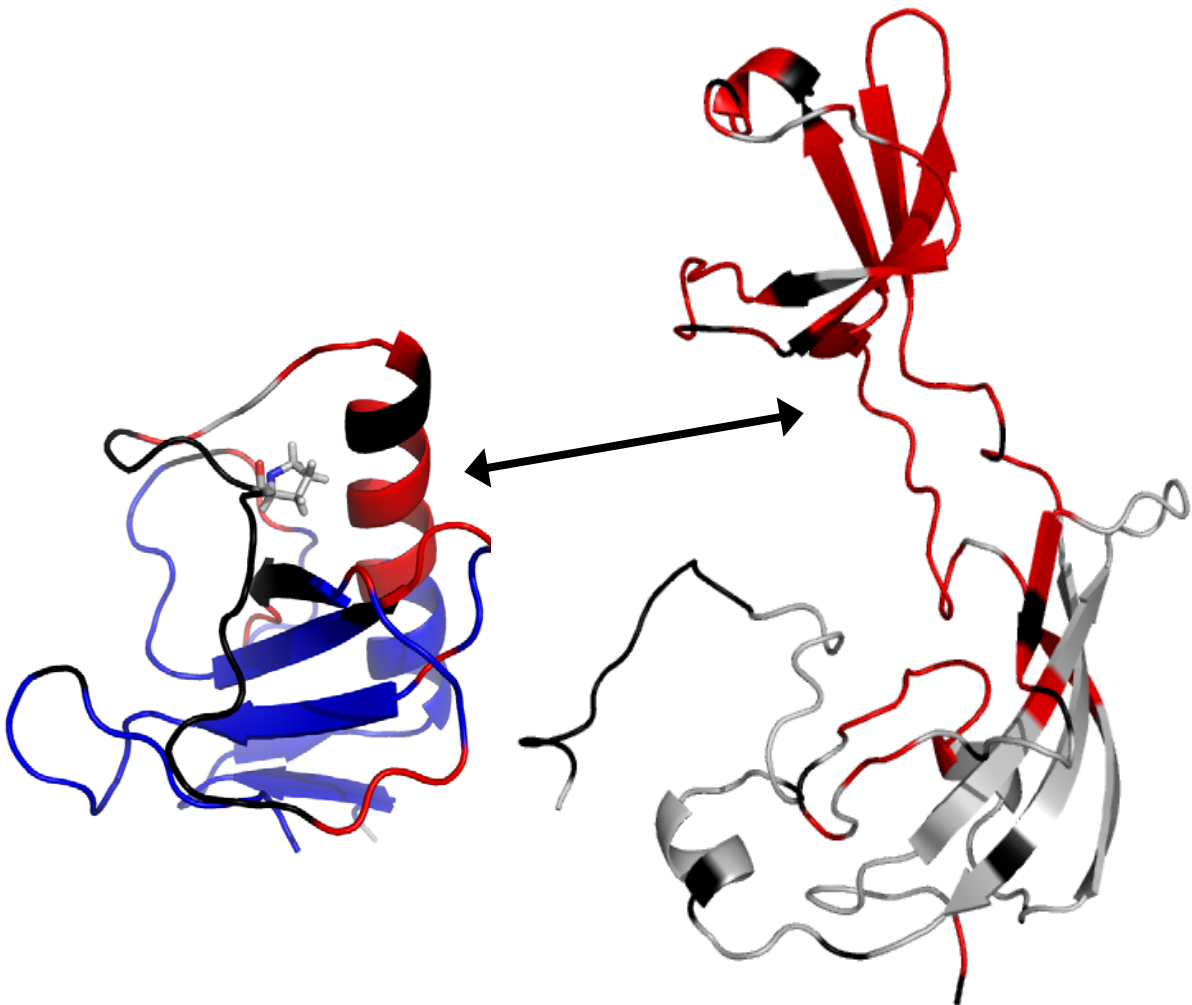


Enzym-Substrat-Erkennung in katalysierten Proteinfaltungsreaktionen



Enzym-Substrat-Erkennung in katalysierten Proteinfaltungsreaktionen

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

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



von Diplom-Chemikerin Caroline Haupt
geboren am 28. Juni 1980 in Karlsburg

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.10.2009

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 21.12.2009

Gutachter: (1) Prof. Dr. Milton T. Stubbs

(2) Prof. Dr. Jochen Balbach

(3) PD Dr. Jochen Reinstein

Der wahre Wissenschaftler hört
auf die Intelligenz der Natur
und sieht die Natur der Sache.

Anthony G. E. Blake

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Anwendung der NMR-Spektroskopie für Proteinfaltungsreaktionen	4
1.1.1. Chronologische Entwicklung von NMR-spektroskopischen Methoden zur Untersuchung von Proteinfaltungsreaktionen	5
1.1.2. Neue Methoden zur Beschleunigung der NMR-Datenaufnahme	7
1.1.3. Indirekte NMR-spektroskopische Charakterisierung von kurzlebigen Proteinfaltungsintermediaten	9
1.2. Eigenschaften der Peptidyl-Prolyl-Bindung	10
1.3. Das Modells substrat Ribonuklease T1 (S54G/P55N)	10
1.4. Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	12
1.5. Der Proteinfaltungshelfer SlyD	14
1.6. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	18
2. Materialien und Methoden	21
2.1. Materialien	21
2.1.1. Chemikalien und Säulenmaterialien	21
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3. Geräte	21
2.1.4. Bakterienstämme und Plasmide	22
2.1.5. Nährmedien	23
2.1.6. Enzyme, Peptide und Proteine	24
2.1.7. Standards	24
2.2. Elektrophoretische Methoden	25
2.2.1. Agarose-Gelelektrophorese	25
2.2.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.3. Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1. Herstellung und Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.3.2. Plasmid-Präparation nach dem Plasmid Mini-Prep-Kit	26
2.3.3. Sequenzspezifische Mutagenese (QuikChange®)	27
2.3.4. Kolonie-PCR	28
2.3.5. Klonierung von <i>E.c.</i> SlyD-Varianten in den pETSUMOadapt-Vektor	28
2.3.6. Restriktion und Ligation	29
2.4. Gewinnung von Proteinen	29
2.4.1. Reinigung von RNase T1 (S54G/P55N)	29
2.4.2. Reinigung von SlyD*	31
2.4.3. Reinigung der SlyD-Varianten <i>E.c.</i> SlyD(1-155) und <i>E.c.</i> -IF-Domäne als SUMO-Fusionsproteine	33
2.4.4. Präparation der SUMO-Protease Ulp1	34
2.5. Spektroskopische Messungen	35
2.5.1. Absorptionsspektroskopie	35
2.5.2. Fluoreszenzspektroskopie	36
2.5.3. Circular dichroismus-(CD)-Spektroskopie	36
2.5.4. Konzentrationsbestimmung von GdmCl, Harnstoff und NaCl	37
2.5.5. Untersuchungen zur konformationellen Stabilität von SlyD*	37
2.5.5.1. Auswertung von Denaturierungsmittelinduzierten Entfaltungsübergängen	38

2.5.5.2.	Auswertung und Messung von thermisch induzierten Entfaltungsübergängen	39
2.5.6.	Rückfaltungsexperimente mit RNase T1 (S54G/P55N)	40
2.5.7.	Katalyse der Rückfaltung von RCM-RNase T1 (S54G/P55N).....	41
2.5.8.	Proteasefreier PPIase-Test.....	41
2.5.9.	Insulinaggregation als Test auf Chaperonaktivität.....	42
2.6.	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC).....	42
2.7.	NMR-spektroskopische Methoden.....	43
2.7.1.	Eindimensionale NMR-Spektroskopie.....	44
2.7.2.	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie	45
2.7.3.	Dreidimensionale NMR-Spektroskopie	47
2.7.4.	NMR-Titrations zur Lokalisierung der primären Bindestellen in SlyD*	51
2.7.5.	Harnstoffinduzierte Übergangskurven von SlyD*	52
2.7.6.	NMR-spektroskopische Detektion des Amidprotonenaustauschs	53
2.7.7.	Echtzeit-NMR-Spektroskopie	56
2.7.7.1.	Rückfaltungsexperimente mit RNase T1 (S54G/P55N)	56
2.7.7.2.	Beobachtung der Insulinaggregation.....	58
3.	Ergebnisse und Diskussion	61
3.1.	Thermodynamische Stabilität von <i>E.c.</i> SlyD	61
3.1.1.	Harnstoffinduzierte Entfaltungsübergänge im Gleichgewicht	61
3.1.2.	Thermisch induzierte Entfaltungsübergänge im Gleichgewicht	63
3.1.3.	NMR-Spektroskopische Methoden zur Betrachtung der thermodynamischen Stabilität von <i>E.c.</i> SlyD	66
3.1.3.1.	Harnstoffinduzierte Entfaltungsübergänge von SlyD*	67
3.1.3.2.	Harnstoffinduzierter Entfaltungsübergang von SlyD*- Δ IF	73
3.1.3.3.	Harnstoffinduzierter Entfaltungsübergang von SlyD(1-155) in Anwesenheit von Ni^{2+}	75
3.1.3.4.	Amidprotonenaustauschexperimente zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilität von SlyD* im nativen Zustand.....	76
3.1.3.5.	H/D-Austausch in Gegenwart verschiedener Harnstoffkonzentrationen (<i>native state hydrogen exchange</i> -Strategie)	82
3.1.4.	Charakterisierung der Ni^{2+} -Bindung an SlyD* durch Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	85
3.1.4.1.	NMR-Titration von ^{15}N - <i>E.c.</i> SlyD(1-155) mit Ni^{2+}	87
3.1.4.2.	Eignung des Systems für paramagnetische NMR-Untersuchungen	89
3.1.5.	Zusammenfassende Diskussion: NMR-spektroskopische Betrachtung der thermodynamischen Stabilität von SlyD*	91
3.2.	Chaperonaktivität von SlyD*	93
3.2.1.	Lokalisierung der primären Bindestellen in SlyD* durch Analyse von NMR-Titrations.....	93
3.2.1.1.	Entfaltete Proteine als Chaperonsubstrate.....	93
3.2.1.2.	Peptide als Chaperonsubstrate.....	97
3.2.2.	Beobachtung der Chaperonfunktion von SlyD* während der Insulinaggregation 99	
3.2.2.1.	Streulichtmessungen zur Detektion der Insulinaggregation.....	99
3.2.2.2.	Eindimensionale Echtzeitkinetik zur Beobachtung des Aggregationsverhaltens von Insulin in Gegenwart von SlyD*	100
3.2.2.3.	Zweidimensionale Echtzeitkinetik zur Beobachtung des Aggregationsverhaltens von Insulin in Gegenwart von SlyD*	101

3.2.3.	Zusammenfassende Diskussion: Lokalisierung der Bindestellen in SlyD* und Charakterisierung der Chaperonaktivität.....	103
3.3.	Peptidyl-Prolyl-Isomerase- Funktion von SlyD*	105
3.3.1.	Bedeutung der Y68W-Mutation für den Katalysemechanismus der Prolylisomerase SlyD*	105
3.3.2.	Echtzeit-NMR-Untersuchung zur Katalyse der Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N).....	107
3.3.2.1.	3D NMR-Spektroskopie zur Zuordnung des kinetischen Faltungsintermediates von RNase T1 (S54G/P55N)	108
3.3.2.2.	Die NMR-spektroskopische Entdeckung einer zweiten Konformation in nativer RNase T1 (S54G/P55N).....	111
3.3.2.3.	Beobachtung der Rückfaltungskatalyse durch seriell aufgenommene 2D ¹ H/ ¹⁵ N-TROSY-HSQC-Spektren	113
3.3.3.	Zusammenfassende Diskussion: Echtzeit-NMR-Betrachtung der von SlyD* katalysierten Rückfaltung des transienten Faltungsintermediates von RNase T1 (S54G/P55N)	119
4.	Zusammenfassung	121
5.	Summary	123
6.	Abkürzungsverzeichnis	125
7.	Literaturverzeichnis	129
8.	Anhang	143
8.1.	Abbildungen	143
8.2.	Tabellen	159
8.3.	Pulsprogramme.....	175
8.4.	Felix-Macros	191
9.	Eigene Publikationen	193
10.	Lebenslauf	194
11.	Danksagung	195

1. Einleitung

Als vor vier Milliarden von Jahren sich mit Hilfe der Energie des Sonnenlichtes aus einfachen Elementen und organischen Verbindungen die ersten Biomoleküle bildeten, war noch nicht an die Vielfalt und Komplexität eben dieser Biomoleküle zu denken, welche in den folgenden Millionen von Jahren das Leben auf der Erde entstehen ließen, bestimmten und weiterhin bestimmen werden. Eine der wichtigsten Klassen dieser Biomoleküle sind die Proteine, benannt nach „protos“ aus dem Griechischen für „erstes“ oder „an erster Stelle“. Sie entwickelten im Verlauf der Evolution spezifische biochemische und zelluläre Funktionen, was ein dynamisches Wechselspiel untereinander zur Folge hatte.

Aufgebaut sind Proteine aus 20 natürlich vorkommenden Grundbausteinen, den Aminosäuren, welche linear über Peptidbindungen in den verschiedensten Kombinationen miteinander verknüpft sind (Primärstruktur). Dabei können sich bestimmte Sekundärstrukturelemente wie α -Helices, β -Faltblätter und β -Schleifen ausbilden, deren dreidimensionale Anordnung wiederum als Tertiärstruktur bezeichnet wird. Wenn mehrere strukturierte Proteinketten sich zusammenlagern, wird von Quartärstruktur gesprochen (Abb. 1-1). Das ermöglicht höchst unterschiedliche Strukturen, Eigenschaften und Funktionen. Anfinsen zeigte bereits 1973, dass die dreidimensionale Struktur eines Proteins ausschließlich in der Abfolge seiner Aminosäuresequenz festgelegt ist (Anfinsen, 1973). Sowohl die dreidimensionale Struktur als auch die Flexibilität der Aminosäurekette sind entscheidende Kriterien für die Funktion eines Proteins. Auf seinem Weg von der primären Aminosäuresequenz bis hin zur korrekten, nativ gefalteten und somit funktionellen Struktur kann es mehrere Faltungswege einschlagen. Der denaturierte Zustand besteht aus einem umfangreichen Ensemble von Konformationen der Aminosäurekette. Der Weg zum nativen Zustand ist auf den sogenannten Energiehyperflächen – *folding energy landscapes* – vorgegeben, wobei sich jeder Konformation des Ensembles mehrere mögliche Wege zum Erreichen des nativen Zustandes entlang der Energiehyperfläche bieten (Wolynes *et al.*, 1995; Dill *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1998).

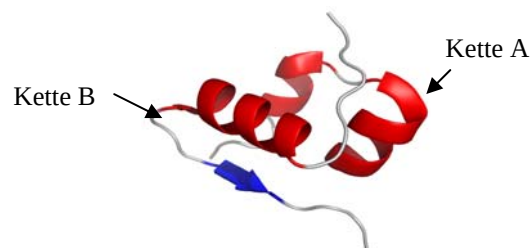


Abb. 1-1 Quartärstruktur von Insulin (2ins.pdb). Die Farbkodierung wurde entsprechend der Sekundärstrukturelemente α -Helix (rot) und β -Faltblatt (blau) vorgenommen. Unstrukturierte Bereiche sind in grau gehalten.

Kleine Eindomänenproteine falten in der Regel sehr schnell vom denaturierten in den nativen Zustand, ohne Zwischenzustände zu durchlaufen und lassen sich mit dem einfachsten Modell eines Zweizustandsfalters beschreiben (Jackson, 1998; Fersht, 2000). Größere Proteine mit mehr als 100 Aminosäuren durchlaufen dagegen eine raue trichterförmige Energielandschaft (Abb. 1-2) (Jahn *et al.*, 2005). Auf Grund ihrer Größe und der höheren Anzahl möglicher Kontakte tendieren sie dazu, schnell kompakte Strukturen einzunehmen und sich nur langsam zum nativen Zustand umzuordnen. Die treibende Kraft zur Erreichung der nativen Konformation ist die höhere Stabilisierung der nativen Kontakte gegenüber den nicht-nativen Wechselwirkungen. Je mehr native Kontakte vorhanden sind, umso mehr verringert sich die freie Energie der Polypeptidkette und am Ende des Faltungstrichters findet sich mit der energieärmsten Struktur der native Zustand wieder. Die raue Oberfläche der trichterförmigen Faltungslandschaft führt jedoch zu metastabilen, nicht-nativen Wechselwirkungen während der Faltung, so dass sich Intermediate populieren können.

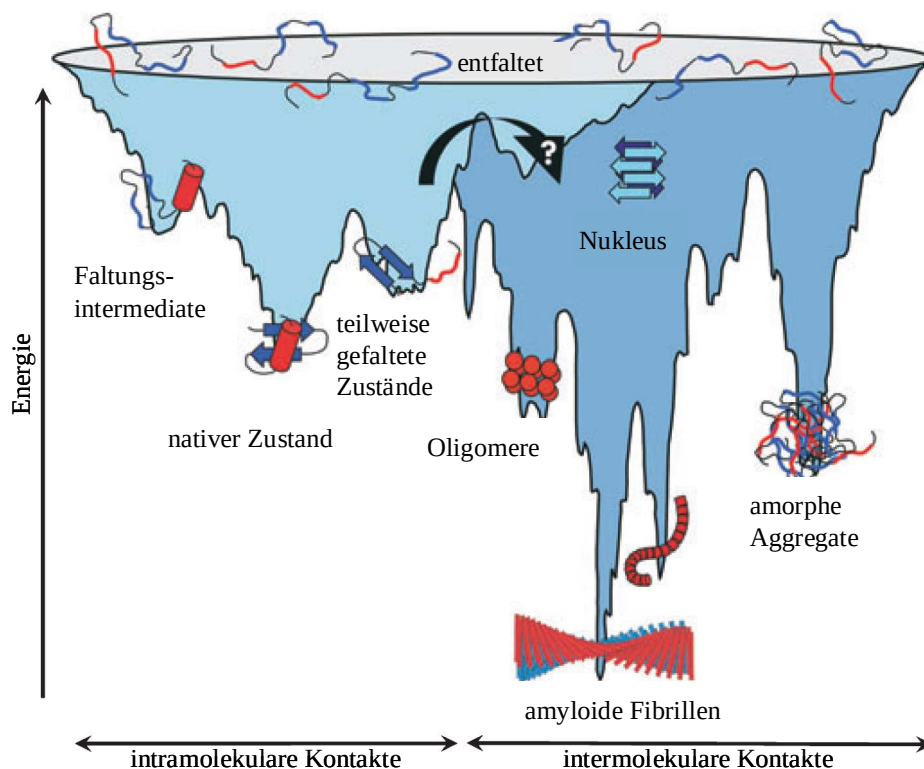


Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Energiehyperfläche zur Proteinfaltung und Aggregation. Die Oberfläche (grau) zeigt die Vielzahl an möglichen Proteinkonformationen (Ensemble an Konformationen des denaturierten Zustandes), die in Richtung des nativen Zustandes (hellblau) oder in Richtung der amyloiden Fibrillen (dunkelblau) wandern und dabei teilweise gefaltete intermediäre Zustände durchlaufen, von denen jedoch kaum detaillierte Strukturen oder Modelle existieren. (Die Abbildung wurde aus Jahn *et al.*, 2005 entnommen.)

Intermediate stellen Strukturen dar, die sich in einem lokalen Energieminimum befinden. Sie markieren den Weg zum nativen Zustand, dem globalen Energieminimum, und beschleunigen unter bestimmten Umständen die Faltungsreaktion (Wagner *et al.*, 1999), indem sie die Anzahl der möglichen Konformationen, die der sich faltenden Polypeptidkette zur Verfügung stehen, einschränken (Udgaonkar *et al.*, 1990; Kiefhaber *et al.*, 1992c). Levinthal hatte 1968 postuliert, dass eine Polypeptidkette eine astronomisch lange Zeit brauchen würde, um seine native Form zu erreichen, weil der Konformationsraum, welcher der Polypeptidkette zugänglich ist, auch astronomisch groß erscheint (Levinthal, 1968). Trotzdem verläuft die Faltung von Proteinen in einer biologisch relevanten Zeitskala, da sie Zwischenstufen durchlaufen, nämlich die oben aufgeführten partiell gefalteten Intermediate (Schmid, 1983; Kuwajima *et al.*, 1985), aber auch weil der energetisch zugängliche Konformationsraum sehr viel kleiner ist, als Levinthal theoretisch angenommen hatte (Karplus, 1997). Einige theoretisch mögliche Konformationen können auf Grund von sterischen Hinderungen ausgeschlossen werden. Ebenso treten im denaturierten Zustand erste Wechselwirkungen innerhalb der Aminosäurekette auf, welche den verfügbaren Konformationsraum am Anfang der Faltungsreaktion weiter einschränken.

Durch konformationelle Fluktuationen können partiell gefaltete, aber auch falsch gefaltete Zustände über exponierte hydrophobe Seitenketten, die im nativen Zustand im Proteininneren verborgen bleiben, eine Tendenz zum Aggregieren entwickeln, was bis zur Ausbildung von amyloiden Strukturen führen kann (Abb. 1-2, rechte Seite des Schaubildes). Aggregate stellen einen zweiten hoch geordneten Zustand neben dem nativen Zustand dar und nehmen noch niedrigere Energieminima ein. Der Übergang vom nativ gefalteten zum fehlgefalteten aggregierten Zustand wird durch eine evolutionär bedingte hohe Energiebarriere gehindert. Zurzeit ist noch nicht bekannt, welche Spezies oder welcher Mechanismus dazu führt, dass ein kinetisch stabiles Intermediat in ein thermodynamisches Energieminimum in Form von Aggregaten oder amyloiden Fibrillen überführt wird.

In der eng gepackten, überfüllten Umgebung in Zellen ist diese Affinität zu hydrophoben Bereichen stärker ausgeprägt, zumal auch die Konzentration an aggregationsanfälligen Zuständen höher ist. Da Krankheiten durch aggregierte und falsch gefaltete Proteine ausgelöst werden können (z.B. die Alzheimer-Erkrankung, Chorea Huntington, die Parkinson-Erkrankung) (Auluck *et al.*, 2002), ist eine Unterdrückung der ungünstigen Wechselwirkungen unbedingt notwendig. Im Verlauf der Evolution haben sich deshalb spezialisierte Proteine entwickelt, welche die produktive Faltung unterstützen und durch Bindung an aggregationsanfällige Zustände deren Aggregation verhindern. Sie werden im Allgemeinen als molekulare Chaperone bezeichnet. Dieser Name wurde als erstes 1978 von Laskey geprägt, als er bei seinen Arbeiten mit Nucleoplasmin feststellte, dass es die

Aggregation der Histon-Proteine bei der Zusammenlagerung mit DNA zu den Nukleosomen verhinderte (Laskey *et al.*, 1978). In den folgenden Jahren klassifizierte Ellis die Chaperone als Faltungshelferproteine (Ellis, 1987; Ellis *et al.*, 1991). Chaperone binden bevorzugt an exponierte hydrophobe Regionen und somit vor allem an aggregationsanfällige Proteine. Sie interagieren direkt posttranslational mit der wachsenden Polypeptidkette und verhindern Missfaltungen. Des Weiteren unterstützen sie den Abschluss des Faltungsprozesses, indem sie die vorübergehend gebundenen partiell gefalteten Intermediate vom sie umgebenden Zellmilieu abschirmen, stabilisieren und fehlerhafte Assoziationen verhindern (Hendrick *et al.*, 1995; Buchner, 1999; Hartl *et al.*, 2009).

Neben den hauptsächlich passiv arbeitenden Chaperonen gibt es noch eine Vielzahl weiterer Enzyme, die produktiv die Proteinfaltung unterstützen. Faltungskatalysatoren wie Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIase) oder Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIase) beschleunigen geschwindigkeitsbestimmende Schritte im Faltungsprozess und verkürzen aktiv die Lebensdauer der aggregationsanfälligen Intermediate (siehe Kapitel 1.4).

In den letzten Jahren haben sich durch Verbesserung experimenteller Techniken immer mehr Möglichkeiten offenbart, die komplexe Natur der Proteinfaltung zu verstehen. Das Zusammenspiel verschiedener experimenteller Methoden wie Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie (Kelly *et al.*, 2006; Royer, 2006), FRET-basierte Einzelmolekülspektroskopie (Schuler *et al.*, 2008), Echtzeit-NMR-Spektroskopie (Balbach *et al.*, 1999; Dyson *et al.*, 2005), NMR-Relaxationsmethoden (Dyson *et al.*, 2005; Korzhnev *et al.*, 2008) mit den computergesteuerten Simulationen von Moleküldynamiken zur Untersuchung der Energielandschaften erlaubt schon ein recht genaues Bild von der Faltung von Proteinen (Bartlett *et al.*, 2009). Trotz der Vielzahl an Modellen zur Proteinfaltung als auch an Methoden, die Proteinfaltung zu untersuchen, bleibt ein globales und übergreifendes Verständnis zur Faltung vieler Proteine noch verborgen. Die Dringlichkeit, Proteinfaltung bis ins Detail verstehen zu können, ist offensichtlich, da immer mehr Krankheiten bekannt werden, die auf fehlgefaltete oder aggregierte Proteinstrukturen zurückgeführt werden können (Dobson, 1999). Unter den genannten experimentellen Methoden bietet die Echtzeit-NMR-Spektroskopie die Möglichkeit, auf molekularer Ebene und mit hoher zeitlicher Auflösung einem umfassenderen Verständnis der Proteinfaltung näher zu kommen.

1.1. Anwendung der NMR-Spektroskopie für Proteinfaltungsreaktionen

Neben der reinen Strukturaufklärung von Proteinen ist die NMR-Spektroskopie eine äußerst effiziente Methode, um auch den denaturierten Zustand eines Proteins und intermediäre Zustände von langsam faltenden Proteinen auf Ebene einzelner Aminosäurereste zu

untersuchen (Dyson *et al.*, 2005; Bartlett *et al.*, 2009). Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können gleichzeitig strukturelle und zeitaufgelöste Informationen über einzelne Aminosäurereste im sich faltenden oder entfaltenden Protein erhalten werden. Ein deutlicher Vorteil der NMR-Spektroskopie liegt in der breiten Zeitskala, welche mehr als fünfzehn Größenordnungen umfasst von Proteindynamiken im pico-Sekundenbereich, über Austauschreaktionen im mikro-Sekundenbereich bis hin zu Echtzeitkinetiken im Bereich von Sekunden bis Tagen (Abb. 1-3). Großes Interesse gilt der Beobachtung von Faltungsintermediaten, die nur für eine kurze Zeit populiert werden. So konnten bereits Faltungsintermediate mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie charakterisiert werden, die sonstigen spektroskopischen Methoden verborgen blieben (Killick *et al.*, 1999; Zeeb *et al.*, 2002).

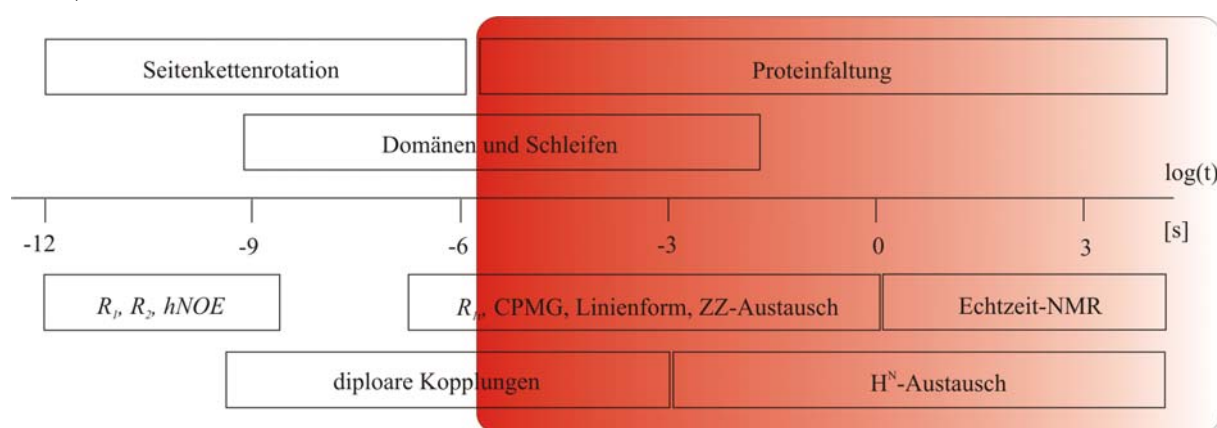


Abb. 1-3 Logarithmische NMR-Zeitskala (Zeeb *et al.*, 2004). Oberhalb der Zeitachse sind die verschiedenen Prozesse der Proteindynamik dargestellt. Mögliche NMR-Messmethoden in den dazugehörigen Zeitbereichen sind unterhalb der Zeitachse aufgeführt. R_1 , R_2 und $hNOE$ stehen für R_1 - (Spin-Gitter- oder auch longitudinale) Relaxation, R_2 - (transversale) Relaxation und den heteronuklearen NOE-Effekt. $R_{1\rho}$ ist die longitudinale Relaxationsrate im rotierenden Koordinatensystem, CPMG die Dispersion der transversalen Relaxationszeit unter Nutzung der Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Spincho-Sequenzen. Mit Linienform ist die eindimensionale Linienformanalyse im 1D Spektrum gemeint und ZZ-Austausch bezeichnet die zweidimensionale Austauschspektroskopie. H^N -Austausch steht für den Amidprotonenaustausch. Der rote Rahmen symbolisiert den Zeitbereich, der durch Proteinfaltungsreaktionen und den dafür einsetzbaren Untersuchungsmethoden abgedeckt wird. (Die Abbildung wurde nach Zeeb *et al.*, 2004 erstellt).

1.1.1. Chronologische Entwicklung von NMR-spektroskopischen Methoden zur Untersuchung von Proteinfaltungsreaktionen

Die Untersuchung von Proteinfaltungsreaktionen, welche typischerweise im Millisekunden- und Minutenbereich ablaufen, ist auf Grund der Zeitlimitierung für die NMR-Spektroskopie, einer intrinsisch langsamen Messmethode, immer noch eine große Herausforderung. Die ersten etablierten NMR-Experimente im Bereich der Proteinfaltung waren H/D-Austauschexperimente (Wagner *et al.*, 1982). Über die Verteilung der eingetauschten

Deuteronen an weniger stabilen Stellen der Proteinkette konnten Aussagen über Bereiche in Proteinen getroffen werden, die für den H/D-Austausch eine lokale oder globale Entfaltung erforderten (Bai *et al.*, 1995a; Englander *et al.*, 1996). In Verbindung mit kinetischen Experimenten und quenched-flow-Techniken ist es sogar möglich, intermediäre Strukturen aufzulösen (siehe Literatur in (Schulenburg *et al.*, 2009)).

Neben den kinetischen Experimenten zur Untersuchung der Proteinfaltung sind auch NMR-Messungen im Gleichgewicht durchgeführt worden. So brachten Gleichgewichts-entfaltungsübergänge in Gegenwart von Denaturierungsmitteln (wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid) sowie Temperatur- oder pH-Sprünge aminosäurespezifisch neue Informationen über die Thermodynamik und die Kooperativität der Faltung (Dobson *et al.*, 1984; Roder, 1989). Wegen der hohen Empfindlichkeit der chemischen Verschiebung einzelner Resonanzen gegenüber geringsten lokalen Veränderungen im System war es möglich, Gleichgewichtsfaltungsintermediate zu finden, die nicht mit anderen Methoden detektiert werden konnten (Ropson *et al.*, 1992; Russell *et al.*, 2000; Zeeb *et al.*, 2002). Bei schnellen Umwandlungen zwischen zwei Zuständen im Bereich von $0,1 \text{ s}^{-1}$ bis 10 s^{-1} ist die Bestimmung von Faltungsraten auch aus dem Gleichgewichtszustand möglich, wenn die zweidimensionale ZZ-Austauschspektroskopie angewendet wird (Palmer *et al.*, 2001). Bei dieser Methode werden die Kreuzsignale des nativen und des entfalteten Zustandes miteinander korreliert und über den Vergleich der Austauschkreuzsignale mit den eigenen Kreuzsignalen die intrinsischen Faltungsraten bestimmt (Montelione *et al.*, 1989; Wider *et al.*, 1991; Farrow *et al.*, 1994; Burton *et al.*, 1996).

Erste direkt detektierte kinetische Prozesse wurden durch kurze aufeinander folgende eindimensionale Protonenspektren verfolgt. Mit der Verwendung einer stopped-flow Apparatur im Inneren des NMR-Probenkopfes waren bei einer Totzeit von 50 ms Faltungsraten bis zu $0,2 \text{ s}^{-1}$ detektierbar. Diese Methode wurde erfolgreich für die Analyse des Faltungsverhaltens verschiedener Proteine angewendet u.a. für α -Lactalbumin (Balbach *et al.*, 1995; Wirmer *et al.*, 2001), RNase T1 (Balbach *et al.*, 1999), Lysozym (Hore *et al.*, 1997; Mok *et al.*, 2003) und Barstar (Bhuyan *et al.*, 1999; Killick *et al.*, 1999). Der Nachteil der Protonenspektren liegt trotz hoher spektraler Auflösung in einer schwierigen Zuordnung der Resonanzen auf Grund der starken Signalüberlagerung vor allem bei Proteinen. Deshalb wurde eine neue Methode entwickelt, bei der ein einziges, gut aufgelöstes zweidimensionales Spektrum während der Faltungsreaktion aufgezeichnet wird, in dem sich die kinetische Information in der Linienform der Kreuzsignale niederschlägt (Balbach *et al.*, 1996; Balbach *et al.*, 1999).

Für sehr langsame Faltungsreaktionen (Stunden bis Tage) können durch in Folge aufgenommene mehrdimensionale NMR-Experimente unter Zuhilfenahme von Heterokernen

wie ^{15}N oder ^{13}C weitere spektrale Dimensionen erreicht werden während des Faltungsprozesses und ermöglichen somit detailliertere Untersuchungen des Proteinfaltungsmechanismus. Zweidimensionale $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperimente (HSQC, TROSY-HSQC), welche die skalare Kopplung zwischen den ^1H - und ^{15}N -Kernen ausnutzen, liefern hochaufgelöste Spektren, in denen jedes Amidproton eines Proteins ein Signal zeigt, was die Analyse einzelner Regionen in Proteinen bei bekannter Zuordnung der einzelnen Resonanzen stark vereinfacht. Dennoch sind die meisten Faltungsreaktionen immer noch zu schnell, um mit den bisher bekannten Methoden für Echtzeit-NMR-Spektroskopie untersucht werden zu können.

1.1.2. Neue Methoden zur Beschleunigung der NMR-Datenaufnahme

Ein großer Nachteil der mehrdimensionalen NMR-Experimente ist die lange Wartezeit zwischen zwei einzelnen *scans*, die aber auf Grund der langsamen Wiederherstellung der Gleichgewichtsmagnetisierung nötig ist, bevor der nächste *scan* gestartet werden kann. Die Aufnahme mehrerer aufeinander folgender *scans* steigert die Signalintensität und garantiert eine hohe spektrale Auflösung. Der extreme Zeitaufwand kommt durch die zusätzlichen Dimensionen zustande, welche inkrementiert werden müssen für die hohe spektrale Auflösung. Die sich immer weiter entwickelnde Magnet- und Spektrometertechnologie verspricht zwar einen Gewinn an Sensitivität, dies reicht jedoch nicht aus, um gleichzeitig die hohe kinetische Auflösung in Proteinfaltungsprozessen zu garantieren. Die Weiterentwicklungen der NMR-Experimente in den letzten Jahren basieren auf einer Reduktion der Aufnahmezeiten, ohne dass dabei die spektrale Qualität verloren geht. Ein erster Ansatzpunkt ist die Reduktion der aufzunehmenden Datenpunkte in den zu inkrementierenden Dimensionen. In Methoden wie Projektions-NMR (*projection reconstruction*) (Szyperski *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2003; Brutscher, 2004; Kupce *et al.*, 2004), HADAMARD-NMR (Kupce *et al.*, 2003; Brutscher, 2004), *single-scan* NMR (Frydman *et al.*, 2002) und nichtlineare Datenaufnahmetechniken (Mandelshtam, 2000; Hoch *et al.*, 2001; Rovnyak *et al.*, 2004) konnte dies verwirklicht werden. Ein Nachteil von z.B. HADAMARD-NMR ist jedoch, dass nur Systeme betrachtet werden können, in denen Veränderungen sich ausschließlich auf die Signalintensität auswirken. Kinetische Prozesse, bei denen sich auch die chemische Verschiebung der betroffenen Kreuzsignale verändert, sind nicht zugänglich.

Die zweite Möglichkeit, die Aufnahmezeiten von mehrdimensionalen NMR-Spektren zu verringern, ist die Verkürzung der Wartezeit zwischen zwei aufeinander folgenden *scans*. Dazu müssen Möglichkeiten gefunden werden, welche die Wiederherstellung der

Gleichgewichtsmagnetisierung beschleunigen. Schanda und Mitarbeiter entwickelten unter diesem Gesichtspunkt das SOFAST-*(band-selective optimized flip-angle short-transient)*-HMQC Experiment (Schanda *et al.*, 2005a; Schanda *et al.*, 2005b). Durch die Verwendung der sogenannten Ernst-Winkel-Anregung wird nur ein Teil der Gleichgewichtsmagnetisierung angeregt, wodurch die Wartezeit zwischen den *scans* reduziert werden kann (Ernst *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 1997). Zusätzlich kann über bandselektive Pulse die effektive Spin-Gitter-Relaxationszeit (longitudinale Relaxation) der beobachteten Protonen verkürzt und damit auch die Wartezeit zwischen den *scans* reduziert werden (Pervushin *et al.*, 2002). Mit dieser selektiven Protonenmanipulation wird erreicht, dass alle Protonen außerhalb des spektralen Fensters, vor allem aber auch die Wasserprotonen, nicht angeregt werden und somit den zu beobachtenden Protonen über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Protonenaustauschen zur Verringerung der Spin-Gitter-Relaxationszeit zur Verfügung stehen.

Die SOFAST-Methode, angewendet als Serie von zweidimensionalen Spektren nach Start eines kinetischen Prozesses, schließt somit eine erste Lücke in der NMR-Zeitskala zur hochaufgelösten Echtzeit-Beobachtung von Faltungsprozessen für den Sekunden- bis Minutenbereich (Abb. 1-3). Werden die beiden erwähnten Ansatzpunkte zur Reduktion der Aufnahmezeit von NMR-Spektren kombiniert, eröffnen sich wieder neue Möglichkeiten (*ultrafast* 2D NMR) (Schanda *et al.*, 2005a; Gal *et al.*, 2009). Sogenannte Hybrid-Techniken werden bereits in der Literatur beschrieben, jedoch ist ihre Anwendung bis jetzt auf Modellsysteme beschränkt.

Der Effekt der erhöhten Spin-Gitter-Relaxation durch Verwendung von bandselektiven Pulsen kann auch auf dreidimensionale NMR-Experimente ausgeweitet werden. Die BEST-Sequenzen (*band-selective excitation short-transient*) sind durch die ausschließliche Verwendung von bandselektiven Pulsen ebenfalls optimiert auf eine minimale Anregung der aliphatischen und der Wasserprotonen (Schanda *et al.*, 2006; Lescop *et al.*, 2007). Die Kohärenztransferwege in den dreidimensionalen H-N-C-Korrelationsexperimenten (BEST-HNCA, BEST-HNCACB, BEST-HNCO und weitere) sind identisch zu den konventionellen dreidimensionalen NMR-Experimenten. Lediglich die Aufnahmezeiten sind drastisch reduziert (in etwa zehnfach) bei dennoch gleich bleibender Sensitivität.

Die multidimensionalen heteronuklearen NMR-Experimente liefern die erforderliche spektrale Auflösung, um individuelle Regionen in Proteinen und anderen Makromolekülen charakterisieren zu können. Neben der spektralen Auflösung wird jetzt auch eine zunehmende zeitliche Auflösung von kinetischen Prozessen erreicht. Daher sollte es möglich sein, mit Hilfe von NMR-Spektroskopie vielfältige Proteinfaltungsprozesse in Lösung zu untersuchen und elementare Schritte in der Proteinfaltung aufzudecken.

1.1.3. Indirekte NMR-spektroskopische Charakterisierung von kurzlebigen Proteinfaltungsintermediaten

Neben den Fortschritten zur Untersuchung langsamer Proteinfaltungsreaktionen (Minuten bis Stunden) mittels NMR-Spektroskopie und der ebenso gegebenen Möglichkeiten, langlebige Faltungsintermediate strukturell charakterisieren zu können, wurden auch NMR-Methoden zur Untersuchung schneller Proteinfaltungsreaktionen (Millisekunden) entwickelt, bei denen transiente Faltungsintermediate nur kurzzeitig und gering populierte (min. 0,5 %) auftreten (Korzhnev *et al.*, 2004; Grey *et al.*, 2006; Korzhnev *et al.*, 2008). Letztere werden als angeregte Zustände bezeichnet und sind für die meisten biophysikalischen Methoden (und auch für die NMR-Spektroskopie) nicht direkt sichtbar und können nur indirekt analysiert werden. Dabei wird ausgenutzt, dass sich die transient vorhandenen angeregten Zustände im ständigen konformationellen Austausch (optimal: 100 bis 1000 Hz) mit dem nicht angeregten Grundzustand befinden, so dass zur Untersuchung der angeregten Zustände CPMG-Relaxationsdispersions-Experimente angewendet werden können (Carr *et al.*, 1954; Meiboom *et al.*, 1958; Luz *et al.*, 1963).

Darauf aufbauend wurden von Lewis Kay und seinen Mitarbeitern weiterführende Methoden entwickelt, wodurch das Proteinerückgrat der angeregten Zustände über die chemische Verschiebung und über residuale dipolare Kopplungen (RDCs) zugeordnet werden konnte (Vallurupalli *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2008; Vallurupalli *et al.*, 2008a). Somit gelang ihnen für eine transiente Liganden-gebundene Konformation der SH3-Domäne die erste Rückgrat-Strukturaufklärung eines angeregten, unsichtbaren Zustandes, die nur auf Ergebnissen aus CPMG-Experimenten basiert (Vallurupalli *et al.*, 2008b). Im Hinblick auf die komplette Strukturaufklärung eines transienten, angeregten Zustandes, wie z.B. eines kurzlebigen Faltungsintermediates bei schnellen Proteinfaltungsreaktionen, wurde kürzlich auch über die Zugänglichkeit von chemischen Verschiebungen und RDCs von Seitenketten in Proteinen sowie über deren intrinsische Bewegung berichtet (Baldwin *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2009; Vallurupalli *et al.*, 2009).

Durch die unterschiedlichsten Möglichkeiten zum Studium von Proteinfaltungsreaktionen, welche die NMR-Spektroskopie bietet, können immer mehr Erkenntnisse über die Beschaffenheit der Energiehyperflächen verschiedenster Proteine erhalten werden. Auch in Zukunft wird es aufbauend auf den bis dato entwickelten Methoden eine fortwährende und vielversprechende Weiterentwicklung der NMR-Spektroskopie geben, die sich vor allem zum Ziel setzen wird, direkt nicht detektierbare Zustände zu charakterisieren, welche hauptsächlich nur mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zugänglich sind.

1.2. Eigenschaften der Peptidyl-Prolyl-Bindung

Die Peptidbindung in Proteinen besitzt partiellen Doppelbindungscharakter und daher eine planare Geometrie, so dass aufeinander folgende C^α -Atome entweder nur in der *cis*- oder *trans*-Konformation vorliegen können. Auf Grund der sterischen Abstoßung der Aminosäureseitenketten mit dem Carbonylsauerstoff ist die bevorzugte Position bei Nicht-Prolylbindungen in *trans*. Es gibt nur eine verschwindend geringe Anzahl (0,1 % bis 1 %) von Nicht-Prolylbindungen in *cis*-Konformation im nativen Protein (Ramachandran *et al.*, 1976; Stewart *et al.*, 1990; Macarthur *et al.*, 1991). Bei Peptidyl-Prolylbindungen unterscheiden sich die beiden Konformationen energetisch nur geringfügig, da für den Prolin-Pyrrolidinring immer das C^α -Atom der Vorgängeraminoäure *cis*-ständig zu einem Pyrrolidinring-C-Atom (C^α oder C^δ) ist (Abb. 1-4). Das *cis/trans*-Gleichgewicht kann somit stark verschoben sein und statistisch gesehen bis zu 30 % auf Seiten der *cis*-Konformation in unstrukturierten Proteinen schwenken (Cheng *et al.*, 1977; Grathwohl *et al.*, 1981; Reimer *et al.*, 1998). In gefalteten Proteinen beträgt der *cis*-Anteil bis zu 7 % (Stewart *et al.*, 1990; Macarthur *et al.*, 1991).

Die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ist eine sehr langsame Reaktion auf Grund der relativ hohen Energiebarriere von 85 kJ/mol und stellt dadurch in den Proteinfaltungsreaktionen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar, bei welchen die *cis*-Konformation ausgebildet wird. Langlebige Faltungsintermediate mit einer inkorrekten Peptidyl-Prolylbindung können daher mit den zeitaufwendigen NMR-Messmethoden strukturell detailliert untersucht werden.

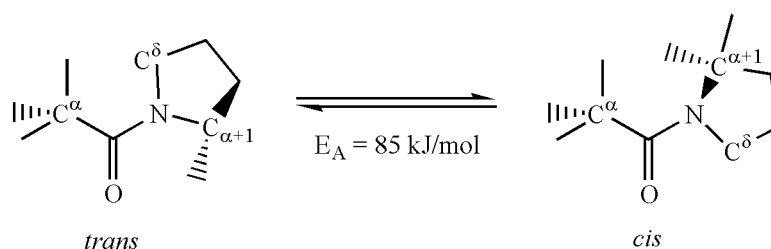


Abb. 1-4 *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung.

1.3. Das Modellsubstrat Ribonuklease T1 (S54G/P55N)

Ribonuklease T1 (im Folgenden RNase T1 genannt) ist ein kleines, gut charakterisiertes Ein-Domänenprotein, dessen Faltungsmechanismus während der letzten Jahrzehnte vor allem

durch Arbeiten von Thomas Kiefhaber vollständig aufgeklärt wurde (Kiefhaber *et al.*, 1990a; Kiefhaber *et al.*, 1990b; Kiefhaber *et al.*, 1990c; Kiefhaber *et al.*, 1992b).

RNase T1 besteht aus 104 Aminosäuren und wird vom Schimmelpilz *Aspergillus oryzae* produziert. Seine Aktivität beruht auf der endonukleolytischen Spaltung von einsträngiger RNA zu 3'-Mono- und Oligonukleotiden, die auf Guaninphosphat enden (Takahashi *et al.*, 1970). Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur erfolgte mittels Röntgenkristall- und NMR-Spektroskopie (Heinemann *et al.*, 1982; Hoffmann *et al.*, 1988; Martinez-Oyanedel *et al.*, 1991) (Abb. 1-5). RNase T1 (S54G/P55N) ist im nativen Zustand durch zwei Disulfidbrücken bei Cys2-Cys10 sowie Cys6-Cys103 enorm stabilisiert (Pace *et al.*, 1988b), wodurch die Rückfaltung des Proteins verlangsamt wird (Mücke *et al.*, 1994b).

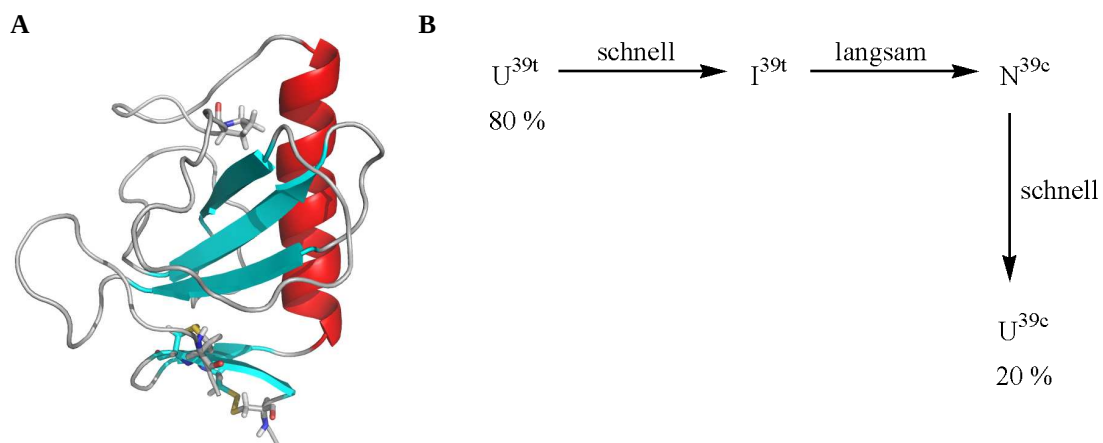


Abb. 1-5 Ribonuklease T1. **A** Tertiärstruktur von RNase T1 (9rnt.pdb, Röntgenkristallstruktur nach Martinez-Oyanedel *et al.*, 1991). β -Faltblattstränge sind türkis, α -Helices sind rot dargestellt. Die Prolin39-Seitenkette sowie die zwei Disulfidbrücken (C2-C10, C6-C103) sind in Stäbchenform eingezeichnet. Die Abbildung wurde mit PyMol (DeLanoScientific LLC, 2006) erstellt. **B** Kinetisches Modell zur Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N). Die einzelnen Species wurden mit U (denaturierter Zustand), I (kinetisches Faltungsintermediat) und N (nativer Zustand) bezeichnet, wobei die hochgestellten Indices die *cis*- oder *trans*-Konformation der Peptidyl-Prolyl-Bindung von Pro39 angeben.

RNase T1 besitzt vier Proline an den Positionen 39, 55, 60 und 73, von denen zwei (P39, P55) in der nativen Form in der *cis*-Konformation vorliegen (Heinemann *et al.*, 1982). Die langsamen *trans* $\rightarrow$ *cis*-Isomerisierungsreaktionen an P39 und P55 bestimmen im Wesentlichen den komplexen Faltungsmechanismus von RNase T1 (Kiefhaber *et al.*, 1990b; Kiefhaber *et al.*, 1992a; Mayr *et al.*, 1993). Über Sequenzhomologievergleiche verwandter RNasen wurde für die strukturell sehr ähnliche RNase C2 aus *Aspergillus clavatus* anstelle der *cis*-Ser54-Pro55-Bindung eine *trans*-Gly54-Asn55-Bindung gefunden (Heinemann *et al.*, 1989). Diese Position bietet sich nun an, den komplexen Faltungsmechanismus zu

vereinfachen und die *cis*-Ser54-Pro55-Bindung in RNase T1 zu ersetzen. Der sich daraus ergebene Faltungsmechanismus für die S54G/P55N-Variante ist in Abb. 1-5 zu sehen.

Das sich schnell bildende, aber langlebige Intermediat mit der inkorrekten *trans*-Bindung an P39 (I^{39t}) ist je nach experimentellen Bedingungen für längere Zeit populierbar und stellt einen exzellenten Kandidaten dar, um mit NMR-Methoden Faltungsintermediate eingehend zu untersuchen (Balbach *et al.*, 1999). Erste Versuche zur Zuordnung des Faltungsintermediates I^{39t} sind mit Hilfe eines während der Rückfaltung aufgenommenen 3D ^{15}N -editierten NOESY-HSQC bereits unternommen worden (Hagn, 2003; Hartung, 2004).

Werden die Thiolgruppen in RNase T1 (S54G/P55N) reduziert und anschließend carboxymethyliert, so tritt eine derartige Destabilisierung des Enzyms ein, dass es entfaltet vorliegt. Durch das Erhöhen der Ionenstärke auf 2 M NaCl kann zumindest eine nativ-ähnliche Struktur der sogenannten RCM-Form von RNase T1 (S54G/P55N) erreicht werden (Oobatake *et al.*, 1979; Pace *et al.*, 1988a). Die RCM-Variante der RNase T1 (S54G/P55N) faltet sich unter Hochsalzbedingungen mit dem Verlauf einer monoexponentiellen Kinetik zurück, ohne ein Intermediat zu populieren. Die Prolylisomerisierung ist dabei auch um den Faktor 2,5 schneller (Mücke *et al.*, 1994a). Diese Variante eignet sich generell zur Charakterisierung von Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, da die einphasige Rückfaltungskinetik einfach zu analysieren ist. Dazu wird auf die intrinsische Fluoreszenz von Tryptophan 59 zurückgegriffen, welches sich in der nativen Konformation lösungsmittelunzugänglich im hydrophoben Kern befindet und durch Entfaltung eine Rotverschiebung und Verringerung der Fluoreszenz bei 320 nm hervorruft.

1.4. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Proteine mit einer natürlichen *cis*-Xaa-Pro-Peptidbindung falten auf Grund der hohen Energiebarriere von 85 kJ/mol (Abb. 1-4) nur langsam vom denaturierten Zustand mit einer inkorrekten *trans*-Xaa-Pro-Peptidbindung in ihre natürliche und funktionelle Struktur, wie an Hand der RNase T1 gezeigt werden konnte (Brandts *et al.*, 1975; Kiefhaber *et al.*, 1990a). Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (im Folgenden PPIasen genannt) können spezifisch diesen ratenlimitierenden Schritt der *trans* → *cis*-Isomerisierung katalysieren und tragen somit zu einer Beschleunigung der Faltung bei.

Die Entdeckung der PPIasen ist auf Fischer und Mitarbeiter zurückzuführen (Fischer *et al.*, 1984b). Sie isolierten ein Enzym aus Schweinenierenextrakt, welches in dem gleichzeitig etablierten Testsystem auf PPIase-Aktivität eine deutliche Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen in Tetrapeptiden zeigte (Fischer *et al.*, 1984a). Auch gegenüber Proteinsubstraten konnte *in vitro* eine beachtliche Katalyse der *cis/trans*-

Isomerisierung nachgewiesen werden (Lang *et al.*, 1987; Lang *et al.*, 1988; Fischer *et al.*, 1990). Die Schweinenieren-PPIase wurde später über Sequenzierungsstudien als Cyclophilin identifiziert (Fischer *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1989).

PPIasen kommen sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vor und können in drei übergeordnete Familien eingeteilt werden, die untereinander keinerlei Sequenzhomologien aufweisen: Cyclophiline, Parvuline und FK506-bindende Proteine (FKBPs). Sie unterscheiden sich auch in ihrer Substratspezifität und in ihrer Sensitivität gegenüber Inhibitoren. Die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und FK506 inhibieren selektiv ihre jeweiligen Partner Cyclophilin und FKBP (Handschumacher *et al.*, 1984; Harding *et al.*, 1989; Siekierka *et al.*, 1989). Die immunsuppressive Wirkung dieser Substanzen beruht darauf, dass der Cyclophilin/CsA-Komplex bzw. der FKBP/FK506-Komplex an die Proteinphosphatase Calcineurin bindet und daraus eine Hemmung der T-Lymphozyten-Proliferation resultiert (Schreiber *et al.*, 1991; Clardy, 1995). Röntgenkristall- und NMR-Strukturuntersuchungen zeigten, dass die Bindung des jeweiligen Immunsuppressivums im hochkonservierten aktiven Zentrum der Isomerase erfolgt. Durch diese Bindung wird die PPIase-Aktivität der entsprechenden Enzyme reversibel inhibiert (Kallen *et al.*, 1991; Michnick *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1991; Kallen *et al.*, 1992; Mikol *et al.*, 1994; Itoh *et al.*, 1995).

Die PPIasen sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. So unterstützen sie die posttranslationale Faltung von Polypeptidketten und beschleunigen langsame Prolylisomerisierungen. PPIasen können aber auch am Transport von Proteinen mitwirken und in die Regulation des Zellzyklus eingreifen. Letzteres wird durch die selektive Katalyse von phosphorylierten Ser/Thr-Pro-Bindungen durch die Parvuline, insbesondere das humane Pin1, erreicht (Lu *et al.*, 1996; Yaffe *et al.*, 1997; Crenshaw *et al.*, 1998). Für alle drei Familien gibt es Ein-Domänen-Enzyme, die nur aus der jeweiligen PPIase-Domäne bestehen, und Mehr-Domänen-Proteine, bei denen die PPIase-Domäne N- oder C-terminal durch weitere funktionelle Domänen ergänzt wird. Erst das Zusammenspiel verschiedener funktioneller Domänen ermöglicht die Bewältigung komplexer Aufgaben. Das konnte für eine Vielzahl von Faltungshelferproteinen gezeigt werden, die alle eine FKBP-Domäne aufweisen. Der bekannteste Vertreter dieser Faltungshelferenzyme ist der Trigger-Factor. Neben einer FKBP-Domäne besitzt er noch eine Chaperondomäne und eine Domäne zur Wechselwirkung mit den Ribosomen (Stoller *et al.*, 1995; Hestekamp *et al.*, 1996; Scholz *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 2009). Auf Grund der speziellen Kombination mit einer Chaperondomäne wurde dem Trigger-Factor eine neue Unterfamilie der FKBP-artigen PPIasen zugewiesen. Ein weiterer Vertreter dieser neuen Untergruppe ist das FkpA (Ramm *et al.*, 2000, 2001).

1.5. Der Proteinfaltungshelfer SlyD

Auch SlyD kann dieser neuen Unterfamilie der FKBP-artigen PPIasen zugeordnet werden. Es kommt vorwiegend im Cytosol von Prokaryonten vor und besitzt sowohl Peptidyl-Prolyl-Isomerase- als auch Chaperonaktivität (Scholz *et al.*, 2006). Alle SlyD-Proteine aus verschiedenen prokaryontischen Organismen weisen eine zentrale FKBP-Domäne auf, die jedoch durch einen Einschub von 59-65 Aminosäuren in die Flap-Region erweitert ist (Abb. 1-6). Suzuki und Mitarbeiter konnten zeigen, dass diese zusätzlichen Aminosäuren eine strukturell unabhängige Domäne bildet und nannten sie *insert-in-flap*- oder IF-Domäne (Suzuki *et al.*, 2003).

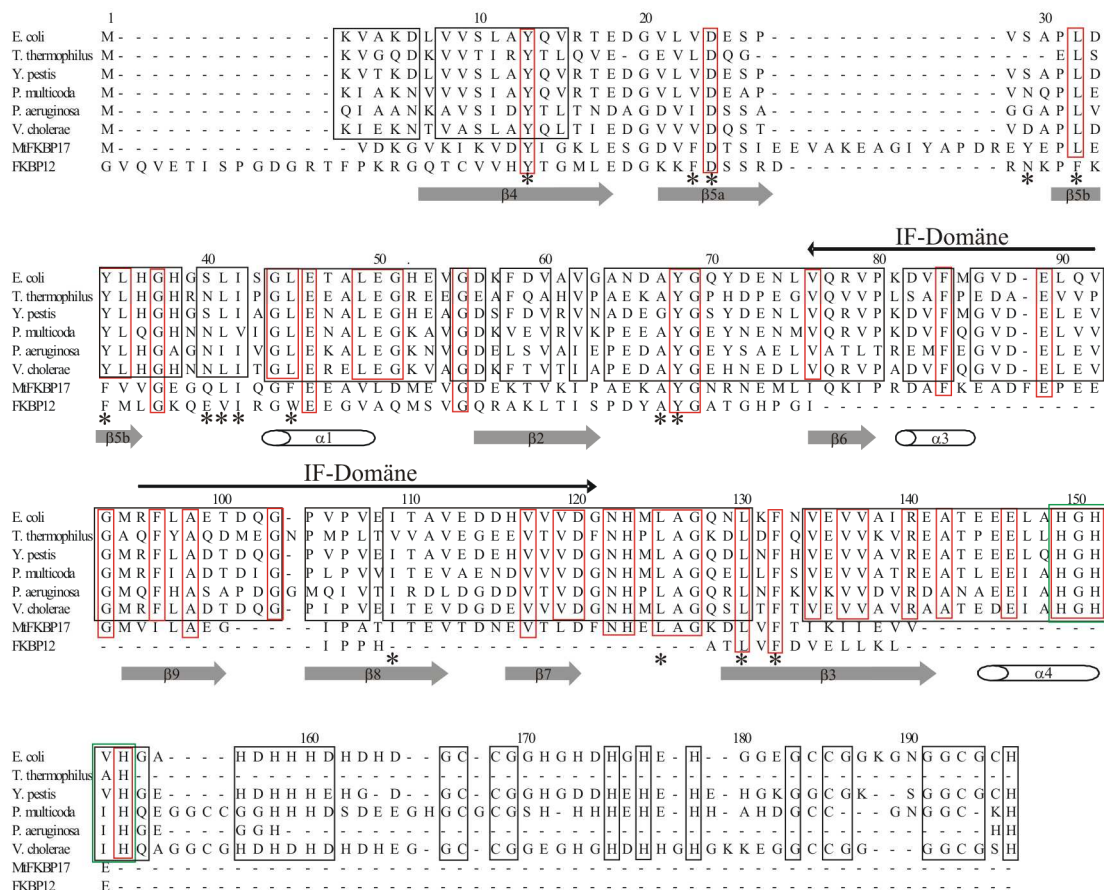


Abb. 1-6 Sequenzvergleich für verschiedene bakterielle SlyD-Proteine und den FKBP-Homologen MtFKBP17 und FKBP12 (erstellt mit ClustalW 1.83 (Thompson *et al.*, 1994; Higgins *et al.*, 1996)). Identische Aminosäurereste sind mit einem roten Rahmen gekennzeichnet, ähnliche Sequenzabschnitte werden durch einen schwarzen Rahmen symbolisiert. Der grüne Rahmen repräsentiert das vermutliche Metallbindemotiv am Ende der letzten α -Helix der FKBP-Domäne nach Löw *et al.*, 2009. Die Sekundärstrukturelemente sind angedeutet und die IF-Domäne ist eingezeichnet. Die Nummerierung erfolgt an Hand von *E. coli* SlyD. Die Aminosäurereste des aktiven Zentrums werden durch einen Stern angezeigt. (UniProt-Zugangsnummern: *E.c.*SlyD: P0A9K9, *Tt*SlyD: Q5SLE7, *Pm*SlyD: Q9CL91, *Pa*SlyD: A6VAE2, *Vb*SlyD: C2C611, *Yp*SlyD: Q7CFU4, *Mt*FKBP17: O52980, FKBP12: P62242)

SlyD aus *Escherichia coli* (*E. coli*) zeigt für seine FKBP-Domäne eine Sequenzidentität von 28,1 % verglichen mit hFKBP12, einer humanen Ein-Domänen-Prolylisomerase vom FKBP-Typ. *E.c.*SlyD besteht aus 196 Aminosäuren, wobei die FKBP- und IF-Domäne mit 150 Aminosäuren den größten strukturellen Anteil haben. Seit kurzem ist die NMR-Struktur von *E.c.*SlyD(1-165) (im Folgenden als SlyD* bezeichnet) in Lösung bekannt (Weininger *et al.*, 2009). Diese zeigt die für FKBP-typischen Strukturelemente eines viersträngiges β -Faltblattes ($\beta 2$ - $\beta 5$) und einer α -Helix ($\alpha 1$) (Abb. 1-7). Verglichen mit hFKBP12 und MtFKBP17, einer archealen, SlyD strukturell und funktionell homologen Prolylisomerase (Suzuki *et al.*, 2003), besitzt eine zusätzliche α -Helix ($\alpha 4$) am C-Terminus. Ein struktureller Vergleich des aktiven Zentrums der Isomerase von SlyD* mit hFKBP12 und MtFKBP17 hebt die Position von Tyrosin 68 hervor in der sonst absolut vergleichbaren Übereinanderlagerung (Abb. 1-7). Die Seitenkette von Y68 zeigt in die hydrophobe Bindetasche des aktiven Zentrums, weshalb vermutet wird, dass das der Grund für die herabgesetzte Bindungsaffinität des FKBP-Inhibitors FK506 und die niedrigere Prolylisomeraseaktivität ist.

Die IF-Domäne setzt sich aus vier kurzen β -Faltblattsträngen ($\beta 6$ - $\beta 9$) und einer kurzen α -Helix ($\alpha 3$) zusammen. Die Oberfläche der IF-Domäne wird vorwiegend durch hydrophobe und negativ geladene Aminosäureseitenketten bestimmt. Obwohl beide Domänen für sich strukturell aufgelöst werden konnten, ist es in Lösung nicht möglich, eine definierte Orientierung beider Domänen zueinander zu finden. Vielmehr erscheint die IF-Domäne als sehr flexibel (Weininger *et al.*, 2009). Eine andere, vor kurzem veröffentlichte NMR-Struktur von Vollängen-*E.c.*SlyD zeigt die gleichen Strukturmerkmale wie SlyD* und demonstriert ebenfalls die Flexibilität innerhalb der IF-Domäne sowie die Flexibilität der beiden Domänen zueinander (Martino *et al.*, 2009).

In dieser kürzlich veröffentlichten NMR-Struktur von Vollängen-SlyD ist der C-Terminus ebenfalls aufgelöst worden (Martino *et al.*, 2009). Dem in hohem Maße unstrukturierten Teil werden metallbindende Eigenschaften zugeschrieben. Er zeigt eine hohe Affinität zu zweifach positiv geladenen Metallionen, wobei Ni^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} am stärksten gebunden werden (Hottenrott *et al.*, 1997). Die Bindung von bis zu drei Ni^{2+} z.B. erfolgt reversibel und kann dadurch die PPIase-Aktivität regulieren, die im Ni^{2+} gebundenen Zustand nahezu ausgelöscht ist.

In weiteren Mutationsstudien mit SlyD* wurde die PPIase-Aktivität näher untersucht. Die isolierte FKBP-Domäne von *E.c.*SlyD zeigt verglichen mit hFKBP12 eine geringere PPIase-Funktion bezogen auf die Tetrapeptidsubstrate (Scholz *et al.*, 2006; Knappe *et al.*, 2007). Die IF-Domäne ist der Grund dafür, dass SlyD* dennoch ein guter Proteinfaltungshelfer ist. Wird die *E.c.*SlyD-IF-Domäne in den Loop von hFKBP12 inseriert, so zeigt sich gegenüber Proteinsubstraten eine 200fach erhöhte PPIase-Aktivität (Knappe *et al.*, 2007).

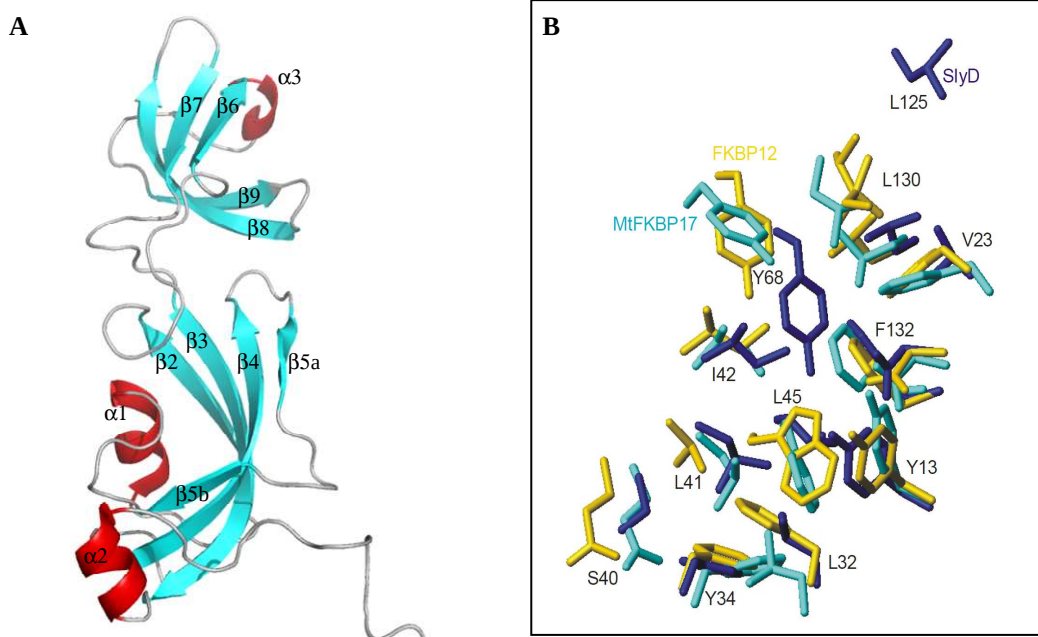


Abb. 1-7 Dreidimensionale Struktur von SlyD* (2k8i.pdb). **A** Dargestellt ist die NMR-Struktur nach Weininger *et al.*, 2009. Die β -Faltblattstränge sind in türkis, die α -Helices in rot dargestellt und gemäß der Struktur von hFKBP12 (1fkf.pdb) nummeriert. Die Abbildung wurde mit PyMol (DeLanoScientific LLC, 2006) erstellt. **B** Übereinanderlagerung der Seitenketten von SlyD* (blau), hFKBP12 (gelb) und MtFKBP17 (türkis), die direkt an der PPIase-Aktivität beteiligt sind. Die Bezifferung der Seitenketten bezieht sich auf SlyD*.

Seit der Entdeckung von SlyD als Wirtsfaktor bei der Bakterienlyse durch Phagen und als permanente, hartnäckige Verschmutzung bei der Reinigung rekombinanter Proteine mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie sind einige *in vivo* Funktionen für SlyD beschrieben wurden. Der zunächst auftretende Name WHP (*wonderous histidine-rich protein*) deutete schon früh auf seine metallbindenden Eigenschaften hin (Wülfing *et al.*, 1994). Der gleichzeitig vergebene Name SlyD für *sensitivity to lysis D* ist auf seine Funktion als Wirtsfaktor in *E. coli* zurückzuführen, der bei der Protein E-vermittelten Lyse von Bakterienzellen durch den Phagen Φ X174 eine dominante Rolle spielt (Roof *et al.*, 1994; Roof *et al.*, 1997; Bernhardt *et al.*, 2002). Es wurde vermutet, dass SlyD in seiner Funktion als Chaperon das hydrophobe Lyse-Protein E gegenüber dem cytosolischen Milieu abschirmt und stabilisiert. SlyD-defiziente *E. coli*-Stämme sind nicht anfällig gegenüber einer Lyse durch den Phagen Φ X174. Sequenzanalysen zeigten, dass die beiden gefundenen Proteine WHP und SlyD identisch sind.

Neben der Unterstützung der Protein E-vermittelten Lyse von *E. coli*-Zellen ist es sehr wahrscheinlich, dass SlyD auf Grund seiner PPIase-Aktivität, der universellen Chaperonaktivität und dem Vorhandensein von Metallbindeeigenschaften noch weitere zelluläre Funktionen einnehmen kann. Kürzlich wurde eine Beteiligung von SlyD in dem Tat (*twin arginine translocation*)-abhängigen Transportsystem nachgewiesen (Graubner *et al.*,

2007). Es bindet an die ungefalteten, hydrophoben und positiv geladenen Tat-Signalpeptidsequenzen von gefalteten Proteinen und schützt sie vor proteolytischem Abbau im Cytosol, während sie zum Tat-Translokator in der Membran transportiert wird. Neben der hohen Affinität zu SlyD gehen die Tat-Signalpeptide auch eine starke Bindung zum cytosolischen Chaperon DnaK ein. Alle Tat-Signalpeptidsequenzen zeigen einen strukturell ähnlichen Aufbau aus einem hydrophilen Bereich (n-Region), einem hydrophoben Bereich (h-Region) und dem C-terminalen Bereich der Spaltungsseite zur Abspaltung des Signalpeptides (c-Region) (Abb. 1-8).

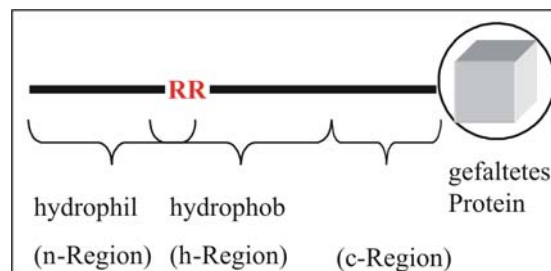


Abb. 1-8 Schematischer Aufbau eines Proteins mit Tat-Signalpeptidsequenz. RR steht für das *twin-arginine* Motiv.

Des Weiteren wird für SlyD gleichermaßen eine Beteiligung an der Biosynthese der NiFe-Hydrogenase (Zhang *et al.*, 2005; Leach *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007) und von Urease (Stingl *et al.*, 2008; Benanti *et al.*, 2009) vermutet. Beide Enzyme benötigen Nickel für die Assemblierung ihres Metallzentrums. Da SlyD in der Lage ist, drei Ni^{2+} -Ionen zu binden (Hottenrott *et al.*, 1997), wird eine Funktion als Ni^{2+} -Transporter diskutiert. Bei der Biosynthese der NiFe-Hydrogenase kommen verschiedene Hilfsproteine zum Einsatz, unter anderem die Untereinheit HypB, für die eine direkte spezifische Bindung an die Chaperondomäne von SlyD nachgewiesen werden konnte (Leach *et al.*, 2007). Durch die Bindung wird von SlyD eine Ablösung des an HypB gebundenen Ni^{2+} induziert, welches in nachfolgenden Schritten in das NiFe-Metallzentrum eingebaut werden kann. Trotz der spezifischen Interaktion von SlyD mit HypB kann auch in SlyD-defizienten *E. coli*-Stämmen Hydrogenaseaktivität nachgewiesen werden, wenn auch diese schwächer ausfällt. Eine vollständige Wiederherstellung der Hydrogenaseaktivität ist möglich, wenn den Bakterien Nickel zugefüttert wird (Zhang *et al.*, 2007).

