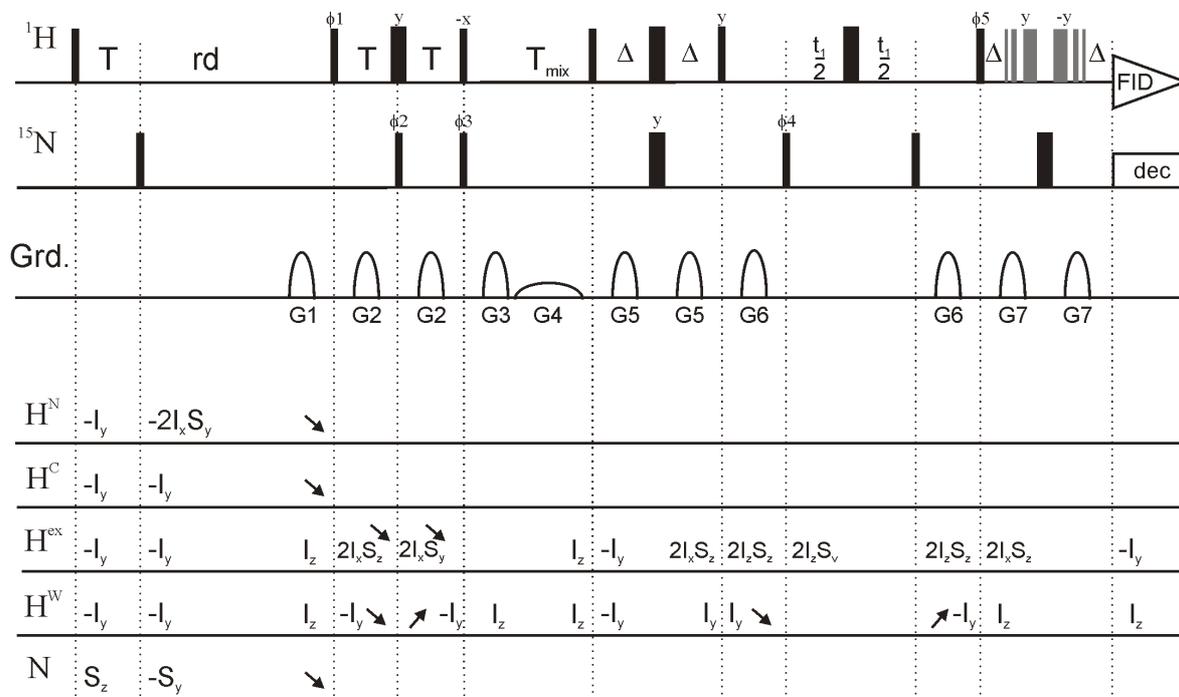


Abb. 11: Pulssequenz des newMEXICO Amidprotonenaustauschexperiments.

Schmale und breite ausgefüllte schwarze Rechtecke repräsentieren 90° - bzw. 180° -Pulse. Graue Rechtecke stellen die Pulse des 3-9-19 WATERGATE (Piotto et al. 1992) da. Offene Halbellipsen stehen für z-Gradienten. Die relativen Gradientenstärken betragen 13%, -10%, -18%, 1%, 13%, 30% und 50%. Δ beträgt 2,5 ms, T 5,5 ms, rd 55 ms und T_{mix} 10 bis 250 ms. Für die indirekte Dimension wird t_1 inkrementiert. Während der Aufnahme (FID) wird mit GARP (Shaka et al. 1985) auf dem ^{15}N Kanal entkoppelt (dec). Alle nicht genannten Phasen der Pulse sind x . Die Phasenzyklen lauten $\phi 1=(x, x, -x, -x)$, $\phi 2=(x, x, x, x, -x, -x, -x, -x)$, $\phi 3=(x, x, x, x, x, x, x, x, -x, -x, -x, -x, -x, -x, -x)$, $\phi 4=(x, -x)$, $\phi 5=(-x, -x, x, x)$ und für den Empfänger $(x, -x)$. Die Quadraturdetektion erfolgte durch Inkrementierung von $\phi 4$ im States-TPPI Modus (Marion et al. 1989). Zusätzlich ist das Verhalten der verschiedenen Kerne im Produktoperatorformalismus beschrieben. H^{N} steht für Amidprotonen, H^{C} für Kohlenstoffgebundene Protonen, H^{ex} für mit dem Wasser ausgetauschte Amidprotonen, H^{W} für die Protonen des Wasser und N für den Amidstickstoff. Nach unten und nach oben zeigende Pfeile stehen für den Prozess der Dephasierung und Rephasierung. Dephasierte Zustände führen zu keinem beobachtbaren Signal und werden nicht weiter betrachtet.

Der Austausch (bzw. Eintausch) zwischen Amidprotonen und Wasser wird nach der Austauschgleichung (Formel 1) zweier Moleküle (Jeener et al. 1979) bei der eines (Wasser) in deutlichem Überschuss vorliegt (Schwartz & Cutnell 1983) bestimmt. Die so bestimmte Austauschrate wird dann analog zu 2.2.3 ausgewertet.

$$Int = \frac{k_{ex}}{R_{1NH} + k_{ex} - R_{1W}} \cdot [\exp(-R_{1W}t) - \exp(-(R_{1NH} + k_{ex})t)]$$

Formel 1: Austauschgleichung zwischen Amidprotonen und Wasser (im Überschuss)

Gezeigt ist der Zusammenhang der gemessenen Intensität (*Int*) in Abhängigkeit der Wartezeit (*t*). Dieser hängt von der Austauschrate zwischen Amidprotonen und Wasser (k_{ex}), sowie der longitudinalen Relaxationsrate der Amidprotonen (R_{1NH}) und des Wassers (R_{1W}) ab, wobei letztere auf 0.42 s^{-1} bestimmt wurde.

2.2.5 Quenched-flow Amidprotonenaustausch

Der in 2.2.3 und 2.2.4 beschriebene Amidprotonenaustausch ermöglicht es, transient vorliegende, austauschkompetente Zustände zu untersuchen. Um jedoch kurzlebige Intermediate im Zeitbereich von Millisekunden bis wenigen Sekunden direkt zu untersuchen, muss der Amidprotonenaustausch mit schnellen Mischtechniken kombiniert werden. Dadurch wird das Protein zu bestimmten Rückfaltungszeiten in definierte Bedingungen gebracht in denen entfaltete ungeschützte Bereiche quantitativ austauschen, während der Austausch in geschützten Bereichen aufgrund der kurzen Austauschzeit minimal ist. So lässt sich der zeitabhängige Aufbau geschützter Bereiche eines Proteins zeitabhängig verfolgen, der Protonierungsgrad zu verschiedenen Rückfaltungszeiten wird sozusagen eingefroren („gequenched“). In diesem *quenched-flow* Ansatz (Briggs & Roder 1992; Radford et al. 1992; Varley et al. 1993) wird dabei entfaltetes protoniertes Protein (in 6 M GdmCl, pH 5,5) mit Rückfaltungspuffer (0 M GdmCl, pH 5,5) im Verhältnis 1 : 8 sehr schnell mit Hilfe zweier Spritzen gemischt. Die resultierende Bedingung (0,67 M GdmCl) erlaubt eine Faltung des Proteins. Nach verschieden langen Rückfaltungszeiten (60ms bis 2s) wird, durch eine 1 : 9 Verdünnung mit Hilfe einer dritten Spritze das Protein in einen Austauschpuffer gebracht, pH 11,0, 90% D₂O. Nach 8,3 ms bei pH 11,0 (Deuteriumpuls) in denen alle Amidprotonen in entfaltenen Bereichen vollständig austauschen wird der Austauschprozess drastisch (ca. 300000fach, $10^{(11-5,5)}$) verlangsamt (*quench*), indem mit Hilfe einer vierten Spritze der pH Wert wieder auf 5,5 gebracht wird. Anschließend wird das Protein in 100% D₂O-Puffer, pH

5,5 (pD 5,1) konzentriert (300 μ M) und $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren gemessen. (Abb. 12). Die so erhaltenen Aufbaukinetiken wurden nur für solche Amidprotonen ausgewertet, die im Kontrollexperiment im nativen Zustand bei pH 5,5 über 24h keinen Austausch zeigten. Zudem erfolgte eine Korrektur, in der die 10% der Protonen im Austauschpuffer berücksichtigt wurden und als Nullwert betrachtet wurden.

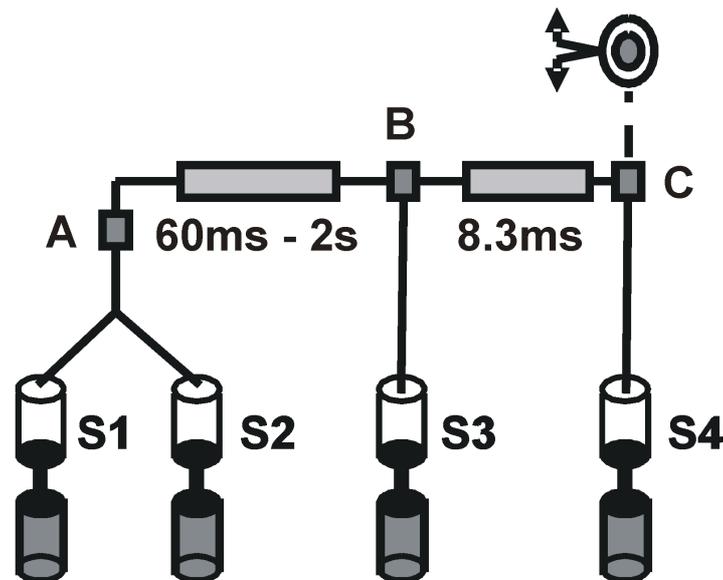


Abb. 12: Schema des quenched-flow Amidprotonenaustausches

Die Spritzen 1-4 (S1-S4) enthalten: **S1** entfaltetes Protein in 50 mM Acetat, 6 M GdmCl, H_2O , pH 5,5; **S2** 50 mM Acetat, 0 M GdmCl, H_2O , pH 5,5; **S3** 20 mM Glycin, 0,667 M GdmCl, D_2O , pD 11,4; **S4** 10M Acetat, 0,667 M GdmCl, 90% D_2O , pD 2. Nach Mischen von **S1** und **S2** im Verhältnis 1 : 8 liegen an Punkt **A** Bedingungen mit 0,667 M GdmCl, H_2O , pH 5,5 vor. Das Protein wird nun nach unterschiedlich langen (60 ms bis 2 s) Rückfaltungszeiten durch eine 1 : 9 Mischung mit **S3** in 0,667 M GdmCl, 90% D_2O , pH 11 gebracht (Punkt **B**) bevor es nach 8,3 ms durch 1 : 2 Mischung mit **S4** in 0,667 M GdmCl, 90% D_2O pH 5,5 in Punkt **C** vorliegt. Nach vollständiger Rückfaltung wird es in 100% D_2O , 0 M GdmCl, pH 5,5 (pD 5,1) konzentriert und anschließend NMR-spektroskopisch untersucht.

2.2.6Faltungsübergänge

Um die Entfaltung eines Proteins im Gleichgewicht auf der Ebene einzelner Aminosäuren zu verfolgen, wurden bei verschiedenen Punkten des Überganges (Temperatur, oder Harnstoff- bzw. GdmCl-Konzentrationen) ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren (siehe 2.2.1) gemessen. Von jedem Messpunkt der Denaturierungsmittel-induzierten Übergänge wurde eine Probe genommen (5 μ l) und die Konzentration an Denaturierungsmittel anhand des Brechungsindex bestimmt (Pace 1986). Im Falle des Harnstoff-induzierten Übergangs wurden Messproben mit verschiedener Harnstoffkonzentration ausgehend von zwei Proteinstammlösungen in 0 M

bzw. 6 M Harnstoff hergestellt, während im Fall des GdmCl-induzierten Übergangs aufgrund der Aggregationsanfälligkeit für jeden Messpunkt eine neue Probe präpariert wurde.

2.2.7 Echtzeit-NMR

Langsame Faltungsreaktionen von Proteinen im Bereich von Sekunden bis Stunden lassen sich über eine Serie von nacheinander aufgenommenen NMR-Spektren in Echtzeit verfolgen (Balbach et al. 1995). Grundsätzlich sind dabei die Fälle von 1D- (Balbach et al. 1995) und 2D-Echtzeitexperimenten (Balbach et al. 1996) zu unterscheiden. Im 1D-Fall (^1H) lassen sich Spektren relativ schnell (alle 10 s) bzw. mit deutlich besserem Signal zu Rausch Verhältnis (S/N) messen. Dafür beschränkt sich die Information dieser Spektren auf globalen Aussagen, da kaum einzelne Resonanzen, die spezifisch einem Proton zugeordnet sind, beobachtet werden können. Um Aussagen über das Verhalten individueller Reste treffen zu können, muss auch in diesem Fall auf 2D-Experimente zurückgegriffen werden. Diese dauern jedoch deutlich länger, von mehreren Minuten (>5) bis, bei schlechtem S/N, hin zu mehreren Stunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Varianten durchgeführt.

Um den Zustand von Onconase vor der Isomerisierung zu charakterisieren (ent- oder teilgefaltet) wurde 1D-Protonen-Echtzeitspektroskopie angewendet. Zur Verbesserung der zeitlichen Auflösung wurden die Experimente direkt im NMR-Probenkopf durch Mischen mit einer Spritze, welche sich außerhalb des Spektrometers befindet, gestartet. Dadurch wird keine Zeit zur Temperatureinstellung benötigt, allerdings vergehen bis die durch den Mischvorgang hervorgerufenen Inhomogenitäten abgeklungen sind etwa 10 Sekunden.

Im Fall der Charakterisierung des transienten Zustandes des G3P mit inkorrektem *trans* Pro213, auf der Basis einzelner Aminosäurereste wurde 2D Echtzeitspektroskopie eingesetzt. Aufgrund der extrem langsamen Reaktion (Abb. 6B) wurde die Reaktion durch Mischen außerhalb des Spektrometers gestartet. Das schlechte S/N machte Aufnahmezeiten der Spektren von über 2h notwendig. Deshalb wurde während der Reaktionszeit von 8h keine Serie von Experimenten gemessen, sondern ein einziges 2D-Spektrum während der Reaktion (kinetisches Spektrum), welches Signale des nativen und des intermediären Zustands enthält. Zusätzlich wurde nach der Reaktion ein identisches Spektrum (Referenzspektrum) gemessen, welches nur den nativen Zustand enthält. Aus diesen beiden Spektren und dem daraus errechneten Differenzspektrum (Referenzspektrum minus kinetisches Spektrum) lassen sich nun drei verschiedene Fälle unterscheiden, die zu unterschiedlichen Signalen führen (Steebhorn et al. 2000) (Abb. 13): (1) Reste, die im Intermediat schon in nativer chemischer Umgebung waren geben im kinetischen und im Referenzspektrum identische Signale und im

Differenzspektrum folglich kein Signal. (2) Reste, die im Verlauf der Reaktion erst ihre native chemische Umgebung einnehmen, geben im Referenzspektrum (in dem 100% der Moleküle zur ganzen Zeit nativ sind) ein stärkeres Signal als im kinetischen Spektrum und im Differenzspektrum somit ein positives Signal. Somit lässt sich für jeden Rest unterscheiden, ob er im Intermediat schon in einem nativ strukturierten Bereich ist, oder nicht. Reste, die im Intermediat noch nicht in ihrer nativen chemischen Umgebung sind, geben zudem (3) zusätzliche Signale im kinetischen Spektrum und somit negative Signale im Differenzspektrum. Aufgrund der fehlenden Zuordnung der Signale des Intermediates wurde der dritte Datensatz jedoch nicht ausgewertet.

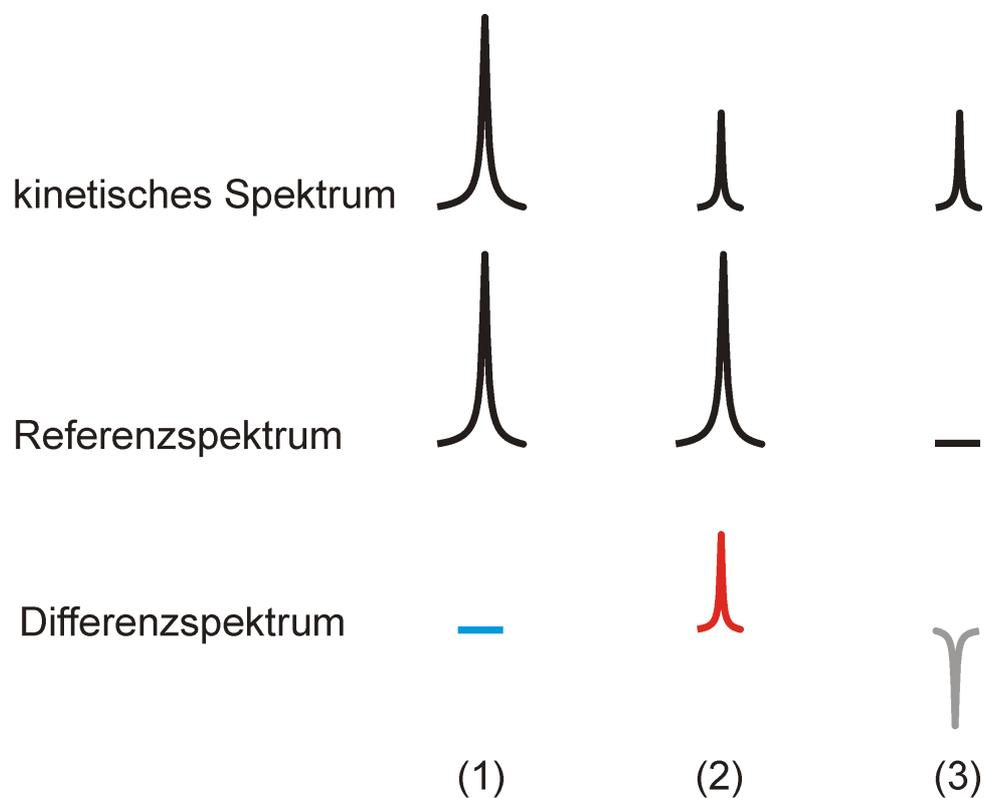


Abb. 13: Schematische Darstellung des Echtzeit-NMR Experimentes.

Gezeigt ist das Verhalten von drei unterschiedlichen Sätzen von Signalen (1-3). Reste, die in I in nativer chemischer Umgebung sind (1), geben ein identisches Signal im kinetischen Spektrum und Referenzspektrum und keines im Differenzspektrum (Referenzspektrum – kinetisches Spektrum). Reste die in I nicht in nativer chemischer Umgebung sind (2) geben im kinetischen Spektrum ein vermindertes Signal im Vergleich zum Referenzspektrum und damit ein positives Signal im Differenzspektrum. Signale vom intermediären Zustand (3) treten nur im kinetischen Spektrum auf und ergeben somit ein negatives Signal im Differenzspektrum. Da es für sie keine Zuordnung gibt, werden sie nicht ausgewertet.

2.2.8 Konkurrenz zwischen Rückfaltung und Amidprotonenaustausch

Mit den in 2.2.7 beschriebenen Echtzeit-NMR-Experimenten erhält man strukturelle Aussagen über Faltungsintermediate von Proteinen. Um nun die thermodynamische Stabilität des Intermediates zu untersuchen, muss man das Rückfaltungsexperiment mit Amidprotonenaustausch kombinieren (Schema Abb. 14) (Koide et al. 1993; Steegborn et al. 2000). Hierfür wurde, für Untersuchungen des G3P, die Rückfaltung des entfalteten Proteins (in 4 M GdmCl) durch vierfache Verdünnung in Rückfaltungspuffer initiiert. Nach 5 min liegt das Intermediat quantitativ populiert vor, da alle Faltungsprozesse wie die Faltung der N1-Domäne ($\tau_1 = 9,4\text{ms}$), die Faltung der N2-Domäne ($\tau_2 = 7\text{s}$) sowie die lose Assoziation der Domänen ($\tau_3=42\text{s}$) bereits abgelaufen sind (Martin & Schmid 2003b) (siehe Abb. 6B). Nun wird der Puffer mittels einer NAP-Säule (GE Healthcare) von protoniertem zu deuteriertem (0 M GdmCl) gewechselt und somit der Austausch der Amidprotonen gestartet. Für alle Reste, die im nativen Zustand stark geschützt sind, und während der Zeit des Experimentes (Rückfaltungszeit) keinen Austausch zeigen, muss ein gemessener Austausch im intermediären Zustand erfolgt sein. Dies wurde mittels eines H/D Austauschexperimentes (2.2.3) bestimmt. Der Anteil des Austausches wird direkt über die relativen Intensitäten der Signale (Konkurrenzexperiment im Vergleich zu Referenzexperiment, mit bereits nativem Protein) erhalten. Dies wird durch ^{15}N -TROSY-HSQC Spektren beider Ansätze, die nach der Rückfaltungszeit (10h > 5 mal die Zeitkonstante von 6200s) gemessen wurden, erreicht. Die Intensitäten wurden dabei um den Betrag von aggregiertem Protein im Rückfaltungsexperiment, welcher durch Absorptionsmessung ermittelt wurde, korrigiert. Unter Annahme einer exponentiellen Rückfaltungskinetik und eines exponentiellen Austauschverhaltens lassen sich nach Formel 2 über den relativen Protonenbesetzungsgrad somit Schutzfaktoren des Intermediates berechnen. In dieser Endpunktsbestimmung werden Austauschraten aus Intensitäten gewonnen. Abb. 15 zeigt exemplarisch die Abnahme des Protonenbesetzungsgrades im Verlauf der Rückfaltung für drei verschiedene Austauschraten. Relativ exakt lassen sich die Schutzfaktoren für relative Intensitäten zwischen 0,03 und 0,99 bestimmen. Jenseits dieser Grenzen führen kleine Messungenauigkeiten zu großen Veränderungen des bestimmten Schutzfaktors (0,9999 führt im Vergleich zu 0,999 zu einem 10fach höheren Schutzfaktor), eine quantitative Bestimmung ist nicht mehr sinnvoll.

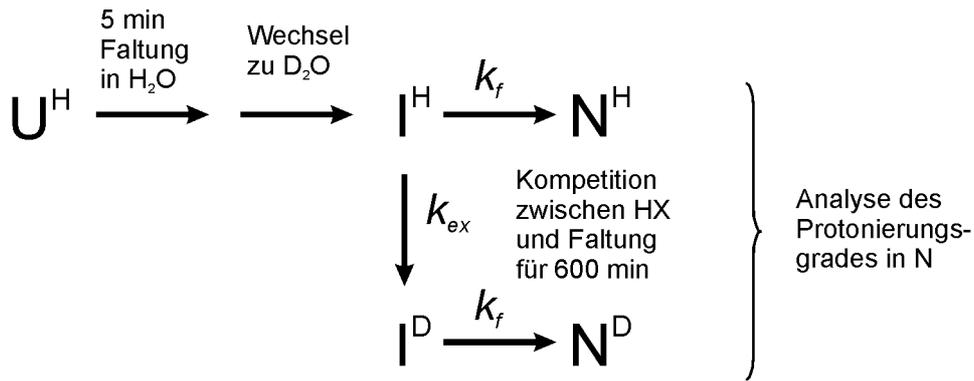


Abb. 14: Schema der Konkurrenz zwischen Amidprotonenaustausch (HX) und Faltung

Entfaltetes protoniertes Protein (U^H) wird in H_2O gefaltet, bis es vollständig in I und N vorliegt. Durch anschließenden Wechsel des Lösungsmittels nach D_2O wird der Austausch induziert. Während der langsamen Faltung (mit der Ratenkonstante k_f) kann ein Amidproton des Proteins aus dem protonierten intermediären Zustand (I^H) entweder den nativen Zustand (N^H) erreichen, in dem es vor Amidprotonenaustausch geschützt ist, oder es tauscht mit D_2O aus (mit der Austauschrate k_{ex}). In diesem wird deuteriertes Intermediat (I^D) erhalten das dann einen nativen Zustand ohne detektierbares Proton (N^D) einnimmt.

$$P = \frac{k_{int} \cdot S}{k_f \cdot (1 - S)} \quad ; \quad S = \frac{I_{comp}}{I_{ref}}$$

Formel 2: Berechnung der Schutzfaktoren aus dem Konkurrenzexperiment

P ist der Schutzfaktor, k_{int} die intrinsische Austauschrate (Bai et al. 1993), k_f die Rückfaltungsrate ($0,009677 \text{ min}^{-1}$). Der Protonenbesetzungsgrades S der einzelnen Amidprotonen wird aus dem Quotienten der Intensität aus dem Konkurrenzexperiment (verbliebene Protonen; I_{comp}) und der Intensität aus dem Referenzexperiment (100% Protonen; I_{ref}) erhalten.

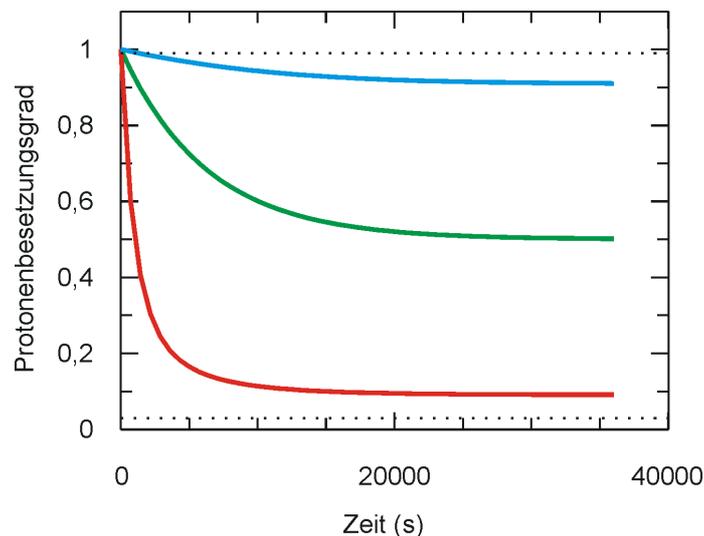


Abb. 15: Bestimmung von Austauschraten mittels Endpunktanalyse

Gezeigt sind 3 verschiedene simulierte Austauschkinetiken. Bei der grünen Kurve wurde die Austauschrate gleich der Rückfaltungsrate ($0,0097 \text{ min}^{-1}$) gesetzt, bei der blauen wurde sie zehnmal langsamer, bei der roten Kurve zehnmal schneller gewählt. Die gezeigten Kurven hängen von den Austauschraten der mit der Rückfaltungsrate abnehmenden Population des Intermediates ab und wurden mit dem Programm Scientist (MicroMath) simuliert. Nach 36000s (Ende der Kurven) werden die Intensitäten nach Formel 2 analysiert. Die gepunkteten Linien bei 0,03 bzw. 0,99 zeigen die Grenzen in denen eine quantitative Analyse der Endpunkte sinnvoll ist.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung von intermediären Faltungszuständen aus dem Ensemble des nativen Zustands

Proteine liegen unter nativen Bedingungen zwar überwiegend in ihrer nativen Form vor, zu einem sehr geringen Maße liegen sie, gemäß ihrer Gleichgewichtskonstante, jedoch auch in ent- oder teilgefalteter Form vor (Abb. 16). Das Austauschverhalten der Amidprotonen mit dem Wasser unterscheidet sich jedoch sehr stark je nach Zustand. So tauschen Protonen im entfalteten Zustand im Bereich von Millisekunden bis Sekunden aus, in gefalteten Bereichen von Proteinen ist der Austausch jedoch verlangsamt bis zu einem Zeitbereich von Tagen, Wochen oder auch Jahren. Das Austauschverhalten der Amidprotonen wird aufgrund der sehr großen Zeitunterschiede von teilge- bzw. entfalteten Zuständen geprägt, auch wenn diese im zeitlichen Mittel nur gering populiert vorliegen. Somit ermöglichen Amidprotonenaustauschexperimente Einblicke in diese austauschkompetenten Formen (gestrichelte Kästchen in Abb. 16). Während die am langsamsten austauschenden Aminosäuren nur im Fall einer kompletten Entfaltung des Proteins austauschen (Abb. 16 U), lässt sich ein erhöhter Austausch auf zwei verschiedene Ursachen zurückführen. Zum einen können Amidprotonen in Bereichen liegen, die von vornherein nicht geschützt sind oder ihren durch lokale Fluktuationen innerhalb des nativen Zustands verlieren (*local breathing*, o in Abb. 16 N). Zum anderen kann der erhöhte Austausch dadurch zustande kommen, dass diese Aminosäuren bereits in einem Intermediat in nicht geschützten Bereichen liegen und deshalb austauschen können (Abb. 16 I). Sie würden also keine globale Entfaltung benötigen um auszutauschen. Experimentell unterscheiden lassen sich diese beiden Fälle durch Zugabe von Denaturanzien, welche das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Faltungszuständen beeinflussen. Dadurch werden lokale Fluktuationen innerhalb des nativen Zustands nicht beeinflusst, die Population eines Intermediates und seine Auswirkung auf den Austausch aber sehr wohl (Mayo & Baldwin 1993).

Quantitativ analysieren lassen sich die Austauschraten, wenn sie entweder dem EX2- oder dem EX1-Mechanismus folgen (Abb. 10). Im EX2-Fall erhält man Aussagen über das Gleichgewicht zwischen N und U, bzw. N und I, je nachdem ob das jeweilige Amidproton erst nach globaler Entfaltung oder bereits nach einer Teilentfaltung zum Intermediat austauschen kann. Im EX1-Fall erhält man analog dazu Informationen über die Raten $N \rightarrow U$, bzw. $N \rightarrow I$.

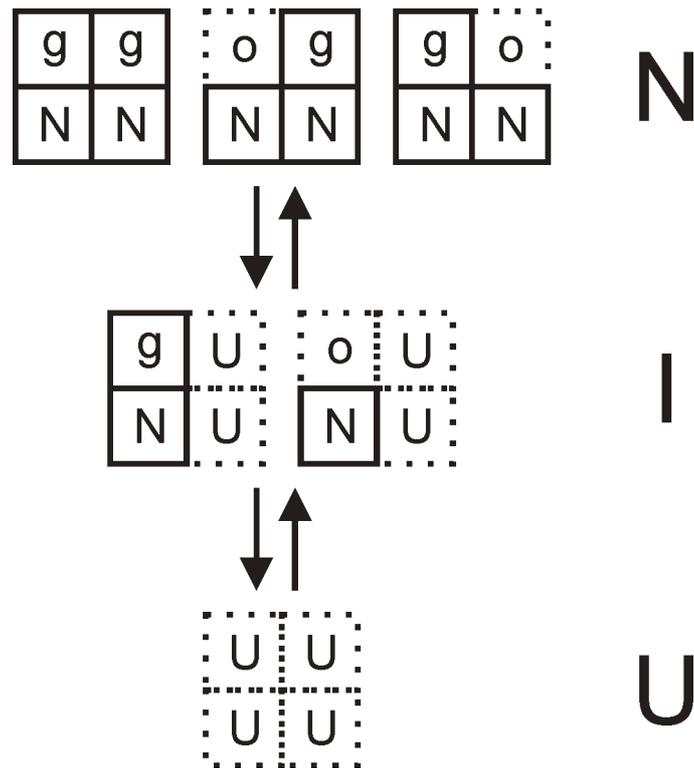


Abb. 16: Schema des Austauschverhaltens im nativen Ensemble.

Gezeigt sind die unter nativen Bedingungen auftretenden Zustände: nativ (**N**), intermediär (**I**), entfaltet (**U**). Geschützte gefaltete Bereiche sind mit N gekennzeichnet, wenn sie entfaltet sind mit U. Wenig geschützte Bereiche sind in geschlossener Form mit g, in offener mit o benannt. Austauschkompetente Zustände sind mit gepunkteten Linien umrandet, Zustände in denen kein Austausch stattfindet mit geschlossenen Linien.

3.1.1 Das Ankyrin-repeat Protein P19

3.1.1.1 Vorarbeiten

Während Fluoreszenz- oder CD- detektierte Gleichgewichtsübergänge von P19 auf einen Zweizustandsmechanismus hindeuteten, zeigte ein mit NMR-Spektroskopie detektierter Harnstoff-induzierter Übergang das Vorhandensein eines niedrig populierte Gleichgewichtsintermediates (Zeeb et al. 2002). Die Übergänge aus nativen und entfalteten Signalen zeigten unterschiedliche Übergangsmittelpunkte, zudem wurden im Bereich des Übergangsmittelpunktes zusätzliche Signale beobachtet, die von einem Intermediat stammen mussten. Allerdings lies sich nicht klären, welche Reste bereits im Intermediat entfaltet sind. Christian Löw konnte in seiner Arbeit (Löw et al. 2007; Löw 2008) in kinetischen Analysen je 2 Ratenkonstanten der Faltung und Entfaltung beobachten. Zudem zeigten die Fluoreszenzkinetiken einen transienten hyperfluoreszierenden Zustand, der eindeutig auf ein Faltungsintermediat zurückzuführen ist. Eine vollständige kinetische Analyse ließ sich mit einem linearen Dreizustandsmodell ($N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$) durchführen und lieferte Stabilitäten von $\Delta G^0_{NU} = 26,4 \text{ kJ/mol}$, $\Delta G^0_{NI} = 14,8 \text{ kJ/mol}$ und $\Delta G^0_{IU} = 12,3 \text{ kJ/mol}$.

Um das Intermediat strukturell mit NMR-Spektroskopie beschreiben zu können, wurde auf die publizierte Zuordnung der Amidprotonen von P19 von Baumgartner (Baumgartner et al. 1998) zurückgegriffen. Die daraus übertragene Zuordnung auf die in dieser Arbeit verwendeten Meßbedingungen ist in Abb. 17 gezeigt.