Für die gezeigten Beteiligungen am Tat-abhängigen Transportsystem gibt es für die Bakterien Möglichkeiten, einen SlyD-Mangel zu kompensieren, indem sie auf andere im Cytosol vorhandenen Chaperone zurückgreifen. Bei der Biosynthese der *E. coli* Hydrogenase ist eine vergleichbare natürliche Kompensation nicht beobachtet worden, wodurch die Hypothese für eine spezifische *in vivo* Funktion für SlyD stark gestützt wird.

1.6. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

*E.c.*SlyD ist auf Grund seiner kombinierten Peptidyl-Prolyl-Isomerase- und Chaperonaktivität als sehr effizienter Proteinfaltungshelfer bekannt (Scholz *et al.*, 2006). Basierend auf hochaufgelösten NMR-spektroskopischen Methoden sollten im Rahmen dieser Arbeit beide Funktionen näher untersucht werden. Diese Struktur- und Stabilitätsuntersuchungen sollten durch Aktivitätsanalysen erreicht werden und die funktionelle Besonderheiten des äußerst interessanten Proteinfaltungshelfers SlyD* beleuchten. Hierzu sollten aus der Struktur abgeleitete Deletionsmutationen und gezielte Substitutionen einzelner Aminosäurereste diese Vorgehensweise unterstützen.

Die für die NMR-Untersuchungen benötigten Mengen an isopenmarkierten Proben (^{15}N und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) sollten ausreichend hergestellt und gereinigt werden. Neben der allgemeinen Stabilitätsbetrachtung sollte der spezielle Einfluss von Ni^{2+} auf Stabilität und Funktion von SlyD* untersucht werden.

Bezüglich der Chaperonfunktion von SlyD* sollte der Einfluss verschiedenster Bindungspartner auf einzelne Aminosäurereste von SlyD* aufgezeigt werden. Mit Hilfe von NMR-Titrationen sollten die primären Bindestellen in SlyD* lokalisiert und charakterisiert werden. Des Weiteren sollte ein NMR-spektroskopischer Ansatz zur zeitaufgelösten Beobachtung der Unterdrückung der Aggregation von Substratproteinen entwickelt und umgesetzt werden.

Zur Analyse der PPIase-Funktion von SlyD* ist RNase T1 (S54G/P55N) als Modellsubstrat vorgesehen, da es genau eine native *cis*-Peptidyl-Prolyl-Bindung bei Y38-P39 aufweist, schnell ein langlebiges kinetisches Faltungsintermediat bildet und weil der zugrunde liegende Faltungsmechanismus in den letzten Jahrzehnten weitgehend aufgeklärt werden konnte (Kiefhaber *et al.*, 1990a; Kiefhaber *et al.*, 1992b; Mücke *et al.*, 1994b; Mayr *et al.*, 1996). Mit Hilfe eindimensionaler Protonenspektren und zweidimensionaler NOESY-Experimente sind die Grundsteine zur weiteren hochauflösenden Echtzeit-NMR-Strukturuntersuchung des kinetischen Faltungsintermediates von RNase T1 (S54G/P55N) bereits gelegt worden (Balbach *et al.*, 1999; Steegborn *et al.*, 2000; Hagn, 2003; Hartung, 2004). Darauf aufbauend sollte die durch den Proteinfaltungshelfer SlyD* katalysierte Rückfaltungsreaktion von RNase T1 (S54G/P55N) mit hochauflösender Tripelresonanz-NMR-Spektroskopie näher untersucht werden. Von Interesse war dabei die Aufklärung der Interaktionsstelle zwischen dem Faltungsintermediat und der katalytisch aktiven Prolylisomerase. Dazu wurde die Zuordnung der Rückgratamidprotonen des Intermediates im Komplex mit SlyD* benötigt. Vorbereitend sollte das Reaktionssystem auf die gewünschten NMR-Messmethoden hinsichtlich Puffer-,

Temperatur- und Katalysebedingungen optimiert werden. Zusätzlich ist die Entwicklung und Anpassung der einzusetzenden Echtzeit-NMR-Methoden für diese Fragestellung nötig.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte somit das molekulare Verständnis der Katalyse langsamer Faltungsreaktionen durch PPIasen sowie der Domänenkommunikation zwischen der Chaperon- und PPIase-Domäne von SlyD* sein.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Säulenmaterialien

Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), ATP (Fermentas, St.Leon-Rot, D); Guanidiniumchlorid (*ultra pure*), Coomassie Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D); Harnstoff (*ultra pure*), IPTG (Gerbü, Gaiberg, D); HiLoad Superdex 75 prep grade, Ni-Sephacrose Fast Flow (GE Healthcare, München, D)

Alle weiteren verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien und Materialien wurden im Reinheitsgrad p.A. von der Firma Roth (St.Leon-Rot, D) bzw. VWR (Darmstadt, D) bezogen. Für die Puffer wurde doppeltentionisiertes Wasser verwendet und gegebenenfalls über einen 0,45 µm-Filter filtriert. Spektroskopische Puffer sind über einen 0,2 µm-Filter filtriert worden.

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

GelPrep Kit, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, D)
Millipore-Filter (Porengröße 0,45 µm)	Millipore (Bedford, USA)
NMR-Röhrchen (5 mm)	New Era (Vineland, NY, USA)
Konzentratoren VivaSpin 6 (3000 MWCO) und VivaSpin 15R (5000 und 10000 MWCO)	Sartorius (Aubagne Cedex, F)
PD10-Säulen mit Sephadex G-25	GE Healthcare (München, D)
Plasmid Mini-Prep Kit, PCR Purification Kit	Jena Bioscience (Jena, D)
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil®	Hellma (Mühlheim, D)
Spectro/Por-Dialyseschläuche	Spectrum (L.A., CA, USA)
(Ausschlussgrenzen 3,5 kDa; 1 kDa)	

2.1.3. Geräte

Äkta Purifier, Äkta FPLC	GE-Healthcare (München, D)
Autoklav VX-95	Systec (Wettenberg, D)

Brutschrank	Heraeus (Hanau, D) (jetzt: Thermo Fischer Scientific)
CD-Spektrometer J-815, Peltierelement PTC-423S/15; UV/VIS-Spektralphotometer V-650, Peltierelement ETC-505T; Fluoreszenzspektralphotometer FP-6500	Jasco (Groß-Umstadt, D)
Christ Alpha 1-4 LSC Gefriertrocknungsanlage	Christ (Osterode, D)
Dampfsterilisator Omega Media (5 l)	Prestige Medical (Blackburn, UK)
Eppendorf-Tischzentrifuge, Eppendorf-Tischkühl- zentrifuge, Thermomixer, Thermocycler	Eppendorf (Hamburg, D) (jetzt: New Brunswick Scientific)
Fermenter (5 l)	New Brunswick Scientific, (Nürtingen, D)
Hoefer Elektrophoreseeinheit SE 250	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)
Kühlzentrifuge „Sorvall RC5B Plus“, Heraeus Biofuge PrimoR	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)
NMR-Spektrometer AvanceIII 600 MHz, 800 MHz	Bruker (Karlsruhe, D)
Refraktometer	Krüß (Hamburg, D)
Reinstwasseranlage GenPure (UF)	TKA Reinstwassersysteme (Niederelbert, D)
Schüttelinkubatoren Innova 40 und 43	New Brunswick Scientific, (Nürtingen, D)
Ultraschallaufschlussgerät Sonifier W-250 D	Branson (Dietzenbach, D)
VP-ITC Titrationskalorimeter	Microcal LLC (Northampton, USA)

2.1.4. Bakterienstämme und Plasmide

Zur Produktion von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm TOP10 verwendet, während zur Expression der Proteine die beiden weiteren aufgeführten Stämme verwendet wurden.

Tab. 2-1 Eingesetzte Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1 deoR araD139</i> $\Delta(ara\text{-}leu)7697$ <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, D (Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>E.coli</i> DH5 α <i>endA1</i> F' <i>gyrA96 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>lacZ\Delta M15 recA1 supE44</i> $\lambda^- deoR thi-1$ $\Phi80d$ $\Delta(lacZYA\text{-}argF)U169$	Invitrogen, Karlsruhe, D (Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	B F' <i>dcm ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^+$) <i>gal\lambda</i> (DE3)	Stratagene, Heidelberg, D

Zur Expression der jeweiligen Proteine wurden die in Tab. 2-2 aufgelisteten Vektoren verwendet:

Tab. 2-2 Auflistung der verwendeten Plasmide

pA2T1	Plasmid für das RNase T1-Gen mit den Mutationen S54G/P55N, kloniert als <i>Bsp1407I/PaeI</i> -Fragment, enthält eine Ampicillin-Resistenz und eine ompA-Signalsequenz für den Transport ins Periplasma	
pETSUMOadapt	Das Plasmid pETSUMOadapt wurde durch Einfügen einer kurzen DNA Sequenz als <i>multiple cloning site</i> in den Vektor pETSUMO der Firma Invitrogen hergestellt. Es enthält eine Kanamycin-Resistenz.	Der pETSUMOadapt-Vektor wurde freundlicherweise von E. Bosse-Dönecke (Bosse-Doenecke <i>et al.</i> , 2008) zur Verfügung gestellt.
pET24a	Das SlyD(1-165)-Gen ist als <i>NdeI/XhoI</i> -Fragment vor einen His ₆ -Tag kloniert und enthält eine Kanamycin-Resistenz.	Das Plasmid wurde freundlicherweise von C. Scholz zur Verfügung gestellt.
pET28b	Das Plasmid enthält das Gen für Ulp1(403-621) als <i>NheI/SacI</i> -Fragment mit C-terminalem His ₆ -Tag und eine Kanamycin-Resistenz.	pET28b wurde von C. Lima (Mossesso <i>et al.</i> , 2000) zur Verfügung gestellt. U.S. Patent Nr. 6,872,551

2.1.5. Nährmedien

dYT-Medium	16 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro 1 l H ₂ O
feste Nährböden	dYT-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar
RNase-Testagar	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl (LB-Medium), 1,5 % (w/v) Agar-Agar pro 1 l H ₂ O; 50 mg/ml Toluidinblau, 2 g/l Hefe-RNA (in 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 gelöst, sterilfiltriert)
5xM9	85 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O, 15 g KH ₂ PO ₄ , 2,5 g NaCl, 5 g ¹⁵ NH ₄ Cl pro 1 l H ₂ O

TS2	100 mg ZnSO ₄ · 7 H ₂ O, 30 mg MnCl ₂ · 4 H ₂ O, 300 mg H ₃ BO ₃ , 200 mg CoCl ₂ · 6 H ₂ O, 20 mg NiCl ₂ · 6 H ₂ O, 10 mg CuCl ₂ · 2 H ₂ O, 900 mg Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O, 20 mg Na ₂ SeO ₃ pro 1 l H ₂ O, sterilfiltriert
Minimalmedium	200 ml 5xM9, 2 ml TS2-Lösung, 2 ml 1 M MgSO ₄ , 1 ml 0,1 M CaCl ₂ , 1 ml 10 mM Fe(III)-citrat (sterilfiltriert), 20 ml 30 % (w/v) Glukose (6 g/l), (gegebenfalls 10 % ¹³ C-Glukose, 2 g/l) (sterilfiltriert) pro 1 l Gesamtvolumen

Alle zur Züchtung der Mikroorganismen verwendeten Materialien und die Kulturmedien wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck im Autoklaven für 20 Minuten dampfsterilisiert. Das jeweils benötigte Antibiotikum (Kanamycin 30 µg/ml, Ampicillin 300 µg/ml, sterilfiltriert über einen 0,22 µm-Filter) wurde nach dem Abkühlen zugegeben.

2.1.6. Enzyme, Peptide und Proteine

Restriktionsendonukleasen <i>Eco31I</i> (10 U/µl), FastDigest <i>BamHI</i> (1 U/µl), <i>DpnI</i> (10 U/µl); T4 DNA Ligase (1 U/µl); T4 DNA Polynukleotidkinase (10 U/µl)	MBI Fermentas (St.Leon-Rot, D)
<i>Taq</i> - (3 U/µl) und <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/µl) <i>Pfu</i> -Turbo DNA-Polymerase (3 U/µl) PHUSION-DNA-Polymerase (3 U/µl)	Promega (Madison, WI, USA) Stratagene (Amsterdam, NL) Jena Bioscience (Jena, D)
α-Lactalbumin bovine Insulin Citrat-Synthase Tat27-Peptid Tat-Peptide (VRR, RR, KK)	Sigma (Deisenhofen, D) Sigma (Deisenhofen, D) Roche Diagnostics (Penzberg, D) Activotec (Cambridge, UK) JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, D)

2.1.7. Standards

Protein-Leiter Roti [®] -Mark Standard pUC19 DNA/ <i>MspI</i> (<i>HpaII</i>)-Marker Lambda DNA/ <i>Eco130I</i> (<i>StyI</i>)-Marker	Roth (Karlsruhe, D) MBI Fermentas (St.Leon-Rot, D) MBI Fermentas (St.Leon-Rot, D)
--	---

2.2. Elektrophoretische Methoden

2.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Reinheit von DNA-Fragmenten wurde mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurden je nach Größe der DNA entweder Agarosegele der Konzentration 0,6 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer für Fragmente größer als 500 bp oder 1,6 % (w/v) für kleinere Fragmente verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 6 V/cm Elektrodenabstand in 1 x TAE-Puffer. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden durch 10 minütiges Färben in Ethidiumbromidlösung (ca. 2 µg/ml in 1 x TAE-Puffer) unter der UV-Lampe (302 nm) sichtbar gemacht.

2.2.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die hier verwendeten relativ kleinen Proteine (3 - 19 kDa) wurde das SDS-PAGE-Verfahren nach Schägger und von Jagow (Schägger *et al.*, 1987) eingesetzt. Bei dieser optimierten Variante wird Tricin anstatt Glycin als Folgeion verwendet.

Je nach Proteingröße wurden 12,5 % (11 - 19 kDa) oder 15 % (3 - 10 kDa) Trenngele (ca. 5 cm) hergestellt. Die Elektrophorese wurde bei Stromstärken von 25 mA (Sammelgel) und 45 mA (Trenngel) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proteinbanden im Trenngel für fünf Minuten fixiert, 60 Minuten gefärbt und 120 Minuten oder über Nacht entfärbt.

Trenngel 12,5 %:	4,17 ml Acrylamidlösung, 3,27 ml Gelpuffer, 2,85 ml ddH ₂ O, 4,5 µl TEMED, 83,3 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat
Trenngel 15 %:	5,0 ml Acrylamidlösung, 3,26 ml Gelpuffer, 1,65 ml ddH ₂ O, 4,5 µl TEMED, 83,3 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat
Sammelgel 6 %:	1,2 ml Acrylamidlösung, 1,5 ml Gelpuffer, 3,25 ml ddH ₂ O, 4 µl TEMED, 50 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat
Acrylamidlösung:	30:1 Rotiphorese Gel 30
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl, 0,3 % (w/v) SDS, pH ^{25°C} 8,45
4 x RotiLoad-Probenpuffer:	200 mM Tris/HCl, pH ^{25°C} 7,0, 120 mM DTE, 40 mM EDTA, 48 % (w/v) Glycerin, 15 % (w/v) SDS, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
Anodenpuffer:	200 mM Tris/HCl, pH ^{25°C} 8,9

Kathodenpuffer:	100 mM Tris/HCl pH ^{25°C} 8.23, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS
Fixierlösung:	10 % (w/v) Trichloressigsäure
Färbelösung:	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Herstellung und Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Sowohl für die Transformation der Expressionsstämme *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* DH5 α als auch für den *E. coli*-Stamm TOP10, der zur Vervielfältigung von Plasmiden eingesetzt wurde, sind CaCl₂-kompetente Zellen verwendet worden.

Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte nach Cohen (Cohen *et al.*, 1972). Zur Transformation wurden 3 - 5 μ l Plasmid-DNA (1 - 10 ng DNA) bzw. 20 μ l Ligationsansatz zu einem 200 μ l-Aliquot CaCl₂-kompetenter Zellen zugegeben und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzepuls von 42 °C für 60 s ausgesetzt, sofort wieder auf Eis gestellt und mit 600 μ l frischem, gekühltem dYT-Medium versetzt. Die Zellen wurden noch für 30 min bei 37 °C inkubiert, dann abzentrifugiert und anschließend auf Selektionsplatten (50 μ g/ml Kanamycin bzw. 300 μ g/ml Ampicillin) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

2.3.2. Plasmid-Präparation nach dem Plasmid Mini-Prep-Kit

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 5 ml-Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien wurde das Plasmid-MiniPrep-Kit von Jena Bioscience verwendet. Den Angaben des Herstellers zufolge wurden 2 ml der Bakterienkultur zentrifugiert, das Pellet resuspendiert und nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgeschlossen. Die über SpinColumns gereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 μ l Elutionspuffer oder ddH₂O eluiert. Zur Kontrolle wurde die Plasmid-DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1) überprüft und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.3.3. Sequenzspezifische Mutagenese (QuikChange®)

Punktmutationen wurden mit Hilfe des QuikChange®-Verfahrens (Stratagene, Heidelberg, D) in das gewünschte Plasmid eingebracht. Dabei werden zwei zueinander komplementäre, mutagen Primer verwendet, welche beide die Punktmutation enthalten. Für die Amplifikation der DNA wurde die *Pfu*-Polymerase (*proofreading*-Polymerase) verwendet, welche nach einer Vortemperierung der Ansätze auf 95 °C im Thermocycler zugegeben wurde. Dieser sogenannte *hot start* ist nötig, um den Abbau der Primer durch die Exonukleaseaktivität der *Pfu*-Polymerase zu vermeiden und um unspezifische Polymerisationsprodukte zu verhindern. Das Ursprungsplasmid kann leicht durch *DpnI*-Zugabe gespalten und so den folgenden Reaktionsschritten entzogen werden, da nur die Template-DNA methyliert ist (Zielsequenz von *DpnI*: 5'-G^{m6}ATC-3').

Zur sequenzspezifischen Amplifikation der Template-DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Für einen 50 µl-Ansatz wurden 37,5 µl ddH₂O, 5 µl 10 x *Pfu*-Puffer (200 mM Tris/HCl, pH^{25°C} 8.8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA), je 2 µl Primer (0,5 µM), 2 µl dNTPs (je 10 mM) und 0,5 µl Template-DNA vermischt, im Thermocycler bei 95 °C vortemperiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl *Pfu*-Polymerase gestartet (*hot start*). Folgendes Temperaturprogramm wurde für die QuikChange® Reaktion verwendet: 2 min Aufheizen bei 95 °C, anschließend 30 Zyklen mit jeweils 30 s bei 95 °C zur Denaturierung, 30 s bei der primerspezifischen Temperatur zur Primer-Anlagerung und 15 min Polymerisation bei 68 °C. Abschließend wurde noch für 10 min die Temperatur von 68 °C gehalten und auf 5 °C abgekühlt. Durch Zugabe von 1 µl *DpnI* pro Ansatz und Inkubation bei 37 °C für 8 Stunden oder über Nacht wurde die Template-DNA gespalten. Alternativ dazu wurden gegebenenfalls 0,5 µl FastDigest*DpnI* verwendet und für 15 Minuten inkubiert.

Zur Überprüfung der PCR-Ansätze wurden 5 µl Probe durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1) untersucht. Im Anschluss daran wurden die PCR-Ansätze mit dem PCR-Purification-Kit von Jena Bioscience (Jena Bioscience, D) über Bindung der DNA an eine Silica-Gel-Membran in SpinColumns gereinigt und in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (2.3.1). Einzelne Kolonien wurden dann mittels Kolonie-PCR untersucht und bei positivem Ausgang in eine 5 ml-dYT-Übernachtskultur überimpft. Die daraus isolierte Plasmid-DNA diente als Grundlage für die Sequenzierung (Seqlab, Göttingen, D).

2.3.4. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine schnelle und einfache Methode, um den Erfolg von Klonierungen zu überprüfen. Für die Stammlösung (10 Ansätze) wurden 67 µl ddH₂O, 10 µl 10 x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH^{25 °C} 9.0, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100), 10 µl MgCl₂ (25 mM), je 4 µl Primer, 3 µl dNTPs und 2 µl *Taq*-Polymerase gemischt. Für die Überprüfung der SlyD-Punktmutationen wurde das T7-Promotor/ Terminator-Primerpaar eingesetzt und für die SUMO-Fusionsproteine das SUMO-for/ T7-Terminator-Primerpaar. Es wurden jeweils 10 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert und pro Ansatz wurde eine Bakterienkolonie von der Agarplatte hinein transferiert. Mit der gleichen Pipettenspitze wurde dieselbe Bakterienkolonie in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl dYT überimpft.

Das Temperaturprogramm für die PCR setzte sich wie folgt zusammen: 2 min Aufheizen bei 95 °C, dann 30 Zyklen von jeweils 30 s bei 95 °C Denaturierung, 20 s bei 50 °C Anlagerung der Primer und 30 s bei 72 °C Polymerisierung. Abschließend wurde für 10 min die Temperatur von 72 °C gehalten und dann auf 4 °C gekühlt. Die beimpften dYT-Reaktionsgefäße wurden derweil bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung der DNA-Fragmente auf ihre richtige Länge wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1) durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wurde die entsprechende Bakterienkultur in 5 ml dYT über Nacht kultiviert und für die Plasmidpräparation verwendet.

2.3.5. Klonierung von *E.c.*SlyD-Varianten in den pETSUMOadapt-Vektor

Die SUMO-Fusions-Technologie ist eine leistungsfähige und vor allem preisgünstige Methode zur Reinigung sowohl von besonders kleinen Proteinen als auch von Proteinen, die in herkömmlichen Methoden nur in unzureichendem Maßstab hergestellt werden können. Diese SUMO-Fusionsstrategie erfreut sich in letzter Zeit wachsender Beliebtheit (Mossessova *et al.*, 2000; Malakhov *et al.*, 2004). Als Expressionspartner für das gewünschte Protein wird SUMO („*small ubiquitin-like modifier*“, Smt3 aus *Saccharomyces cerevisiae*) verwendet. Es enthält einen N-terminalen His₆-Tag für die Reinigung mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (Ni-IMAC) (2.4.3). Vorteile des Systems sind: ein hohes Expressionslevel an löslichem Protein, das Vorhandensein einer einzigen Spaltstelle für die sehr spezifische SUMO-Protease (Ulp1) (Reverter *et al.*, 2004) und das Fehlen von störenden Reinigungs-Tags im sauberen Protein.

Das rekombinante Plasmid ist so konstruiert, dass die Fusion zwischen dem Amino-Terminus des gewünschten Proteins und dem Carboxyl-Terminus des SUMO-Tags ausgebildet wird. Für die hier durchgeführten Klonierungen wurde ein leicht veränderter pETSUMO-

Expressionsvektor verwendet, bei dem in das Ursprungsplasmid eine „*multiple cloning site*“ eingebaut wurde (pETSUMOadapt, Bosse-Doenecke *et al.*, 2008). Diese ermöglicht das Einfügen beliebiger DNA-Sequenzen durch geeignete Wahl der jeweiligen Schnittstellen.

Die SUMO-Fusionstrategie wurde zur Gewinnung der isolierten IF-Domäne von SlyD* angewendet. Des Weiteren wurde *E.c.SlyD(1-155)* auf diese Weise gewonnen.

2.3.6. Restriktion und Ligation

Die Amplifikation der Inserts erfolgte mit einem N-terminalen Primer, der eine *Eco31I*-Schnittstelle enthält, und mit einem C-terminalen Primer, der die *BamHI*-Schnittstelle enthält. Die Spaltung von Vektor und Insert wurde in zwei Schritten vollzogen. Als erstes fand die *Eco31I*-Spaltung in einem 50 µl-Ansatz (14,5 µl ddH₂O, 5 µl Puffer G, 30 µl des über eine SpinColumn entsalzten PCR-Produktes und 0,5 µl *Eco31I*) für 1 - 2 Stunden bei 37 °C statt. Nach erneuter Entsalzung wurde der Ansatz mit 5 µl FastDigest-Puffer versetzt, mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt und mit 1 µl FastDigest *BamHI* für 10 min bei 37 °C verdaut. Sowohl Insert als auch Vektor wurden vor der Ligation über SpinColumns entsalzt (PCR Purification Kit).

Zur Ligation in einem Gesamtvolumen von 40 µl wurden 20 µl entsalztes geschnittenes Insert und 5 µl geschnittener Vektor mit 4 µl Ligase-Puffer vermengt, mit ddH₂O aufgefüllt und mit 1 µl T4-DNA-Ligase für 2 Stunden bei 22 °C ligiert. Alternativ dazu wurde die Ligation auch bei 16 °C über Nacht durchgeführt. 20 µl des Ligationsansatzes wurden direkt zur Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* Top10 (2.3.1) eingesetzt. Die erhaltenen Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.3.4) auf die richtige Länge hin untersucht und bei positivem Ergebnis in einer 5 ml-Übernachtskultur zur Plasmidpräparation kultiviert. Anschließend wurden Proben zur Sequenzierung gegeben (Seqlab, Göttingen, D).

2.4. Gewinnung von Proteinen

2.4.1. Reinigung von RNase T1 (S54G/P55N)

Expression und Zellaufschluss

RNase T1 (S54G/P55N) exprimierende *E. coli* DH5α pA2T1 - Zellen wurden in 4 l dYT-Medium (300 µg/ml Ampicillin) bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Nach weiteren 16 Stunden Inkubation (12 Stunden bei Anzucht in Minimalmedium) wurden

die Zellen durch Zentrifugation (GS-3-Rotor, 4 °C, 7000 Upm, 20 min) geerntet und bei -80 °C gelagert. Wenn RNase T1 (S54G/P55N) vollständig ¹⁵N-markiert werden sollte, erfolgte die Kultivierung der Zellen in M9-Minimalmedium mit ¹⁵N-NH₄Cl als einzige Stickstoffquelle im Fermenter. Für die doppelt markierte RNase T1 (S54G/P55N) wurde zusätzlich ¹³C-Glucose als einzige Kohlenstoffquelle eingesetzt.

Das für die RNase T1 (S54G/P55N) kodierende Plasmid enthält eine OmpA-Signalsequenz, die dafür sorgt, dass das exprimierte Fusionsprotein ins Periplasma transportiert wird. Dort wird das OmpA-Signalpeptid abgespalten und die RNase T1 (S54G/P55N) kann durch einen osmotischen Schock freigesetzt werden (Neu *et al.*, 1965). Dazu wurde das Zellpellet in 50 ml PES-Puffer (20 mM Piperazin, 5 mM EDTA, 30 % (w/v) Saccharose, pH 6.0) resuspendiert und bei 4 °C für 45 min geschüttelt. Der Periplasmaaufschluss wurde durch Zugabe des sechsfachen Volumens an PE-Puffer (20 mM Piperazin, 5 mM EDTA, pH 6.0) ausgelöst. Die Zellsuspension wurde für weitere 15 min bei 4 °C geschüttelt. Im Anschluss erfolgte die Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (GS-3-Rotor, 4 °C, 9000 Upm, 45 min). Um die Ausbeute an RNase T1 (S54G/P55N) zu erhöhen, wurde der Periplasmaaufschluss mit den unlöslichen Zellbestandteilen wiederholt. Diese wurden erneut in PES-Puffer resuspendiert, bei 4 °C inkubiert und durch Zugabe des sechsfachen Volumens an PE-Puffer aufgeschlossen.

Chromatographische Reinigung von RNase T1 (S54G/P55N)

Die Reinigung erfolgte leicht abgewandelt nach Mücke (Mücke *et al.*, 1994b).

Das abzentrifugierte Rohlysate wurde nach dem Periplasmaaufschluss auf einen mit PE-Puffer äquilibrierten Anionenaustauscher (Fractogel EMD-650 TMAE) aufgetragen und gewaschen. Die Elution erfolgte über einen Salzgradienten von 0 – 40 % Puffer B (20 mM Piperazin, 5 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 6.0) in 80 Minuten bei einem Fluss von 5 ml/min. Die gesammelten Fraktionen wurden mit einem qualitativen Farbttest (Toluidinblau-Testagar nach (Quaas *et al.*, 1989)) untersucht. RNase-haltige Fraktionen wurden zunächst 24 Stunden in 1:10 verdünnten, dann 36 Stunden in 1:20 verdünnten PE-Puffer dialysiert und abschließend zur Volumenverringerung lyophilisiert.

Für die folgende Gelfiltration in 50 mM NH₄Ac, pH 5.5 wurde das Lyophilisat in 10 ml Gelfiltrationspuffer aufgenommen, abzentrifugiert und auf eine HiLoad Superdex 75 prep-grade-Säule (Größe 16/60) aufgetragen. RNase-haltige Fraktionen wurden wieder mit dem Toluidinblau-Testagar untersucht und für die Dialyse (36 h in 1:20 verdünnten, 48 h in 1:40 verdünnten Gelfiltrationspuffer) gepoolt. Die sich anschließende Gefriertrocknung lieferte saubere, lyophilisierte RNase T1 (S54G/P55N).

Reduktion und Carboxymethylierung von RNase T1 (S54G/P55N)

Die Reduktion und Carboxymethylierung des Proteins wurde, wie bei Mücke (Mücke *et al.*, 1994a) beschrieben, durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 10 mg des lyophilisierten Proteins in 275 µl 0,2 M Tris/HCl, 7 M GdmCl, 2 mM EDTA, pH^{25°C} 8.7 gelöst, zur Reduktion mit 60 µl 200 mM DTT in 0,2 M Tris-HCl, 7 M GdmCl, 2 mM EDTA, pH^{25°C} 8.7 versetzt und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Carboxymethylierung wurde durch Zugabe von 60 µl 0,6 M Natriumiodacetat in 0,2 M Tris-HCl, pH^{25°C} 7.5 und Inkubation für 5 min im Dunkeln erreicht. Im Anschluss erfolgte die Entsalzung der Ansätze durch zweifache Gelfiltration über eine PD10-Säule in 25 mM NH₄Ac, pH 5.5. Die präparierten Proteine wurden dann in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

Die Reduktion und Carboxymethylierung von α-Lactalbumin wurde analog durchgeführt.

2.4.2. Reinigung von SlyD*

Bei den folgenden Reinigungen wurden nach jedem Reinigungsschritt die gesammelten Fraktionen über SDS-PAGE (2.2.2) untersucht. Fraktionen, die nach dem letzten Reinigungsschritt das jeweilige gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und über VivaSpin-Konzentratoren, deren Ausschlussvolumen der molekularen Größe entsprechend gewählt wurde, aufkonzentriert. Zur Lagerung wurden die Proteine in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Expression und Zellaufschluss

Die Expression von SlyD* erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3). Die Zellen wurden in 4 l dYT-Medium bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ > 1,0 kultiviert und durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Die Zellernte durch Zentrifugation (GS-3-Rotor, 4 °C, 7000 Upm, 20 min) erfolgte nach drei bis vier Stunden Expression. Die geernteten Zellen wurden in Aufschlusspuffer (50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 7.5) resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Für ¹⁵N-markiertes SlyD wurden die Zellen in M9-Minimalmedium mit ¹⁵N-NH₄Cl als einzige Stickstoffquelle im Fermenter kultiviert. Für die Zuordnung der Y68W-Mutante wurde zur Gewinnung von doppelt markiertem Protein zusätzlich ¹³C-Glucose als einzige Kohlenstoffquelle eingesetzt.

Zur Vorbereitung des Zellaufschlusses wurde das in Auftragungspuffer (50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 7.5) resuspendierte Zellpellet für 20 Minuten auf Eis mit Lysozym behandelt. Die Zellen wurden dann mit Ultraschall (40 % Amplitude, 3 min mit je

1,5 s Pulsierung und Pause) auf Eis aufgeschlossen und unlösliche Zellbestandteile bei 20000 Upm und 4 °C abzentrifugiert.

Ni-Ionen-Affinitätschromatographie (Ni-IMAC)

Das Rohlysat wurde auf eine mit 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 7.5 äquilibrierte Ni-Sepharose-Säule mit Hilfe einer P1-Pumpe bei einem Fluss von 1 ml/min aufgetragen. SlyD* ist mit einem C-terminalen His₆-Tag ausgestattet und bindet darüber an das Säulenmaterial. Nichtbindende Proteine aus dem Zelllysat wurden im Durchfluss aufgefangen. Die Säule wurde im Anschluss bei einem Fluss von 2 ml/min mit Puffer A gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm weniger als 0,2 A.U. betrug.

SlyD* bindet auf Grund seiner Chaperoneigenschaften unzählige Proteine und Peptide aus dem Rohlysat hoch affin. Günstigerweise können diese abgetrennt werden, solange SlyD* noch an das Säulenmaterial gebunden ist. Dazu wird SlyD* schrittweise denaturiert und im nicht funktionalen Zustand werden Peptide oder Proteine abgelöst. Zur Denaturierung wurde die Konzentration von GdmCl über einen Gradienten von 0 - 100 % 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 6 M GdmCl, pH 7.5 in 80 ml (4 x Säulenvolumen) bei einem Fluss von 2 ml/min erhöht. Es wurde solange weiter mit 100 % GdmCl gewaschen, bis kein Protein mehr eluierte. Dann erfolgte die langsame Renaturierung von SlyD* gebunden an das Säulenmaterial durch Erniedrigung der GdmCl-Konzentration über einen Gradienten von 100 - 0 % GdmCl in 200 ml (10 x Säulenvolumen). Die Elution von SlyD* erfolgte bei 250 mM Imidazol.

Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Die vereinigten SlyD*-haltigen Fraktionen wurden auf eine in 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,03 % NaN₃, pH 7.5 äquilibrierte HiLoad Superdex 75 prep-grade-Säule (Größe 16/60) aufgetragen. Das aufgespritzte Probenvolumen betrug jeweils 5 ml und eluiert wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Ab einem Elutionsvolumen von 40 ml wurde 2 ml-Fraktionen gesammelt. Die Anwesenheit von EDTA im Gelfiltrationspuffer soll Metallionen, insbesondere Ni²⁺, die aus der Ni-IMAC mitgezogen werden, binden und somit dem hoch metallaffinen Enzym SlyD* entziehen. Da alle Aktivitäts- und vor allem die NMR-Untersuchungen im EDTA-freien Puffer durchgeführt werden, erfolgte im Anschluss an die Gelfiltration eine Dialyse der vereinigten SlyD*-haltigen Fraktionen in 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 0,03 % NaN₃, pH 7.5.

Die Reinigung von TtSlyD erfolgte in analoger Weise bei Raumtemperatur. Für die His₆-Tag-freie TtSlyD-Variante wurde am C-Terminus vor dem His₆-Tag eine Thrombinschnittstelle

eingefügt (2.3.3). Nach dem ersten Reinigungsschritt über Ni-IMAC wurde über Nacht im Dialyseschlauch mit 50 U Thrombin in 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 die Spaltungsreaktion durchgeführt. Das His₆-Tag-freie TtSlyD wurde über eine zweite Ni-IMAC von ungespaltenem Protein und vom His₆-Tag abgetrennt. Der abschließende Reinigungsschritt über Gelfiltration erfolgte wie oben beschrieben. Auf Grund der Thrombinschnittstelle gibt es vier zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus: Leu150-Val151-Pro152-Lys153.

2.4.3. Reinigung der SlyD-Varianten *E.c.*SlyD(1-155) und *E.c.*-IF-Domäne als SUMO-Fusionsproteine

Expression und Zellaufschluss für SUMO-Fusionsproteine

Die SUMO-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Dazu sind die Zellen in 4 l dYT-Medium bzw. bei vollständiger ¹⁵N-Markierung in M9-Minimalmedium bei 37 °C und 250 Upm in Schüttelkolben bzw. im Fermenter kultiviert worden. Zur Expression wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ > 1,0 mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und für weitere drei Stunden inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (GS-3-Rotor, 4 °C, 7000 Upm, 20 min) geerntet, in Aufschlusspuffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 7.5) resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

Der Zellaufschluss der aufgetauten Zellen erfolgte analog 2.4.2 durch Behandlung mit Lysozym und anschließender Beschallung durch Ultraschall.

1. Ni-Ionen-Affinitätschromatographie

Das durch Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennte Rohlysate wurde auf eine mit 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 7.5 äquilibrierte Ni-Sepharose-Säule mit Hilfe einer P1-Pumpe bei einem Fluss von 1 ml/min aufgetragen. Das SUMO-Protein ist mit einem N-terminalen His₆-Tag ausgestattet und bindet darüber an das Säulenmaterial. Nichtbindende Proteine aus dem Zelllysate wurden im Durchfluss aufgefangen.

Das SUMO-Fusionsprotein wurde nach einem Waschschrift mit 250 mM Imidazol von der Säule eluiert und in Fraktionen zu 5 ml aufgefangen. Alle SUMO-Fusionsprotein-haltigen Fraktionen wurden gepoolt. Die SUMO-Protease Ulp1 (Amerik *et al.*, 2004; Reverter *et al.*, 2004) arbeitet optimal, wenn die Imidazol-Konzentration geringer als 150 mM ist und wenn 150 mM NaCl vorhanden sind. Der Protein-Pool wurde deshalb über Nacht in 50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 7.5 dialysiert, um die optimalen Salzkonzentrationen für die Spaltungsreaktion zu gewährleisten.

SUMO-Spaltung und 2. Ni- Ionen-Affinitätschromatographie

Der dialysierte SUMO-Fusionsprotein-haltige Pool wurde mit 1:10 an Volumen mit SUMO-Puffer (10 x SUMO-Puffer: 500 mM Tris/HCl, 2 % IGEPAL, 1,5 M NaCl, 10 mM DTT, pH^{4°C} 8.0) versetzt. Der Spaltungsansatz wurde in Anwesenheit von 20 µg/ml Ulp1 bei 4 °C für 6 h (*E.c.*-IF-Domäne) geschüttelt. Das SUMO-*E.c.*SlyD(1-155)-Fusionsprotein wurde bei 30 °C für 24 h gespalten. Im Laufe der Spaltung von SUMO-*E.c.*SlyD(1-155) wurde im Abstand von ca. 8 h frische Protease hinzugegeben.

Die Spaltung von SUMO ist dann erschwert, wenn das Zielprotein mit Lysin, Leucin, Valin oder Prolin beginnt. Da SlyD* an zweiter Position ein Lysin hat, scheint die Spaltung hier teilweise behindert. Das große gefaltete Protein kann zusätzlich durch sterische Hinderung die Angriffsfläche für die Protease behindern. Durch Erhöhung der Temperatur und Verlängerung der Inkubationszeit ist eine gute Ausbeute an gespaltenem Protein möglich.

Die Spaltungsreaktion wurde durch Auftragung des Spaltungsansatzes auf die Ni-Sepharose-Säule über eine P1-Pumpe gestoppt. Sowohl das gespaltene SUMO als auch die SUMO-Protease enthalten einen N-terminalen His₆-Tag und binden an die Säulenmatrix, während das Zielprotein ohne His₆-Tag im Durchfluss aufgefangen wurde. Im Anschluss wurde mit 2 ml/min mit Puffer A gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm niedriger als 0,2 A.U. war. Die Protease, SUMO und noch ungespaltenes Protein wurden mit 500 mM Imidazol von der Säule entfernt.

Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Analog zur Reinigung von SlyD* wurden die jeweiligen Proteine über eine HiLoad Superdex 75 prep-grade-Säule (Größe 16/60) in 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,03 % NaN₃, pH 7.5 weiter aufgereinigt. Der proteinhaltige Durchfluss nach der 2. Ni-IMAC-Säule wurde in 5 ml-Schritten auf die Säule aufgetragen und bei einem Fluss von 1 ml/min in 2 ml Fraktionen eluiert. Fraktionen, die das jeweilige gewünschte Protein enthalten, wurden vereinigt, gegen 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 0,03 % NaN₃, pH 7.5 EDTA-frei dialysiert.

2.4.4. Präparation der SUMO-Protease Ulp1

Zur Expression von Ulp1 wurde der Stamm *E. coli* BL21 pLysS verwendet. Die Zellkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. Die Expression erfolgte bei 30 °C für 3,5 bis 4 h nach Zugabe von 0,75 mM IPTG. Nach der Zellernte wurde das Zellpellet zur Lagerung bei -80 °C in 50 mM Tris/HCl, pH^{4°C} 8.0, 20 % Saccharose

resuspendiert. Der Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde in Gegenwart von 350 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 0,2 % IGEPAL und 10 mM Imidazol durchgeführt und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernt. Der Zellextrakt wurde auf eine Ni-Sepharose-Säule aufgetragen und das Protein bei 250 mM Imidazol eluiert. Imidazol wurde durch Dialyse entfernt und die Protease wurde zur Langzeitlagerung bei -80 °C mit 50 % Glycerin versetzt.

Für die Proteolyse von SUMO-Fusionsproteinen ist die einfache Reinigung von Ulp1 ausreichend (Mossessova *et al.*, 2000).

2.5. Spektroskopische Messungen

2.5.1. Absorptionsspektroskopie

Zur Konzentrationsbestimmung wurden UV-Absorptionsspektren an einem Jasco V-650 Absorptionsspektralphotometer aufgenommen. Dazu wurden die Proteinproben vorher, um Aggregat zu entfernen, bei 14000 Upm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Als Referenz wurde unter gleichen Bedingungen das jeweilige Pufferspektrum gemessen und zur Korrektur des Proteinspektrums herangezogen. Die Spektren wurden in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke im Bereich zwischen 240 und 340 nm mit einer Geschwindigkeit von 200 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 nm aufgezeichnet. Die Konzentration des jeweiligen Proteins ergab sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{A_{280nm}}{\epsilon \cdot d} \quad [2.1]$$

mit c , der Konzentration des Proteins, A , der Absorption bei 280 nm, ϵ , des jeweiligen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm, und d , der Schichtdicke der Küvette.

In Tab. 2-3 sind die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine und Proteinvarianten aufgeführt.

Tab. 2-3 Extinktionskoeffizienten aller untersuchten Proteine.

Protein	ϵ_{280} ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Referenz
SlyD*	5788	(Scholz <i>et al.</i> , 2005)
SlyD*Y68W	9620	berechnet nach (Gill <i>et al.</i> , 1989)
<i>E.c.</i> SlyD(1-155)	5788	(Scholz <i>et al.</i> , 2005)
<i>E.c.</i> -IF-Domäne	2960	berechnet nach (Gill <i>et al.</i> , 1989)
SlyD* Δ IF	4960	berechnet nach (Gill <i>et al.</i> , 1989)
(RCM)-RNase T1 (S54G/P55N)	21060	(Takahashi <i>et al.</i> , 1970)
RCM- α -La	28340	(Kronman <i>et al.</i> , 1964)

2.5.2. Fluoreszenzspektroskopie

Für die Messungen der chemisch induzierten Entfaltungsübergänge sowie für Fluoreszenz-Bindungsstudien sind Fluoreszenzemissionsspektren an einem Jasco FP-6500 Spektralfluoreszenzphotometer aufgezeichnet worden. Die Konzentration des Proteins betrug 5 μM für die Entfaltungsübergänge und 1 μM für die Fluoreszenztitrationen im jeweiligen Puffer. Die Titrationen wurden in einer Rundküvette mit 8 mm Durchmesser und die Entfaltungsübergänge in einer 1 x 1 cm^2 rührbaren Fluoreszenzküvette in einem Gesamtvolumen von 1000 μl durchgeführt. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 200 nm/min und die Dämpfung 0,5 s; die Anregungsbandbreite war 3 nm und die Emissionsbandbreite 5 nm. Je nach Protein erfolgte die Anregung bei 280 nm oder 295 nm für Tryptophanvarianten.

2.5.3. Circular dichroismus-(CD)-Spektroskopie

CD-spektroskopische Messungen sind an einem Jasco J-815 CD-Spektrometer durchgeführt worden. Für die thermisch induzierten Entfaltungsübergänge war die Konzentration des Proteins 15 μM für fern-UV-Detektion (190 – 260 nm) und 250 μM für nah-UV-Detektion (260 – 320 nm). Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 50 nm/min und die Dämpfung 1 s. Für einzelne CD-Spektren wurden acht Spektren zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses gemittelt. Die Temperaturübergänge wurden mit interner Temperaturkontrolle in einer temperierbaren Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm und einer Heizrate von 0,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durchgeführt.

2.5.4. Konzentrationsbestimmung von GdmCl, Harnstoff und NaCl

In allen Entfaltungsexperimenten wurden hoch konzentrierte Salzlösungen eingesetzt, deren genaue Konzentration über die Differenz der Brechungsindizes des Puffers in Anwesenheit und in Abwesenheit von Salz (Δn) berechnet wurde. Dabei gelten folgende Gleichungen ([2.2] bis [2.4]) (Pace, 1986):

$$[GdmCl] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot (\Delta n)^2 - 91,6 \cdot (\Delta n)^3 \quad [2.2]$$

$$[Harnstoff] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot (\Delta n)^2 + 185,56 \cdot (\Delta n)^3 \quad [2.3]$$

$$[NaCl] = 105,74 \cdot \Delta n - 89,37 \cdot (\Delta n)^2 + 72,59 \cdot (\Delta n)^3 \quad [2.4]$$

Die refraktometrische Bestimmung der genauen Konzentrationen an Denaturierungsmittel bzw. NaCl wurde im Anschluss an die jeweilige Messung durchgeführt.

2.5.5. Untersuchungen zur konformationellen Stabilität von SlyD*

Die konformationelle Stabilität beschreibt die Gleichgewichtslage zwischen dem nativen (N) und dem denaturierten (U) Zustand eines Proteins. Dabei wird von einem Zweizustandsmodell entsprechend Gleichung [2.5] (Tanford, 1968) ausgegangen, wenn die Entfaltung bzw. Faltung des Proteins ohne das Auftreten von Intermediaten erfolgt.

$$N \leftrightarrow U \quad [2.5]$$

Über das Zweizustandsmodell ([2.5]) kann die Gleichgewichtskonstante K_U der Entfaltungsreaktion mit Hilfe jedes messbaren physikalischen Unterschiedes zwischen N und U erhalten werden ([2.6]), wobei der physikalische Messwert bei Vorhandensein einer Mischung von N und U als y_{obs} bezeichnet wird und die jeweilige physikalische Eigenschaft von N und U mit y_N bzw. y_U gegeben ist.

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{(y_N - y_{obs})}{(y_{obs} - y_U)} \quad [2.6]$$

Die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_U wird im thermodynamischen Gleichgewicht über die Gleichgewichtskonstante K_U definiert ([2.7]).

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln K_U \quad [2.7]$$

Zur Bestimmung der konformationellen Stabilität wurden denaturierungsmittelinduzierte und thermisch induzierte Entfaltungsübergänge gemessen.

2.5.5.1. Auswertung von Denaturierungsmittelinduzierten Entfaltungsübergängen

Die lineare Abhängigkeit der Proteinstabilität von der Denaturierungsmittelkonzentration ($[D]$) wird durch das lineare Extrapolationsmodell (LEM, *linear extrapolation model*) (Pace, 1986) beschrieben ([2.8]), mit $\Delta G_U(H_2O)$, der freien Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmittel, und m , der Kooperativität des Entfaltungsüberganges.

$$\Delta G_U = \Delta G_U(H_2O) + m \cdot [D] \quad [2.8]$$

Die spektroskopisch ermittelten Eigenschaften des nativen (N) und des denaturierten (D) Zustandes eines Proteins ($y_{N,U}$) sind ebenfalls durch eine lineare Abhängigkeit von $[D]$ gekennzeichnet ([2.9]).

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot [D] \quad [2.9]$$

Die resultierende Gerade mit der Steigung $m_{N,U}$ und der spektroskopischen Eigenschaft des nativen bzw. entfalteten Proteins in Abwesenheit von Denaturierungsmittel $y_{N,U}^0$ umschreibt die Basislinie des nativen bzw. entfalteten Zustandes.

Der Entfaltungsübergang des Proteins, welcher an Hand der spektroskopischen Messgröße y_{obs} in Abhängigkeit vom Denaturierungsmittel gemessen wurde, ist durch Kombination der Gleichungen [2.6] bis [2.9] gegeben ([2.10]).

$$y_{obs}([D]) = \frac{y_N^0 + m_N[D] + (y_U^0 + m_U[D]) \cdot e^{-\frac{\Delta G_U(H_2O) + m \cdot [D]}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G_U(H_2O) + m \cdot [D]}{RT}}} \quad [2.10]$$

Die Kooperativität des Entfaltungsüberganges (m -Wert) ist dabei ein Maß für die Differenz der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche (SASA – *solvent accessible surface area*) zwischen dem gefalteten und dem entfalteten Zustand (Myers *et al.*, 1995). Sie korreliert demzufolge auch mit der Größe eines Proteins.

Zur Messung der denaturierungsmittelinduzierten Entfaltungsübergänge wurde ein Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektralphotometer verwendet, bei dem der Küvettenblock temperierbar ist. Die Entfaltungsübergänge der SlyD-Varianten (5 μM) wurden bei 15 °C in 1000 μl 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 im Bereich von 0 M bis 8 M Harnstoff durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 278 nm, die Emissionsspektren wurden im Bereich von 300 bis 400 nm mit einer Auflösung von 0,5 s aufgezeichnet.

2.5.5.2. Auswertung und Messung von thermisch induzierten Entfaltungsübergängen

Analog zu den denaturierungsmittelinduzierten Entfaltungsübergängen erfolgte die Auswertung der thermisch induzierten Übergänge auf Basis des Zweizustandsmodells (Gleichung [2.6] und [2.7] sind gültig).

Die spektroskopisch ermittelte Messgröße $y_{N,U}$ ist linear von der Temperatur T abhängig, $y_{N,U}^0$ bezeichnet den Wert bei 0 K und $m_{N,U}$ ist die Steigung der Basislinie ([2.11]).

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot T \quad [2.11]$$

Durch Integration des Enthalpie- und Entropieterms zwischen T_m und T ergibt sich die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_U ([2.12]) mit T_m , die Temperatur im Mittelpunkt des thermischen Entfaltungsüberganges, $\Delta H_U(T_m)$, der van't Hoff-Enthalpie im Mittelpunkt des Überganges, und ΔC_p , die Änderung der Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins (isobarer Prozess).

$$\Delta G_U(T) = \Delta H_U(T_m) \cdot \frac{T_m - T}{T_m} - \Delta C_p \cdot \left[T_m - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \right] \quad [2.12]$$

Die Gleichung [2.13], durch Kombination der Gleichungen [2.6], [2.7], [2.11] und [2.12], erhalten, beschreibt den thermischen Entfaltungsübergang an Hand der spektroskopischen Messgröße y_{obs} (Griko *et al.*, 1988).

$$y_{obs}(T) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot T + (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot e^{\left(\left\{ -\frac{\Delta H_U(T_m)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_m}{T} + \ln\left(\frac{T_m}{T}\right) \right] \right\} \right)}}{1 + e^{\left(\left\{ -\frac{\Delta H_U(T_m)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_m}{T} + \ln\left(\frac{T_m}{T}\right) \right] \right\} \right)}} \quad [2.13]$$

Zur Messung der thermischen Übergänge wurde entweder ein Jasco J-650 Spektralphotometer (UV) oder ein Jasco J-815 CD-Spektrometer verwendet. Beide Geräte sind mit einem Peltierelement (UV: ETC-505T, CD: PTC-423S/15) zur genauen Messung der Temperatur ausgestattet. In der Messküvette wurde die Temperatur mit einem Widerstandsthermometer direkt gemessen.

Die Entfaltungsübergänge der SlyD-Varianten wurden in 3200 μl 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei Detektion mittels UV-Absorption und in 3200 μl 2,5 mM Na_2HPO_4 , 5 mM NaCl, pH 7.5 bei Detektion mittels CD-Spektroskopie durchgeführt. Die Entfaltungskurve wurde im Bereich von 10 °C bis 75 °C mit einer Heizrate von 0,5 °C/ min, einer spektralen Bandbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 s bzw. 1 s aufgezeichnet. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm.

2.5.6. Rückfaltungsexperimente mit RNase T1 (S54G/P55N)

Für die fluoreszenzdetektierten Rückfaltungsexperimente ist ein FP-6500 Spektralfluorimeter von Jasco verwendet worden. Die Reaktion wurde direkt in der thermostatisierbaren Rundküvette mit 8 mm Durchmesser gestartet, wobei folgende Einstellungen gewählt waren: für die Dämpfung 1 s, für die Anregungsspaltbreite 1 - 3 nm und für die Emissionsspaltbreite 3 - 5 nm je nach vorhandener Proteinkonzentration. Als Fluorophor für die Anregung bei 295 nm diente das Tryptophan in der RNase T1 (S54G/P55N). Die Emission wurde bei 320 nm detektiert.

Die Proteinproben wurden vor der Messung bei 14000 Upm und 4 °C für mindestens 10 min zentrifugiert, um vorhandene unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die tatsächliche Proteinkonzentration wurde dann, wie unter 2.5.1 beschrieben, bestimmt. Alle verwendeten Puffer wurden vor Benutzung über einen 0,2 μm -Nylonfilter filtriert und anschließend entgast.

Für die Standardmessung wurden 20 μM in 6 M GdmCl entfaltete RNase T1 (S54G/P55N) durch 100fache Verdünnung in 10 mM Tris, pH^{15°C} 7.5 bei 15 °C und bei verschiedenen Konzentrationen an SlyD* und SlyD-Varianten zurückgefaltet. Im Hinblick auf die Echtzeit-NMR-Messungen sind die fluoreszenzdetektierten Rückfaltungen auch unter NMR-Bedingungen in 10 mM Bis-Tris, pH^{10°C} 6.0 bei 10 °C durchgeführt worden. Dabei wurde die Reaktion durch 10fache Verdünnung der entfalteten RNase T1 (S54G/P55N) zu Endbedingungen von 0,6 M GdmCl gestartet.

2.5.7. Katalyse der Rückfaltung von RCM-RNase T1 (S54G/P55N)

Zur Charakterisierung der verschiedenen SlyD-Varianten wurden die standardisierten Rückfaltungsexperimente mit der reduzierten und carboxymethylierten Form von (S54G/P55N)-RNase T1 (RCM-T1) bei 15 °C durchgeführt.

RCM-T1 wurde durch Inkubation in 10 mM Tris-HCl, pH^{15°C} 7.5 über 60 min vollständig entfaltet. Unter Hochsalzbedingungen nimmt die RCM-Form der RNase T1 (S54G/P55N) eine nativ-ähnliche Struktur an, weshalb die Rückfaltung durch einen Salzsprung initiiert werden kann (siehe auch 1.3). Dies wurde durch 40fache Verdünnung in Endbedingungen von 2 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH^{15°C} 7.5 erreicht. Der Rückfaltungspuffer enthielt verschiedene Mengen an SlyD* bzw. der jeweiligen SlyD-Variante. Die Endkonzentration an RCM-T1 war 0,1 µM.

Die langsame Phase der RCM-T1-Faltung zeigte einen monoexponentiellen Verlauf und wurde mit dem Programm Grafit 5.0 ausgewertet. Die Auftragung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten gegen die Enzymkonzentration liefert die Spezifitätskonstante als Anstieg einer linearen Regression.

2.5.8. Proteasefreier PPIase-Test

Auf Grund der Empfindlichkeit SlyD*s gegenüber Proteasen wurde der proteasefreie Peptidyl-Prolyl-Isomerasetest nach Janowski zur Untersuchung der *cis/trans*-Isomerisierung des chromogenen Peptidsubstrates Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA angewendet (Janowski *et al.*, 1997). Da der *cis*-Anteil in wässriger Lösung nur 10 % beträgt, wurde für das Peptidsubstrat wasserfreies 0,47 M LiCl/TFE als Lösungsmittel verwendet, um den Gehalt des *cis*-Isomers auf 50-70 % zu steigern (Kofron *et al.*, 1991). Zur Messung der Absorptionsänderung während der Isomerisierungsreaktion wurde ein Hewlett Packard 8452A Diodenarray-Photometer mit temperierbaren Küvettenhalter eingesetzt. Die jeweilige PPIase wurde in nanomolaren Konzentrationen in 35 mM HEPES, pH 7.8 und 1 µM Rinderserumalbumin zur Absättigung der Silicatoberfläche der Küvette bei 10 °C für fünf Minuten äquilibriert, bevor durch Zugabe des Peptids mit 60 µM Endkonzentration die Reaktion gestartet wurde. Unter Rühren wurde die Absorptionsänderung bei 330 nm (mit interner Korrektur bei 510 nm) 600 Sekunden lang verfolgt. Die Isomerisierung läuft als Reaktion pseudo-erster Ordnung ab und wurde über Anpassung an eine monoexponentielle Funktion ausgewertet.

2.5.9. Insulinaggregation als Test auf Chaperonaktivität

Ein Standardtest auf Chaperonaktivität ist die Beobachtung der Insulinaggregation (Haslbeck *et al.*, 1999). Insulin wurde in Wasser gelöst, mit 6 M HCl schnell auf einen pH von 1.0 gebracht und dann langsam mit 0,1 N NaOH auf einen pH-Wert von 2 - 3 titriert, so dass eine klare Insulinlösung entstand. Für die Messung wurde Insulin auf eine Endkonzentration von 45 μM verdünnt und in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 25 °C und unterschiedlichen Konzentrationen an SlyD* inkubiert. Mit der Zugabe von 10 mM DTT (Endkonzentration) wurde die reduktive Spaltung der Insulin-Kette B gestartet und dessen Aggregation als Anstieg in der Streulichtintensität bei 400 nm in einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Zur Vorbereitung der NMR-Experimente wurden die Messungen mit 450 μM Insulin und 900 μM SlyD* wiederholt.

2.6. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die freiwerdende Wärme bei Protein-Liganden-Wechselwirkungen wurde mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry* - ITC) an einem VP-ITC von Microcal (Microcal LLC, USA) gemessen und mit Origin 7.5 ausgewertet. ITC ist die genaueste und direkteste Methode, um Veränderungen in der freien Enthalpie während der Bildung eines Enzym-Liganden-Komplexes zu bestimmen (Jelesarov *et al.*, 1999). In einem adiabatischen Mantel befinden sich zwei Messzellen, eine Proben- und eine Referenzzelle. Über eine automatische Spritze werden schrittweise kleine Mengen an Ligand in die Probenzelle injiziert, in der sich das zu untersuchende Enzym befindet. Die durch Komplexbildung freiwerdende Wärme wird dann als die elektrische Leistung angegeben, die nötig ist, um eine konstante Temperaturdifferenz zwischen Proben- und Referenzzelle aufrecht zu erhalten. So ist es möglich, direkt die freiwerdende Reaktionsenthalpie zu messen. Verschiedene SlyD-Varianten wurden mit NiCl_2 (CoCl_2 , GdCl_3) in 10 mM Tris, $\text{pH}^{25^\circ\text{C}}$ 7.5 bei 25 °C titriert. Die Rührgeschwindigkeit der Injektionsspritze betrug 309 U/min. Zwischen den einzelnen Injektionen von 13 μl Metallionenlösung wurde 420 s gewartet, bis das System wieder ins thermodynamische Gleichgewicht zurückgekehrt war. Die nach jeder Injektion freiwerdende Wärme wurde durch Integration des kalorimetrischen Signals erhalten. Die jeweilige Verdünnungswärme des Liganden wurde über analoge Messungen ohne Protein ermittelt. Die Differenz (q_i) zwischen der Reaktionswärme (q_R) und der Verdünnungswärme (q_D) wird für die Berechnung der Bindungsenthalpie für die jeweiligen Reaktionspartner eingesetzt (Leavitt *et al.*, 2001; Velázquez Campoy *et al.*, 2005).

Die Gleichung, die ein allgemeines Bindungsmodell beschreibt, ist in [2.14] wiedergegeben.

$$q_i = v \cdot \Delta H \cdot \Delta L_i \quad [2.14]$$

Dabei steht q_i für eine bestimmte aufgenommene bzw. freiwerdende Wärme nach einer Injektion, v ist das Volumen der Messzelle, ΔH die charakteristische Bindungsenthalpie und ΔL_i die Menge an Ligand, die nach der jeweiligen Injektion an das Protein gebunden hat. Unter Annahme des einfachsten Bindungsmodells mit einer Bindestelle kann die Bindungsenthalpie aus der experimentell bestimmten Wärme ($q_i = q_R - q_D$) entsprechend Gleichung [2.15] bestimmt werden (Leavitt *et al.*, 2001). ΔL_i wird dann durch die Differenz der Konzentration an gebundenem Liganden zwischen zwei aufeinanderfolgenden Injektionen beschrieben. Dabei ist $[L]$ die Konzentration an freiem Liganden, K_a die Assoziationskonstante und $[P]$ die Proteinkonzentration.

$$q_i = v \cdot \Delta H \cdot [P] \cdot \left(\frac{K_a [L]_i}{1 + K_a [L]_i} - \frac{K_a [L]_{i-1}}{1 + K_a [L]_{i-1}} \right) \quad [2.15]$$

Die Änderung der freien Enthalpie durch das Bindungsereignis wird nach Gleichung [2.16] berechnet und liefert über das Gibbs-Helmholtz-Gesetz auch die Änderung der Entropie des Systems ([2.17]).

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad [2.16]$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad [2.17]$$

2.7. NMR-spektroskopische Methoden

Alle NMR-Messungen wurden an Geräten des Typs AvanceIII600 (600 MHz Resonanzfrequenz der Protonen, entspricht einer Magnetfeldstärke von 14,1 T) mit Raumtemperaturprobenköpfen und an einem AvanceIII800 (800 MHz Resonanzfrequenz der Protonen, Magnetfeldstärke 18,8 T), der mit einem Kryoprobenkopf ausgestattet war, durchgeführt (Bruker, Karlsruhe). Die verwendeten Pulsprogramme sind im Anhang beschrieben (8.3). Zum Prozessieren und Analysieren der 1D Protonenspektren wurde das Programm *Felix* (Biosym, San Diego) verwendet. Alle weiteren 2D und 3D NMR-Daten

wurden mit NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) prozessiert und mit NMRView (Johnson, 2004) analysiert.

In den heteronuklearen Experimenten wurde ^{15}N als NMR-aktiver Heterokern eingesetzt. Bei den sequenzspezifischen Zuordnungsexperimenten war eine zusätzliche Markierung mit ^{13}C nötig. Die genauen Puffer- und Messbedingungen sind bei den jeweiligen Experimenten beschrieben.

2.7.1. Eindimensionale NMR-Spektroskopie

Mit einer sehr hohen zeitlichen Auflösung ermöglichen eindimensionale Protonenspektren einen schnellen Überblick über die Beschaffenheit einer NMR-Probe, welche nicht zwingend isotonenmarkiert sein muss. Gleichzeitig vermitteln sie einen ersten Eindruck über Veränderungen während einer enzymatischen Reaktion. Für die Echtzeit-Beobachtung von Reaktionen mittels NMR-Spektroskopie wird eine Serie von Protonenspektren aufgezeichnet. Um die Interaktionen von weder ^{13}C - noch ^{15}N -markierten Substanzen wie Insulin mit SlyD* zu untersuchen, muss auf die 1D Protonenspektroskopie zurückgegriffen werden. Da in Protonenspektren jedes Proton mindestens ein Signal gibt, können unmarkierte Komplexproben nicht mit 1D Spektren analysiert werden. Durch die Verwendung von ^{15}N -markiertem SlyD* und den Einbau eines ^{15}N -Filterelementes in die Pulssequenz eines Protonenspektrums können die Signale aller ^{15}N -gebundenen Protonen unterdrückt werden und übrig bleiben die Protonensignale des unmarkierten Insulins, welche dann ungehindert beobachtet werden können. In Abb. 2-1 ist das ^{15}N -Filterelement in doppelter Ausführung zur Verbesserung des Filtereffektes dargestellt. Zunächst erfolgt eine Anregung aller Protonen. Nur die ^{15}N -gebundenen Protonen können zum Stickstoff koppeln, das führt zu einem 90°-Phasenunterschied zwischen Wasser- und ^{15}N -gebundenen Protonen und nur die Magnetisierung der ^{15}N -gebundenen Protonen wird dann im Anschluss durch die Gradientenpulse G2 bzw. G4 dephasiert.

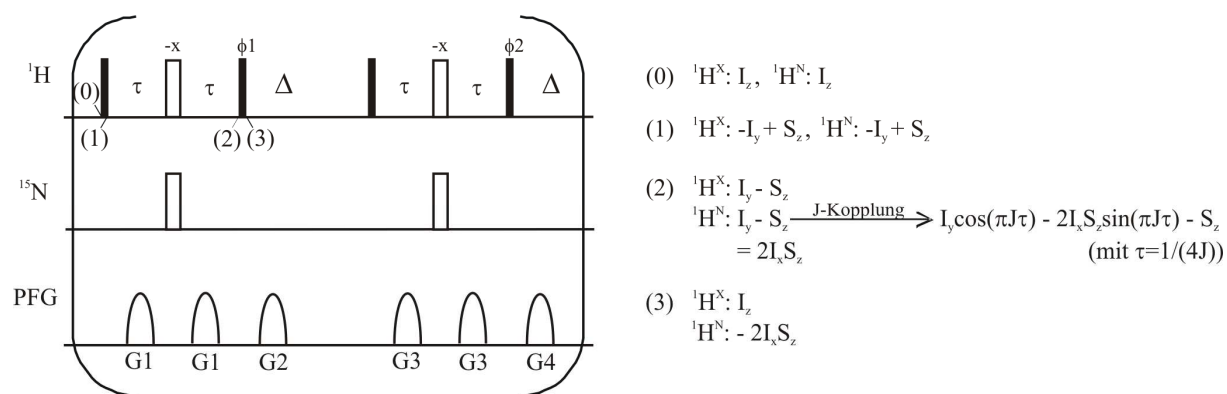


Abb. 2-1 ${}^{15}\text{N}$ -Filterelement zur Unterdrückung der Signale ${}^{15}\text{N}$ -gebundener Protonen. Geschlossene Rechtecke repräsentieren 90° -Pulse, offene Rechtecke 180° -Pulse. Die z-Gradientenpulse werden durch offene Halbellipsen dargestellt und haben folgende relative Gradientenstärken: 16,8 %, 77 %, 19,6 % und 49 %. Alle nicht genannten Pulse besitzen die Phase x, weitere Phasen sind: $\phi_1 = 4(x)$, $4(-x)$ und $\phi_2 = 8(x)$, $8(-x)$; τ beträgt 2,5 ms, $\Delta = 1$ ms. Für vier Punkte ist der Produktoperatorformalismus angegeben, dabei steht ${}^1\text{H}^{\text{N}}$ für ${}^{15}\text{N}$ -gebundene Protonen und ${}^1\text{H}^{\text{X}}$ für ${}^{12}\text{C}$ -gebundene Protonen und für die Wasserprotonen.

Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurde über 1024 *scans* gemittelt. Die Wasserunterdrückung wurde durch die WATERGATE-Sequenz (Piotto *et al.*, 1992) erreicht. Zusätzliche Puffersignale wie GdmCl, DTT und Tris wurden selektiv über einen Vorsättigungspuls minimiert.

2.7.2. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Für die aminosäurespezifische Auflösung bezüglich Bindung, Faltung und Stabilität wurden ${}^1\text{H}/{}^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperimente verwendet. Das FHSQC-Experiment (*fast-Heteronuclear Single-Quantum Correlation*; Abb. 2-2) (Mori *et al.*, 1995) ist eine Weiterentwicklung des konventionellen HSQCs im Hinblick auf eine verbesserte Wasserunterdrückung durch die WATERGATE-Sequenz (*water suppression by gradient tailored excitation*) (Piotto *et al.*, 1992). Die phasensensitive Quadraturdetektion erfolgte durch Inkrementierung von ϕ_1 im States-TPPI-Modus (Marion *et al.*, 1989). Im Allgemeinen wurde eine Datenmatrix von $1024({}^1\text{H}) \times 256({}^{15}\text{N})$ Punkten aufgenommen und durch einfaches *zero filling* prozessiert. In beiden Dimensionen wurde dabei eine cos-Fensterfunktion eingesetzt. Für die Auswertung wurde nur die Tieffeldregion der ${}^1\text{H}$ -Dimension bis zur Wasserresonanz bei ca. 4,7 ppm betrachtet, da alle Amidprotonen in diesem Bereich liegen.

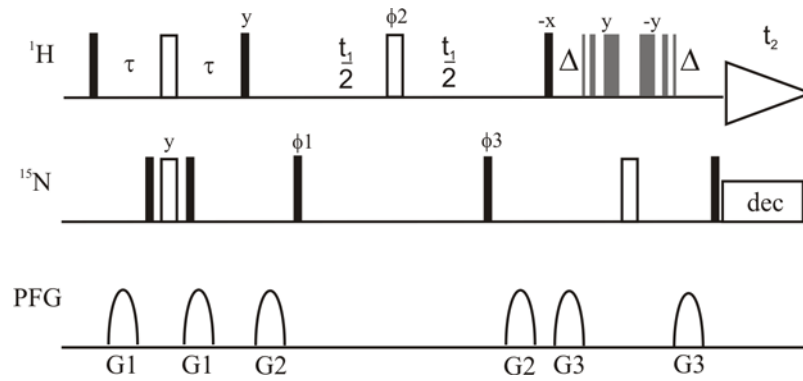


Abb. 2-2 Pulssequenz eines 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ FHSQC-Experimentes (Mori *et al.*, 1995). Die schmalen ausgefüllten Rechtecke repräsentieren 90° -Pulse, breite offene Rechtecke 180° -Pulse; die z-Gradienten werden als offene Halbellipsen dargestellt. Die relativen Gradientenstärken wurden mit 50 %, 80 % und 30 % eingestellt. In der indirekten Dimension (^{15}N) wurde t_1 inkrementiert. Während der Acquisitionszeit t_2 ist auf den ^{15}N -Kanal mit der GARP-Sequenz (Shaka *et al.*, 1985) entkoppelt worden. Sofern nicht anders aufgeführt, erfolgt die Anregung des 90° -Pulses aus x-Richtung. Die Phasenzyklen sind: $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_3 = 4(x), 4(-x)$ und $\text{rec} = (x, -x, x, -x, x, -x, x, -x)$, die Phase des Detektors. Unerwünschte Magnetisierung wird durch die Gradientenpulse G2 dephasiert. Am Ende der Sequenz steht ein selektives 3-9-19-Pulspaar (graue Rechtecke) umgeben von Dephasierungs- und Rephasierungsgradienten (WATERGATE) (Piotto *et al.*, 1992).

Beim $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experiment (*Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy*) wird im Gegensatz zum HSQC-Experiment eine Linienverschmälerung der Resonanzsignale und somit eine höhere Sensitivität erreicht (Weigelt, 1998). Dieser Effekt kommt erst bei größeren Molekülen (größer 20 kDa) und bei hohen Magnetfeldstärken zum Tragen, da aufgrund der längeren Rotations-Korrelationszeiten von großen Proteinen die transversale Relaxationszeit stark verkürzt ist und somit das NMR-Signal rapide absinken und zu Linienverbreiterung und abnehmender spektraler Auflösung führen würde. Im konventionellen HSQC-Experiment ohne Entkopplung entsteht auf Grund von J -Kopplungen ein Multiplett von vier Kreuzsignalen, die alle eine unterschiedliche Linienbreite aufweisen. Die Ursache dafür liegt in konstruktiven bzw. destruktiven Wechselwirkungseffekten zwischen den verschiedenen Relaxationsprozessen, die dabei zum Tragen kommen. So wird bei den angewendeten hohen Magnetfeldstärken für große Proteine die transversale Relaxation (T_2) hauptsächlich durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungsmechanismen und Mechanismen der *chemical shift anisotropy* (CSA) bestimmt. Diese verschiedenen Relaxationsmechanismen haben einen unterschiedlichen Beitrag zur Gesamtrelaxationsrate der einzelnen Kreuzsignale aus dem Multiplett, so dass diese sich stark in ihrer Intensität und Linienbreite unterscheiden. Das TROSY-Experiment selektiert nur die Multiplett-Komponente, bei der die verschiedenen Relaxationsmechanismen fast ausgelöscht sind, was zur Folge hat, dass nur ein Kreuzsignal aus dem Multiplett im Spektrum vorhanden ist.

Das besondere an der TROSY-Sequenz ist der Doppelquanten-Kohärenzschritt, welcher nur von einheitlich an ^{15}N -markierten gebundenen Protonen erreicht werden kann. Da Harnstoff

vernachlässigt), kann es diese Kohärenzselektion nicht eingehen, Harnstoffsignale bleiben somit fast unsichtbar im Spektrum. Deshalb wurden alle Messungen mit ^{15}N -markierten Proteinen, bei denen Harnstoff oder GdmCl im Puffer enthalten war, als $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Experiment durchgeführt. Die phasensensitive Quadraturdetektion erfolgte durch Inkrementierung von ϕ_3 , ϕ_4 , ϕ_7 , ϕ_{10} , des Empfängers und der Gradienten G2 im Echo-Antiecho-Modus.

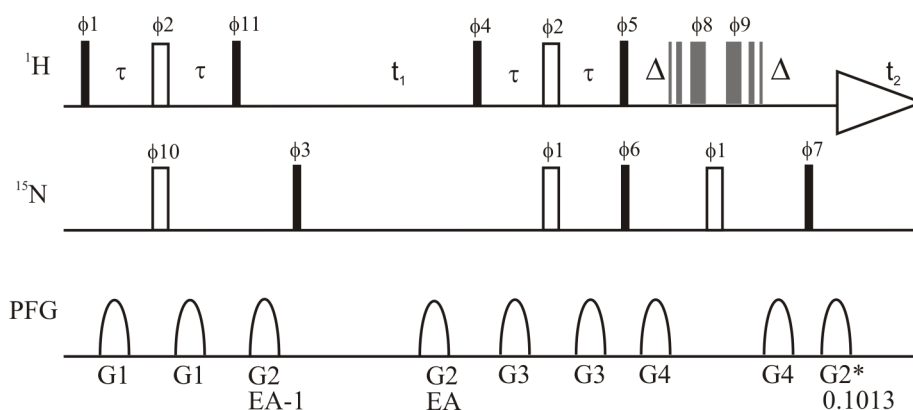


Abb. 2-3 Pulssequenz eines sensitivity- und gradient-enhanced $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -sgTROSY-HSQC-Experimentes (Weigelt, 1998). Ausgefüllte (offene) Rechtecke stellen 90° - (180°)-Pulse dar. Die Anregung des 90° -Pulses erfolgte aus x-Richtung, sofern nicht anders aufgeführt. Die relativen Gradientenstärken betragen 50 %, -80 %, -30 % und -65 %. Der letzte Gradient wird abgeschwächt auf das 0,1013fache des Gradienten G2. In der indirekten Dimension (^{15}N) erfolgt auf t_1 die Inkrementierung. Die eingesetzten Phasenzyklen lauten: $\phi_1 = 2(x), 2(y), 2(-x), 2(-y)$, $\phi_2 = 2(y), 2(-x), 2(-y), 2(x)$, $\phi_3 = (y, -y, -x, x, -y, y, x, -x)$, $\phi_4 = 2(y), 2(-x), 2(-y), 2(x)$, $\phi_5 = 2(-x), 2(-y), 2(x), 2(y)$, $\phi_6 = 2(y), 2(-x), 2(-y), 2(x)$, $\phi_7 = 2(x), 2(y), 2(-x), 2(-y)$, $\phi_8 = 2(x), 2(y), 2(-x), 2(-y)$, $\phi_9 = 2(-x), 2(-y), 2(x), 2(y)$, $\phi_{10} = 2(x), 2(y), 2(-x), 2(-y)$, $\phi_{11} = 2(-y), 2(x), 2(y), 2(-x)$, und $\text{rec} = (x, -x, y, -y, -x, x, -y, y)$, die Phase des Detektors. Die Wasserunterdrückung wird durch ein selektives 3-9-19-Pulspaar (graue Rechtecke) umgeben von Dephasierungs- und Rephasierungsgradienten (WATERGATE), (Piotto *et al.*, 1992) erreicht.

2.7.3. Dreidimensionale NMR-Spektroskopie

Für die sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen von RNase T1 (S54G/P55N) wurde doppelt markierte $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -RNase T1 (S54G/P55N) eingesetzt. Dadurch ergibt sich entlang des Proteinrückgrates eine ununterbrochene Kette NMR-aktiver Kerne, wodurch die Aufnahme von Korrelationsspektren möglich wird, in denen jede Korrelation einer kovalenten Bindung entspricht. Im HNCA-Experiment wird das Amidproton über den Amidstickstoff mit dem Kohlenstoffatom der eigenen, aber auch mit der Vorgängeramino-säure verknüpft. Dabei werden die folgenden skalaren Kopplungen ausgenutzt: $^1J(\text{N}, \text{H}) \sim 90 \text{ Hz}$, $^1J(\text{N}, \text{C}) \sim 15 \text{ Hz}$ und $^2J(\text{N}, \text{C}) \sim 7 \text{ Hz}$ (Abb. 2-4).

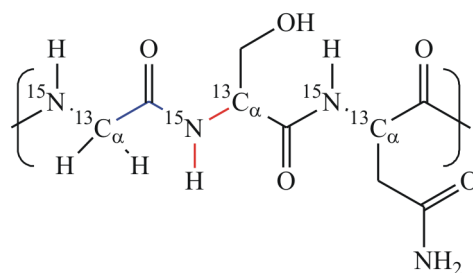


Abb. 2-4 Glycin-Serin-Asparagin-Tripeptid als Ausschnitt einer Aminosäuresequenz. In rot sind Bindungen dargestellt, bei denen die Kopplung über jeweils eine Bindung läuft ($^1J(N,H)$, $^1J(N,C)$). Bei der Kopplung über zwei Bindungen sind die beteiligten Bindungen blau dargestellt ($^2J(N,C)$).

In Abb. 2-5 ist die Pulssequenz des TROSY-basierten HNCA-Experimentes zu sehen. Die Magnetisierung der C^α -Atome wird angeregt, indem sie über $^1H^N \rightarrow N \rightarrow C^\alpha$ und wieder zurück transferiert wird. Diese Art von Experimenten wird als „out and back“ bezeichnet. Die Verwendung von TROSY-Elementen in dem Tripelresonanzexperiment HNCA für protonierte Proteine führt zu einer anderthalbfachen Sensitivitätssteigerung (Salzmann *et al.*, 1998) verglichen mit dem konventionellen HSQC-basierten HNCA-Experiment. Es wurde eine Datenmatrix von $1024(^1H) \times 64(^{15}N) \times 96(^{13}C)$ komplexen Punkten aufgenommen und durch einfaches *zero filling* prozessiert. In allen Dimensionen wurde dabei eine cos-Fensterfunktion eingesetzt.

Neben dem HNCA wurden auch das HNCACB und das HN(CO)CACB aufgezeichnet. Letztere berücksichtigen auch die Korrelation zu den Seitenketten- C^β . Der Weg der Magnetisierung wird bereits durch den Namen des Experimentes impliziert. Im HNCACB wird sie über

$$H^N_i \rightarrow N_i \rightarrow C_{i,i-1}^\alpha \rightarrow C_{i,i-1}^{\alpha,\beta}(t_1) \rightarrow C_{i,i-1}^\alpha \rightarrow N_i(t_2) \rightarrow H^N_i(t_3)$$

und wieder zurück transferiert und im HN(CO)CACB von

$$H^N_i \rightarrow N_i \rightarrow CO_{i-1} \rightarrow C_{i-1}^\alpha \rightarrow C_{i-1}^{\alpha,\beta}(t_1) \rightarrow C_{i-1}^\alpha \rightarrow CO_{i-1} \rightarrow N_i(t_2) \rightarrow H^N_i(t_3)$$

(Salzmann *et al.*, 1999). In ersten Experiment findet der Kohärenztransfer sowohl intraresidual als auch sequentiell statt ($C_{i,i-1}^\alpha$ und $C_{i,i-1}^{\alpha,\beta}$), im HN(CO)CACB nur sequentiell.

Auf eine genauere Beschreibung der Pulssequenzen soll hier verzichtet werden, da diese sich aus der des HNCA-Experimentes leicht ableiten lassen (Salzmann *et al.*, 1998; Salzmann *et al.*, 1999). Die genauen Pulssequenzen sind im Anhang beigelegt.

Abb. 2-5 Pulssequenz eines $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -HNCA-Experimentes nach Salzmann (Salzmann *et al.*, 1998). Schmale ausgefüllte und breite offene Rechtecke stellen 90°-Pulse bzw. 180°-Pulse dar; die z-Gradienten werden als offene Halbellipsen symbolisiert mit den relativen Gradientenstärken von -50 %, 80 %, -80 %, -30 % und -65 %. Die ausgefüllten Halbellipsen präsentieren selektive Pulse und werden als Gauss-Kaskade ausgeführt. Sofern nicht anders aufgeführt, erfolgt die Anregung der 90°-Pulse aus x-Richtung. Die Phasenzyklen sind: $\phi_1 = 2(x), 2(-x)$, $\phi_2 = y, -y$, $\phi_3 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_4 = y$, $\phi_5 = (x)$ und $rec = (x, -x, -x, x)$, die Phase des Detektors. Durch zwei aufeinander folgende INETs wird die ^{15}N -Magnetisierung über ^{15}N auf ^{13}C überführt. Während t_1 entwickelt sich die chemische Verschiebung auf ^{13}C , gleichzeitig wird auf ^1H , ^{15}N und CO entkoppelt. Nach zwei 90°(^{13}C)- und 90°(^{15}N)-Pulsen entwickelt sich die chemische Verschiebung auf ^{15}N während der Evolutionszeit t_2 . Dem abschließenden Kohärenztransfer von ^{15}N auf $^1\text{H}^{\text{N}}$ folgt noch die WATERGATE-Sequenz zur Wasserunterdrückung (Piotto *et al.*, 1992), bevor detektiert wird. Die phasensensitive Quadraturdetektion in der ^{13}C -Dimension erfolgte durch Inkrementierung von ϕ_1 im STATES-TPPI-Modus (Marion *et al.*, 1989), in der ^{15}N -Dimension durch Inkrementierung von ϕ_2, ϕ_4, ϕ_5 , der Phase des Detektors und der mit EA gekennzeichneten Gradienten im Echo-Antiecho-Modus.

49

sich die Gesamt-Aufnahmezeit verkürzt, aber Spektren mit nahezu vergleichbarer Sensitivität liefert.

Die Optimierung und Anpassung der BEST-HNCA-Pulssequenz auf die NMR-Spektrometer der Arbeitsgruppe Biophysik wurden von Rica Patzschke durchgeführt (Patzschke, 2008).

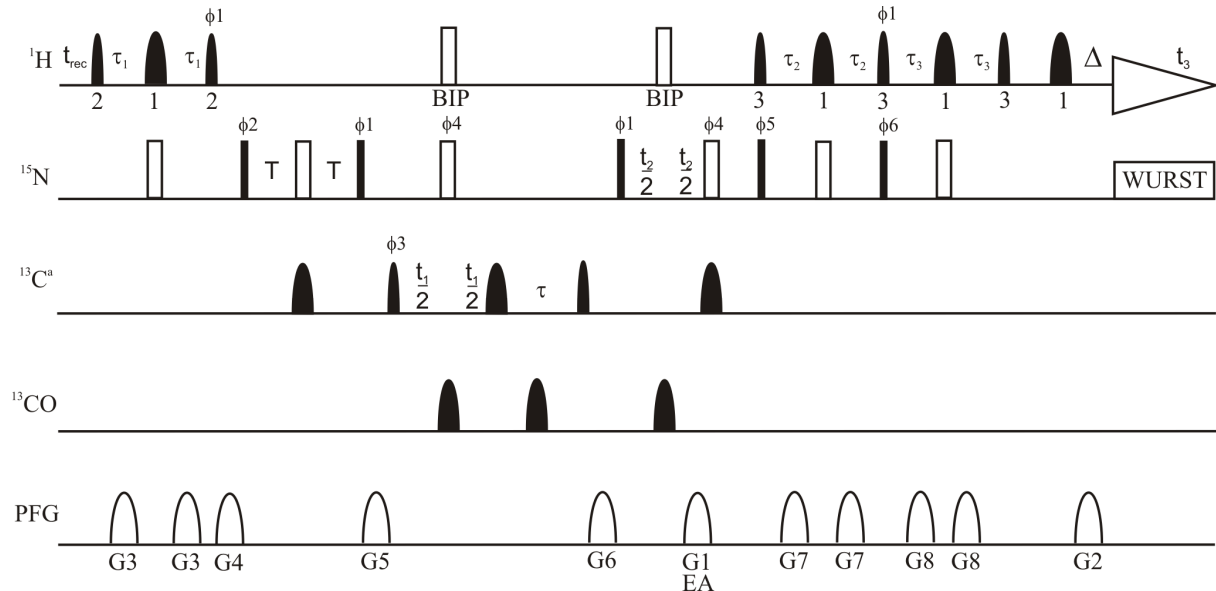


Abb. 2-6 BEST-Pulssequenz für die Aufnahme eines HNCA-Korrelationsspektrums (Lescop *et al.*, 2007). Offene und geschlossene Pulssymbole repräsentieren 90 °- bzw. 180 °-Pulse. Schmale gefüllte Halbellipsen stellen selektive 90 °-Pulse dar und breite gefüllte Halbellipsen sind selektive 180 °-Pulse. Folgende bandselektive Pulse werden verwendet: (1) REBURP (Geen *et al.*, 1991), Pulsdauer 1,5 ms; (2) PC9 (Kupce *et al.*, 1993), Pulsdauer 2,25 ms; (3) E-BURP2 (Geen *et al.*, 1991), Pulsdauer 1,44 ms. Alle bandselektiven ^1H -Pulse sind bei 8,4 ppm zentriert und umfassen einen spektralen Bereich von 4,0 ppm. Der adiabatische ^1H -Entkopplungspuls BIP-720-50-20 (Smith *et al.*, 2001) hat eine Pulsdauer von 150 μs . Die Anregung erfolgt, sofern nicht anders aufgeführt, aus x-Richtung. Weitere Phasenzyklen sind: $\phi_1 = y$, $\phi_2 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = x, -x$; $\phi_6 = y, -y$; und $\text{rec} = (x, -x, -x, x)$, die Phase des Detektors.

Weiterführende dreidimensionale Zuordnungsexperimente wurden mit einfach markierter ^{15}N -RNase T1 durchgeführt. Das ^{15}N -editierte 3D NOESY-HSQC besteht aus den zwei Basiselementen eines NOESY- und eines FHSQC-Spektrums (Talluri & Wagner, 1996). Das ^{15}N -editierte 3D TOCSY-HSQC ergibt sich aus dem jeweiligen NOESY, wenn für τ_m die TOCSY-Mischsequenz eingesetzt wird. In diesem Fall wurde die DIPSI-2rc-(relaxation-compensated)-Sequenz mit einer Mischzeit von 80 ms (Rance, 1987) verwendet. Beide Pulssequenzen finden sich im Anhang wieder. Es entstand eine Datenmatrix von $1024(^1\text{H}) \times 64(^{15}\text{N}) \times 206(^1\text{H})$ komplexen Punkten, welche durch einfaches *zero filling* prozessiert wurde. In allen Dimensionen wurde eine cos-Fensterfunktion eingesetzt.

Alle Messungen bezüglich der Zuordnung erfolgten am AvanceIII800 (mit Kryoprobekopf) bei 10°C in 10 mM Bis-Tris, pH^{10°C} 6,0, 10 % (v/v) D₂O und 0,6 M GdmCl. Einige Zuordnungsexperimente (HNCA, HNCACB, NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC) wurden in Abwesenheit von GdmCl bei 25 °C wiederholt.

2.7.4. NMR-Titrations zur Lokalisierung der primären Bindestellen in SlyD*

Um einen aminosäurespezifischen Einfluss eines Substratbindeereignisses zu analysieren, werden NMR-Titrations durchgeführt und über $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektren detektiert. Die jeweiligen experimentellen Bedingungen für die Titrations sind in Tab. 2-4 zusammengefasst. Nach jedem Titrationsschritt wurde die Probe im NMR-Röhrchen für zehn Minuten inkubiert und anschließend wurde ein FHSQC-Spektrum mit 384 Datenpunkten in der indirekten Dimension aufgezeichnet.

Tab. 2-4 Experimentelle Bedingungen für die NMR-Titrations.

NMR-beobachtetes Protein (Startkonzentration)	Substrat (Startkonzentration)	Konzentrations- verhältnis am Ende	Puffer, Temperatur
^{15}N -SlyD* (1 mM)	RCM- α -La (1,95 mM)	1 : 1,25	50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5, 25 °C
^{15}N -SlyD* (0,63 mM)	RCM-T1 (2,64 mM)	1 : 1,76	50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5, 25 °C
^{15}N -SlyD* (0,68 mM)	Tat-Peptide ^{1,2,3} (9,51 mM ¹ ; 4,24 mM ^{2,3})	1 : 8 ¹ ; 1: 3,1 ^{2,3}	50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5, 25 °C
^{15}N -E.c.SlyD(1-155) (0,56 mM)	NiCl_2 (27 mM)	1 : 4,67	50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5, 25 °C
^{15}N -SlyD* (0,4 mM)	RNase T1 (4,36 mM)	1 : 3	10 mM Bis-Tris, pH ^{20°C} 6.0, 20 °C
^{15}N -RNase T1 (0,4 mM)	SlyD* (4,66 mM)	1 : 3	10 mM Bis-Tris, pH ^{20°C} 6.0, 20 °C

Sequenz der Tat-Peptide:

¹ SDKPISKRRDAVK (VRR), ² SRRDAVKVMLGTAAA (RR), ³ SKKDAVKVMLGTAAA (KK).

Befinden sich Substrat und Bindungspartner im schnellen Austausch bezogen auf die NMR-Zeitskala (mit $k_{ex} \gg \Delta\delta$), so verschieben sich die Kreuzsignale der betroffenen Aminosäurereste im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrum. Dies ist der Fall, wenn das Bindungsereignis durch hohe Dissoziationskonstanten gekennzeichnet ist. Die relative mittlere chemische Verschiebung kann dann an Hand der folgenden Gleichung ([2.18]) berechnet werden (Grzesiek *et al.*, 1996):

$$\Delta\delta_{MWR} (ppm) = \sqrt{\frac{\Delta\delta(^1H)^2 + \frac{1}{25} \Delta\delta(^{15}N)^2}{2}} \quad [2.18]$$

mit $\Delta\delta$, der gemittelten Veränderung der chemischen Verschiebung, $\Delta\delta(^1H)^2$, der Veränderung der chemischen Verschiebung in der 1H -Dimension und $\Delta\delta(^{15}N)^2$, der Veränderung der chemischen Verschiebung in der ^{15}N -Dimension.

Befinden sich beide miteinander wechselwirkende Bindungspartner im langsamen Austausch, was einem höher affinen Bindungsverhältnis entspricht, verändern sich die Intensitäten der jeweiligen Kreuzsignale.

Die Anpassung der Titrationsdaten und Berechnung der Dissoziationskonstante K_D und der Stöchiometrie n erfolgt nach einem einfachen Bindungsmodell mit einer Bindestelle ([2.19]).

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\max} \cdot \frac{((P + n \cdot L_1 + K_D) - \sqrt{(P + n \cdot L_1 + K_D)^2 - 4 \cdot P \cdot n \cdot L_1}))}{2 \cdot P} + m \cdot L_1 \quad [2.19]$$

$$\text{mit } P = \frac{P_0}{V_0 + L} \cdot V_0$$

$$\text{mit } L_1 = \frac{P_0}{V_0 + L} \cdot L$$

Dabei steht P für die absolute Proteinkonzentration, P_0 für die Ausgangs-proteinkonzentration, V_0 für das Ausgangsvolumen, L_1 für die absolute Konzentration des Liganden und L für die jeweils zugegebene Menge an Ligand. Der maximal erreichbare Plateauwert wird mit $\Delta\delta_{\max}$ bezeichnet und variiert je nach Messmethode. Lineare Abweichungen werden durch den Term $m \cdot L_1$ berücksichtigt.

2.7.5. Harnstoffinduzierte Übergangskurven von SlyD*

Zwei Proben von SlyD* mit einer Proteinkonzentration von jeweils 0,67 mM wurden vorbereitet, eine für das native Protein (50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) D₂O) und eine für das entfaltete in 7,4 M Harnstoff. Um verschiedene Harnstoffkonzentrationen bei gleich bleibender Proteinkonzentration zu erhalten, wurden definierte Aliquots aus beiden Proben entnommen und mit der jeweils anderen Probe vermischt. Von beiden Ausgangsproben und nach jedem Probentausch wurden sowohl Protonenspektren mit einer spektralen Breite von 7812,5 Hz, als auch $^1H/^{15}N$ -TROSY-HSQC-Spektren mit 384 Datenpunkten in der indirekten Dimension aufgezeichnet. Nach jeder Messung wurde eine Probe von 10 µl für die genaue Bestimmung der Harnstoffkonzentration über Brechungsindices (nach Gleichung [2.3]) entnommen. In Gegenwart von 0,8 mM NiCl₂

wurde ein weiterer Harnstoffübergang von SlyD* (0,8 mM) gemessen. Die SlyD*ΔIF-Variante wurde analog vermessen.

2.7.6. NMR-spektroskopische Detektion des Amidprotonenaustauschs

Für den langsamen H/D-Austausch wurde entweder lyophilisierte ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) in 10 mM Bis-Tris, $\text{pD}^{10^\circ\text{C}}$ 6.0, 100 % D_2O gelöst bzw. in wässrigem Puffer gelöstes ^{15}N -SlyD* durch schnellen Pufferwechsel über eine PD10-Säule in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.1 (abgelesen, entspricht pD 7.5), 100 % D_2O überführt. Die Abnahme der Intensität der Amidprotonenresonanzen des jeweiligen Proteins wurde im Laufe der Zeit durch die Aufnahme einer Serie von ^{15}N -FHSQC-Spektren über 24 Stunden bei 20°C (RNase T1 (S54G/P55N)) bzw. über 72 Stunden bei 15°C (SlyD*) verfolgt. Um schnell austauschende Amidprotonensignale von SlyD* besser detektieren zu können, wurde zusätzlich ein H/D-Austausch gestartet, bei dem im Abstand von fünf Minuten FHSQC-Spektren aufgezeichnet wurden. Die Austauschrate für jedes Amidproton wird durch Anpassen der abfallenden Signalintensität mit einer monoexponentiellen Funktion bestimmt. Weitere H/D-Austauschexperimente wurden in Gegenwart von 0,62 M, 1,07 M und 1,66 M Harnstoff durchgeführt.

Für Austauschprozesse im ms-Bereich wurden schnelle Austauschtechniken angewendet. Der schnelle Amidprotonenaustausch greift im Gegensatz zur Detektion beim H/D-Austausch nicht auf die im Lösungsmittel vorhandenen NMR-inaktiven Deuteronen zurück, sondern detektiert die zurückkehrende Magnetisierung durch Lösungsmittelprotonen, die mit den Amidprotonen des Proteins ausgetauscht haben. Dabei wird vor dem Start der Austauschreaktion die Magnetisierung der ^{15}N -gebundenen Protonen durch einen ^{15}N -Filter komplett ausgelöscht. Während gewisser Austauschzeiten (10 - 250 ms) kann die Magnetisierung der Amidprotonen durch chemischen Austausch mit den polarisierten Lösungsmittelprotonen zurückgewonnen werden. Demnach wird ein Anstieg des NMR-Signals der einzelnen Amidprotonenresonanzen beobachtet.

Die dem Experiment zu Grunde liegende New MEXICO-Technik stammt von Koide und Mitarbeitern (Koide *et al.*, 1995) (Pulssequenz im Anhang, 8.3). Hierbei handelt es sich um eine modifizierte MEXICO- (*Measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds*) Pulssequenz auf Basis von $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (Gemmecker *et al.*, 1993). In der Pulssequenz folgt zunächst ein 90° -Puls, der die Magnetisierung aller Protonen in die xy-Ebene auslenkt. Im Anschluss folgt eine Wartezeit von 55 ms, in der nur die Wasserprotonen auf Grund des *radiation damping*-Effektes mit einer stark verkürzten Spin-Gitter-Relaxationszeit wieder in das thermische Gleichgewicht (Magnetisierung in z-

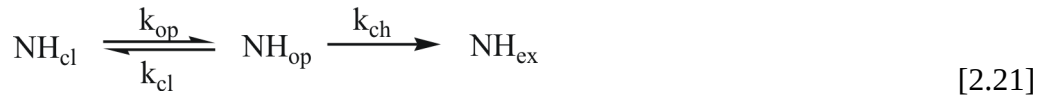
Richtung) zurückkehren können. Durch den sich anschließenden Gradienten wird die restliche Magnetisierung in der xy-Ebene dephasiert. Erst dann folgt der bereits erwähnte ^{15}N -Filter, der spezifisch die Magnetisierung der ^{15}N -gebundenen Protonen auslöscht. Der Grund für diese Vorbereitungsphase vor dem Filterelement liegt darin, dass die ^{15}N -gebundenen Protonen sonst nicht nur durch Austauschreaktionen mit Wasserprotonen, sondern auch über NOE-Effekte (*nuclear overhauser enhancement*) ihre Magnetisierung durch die ^{12}C -gebundenen Protonen wiedererlangen könnten.

Die beobachtete Austauschrate der einzelnen Amidprotonen ergibt sich aus [2.20]:

$$\frac{S(t)}{S_{ref}} = \frac{k_{HX}}{R_1 + R_w} [\exp(-R_w t) - \exp(-(R_1 + k_{HX})t)] \quad [2.20]$$

mit der Signalintensität nach der Austauschzeit $S(t)$, der Signalintensität S_{ref} vor der New MEXICO-Pulssequenz (aus dem Referenzspektrum ohne ^{15}N -Filter), die Relaxationsrate der Wasserprotonen R_w ($R_w = 0,42\text{s}^{-1}$, persönliche Mitteilung U. Weininger) und der Relaxation der Amidprotonen R_1 .

In beiden Austauschexperimenten werden sehr schnell die strukturell leicht zugänglichen Amidprotonen ausgetauscht. Das sind Amidprotonen, die nicht in Sekundärstrukturelemente eingebunden sind und z.B. nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen an einem Austausch gehindert werden. Beim langsamen H/D-Austausch werden Raten im Bereich von wenigen Minuten bis hin zu mehreren Tagen gemessen, während beim schnellen Amidprotonenaustausch Raten im Bereich von $0,2\text{s}^{-1}$ bis 100s^{-1} zugänglich werden. Mit Hilfe der beobachteten Austauschrate können sogenannte Schutzfaktoren (P) und thermodynamische Stabilitätsparameter berechnet werden (Roder *et al.*, 1988; Bai *et al.*, 1995a). Dabei muss gewährleistet sein, dass sich das System im EX2-Bereich befindet. Das einfachste Modell, um die zugrunde liegenden Austauschprozesse beschreiben zu können, ist wieder ein Zweizustandsmodell ([2.5]) (Hvidt *et al.*, 1966). Jedes Amidproton kann in zwei Konformationen vorkommen: dem offenen und damit austauschkompetenten Zustand (NH_{op} , *open state*) und dem geschlossenen (NH_{cl} , *closed state*) Zustand ([2.21]). Die Öffnungs- und Schließraten der geschützten Wasserstoffbrückenbindung sind mit k_{op} bzw. k_{cl} gegeben. Die H/D-Austauschrate bzw. die Austauschrate der Amidprotonen mit den Lösungsmittelprotonen im New MEXICO-Ansatz wird als k_{ch} (*chemical exchange*) bezeichnet. Die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion des Austausches ist in [2.22] wiedergegeben.



$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}} \cdot k_{\text{ch}}}{k_{\text{op}} + k_{\text{cl}} + k_{\text{ch}}} \quad [2.22]$$

Nun können verschiedene Grenzfälle betrachtet werden. Ist die Schließreaktion schneller als der chemische Austausch ($k_{\text{cl}} \gg k_{\text{ch}} + k_{\text{op}}$), so vereinfacht sich Gleichung [2.21] zu [2.23]. Das System liegt unter EX2-Bedingungen vor. Die Austauschreaktion wird dann über die Gleichgewichtskonstante $K_{\text{eq}} = \frac{k_{\text{op}}}{k_{\text{cl}}}$ bestimmt und erlaubt die Bestimmung von thermodynamischen Stabilitätsparametern.

$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}}}{k_{\text{cl}}} \cdot k_{\text{ch}} \quad [2.23]$$

Ist die chemische Austauschrate jedoch größer als die Schließrate ($k_{\text{ch}} \gg k_{\text{cl}} + k_{\text{op}}$), reduziert sich Gleichung [2.21] zu [2.24] und die strukturellen Öffnungsraten der Wasserstoffbrückenbindung können direkt aus den Austauschraten abgelesen werden, da jede Öffnungsreaktion zum Austausch führt. In diesem Fall wird vom EX1-Mechanismus gesprochen.

$$k_{\text{ex}} = k_{\text{op}} \quad [2.24]$$

Der chemische Austauschprozess (k_{ch}) kann säure- bzw. basenkatalysiert werden ([2.25]). Deshalb ist es möglich, unter Variation des pH-Wertes ein System in den EX2 bzw. EX1-Bereich zu drücken, um die jeweils erwünschten Parameter zu bestimmen. Über den EX1-Mechanismus sind direkt lokale oder globale Entfaltungsraten zugänglich, während im EX2-Bereich thermodynamische Stabilitätsparameter bestimmt werden können.

$$k_{\text{ch}} = k_{\text{int}} \cdot [\text{OH}^-] \quad [2.25]$$

Im EX2-Bereich kann der Schutzfaktor ($P = \frac{1}{K_{\text{eq}}}$) aus der intrinsischen Austauschrate k_{int} , die sich aus Berechnungen mit Peptidmodellen ergeben (Molday *et al.*, 1972; Bai *et al.*, 1993; Connelly *et al.*, 1993), und der beobachteten Austauschrate k_{ex} berechnet werden ([2.26]). Die freie Stabilisierungsenthalpie ergibt sich dann aus Gleichung [2.27].

$$P = \frac{k_{\text{int}}}{k_{\text{ex}}} \quad (\text{EX2}) \quad [2.26]$$

$$\Delta G = -RT \ln\left(\frac{1}{P}\right) \quad [2.27]$$

2.7.7. Echtzeit-NMR-Spektroskopie

Die hier durchgeführten NMR-Experimente zur Beobachtung von Reaktionen in Echtzeit bestanden aus in Folge aufgenommenen einzelnen Spektren. Jedes einzelne Spektrum symbolisiert einen gewissen Zustand im Verlaufe der Reaktion. Die Zunahme von Signalintensität entspricht dem Entstehen einer Spezies, währenddessen abnehmende Signale von verschwindenden Spezies stammen. Mit der Kenntnis der Zugehörigkeit der Signale können ortsspezifische Aussagen über das Reaktionsgeschehens getroffen werden (Abb. 2-7).

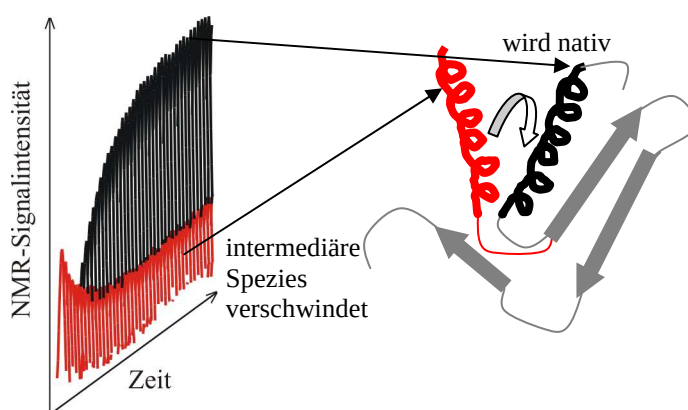


Abb. 2-7 Veranschaulichung des Vorgehens bei Echtzeit-NMR-Experimenten. Das Strukturmodell in grau und schwarz symbolisiert den nativen Zustand eines Proteins mit den Sekundärstrukturelementen α -Helix und β -Faltblatt. Die Position der roten α -Helix soll einen intermediären Zustand während einer Proteinfaltungsreaktion darstellen.

2.7.7.1. Rückfaltungsexperimente mit RNase T1 (S54G/P55N)

Für alle Rückfaltungsexperimente wurden jeweils 450 μl Rückfaltungspuffer (10 mM Bis-Tris, $\text{pH}^{10^\circ\text{C}}$ 6.0, 10 % (v/v) D_2O) auf Eis vorgelegt und mit 50 μl in 6 M GdmCl bei 4°C entfalteter RNase T1 (S54G/P55N) schnell gemischt, kurz abzentrifugiert und ins NMR-Röhrchen überführt. Die Messung wurde nach kurzer Feinabstimmung am NMR-Gerät sofort gestartet, so dass eine Totzeit von ca. drei bis fünf Minuten (je nach durchgeführter Reaktion) resultierte. Für die durch SlyD* katalysierten Rückfaltungsreaktionen wurde im Rückfaltungspuffer die entsprechende Menge SlyD* mit vorgelegt.

1D ^1H -Spektren während der Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N)

Die Rückfaltungsreaktion von 1,9 mM RNase T1 (S54G/P55N) (Endkonzentration) wurde, wie oben beschrieben, gestartet. Eine zweite Rückfaltung fand in Gegenwart von 190 μM SlyD* statt. Während der Rückfaltung wurden am AvanceIII 600-Spektrometer 512 ^1H -Spektren in Folge aufgenommen. Dazu wurde das Pulsprogramm *jbshotprwg2.uw* (Anhang, 8.3) verwendet, welches die Daten in Form einer 2D-Matrix aufnimmt. Einzelne Resonanzen konnten somit einfach mit dem Programm *felix* unter Verwendung der Felix-Makros *add* und *gv1* (8.4) integriert werden. Der Zeitverlauf der Rückfaltung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst. Die Gesamtdauer eines Rückfaltungsexperimentes betrug 11 h 25 min, die Zeit für die Aufnahme eines Spektrums war 80,3 s.

2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren während der Rückfaltung von ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N)

Analog zu den eindimensionalen Experimenten wurde die Rückfaltung von 875 μM ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) einmal in Abwesenheit und ein zweites Mal in Anwesenheit von 87,5 μM SlyD* gestartet. Während der Rückfaltungsreaktion wurden am AvanceIII600 40 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren (2.7.2) mit 128 Datenpunkten in der indirekten Dimension aufgezeichnet. Die Gesamtdauer des Experimentes betrug ca. 13 Stunden. Zur Auswertung mittels monoexponentieller Fitfunktion wurden die integrierten Volumina der einzelnen Kreuzsignale im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum herangezogen.

2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren von ^{15}N -SlyD* während der Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N)

Zur Entfaltung wurden 11,6 mM RNase T1 (S54G/P55N) über Nacht in 4 M GdmCl inkubiert. Bei 4 °C wurde die Rückfaltung durch zehnfache Verdünnung in 10 mM Tris, pH 7.5 gestartet und in einer schnellen Umpufferung über eine PD10-Säule das GdmCl entfernt. Nach Zugabe von 400 μM ^{15}N -SlyD* erfolgten die Überführung der Probe in das NMR-Röhrchen und der schnelle Start der Detektion durch 10-minütige $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren im bereits abgestimmten NMR-Spektrometer. Die Totzeit des Experimentes betrug 9,5 Minuten. Das Referenzspektrum von freiem SlyD* wurde mit einer zweiten Probe in gleichen Pufferbedingungen aufgezeichnet.

3D Zuordnungsexperiment während der Rückfaltung von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -RNase T1 (S54G/P55N)

Ein sich schnell populierendes Faltungsintermediat von RNase T1 (S54G/P55N) faltet unter *trans* $\rightarrow$ *cis*-Prolylisomerisierung langsam in den nativen Endzustand (siehe Abb. 1-5B). Dieses Faltungsintermediat kann mit *fast-pulsing* NMR-Methoden (1.1.2) untersucht werden. Die Rückfaltung wurde mit 800 μM $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -RNase T1 (S54G/P55N) in Abwesenheit bzw. ein zweites Mal in Anwesenheit von 80 μM SlyD* gestartet. Nach drei Minuten experimentell bedingter Totzeit wurde in fünf Minuten ein FHSQC-Spektrum vom Intermediat aufgezeichnet. Gleich im Anschluss startete das BEST-HNCA (2.7.3) zur Zuordnung des Intermediates. Es wurde eine Datenmatrix von 1024(^1H) x 64(^{15}N) x 96(^{13}C) komplexen Punkten aufgenommen und durch einfaches *zero filling* prozessiert. In allen Dimensionen wurde eine cos-Fensterfunktion eingesetzt.

2.7.7.2. Beobachtung der Insulinaggregation

Die Insulinpräparation wurde entsprechend 2.3.3. durchgeführt. Die Inkubation von 450 μM Insulin in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5, 10 % (v/v) D_2O erfolgte bei 25 °C direkt im NMR-Röhrchen. Für die Messungen in Anwesenheit von ^{15}N -SlyD* wurden 900 μM des Proteins mitinkubiert. Durch Zugabe von 10 mM DTT (Endkonzentration) wurde die Aggregationsreaktion im NMR-Röhrchen gestartet, welches im Anschluss sofort ins Spektrometer überführt wurde.

1D ^1H -Spektren während der Aggregation der Insulinkette B

Um in einem ^1H -Spektrum nur Resonanzen vom Insulin sehen zu können, wurde ein ^{15}N -Filter in die Pulssequenz eingebaut, der die Magnetisierung der ^{15}N -gebundenen Protonen von ^{15}N -markiertem SlyD* auslöscht (siehe auch Kapitel 2.7.1, Pulsprogramm *shotzgprwg15NF.ch* im Anhang, 8.3). Während der Aggregation wurden an einem AvanceIII 600-Spektrometer 128 Spektren im Abstand von 43 s aufgezeichnet. Die Gesamtdauer des Experimentes betrug 1 h 32 min. Die Daten wurden mit dem Programm *felix* ausgewertet. Vor der Zugabe von DTT wurde noch ein Referenzspektrum von Insulin aufgezeichnet (Pulsprogramm *zgprwg_15Nfilter.ch* im Anhang, 8.3).

2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektren von ^{15}N -SlyD* während der Insulinaggregation

Zunächst wurde ein Referenzspektrum von SlyD* aufgezeichnet. Nach dem Start der Reaktion durch DTT wurden 15 schnelle FHSQC-Spektren mit 128 Punkten in der indirekten

Dimension aufgezeichnet. Die Dauer eines FHSQC-Spektrums lag bei 4 min 52 s. Die Auswertung der Spektren erfolgte analog zu den NMR-Titrationsen und der Analyse der chemischen Verschiebung mittels Gleichung [2.14].

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Thermodynamische Stabilität von *E.c.SlyD*

Die Abwesenheit des im Volllängen-SlyD vorhandenen unstrukturierten C-terminalen Teils (Martino *et al.*, 2009) beeinflusst die beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Funktionen als Chaperon und PPIase nicht. Daher wurde die verkürzte Variante *E.c.SlyD*(1-165) (SlyD*) verwendet, die in früheren Arbeiten bereits eingehend bezüglich ihrer thermodynamischen Stabilität untersucht worden ist (Scholz *et al.*, 2005; Knappe *et al.*, 2007). Vorbereitend für weiterführende NMR-Untersuchungen zur Stabilität von SlyD* wurden die thermodynamischen Parameter erneut ermittelt, wobei Abweichungen von den bereits bekannten Daten auftraten, weshalb dieser Aspekt näher untersucht werden musste.

In der vor kurzem veröffentlichten Kristallstruktur eines homologen thermophilen SlyD-Proteins (TtSlyD) konnte eine hoch affine Ni^{2+} -Bindestelle am Ende der letzten Helix der FKBP-Domäne (H145-H147-H149) gefunden werden (Löw *et al.*, 2009). Das in der Kristallform gebundene Ni^{2+} -Ion wurde durch die Reinigung von TtSlyD mittels immobilisierter Ni-Ionenaffinitätschromatographie an einer Ni-Sepharose-Säule unbemerkt mitgeschleppt. Kürzlich wurde auch herausgefunden, dass das Wildtyp-SlyD aus *E. coli* an der Biosynthese einer Hydrogenase mit einem NiFe-Metallzentrum involviert ist (Leach *et al.*, 2007). Außerdem ist bekannt, dass die PPIase-Funktion reversibel durch Ni^{2+} -Ionen inhibiert werden kann (Hottenrott *et al.*, 1997). Auf Grund dieser Tatsachen wurde die thermodynamische Stabilität von SlyD*, das ebenfalls über immobilisierte Ni-Ionenaffinitätschromatographie (Ni-IMAC) gereinigt wurde (2.4.2), in Anwesenheit von Ni^{2+} -Ionen untersucht.

3.1.1. Harnstoffinduzierte Entfaltungsübergänge im Gleichgewicht

Zur Analyse der thermodynamischen Stabilität von SlyD* mit Hilfe spektroskopischer Methoden wird auf die intrinsische Fluoreszenz von vier Tyrosinresten zurückgegriffen (Y13, Y34, Y68, Y72). Der entfaltete Zustand von SlyD* ist durch einen starken Anstieg der Fluoreszenz charakterisiert, wobei das Emissionsmaximum unverändert bleibt (Anhang, Abb. 8-1).

Die harnstoffinduzierte Entfaltung wurde über das Fluoreszenzsignal bei 308 nm verfolgt. Die resultierenden Übergangskurven sind in Abb. 3-1 dargestellt. Sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von NiCl_2 können die Kurvenverläufe nach einem Zweizustandsmodell mit

hoch kooperativen Übergängen nach Gleichung [2.10] angepasst werden. Die daraus abgeleiteten Stabilitätsparameter sind in Tab. 3-1 zusammengefasst. Deutlich wird die Übereinstimmung der Stabilitätsparameter der Probe von SlyD*, der Ni^{2+} explizit zugesetzt wurde, mit einer Probe, die nach dem ersten Reinigungsschritt über Ni-IMAC erhalten wurde. Da SlyD* einen C-terminalen His₆-Tag besitzt, ist eine Auswertung der Stabilitätsparameter in Gegenwart von Ni^{2+} nicht zulässig, da der His₆-Tag dazu beiträgt, dass Ni^{2+} gebunden wird (Liu *et al.*, 2003; Knecht *et al.*, 2009) und die in Gegenwart von Ni^{2+} ermittelten thermodynamischen Stabilitätsparameter verfälscht werden. Mit Hilfe von ITC-Messungen von SlyD* mit Ni^{2+} konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der His₆-Tag einen erheblichen Einfluss auf die Affinität von Ni^{2+} zu SlyD* hat (3.1.4) und auch in der Kristallstruktur von TtSlyD wird eine Beteiligung des His₆-Tags an der Ni^{2+} -Bindung beobachtet (Löw *et al.*, 2009). Aus diesen Gründen wurde die Variante *E.c.*SlyD(1-155) hergestellt, die weder einen His₆-Tag noch weitere Histidine im C-terminalen Bereich nach dem finalen His-Gly-His-Xaa-His-Motiv der letzten Helix der FKBP-Domäne aufweist (Abb. 1-6). Nur diese Variante kann in Gegenwart von Ni^{2+} bezüglich ihrer thermodynamischen Stabilität ausgewertet werden. Beide *E.c.*SlyD-Varianten unterscheiden sich im Wesentlichen nicht in ihrer Stabilität bezogen auf die harnstoffinduzierte Entfaltung ohne Ni^{2+} . In Gegenwart von Ni^{2+} konnte für die hier relevante Variante *E.c.*SlyD(1-155) bei gleich bleibend hoher Kooperativität eine um 12,6 kJ/(mol·M) höhere freie Stabilisierungsenthalpie beobachtet werden.

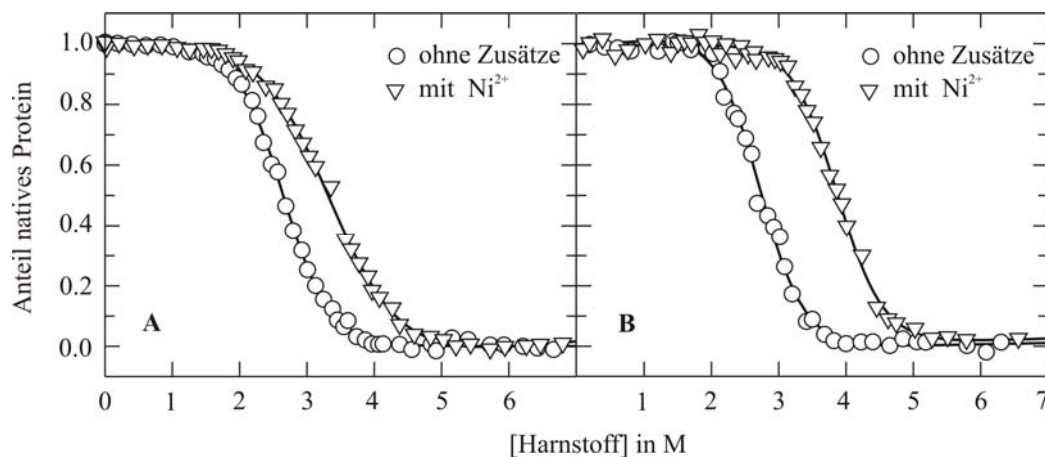


Abb. 3-1 Harnstoffinduzierte Entfaltungsübergänge von SlyD. Entfaltungsübergang von **A** SlyD* (*E.c.*SlyD(1-165)-His₆) und **B** *E.c.*SlyD(1-155) in Abwesenheit und in Anwesenheit von 50 μM NiCl_2 . Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassung der Daten an das Zweizustandsmodell dar. Die Übergänge wurden in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 15 °C gemessen. Die Proteinkonzentration war 5 μM .

Tab. 3-1 Stabilitätsparameter der beiden E.c.SlyD-Varianten aus harnstoffinduzierten Entfaltungsübergängen.

	nach 1. Reinigungsschritt	SlyD*		SlyD(1-155)	
		ohne Ni ²⁺	+ Ni ²⁺	ohne Ni ²⁺	+ Ni ²⁺
$\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$ in kJ/mol	15,7 ± 0,4	18,4 ± 0,6	14,5 ± 0,6	19,9 ± 1,5	27,1 ± 1,3
m in kJ/(mol·M)	4,6 ± 0,1	6,9 ± 0,2	4,2 ± 0,2	7,3 ± 0,5	7,0 ± 0,3
$[D]_{1/2}$ in M	3,4	2,7	3,5	2,7	3,9

Alle Übergänge wurden in 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 15 °C gemessen. Die Proteinkonzentration war 5 µM. Die NiCl₂-Konzentration betrug 50 µM. SlyD* = SlyD(1-165)-His₆. Die Fehler resultieren aus der Anpassung der Daten an Gleichung [2.10].

3.1.2. Thermisch induzierte Entfaltungsübergänge im Gleichgewicht

Um mehr Hinweise auf die Gültigkeit des Zweizustandmodells (Gleichung [2.5]) zu erhalten, wurden neben harnstoffinduzierten Entfaltungsübergängen auch thermisch induzierte Entfaltungsübergänge gemessen und mit verschiedenen spektroskopischen Methoden detektiert. Die Entfaltungsübergänge, die mittels nah-UV und fern-UV CD-Spektroskopie (Abb. 3-2) detektiert wurden, und der mittels UV-Absorption detektierte Entfaltungsübergang zeigen einen Kurvenverlauf, der mit dem Zweizustandsmodell beschrieben werden kann (Tab. 3-2). Veränderungen in der Sekundärstruktur während der Entfaltung (detektiert mit Hilfe von fern-UV CD-Spektroskopie) stimmen mit den Veränderungen in der Tertiärstruktur, welche mit Hilfe von nah-UV CD-Spektroskopie, UV-Absorption und Fluoreszenz (bei der harnstoffinduzierten Entfaltung) detektiert wurden, überein. Da sich die unterschiedlichen optischen Eigenschaften von SlyD* während der Entfaltung (nach Normierung) deckungsgleich verhalten, kann SlyD* als ein Zweizustandsfalter betrachtet werden (Lumry *et al.*, 1966). Die Unterschiede in den freien Stabilisierungsenthalpien zwischen den harnstoffinduzierten (18,4 ± 0,6 kJ/mol) und thermisch induzierten Entfaltungsübergängen (UV: 12,1 ± 1,8 kJ/mol) können darauf zurückgeführt werden, dass für die CD-Messungen ein Puffer mit geringerem Salzgehalt eingesetzt wurde. Eine weitere Ursache könnte die mögliche Abweichung der theoretisch ermittelten Änderung der Wärmekapazität (für SlyD*-His₆-Tag mit 171 Aminosäuren: 8,55 k/(mol·K)) von der tatsächlichen sein (Makhatadze *et al.*, 1990).

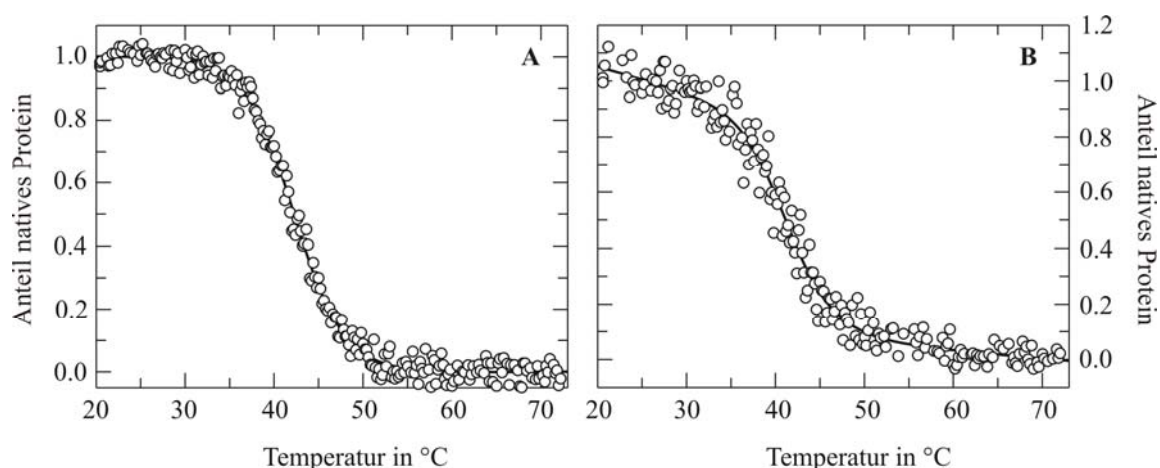


Abb. 3-2 Thermisch induzierte Entfaltungsübergänge von SlyD* mittels CD-Spektroskopie detektiert. Die Übergänge wurden in 2,5 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaCl, pH 7.5 mit einer Aufheizrate von 0,5 °C/min gemessen. **A** Die thermische Entfaltung von 250 µM SlyD* wurde mittels nah-UV CD-Spektroskopie bei 280 nm detektiert. **B** Die Detektion der Entfaltung erfolgte mittels fern-UV CD-Spektroskopie bei 220 nm. Die Proteinkonzentration betrug 15 µM.

Tab. 3-2 Stabilitätsparameter aus den thermisch induzierten Entfaltungsübergängen von SlyD*.

	UV-Absorption	nah-UV CD	fern-UV CD
$\Delta H_U(T_m)$ in kJ/mol	$296,0 \pm 10,9$	$283,5 \pm 12,3$	$301,9 \pm 32,1$
$\Delta S_U(H_2O)$ in J/(mol·K)	$457,6 \pm 6,0$	$430,0 \pm 6,0$	$512,6 \pm 12,7$
$\Delta G_U(H_2O)$ in kJ/mol	$12,1 \pm 1,8$	$11,2 \pm 1,8$	$11,9 \pm 3,8$
T_m in °C	$42,3 \pm 0,2$	$41,9 \pm 0,2$	$41,1 \pm 0,4$

Alle Übergänge wurden in 2,5 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaCl, pH 7.5 gemessen bei einer Heizrate von 0,5 °C/min. Die Proteinkonzentration war 30 µM bei der Detektion mittels UV-Absorption (Sonde: 288 nm), 250 µM bei der Detektion mittels nah-UV CD-Spektroskopie (Sonde: 280 nm) und 15 µM bei der Detektion mittels fern-UV CD-Spektroskopie (Sonde: 220 nm). Die Fehler resultieren aus der Anpassung der Daten an Gleichung [2.13].

In Analogie zu den harnstoffinduzierten Entfaltungen leistete die Anwesenheit von Ni²⁺ einen erheblichen Beitrag zur Stabilisierung von *E.c.*SlyD(1-155) mit einer Erhöhung der freien Stabilisierungsenthalpie um 9,6 kJ/mol und des Übergangsmittelpunktes um 9 °C (Tab. 3-3). Die höchste Stabilisierung wurde bei dreifach molarem Überschuss von Ni²⁺ beobachtet, eine weitere Erhöhung der Ni²⁺-Konzentration führte zur Aggregation der Proteine. Wie schon für die harnstoffinduzierte Entfaltung beobachtet wurde, werden die thermodynamischen Stabilitätsparameter von SlyD* in Gegenwart von Ni²⁺ durch die Affinität des His₆-Tags zu Ni²⁺ verfälscht.

Tab. 3-3 Stabilitätsparameter der beiden *E.c.SlyD*-Varianten aus thermisch induzierten Entfaltungsübergängen in Gegenwart von Ni^{2+} .

	nach 1. Reinigungsschritt	SlyD*		SlyD(1-155)	
		ohne Ni^{2+}	+ Ni^{2+}	ohne Ni^{2+}	+ Ni^{2+}
$\Delta H_U(T_m)$ in kJ/mol	$222,1 \pm 1,3$	$296,0 \pm 10,9$	$259,4 \pm 1,4$	$266,8 \pm 3,0$	$318,3 \pm 1,2$
$\Delta S_U(\text{H}_2\text{O})$ in J/(mol·K)	$66,3 \pm 2,9$	$457,6 \pm 6,0$	$107,0 \pm 0,6$	$308,6 \pm 2,1$	$490,1 \pm 0,4$
$\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$ in kJ/mol	$8,7 \pm 0,9$	$12,1 \pm 1,8$	$11,6 \pm 0,2$	$11,1 \pm 0,6$	$20,7 \pm 0,1$
T_m in °C	$47,7 \pm 0,1$	$42,3 \pm 0,2$	$50,3 \pm 0,1$	$44,2 \pm 0,1$	$53,2 \pm 0,1$

Die Entfaltungsübergänge wurden mittels UV-Absorption bei 288 nm detektiert. SlyD* = *E.c.SlyD*(1-165)-His₆. Die Fehler resultieren aus der Anpassung der Daten an Gleichung [2.13].

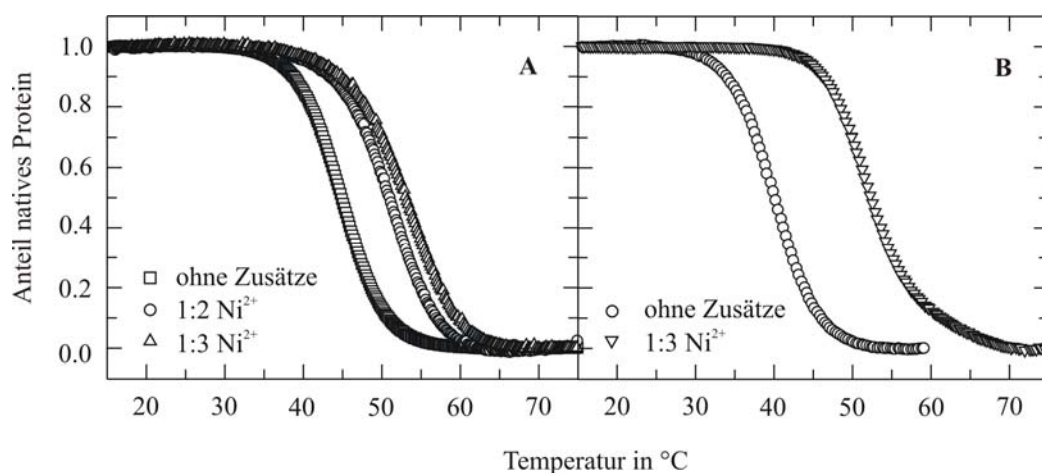


Abb. 3-3 Thermisch induzierte Entfaltungsübergänge in Gegenwart von Ni^{2+} . Entfaltungsübergang von **A** SlyD* (*E.c.SlyD*(1-165)-His₆) und **B** *E.c.SlyD*(1-155) in Abwesenheit und in Anwesenheit von NiCl_2 . Die Übergänge wurden in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 mit einer Aufheizrate von 0,5 °C/min gemessen. Als Sonde diente die UV-Absorption bei 288 nm. Die Proteinkonzentration betrug 30 μM . Je nach Messung wurde NiCl_2 in zwei- bis dreifachen Überschuss eingesetzt, die Endkonzentration war 90 μM .

Um den Einfluss verschiedener zweifach positiv geladener Metallionen auf die Stabilität von *E.c.SlyD*(1-155) zu untersuchen, sind thermisch induzierte Entfaltungsübergänge in Anwesenheit von Ca^{2+} , Zn^{2+} und Mn^{2+} aufgenommen worden. Wie aus den Übergangskurven in Abb. 3-4 hervorgeht, tragen alle verwendeten Metallionen zur Stabilisierung von *E.c.SlyD*(1-155) bei, jedoch ist der Effekt für Ni^{2+} am stärksten.

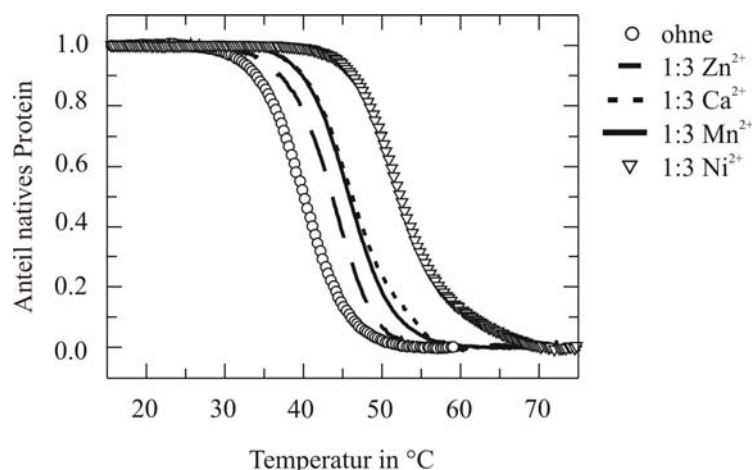


Abb. 3-4 Thermisch induzierte Entfaltungsübergänge von *E.c.SlyD*(1-155) in Anwesenheit verschiedener zweifach positiv geladener Metallionen. Die Übergänge wurden in 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit einer Aufheizrate von 0,5 °C/min gemessen. Als Sonde diente die UV-Absorption bei 288 nm. Die Proteinkonzentration betrug 30 µM. Die Endkonzentration der jeweils eingesetzten Metallsalze (Chloride) war 90 µM. Aus der Anpassung der Daten nach Gleichung [2.13] können folgende freie Stabilitätsenthalpien abgeleitet werden: 11,1 ± 0,6 kJ/mol (ohne Zusätze), 12,61 ± 0,2 kJ/mol (Zn²⁺), 13,5 ± 0,1 kJ/mol (Mn²⁺), 10,6 ± 0,3 kJ/mol (Ca²⁺) und 20,7 ± 0,1 kJ/mol (Ni²⁺).

3.1.3. NMR-Spektroskopische Methoden zur Betrachtung der thermodynamischen Stabilität von *E.c.SlyD*

Die Anwendung NMR-spektroskopischer Methoden sollte einen weiteren Einblick in die thermodynamische Stabilität von SlyD* gewähren. Mit Hilfe von 2D ¹H/¹⁵N-Korrelationsspektren können gezielt Aussagen zu bestimmten Regionen im Protein getroffen werden. Daher wurden harnstoffinduzierte Entfaltungsübergänge mit NMR-Spektroskopie aufgenommen, um lokale Unterschiede im Entfaltungsverhalten zu detektieren. Es wurden aber auch H/D-Austauschexperimente in Gegenwart von Harnstoff durchgeführt, um Informationen über lokale Stabilitäten in Sekundärstrukturelementen zu gewinnen. Da über den H/D-Austausch nur langsame Austauschkinetiken zugänglich sind, welche hohe Stabilitäten symbolisieren, wurde zusätzlich ein New MEXICO-Experiment zur Detektion schneller Amidprotonenaustauschreaktionen aufgenommen, um Aufschluss über flexiblere Regionen im Protein zu erhalten.

3.1.3.1. Harnstoffinduzierte Entfaltungsübergänge von SlyD*

Detektion des Entfaltungsüberganges mittels 1D ^1H -Spektren

Die starke Abhängigkeit der Stabilität der IF-Domäne vom gefalteten Zustand der FKBP-Domäne und die daraus folgende konzertierte Entfaltung und Faltung beider Domänen erklären auch den beobachteten Zweizustandsmechanismus. Die mittels Fluoreszenz detektierten harnstoffinduzierten Übergangskurven sowie die mit CD-Spektroskopie und UV-Absorption detektierten thermisch induzierten Entfaltungsübergänge ließen sich eindeutig nach einem Zweizustandsmodell anpassen. Ein über 1D Protonenspektren verfolgter harnstoffinduzierter Entfaltungsübergang von SlyD* spiegelt ebenso das Verhalten eines Zweizustandsfalters wider. Für der Auswertung wurde ein kleiner Bereich (-0,5 bis 0,5 ppm) in der aliphatischen Region des Spektrums, in dem nur Signale der nativen Spezies vorhanden sind, für jede Harnstoffkonzentration integriert (Szyperski *et al.*, 2006). Dabei sind die aliphatischen Seitenkettengruppen beider Domänen gleichzeitig zugänglich. Der resultierende Übergang ist in Abb. 3-5 zu sehen.

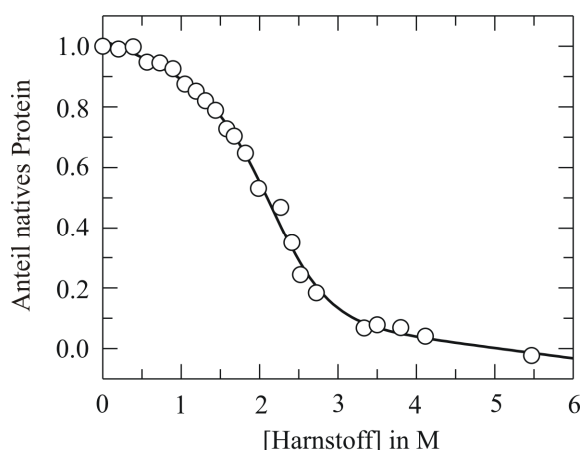


Abb. 3-5 Mittels 1D Protonenspektren detektierter harnstoffinduzierter Entfaltungsübergang von SlyD*. Als Puffer wurde 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 10 % D_2O , pH 7.5 verwendet, die Temperatur betrug 15 °C und die Proteinkonzentration war 0,6 mM. Das Diagramm zeigt den harnstoffinduzierten Entfaltungsübergang nach Integration der ^1H -Resonanzen von aliphatischen Protonen in 1D ^1H -Spektren im Bereich von 0,5 ppm bis -0,5 ppm. Die durchgezogene Linie stellt Anpassungen an ein Zweizustandsmodell entsprechend Gleichung [2.10] dar.

Detektion des Entfaltungsüberganges über 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren

Zur Detektion des harnstoffinduzierten Überganges wurden 30 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren im Bereich von 0 M bis 5,5 M Harnstoff bei 15 °C aufgenommen. Die Spektren vom nativen und entfalteten Protein sind in Abb. 3-6 dargestellt sowie ein weiteres Spektrum von SlyD* am Übergangsmittelpunkt. Das Spektrum des entfalteten Zustandes ist durch einen hohen Überlappungsgrad der Kreuzsignale und durch die geringe Dispersion der Signale

gekennzeichnet. Zur Auswertung des Entfaltungsüberganges wird das Volumen der Kreuzsignale herangezogen. Für die Kreuzsignale der nativen Spezies wird eine Volumenabnahme, für die Signale der denaturierten Spezies eine Volumenzunahme bei einer unterschiedlichen chemischen Verschiebung beobachtet. Insgesamt konnten für den nativen Zustand 93 Aminosäurereste ausgewertet werden (Anhang, Tab. 8-1).

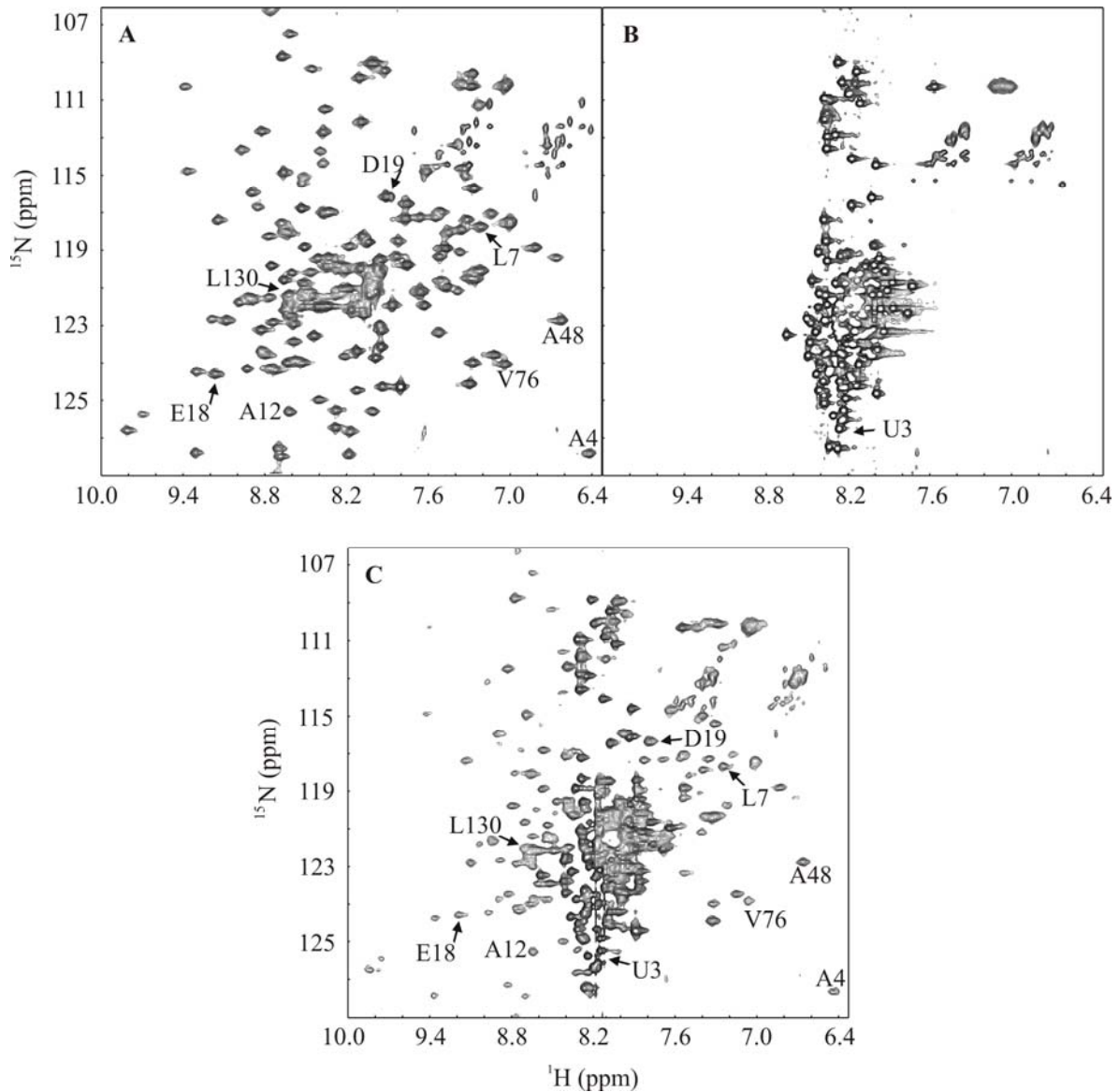


Abb. 3-6 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ TROSY-Spektren von SlyD* während der harnstoffinduzierten Entfaltung. A Spektrum von SlyD* im nativen Zustand bei 0 M Harnstoff, B im entfalteten Zustand bei 5,5 M Harnstoff und C am Übergangsmittelpunkt bei 2,2 M Harnstoff. Der Übergang wurde in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 10 % D_2O , pH 7.5 bei 15 °C und einer Proteinkonzentration von 0,67 mM gemessen. Für die zugeordneten Kreuzsignale ist in Abb. 3-7 die entsprechende Übergangskurve abgebildet.

Einige Beispiele für Kreuzsignale, die eine Übergangskurve nach dem Zweizustandsmodell zeigten, sind in Abb. 3-7 dargestellt. Nicht beachtet wurden Reste, deren Kreuzsignale zu

stark mit anderen überlappten und Reste, deren Kurvenverlauf keine Übergangskurve darstellte. Dies traf vor allem für Aminosäurereste aus der IF-Domäne zu.

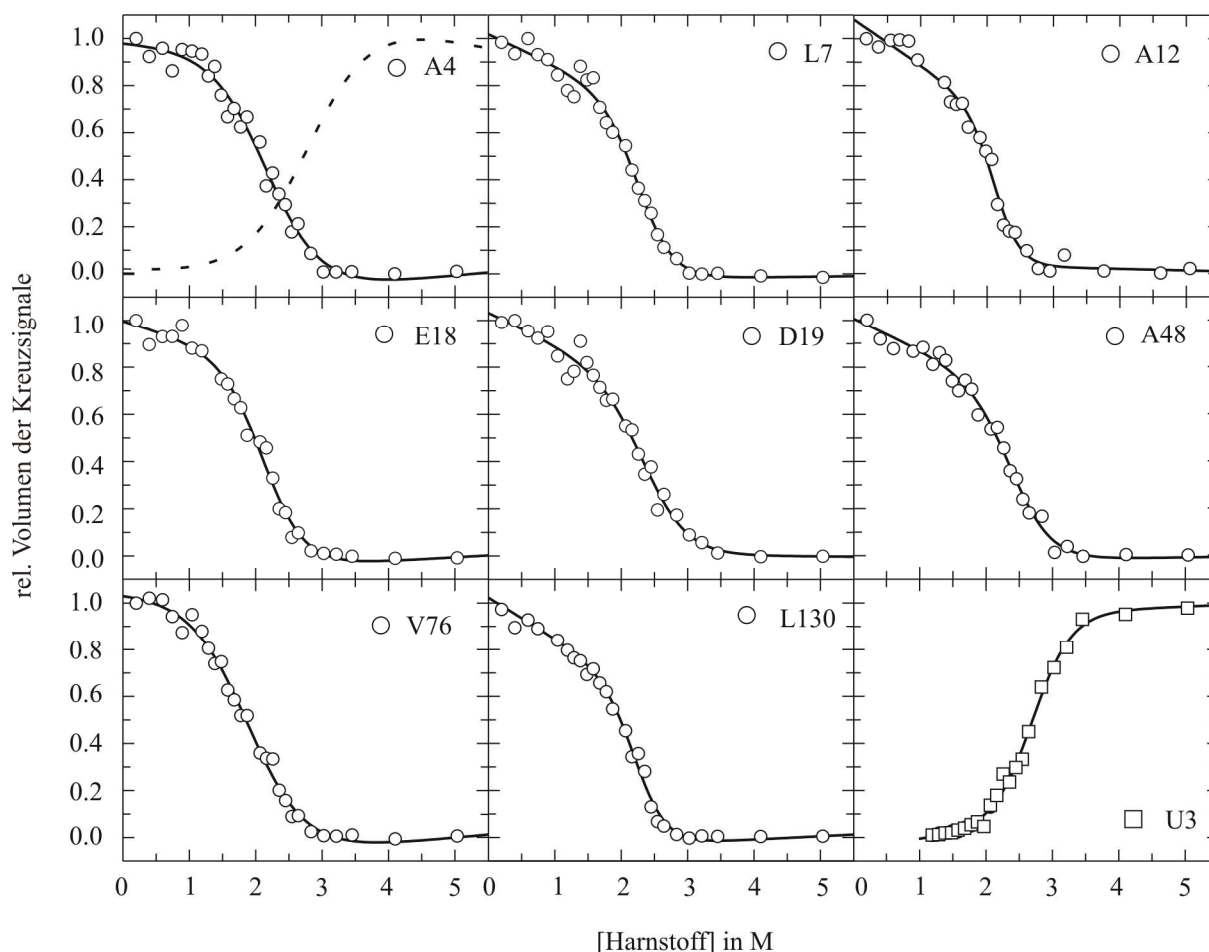


Abb. 3-7 Harnstoffinduzierte Übergangskurven für ausgewählte Reste von SlyD*, die über 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ TROSY-Spektren verfolgt wurden. Der Übergang wurde in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 10 % D_2O , pH 7.5 bei 15 °C und einer Proteinkonzentration von 0,67 mM gemessen. Die Zuordnung der einzelnen Kreuzsignale ist im jeweiligen Diagramm angegeben. Das letzte Diagramm in der unteren Reihe zeigt eine Übergangskurve für ein Kreuzsignal eines entfalteten Restes. Die durchgezogenen Linien stellen Anpassungen an ein Zweizustandsmodell entsprechend Gleichung [2.10] dar. Die gestrichelte Linie im ersten Diagramm der oberen Reihe zeigt die Anpassung der Kreuzsignale des entfalteten Zustandes im direkten Vergleich.

Es gibt sichtbare Unterschiede in den Übergangsverläufen der Kreuzsignale einzelner Aminosäuren der nativen Spezies. Für Reste in der FKBP-Domäne (z.B. A4, A12, A48, L130; Abb. 3-7) zeigen die zugehörigen Kreuzsignale einen nach dem Zweizustandsmodell auswertbaren Entfaltungsübergang. Eine Ausnahme bilden die Aminosäurereste des letzten β -Faltblattes und der letzten α -Helix der FKBP-Domäne, die aus der IF-Domäne zurücklaufen (Abb. 1-6). Die Übergänge dieser Reste zeichnen sich durch eine steile native Basislinie aus, wie an Hand des Restes L130 in Abb. 3-7 zu sehen ist. Für die Mehrheit der Reste aus der IF-Domäne (z.B. V119) und aus dem Linkerbereich zwischen beiden Domänen (z.B. N74) wird nur ein Abfall der Signalintensität ohne Ausbildung eines Übergangsbereiches beobachtet (Abb. 3-8). Das hier beschriebene steile Abfallen der Signalintensität macht eine quantitative

Auswertung des Entfaltungsüberganges der betroffenen Reste nach Gleichung [2.10] unmöglich.