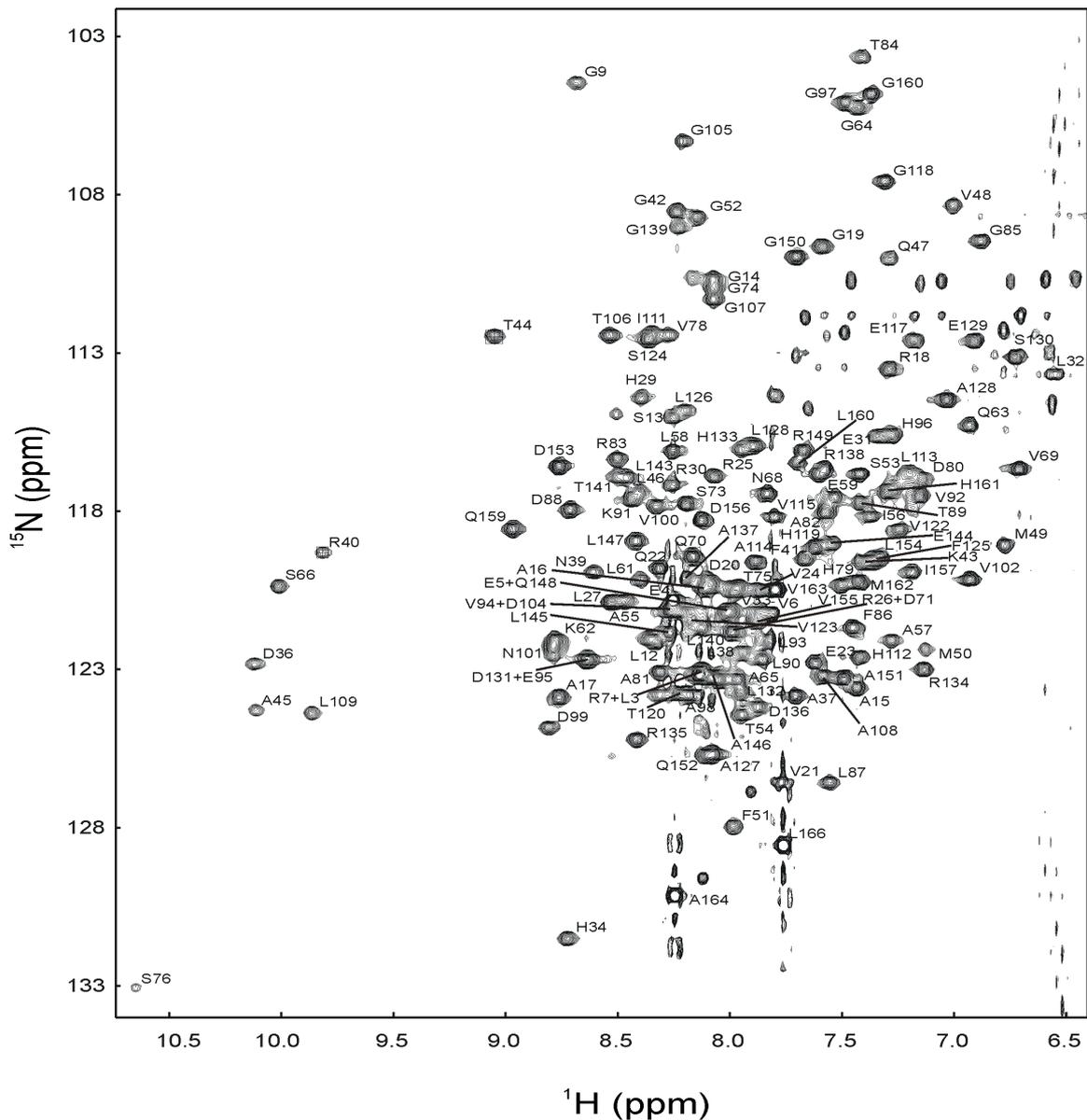


Abb. 17: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC von P19.

Die Aufnahme erfolgte bei 15°C, in 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,5. Amidprotonen sind im Einbuchstabencode beschriftet.

3.1.1.2 Lokale Stabilität von P19 unter nativen Bedingungen

Da sich die Stabilitäten des $\text{N} \rightarrow \text{U}$ und $\text{N} \rightarrow \text{I}$ Überganges stark unterscheiden ($\Delta G^0_{\text{NU}} = 26,4$ kJ/mol, $\Delta G^0_{\text{NI}} = 14,8$ kJ/mol), wurde ein Amidprotonenaustauschexperiment unter nativen Bedingungen (15°C, 0M Denaturierungsmittel) durchgeführt, um die Reste, welche in I entfaltet sind, von denen unterscheiden zu können, welche in I noch nativ gefaltet sind. Für 64 Reste konnten Austauschkinetiken gemessen und ausgewertet werden, und unter Annahme des EX2-Mechanismus (aus Stabilität und Schließraten) in Schutzfaktoren und anschließend in ΔG^0 -Werte umgerechnet werden. Trägt man die Schutzfaktoren in Abhängigkeit der

Proteinsequenz auf (Abb. 18), zeigt sich eine klare Zweiteilung im Molekül. Reste der Ankyrin-*repeats* (ANK) 1 und 2 sind deutlich (100fach) niedriger geschützt als die der Ankyrin-*repeats* 3-5. Die Stabilität der *repeats* 3-5 ($\Delta G^0(\text{HD}) = 27,5 \text{ kJ/mol}$) korreliert sehr gut mit der globalen Stabilität, während die der *repeats* 1-2 ($\Delta G^0(\text{HD}) = 18,2 \text{ kJ/mol}$) mit denen des N \rightarrow I Überganges übereinstimmt. ANK 3-5 sind somit im Intermediat eindeutig gefaltet, während die niedrige Stabilität von ANK 1-2 sowohl auf Entfaltung im Intermediat als auch auf lokale Entfaltungsereignisse zurückzuführen sein kann. Zumindest ein ANK muss in I entfaltet vorliegen, da sich das Intermediat sonst gar nicht im Amidprotonenaustausch widerspiegeln würde. Die gute Korrelation mit den ΔG^0 -Werten aus der Denaturierungsmittel- induzierten Entfaltung, und Unwahrscheinlichkeit der Tatsache, dass zwei Vorgänge, lokale Fluktuation und Entfaltung, zu den gleichen Schutzfaktoren in zwei benachbarten *repeats* führen, lassen jedoch sehr stark annehmen, dass sowohl ANK 1 als auch ANK 2 im Intermediat entfaltet vorliegen.

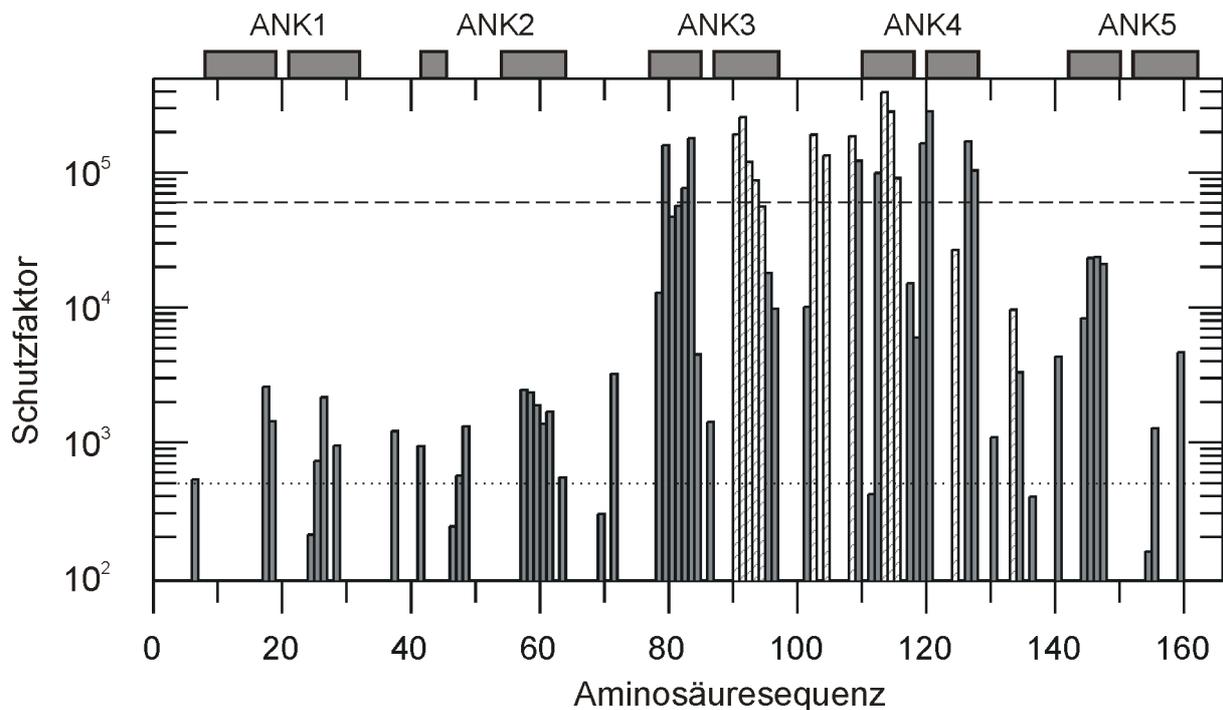


Abb. 18: Schutzfaktoren von P19.

Logarithmische Auftragung der Schutzfaktoren (15°C, pH 7,5) gegen die Aminosäuresequenz. Bei den schraffierten Balken sind die Austauschraten so langsam, dass sie nur anhand der am langsamsten messbaren Reste abgeschätzt wurden. Sie stellen somit einen unteren Grenzwert dar. Die einzelnen Helices sind als graue Querbalken über der Abbildung gezeigt, die fünf Ankyrin-*repeats* mit ANK 1-5 beschriftet. Die aus dem Faltungsmodell ermittelten Gleichgewichtskonstanten sind gestrichelt (N \rightleftharpoons U) bzw. gepunktet (N \rightleftharpoons I) gezeigt.

3.1.1.3 Die Ankyrin-*repeats* 3-5 bilden den Faltungskern in P19

Eine vollständige kinetische Analyse der Faltung von P19 (Löw et al. 2007; Löw 2008) (3.1.1.1) zeigte erstens das Vorhandensein eines „*on pathway*“ Faltungsintermediates und

zweitens, dass die Bildung dieses Intermediates der ratenlimitierende Schritt der Rückfaltung ist. Ist das Intermediat erst einmal gebildet, wird der native Zustand vergleichsweise schnell erreicht. Durch Amidprotonenaustausch (3.1.1.2) konnte gezeigt werden, dass die Ankyrin-*repeats* 3-5 die globale Stabilität besitzen, während die *repeats* 1 und 2 eine deutlich niedrigere Stabilität aufweisen, die mit der des N→I Überganges übereinstimmt (Abb. 19). Bestätigt wurde dieser Befund durch eine Deletion der ersten beiden Ankyrin-*repeats*. Die Faltung des so erhaltenen Fragmentes (ANK 3-5) lässt sich nach dem Zweizustandsmodell beschreiben, die Faltungsraten entsprechen denen des I ⇌ U Überganges in Vollängen P19 (Löw et al. 2007). Diese Ergebnisse lassen sich mit einem Modell beschreiben, in dem zuerst ANK 3-5 falten und somit ein Gerüst für die anschließende Faltung von ANK 1 und 2 bilden. Im nativen Protein entfalten ANK 1 und 2 viel häufiger als das gesamte Protein, die spontane Entfaltung läuft zumeist nur bis zum Intermediat.

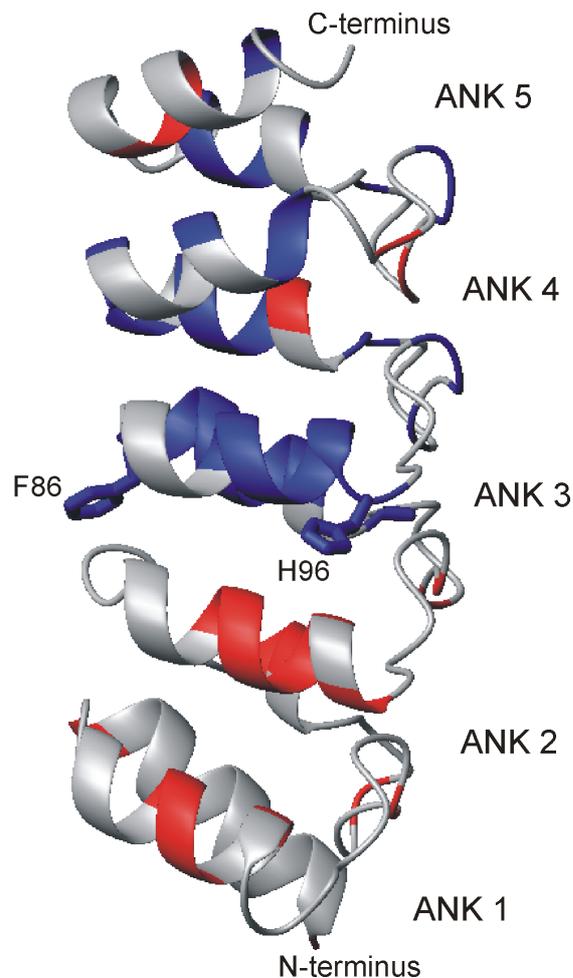


Abb. 19: Strukturelle Beschreibung des Faltungsintermediates von P19.

Gezeigt ist die Kristallstruktur von P19 (1bd8.pdb) als Bänderdarstellung. Die Seitenketten der für Fluoreszenzkinetiken verwendeten Mutationsstellen sind gezeigt. Die Ankyrin-*repeats* sind mit ANK 1-5 beschriftet. Reste mit Schutzfaktoren >12000 sind blau eingefärbt und stellen native Bereiche in I da. Reste mit Schutzfaktoren <12000 sind rot eingefärbt.

3.1.2 Das Eindomänen Modellprotein Barstar

3.1.2.1 Vorarbeiten zur Faltung

Hagen Hofmann konnte in seiner Arbeit (Hofmann et al. 2009) zeigen, dass Barstar über den gesamten Harnstoffbereich, der für eine vollständige Entfaltung des Proteins benötigt wird, in zwei detektierbaren Phasen faltet und entfaltet. Um dieses kinetisch (Fluoreszenz *stopped-flow*) gut untersuchte Intermediat strukturell zu beschreiben, wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen (3.1.2.2) wurde die harnstoffabhängige Faltung im Gleichgewicht auf HSQC-Ebene mit NMR untersucht (2.2.6) um eine eventuelle Population des Intermediates verfolgen zu können. Außerdem (3.1.2.3) wurden Amidprotonenaustauschexperimente im Millisekundenbereich durchgeführt. Dabei wurde auf die publizierte Zuordnung der Amidkreuzsignale (Lubienski et al. 1993) zurückgegriffen. Die daraus übertragene Zuordnung auf die in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen ist in Abb. 20 gezeigt.

3.1.2.2 NMR-detektierter Harnstoff-induzierter Gleichgewichtsübergang

Die Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsentfaltung wurde auf Ebene einzelner Aminosäuren, wie in 2.2.6 beschrieben, durchgeführt. Für 48 Aminosäuren konnten vollständige Übergangskurven (Abb. 21) für spektral getrennt vorliegende Kreuzsignale aufgenommen werden. All diese Kurven ließen sich nach dem Zweizustandsmodell auswerten und zeigten identische Mittelpunkte von $2,66 \pm 0,18$ M im Rahmen der Fehler. Die aus den Übergangskurven bestimmten freien Entfaltungsenthalpien sind in Abb. 22 gezeigt. Die Übergangskurven entfalteter Reste zeigten den gleichen Mittelpunkt und es wurden bei keiner Harnstoffkonzentration zusätzliche Signale zu den Resonanzen von N und U beobachtet. Somit konnten im Gleichgewicht keine Hinweise auf ein sich populierendes Intermediat gefunden werden.

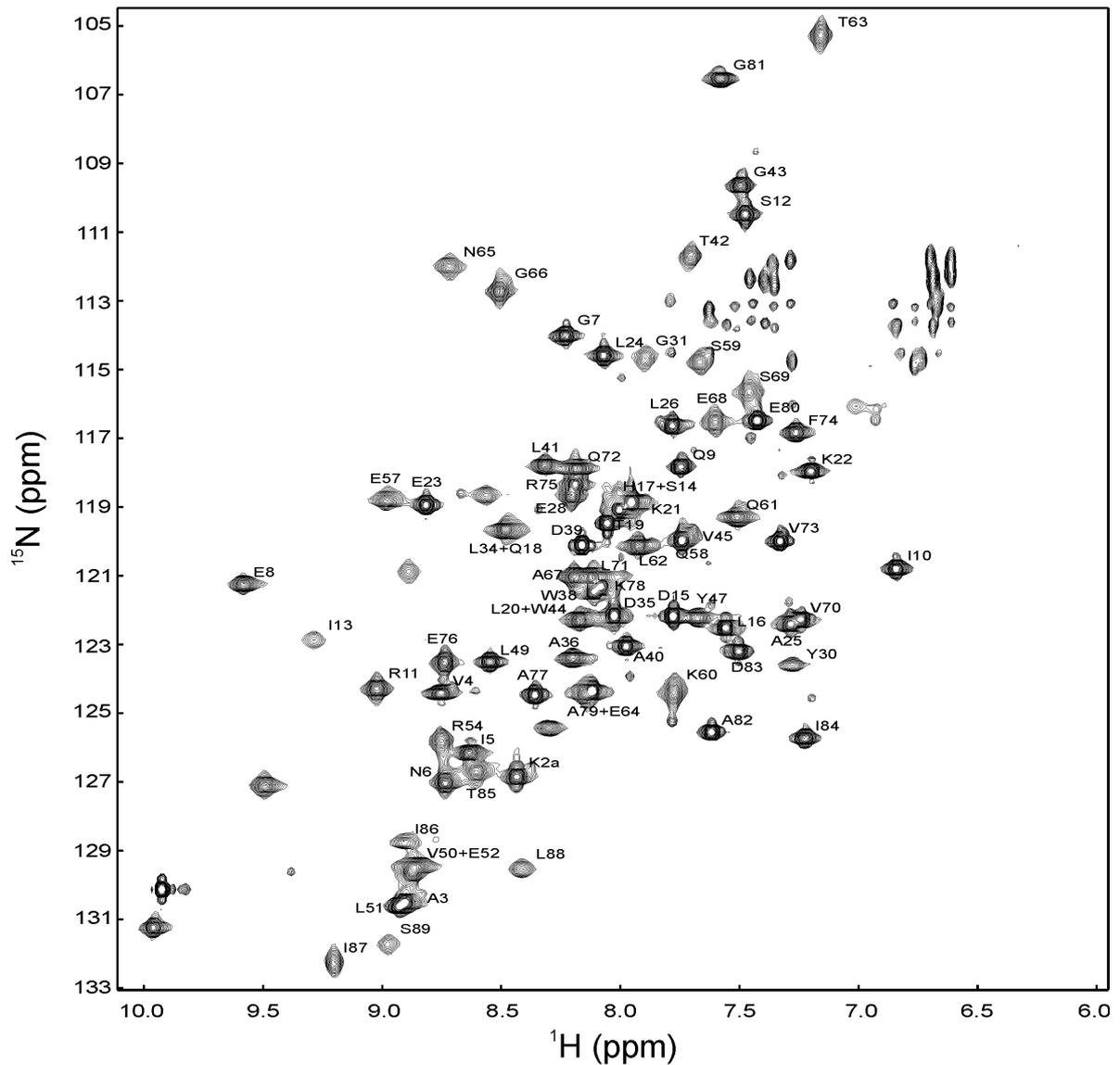


Abb. 20: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC von Barstar.

Die Aufnahme erfolgte bei 25°C, in 50 mM Na-Phosphat, pH 7,0. Amidprotonen sind im Einbuchstabencode beschriftet.

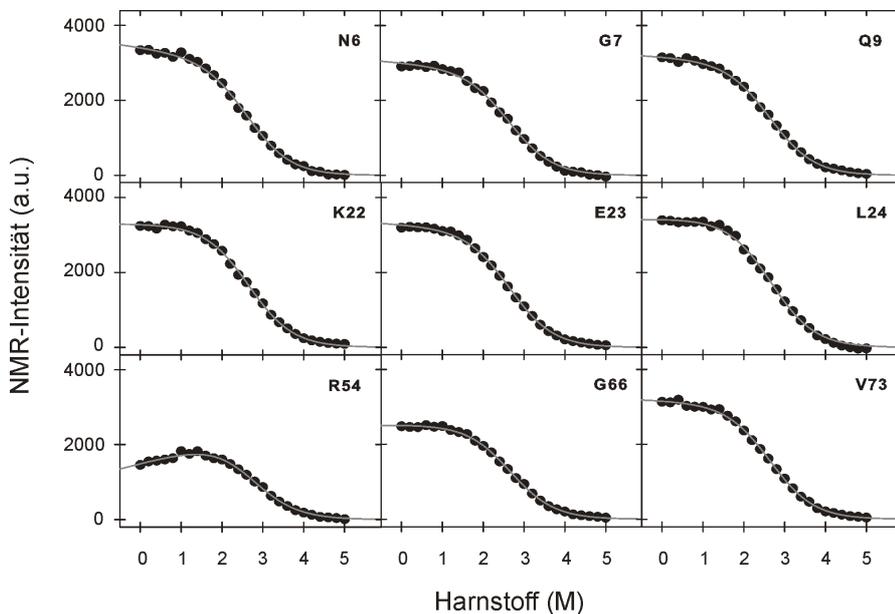


Abb. 21: Harnstoff-induzierter Gleichgewichtsübergang von Barstar

Dieser wurde mit ^{15}N -TROSY-HSQC Spektren bei 25°C, pH 7,0 gemessen. Gezeigt sind neun exemplarische Kurven, bei denen die aus den einzelnen Kreuzsignalen gewonnene Intensität gegen die jeweilige Harnstoffkonzentration aufgetragen ist. Der Fit nach dem Zweizustandsmodell ist als graue Linie eingezeichnet.

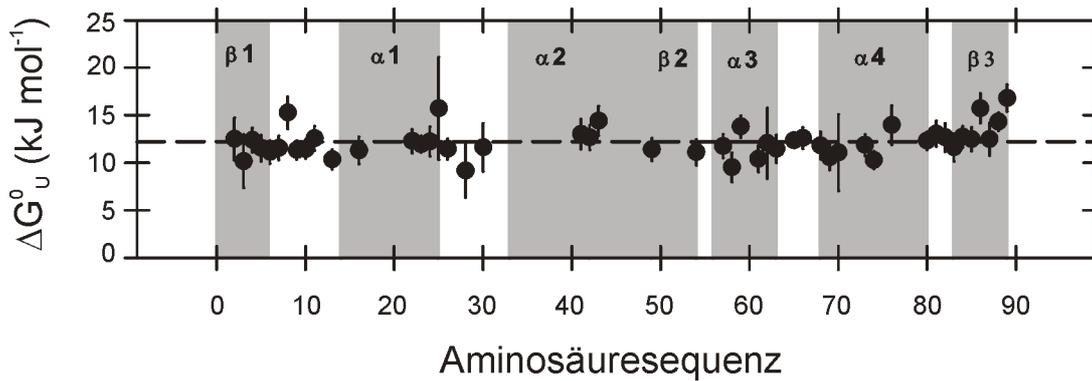


Abb. 22: ΔG°_U -Werte der einzelnen Reste von Barstar aus dem Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergang

Diese sowie der Mittelwert (gestrichelte Linie) sind über die Aminosäuresequenz aufgetragen. Erhalten wurden sie unter Annahme des Zweizustandsmodells. Die Sekundärstrukturelemente von Barstar sind grau hervorgehoben und beschriftet.

3.1.2.3 Lokale Entfaltungsreaktionen von Barstar unter nativen Bedingungen

Die geringe thermodynamische Stabilität und die daraus resultierende hohe Austauschrate von Barstar machte es notwendig auf eine Messtechnik für schnellen Amidprotonenaustausch zurückzugreifen (siehe 2.2.4). Zudem kann bei instabileren Proteinen ($\Delta G^{\circ}_{NU} < 15$ kJ/mol) ein EX2-Austauschmechanismus oft nicht mehr gesichert angenommen werden. Um den Austauschmechanismus für die jeweiligen Amidprotonen zu identifizieren, wurde der Amidprotonenaustausch in einem pH Bereich von 6,5 bis 10 untersucht (pH 6,5, 7,0, 8,0 9,0 10,0). In diesem Bereich unterscheidet sich Barstar nicht in seiner thermodynamischen Stabilität. Insgesamt ließen sich für 64 Reste die Austauschkinetiken nach dem EX1 Mechanismus analysieren (Abb. 23 A und B), für 20 von diesen bei niedrigeren pH Werten zusätzlich nach EX2 (Abb. 23 A).

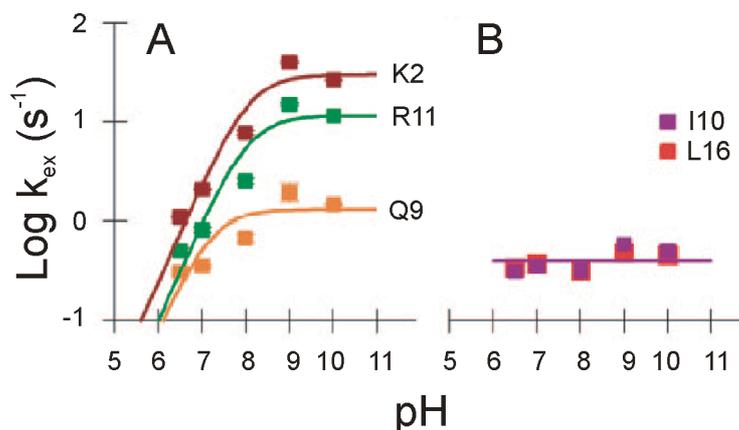


Abb. 23: pH-Abhängigkeit der gemessenen Austauschraten

Die gemessenen Austauschraten (k_{ex}) sind logarithmisch gegen den pH-Wert aufgetragen. In (A) zeigt sich bei kleinen pH-Werten eine Abhängigkeit (gemäß EX2, Steigung 1), bei höheren pH-Werten dagegen keine Abhängigkeit (gemäß EX1, Steigung 0). In (B) sind Austauschraten von Resten gezeigt, die im gesamten untersuchten pH-Bereich keinerlei Abhängigkeit vom pH-Wert zeigen, und demnach dem EX1-Mechanismus folgen.

Ergebnisse und Diskussion

Im EX1 Fall erhält man aus der gemessenen Austauschrate die Rate vom geschlossenen zum offenen, austauschkompetenten Zustand (Öffnungsrate) (Abb. 24). Durch zusätzliche Kenntnis der Gleichgewichtskonstante zwischen den Zuständen, welche nach dem EX2 Mechanismus erhalten wird, ließen sich für die 20 Reste, die einen Wechsel des Austauschregimes (Abb. 23 A) vollzogen, zusätzlich die Schließraten erhalten (Abb. 24).

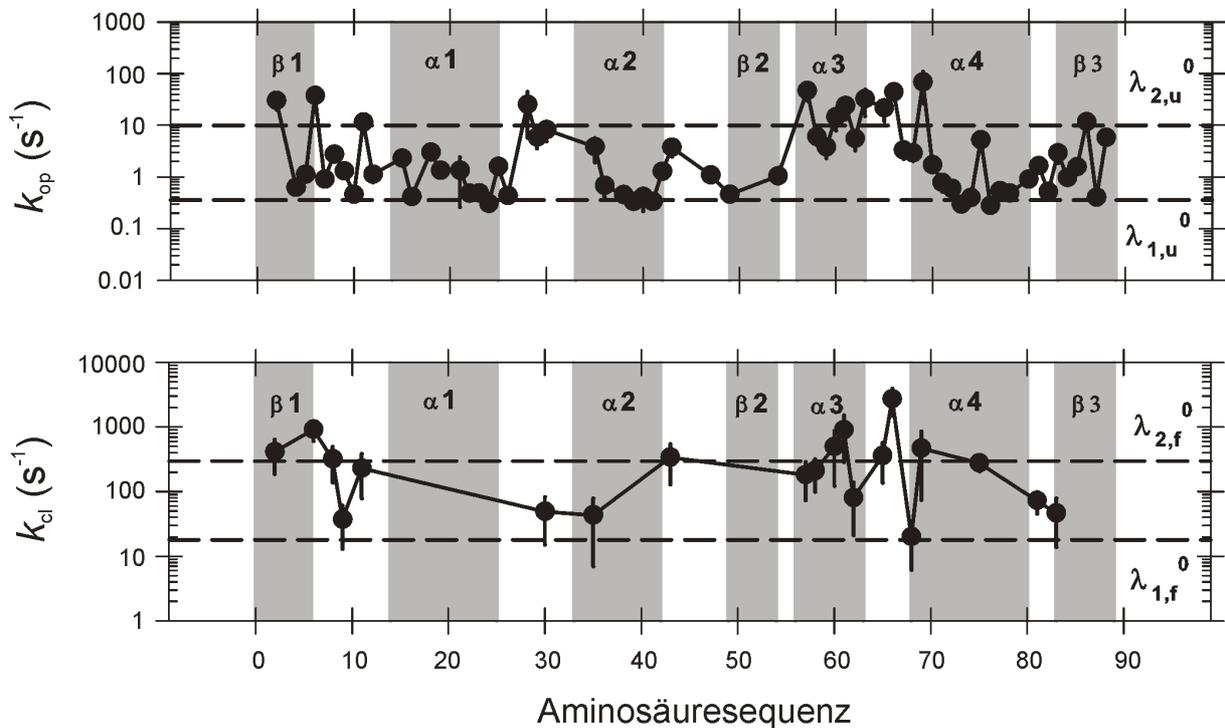


Abb. 24: Öffnungs- und Schließraten von Barstar.

Logarithmisch aufgetragen sind die mit Amidprotonenaustausch erhaltenen Öffnungsraten (EX1 Bedingungen), sowie Schließraten (EX1 und EX2 Bedingungen) gegen die Aminosäuresequenz, bei 0 M Harnstoff 15°C. Die auf 0 M Harnstoff extrapolierten apparenten Faltungsraten (λ_1 und λ_2) aus den Fluoreszenzfaltungskinetiken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente von Barstar sind grau hinterlegt und beschriftet.

Trägt man die so erhaltenen Öffnungs- bzw. Schließraten gegen die Sequenz auf erkennt man jeweils zwei verschiedene Gruppen von Amidprotonen. Im Fall der Öffnungsraten liegt eine Gruppe bei 0,2 bis 0,4 s⁻¹, die zweite bei etwa 20 s⁻¹. Strukturell können der zweiten Gruppe vor allem Amidprotonen im Bereich der Termini sowie Helix 3 zugeordnet werden. Aus der Häufigkeitsverteilung (Abb. 25, Ordinate) können trotz der geringen Stichprobengröße von nur 20 Resten, grob zwei Gruppen von Amidprotonen mit Schließraten im Bereich von 10 s⁻¹ und 300 s⁻¹ identifiziert werden. Vergleicht man die aus dem Amidprotonenaustausch bestimmten Raten mit denen aus Harnstoff-induzierten kinetischen Faltungsexperimenten gefunden Geschwindigkeitskonstanten der Faltungs- und Entfaltungsreaktion (bei 0 M Harnstoff), lässt sich eine gute Übereinstimmung finden (Abb. 25). Die mittels

Amidprotonenaustausch bestimmten Raten geben somit Öffnungs- und Schließraten des Faltungsvorgangs wider und nicht oder zumindest nur teilweise lokalen Fluktuationen.

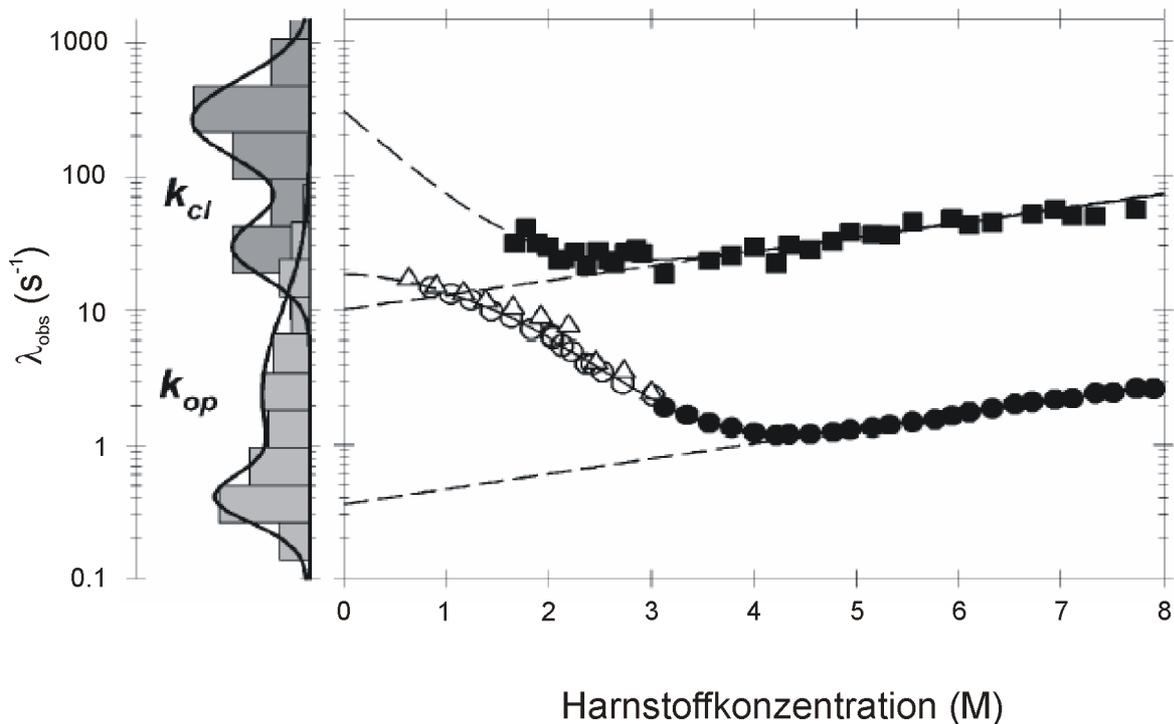


Abb. 25: Harnstoffabhängigkeit der Faltungsraten (λ) von Barstar

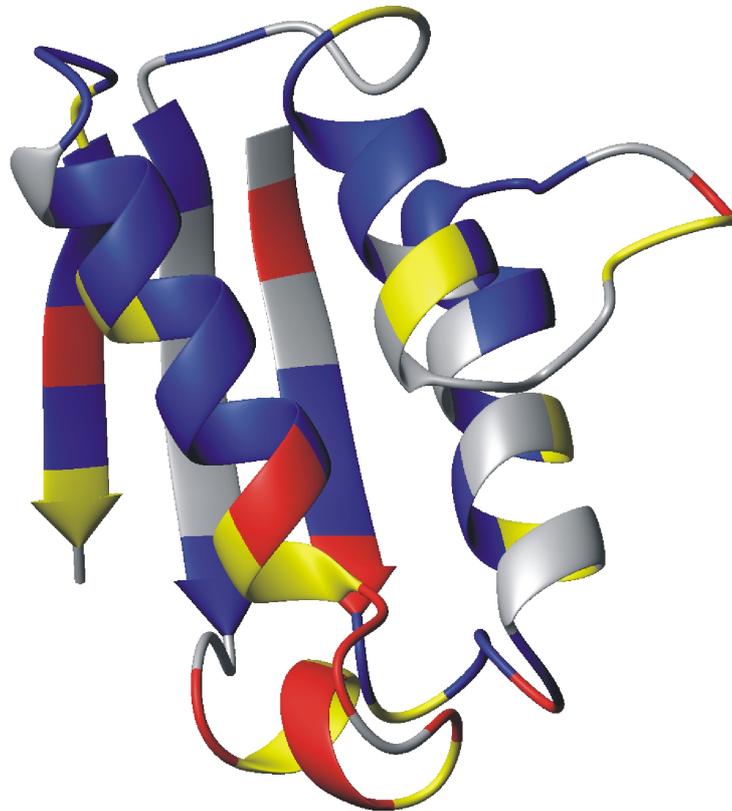
Aufgetragen sind die Entfaltungsraten (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten aus U_{cis} (offene Kreise) und $U_{\text{cis}} + U_{\text{trans}}$ (offene Dreiecke) gegen die Harnstoffkonzentration, sowie deren Extrapolation. Zusätzlich sind die aus dem Amidprotonenaustauschexperiment erhaltenen Öffnungs- (k_{op}) und Schließraten (k_{cl}) bei 0 M Harnstoff als Histogramm dargestellt.