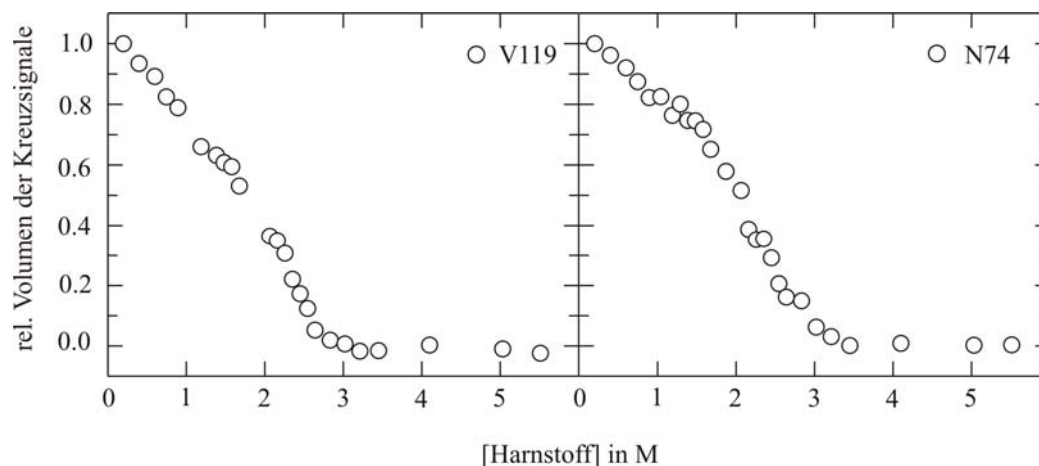


Abb. 3-8 Veränderung des Volumens der Kreuzsignale aus den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren für V119 und N74 in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Als Puffer wurde 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 10 % D_2O , pH 7.5 verwendet, die Temperatur betrug 15 °C und die Proteinkonzentration 0,67 mM. Eine Anpassung an das Zweizustandsmodell war nicht möglich.

In Abb. 3-9 ist ein Vergleich der drei beobachteten unterschiedlichen Kurvenverläufe aus dem NMR-detektierten harnstoffinduzierten Entfaltungsübergang gezeigt. Deutliche Unterschiede sind im Bereich von 0 bis 2 M Harnstoff zu sehen, während sich bei höheren Konzentrationen die drei verschiedenen Verläufe angleichen. In diesem Bereich sollten alle Aminosäurereste von SlyD* den gleichen, von der FKBP-Domäne dominierten Übergang sehen. Aus kinetischen Faltungsstudien ist nämlich bekannt, dass der Übergangszustand zu 70 % nativ-ähnlich ist und nur durch die FKBP-Domäne bestimmt wird (Zoldák *et al.*, 2009). Zoldák schreibt auch, dass die IF-Domäne im nativen Zustand sehr hohe Öffnungs- und Schließraten aufweist und demnach mit hoher Frequenz entfaltet und faltet. Dieser Prozess wird durch die Gegenwart von geringen Mengen an Harnstoff verstärkt, wodurch beim Gleichgewichtsübergang keine native Basislinie populierte wird. Der nur für Reste aus der IF-Domäne und dem Linkerbereich beobachtete Abfall der Kreuzsignalvolumina deutet das beginnende Entfalten der IF-Domäne an. Da SlyD* als kooperative Einheit entfaltet (Zoldák *et al.*, 2009), wo keine der beiden Domänen alleine gefaltet oder entfaltet vorliegen kann, zieht die in Gegenwart geringer Harnstoffkonzentrationen beginnende Entfaltung der IF-Domäne die hoch kooperative Entfaltung des gesamten Proteins nach sich. Die sehr steile Basislinie bei einigen Resten der FKBP-Domäne (die in der Aminosäuresequenz nach der IF-Domäne vorkommen) deutet eine Vermischung (blaue Übergangskurve, L147, Abb. 3-9) der beiden Ereignisse an, also beginnende Entfaltung der IF-Domäne (rote Linie, V119, Abb. 3-9)

und Entfaltung der FKBP-Domäne (grüne Übergangskurve, E18, Abb. 3-9), da alle Reste den gleichen Übergang sehen.

Jeder Aminosäurerest stellt für sich gesehen eine Sonde im System SlyD* bei der Entfaltung dar. Sollten unterschiedliche Prozesse während der Entfaltung ablaufen oder eine intermediäre Spezies auftreten, so müsste das ein deutlich unterschiedlicheres Verhalten der Kreuzsignale der jeweiligen Aminosäurereste verursachen. Unterschiede sind jedoch nur am Anfang des Entfaltungsüberganges zu sehen. Insgesamt gesehen erfahren alle Aminosäurereste von SlyD* den gleichen Übergang, weil die Entfaltung von IF- und FKBP-Domäne konzertiert erfolgt (Zoldák *et al.*, 2009).

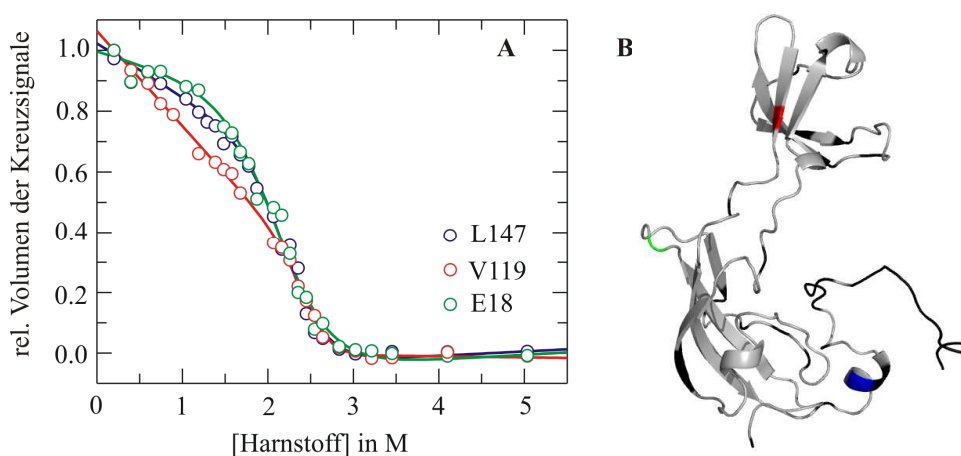


Abb. 3-9 Symbolisierung des konzertierten Entfaltungsprozesses beider Domäne in SlyD*. Die harnstoffinduzierte Entfaltung von ^{15}N -SlyD* wurde mittels 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 10 % D_2O , pH 7.5 bei 15 °C und einer Proteinkonzentration von 0,67 mM verfolgt. **A** Abnahme des Volumens der Kreuzsignale für die Aminosäurereste L147 (blau), V119 (rot) und E18 (grün) mit steigender Harnstoffkonzentration. Die durchgezogenen Linien in blau und grün stellen die jeweilige Anpassung an das Zweizustandsmodell entsprechend Gleichung [2.10] dar. Die rote Linie für V119 dient nur zur einfacheren Betrachtung und hat keine physikalische Bedeutung. **B** Struktur von SlyD*, auf der die drei miteinander verglichenen Reste abgebildet sind (grün: E18 und blau: L147, FKBP-Domäne; rot: V119, IF-Domäne). Schwarz dargestellt sind nicht zugeordnete Reste und Proline sowie Reste, die von Kreuzsignalen der entfalteten Spezies überlagert werden und nicht ausgewertet werden konnten.

Aus den 93 ausgewerteten Übergangskurven aus dem TROSY-Experiment konnten mittlere Stabilitätsparameter abgeleitet werden (Abb. 3-10). Sie zeichnen sich mit bis zu 20 % Abweichung durch relativ hohe Fehler aus. Ein Grund hierfür liegt vor allem in der Schwierigkeit der Auswertung der Entfaltungsübergänge für Signale, die eine steile native Basislinie zeigen und daher einen kaum ausgeprägten Übergangsmittelpunkt haben. Der Großteil der Aminosäurereste von SlyD* zeigt vergleichbare Stabilitäten mit einer mittleren freien Stabilisierungsenthalpie von $17,7 \pm 3,7$ kJ/mol und verdeutlicht somit den Entfaltungsprozess von SlyD* als eine Faltungseinheit.

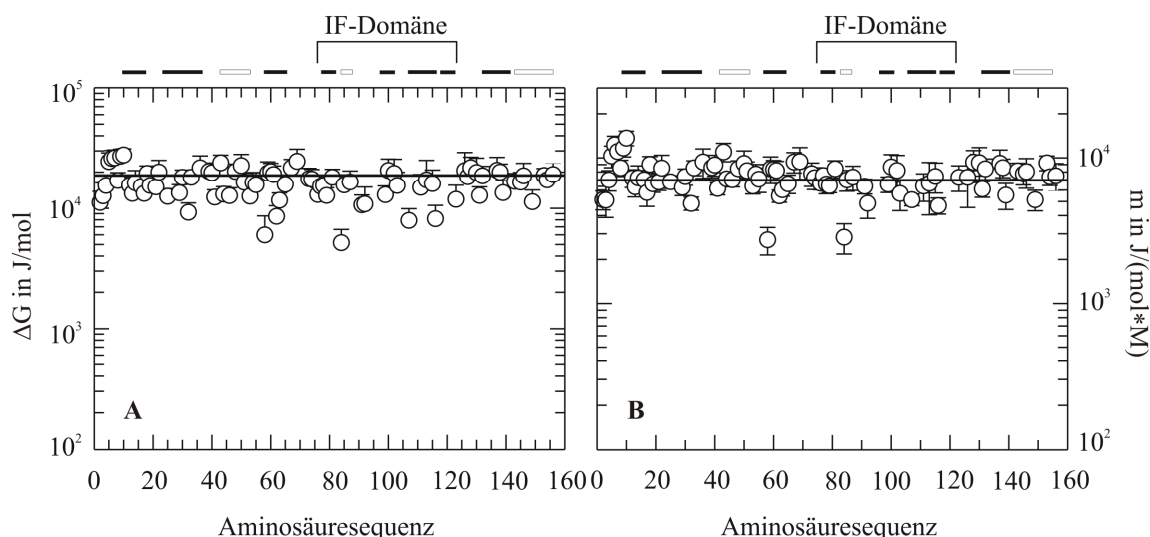


Abb. 3-10 Stabilitätsparameter aus dem NMR-detektierten harnstoffinduzierten Entfaltungsübergang. **A** Freie Stabilisierungsenthalpien und **B** m -Werte in logarithmischer Auftragung für die Aminosäurereste von SlyD*, die einen Entfaltungsübergang entsprechend dem Zweizustandsmodell zeigen. Die Rechtecke repräsentieren Sekundärstrukturelemente, ausgefüllte Rechtecke stehen für β -Faltblätter, offene für α -Helices. Die Position der IF-Domäne ist angedeutet. Als Puffer wurde 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 10 % D_2O , pH 7.5 verwendet, die Temperatur betrug 15 °C und die Proteinkonzentration 0,67 mM. Kreuzsignale für Aminosäurereste von 158 bis 170 waren von starker Signalüberlappung betroffen, H171 zeigte keinen typischen Entfaltungsübergang. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Stabilitätswerte aus dem fluoreszenzdetektierten Entfaltungsübergang bei 15 °C.

Würden beide Domänen unabhängig voneinander entfalten, so müsste sich das stärker auf die Kooperativität auswirken. Die Kooperativität ist ein Maß für die Veränderung der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche bei der Entfaltung (*SASA – solvent accessible surface area*) (Myers *et al.*, 1995). Für die IF-Domäne mit 45 Aminosäuren wäre diese Fläche relativ gering und würde sich in einem geringen m -Wert für die Kooperativität zeigen. Das ist jedoch nicht der Fall. Die m -Werte sind für alle Aminosäurereste in SlyD* vergleichsweise hoch und repräsentieren daher einen Entfaltungsprozess, in dem sich beide Domänen als Einheit zusammen entfalten und eine große Oberfläche anbieten. Deshalb wirken sich der Einschub der IF-Domäne und das damit verbundene konzertierte Entfaltungsverhalten der beiden Domänen stabilisierend auf das Gesamtprotein aus.

Eine Zusammenfassung der thermodynamischen Stabilitätsparameter für alle durchgeführten harnstoffinduzierten Entfaltungsübergänge bietet Tab. 3-4. Die mit Fluoreszenzspektroskopie bestimmten thermodynamischen Stabilitätsparameter stimmen relativ gut mit den Daten aus dem Entfaltungsübergang überein, der mittels 1D Protonenspektroskopie detektiert wurde. Geringfügig kleinere Werte sind für den 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-detektierten Entfaltungsübergang erhalten worden. Wie für eine NMR-Messung erwartet, fällt der Wert für den Übergangsmittelpunkt niedriger aus. Der Grund hierfür ist in dem großen Unterschied in der Proteinkonzentration zwischen NMR- und Fluoreszenzmessung zu suchen. Ein weiterer Grund für die geringen Abweichungen kann auch in der Lage der beobachteten Fluorophore

liegen, die sich ausschließlich in der FKBP-Domäne befinden. Da sich SlyD* jedoch als eine kooperative Faltungseinheit verhält, sollte das keine Rolle spielen. Zur Überprüfung wurde eine Tryptophanmutation (F84W) in die IF-Domäne eingeführt. Diese zeigte aber beim mittels Fluoreszenz detektierten harnstoffinduzierten Entfaltungsübergang kein abweichendes Verhalten (Anhang, Abb. 8-2).

Unterschiede, die sich im Verhalten der Übergangskurven für den nativen Zustand verglichen mit dem entfalteten Zustand zeigen, sind auf das beginnende Entfalten der IF-Domäne zurückzuführen. Der Entfaltungsübergang, welcher an Hand der Kreuzsignale der entfalteten Spezies beobachtet wird, zeigt einen um 0,5 M deutlich zu höheren Harnstoffkonzentrationen verschobenen Übergangsmittelpunkt. Ein direkter Vergleich der Übergangskurven für den nativen und entfalteten Zustand ist im ersten Diagramm von Abb. 3-7 gegeben. Aus den unterschiedlichen Mittelpunkten lässt sich ableiten, dass sich die Populationen für beide Zustände nicht bei einem Proteinanteil von 0,5 treffen. Das legt die Vermutung nahe, dass eine dritte Spezies vorhanden sein könnte. Zusätzliche Kreuzsignale, welche auf eine weitere Population bzw. auf ein unterschiedliches Faltungsverhalten hätten schließen lassen können, wurden nicht beobachtet. Dies bedeutet aber nicht zwingend, dass keine weitere Spezies vorhanden ist, sondern dass sie nicht in ausreichendem Maße populierte sein könnte. Um diese Tatsache näher zu untersuchen, sind H/D-Austauschexperimente (3.1.3.4) durchgeführt worden.

3.1.3.2. Harnstoffinduzierter Entfaltungsübergang von SlyD*-ΔIF

Um den Einfluss der FKBP-Domäne auf die Entfaltung des Gesamtproteins SlyD* zu untersuchen, wurde auch mit der isolierten FKBP-Domäne (SlyD*-ΔIF) eine harnstoffinduzierte Entfaltung durchgeführt und mittels $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren detektiert. Eine vergleichende Entfaltungsreaktion mit der isolierten IF-Domäne konnte nicht durchgeführt werden, da die isolierte IF-Domäne nicht gefaltet vorliegt (Anhang, Abb. 8-9) und als separate Einheit nicht stabil sein kann (Zoldák *et al.*, 2009).

Bei dem harnstoffinduzierten Entfaltungsübergang von SlyD*-ΔIF war besonders das Verhalten der nativen Basislinie für Aminosäurereste aus dem letzten β -Faltblatt und der letzten α -Helix von Interesse, da diese das gekoppelte Entfalten beider Domänen in SlyD* wiedergaben (Abb. 3-9). In Abb. 3-11 ist exemplarisch die Übergangskurve des Restes L147 im Vergleich zu SlyD* dargestellt. Die lang gestreckte und flachere native Basislinie für SlyD*-ΔIF fällt sofort ins Auge. Ebenso ist der Übergangsmittelpunkt bei 2,9 M Harnstoff klar zu erkennen. Die mittleren Stabilitätsparameter sind mit denen aus der Fluoreszenzmessung vergleichbar (Tab. 3-4; Anhang, Abb. 8-3).

Ein Vergleich der Übergangskurven von SlyD* mit denen der Δ IF-Variante offenbart Unterschiede für den nativen Zustand. Während die Kurvenverläufe für die Aminosäurereste 2 bis 68 kaum variieren, zeigen die Aminosäurereste 129 bis 150 weniger steile native Basislinien sowie einen gut ausgeprägten Übergangsbereich. Das alles deutet darauf hin, dass die IF-Domäne, die vor dem letzten β -Faltblatt eingefügt ist, einen erheblichen Einfluss auf den Entfaltungsprozess des gesamten Proteins hat.

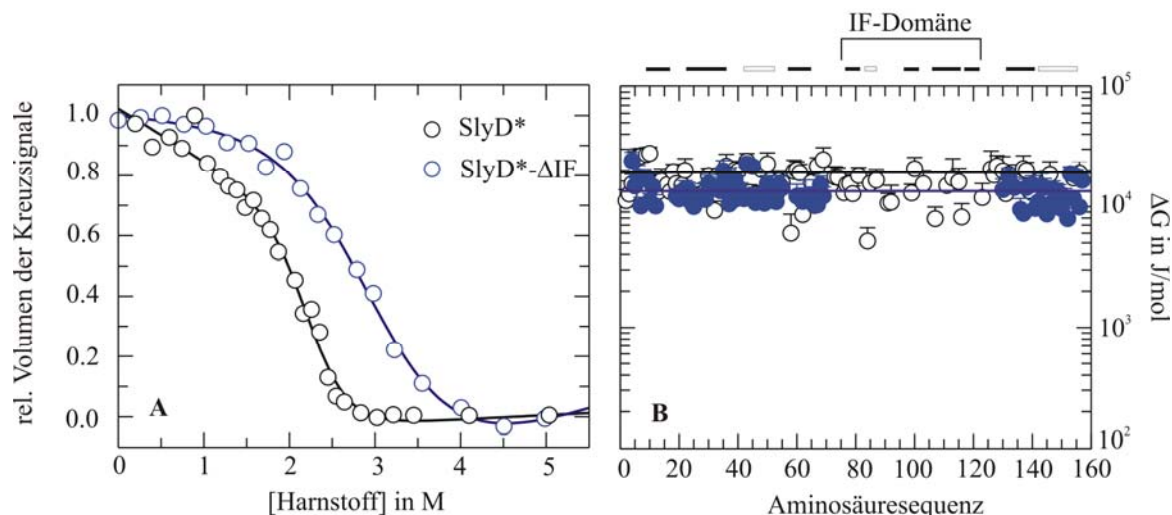


Abb. 3-11 NMR-detektierter harnstoffinduzierter Entfaltungsübergang von SlyD*- Δ IF. **A** Harnstoffinduzierte Übergangskurve für den Rest L147 von SlyD*- Δ IF (blau) im Vergleich zu SlyD* (schwarz). Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassung an das Zweizustandsmodell dar (Gleichung [2.10]). Für L147 ergibt sich $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) = 27,9 \pm 3,0$ kJ/mol, $m_{\text{eq}} = 12,3 \pm 1,3$ kJ/(M·mol), $[D]_{1/2} = 2,3$ M (schwarz: SlyD*) und $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) = 10,5 \pm 2,4$ kJ/mol, $m_{\text{eq}} = 3,0 \pm 1,1$ kJ/(M·mol), $[D]_{1/2} = 3,5$ M (blau: SlyD*- Δ IF). **B** Freie Stabilisierungsenthalpien in logarithmischer Auftragung für die Aminosäurereste von SlyD*- Δ IF (geschlossene blaue Kreise). Die Rechtecke symbolisieren Sekundärstrukturelemente, ausgefüllte Rechtecke stehen für β -Faltblätter, offene für α -Helices. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die freien Stabilisierungsenthalpien aus den fluoreszenzdetektierten Entfaltungsübergängen bei 15 °C (schwarze offene Kreise: SlyD*, $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) = 18,4 \pm 0,6$ kJ/mol und blau: SlyD*- Δ IF, $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) = 13,9 \pm 0,5$ kJ/mol). Die Fehler resultieren aus der Anpassung der Daten an Gleichung [2.10].

Tab. 3-4 Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter aus den harnstoffinduzierten Entfaltungsübergängen von SlyD* und SlyD*- Δ IF.

	SlyD*				SlyD*- Δ IF		
	Fluoreszenz	¹ H-Spektren	TROSY-Spektren	Fluoreszenz (Zoldák) ^a	Fluoreszenz	TROSY-Spektren	Fluoreszenz (Zoldák) ^a
$\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$ in kJ/mol	18,4 ± 0,6	18,8 ± 0,4	17,7 ± 3,7	14,2	13,9 ± 0,5	13,6 ± 1,4	12
m in kJ/(mol·M)	6,9 ± 0,2	8,1 ± 1,6	8,0 ± 1,4	6,4	3,2 ± 0,1	4,7 ± 0,6	4,6
$[D]_{1/2}$ in M	2,7	2,3	2,2	2,2	4,3	2,9	2,6

Die Übergänge wurden in 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 15 °C gemessen. Die angegebenen Fehler resultieren aus der Anpassung an Gleichung [2.10]. ^a Die aufgeführten Stabilitätsparameter wurden aus Zoldák *et al.*, 2009 entnommen. Diese Übergänge sind in 100 mM KH₂PO₄, pH 7.5 bei 25 °C gemessen worden.

Sowohl Stabilität als auch Kooperativität sind in der isolierten FKBP-Domäne deutlich reduziert im Vergleich zu SlyD* (Tab. 3-4). Wenn beide Domänen vorhanden sind, ist die kooperative Faltungseinheit größer, da die Domänen nicht unabhängig voneinander entfalten und falten (3.1.3.1), daher ist der *m*-Wert für SlyD* höher und für SlyD*-ΔIF dementsprechend gering. Wie an Hand des Entfaltungsüberganges von SlyD*-ΔIF gezeigt werden konnte, bedeutet die Anwesenheit der IF-Domäne für SlyD* einen enormen Stabilitätsgewinn.

3.1.3.3. Harnstoffinduzierter Entfaltungsübergang von SlyD(1-155) in Anwesenheit von Ni^{2+}

Die mittels Fluoreszenz detektierte Entfaltung von SlyD(1-155) durch Harnstoff zeigte einen stabilisierenden Effekt durch Ni^{2+} . Dies konnte auch in einem entsprechenden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-detektierten harnstoffinduzierten Entfaltungsübergang beobachtet werden. Einige Aminosäurereste weisen in Anwesenheit von Ni^{2+} eine höhere Stabilität auf, wie in Abb. 3-12 gezeigt wird (Anhang, Tab. 8-2). Des Weiteren zeigen die jeweiligen Übergangskurven eine ausgeprägte native Basislinie und einen gut definierten Übergangsbereich und Mittelpunkt bei 2,2 M Harnstoff. In Gegenwart von Ni^{2+} wird der native Zustand von SlyD(1-155) stabilisiert, vor allem aber die IF-Domäne, die im Bereich V76 bis G86 höhere Stabilisierungsenthalpien aufweist (Abb. 3-12B).

Jedoch muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die spektrale Qualität durch Ni^{2+} stark beeinträchtigt wird, worin auch die Schwankungen in den Stabilitätswerten begründet sind. Eine Vielzahl der Kreuzsignale zeigte eine extreme Linienverbreiterung bis hin zur Detektionsgrenze. Diese Reste fallen für eine thermodynamische Betrachtung weg. So können die in Abb. 3-12 dargestellten Stabilisierungsenthalpien nur auf lokale Regionen im Protein bezogen werden, erlauben aber keine globale Einschätzung der Stabilität.

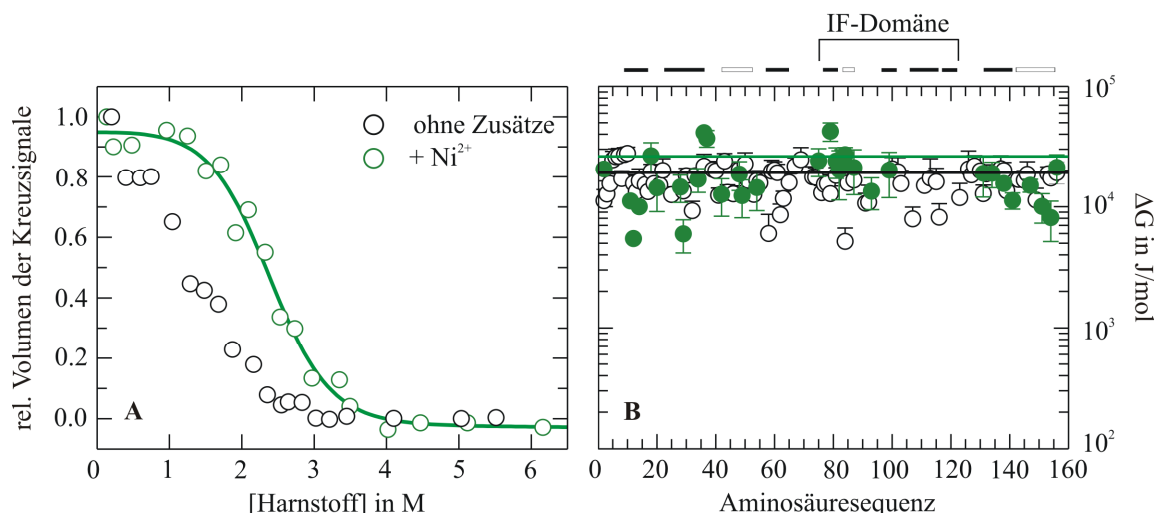


Abb. 3-12 NMR-detektierter Entfaltungsübergang in Gegenwart von Ni^{2+} . **A** Harnstoffinduzierte Übergangskurve für den Rest M94 aus der IF-Domäne von SlyD(1-155) (grün: $+\text{Ni}^{2+}$, schwarz: ohne Ni^{2+}). Die durchgezogene Linie entspricht der Anpassung an das Zweizustandsmodell (Gleichung [2.10]). **B** Freie Stabilisierungsenthalpien in logarithmischer Auftragung für die Aminosäurereste SlyD(1-155) in An- (grün) und Abwesenheit (schwarz) von Ni^{2+} ($800\ \mu\text{M}\ \text{NiCl}_2$, entspricht einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 Protein/ Ni^{2+}), die einen Entfaltungsübergang entsprechend dem Zweizustandsmodell zeigen. Die Rechtecke symbolisieren Sekundärstrukturelemente, ausgefüllte Rechtecke stehen für β -Faltblätter, offene für α -Helices. Die Mehrheit der Kreuzsignale zeigte eine starke Linienverbreiterung und konnte nicht analysiert werden. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Stabilitätswerte aus den fluoreszenzdetektierten Entfaltungsübergängen (schwarz: ohne Ni^{2+} , $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) = 18,4 \pm 0,6\ \text{kJ/mol}$ und grün: $+\text{Ni}^{2+}$, $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) = 27,1 \pm 1,3\ \text{kJ/mol}$). Angegebene Fehlerbalken resultieren aus der Anpassung der Daten an Gleichung [2.10].

3.1.3.4. Amidprotonenaustauschexperimente zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilität von SlyD* im nativen Zustand

H/D-Austausch zur Bestimmung langsamer Austauschreaktionen

Ein Maß für die lokale Struktur und Stabilität in Proteinen, aber auch für die globale Entfaltungsreaktion stellen die Schutzfaktoren dar. Sie sind über Amidprotonenaustauschexperimente leicht zugänglich (2.7.6). Nach Start der Austauschreaktion durch einen schnellen Pufferwechsel in 100 % D_2O wurden im Abstand von 40 Minuten $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektren über 65 Stunden hinweg aufgenommen. Am Ende der Reaktion gab es noch 20 Amidprotonen, die nicht vollständig, sondern nur zu 30 - 40 % ausgetauscht hatten. Um auch die sehr schnell austauschenden Amidprotonen detektieren zu können, wurde in einem zweiten H/D-Austauschexperiment im Abstand von fünf Minuten jeweils ein $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektrum aufgezeichnet. So konnten noch einige Amidprotonen in den flexibleren Schleifen-Bereichen des Proteins analysiert werden. Die entsprechenden Austauschkinetiken sind in Abb. 3-13 dargestellt.

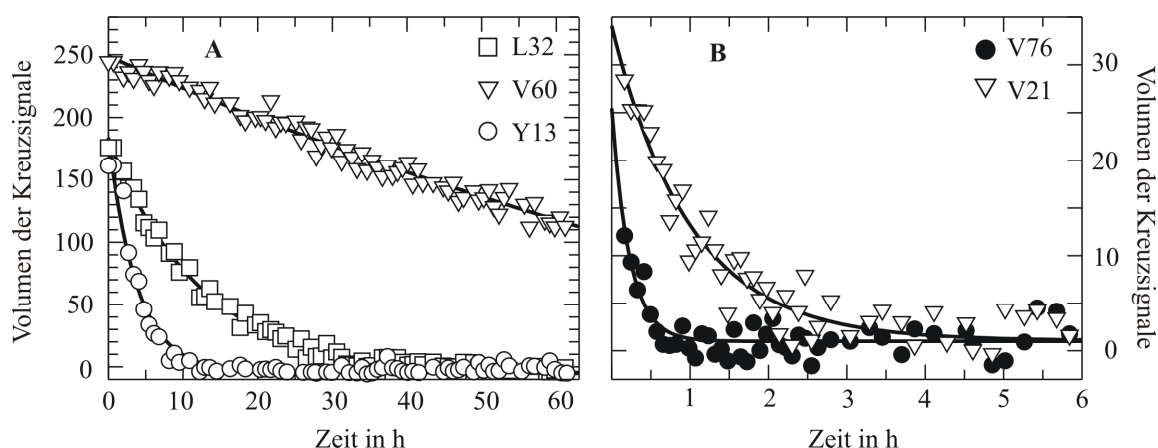


Abb. 3-13 Kinetiken des H/D-Austausches von SlyD*. Die Anpassung der Kinetiken an eine monoexponentielle Funktion liefert Austauschraten von $0,006 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ (V60), $0,080 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ (L32), $0,259 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$ (Y13), $4,426 \pm 0,968 \text{ h}^{-1}$ (V76) und $0,999 \pm 0,064 \text{ h}^{-1}$ (V21). **A** Jeder Datenpunkt wurde im Abstand von 40 Minuten aufgenommen. **B** Zur Detektion schneller austauschender Amidprotonen wurden HSQC-Spektren im Abstand von 5 Minuten aufgenommen. Die Fehler resultieren aus der Anpassung an die monoexponentielle Funktion.

Die nach Gleichung [2.26] unter Annahme des EX2-Mechanismus berechneten Schutzfaktoren offenbaren signifikante Unterschiede in den Stabilitäten der beiden Domänen (Abb. 3-14; Anhang, Tab. 8-4). Sofern mit H/D-Austausch detektierbar zeigen die Amidprotonen in der IF-Domäne um den Faktor 100 bis 1000 geringere Schutzfaktoren als der Großteil der Amidprotonen in der FKBP-Domäne. Amidprotonen, die in β -Faltblattstrukturen in der FKBP-Domäne involviert sind, zeigen höhere Schutzfaktoren, da sie stärker in Sekundärstrukturelementen geschützt sind. Besonders deutlich wird die hohe Stabilität der beiden zentralen β -Faltblätter der FKBP-Domäne. Schleifenregionen haben kaum einen Schutz gegenüber dem Austausch von Lösungsmitteldeuteronen. Die Heterogenität in den Schutzfaktoren für SlyD* deutet auf sehr unterschiedliche lokale Stabilitäten in IF-Domäne bzw. FKBP-Domäne hin.

Trotz der allgemein hohen Stabilität von SlyD* und den Stabilitätsgewinn durch die Anwesenheit der IF-Domäne, was durch die harnstoffinduzierten Entfaltungsübergänge gezeigt werden konnte (3.1.1), tauschen fast alle Reste der IF-Domäne innerhalb der experimentellen Totzeit aus. Die Ursache hierfür kann in der sehr hohen intrinsischen Dynamik der IF-Domäne liegen (Kovermann, persönliche Mitteilung; Zoldák *et al.*, 2009). Demnach liegt ein hoch dynamisches konformationelles Gleichgewicht zwischen dem gefalteten und dem entfalteten Zustand der IF-Domäne vor.

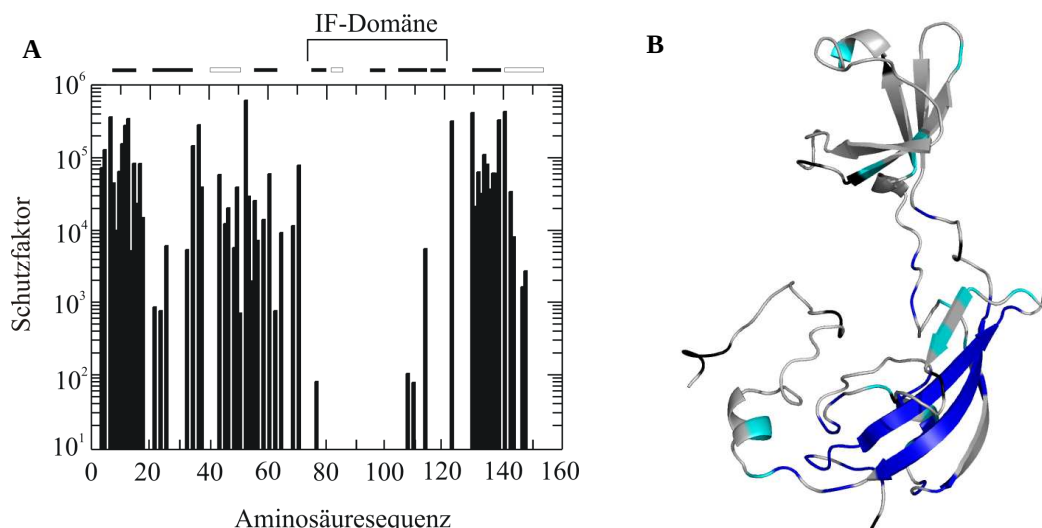


Abb. 3-14 H/D-Austausch von SlyD*. **A** Schutzfaktoren der Rückgratamidprotonen von SlyD* in logarithmischer Auftragung. Die Rechtecke repräsentieren Sekundärstrukturelemente, ausgefüllte Rechtecke stehen für β -Faltblätter, offene für α -Helices. **B** Bereiche hoher ($S > 10^4$, blau) und niedriger Schutzfaktoren ($10^2 \leq S \leq 10^4$, cyan) auf die Struktur von SlyD* gelegt. Die Berechnung der Schutzfaktoren erfolgte nach Gleichung [2.26]. In grau sind diejenigen Bereiche dargestellt, in denen die jeweiligen Kreuzsignale innerhalb der Totzeit des Experimentes ausgetauscht haben (40 Minuten). Nicht zugeordnete Reste und Proline sind schwarz eingefärbt.

Amidprotonenaustausch zur Bestimmung schneller Austauschreaktionen

Mit der modifizierten MEXICO-Technik (New MEXICO, 2.7.6.) können Austauschprozesse in einem Zeitfenster von 10 ms bis 250 ms bestimmt werden. Für 47 Amidprotonen, deren Austausch gegen Lösungsmittelprotonen auf Grund des geringeren Schutzes nicht mit H/D-Austausch detektiert werden konnte, sind in dem genannten Zeitfenster höhere Austauschraten mit New MEXICO analysiert worden. Abb. 3-15D stellt den Wiederaufbau der Magnetisierung der Amidprotonen durch Eintauch der polarisierten Wasserprotonen dar.

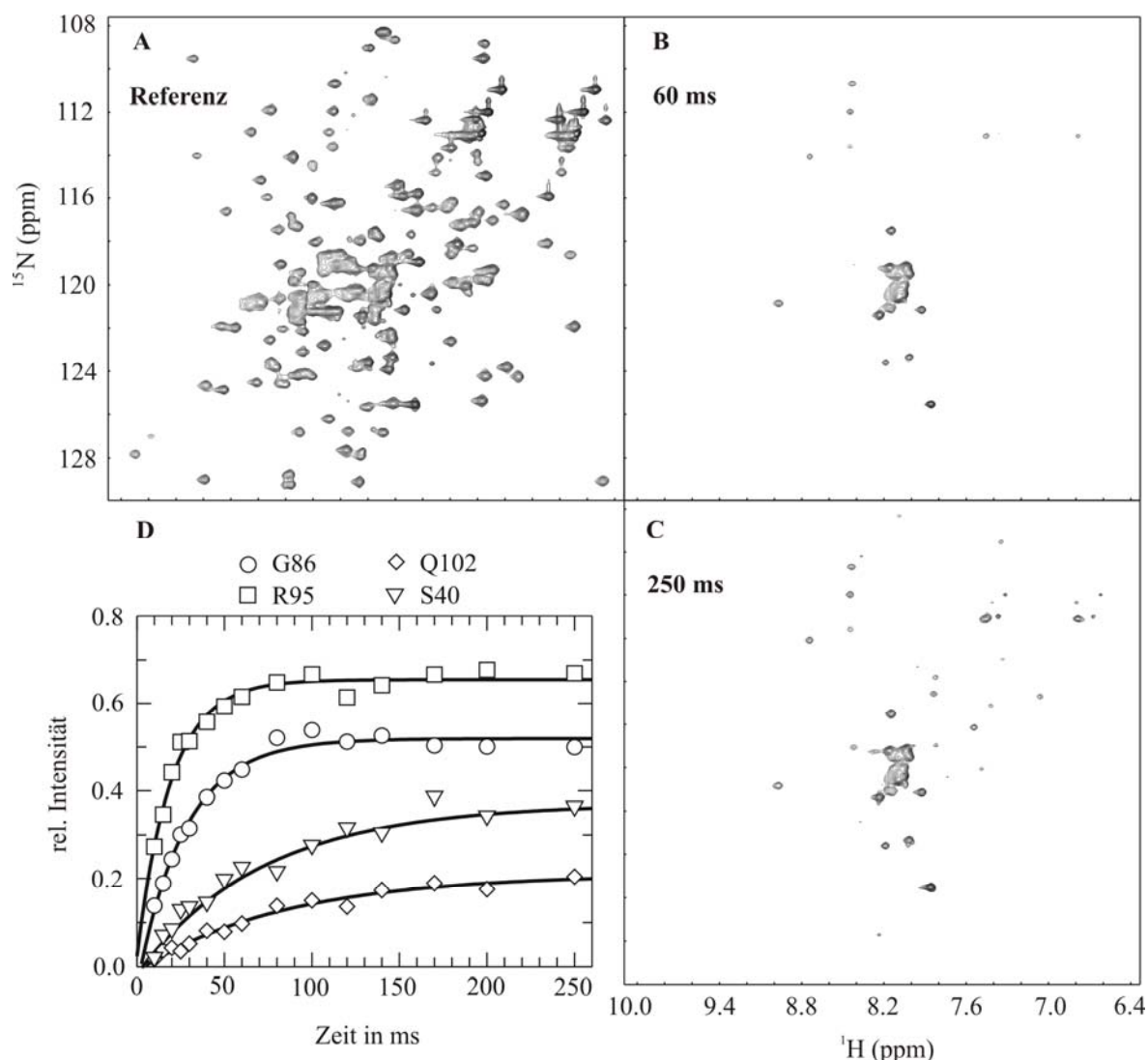


Abb. 3-15 Schneller Amidprotonenaustausch (New MEXICO). A-C $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektren vor dem Amidprotonenaustausch (Referenz) und 60 ms bzw. 250 ms nach Start der Austauschreaktion. D Austauschkinetiken für ausgewählte Aminosäurereste von SlyD* bei pH 7.5 und 15 °C. Die Anpassung der Kinetiken an eine monoexponentielle Funktion lieferte Austauschraten von $512 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ (R95), $37 \pm 3 \text{ s}^{-1}$ (G86), $14 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ (S40) und $12 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ (Q102). Die angegebenen Fehler resultieren aus der Anpassung an eine monoexponentielle Funktion.

Eine Auswertung der Austauschreaktionen im Hinblick auf die thermodynamische Stabilität kann nur durchgeführt werden, wenn der Austauschprozess nach dem EX2-Mechanismus verläuft (2.7.6). Auf Grund der pH-Abhängigkeit der Zugehörigkeit zum EX1- oder EX2-Mechanismus wurde das New MEXICO-Experiment bei zwei weiteren pH-Werten wiederholt (pH 6.0, pH 9.0). Für 20 Reste konnte bei hohem pH-Wert ein Übergang zum EX1-Bereich beobachtet werden. Diese fallen für eine thermodynamische Betrachtung weg. Für die restlichen 27 Aminosäurereste wurden nach Gleichung [2.26] die Schutzfaktoren und die thermodynamische Stabilität berechnet (Anhang, Tab. 8-8).

Werden die Ergebnisse des langsamen H/D-Austausches und die des schnellen Amidprotonenaustausches kombiniert, ergibt sich ein recht genaues Bild von der Stabilität des gesamten Proteins (Abb. 3-16). Die zentralen β -Faltblattstränge der FKBP-Domäne weisen mit 25 bis 30 kJ/mol verglichen mit der aus den harnstoffinduzierten Entfaltungsübergängen eine sehr hohe freie Enthalpie ΔG_{HD} auf. Normalerweise würden die höchsten Stabilisierungsenthalpien aus dem H/D-Austausch, die sich aus den langsamsten Austauschraten ergeben, denen entsprechen, die aus den denaturierungsmittelinduzierten Entfaltungen hervorgehen. Es ist aber nicht unüblich, dass ΔG_{HD} höhere Werte aufweist (Mayo *et al.*, 1993; Bai *et al.*, 1994). Das beim H/D-Austausch eingesetzte D₂O sorgt bekanntermaßen für eine zusätzliche Stabilisierung des Proteins (Mullins *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 1997; Krantz *et al.*, 2000). Weitere Gründe für die vermeintlich höhere Stabilisierung können in einer langsamen Prolylisomerisierung liegen, deren Beitrag 1,4 kcal/mol ausmachen würde (Bai *et al.*, 1994). Diese Differenz von ca. 6 kJ/mol wird auch beim SlyD* beobachtet, so dass diese Tatsache und der Isotopeneffekt vom D₂O für die Abweichungen in den freien Stabilisierungsenthalpien sprechen. Bei der Auswertung der Schutzfaktoren wird ein einfacher Zweizustandsmechanismus für das Öffnungs- und Schließgleichgewicht für geschützte ($N-H_{cl}$) und ungeschützte ($N-H_{op}$) Amidprotonen angenommen ($N-H_{cl} \rightleftharpoons N-H_{op}$). Abweichungen von einem reinen Zweizustandsmodell können nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin ist ein Wechsel vom EX2-Mechanismus in den EX1-Mechanismus möglich. Die Berechnung der thermodynamischen Parameter erfordert einen Austausch im EX2-Bereich, sollten Interferenzen mit dem EX1-Mechanismus auftreten, wären die errechneten Werte fehlerbehaftet. Bei einem pH-Wert von 7.5 (pD 7.1), bei dem alle Messungen durchgeführt wurden, sollte dieser Wechsel jedoch nicht favorisiert sein.

Während die Stabilitätswerte aus dem harnstoffinduzierten Übergang die Sekundärstrukturelemente von SlyD* nicht widerspiegeln, korrelieren die Stabilitäten aus den Austauschexperimenten recht gut mit den Abschnitten der jeweiligen Sekundärstrukturen. Aus dem H/D-Austausch fehlende Stabilitätsinformationen für Schleifenbereiche im Protein konnten mit schnellen Amidprotonenaustauschprozessen ermittelt werden. Ebenso waren mit Hilfe der Detektion des schnellen Austauschprozesses einige Aminosäurereste aus der IF-Domäne zugänglich und konnten bezüglich ihrer Stabilität eingeordnet werden. Mögliche Ursachen für die sehr schnellen Austauschreaktionen können lokale Entfaltungsprozesse sein oder lokale Fluktuationen in der Struktur der nativen Moleküle (Bai *et al.*, 1995; Maity *et al.*, 2003). Um zwischen lokalen Entfaltungsreaktionen und der allgemeinen Dynamik in der Struktur unterscheiden zu können, sind aminosäurespezifische Informationen aus NMR-detektierten harnstoffinduzierten Entfaltungsübergängen sehr hilfreich, da jeder

Entfaltungsprozess durch eine Übergangskurve mit definierten Parametern, wie den Übergangsmittelpunkt, die Kooperativität und die freie Stabilisierungsenthalpie der Entfaltung, eindeutig beschreibbar ist. Regionenspezifische Kooperativitätswerte würden Aufschluss über lokale Entfaltungsvorgänge geben.

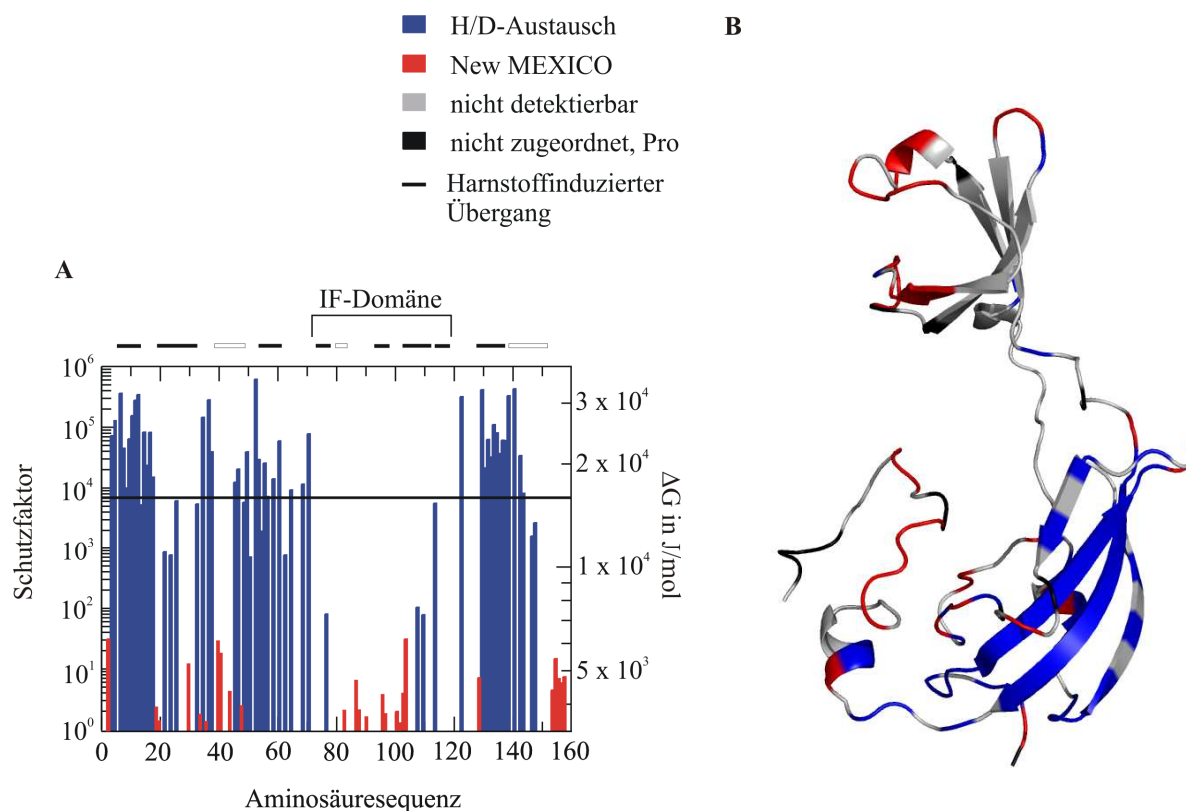


Abb. 3-16 Stabilitätsparameter aus den Amidprotonenaustauschexperimenten. **A** Schutzfaktoren und Stabilisierungsenthalpien der einzelnen Rückgratamidprotonen von SlyD* in logarithmischer Auftragung. Rot: Daten aus dem New MEXICO-Experiment, blau: Daten aus dem H/D-Austausch. Die Rechtecke repräsentieren Sekundärstrukturelemente, ausgefüllte Rechtecke stehen für β -Faltblätter, offene für α -Helices. Die durchgezogene Linie entspricht den freien Stabilisierungsenthalpien aus dem mit 2D TROSY-Spektren detektierten harnstoffinduzierten Übergang (-) (Tab. 3-4). **B** Bereiche hoher Schutzfaktoren ($S > 10^2$, blau, mit H/D-Austausch zugänglich) und niedriger Schutzfaktoren ($S \leq 10^2$, rot, nur über den schnellen Amidprotonenaustausch zugänglich) auf die Struktur von SlyD* gelegt. Grau sind Amidprotonen dargestellt, die weder mit H/D-Austausch noch New MEXICO zugänglich waren bzw. die in den EX1-Mechanismus übergegangen sind. Nicht zugeordnete Reste und Proline sind schwarz dargestellt.

Die NMR-Daten aus den harnstoffinduzierten Entfaltungsübergängen für die Aminosäurereste der IF-Domäne waren bezogen auf ihre Kooperativität und Stabilität nicht klar definiert. Die meisten Kurvenverläufe für Reste aus der IF-Domäne zeigten einen steilen Abfall der nativen Basislinie, ohne dass sich ein klar abgegrenzter Übergangsbereich herauskristallisierte. Beim H/D-Austausch haben fast alle Amidprotonen der IF-Domäne innerhalb der experimentellen Totzeit ausgetauscht. Das bedeutet, dass die jeweiligen Amidprotonen sehr schnell in einer austauschkompetenten offenen Form vorliegen würden. Die über schnellen Magnetisierungsaustausch ermittelten Austauschraten (2 bis 80 ms, Abb. 3-15) liegen im

Bereich derjenigen, welche über kinetische Messungen zum Faltungsweg von SlyD* für das Faltungs-/ Entfaltungsgleichgewicht (10 ms) der IF-Domäne im nativen Zustand bestimmt wurden (Zoldák *et al.*, 2009). Über die Amidprotonenaustauschexperimente konnten diese infinitesimal populierte Zustände detektiert werden. Die hier gezeigten Ergebnisse entsprechen damit dem Modell, dass die IF-Domäne lokale Fluktuationen zeigt und keine lokale Entfaltung eingeht. Zur weiteren Stützung dieser These wird die *native state hydrogen exchange*-Strategie angewendet.

3.1.3.5. H/D-Austausch in Gegenwart verschiedener Harnstoffkonzentrationen (*native state hydrogen exchange*-Strategie)

Trotz Hinweise aus den harnstoffinduzierten Entfaltungen, dass eine intermediäre Spezies vorhanden sein könnte (Abb. 3-7), wurde dies durch die Amidprotonenaustauschexperimente nicht eindeutig bestätigt. Falls das letzte β -Faltblatt und die letzte α -Helix in der FKBP-Domäne, welche ein leicht unterschiedliches Verhalten in den Kurvenverläufen der harnstoffinduzierten Entfaltung zeigen, im Anschluss an eine lokale Entfaltung der IF-Domäne als Faltungsuntereinheit die Entfaltung der FKBP-Domäne einleiten würde, so sollte es möglich sein, bei Amidprotonenaustauschreaktionen in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen an Denaturierungsmittel zwischen unterschiedlichen Entfaltungsvorgängen insbesondere zwischen globalen bzw. lokalen Entfaltungsvorgängen und lokalen Fluktuationen unterscheiden zu können. Lokale Fluktuationen treten hauptsächlich in stabileren Proteinen auf, während weniger stabile Proteine eher dazu tendieren, global zu entfalten, wenn die thermodynamische Stabilität des gesamten Systems im Gleichgewicht herabgesetzt wird.

Die Störung des strukturellen Gleichgewichts eines Proteins durch verschiedene Mengen an Denaturierungsmittel wie z.B. Harnstoff kann zur Identifizierung von unabhängigen Faltungseinheiten, den so genannten PUFs (*partially unfolded forms*) (Bai *et al.*, 1995b) oder *foldons* (Maity *et al.*, 2005) beitragen (Mayo *et al.*, 1993; Englander, 1998). Dazu werden amidprotonenspezifisch die freien Stabilisierungsenthalpien aus den H/D-Austauschraten berechnet und gegenüber der Denaturierungsmittelkonzentration aufgetragen. Wenn Gruppen von Amidprotonen einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigen und bei höheren Denaturierungsmittelkonzentrationen in einer isoenergetischen Linie mit gleichem m-Wert zusammenlaufen, können diese Gruppen gleichen Faltungsuntereinheiten zugeordnet werden. Für verschiedene Proteine konnte die Existenz kinetischer Intermediate durch die Aufklärung von *foldons* bestätigt werden: Cytochrom C (Bai *et al.*, 1996), T4 Lysozym (Hu *et al.*, 1994),

Apomyoglobin (Feng *et al.*, 2001), Barstar (Bhuyan *et al.*, 1998) und RNase H (Chamberlain *et al.*, 1996; Chamberlain *et al.*, 1998).

Für SlyD* wurden drei weitere H/D-Austauschexperimente in Gegenwart von verschiedenen Harnstoffkonzentrationen durchgeführt, bei denen die native Spezies entsprechend der harnstoffinduzierten Entfaltungsübergänge noch vollständig populiert sein sollte (0,62 M, 1,07 M und 1,66 M; Anhang, Tab. 8-5, Tab. 8-6, Tab. 8-7). Wie erwartet, beschleunigte sich der H/D-Austausch mit steigender Harnstoffkonzentration und die Schutzfaktoren nahmen ab (Abb. 3-17). Betrachtet wurden nur die Amidprotonen, die bei 0 M Harnstoff ausgewertet werden konnten. Schon geringe Mengen an Harnstoff sorgten für eine Beschleunigung des Austausches um das Vierfache.

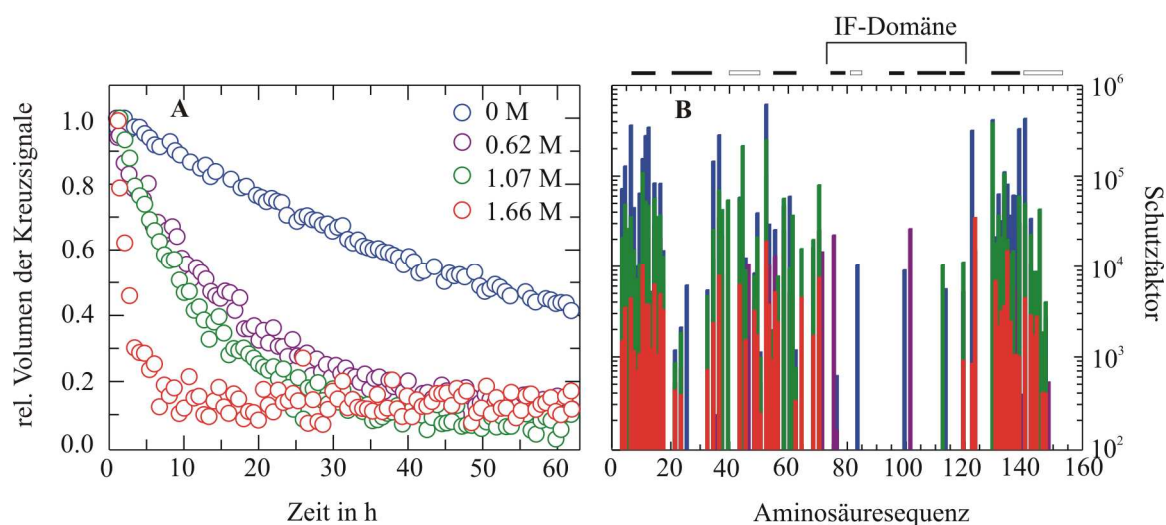


Abb. 3-17 H/D-Austausch in Gegenwart verschiedener Harnstoffkonzentrationen. **A** Kinetiken des H/D-Austausches von SlyD* für das Amidproton V134 bei 0 M, 0,62 M, 1,07 M und 1,66 M Harnstoff. Die Anpassung der Kinetiken an eine monoexponentielle Funktion lieferte Austauschraten von $0,015 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ (0 M), $0,061 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ (0,62 M), $0,088 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ (1,07 M) und $0,493 \pm 0,029 \text{ h}^{-1}$ (1,66 M). **B** Schutzfaktoren der Rückgratamidprotonen von SlyD* in logarithmischer Auftragung. Die Farbkodierung entspricht der gleichen wie in **A**. Die Rechtecke repräsentieren Sekundärstrukturelemente, ausgefüllte Rechtecke stehen für β -Faltblätter, offene für α -Helices.

Aus der Auftragung der freien Enthalpie des Austausches gegen die Harnstoffkonzentration hebt sich keine Gruppierung hervor; mit steigender Harnstoffkonzentration sinkt die freie Enthalpie des Austausches. Es gibt zwischen den Amidprotonen des letzten β -Faltblattes und der anderen stabilen Faltblattstränge keinen messbaren Unterschied. Die Kurven treffen sich in einem Punkt bei ca. 2,6 M Harnstoff, welcher dem Übergangsmittelpunkt der globalen Entfaltung durch Harnstoff entspricht (Fluoreszenzmessung, entfaltete Fraktion beim NMR-detektierten Übergang). Die aus dem Anstieg der Kurven ermittelten m -Werte variieren zwischen 4 und 8 kJ/(mol·M). Da sowohl unter stabilisierenden Bedingungen für Harnstoffkonzentration zwischen 0 und 1 M als auch bei destabilisierenden Bedingungen bei Konzentrationen größer als 1 M die freie Enthalpie mit vergleichbaren m -Werten sinkt, kann

davon ausgegangen werden, dass die gesamte β -Faltblattstruktur der FKBP-Domäne kooperativ und global entfaltet.

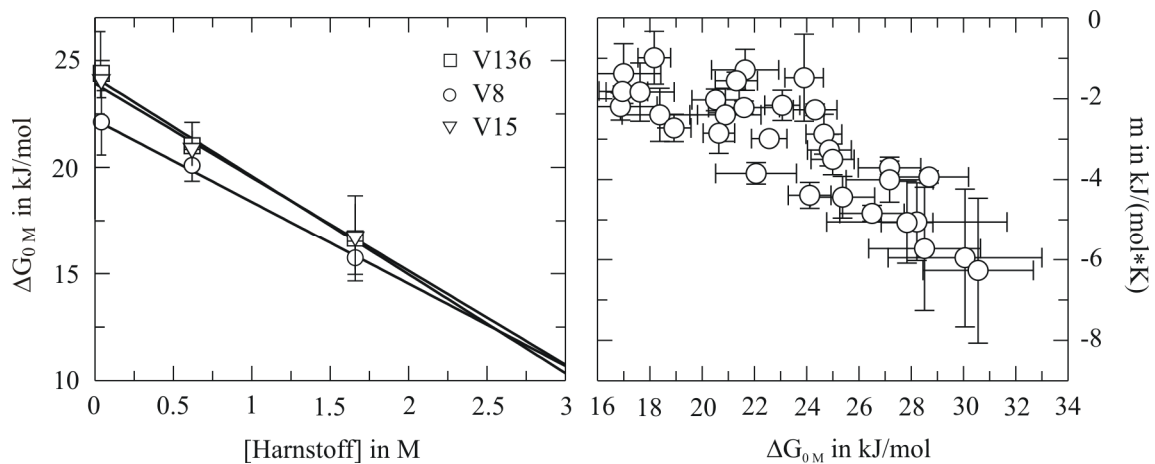


Abb. 3-18 Native state hydrogen exchange. **A** Freie Enthalpie des H/D-Austausches in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration einiger ausgewählter langsam austauschender Amidprotonen aus der FKBP-Domäne von SlyD*. Aus den negativen Anstiegen der Kurven wurden die m-Werte in einer linearen Regression ermittelt: $3,85 \pm 0,27$ kJ/(mol·M) (V8), $4,39 \pm 0,32$ kJ/(mol·M) (V15) und $4,62 \pm 0,34$ kJ/(mol·M) (V136). **B** Auftragung der berechneten m-Werte gegen die freie Enthalpie des H/D-Austausches bei 0 M Harnstoff für alle ausgewerteten Reste. Es ist keine Gruppierung erkennbar.

Es konnte somit keine Korrelation gefunden, die eine thermodynamische Unterscheidung des letzten β -Faltblattes ($\beta 3$) in der Betrachtung mittels H/D-Austausch und in der Detektion über den harnstoffinduzierten Entfaltungsübergang erlauben würde. Im H/D-Austausch wurden hohe thermodynamische Stabilitäten ermittelt, während bei der Entfaltung durch das Fehlen einer ausgeprägten nativen Basislinie Hinweise auf eine unmittelbar einsetzende Entfaltung gegeben waren. Über die kombinierte Methode H/D-Austausch in Gegenwart verschiedener Harnstoffkonzentrationen (*native state hydrogen exchange*-Strategie) sind keine weiterführenden Informationen erhalten worden. Sogenannte *foldons* als unabhängige Faltungsuntereinheiten traten nicht auf. Des Weiteren verhielten sich nahezu alle ausgewerteten Aminosäurereste nach dem Prinzip der kooperativen globalen Entfaltung bei steigenden Harnstoffkonzentrationen.

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits getroffene Vermutung, dass die Abweichungen in der nativen Basislinie für die erwähnten Reste der FKBP-Domäne nur auf eine Überlagerung der Entfaltungsvorgänge in IF- bzw. FKBP-Domäne zurückzuführen sind (Abb. 3-9). Eine lokale Entfaltung in der IF-Domäne bei gleichzeitig gefalteter FKBP-Domäne kann auf jeden Fall ausgeschlossen werden, da auf Grund des konzertierten Entfaltungsprozesses keine der beiden Domänen separat lokal entfalten kann. Ebenso zeigte die *native state hydrogen exchange*-Theorie, dass keine *foldons* (oder *PUFs*) gebildet wurden. Der Entfaltungsprozess von SlyD* kann in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von Gabriel Zoldák als ein hoch

kooperativer Vorgang beschrieben werden, bei dem eine ausgeprägte Rückkopplung zwischen beiden Domänen besteht. Setzt die Entfaltung einer der beiden Domänen ein, so bedeutet das zwangsweise die konzertierte Entfaltung beider Domänen. Es gibt keinen Zustand, in dem eine der beiden Domänen entfaltet vorliegen kann, während die zweite gefaltet ist. Die geringen Schutzfaktoren in der IF-Domäne resultieren aus unkorrelierten Öffnungsereignissen mit sehr hohen Öffnungs- und Schließraten. Durch die Einbindung der IF-Domäne in die *flap*-Region der FKBP-Domäne (siehe Kapitel 1.5) wird die IF-Domäne trotz ihrer hohen, intrinsischen Faltungsdynamik stark stabilisiert.

Da der Schutz der IF-Domäne gegenüber dem H/D-Austausch bei 0 M Harnstoff schon so gering ist, können bei dem Experiment in Anwesenheit von Harnstoff keine Aussagen zur IF-Domäne getroffen werden. Um eine vollständige Analyse des gesamten Proteins nach der *native state hydrogen exchange*-Theorie durchführen zu können, sollten die Amidprotonenaustauschreaktionen mittels New MEXICO, bei denen auch die IF-Domäne zugänglich ist, auch in Gegenwart von Harnstoff analysiert werden. Die Bestimmung von Austauschraten gegenüber Wasserprotonen mit dem New MEXICO-Experiment in Gegenwart von Denaturierungsmitteln wie Harnstoff ist zur Zeit jedoch noch nicht möglich, da dieses ebenfalls mit dem Wasser austauschen würden.

3.1.4. Charakterisierung der Ni^{2+} -Bindung an SlyD* durch Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Kristallstrukturen des thermophilen homologen SlyDs (TtSlyD) offenbarten die unter den SlyD-Proteinen hoch konservierte Metallbindestelle in der FKBP-Domäne (TtSlyD: H145-H147-H149; SlyD*: H149-H151-H153; Abb. 1-6) (Löw *et al.*, 2009). Die Gegenwart von Ni^{2+} wirkte sich in einer starken thermodynamischen Stabilisierung aus (3.1.1). Um einen Eindruck von der Bindungsstärke der Ni^{2+} -Ionen zu SlyD zu bekommen, wurden ITC-Titrations durchgeführt. Die sehr empfindliche Messmethode beruht auf der Detektion kleinster Wärmeveränderungen (2.6). Jede Wechselwirkung zwischen zwei Reaktionspartnern, aber vor allem deren Komplexbildung, verursacht eine geringfügige Änderung der freien Enthalpie und damit eine Wärmetönung des Systems. Auf Grund der sehr hohen Sensitivität sind Affinitäten im Bereich 10^7 M^{-1} , in dem die Metallbindung vermutet wird, leicht zugänglich.

Erste ITC-Messungen zeigten einen zweistufigen Bindungsmechanismus (Anhang, Abb. 8-4). Vermutungen über eine Dimerisierung der SlyD-Moleküle induziert durch Bindung von Ni^{2+} konnte über Ultrazentrifugationsmessungen nicht bestätigt werden. In allen untersuchten Konzentrationsverhältnissen ($\text{SlyD}/\text{Ni}^{2+} = 1:0; 1:0,2; 1:0,5$ und $1:1$) traten mit einem

abgeschätzten Messfehler von 15 % nur monomere Moleküle auf. In einer der beiden bekannten Kristallstrukturen von TtSlyD, in denen ein Ni^{2+} -Ion gebunden ist, zeigte auch der C-terminale His₆-Tag eine Koordination zum gebundenen Ni^{2+} . Beide rekombinant hergestellten homologen SlyDs (TtSlyD und SlyD*) enthalten einen C-terminalen His₆-Tag zur Reinigung über Ni-IMAC (2.4.2). Der beobachtete zweistufige Mechanismus wird daher wahrscheinlich durch Beteiligung des His₆-Tags an der Ni^{2+} -Koordination verursacht. In zwei aufeinanderfolgenden, sich gegenseitig beeinflussenden Bindungsereignissen wären die Ni^{2+} -Bindestelle in der FKBP-Domäne und zusätzlich die im His₆-Tag zu besetzen.

Um eine genaue Vorstellung von der Ni^{2+} -Affinität der unter den SlyD-Proteinen hoch konservierten Metallbindestelle in der FKBP-Domäne zu erhalten, wurden zwei Varianten hergestellt, die exakt nur die minimale SlyD-Sequenz (entsprechend der des TtSlyDs, Abb. 1-6) inklusive des einen Metallbinde-Motivs enthalten und bei denen der His₆-Tag abgespalten werden konnte: TtSlyD und *E.c.*SlyD(1-155). Die jeweiligen ITC-Titrationskurven sind in Abb. 3-19 dargestellt. Beide Kurven konnten an ein einfaches Bindungsmodell mit einer Bindestelle angepasst werden und offenbarten extrem hohe Affinitäten zu Ni^{2+} mit K_D -Werten im Bereich von 50 nM. Für TtSlyD wurde eine 1:1-Stöchiometrie ermittelt, während für *E.c.*SlyD(1-155) die Stöchiometrie 0,7 war. Die nicht-gradzahlige Stöchiometrie könnte darauf zurückgeführt werden, dass die metallbindende, aktive SlyD*-Konzentration nicht die tatsächlich ermittelte sein muss. Dieses abweichende Verhalten wurde unter allen Messungen nur für *E.c.*SlyD(1-155) beobachtet. Weitere mögliche Ursachen für die Abweichung könnten gemischte Stöchiometrien sein, in denen trotz negativer Ultrazentrifugationsdaten einige wenige Dimere auftreten, deren Existenz im abgeschätzten Messfehlerbereich von 15 % unentdeckt geblieben wäre. Bei der Auswertung wurde ein einfaches Bindungsmodell herangezogen, das vielleicht die gegebenen Verhältnisse nicht richtig wiedergeben könnte.

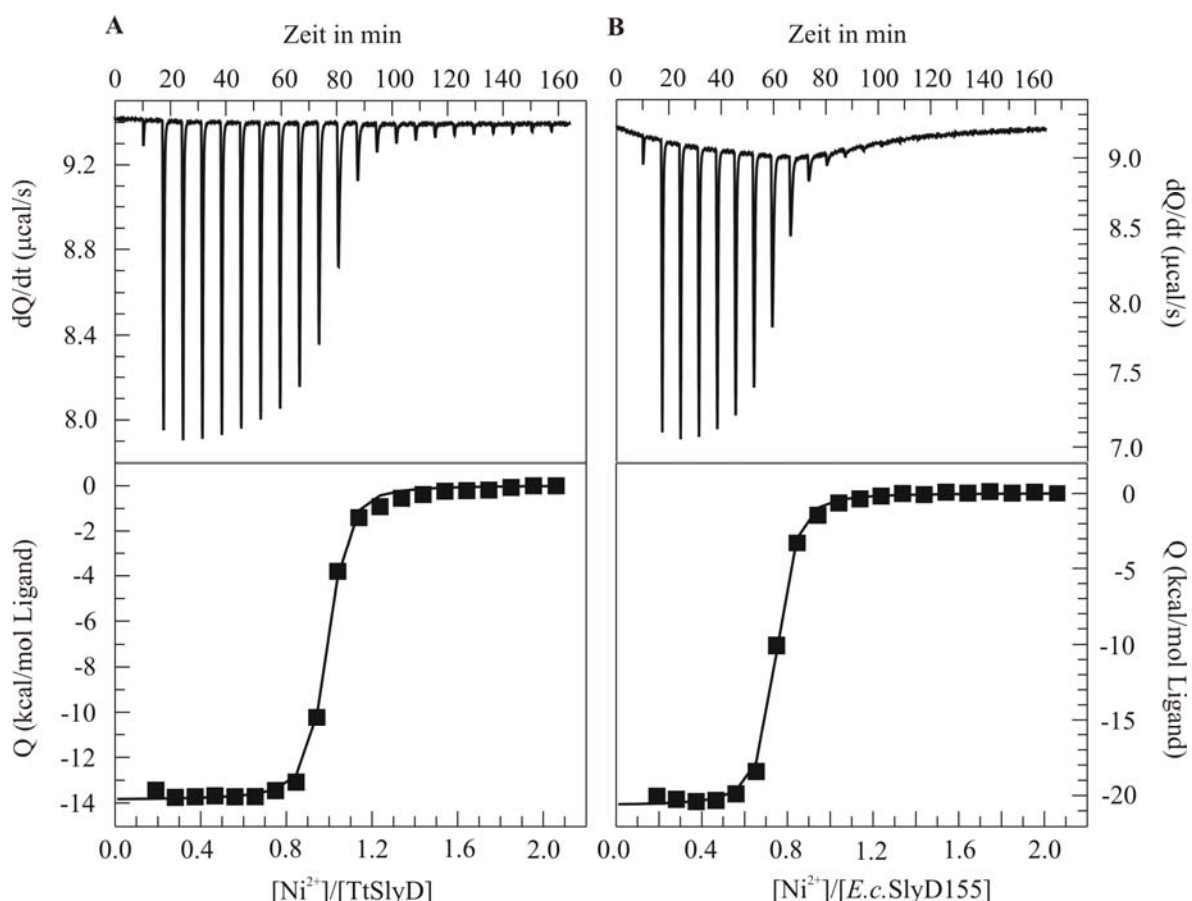


Abb. 3-19 Isothermale Titrationskalorimetriekurven von den beiden homologen SlyDs mit Ni^{2+} . Die obere Abbildung gibt jeweils die elektrische Leistung direkt wieder, die nach jeder Injektion von Ni^{2+} detektiert wurde, und entspricht der aufzubringenden Leistung für eine konstante Temperatur zwischen Proben- und Referenzzelle. In der unteren Abbildung werden die integrierten, um die Verdünnungswärme korrigierten Wärmemengen gegenüber dem Konzentrationsverhältnis Ligand/Protein aufgetragen. Die thermodynamischen Parameter wurden aus einer nichtlinearen Anpassung der experimentellen Daten an ein Bindungsmodell mit einer Bindestelle erhalten. **A** Isotherme Titration von $27 \mu\text{M}$ TtSlyD mit $270 \mu\text{M}$ NiCl_2 (in 10 mM Tris, $\text{pH}^{25^\circ\text{C}}$ 7.5, 25°C). Die durch Bindung freiwerdende Reaktionsenthalpie betrug $-13,9 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$; die Affinitätskonstante war $2,0 \pm 0,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Daraus resultierte ein K_D -Wert von ca. 50 nM . Pro TtSlyD-Molekül wurde ein Ni^{2+} -Ion gebunden. **B** Isotherme Titration von $27 \mu\text{M}$ E.c.SlyD(1-155) mit $270 \mu\text{M}$ NiCl_2 . Die durch Bindung freiwerdende Reaktionsenthalpie betrug hier $-20,7 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$; die Affinitätskonstante war $1,5 \pm 0,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Der daraus resultierende K_D -Wert betrug ca. 65 nM . Die Stöchiometrie wurde zu $0,7$ bestimmt.

3.1.4.1. NMR-Titration von ^{15}N -E.c.SlyD(1-155) mit Ni^{2+}

Um die Bindung von Ni^{2+} an SlyD(1-155) zu verfolgen, wurde nach jedem Titrationsschritt ein 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektrum von ^{15}N -SlyD(1-155) aufgezeichnet. Die Spektren konnten nur bis zu einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 ausgewertet werden, bei Ni^{2+} -Überschuss setzte die Aggregation des Proteins ein. An Hand der Veränderung der chemischen Verschiebung der Kreuzsignale von SlyD(1-155) konnte gezeigt werden, dass die Auswirkungen der Ni^{2+} -Bindung nicht auf das His-Motiv in der C-terminalen α -Helix beschränkt ist (Abb. 3-20). Tatsächlich deuten Veränderungen der chemischen Verschiebung

bei Kreuzsignalen für Aminosäurereste des aktiven Zentrums der PPIase-Domäne an, dass sie durch die Bindung von Ni^{2+} beeinflusst werden. Dies wurde ebenso bei einer Ni^{2+} -Titration mit dem Volllängen-SlyD beobachtet (Martino *et al.*, 2009) und gibt erstmals auf molekularer Ebene Hinweise dafür, warum in Gegenwart von Ni^{2+} die Inhibierung der PPIase-Aktivität beobachtet werden konnte (Hottenrott *et al.*, 1997).

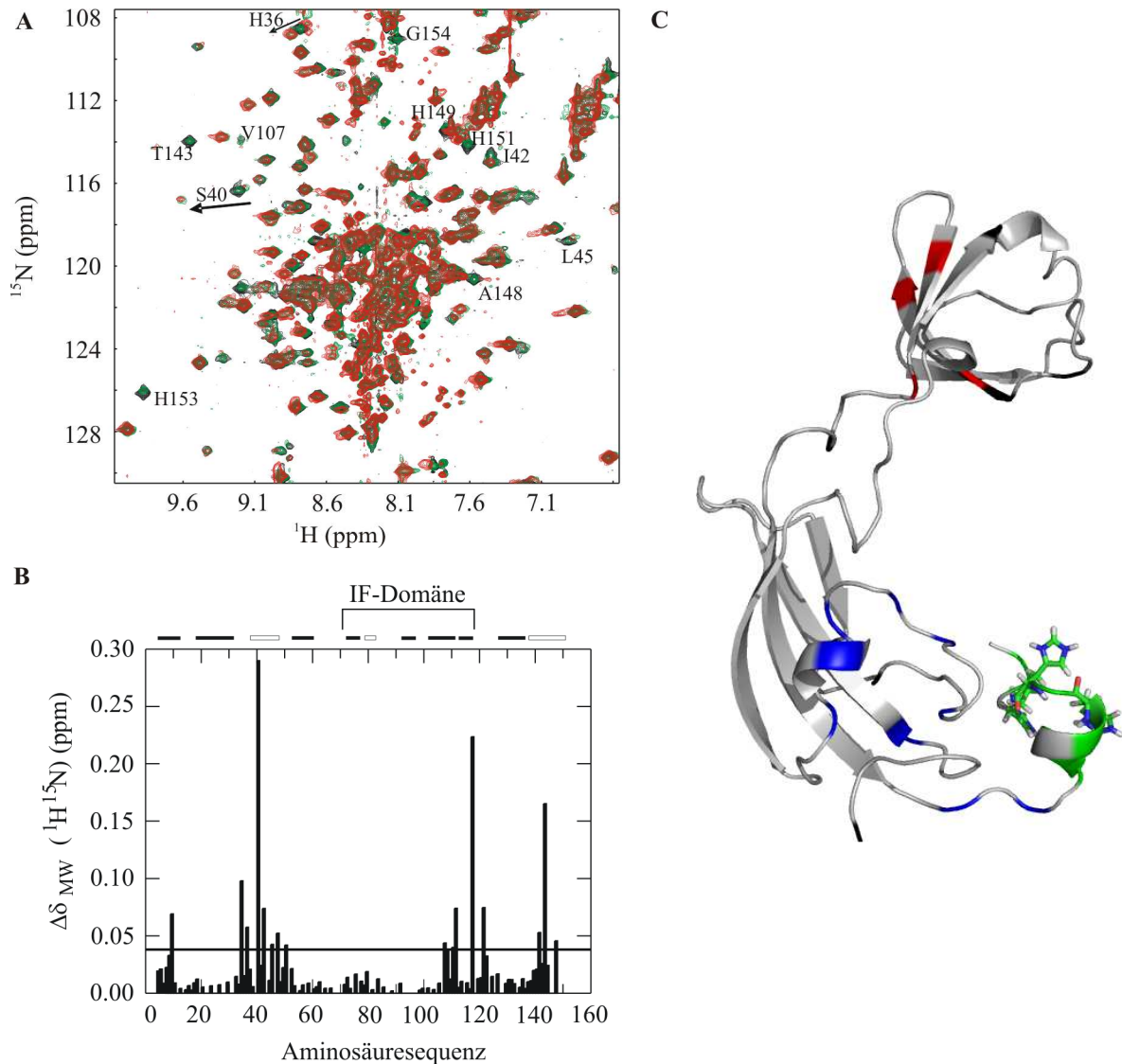


Abb. 3-20 NMR-Titration von ^{15}N -SlyD(1-155) mit Ni^{2+} . **A** FHSQC-Spektren von 0,56 mM ^{15}N -SlyD(1-155) bei verschiedenen Titrationsschritten mit 27 mM NiCl_2 in 10 mM Tris, 10 % D_2O , pH 7.5 bei 25 °C. Die entsprechende Zuordnung einiger Kreuzsignale ist angezeigt, ebenso die Richtung der Veränderung der chemischen Verschiebung. Konzentrationsverhältnisse SlyD(1-155)/ Ni^{2+} : 1:0 (schwarz), 1:0,11 (grün) und 1:1,07 (rot). **B** Auftragung der maximalen chemischen Verschiebung aller Kreuzsignale gegen die Aminosäuresequenz von SlyD(1-155). Die cut-off-Grenze für spezifische Wechselwirkungen bei 0,04 ppm ist eingezeichnet. Die Rechtecke stellen die Sekundärstrukturelemente dar, ausgefüllte Rechtecke stehen für β -Faltblätter, offene für α -Helices. **C** Aminosäuren, die auf Grund der Veränderung der chemischen Verschiebung der jeweiligen Kreuzsignale eine Beeinflussung durch Ni^{2+} -Bindung anzeigen, sind farbig auf der Struktur von SlyD(1-155) abgebildet. Neben der C-terminalen Helix, welche das His-Motiv enthält, werden auch Reste aus dem aktiven Zentrum der PPIase-Domäne beeinflusst. Rot: Reste in der IF-Domäne, blau: Reste in der FKBP-Domäne, grün: Reste, deren korrespondierendes Kreuzsignal verschwindet. Die Histidine des metallbindenden Motivs (H149, H151, H153) sind in Stäbchenform dargestellt.

Auf Grund von Linienverbreiterung verschwinden die Kreuzsignale, welche hauptsächlich die C-terminale Helix und das Ni^{2+} -bindende His-Motiv (H149-G150-H151-V152-H153) umfassen. Möglicherweise ist das auf den paramagnetischen Effekt von Ni^{2+} zurückzuführen, falls Ni^{2+} hier als *high-spin* Komplex vorläge und damit paramagnetisch wäre. Diese mögliche Ursache wurde auch bei Martino *et al.*, 2009 diskutiert. Für einen vergleichbaren Komplex aus dem thermophilen SlyD-Homologen TtSlyD mit Ni^{2+} konnte jedoch kein paramagnetischer Effekt nachgewiesen werden (3.1.4.2).

3.1.4.2. Eignung des Systems für paramagnetische NMR-Untersuchungen

Mit der Bestätigung einer intrinsisch vorhandenen hoch affinen Bindestelle für Ni^{2+} stellte sich die Frage, ob dieses System genutzt werden könnte, um paramagnetische NMR-spektroskopische Studien durchzuführen. Dazu wurden an der Universität Marburg von PD Dr. Antonio J. Pierik EPR-(Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie)-Messungen von TtSlyD in Gegenwart äquivalenter Mengen Ni^{2+} vorgenommen. Da Ni^{2+} allein in TtSlyD kein paramagnetisches Verhalten zeigte, wurden angelehnt an die Eigenschaften der Ni-haltigen Superoxid-Dismutase (Ni-SOD) (Ragsdale, 2009) weitere potentielle Liganden zur Koordination des Ni^{2+} -Ions angeboten. Zusätzliche Oxidierungsversuche, um das diamagnetische Ni^{2+} in die höhere paramagnetisch relevante Oxidationsstufe +3 zu bringen, scheiterten. Alle Ni^{2+} -haltigen Proben zeigten kein paramagnetisches EPR-Signal (Abb. 3-21).

Von zwei Metallionen, Gd^{3+} und Co^{2+} , ist bekannt, dass sie paramagnetisches Verhalten zeigen. Gd^{3+} kann jedoch nicht verwendet werden, da es als dreiwertiges Metallion nicht von SlyD gebunden wurde (Anhang, Abb. 8-5A; Hottenrott *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu zeigte das paramagnetische Co^{2+} , verglichen mit Ni^{2+} eine um den Faktor 10 schwächere, aber für die durchzuführenden Experimente hinreichende Affinität zu TtSlyD. Für den Co^{2+} /TtSlyD-Komplex konnte das erwartete EPR-Signal als Hinweis auf paramagnetisches Verhalten detektiert werden (Abb. 3-21). Somit wurde ein vielversprechendes System gefunden, um paramagnetische NMR-Untersuchungen durchführen zu können. Mit deren Hilfe könnten z.B. residuale dipolare Kopplungen (RDCs) bestimmt werden, um weitere Strukturinformationen zu erhalten wie z.B. die Orientierung der beiden flexiblen Domänen in SlyD zueinander.

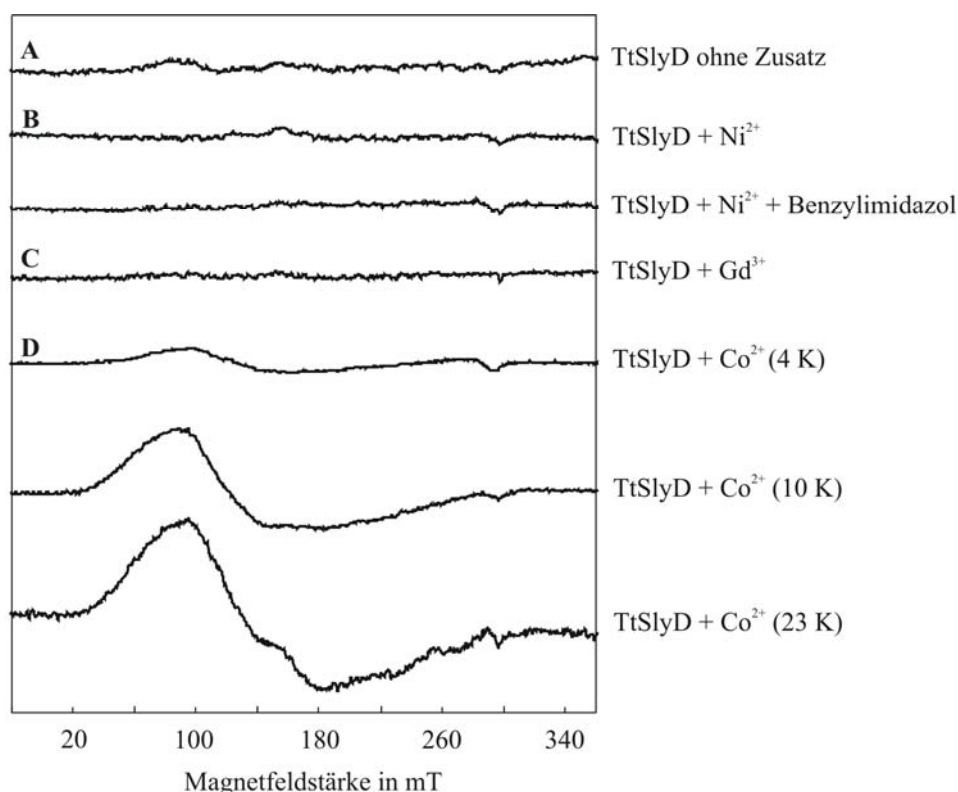


Abb. 3-21 EPR-Spektren von 72 μM TtSlyD mit verschiedenen Metallionen in 10 mM Tris, $\text{pH}^{25^\circ\text{C}}$ 7.5 (PD Dr. Pierik, Universität Marburg). Die Spektren sind an einem Bruker EMX 6/1 Spektrometer, welches mit einer ER-4102 Standard Universal TE102 rechteckigen Zelle und einem Oxford 900 Helium-Kryostaten (Oxford Instruments) ausgestattet war, aufgezeichnet worden. Die Messbedingungen wurden wie folgt gewählt: eingestrahlte Mikrowellen-Leistung 20 mW bei einer Frequenz von $9,460 \pm 0,002$ GHz (die Mikrowellenfrequenz wurde mit einem Hewlett-Packard 5340 Frequenzzähler bestimmt mit $g = 2,0028$), mit 100 kHz Modulationsfrequenz und 1,0 mT Modulationsamplitude. Dargestellt werden die ersten Ableitungen des jeweiligen Absorptionsspektrums. **A** Referenzspektrum von TtSlyD ohne Metallionenzusatz. **B** EPR-Spektren von TtSlyD in Gegenwart von 72 μM Ni^{2+} und 144 μM 1-Benzylimidazol als potentieller weiterer Ligand für Ni^{2+} neben den bereits vorhandenen drei Histidin-Seitenketten. **C** EPR-Spektrum von TtSlyD in Gegenwart von 72 μM Gd^{3+} . In den Spektren A-C konnte kein EPR-Signal detektiert werden. **D** EPR-Spektren von TtSlyD in Gegenwart von *high-spin* Co^{2+} mit $S = 3/2$ (72 μM) bei unterschiedlichen Temperaturen.

Nach Hinweisen aus einer der Kristallstrukturen von TtSlyD (Struktur A, Löw *et al.*, 2009), in der Zn^{2+} durch das Metallbindemotiv in SlyD koordiniert wurde, sind auch Affinitätsuntersuchungen zur Bindung von Zn^{2+} durchgeführt worden. Mit nahezu vergleichbarer Affinität wurde auch Zn^{2+} durch TtSlyD gebunden (Anhang, Abb. 8-5). Bei der Bindung von Ni^{2+} wird mehr Energie frei als bei der Bindung von Zn^{2+} . Die Tab. 3-5 enthält eine Übersicht der Bindungskonstanten und Reaktionsenthalpien aller untersuchten Metallionen. Die geringfügigen Unterschiede zwischen den Affinitäten lassen keine Aussage über die Spezifität SlyD*s gegenüber bestimmten Metallionen zu. Da eine Beteiligung SlyDs an der Biosynthese der *E. coli* Hydrogenase gezeigt werden konnte (Leach *et al.*, 2007), legen die allgemein sehr hohen Affinitäten zu Ni^{2+} eine spezifische Rolle als Ni^{2+} -Transporter nahe.

Während der Biosynthese des Metallzentrums der Hydrogenase hat die Untereinheit HypB eine wichtige Funktion als Ni^{2+} -Lieferant. Es konnte gezeigt werden, dass SlyD *in vivo* benötigt wird, damit Ni^{2+} von der hoch affinen Ni^{2+} -Bindestelle in HypB (K_D im picomolaren Bereich) dem Metallzentrum zugeführt werden kann (Leach *et al.*, 2005; Leach *et al.*, 2007). Dabei wird vermutet, dass SlyD, wenn es an HypB über die Chaperondomäne bindet, eine besser zugängliche Konformation der hoch affinen Ni^{2+} -Bindestelle in HypB vermittelt, und dadurch die Freigabe des Ni^{2+} -Ions stimuliert. Die in SlyD(1-155) gefundene Metallbindestelle mit einem K_D von 50 nM könnte dann in der austauschkompetenten Konformation von HypB als Transporter des Ni^{2+} -Ions zum Metallzentrums der Apohydrogenase dienen. Da Ni^{2+} in den für den Aufbau des Metallzentrums benötigten Konzentrationen für die Zelle toxisch ist und es deswegen *in vivo* nur im femtomolaren Bereich in freier Form vorkommt (Outten *et al.*, 2001), könnte der von Leach und seinen Mitarbeitern beschriebene Vorgang mit der Beteiligung von SlyD und der nur für die SlyD-artige Proteine hoch konservierten, hoch affinen Metallbindestelle (Abb. 1-6) eine spezifische *in vivo* Funktion für SlyD darstellen.

Tab. 3-5 Zusammenfassung der Parameter aus den ITC-Messungen zur Metallionenbindung an SlyD (27 μM).

	<i>E.c.</i> SlyD(1-155)	TtSlyD			
	Ni^{2+}	Ni^{2+}	$\text{Ni}^{2+} + \text{BI}^a$	Co^{2+}	Zn^{2+}
ΔH in kcal/mol	$-20,7 \pm 0,2$	$-13,9 \pm 0,1$	$-13,8 \pm 0,1$	$-13,2 \pm 0,2$	$-10,0 \pm 0,1$
ΔH in kJ/mol	$-4,95 \pm 0,05$	$-3,32 \pm 0,02$	$-3,30 \pm 0,02$	$-3,15 \pm 0,05$	$-2,39 \pm 0,02$
ΔG in kJ/mol	$-9,8 \pm 1,3$	$-9,95 \pm 1,4$	$-9,8 \pm 1,4$	$-8,7 \pm 0,7$	$-9,5 \pm 1,5$
ΔS in J/(mol·K)	$16,3 \pm 2,1$	$22,2 \pm 3,2$	$21,9 \pm 3,1$	$18,6 \pm 1,2$	$24,0 \pm 3,7$
K_a in 10^7 M^{-1}	$1,54 \pm 0,20$	$1,98 \pm 0,28$	$1,56 \pm 0,22$	$0,24 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,15$
K_D in nM	65 ± 8	50 ± 7	62 ± 9	420 ± 35	102 ± 16

Die Metallionen wurden als Chloride eingesetzt; es wurde bis zu einem zweifachen Überschuss an Metallionenkonzentration titriert. Die Pufferbedingungen waren 10 mM Tris, pH^{25°C} 7,5, 25 °C. Die Anpassung der Daten erfolgte nach einem Bindungsmodell mit einer Bindestelle. ^a Als potentieller weiterer Ligand wurden 54 μM 1-Benzylimidazol dem Protein und Puffer zugesetzt.

3.1.5. Zusammenfassende Diskussion: NMR-spektroskopische Betrachtung der thermodynamischen Stabilität von SlyD*

Eine detaillierte hoch aufgelöste Analyse der harnstoffinduzierten Entfaltung durch Aufnahme von 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren gab Auskunft über einen nahezu simultan verlaufenden Entfaltungsprozess. Alle ausgewerteten Aminosäurereste des nativen Zustandes zeigten ähnlich hohe Kooperativitätswerte und Übergangsmittelpunkte um 2,2 M Harnstoff. Die Reste des entfalteten Zustandes dagegen zeigten Übergangsmittelpunkte um 2,6 M Harnstoff, weshalb die Existenz eines intermediären Faltungszustandes vermutet wurde. Allerdings

traten weder in den 2D Spektren zusätzliche intermediäre Signale auf, noch zeigten H/D-Austauschexperimente in Gegenwart von Harnstoff Hinweise auf einen intermediären Zustand. Die steil abfallende Signalintensität der Kreuzsignale der IF-Domäne in den 2D Spektren der harnstoffinduzierten Entfaltung und die fehlende Ausbildung einer nativen Basislinie deuten auf Unterschiede in der FKBP- und IF-Domäne im nativen Grundzustand hin. Dies wird durch die sehr niedrigen Schutzfaktoren für die IF-Domäne aus den H/D-Austauschexperimenten unterstützt. Die trotz ausgeprägter Sekundärstrukturen in der IF-Domäne (Abb. 1-7) sehr niedrigen Schutzfaktoren werden durch eine hohe intrinsische Faltungsdynamik innerhalb der IF-Domäne begründet. Die offene, austauschkompetente Form wird innerhalb von 2 – 80 ms (Abb. 3-15) erreicht. Es besteht ein schnelles Gleichgewicht zwischen der nativen und entfalteten Konformation. Durch die Einbindung der IF-Domäne (*guest domain*, Zoldák *et al.*, 2009) in die *flap*-Region der FKBP-Domäne (*host domain*, Zoldák *et al.*, 2009) wird sie trotz ihrer hohen intrinsischen Faltungsdynamik stabilisiert und hat einen starken Einfluss auf den Faltungs- und Entfaltungsprozess des gesamten Proteins SlyD*.

Der Entfaltungsprozess von SlyD* im Gleichgewicht erscheint als Zweizustandsmechanismus. Sowohl die fluoreszenzdetektierten Entfaltungsübergänge als auch die über NMR-Spektroskopie verfolgte Entfaltung zeigen annähernd die gleichen Stabilitätsparameter mit $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) \sim 18,4 \text{ kJ/mol}$ und $m_{\text{eq}} \sim 7,0 \text{ kJ/(M}\cdot\text{mol)}$. Die Präsenz der IF-Domäne bedeutet für SlyD* verglichen mit der isolierten FKBP-Domäne (SlyD*- Δ IF, $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) \sim 13,9 \text{ kJ/mol}$ und $m_{\text{eq}} \sim 4,7 \text{ kJ/(M}\cdot\text{mol)}$) einen enormen Stabilitätsgewinn und eine stark erhöhte Kooperativität. Dies begründet auch die konzertierte Entfaltung beider Domänen. SlyD* entfaltet als eine kooperative Faltungseinheit, in der keine der beiden Domänen lokal entfaltet vorliegen kann, wenn die jeweils andere gefaltet ist. Mit Hilfe der *native state hydrogen exchange*-Theorie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die FKBP als Einheit mit der IF-Domäne entfaltet, da keine teilweise gefalteten Zwischenzustände oder Faltungsuntereinheiten nachgewiesen werden konnten.

In Gegenwart von Ni^{2+} tritt eine erhebliche thermodynamische Stabilisierung von SlyD(1-155) ein. Über den Vergleich mit der Kristallstruktur von TtSlyD (Löw *et al.*, 2009) konnte die Bindestelle des Metallions lokalisiert werden. Sie befindet sich in der letzten α -Helix ($\alpha 3$) der FKBP-Domäne in einem Histidin-Motiv: His149-Gly150-His151-Val152-His153 in *E.c.*SlyD bzw. His145-Gly146-His147-Ala148-His149 in TtSlyD. Diese letzte α -Helix ist einzigartig unter den FK506-bindenden Proteinen und kommt nur in den zu SlyD homologen FKBP's vor. Sie stellt somit nicht nur ein neues strukturelles, sondern auch ein neues funktionelles Element dar.

Es konnte ferner mit Hilfe von isothermaler Titrationskalorimetrie gezeigt werden, dass die Bindung von zweifach positiv geladenen Metallionen nicht auf Ni^{2+} beschränkt ist, jedoch für Ni^{2+} die höchste Affinität aufweist. Für das in SlyD* gebundene Co^{2+} wurde darüber hinaus paramagnetisches Verhalten festgestellt. Darauf aufbauend sollten Studien mit paramagnetischer NMR-Spektroskopie möglich sein, wodurch die hohe Dynamik der FKBP- und IF-Domäne relativ zueinander detaillierter charakterisiert werden könnte.

3.2. Chaperonaktivität von SlyD*

3.2.1. Lokalisierung der primären Bindestellen in SlyD* durch Analyse von NMR-Titrations

Die NMR-Spektroskopie ist bestens dafür geeignet, auch schwache Bindeereignisse zu studieren, da die chemische Verschiebung der einzelnen Kreuzsignale sehr empfindlich auf Veränderungen der unmittelbaren Umgebung der jeweiligen Amidprotonen reagiert und somit trotz der hohen für die NMR-Spektroskopie benötigten Konzentrationen Wechselwirkungen zwischen zwei Bindungspartnern anzeigen kann. Die Chaperonaktivität von SlyD* wurde in Gegenwart verschiedener Proteine und Peptide untersucht. Es wurden hauptsächlich 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektren von ^{15}N -markiertem SlyD* nach jedem Titrationsschritt aufgezeichnet und die Veränderung der chemischen Verschiebung der SlyD*-Kreuzsignale analysiert.

3.2.1.1. Entfaltete Proteine als Chaperonsubstrate

Gefaltete Proteinsubstrate wie native RNase T1 (S54G/P55N) in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 25 °C zeigten keine Bindung an SlyD* (Anhang, Abb. 8-6). Als weitere Substrate wurden permanent entfaltete Proteine wie reduzierte und carboxymethylierte RNase T1 (S54G/P55N) (RCM-T1) und RCM- α -Lactalbumin (RCM- α -La) verwendet (2.4.1). Die genauen Titrationsbedingungen sind in Tab. 2-4 (2.7.4) hinterlegt. Bei den gewählten Pufferbedingungen liegen beide Proteine permanent entfaltet vor. Abb. 3-22 zeigt eine Überlagerung von FHSQC-Spektren, die an ausgewählten Punkten der Titration mit RCM- α -La aufgezeichnet wurden. Ein Großteil der Kreuzsignale von SlyD* blieb durch Zugabe von RCM- α -La unbeeinflusst (A30, V21, A148, E146, A67; Abb. 3-22). Bei einigen Signalen konnte jedoch eine signifikante Veränderung der chemischen Verschiebung mit steigender Zugabe des Substrates beobachtet werden (A111, L41, Q91; Abb. 3-22). Dieser

kontinuierliche Verlauf der Verschiebung und die gleich bleibend scharfen Signale deuten auf einen schnellen Austausch relativ zur NMR-Zeitskala zwischen beiden Partnern hin. Einige wenige Kreuzsignale zeigten jedoch eine starke Linienverbreiterung bis hin zum Detektionslimit (V76, F84, E108; Abb. 3-22). Diese jeweiligen Amidprotonen scheinen direkt an der Komplexbildung beteiligt zu sein. Neben der direkten Bindung an das Substrat kann die Veränderung der Verschiebung auch durch Konformationsänderungen, induziert durch Substratbindung, hervorgerufen werden.

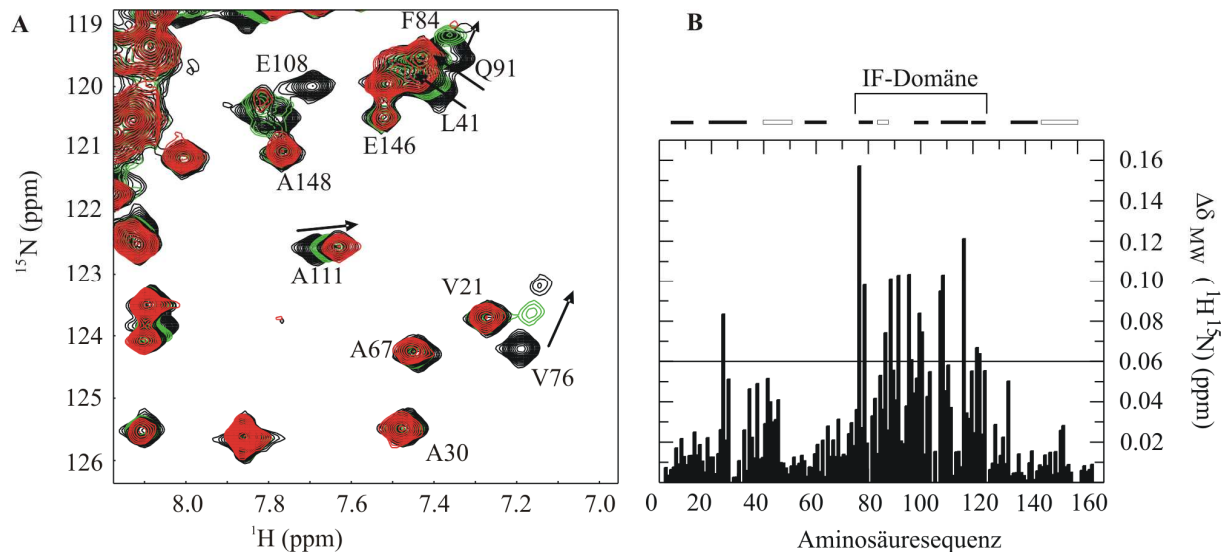


Abb. 3-22 NMR-Titration von ^{15}N -SlyD* mit RCM- α -La. **A** Ausschnitt aus den FHSQC-Spektren von 1 mM ^{15}N -SlyD* zu verschiedenen Titrationsschritten mit 1,95 mM RCM- α -La in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 10 % D_2O , pH 7.5 bei 25 °C. Die entsprechende Zuordnung einiger Kreuzsignale ist angezeigt, ebenso die Richtung der Veränderung der chemischen Verschiebung. Konzentrationsverhältnisse SlyD*/RCM- α -La: 1:0 (schwarz), 1:0,29 (grün), 1:0,74 (blau) und 1:1,25 (rot). **B** Auftragung der maximalen chemischen Verschiebung aller Kreuzsignale gegen die Aminosäuresequenz von SlyD*. Die *cut-off*-Grenze für spezifische Wechselwirkungen bei 0,06 ppm ist eingezeichnet. Die Rechtecke stellen die Sekundärstrukturelemente dar, ausgefüllte Rechtecke stehen für β -Faltblätter, offene für α -Helices.

In Abb. 3-22B ist die maximale Veränderung der chemischen Verschiebung aller Amidprotonen aufgetragen. Bei Verschiebungen größer als 0,06 ppm handelt es sich um spezifische Wechselwirkungen und davon betroffene Amidprotonen sind in Abb. 3-23A auf der Struktur von SlyD* abgebildet. Hauptsächlich sind Aminosäuren in der IF-Domäne an einer Bindung des Substrates RCM- α -La involviert. Nur vereinzelt zeigen zwei bis drei Reste hauptsächlich in Schleifenbereichen in der FKBP-Domäne signifikante Veränderungen in der chemischen Verschiebung, wofür vermutlich Konformationsumwandlungen verantwortlich sind.

Als zweites permanent entfaltetes Protein wurde RCM-T1 zu SlyD* titriert und in analoger Weise die primären Bindestellen lokalisiert. Die spezifischen Veränderungen der chemischen Verschiebung der Kreuzsignale in den einzelnen FHSQC-Spektren von ^{15}N -SlyD* durch

Zugabe von RCM-T1 stimmen größtenteils mit den Ergebnissen aus der Titration mit RCM- α -La überein. In Abb. 3-23B wird deshalb als Zusammenfassung nur an Hand der Struktur von SlyD* gezeigt, welche Aminosäurereste an einer Wechselwirkung mit RCM-T1 beteiligt sind. Ein Vergleich der primären Bindestellen von RCM- α -La und RCM-T1 an SlyD* verdeutlicht, dass permanent entfaltete Proteine vorrangig mit der Chaperondomäne interagieren. Eine Auflistung der beteiligten Aminosäurereste zeigt, dass sie der hydrophoben Oberfläche der IF-Domäne angehören sowie einzelnen negativ geladenen Bereichen: V76, F84, G86, D88, Q91, R95, F96, A98, E99, V107, E108, H116 und G121.

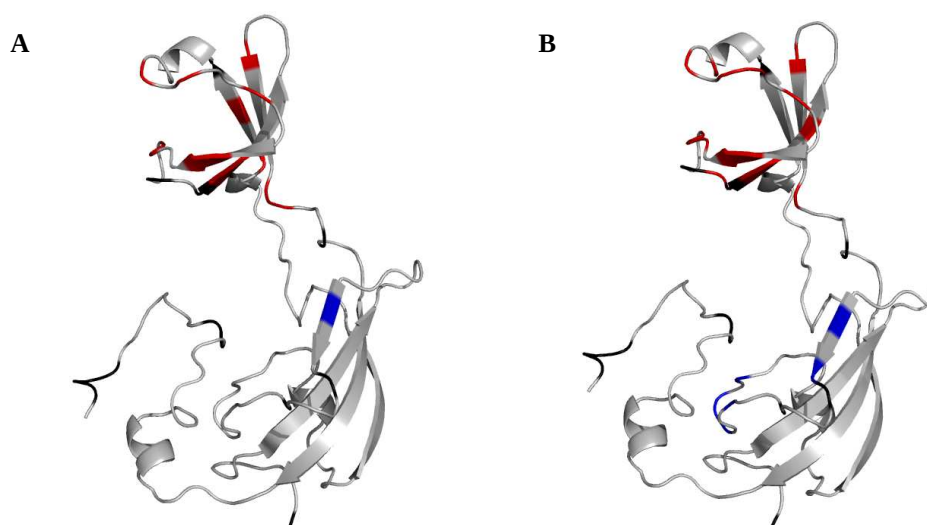


Abb. 3-23 NMR-Titration mit entfaltenen Proteinsubstraten. Amidprotonen, deren Veränderungen in der Verschiebung $\geq 0,06$ ppm ist, sind auf der Struktur von SlyD* abgebildet. Die Farbkodierung deutet auf die funktionell unterschiedlichen Domänen hin (rot: Chaperondomäne, blau: FKBP-Domäne, schwarz: nicht zugeordnete Reste oder Proline). **A** Titration mit RCM- α -La. **B** Titration mit RCM-T1.

Aus der Auftragung der Veränderung der chemischen Verschiebung gegen die steigende Substratkonzentration können die Dissoziationskonstanten der gebildeten SlyD*-Substrat-Komplexe sowie die Stöchiometrien der Komplexe bestimmt werden. Für RCM- α -La sind die jeweiligen Auftragungen für die Aminosäurereste V76 und D24 in Abb. 3-24 dargestellt. Die Stöchiometrie von zwei kann direkt aus der ersten Auftragung abgelesen werden. Die entfaltete Proteinkette von RCM- α -La wird durch zwei SlyD*-Moleküle gebunden. Die ermittelten Dissoziationskonstanten der beteiligten Aminosäurereste betragen zwischen 50 und 200 μ M. Da für die NMR-Messungen weit höhere Konzentrationen an Enzym und Substrat eingesetzt werden mussten, liefern diese nur ungefähre K_D -Werte. Die Bestimmung des Äquivalenzpunktes mit 0,5 war eindeutig möglich.

Aus FRET-Messungen mit RCM- α -La und AEDANS-markiertem SlyD* konnte die wahre Dissoziationskonstante von 2,2 μ M ermittelt werden (Weininger *et al.*, 2009). Diese weicht bis zu zwei Größenordnungen von denen ab, welche über die NMR-Titration ermittelt

wurden. Da aus der Stöchiometrie eine Beteiligung von zwei SlyD*-Molekülen an der Bindung der entfalteten RCM- α -La-Kette abgeleitet werden konnte, ist möglicherweise auch ein zweistufiger Bindungsmechanismus mit sehr unterschiedlichen Affinitäten denkbar. Das affine, aus FRET-Messungen ermittelte Bindungsereignis könnte die Bindung des ersten SlyD*-Moleküls an die entfaltete RCM- α -La-Kette beschreiben, würde aber in der NMR-Messung vielleicht durch die schwächere Bindung des zweiten SlyD*-Moleküls überlagert werden. Falls zwei aufeinander folgende Bindungsereignisse vorliegen würden, so könnte jedes für sich im jeweiligen Konzentrationsbereich mit einem einfachen Bindungsmodell beschrieben werden.

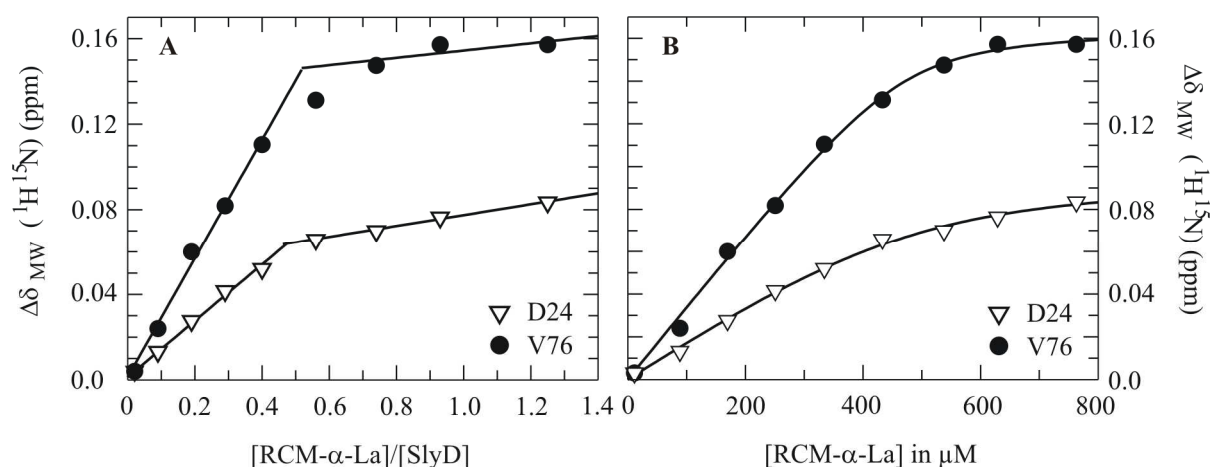


Abb. 3-24 Titrationskurven von ^{15}N -SlyD* mit RCM- α -La. **A** Dargestellt ist die Abhängigkeit der Veränderung der chemischen Verschiebung vom Konzentrationsverhältnis RCM- α -La zu SlyD* für die beiden Amidprotonen von V76 und D24. Aus der linearen Anpassung wird die Gleichgewichtsbindungskurve erhalten. Der Äquivalenzpunkt ist bei ca. 0,5 und zeigt einen 1:2-Komplex an. **B** Abhängigkeit der Veränderung der chemischen Verschiebung von der Substratkonzentration RCM- α -La. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Anpassung der Daten an ein einfaches Bindungsmodell. Die Dissoziationskonstante und die Stöchiometrie betragen jeweils $68 \pm 7 \mu\text{M}$ und $n = 2,1 \pm 0,1$ für V76 bzw. $199 \pm 14 \mu\text{M}$ und $n = 2,0 \pm 0,1$ für D24. Die Bedeutung der Bindungsparameter wird im Text diskutiert.

Bei der NMR-Titration von SlyD* mit RCM-T1 bildete sich ein 1:1-Komplex heraus. Die entsprechenden Kurven sind in Abb. 8-8 (Anhang) dargestellt. Im Gegensatz zur Titration mit RCM- α -La wird bei RCM-T1 das Plateau der Bindungskurve nicht erreicht. Auch hier ist die Bestimmung der exakten Dissoziationskonstante aus der NMR-Messung auf Grund der eingesetzten hohen Konzentrationen nicht möglich. Aus Fluoreszenztitrationen konnte die Dissoziationskonstante mit $4,4 \mu\text{M}$ bestimmt werden (Anhang, Abb. 8-8). Bei der Komplexbildung mit beiden entfalteten Proteinsubstraten sind auf Seiten von SlyD* die gleichen in der IF-Domäne befindlichen Aminosäurereste beteiligt. Das spricht dafür, dass SlyD* mit verschiedenen entfalteten Proteinketten mit ähnlicher Affinität und in gleichen Binderegionen interagiert.

3.2.1.2. Peptide als Chaperonsubstrate

Neben den Wechselwirkungen mit entfalteten Proteinketten sollte auch das Bindungsverhalten von SlyD* an kurze Peptide untersucht werden. Kürzlich wurde herausgefunden, dass SlyD beim Transport von gefalteten Proteinen, bei denen zwei aufeinander folgende Arginine in einer spezifischen Signalsequenz vorhanden sind, über das Tat-(*twin-arginine-translocon*)-Transportsystem beteiligt ist (Graubner *et al.*, 2007).

Es wurden drei synthetisierte Peptide aus der Tat-Signalpeptidsequenz von HiPIP sowie das Volllängenprotein HiPIP (*High Potential Iron-Sulfur Protein*) (Graubner *et al.*, 2007) auf ihr Bindungsverhalten mit SlyD* überprüft. Das erste Peptid umfasst den hydrophilen Bereich des Signalpeptids und enthält das *twin-arginine* Motiv (Abb. 1-8, Kapitel 1.5) mit der Sequenz SDKPISKSRRDAVK. Es wird im Folgenden als VRR-Peptid abgekürzt. Das zweite (abgekürzt als RR-Peptid) und dritte Peptid (abgekürzt als KK-Peptid) umfassen die hydrophobe Region in dem Bereich SRRDAVKVMLGTAAA. Sie sind in ihrer Sequenz identisch, bis auf das *twin-arginine* Motiv, welches beim KK-Peptid gegen zwei Lysine ausgetauscht wurde, wodurch bekanntermaßen ein Transport über den Tat-Transporter unterbunden wird (Stanley *et al.*, 2000).

Analog zur NMR-Titration mit entfalteten Proteinen wurden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektren von ^{15}N -SlyD* bei verschiedenen Punkten der Peptidzugabe aufgezeichnet und entsprechend der Veränderung der chemischen Verschiebung der Kreuzsignale von ^{15}N -SlyD* analysiert. Bei der Titration mit dem hydrophilen VRR-Peptid konnten keine signifikanten Verschiebungen der Kreuzsignale beobachtet werden, demzufolge bindet das hydrophile Peptid nicht an SlyD*. Die beiden hydrophoben Peptide (RR- und KK-Peptid) sowie das Volllängen-HiPIP verursachen Veränderungen bei den chemischen Verschiebungen der Kreuzsignale. Sie verhalten sich dabei in ähnlicher Weise wie die entfalteten Proteinketten RCM- α -La und RCM-T1. Eine Zusammenfassung der veränderten chemischen Verschiebungen von Kreuzsignalen ist in Abb. 3-25 beispielhaft für das RR-Peptid gegeben. Die abgebildete Struktur von SlyD* repräsentiert die Bindestellen für die hydrophoben Peptide, welche sich ausschließlich in der IF-Domäne befinden.

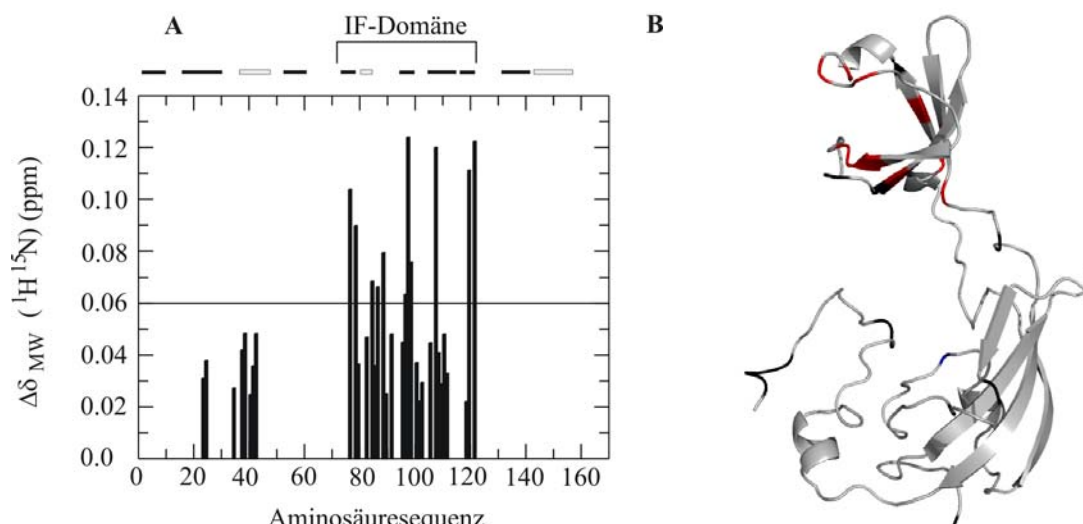


Abb. 3-25 NMR-Titration von ^{15}N -SlyD mit dem RR-Peptid. **A** Auftragung der maximalen chemischen Verschiebung aller Kreuzsignale gegen die Aminosäuresequenz von SlyD* bei der Titration mit dem RR-Peptid. Die cut-off-Grenze für spezifische Wechselwirkungen bei 0,06 ppm ist eingezeichnet. Veränderungen $\geq 0,02$ ppm wurden der Einfachheit halber weggelassen. Die ausgefüllten und offenen Rechtecke symbolisieren die Sekundärstrukturelemente β -Faltblatt bzw. α -Helix. **B** Amidprotonen, deren Veränderungen in der Verschiebung $\geq 0,06$ ppm ist, sind rot auf der Struktur von SlyD* abgebildet. (schwarz: nicht zugeordnete Reste oder Proline). Die Titration wurde in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 10 % D_2O , pH 7.5 bei 25 °C durchgeführt.

In Abb. 3-26 ist die Gleichgewichtsbindungskurve zur Bestimmung des Äquivalenzpunktes stellvertretend für das RR-Peptid aufgeführt. Beide Peptide bildeten einen 1:1-Komplex mit SlyD*. Wie bereits bei den NMR-Titrationsen mit entfalteten Proteinsubstraten erwähnt, konnten aus den Bindungsisothermen auf Grund der verwendeten hohen Protein- und Peptidkonzentrationen keine Dissoziationskonstanten bestimmt werden.

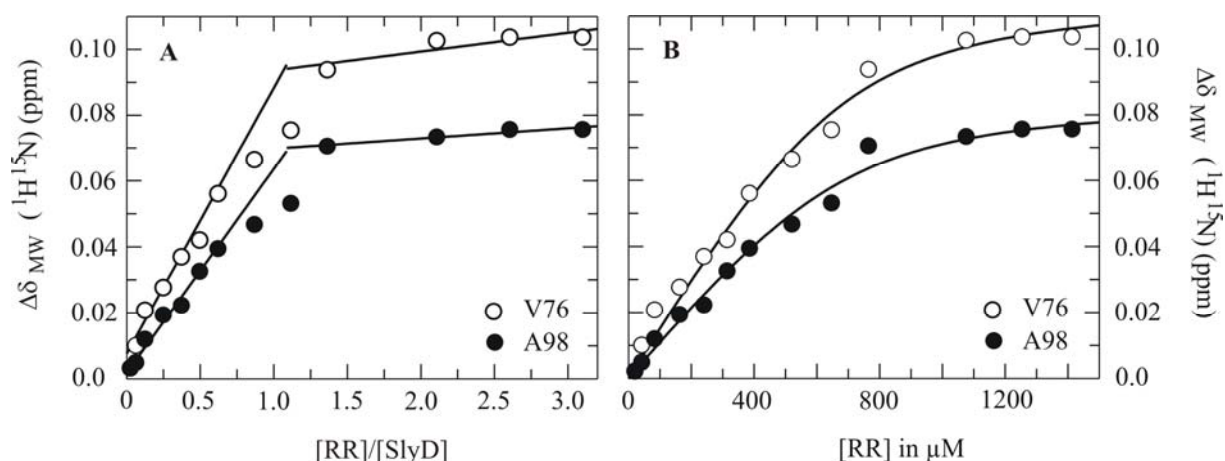


Abb. 3-26 Titrationskurven von ^{15}N -SlyD* mit dem RR-Peptid. **A** Dargestellt ist die Abhängigkeit der Veränderung der chemischen Verschiebung vom Konzentrationsverhältnis RR-Peptid zu SlyD* für die beiden Amidprotonen von V76 und A98. Aus der linearen Anpassung wird die Gleichgewichtsbindungskurve erhalten. Der Äquivalenzpunkt ist bei ca. 1. **B** Abhängigkeit der Veränderung der chemischen Verschiebung von der Substratkonzentration des RR-Peptids. Die durchgezogenen Linien haben keinerlei physikalische Bedeutung und dienen nur der einfacheren Betrachtung.

Um eine Vorstellung von der Bindungsstärke von Tat-Peptiden an SlyD* zu bekommen, wurde eine weitere Variante eines Tat-Signalpeptides (Tat27), welches in der natürlichen Sequenz ein Tryptophan aufweist, einer mittels Fluoreszenz detektierten Bindungsstudie unterworfen. Dieses synthetisierte Peptid stammt aus der Tat-Signalpeptidsequenz von CueO, einer Kupfer-Oxidase aus dem Cytosol von *E. coli* (Grass *et al.*, 2001). Die Dissoziationskonstante wurde zu $0,5 \mu\text{M} \pm 0,1 \mu\text{M}$ bestimmt (Anhang, Abb. 8-7) und ist vergleichbar mit dem K_D -Wert eines Komplexes aus dem thermophilen Homologen von SlyD (TtSlyD) mit diesem Tat27-Peptid, welcher ebenfalls $0,5 \mu\text{M} \pm 0,2 \mu\text{M}$ betrug (Löw *et al.*, 2009).

3.2.2. Beobachtung der Chaperonfunktion von SlyD* während der Insulinaggregation

Standardtests auf Chaperonaktivität untersuchen aggregierende Substratproteine dahingehend, wie stark die Aggregation in Anwesenheit eines Chaperons vermindert oder sogar unterdrückt werden kann. Einige dieser Standardsubstrate sind z.B. Citratsynthase (Buchner *et al.*, 1998), Luciferase (Frydman *et al.*, 1996), Rhodanese (Minami *et al.*, 1996) und Insulin (Haslbeck *et al.*, 1999). Insulin bzw. der aggregierende Anteil, die B-Kette, ist mit 30 Aminosäuren das mit Abstand kleinste Substrat und daher für Untersuchungen der Chaperonaktivität der isolierten kleinen IF-Domäne, aber auch für NMR-Untersuchungen bestens geeignet (2.5.9).

3.2.2.1. Streulichtmessungen zur Detektion der Insulinaggregation

Durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) werden die Disulfidbrücken, die beide Insulinketten zusammenhalten, reduziert und während die A-Kette in Lösung bleibt, fängt die B-Kette mit einer kurzen Verzögerungsphase an zu aggregieren. Diese Aggregation konnte durch einen Anstieg in der Lichtstreuung im Verlauf der Zeit verfolgt werden. Bei Zugabe steigender Konzentrationen an SlyD* als Chaperon konnte eine Reduktion der Lichtstreuung beobachtet werden, weil die Interaktion mit SlyD* die B-Kette vor der Aggregation schützt.

Da bereits vermutet wurde, dass die Chaperonaktivität von SlyD* auf die IF-Domäne beschränkt ist (3.2.1) (Knappe *et al.*, 2007), wurden auch die isolierten funktionellen Domänen auf ihre Chaperonaktivität hin untersucht. Abb. 3-27 zeigt die Streulichtmessungen von aggregierender Insulinkette B in Anwesenheit von Vollängen-SlyD*, SlyD*- Δ IF und der isolierten *E.c.*-IF-Domäne. Schon geringste Mengen an Vollängenenzym erreichen eine Verringerung der Aggregation, und bei einem Konzentrationsverhältnis von 2:1 Insulin/SlyD* wird die Aggregation klar vermindert. Die isolierte FKBP-Domäne (SlyD*- Δ IF) war nicht in

der Lage, die Aggregation von Insulin zu unterdrücken. Um die Aktivität der isolierten IF-Domäne untersuchen zu können, musste dem Reaktionsansatz 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zur strukturellen Stabilisierung der IF-Domäne zugesetzt werden. Aus NMR-Messungen konnte abgeschätzt werden, dass in Anwesenheit von 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ die IF-Domäne zu ca. 30 % strukturiert vorliegt (Anhang, Abb. 8-9). Das würde auch die verringerte Aktivität der isolierten IF-Domäne erklären, die in deutlich höheren Mengen eingesetzt werden musste, um eine klare Verringerung der Aggregation detektieren zu können. Nichtsdestotrotz konnte für die stabilisierte isolierte IF-Domäne ihre Funktion als Chaperon nachgewiesen werden.

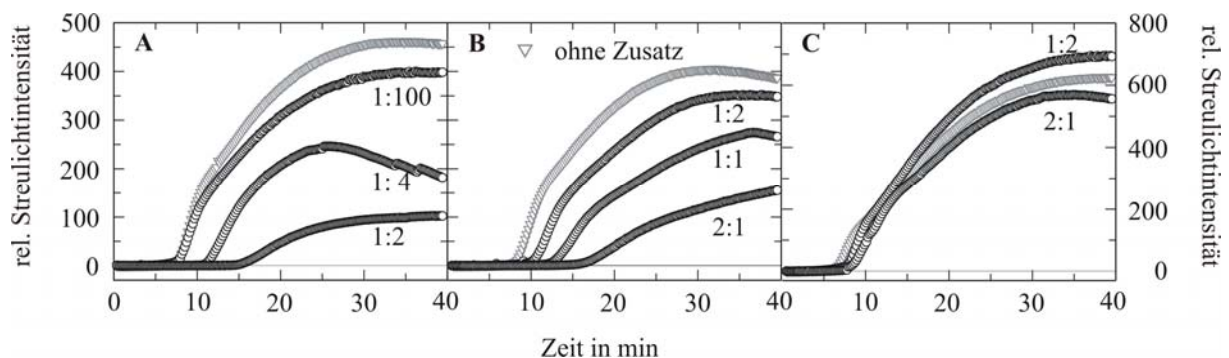


Abb. 3-27 Insulin-Test auf Chaperonaktivität. Streulichtmessungen zur Aggregation von 45 μM Insulin in 50 mM Na_2HPO_4 , 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,5 bei 25 °C in Anwesenheit von SlyD* (A), der isolierten *E.c.*-IF-Domäne (B) und SlyD*- ΔIF (C). Durch Zugabe von 10 mM DTT wurde die Reaktion gestartet und der zeitliche Verlauf bei 400 nm beobachtet. Die verwendeten Konzentrationsverhältnisse SlyD*(-Variante) : Insulin sind aufgeführt. Graue Dreiecke bezeichnen den Aggregationsverlauf von Insulin ohne Chaperonzusätze.

3.2.2.2. Eindimensionale Echtzeitkinetik zur Beobachtung des Aggregationsverhaltens von Insulin in Gegenwart von SlyD*

Eine weitere Möglichkeit, die Insulinaggregation und deren Unterdrückung zu beobachten, bietet die NMR-Spektroskopie. In Folge aufgenommene Protonenspektren zeigen in hoher zeitlicher Auflösung Veränderungen in Proteinen an. In Analogie zu den Streulichtmessungen wurde die Aggregation von Insulin durch Zugabe von DTT in einem NMR-Röhrchen gestartet und über 90 Minuten mit Hilfe von Protonenspektren verfolgt. In einer Vergleichsmessung, als dem Reaktionsansatz kein Chaperon zugesetzt wurde, setzte die Aggregation auf Grund der im Vergleich zu den Streulichtmessungen eingesetzten höheren Konzentrationen an Insulin unmittelbar nach der experimentellen Totzeit von sieben Minuten ein. Die stark verrauschten Spektren deuten darauf hin, dass kaum noch lösliches Protein vorhanden ist (Anhang, Abb. 8-10). Das betrifft sowohl A- als auch B-Kette von Insulin.

In einem zweiten Ansatz sollte das Aggregationsverhalten von Insulin in Anwesenheit des Chaperons SlyD* analysiert werden. Da in Protonenspektren auch die Protonen von SlyD*

sichtbar sind, wurde ^{15}N -markiertes SlyD* eingesetzt. Durch ein ^{15}N -Filterelement in der Pulssequenz des Protonenspektrums können die Signale von ^{15}N -gebundenen Protonen selektiv unterdrückt werden (2.7.1.). Übrig bleiben nur die Signale von Insulin im ausgewählten Amidprotonenbereich von 8,5 bis 8 ppm. In Abb. 3-28 ist der erwähnte spektrale Bereich dargestellt. Im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion waren deutlich mehr Signale mit hohem Signal/Rausch-Verhältnis analysierbar. Das in der Lösung befindliche SlyD* konnte die Aggregation wirkungsvoll unterdrücken. Es sind sowohl Signale der löslichen Insulinkette A, als auch Signale der an SlyD* gebundenen Kette B zu sehen. Die Resonanzen bei 8,4 ppm, 8,0 ppm und 7,9 ppm waren in den Spektren der unkatalysierten Reaktion nicht vorhanden und stammen wohl von der an SlyD* gebundenen Kette B.

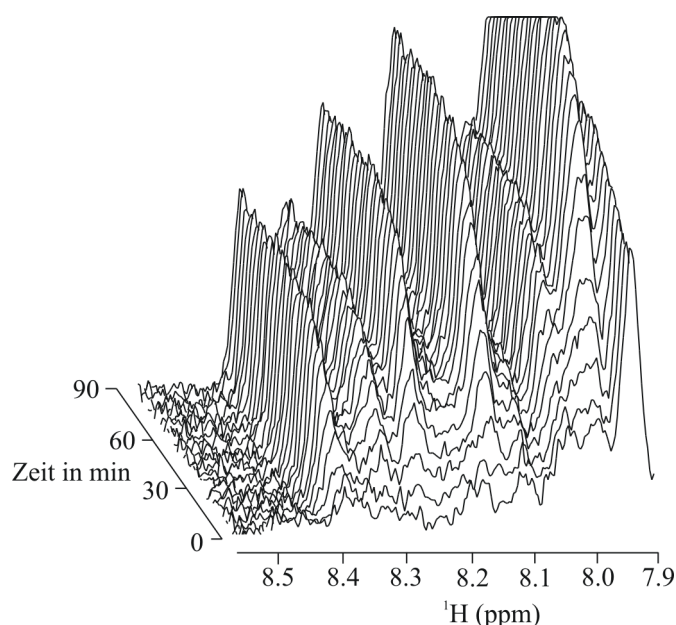


Abb. 3-28 Folge von 1D ^1H -Spektren von 450 μM Insulin in Anwesenheit von 900 μM ^{15}N -SlyD*. Die Reaktion wurde in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl , 10 % D_2O , pH 7.5 bei 25 °C durch Zugabe von 10 mM DTT (Endkonzentration) gestartet. Die Signale von ^{15}N -SlyD* wurden durch einen ^{15}N -Filter unterdrückt. Zu sehen ist der Tieffeldbereich mit einigen sehr gut aufgelösten Signalen von Amidprotonen von Insulin. Die zeitliche Auflösung pro Spektrum betrug 2 min 52 s, da zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses vier aufeinander folgende Spektren gemittelt wurden.

3.2.2.3. Zweidimensionale Echtzeitkinetik zur Beobachtung des Aggregationsverhaltens von Insulin in Gegenwart von SlyD*

Die Analyse der 1D Protonenspektren brachte Informationen über die durch SlyD* in Lösung gehaltene Insulinkette B. Dabei wurden die Signale des ^{15}N -markierten SlyD*s unterdrückt. Wenn im Gegensatz dazu in $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektren spezifisch das ^{15}N -markierte SlyD* detektiert wird, können Aussagen getroffen werden, welche Aminosäurereste auf Seiten von

SlyD* mit Insulin interagieren. Dabei wird analog zu den NMR-Titrations beobachtet, welche Kreuzsignale ihre chemische Verschiebung durch die Substratbindung verändern. Im Unterschied zur Titration wird bei der Unterdrückung der Insulinaggregation zeitaufgelöst die Bindung der intrinsisch freigesetzten Insulinketten an SlyD* beobachtet.

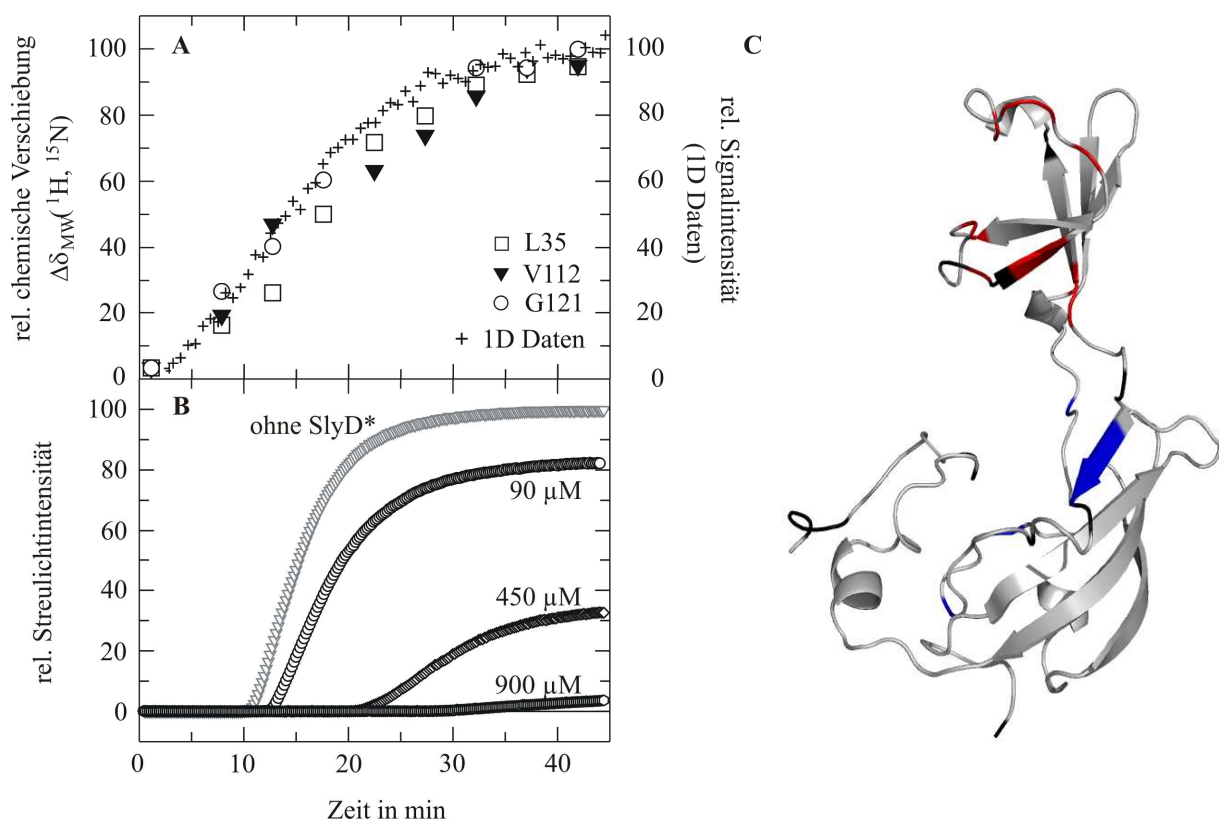


Abb. 3-29 Aggregation von 450 μM Insulin in Gegenwart von 900 μM SlyD*. Die Reaktion wurde in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl , 10 % D_2O , pH 7.5 bei 25 °C durch Zugabe von 10 mM DTT (Endkonzentration) gestartet und mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie (1D ${}^1\text{H}$ -Spektren bzw. 2D ${}^1\text{H}/{}^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektren) (**A**) oder Lichtstreuungsmessungen (**B**) verfolgt. **A** Der zeitliche Verlauf der Veränderung der chemischen Verschiebung ist für die SlyD*-Amidprotonen von L35, V112 und G121 sowie für das zwischen 8,35 und 8,44 ppm integrierte Signal von Insulin aus den ${}^1\text{H}$ -Spektren dargestellt. **B** Während der 30-minütigen Verzögerungsphase der Aggregation erfolgt bereits die vollständige Bindung von Insulin an SlyD* (NMR-Bedingungen: 900 μM SlyD*). **C** Die mit der Insulinkette B wechselwirkenden Amidprotonen sind auf der Struktur von SlyD* abgebildet. Die Farbkodierung verdeutlicht nur die zwei funktionell unterschiedlichen Domänen (rot: IF-Domäne, blau: FKBP-Domäne, schwarz: nicht zugeordnete Reste und Proline).

Nach Start der Reaktion durch DTT wurden 15 kurze FHSQC-Spektren (5 min) von ${}^{15}\text{N}$ -SlyD* aufgezeichnet. Durch die Bindung der aggregationsanfälligen Insulinkette B an SlyD* verschieben sich die Kreuzsignale der betroffenen Amidprotonen des Chaperons. Der Großteil dieser Veränderungen betrifft die Aminosäurereste in der IF-Domäne (Abb. 3-29) und zeigt somit die gleichen Reste, die schon in den Gleichgewichtstitrationen gefunden wurden. Der zeitliche Verlauf der Veränderung der chemischen Verschiebung einiger Kreuzsignale ist in Abb. 3-29A wiedergegeben. Der gleiche zeitliche Verlauf konnte auch für die Insulinsignale aus den ${}^{15}\text{N}$ -gefilterten 1D Echtzeitkinetiken beobachtet werden. Dieser

Zeitverlauf, der in beiden Echtzeitexperimenten aufgedeckt wurde, entspricht der intrinsischen Freisetzung der Insulinketten durch Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT und wurde schon in früheren Studien zur Reduktion von Insulin diskutiert (Holmgren, 1979).

Mit Hilfe der unterschiedlichen verwendeten Detektionsmethoden kann der Prozess der durch SlyD* vermittelten Unterdrückung der Aggregation von Insulin unter verschiedenen Gesichtspunkten analysiert werden. Die Bindungsstellen von SlyD* für die freigesetzte Insulinkette B wurden über die zeitaufgelöst aufgezeichneten 2D FHSQC-Spektren von ^{15}N -SlyD* bestimmt. Sie befinden sich hauptsächlich in der IF-Domäne. Die 1D ^{15}N -gefilterten Protonenspektren gaben Aufschluss darüber, wie sich die freigesetzten Insulinketten in Gegenwart von SlyD* verhalten. Gut aufgelöste Resonanzen der Insulinketten belegen, dass sie effektiv in Lösung gehalten werden können, ohne dass Aggregate auftreten. Die unter analogen experimentellen Bedingungen durchgeführten Lichtstreuungsmessungen zeigen ebenfalls, dass keine Aggregation stattfindet. Die entsprechende Kurve in Abb. 3-29B bei 900 μM SlyD* bleibt über 30 Minuten konstant bei einer Intensität von Null, während in Abwesenheit von SlyD* (graue Dreiecke, Abb. 3-29B) ein starker Anstieg der Lichtstreuung die Aggregation von Insulin anzeigt. Der Vergleich der Zeitverläufe aus den NMR-Experimenten, die eine eindeutige Wechselwirkung von SlyD* mit Insulin bezeugen, mit dem entsprechenden Kurvenverlauf für die unterdrückte Lichtstreuung bei 900 μM SlyD* verdeutlicht, dass die Bindung der aggregationsanfälligen Insulinkette B an SlyD* bereits während der langen Verzögerungsphase eingesetzt hat. Während dieser Phase erfolgt die Bindung an SlyD* in dem Maße, wie die Freisetzung der Insulinkette B stattfindet. Das führt zu der beobachteten Verlängerung der Verzögerungsphase um 30 Minuten (Abb. 3-29B) und der starken Unterdrückung der Aggregation.

3.2.3. Zusammenfassende Diskussion: Lokalisierung der Bindestellen in SlyD* und Charakterisierung der Chaperonaktivität

Chaperone unterdrücken die Aggregation von Proteinen, indem sie an freie hydrophobe Bereiche von entfalteten oder teilweise gefalteten Proteinen bzw. Peptiden binden. SlyD wurde als hoch effizientes Chaperon klassifiziert und wird daher auch als Fusionsmodul für aggregationsanfällige Proteine eingesetzt, um eben solche permanent in Lösung und demzufolge funktionsfähig zu halten (Scholz *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2006; Scholz *et al.*, 2008). Diese Eigenschaft wurde von Roche Diagnostics (Penzberg) ausgenutzt, um einen serologischen Test gegen HIV aufzubauen, der bereits auf dem Markt eingeführt wurde (Scholz *et al.*, 2005). Durch Deletionsmutationsanalysen wurde herausgefunden, dass die

isolierte FKBP-Domäne von SlyD* nicht mehr als Chaperon aktiv war und die Vermutung geäußert, dass die Chaperonfunktion auf die IF-Domäne beschränkt sei (Suzuki *et al.*, 2003; Scholz *et al.*, 2006; Knappe *et al.*, 2007).

Um in dieser Arbeit nun einen orts aufgelösten Eindruck über die Chaperonfunktion von SlyD* zu erhalten, wurden verschiedene NMR-Titrations von ^{15}N -markiertem SlyD* durchgeführt. Für die Bindungsstudien sind entfaltete Proteine und Peptide eingesetzt worden. Mit Hilfe der NMR-Titrations konnten die Beiträge einzelner Aminosäurereste in SlyD* zur Bindung von Substratmolekülen charakterisiert werden. Dabei treten Wechselwirkungen vorrangig immer mit der IF-Domäne auf, insbesondere mit den hydrophoben und negativ geladenen Seitenketten V76, F84, G86, D88, Q91, R95, F96, A98, E99, V107, E108, H116 und G121. SlyD* zeigt keinerlei Präferenzen gegenüber einem bestimmten entfalteten oder teilweise gefalteten Substrat und ist als Chaperon wohl universell einsetzbar. Wechselwirkungen mit gefalteten Proteinen werden generell nicht beobachtet.

Für SlyD* konnte in dieser Arbeit eine eindeutige Zuordnung der Chaperonfunktion auf die IF-Domäne gezeigt werden, welche für das archeale homologe MtFKBP17 bis dato nur angenommen werden konnte (Suzuki *et al.*, 2003). Die Besonderheit der IF-Domäne in SlyD* liegt in ihrer hohen intrinsischen Faltungsdynamik. Durch das schnelle konformationelle Gleichgewicht zwischen nativem und entfaltetem Zustand kann sie sich verschiedenen teilweise gefalteten oder entfalteten Substratproteinen anpassen, wodurch eine sehr schnelle und feste Bindung gewährleistet wird (siehe Abschnitt 3.1; Zoldák *et al.*, 2009).

Eine spezifische *in vivo* Funktion für die Chaperonaktivität konnte bis jetzt noch nicht eindeutig gezeigt werden. Es ist jedoch bekannt, dass die spezifische Bindung von SlyD an HypB während des Ni^{2+} -Transportes zum Aufbau des Metallzentrums der Apohydrogenase in *E. coli* auf der Wechselwirkung der Chaperondomäne von SlyD mit HypB beruht (Leach *et al.*, 2007). Ebenso wurde eine Beteiligung SlyDs am Tat-abhängigen Transport von gefalteten Proteinen gezeigt (Graubner *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien mit Tat-Signalpeptidsequenzen unterstützen die Vermutung, dass SlyD die entfalteten, ungeschützten Tat-Signalpeptide von gefalteten Proteinen gegenüber Proteasen im Zytosol abschirmt.

Hitzeschockversuche bei *E. coli* BL21 DE3 zeigten einen enormen Anstieg der SlyD-Konzentration gegenüber normalen, stressfreien Bedingungen in der *E. coli*-Zelle (Han *et al.*, 2007). Dabei wurde festgestellt, dass SlyD nach der Hitzeschockbehandlung die Faltung von zytosolischen Proteinen unterstützte und aggregationsanfällige Proteine in Lösung hielt. Das Verhalten von SlyD* gegenüber aggregationsanfälligen Proteinen konnte im Rahmen dieser Arbeit auf molekularer Ebene wirkungsvoll aufgezeigt werden. In einem hochaufgelösten Echtzeit-NMR-Ansatz wurde die durch das Chaperon SlyD* inhibierte Aggregation von

Insulin charakterisiert. Mit Hilfe der unterschiedlichen methodischen Herangehensweisen konnte einerseits mit Streulichtmessungen beobachtet werden, wie die Oligomerisierung der Insulinkette B voranschreitet, und andererseits, wie die in Gegenwart von SlyD* löslichen Ketten freigesetzt werden und wie diese sich im Komplex mit SlyD* verhalten. In dem Maße, wie die aggregationsanfällige Insulinkette B durch DTT freigesetzt wird, erfolgt sofort die Bindung an SlyD*, wodurch die Aggregation unterdrückt wird. Dabei sind wieder die gleichen Aminosäurereste der IF-Domäne beteiligt, die als Bindestelle für Chaperonsubstrate lokalisiert worden sind.

3.3. Peptidyl-Prolyl-Isomerase- Funktion von SlyD*

3.3.1. Bedeutung der Y68W-Mutation für den Katalysemechanismus der Prolylisomerase SlyD*

Der exakte Katalysemechanismus der Prolylisomerisierung von FKBP's ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt viele Hypothesen, von denen die der *catalysis by distortion* am plausibelsten erscheint (Harrison *et al.*, 1990; Fanghänel *et al.*, 2004). Bei diesem Katalysemechanismus wird vermutet, dass die Ausbildung der Wasserstoffbrücke vom Prolin-Carbonylsauerstoff zum Proteinrückgrat der jeweiligen Aminosäuren des aktiven Zentrums in der oberen Bindetasche für die Polarisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung sorgt, wodurch der Doppelbindungscharakter aufgehoben werden würde und die Rotation um die Bindung zur *cis*-Konformation ermöglicht werden könnte (Bossard *et al.*, 1994).

Spezifische Punktmutationsstudien von FKBP12 im Bereich des aktiven Zentrums unterstützen diese These (Bossard *et al.*, 1994; Ikura *et al.*, 2007). Neben Y26, F36, D37, I56 und F99 spielt dabei Y82 eine entscheidende Rolle für die Aktivität. Mutationen von Y82 gegen Leucin (Bossard *et al.*, 1994) reduzieren die Aktivität auf 10 %, wohingegen Mutationen gegen Tryptophan die Aktivität auf das Dreifache steigern (Ikura *et al.*, 2007). Das Tyrosin 82 ist unter den FKBP-artigen PPIasen hoch konserviert und entspricht dem Tyrosin 68 in SlyD*. In der NMR-Struktur von SlyD* zeigt die Y68-Seitenkette abweichend von der Position der Tyrosinseitenkette in FKBP12 und MtFKBP17 in die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums und füllt die Substratbindestelle fast aus (Abb. 1-7, Weininger *et al.*, 2009).