3.1.2.4 Helix 3 ist hochdynamisch und die Startregion der Entfaltung

Die aus den Fluoreszenzkinetiken ermittelten Raten spiegeln sich in denen aus dem Amidprotonenaustausch erhaltenen wider. So korrelieren die geringen Öffnungsraten für die Mehrheit der Amidprotonen gut mit der Geschwindigkeitskonstante für die globale Entfaltung von Barstar die den größten Teil der Fluoreszenzamplitude ausmacht. Die Öffnungsraten der zweiten Population an Amidprotonen (Helix 3 und Termini, Abb. 26) lassen sich gut mit der Geschwindigkeitskonstante der schnellen Entfaltungsreaktion von Barstar-pWt korrelieren (Abb. 25). Aus dieser Übereinstimmung und der Tatsache, dass Helix 3 das einzige Sekundärstrukturelement ist, welches gänzlich hohe Öffnungsraten aufweist (Abb. 26) lässt sich schließen, dass die Amidprotonen von Helix 3 in einem ersten lokalen Entfaltungsschritt den austauschkompetenten Zustand erreichen. Es erscheint demnach wahrscheinlich, dass Helix 3 von Barstar-pWt in einem ersten Schritt entfaltet und somit im mittels *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie identifizierten Entfaltungsintermediat bereits unstrukturiert vorliegt. Darüber hinaus zeigt sich, dass der native Zustand von Barstar hochdynamisch ist.

Ergebnisse und Diskussion

Die breite Verteilung der mit Amidprotonenaustausch erhaltenen Öffnungs- und Schließraten lässt auf zahlreiche lokale Fluktuationen schließen. Innerhalb dieser Heterogenität des nativen Zustands erreicht Barstar allerdings auch den Zustand des Faltungsintermediates, bei dem die Helix 3 entfaltet ist.



Helix-3

Abb. 26: Strukturelle Beschreibung des Faltungsintermediates von Barstar

Gezeigt ist die NMR-Struktur von Barstar (Lubienski et al. 1994) (1bta.pdb) als Bänderdarstellung. Reste mit Öffnungsraten kleiner 2 s^{-1} sind blau, Reste mit Öffnungsraten von 2 bis 10 s^{-1} sind gelb und Öffnungsraten größer 10 s^{-1} sind rot eingefärbt.

3.2 Restespezifische Entfaltung im Gleichgewichtsübergang

Unterscheidet sich ein intermediärer Faltungszustand energetisch deutlich von anderen Zuständen (nativ, entfaltet oder ein anderer intermediärer), so ist es möglich, dass dieser sich auch im Gleichgewicht während eines Entfaltungsüberganges populiert. Dieses Szenario lässt eine eingehende strukturelle Untersuchung des Intermediates zu, da man von zeitaufgelösten Experimenten unabhängig ist. Z.B. lässt sich beim Übergang detektiert mittels NMR-Spektroskopie für jeden Rest individuell verfolgen, bei welchem Faltungsschritt ($N \rightarrow I$ oder $I \rightarrow U$) er seine native chemische Umgebung verliert und daraus ableiten wie das Intermediat strukturell beschaffen ist.

3.2.1 Das thermophile Ankyrin-repeat Protein (tANK)

3.2.1.1 Vorarbeiten

Für tANK wurde von Christian Löw (Löw 2008; Löw et al. 2008b) ein analoges Faltungsverhalten wie bei P19 gefunden. Die Faltung lässt sich durch ein lineares Modell mit einem „*on pathway*“ Intermediat ($N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$) beschreiben, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt liegt zwischen I und U. Allerdings ist das Intermediat thermodynamisch deutlich stabiler als bei P19, was die Übergänge zwischen N und I und zwischen I und U soweit voneinander trennt, dass im Gleichgewicht beide Übergänge ($N \rightleftharpoons I$ und $I \rightleftharpoons U$) unter Fluoreszenz-, CD- und NMR- Detektion zu beobachten sind. Das Intermediat populiert sich dabei bei 2 M GdmCl zu über 90%. Um die beiden Entfaltungsereignisse Rest für Rest mittels NMR beobachten zu können wurden zunächst 85% der Amidkreuzsignale des aus 192 Aminosäuren bestehenden Proteins mit Hilfe von Trippelresonanzexperimenten anhand einer dreifach markierten Probe ($^{15}\text{N}^{13}\text{C}^2\text{D}$) zugeordnet (Abb. 27).

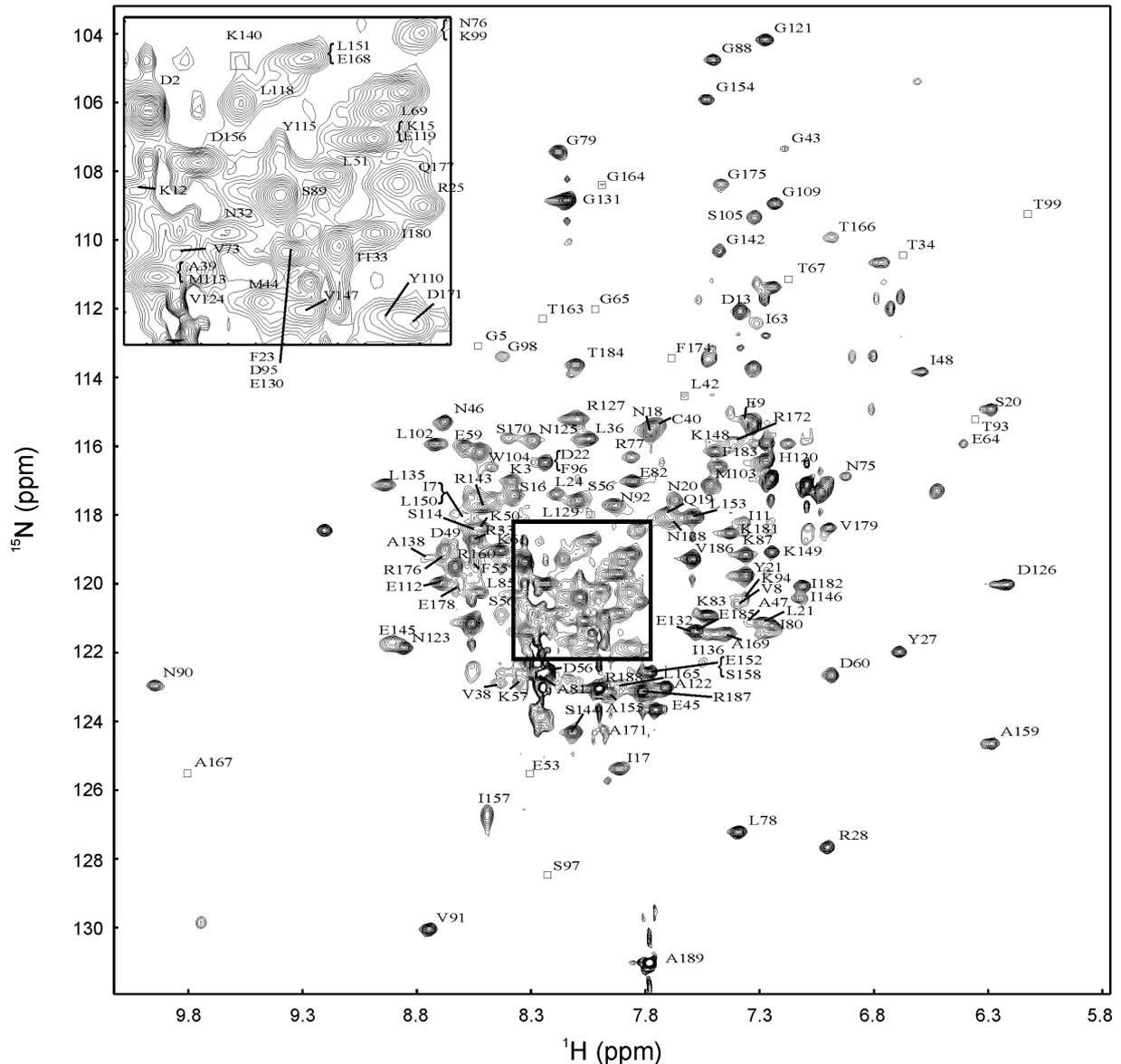


Abb. 27: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC von tANK.

Die Aufnahme erfolgte bei 25°C, pH 7,4 in 50 mM Na-Phosphat. Amidprotonen sind im Einbuchstabencode beschriftet. Kreuzsignale, die bei dieser Konturebene nicht zu erkennen sind, sind mit Rechtecken markiert.

3.2.1.2 Entfaltung individueller Reste im GdmCl-induzierten Übergang

Es wurden 19 Proben mit verschiedenen GdmCl Konzentrationen zwischen 0 M und 4 M präpariert und im Anschluss bei 15°C gemessen. Für 66 native Reste konnte ein vollständiger Entfaltungsübergang verfolgt werden. Zusätzlich ließ sich der Aufbau von 40 Signalen des entfaltenen Zustands, sowie der Aufbau und Abbau von 12 Signalen des intermediären Zustands beobachten. Bereits aus den Spektren wird ersichtlich, dass die nativen Signale mancher Reste bereits ihre Intensität beim Übergang zum Intermediat verlieren, andere erst bei deutlich höherer GdmCl Konzentration beim Übergang zum entfaltenen Zustand (Abb. 28).

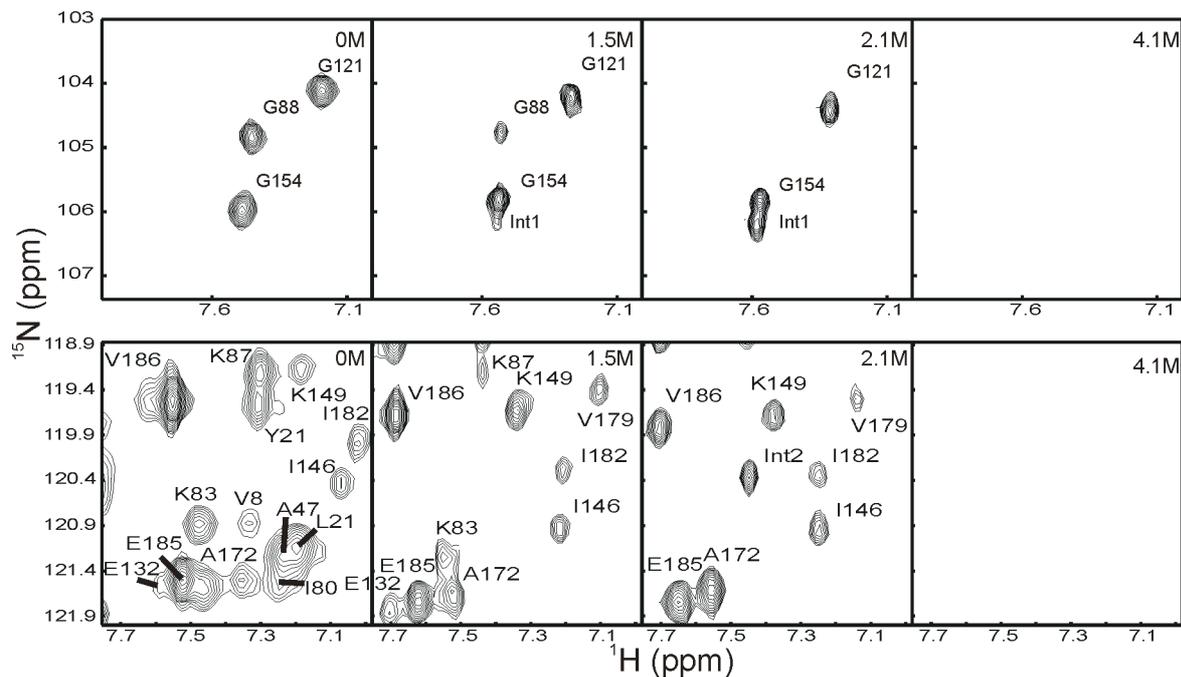


Abb. 28: Ausschnitte aus den ^{15}N -TROSY-Spektren zu verschiedenen Punkten des Überganges
 Gezeigt sind zwei Ausschnitte aus den ^{15}N -TROSY-Spektren bei vier verschiedenen GdmCl-Konzentrationen (0 M, 1,5 M, 2,1 M und 4,1 M). Die Konzentration von 2,1 M entspricht der höchsten Population des Intermediates. Die Amidkrenzsignale sind im Einbuchstabencode beschriftet, zusätzliche Signale, die bei der Bildung des intermediates auftauchen, mit Int1 und Int2.

Eine quantitative Analyse der Signale des nativen und entfaltenen Zustands zeigt, welche Reste bereits im ersten Übergang ($\text{N} \rightarrow \text{I}$) und welche erst beim zweiten Übergang ($\text{I} \rightarrow \text{U}$) entfalten (Abb. 29 A). Signale des entfaltenen Zustands zeigen die analogen Übergänge (Abb. 29 C). Die Übergänge stimmen sehr gut mit denen aus der Fluoreszenzmessung überein. Auch die Signale des Intermediates folgen dem zu erwarteten Verlauf (Abb. 29 B) mit einer maximalen Population bei 2,1 M GdmCl. Aufgrund dieses Experimentes kann für einzelne Aminosäuren zweifelsfrei gezeigt werden, ob sie im Intermediat noch in ihrer nativen chemischen Umgebung sind (nativ gefaltet) oder nicht. Die Reste aus ANK 3-5 sind dabei noch gefaltet, die Reste aus ANK 1-2 nicht (Abb. 29 D). Da bereits in I viele Signale des entfaltenen Zustands vorhanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass ANK 1-2 weitgehend entfaltet sind. Die wenigen Signale des intermediären Zustands können zum einen von Resten kommen, die zwar entfaltet sind, aber in unmittelbarer Nähe zu ANK3 durch dessen Entfaltung sich ihre chemische Umgebung nochmals ändert, oder durch Reststrukturen, die im Verlauf der Entfaltung aufgelöst werden. Die gute Übereinstimmung mit der Entfaltung von ANK 3-5 macht den ersteren Fall wahrscheinlicher, gänzlich ausgeschlossen werden können Reststrukturen aber nicht.

Ergebnisse und Diskussion

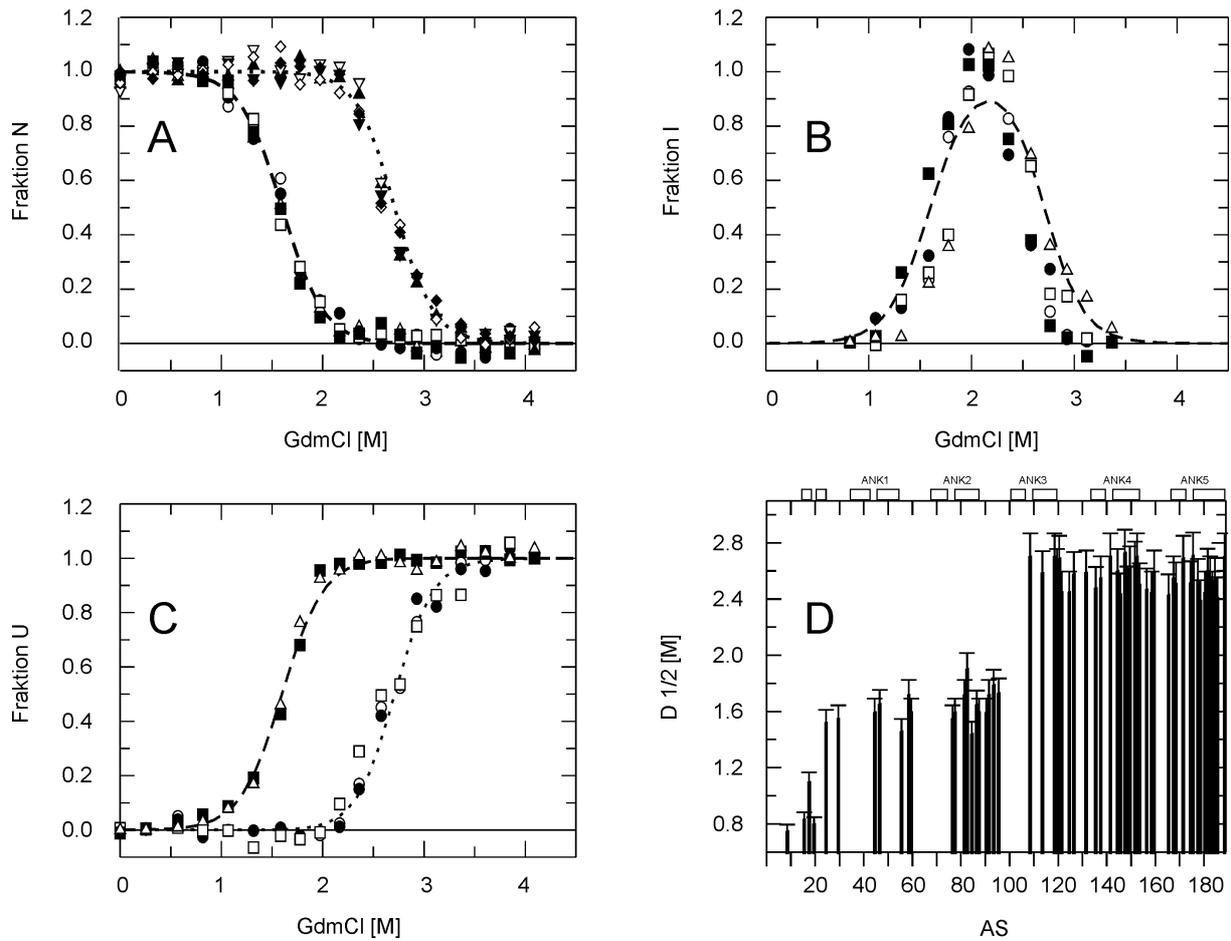


Abb. 29: Quantitative Auswertung des GdmCl-induzierten NMR-Übergangs von tANK.

Gezeigt sind für verschiedene Reste sowohl die normierten Übergänge der nativen Amidkreuzsignale (A), Aufbau und Zerfall des Intermediates (B), sowie der Aufbau von Signalen des entfalteten Zustands (C). Zudem sind die Übergänge von N zu I und I zu U aus den Fluoreszenzexperimenten als gestrichelte und gepunktete Linien gezeigt. In D sind die Mittelpunkte aus den Übergängen der zugeordneten nativen Kreuzsignale (A) gegen die Sequenz aufgetragen.

3.2.1.3 Repeats 1-2 entfalten im ersten Übergang, repeats 3-5 im zweiten

Während in 3.1.1.3 einige Hinweise vorlagen, dass ANK 3-5 im Faltungsintermediat von P19 noch gefaltet sind, während ANK 1 und 2 entfaltet sind, konnte in 3.2.1.2 für das strukturhomologe tANK eindeutig gezeigt werden, dass im Intermediat lediglich Reste aus ANK 3-5 nativ gefaltet sind. Reste aus ANK 1 und 2 sind nicht mehr nativ gefaltet und zumindest größtenteils evtl. sogar gänzlich entfaltet (Abb. 30). Der Faltungsmechanismus von P19 und tANK ist analog, wie durch kinetische Analysen gezeigt wurde (Löw et al. 2008b). Daraus lässt sich erstens ableiten, dass die Annahmen zum Intermediat von P19 richtig sind, und zweitens dass der Faltungsmechanismus für P19 ähnliche Ankyrinproteine (5 ANK) evolutionär konserviert ist. ANK 3-5 bilden dabei das stabile Gerüst bereits im „on pathway“ Intermediat. ANK 1-2, welche in P19 die Interaktion zum Zielprotein CDK 4/6 vermitteln, sind thermodynamisch weniger stabil und bilden sich erst im letzten Faltungsschritt.

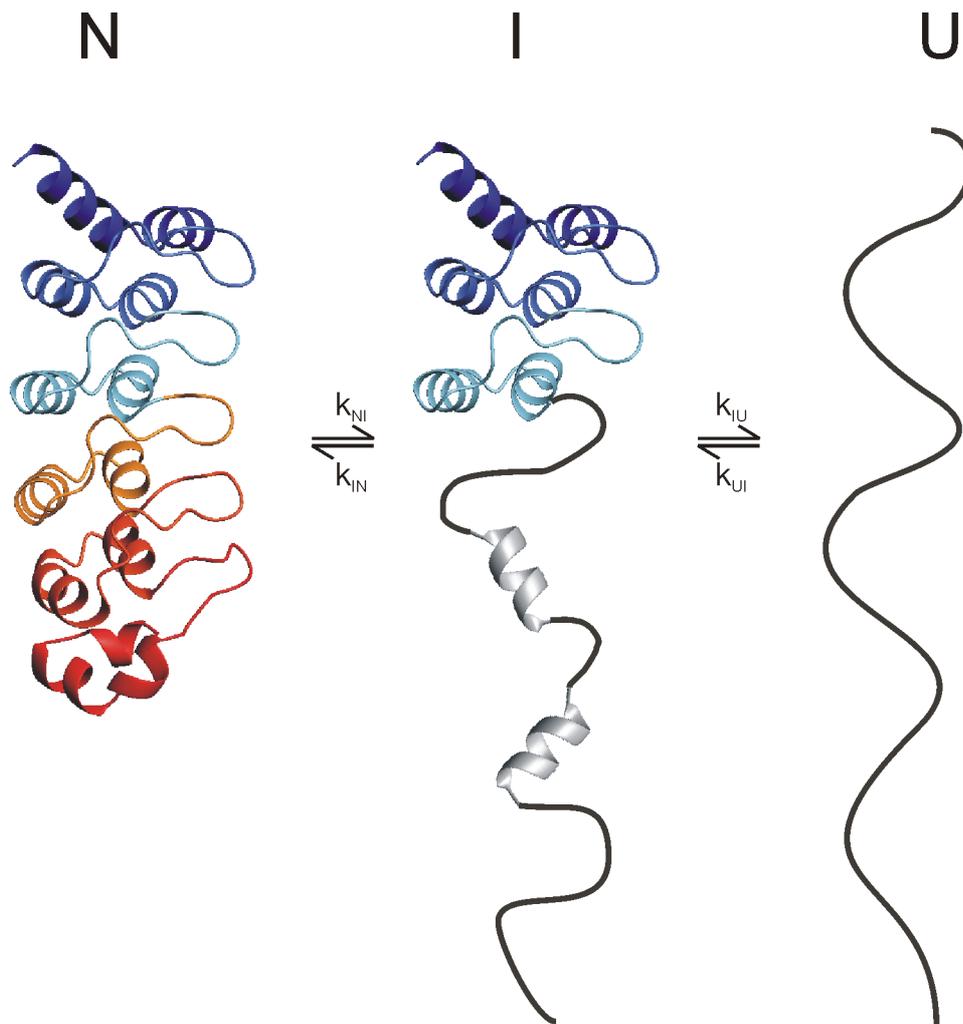


Abb. 30: Modell zur Faltung von tANK

Im nativen Zustand (Bänderdarstellung von 2rfm.pdb) liegen alle fünf Ankyrin-*repeats* (von rot nach blau) gefaltet vor. Im intermediären Zustand sind ANK 3-5 nativ, identisch wie in N, während ANK 1-2 entweder vollständig entfaltet sind, oder entfaltet mit Reststrukturen. Im zweiten Übergang entfaltet tANK gänzlich.

3.2.2 Auswirkung einer lokalen chemischen Modifikation auf P19

Obwohl P19 das thermodynamisch stabilste Protein innerhalb der INK4 Familie ist (P15, P16, P18, P19), hat es die kürzesten Halbwertszeiten in der Zelle. Dabei wird P19, nachdem K62 ubiquitiniert wurde, vom Proteasom abgebaut (Thullberg et al. 2000a). Während P15 und P16 *in vivo*, wohl nicht phosphoryliert werden, wurde eine Phosphorylierung in der Zelle für P18 und P19 gezeigt (Thullberg et al. 2000b). Beide Beobachtungen führten dazu mögliche Auswirkungen einer Phosphorylierung an zwei möglichen Phosphorylierungsstellen (S66 und S76) auf die thermodynamische Stabilität zu untersuchen. Da die Kinase, welche *in vivo* die Phosphorylierung durchführt, unbekannt ist, wurden die *in vitro* Studien anhand von Glutamat Mutanten (S66E und/oder S76E) durchgeführt. Bei diesen wird analog zur Phosphorylierung negative Ladung an die gleiche Position eingeführt, weshalb Glu-Mutanten als Nachbildung von Phosphorylierungen gelten (Hupp & Lane 1995; Park et al. 2006).

3.2.2.1 Vorarbeiten

In seiner Arbeit (Löw 2008; Löw et al. 2009) konnte Christian Löw zeigen, dass die Mutanten S66E und S76A keine veränderte Stabilität im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Dagegen führt die Mutation S76E (negative Ladung zwischen ANK 2 und 3) zu einer drastischen Destabilisierung. Während in sequentieller Faltung ($N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$) die Stabilität des Intermediates praktisch unverändert blieb, wurde der native Zustand destabilisiert. So zeigte die S76E Mutante zwar das gleiche Faltungsverhalten wie der Wildtyp bei 15°C, bei 37°C (Körpertemperatur) lag P19 S76E nur noch im intermediären, bzw. entfalteten Zustand vor. Der native, funktionelle Zustand wurde nicht mehr populiert. Der teilgefaltete Zustand sollte nun in einem Temperaturübergang mittels NMR strukturell untersucht werden. Die Zuordnung der Amidresonanzen (Abb. 31) konnte weitestgehend (>80%) von der Zuordnung des Wildtyps (3.1.1.1) übertragen werden.

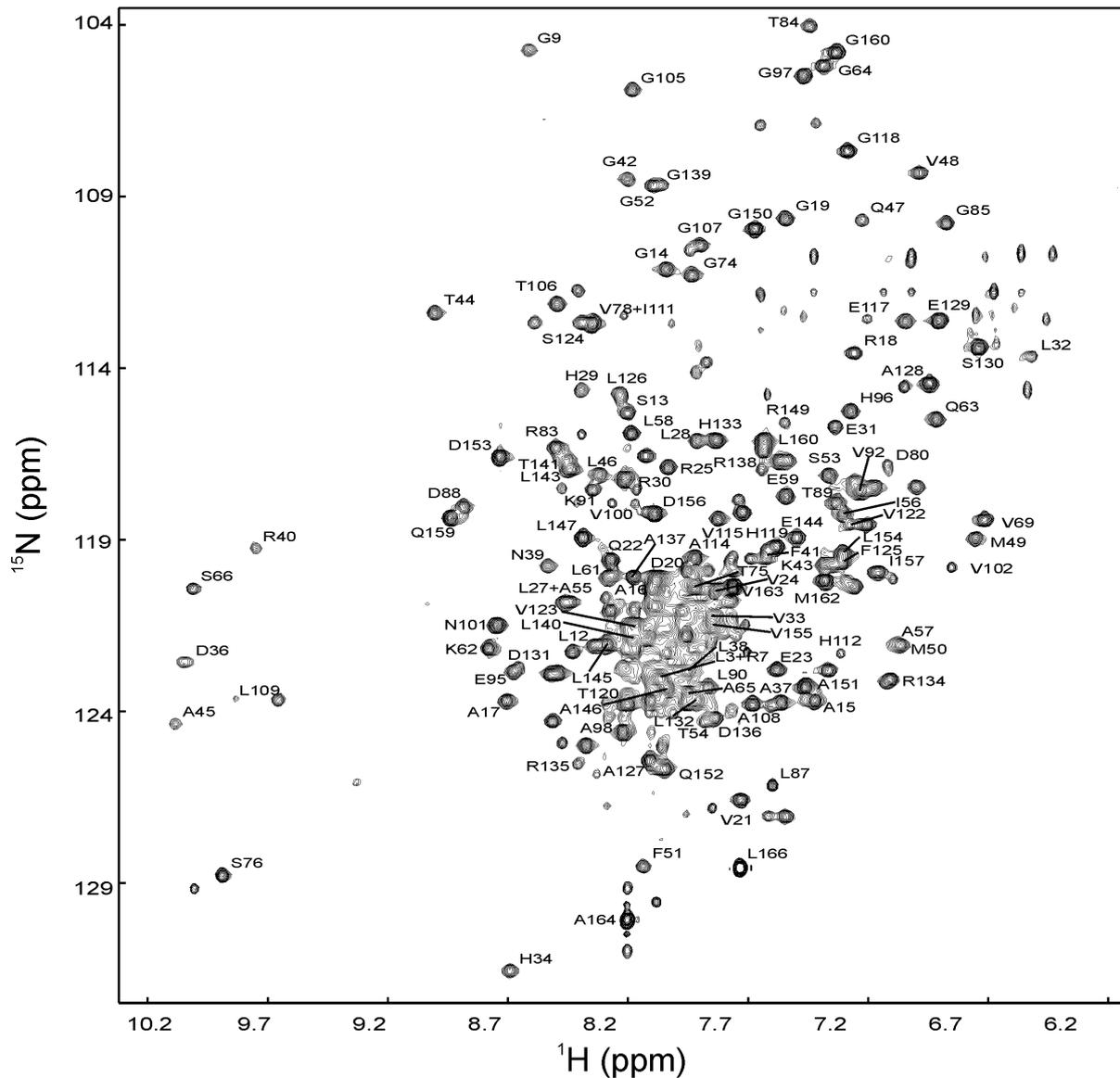


Abb. 31: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC von P19 S76E.

Die Aufnahme erfolgte bei 15°C, in 50 mM Na-Phosphat, pH 7,5. Amidprotonen sind im Einbuchstabencode beschriftet.

3.2.2.2 Temperatur-induzierte Entfaltung individueller Reste

Um die lokale Entfaltung von P19 S76E zu beobachten wurden ^{15}N -TROSY-HSQC Spektren bei verschiedenen Temperaturen zwischen 15 und 40 °C gemessen. Zur Kontrolle wurden analog Spektren von P19 Wt gemessen. Die Spektren des Wildtyp Proteins blieben, bis auf leichte temperaturbedingte Verschiebungen, unverändert. P19 Wt liegt zwischen 15°C und 37°C quantitativ (>99%) in gefalteter Form vor. Die Spektren von P19 S76E sehen bei niedrigen Temperaturen absolut vergleichbar aus, verlieren aber bei höheren Temperaturen einen Großteil ihrer Intensität (Abb. 32). Dieser Intensitätsverlust ist auf zwei Ursachen zurückzuführen. Zum einen wird das Protein kontinuierlich destabilisiert bzw. entfaltet

(Verändern der Gleichgewichtskonstante). Zum anderen wird der chemische Austausch der Amidprotonen mit dem Wasser schneller. Dies führt dazu, dass bei höheren Temperaturen keine Signale ungeschützter Amidprotonen (z.B. in entfalteten Regionen) sichtbar sind. Das gleiche Verhalten zeigte ein entfaltetes Peptid aus 34 Aminosäuren (Löw et al. 2008a) in einem Kontrollexperiment. Durch Entfalten von N zu I verlieren nun manche Reste komplett ihre native chemische Umgebung (keine messbaren Signale der entfalteten Form), die Signale der Reste, die sich noch in nativer chemischer Umgebung befinden, verlieren einen Großteil ihrer Intensität, da sie durch die niedrigere Stabilität des intermediären Zustands schneller mit dem Wasser austauschen. Im zweiten Übergang (I zu U), verlieren diese nun vollständig ihre Intensität. Die Spektren wurden dahingehend analysiert, welche Reste bei 37°C gänzlich ihr natives Signal verloren haben (in I entfaltet), oder noch in ihrer nativen chemischen Umgebung sind, und deshalb noch reduzierte aber deutlich sichtbare native Signale aufweisen (in I gefaltet).

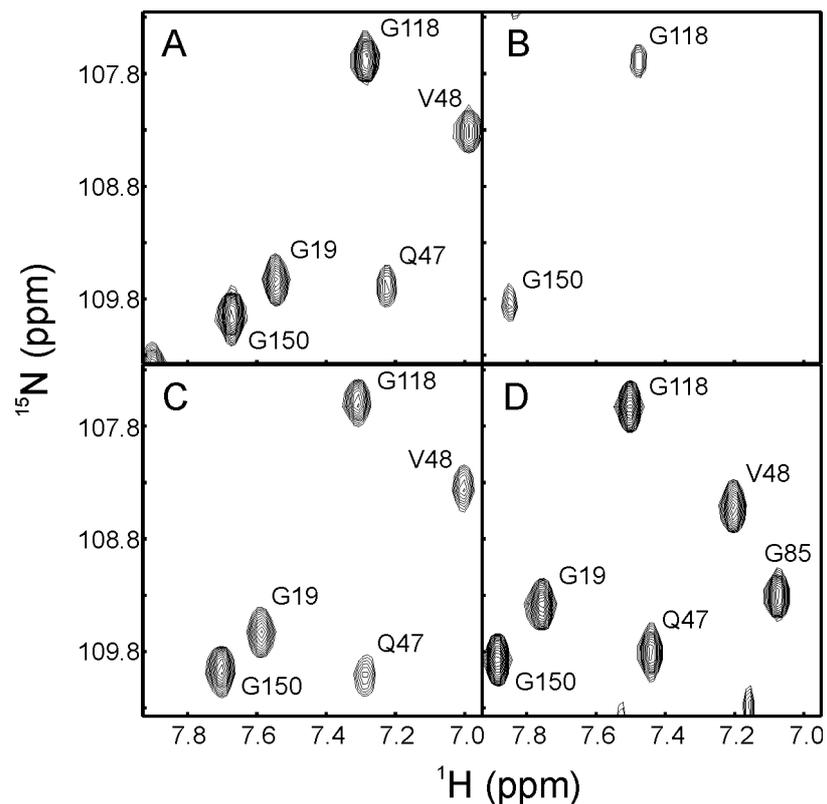


Abb. 32: Ausschnitt aus den ^{15}N -TROSY-Spektren

Die Spektren zeigen für P19 S76E native Amidkreuzsignale (beschriftet im Einbuchstabencode) bei 15°C (A). Bei 37°C (B) sind einige Signale noch vorhanden, wenn auch mit verringerter Intensität, andere sind vollständig verschwunden. P19 Wt zeigt bei 15°C (C) ein vergleichbares Spektrum wie die Mutante, bei 37°C (D) sind alle Signale in ihrer nativen chemischen Umgebung.

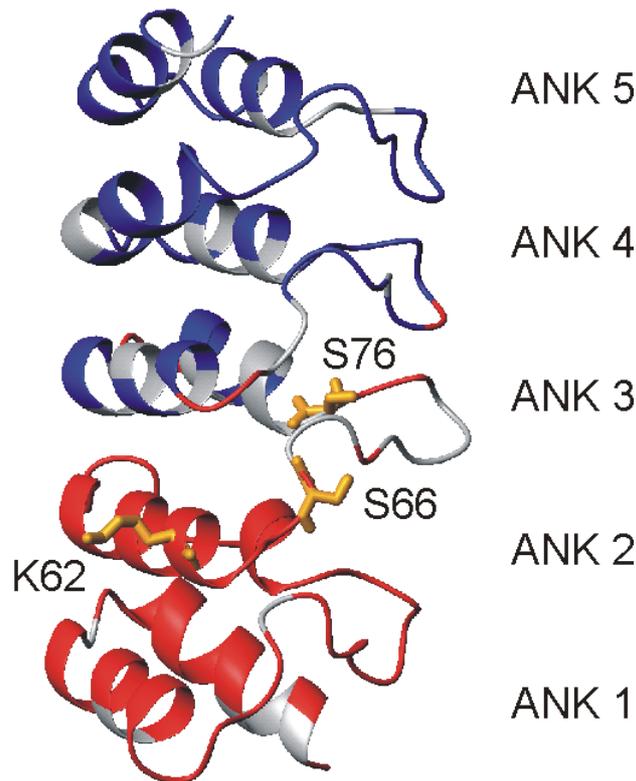


Abb. 33: Strukturelle Beschreibung des Faltungsintermediates von P19 S76E.

Gezeigt ist die Kristallstruktur von Wildtyp P19 (1bd8.pdb) als Bänderdarstellung. Die Seitenketten der Reste der Phosphorylierung (S66 und S76) sowie der Ubiquitinierung sind gezeigt. Die Ankyrin-repeats sind mit ANK 1-5 beschriftet. Reste mit nativen Amidkreuzsignalen bei 37°C sind blau eingefärbt und Reste die ihr natives Kreuzsignal bei 37°C verloren haben sind rot eingefärbt.

3.2.2.3 Modifiziertes P19 liegt bei Körpertemperatur teilentfaltet und ubiquitinierungskompetent vor

P19 S76E liegt bei Körpertemperatur teilgefaltet vor, ANK 1&2, die für die Bindung an CDK 4/6 verantwortlich sind, sind entfaltet, während das Gerüst aus ANK 3-5 noch gefaltet vorliegt. Daraus lässt sich ableiten, dass bei phosphoryliertem P19 in der Zelle die Bindungsfähigkeit an CDK 4/6 beeinträchtigt ist, und so die Inhibitionsfähigkeit von P19 während des Zellzykluses reguliert werden kann. Des Weiteren konnte Christian Löw zeigen, dass P19 S66E/S76E durch Ubiquitin Ligasen ubiquitiniert werden kann während die Einzelmutanten nicht ubiquitiniert werden. Diese findet an Position K62 statt (Thullberg et al. 2000a). Polyubiquitin dient als Abbausignal der markierten Proteine. Somit würde P19 nicht nur von seiner aktiven in eine inaktive Form gebracht, sondern kann, nach einer dadurch möglichen weiteren Phosphorylierung und anschließender Ubiquitinierung, zudem auch abgebaut werden und wäre nicht mehr als Inhibitor verfügbar. Die in 3.1.1 gefundene „Sollbruchstelle“ wird also zur Regulation der Proteinfunktion von P19 ausgenutzt.

3.3 Kinetische Faltungsintermediate

Sehr viele Proteine falten über Intermediate, die sich im Gleichgewicht nicht, oder nur sehr gering populieren (Baldwin & Rose 1999). Um Faltungsintermediate mit NMR zu untersuchen, kann man zum einen den Zustand kurzlebiger (100 ms bis 10 s) Intermediate einfrieren (bzw. quenchen) und anschließend untersuchen. Zum anderen ist es auch möglich besonders langlebige (min bis h) Intermediate in Echtzeit zu charakterisieren.

3.3.1 Schnelle Faltung von Onconase

3.3.1.1 Vorarbeiten zur Faltung

In kinetischen Faltungsuntersuchungen von Onconase konnte Cindy Schulenburg drei Phasen während der Rückfaltung identifizieren, welche sich bei 0 M GdmCl jeweils um einen Faktor von 10 in den apparenten Faltungsraten unterscheiden ($13,3 \text{ s}^{-1}$, $0,5 \text{ s}^{-1}$, $0,026 \text{ s}^{-1}$) (Schulenburg et al. 2007b). Dies würde bedeuten, dass mindestens zwei kinetische Intermediate an der Faltung beteiligt sind. Die langsamste Phase zeigt aufgrund ihrer Geschwindigkeitskonstante und der Unabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der GdmCl Konzentration Charakteristika einer Prolyl-Isomerisierungsreaktion. Allerdings ließ sich die langsame Rückfaltungsreaktion von Onconase in Gegenwart von PPIasen nicht beschleunigen. Für weitere NMR-Experimente wurde die publizierte Zuordnung einer Mutante (Gorbatyuk et al. 1999) von Cindy Schulenburg mit Hilfe von ^{15}N -NOESY-HSQC und ^{15}N -TOCSY-HSQC Experimenten überprüft und auf das Wildtyp Protein übertragen (Abb. 34).

3.3.1.2 Isomerisierung im entfalteten Zustand

Zur Klärung der Ursache der langsamen Phase (Isomerisierung im entfalteten Zustand oder intrinsisch langsame Faltungsreaktion), die der langsamen Phase der Rückfaltung zugrunde liegt wurde ein 1D Echtzeit-NMR Experiment (Balbach et al. 1995) durchgeführt. Die langsame Phase wurde bei 10°C mit einer Serie von 1D Spektren verfolgt. Die schnelleren Reaktionen sind bereits in der Totzeit (12s) abgelaufen. Hierbei zeigte sich, dass bereits das erste Spektrum die vollständigen Charakteristika des nativen Zustands aufweist. Während der langsamen Reaktion steigen die Intensitäten um weitere ca. 10% an. Eine Anpassung der Kinetik ergibt, dass zum Zeitpunkt null bereits 75 % der Moleküle nativ sind (Abb. 35). Dies

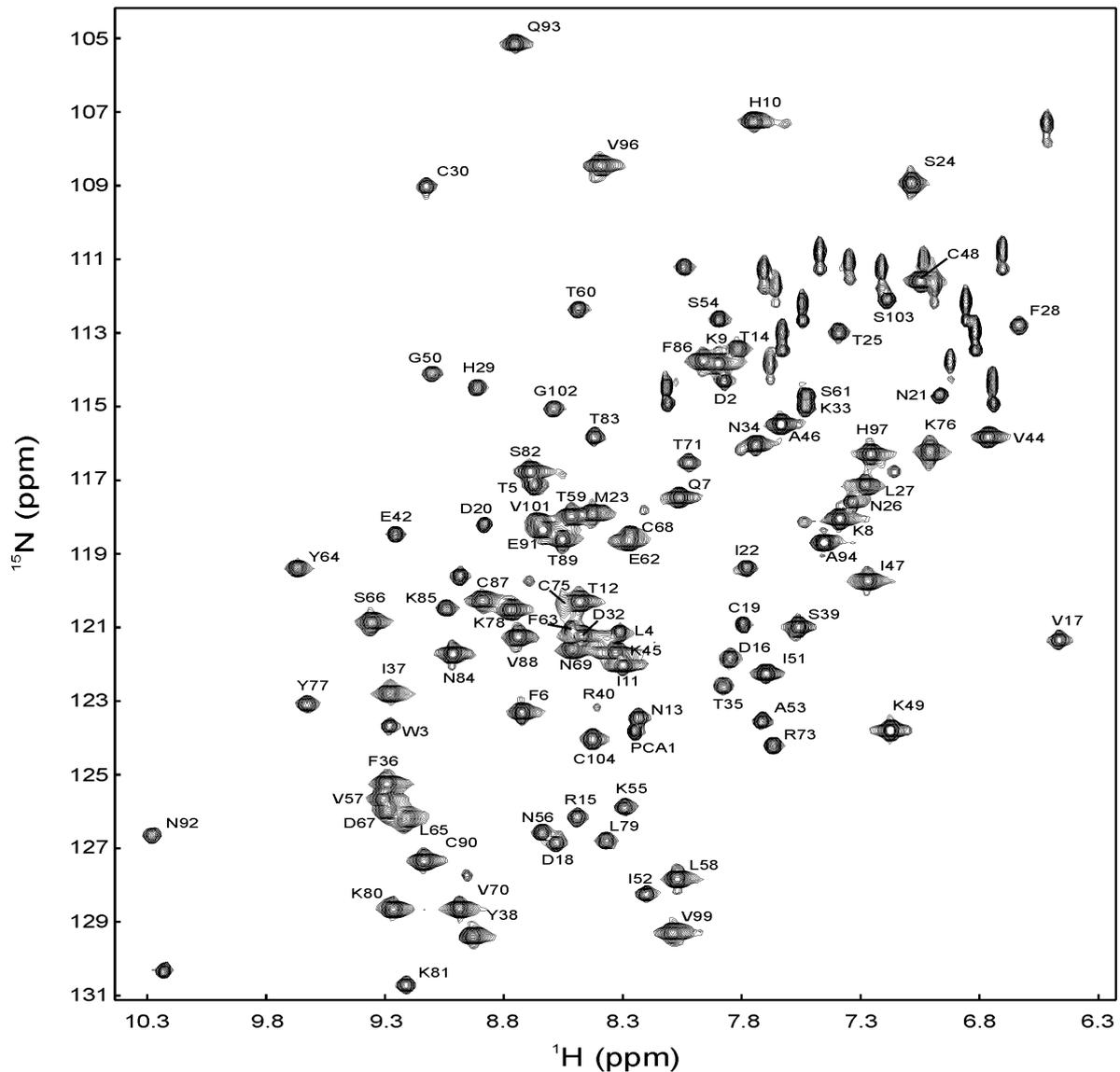


Abb. 34: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC von Wildtyp Onconase

Die Aufnahme erfolgte bei 20°C, in 50 mM Na-Acetat, pH 5,5. Amidprotonen sind im Einbuchstabencode beschriftet.

zeigt, dass die langsame Phase nicht der abschließende Schritt der Faltung ist (was eine Veränderung einiger Signale von 0% auf 100% zur Folge hätte) sondern lediglich 25% der Moleküle erst nach Isomerisierung (vermutlich *cis* zu *trans* Isomerisierung von Prolin) ihre native Konformation erreichen können. Ein aus den Spektren des Start- und Endpunktes berechnetes Spektrum vor der Isomerisierung zeigt die Charakteristiken eines entfalteten Proteins (Abb. 36). Daraus wird klar, dass die Isomerisierung im entfalteten Zustand ablaufen muss, bevor das Protein anfangen kann zu falten. Es bildet sich kein Intermediat mit falschem Isomerisierungszustand eines Prolins, wie z.B. bei RNase T1 S54G/P55N (Kiefhaber et al. 1990), bei der ein Intermediat mit inkorrektem *trans* Prolin in einer langsamen Reaktion zum nativen Zustand mit korrektem *cis* Prolin reagiert.

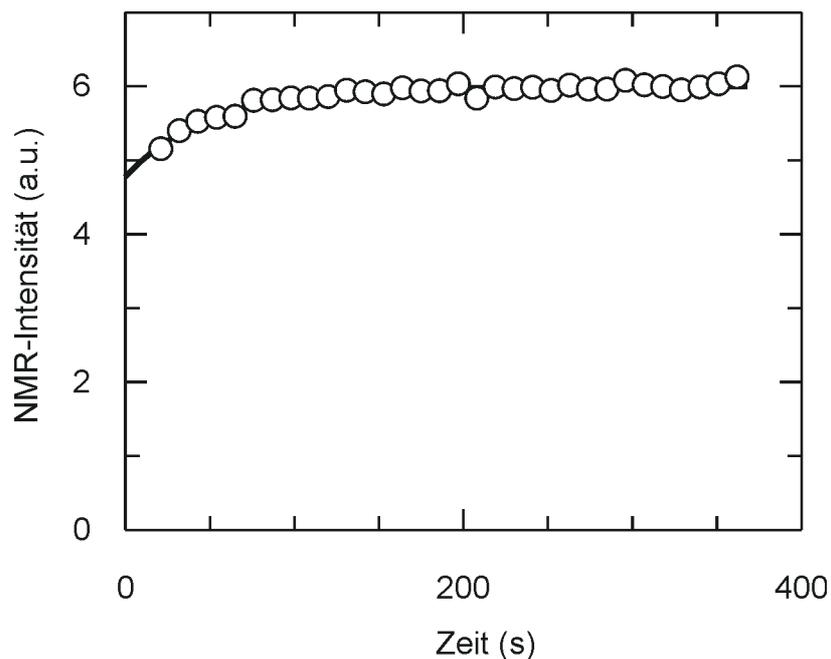


Abb. 35: Intensitätszunahme im Verlauf der Isomerisierung von Onconase während eines 1D-Echtzeit-NMR-Experimentes.

Aufgetragen ist der zeitliche Verlauf der Intensität des mit * in Abb. 36 gekennzeichneten Methylbereichs nach Rückfaltung von in 0,6 M GdmCl. Der als schwarze Linie dargestellte einfachexponentielle Fit ergab eine Rate von $0,021 \pm 0,010 \text{ s}^{-1}$.

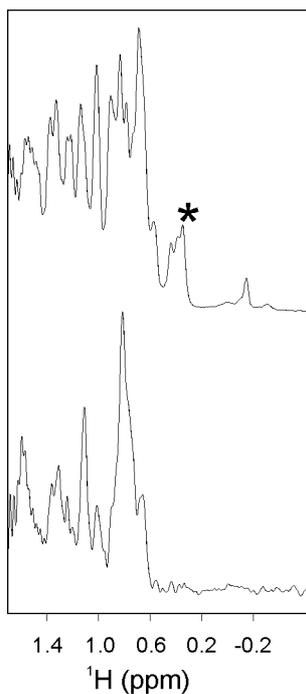


Abb. 36: Ausschnitt aus der Methylgruppenregion von Onconase nach und vor der Isomerisierung

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem 1D¹H-Spektrum nach der Isomerisierung (oben), sowie das Spektrum vor der Isomerisierung (unten). Der in Abb. 35 ausgewertete Methylbereich ist mit * gekennzeichnet. Das Spektrum vor der Isomerisierung zeigt alle Charakteristiken eines entfalteten Proteins.

3.3.1.3 Identifikation geschützter Bereiche im Intermediat mittels *quenched-flow* NMR

Mit Hilfe von *quenched-flow* Amidprotonenaustauschexperimenten, sollte nun geklärt werden welche Reste durch Strukturbildung bereits in I vom Austausch mit den Protonen des Wassers geschützt vorliegen, und welche erst in N geschützt werden. Dafür wurde protonierte entfaltete Onconase zurückgefaltet und zu verschiedenen Zeitpunkten der Rückfaltung einem „Deuterium Puls“ von 8,3 ms ausgesetzt. Dieser führt bei Amidprotonen in ungeschützten Bereichen zu einem vollständigen Austausch, geschützte Amidprotonen tauschen aufgrund der sehr kurzen Zeit nicht aus. Durch ^{15}N -HSQC Spektren wurde anschließend ermittelt welcher Protonierungsgrad bei verschiedenen Resten nach verschiedenen Rückfaltungszeiten vorliegt. Dabei wurden nur Reste ausgewertet, die im nativen Zustand keinen Austausch während der Dauer des Experimentes zeigen, und bei denen deshalb der Austausch ausschließlich in U und I abläuft. Hierbei lassen sich zwei Gruppen unterscheiden. Die eine erhält bereits mit der Bildung von I einen hohen Schutz gegen Austausch (Abb. 37 blau), die andere erst mit der Bildung von N (Abb. 37 grün). Reste der ersten Gruppe zeigen somit Strukturbildung des Faltungsintermediates an, Reste der zweiten Gruppe Bereiche, die sich erst im Übergang von I nach N strukturieren.

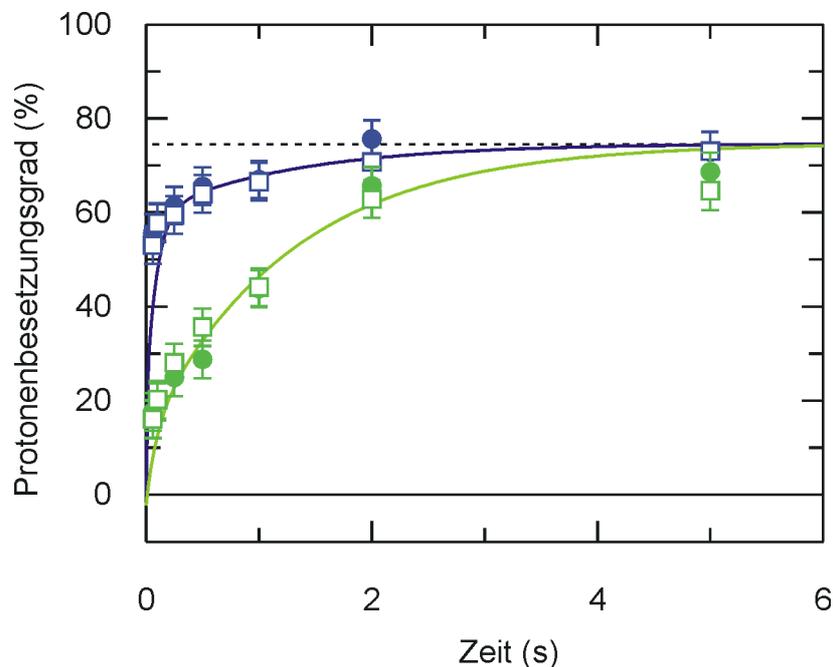


Abb. 37: Aufbaukinetiken des Protonenbesetzungsgrades von Onconase in Abhängigkeit der Rückfaltungszeit.

Der zeitliche Verlauf des Protonenbesetzungsgrades von V44 und K49, welche bereits in I geschützt sind, ist in blau, der von K78 und S82, welche erst mit Bildung von N geschützt werden, ist in grün gezeigt. Die gestrichelte Linie markiert den maximalen Protonenbesetzungsgrad vor der Isomerisierung (75%). Die Anpassung ergibt sich aus den mittels Fluoreszenz *stopped-flow* erhaltenen Rückfaltungsraten ($4,72\text{ s}^{-1}$ und $0,38\text{ s}^{-1}$) und frei angepassten Amplituden (blau 58% und 17%, grün 0% und 75%).

3.3.1.4 Onconase zeigt bei vereinfachter Faltung ein zu RNase A konserviertes Faltungsintermediat

Im Rückfaltungsintermediat von Onconase sind Faltblatt 1 und 3 sowie Helix 1 teilweise, Faltblatt 5 und 6 sowie Helix 3 nahezu vollständig gefaltet (Abb. 38). Dies ist sehr ähnlich zu einem ebenfalls mittels *quenched-flow* Analyse untersuchtem Intermediat der RNase A (Udgaonkar & Baldwin 1990; Houry & Scheraga 1996). Allerdings ist die Faltung der RNase A aufgrund von 2 *cis*-Proline im nativen Zustand und der daraus resultierenden Isomerisierungsreaktionen deutlich komplexer (Balbach & Schmid 2000). Die Faltung von Onconase (alle Proline in *trans*) und RNase A (2 Proline in *cis*- 2 Proline in *trans*-Konformation) ist jedoch, bei nativartigem Isomerisierungszustand der Prolinreste im entfalteten Zustand, vergleichbar, das „*on pathway*“ Intermediat scheint in beiden Proteinen konserviert zu sein. Dagegen unterscheidet sich Onconase von RNase A durch eine deutlich höhere Stabilität und ein vereinfachtes Faltungsverhalten.

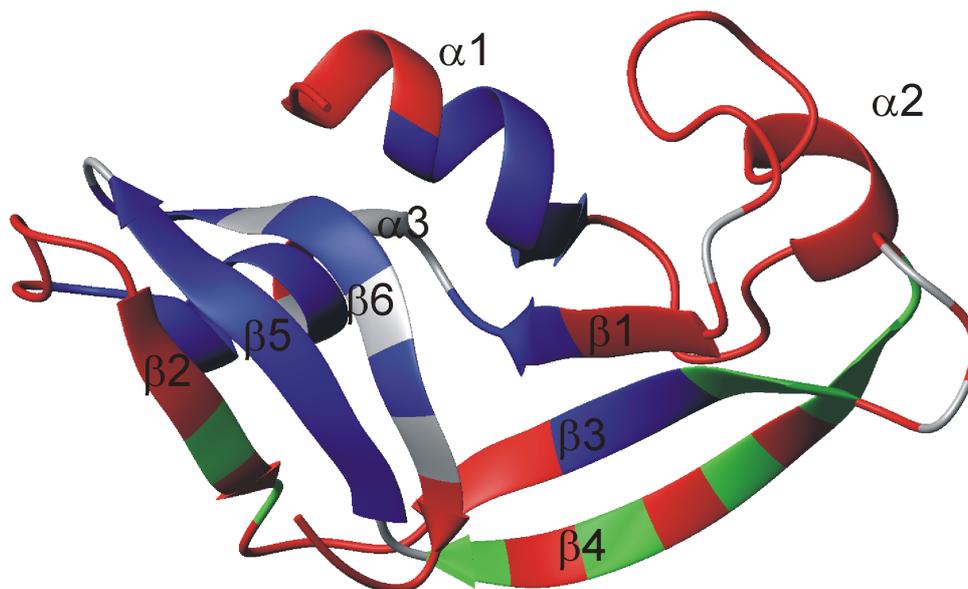


Abb. 38: Strukturelle Beschreibung des Faltungsintermediates von Onconase

Gezeigt ist die Kristallstruktur von Onconase (Mosimann et al. 1994) (1onc.pdb) als Bänderdarstellung. Reste mit Schutz in I sind blau, Reste mit Schutz in N sind grün und Reste die im nativen Zustand austauschen sind rot eingefärbt. Die geschützten Bereiche wurden über *quenched-flow* NMR identifiziert.

3.3.2 Langsame prolinlimitierte Faltung des Zweidomänenproteins G3P aus dem Phagen fd

3.3.2.1 Vorarbeiten

Der Faltungsmechanismus von G3P erstreckt sich über einen sehr großen Zeitbereich vom Millisekunden- bis in den Stundenbereich (Abb. 6 B). Zuerst erfolgt eine unabhängige Faltung der einzelnen Domänen (zuerst N1 dann N2) und daran anschließend die Domänenassoziation (Martin & Schmid 2003b). Vervollständigt wird die Ausbildung der nativen Konformation durch eine sehr langsame Reaktion ($\tau = 6200$ s), bedingt durch Prolin 213, welches von *trans* nach *cis* Konformation isomerisiert (Martin & Schmid 2003c). Im *trans* Zustand sind die Phagen infektiös, im nativen *cis* Zustand nicht. Die Infektiösität geht exakt einher mit der Zeitkonstante dieser langsamen Reaktion (Eckert et al. 2005). So verringert der Zusatz von PPIasen oder der Aminosäureaustausch von Pro213 die Infektiösität in dem Maße, wie die langsame Reaktion dadurch beschleunigt wird. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass sich G3P besonders durch Mutationen im *hinge*-Bereich stabilisiert wird, welcher über Wechselwirkungen mit der N1 Domäne die Struktur des Zweidomänenproteins zusammenhält (Martin & Schmid 2003a). Zur Charakterisierung des Intermediates, welches sich vor der ratenlimitierenden Prolyl-Isomerisierung bildet und den infektiösen Zustand von G3P darstellt, in Bezug auf Struktur und Stabilität, wurde zunächst die Amidkreuzsignale (>93%) einer stabilisierenden Variante der beiden N-terminalen Domänen von G3P im nativen Zustand mit Hilfe von Trippelresonanzexperimenten anhand einer dreifach markierten Probe ($^{15}\text{N}^{13}\text{C}^2\text{D}$) zugeordnet (Abb. 39).

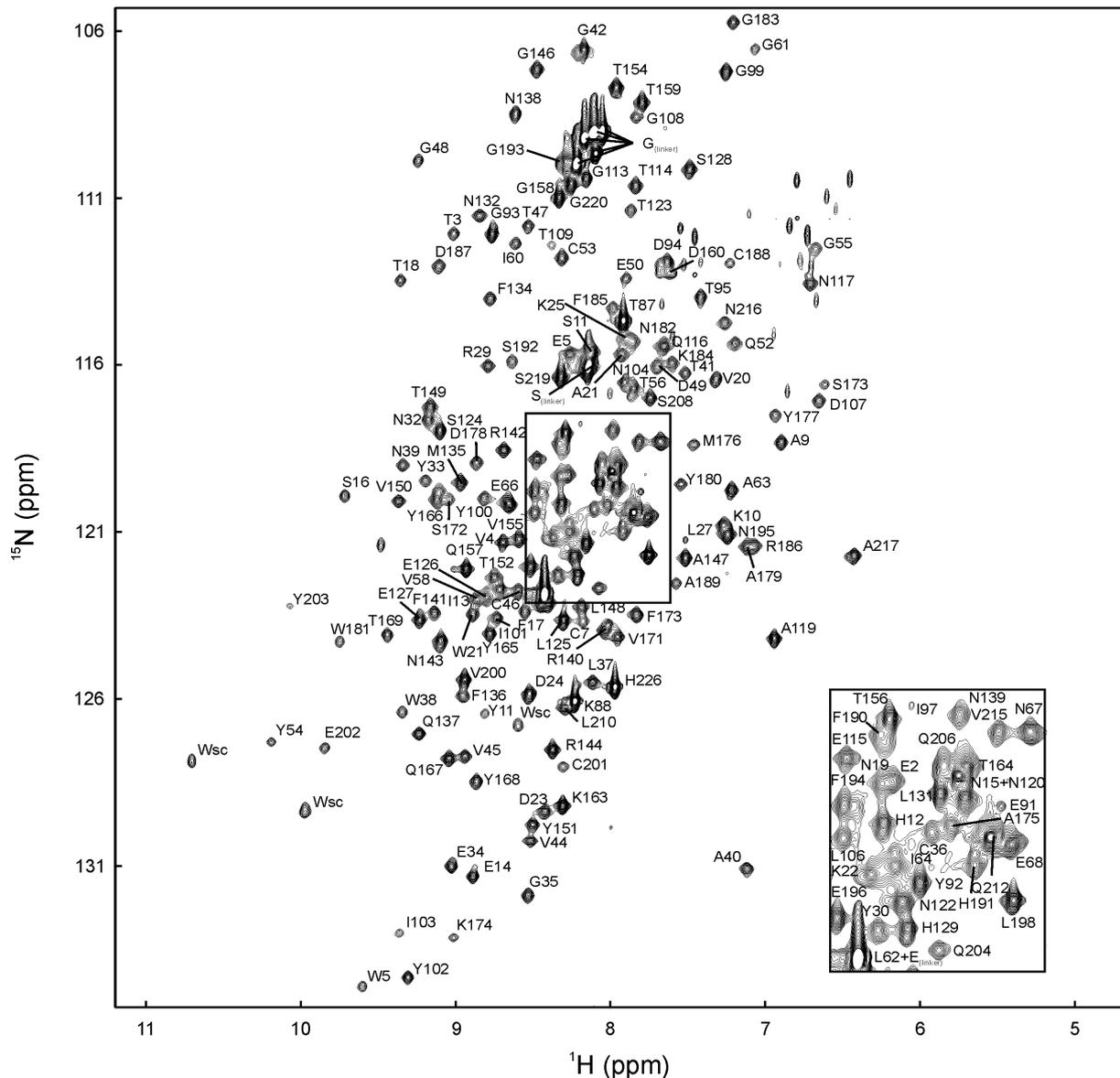


Abb. 39: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC von G3P.

Die Aufnahme erfolgte bei 25°C, in 50 mM Na-Phosphat, pH 7,0. Amidprotonen sind im Einbuchstabencode beschriftet.

3.3.2.2 Strukturelle Charakterisierung des Intermediats mit zweidimensionaler Echtzeit-NMR

Um strukturelle Informationen über das Faltungsintermediat (den *trans* Zustand) zu erhalten, wurde die langsame Reaktion (*trans* \rightarrow *cis*) in Echtzeit mittels NMR verfolgt. Ein einziges ^{15}N -TROSY-HSQC wurde während der langsamen Faltungsreaktion aufgenommen (kinetisches Spektrum) und ein identisches zweites Spektrum (Referenzspektrum) nachdem diese Reaktion vollständig abgelaufen waren. Durch Subtraktion des kinetischen Spektrums vom Referenzspektrum erhält man das Differenzspektrum. Anschließend wurde analysiert welche Amidprotonen während der langsamen Reaktion schon in ihrer nativen chemischen

Ergebnisse und Diskussion

Umgebung waren, und somit ein identisches Signal wie im Referenzspektrum (und demzufolge kein Signal im Differenzspektrum) geben, und welche Amidprotonen erst mit der langsamen Reaktion ihre native chemische Umgebung erreichen, also ein vermindertes Signal im Vergleich zum Referenzspektrum (und somit ein positives Signal im Differenzspektrum) zeigen (Abb. 40 a und b). Alle Aminosäuren, die keine Änderung zeigen, weisen im Intermediat eine identische lokale Struktur wie im nativen Zustand auf. Alle anderen erreichen ihre native chemische Umgebung erst nach der Isomerisierung von Prolin 213 in die *cis* Konformation. Über das Ausmaß der strukturellen Abweichung vom nativen Zustand lässt sich nur anhand dieser Auswertung der chemischen Verschiebung keine Aussage treffen. Die N2 Domäne von G3P ist im *trans* Zustand bereits nativ gefaltet, N1 ist ebenfalls gefaltet, die Aminosäuren auf der dem *hinge* abgewandten Seite zeigen native chemische Verschiebung. Dahingegen sind der *hinge* und die Aminosäuren der N1 Domäne, die zum *hinge* zeigen, nicht nativ. Strukturell ist durch das *trans* Prolin also lokal die Wechselwirkung zwischen *hinge* und N1 betroffen (Abb. 40 c).

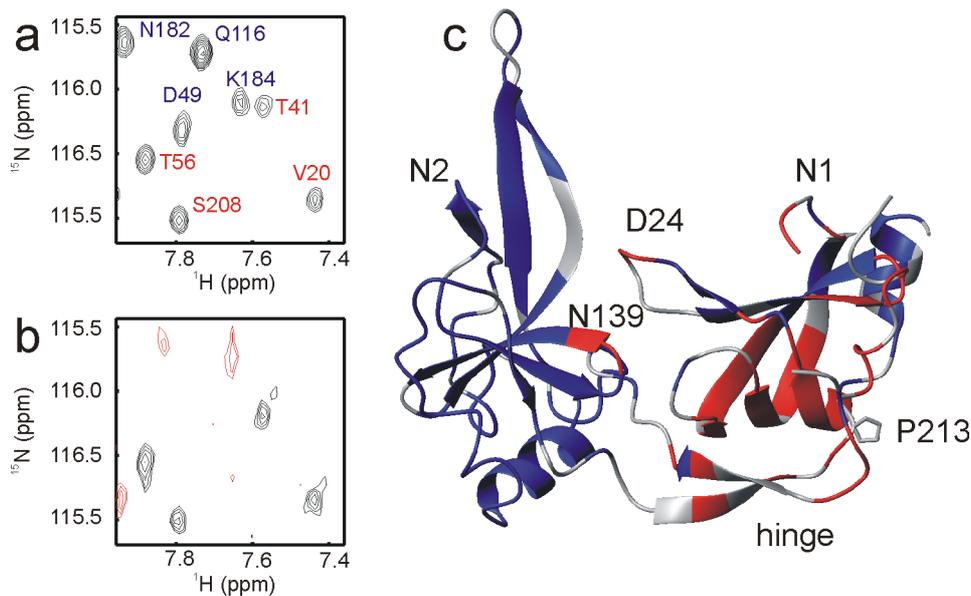


Abb. 40: Strukturelle Charakterisierung des Faltungsintermediates (*trans* Zustand) von G3P

Ausschnitt aus dem Referenzspektrum (a) und Differenzspektrum (b). (c) Bänderdarstellung von G3P (2g3p.pdb) (Holliger et al. 1999). Reste mit nativer chemischer Verschiebung in I (null im Differenzspektrum) sind in (a) blau beschriftet und in (c) blau eingefärbt. Reste mit nicht nativer chemischer Verschiebung in I (positives schwarzes Signal im Differenzspektrum) sind in (a) rot beschriftet und in (c) rot eingefärbt.

3.3.2.3 **Kompetition zwischen Rückfaltung und Amidprotonenaustausch ermöglicht die Beschreibung der lokalen Stabilität des Intermediats**

In 3.3.2.2 wurde gezeigt, dass im *trans* Zustand von Pro213 die Wechselwirkungen zwischen *hinge* und N1 nicht nativ sind. Mit Hilfe von Amidprotonenaustauschexperimenten im nativen Zustand, im Intermediat und von der isolierten N1 Domäne, sollte nun geklärt werden, wie stabil die einzelnen Bereiche von G3P in den verschiedenen Zuständen sind, und wann welche stabilisierenden Wechselwirkungen ausgebildet werden. Im nativen Zustand zeigen alle Struktureinheiten (N1, N2 und *hinge*) in etwa den gleichen Schutzfaktor. Keiner der Bereiche entfaltet lokal vor den anderen, die Entfaltung ist ein hoch kooperativer Prozess. Dies unterstreicht wie wichtig die Domänenwechselwirkungen für die Stabilität von G3P sind. Sind sie intakt, ist das gesamte Protein gefaltet, brechen sie auseinander, entfalten alle Bereiche kooperativ (Abb. 41 a). Die Stabilität der einzelnen Domänen ist deutlich geringer, im Vergleich zu der durch die Domäneninteraktion vermittelten Gesamtstabilität. Im Intermediat (*trans* Zustand) liegt die maximale Stabilität um Faktor zehn unter der Stabilität des nativen (*cis*) Zustands. Die N1 und N2 Domänen zeigen noch immer relativ zueinander einen vergleichbaren Schutz, die Stabilität des *hinge* ist deutlich reduziert, aber noch klar über einer ungefalteten Kette (Abb. 41 B). Während die Stabilität der N1 Domäne im Intermediat mit der Stabilität der isolierten N1 Domäne (Abb. 41 C) übereinstimmt (mit Ausnahme des N-Terminalen Bereichs), ist die Stabilität der N2 Domäne deutlich höher als in isolierter Form (Jakob & Schmid 2008). N1 und N2 wechselwirken also noch immer, wahrscheinlich über einen nicht komplett entfalteten *hinge*. Dies stabilisiert die N2 Domäne bis zur intrinsischen Stabilität der isolierten N1. Eine erhöhte Stabilität über die Stabilität der Einzeldomänen hinaus liegt nicht vor, die Wechselwirkung zwischen den Domänen ist deutlich schwächer als im nativen Zustand.