In Anlehnung an die Mutationsstudien von Ikura und Ito wurde das Tyrosin 68 gegen ein Tryptophan ausgetauscht. Einerseits sollte die Tryptophan-Mutation auf Grund erhöhter Hydrophobizität die Aktivität erhöhen, andererseits ist Tryptophan voluminöser als Tyrosin

und könnte die Substratbindetasche weiter blockieren. Thermische und harnstoffinduzierte Entfaltungsübergänge der Tryptophan-Mutante zeigten eine geringfügig niedrigere thermodynamische Stabilität (thermisch: $\Delta H_U(\text{H}_2\text{O}) = 244,8 \pm 1,5 \text{ kJ/mol}$, $T_m = 41,3 \text{ }^\circ\text{C}$; Harnstoff: $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) = 14,1 \pm 0,7 \text{ kJ/mol}$, $m = 6,3 \pm 0,3 \text{ kJ/(mol}\cdot\text{M)}$, $[D]_{1/2} = 2,2 \text{ M}$), die Chaperonaktivität im Insulin-Aggregationstest blieb unverändert (Abb. 8-11, Abb. 8-12 im Anhang).

Deutliche Unterschiede zu SlyD* offenbarten sich bei der PPIase-Funktion für SlyD*-Y68W. Sowohl im Tetrapeptid-Test als auch bei der Rückfaltung von RCM-T1 unter Hochsalzbedingungen sank die katalytische Effizienz auf 23 % bzw. 13 % ab (Tab. 3-6). Die allgemein höhere PPIase-Aktivität von SlyD* gegenüber Proteinsubstraten im Vergleich zum Peptidsubstrat trifft auch für die Y68W-Mutante zu. Die Analyse der Michaelis-Menten-Kinetik in Bezug auf RCM-T1 als Substrat ließ erkennen, dass sich die Affinität zum Substrat verbessert. Höhere intrinsische Dynamiken auf der schnellen NMR-Zeitskala im Bereich um W68 unterstützen die Substratbindung (Anhang, Abb. 8-13). Die Ursache für die drastische Reduktion der Aktivität ist vielmehr in der sehr geringen Wechselzahl (k_{cat}) zu suchen. Trotz erhöhter Affinität ist die Substratumsetzung stark vermindert. Vermutlich nimmt die sperrige Tryptophan-Seitenkette die obere Substratbindetasche (*hydrophilic edge*) (Ikura *et al.*, 2007) stärker ein, verbessert durch ihre Hydrophobizität die Bindungsaffinität zum *trans*-Prolin und der Vorgängeraminoäure (idealerweise eine hydrophobe Aminosäure), verhindert aber gleichzeitig die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen des Prolin-Carbonylsauerstoffs zu den Amidprotonen des SlyD*-Proteinrückgrates im aktiven Zentrum, wodurch die katalytische Umsetzung behindert wird.

Tab. 3-6 Katalytische Effizienzen von SlyD* und der Y68W-Mutante für die PPIase-Funktion im RCM-T1- und Tetrapeptid-Test.

	RCM-T1			Tetrapeptid		
	SlyD*	Y68W	FKBP12 ^a	SlyD*	Y68W	FKBP12 ^a
k_{cat}/K_M in $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1,33 \pm 0,16$	$0,17 \pm 0,01$	0,015	$0,33 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,01$	0,7
k_{cat} in s^{-1}	$0,505 \pm 0,038$	$0,021 \pm 0,002$	-	-	-	-
K_M in μM	$0,38 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,01$	-	-	-	-

^a Daten aus Knappe *et al.*, 2007 entnommen.

SlyD* ist eine sehr effiziente PPIase bezogen auf Proteinsubstrate (Hottenrott *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 2006; Knappe *et al.*, 2007). Verglichen mit FKBP12 katalysiert SlyD* die *trans* $\rightarrow$ *cis*-Isomerisierung von RCM-T1 um zwei Größenordnungen besser (Knappe *et al.*, 2007) (Tab. 3-6). Die Ursache dafür ist in der hohen Affinität der IF-Domäne zu entfalteten Proteinketten zu sehen (Absatz 3.2.1.1). Kleine Peptidsubstrate, die direkt ans aktive Zentrum der FKBP-Domäne binden, werden dagegen von SlyD* um einen Faktor drei schlechter

katalysiert. In kombinierten Mutationsstudien wurde die IF-Domäne von SlyD* in den entsprechenden Loop-Bereich von FKBP12 eingefügt und eine Prolylisomerase erschaffen, welche in katalysierten Proteinfaltungsreaktionen noch aktiver ist als SlyD* (Knappe *et al.*, 2007). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die FKBP-Domäne von SlyD* eine geringere intrinsische Prolylisomerasenfunktion hat, welche aber durch die Existenz der Chaperondomäne kompensiert wird.

Erste Hinweise für die niedrigere intrinsische PPIase-Aktivität sind in der NMR-Struktur aufgedeckt worden, in der die Seitenkette von Tyrosin 68 im Gegensatz zu FKBP12 in das aktive Zentrum ragt. Die Analyse der katalytischen Effizienz der Y68W-Mutante von SlyD* bestätigt diese Vermutung. Trotz erhöhter Substratbindung auf Grund der großen hydrophoben Seitenkette, was sich in einer kleineren Michaelis-Menten-Konstante widerspiegelt, ist die katalytische Effizienz um einen Faktor zehn geringer. Der Grund liegt in einem kleinen k_{cat} -Wert, wonach die Umsetzung des Substrates stark behindert wird. Die Zugänglichkeit zu den Aminosäureresten des katalytisch aktiven Zentrums wird durch die sperrige Seitenkette herabgesetzt. Im Vergleich zur natürlich vorhandenen Seitenkette von Tyrosin erscheint dieser Effekt durch das Tryptophan verstärkt worden zu sein. Diese Tatsachen könnten erste mechanistische Hinweise für die beobachtete reduzierte PPIase-Aktivität sein.

3.3.2. Echtzeit-NMR-Untersuchung zur Katalyse der Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N)

Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die bisherigen Untersuchungen zur Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N) fanden entweder in 10 mM Na-Oxalat, 0,6 M GdmCl bei pH 5.0 für die unkatalysierte Rückfaltung oder in 50 mM Tris, 0,6 M GdmCl, pH^{15 °C} 8.0 für die Rückfaltung in Anwesenheit von YpSlyD, einer SlyD-homologen PPIase aus *Yersinia pestis*, bei 15 °C oder 1 °C statt (Hagn, 2003; Hartung, 2004). Diese Reaktionsbedingungen konnten für die SlyD*-katalysierte Reaktion nicht verwendet werden, da SlyD* eine zu hohe PPIase-Aktivität aufweisen würde und die katalysierte Rückfaltung unter den Bedingungen zu schnell ablaufen würde, um eine mehrdimensionale NMR-spektroskopische Analyse durchführen zu können. Zusätzlich musste noch die pH-Stabilität von SlyD* (pI = 4.95) und die geringere Stabilität gegenüber GdmCl berücksichtigt werden (Anhang, Abb. 8-14, Abb. 8-15). Im Gegensatz zu YpSlyD ist von SlyD* sowohl Zuordnung als auch NMR-Struktur bekannt, eine der Voraussetzungen, um NMR-spektroskopisch Bindungsereignisse zu analysieren.

Die NMR-Messungen mit markierter RNase T1 (S54G/P55N) zur Detektion des Geschehens auf Substratebene wurden in 10 mM Bis-Tris, 0,6 M GdmCl, pH^{10 °C} 6.0 bei 10 °C in Anwesenheit von 10 % SlyD* durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte eine Beschleunigung der Rückfaltung um ca. 50 % erreicht werden, wie an Hand der fluoreszenzdetektierten Rückfaltungskinetiken und der 1D ¹H-Spektren-analysierten Rückfaltungskinetik gezeigt werden konnte (Abb. 3-30; *stacked plot*: Abb. 8-16 im Anhang). Für die Analyse der RNase-T1-(S54G/P55N)-Bindung an ¹⁵N-SlyD* wurde als Puffer 10 mM Tris, pH^{20 °C} 7.5 verwendet und bei 20 °C in Abwesenheit von GdmCl gemessen, da SlyD* unter den zunächst verwendeten Bedingungen schon teilweise entfaltet vorliegt (Abb. 8-14). Für die NMR-technisch erwünschte reduzierte PPIase-Aktivität wirkte sich dieser Faktor für die ¹⁵N-RNase T1 (S54G/P55N)-detektierte katalysierte Rückfaltung positiv aus.

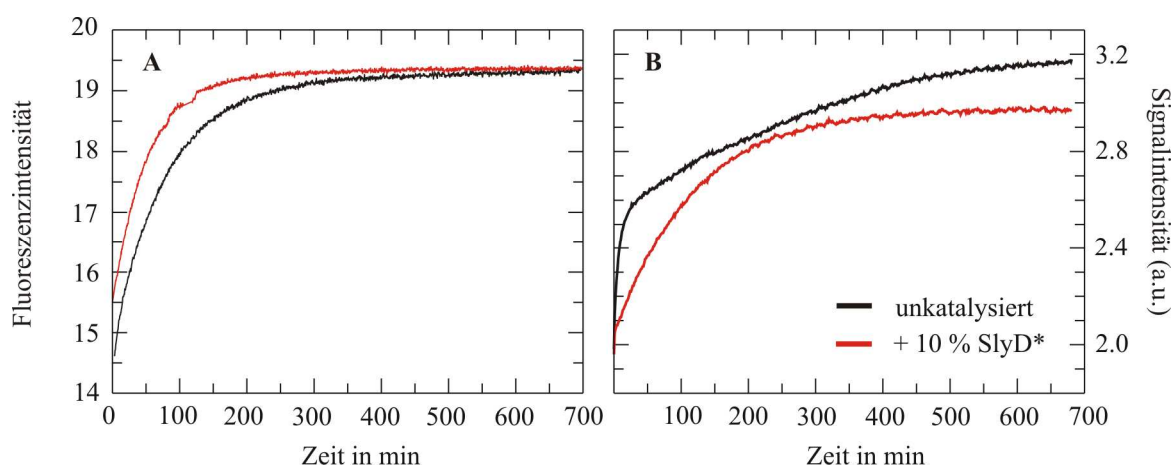


Abb. 3-30 Rückfaltungskinetiken von RNase T1 (S54G/P55N) (schwarz) in Gegenwart von 10 % SlyD* (rot) in 10 mM Bis-Tris, pH^{10 °C} 6.0 bei 10 °C. **A** Fluoreszenzdetektierte Kinetiken von 80 µM RNase T1 (S54G/P55N) +/- 8 µM SlyD* mit folgenden Raten für die langsame Prolylisomerisierung: $k_0 = 0,0129 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$ und $k_{\text{kat}} = 0,0198 \pm 0,0027 \text{ min}^{-1}$. **B** Rückfaltungskinetik von 1,9 mM RNase T1 (S54G/P55N) +/- 190 µM SlyD* mit 1D ¹H NMR-Spektren verfolgt. Das isolierte Signal im Tieffeldbereich wurde zwischen 9,55 und 9,75 ppm integriert und lieferte folgende Raten: $k_0 = 0,0043 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$ und $k_{\text{kat}} = 0,0086 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$. Bei der unkatalysierten Reaktion konnte hier sogar die schnelle Rückfaltungsreaktion (Balbach *et al.*, 1999) aufgelöst werden. Der Unterschied zwischen den fluoreszenz- und NMR-detektierten Raten ist auf die große Konzentrationsdifferenz zurückzuführen.

3.3.2.1. 3D NMR-Spektroskopie zur Zuordnung des kinetischen Faltungsintermediates von RNase T1 (S54G/P55N)

Im Hinblick auf die Analyse der durch SlyD* vermittelten Katalyse der Prolylisomerisierung wurde die Zuordnung der Rückgratamidprotonen des kinetischen Faltungsintermediates von RNase T1 (S54G/P55N) im Komplex mit SlyD* durchgeführt. Dabei wurden gleichzeitig die Zuordnung des freien Intermediates sowie die des nativen Zustandes für die gewählten

Reaktionsbedingungen angepasst. Mit der zusätzlichen Korrelation in der ^{13}C -Ebene eröffnen sich bessere Möglichkeiten für eine genauere Zuordnung der RNase T1 (S54G/P55N), bei der in früheren Arbeiten nur auf $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren zurückgegriffen worden ist (Balbach *et al.*, 1999; Steegborn *et al.*, 2000). Die vollständigen Zuordnungstabellen sind im Anhang beigelegt (ohne GdmCl bei 25 °C: Tab. 8-9, mit 0,6 M GdmCl bei 10 °C: Tab. 8-10). Dreidimensionale Zuordnungsexperimente wie z.B. das HNCA, welche auf Korrelationen zwischen den drei NMR-aktiven Kernen ^1H , ^{13}C und ^{15}N zurückgreifen, benötigen in der Regel 1-2 Tage Messzeit. Wie aus mit Fluoreszenz detektierten und mit 1D ^1H -Spektren verfolgten Rückfaltungskinetiken von RNase T1 (S54G/P55N) bekannt ist, beträgt die Lebenszeit des kinetischen Faltungsintermediates maximal fünf Stunden (Abb. 3-30). Mit Hilfe des BEST-Ansatzes war es möglich, ein HNCA-Experiment innerhalb von den erforderlichen fünf Stunden aufzunehmen (Schanda *et al.*, 2006; Lescop *et al.*, 2007) (siehe auch Kapitel 1.1.2 und 2.7.3). Die Wartezeit zwischen zwei aufeinander folgenden *scans* konnte dabei auf 100 ms reduziert werden, wodurch sich die absolute Aufnahmezeit etwa um den Faktor 10 von 56 Stunden für ein konventionelles HNCA-Experiment auf fünf Stunden für das BEST-HNCA verringerte.

Die Rückfaltung von in 6 M GdmCl entfalteter RNase T1 (S54G/P55N) wurde durch schnelles 10faches Verdünnen in Rückfaltungspuffer (10 mM Bis-Tris, pH $^{10\text{ }^\circ\text{C}}$ 6.0, 10 % D $_2\text{O}$) auf Eis gestartet. Nach einer Totzeit von drei Minuten wurde ein kurzes 5-Minuten $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC vom sich schnell bildenden Intermediat aufgenommen, bevor das BEST-HNCA während der Rückfaltung über fünf Stunden lief. Nach vollendeter Rückfaltung wurden 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren und 3D $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren sowie ^{15}N -editierte $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-(TOCSY)-HSQC-Spektren vom nativen Zustand aufgezeichnet. In einem zweiten Reaktionsansatz wurde in Gegenwart von 10 % SlyD* die katalysierte Rückfaltung in analoger Vorgehensweise betrachtet.

In den BEST-HNCA-Spektren sind neben den Kreuzsignalen vom Intermediat auch die Kreuzsignale des nativen Zustandes zu sehen. Die meisten unterscheiden sich jedoch in ihren Verschiebungen, so dass sie die Zuordnung des Intermediates nicht beeinträchtigen. Für 16 Amidprotonen wurde kein doppelter Datensatz gefunden; sie symbolisieren den Bereich des Intermediates, der sich bereits in einer nativ-ähnlichen Umgebung im Molekül befindet. Die Verknüpfung der entsprechenden Streifen ist für den nativen Datensatz und für den jeweiligen intermediären Datensatz möglich. In Abb. 3-31 werden aufeinander folgende $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Streifen des kinetischen Faltungsintermediates aus dem BEST-HNCA gezeigt. Besonders im zentralen Bereich des $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektrums kommt es zu erheblicher Signalüberlappung, was sich auch in den $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Streifen niederschlägt. Das erschwert die Auswertung der weniger intensiven Signale. Für 63 der 104 Aminosäuren im Rückgrat des Intermediates und für die

16 Reste, die sich bereits in einer nativ-ähnlichen Umgebung befinden, war eine eindeutige Zuordnung möglich. Vermutlich liegen die Signale der restlichen Aminosäuren, welche sich im Schleifenbereich hinter P39 befinden, in dem eben erwähnten Teil des Spektrums, in dem die Kreuzsignale für komplett entfaltete Proteinketten liegen. Hier war die Zuordnung wegen Signalüberlagerung nicht zweifelsfrei möglich (Anhang, Tab. 8-11).

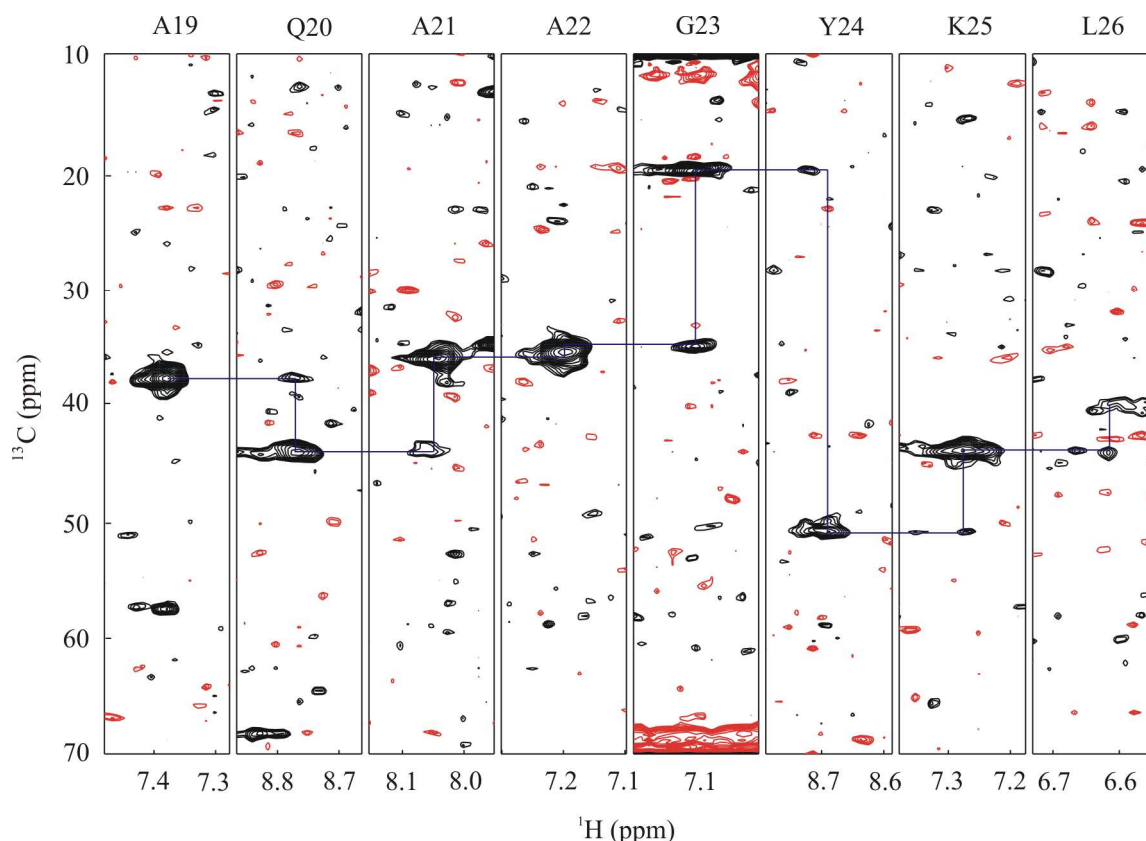


Abb. 3-31 Streifen aus dem BEST-HNCA. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Streifen eines ausgewählten Sequenzbereiches des Faltungsintermediates von RNase T1 (S54G/P55N) während der katalysierten Rückfaltung durch 10 % SlyD* in 10 mM Bis-Tris, 0,6 M GdmCl, pH^{10 °C}6.0 bei 10 °C. Die Konnektivitäten im Bereich der C $^{\alpha}$ -Atome sind durch Linien angedeutet. (rot: negative Signalintensität, schwarz: positive Signalintensität)

In den 3D Zuordnungsspektren traten neben den Kreuzsignalen des nativen und intermediären Zustandes 22 weitere Signale auf, die weder dem einen noch dem anderen Zustand zugeordnet werden konnte. Diese Signale zeigen größtenteils die gleiche $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Verschiebung wie bereits zugeordnete, unterscheiden sich aber hauptsächlich in den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Verschiebungen. Diese 22 zusätzlichen Kreuzsignale wurden einer zweiten, geringer populierte Spezies zugeordnet (*minor* Spezies).

3.3.2.2. Die NMR-spektroskopische Entdeckung einer zweiten Konformation in nativer RNase T1 (S54G/P55N)

Die dreidimensionalen Zuordnungsexperimente deckten das Vorhandensein einer zweiten Spezies in der RNase T1-(S54G/P55N)-Lösung auf. Sowohl für die Hauptspezies als auch für die *minor* Spezies treten in den 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren und in den 3D $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Zuordnungstreifen getrennte Kreuzsignale auf (Abb. 3-32). Diese erscheinen bei anderen chemischen Verschiebungen, als für das Intermediat beobachtet wird und zeigen teilweise auch im Intermediat einen doppelten Datensatz (insbesondere V79, N83, G88). Die Intensität des zweiten Datensatzes beträgt in etwa die Hälfte der restlichen Signale. Es handelt sich wahrscheinlich um eine zweite Konformation im Bereich der β -Faltblattstränge 6 und 7 (V78 – V89; Anhang, Abb. 8-18). Beide Konformationen kommen sowohl in nativer als auch in zurückgefalteter RNase T1 (S54G/P55N) vor. Die von CSI (*chemical shift index*) abgeleiteten *phi/psi*-Diederwinkel stimmen für die Sekundärstrukturelemente der zweiten Konformation mit der Hauptspezies bis auf das letzte β -Faltblatt überein. Dieses β -Faltblatt zeigt hauptsächlich unstrukturierte Bereiche (*random coil*).

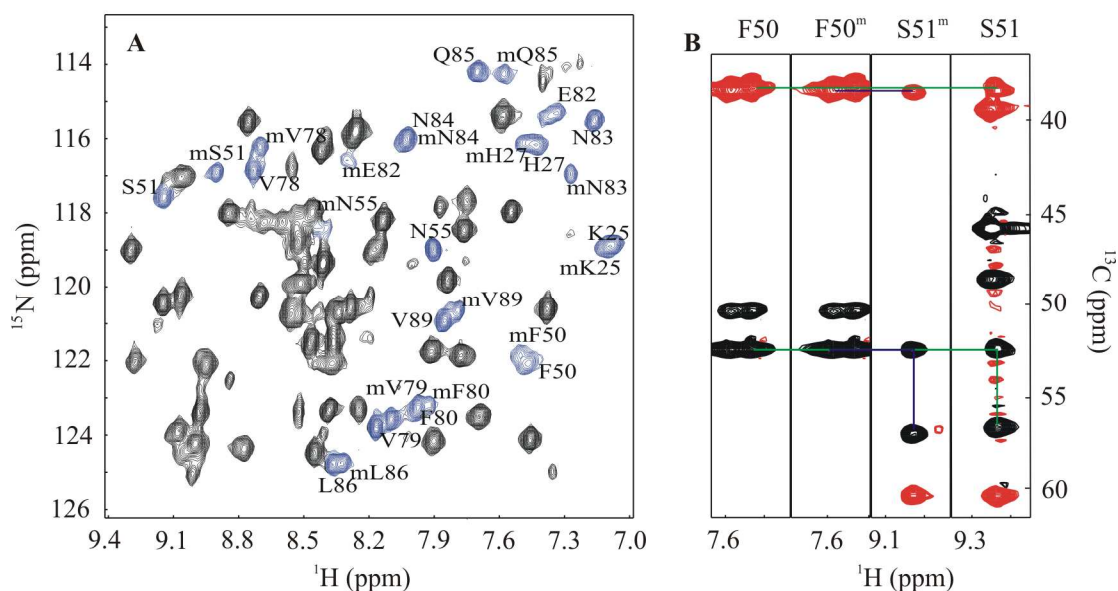


Abb. 3-32 Zuordnung der zweiten Konformation von RNase T1 (S54G/P55N). **A** Ausschnitt aus dem $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC von zurückgefalteter nativer RNase T1 (S54G/P55N). Die Kreuzsignale des doppelten Datensatzes sind blau eingefärbt und zugeordnet. **B** HNCACB-Streifen von F50 und S51 und der zugehörigen zweiten Konformation F50^m und S51^m bei 25 °C. Die Konnektivitäten zwischen F50 (Vorgänger) und S51 sind jeweils für C^α und C^β angegeben. Die Unterschiede bei den Verknüpfungen sind für Hauptspezies (grün) und *minor* Spezies (blau) angedeutet. Im Streifen von S51 sind zusätzlich die Signale von G7 zu sehen.

Zur Untersuchung der Stabilität der zweiten Konformation wurde ein H/D-Austauschexperiment durchgeführt. Dieses offenbarte eine weitaus geringere thermodynamische Stabilität für die *minor* Spezies. Der Austausch mit den Lösungsmitteldeuteronen war innerhalb von 5 Stunden abgeschlossen und deutet auf Schutzfaktoren im Bereich von 10^2 und einer Stabilisierungsenthalpie von ca. 11 kJ/mol hin. Die Hauptspezies hingegen hat eine freie Stabilisierungsenthalpie von mehr als 24 kJ/mol (für Q85), entsprechend einem Schutzfaktor von ca. $2 \cdot 10^4$ (Abb. 3-33).

Eine Trennung beider Spezies auf Grund ihrer unterschiedlichen thermodynamischen Stabilitäten war nicht möglich. Auch die bevorzugte Wechselwirkung SlyD*s mit der zweiten Konformation (*minor*) reichte nicht aus, um beide Spezies voneinander zu trennen.

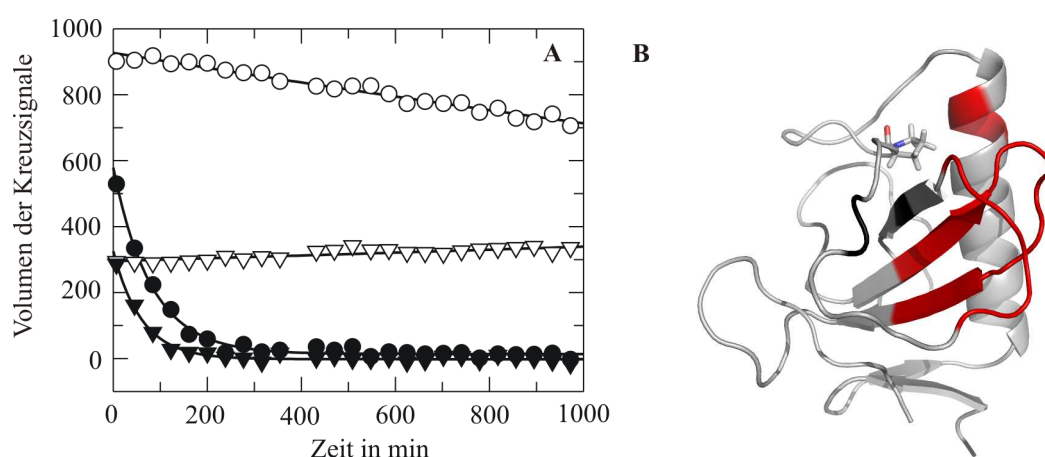


Abb. 3-33 A H/D-Austauschkinetiken der Amidprotonen N83 (∇) und Q85 ($\circ$) von RNase T1 (S54G/P55N). Die offenen Symbole stehen für Kreuzsignale der Hauptspezies, die geschlossenen für Signale der zweiten Konformation. Die Anpassung der Kinetiken an eine monoexponentielle Funktion liefert Austauschraten von $0,990 \pm 0,054 \text{ h}^{-1}$ (*minor*N83), $0,738 \pm 0,030 \text{ h}^{-1}$ (*minor*Q85) und $0,012 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ (Q85). Jeder Datenpunkt wurde im Abstand von 40 Minuten aufgenommen. **B Struktur von RNase T1.** Die rot abgebildeten Bereiche repräsentieren die Region, in der zwei Konformationen auftreten. Das Prolin 39 ist in Stäbchenform dargestellt. Nicht zugeordnete Amidprotonen bzw. weitere Proline sind schwarz eingefärbt.

Zunächst geäußerte Vermutungen, dass es sich bei der zweiten Spezies um Verunreinigungen durch eine RNase T1-(S54G/P55N)-Mutante mit einer versteckten Punktmutation handeln könnte, wurden über massenspektrometrische Untersuchungen ausgeschlossen. Die verwendeten RNase T1-(S54G/P55N)-Proben waren immer uniform. Um ein Disulfid-Shuffling auszuschließen, sind mit Hilfe von Mathias Müller in der Gruppe von Prof. Dr. Andrea Sinz (Institut für Pharmazie, MLU Halle) weiterführende MS-Analysen durchgeführt worden. Dazu wurde RNase T1 (S54G/P55N) mit Pepsin bei pH 1.2 für drei Stunden gespalten, anschließend sofort per Nano-HPLC getrennt und mittels MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie (Ultraflex III, Bruker Daltonik, Bremen) analysiert (genaue Bedingungen sind im Anhang unter Abb. 8-19 aufgeführt). Das korrekte Disulfidmuster wurde anhand des Fragmentions $[M+H]^+$ 2020,643 u (Aminosäuresequenzen 1–16/102–104)

bestätigt. Nach Auswertung der dazugehörigen MS/MS-Daten konnte die richtige Verknüpfung der Disulfidbrücken bestätigt werden (Abb. 8-20). Die gefundene zweite Konformation zeigt also dieselben Disulfidbrücken wie die Hauptspezies und kann sich nur durch Veränderungen in den Seitenkettenkonformationen erklären lassen. Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Spezies kann auch ausgeschlossen werden, da während des H/D-Austausches keine Hinweise auf einen Austausch der Konformationen gesehen wurden.

Bereits in früheren Arbeiten zur RNase T1 wurden Vermutungen über eine zweite Konformation geäußert (Chen *et al.*, 1987). In den dort durchgeführten Analysen wurden zwei verschiedene Fluoreszenz-Lebenszeiten für das Tryptophan 59 gefunden, weshalb vermutet wurde, dass die Seitenkette von W59 zwei unterschiedliche Umgebungen einnehmen kann. Andererseits wurde auch diskutiert, ob der Fluoreszenz-*Quencher* im hydrophoben Kern des Moleküls seine Position verändern würde und das den beobachteten Einfluss auf die zwei Lebenszeiten von W59 hätte. Auf Grund der hier durchgeführten NMR-spektroskopischen Messungen wäre die zweite Hypothese als wahrscheinlicher anzusehen, da für W59 keine zwei Kreuzsignale gefunden wurden. Der gesamte Schleifenbereich vor W59 (F50–N55) sowie die β -Faltblätter (V78–V89), die strukturell im Kern der RNase T1 sitzen, zeigten indes unterschiedliche Kreuzsignale. Hershberger und Kollegen sprachen von Mikroheterogenität in der W59-Umgebung und stellten ebenfalls die Hypothese zweier möglicher Konformationen auf, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden würden (Hershberger *et al.*, 1980). In einer Kristallstruktur von RNase T1 mit gebundenem Substrat wurden ebenfalls Hinweise für Unterschiede in den Seitenkettenkonformationen gefunden (Sugio *et al.*, 1985). Mit den hochaufgelösten NMR-spektroskopischen Untersuchungen ist es nun gelungen, weitere Hinweise auf die Existenz einer zweiten Konformation zu erhalten. Bis jetzt ist es jedoch noch nicht möglich, die Art der Konformationsunterschiede zu klassifizieren oder konkrete Vermutungen darüber zu äußern. Lediglich eine geringere thermodynamische Stabilität und bevorzugte Wechselwirkungen einer der beiden Konformationen mit dem Proteinfaltungshelfer SlyD* konnten festgestellt werden (Anhang, Abb. 8-21).

3.3.2.3. Beobachtung der Rückfaltungskatalyse durch seriell aufgenommene 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren

Die Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N) und die damit verbundene Isomerisierung des Prolin 39 war auf Grund der langen Lebenszeit des kinetischen Faltungsintermediates

mehrfach Gegenstand von NMR-Untersuchungen (Balbach *et al.*, 1999; Steegborn *et al.*, 2000). Mit einem kinetischen 3D ^{15}N -editierten NOESY-HSQC sind erste Versuche zur Zuordnung des transienten Faltungsintermediates $\text{I}^{39\text{t}}$ getätigt worden (Hagn, 2003; Hartung, 2004). Zur Katalyse der Prolylisomerisierung durch die PPIase SlyD sind bis jetzt nur eindimensionale Echtzeit-NMR-Experimente durchgeführt worden (Hagn, 2003; Hartung, 2004). Erste mehrdimensionale NMR-Spektren lassen Rückschlüsse auf spezifische, hoch aufgelöste katalytische Wechselwirkungen zwischen dem Substrat RNase T1 (S54G/P55N) und der PPIase SlyD zu.

Der Verlauf der Rückfaltungskatalyse von Seiten des Substrates ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N)

Während der Rückfaltung wurden im Abstand von 20 Minuten 2D TROSY-HSQC-Spektren von ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) aufgenommen. Das erste Spektrum zeigt hauptsächlich die Kreuzsignale des Faltungsintermediates (Abb. 3-34, Gesamtspektrum im Anhang, Abb. 8-22). Die hohe Dispersion bestätigt den bereits im Intermediat vorhandenen hohen Anteil an Tertiärstruktur und dessen nativ-ähnliche Form. Die katalysierte Rückfaltung läuft wie erwartet doppelt so schnell ab (geschlossene Symbole in Abb. 3-34C; Anhang, Tab. 8-12). Bei der unkatalysierten Rückfaltungsreaktion lag auf Grund leichter Aggregation eine etwas geringere Proteinkonzentration vor, was den Unterschied in den Signalvolumina zwischen katalysierter und unkatalysierter Reaktion erklärt. Die fehlende Aggregation bei der katalysierten Reaktion zeigt bereits den positiven Einfluss der Chaperondomäne von SlyD*. Aus dem gut erkennbaren *offset* der Kinetiken und auch an der bereits im Spektrum des Intermediates vorhandenen geringen Intensität von Kreuzsignalen des nativen Zustandes lässt sich der 20 %ige Anteil an Molekülen ablesen, die schon im entfalteten Zustand die Peptidyl-Prolyl-Bindung von Y38 - P39 in *cis*-Konformation aufweisen und sofort in der Totzeit des Experimentes in die native Form falten (Abb. 3-34, siehe auch Faltungsmechanismus in Abb. 1-5).

An Hand der Struktur der RNase T1 (S54G/P55N) in Abb. 3-34D wird veranschaulicht, welche Aminosäurereste sich im Intermediat noch nicht in einer nativ-ähnlichen Umgebung befinden. Dies betrifft vor allem den Großteil der Helix und die Schleifenbereiche um P39. Die β -Faltblattstränge, welche durch die zwei Disulfidbrücken stabilisiert werden, sind bereits im Intermediat in ihrer nativen Position. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Erkenntnisse (Kiefhaber *et al.*, 1992c; Balbach *et al.*, 1999; Zeeb *et al.*, 2004), bei denen u.a. auch durch NOE-Abstände und H/D-Austauschexperimente im Intermediat festgestellt wurde, dass die Helix bereits als Sekundärstrukturelement vorhanden ist, aber noch nicht in ihrer finalen, nativen Position (Balbach *et al.*, 1999; Steegborn *et al.*, 2000).

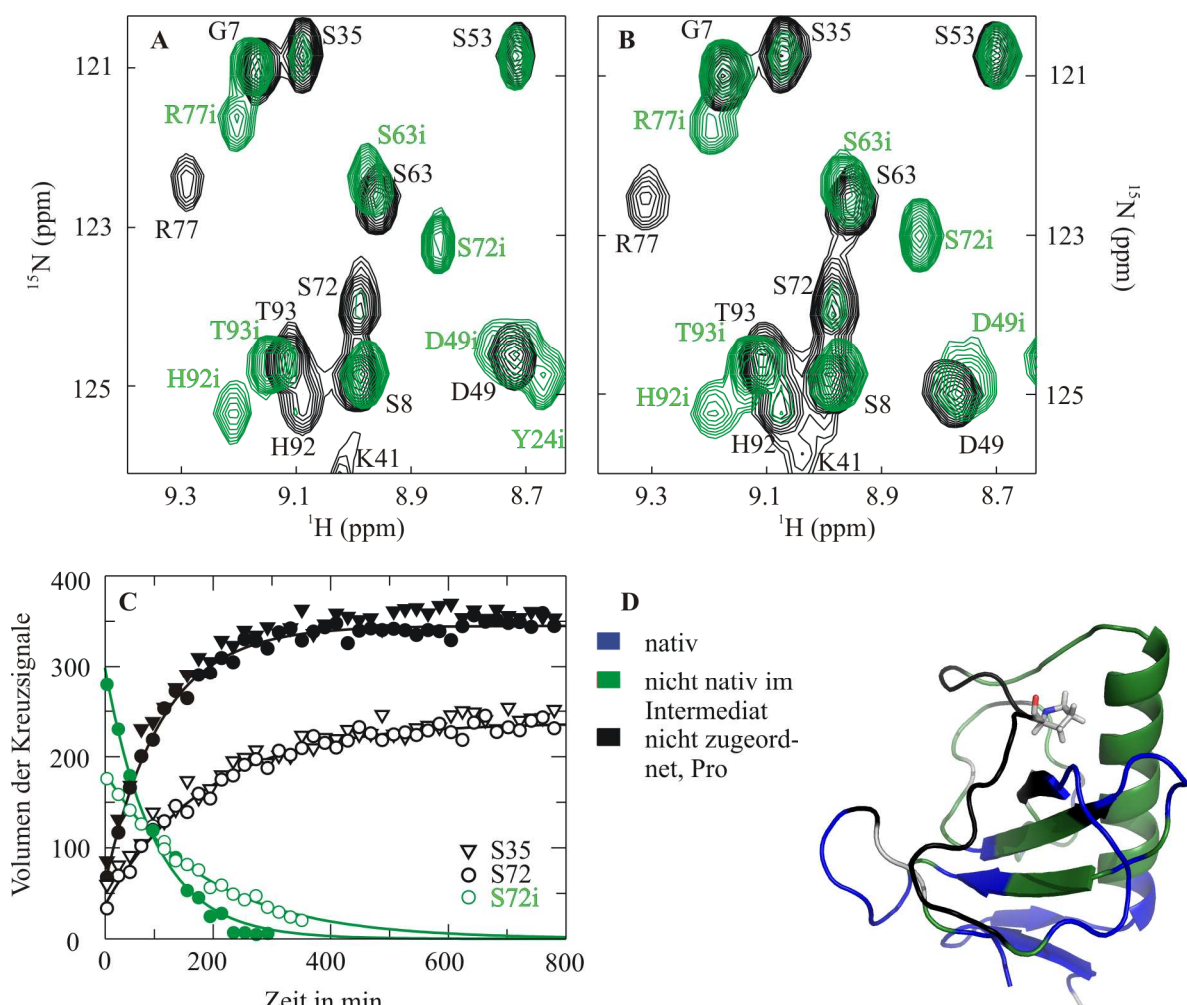


Abb. 3-34 Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N) bei pH 6.0 und 10 °C. **A** Ausschnitt aus den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $875\ \mu\text{M}$ ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) am Anfang der Rückfaltung (grün: Spektrum vom Intermediat nach 20 Minuten Rückfaltungsdauer) und am Ende (schwarz: Spektrum des nativen Zustandes). Die Zuordnung vom Intermediat (grün) und vom nativen Zustand (schwarz) ist angegeben. **B** Ausschnitt aus den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $875\ \mu\text{M}$ ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) während der durch $87,5\ \mu\text{M}$ SlyD* katalysierten Rückfaltung am Anfang (intermediärer Zustand) und Ende. Die Farbkodierung ist analog zu A. **C** Rückfaltungskinetiken von RNase T1 (S54G/P55N), die an Hand der Volumenabnahme der Kreuzsignale des intermediären Zustandes für S72 (grün) bzw. der Zunahme der Kreuzsignale des nativen Zustandes für S72 und S35 (schwarz) verfolgt werden können. Offene Symbole repräsentieren die unkatalysierte Reaktion, geschlossene stehen für die durch SlyD* katalysierte Reaktion. Aus der Anpassung der Daten an eine monoexponentielle Funktion können die Rückfaltungsraten ermittelt werden: $0,0051 \pm 0,0004\ \text{min}^{-1}$ (S35), $0,0102 \pm 0,0004\ \text{min}^{-1}$ (S35, katalysiert), $0,0059 \pm 0,0003\ \text{min}^{-1}$ (S72), $0,0130 \pm 0,0004\ \text{min}^{-1}$ (S72, katalysiert), $0,0059 \pm 0,0002\ \text{min}^{-1}$ (S72i, Intermediat) und $0,0120 \pm 0,0006\ \text{min}^{-1}$ (S72i, Intermediat, katalysiert). Die angegebenen Fehler resultieren aus der Anpassung der Daten an eine monoexponentielle Funktion. **D** Struktur von RNase T1. Die Aminosäurereste, die sich im Intermediat schon in einer nativ-ähnlichen Umgebung befinden, sind in blau dargestellt. In grün werden diejenigen gezeigt, deren native chemische Verschiebung sich von der im Intermediat unterscheiden. P39 ist in Stäbchenform hervorgehoben.

Ein Vergleich der Intermediatskreuzsignale von RNase T1 (S54G/P55N) in freier Form mit der während der Katalyse mit SlyD* interagierenden Form soll Wechselwirkungen während der Katalyse der Prolylisomerisierung aufzeigen. Die dazu benötigte Zuordnung der

intermediären Zustände in freier und gebundener Form wird in 3.3.2.1 diskutiert. Für den in Abb. 3-34 dargestellten Ausschnitt zeigt die Mehrheit der Kreuzsignale von RNase T1 (S54G/P55N) sowohl im unkatalysierten als auch im katalysierten Zustand die gleiche chemische Verschiebung. Das bedeutet, dass die meisten Aminosäuren nicht an einer Wechselwirkung mit SlyD* beteiligt sind. Für die Signale von D49 und Y24 (Abb. 3-34) im Intermediat werden unterschiedliche chemische Verschiebungen zwischen freier und der durch SlyD*-komplexierten Form beobachtet. Diese und weitere Aminosäuren gehen im intermediären Zustand Wechselwirkungen mit SlyD* ein (rot in Abb. 3-35B). Einige Amidprotonen für den intermediären Zustand konnten auf Grund fehlender Kreuzsignale nicht zugeordnet werden. Ein Großteil dieser 21 Aminosäuren befindet sich in der Schleifenregion, welche dem Prolin 39 folgt. Für diesen Bereich wäre eine Interaktion mit SlyD* sehr wahrscheinlich, kann bisher aber nur vermutet werden.

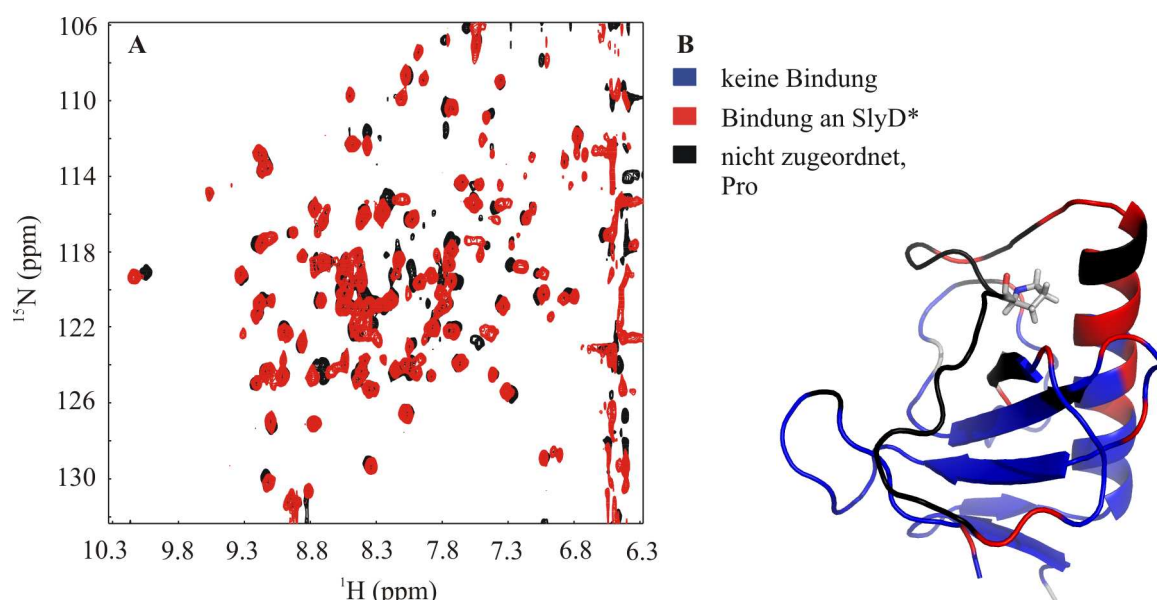


Abb. 3-35 Wechselwirkung von SlyD* mit dem Faltungsintermediat. **A** Überlagerung der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren des RNase T1-(S54G/P55N)-Intermediates in Abwesenheit (schwarz) und in Anwesenheit (rot) von SlyD*. Die Signale zwischen 6,35 – 6,55 ppm sind auf GdmCl (natürliche Häufigkeit von ^{15}N) zurückzuführen. Kreuzsignale, die in beiden Formen die gleiche chemische Verschiebung aufweisen, werden durch SlyD* nicht beeinträchtigt (blau in **B**). Kreuzsignale mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen zeigen eine Wechselwirkung der jeweiligen Aminosäure mit SlyD* an und sind in **B** in rot ($\Delta\delta_{\text{MW}} > 0,03$ ppm) auf der Struktur von RNase T1 (S54G/P55N) abgebildet. **B** Struktur von (nativer) RNase T1. P39 ist in Stäbchenform hervorgehoben. Die Einfärbung der Amidprotonen wurde entsprechend der Zuordnung des Intermediates vorgenommen.

Klar zu erkennen ist, dass SlyD* nicht mit dem Teil von RNase T1 (S54G/P55N) interagiert, der bereits seine native Form angenommen hat. Ebenso wird deutlich, dass die Wechselwirkung nicht mit dem ganzen Intermediat stattfindet, sondern nur auf der Seite des Moleküls, auf der sich die zu isomerisierende Peptidyl-Prolyl-Bindung (Y38-P39) befindet: die Schleifenregionen rund um das Prolin und der C-Terminus der α -Helix, der dem Prolin 39

gegenüberliegt. Wegen dieser spezifischen Wechselwirkung mit gefalteten Regionen des Intermediates von RNase T1 (S54G/P55N) können unspezifische Bindeereignisse mit entfalteten Proteinketten ausgeschlossen werden. Mit diesem Experiment können also ortsaufgelöst die Regionen im Substrat identifiziert werden, mit denen SlyD* während der Katalyse der Peptidyl-Prolyl-Bindung Y38-P39 interagiert.

Der Verlauf der Rückfaltungskatalyse von Seiten der PPIase ^{15}N -SlyD*

Im vorhergehenden Kapitel wurde der strukturelle Effekt der SlyD*-vermittelten Katalyse auf das Substrat mit Hilfe von ^{15}N -markierter RNase T1 (S54G/P55N) untersucht. Im Folgenden wird nun über den Isotopenfilter der Katalysevorgang an ^{15}N -SlyD* strukturell untersucht. Um ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis in den ^{15}N -SlyD*-TROSY-HSQC-Spektren zu garantieren, wurden 30 % SlyD* relativ zur RNase T1 (S54G/P55N)-Konzentration eingesetzt. Zusätzlich zum höheren pH-Wert und der Temperatur von 20 °C führte das zu einer Beschleunigung der Rückfaltung, so dass die katalysierte Reaktion nur über 50 Minuten verfolgt werden konnte (Abb. 3-37B).

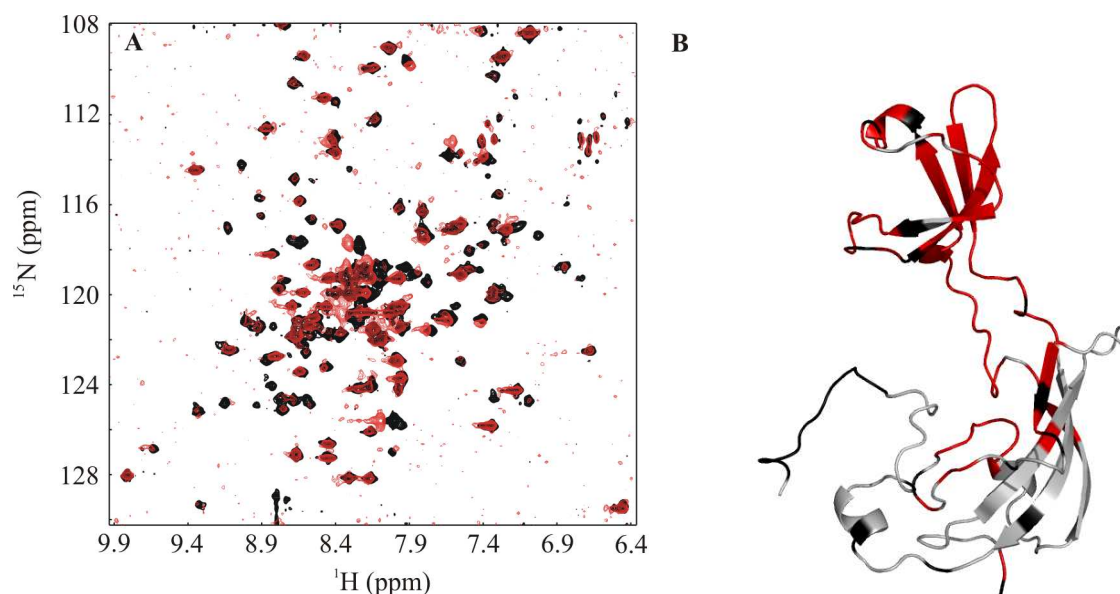


Abb. 3-36 Wechselwirkung von ^{15}N -SlyD* mit dem Faltungsintermediat. **A** Übereinanderlagerung der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von 0,4 mM ^{15}N -SlyD* vor (schwarz) und nach 10 Minuten (rot) während der Katalyse der Rückfaltung von 1,16 mM RNase T1 (S54G/P55N) bei pH 7.5 und 20 °C. **B** Struktur von SlyD*. Die Aminosäuren, die auf Grund der Veränderung der chemischen Verschiebung eine Wechselwirkung mit RNase T1 (S54G/P55N) während der ersten 10 Minuten anzeigen, sind rot abgebildet (schwarz: nicht zugeordnet, Proline; grau: keine Wechselwirkung).

In Abb. 3-36B sind diejenigen Bereiche in SlyD* rot dargestellt, die während der Katalyse mit RNase T1 (S54G/P55N) interagieren. Deutlich zu sehen ist, dass nahezu die gesamte IF-Domäne und nur einige spezifische Reste des aktiven Zentrums der FKBP-Domäne durch das Substrat beeinflusst werden. Beide funktionellen Eigenschaften von SlyD*, die

Chaperonaktivität der IF-Domäne und die PPIase-Aktivität der FKBP-Domäne, kommen dabei zum Vorschein. Bis jetzt können diese interagierenden Aminosäuren nur über Linienverbreiterung detektiert werden (Abb. 3-36A).

Aus den im Abstand von zehn Minuten aufgenommenen Spektren lässt sich keine Rückfaltungskinetik ableiten. Bei der Auftragung der Veränderung der chemischen Verschiebung gegenüber der Zeit werden dennoch einige Unterschiede sichtbar. So zeigt der zeitliche Verlauf der Veränderungen ein Minimum bei 50 Minuten, dem Zeitpunkt, bei dem die Katalyse, der fluoreszenzdetektierten Rückfaltung zufolge, beendet sein sollte (Abb. 3-37). Danach tritt wieder eine Wechselwirkung mit RNase T1 (S54G/P55N) ein, gekennzeichnet durch einen erneuten Anstieg in der Veränderung der chemischen Verschiebung, welche dann auf einem relativ konstanten Niveau verbleibt.

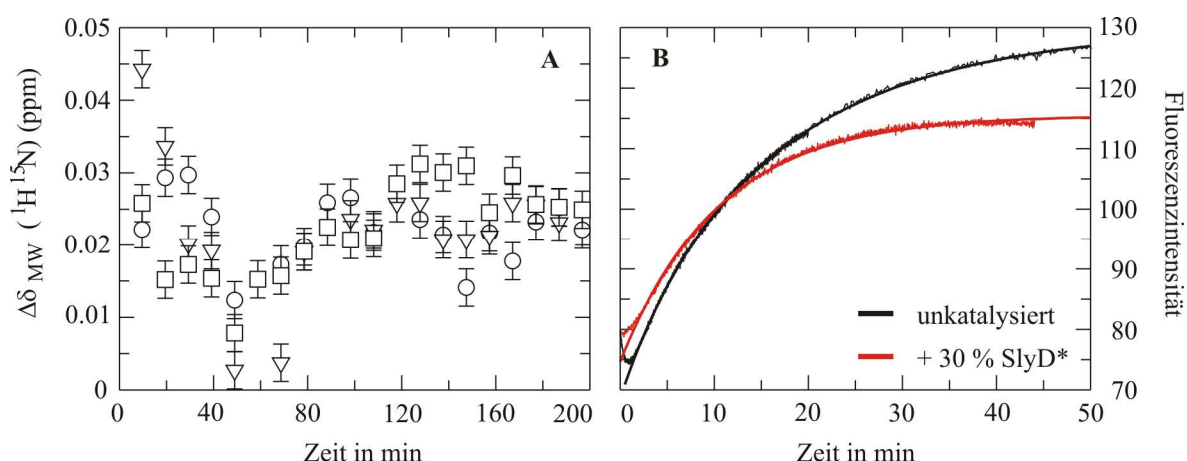


Abb. 3-37 Rückfaltungskinetik von RNase T1 (S54G/P55N) bei pH 7.5 und 20 °C. **A** Auftragung der zeitlichen Veränderung der chemischen Verschiebung von Kreuzsignalen ($\circ$ S26, ∇ E99, $\square$ V119) von SlyD* während der Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N) bei pH 7.5 und 20 °C. **B** Fluoreszenzdetektierte Rückfaltungskinetiken von RNase T1 in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit (rot) von 30 % SlyD* bei pH 7.5 und 20 °C. Aus der Anpassung der experimentellen Daten an eine monoexponentielle Funktion ergeben sich folgende Rückfaltungsraten: $0,0569 \pm 0,0012 \text{ min}^{-1}$ (unkatalysiert) und $0,0953 \pm 0,0003 \text{ min}^{-1}$ (katalysiert).

Da die NMR-Kinetiken nicht eindeutig waren, kann über das tatsächlich ablaufende Geschehen nur spekuliert werden. An Hand des Vergleiches mit der mittels Fluoreszenz detektierten Rückfaltungskinetik könnten die ersten 50 Minuten den Verlauf der Katalyse wiedergeben, in der direkte Interaktionen des kinetischen Faltungsintermediates von RNase T1 (S54G/P55N) mit SlyD* auftreten würden. Sobald die Peptidyl-Prolyl-Bindung in der korrekten nativen *cis*-Konformation vorläge, würde der Enzym-Substrat-Komplex zerfallen und eine schnelle Faltung der RNase T1 (S54G/P55N) bewirken, wobei eine Rückbindung des nativen Moleküls ausgeschlossen werden kann. In dem Moment, wo die Bindungsstellen von SlyD* wieder frei wären (bei Minute 50), wird eine erneute Wechselwirkung mit dem Substrat beobachtet, die sich wahrscheinlich auf die zweite, geringer populierte Spezies von

RNase T1 (S54G/P55N) beschränkt. Das Geschehen im Bereich von 50 bis 200 Minuten könnte eine langsame, permanente Assoziation der *minor* Spezies von RNase T1 (S54G/P55N) mit SlyD* widerspiegeln. Bereits im Gleichgewicht konnte mit Hilfe von NMR-Titrationen von nativer RNase T1 (S54G/P55N) mit SlyD* gezeigt werden, dass der Bereich von RNase T1 (S54G/P55N), in dem zwei Konformationen vorliegen (3.3.2.2), im nativen Zustand mit SlyD* interagiert, die zweite, geringer populierte Konformation jedoch bevorzugt. Die Kreuzsignale der zweiten Konformation von ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) verschieben sich bei Zugabe von SlyD* enorm, während die jeweiligen Kreuzsignale der nativen Hauptspezies nur geringe Verschiebungen erfahren (Anhang, Abb. 8-21).

3.3.3. Zusammenfassende Diskussion: Echtzeit-NMR-Betrachtung der von SlyD* katalysierten Rückfaltung des transienten Faltungsintermediates von RNase T1 (S54G/P55N)

Die Anwendung und Entwicklung höherdimensionaler Echtzeit-NMR-Techniken zum Studium der langsamen Proteinfaltungsreaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert. Die Faltung des Modellproteins RNase T1 (S54G/P55N) stellt eines der am eingehendsten untersuchten Systeme dar (Kiefhaber *et al.*, 1990a; Kiefhaber *et al.*, 1990b; Kiefhaber *et al.*, 1990c; Kiefhaber *et al.*, 1992b). Die langsame *trans* $\rightarrow$ *cis*-Isomerisierung von Prolin 39 synchronisiert die kooperative Rückfaltung des langlebigen kinetischen Faltungsintermediates. Erste NMR-Experimente, um das transiente Faltungsintermediat zu charakterisieren, wurden schon durchgeführt (Hagn, 2003; Hartung, 2004; Zeeb *et al.*, 2004). Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag in der Analyse der Wechselwirkungen des transienten Faltungsintermediates mit dem Proteinfaltungshelfer SlyD*. Mit optimierten Expressionsbedingungen konnte doppelt markierte $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -RNase T1 (S54G/P55N) in ausreichendem Maßstab hergestellt werden, so dass Tripelresonanzexperimente zur weiteren Charakterisierung des Faltungsintermediates eingesetzt werden konnten. Um die katalytischen Wechselwirkungen von SlyD* während der Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N) untersuchen zu können, ist zunächst eine eindeutige Zuordnung des transienten Faltungsintermediates durchgeführt worden. Mit einem 3D $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -BEST-HNCA in Echtzeit während der 5-stündigen Lebenszeit des Faltungsintermediates gelang die Zuordnung von 80 % aller Kreuzsignale im freien als auch im SlyD*-gebundenen Zustand. Mit der im Vergleich zu früheren Arbeiten vervollständigten und teilweise korrigierten Zuordnung des intermediären Zustandes ist die Lokalisierung der Interaktionsstelle mit SlyD* gelungen. Nicht der gesamte nicht-native Bereich des Faltungsintermediates, sondern nur der

Bereich des Moleküls, in dem die Katalyse der Prolylisomerisierung stattfindet, geht Wechselwirkungen mit SlyD* ein. Auf der Seite von SlyD* tritt die gesamte IF-Domäne und einige Aminosäurereste des aktiven Zentrums mit dem Faltungsintermediat in Kontakt. Die für das archeale SlyD-Homologe MtFKBP17 geäußerte Vermutung, dass ein harmonisches Zusammenspiel beider Domänen die Faltung von Proteinsubstraten unterstützen würde (Suzuki *et al.*, 2003), konnte hier erstmals auf molekularer Ebene an Hand der durch SlyD* katalysierten Rückfaltungskatalyse von RNase T1 (S54G/P55N) gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die erste strukturelle Charakterisierung der Interaktionsflächen zwischen einem transienten Faltungsintermediat und dem Proteinfaltungshelferenzym SlyD* aufzudecken. Die Vorbereitungen zur kompletten Strukturaufklärung des Komplexes SlyD*-RNase-T1-(S54G/P55N)-Intermediat sind nun gegeben.

Bei der 3D Zuordnung des nativen und intermediären Zustandes von RNase T1 (S54G/P55N) ist eine weitere Spezies zum Vorschein gekommen. Dabei handelt es sich um eine zweite Konformation im Bereich der beiden β -Faltblattstränge 6 und 7 (V78-V89) und des räumlich darüber liegenden Schleifenbereichs (F50-N55). 22 Aminosäurereste zeigen diesen doppelten Datensatz und werden als *minor* Konformation bezeichnet, dessen Stabilität im Vergleich zur Hauptspezies deutlich um zwei Größenordnungen herabgesetzt ist. Mit SlyD* wird eine permanente Interaktion beobachtet, nicht nur eine transiente Bindung während der Katalyse.

4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Proteinfaltungshelfer SlyD* aus *E. coli* strukturell und funktionell mit einer Reihe von biophysikalischen Methoden ausführlich charakterisiert. Die thermodynamische Stabilität wird von der Präsenz der beiden individuellen Domänen (FKBP- und IF-Domäne) in SlyD* bestimmt. So zeigten harnstoffinduzierte Entfaltungsübergänge und Amidprotonenaustauschexperimente, dass die IF-Domäne mit hoher Rate entfaltet bzw. zurückfaltet und unter denaturierenden Bedingungen die hoch kooperative Entfaltung des gesamten Proteins einleiten kann. In Gegenwart von zweifach positiv geladenen Metallionen, insbesondere Ni^{2+} , tritt eine erhebliche Stabilisierung von SlyD* ein. Das hoch affine Metallbindemotiv in der letzten α -Helix wurde in den zu SlyD homologen FKBP als einzigartige und neue strukturelle und funktionelle Einheit gefunden.

Die Chaperonaktivität von SlyD* ist auf der IF-Domäne lokalisiert. Entfaltete, teilweise gefaltete oder zur Aggregation tendierende Proteine und Peptide binden hauptsächlich an den hydrophoben und negativ geladenen Seitenketten an der Oberfläche der IF-Domäne. Neben der hervorragend ausgeprägten Chaperonfunktion hat SlyD* auch eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Funktion. Die intrinsische Aktivität fällt verglichen mit hFKBP12 geringer aus, wofür die in das aktive Zentrum zeigende Seitenkette von Tyrosin 68 verantwortlich zu sein scheint. Aktivitätsstudien der Y68W-Mutante von SlyD* belegen diese Vermutung.

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag in der Anwendung und Entwicklung mehrdimensionaler Echtzeit-NMR-Techniken zum Studium der langsamen Proteinfaltungsreaktion von RNase T1 (S54G/P55N) in Gegenwart des Proteinfaltungshelfers SlyD*. Das Rückgrat des transienten Faltungsintermediates von RNase T1 (S54G/P55N) wurde in einem kurzen, fünf-stündigen 3D BEST-HNCA-Experiment sowohl im freien Zustand als auch im Komplex mit SlyD zu 80 % zugeordnet. Während der NMR-Zuordnung des nativen und intermediären Zustandes von RNase T1 wurde eine zweite, weniger stabile Spezies (20 %) gefunden, welche wahrscheinlich eine weitere Konformation der Aminosäurereste 50-55 und 78-89 darstellt.

Die kombinierte Analyse der in Serie aufgenommenen 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren von ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) im Komplex mit unmarkiertem SlyD* sowie von ^{15}N -SlyD* im Komplex mit unmarkierter RNase T1 (S54G/P55N) während der katalysierten Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N) ermöglichte die erste strukturelle Charakterisierung der Interaktionsflächen zwischen dem Proteinfaltungshelfer SlyD* und seinem transienten Faltungssubstrat. Nur der Bereich des Faltungsintermediates, in dem die zu isomerisierende Prolinbindung liegt (Y38-P39), geht Wechselwirkungen mit SlyD* ein und demonstriert das effektive Zusammenspiel von IF- und FKBP-Domäne in SlyD*, welche gleichermaßen mit dem Faltungsintermediat interagieren.

5. Summary

In this thesis the protein folding helper enzyme SlyD from *Escherichia coli* was structurally and functionally characterised in great detail using various biophysical techniques. The thermodynamic stability is determined by the presence of two individual domains (FKBP and IF domain). Urea-induced unfolding transitions and amide proton exchange experiments showed that the IF domain rapidly folds and unfolds under native conditions and could induce the highly cooperative unfolding of the whole protein at stronger denaturing conditions. In the presence of divalent cations, especially Ni^{2+} , SlyD* is extensively stabilised. The high affinity metal-binding motif was localised in the last α -helix which is unique amongst SlyD-like FKBP and represents a new structural and functional unit.

The chaperone activity is localised in the IF domain. Unfolded, partially folded or aggregation-prone proteins and peptides exclusively bind to the hydrophobic patches and negatively charged side chains at the surface of the IF domain. Beside this excellently pronounced chaperone activity, SlyD* also inheres peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase properties. Compared to FKBP12 its intrinsic PPIase activity is reduced caused by the side chain of tyrosine 68 which points into the active site. Activity studies of an Y68W mutant support this hypothesis.

The main focus of this thesis was the application and development of higher dimensional real-time NMR techniques to study the slow protein folding process of RNase T1 (S54G/P55N) in the presence of the protein folding helper enzyme SlyD*. NMR resonances of the transient folding intermediate in free form and in complex with SlyD* were assigned to 80 % with the help of a 3D BEST-HNCA which was recorded during the five-hour lifetime of the intermediate. The 3D assignment of the native and the intermediate state of RNase T1 (S54G/P55N) revealed another less stable species which seems to be related to a second conformation (20 %) for residues F50-N55 and V78-V89.

The combined analysis of sequentially recorded 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ correlation spectra of ^{15}N -labelled RNase T1 (S54G/P55N) in complex with SlyD* as well as of ^{15}N -labelled SlyD* in complex with RNase T1 (S54G/P55N) during the catalysed refolding of RNase T1 (S54G/P55N) allowed the first structural characterisation of the interaction site between the protein folding helper enzyme SlyD* and its transient folding substrate. The interaction is restricted to that part of RNase T1 (S54G/P55N) where the catalysis of the proline isomerisation takes place (Y38-P39). SlyD* itself is interacting with the complete IF domain and with residues from the active site of the FKBP domain which illustrates an effective interplay between the two domains of SlyD*.

6. Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D,	ein-, zwei-, dreidimensional
$A_{280\text{ nm}}$	Absorption bei 280 nm
AcCN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
A.U.	Absorptionsseinheiten
a.u.	arbitrary units
bp	Basenpaar (DNA)
BEST	<i>band-selective excitation short-transient</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
CsA	Cyclosporin A
ΔC_p	Änderung der Wärmekapazität (isobarer Prozess)
$\Delta\delta_{\text{MW}}$	mittlere Änderung der chemischen Verschiebung
$\Delta G_u(\text{H}_2\text{O})$	freie Stabilisierungsenthalpie in Abwesenheit von Denaturierungsmittel
$\Delta H_u(T_m)$	van't Hoff Enthalpie
$\Delta S_u(\text{H}_2\text{O})$	Änderung der Entropie bei Entfaltung
Δn	Differenz der Brechungsindices
d	Schichtdicke der Küvette (in dm)
[D]	Denaturierungsmittelkonzentration
$[D]_{1/2}$	Übergangsmittelpunkt bei Denaturierungsmittelinduzierter Entfaltung
ddH ₂ O	doppeltentionisiertes Wasser (Rest-Leitfähigkeit 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dYT	double yeast trypton (Medium)
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
E_A	Aktivierungsenergie
<i>E.c. (E. coli)</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
FID	<i>free induction decay</i>
FKBP	FK505-bindendes Protein

FT	Fouriertransformation
GdmCl	Guanidiniumchlorid
HCl	Salzsäure
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
hNOE	heteronuklearer NOE-Effekt
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz (MHz, GHz)	Hertz (s^{-1}) (Megahertz, Gigahertz)
IF	insert-in-flap
INEPT	<i>insensitive nuclei enhancement by polarisation transfer</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
k_0	Rate der unkatalysierten Rückfaltungsreaktion
k_{cat}	Wechselzahl
k_{cat}/K_M	Katalytische Effizienz eines Enzyms
k_{ch}	chemische Austauschrate
k_{cl}	Schließrate
K_D	Dissoziationskonstante
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante
k_{int}	intrinsische Austauschrate (für Modellpeptide bestimmt)
k_{kat}	Rate der katalysierten Rückfaltungsreaktion
KK	hydrophobes Peptid aus der HiPIP-Signalpeptidsequenz mit zwei Lysinen an Stelle von Arginin
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
k_{op}	Öffnungsrate
N	nativer Zustand
n	Stöchiometrie
NaOH	Natronlauge
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement spectroscopy</i>
M	Molar (mol/l)
m	Kooperativitätsparameter
(New) MEXICO	<i>measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds</i>
min	Minute
min.	mindestens

MS	Massenspektrometrie
Ni-IMAC	Ni-Ionenmetallaffinitätschromatographie
OD	optische Dichte
P	Schutzfaktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
ppm	<i>parts per million</i>
RCM-T1	reduzierte und carboxymethylierte RNase T1
RCM- α -La	reduziertes und carboxymethyliertes α -Lactalbumin
RNase T1	Ribonuklease T1
RR	hydrophobes Peptid aus der HiPIP-Signalpeptidsequenz
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SlyD	<i>sensitivity to lysis D</i>
SlyD*	<i>E.c.SlyD(1-165)</i>
SOFAST	<i>band-selective optimized flip-angle short-transient</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
T _m	Temperatur am Übergangsmittelpunkt
Tat	<i>twin-arginine translocon</i>
Tat27	Signalpeptidsequenz aus CueO
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase incrementation</i>
(Bis-)-Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TROSY	<i>transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
U	entfalteter Zustand
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
VRR	hydrophiles Peptid aus der HiPIP-Signalpeptidsequenz
(v/v)	Volumen pro Volumen
WATERGATE	<i>water suppression by gradient-taylorized excitation</i>
WHP	<i>wonderous histidine-rich protein</i>

(w/v)	Gewicht pro Volumen
<i>YpSlyD</i>	SlyD aus <i>Yersinia pestis</i>
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren wurden mit den üblichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

7. Literaturverzeichnis

- Amerik und Hochstrasser (2004). "Mechanism and function of deubiquitinating enzymes." *Biochim. Biophys. Acta.* **1695**(1-3), 189-207.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of proteins chains." *Science* **181**, 223-230.
- Auluck, P. K., Chan, H. Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. und Bonini, M. N. (2002). "Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease." *Science* **295**(5556), 865-868.
- Bai, Y. W., Englander, J. J., Mayne, L., Milne, J. S. und Englander, S. W. (1995a). "Thermodynamic parameters from hydrogen exchange measurements." *Energetics of Biological Macromolecules* **259**, 344-356.
- Bai, Y. W. und Englander, S. W. (1996). "Future directions in folding: The multi-state nature of protein structure." *Protein Struct. Funct. Genet.* **24**(2), 145-151.
- Bai, Y. W., Milne, J. S., Mayne, L. und Englander, S. W. (1994). "Protein stability parameters measured by hydrogen exchange." *Proteins: Structure Function and Genetics* **20**, 4-14.
- Bai, Y. W., Sosnick, T. R., Mayne, L. und Englander, S. W. (1995b). "Protein folding intermediates: Native-state hydrogen exchange." *Science* **269**(5221), 192-197.
- Balbach, J., Forge, V., Lau, W. S., van Nuland, N. A. J., Brew, K. und Dobson, C. M. (1996). "Protein folding monitored at individual residues during a two- dimensional NMR experiment." *Science* **274**(5290), 1161-1163.
- Balbach, J., Forge, V., van Nuland, N. A. J., Winder, S. L., Hore, P. J. und Dobson, C. M. (1995). "Following protein folding in real time using NMR spectroscopy." *Nat. Struct. Biol.* **2**(10), 865-870.
- Balbach, J., Steegborn, C., Schindler, T. und Schmid, F. X. (1999). "A protein folding intermediate of ribonuclease T1 characterized at high resolution by 1D and 2D real-time NMR spectroscopy." *J. Mol. Biol.* **285**(2), 829-842.
- Baldwin, A. J., Hansen, D. F., Vallurupalli, P. und Kay, L. E. (2009). "Measurement of methyl axis orientations in invisible, excited states of proteins by relaxation dispersion NMR spectroscopy." *J Am Chem Soc.* **131**(33), 11939-11948.
- Bartlett, A. und Radford, S. E. (2009). "An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms." *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**(6), 582-588.
- Benanti und Chivers (2009). "An intact urease assembly pathway is required to compete with NikR for nickel ions in Helicobacter pylori." *J. Bacteriol.* **191**(7), 2405-2408.
- Bernhardt, T. G., Roof, W. D. und Young, R. (2002). "The Escherichia coli FKBP-type PPIase SlyD is required for the stabilization of the E lysis protein of bacteriophage phi X174." *Mol. Microbiol.* **45**(1), 99-108.
- Bhuyan, A. K. und Udgaonkar, J. B. (1998). "Multiple kinetic intermediates accumulate during the unfolding of horse cytochrome c in the oxidized state." *Biochemistry* **37**(25), 9147-9155.
- Bhuyan, A. K. und Udgaonkar, J. B. (1999). "Observation of multistate kinetics during the slow folding and unfolding of barstar." *Biochemistry* **38**(28), 9158-9168.
- Bossard, M. J., Bergsma, D. J., Brandt, M., Livi, G. P., Eng, W. K., Johnson, R. K. und Levy, M. A. (1994). "Catalytic and ligand binding properties of the FK506 binding protein FKBP12: effects of the single amino acid substitution of Tyr82 to Leu." *Biochem. J.* **297**, 365-372.

- Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Möller Knudsen, S. und Rudolph, R. (2008). "High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors." *Protein Expr. Purif.* **58**, 114-121.
- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. und Brennan, M. (1975). "Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues." *Biochemistry* **14**, 4953-4963.
- Brutscher (2004). "Combined frequency- and time-domain NMR spectroscopy. Application to fast protein resonance assignment." *J. Biomol. NMR* **29**(1), 57-64.
- Buchner, Grallert und Jakob (1998). "Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein." *Methods Enzymol.* **290**, 323-338.
- Buchner, J. (1999). "Hsp90 & Co. - a holding for folding." *Trends Biochem. Sci.* **24**(4), 136-141.
- Burton, R. E., Huang, G. S., Daugherty, M. A., Fullbright, P. W. und Oas, T. G. (1996). "Microsecond protein folding through a compact transition state." *J. Mol. Biol.* **263**(2), 311-322.
- Carr, H. Y. und Purcell, E. M. (1954). "Effets of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments." *Phys. Rev.* **94**, 630-638.
- Chamberlain, A. K., Handel, T. M. und Marqusee, S. (1996). "Detection of rare partially folded molecules in equilibrium with the native conformation of RNaseH." *Nat. Struct. Biol.* **3**(9), 782-787.
- Chamberlain, A. K. und Marqusee, S. (1998). "Molten globule unfolding monitored by hydrogen exchange in urea." *Biochemistry* **37**(7), 1736-1742.
- Chan, H. S. und Dill, K. A. (1998). "Protein folding in the landscape perspective: chevron plots and non-Arrhenius kinetics." *Proteins* **30**(1), 2-33.
- Chen, L. X., Longworth, J. W. und Fleming, G. R. (1987). "Picosecond time-resolved fluorescence of ribonuclease T1. A pH and substrate analogue binding study." *Biophys. J.* **51**(6), 865-873.
- Cheng, H. N. und Bovey, F. A. (1977). "Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acteyl-L-proline and glycyl-L-proline." *Biopolymers* **16**, 1465-1472.
- Clardy, J. (1995). "The chemistry of signal transduction." *PNAS* **92**(1), 56-61.
- Cohen, S., Chang, A. und Hsu, L. (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA." *PNAS* **69**, 2110-2114.
- Crenshaw, Yang, Means und Kornbluth (1998). "The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1." *EMBO J.* **17**(5), 1315-1327.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. und Bax, A. (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." *J. Biomol. NMR* **6**(3), 277-293.
- Dill, K. A. und Chan, H. S. (1997). "From Levinthal to pathways to funnels." *Nat. Struct. Biol.* **4**(1), 10-19.
- Dobson, C. M. (1999). "Protein misfolding, evolution and disease." *Trends Biochem. Sci.* **24**(9), 329-332.
- Dobson, C. M. und Evans, P. A. (1984). "Protein folding kinetics from magnetization transfer nuclear magnetic resonance." *Biochemistry* **23**(19), 4267-4270.
- Dyson, H. J. und Wright, P. E. (2005). "Intrinsically unstructured proteins and their functions." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**(3), 197-208.
- Ellis, J. R. (1987). "Proteins as molecular chaperones." *Nature* **328**, 378-379.
- Ellis, J. R. und van der Vies, S. M. (1991). "Molecular chaperones." *Annual Review of Biochemistry* **60**, 321-347.
- Englander, S. W. (1998). "Native-state HX." *Trends Biochem. Sci.* **23**(10), 378.

- Englander, S. W., Sosnick, T. R., Englander, J. J. und Mayne, L. (1996). "Mechanisms and uses of hydrogen exchange." *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**(1), 18-23.
- Ernst, R. R., Bodenhausen, G. und Wokaun, A. (1987). Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. Oxford, Oxford University Press.
- Fanghänel, J. und Fischer, G. (2004). "Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases." *Front. Biosci.* **9**, 3453-3478.
- Farrow, N. A., Zhang, O., Forman-Kay, J. D. und Kay, L. E. (1994). "A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of ^{15}N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium." *J. Biomol. NMR* **4**, 727-734.
- Feng, Z., Butler, M. C., Alam, S. L. und Loh, S. N. (2001). "On the nature of conformational openings: native and unfolded-state hydrogen and thiol-disulfide exchange studies of ferric aquomyoglobin." *J Mol Biol.* **314**(1), 153-166.
- 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." *PNAS* **97**(4), 1525-1529.
- Fischer, G., Bang, H., Berger, E. und Schellenberger, A. (1984a). "Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates." *Biochim. Biophys. Acta* **791**(1), 87-97.
- Fischer, G., Bang, H. und Mech, C. (1984b). "Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden." *Biomed. Biochim. Acta* **43**, 1101-1111.
- Fischer, G. und Schmid, F. X. (1990). "The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell." *Biochemistry* **29**, 2205-2212.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. und Schmid, F. X. (1989). "Cyclophilin and peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerase are probably identical proteins." *Nature* **337**, 476-478.
- Frydman, J. und Hartl, F. U. (1996). "Principles of chaperone-assisted protein folding: Differences between in vitro and in vivo mechanisms." *Science* **272**(5267), 1497-1502.
- Frydman, L., Scherf, T. und Lupulescu, A. (2002). "The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan." *PNAS* **99**(25), 15858-15862.
- Gal, M., Kern, T., Schanda, P., Frydman, L. und Brutscher, B. (2009). "An improved ultrafast 2D NMR experiment: towards atom-resolved real-time studies of protein kinetics at multi-Hz rates." *J. Biomol. NMR* **43**(1), 1-10.
- Geen, H. und Freeman, R. (1991). "Band-selective radiofrequency pulses." *J. Magn. Res.* **93**(1), 93-141.
- Gemmecker, G., Jahnke, W. und Kessler, H. (1993). "Measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds." *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11620-11621.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990). "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants." *PNAS* **87**(12), 4645-4649.
- Grass, G. und Rensing, C. (2001). "CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in Escherichia coli." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**(5), 902-908.
- Grathwohl, C. und Wüthrich, K. (1981). "NMR studies of the rates of proline cis-trans isomerization in oligopeptides." *Biopolymers* **20**, 2623-2633.

- Graubner, W., Schierhorn, A. und Brüser, T. (2007). "DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone." *J. Biol. Chem.* **282**(10), 7116-7124.
- Grey, M. J., Tang, Y., Alexov, E., McKnight, C. J., Raleigh, D. P. und Palmer, A. G. r. (2006). "Characterizing a partially folded intermediate of the villin headpiece domain under non-denaturing conditions: contribution of His41 to the pH-dependent stability of the N-terminal subdomain." *J Mol Biol.* **355**(5), 1078-1094.
- Griko, Y. V., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y. und Kutysenko, V. P. (1988). "Thermodynamic study of the apomyoglobin structure." *J. Mol. Biol.* **202**(1), 127-138.
- Grzesiek, S. und Bax, A. (1992). "Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR." *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6291-6293.
- Grzesiek, S., Stahl, S. J., Wingfield, P. T. und Bax, A. (1996). "The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR." *Biochemistry* **35**(32), 10256-10261.
- Hagn, F. (2003). Echtzeit NMR-Spektroskopie zum Studium der Proteinfaltung von Ribonuklease T1. Biochemie III. Bayreuth, Universität Bayreuth.
- Han, K. Y., Song, J. A., Ahn, K. Y., Park, J. S., Seo, H. S. und Lee, J. (2007). "Solubilization of aggregation-prone heterologous proteins by covalent fusion of stress-responsive Escherichia coli protein, SlyD." *Protein Eng Des Sel* **20**(11), 543-549.
- Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J. und Drugge, R. J. (1984). "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A." *Science* **226**, 544-547.
- Hansen, D. F., Vallurupalli, P. und Kay, L. E. (2008). "Quantifying two-bond ¹HN-¹³CO and one-bond ¹H(alpha)-¹³C(alpha) dipolar couplings of invisible protein states by spin-state selective relaxation dispersion NMR spectroscopy." *J Am Chem Soc.* **130**(26), 8397-8405.
- Hansen, D. F., Vallurupalli, P. und Kay, L. E. (2009). "Measurement of methyl group motional parameters of invisible, excited protein states by NMR spectroscopy." *J Am Chem Soc.* **131**(35), 12745-12754.
- Harding, M. W., Galat, A., Ueling, D. E. und Schreiber, S. L. (1989). "A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase." *Nature* **341**, 758-760.
- Harrison, R. K. und Stein, R. L. (1990). "Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes." *Biochemistry* **29**, 3813-3816.
- Hartl, F. U. und Hayer-Hartl, M. (2009). "Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo." *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**(6), 574-581.
- Hartung, S. (2004). Structural biology studies of the catalysis of ribonuclease T1. Biochemie III. Bayreuth, Universität Bayreuth.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R. und Buchner, J. (1999). "Hsp26: a temperature-regulated chaperone." *Embo J.* **18**(23), 6744-6751.
- Heinemann, U. und Hahn, U. (1989). Structural and functional studies of ribonuclease T1. Protein-Nucleic Acid Interaction. W. Saenger und U. Heinemann. London, MacMillan: 111-141.
- Heinemann, U. und Saenger, W. (1982). "Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex: an x-ray structure." *Nature* **299**, 27-31.
- Hendrick, J. P. und Hartl, F. U. (1995). "The role of molecular chaperones in protein folding." *FASEB Journal* **9**(15), 1559-1569.

- Hershberger, M. V., Maki, A. H. und Galley, W. C. (1980). "Phosphorescence and optically detected magnetic resonance studies of a class of anomalous tryptophan residues in globular proteins." *Biochemistry* **19**(10), 2204-2209.
- Hesterkamp, T. und Bukau, B. (1996). "Identification of the prolyl isomerase domain of Escherichia coli trigger factor." *FEBS Lett.* **385**(1-2), 67-71.
- Higgins, Thompson und Gibson (1996). "Using CLUSTAL for multiple sequence alignments." *Methods Enzymol.* **266**, 383-402.
- Hoch und Stern (2001). "Maximum entropy reconstruction, spectrum analysis and deconvolution in multidimensional nuclear magnetic resonance." *Methods Enzymol.* **338**, 159-178.
- Hoffmann, E. und Rüterjans, H. (1988). "Two-dimensional ¹H-NMR investigation of ribonuclease T1. Resonance assignments, secondary and low-resolution tertiary structures of ribonuclease T1." *European Journal of Biochemistry* **177**(3), 539-560.
- Holmgren, A. (1979). "Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action." *J. Biol. Chem.* **254**(18), 9113-9119.
- Hore, P. J., Winder, S. L., Roberts, C. H. und Dobson, C. M. (1997). "Stopped-flow photo-CIDNP observation of protein folding." *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5049-5050.
- Hottenrott, S., Schumann, T., Plückthun, A., Fischer, G. und Rahfeld, J. U. (1997). "The Escherichia coli SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase." *J. Biol. Chem.* **272**(25), 15697-15701.
- Hu, C. K., Kohnert, U., Wilhelm, O., Fischer, S. und Llinas, M. (1994). "Tissue-type plasminogen activator domain-deletion mutant BM 06.022: Modular stability, inhibitor binding, and activation cleavage." *Biochemistry* **33**(39), 11760-11766.
- Hvidt, H. und Nielsen, S. O. (1966). "Hydrogen exchange in proteins." *Adv. Protein Chem.* **21**, 287-286.
- Ikura, T. und Ito, N. (2007). "Requirements for peptidyl-prolyl isomerization activity: A comprehensive mutational analysis of the substrate-binding cavity of FK506-binding protein 12." *Protein Science* **16**(12), 2618-2625.
- Itoh, S. und Navia, M. A. (1995). "Structure comparison of native and mutant human recombinant FKBP12 complexes with the immunosuppressant drug FK506 (tacrolimus)." *Protein Science* **4**(11), 2261-2268.
- Jackson, S. E. (1998). "How do small single-domain proteins fold?" *Fold. Des.* **3**(4), R81-91.
- Jahn, T. R. und Radford, S. E. (2005). "The Yin and Yang of protein folding." *FEBS J.* **272**(23), 5962-5970.
- Janowski, B., Wöllner, S., Schutkowski, M. und Fischer, G. (1997). "A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates." *Anal. Biochem.* **252**(2), 299-307.
- Jelesarov, I. und Bosshard, H. R. (1999). "Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition." *J. Mol. Recognit.* **12**(1), 3-18.
- Johnson, B. A. (2004). "Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules." *Methods Mol. Biol.* **278**, 313-352.
- Kallen, J., Spitzfaden, C., Zurini, M. G. M., Wider, G., Widmer, H., Wüthrich, K. und Walkinshaw, M. D. (1991). "Structure of Human Cyclophilin and Its Binding Site for Cyclosporin-A Determined by X-Ray Crystallography and NMR Spectroscopy." *Nature* **353**(6341), 276-279.
- Kallen, J. und Walkinshaw, M. D. (1992). "The X-Ray Structure of a Tetrapeptide Bound to the Active Site of Human Cyclophilin-A." *FEBS Lett.* **300**(3), 286-290.
- Karplus, M. (1997). "The Levinthal paradox: yesterday and today." *Fold Des.* **2**(4), 69-75.

- Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R. und Bax, A. (1990). "3-Dimensional Triple-Resonance Nmr-Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins." *J. Magn. Res.* **89**(3), 496-514.
- Kelly und Price (2006). Circular dichroism to study protein interactions. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **20**: 20.10.
- Kiefhaber, T., Grunert, H.-P., Hahn, U. und Schmid, F. X. (1990a). "Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding." *Biochemistry* **29**, 6475-6480.
- Kiefhaber, T., Grunert, H. P., Hahn, U. und Schmid, F. X. (1992a). "Folding of RNase T1 is decelerated by a specific tertiary contact in a folding intermediate." *Proteins: Structure Function and Genetics* **12**, 171-179.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. und Schmid, F. X. (1990b). "Folding of Ribonuclease T₁. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization." *Biochemistry* **29**, 3053-3061.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. und Schmid, F. X. (1990c). "Folding of ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions." *Biochemistry* **29**(12), 3061-3070.
- Kiefhaber, T. und Schmid, F. X. (1992b). "Kinetic Coupling Between Protein Folding and Prolyl Isomerization .2. Folding of Ribonuclease-A and Ribonuclease-T1." *J. Mol. Biol.* **224**(1), 231-240.
- Kiefhaber, T., Schmid, F. X., Willaert, K., Engelborghs, Y. und Chaffotte, A. (1992c). "Structure of a Rapidly Formed Intermediate in Ribonuclease- T1 Folding." *Protein Science* **1**(9), 1162-1172.
- Killick, T. R., Freund, S. M. und Fersht, A. R. (1999). "Real-time NMR studies on a transient folding intermediate of barstar." *Protein Science* **8**(6), 1286-1291.
- Kim, S. und Szyperski, T. (2003). "GFT NMR, a new approach to rapidly obtain precise high-dimensional NMR spectral information." *J. Am. Chem. Soc.* **125**(5), 1385-1393.
- Knappe, T. A., Eckert, B., Schaarschmidt, P., Scholz, C. und Schmid, F. X. (2007). "Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding." *J. Mol. Biol.* **368**(5), 1458-1468.
- Knecht, S., Ricklin, D., Eberle, A. N. und Ernst, B. (2009). "Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces." *J Mol Recognit.* **22**(4), 270-279.
- Kofron, J. L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colonbonilla, E. und Rich, D. H. (1991). "Determination of Kinetic Constants for Peptidyl Prolyl Cis- Trans Isomerases by an Improved Spectrophotometric Assay." *Biochemistry* **30**(25), 6127-6134.
- Koide, S., Jahnke, W. und Wright, P. E. (1995). "Measurement of intrinsic exchange rates of amide protons in a ¹⁵N-labeled peptide." *J. Biomol. NMR* **6**(3), 306-312.
- Korzhnev, D. M. und Kay, L. E. (2008). "Probing invisible, low-populated States of protein molecules by relaxation dispersion NMR spectroscopy: an application to protein folding." *Acc. Chem. Res.* **41**(3), 442-451.
- Korzhnev, D. M., Salvatella, X., Vendruscolo, M., Di Nardo, A. A., Davidson, A. R., Dobson, C. M. und Kay, L. E. (2004). "Low-populated folding intermediates of Fyn SH3 characterized by relaxation dispersion NMR." *Nature* **430**(6999), 586-590.
- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N. und Bukau, B. (2009). "The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins." *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**(6), 589-597.
- Krantz, B. A., Moran, L. B., Kentsis, A. und Sosnick, T. R. (2000). "D/H amide kinetic isotope effects reveal when hydrogen bonds form during protein folding." *Nat. Struct. Biol.* **7**(1), 62-71.
- Kronman, M. J. und Andreotti, R. (1964). "Inter- and intramolecular interactions of alpha-Lactalbumin. I. The apparent heterogeneity at acid pH." *Biochemistry* **3**, 1145-1151.

- Kupce, E. und Freeman, R. (1993). "Polychromatic Selective Pulses." *J. Magn. Res. Series A* **102**(1), 112-126.
- Kupce, E. und Freeman, R. (2003). "Fast multi-dimensional NMR of proteins." *J. Biomol. NMR* **25**(4), 349-354.
- Kupce, E. und Freeman, R. (2004). "Projection-reconstruction technique for speeding up multidimensional NMR spectroscopy." *J. Am. Chem. Soc.* **126**(20), 6429-6440.
- Kuwajima, K., Hiraoka, Y., Ikeguchi, M. und Sugai, S. (1985). "Comparison of the transient folding intermediates in lysozyme and alpha-lactalbumin." *Biochemistry* **24**(4), 874-881.
- Lang, K. und Schmid, F. X. (1988). "Protein-disulphide isomerase and prolyl isomerase act differently and independently as catalysts of protein folding." *Nature* **331**(6155), 453-455.
- Lang, K., Schmid, F. X. und Fischer, G. (1987). "Catalysis of protein folding by prolyl isomerase." *Nature* **329**, 268-270.
- Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. und Finch, J. T. (1978). "Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA." *Nature* **275**, 416-420.
- Leach, M. R., Sandal, S., Sun, H. und Zamble, D. B. (2005). "Metal Binding Activity of the Escherichia coli Hydrogenase Maturation Factor HypB." *Biochemistry* **44**(36), 12229-12238.
- Leach, M. R., Zhang, J. W. und Zamble, D. B. (2007). "The role of complex formation between the Escherichia coli hydrogenase accessory factors HypB and SlyD." *J. Biol. Chem.* **282**(22), 16177-16186.
- Leavitt, S. und Freire, E. (2001). "Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry." *Curr Opin Struct Biol.* **11**(5), 560-566.
- Lescop, E., Schanda, P. und Brutscher, B. (2007). "A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment." *J. Magn. Reson.* **187**(1), 163-169.
- Levinthal, C. J. (1968). "Are there pathways for protein folding?" *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45.
- Liu, H. L., Ho, Y. und Hsu, C. M. (2003). "Molecular simulations to determine the chelating mechanisms of various metal ions to the His-tag motif: a preliminary study." *J Biomol Struct Dyn.* **21**(1), 31-41.
- L  w, C., Neumann, P., Tidow, H., Weininger, U., Haupt, C., Friedrich-Epler, B., Scholz, C., Stubbs, M. T. und Balbach, J. (2009). "Structural, Dynamic and Functional Characterization of the Metallochaperone SlyD from Thermus thermophilus." *J. Mol. Biol.*, in Bearbeitung.
- Lu, K. P., Hanes, S. D. und Hunter, T. (1996). "A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis." *Nature* **380**(6574), 544-547.
- Lumry, R., Biltonen, R. und Brandts, J. F. (1966). "Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins." *Biopolymers* **4**(8), 917-944.
- Luz, Z. und Meiboom, S. (1963). "Nuclear Magnetic Resonance Study of the Protolysis of Trimethylammonium Ion in Aqueous Solution---Order of the Reaction with Respect to Solvent." *The Journal of Chemical Physics* **39**(2), 366-370.
- Macarthur, M. W. und Thornton, J. M. (1991). "Influence of proline residues on protein conformation." *J. Mol. Biol.* **218**, 397-412.
- Maity, H., Maity, M., Krishna, M. M., Mayne, L. und Englander, S. W. (2005). "Protein folding: the stepwise assembly of foldon units." *PNAS* **102**(13), 4741-4746.
- Makhatadze, G. I., Gill, S. J. und Privalov, P. L. (1990). "Heat capacity of proteins. I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: hydration effect." *Biophys Chem.* **38**(1-2), 33-37.

- Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D. und Butt, T. R. (2004). "SUMO-fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins." *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 75-86.
- Mandelshtam, V. A. (2000). "The multidimensional filter diagonalization method." *J. Magn. Res.* **144**(2), 343-356.
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R. und Bax, A. (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.
- Martinez-Oyanedel, J., Choe, H.-W., Heinemann, U. und Saenger, W. (1991). "Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution." *J. Mol. Biol.* **222**, 335-352.
- Martino, L., He, Y., Hands-Taylor, K. L., Valentine, E. R., Kelly, G., Giancola, C. und Conte, M. R. (2009). "The interaction of the Escherichia coli protein SlyD with nickel ions illuminates the mechanism of regulation of its peptidyl-prolyl isomerase activity." *FEBS J.* **276**(16), 4529-4544.
- Mayo, S. L. und Baldwin, R. L. (1993). "Guanidinium Chloride Induction of Partial Unfolding in Amide Proton Exchange in RNase-A." *Science* **262**, 873-876.
- Mayr, L. M., Kiefhaber, T. und Schmid, F. X. (1993). Prolyl isomerizations as rate-determining steps in the folding of ribonuclease T₁. *Protein folding: in vivo and in vitro*. J. L. Cleland. Washington, American Chemical Society. **526**: 142-155.
- Mayr, L. M., Odefey, C., Schutkowski, M. und Schmid, F. X. (1996). "Kinetic analysis of the unfolding and refolding of ribonuclease T1 by a stopped-flow double-mixing technique." *Biochemistry* **35**(17), 5550-5561.
- Meiboom, S. und Gill, D. (1958). "Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times." *Rev. Sci. Instrum.* **29**, 688-691.
- Michnick, S. W., Rosen, M. K., Wandless, T. J., Karplus, M. und Schreiber, S. L. (1991). "Solution Structure of FKBP, a Rotamase Enzyme and Receptor for FK506 and Rapamycin." *Science* **252**(5007), 836-839.
- Mikol, V., Kallen, J. und Walkinshaw, M. D. (1994). "X-ray structure of a cyclophilin B cyclosporin complex: Comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin- binding domain." *PNAS* **91**(11), 5183-5186.
- Minami, Y., Hohfeld, J., Ohtsuka, K. und Hartl, F. U. (1996). "Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40." *J. Biol. Chem.* **271**(32), 19617-19624.
- Mok, K. H., Nagashima, T., Day, I. J., Jones, J. A., Jones, C. J., Dobson, C. M. und Hore, P. J. (2003). "Rapid sample-mixing technique for transient NMR and photo-CIDNP spectroscopy: applications to real-time protein folding." *J. Am. Chem. Soc.* **125**(41), 12484-12492.
- Montelione, G. T. und Wagner, G. (1989). "2D Chemical Exchange NMR Spectroscopy by Proton-Detected Heteronuclear Correlation." *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 3096-3098.
- Moore, J. M., Peattie, D. A., Fitzgibbon, J. und Thomson, J. A. (1991). "Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506." *Nature* **351**, 248-250.
- Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M. O. und van Zijl, P. C. (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. Res. B* **108**(1), 94-98.
- Mossessova, E. und Lima, C. D. (2000). "Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast." *Mol. Cell* **5**(5), 865-876.

- Mücke, M. und Schmid, F. X. (1994a). "Folding mechanism of ribonuclease T1 in the absence of the disulfide bonds." *Biochemistry* **33**(48), 14608-14619.
- Mücke, M. und Schmid, F. X. (1994b). "Intact disulfide bonds decelerate the folding of ribonuclease T1." *J.Mol. Biol.* **239**, 713-725.
- Mullins, L. S., Pace, C. N. und Raushel, F. M. (1997). "Conformational stability of ribonuclease T1 determined by hydrogen- deuterium exchange." *Protein Science* **6**(7), 1387-1395.
- Myers, J. K., Pace, C. N. und Scholtz, J. M. (1995). "Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding." *Protein Sci.* **4**, 2138-2148.
- Neu, H. C. und Heppel, L. A. (1965). "The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during formation of spheroblasts." *J. Biol. Chem.* **240**, 3685-3692.
- Oobatake, M., Takahashi, S. und Ooi, T. (1979). "Conformational stability of ribonuclease T1. II. Salt-induced renaturation." *J. Biochemistry* **86**, 65-70.
- Outten, C. E. und O'Halloran, T. V. (2001). "Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis." *Science* **292**(5526), 2488-2492.
- Pace, C. N. (1986). "Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves." *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.
- Pace, C. N. und Grimsley, G. R. (1988a). "Ribonuclease T1 is stabilized by cation and anion binding." *Biochemistry* **27**, 3242-3246.
- Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomson, J. A. und Barnett, B. J. (1988b). "Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds." *J. Biol. Chem.* **263**, 11820-11825.
- Palmer, A. G., III, Kroenke, C. D. und Loria, J. P. (2001). "Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules." *Methods Enzymol.* **339**, 204-238.
- Parker, M. J. und Clarke, A. R. (1997). "Amide backbone and water-related H/D isotope effects on the dynamics of a protein folding reaction." *Biochemistry* **36**(19), 5786-5794.
- Patzschke, R. (2008). Echtzeit NMR-Spektroskopie zur Untersuchung schneller Proteinfaltungsreaktionen. Physik, Biophysik. Halle, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Pervushin, K., Vögeli, B. und Eletsy, A. (2002). "Longitudinal (1)H relaxation optimization in TROSY NMR spectroscopy." *J. Am. Chem. Soc.* **124**(43), 12898-12902.
- Piotto, M., Saudek, V. und Sklenar, V. (1992). "Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions." *J. Biomol. NMR* **2**, 661-665.
- Quaas, R., Landt, O., Grunert, H.-P., Beineke, M. und Hahn, U. (1989). "Indicator plates for rapid detection of ribonuclease T1 secreting *Escherichia coli* clones." *Nucleic Acids Res.* **17**(8), 3318.
- Ragsdale, S. W. (2009). "Nickel-based Enzyme Systems." *J. Biol. Chem.* **284**(28), 18571-18575.
- Ramachandran, G. N. und Mitra, A. K. (1976). "An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides." *J. Mol. Biol.*(107), 85-92.
- Ramm, K. und Plückthun, A. (2000). "The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity in vitro." *J. Biol. Chem.* **275**(22), 17106-17113.
- Ramm, K. und Plückthun, A. (2001). "High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase FkpA." *J. Mol. Biol.* **310**(2), 485-498.

- Rance, M. (1987). "Improved techniques for homonuclear rotating-frame and isotropic mixing experiments." *J. Magn. Res.* **74**(3), 557-564.
- Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. und Fischer, G. (1998). "Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation." *J. Mol. Biol.* **279**(2), 449-460.
- Reverter, D. und Lima, C. D. (2004). "A basis for SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex." *Structure* **12**(8), 1519-1531.
- Roder, H. (1989). "Structural characterization of protein folding intermediates by proton magnetic resonance and hydrogen exchange." *Methods Enzymol.* **176**, 446-473.
- Roder, H., Elöve, G. A. und Englander, S. W. (1988). "Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by hydrogen exchange labelling and proton NMR." *Nature* **335**(6192), 700-704.
- Roof, W. D., Fang, H. Q., Young, K. D., Sun, J. und Young, R. (1997). "Mutational analysis of slyD, an Escherichia coli gene encoding a protein of the FKBP immunophilin family." *Mol. Microbiol.* **25**(6), 1031-1046.
- Roof, W. D., Horne, S. M., Young, K. D. und Young, R. (1994). "slyD, a host gene required for phi X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerases." *J. Biol. Chem.* **269**(4), 2902-2910.
- Ropson, I. J. und Frieden, C. (1992). "Dynamic NMR Spectral Analysis and Protein Folding - Identification of a Highly Populated Folding Intermediate of Rat Intestinal Fatty Acid-Binding Protein by F-19 NMR." *PNAS* **89**(15), 7222-7226.
- Ross, A., Salzman, M. und Senn, H. (1997). "Fast-HMQC using Ernst angle pulses: an efficient tool for screening of ligand binding to target proteins." *J. Biomol. NMR* **10**(4), 389-396.
- Rovnyak, D., Frueh, D. P., Sastry, M., Sun, Z. Y., Stern, A. S., Hoch, J. C. und Wagner, G. (2004). "Accelerated acquisition of high resolution triple-resonance spectra using non-uniform sampling and maximum entropy reconstruction." *J. Magn. Res.* **170**(1), 15-21.
- Royer, C. A. (2006). "Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence." *Chem. Rev* **106**(5), 1769-1784.
- Russell, B. S., Melenkivitz, R. und Bren, K. L. (2000). "NMR investigation of ferricytochrome c unfolding: detection of an equilibrium unfolding intermediate and residual structure in the denatured state." *PNAS* **97**(15), 8312-8317.
- Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H. und Wuthrich, K. (1998). "TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23), 13585-13590.
- Salzmann, M., Wider, G., Pervushin, K. und Wüthrich, K. (1999). "Improved sensitivity and coherence selection for [15N,1H]-TROSY elements in triple resonance experiments." *J. Biomol. NMR* **15**(2), 181-184.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schanda, P. und Brutscher, B. (2005a). "Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds." *J. Am. Chem. Soc.* **127**(22), 8014-8015.
- Schanda, P., Kupce, E. und Brutscher, B. (2005b). "SOFAS-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds." *J. Biomol. NMR* **33**(4), 199-211.
- Schanda, P., Van Melckebeke, H. und Brutscher, B. (2006). "Speeding up three-dimensional protein NMR experiments to a few minutes." *J. Am. Chem. Soc.* **128**(28), 9042-9043.

- Schmid, F. X. (1983). "Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates." *Biochemistry* **22**(20), 4690-4696.
- Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J. und Schmid, F. X. (2006). "SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities." *Biochemistry* **45**(1), 20-33.
- Scholz, C., Schaarschmidt, P., Engel, A. M., Andres, H., Schmitt, U., Faatz, E., Balbach, J. und Schmid, F. X. (2005). "Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules." *J. Mol. Biol.* **345**(5), 1229-1241.
- Scholz, C., Stoller, G., Zarnt, T., Fischer, G. und Schmid, F. X. (1997). "Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding." *EMBO J.* **16**(1), 54-58.
- Scholz, C., Thirault, L., Schaarschmidt, P., Zarnt, T., Faatz, E., Engel, A. M., Upmeyer, B., Bollhagen, R., Eckert, B. und Schmid, F. X. (2008). "Chaperone-aided in vitro renaturation of an engineered E1 envelope protein for detection of anti-Rubella virus IgG antibodies." *Biochemistry* **47**(14), 4276-4287.
- Schreiber, S. L., Liu, J., Albers, M. W., Karmacharya, R., Koh, E., Martin, P. K., Rosen, M. K., Standaert, R. F. und Wandless, T. J. (1991). "Immunophilin-Ligand Complexes as Probes of Intracellular Signaling Pathways." *Transplant. Proc.* **23**(6), 2839-2844.
- Schulenburg, C., Löw, C., Weininger, U., Mrestani-Klaus, C., Hofmann, H., Balbach, J., Ulbrich-Hofmann, R. und Arnold, U. (2009). "The folding pathway of onconase is directed by a conserved intermediate." *Biochemistry* **48**(35), 8449-8457.
- Schuler, B. und Eaton, W. A. (2008). "Protein folding studied by single-molecule FRET." *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**(1), 16-26.
- Shaka, A. J., Barker, P. B. und Freeman, R. (1985). "Computer-Optimized Decoupling Scheme for Wideband Applications and Low-Level Operation." *J. Magn. Res.* **64**(3), 547-552.
- Siekierka, J. J., Hung, S. H. Y., Poe, M., Lin, C. S. und Sigal, N. H. (1989). "A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin." *Nature* **341**, 755-757.
- Smith, M. A., Hu, H. und Shaka, A. J. (2001). "Improved Broadband Inversion Performance for NMR in Liquids." *J Magn Res* **151**(2), 269-283.
- Stanley, N. R., Palmer, T. und Berks, B. C. (2000). "The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in Escherichia coli." *J. Biol. Chem.* **275**(16), 11591-11596.
- Steegborn, C., Schneider-Hassloff, H., Zeeb, M. und Balbach, J. (2000). "Cooperativity of a Protein Folding Reaction Probed at Multiple Chain Positions by Real-Time 2D NMR Spectroscopy." *Biochemistry* **39**(27), 7910-7919.
- Stewart, D. E., Sarkar, A. und Wampler, J. E. (1990). "Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures." *J. Mol. Biol.* **214**, 253-260.
- Stingl, Schauer, Ecobichon, Labigne, Lenormand, Rousselle, Namane und Reuse, d. (2008). "In vivo interactome of Helicobacter pylori urease revealed by tandem affinity purification." *Mol Cell Proteomics* **7**(12), 2429-2441.
- Stoller, G., Rücknagel, K. P., Nierhaus, K., Schmid, F. X., Fischer, G. und Rahfeld, J.-U. (1995). "Identification of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase bound to the Escherichia coli ribosome as the trigger factor." *EMBO J.* **14**, 4939-4948.
- Sugio, S., Oka, K., Ohishi, H., Tomita, K. und Saenger, W. (1985). "Three-dimensional structure of the ribonuclease T1 X 3'-guanylic acid complex at 2.6 Å resolution." *FEBS Lett.* **183**(1), 115-118.

- Suzuki, R., Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K., Maruyama, T. und Tanokura, M. (2003). "Three-dimensional solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of peptidyl prolyl cis-trans isomerase and chaperone-like activities." *J. Mol. Biol.* **328**(5), 1149-1160.
- Szyperski, T., Mills, J. L., Perl, D. und Balbach, J. (2006). "Combined NMR-observation of cold denaturation in supercooled water and heat denaturation enables accurate measurement of $\Delta C(p)$ of protein unfolding." *Eur Biophys J.* **35**(4), 363-366.
- Szyperski, T., Wider, G., Bushweller, J. H. und Wüthrich, K. (1993). "3D ^{13}C - ^{15}N -heteronuclear two-spin coherence spectroscopy for polypeptide backbone assignments in ^{13}C - ^{15}N -double-labeled proteins." *J. Biomol. NMR* **3**(1), 127-132.
- Takahashi, K., Uchida, T. und Egami, F. (1970). "Ribonuclease T1: structure and function." *Adv. Biophysics* **1**, 53-98.
- Takahashi, N., Hayano, T. und Suzuki, M. (1989). "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin." *Nature* **337**, 473-475.
- Tanford, C. (1968). "Protein denaturation, part A." *Advances in Protein Chemistry* **23**, 121-217.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res.* **22**(22), 4673-4680.
- Udgaonkar, J. B. und Baldwin, R. L. (1990). "Early folding intermediate of ribonuclease A." *PNAS* **87**(21), 8197-8201.
- Vallurupalli, P., Hansen, D. F. und Kay, L. E. (2008a). "Probing structure in invisible protein states with anisotropic NMR chemical shifts." *J Am Chem Soc.* **130**(9), 2734-2735.
- Vallurupalli, P., Hansen, D. F. und Kay, L. E. (2008b). "Structures of invisible, excited protein states by relaxation dispersion NMR spectroscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(33), 11766-11771.
- Vallurupalli, P., Hansen, D. F., Lundström, P. und Kay, L. E. (2009). "CPMG relaxation dispersion NMR experiments measuring glycine ^1H α and ^{13}C α chemical shifts in the 'invisible' excited states of proteins." *J Biomol NMR.* **45**(1-2), 45-55.
- Vallurupalli, P., Scott, L., Williamson, J. R. und Kay, L. E. (2007). "Strong coupling effects during X-pulse CPMG experiments recorded on heteronuclear ABX spin systems: artifacts and a simple solution." *J Biomol NMR.* **38**(1), 41-46.
- Velázquez Campoy, A. und Freire, E. (2005). "ITC in the post-genomic era...? Priceless." *Biophys Chem.* **115**(2-3), 115-124.
- Wagner, C. und Kiefhaber, T. (1999). "Intermediates can accelerate protein folding." *PNAS* **96**(12), 6716-6721.
- Wagner, G. und Wüthrich, K. (1982). "Amide protein exchange and surface conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor in solution. Studies with two-dimensional nuclear magnetic resonance." *J. Mol. Biol.* **160**(2), 343-361.
- Weigelt, J. (1998). "Single scan, sensitivity- and gradient-enhanced TROSY for multidimensional NMR experiments." *J. Am. Chem. Soc.* **120**(41), 10778-10779.
- Weininger, U., Haupt, C., Schweimer, K., Graubner, W., Kovermann, M., Brüser, T., Scholz, C., Schaarschmidt, P., Zoldak, G., Schmid, F. X. und Balbach, J. (2009). "NMR solution structure of SlyD from Escherichia coli: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function." *J. Mol. Biol.* **387**(2), 295-305.
- Wider, G., Neri, D. und Wüthrich, K. (1991). "Studies of slow conformational equilibria in macromolecules by exchange of heteronuclear longitudinal 2-spin-order in a 2D difference correlation experiment." *J. Biomol. NMR* **1**, 93-98.

- Wirmer, S. L., Kühne, T. und Schwalbe, H. (2001). "Millisecond time resolved photo-CIDNP NMR reveals a non-native folding intermediate on the ion induced refolding pathway of bovine-lactalbumin." *Angew. Chem.* **113**, 4378-4381.
- Wolynes, P. G., Onuchic, J. N. und Thirumalai, D. (1995). "Navigating the folding routes." *Science* **267**(5204), 1619-1620.
- Wülfing, C., Lombardero, J. und Plückthun, A. (1994). "An Escherichia coli protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif." *J. Biol. Chem.* **269**(4), 2895-2901.
- Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., Cantley, L. C. und Lu, K. P. (1997). "Sequence-Specific and Phosphorylation-Dependent Proline Isomerization: A Potential Mitotic Regulatory Mechanism." *Science* **278**(5345), 1957-1960.
- Zeeb, M. und Balbach, J. (2004). "Protein folding studied by real-time NMR spectroscopy." *Methods* **34**(1), 65-74.
- Zeeb, M., Rösner, H., Zeslawski, W., Canet, D., Holak, T. A. und Balbach, J. (2002). "Protein folding and stability of human CDK inhibitor p19INK4d." *J. Mol. Biol.* **315**(3), 447-457.
- Zhang, J. W., Butland, G., Greenblatt, J. F., Emili, A. und Zamble, D. B. (2005). "A role for SlyD in the Escherichia coli hydrogenase biosynthetic pathway." *J. Biol. Chem.* **280**(6), 4360-4366.
- Zhang, J. W., Leach, M. R. und Zamble, D. B. (2007). "The peptidyl-prolyl isomerase activity of SlyD is not required for maturation of Escherichia coli hydrogenase." *J. Bacteriol.* **189**(21), 7942-7944.
- Zoldák, G., Carstensen, L., Scholz, C. und Schmid, F. X. (2009). "Consequences of domain insertion on the stability and folding mechanism of a protein." *J. Mol. Biol.* **386**(4), 1138-1152.

8. Anhang

8.1. Abbildungen

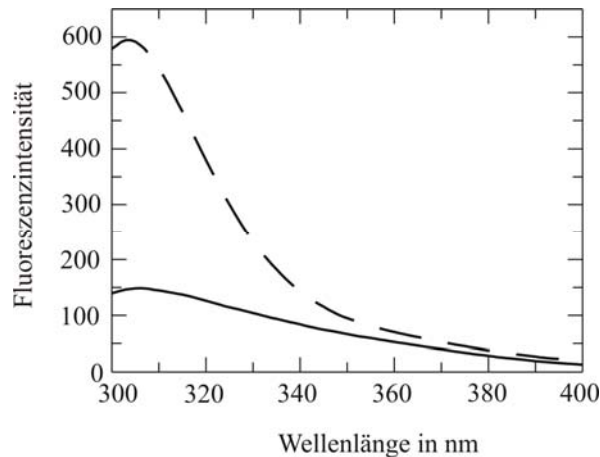


Abb. 8-1 Fluoreszenzemissionsspektrum von 5 μM SlyD* in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 15 °C. Die Anregung erfolgte bei 278 nm. Die durchgezogene Linie repräsentiert den nativen Zustand, die Kurve für das entfaltete Protein ist gestrichelt dargestellt.

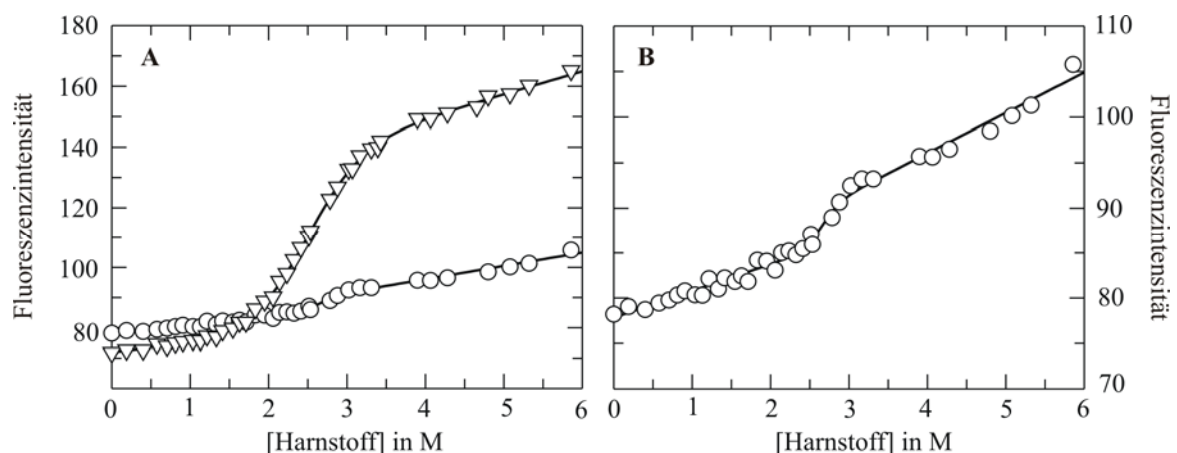


Abb. 8-2 Harnstoffinduzierter Entfaltungsübergang von SlyD*-F84W. Detektion des Überganges bei 308 nm nach Anregung bei 280 nm (Dreiecke), Detektion bei 344 nm nach Anregung bei 295 nm (Kreise). Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassung der Daten an das Zweizustandsmodell dar. Die resultierenden Stabilitätsparameter sind (nach Anregung bei 280 nm): $\Delta G_{\text{U}}(\text{H}_2\text{O}) = 16,8 \pm 0,7 \text{ kJ/mol}$, $m_{\text{eq}} = 6,8 \pm 0,3 \text{ kJ/(M}\cdot\text{mol)}$, $[D]_{1/2} = 2,5 \text{ M}$. Der zweite Übergang, der in **B** vergrößert dargestellt ist, konnte nicht ausgewertet werden. Die durchgezogene Linie dient nur der einfacheren Betrachtung. Der Übergang wurde in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 15 °C gemessen. Die Proteinkonzentration war 5 μM .

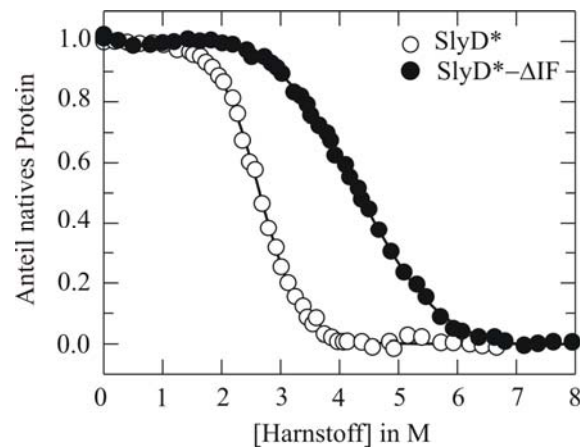


Abb. 8-3 Harnstoffinduzierter Entfaltungsübergang von SlyD*- Δ IF. Entfaltungsübergang von SlyD* (offene Symbole) und SlyD*- Δ IF (geschlossene Symbole). Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassung der Daten an das Zweizustandsmodell dar. Die resultierenden Stabilitätsparameter sind für SlyD*: $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) = 18,4 \pm 0,6 \text{ kJ/mol}$, $m_{\text{eq}} = 6,9 \pm 0,2 \text{ kJ/(M}\cdot\text{mol)}$, $[D]_{1/2} = 2,7 \text{ M}$ und für SlyD*- Δ IF: $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) = 13,9 \pm 0,5 \text{ kJ/mol}$, $m_{\text{eq}} = 3,2 \pm 0,1 \text{ kJ/(M}\cdot\text{mol)}$, $[D]_{1/2} = 4,3 \text{ M}$. Die Übergänge wurden in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 15 °C gemessen. Die Proteinkonzentration war 5 μM .

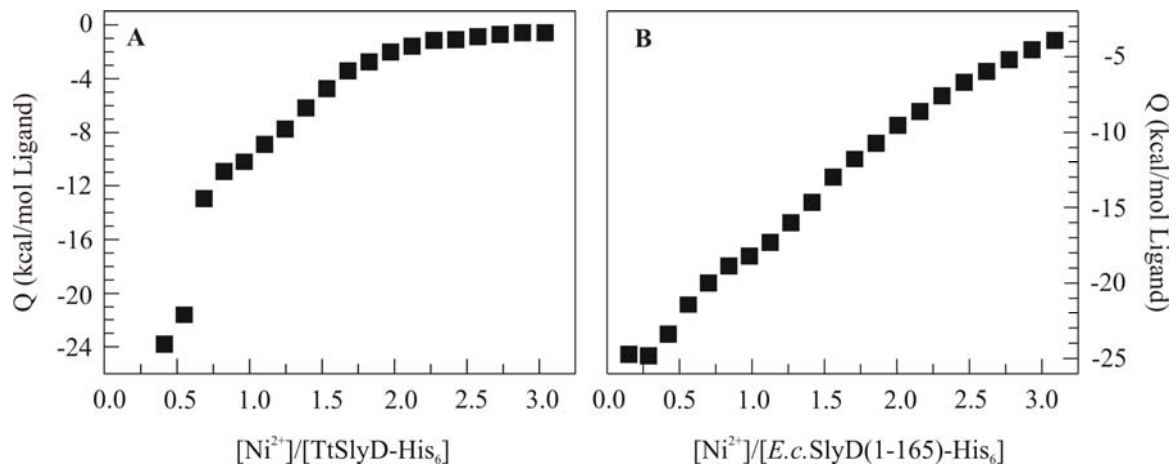


Abb. 8-4 Isothermale Titrationskalorimetrie-Daten von zwei homologen SlyDs mit Ni^{2+} . Die integrierte Wärmemenge wurde gegenüber dem Konzentrationsverhältnis Ligand/Protein aufgetragen. Es sind jeweils zwei Bindungsereignisse zu sehen, jedoch war eine Anpassung der Daten an ein entsprechendes Bindungsmodell auf Grund der ineinander übergehenden Prozesse nicht möglich. **A** Isotherme Titration von 18 μM TtSlyD-His₆ mit 270 μM NiCl_2 (in 10 mM Tris, pH^{25°C} 7.5, 25 °C). **B** Isotherme Titration von 16 μM E.c.SlyD(1-165)-His₆ mit 240 μM NiCl_2 .

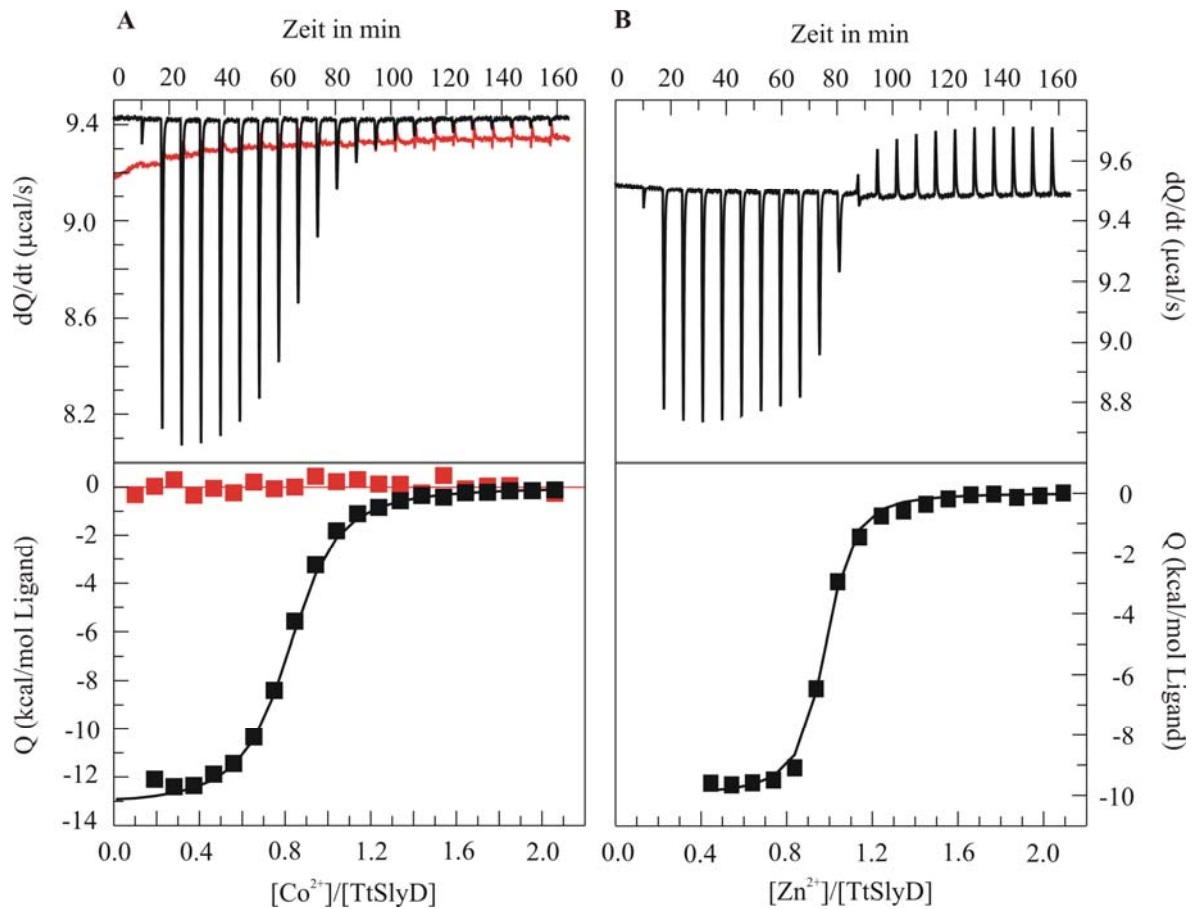


Abb. 8-5 Isothermale Titrationskalorimetrie kurven von TtSlyD mit Co^{2+} , Gd^{3+} und Zn^{2+} . Die obere Abbildung gibt jeweils die elektrische Leistung direkt wieder, die nach jeder Injektion des jeweiligen Metallions detektiert wurde. In der unteren Abbildung werden die integrierten Wärmemengen gegenüber dem Konzentrationsverhältnis Metallion/TtSlyD aufgetragen. Die thermodynamischen Parameter wurden aus einer nichtlinearen Anpassung an die experimentellen Daten an ein Bindungsmodell mit einer Bindestelle erhalten. A Isotherme Titration von 27 μM TtSlyD mit 270 μM $CoCl_2$ (in 10 mM Tris, $pH^{25^\circ C}$ 7.5, 25 °C). Die durch Bindung freiwerdende Reaktionsenthalpie betrug $-13,2 \pm 0,2$ kcal/mol; die Affinitätskonstante war $2,4 \pm 0,2 \times 10^6 M^{-1}$. Daraus resultierte ein K_D -Wert von 420 nM. Die in rot dargestellten Daten entsprechen der Titration von TtSlyD mit $GdCl_3$. Es konnte keine Bindung von Gd^{3+} festgestellt werden. B Isotherme Titration von 27 μM TtSlyD mit 270 μM $ZnCl_2$ (in 10 mM Tris, $pH^{25^\circ C}$ 7.5, 25 °C). Die durch Bindung freiwerdende Reaktionsenthalpie betrug hier $-10,0 \pm 0,1$ kcal/mol; die Affinitätskonstante war $9,8 \pm 1,5 \times 10^6 M^{-1}$. Der daraus resultierende K_D -Wert betrug 102 nM.

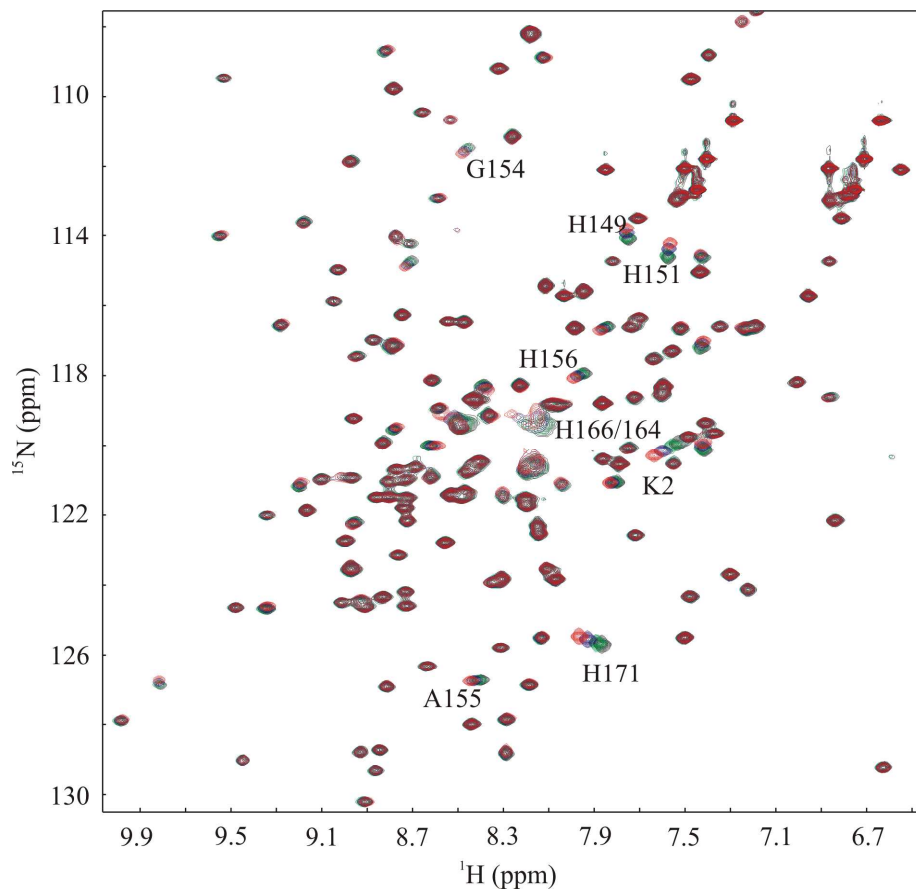


Abb. 8-6 NMR-Titration von ^{15}N -SlyD* mit nativer RNase T1 (S54G/P55N) in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 25 °C. Die Veränderung der chemischen Verschiebung einiger Kreuzsignale beruht auf unspezifischen Wechselwirkungen des unstrukturierten C-terminalen Teils und des His₆-Tags.

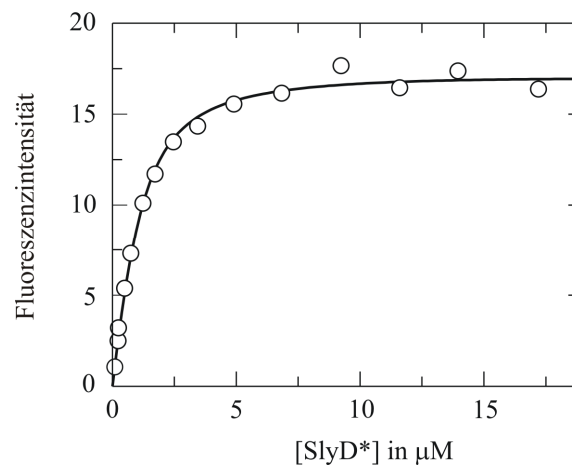


Abb. 8-7 Fluoreszenzdetektierte Titration von Tat27 mit SlyD* in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 25 °C. Die durchgezogene Linie entspricht der Anpassung an ein einfaches Bindungsmodell mit einer Bindestelle. Bei einer Stöchiometrie von 1 resultiert eine Dissoziationskonstante von $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Aminosäuresequenz des Tat-Peptides: QRRDFLKYSVALGVASALPLWSRAVFA.

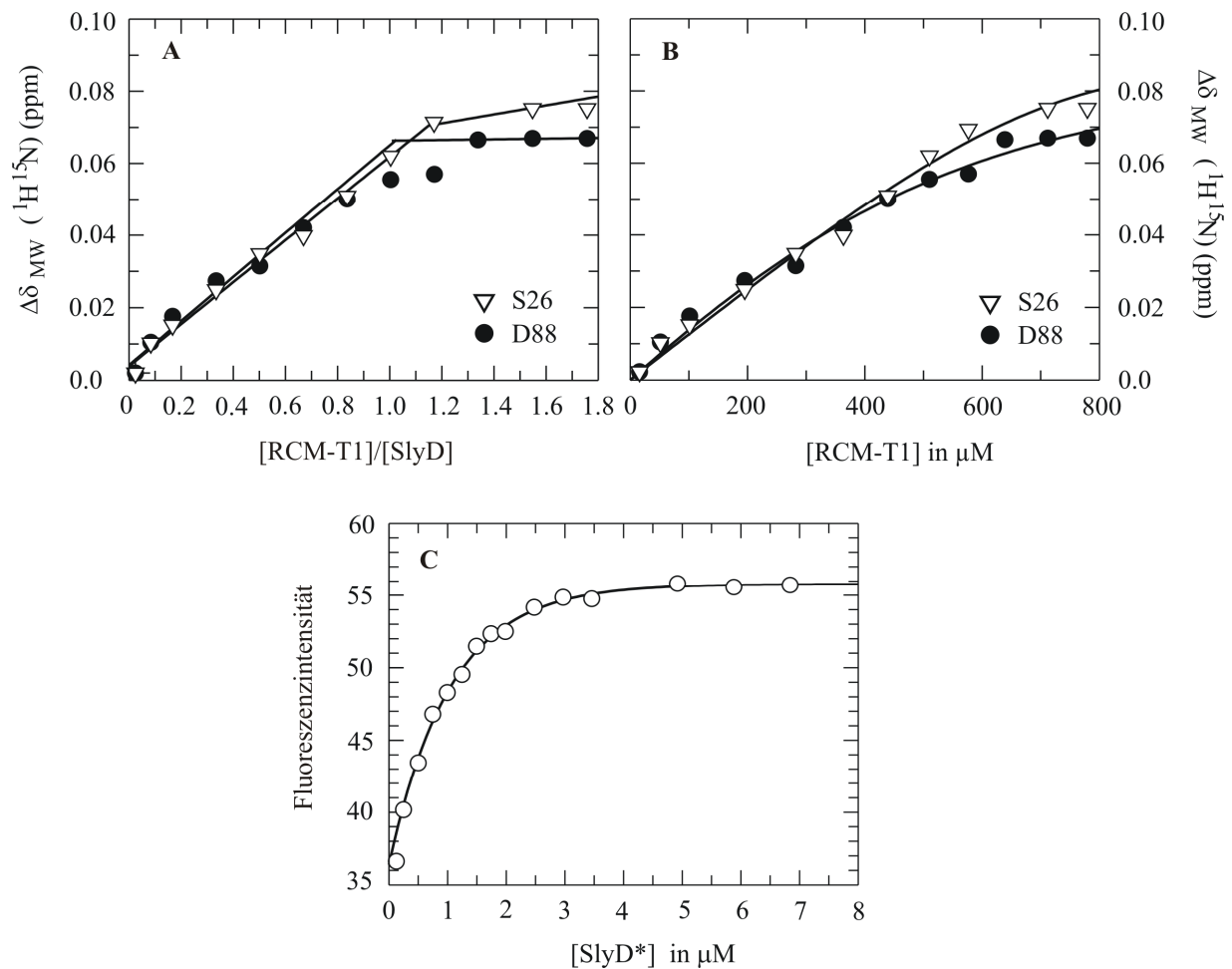


Abb. 8-8 Titration von ^{15}N -SlyD* mit RCM-T1. Abhängigkeit der Veränderung der chemischen Verschiebung vom Konzentrationsverhältnis RCM-T1 zu SlyD* (**A**) und von der Substratkonzentration RCM-T1 (**B**) für die beiden Amidprotonen von D88 und S26 aus der NMR-Titration. **A** Aus der linearen Anpassung wird die Gleichgewichtsbindungskurve erhalten. Der Äquivalenzpunkt ist bei ca. 1 und zeigt einen 1:1-Komplex an. **B** Die durchgezogenen Linien sollen das Auge nur führen, besitzen aber keine physikalische Bedeutung. **C** Fluoreszenzdetektierte Titration von RCM-T1 mit SlyD*. Die durchgezogene Linie entspricht der Anpassung an ein einfaches Bindungsmodell mit einer Bindestelle. Bei einer Stöchiometrie von 1 resultiert eine Dissoziationskonstante von $4,4 \pm 0,8 \mu M$. Beide Titrations wurden in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 25 °C durchgeführt.

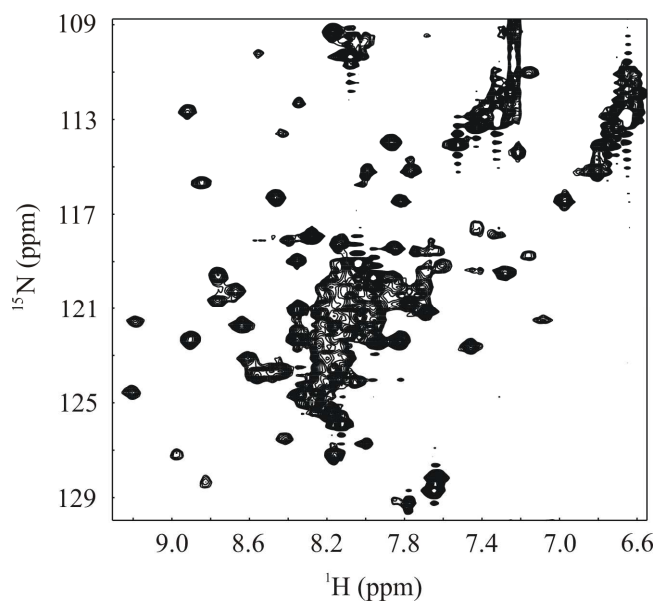


Abb. 8-9 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektrum der isolierten IF-Domäne in Anwesenheit von 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei 25 °C. Die Kreuzsignale der entfalteten Spezies finden sich hauptsächlich in der Mitte des Spektrums bei 7,8 bis 8,4 ppm. Die Intensität der dispersen Signale der strukturierten Spezies beträgt ungefähr 30 %.

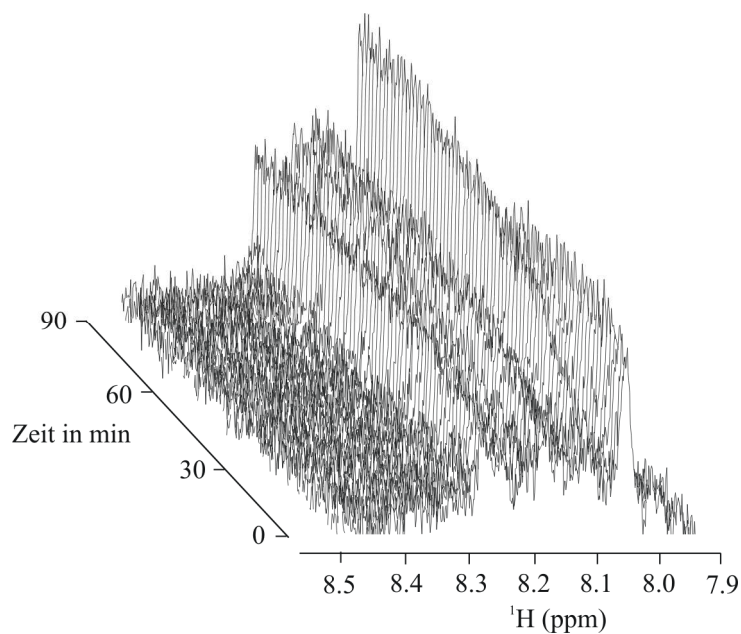


Abb. 8-10 Folge von 1D ^1H -Spektren von 450 μM Insulin nach Start der Aggregationsreaktion bei 25 °C durch Zugabe von DTT. Der Tieffeldbereich mit einigen wenigen Signalen von Amidprotonen der Kette A ist abgebildet.

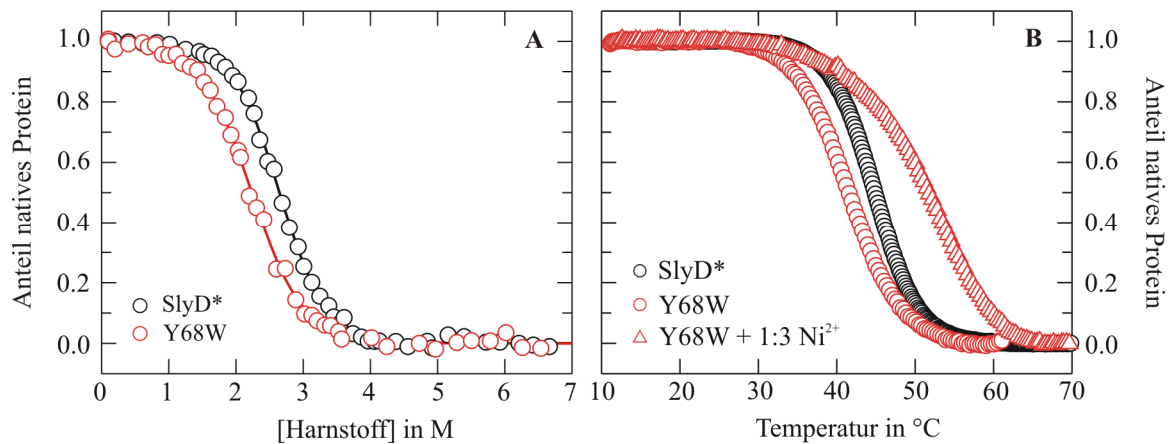


Abb. 8-11 Thermodynamische Stabilität der Y68W-Mutante von SlyD*. **A** Harnstoffinduzierte Entfaltungsübergänge von SlyD*-Y68W (rot) im Vergleich zu SlyD* (schwarz). Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassung der Daten an das Zweizustandsmodell dar (Stabilitätsparameter für SlyD*-Y68W: $\Delta G_u(H_2O) = 14,1 \pm 0,7$ kJ/mol, $m_{eq} = 6,3 \pm 0,3$ kJ/(mol·M), $[D]_{1/2} = 2,2$ M). Die Übergänge wurden in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 15 °C gemessen. Die Proteinkonzentration war 5 μ M. **B** Thermisch induzierter Entfaltungsübergang von SlyD*-Y68W in Abwesenheit und in Anwesenheit von $NiCl_2$ verglichen mit dem von SlyD*. Die nach einem Zweizustandsmodell berechneten Parameter sind: $\Delta H_u(T_m) = 244,8 \pm 1,5$ kJ/mol und $T_m = 41,3$ °C). Die Übergänge wurden ebenfalls in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 gemessen mit einer Aufheizrate von 0,5 °C/min. Als Sonde diente die UV-Absorption bei 288 nm. Die Proteinkonzentration betrug 30 μ M. $NiCl_2$ wurde in dreifachem Überschuss eingesetzt, die Endkonzentration war 90 μ M. SlyD*-Y68W weist geringfügig weniger Stabilität auf als SlyD*.

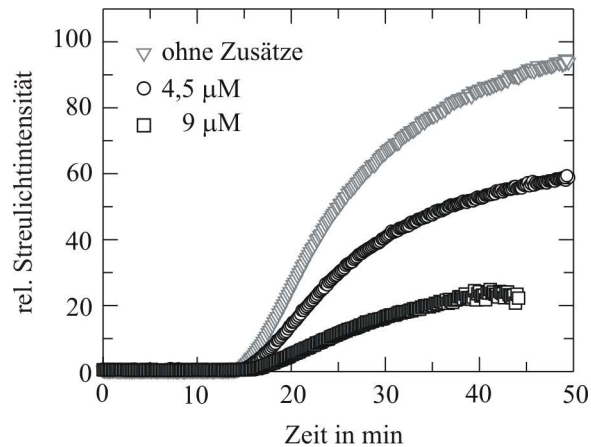


Abb. 8-12 Chaperonaktivität von SlyD*-Y68W entsprechend des Insulin-Tests. Streulichtmessungen zur Aggregation von 45 μ M Insulin in 50 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 25 °C in Anwesenheit von 4,5 μ M ($\circ$) und 9 μ M ($\square$) SlyD*-Y68W. Durch Zugabe von 10 mM DTT wurde die Reaktion gestartet und der zeitliche Verlauf bei 400 nm beobachtet. Graue Dreiecke bezeichnen den Aggregationsverlauf von Insulin ohne Chaperonzusätze.

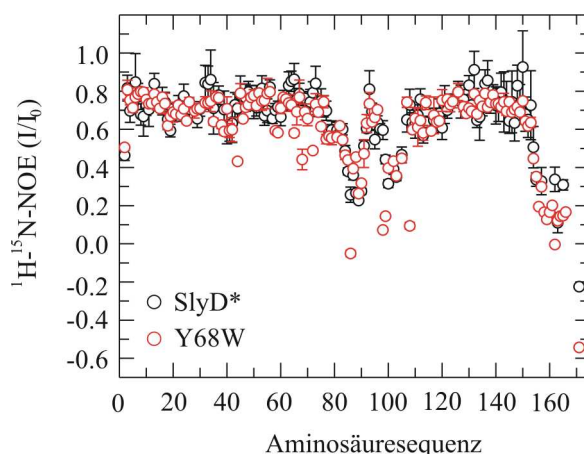


Abb. 8-13 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -heteronuklearer NOE bei 14,2 T und 25 °C für SlyD* (schwarz) und SlyD*-Y68W (rot). Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Dynamik der beiden Domänen in beiden Proteinen auf der pico- bis nano-Sekunden NMR-Zeitskala, die IF-Domäne ist sehr viel flexibler als die FKBP-Domäne. Im Bereich um W68 zeigt sich in der Mutante eine erhöhte Dynamik. Die Daten des hNOEs wurden freundlicherweise von Michael Kovermann zur Verfügung gestellt.

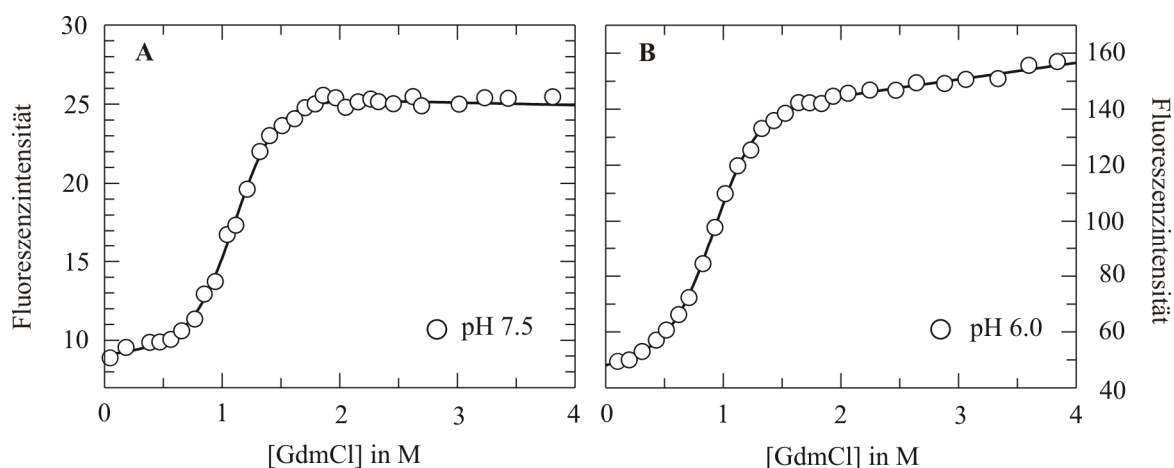


Abb. 8-14 Thermodynamische Stabilität von SlyD* gegenüber GdmCl. GdmCl-induzierter Entfaltungsübergang von SlyD* in 10 mM Tris, pH^{20 °C}7,5 bei 20 °C (A) und in 10 mM Bis-Tris, pH^{10 °C}6,0 bei 10 °C (B). Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassung der Daten an das Zweizustandsmodell dar mit folgenden Stabilitätsparametern: $\Delta G_{\text{U}}(\text{H}_2\text{O}) = 15,3 \pm 1,4$ kJ/mol, $m_{\text{eq}} = 13,7 \pm 1,1$ kJ/(M·mol) und $[D]_{1/2} = 1,1$ M (pH 7,5, A) bzw. $\Delta G_{\text{U}}(\text{H}_2\text{O}) = 12,0 \pm 0,8$ kJ/mol, $m_{\text{eq}} = 13,0 \pm 0,6$ kJ/(M·mol) und $[D]_{1/2} = 0,9$ M (pH 6,0, B). Die Proteinkonzentration betrug 2 μM (A) bzw. 5 μM (B). Die Fehler resultieren aus der Anpassung der Daten an Gleichung [2.10].