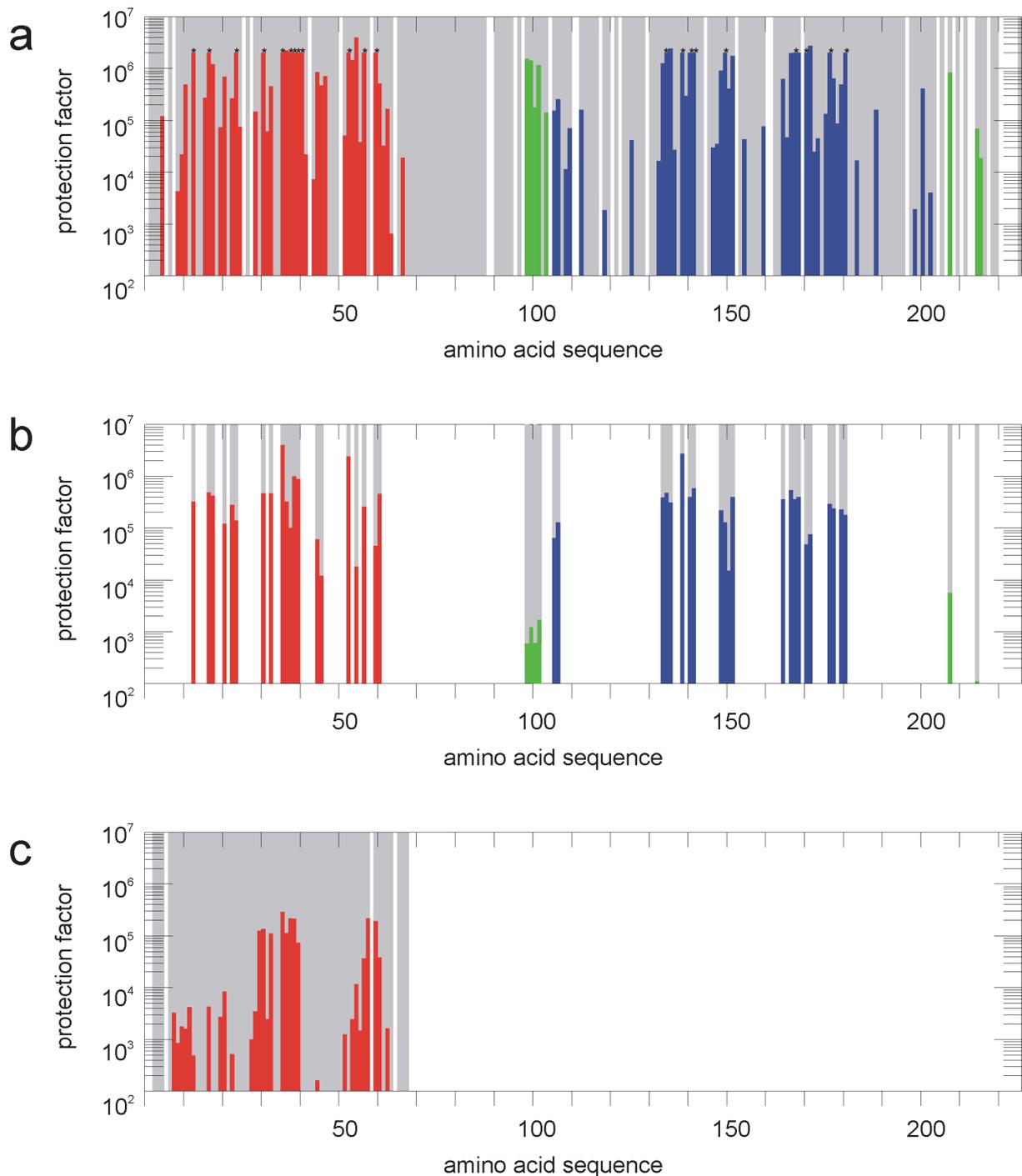


Abb. 41: Schutzfaktoren von G3P in verschiedenen Zuständen

Durch Amidprotonenaustausch erhaltene Schutzfaktoren von G3P im nativen/ *cis* Zustand von Pro213 (a), im intermediären *trans* Zustand von Pro213 (b) und der isolierten N1 Domäne (c), gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen. Alle Experimente wurden bei 25°C pH 7,0 durchgeführt. Die mit * gekennzeichneten Reste in (a) tauschen während der Zeit des Experimentes zu langsam aus, um einen Schutzfaktor bestimmen zu können. Dieser wurde auf $2 \cdot 10^6$ gesetzt, den Bereich der Reste mit dem höchsten Schutz, die noch quantitativ auswertbar waren. Reste der N1-Domäne sind rot, Reste der N2-Domäne blau und Reste des *hinge* grün eingefärbt.

3.3.2.4 Ein Netz von H-Brücken vermittelt den prolinregulierten Faltungszustand

Prolin 213 im *trans* Zustand führt zu einer deutlich verschlechterten Wechselwirkung des *hinge* mit der N1 Domäne. Dies hat zum einen deutlichen Stabilitätsverlust zur Folge, führt aber auch zum infektiösen Zustand. Sowohl die Kontaktfläche der Domänen im nativen G3P, als auch die Position der stabilisierenden Mutationen und der Amidprotonenaustausch im nativen Zustand zeigen, dass die Hauptwechselwirkung zwischen *hinge* und N1 im Bereich der Faltblätter des *hinge* stattfinden, Prolin 213 liegt jedoch davon räumlich entfernt. Wie Prolin 213 mechanistisch die Interaktionen zwischen *hinge* und N1, und somit zwischen dem infektiösen (*trans*) und dem stabilen (*cis*) Zustand reguliert, zeigt sich, wenn man das Wasserstoffbrückennetz in *hinge* und zwischen *hinge* und N1 analysiert (Abb. 42). Die im nativen Zustand hochgeschützten Wasserstoffbrücken ziehen sich vom Bereich der Faltblätter über die N1 Domäne bis hin zum Bereich um Prolin 213. All diese Wasserstoffbrücken sind im Intermediat deutlich weniger geschützt, während die Auswirkungen auf Wasserstoffbrücken im übrigen Protein eher gering sind. Eine lokale Veränderung an Prolin 213 würde somit die exakte Geometrie der richtungsabhängigen Wasserstoffbrücken im und zum *hinge* stören, und diese somit brechen bzw. schwächen.

Die stark stabilisierten Rückgratwasserstoffbrücken in Abb. 40b zeigen den molekularen Weg, der die räumliche Spezifität von H-Brücken und den Unterscheid von lokalen Stabilitäten verwendet, um das Signal weiterzuleiten, das durch das Umschalten an Pro213 generiert wurde. Die Verkürzungen zwischen Pro213 und den Anknüpfungspunkten der Wasserstoffbrücken sind reich an Prolinresten und β -verzweigten Aminosäuren. Das erhöht wahrscheinlich die Kettenrigidität und hilft so, das Signal der Isomerisierung an Pro213 zur anderen Seite der Gelenkregion weiterzuleiten. Somit kann Prolin 213, obwohl räumlich entfernt, die Hauptinteraktionsfläche beeinflussen und steuern.

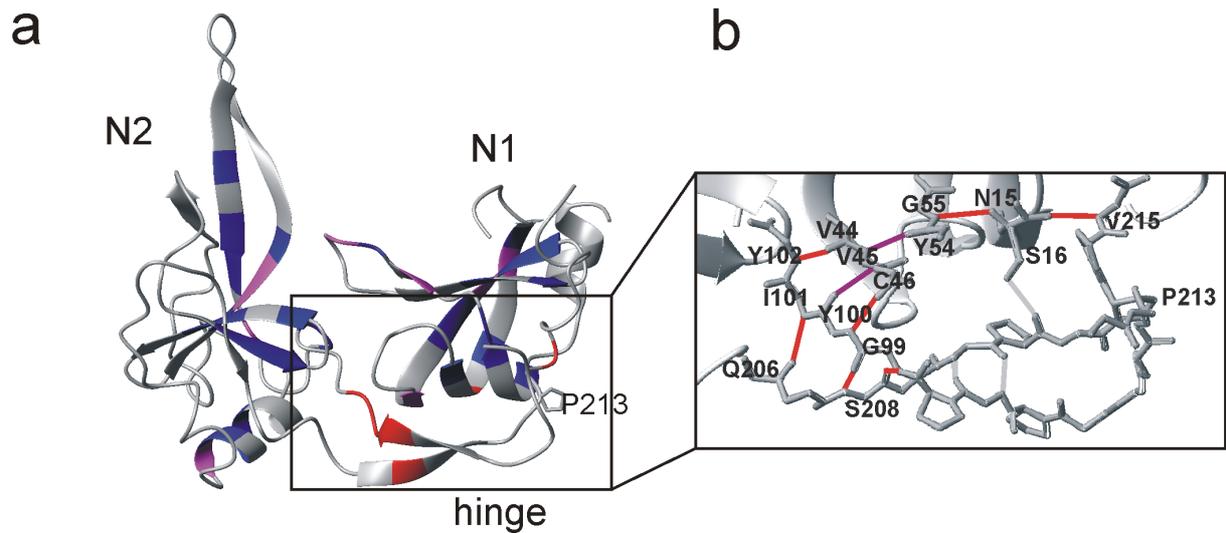


Abb. 42: Wasserstoffbrückennetzwerk des *hinge*.

(a) Vergleich aller in I bestimmbaren Schutzfaktoren P(I) mit den nativen Schutzfaktoren P(N). Reste, deren P(I) 1 bis 10fach kleiner als der P(N) ist, sind blau eingefärbt. Ist P(I) 10 bis 100fach geringer sind die Reste magenta, ab 100fach geringer rot eingefärbt. In (a) sind die Wasserstoffbrücken explizit dargestellt. Sie sind gemäß ihres unterschiedlichen Schutzes in I und N nach dem Farbcode aus (a) eingefärbt.

4 Zusammenfassende Diskussion

4.1 Strukturelle Charakterisierung von transient vorliegenden teilgefalteten Zustände aus dem Ensemble des nativen Zustands

Transient vorliegende teilgefaltete Proteinzustände lassen sich unter nativen Bedingungen mit Hilfe von Amidprotonenaustauschexperimenten (2.2.3) untersuchen. Das Prinzip dieser Experimente beruht darauf, dass diese teilgefalteten oder entfalteten Zustände, obwohl sie nur zu einem verschwindend kleinen Anteil vorliegen, das Austauschverhalten dominieren. Somit lassen sich in einem Protein Bereiche mit unterschiedlicher Stabilität, bzw. unterschiedlichen Öffnungsraten, identifizieren. Man unterscheidet Bereiche mit globaler Stabilität, die nur dann einen Austausch zeigen, wenn das Protein komplett entfaltet, und Bereiche mit verminderter bis nicht mehr messbaren Stabilität. Dabei lässt sich allerdings nicht immer zweifelsfrei klären, ob diese Bereiche lokal entfalten (atmen), oder bis zum Intermediat entfalten und dort austauschen. Allerdings geben diese Experimente im Verbund mit Denaturierungsmittel-induzierten Faltungsexperimenten Hinweise, welche Bereiche als im Intermediat entfaltet in Frage kommen. Unterscheidet sich das Intermediat deutlich vom nativen Zustand, und liegt das Intermediat auf der Reaktionskoordinate zwischen nativem Zustand und Geschwindigkeitsbestimmendem Schritt, ermöglichen die Amidprotonenaustauschexperimente eine gute Korrelation mit den Faltungsereignissen. Eine andere Möglichkeit um Intermediate (abhängig von den Gleichgewichtskonstanten zwischen N, I und U) von lokalen Fluktuationen (unabhängig von Gleichgewichtskonstanten) zu trennen wäre die Amidprotonenaustauschexperimente bei verschiedenen Denaturierungsmittelkonzentrationen durchzuführen (Mayo & Baldwin 1993; Bai et al. 1995). Vor allem bei Intermediaten, die sich energetisch wenig vom nativen, bzw. entfalteten Zustand unterscheiden, empfiehlt sich diese ausführlichere Analyse.

Für P19 (3.1.1) konnte gezeigt werden, dass ANK 3-5 die globale Stabilität zeigen, und somit im Intermediat gefaltet vorliegen. Dagegen zeigen ANK 1-2 die Stabilität des N→I Übergangs (3.1.2). Daraus lässt sich schließen, dass ANK 1-2 im Intermediat entfaltet vorliegen. Bei Barstar zeigen die meisten Reste eine Öffnungsrate, die der langsamen Entfaltungsrates aus Fluoreszenzkinetiken entspricht. Reste der Helix 3 zeigen dagegen deutlich höhere Öffnungsraten hin zur austauschkompetenten Form, die der schnelleren Fluoreszenz detektierten Entfaltungsrates entsprechen. Helix 3 erreicht also deutlich schneller

einen Austauschkompetenten Zustand und liegt in diesem Intermediat entfaltet vor. Nachdem die initialen Entfaltungseignisse auf Helix 3 lokalisiert wurden, ermöglicht dies weitere kinetische Untersuchungen und Mutationsstudien, um das Bild zu vervollständigen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mit Hilfe von Amidprotonenaustauschexperimenten recht einfach Hinweise auf die Struktur eines mit klassischen Methoden detektierten und charakterisierten Intermediates erhalten lassen. Eine andere Methode um gering populierte Zustände, welche sich im Austausch mit dem Grundzustand befinden, sind so genannte R_2 -Dispersionsmessungen (Korzhnev et al. 2004; Mittermaier & Kay 2006; Korzhnev & Kay 2008). Diese unterliegen einem recht engen Zeitfenster (Austausch vom Grundzustand zum angeregten Zustand im Idealfall zwischen 200 und 2000 s^{-1}), liefern dafür aber Aussagen über die apparenten Raten (kinetisch), die Populationen (thermodynamisch) und über chemischen Verschiebungen des angeregten Zustands (strukturell). Über die Kenntnis vieler chemischer Verschiebungen eines Intermediates, bzw. der auf der Messung chemischer Verschiebungen beruhenden residualen dipolaren Kopplungen (Tjandra & Bax 1997) ist eine Bestimmung einer hochaufgelösten Struktur denkbar.

4.2 Entfaltung in Gleichgewichtsübergängen aufgelöst für individuelle Reste

Populieren sich Faltungsintermediate im Verlauf einer Gleichgewichtsentfaltung (Denaturierungsmittel, Temperatur, etc) quantitativ, kann durch NMR-detektierte Übergänge für jeden Rest zweifelsfrei gesagt werden, ob er in I nativ gefaltet, entfaltet oder in veränderter Konformation vorliegt. So zeigt sich für tANK (3.2.1), dass ANK 1-2 im Intermediat weitgehend entfaltet vorliegen. Dagegen liegen ANK 3-5 noch genauso gefaltet vor wie im nativen Zustand. Bei P19 S76E (3.2.2), welches ein Mimik für Phosphorylierung ist, liegen bei 37°C nur ANK 3-5 gefaltet vor, ANK 1-2 sind entfaltet. Da die Übergänge enger beisammen liegen, und durch die Temperatur zusätzlich durch erhöhten Austausch mit dem Wasser alle Signalintensitäten betroffen sind, lässt sich dieser Übergang schwerer quantitativ auswerten als bei tANK. So lässt sich nicht sagen, wie viel der Moleküle bei 37°C in I und in U vorliegen. Fest steht lediglich, dass keine mehr nativ sind und ANK 1-2 somit entfaltet sind. Ebenso wenig lässt sich die Verteilung von I und U durch Fluoreszenz

detektierte Gleichgewichtsübergänge quantifizieren, da die Entfaltung unmittelbar (bei kleinsten Mengen Harnstoff) einsetzt.

Da die beiden Übergänge $N \rightarrow I$ und $I \rightarrow U$ ausreichend voneinander getrennt liegen (die Übergangsmittelpunkte unterscheiden sich um 1 M GdmCl) lassen sie sich quantitativ auswerten (bei tANK), oder zumindest lässt sich die strukturelle Beschaffenheit des Intermediates feststellen. Bei anderen Übergängen ließ sich zumeist nur die Existenz eines Gleichgewichtsintermediates feststellen (Zeeb et al. 2002) oder ausschließen (Zeeb et al. 2004). Die aus den getrennten Übergängen resultierende hohe Population des Intermediates von tANK (>90% bei 2,1 M GdmCl) würde zudem eine hochaufgelöste Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Intermediates im Gleichgewicht durch NMR-Spektroskopie ermöglichen.

4.3 Schnelle Faltungsreaktionen mit *quenched-flow* NMR

Proteinfaltungsreaktionen sind überwiegend zu schnell, um sie in Echtzeit mit der intrinsisch langsamen NMR-Spektroskopie untersuchen zu können. Strukturell kann man Intermediate in solchen Reaktionen nur indirekt aus Gleichgewichtsmessungen mit Amidprotonenaustausch (3.1.1 und 3.1.2) oder neuerdings über R_2 -Dispersionsmessungen (Korzhev et al. 2004; Mittermaier & Kay 2006; Korzhnev & Kay 2008) charakterisieren. Eine elegante Abwandlung des Amidprotonenaustausches im Gleichgewicht, mit dem man direkt Informationen über das Intermediat erhält, ist der *quenched-flow* Amidprotonenaustausch. Dabei wird zu verschiedenen Rückfaltungszeiten ein Austauschpuls gesetzt und nach kurzer Zeit gequenched. So findet der Hauptaustausch zu definierten Zeiten statt, das Protein wird chemisch markiert und kann, da der Austausch geschützter Amidprotonen im nativen Protein extrem verlangsamt ist, nach der Faltung mit NMR untersucht werden. Der aus dem Austausch bei verschiedenen Rückfaltungszeiten resultierende Protonenbesetzungsgrad, wird eingefroren (Radford et al. 1992). Für Onconase konnte somit gezeigt werden, welche Reste bereits mit der Reaktion zum Intermediat geschützt werden, und somit in I gefaltet sind, während andere Bereiche erst mit Erreichen des nativen Zustands vom Austauschpuls geschützt sind. Das so detektierte Faltungsintermediat ist strukturell ähnlich zu dem Intermediat von RNase A mit nativen Isomerisierungszuständen der Proline. Zusätzlich zur Struktur scheinen auch wichtige Abschnitte auf der Reaktionskoordinate der Faltung konserviert zu sein.

4.4 Hocho aufgelöste Informationen zur Struktur und Stabilität langlebiger kinetischer Intermediate mittels Echtzeit-NMR

Sehr langsame Reaktionen lassen sich direkt in Echtzeit mit NMR verfolgen. Obwohl diese Methode aufgrund ihrer niedrigen Zeitaufösung limitiert ist, bietet sie hocho aufgelöste Informationen über die Beschaffenheit von kinetischen Faltungintermediaten, wie sie sonst nur bei sich im Gleichgewicht hoch populierenden Intermediaten erreicht wird (3.2.1 und 3.2.2). So unterscheidet man mit dieser Methode nicht, wie beim Amidprotonenaustausch, zwischen geschützt und nicht geschützt, sondern kann, da man die exakte chemische Verschiebung in I und N vergleicht, zwischen nativ und nicht nativ unterscheiden, wobei nativ bedeutet, dass die gleiche chemische Umgebung wie im der Struktur des nativen Zustands vorliegt. Dies wurde nun erstmals erfolgreich auf ein Zweidomänenprotein von 226 Aminosäuren angewandt. Zudem lässt sich über Konkurrenzexperimente zwischen Faltung und Amidprotonenaustausch, die Stabilität einzelner Reste im kinetischen Intermediat quantitativ bestimmen. Aufgrund der langsamen Reaktion ($\tau = 6200$ s) und neuer Techniken (quantitativer Pufferwechsel) gelang es das Intermediat zu 100% in wässrigem Puffer zu populieren und anschließend in 100% deuteriertem Puffer den Amidprotonenaustausch durchzuführen. Bei früheren Experimenten (Koide et al. 1993; Steegborn et al. 2000) wurden dagegen bei Schritte durch einfaches Mischen in 90% deuteriertem und 10% protoniertem Puffer durchgeführt. Durch diese Verbesserungen konnte nun erstmals die Stabilität unterschiedlicher Bereiche eines Faltungintermediates unterschieden und quantitativ bestimmt werden. Im Besonderen konnte die unterschiedliche Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen im nicht infektiösen nativen Zustand (Pro213 in *cis*) und im infektiösen intermediären Zustand (Pro213 in *trans*) untersucht werden.

Dies ermöglicht nun eine molekulare mechanistische Beschreibung wie der Isomerisierungszustand von Prolin 213 die Domäneninteraktion im G3P und somit die Infektiösität steuert. Prolin 213 ist mit der Hauptinteraktionsfläche zwischen N1-Domäne und *hinge* Subdomäne durch ein Netz von Wasserstoffbrücken verbunden. All diese im nativen Zustand äußerst stabilen Wasserstoffbrücken (hoher Schutzfaktor, der die globale Stabilität widerspiegelt) sind im intermediären *trans* Zustand deutlich geschwächt (um einen Faktor 100 in den Schutzfaktoren). Ermöglicht wird dieser Unterschied durch die hohe Abhängigkeit der Wasserstoffbrücken von der lokalen Geometrie. Veränderungen in Pro213 wirken sich auf die Stärke und Beschaffenheit der benachbarten Wasserstoffbrücken aus, was wiederum weitere Wasserstoffbrücken in direkter Umgebung dieses veränderten Bereiches beeinflussen kann. Letztendlich führt dies dazu, dass die dadurch geschwächten Wasserstoffbrücken im

Zusammenfassende Diskussion

β -Faltblatt des *hing*es bzw. vom Faltblatt zur N1-Domäne die Interaktion zwischen *hing*e und N1 nicht mehr stabilisieren können. Ist diese Klammer erst einmal aufgebrochen bzw. destabilisiert wirkt sich dies ebenso auf die von ihr vermittelte Interaktion der N2 Domäne mit der N1 Domäne aus. Die N2 Domäne kann nicht länger die TolA Bindungsstelle der N1 Domäne blockieren, der initiale Kontakt zwischen dem Phagen fd (über sein G3P) und der *E. coli* Zelle ist gemacht. Dies zeigt, dass relativ geringfügige Veränderungen an einer abseits gelegenen Stelle eines Proteins, dessen globales Verhalten (in diesem Fall die Domäneninteraktion) beeinflussen können. Es kommt darauf an, dass der Hebel an der richtigen Stelle ansetzt. Über den Isomerisierungszustand von Prolin 213 kann das G3P des Phagen fd nun für einige Minuten bis Stunden von seinem stabilen Grundzustand (Schutz vor Abbau) in seinen infektiösen Zustand wechseln. Dies bedeutet, dass der Phage nach Kontakt mit dem F-Pilus der Zelle, welcher *in vivo* zum infektiösen Zustand führt, ausreichend Zeit hat die Zelle zu infizieren, bevor wieder der stabile Dauerzustand eingenommen wird.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es Proteinfaltungsintermediate mit verschiedenen NMR-spektroskopischen Methoden strukturell zu charakterisieren. Dabei sollten neben kleinen Modellproteinen auch größere, NMR-spektroskopisch anspruchsvollere Proteine bis zu einer Größe von 25 kDa (226 Aminosäuren) untersucht werden.

So konnte mittels Amidprotonenaustausch für das humane Ankyrin-*repeat* Protein P19, ein zuvor mittels eines NMR-detektierten Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergangs (Zeeb et al. 2002), bzw. Fluoreszenz-detektierten kinetischen Untersuchungen (Löw et al. 2007) identifiziertes Faltungsintermediat strukturell näher beschrieben werden. Es zeigte sich, dass die Schutzfaktoren der Ankyrin-*repeats* 3-5 mit der globalen thermodynamischen Stabilität einhergehen, während sie für die Ankyrin-*repeats* 1-2 mit der Stabilität des N→I Überganges korrelieren. Für das strukturhomologe tANK konnten diese Beobachtungen durch einen NMR-detektierten GdmCl-induzierten Gleichgewichtsübergang eindeutig bestätigt werden. Reste der ersten beiden Ankyrin-*repeats* entfalten in einem ersten Übergang, während Reste der Ankyrin-*repeats* 3-5 erst in einem deutlich getrennten zweiten Übergang bei höheren GdmCl-Konzentrationen entfalten und somit im Intermediat noch nativ gefaltet vorliegen. Die Einführung einer negativen Ladung in der P19 Variante S76E (Mimik einer Phosphorylierung) bedingt, dass bei 37°C die ersten beiden, funktionellen Ankyrin-*repeats* entfaltet vorliegen. In diesem Zustand kann P19 weiter phosphoryliert, ubiquitiniert und somit seine Funktion reguliert werden.

Für Barstar konnten durch eine Analyse des Millisekundenamidprotonenaustausches im EX1 und EX2 Austauschregime zahlreiche Öffnungs- bzw. Schließraten bestimmt werden. Diese entsprechen den extrapolierten Faltungs- und Entfaltungsraten aus kinetischen Experimenten. Helix 3 zeigt dabei Öffnungsraten, welche den Entfaltungsraten von N nach I entsprechen und konnte somit als Startpunkt der Entfaltung und als in I entfaltet identifiziert werden. Mit NMR-detektierten *quenched-flow* Untersuchungen konnte der Bereich von Onconase bestimmt werden, der im transienten kinetischen Rückfaltungsintermediat durch Strukturbildung vor Amidprotonenaustausch geschützt ist. Dies entspricht einem Rückfaltungsintermediat der strukturhomologen RNase A, was nahe legt, dass nicht nur die native Struktur, sondern auch die des Intermediates für Mitglieder einer Superfamilie konserviert ist.

Für den intermediären und infektiösen *trans* Zustand (Pro213) des Zweidomänenproteins G3P aus dem Phagen fd, welcher in einer langsamen Reaktion in den nativen *cis* Zustand übergeht,

Zusammenfassung

gelang mittels Echtzeit-NMR neben der strukturellen Charakterisierung auch eine quantitative Beschreibung des Schutzes einzelner Amidprotonen. Dies ermöglichte es ein Netz von Wasserstoffbrücken zwischen Prolin213 und der Domäneninteraktionsfläche zu identifizieren, welche im Intermediat deutlich geschwächt sind. So wird durch den Isomerisierungszustand von Prolin 213 die Stärke der Domänenwechselwirkung gesteuert und zwischen dem infektiösen Zustand (schwache Wechselwirkung der Domänen) und dem stabilen nativen (starke Domänenwechselwirkung) geschaltet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch eine Reihe von NMR-Experimenten ein detaillierter struktureller Einblick in die Beschaffenheit von Proteinfaltungsintermediaten gewonnen werden kann, woraus sich fundierte molekulare Erkenntnisse zur Faltung und Funktion dieser Proteine ableiten lassen.

6 Abkürzungsverzeichnis

ANK	Ankyrin- <i>repeat</i>
CD	Circulardichroismus
CDK	Cyclin abhängige Kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EX	Austauschmechanismus
EX1	monomolekularer Austauschmechanismus
EX2	bimolekularer Austauschmechanismus
fHSQC	fast HSQC
G3P	Gen-3-Protein filamentöser Phagen
GdmCl	Guanidiniumchlorid
H/D	Protonen zu Deuterium
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
I	intermediärer Zustand
MEXICO	magnetization exchange in isotopically labeled compounds
N	nativer Zustand
N1	1. N-terminale Domäne des Gen-3-Proteins
N2	2. N-terminale Domäne des Gen-3-Proteins
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RNA	Ribonukleinsäure
sgTROSY	sensitivity and gradient enhanced TROSY
S/N	Signal zu Rauschen
tANK	thermophiles Ankyrin- <i>repeat</i> Protein
TOCSY	total correlation spectroscopy
TROSY	transverse relaxation optimized spectroscopy
U	entfalteter Zustand
Wt	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of proteins chains." Science **181**: 223-230.
- Arnold, U., C. Schulenburg, D. Schmidt and R. Ulbrich-Hofmann (2006). "Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics." Biochemistry **45**(11): 3580-7.
- Bai, Y. W., J. S. Milne, L. Mayne and S. W. Englander (1993). "Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange." Proteins: Structure Function and Genetics **17**: 75-86.
- Bai, Y. W., J. S. Milne, L. Mayne and S. W. Englander (1994). "Protein stability parameters measured by hydrogen exchange." Proteins: Structure Function and Genetics **20**: 4-14.
- Bai, Y. W., T. R. Sosnick, L. Mayne and S. W. Englander (1995). "Protein folding intermediates: Native-state hydrogen exchange." Science **269**(5221): 192-197.
- Balbach, J., V. Forge, W. S. Lau, N. A. J. van Nuland, K. Brew and C. M. Dobson (1996). "Protein folding monitored at individual residues during a two- dimensional NMR experiment." Science **274**(5290): 1161-1163.
- Balbach, J., V. Forge, N. A. J. van Nuland, S. L. Winder, P. J. Hore and C. M. Dobson (1995). "Following protein folding in real time using NMR spectroscopy." Nat. Struct. Biol. **2**(10): 865-870.
- Balbach, J. and F. X. Schmid (2000). Proline isomerization and its catalysis in protein folding. Mechanisms of Protein Folding. R. H. Pain. Oxford, University Press: 212-237.
- Baldwin, R. L. (1994). "Protein folding - Matching speed and stability." Nature **369**: 183-184.
- Baldwin, R. L. (1996). "On-pathway versus off-pathway folding intermediates." Fold. Des. **1**(1): R1-R8.
- Baldwin, R. L. and G. D. Rose (1999). "Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states." Trends Biochem. Sci. **24**(2): 77-83.
- Batey, S., K. A. Scott and J. Clarke (2006). "Complex folding kinetics of a multidomain protein." Biophys J **90**(6): 2120-30.
- Baumgartner, R., C. Fernandez-Catalan, A. Winoto, R. Huber, R. A. Engh and T. A. Holak (1998). "Structure of human cyclin-dependent kinase inhibitor p19INK4d: comparison to known ankyrin-repeat-containing structures and implications for the dysfunction of tumor suppressor p16INK4a." Structure **6**(10): 1279-1290.
- Bernado, P., L. Blanchard, P. Timmins, D. Marion, R. W. Ruigrok and M. Blackledge (2005). "A structural model for unfolded proteins from residual dipolar couplings and small-angle x-ray scattering." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(47): 17002-7.
- Binz, H. K., P. Amstutz, A. Kohl, M. T. Stumpp, C. Briand, P. Forrer, M. G. Grütter and A. Plückthun (2004). "High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries." Nat. Biotechnol. **22**(5): 575-582.
- Bloembergen, N. and R. V. Pound (1954). "Radiation damping in magnetic resonance experiments." Phys. Rev. **95**: 8-12.
- Bork, P. (1993). "Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally?" Proteins **17**(4): 363-74.
- Bradley, C. M. and D. Barrick (2005). "Effect of multiple prolyl isomerization reactions on the stability and folding kinetics of the notch ankyrin domain: experiment and theory." J. Mol. Biol. **352**(2): 253-265.
- Briggs, M. S. and H. Roder (1992). "Early Hydrogen-Bonding Events in the Folding Reaction of Ubiquitin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **89**(6): 2017-2021.

Literaturverzeichnis

- Brotherton, D. H., V. Dhanaraj, S. Wick, L. Brizuela, P. J. Domaille, E. Volyanik, X. Xu, E. Parisini, B. O. Smith, S. J. Archer, M. Serrano, S. L. Brenner, T. L. Blundell and E. D. Laue (1998). "Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d." *Nature* **395**(6699): 244-250.
- Buckle, A. M., G. Schreiber and A. R. Fersht (1994). "Protein-protein recognition: Crystal structural analysis of a barnase barstar complex at 2.0-angstrom resolution." *Biochemistry* **33**(30): 8878-8889.
- Chatellier, J., O. Hartley, A. D. Griffiths, A. R. Fersht, G. Winter and L. Riechmann (1999). "Interdomain interactions within the gene 3 protein of filamentous phage." *FEBS Lett* **463**(3): 371-4.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer and A. Bax (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." *J. Biomol. NMR* **6**(3): 277-93.
- Deng, L. W., P. Malik and R. N. Perham (1999). "Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli." *Virology* **253**(2): 271-7.
- Deng, L. W. and R. N. Perham (2002). "Delineating the site of interaction on the pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli." *J Mol Biol* **319**(3): 603-14.
- Devi, V. S., H. K. Binz, M. T. Stumpp, A. Plückthun, H. R. Bosshard and I. Jelesarov (2004). "Folding of a designed simple ankyrin repeat protein." *Protein Sci.* **13**(11): 2864-2870.
- Dobson, C. M. (2003). "Protein folding and misfolding." *Nature* **426**(6968): 884-890.
- Eckert, B., A. Martin, J. Balbach and F. X. Schmid (2005). "Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection." *Nat Struct Mol Biol* **12**(7): 619-23.
- Fersht, A. (1998). *Structure and Mechanism in Protein Science* W. H. Freeman.
- Fersht, A. R. (2000). "Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4): 1525-9.
- Fersht, A. R., A. Matouschek and L. Serrano (1992). "The Folding of an Enzyme .1. Theory of Protein Engineering Analysis of Stability and Pathway of Protein Folding." *Journal of Molecular Biology* **224**(3): 771-782.
- Geerlof, A., J. Brown, B. Coutard, M. P. Egloff, F. J. Enguita, M. J. Fogg, R. J. Gilbert, M. R. Groves, A. Haouz, J. E. Nettleship, P. Nordlund, R. J. Owens, M. Ruff, S. Sainsbury, D. I. Svergun and M. Wilmanns (2006). "The impact of protein characterization in structural proteomics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 10): 1125-36.
- Gemmecker, G., W. Jahnke and H. Kessler (1993). "Measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds." *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 11620-11621.
- Golbik, R., G. Fischer and A. R. Fersht (1999). "Folding of barstar C40A/C82A/P27A and catalysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerization by human cytosolic cyclophilin (Cyp18)." *Protein Sci.* **8**(7): 1505-1514.
- Goldberg, M. E. (1985). "The second translation of the genetic message: protein folding and assembly." *Trends in Biochemical Sciences* **10**: 388-391.
- Gorbatyuk, V., Y. C. Chen, Y. J. Wu, R. J. Youle and T. H. Huang (1999). "Sequence-specific ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of recombinant onconase/P-30 protein." *J Biomol NMR* **15**(4): 343-4.
- Hofmann, H., U. Weininger, C. Low, R. P. Golbik, J. Balbach and R. Ulbrich-Hofmann (2009). "Fast amide proton exchange reveals close relation between native-state dynamics and unfolding kinetics." *J Am Chem Soc* **131**(1): 140-6.

Literaturverzeichnis

- Holliger, P. and L. Riechmann (1997). "A conserved infection pathway for filamentous bacteriophages is suggested by the structure of the membrane penetration domain of the minor coat protein g3p from phage fd." Structure **5**(2): 265-275.
- Holliger, P., L. Riechmann and R. L. Williams (1999). "Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: evidence for conformational lability." J Mol Biol **288**(4): 649-57.
- Houry, W. A. and H. A. Scheraga (1996). "Structure of a hydrophobically collapsed intermediate on the conformational folding pathway of ribonuclease A probed by hydrogen-deuterium exchange." Biochemistry **35**(36): 11734-11746.
- Hupp, T. R. and D. P. Lane (1995). "Two distinct signaling pathways activate the latent DNA binding function of p53 in a casein kinase II-independent manner." J Biol Chem **270**(30): 18165-74.
- Ikura, M., L. E. Kay and A. Bax (1990). "A Novel-Approach for Sequential Assignment of H-1, C-13, and N-15 Spectra of Larger Proteins - Heteronuclear Triple-Resonance 3-Dimensional Nmr-Spectroscopy - Application to Calmodulin." Biochemistry **29**(19): 4659-4667.
- Jackson, S. E. (1998). "How do small single-domain proteins fold?" Fold. Des. **3**(4): R81-91.
- Jaenicke, R. (1991). "Protein Stability and Protein Folding." Protein Conformation. **161:206-221**: 206-221.
- Jaenicke, R. (1996). "How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability?" Naturwissenschaften. **83**(12): 544-554.
- Jaenicke, R. (1999). "Stability and folding of domain proteins." Prog. Biophys. Mol. Biol. **71**(2): 155-241.
- Jakob, R. P. and F. X. Schmid (2008). "Energetic coupling between native-state prolyl isomerization and conformational protein folding." J Mol Biol **377**(5): 1560-75.
- Jeener, J., B. H. Meier, P. Bachmann and R. R. Ernst (1979). "Investigation of Exchange Processes by 2-Dimensional Nmr-Spectroscopy." Journal of Chemical Physics **71**(11): 4546-4553.
- Jha, A. K., A. Colubri, K. F. Freed and T. R. Sosnick (2005). "Statistical coil model of the unfolded state: resolving the reconciliation problem." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13099-104.
- Johnson, B. A. (2004). "Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules." Methods Mol. Biol. **278**: 313-52.
- Jucovic, M. and R. W. Hartley (1996). "Protein-protein interaction: A genetic selection for compensating mutations at the barnase-barstar interface." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **93**(6): 2343-2347.
- Kay, L. E. (2005). "NMR studies of protein structure and dynamics." J Magn Reson **173**(2): 193-207.
- Kay, L. E., M. Ikura, R. Tschudin and A. Bax (1990). "3-Dimensional Triple-Resonance Nmr-Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins." Journal of Magnetic Resonance **89**(3): 496-514.
- Kiefhaber, T. (1995). "Kinetic traps in lysozyme folding." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**: 9029-9033.
- Kiefhaber, T., H.-P. Grunert, U. Hahn and F. X. Schmid (1990). "Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding." Biochemistry **29**: 6475-6480.
- Kiefhaber, T., H. P. Grunert, U. Hahn and F. X. Schmid (1992). "Folding of RNase T1 is decelerated by a specific tertiary contact in a folding intermediate." Proteins: Structure Function and Genetics **12**: 171-179.

Literaturverzeichnis

- Kohl, A., H. K. Binz, P. Forrer, M. T. Stumpp, A. Plückthun and M. G. Grütter (2003). "Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1700-5.
- Koide, S., H. J. Dyson and P. E. Wright (1993). "Characterization of a folding intermediate of apoplastocyanin trapped by proline isomerization." Biochemistry **32**: 12299-12310.
- Koide, S., W. Jahnke and P. E. Wright (1995). "Measurement of intrinsic exchange rates of amide protons in a N- 15-labeled peptide." J. Biomol. NMR **6**(3): 306-312.
- Koradi, R., M. Billeter and K. Wüthrich (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures." J Mol Graph **14**(1): 51-55.
- Korzhev, D. M. and L. E. Kay (2008). "Probing invisible, low-populated States of protein molecules by relaxation dispersion NMR spectroscopy: an application to protein folding." Acc Chem Res **41**(3): 442-51.
- Korzhev, D. M., X. Salvatella, M. Vendruscolo, A. A. Di Nardo, A. R. Davidson, C. M. Dobson and L. E. Kay (2004). "Low-populated folding intermediates of Fyn SH3 characterized by relaxation dispersion NMR." Nature **430**(6999): 586-590.
- Levinthal, C. J. (1968). "Are there pathways for protein folding?" J. Chim. Phys. **65**: 44-45.
- Löw, C. (2008). Energy Landscapes of Protein Folding: From Structure to Function. Physik. Halle, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg.
- Löw, C., N. Homeyer, U. Weininger, H. Sticht and J. Balbach (2009). "Conformational switch upon phosphorylation: human CDK inhibitor p19INK4d between the native and partially folded state." ACS Chem Biol **4**(1): 53-63.
- Löw, C., U. Weininger, H. Lee, K. Schweimer, I. Neundorf, A. G. Beck-Sickinger, R. W. Pastor and J. Balbach (2008a). "Structure and dynamics of helix-0 of the N-BAR domain in lipid micelles and bilayers." Biophys J **95**(9): 4315-23.
- Löw, C., U. Weininger, P. Neumann, M. Klepsch, H. Lilie, M. T. Stubbs and J. Balbach (2008b). "Structural insights into an equilibrium folding intermediate of an archaeal ankyrin repeat protein." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3779-84.
- Löw, C., U. Weininger, M. Zeeb, W. Zhang, E. D. Laue, F. X. Schmid and J. Balbach (2007). "Folding mechanism of an ankyrin repeat protein: scaffold and active site formation of human CDK inhibitor p19(INK4d)." J Mol Biol **373**(1): 219-31.
- Lubienski, M. J., M. Bycroft, S. M. V. Freund and A. R. Fersht (1994). "Three-dimensional solution structure and C-13 assignments of barstar using nuclear magnetic resonance spectroscopy." Biochemistry **33**(30): 8866-8877.
- Lubienski, M. J., M. Bycroft, D. N. Jones and A. R. Fersht (1993). "Assignment of the backbone 1H and 15N NMR resonances and secondary structure characterization of barstar." FEBS Lett **332**(1-2): 81-7.
- Lubkowski, J., F. Hennecke, A. Pluckthun and A. Wlodawer (1999). "Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA." Structure **7**(6): 711-22.
- Main, E. R., S. E. Jackson and L. Regan (2003). "The folding and design of repeat proteins: reaching a consensus." Curr Opin Struct Biol **13**(4): 482-9.
- Marion, D., M. Ikura, R. Tschudin and A. Bax (1989). "Rapid recording of 2D NMR-spectra without phase cycling - application to the study of hydrogen-exchange in proteins." J. Magn. Reson. **85**: 393-399.

Literaturverzeichnis

- Martin, A. and F. X. Schmid (2003a). "Evolutionary stabilization of the gene-3-protein of phage fd reveals the principles that govern the thermodynamic stability of two-domain proteins." J. Mol. Biol. **328**(4): 863-875.
- Martin, A. and F. X. Schmid (2003b). "The folding mechanism of a two-domain protein: folding kinetics and domain docking of the gene-3 protein of phage fd." J. Mol. Biol. **329**(3): 599-610.
- Martin, A. and F. X. Schmid (2003c). "A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd." J. Mol. Biol. **331**(5): 1131-1140.
- Mayo, S. L. and R. L. Baldwin (1993). "Guanidinium Chloride Induction of Partial Unfolding in Amide Proton Exchange in RNase-A." Science **262**: 873-876.
- Mikulski, S. M., W. Ardelt, K. Shogen, E. H. Bernstein and H. Menduke (1990). "Striking increase of survival of mice bearing M109 Madison carcinoma treated with a novel protein from amphibian embryos." J Natl Cancer Inst **82**(2): 151-3.
- Mittermaier, A. and L. E. Kay (2006). "New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics." Science **312**(5771): 224-228.
- Montelione, G. T., D. Zheng, Y. J. Huang, K. C. Gunsalus and T. Szyperski (2000). "Protein NMR spectroscopy in structural genomics." Nat Struct Biol **7 Suppl**: 982-5.
- Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." Nature **374**: 131-134.
- Mori, S., C. Abeygunawardana, J. Berg and P. van Zijl (1997). "NMR study of rapidly exchanging amide protons in staphylococcal nuclease and the correlation with structural and dynamic properties." J. Am. Chem. Soc. **119**: 6844-6852.
- Mori, S., C. Abeygunawardana, M. O. Johnson and P. C. van Zijl (1995). "Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation." J. Magn. Reson. B **108**(1): 94-98.
- Mosavi, L. K., D. L. Minor, Jr. and Z. Y. Peng (2002). "Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16029-34.
- Mosimann, S. C., W. Ardelt and M. N. James (1994). "Refined 1.7 Å X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity." J Mol Biol **236**(4): 1141-53.
- Nolting, B., R. Golbik and A. R. Fersht (1995). "Submillisecond events in protein folding." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **92**(23): 10668-10672.
- Pace, C. N. (1986). "Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves." Methods in Enzymology **131**: 266-280.
- Park, K. S., D. P. Mohapatra, H. Misonou and J. S. Trimmer (2006). "Graded regulation of the Kv2.1 potassium channel by variable phosphorylation." Science **313**(5789): 976-9.
- Piotto, M., V. Saudek and V. Sklenar (1992). "Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions." J. Biomol. NMR **2**: 661-665.
- Radford, S. E., C. M. Dobson and P. A. Evans (1992). "The Folding of Hen Lysozyme Involves Partially Structured Intermediates and Multiple Pathways." Nature **358**(6384): 302-307.
- Sattler, M., J. Schleucher and C. Griesinger (1999). "Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients." Prog. NMR Spectrosc. **34**: 93-158.
- Schindler, T., M. Herrler, M. A. Marahiel and F. X. Schmid (1995). "Extremely rapid folding in the absence of intermediates: the cold-shock protein from *Bacillus subtilis*." Nat. Struct. Biol. **2**: 663-673.

Literaturverzeichnis

- Schreiber, G. and A. R. Fersht (1993). "The refolding of *cis*- and *trans*-peptidylprolyl isomers of Barstar." Biochemistry **32**: 11195-11203.
- Schulenburg, C., B. Ardel, W. Ardel, U. Arnold, K. Shogen, R. Ulbrich-Hofmann and Z. Darzynkiewicz (2007a). "The interdependence between catalytic activity, conformational stability, and cytotoxicity of onconase." Cancer Biol Ther **6**(8): 1233-9.
- Schulenburg, C., M. M. Martinez-Senac, C. Low, R. Golbik, R. Ulbrich-Hofmann and U. Arnold (2007b). "Identification of three phases in Onconase refolding." Febs J **274**(22): 5826-33.
- Schwartz, A. L. and J. D. Cutnell (1983). "One-Dimensional and Two-Dimensional Nmr-Studies of Exchanging Amide Protons in Glutathione." Journal of Magnetic Resonance **53**(3): 398-411.
- Sedgwick, S. G. and S. J. Smerdon (1999). "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework." Trends Biochem. Sci. **24**(8): 311-316.
- Shaka, A. J., P. B. Barker and R. Freeman (1985). "Computer-Optimized Decoupling Scheme for Wideband Applications and Low-Level Operation." Journal of Magnetic Resonance **64**(3): 547-552.
- Shastri, M. C. R., V. R. Agashe and J. B. Udgaonkar (1994). "Quantitative analysis of the kinetics of denaturation and renaturation of barstar in the folding transition zone." Protein Science **3**(9): 1409-1417.
- Shastri, M. C. R. and J. B. Udgaonkar (1995). "The folding mechanism of barstar: Evidence for multiple pathways and multiple intermediates." Journal of Molecular Biology **247**(5): 1013-1027.
- Steggborn, C., H. Schneider-Hassloff, M. Zeeb and J. Balbach (2000). "Cooperativity of a Protein Folding Reaction Probed at Multiple Chain Positions by Real-Time 2D NMR Spectroscopy." Biochemistry **39**(27): 7910-7919.
- Stefani, M. (2004). "Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world." Biochim Biophys Acta **1739**(1): 5-25.
- Tang, K. S., A. R. Fersht and L. S. Itzhaki (2003). "Sequential unfolding of ankyrin repeats in tumor suppressor p16." Structure **11**(1): 67-73.
- Thullberg, M., J. Bartek and J. Lukas (2000a). "Ubiquitin/proteasome-mediated degradation of p19INK4d determines its periodic expression during the cell cycle." Oncogene **19**(24): 2870-2876.
- Thullberg, M., J. Bartkova, S. Khan, K. Hansen, L. Ronnstrand, J. Lukas, M. Strauss and J. Bartek (2000b). "Distinct versus redundant properties among members of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors." FEBS Lett. **470**(2): 161-166.
- Tjandra, N. and A. Bax (1997). "Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium." Science **278**(5340): 1111-1114.
- Udgaonkar, J. B. and R. L. Baldwin (1990). "Early folding intermediate of ribonuclease A." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8197-201.
- Varley, P., A. M. Gronenborn, H. Christensen, P. T. Wingfield, R. H. Pain and G. M. Clore (1993). "Kinetics of folding of the all beta-sheet protein Interleukin-1 β ." Science **260**: 1110-1113.
- Weigelt, J. (1998). "Single scan, sensitivity- and gradient-enhanced TROSY for multidimensional NMR experiments." Journal of the American Chemical Society **120**(41): 10778-10779.
- Wider, G. and K. Wüthrich (1999). "NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution." Curr Opin Struct Biol **9**(5): 594-601.
- Wilson, C. J., P. Das, C. Clementi, K. S. Matthews and P. Wittung-Stafshede (2005). "The experimental folding landscape of monomeric lactose repressor, a large two-domain protein, involves two kinetic intermediates." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14563-8.

Literaturverzeichnis

Wirmer, J., H. Berk, R. Ugolini, C. Redfield and H. Schwalbe (2006). "Characterization of the unfolded state of bovine alpha-lactalbumin and comparison with unfolded states of homologous proteins." Protein Sci **15**(6): 1397-407.

Wolynes, P. G. (2005). "Energy landscapes and solved protein-folding problems." Philos Transact A Math Phys Eng Sci **363**(1827): 453-64; discussion 464-7.

Wu, Y., S. M. Mikulski, W. Ardel, S. M. Rybak and R. J. Youle (1993). "A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity." J Biol Chem **268**(14): 10686-93.

Wüthrich, K. (1990). "Protein Structure Determination in Solution by NMR." Journal of Biological Chemistry **265**(36): 22059-22062.

Zeeb, M., G. Lipps, H. Lilie and J. Balbach (2004). "Folding and association of an extremely stable dimeric protein from *Sulfolobus islandicus*." J. Mol. Biol. **336**(1): 227-240.

Zeeb, M., H. Rösner, W. Zeslawski, D. Canet, T. A. Holak and J. Balbach (2002). "Protein folding and stability of human CDK inhibitor p19INK4d." J. Mol. Biol. **315**(3): 447-457.

8 Anhang

8.1 Verwendete Pulsprogramme

8.1.1 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -fHSQC

```
;fhsqcN15.uw
;avance-version
;S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O'Neil-Johnson & P.C.M. van Zijl,
; J. Magn. Reson. B 108, 94-98 (1995)
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d26=2.5m"
```

```
"d0=(in0-(p21*1.273+6u+4*p3))*0.5"
```

```
"DELTA=d19-p22/2"
```

```
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
```

```
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2-8u-p21-108u"
```

```
"TAU=d26-p16-d16-4u"
```

```
"CEN_HN2=(p22*2+6u-p2)/2"
```

```
"CEN_HC2=(p4*2+6u-p2)/2"
```

```
;;"l3=(td1/2)"
```

```
1 ze
d11 p16:f3
2 d1 do:f3
3m
3 d11
4 d12 p11:f1
50u UNBLKGRAD
(p1 ph0)
4u
p16:gp1
d16
TAU p13:f3
(CEN_HN2 p2 ph0) (p21 ph0 3u p22 ph1 3u p21 ph0):f3
TAU
4u
p16:gp1
d16 p12:f2
(p1 ph1)
4u
p16:gp2
d16
(p21 ph4):f3
```

```
d0
(CEN_HC2 p2 ph6) (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3 ph0):f2
d0
(p21 ph5):f3
4u
p16:gp2
d16
(p1 ph2)
DELTA1
p16:gp3
d16 p118:f1
p28*0.231 ph1
d19*2
p28*0.692 ph1
d19*2
p28*1.462 ph1
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*0.231 ph3
4u
p16:gp3
d16
4u BLKGRAD
DELTA2
(p21 ph0):f3
4u
100u p16:f3
4u
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 mc #0 to 2 F1PH(ip4, id0)
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=0 2
ph5=0 0 0 2 2 2 2
ph6=0 0 2 2
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

; gradients: p16 = 1ms
; gpz1 = 50%
; gpz2 = 80%
; gpz3 = 30%
```

Anhang

8.1.2¹H¹⁵N-sgTROSY-HSQC

```
;SG-TROSY
;avance-version
;J.Weigelt, JACS 120(1998), 10778-10779
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
```

```
"d0=4u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d25=2.65m"
"d26=2.65m"
"d27=2.65m"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"TAU2=d25-p16-d16-4u"
"DELTA1=d0*2+p3*4+6u+p16+d16"
"DELTA2=d27-4u-p16-d16"
"DELTA3=(d19*2-p22)*0.5"
"DELTA4=DELTA1-p16-d16-p21-8u"
```

```
"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
```

```
1 ze
d11
2 d11
d1 p1:f1 p2:f2 p3:f3
50u UNBLKGRAD
(p1 ph1)
4u
p16:gp1
d16
TAU2
(CEN_HN2 p2 ph2) (p22 ph10):f3
4u
TAU2
p16:gp1
d16
(p1 ph11)
4u
p16:gp2*EA*-1
d16
(p21 ph3):f3 ;; ph2=1; ph3=13
d0
(p3 ph1 3u p4 ph2 3u p3 ph1):f2
d0
p16:gp2*EA
d16
(p1 ph4) ;; ph4=1, invert for second FID
4u
p16:gp3
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph2) (p22 ph1):f3
```

```
4u
TAU
p16:gp3
d16
(p1 ph5)
DELTA1
(p21 ph6):f3 ;;ph5=2, ph6=1
4u
p16:gp4
d16 p18:f1
DELTA2
p28*0.231 ph8
d19*2
p28*0.692 ph8
d19*2
p28*1.462 ph8
DELTA3
(p22 ph1):f3
DELTA3
p28*1.462 ph9
d19*2
p28*0.692 ph9
d19*2
p28*0.231 ph9
4u
DELTA2
p16:gp4
d16
(p21 ph7):f3 ;; ph7=0 . invert for second FID
4u
p16:gp2*0.1013
d16
DELTA4
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1EA(igrad EA & ip4*2 & ip7*2, id0 & ip3*2 & ip10*2
& ip31*2)
exit

ph1=0 0 1 1 2 2 3 3
ph2=1 1 2 2 3 3 0 0
ph3=1 3 2 0 3 1 0 2
ph4=1 1 2 2 3 3 0 0
;;ph4=3 3 0 0 1 1 2 2
ph5=2 2 3 3 0 0 1 1
ph6=1 1 2 2 3 3 0 0
ph7=0 0 1 1 2 2 3 3
;;ph7=2 2 3 3 0 0 1 1
ph8=0 0 1 1 2 2 3 3
ph9=2 2 3 3 0 0 1 1
ph10=0 0 1 1 2 2 3 3
ph11=3 3 0 0 1 1 2 2
ph31=0 2 1 3 2 0 3 1

; gradients: p16 = 1ms
; gpz1 = 50%
; gpz2 = -80%
; gpz3 = -30%
; gpz4 = -65%
```

Anhang

8.1.3newMEXICO-fHSQC

;MEXICO-FHSQC

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d5=55m"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d26=2.5m"
```

```
"d0=(in0-(p21*1.273+p2))*0.5"
```

```
"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2-8u-p21-108u"
"DELTA3=5.5m-4u-p16-d16"
"DELTA4=5.4m-p16-d16"
```

```
"p19=d8-4u-p16-d16*2" ;; d8 = mixing time
```

```
"TAU=d26-p16-d16-4u"
```

```
"CEN_HN1=(p21-p2)/2"
"CEN_HN2=(p22*2+6u-p2)/2"
"CEN_HC2=(p4*2+6u-p2)/2"
```

```
;;"l3=(td1/2)"
```

```
1 ze
  d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
  3m
3 d11
4 d12 pl1:f1
  (p1 ph0):f1
  d4 pl2:f3
  (p21 ph0):f3
d5 UNBLKGRAD ;; allow radiation damping
p16 gp1
d16
(p1 ph5)
4u
p16 gp2
d16
DELTA3
(CEN_HN1 p2 ph1) (p21 ph7):f3
DELTA4
p16 gp2
d16
(p1 ph2) (p21 ph8):f3
4u
p16 gp3
d16
p19 gp4
d16
```

```
(p1 ph0)
4u
p16 gp5
TAU pl3:f3
(CEN_HN2 p2 ph0) (p21 ph0 3u p22 ph1 3u p21 ph0):f3
TAU
4u
p16 gp5
d16 pl2:f2
(p1 ph1)
4u
p16 gp6
d16
(p21 ph4):f3
d0
(CEN_HC2 p2 ph0) (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3 ph0):f2
d0
(p21 ph0):f3
4u
p16 gp6
d16
(p1 ph6)
DELTA1
p16 gp7
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph1
d19*2
p28*0.692 ph1
d19*2
p28*1.462 ph1
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*0.231 ph3
4u
p16 gp7
d16
4u BLKGRAD
DELTA2
(p21 ph0):f3
4u
100u pl16:f3
4u
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 mc #0 to 2 F1PH(ip4, id0)
exit
```

```
ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=0 2
ph5=0 0 2 2
ph6=2 2 0 0
ph7=0 0 0 0 2 2 2 2
ph8=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph31=0 2
```

Anhang

8.1.4trHNCA

```
;TROSSY-HNCA
;avance-version
;including 2H decoupling using 2HTX

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"

"d3=12.4m"

"d0=4u"
"d10=4u"
"d26=2.65m"
"d30=d3*0.5"
"d29=d30-d10"
"d28=d29-p16-d16+p21*1.273+DELTA1-p11-28u"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"DELTA=d0*2-4u"
"DELTA1=4u"
"DELTA2=TAU"
"DELTA3=0.5*(p16+d16+8u-p28*4.770-d19*10-p22-DELTA1)"
"DELTA4=TAU-p28*4.77-d19*10"

"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"

"in30=in10" ;; nd0 = 4

aqseq 321

1 ze
d11 LOCKDEC_ON
d11 pl17:f4
2 d11
d11 H2_LOCK
9m LOCKH_OFF
d1 pl11:f1 pl2:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
d12 H2_PULSE
(p11 ph3)
4u
20u pl1:f1
4u
(p1 ph0)
4u
p16:gp1
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp1
d16
(p1 ph3)
4u
p16:gp2*EA
d16
(p21 ph7):f3
d3
(p14:sp3 ph10):f2 (CEN_CN2 p22 ph0):f3
d3 pl1:f1
(p21 ph1):f3
4u
(p17 ph1):f4
4u
d12 cpds4:f4 ph0

(p13:sp2 ph8):f2
d0
(CEN_HC2 p2 ph0):f1 (p14:sp5 ph10):f2 (CEN_CN2 p22 ph0):f3
d0
(p14:sp3 ph11):f2
DELTA
(CEN_HC2 p2 ph2):f1 (p14:sp5 ph12):f2
4u
(p13:sp8 ph13):f2
4u do:f4
4u
(p17 ph3):f4

(p21 ph6):f3
d30
(p14:sp5 ph10):f2
d30
(p14:sp3 ph11):f2 (CEN_CN2 p22 ph9):f3
d29
d10
(p14:sp5 ph12):f2
d10
d28
p16:gp3*EA
d16 pl11:f1
(p11 ph0):f1
4u
20u pl1:f1
4u
(p1 ph4)
4u
p16:gp4
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp4
d16
(p1 ph2)
DELTA1
(p21 ph1):f3
4u
p16:gp5
d16 pl18:f1
DELTA2
DELTA3
(p22 ph0):f3
DELTA3
p28*0.231 ph0
d19*2
p28*0.692 ph0
d19*2
p28*1.462 ph0
d19*2
p28*1.462 ph2
d19*2
p28*0.692 ph2
d19*2
p28*0.231 ph2
4u
DELTA4
p16:gp5
d16
(p21 ph5):f3 ;; ph7=0 . invert for second FID
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAMP
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
F1PH(rd10 & rd30 & ip8, id0)
F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10 & dd30 & ip6*2 &
ip31*2)

d11 H2_LOCK
d11 LOCKH_OFF
d11 LOCKDEC_OFF
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=1
ph5=0
ph6=1 3
ph7=0
ph8=0 0 2 2
ph9=0 0 0 2 2 2 2
ph10=0
ph11=0
ph12=0
ph13=0
ph31=0 2 2 0
```

Anhang

8.1.5trHNCACB

```
;TROSY-HNCACB
;avance-version
;including 2H decoupling using 2HTX
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
```

```
"d3=12.4m"
```

```
"d0=10u"
```

```
"d10=4u"
```

```
"d23=(3.5m-p14)*0.5"
```

```
"d26=2.65m"
```

```
"d30=d3*0.5"
```

```
"d29=d30-d10"
```

```
"d28=d29-p16-d16+p21*1.273+DELTA1-p11-28u"
```

```
"TAU=d26-p16-d16-4u"
```

```
"DELTA=d0*2-10u"
```

```
"DELTA1=4u"
```

```
"DELTA2=TAU"
```

```
"DELTA3=0.5*(p16+d16+8u-p28*4.770-d19*10-p22-DELTA1)"
```

```
"DELTA4=TAU-p28*4.77-d19*10"
```

```
"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
```

```
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
```

```
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"
```

```
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"
```

```
"in30=in10" ;; nd0 = 4
```

```
aqseq 321
```

```
1 ze
```

```
  d11 LOCKDEC_ON
```

```
  d11 p117:f4
```

```
2 d11
```

```
  d11 H2_LOCK
```

```
  9m LOCKH_OFF
```

```
  d1 p11:f1 p12:f2 p13:f3
```

```
  50u UNBLKGRAD
```

```
  d12 H2_PULSE
```

```
  (p11 ph3)
```

```
  4u
```

```
  20u p11:f1
```

```
  4u
```

```
  (p1 ph0)
```

```
  4u
```

```
  p16:gp1
```

```
  d16
```

```
  TAU
```

```
  (CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
```

```
  4u
```

```
  TAU
```

```
  p16:gp1
```

```
  d16
```

```
  (p1 ph3)
```

```
  4u
```

```
  p16:gp2*EA
```

```
  d16
```

```
  (p21 ph7):f3
```

```
  d3
```

```
  (p14:sp3 ph10):f2 (CEN_CN2 p22 ph0):f3
```

```
  d3 p11:f1 p12:f2
```

```
  (p21 ph1):f3
```

```
  4u
```

```
  (p17 ph1):f4
```

```
  4u
```

```
  d12 cpds4:f4 ph0
```

```
  (p3 ph8):f2
```

```
  4u
```

```
  d23 p10:f2
```

```
  (p14:sp5 ph0):f2
```

```
  4u
```

```
  d23 p12:f2
```

```
  (p4 ph10):f2
```

```
  4u
```

```
  d23 p10:f2
```

```
  (p14:sp5 ph0):f2
```

```
  4u
```

```
  d23 p12:f2
```

```
  (p3 ph12):f2
```

```
  4u
```

```
  d0 p10:f2
```

```
  (CEN_HC2 p2 ph0):f1 (p14:sp5 ph10):f2 (CEN_CN2 p22 ph0):f3
```

```
  d0
```

```
  4u p12:f2
```

```
  (p4 ph10):f2
```

```
  4u
```

```
  DELTA p10:f2
```

```
  (CEN_HC2 p2 ph2):f1 (p14:sp5 ph7):f2
```

```
  10u
```

```
  4u p12:f2
```

```
  (p3 ph11):f2
```

```
  4u
```

```
  d23 p10:f2
```

```
  (p14:sp5 ph10):f2
```

```
  4u
```

```
  d23 p12:f2
```

```
  (p4 ph0):f2
```

```
  4u
```

```
  d23 p10:f2
```

```
  (p14:sp5 ph0):f2
```

```
  4u
```

```
  d23 p12:f2
```

```
  (p3 ph13):f2
```

```
  4u do:f4
```

```
  4u
```

```
  (p17 ph3):f4
```

```
  (p21 ph6):f3
```

```
  d30 p10:f2
```

```
  (p14:sp5 ph10):f2
```

```
  d30
```

```
  (p14:sp3 ph11):f2 (CEN_CN2 p22 ph9):f3
```

```
  d29
```

```
  d10
```

```
  (p14:sp5 ph12):f2
```

```
  d10
```

```
  d28
```

```
  p16:gp3*EA
```

```
  d16 p11:f1
```

```
  (p11 ph0):f1
```

```
  4u
```

```
  20u p11:f1
```

```
  4u
```

```
  (p1 ph4)
```

```
  4u
```

```
  p16:gp4
```

```
  d16
```

```
  TAU
```

```
  (CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
```

```
  4u
```

```
  TAU
```

```
  p16:gp4
```

```
  d16
```

```
  (p1 ph2)
```

```
  DELTA1
```

```
  (p21 ph1):f3
```

```
  4u
```

```
  p16:gp5
```

```
  d16 p118:f1
```

```
  DELTA2
```

```
  DELTA3
```

```
  (p22 ph0):f3
```

```
  DELTA3
```

```
  p28*0.231 ph0
```

```
  d19*2
```

```
  p28*0.692 ph0
```

```
  d19*2
```

```
  p28*1.462 ph0
```

```
  d19*2
```

```
  p28*1.462 ph2
```

```
  d19*2
```

```
  p28*0.692 ph2
```

```
  d19*2
```

```
  p28*0.231 ph2
```

```
  4u
```

```
  DELTA4
```

```
  p16:gp5
```

```
  d16
```

```
  (p21 ph5):f3
```

```
  4u
```

```
  p16:gp3*0.1013
```

Anhang

```
d16
4u BLKGRAMP
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
      F1PH(rd10 & rd30 & ip11 & ip13, id0)
      F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10 & dd30 & ip6*2 &
ip31*2)

d11 H2_LOCK
d11 LOCKH_OFF
d11 LOCKDEC_OFF
exit

ph0=0
ph1=1
```

```
ph2=2
ph3=3
ph4=1
ph5=0
ph6=1 3
ph7=0
ph8=0 0 2 2
ph9=0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2
ph10=0
ph11=3 3 3 3 1 1 1 1
ph12=1 1 1 1 3 3 3 3
ph13=0
ph31=0 2 2 0
```

Anhang

8.1.6trHN(CO)CACB

```
;TROSSY-HNCOACCB  
;avance-version
```

```
#include <Avance.incl>  
#include <Grad.incl>  
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"  
"p22=p21*2"
```

```
"d3=12.4m"
```

```
"d0=10u"
```

```
"d10=4u"
```

```
"d23=3.5m"
```

```
"d26=2.65m"
```

```
"d30=d3*0.5"
```

```
"d29=d30-d10"
```

```
"d28=d29-p16-d16+p21*1.273+DELTA1-p11-28u"
```

```
"TAU=d26-p16-d16-4u"
```

```
"DELTA=d0*2-10u"
```

```
"DELTA1=4u"
```

```
"DELTA2=TAU"
```

```
"DELTA3=0.5*(p16+d16+8u-p28*4.770-d19*10-p22-DELTA1)"
```

```
"DELTA4=TAU-p28*4.77-d19*10"
```

```
"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
```

```
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
```

```
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"
```

```
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"
```

```
"in30=in10" ;; nd0 = 4
```

```
aqseq 321
```

```
1 ze
```

```
d11 LOCKDEC_ON
```

```
d11 pl17:f4
```

```
2 d11
```

```
d11 H2_LOCK
```

```
9m LOCKH_OFF
```

```
d1 pl11:f1 pl0:f2 pl3:f3
```

```
50u UNBLKGRAD
```

```
d12 H2_PULSE
```

```
(p11 ph3)
```

```
4u
```

```
20u pl1:f1
```

```
4u
```

```
(p1 ph0)
```

```
4u
```

```
p16:gp1
```

```
d16
```

```
TAU fq2:f2
```

```
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
```

```
4u
```

```
TAU
```

```
p16:gp1
```

```
d16
```

```
(p1 ph3)
```

```
4u
```

```
p16:gp2*EA
```

```
d16
```

```
(p21 ph7):f3
```

```
d3
```

```
(p14:sp3 ph10):f2 (CEN_CN2 p22 ph0):f3
```

```
d3 pl1:f1
```

```
(p21 ph1):f3
```

```
4u
```

```
(p13:sp2 ph10):f2
```

```
4u
```

```
(p14:sp5 ph11):f2
```

```
d24
```

```
(p14:sp3 ph10):f2
```

```
4u
```

```
(p14:sp5 ph11):f2
```

```
d24
```

```
(p13:sp8 ph12):f2
```

```
4u
```

```
50u fq2:f2
```

```
20u
```

```
p16:gp6
```

```
d16
```

```
(p17 ph1):f4
```

```
4u
```

```
d12 cpds4:f4 ph0
```

```
(p12:sp12 ph8):f2
```

```
4u
```

```
d23
```

```
(p15:sp13 ph10):f2
```

```
4u
```

```
d23
```

```
(p12:sp12 ph13):f2
```

```
4u
```

```
d0
```

```
(p14:sp7 ph0):f2 (CEN_CN2 p22 ph0):f3
```

```
d0
```

```
4u
```

```
(p15:sp13 ph15):f2
```

```
4u
```

```
DELTA
```

```
(p14:sp7 ph10):f2
```

```
10u
```

```
4u
```

```
(p12:sp12 ph16):f2
```

```
4u
```

```
d23
```

```
(p15:sp13 ph11):f2
```

```
4u
```

```
d23
```

```
(p12:sp12 ph17):f2
```

```
4u do:f4
```

```
(p17 ph3):f4
```

```
50u fq2:f2
```

```
4u
```

```
(p13:sp2 ph12):f2
```

```
4u
```

```
d24
```

```
(p14:sp5 ph11):f2
```

```
4u
```

```
(p14:sp3 ph10):f2
```

```
d24
```

```
(p14:sp5 ph11):f2
```

```
4u
```

```
(p13:sp8 ph10):f2
```

```
(p21 ph6):f3
```

```
d30 pl0:f2
```

```
(p14:sp5 ph10):f2
```

```
d30
```

```
(p14:sp3 ph11):f2 (CEN_CN2 p22 ph9):f3
```

```
d29
```

```
d10
```

```
(p14:sp5 ph12):f2
```

```
d10
```

```
d28
```

```
p16:gp3*EA
```

```
d16 pl11:f1
```

```
(p11 ph0):f1
```

```
4u
```

```
20u pl1:f1
```

```
4u
```

```
(p1 ph4)
```

```
4u
```

```
p16:gp4
```

```
d16
```

```
TAU
```

```
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
```

```
4u
```

```
TAU
```

```
p16:gp4
```

```
d16
```

```
(p1 ph2)
```

```
DELTA1
```

```
(p21 ph1):f3
```

```
4u
```

```
p16:gp5
```

```
d16 pl18:f1
```

```
DELTA2
```

```
DELTA3
```

```
(p22 ph0):f3
```

```
DELTA3
```

```
p28*0.231 ph0
```

```
d19*2
```

```
p28*0.692 ph0
```

```
d19*2
```

```
p28*1.462 ph0
```

```
d19*2
```

```
p28*1.462 ph2
```

```
;; starting CA evolution
```

Anhang

```
d19*2
p28*0.692 ph2
d19*2
p28*0.231 ph2
4u
DELTA4
p16:gp5
d16
(p21 ph5):f3
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
      F1PH(rd10 & rd30 & ip16 & ip17, id0)
      F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10 & dd30 & ip6*2 &
ip31*2)

d11 H2_LOCK
d11 LOCKH_OFF
d11 LOCKDEC_OFF
```

```
exit
ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=1
ph5=0
ph6=1 3
ph7=0
ph8=0 0 2 2
ph9=0 0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2 2
ph10=0
ph11=0
ph12=1
ph13=1 1 1 1 3 3 3 3
ph15=0
ph16=3 3 3 3 1 1 1 1
ph17=0
ph31=0 2 2 0
```

8.2 Zuordnungen und Daten

8.2.1P19

Nr	AS	PF		Nr	AS	PF		Nr	AS	PF		Nr	AS	PF
1	M			51	F			101	N	1,01E+04		151	A	
2	L			52	G			102	V	1,91E+05		152	Q	
3	L			53	S			103	P			153	D	
4	E			54	T			104	D	1,34E+05		154	L	1,55E+02
5	E			55	A			105	G			155	V	1,28E+03
6	V	5,31E+02		56	I			106	T			156	D	
7	R			57	A	2,45E+03		107	G			157	I	
8	A			58	L	2,35E+03		108	A	1,87E+05		158	L	
9	G			59	E	1,88E+03		109	L	1,22E+05		159	Q	4,66E+03
10	D			60	L	1,37E+03		110	P			160	G	
11	R			61	L	1,69E+03		111	I	4,12E+02		161	H	
12	L			62	K			112	H	9,94E+04		162	M	
13	S			63	Q	5,50E+02		113	L	3,94E+05		163	V	
14	G			64	G			114	A	2,83E+05		164	A	
15	A			65	A			115	V	9,12E+04		165	P	
16	A			66	S			116	Q			166	L	
17	A	2,59E+03		67	P			117	E	1,51E+04				
18	R	1,44E+03		68	N			118	G	6,00E+03				
19	G			69	V	2,94E+02		119	H	1,65E+05				
20	D			70	Q			120	T	2,85E+05				
21	V			71	D	3,22E+03		121	A					
22	Q			72	T			122	V					
23	E			73	S			123	V					
24	V	2,07E+02		74	G			124	S	2,67E+04				
25	R	7,30E+02		75	T			125	F					
26	R	2,16E+03		76	S			126	L	1,71E+05				
27	L			77	P			127	A	1,04E+05				
28	L	9,50E+02		78	V	1,29E+04		128	A					
29	H			79	H	1,60E+05		129	E					
30	R			80	D	4,71E+04		130	S	1,09E+03				
31	E			81	A	5,68E+04		131	D					
32	L			82	A	7,69E+04		132	L					
33	V			83	R	1,80E+05		133	H	9,64E+03				
34	H			84	T	4,49E+03		134	R	3,30E+03				
35	P			85	G			135	R					
36	D			86	F	1,42E+03		136	D	3,95E+02				
37	A	1,21E+03		87	T			137	A					
38	L			88	D			138	R					
39	N			89	T			139	G					
40	R			90	L	1,93E+05		140	L	4,33E+03				
41	F	9,41E+02		91	K	2,58E+05		141	T					
42	G			92	V	1,20E+05		142	P					
43	K			93	L	8,82E+04		143	L					
44	T			94	V	5,62E+04		144	E	8,32E+03				
45	A			95	E	1,80E+04		145	L	2,33E+04				
46	L	2,39E+02		96	H	9,77E+03		146	A	2,37E+04				
47	Q	5,68E+02		97	G			147	L	2,10E+04				
48	V	1,32E+03		98	A			148	Q					
49	M			99	D			149	R					
50	M			100	V			150	G					

Tabelle 1: Schutzfaktoren von P19

Gezeigt sind die Schutzfaktoren (PF) von P19, die mittels H/D Austausch bei 15°C, pH 7.5 bestimmt wurden, für die einzelnen Aminosäuren (AS)

8.2.2 Barstar

Nr.	AS	m_{en} (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	±	$[D]_{1/2}$ (M)	±	ΔG°_0 (kJ mol ⁻¹)	±
2	K	4,63	0,80	2,70	0,11	12,49	2,23
3	A	3,89	1,02	2,61	0,24	10,15	2,81
4	V	4,67	0,45	2,65	0,1	12,38	1,29
5	I	4,37	0,50	2,64	0,10	11,53	1,38
6	N	4,40	0,45	2,53	0,10	11,12	1,22
7	G	4,44	0,46	2,60	0,10	11,54	1,27
8	E	5,24	0,56	2,91	0,10	15,26	1,70
9	Q	4,34	0,33	2,61	0,10	11,32	0,97
10	I	4,40	0,34	2,60	0,10	11,43	1,00
11	R	4,70	0,44	2,68	0,10	12,56	1,26
12	S						
13	I	4,27	0,40	2,42	0,10	10,34	1,05
14	S						
15	D						
16	L	4,38	0,53	2,58	0,10	11,28	1,43
17	H						
18	Q						
19	T						
20	L						
21	K						
22	K	4,67	0,44	2,63	0,10	12,28	1,25
23	E	4,61	0,29	2,59	0,10	11,94	0,88
24	L	4,51	0,54	2,71	0,10	12,22	1,54
25	A	5,88	1,98	2,67	0,18	15,71	5,40
26	L	4,43	0,39	2,58	0,10	11,45	1,09
27	A						
28	E	3,76	1,12	2,44	0,21	9,18	2,84
29	Y						
30	Y	4,72	1,00	2,46	0,13	11,60	2,54
31	G						
32	E						
33	N						
34	L						
35	D						
36	A						
37	L						
38	W						
39	D						
40	A						
41	L	4,92	0,57	2,65	0,10	13,01	1,60
42	T	4,79	0,45	2,64	0,10	12,64	1,28
43	G	5,21	0,53	2,76	0,10	14,40	1,55
44	W						
45	V						
46	E						
47	Y						
48	A						
49	L	4,38	0,43	2,60	0,10	11,39	1,20
50	V						
51	L						
52	E						
53	W						
54	R	4,28	0,51	2,59	0,10	11,10	1,38
55	Q						
56	F						
57	E	4,45	0,44	2,64	0,10	11,75	1,25
58	Q	3,96	0,62	2,40	0,10	9,50	1,54
59	S	4,89	0,37	2,82	0,10	13,79	1,16
60	K						
61	Q	4,10	0,53	2,54	0,10	10,42	1,40
62	L	4,53	1,39	2,66	0,10	12,04	3,72
63	T	4,49	0,55	2,55	0,10	11,46	1,46
64	E						
65	N	4,68	0,25	2,63	0,10	12,34	0,80
66	N	4,74	0,39	2,66	0,10	12,60	1,13
67	A						
68	E	4,54	0,53	2,60	0,10	11,81	1,44
69	S	4,35	0,52	2,43	0,10	10,57	1,34
70	V	4,42	1,60	2,50	0,10	11,06	4,01
71	L						
72	Q	4,52	0,39	2,62	0,10	11,85	1,13
73	V	4,19	0,34	2,45	0,10	10,28	0,93
74	F						
75	R						
76	E	4,98	0,72	2,80	0,10	13,95	2,07
77	A						
78	K						
79	A						
80	E	4,70	0,32	2,62	0,10	12,31	0,96
81	G	4,75	0,46	2,75	0,10	13,06	1,34
82	A	4,79	0,53	2,64	0,10	12,65	1,49
83	D	4,49	0,54	2,58	0,10	11,60	1,45
84	I	4,75	0,38	2,68	0,10	12,73	1,12
85	T	4,67	0,44	2,67	0,10	12,48	1,26
86	I	5,29	0,50	2,97	0,10	15,72	1,56
87	I	4,53	0,60	2,75	0,10	12,47	1,70
88	L	4,89	0,28	2,93	0,10	14,32	0,96
89	S	5,60	0,43	3,00	0,10	16,79	1,42

Anhang

Tabelle 2: Thermodynamische Parameter aus dem NMR-detektierten Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergang von Barstar

Gezeigt sind die m -Wert (m_{eq}), Übergangsmittelpunkt ($D_{1/2}$) und freie Enthalpie der Entfaltung (ΔG°) mit dem jeweiligem Fehler von Barstar, welche aus einem Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergang bei 25°C, pH 7.0 unter Annahme des Zweizustandsmodells für die einzelnen Aminosäuren (AS) erhalten wurden.

Nr.	AS	pH 6,5	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	Austausch nach	k_{op} / s^{-1}	k_{cl} / s^{-1}	$DG_{HX} / kJ \Sigma mol^{-1}$
2	K	1,11 ± 0,02	2,07 ± 0,04	7,75 ± 0,40	40,00 ± 1,60	26,60 ± 0,30	EX2 & EX1	29,90 ± 10,00	413 ± 227	6,5 ± 3,0
3	A									
4	V	0,44 ± 0,06	-	-	0,77 ± 0,07	0,66 ± 0,05	EX1	0,62 ± 0,03	-	-
5	I	0,73 ± 0,05	0,72 ± 0,10	-	1,03 ± 0,05	1,39 ± 0,04	EX1	1,12 ± 0,19	-	-
6	N	0,93 ± 0,03	1,84 ± 0,04	9,70 ± 0,66	35,90 ± 2,40	37,60 ± 0,60	EX2 & EX1	37,24 ± 7,72	910 ± 304	7,9 ± 2,7
7	G	0,40 ± 0,03	0,49 ± 0,05	0,52 ± 0,07	1,17 ± 0,03	1,20 ± 0,04	EX1	0,90 ± 0,20	-	-
8	E	-	-	0,78 ± 0,08	2,75 ± 0,09	2,25 ± 0,03	EX2 & EX1	2,72 ± 0,64	318 ± 181	11,8 ± 2,9
9	Q	0,31 ± 0,02	0,36 ± 0,04	0,68 ± 0,06	1,93 ± 0,04	1,47 ± 0,03	EX2 & EX1	1,30 ± 0,38	37 ± 24	8,3 ± 3,0
10	I	0,31 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,59 ± 0,04	0,51 ± 0,04	EX1	0,46 ± 0,07	-	-
11	R	0,51 ± 0,03	0,83 ± 0,05	2,54 ± 0,18	15,00 ± 0,37	11,50 ± 0,10	EX2 & EX1	11,48 ± 4,68	230 ± 152	7,4 ± 3,1
12	S	0,49 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,54 ± 0,03	1,67 ± 0,06	1,55 ± 0,04	EX1	1,12 ± 0,34	-	-
13	I									
14	S									
15	D	1,18 ± 0,02	1,22 ± 0,01	1,44 ± 0,63	2,65 ± 0,06	3,31 ± 0,02	EX1	2,28 ± 0,51	-	-
16	L	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,49 ± 0,04	0,46 ± 0,02	EX1	0,42 ± 0,04	-	-
17	H									
18	Q	3,13 ± 0,73	2,85 ± 0,04	-	-	-	EX1	2,99 ± 0,37	-	-
19	T	1,40 ± 0,02	1,37 ± 0,03	1,03 ± 0,05	1,20 ± 0,03	1,78 ± 0,03	EX1	1,33 ± 0,17	-	-
20	L									
21	K	0,58 ± 0,02	0,80 ± 0,03	4,29 ± 0,33	-	-	EX1	1,34 ± 1,10	-	-
22	K	0,35 ± 0,03	0,43 ± 0,04	-	0,64 ± 0,03	0,36 ± 0,02	EX1	0,48 ± 0,09	-	-
23	E	0,30 ± 0,03	0,42 ± 0,03	-	0,59 ± 0,05	0,40 ± 0,04	EX1	0,49 ± 0,06	-	-
24	L	-	-	-	0,33 ± 0,04	0,28 ± 0,03	EX1	0,30 ± 0,03	-	-
25	A	-	-	-	1,66 ± 0,05	1,53 ± 0,02	EX1	1,60 ± 0,03	-	-
26	L	0,23 ± 0,02	0,31 ± 0,05	-	0,73 ± 0,05	0,47 ± 0,03	EX1	0,43 ± 0,11	-	-
27	A									
28	E	1,23 ± 0,03	6,77 ± 0,14	16,00 ± 1,00	-	-	EX2/EX1	25,00 ± 19,00	-	-
29	Y	1,81 ± 0,17	4,06 ± 0,45	3,03 ± 0,44	-	9,53 ± 0,38	EX2/EX1	5,90 ± 2,40	-	-
30	Y	0,90 ± 0,07	1,58 ± 0,09	6,56 ± 0,36	-	-	EX2 & EX1	8,20 ± 3,40	49 ± 34	4,4 ± 3,4
31	G									
32	E									
33	N									
34	L									
35	D	0,33 ± 0,01	0,55 ± 0,02	1,47 ± 0,87	5,58 ± 0,09	-	EX2 & EX1	3,80 ± 1,90	43 ± 36	6,1 ± 3,4
36	A	-	0,28 ± 0,04	0,40 ± 0,06	0,91 ± 0,06	-	EX1	0,68 ± 0,27	-	-
37	L									
38	W	0,29 ± 0,02	0,33 ± 0,04	-	0,58 ± 0,03	0,38 ± 0,01	EX1	0,45 ± 0,07	-	-
39	D	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,41 ± 0,03	0,38 ± 0,03	EX1	0,33 ± 0,05	-	-
40	A	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,03	-	0,21 ± 0,02	0,87 ± 0,04	EX1	0,41 ± 0,20	-	-
41	L	0,32 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,30 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,31 ± 0,03	EX1	0,33 ± 0,02	-	-
42	T	1,67 ± 0,06	1,64 ± 0,06	1,15 ± 0,09	0,88 ± 0,07	1,21 ± 0,06	EX1	1,27 ± 0,21	-	-
43	G	0,43 ± 0,02	0,59 ± 0,03	1,37 ± 0,09	4,77 ± 0,10	4,65 ± 0,05	EX2 & EX1	3,70 ± 1,27	336 ± 209	11,2 ± 2,9
44	W									
45	V									
46	E									
47	Y	-	-	-	1,33 ± 0,07	0,85 ± 0,04	EX1	1,09 ± 0,09	-	-
48	A									
49	L	0,40 ± 0,03	0,53 ± 0,07	-	0,64 ± 0,04	0,29 ± 0,02	EX1	0,46 ± 0,13	-	-
50	V									
51	L									
52	E									
53	W									
54	R	-	-	-	0,74 ± 0,07	1,34 ± 0,10	EX1	1,04 ± 0,06	-	-
55	Q									
56	F									
57	E	0,96 ± 0,06	1,99 ± 0,06	10,35 ± 0,70	-	51,80 ± 1,30	EX2 & EX1	46,60 ± 16,00	181 ± 108	3,4 ± 3,3
58	Q	0,33 ± 0,02	0,50 ± 0,02	1,86 ± 0,09	7,55 ± 0,11	6,00 ± 0,04	EX2 & EX1	6,00 ± 2,00	209 ± 110	8,8 ± 2,9
59	S	1,11 ± 0,08	1,19 ± 0,11	1,49 ± 0,13	5,85 ± 0,20	5,50 ± 0,07	EX1	3,78 ± 1,49	-	-
60	K	0,87 ± 0,03	1,14 ± 0,05	3,29 ± 0,15	20,54 ± 0,52	15,00 ± 0,16	EX2 & EX1	14,50 ± 6,70	494 ± 373	8,7 ± 3,2
61	Q	0,65 ± 0,03	0,96 ± 0,05	3,90 ± 0,20	31,00 ± 1,00	20,5 ± 0,20	EX2 & EX1	24,00 ± 11,00	906 ± 622	9,0 ± 3,0
62	L	0,44 ± 0,02	0,54 ± 0,04	1,56 ± 0,08	7,7 ± 0,2	6,00 ± 0,05	EX2 & EX1	5,50 ± 2,30	80 ± 60	6,6 ± 3,2
63	T	2,33 ± 0,05	3,08 ± 0,09	11,17 ± 0,94	-	45,0 ± 2,8	EX2 & EX1	32,00 ± 17,00	-	-
64	E									
65	N	1,34 ± 0,06	2,64 ± 0,07	14,20 ± 1,20	-	-	EX2 & EX1	21,00 ± 9,00	357 ± 222	7,0 ± 3,0
66	N	0,85 ± 0,03	1,66 ± 0,05	8,09 ± 0,52	47,60 ± 2,50	39,00 ± 0,50	EX2 & EX1	44,00 ± 13,00	2714 ± 1233	10,2 ± 2,8
67	A	1,12 ± 0,02	1,14 ± 0,02	1,56 ± 0,07	4,46 ± 0,10	4,94 ± 0,04	EX1	3,30 ± 1,10	-	-
68	E	0,48 ± 0,05	0,64 ± 0,08	1,29 ± 0,08	3,54 ± 0,13	3,92 ± 0,07	EX2 & EX1	2,90 ± 0,90	20 ± 14	4,8 ± 3,3
69	S	2,34 ± 0,05	4,83 ± 0,07	33,80 ± 2,20	-	-	EX2&EX1	68,00 ± 41,00	468 ± 394	4,8 ± 3,5
70	V	-	-	-	1,81 ± 0,04	1,62 ± 0,03	EX1	1,72 ± 0,03	-	-
71	L	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,04	0,37 ± 0,05	1,20 ± 0,05	1,09 ± 0,03	EX1	0,77 ± 0,25	-	-
72	Q	0,29 ± 0,02	0,30 ± 0,03	-	0,53 ± 0,05	0,78 ± 0,05	EX1	0,60 ± 0,13	-	-
73	V	0,25 ± 0,03	0,33 ± 0,05	-	0,27 ± 0,03	-	EX1	0,30 ± 0,04	-	-
74	F	0,37 ± 0,04	-	-	0,42 ± 0,04	-	EX1	0,39 ± 0,03	-	-
75	R	0,25 ± 0,02	0,62 ± 0,04	3,15 ± 0,21	-	-	EX2 & EX1	5,20 ± 1,00	278 ± 73	9,6 ± 2,6

Anhang

76	E	-	-	-	0,32 ± 0,04	0,24 ± 0,02	EX1	0,28 ± 0,02	-	-
77	A	0,31 ± 0,02	0,41 ± 0,05	-	0,39 ± 0,05	0,77 ± 0,04	EX1	0,54 ± 0,12	-	-
78	K	0,35 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,36 ± 0,04	0,70 ± 0,02	0,46 ± 0,01	EX1	0,49 ± 0,07	-	-
79	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	E	0,32 ± 0,03	0,40 ± 0,04	-	1,04 ± 0,04	0,85 ± 0,04	EX1	0,90 ± 0,15	-	-
81	G	0,30 ± 0,04	0,43 ± 0,08	-	1,80 ± 0,08	1,57 ± 0,04	EX2 & EX1	1,64 ± 0,32	72 ± 27	9,4 ± 2,7
82	A	0,36 ± 0,03	0,43 ± 0,06	-	0,56 ± 0,03	0,49 ± 0,02	EX1	0,52 ± 0,03	-	-
83	D	0,36 ± 0,04	0,59 ± 0,06	1,01 ± 0,09	4,43 ± 0,09	3,31 ± 0,05	EX2 & EX1	2,88 ± 1,04	46 ± 33	6,9 ± 3,2
84	I	0,58 ± 0,05	0,71 ± 0,08	-	1,21 ± 0,06	0,81 ± 0,04	EX1	0,96 ± 0,14	-	-
85	T	1,11 ± 0,05	1,29 ± 0,12	1,14 ± 0,11	1,75 ± 0,07	1,91 ± 0,05	EX1	1,56 ± 0,19	-	-
86	I	-	-	3,77 ± 0,50	11,85 ± 0,50	11,4 ± 0,2	EX2/EX1	11,60 ± 0,30	-	-
87	I	-	-	-	0,62 ± 0,08	0,19 ± 0,02	EX1	0,40 ± 0,05	-	-
88	L	-	-	-	6,64 ± 0,17	4,84 ± 0,13	EX1	5,74 ± 0,11	-	-
89	S	-	-	-	-	-	-	-	k_{cl} / s^{-1}	$DG_{HX} / kJ \sum mol^{-1}$

Tabelle 3: Amidprotonenaustauschraten von Barstar.

Gezeigt sind die gemessenen Austauschraten bei verschiedenen pH-Werten (jeweils in s^{-1}), das Austauschregime, sowie die erhaltenen Öffnungs- (k_{op}) und Schließraten (k_{cl}) und der freien Enthalpie (ΔG°) für die einzelnen Aminosäuren (AS).

8.2.3tANK

Nr.	AS	HN	N	CA	CB	$[D]_{1/2} (M)$	\pm
1	M						
2	D	8,36	119,25	54,12	36,67		
3	K	8,38	116,73	54,12	26,31		
4	N						
5	G	8,58	112,88	42,55			
6	E			52,39	25,96		
7	I	8,58	117,88	55,67	38,05		
8	V	7,41	120,48	63,79	27,69		
9	E	7,34	115,07	54,81	25,96	0,75	0,05
10	K			57,92	28,90		
11	I	7,39	118,03	63,79	27,52		
12	K	8,35	120,30	56,02	26,65		
13	D	7,39	111,87	52,91	34,77		
14	E			57,06	26,14		
15	K	7,97	119,62	56,19	28,21		
16	S	8,40	117,36	59,30		0,83	0,05
17	I	7,94	125,18	62,41	34,60		
18	N	7,80	115,37	52,74	34,94	1,10	0,07
19	Q	7,74	117,84	53,95	25,96		
20	N	7,69	117,35	50,32	37,54	0,80	0,05
21	L	7,28	120,93	56,88	39,26		
22	D	8,25	116,29	54,64	37,02		
23	F	8,08	120,97	57,57	36,50		
24	L	8,23	117,30	53,26	39,61		
25	R	7,85	120,34	56,19	26,31	1,52	0,09
26	N			49,28	36,84		
27	Y	6,72	121,85	57,23	34,25		
28	R	6,96	127,13	50,66	31,14		
29	D			49,63	36,15		
30	S	6,31	114,81	59,82	64,83	1,55	0,09
31	Y	7,38	119,50	51,35	34,25		
32	N	8,24	120,67	49,45	37,54		
33	R	8,57	118,60	53,95	30,28		
34	T	6,67	110,44	54,98	66,56		
35	P			62,93	27,86		
36	L	8,06	115,64	55,33	36,50		
37	M						
38	V	8,45	122,79	63,62	28,38		
39	A	8,35	121,21	52,22	14,91		
40	C	7,75	115,28	55,16	37,54		
41	M			56,36	28,73		
42	L	7,65	114,71	51,70	38,40		
43	G	7,22	107,13	43,41			
44	M	8,15	121,53	51,35	26,65		
45	E	7,78	123,50	56,54	26,48	1,60	0,10
46	N	8,69	115,13	51,70	34,25		
47	A	7,32	120,95	49,63	16,98	1,65	0,10
48	I	6,66	113,73	59,99	32,01		
49	D	8,67	118,81	55,67	36,15		
50	K	8,51	118,14	54,12	27,86		
51	L	8,02	120,04	55,33	37,88		
52	V			59,30	29,24		
53	E	8,31	125,52	53,43	26,83		
54	N						
55	F	8,55	119,80	55,50			
56	D	8,21	122,46	51,01	37,88	1,46	0,09
57	K	8,36	122,74	54,12	26,48		
58	L			56,36	38,74		
59	E	8,58	115,81	50,49	24,06	1,72	0,10
60	D	7,01	122,56	53,08	37,19	1,60	0,10
61	K	8,41	118,81	52,39	33,74		
62	D						
63	I	7,34	112,52	61,37	34,94		
64	E	6,44	115,80	55,67	29,24		
65	G	8,02	112,01	41,51			
66	S	8,50	120,87	55,85	59,13		
67	T	7,19	111,10	56,36	70,53		
68	A			49,63	15,60		
69	L	7,93	119,40	56,54	38,74		
70	I						
71	W						
72	A						
73	V	8,29	120,89	63,96	34,43		
74	K			57,40			
75	N	6,95	116,71	50,15	37,19		
76	N	7,85	118,33	50,15	32,35		
77	R	7,88	116,20	49,28	23,72	1,55	0,09
78	L	7,41	127,12	56,54	38,40	1,60	0,10
79	G	8,18	107,23	43,75			
80	I	7,26	121,29	62,24	33,56		
81	A	8,26	122,42	53,08	13,87		
82	E	7,86	117,13	56,88	25,79	1,72	0,10
83	K	7,54	120,61	56,54	28,90	1,90	0,11
84	L			54,64	36,50		
85	L	8,56	120,38	55,16	36,50	1,44	0,09
86	S	8,14	117,44	58,26	59,47		
87	K	7,38	119,08	52,22	29,24	1,65	0,10
88	G	7,53	104,63	42,03		1,60	0,10
89	S	8,11	120,17	58,44	60,68		

Anhang

90	N	9,95	122,85	49,80	34,43		
91	V	8,75	129,86	59,65	28,73	1,60	0,10
92	N	7,96	117,59	49,97	36,15	1,72	0,10
93	T	6,37	115,19	59,99	64,83		
94	K	7,42	120,30	51,35	33,74	1,79	0,11
95	D	8,08	120,97	51,35	37,54		
96	F	8,25	116,29			1,73	0,10
97	S	8,23	128,47	55,85	60,86		
98	G	8,49	112,96	42,72			
99	K	7,85	118,33	53,08	27,86		
100	T	6,13	109,24	54,98	65,69		
101	P			63,96	28,73		
102	L	8,74	115,82	54,64	38,23		
103	M	7,53	117,10	57,92	27,69		
104	W	8,49	116,55	52,56	27,34		
105	S	7,33	109,02	55,50	65,69		
106	I						
107	I						
108	F			55,16	34,60		
109	G	7,26	108,80	43,06		2,71	0,16
110	Y	7,86	121,81	49,28	32,87		
111	S			59,99			
112	E	8,73	119,83	57,75	24,41		
113	M	8,35	121,21	54,29	26,65		
114	S	8,56	118,18	59,82	60,86	2,59	0,16
115	Y	8,09	119,66	57,75	33,74		
116	F						
117	L			54,98	37,19		
118	L	8,18	119,23	55,33	37,71		
119	E	7,90	119,89	54,98	25,79	2,71	0,16
120	H	7,25	116,15	53,26	25,10	2,60	0,16
121	G	7,23	103,94	43,06		2,69	0,16
122	A	7,79	123,07	49,63	16,29	2,45	0,15
123	N	8,87	121,62	49,97	34,25		
124	V	8,29	121,51	61,03	28,90		
125	N	8,30	115,64	49,63	36,84	2,45	0,15
126	D	6,23	119,96	51,87	39,44		
127	R	8,09	115,03	50,49	30,80	2,58	0,15
128	N	7,70	118,19	48,07	36,67		
129	L	8,11	117,94	48,25	36,84		
130	E	8,08	120,97	53,08	26,83		
131	G	8,15	108,54	42,89			
132	E	7,68	121,55	49,11	32,87	2,59	0,16
133	T	8,01	120,87	59,99			
134	P			63,79	28,38		
135	L	8,91	116,92	55,16	38,05		
136	I	7,56	122,11	64,14	35,46	2,48	0,15
137	V			63,96	28,55		
138	A	8,78	119,14	52,05	15,08	2,55	0,15
139	S			53,26			
140	K	8,17	118,77	56,54	25,44		
141	Y			56,36	35,46		
142	G	7,50	110,19	44,10		2,71	0,16
143	R	8,53	117,62	52,91	23,72		
144	S	8,14	124,24	56,71			
145	E	8,94	121,52	56,36	24,11	2,60	0,16
146	I	7,14	120,21	58,44	31,49	2,44	0,15
147	V	8,05	121,59	64,83	27,34		
148	K	7,52	116,02	57,23	28,90	2,73	0,16
149	K	7,26	118,96	54,29	27,86	2,48	0,15
150	L	8,58	117,88	54,81	37,36	2,62	0,16
151	L	8,04	118,57	55,16	37,36		
152	E	7,80	122,52	55,85	25,96	2,65	0,16
153	L	7,61	117,93	51,53	38,74	2,71	0,16
154	G	7,56	105,76	42,72		2,50	0,15
155	A	7,97	122,97	49,97	16,98		
156	D	8,27	119,91	50,66	37,19		
157	I	8,49	126,35	60,51	35,46	2,47	0,15
158	S	7,80	122,52	55,85	61,37		
159	A	6,29	124,45	50,15	15,94	2,45	0,15
160	R	8,64	119,44	50,66	30,45	2,59	0,16
161	D	7,89	121,72	49,80	38,40		
162	L						
163	T	8,25	112,30		65,52		
164	G	8,03	108,28	41,85			
165	L	7,94	122,86	51,87	38,74		
166	T	6,99	109,77	56,19	69,32	2,43	0,15
167	A	9,80	125,51	53,26	14,91		
168	E	8,04	118,57	56,36	25,27	2,55	0,15
169	A	7,51	121,37	52,05	15,77	2,51	0,15
170	S	8,46	115,69	59,99	59,13		
171	A	8,02	124,11	52,05	14,56		
172	R	7,43	115,69	56,71	26,14	2,69	0,16
173	I						
174	F	7,68	113,43	57,23	35,12		
175	G	7,51	108,28	43,75		2,52	0,15
176	R	8,71	119,08	48,76	21,99	2,71	0,16
177	Q	7,90	120,14	55,16	25,79		
178	E	8,62	120,33	56,19	25,44	2,53	0,15
179	V	7,02	118,19	62,93	28,04	2,39	0,14
180	I	7,94	120,73	62,76	34,77		
181	K	7,45	118,43	56,54	28,99	2,45	0,15
182	I	7,12	119,90	61,20	33,56	2,60	0,16
183	F	7,50	116,47	58,96	35,46	2,55	0,15
184	T	8,13	113,54	62,24	66,21	2,45	0,15
185	E	7,60	121,28	54,81	26,31	2,54	0,15

Anhang

186	V	7,61	119,04	60,51	28,55	2,41	0,14
187	R	7,81	122,85	53,26	27,00		
188	R	8,00	122,90	53,26	27,00		
189	A	7,78	130,96	50,84	16,63	2,71	0,16

Tabelle 4: Rückgratzuordnung und Übergangsmittelpunkte von tANK

Gezeigt sind die zugeordneten chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrates (HN, N, CA und CB) sowie die Übergangsmittelpunkte ($D_{1/2}$), welche aus einem GdmCl-induzierten Gleichgewichtsübergang bei 15°C, pH 7.5 bestimmt wurden, für die einzelnen Aminosäuren (AS).

8.2.4P19 S76E

Nr	AS	PF	Nr	AS	PF	Nr	AS	PF	Nr	AS	PF
1	M		51	F	nein	101	N	ja	151	A	ja
2	L		52	G		102	V	ja	152	Q	ja
3	L	nein	53	S	nein	103	P		153	D	ja
4	E		54	T	nein	104	D	ja	154	L	ja
5	E		55	A	nein	105	G	nein	155	V	ja
6	V		56	I	nein	106	T	ja	156	D	ja
7	R	nein	57	A	nein	107	G	ja	157	I	ja
8	A		58	L	nein	108	A	ja	158	L	
9	G	nein	59	E	nein	109	L	ja	159	Q	ja
10	D		60	L	nein	110	P		160	G	ja
11	R		61	L	nein	111	I	ja	161	H	
12	L	nein	62	K	nein	112	H	ja	162	M	ja
13	S	nein	63	Q	nein	113	L		163	V	ja
14	G	nein	64	G	nein	114	A		164	A	nein
15	A	nein	65	A	nein	115	V	ja	165	P	
16	A	nein	66	S	nein	116	Q		166	L	ja
17	A	nein	67	P		117	E	ja			
18	R	nein	68	N		118	G	ja			
19	G	nein	69	V	nein	119	H	ja			
20	D		70	Q		120	T	nein			
21	V	nein	71	D		121	A				
22	Q	nein	72	T		122	V	ja			
23	E	nein	73	S		123	V	ja			
24	V	nein	74	G	nein	124	S	ja			
25	R	nein	75	T	nein	125	F	ja			
26	R		76	S	nein	126	L	ja			
27	L	nein	77	P		127	A	ja			
28	L	nein	78	V	ja	128	A	ja			
29	H	nein	79	H		129	E	ja			
30	R	nein	80	D		130	S	ja			
31	E	nein	81	A		131	D	ja			
32	L	nein	82	A	ja	132	L	ja			
33	V	nein	83	R	ja	133	H	ja			
34	H	nein	84	T	nein	134	R	ja			
35	P		85	G	nein	135	R	ja			
36	D	nein	86	F		136	D	ja			
37	A	nein	87	T	ja	137	A	ja			
38	L	nein	88	D	ja	138	R	ja			
39	N	nein	89	T		139	G	ja			
40	R	nein	90	L		140	L	ja			
41	F	nein	91	K	nein	141	T	nein			
42	G	nein	92	V	ja	142	P				
43	K	nein	93	L		143	L	ja			
44	T	nein	94	V	ja	144	E	ja			
45	A	nein	95	E	ja	145	L	ja			
46	L	nein	96	H	nein	146	A	ja			
47	Q	nein	97	G	nein	147	L	ja			
48	V	nein	98	A		148	Q				
49	M	nein	99	D		149	R	ja			
50	M	nein	100	V	ja	150	G	ja			

Tabelle 5: Native Anteile von P19 S76E bei 37°C

Gezeigt ist, ob die einzelnen Aminosäuren (AS) von P19 S76E bei 37°C ein natives Amidkreuzsignal aufweisen (ja) oder nicht (nein).

8.2.5 Onconase

Nr.	AS	H/D nativ 1d	Int 60ms/ref	Int 100ms/ref	Int 250ms/ref	Int 500ms/ref	Int 1000ms/ref	Int 2000ms/ref	Int 5000ms/ref
1	Pyr	ja	0,06	0,12	0,04	0,04	0,05	0,03	0,06
2	D	ja	0,24	0,33	0,17	0,25	0,29	0,01	0,22
3	W	ja	0,08	-0,01	0,02	0,01	-0,01	-0,03	-0,01
4	L	ja	0,22	0,18	0,16	0,24	0,28	0,36	0,36
5	T	ja	-0,09	0,04		-0,07	-0,03		0,11
6	F	nein	0,47	0,53	0,52	0,55	0,60	0,66	0,64
7	Q	nein	0,45	0,53	0,58	0,55	0,56	0,64	0,65
8	K	nein	0,43	0,50	0,55	0,52	0,55	0,62	0,59
9	K	nein	0,49	0,63	0,56	0,53	0,56	0,72	0,57
10	H	nein	0,48	0,54	0,53	0,58	0,59	0,68	0,65
11	I	nein	0,43	0,45	0,61	0,46	0,65	0,58	0,54
12	T	nein	0,45	0,51	0,57	0,54	0,58	0,64	0,64
13	N	ja	0,04	0,14	0,01	0,01	0,03	0,11	0,11
14	T	ja	0,03	0,03	0,20	0,04	0,03	0,04	0,06
15	R	ja	0,01	-0,03	0,02	0,00	-0,03	-0,06	-0,04
16	D	ja	0,03	0,01	0,08	0,06	0,05	0,02	0,04
17	V	ja	0,04	0,00	0,15	0,02	0,04	0,26	0,08
18	D	ja	-0,04	-0,04	0,10	-0,02	-0,01	-0,02	-0,05
19	C	ja	0,07	0,00	0,05	0,06	0,04	0,00	-0,01
20	D	ja	0,07	-0,04	-0,01	0,00	0,03	-0,03	-0,03
21	N	ja	0,22	0,14	0,20	0,22	0,25	0,16	0,22
22	I	ja	0,05	0,08	0,08	0,08	0,00	0,06	0,02
23	M	nein	0,17	0,17	0,23	0,44	0,50	0,35	0,60
24	S	nein	0,02	0,11	0,21	0,07	0,18	0,50	0,39
25	T								
26	N	ja	-0,01	0,06	0,17	-0,01	0,01	0,03	0,02
27	L	nein	0,04	0,10	0,25	0,10	0,20	0,45	0,38
28	F	ja	0,05	0,05	0,07	0,02	0,00	0,08	-0,02
29	H	ja	-0,04	-0,01	0,27	-0,02	0,01	0,69	0,02
30	C	ja	0,02	-0,04	0,28	-0,07	-0,02	0,61	0,09
31	K								
32	D	ja	-0,06	-0,18	0,39	-0,04	-0,03	0,62	-0,01
33	K	ja	0,00	0,13	0,19	0,03	-0,02	0,26	0,03
34	N	nein	0,11	0,15	0,25	0,19	0,32	0,59	0,54
35	T	ja	0,01	0,00	0,08	0,02	0,07	0,04	-0,03
36	F	nein	0,52	0,55	0,59	0,55	0,75	0,77	0,84
37	I	nein	0,44	0,51	0,57	0,51	0,56	0,63	0,58
38	Y	nein	0,46	0,50	0,51	0,53	0,57	0,66	0,60
39	S	nein	0,25	0,46	0,57	0,33	0,42	0,66	0,50
40	R								
41	P								
42	E	ja	0,01	-0,03	-0,02	-0,03	0,01	0,04	-0,03
43	P								
44	V	nein	0,49	0,56	0,57	0,60	0,63	0,72	0,71
45	K								
46	A	nein	0,48	0,60	0,58	0,58	0,60	0,72	0,64
47	I	nein	0,50	0,52	0,56	0,53	0,59	0,69	0,62
48	C	nein	0,46	0,48	0,45	0,52	0,53	0,60	0,58
49	K	nein	0,53	0,58	0,60	0,59	0,67	0,71	0,73
50	G	ja	0,02	0,00	0,08	0,01	0,08	-0,03	0,05
51	I	nein	0,27	0,53	0,64	0,36	0,50	0,75	0,67
52	I	ja	0,04	0,04	0,01	0,04	0,05	0,05	0,01
53	A	ja	0,08	0,04	0,06	0,07	0,13	0,01	0,08
54	S	ja	0,08	0,05	0,06	0,07	0,07	0,06	0,04
55	K	ja	0,04	0,03	0,15	0,02	0,01	0,28	0,02
56	N	ja	0,03	-0,03	0,08	0,01	0,02	0,01	0,01
57	V	nein	0,26	0,32	0,34	0,56	0,62	0,60	0,84
58	L	nein	0,10	0,36	0,55	0,19	0,33	0,75	0,54
59	T	nein	0,44	0,56	0,55	0,50	0,51	0,56	0,56
60	T	ja	0,01	0,03	0,11	0,05	0,02	0,01	-0,02
61	S	ja	-0,02	-0,04	0,08	-0,02	0,01	-0,02	-0,02
62	E								
63	F	ja	-0,05	-0,18	0,41	-0,02	-0,04	0,20	0,00
64	Y	ja	-0,05	0,10	0,34	-0,01	0,10	0,58	0,33
65	L	nein	0,41	0,50	0,54	0,48	0,51	0,59	0,71
66	S	nein	0,50	0,52	0,52	0,55	0,60	0,70	0,65
67	D	nein	0,36	0,39	0,41	0,46	0,49	0,50	0,61
68	C	nein	0,14	0,17	0,17	0,27	0,34	0,49	0,50
69	N	nein			0,27			0,79	
70	V	nein	0,08	0,17	0,24	0,21	0,27	0,55	0,48
71	T	ja	-0,03	-0,02	0,21	0,01	-0,02	0,39	0,00
72	S								
73	R	ja	0,05	0,03	0,04	-0,01	0,01	0,04	0,02
74	P								
75	C	ja	0,03	-0,05	0,39	0,08	0,08	0,09	0,06
76	K	nein	0,14	0,20	0,26	0,27	0,34	0,55	0,54
77	Y								
78	K	nein	0,16	0,20	0,28	0,26	0,34	0,53	0,55
79	L	ja	-0,02	-0,03	-0,01	-0,04	-0,01	-0,03	-0,02
80	K	nein	0,15	0,18	0,27	0,28	0,38	0,57	0,59
81	K	ja	0,09	-0,01	0,01	0,12	0,03	-0,04	0,05
82	S	nein	0,06	0,09	0,19	0,14	0,27	0,45	0,38
83	T	ja	-0,01	-0,05	0,03	0,01	-0,01	-0,03	-0,02
84	N	nein	0,18	0,20	0,25	0,29	0,38	0,57	0,59
85	K								
86	F	nein	0,47	0,54	0,66	0,56	0,55	0,67	0,45
87	C	nein	0,56	0,59	0,58	0,63	0,64	0,75	0,66
88	V	nein	0,64	0,64	0,66	0,67	0,68	0,75	0,70
89	T	nein	0,60	0,74	0,61	0,65	0,69	0,56	0,70
90	C	nein	0,61	0,63	0,62	0,66	0,69	0,75	0,71
91	E	nein	0,59	0,60	0,54	0,65	0,67	0,67	0,70
92	N								
93	Q	nein	0,32	0,56	0,55	0,40	0,46	0,56	0,53
94	A	nein	0,64	0,68	0,65	0,71	0,73	0,76	0,75
95	P								
96	V	nein	0,59	0,64	0,64	0,65	0,63	0,70	0,67

Anhang

97	H	nein	0,48	0,52	0,53	0,53	0,59	0,66	0,60
98	F								
99	V	nein	0,56	0,57	0,58	0,59	0,61	0,68	0,65
100	G								
101	V	ja	-0,09	0,08		-0,10	-0,09	-0,02	-0,07
102	G	ja	0,01	-0,04		-0,01	0,04		0,03
103	S	ja	0,02	-0,02	0,20	-0,01	0,03	0,17	0,08
104	C	ja	0,02	-0,02	0,00	0,03	0,02	-0,01	-0,03

Tabelle 6: Protonierungsgrad von Onconase bei verschiedenen Rückfaltungszeiten

Gezeigt ist, ob die einzelnen Aminosäuren (AS) von nativer Onconase innerhalb eines Tages mit dem Lösungsmittel austauschen (H/D nativ 1d) oder nicht, sowie das Verhältnis der Intensitäten der Amidkreuzsignale bei verschiedenen Rückfaltungszeiten der Referenz (Int xxx ms/ref). Die Farbkodierung entspricht Abb. 38.

8.2.6G3P

Nr.	AS	HN	N	CA	CB	nativ in I	PF nativ	PF Int	PF Dom
1	A	-	-	47,89	15,68				
2	E	8,32	119,31	51,47	26,73				
3	T	9,01	112,04	55,74	69,05	yes			
4	V	8,70	121,28	64,61	27,58	yes			
5	E	8,26	115,63	56,59	25,02	yes	1,20E+05		
6	S			58,12	60,13				
7	C	8,18	123,64	55,57	34,24	yes			3,24E+03
8	L			53,18	37,31				8,43E+02
9	A	6,90	118,29	48,23	15,64	yes	4,22E+03		1,78E+03
10	K	7,27	120,77	54,54	29,80	yes	2,19E+04		1,58E+03
11	S	8,13	115,56	54,88	60,17		4,88E+05		4,19E+03
12	H	8,32	120,10	51,64	27,59	yes			4,85E+02
13	I	8,87	123,01	57,43	37,48	no	2,00E+06	3,23E+05	
14	E	8,89	131,29	50,45	24,86	no			
15	N	7,97	119,59	48,59	37,90	no			
16	S	9,72	119,89	54,71	59,83	no	2,74E+05		4,30E+03
17	F	8,56	123,34	50,28	37,48	no	2,00E+06	4,86E+05	
18	T	9,36	113,43	53,52	66,66	no	1,20E+06	4,17E+05	
19	N	8,28	119,26	50,96	33,38	yes			2,74E+03
20	V	7,32	116,41	57,61	29,12	no	7,28E+04		8,41E+03
21	W	8,89	123,44	53,18	28,95	yes	7,03E+05	1,18E+05	
22	K	8,37	121,14	49,42	31,00	yes			5,17E+02
23	D	8,43	129,35	51,47	40,89	yes	2,66E+05	2,84E+05	
24	D	8,53	125,82	53,00	37,31	no	2,00E+06	1,44E+05	
25	K	7,90	115,19	53,18	29,29	no	7,51E+04		
26	T			58,62	65,47				
27	L	7,52	121,21	48,06	38,16				1,00E+03
28	D			49,43	38,67				3,48E+03
29	R	8,79	116,00	49,42	26,05	yes	1,46E+05		1,26E+05
30	Y	8,34	122,26	52,15	38,84				1,36E+05
31	A	7,93	115,64	48,23	20,25	yes	2,00E+06	4,71E+05	2,45E+03
32	N	9,18	117,61	48,23	37,31	no	6,10E+04		1,11E+05
33	Y	9,20	119,44	54,71	35,95	no	4,49E+05	4,71E+05	
34	E	9,03	130,99	53,35	24,34	no			
35	G	8,54	131,86	41,75	-	no			2,92E+05
36	C	8,11	120,29	49,76	35,60	yes	2,00E+06	4,00E+06	1,12E+05
37	L	8,12	125,47	50,38	41,06	yes	2,23E+06	3,21E+05	2,17E+05
38	W	9,35	126,37	51,98	29,12	yes	2,00E+06	1,01E+05	2,11E+05
39	N	9,34	118,98	46,52	40,72	no	2,00E+06	1,01E+06	7,28E+04
40	A	7,12	131,06	48,91	12,74	no	2,00E+06	8,77E+05	
41	T	7,52	116,22	56,25	68,87	no	2,00E+06		
42	G	8,17	106,54	41,58	-	no	2,21E+04		
43	V			60,00	26,90				
44	V	8,52	130,23	57,10	29,63	no	7,30E+03		1,61E+02
45	V	8,94	127,70	56,25	30,99	no	8,47E+05	6,04E+04	
46	C	8,60	122,76	51,30	44,13	no	4,69E+05	1,17E+04	
47	T	8,53	111,80	58,29	66,31	no	7,05E+05		
48	G	9,24	109,85	43,28	-				
49	D	7,70	116,00	49,42	36,63	yes			
50	E	7,90	113,37	54,20	23,32				
51	T			60,34	67,00				1,24E+03
52	Q	7,20	115,33	51,47	31,51	no	5,02E+04		
53	C	8,32	112,77	53,18	45,50	no	2,00E+06	2,36E+06	2,47E+03
54	Y	10,19	127,26	51,64	37,65	no	1,46E+06		1,16E+04
55	G	6,68	112,49	41,23	-		4,01E+06	1,80E+04	1,47E+03
56	T	7,85	116,68	58,98	63,24	no	3,77E+04		3,69E+04
57	W	9,60	134,58	54,20	25,53	no	2,00E+06	2,59E+05	2,18E+05
58	V	8,80	122,93	53,69	30,14	no			
59	P	-	-	58,13	26,39				1,94E+05
60	I	8,61	112,33	56,93	36,46	yes	2,00E+06	4,50E+04	3,80E+04
61	G	7,07	106,51	40,89	-	yes	5,10E+05	4,58E+05	
62	L	8,43	122,81	51,77	39,74		3,23E+04		1,63E+03
63	A	7,22	119,72	49,08	14,79	no	1,67E+05		
64	I	8,27	120,97	54,54	34,75	yes	6,52E+02		
65	P	-	-	60,34	28,27				
66	E	8,66	120,13	53,69	25,71	no			
67	N	7,68	118,27	49,42	34,24	no	1,89E+04		
68	E	7,76	120,53	53,01	26,39	no			
69	G	8,10 / 8,22	109,63 / 109,92	41,75	-				
70	G	8,06 / 8,11 / 8,17	109,01 / 109,00 / 109,16	41,58	-				
71	G	8,06 / 8,11 / 8,17	109,01 / 109,00 / 109,16	41,58	-				
72	S	8,15	116,04	54,88	60,34				
73	E	8,43	122,81	53,18	26,22				
74	G	8,10 / 8,22	109,63 / 109,92	41,75	-				
75	G	8,06 / 8,11 / 8,17	109,01 / 109,00 / 109,16	41,58	-				
76	G	8,06 / 8,11 / 8,17	109,01 / 109,00 / 109,16	41,58	-				
77	S	8,15	116,04	54,88	60,34				
78	E	8,43	122,81	53,18	26,22				
79	G	8,10 / 8,22	109,63 / 109,92	41,75	-				
80	G	8,06 / 8,11 / 8,17	109,01 / 109,00 / 109,16	41,58	-				
81	G	8,06 / 8,11 / 8,17	109,01 / 109,00 / 109,16	41,58	-				
82	S	8,15	116,04	54,88	60,34				
83	E	8,43	122,81	53,18	26,22				
84	G	8,10 / 8,22	109,63 / 109,92	41,75	-				
85	G	8,06 / 8,11 / 8,17	109,01 / 109,00 / 109,16	41,58	-				
86	G	8,06 / 8,11 / 8,17	109,01 / 109,00 / 109,16	41,58	-				
87	T	7,92	114,64	57,96	66,14				
88	K	8,23	126,03	50,45	28,78				
89	P	-	-						

Anhang

90	P	-	-	59,32	28,05				
91	E	7,81	119,76	51,64	27,59				
92	Y	8,16	121,31	54,03	37,14	yes			
93	G	8,77	112,05	40,55	-	no			
94	D	7,64	112,90	48,74	38,16	no			
95	T	7,42	113,93	55,05	66,14	no			
96	P	-	-	54,28	26,21				
97	I	8,20	117,73	49,42	35,43				
98	P	-	-	58,81	28,78				
99	G	7,26	107,19	41,06	-	no	1,54E+06	6,00E+02	
100	Y	8,82	119,97	52,15	38,33	yes	1,42E+06	1,20E+03	
101	I	8,74	123,56	59,15	33,21	no	1,78E+05	6,09E+02	
102	Y	9,31	134,31	53,18	34,75		1,15E+06	1,79E+03	
103	I	9,37	132,99	55,74	34,41				
104	N	7,91	116,50	53,35	37,31	yes	1,42E+05		
105	P	-	-	60,34	28,95				
106	L	8,49	120,41	49,08	36,29	yes	1,53E+05	6,41E+04	
107	D	6,66	117,04	51,47	36,97	yes	2,58E+05	1,33E+05	
108	G	7,84	108,55	43,28	-	yes			
109	T	8,38	112,38	60,00	70,98	yes	1,14E+04		
110	Y	8,81	126,41	51,47	36,12	yes	7,02E+04		
111	P	-	-						
112	P	-	-	58,45	27,76				
113	G	8,16	110,38	42,26	-	yes	1,61E+05		
114	T	7,84	110,60	56,25	70,07	yes			
115	E	8,48	118,80	55,05	25,37	yes			
116	Q	7,66	115,41	54,41	24,68	yes			
117	N	6,71	113,53	45,33	33,39	yes			
118	P	-	-	59,15	27,93				
119	A	6,94	124,16	48,74	15,47	yes	1,84E+03		
120	N	7,97	119,59	47,55	35,43	yes			
121	P	-	-	60,00	28,21				
122	N	8,24	121,68	48,06	34,92	yes			
123	P	-	-	58,98	28,95				
124	S	9,10	117,93	53,35	62,04	yes			
125	L	8,31	123,61	49,94	37,14	yes			
126	E	8,72	122,69	50,62	27,41	yes	4,11E+04		
127	E	9,24	123,60	55,22	26,05	yes			
128	S	7,49	110,12	52,49	61,54	yes			
129	H	8,21	122,22	53,69	26,22	yes			
130	P	-	-	58,12	27,76				
131	L	8,07	119,51	51,64	38,67	yes			
132	N	8,85	111,50	51,64	34,24	yes			
133	T	7,87	111,34	58,64	67,85	yes	1,64E+04		
134	F	8,78	113,99	50,28	38,33	yes	1,26E+06	3,87E+05	
135	M	8,97	119,49	49,25	30,83	yes	2,00E+06	4,76E+05	
136	F	8,96	125,88	53,35	37,48	yes	2,42E+06	3,14E+05	
137	Q	9,24	127,02	53,09	21,27	yes	2,69E+04		
138	N	8,62	108,46	51,30	34,75	no			
139	N	7,99	117,92	48,23	37,82	no	2,00E+06	2,71E+06	
140	R	8,04	123,92	51,47	29,80	yes	2,95E+05		
141	F	9,14	123,39	52,84	39,87	yes	2,00E+06	4,05E+05	
142	R	8,69	118,52	50,78	29,80	yes	2,00E+06	5,80E+05	
143	N	9,10	124,22	47,72	36,28	yes			
144	R	8,38	127,49	51,13	26,90	yes			
145	Q	-	-	52,94	23,49				
146	G	8,48	107,13	41,92	-	yes			
147	A	7,52	121,75	47,03	14,96	yes	2,99E+04		
148	L	8,19	123,21	49,59	39,01	yes	3,52E+04		
149	T	9,17	117,23	56,08	69,56	yes	9,12E+05	2,22E+05	
150	V	9,37	120,05	53,86	32,19	yes	2,00E+06	1,32E+05	
151	Y	8,50	129,74	52,84	34,75	yes	4,10E+05	1,50E+04	
152	T	8,75	122,34	55,91	63,41		1,76E+06	4,05E+05	
153	G	-	-	41,06					
154	T	7,96	107,67	56,25	68,19				
155	V	8,59	121,19	57,44	32,36	yes	4,32E+04		
156	T	8,29	118,01	56,25	66,99	yes			
157	Q	8,93	122,08	51,64	29,46	yes			
158	G	8,33	110,96	40,55	-	yes			
159	T	7,80	108,12	57,78	66,83	yes			
160	D	7,62	113,23	52,67	33,39		7,70E+04		
161	P	-	-						
162	V	-	-	58,64	28,27				
163	K	8,31	129,17	51,47	31,17	yes			
164	T	7,96	118,98	58,98	65,97	yes			
165	Y	8,78	124,02	52,15	39,19	yes	6,22E+05	3,57E+05	
166	Y	9,12	119,99	53,86	34,75	yes	4,70E+04		
167	Q	9,05	127,76	52,15	27,76	yes	1,97E+06	5,41E+05	
168	Y	8,87	128,43	54,03	36,97	yes	2,00E+06	3,57E+05	
169	T	9,44	124,05	57,27	67,17	yes	2,03E+06	4,05E+05	
170	P	-	-	60,12	28,38				
171	V	7,96	124,11	60,12	28,88	yes	2,00E+06	4,80E+04	
172	S	9,05	120,02	51,98	62,05	yes	2,74E+06	7,59E+04	
173	S	6,62	116,56	51,30	61,71	yes	2,48E+04		
174	K	9,02	133,12	54,37	28,44	yes	4,51E+04		
175	A	8,02	120,16	51,30	14,79	yes			
176	M	7,46	118,35	53,35	27,59	yes	1,32E+05		
177	Y	6,94	117,47	60,17	32,70	yes	2,00E+06	2,91E+05	
178	D	8,87	118,89	54,20	36,63	yes	6,42E+05	2,42E+05	
179	A	7,08	121,40	51,30	13,25	yes	8,69E+04		
180	Y	7,55	119,55	57,96	34,58	yes	4,88E+05	2,26E+05	
181	W	9,75	124,26	55,05	24,68	yes	2,00E+06	1,83E+05	
182	N	7,86	115,27	49,94	35,09	yes			
183	G	7,21	105,71	42,60	-	yes			
184	K	7,60	115,93	52,32	26,22	yes	1,68E+04		
185	F	7,99	114,28	51,64	35,26	yes			

Anhang

186	R	7,12	121,42	55,74	25,88	yes			
187	D	9,11	113,00	50,79	36,97	yes			
188	C	7,23	112,93	52,49	43,45	yes			
189	A	7,58	122,51	49,59	15,47	yes	1,60E+05		
190	F	8,33	118,32	53,52	34,92	yes			
191	H	7,92	120,94	53,35	26,05	yes			
192	S	8,64	115,87	53,69	61,71	yes			
193	G	8,29	109,88	40,72	-	yes			
194	F	8,49	119,74	53,86	34,75	yes			
195	N	7,25	121,04	49,08	36,46	yes			
196	E	8,52	122,02	53,18	26,56	yes			
197	D			50,28	37,99				
198	L	7,75	121,66	50,45	39,19	yes			
199	F	7,84	123,45	54,71	36,29	yes	1,90E+03		
200	V	8,94	125,39	59,32	28,27	yes			
201	C	8,31	128,00	54,20	38,67	yes	4,13E+05		
202	E	9,85	127,44	55,74	26,22				
203	Y	10,07	123,19	54,54	34,58		4,02E+03		
204	Q	8,08	122,66	50,79	25,03	yes			
205	G			41,58	-				
206	Q	8,06	118,95	52,15	26,56				
207	S			55,74	60,46				
208	S	7,75	116,97	52,15	59,66	no	8,38E+05	5,55E+03	
209	Y			55,74	34,07				
210	L	8,30	126,24	46,87	34,75	no			
211	P	-	-	58,98	28,10				
212	Q	7,85	120,39	51,64	27,58	no			
213	P	-	-						
214	P	-	-	58,67	27,07				
215	V	7,82	118,28	59,75	28,27	no	6,90E+04	1,10E+02	
216	N	7,26	114,71	47,72	34,24	no	1,87E+04		
217	A	6,43	121,68	47,21	14,62	no			
218	P	-	-	59,66	28,05				
219	S	8,32	116,34	54,71	60,51	no			
220	G	8,26	110,54	41,58	-	no			
221	H								
222	H								
223	H								
224	H								
225	H			52,27	26,20				
226	H	7,97	125,61	53,69	26,56	yes			

Tabelle 7: Rückgratzuordnung, native chemische Verschiebung im Intermediat, sowie Schutzfaktoren der einzelnen Zustände von G3P

Gezeigt sind die zugeordneten chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrates (HN, N, CA und CB) und ob die Amidkreuzsignale der einzelnen Aminosäuren (AS) im Intermediat native chemische Verschiebung zeigen (nativ in I): **ja** oder **nein**. Die Farbkodierung ist die gleiche wie in Abb. 40. Zudem sind die Schutzfaktoren im nativen Zustand (PF nativ), im Intermediat (PF Int), sowie der isolierten N1 Domäne (PF Dom) bei 25°C, pH 7.0 angegeben.

9 Eigene Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Publikationen:

- 1) (zu 3.1.1)
Lów C, **Weininger U**, Zeeb M, Zhang W, Laue ED, Schmid FX, Balbach J.
J Mol Biol. 2007 Oct 12;373(1):219-31.
“Folding mechanism of an ankyrin repeat protein: scaffold and active site formation of human CDK inhibitor p19(INK4d).”
- 2) (zu 3.1.2)
Hofmann H, **Weininger U**, Lów C, Golbik RP, Balbach J, Ulbrich-Hofmann R.
J Am Chem Soc. 2009 Jan 14;131(1):140-6.
“Fast amide proton exchange reveals close relation between native-state dynamics and unfolding kinetics.”
- 3) (zu 3.2.1)
Lów C, **Weininger U**, Neumann P, Klepsch M, Lilie H, Stubbs MT, Balbach J.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 11;105(10):3779-84.
„Structural insights into an equilibrium folding intermediate of an archaeal ankyrin repeat protein.“
- 4) (zu 3.2.2)
Lów C, Homeyer N, **Weininger U**, Sticht H, Balbach J.
ACS Chem Biol. 2009 Jan 16;4(1):53-63.
„Conformational switch upon phosphorylation: human CDK inhibitor p19INK4d between the native and partially folded state.“
- 5) (zu 3.3.1)
Schulenburg C, Lów C, **Weininger U**, Mrestani-Klaus C, Hofmann H, Balbach J, Ulbrich-Hofmann R, Arnold U.
Biochemistry. 2009 Sep 8;48(35):8449-57.
„The folding pathway of onconase is directed by a conserved intermediate.”
- 6) (zu 3.3.2)
Weininger U, Jakob RP, Eckert R, Schweimer K, Schmid FX, Balbach J.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jul 28;106(30):12335-40.
“A remote prolyl isomerization controls domain assembly via a hydrogen bonding network.”

Eigene Publikationen

Des Weiteren entstanden folgende Publikationen:

- 7) Kliemannel M, **Weininger U**, Balbach J, Schwarz E, Rudolph R. *Biochemistry*. 2006 Mar 21;45(11):3517-24.
“Examination of the slow unfolding of pro-nerve growth factor argues against a loop threading mechanism for nerve growth factor.“

Es wurde die langsame Entfaltung des humanen nerve growth factors (NGF) sowie seiner Proform untersucht. Die sehr langsame Entfaltung steht dabei im Zusammenhang mit der Auflösung eines Cysteinknotens. Dabei kamen 1D- sowie 2D-Echtzeit-NMR-Experimente zum Einsatz. Ein identisches Entfaltungsverhaltens der Proform und der reifen Form widerlegte einen postulierten *loop threading* Mechanismus der Entfaltung.

- 8) Zeeb M, Max KE, **Weininger U**, Löw C, Sticht H, Balbach J. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(16):4561-71.
„Recognition of T-rich single-stranded DNA by the cold shock protein Bs-CspB in solution.“

In dieser Arbeit wurde die DNA-Bindung des Kälteschockproteins B (CspB) aus *Bacillus subtilis* untersucht. Mittels NMR-Spektroskopie wurde die Struktur von CspB in DNA-gebundener Form bestimmt, die DNA-Bindungsregion lokalisiert, sowie die Dynamik von CspB in freier und gebundener Form analysiert. Des Weiteren wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie die Bindungsstärke verschiedener DNA-Fragmente und unterschiedlicher Proteinmutanten systematisch untersucht.

- 9) Bosse-Doenecke E, **Weininger U**, Gopalswamy M, Balbach J, Knudsen SM, Rudolph R. *Protein Expr Purif*. 2008 Mar;58(1):114-21.
„High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors.“

In dieser Arbeit wurden das Glucagon-artige Peptid (GLP) sowie das Parathyroidhormon (PTH) rekombinant als SUMO-Fusionsprotein hergestellt. Beide rekombinanten Peptide verhalten sich identisch wie synthetisierte. Im Falle von PTH wurde dies auch mit NMR-Spektroskopie bestätigt.

- 10) Löw C, **Weininger U**, Lee H, Schweimer K, Neundorf I, Beck-Sickinger AG, Pastor RW, Balbach J. *Biophys J*. 2008 Nov 1;95(9):4315-23.
“Structure and dynamics of helix-0 of the N-BAR domain in lipid micelles and bilayers.“

Hier wurde die Rolle der N-terminalen Helix (helix-0) der humanen Bin1/Amphiphysin II BAR-Domäne untersucht, welche sich nur in Gegenwart von Micellen und Liposomen ausbildet. Mit NMR-Spektroskopie wurde die Struktur der Helix in Gegenwart von SDS- sowie DPC-Micellen gelöst, sowie durch Amidprotonenaustauschexperimente die Orientierung der Helix zu den Micellen bestimmt. Die Interaktion des Peptides mit Micellen, sowie die Ausbildung der Helix wurden weiterhin mit MD-Simulationen beleuchtet.

Eigene Publikationen

- 11) Hoffmann A, Funkner A, Neumann P, Juhnke S, Walther M, Schierhorn A, **Weininger U**, Balbach J, Reuter G, Stubbs MT.
J Biol Chem. 2008 Nov 21;283(47):32598-609.
“Biophysical characterization of refolded Drosophila Spätzle, a cystine knot protein, reveals distinct properties of three isoforms.“

In dieser Arbeit wurden verschiedene Isoformen von Spätzle aus Drosophila rekombinant hergestellt, zurückgefaltet und charakterisiert. Zudem wurde die Kristallstruktur des Cysteinknotens gelöst.

- 12) **Weininger U**, Haupt C, Schweimer K, Graubner W, Kovermann M, Brüser T, Scholz C, Schaarschmidt P, Zoldak G, Schmid FX, Balbach J.
J Mol Biol. 2009 Mar 27;387(2):295-305.
“NMR solution structure of SlyD from Escherichia coli: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function.“

Hier wurde die Struktur von SlyD aus *E. coli* mit NMR-Spektroskopie gelöst. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Orientierung der beiden Domänen, der FKBP-Domäne und der IF-Domäne, unabhängig voneinander ist. Zudem wurde die Chaperonaktivität von SlyD auf der IF-Domäne lokalisiert und mit zahlreichen entfaltenen Peptiden, Proteinen sowie während einer Aggregation (Insulin) untersucht.

10 Lebenslauf

Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Geburtsdatum: 06.05.1978 in Dillingen an der Donau

Ab 01/2005 Promotion
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

11/1999-12/2004 Studium Biochemie
Universität Bayreuth
Diplomarbeit "NMR-spektroskopische Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur und DNA-Bindung von ORF56 aus *Sulfolobus islandicus*"

07/1998-04/1999 Wehrdienst

09/1989-06/1998 Gymnasium Wertheim

09/1985-08/1989 Grundschule Kreuzwertheim

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Jochen Balbach bedanken für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, interessante Projekte, zahlreiche Kooperationsmöglichkeiten, den nötigen wissenschaftlichen Freiraum und die Möglichkeit die NMR-Spektroskopie in zahlreichen ihrer Facetten kennen zu lernen und ausgiebig praktizieren zu können. Darüber hinaus möchte ich mich für zahlreiche Gespräche, Diskussionen und Ratschläge bedanken, die auch über das Wissenschaftliche hinaus gingen.

Herrn Professor Milton Stubbs danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, Diskussionen, Kooperationen und die Aufnahme zu zahlreichen Aktivitäten seiner Arbeitsgruppe.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Christian Löw für exzellente, höchstproduktive Schreibtischnachbarschaft, das gemeinsame Zurechtfinden in Halle, den gemeinsamen mühsamen Mitaufbau der Infrastruktur (das war was am Anfang im Hohen Weg), zahlreiche Diskussionen, notwendige positive Kritik, zahlreiche Unternehmungen, tolle Kooperationen, verrückte Messaktionen in Berlin und Bayreuth und und und...

Michael Kovermann danke ich ebenfalls für tolle Schreibtischnachbarschaft, zahlreiche leidenschaftliche interessante Diskussionen über NMR und Proteine und seine inspirierende Begeisterungsfähigkeit. Darüber hinaus danke ich auch für zahlreiche Fußballabende und weitere Unternehmungen.

Caroline Haupt und Rica Patzschke danke ich für schöne Schreibtischnachbarschaft, Gespräche und Unternehmungen.

Katrin Waldheim möchte ich für ihre Unterstützung im Labor und bei Fluoreszenzübergängen danken.

Ebenso gilt mein Dank allen weiteren Mitgliedern der Biophysik: Mohanraj Gopalswamy, Stefan Gröger, Tobias Gruber, Mathias Henze, Andi Klamt, PD Dr. Detlef Reichert und Rolf Sachs.

Danksagung

Bei Professor Kay Saalwächter und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für das gute Zusammenleben in der Betty-Heimann-Straße bedanken, besonders bei Walter, Fabian, Frank und Pierre.

Professor Renate Ulbrich-Hofmann, Dr. Ulrich Arnold, Dr. Hagen Hofmann und Dr. Cindy Schulenburg möchte ich für die schönen Kooperationen danken. Cindy und Hagen darüber hinaus auch für interessante Diskussionen und so manchen schönen und auch denkwürdigen Abend.

Bei Professor Franz Xaver Schmid möchte ich mich für zahlreiche tolle Kooperationen, viele lehrreiche Diskussionen und sein stetes Interesse bedanken. Seine kritische, durchdachte und exakte Herangehensweise haben mich viel für die Wissenschaft und darüber hinaus lernen lassen.

Besonders Dr. Roman Jakob und Dr. Barbara Eckert möchte ich für zahlreiche schöne Zusammenarbeit, Gespräche, Unternehmungen und die vielen Einquartierungen in Bayreuth danken. Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Anne Geitner, Dr. Insa Kather, Stefan Lorenz, Stephanie Thoms und Dr. Gabriel Zoldak bedanken. Alle haben mich während meiner Aufenthalte in Bayreuth stets so aufgenommen als würde ich zu ihrer Gruppe dazugehören.

Professor Paul Rösch danke ich für die zahlreiche NMR-Messzeit in Bayreuth, die mich durch die spektrometerlose Zeit in Halle gebracht hat. Dr. Kristian Schweimer danke ich für viele Diskussionen und Erklärungen zur NMR-Spektroskopie, sowie fürs oftmalige über die Schulter schauen.

Bei Professor Hartmut Oschkinat und Dr. Peter Schmieder möchte ich mich für NMR-Messzeit am 900 MHz Spektrometer in Berlin bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation verwendet. Aus der Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, die vorliegende Dissertation an keiner anderen Einrichtung zur Bewerbung um einen Doktorgrad eingereicht zu haben. Ich selbst habe mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale),

Ulrich Weininger