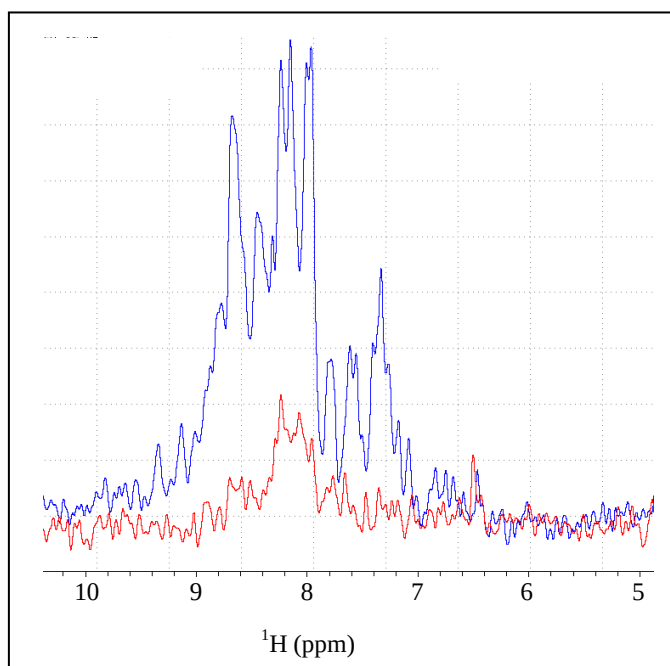


Abb. 8-15 ^1H -Spektren von SlyD* in 10 mM Tris, $\text{pH}^{20^\circ\text{C}} 7.5$ in Gegenwart von GdmCl. Deutlich zu erkennen ist die geringe Auflösung und Signalintensität in Gegenwart von GdmCl (0,4 M GdmCl (rotes Spektrum) und ohne GdmCl (blaues Spektrum)).

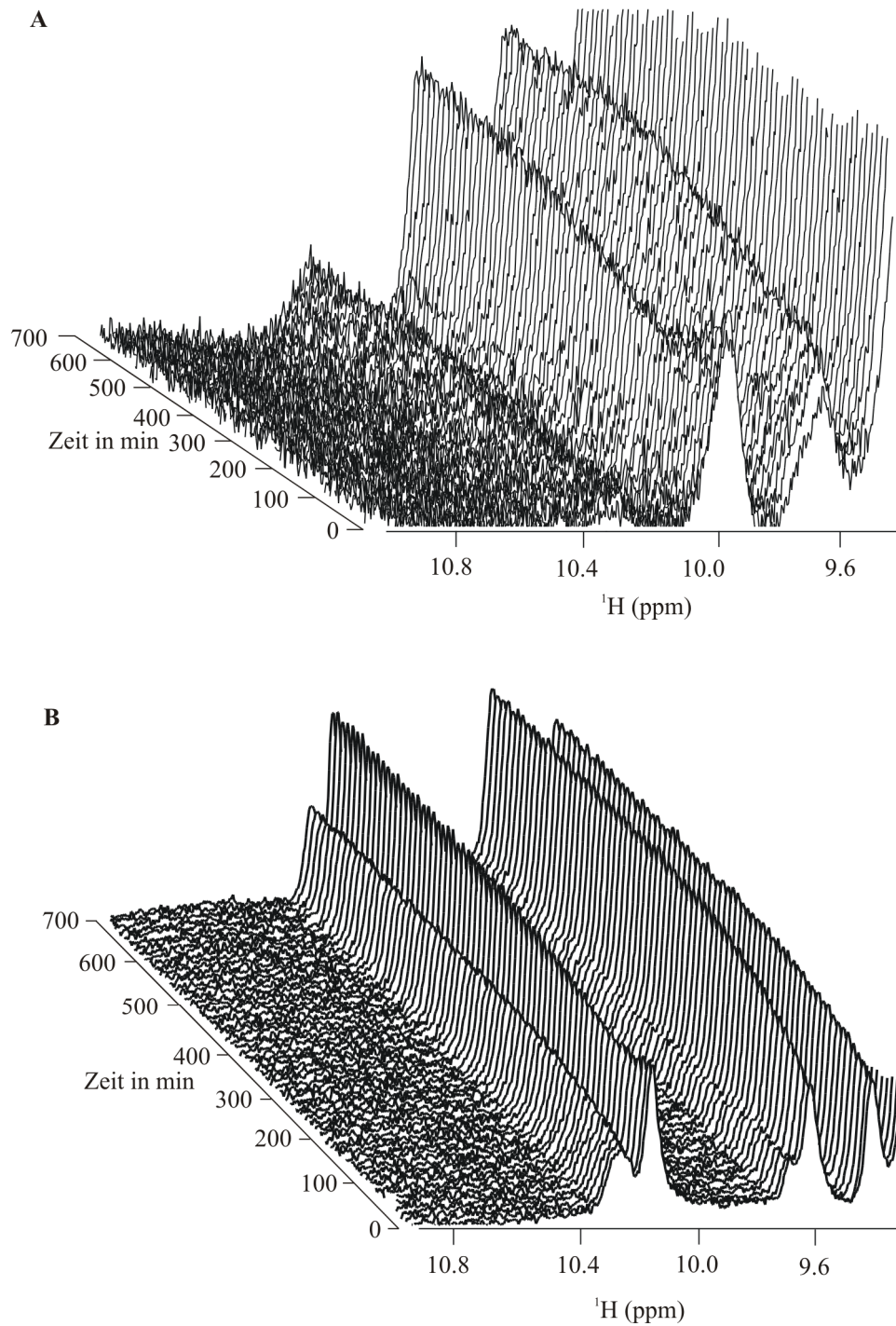


Abb. 8-16 stacked plot für die Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N). Folge von 1D ^1H -Spektren von 1,9 mM RNase T1 (S54G/P55N) in Abwesenheit (**A**) und Anwesenheit von 190 μM SlyD* (**B**). Dargestellt ist die Tieffeldregion mit dem Amidprotonenbereich. Die zeitliche Auflösung pro Spektrum betrug 5 min 21 s, da zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses vier aufeinander folgende Spektren gemittelt wurden.

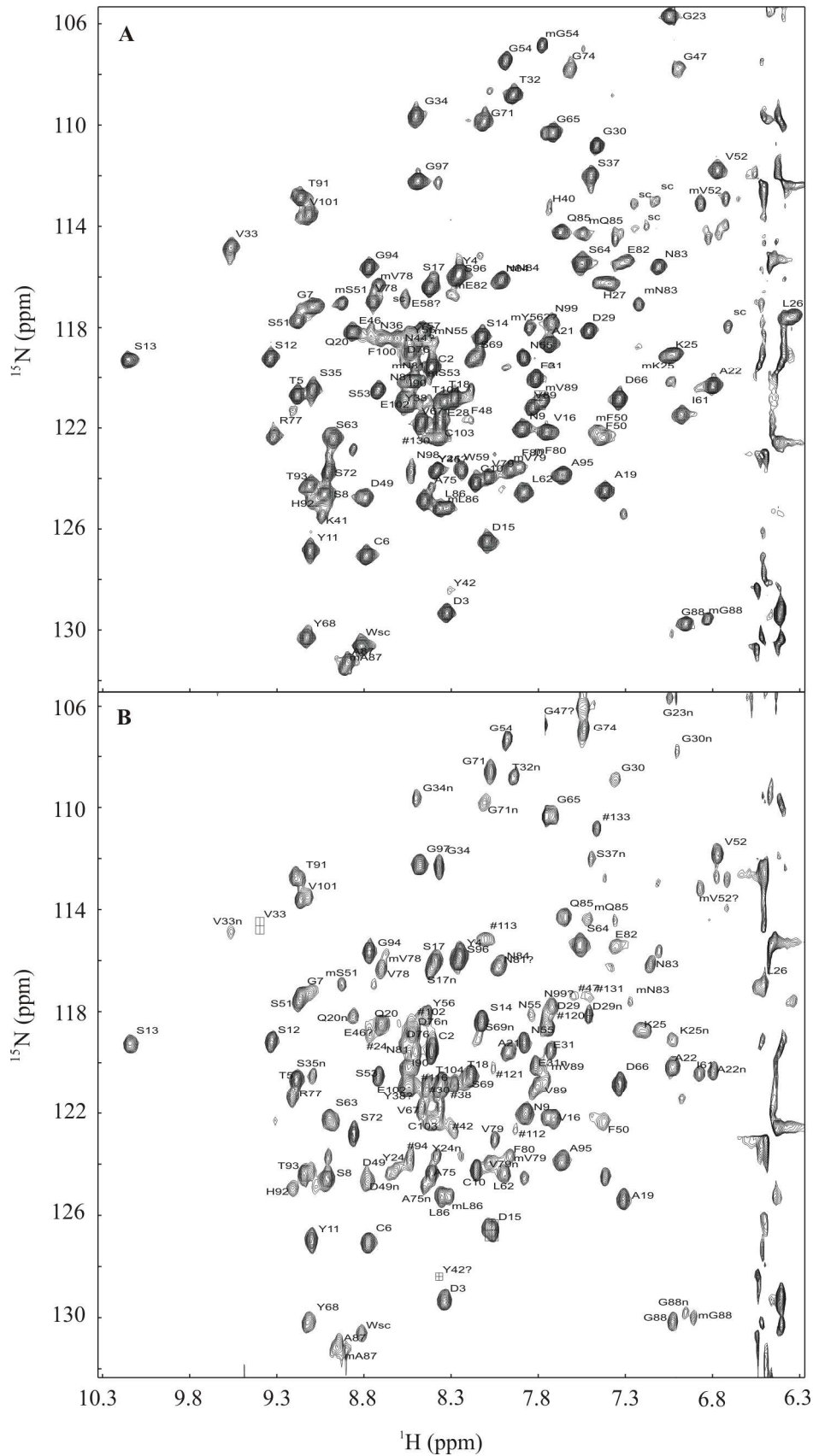


Abb. 8-17 Zuordnung der Kreuzsignale von RNase T1 (S54G/P55N). $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von ^{15}N -RNase T1 in 10 mM Bis-Tris, 0,6 M GdmCl, $\text{pH}^{10^\circ\text{C}}$ 6.0 bei 10°C in Gegenwart von 10 % SlyD*. Die Zuordnung der einzelnen Kreuzsignale ist angegeben. Ein kleines m kennzeichnet Kreuzsignale, die der zweiten Konformation angehören. **A** Spektrum der nativen RNase T1 im Komplex. **B** Spektrum des Intermediates im Komplex mit SlyD*. Die Zuordnung entspricht der des Intermediates, angegebene native Kreuzsignale sind mit einem kleinen n bezeichnet.

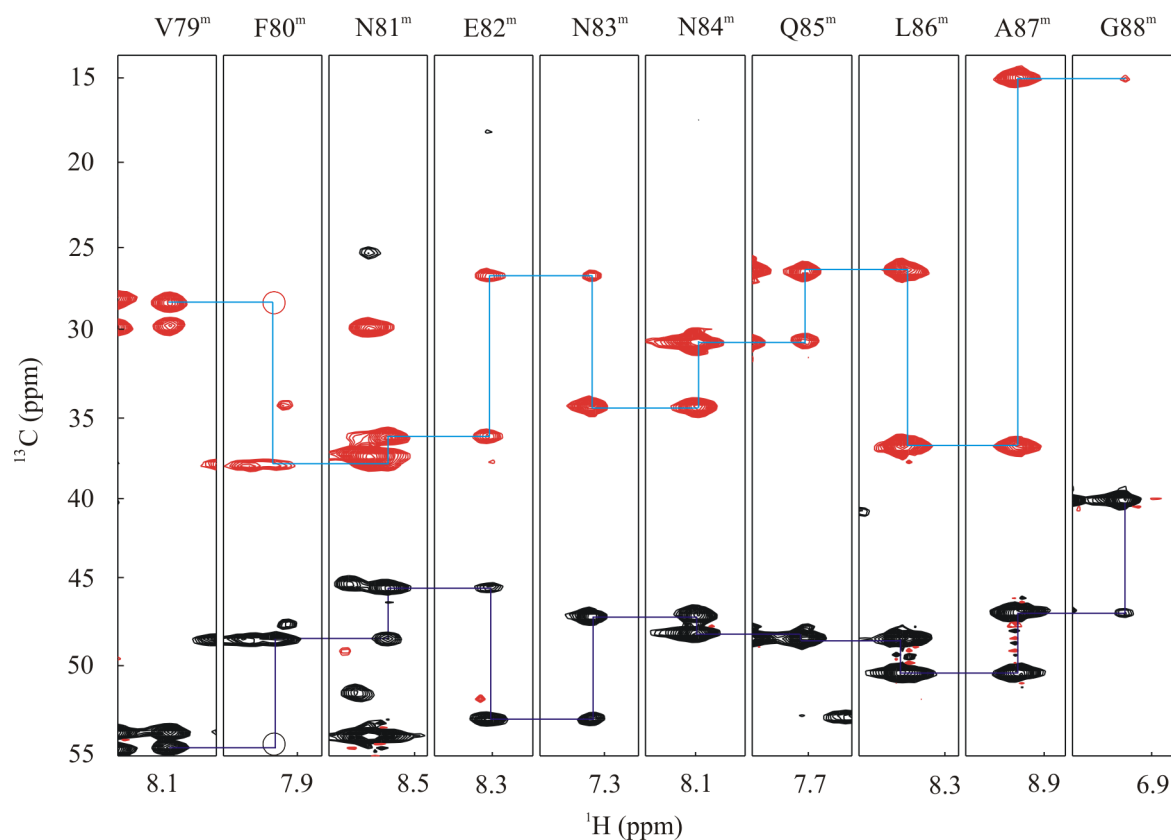


Abb. 8-18 Zuordnung der *minor* Spezies. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Streifen aus dem HNCACB von nativer RNase T1 (S54G/P55N) nach erfolgter Rückfaltung in 10 mM Bis-Tris, 0,6 M GdmCl, $\text{pH}^{10^\circ\text{C}} 6.0$. Zu sehen sind nur die Streifen von Kreuzsignalen der zweiten (*minor*) Konformation und deren Konnektivitäten, angedeutet durch dunkelblaue (Verknüpfung der C^α -Atome, schwarz) und hellblaue Linien (Verknüpfungen der C^β -Atome, rot). Die offenen Kreise zeigen die Position von Kreuzsignalen an, die unterhalb der Detektionsgrenze sind.

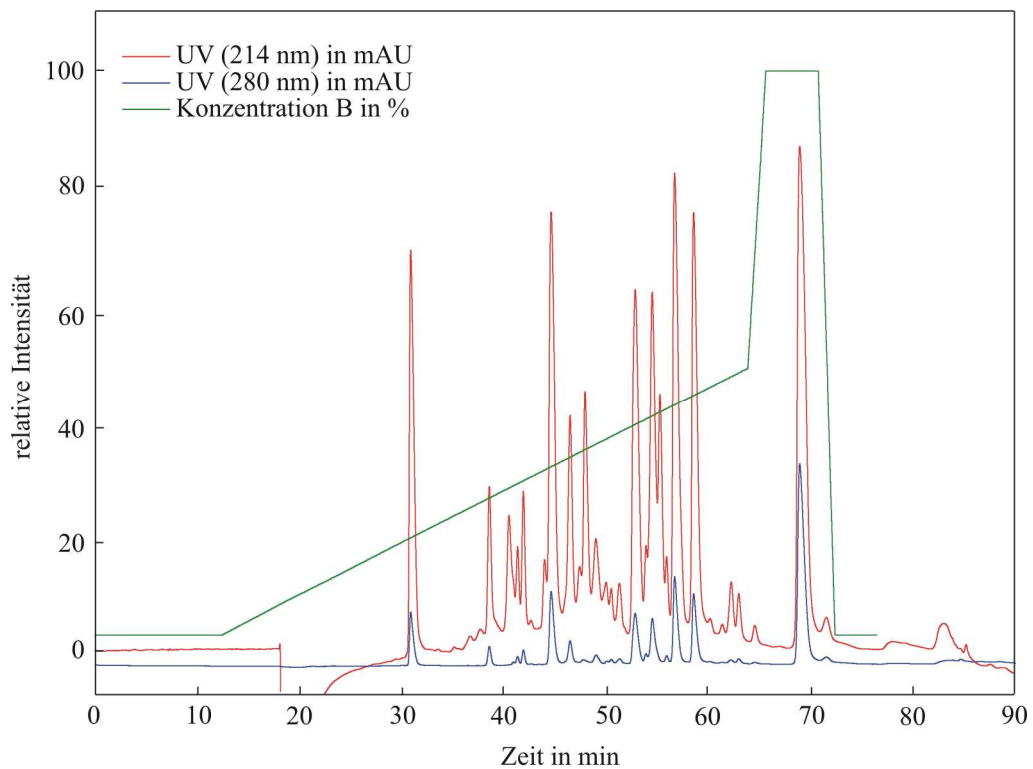


Abb. 8-19 HPLC-Chromatogramm der mit Pepsin gespaltenen RNase T1 (S54G/P55N)-Probe. Der Verdau mit Pepsin (1:33 (w/w) eingesetzt) wurde in 84 mM HCl, 25 mM NaCl bei pH 1.2 (mit 10 % TFA eingestellt) und bei 37 °C für 3 Stunden durchgeführt. Die Probe wurde auf eine in 5 % AcCN, 0,05 % TFA äquilibrierte RP-C18-Säule aufgetragen und mit einem Gradienten von 0 bis 50 % B (B: 80 % AcCN, 0,04 % TFA) über 60 Minuten eluiert. Fraktionen wurden alle 15 s direkt auf das Maldi-Target aufgespottet. Die Flussrate betrug 300 nl/min.

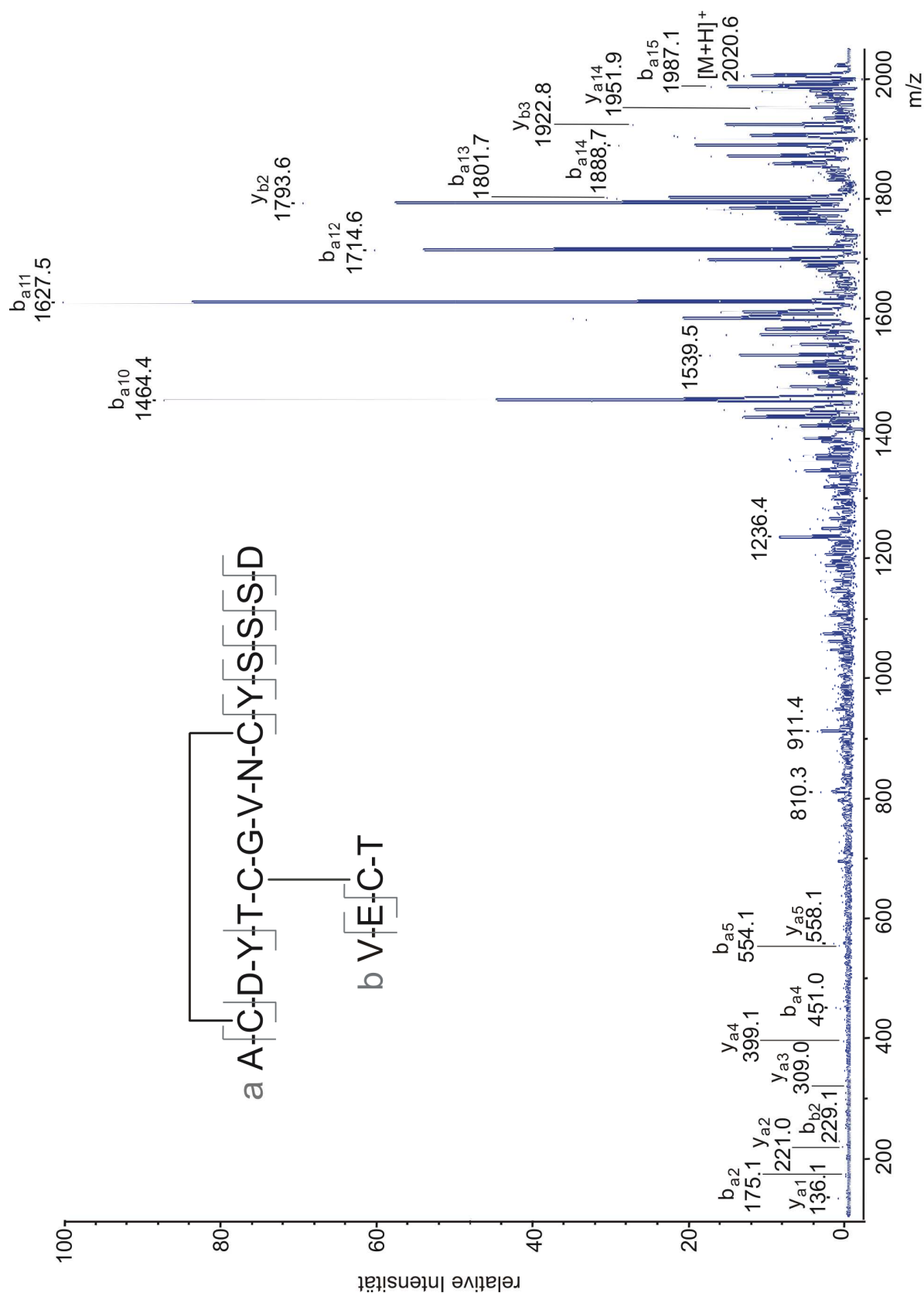


Abb. 8-20 MS/MS-Spektrum der Fragmentierung des Peptidfragmentes der Masse 2020,643 u (Fragment 1-16 + 102-104). Die jeweiligen Fragmentionen sind aufgeführt und der y-Fragmentionenserie, bei der die C-terminalen Fragmentionen entstehen, bzw. der b-Fragmentionenserie, bei der die N-terminalen Fragmentionen entstehen, zugeordnet. Die Aminosäuresequenzabfolge von RNase T1 (S54G/P55N) mit A1-D15 und E102-T104 kann bis auf die große Lücke des ungespaltenen, nicht fragmentierten Ions der Masse 963,40 u (y-Serie) zugeordnet werden. Die Masse von 963,40 u entspricht dem Peptidfragment C10-C2 mit interner Verbrückung von C10 mit dem Fragment E102-C103-T104.

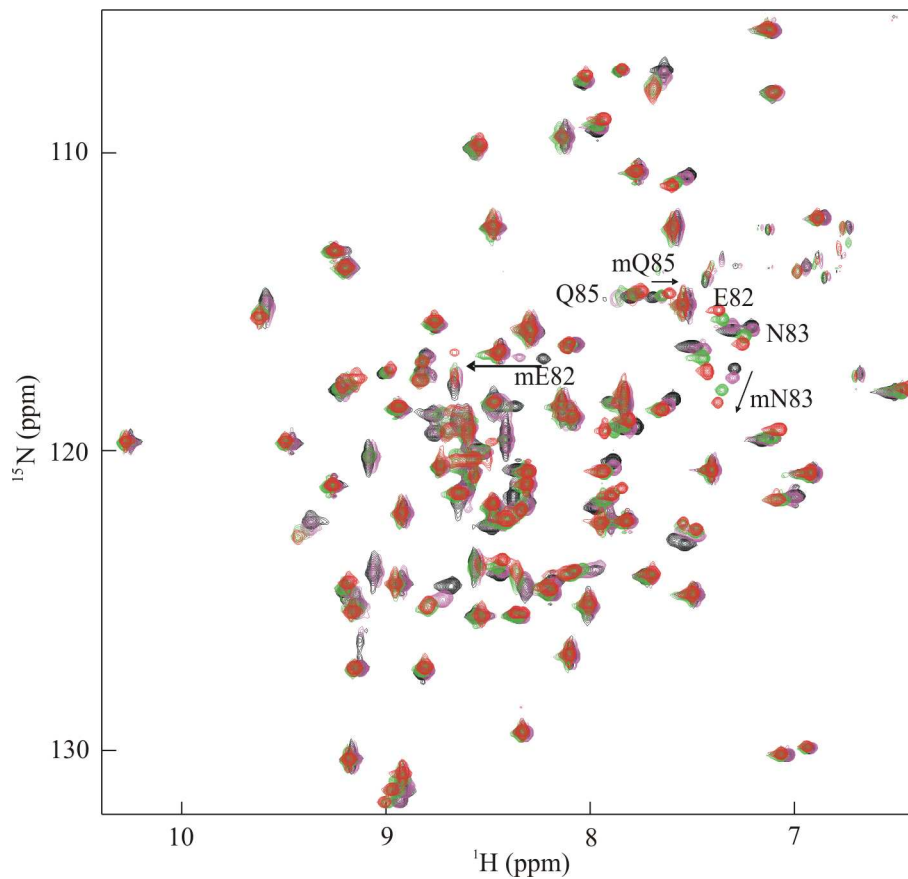


Abb. 8-21 NMR-Titration von ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) mit SlyD*. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -FHSQC-Spektren von 0,4 mM ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) zu verschiedenen Titrationsschritten mit 4,66 mM SlyD* zur Differenzierung der zwei Konformationen. Die entsprechende Zuordnung einiger Kreuzsignale für beide Konformationen (kleines m steht für die *minor* Konformation) ist angezeigt, ebenso die Richtung der Veränderung der chemischen Verschiebung. Konzentrationsverhältnisse ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N)/SlyD*: 1:0 (schwarz), 1:0,33 (magenta), 1:1 (grün) und 1:3 (rot).

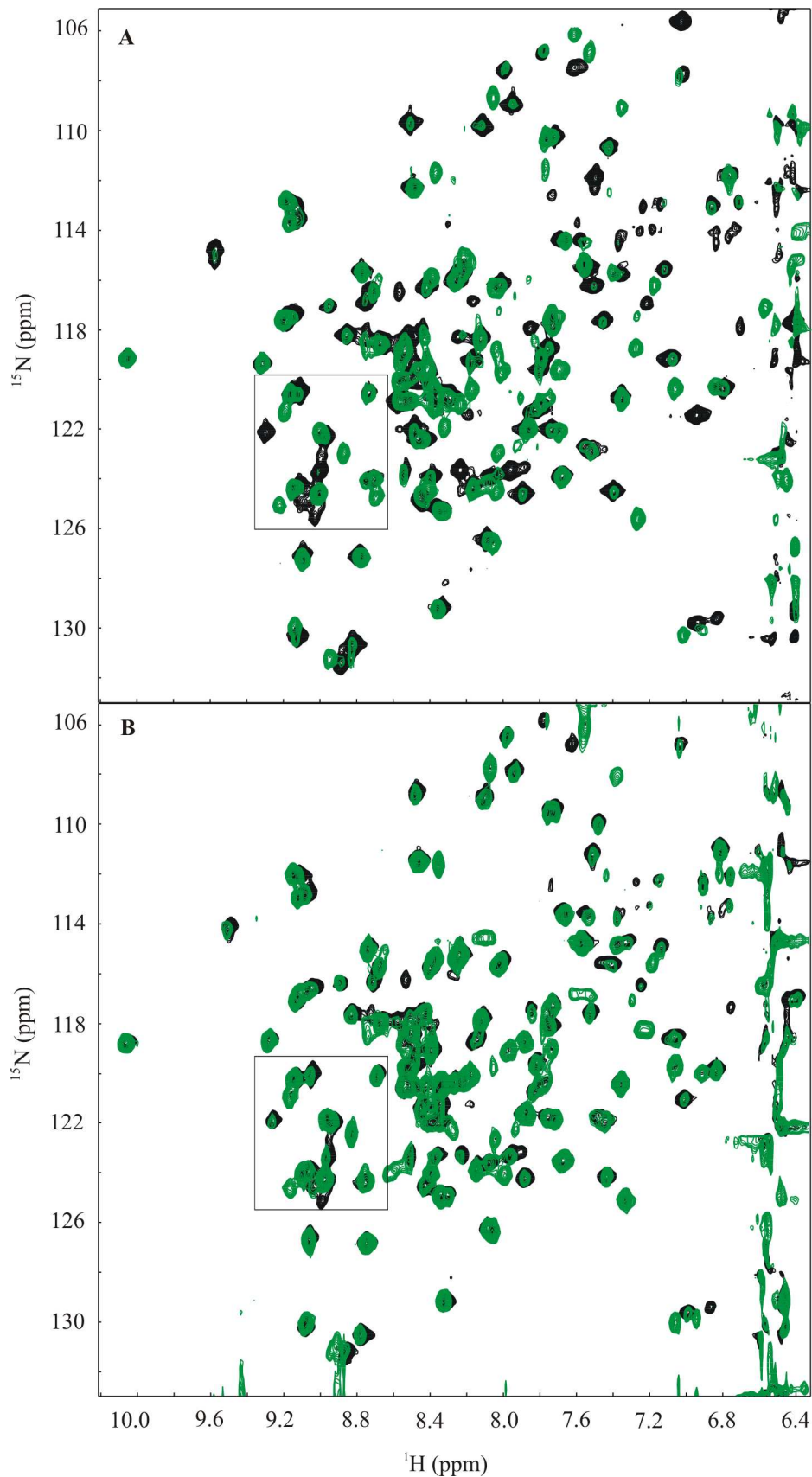


Abb. 8-22 Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N) bei pH 6.0 und 10 °C. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von $875\ \mu\text{M}$ ^{15}N -RNase T1 (S54G/P55N) am Anfang der Rückfaltung (grün: Spektrum vom Intermediat nach 20 Minuten Rückfaltungsdauer) und am Ende (schwarz: Spektrum des nativen Zustandes). **A** Rückfaltung ohne SlyD*. **B** Rückfaltung in Gegenwart von $87,5\ \mu\text{M}$ SlyD*. Der Rahmen gibt jeweils den Bereich an, der in Abb. 3-34 vergrößert dargestellt wurde.

8.2. Tabellen

Tab. 8-1 Stabilitätsparameter aus den harnstoffinduzierten Entfaltungsübergängen von SlyD* für jedes Amidproton. Aufgelistet sind nur die Reste, deren Übergangskurve nach einem Zweizustandsmodell ausgewertet werden konnten. Die Fehler resultieren aus der nichtlinearen Anpassung an Gleichung [2.10]. Daten für Kreuzsignale der entfalteten Spezies sind durchgehend nummeriert.

Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error	Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
2	K	11,2	2,6	5,2	0,8	69	G	24,7	6,4	9,4	2,3
3	V	12,7	3,6	5,1	1,2	73	E	17,6	3,9	7,8	1,4
4	A	15,5	3,2	7,0	1,1	74	N	17,5	3,5	7,3	1,3
5	K	24,6	4,4	10,3	1,7	76	V	13,0	1,9	6,7	0,7
6	D	26,1	4,2	12,3	1,8	77	Q	15,3	1,9	7,6	0,7
7	L	26,4	4,2	11,1	1,6	78	R	15,5	2,8	6,6	0,9
8	V	17,1	2,7	8,5	1,1	79	V	12,8	2,0	6,4	0,7
9	V	27,2	3,8	11,7	1,5	81	K	18,1	3,0	8,4	1,1
10	S	27,8	3,5	13,6	1,6	82	D	20,2	5,3	8,7	2,0
11	L	31,9	4,4	13,7	1,8	84	F	5,2	1,5	2,9	0,7
12	A	15,6	2,8	7,3	1,0	85	M	15,7	3,3	7,0	1,2
13	Y	13,3	2,8	6,3	0,9	87	V	16,6	3,9	7,4	1,4
14	Q	16,3	4,3	7,3	1,5	89	E	22,5	6,0	9,0	2,3
16	R	15,2	3,1	7,1	1,1	91	Q	10,7	2,2	6,4	0,7
17	T	13,3	3,6	5,8	1,1	92	V	10,9	4,2	4,9	1,0
18	E	19,6	3,0	9,0	1,2	99	E	13,0	2,4	6,6	0,8
19	D	15,5	2,5	6,6	0,8	100	T	20,7	5,0	8,7	1,9
20	G	29,6	7,0	12,1	2,7	102	Q	19,6	6,0	8,2	2,2
21	V	15,1	2,5	6,8	0,9	103	G	15,5	4,5	5,7	1,4
22	L	20,0	5,1	8,5	1,9	107	V	7,9	2,0	5,1	0,5
25	E	12,6	2,0	6,9	0,7	109	I	28,1	7,2	12,4	3,0
29	S	13,4	2,3	6,3	0,8	111	A	15,0	4,2	6,4	1,4
30	A	18,1	2,7	7,4	1,0	112	V	23,5	6,1	10,2	2,4
32	L	9,3	1,8	4,9	0,5	113	E	17,3	7,8	6,7	2,6
33	D	18,2	2,6	8,5	1,0	115	D	16,0	4,8	7,5	1,7
36	H	21,7	5,5	9,4	2,1	116	H	8,2	2,4	4,7	0,6
39	G	20,3	3,5	8,6	1,3	117	V	24,1	3,6	11,2	1,5
40	S	19,8	3,8	8,9	1,5	118	V	20,1	3,9	9,2	1,6
41	L	12,4	1,8	6,2	0,6	123	H	11,9	3,7	7,4	1,5
43	S	23,9	3,8	11,0	1,6	126	A	20,6	8,5	7,3	2,8
44	G	13,1	2,0	7,2	0,7	127	G	18,3	3,0	9,4	1,3
46	E	12,8	2,1	7,1	0,8	128	Q	21,8	4,8	9,4	1,9
48	A	20,3	3,0	8,4	1,1	130	L	19,9	6,3	9,3	2,5
49	L	37,8	4,8	16,3	2,0	131	K	12,8	2,3	6,1	0,8
50	E	22,7	5,4	9,2	2,0	132	F	18,7	3,7	8,4	1,4
51	G	16,5	3,1	8,2	1,2	137	V	20,8	5,7	9,2	2,1
52	H	32,0	7,2	13,1	2,8	138	A	20,0	3,3	8,5	1,2
53	E	12,6	2,1	6,4	0,8	139	I	13,5	3,5	5,5	1,1
54	V	16,4	3,4	7,7	1,3	143	T	16,8	2,7	8,1	1,0
55	G	15,7	4,2	7,1	1,4	145	E	16,5	3,3	7,8	1,2
58	F	6,0	2,6	2,7	0,6	146	E	18,7	5,0	8,0	1,9
61	A	19,1	3,4	8,2	1,3	147	L	27,9	3,0	12,3	1,3
62	V	8,6	1,9	5,5	0,5	149	H	11,4	2,8	5,2	0,8
63	G	11,7	1,8	6,0	0,6	153	H	18,8	2,6	9,2	1,1
65	N	15,8	2,9	6,6	1,0	154	G	17,3	2,6	7,4	0,9
67	A	21,7	3,8	9,4	1,5	156	H	19,1	4,6	7,5	1,6

Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
entfaltet					
1		12,1	2,3	5,2	0,8
2		9,8	3,8	3,7	1,1
3		15,3	5,1	5,7	1,7
4		22,1	3,6	8,2	1,2
5		12,8	5,2	4,8	1,6
6		28,4	3,8	10,5	1,4
7		13,2	3,3	5,8	1,2
8		9,1	0,9	3,2	0,2
9		12,7	2,7	4,9	0,9
10		10,7	2,0	4,1	0,7
11		9,8	2,9	3,8	1,0
12		6,4	0,9	2,5	0,2
13		9,5	1,1	3,5	0,3
14		14,8	2,6	6,1	0,9
15		8,0	1,5	3,7	0,5
16		12,8	3,7	5,4	1,3
17		14,9	3,1	6,2	1,1
18		22,8	6,2	9,7	2,2

Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
19		9,6	0,6	3,2	0,2
20		14,2	3,6	5,6	1,0
21		10,5	1,2	3,6	0,3
22		13,1	1,3	5,6	0,5
23		10,6	2,1	4,5	0,7
24		8,7	1,2	4,3	0,4
25		13,5	2,8	5,3	0,9
26		9,5	1,0	3,9	0,3
27		11,4	2,9	4,7	0,8
28		7,6	0,5	3,1	0,1
29		16,9	1,9	6,5	0,7
30		12,8	3,4	5,2	0,9
31		9,0	1,8	4,0	0,5
32		10,3	3,8	4,8	1,1
33		11,5	3,8	4,8	1,0
34		8,8	2,0	4,2	0,5
35		7,4	1,8	3,3	0,5
36		11,7	4,5	4,6	1,8
37		9,3	3,9	4,0	1,0

Tab. 8-2 Stabilitätsparameter aus den harnstoffinduzierten Entfaltungsübergängen von SlyD* in Gegenwart von Ni²⁺ für jedes Amidproton. Aufgelistet sind nur die Reste, deren Übergangskurve nach einem Zweizustandsmodell ausgewertet werden konnten. Die Fehler resultieren aus der nichtlinearen Anpassung an Gleichung [2.10]. Daten für Kreuzsignale der entfalteten Spezies sind durchgehend nummeriert.

Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
4	A	11,5	5,4	5,3	2,0
5	K	29,2	13,4	12,4	5,5
11	L	11,1	0,0	7,1	0,0
12	A	5,5	0,0	6,9	0,0
16	R	22,5	11,0	8,0	3,9
17	T	16,7	7,7	7,2	3,1
18	E	26,5	7,5	12,4	3,4
19	D	8,3	4,0	3,7	1,4
20	G	14,4	5,3	5,3	1,8
21	V	10,0	5,3	3,5	1,8
22	L	24,2	12,3	8,7	4,4
26	S	13,5	3,8	3,9	1,2
28	V	14,5	3,7	7,8	1,7
34	Y	16,9	3,8	4,1	1,1
35	L	10,0	3,8	3,5	1,1
37	G	37,1	5,9	18,7	2,9
40	S	24,5	14,8	22,0	11,9
42	I	12,7	4,3	5,4	1,6
47	T	15,3	9,6	6,1	3,5
48	A	18,7	5,0	7,4	1,9
49	L	12,4	4,3	5,1	1,5
54	V	14,4	5,1	6,7	2,1
55	G	10,0	5,1	3,5	2,1
56	D	10,0	5,1	3,5	2,1
57	K	10,7	1,9	3,4	0,6
60	V	9,6	3,5	4,7	1,3

Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
75	L	24,1	6,3	11,1	2,8
76	V	9,9	6,9	4,8	2,5
81	K	24,0	6,9	11,4	3,2
82	D	20,3	8,9	7,6	3,2
83	V	25,1	4,7	11,6	1,9
84	F	27,1	4,0	13,0	1,9
87	V	21,1	8,6	7,4	3,0
89	E	5,5	3,4	2,3	1,2
93	G	13,4	4,0	5,7	1,5
94	M	5,6	6,0	2,2	1,7
95	R	6,3	2,4	2,2	0,8
97	L	20,4	7,6	9,0	3,1
99	E	20,1	8,2	8,5	3,2
103	G	10,0	4,1	3,5	1,1
105	V	10,6	5,8	6,3	2,6
115	D	30,6	10,3	12,5	4,1
116	H	8,3	4,8	4,7	1,8
117	V	10,0	4,8	3,5	1,8
130	L	19,2	8,5	8,6	3,6
131	K	19,0	7,0	7,9	2,8
134	V	18,9	4,6	17,9	3,8
147	L	15,0	1,8	4,0	0,6
entfaltet					
1		17,3	3,6	5,8	1,1
2		14,9	8,6	5,1	2,8
3		16,9	6,7	5,2	2,0

Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
4		29,3	4,0	7,4	1,0
5		16,9	4,8	4,6	1,4
6		21,2	0,0	4,4	0,0
7		12,7	6,1	2,9	1,6
8		17,1	4,9	4,6	1,3
9		27,4	4,3	9,3	1,4
10		22,1	5,7	5,2	1,5
11		9,0	4,5	2,1	1,4
12		14,8	4,7	4,6	1,3
13		30,5	11,9	5,4	5,1
14		24,5	4,9	6,6	1,4
15		32,0	12,1	8,8	3,5
16		15,1	7,0	3,8	1,9
17		21,4	4,4	5,5	1,2

Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
18		11,5	4,3	2,9	1,2
19		14,8	6,2	4,3	1,6
20		24,2	8,1	6,9	2,3
21		27,6	11,2	8,6	3,3
22		18,8	9,1	5,9	2,6
23		11,8	9,1	3,0	2,5
24		12,2	4,6	2,8	1,3
25		16,0	4,3	4,6	1,2
26		22,5	6,1	6,0	1,7
27		11,4	3,5	2,6	1,1
28		31,8	7,3	8,6	2,0
29		32,3	8,4	8,5	2,3
30		24,9	3,9	7,0	1,0

Tab. 8-3 Stabilitätsparameter aus den harnstoffinduzierten Entfaltungsübergängen von SlyD*ΔIF für jedes Amidproton. Aufgelistet sind nur die Reste, deren Übergangskurve nach einem Zweizustandsmodell ausgewertet werden konnten. Die Fehler resultieren aus der nichtlinearen Anpassung an Gleichung [2.10]. Daten für nicht zugeordnete Kreuzsignale sind gekennzeichnet und fortlaufend nummeriert. Daten für Kreuzsignale der entfalteten Spezies sind durchgehend nummeriert.

Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
3 V		24,1	4,2	9,0	1,6
5 K		17,9	4,2	6,2	1,6
7 L		17,2	3,3	4,9	1,2
10 S		14,8	3,9	5,3	1,6
11 L		10,1	2,4	4,1	1,0
15 V		2,4	5,5	2,2	2,2
17 T		7,4	4,0	2,7	1,9
18 E		12,1	1,9	4,0	0,8
23 V		10,9	3,1	3,8	1,3
24 D		10,0	2,9	3,1	1,3
25 E		18,1	4,9	7,0	2,0
26 S		12,0	3,5	3,1	1,5
28 V		11,4	2,8	3,5	1,3
29 S		15,5	2,9	5,2	1,1
32 L		14,1	2,0	4,4	0,0
33 D		14,8	2,6	5,0	1,0
34 Y		19,9	4,3	6,0	1,6
35 L		11,5	2,9	4,3	1,3
39 G		12,2	3,5	4,2	1,4
41 L		10,1	4,0	2,4	2,5
55 G		15,3	2,8	4,7	1,1
56 D		14,3	3,4	4,1	1,4
59 D		39,6	6,2	10,3	1,8
60 V		16,4	7,9	5,4	3,1
61 A		12,2	3,1	3,4	1,4
131 K		13,8	3,1	4,7	1,2
134 V		12,0	7,0	4,2	2,9
135 E		14,4	3,1	4,7	1,3
136 V		16,9	7,6	4,3	3,2
140 R		14,4	2,5	5,1	1,0
141 E		15,2	2,8	4,7	1,1

Position	Amino- säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
144 E		14,7	4,1	6,1	1,7
145 E		14,4	2,7	4,2	1,0
146 E		8,7	3,0	3,0	1,2
147 L		10,5	2,4	3,0	1,1
148 A		14,0	2,3	4,7	0,9
154 G		18,8	2,7	7,0	1,1
nicht zugeordnet					
1		14,6	3,3	5,7	1,4
2		9,9	5,4	4,0	2,3
3		14,4	3,7	4,8	1,4
4		11,0	4,7	3,0	2,1
5		11,6	2,4	3,9	1,0
6		18,8	6,6	5,6	2,3
7		11,0	3,2	4,1	1,3
8		20,6	8,4	7,1	3,1
9		9,6	6,5	2,3	2,3
10		12,3	4,4	5,3	2,2
11		10,2	2,4	3,0	1,2
12		10,3	3,2	4,2	1,4
13		17,7	3,2	4,6	1,1
14		11,9	5,2	5,3	2,3
15		13,9	1,4	3,9	4,4
16		7,5	6,1	4,1	2,6
17		16,4	4,5	5,8	1,8
18		17,0	4,4	5,9	1,8
entfaltet					
1		13,5	2,0	4,1	0,8
2		15,1	3,2	4,6	1,2
3		13,9	8,1	6,0	3,2
4		10,9	3,5	3,4	1,4
5		16,3	3,8	4,3	1,4

Position	Amino säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
6		18,2	3,9	5,6	1,4
7		13,0	3,6	4,1	1,4
8		14,8	2,9	4,6	1,1
9		10,1	6,1	4,2	2,2
10		12,2	2,9	4,0	1,1
11		17,5	3,0	5,4	1,1
12		22,3	7,0	6,6	2,2
13		15,4	3,5	4,5	1,2
14		14,1	5,4	4,4	1,8
15		5,6	10,2	3,2	3,0
16		30,7	9,9	8,9	3,0
17		19,6	18,5	7,0	6,7
18		27,8	8,7	8,8	2,8

Position	Amino säure	ΔG [kJ/mol]	error	m [kJ/(mol·M)]	error
19		6,6	17,0	3,8	4,9
20		17,3	5,3	5,3	1,8
21		9,4	6,1	2,7	1,9
22		11,0	1,1	3,1	3,7
23		21,1	5,0	6,2	1,5
24		22,6	11,7	6,8	3,6
25		23,4	4,5	7,3	1,4
26		19,4	9,6	6,1	2,8
27		16,1	11,6	4,9	3,3
28		17,4	5,2	4,7	1,6
29		11,8	19,4	3,3	5,5
30		15,6	7,1	5,0	2,6

Tab. 8-4 Stabilitätsparameter von SlyD* aus dem H/D-Austauschexperiment bei 0 M Harnstoff. Die Anpassung der Kreuzsignalvolumina im Verlauf der Zeit an eine monoexponentielle Funktion zur Bestimmung der Austauschraten liefern die aufgeführten Fehler. Aufgelistet sind nur Reste, deren Austausch verfolgt werden konnte. k_{ex} ist die Austauschrate, P steht für Schutzfaktor.

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
3	V	0,0108	72700	26,8	23,3
4	A	0,0162	129000	28,2	12,2
6	D	0,0053	364000	30,7	19,1
7	L	0,0114	44800	25,7	22,6
8	V	0,0360	9990	22,1	7,0
9	V	0,0066	64800	26,5	52,7
10	S	0,0318	156000	28,7	5,3
11	L	0,0055	279000	30,1	9,8
12	A	0,0052	345000	30,6	6,9
13	Y	0,3000	5250	20,5	4,4
14	Q	0,0450	83600	27,2	4,4
15	V	0,0390	23500	24,1	3,4
16	R	0,0304	83000	27,2	6,1
17	T	0,2770	15000	23,1	2,9
21	V	0,7200	1190	17,0	8,1
23	V	0,1680	2120	18,4	7,9
25	E	0,0985	6140	20,9	6,5
32	L	0,0840	5450	20,6	2,9
34	Y	0,0072	146000	28,5	7,5
36	H	0,0138	284000	30,1	20,0
43	S	0,0660	58400	26,3	17,3
45	L	0,0900	12400	22,6	3,0
48	A	0,5506	8390	21,6	5,9
49	L	0,0198	39200	25,4	4,8
50	E	0,4980	1130	16,9	8,0
52	H	0,0150	618000	31,9	8,0
53	E	0,0840	29400	24,7	2,8
54	V	0,2100	1950	18,2	3,4

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
55	G	0,1500	25600	24,3	3,4
56	D	0,3000	7310	21,3	3,8
58	F	0,0473	47200	25,8	17,0
60	V	0,0064	59900	26,4	17,8
62	V	0,4860	1190	17,0	5,7
76	V	0,5760	620	15,4	19,8
83	V	0,0374	10300	22,1	30,5
99	E	0,1020	9060	21,9	15,3
113	E	0,1200	5600	20,7	19,0
116	H	0,0276	151000	28,6	50,0
122	N	0,0420	319000	30,4	7,1
129	N	0,0342	417000	31,0	31,6
130	L	0,0760	21300	23,9	3,1
131	K	0,0258	63400	26,5	4,7
132	F	0,0693	32200	24,9	3,4
133	N	0,0960	111000	27,8	3,6
134	V	0,0149	81000	27,1	7,6
135	E	0,0180	36900	25,2	16,7
136	V	0,0067	61400	26,4	25,9
137	V	0,0072	60800	26,4	10,8
138	A	0,0066	332000	30,5	6,4
140	R	0,0047	432000	31,1	19,0
142	A	0,0600	34000	25,0	3,3
143	T	0,3060	8140	21,6	6,3
146	E	0,4147	1570	17,6	7,4
147	L	0,2058	2680	18,9	3,4

Tab. 8-5. Stabilitätsparameter von SlyD* aus dem H/D-Austauschexperiment bei 0,62 M Harnstoff. Die Anpassung der Kreuzsignalvolumina im Verlauf der Zeit an eine monoexponentielle Funktion zur Bestimmung der Austauschraten liefern die aufgeführten Fehler. Aufgelistet sind nur Reste, deren Austausch verfolgt werden konnte. k_{ex} ist die Austauschrate, P steht für Schutzfaktor.

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]	Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
3	V	0,101	7580	21,4	6,6	54	V	0,417	988	16,5	6,1
4	A	0,113	18600	23,6	4,8	55	G	0,301	13000	22,7	9,0
6	D	0,097	20000	23,7	7,6	56	D	0,513	4250	20,0	5,9
7	L	0,050	10200	22,1	29,7	58	F	0,090	24900	24,3	2,2
8	V	0,082	4360	20,1	3,7	60	V	0,075	5100	20,5	4,0
9	V	0,065	6420	21,0	6,2	62	V	0,859	674	15,6	9,2
10	S	0,097	51000	26,0	2,8	76	V	2,299	155	12,1	48,1
11	L	0,079	19500	23,7	6,0	130	L	0,221	7320	21,3	3,9
12	A	0,085	21100	23,9	4,6	131	K	0,102	16000	23,2	2,8
13	Y	0,607	2580	18,8	7,5	132	F	0,210	10600	22,2	7,8
14	Q	0,129	29000	24,6	6,1	133	N	0,181	57500	26,3	4,7
15	V	0,151	6100	20,9	3,9	134	V	0,088	13800	22,9	2,4
16	R	0,122	20700	23,8	5,0	135	E	0,082	8080	21,6	4,2
17	T	0,617	6730	21,1	7,2	136	V	0,064	6480	21,0	5,2
21	V	1,647	520	15,0	11,9	137	V	0,075	5580	20,7	7,6
23	V	0,477	749	15,9	11,1	138	A	0,070	30200	24,7	5,2
32	L	0,234	1900	18,1	6,2	140	R	0,072	28500	24,6	5,4
34	Y	0,084	12300	22,6	17,5	142	A	0,195	10600	22,2	5,0
36	H	0,110	35500	25,1	6,5	143	T	0,604	4140	20,0	15,2
45	L	0,211	5420	20,6	5,7	146	E	1,066	609	15,4	15,1
48	A	1,074	4300	20,1	9,0	147	L	0,521	1060	16,7	8,5
49	L	0,087	8920	21,8	3,1						
50	E	1,075	523	15,0	9,7						
52	H	0,092	102000	27,6	3,1						
53	E	0,244	10100	22,1	6,2						

Tab. 8-6. Stabilitätsparameter von SlyD* aus dem H/D-Austauschexperiment bei 1,66 M Harnstoff. Die Anpassung der Kreuzsignalvolumina im Verlauf der Zeit an eine monoexponentielle Funktion zur Bestimmung der Austauschraten liefern die aufgeführten Fehler. Aufgelistet sind nur Reste, deren Austausch verfolgt werden konnte. k_{ex} ist die Austauschrate, P steht für Schutzfaktor.

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]	Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
3	V	0,036	21000	23,9	10,1	34	Y	0,040	25700	24,3	10,7
4	A	0,043	49100	25,9	5,1	36	H	0,056	70000	26,8	7,1
6	D	0,055	35500	25,1	10,3	45	L	0,130	9090	21,9	5,4
7	L	0,034	15200	23,1	6,0	48	A	0,595	7770	21,5	6,9
8	V	0,049	7220	21,3	6,2	49	L	0,037	21200	23,9	5,7
9	V	0,039	10700	22,2	12,6	50	E	0,570	992	16,5	7,3
10	S	0,046	109000	27,8	3,7	52	H	0,037	251000	29,8	4,2
11	L	0,029	52700	26,0	11,6	54	V	0,210	1980	18,2	3,7
12	A	0,038	47300	25,8	5,0	56	D	0,280	7720	21,5	3,4
13	Y	0,310	5130	20,5	6,9	58	F	0,039	56900	26,3	2,9
14	Q	0,066	56700	26,3	11,3	60	V	0,040	9610	22,0	5,3
15	V	0,026	35600	25,1	36,8	62	V	0,760	759	15,9	6,7
16	R	0,068	37100	25,2	5,1	130	L	0,089	18200	23,5	3,3
17	T	0,322	12900	22,7	4,2	131	K	0,044	37100	25,2	2,0
21	V	1,000	857	16,2	6,2	132	F	0,105	21200	23,9	6,0
23	V	0,190	1850	18,0	7,1	133	N	0,098	106000	27,8	4,1
32	L	0,094	4720	20,3	4,6	134	V	0,061	20000	23,7	2,7

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
135	E	0,048	13700	22,8	5,2
136	V	0,028	14900	23,0	8,7
138	A	0,035	59700	26,4	7,2
140	R	0,041	50000	25,9	7,1

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
142	A	0,091	22800	24,0	4,2
143	T	0,290	8700	21,7	12,4
146	E	0,348	1870	18,0	10,7
147	L	0,137	4010	19,9	5,1

Tab. 8-7 Stabilitätsparameter von SlyD* aus dem H/D-Austauschexperiment bei 1,07 M Harnstoff. Die Anpassung der Kreuzsignalvolumina im Verlauf der Zeit an eine monoexponentielle Funktion zur Bestimmung der Austauschraten liefern die aufgeführten Fehler. Aufgelistet sind nur Reste, deren Austausch verfolgt werden konnte. k_{ex} ist die Austauschrate, P steht für Schutzfaktor.

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
3	V	0,51	1500,00	17,54	6,95
4	A	0,60	3520,00	19,59	7,56
6	D	0,44	4430,00	20,14	13,89
7	L	0,44	1160,00	16,91	7,04
8	V	0,50	712,00	15,74	4,93
9	V	0,39	1080,00	16,75	10,69
10	S	0,49	10200,00	22,11	4,52
11	L	0,41	3790,00	19,76	10,44
12	A	0,48	3760,00	19,72	8,94
13	Y	1,27	1240,00	17,08	10,03
14	Q	0,60	6310,00	20,98	10,65
15	V	0,86	1070,00	16,75	9,26
16	R	0,51	4920,00	20,39	8,54
17	T	1,27	3270,00	19,38	10,50
21	V	1,99	431,00	14,53	14,22
23	V	0,93	383,00	14,24	12,46
32	L	0,62	723,00	15,78	9,93
34	Y	0,44	2370,00	18,63	8,14
36	H	0,49	7870,00	21,52	10,98
45	L	0,74	1540,00	17,58	10,17
48	A	1,43	3240,00	19,38	12,37
49	L	0,45	1730,00	17,88	4,93

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
50	E	2,34	240,00	13,15	22,67
52	H	0,49	19100,00	23,61	5,89
53	E	0,65	3780,00	19,76	9,12
54	V	0,45	919,00	16,37	11,36
55	G	0,75	5200,00	20,52	15,07
56	D	0,90	2420,00	18,67	8,44
62	V	1,75	332,00	13,90	16,03
130	L	0,74	6890,00	21,19	6,92
131	K	0,52	2180,00	18,42	3,64
132	F	0,61	3180,00	19,34	10,18
133	N	0,69	3690,00	19,68	5,78
134	V	0,49	15100,00	23,07	5,95
135	E	0,63	2460,00	18,72	7,62
136	V	0,39	1050,00	16,66	9,68
137	V	0,41	1060,00	16,71	12,00
138	A	0,51	1010,00	16,58	8,36
140	R	0,46	4460,00	20,14	7,29
142	A	0,72	2890,00	19,09	7,75
143	T	1,45	1730,00	17,88	24,30
146	E	1,60	405,00	14,40	17,56
147	L	1,39	397,00	14,32	15,22

Tab. 8-8 Stabilitätsparameter von SlyD* aus dem Amidprotonenaustauschexperiment New MEXICO. Die Anpassung der Kreuzsignalvolumina im Verlauf der Zeit an eine monoexponentielle Funktion zur Bestimmung der Austauschraten liefern die aufgeführten Fehler. k_{ex} bezeichnet die Austauschrate und P den Schutzfaktor. Aufgelistet sind nur die Reste, die mittels New MEXICO detektierbar waren und sich im EX2-Regime befanden.

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
2	K	6,37	278,00	13,5	15,0
18	E	7,71	2,32	0,7	24,3
19	D	9,71	1,34	2,6	10,6
29	S	5,14	12,00	0,8	31,2
33	D	6,59	1,71	-	20,8
34	Y	23,54	0,55	2,9	21,1
35	L	8,29	1,30	8,0	20,8
37	G	4,35	4,47	3,0	20,8
39	G	6,34	28,70	6,8	24,2
40	S	6,99	18,00	2,8	13,9
43	S	11,87	4,21	0,9	24,8

Position	Amino- säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
47	T	9,07	2,44	0,1	19,7
58	F	22,39	1,24	-	12,0
82	D	11,77	2,05	4,1	17,8
83	V	6,06	0,79	0,2	22,3
86	G	13,44	6,42	-	4,8
87	V	5,11	2,08	1,3	13,6
88	D	16,19	0,82	2,4	7,9
89	E	4,75	1,58	0,7	20,9
95	R	14,90	3,73	-	8,2
96	F	19,89	1,75	0,2	16,8
97	L	16,13	0,69	3,5	25,7

Position	Amino säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
100	T	11,54	1,92	2,6	9,2
101	D	23,51	1,23	8,2	5,3
102	Q	7,01	3,93	-	14,7
103	E	3,41	31,10	-	44,7
114	D	14,74	0,88	-	12,1
115	D	19,95	0,61	4,4	7,5
119	V	31,73	0,16	-	7,7
128	Q	8,60	7,14	3,0	14,0
153	H	12,75	4,45	4,3	27,0
154	G	12,40	14,70	3,8	6,9

Position	Amino säure	k_{ex} [h ⁻¹]	P	ΔG [kJ/mol]	error [%]
155	A	7,76	6,89	4,4	6,6
156	H	13,42	5,84	2,4	8,8
157	D	6,72	7,40	4,8	7,3
161	D	13,41	3,71	3,3	8,5
162	H	6,11	8,51	3,7	7,5
163	D	9,97	4,98	1,7	4,7
164	H	9,07	5,73	-	2,3
165	D	16,40	3,03	-	2,8
166	H	1,70	0,49	-	86,9

Tab. 8-9 Zuordnung (¹H, ¹⁵N, ¹³C^α, ¹³C^β) für RNase T1 (S54G/P55N) in 10 mM Bis-Tris, pH^{25 °C} 6.0 bei 25 °C. ^a Jeweilige Kreuzsignale nur über das HNCA zugeordnet. *minor* bezeichnet die zweite Konformation.

Nr.	Amino- säure	¹ H	¹⁵ N	¹³ C ^α	¹³ C ^β
1	A	n.a.	n.a.	49,159	16,739
2	C	8,437	119,330	52,625	41,179
3	D	8,350	129,104	55,579	38,057
4	Y	8,313	115,599	54,965	40,039
5	T	9,297	120,913	59,496	66,592
6	C	8,845	127,104	48,274	38,040
7	G	9,244	117,613	45,156	
8	S	8,941	124,131	55,790	61,387
9	N	7,927	122,085	50,273	36,281
10	C	8,213	124,515	52,352	42,598
11	Y	9,160	126,939	54,271	39,479
12	S	9,507	119,515	53,988	64,751
13	S	10,287	119,449	60,307	60,169
14	S	8,160	118,230	58,848	59,784
15	D	8,122	126,535	55,550	38,360
16	V	7,847	122,078	64,185	29,165
17	S	8,468	116,401	59,312	59,956
18	T	8,336	120,877	64,265	66,264
19	A	7,521	124,522	53,391	15,973
20	Q	8,975	118,323	57,149	26,127
21	A	7,864	118,926	52,432	15,413
22	A	6,942	120,456	51,792	16,452
23	G	7,147	105,659	43,077	
24	Y	8,469	123,801	60,188	34,922
25	K	7,153	119,330	56,510	29,325
26	L	6,522	117,692	56,241	38,040
27	H	7,496	116,268	56,233	24,608
28	E	8,410	121,561	56,110	26,607
29	D	7,644	118,091	51,792	37,640
30	G	7,557	110,474	43,877	
31	E	7,920	120,218	52,192	31,404
32	T	7,988	108,931	57,309	71,100
33	V	9,616	114,686	58,189	34,042
34	G	8,596	109,547	41,718	
35	S	9,106	119,880	58,908	60,108
36	N	8,445	118,310	49,953	36,121

Nr.	Amino- säure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\beta$
37	S	7,604	112,096	56,350	58,509
38	Y	8,668	121,197	54,820	27,086
39	P				
40	H	7,974	114,764	50,653 ^a	n.a.
41	K	9,156	126,151	55,381 ^a	n.a.
42	Y	8,557	128,857	53,256 ^a	n.a.
43	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
44	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
45	Y	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
46	E	8,807	118,470	56,989	25,727
47	G	7,133	107,628	43,637	
48	F	8,213	121,503	54,991	34,922
49	D	8,728	124,482	50,113	36,681
50	F	7,539	122,706	52,360	36,956
51	S	9,255	117,686	56,910	61,067
52	V	6,891	111,964	55,870	31,724
53	S	8,760	120,290	56,190	62,107
54	G	8,052	107,356	39,479	
55	N	7,819	118,886	51,632	37,800
56	Y	8,492	118,111	53,232	38,622
57	Y	8,675	118,760	54,591	39,486
58	E	8,712	117,547	51,113	30,444
59	W	8,350	124,257	50,273	32,523
60	P			60,667	28,925
61	I	7,030	121,291	55,950	38,600
62	L	8,043	124,999	50,673	40,119
63	S	8,941	121,793	58,109	59,708
64	S	7,552	114,779	56,110	61,387
65	G	7,793	110,368	42,678	
66		7,429	120,343	51,313	38,84
67	V	8,491	121,568	60,028	30,045
68	Y	9,194	129,918	58,669	34,442
69	S	8,106	118,615	54,351	61,547
70	G	n.a.	n.a.	42,358	
71	G	8,149	109,183	41,318	
72	S	9,092	123,807	54,511	60,428
73	P			61,227	29,725
74	G	7,672	106,959	42,997	
75	A	8,585	125,217	51,313	19,011
76	D	8,631	118,840	51,952	39,719
77	R	9,406	122,157	50,753	29,885
78	V	8,851	117,057	58,189	31,484
79	V	8,221	124,111	57,069	29,725
80	F	8,002	123,677	51,171	40,205
81	N	8,624	120,448	47,715	39,479
82	E	7,327	115,606	55,790	28,925
83	N	7,239	115,593	49,634	36,521
84	N	8,103	116,136	50,839	32,443
85	Q	7,829	114,526	51,153	27,726
86	L	8,391	125,236	53,278	38,962
87	A	8,973	131,409	49,474	15,733
88	G	7,070	129,859	42,438	
89	V	7,992	121,593	59,247	31,503

Nr.	Amino- säure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\beta$
90	I	8,593	119,694	57,309	39,639
91	T	9,296	112,977	57,096	66,664
92	H	9,179	124,813	53,711	27,006
93	T	9,233	124,423	62,576	64,675
94	G	8,777	115,493	42,518	
95	A	7,744	123,899	47,955	19,091
96	S	8,322	115,765	54,991	61,707
97	G	8,488	112,235	44,357	
98	N	8,589	123,449	49,794	36,041
99	N	7,856	118,164	51,073	37,560
100	F	8,787	119,085	55,310	41,638
101	V	9,230	113,613	57,869	33,003
102	E	8,655	121,079	55,071	27,006
103	C	8,486	122,144	55,950	43,077
104	T	8,366	120,366	60,827	68,343
	{Wsc}	8,957	130,991		
<i>minor</i>					
25	K	7,180	119,357	56,525	29,383
27	H	7,506	116,268	56,233	24,608
50	F	7,592	122,485	52,432	37,027
51	S	9,036	117,109	57,309	61,067
52	V	6,981	113,613	57,069	31,564
53	S	8,600	120,457	54,831	62,586
54	G	7,881	106,985	41,638	
55	N	8,367	118,266	52,032	n.a.
78	V	8,831	116,513	58,029	31,484
79	V	8,112	123,721	57,069	29,885
80	F	7,948	123,474	51,158	40,116
81	N	8,569	119,767	47,955	38,28
82	E	8,315	116,619	56,190	28,206
83	N	7,330	117,070	49,794	36,521
84	N	8,099	116,116	50,753	32,443
85	Q	7,712	114,552	51,153	27,886
86	L	8,370	125,270	53,354	39,000
87	A	8,956	131,091	49,474	15,733
88	G	6,956	129,614	42,358	
89	V	7,947	121,408	59,232	31,453

Tab. 8-10 Zuordnung (^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$) für RNase T1 (S54G/P55N) in 10 mM Bis-Tris, 0,6 M GdmCl, pH^{10 °C} 6.0 bei 10 °C. ^a Jeweilige Kreuzsignale nur über das HNCA zugeordnet. *minor* bezeichnet die zweite Konformation.

Nr.	Amino- säure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\beta$
1	A	n.a.	n.a.	48,948	16,653
2	C	8,435	119,537	52,721	41,146
3	D	8,365	129,177	55,272	37,615
4	Y	8,238	115,624	54,781	39,871
5	T	9,179	120,581	59,195	66,455
6	C	8,812	127,096	48,111	38,004
7	G	9,179	117,359	44,072	
8	S	9,041	124,567	55,762	61,157
9	N	7,898	121,969	49,975	36,241

Nr.	Amino- säure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\beta$
10	C	8,191	124,292	52,329	42,322
11	Y	9,117	127,007	54,193	39,184
12	S	9,334	119,318	53,604	64,591
13	S	10,083	119,108	60,276	
14	S	8,144	118,315	58,607	59,686
15	D	8,113	126,416	55,272	38,105
16	V	7,761	122,001	64,002	29,08
17	S	8,441	116,271	58,999	59,686
18	T	8,311	120,711	64,100	66,160
19	A	7,417	124,470	53,212	15,739
20	Q	8,877	118,128	56,939	26,039
21	A	7,795	119,076	52,232	15,347
22	A	6,817	120,355	51,544	16,230
23	G	7,050	105,605	43,010	
24	Y	8,408	123,855	54,770	60,078
25	K	7,097	119,100	56,547	29,375
26	L	6,436	117,673	56,056	38,070
27	H	7,538	116,207	56,155	24,372
28	E	8,381	120,703	55,468	26,137
29	D	7,473	117,594	51,054	37,026
30	G	7,445	110,635	43,893	
31	E	7,821	119,594	51,740	30,944
32	T	7,972	108,956	57,135	71,163
33	V	9,595	114,766	58,116	34,038
34	G	8,533	109,654	41,440	
35	S	9,131	120,411	58,803	59,882
36	N	8,548	118,379	49,778	35,849
37	S	7,516	111,874	56,155	58,411
38	Y	8,572	120,857	54,781	26,628
39	P				
40	H	7,756	112,563	n.a.	n.a.
41	K	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
42	Y	8,343	128,165	n.a.	n.a.
43	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
44	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
45	Y	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
46	E	8,769	118,315	56,284 ^a	n.a.
47	G	7,040	107,743	43,598	
48	F	8,214	121,415	54,585	34,770
49	D	8,736	124,033	49,680	35,849
50	F	7,541	122,932	52,035	36,536
51	S	9,208	117,659	56,841	60,765
52	V	6,787	111,768	55,664	31,729
53	S	8,759	120,533	56,056	61,943
54	G	8,016	107,596	39,184	
55	N	7,776	118,679	51,446	37,615
56	Y	8,469	117,999	53,114	38,203
57	Y	8,673	118,533	n.a.	n.a.
58	E	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
59	W	8,258	123,644	50,171	n.a.
60	P			60,741	28,688
61	I	6,966	121,439	55,664	38,400
62	L	7,919	124,608	50,465	40,067

Nr.	Amino- säure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\beta$
63	S	8,997	122,316	58,116	59,392
64	S	7,564	115,478	55,958	61,354
65	G	7,741	110,222	42,225	
66	D	7,377	120,751	51,054	38,105
67	V	8,511	121,998	60,176	29,865
68	Y	9,142	130,294	58,411	34,181
69	S	8,193	119,205	54,095	61,354
70	G	n.a.	n.a.	41,188	
71	G	8,136	109,841	41,998	
72	S	9,029	123,677	54,389	60,275
73	P				
74	G	7,632	107,467	42,912	
75	A	8,475	124,762	51,054	18,878
76	D	8,562	118,784	51,838	39,282
77	R	9,320	122,106	50,563	29,473
78	V	8,773	116,919	57,920	31,336
79	V	8,096	123,928	56,939	29,669
80	F	7,909	123,491	50,857	40,067
81	N	8,473	120,144	47,424	39,282
82	E	7,379	115,737	55,566	28,786
83	N	7,141	115,559	49,386	36,241
84	N	8,037	116,126	50,563	32,219
85	Q	7,714	114,353	50,955	27,609
86	L	8,388	125,142	53,114	38,792
87	A	8,902	131,314	49,288	15,445
88	G	6,967	129,816	42,225	
89	V	7,851	121,245	58,999	31,401
90	I	8,545	119,901	57,037	39,380
91	T	9,181	112,879	56,841	66,455
92	H	9,093	124,802	53,702	n.a.
93	T	9,135	124,252	62,443	64,493
94	G	8,797	115,632	42,225	
95	A	7,701	123,863	47,620	19,075
96	S	8,286	115,964	54,683	61,648
97	G	8,518	112,245	44,187	
98	N	8,558	123,661	49,496	n.a.
99	N	7,756	117,796	50,563	37,320
100	F	8,690	118,452	55,272	41,538
101	V	9,147	113,559	57,626	32,808
102	E	8,587	120,905	54,781	26,628
103	C	8,449	122,387	55,762	42,912
104	T	8,357	120,622	60,569	68,024
	Wsc	8,846	130,682		
<i>minor</i>					
25	K	7,130	119,181	56,598	29,3118
27	H	7,538	116,207	56,155	24,372
50	F	7,579	122,689	52,156	36,737
51	S	8,972	117,027	57,332	60,765
52	V	6,885	113,033	56,841	31,631
53	S	8,507	119,326	54,585 ^a	n.a.
54	G	7,807	106,860	41,440	n.a.
55	N	8,267	118,242	50,073	36,928
78	V	8,747	116,336	57,920	31,268

Nr.	Amino- säure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\beta$
79	V	7,985	123,628	57,037	29,865
80	F	7,856	123,296	n.a.	n.a.
81	N	8,520	119,934	48,013	38,309
82	E	8,185	116,846	56,056	28,001
83	N	7,238	116,911	49,548	36,159
84	N	8,041	116,126	50,563	32,029
85	Q	7,603	114,393	50,857	27,707
86	L	8,355	125,199	53,116	38,615
87	A	8,915	131,419	49,680	15,427
88	G	6,854	129,606	42,225	
89	V	7,799	121,043	58,946	31,311

Tab. 8-11 Zuordnung (^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$) für das Faltungsintermediat von RNase T1 (S54G/P55N) in 10 mM Bis-Tris, 0,6 M GdmCl, pH 10 6.0 bei 10 °C. *minor* bezeichnet die zweite Konformation.

Nr.	Amino- säure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$
1	A	n.a.	n.a.	48,687
2	C	8,413	119,451	52,429
3	D	8,359	129,190	54,955
4	Y	8,216	115,602	54,487
5	T	9,161	120,482	58,978
6	C	8,776	127,106	47,798
7	G	9,196	117,548	44,758
8	S	9,002	124,558	55,452
9	N	7,859	121,940	49,835
10	C	8,164	124,387	52,053
11	Y	9,093	127,163	53,949
12	S	9,312	119,252	53,413
13	S	10,043	119,070	59,923
14	S	8,125	118,370	58,385
15	D	8,050	126,503	55,022
16	V	7,691	122,080	63,643
17	S	8,391	115,871	58,814
18	T	8,174	120,423	64,037
19	A	7,266	125,543	52,840
20	Q	8,676	118,544	56,382
21	A	8,009	119,663	51,982
22	A	7,063	120,256	51,642
23	G	7,615	106,089	42,789
24	Y	8,694	124,643	60,245
25	K	7,278	118,615	56,525
26	L	6,574	117,103	54,343
27	H	n.a.	n.a.	n.a.
28	E	n.a.	n.a.	n.a.
29	D	7,734	117,348	51,266
30	G	7,359	109,057	43,182
31	E	7,696	119,577	52,840
32	T	n.a.	n.a.	n.a.
33	V	9,415	114,118	58,385
34	G	8,368	111,685	43,325
35	S	n.a.	n.a.	n.a.
36	N	n.a.	n.a.	n.a.
37	S	n.a.	n.a.	n.a.

Nr.	Amino- säure	$^{\text{N}}\text{H}$	^{15}N	$^{13}\text{C}^{\alpha}$
38	Y	n.a.	n.a.	n.a.
39	P			
40	H	n.a.	n.a.	n.a.
41	K	n.a.	n.a.	n.a.
42	Y	n.a.	n.a.	
43	N	n.a.	n.a.	n.a.
44	N	n.a.	n.a.	n.a.
45	Y	n.a.	n.a.	n.a.
46	E	8,756	118,424	56,382
47	G	n.a.	n.a.	
48	F	n.a.	n.a.	54,45
49	D	8,754	124,012	49,514
50	F	7,519	122,840	51,839
51	S	9,166	117,434	56,560
52	V	6,769	111,890	55,452
53	S	8,734	120,473	55,774
54	G	7,980	107,496	39,029
55	N	7,790	119,168	51,191
56	Y	8,433	118,208	52,948
57	Y	n.a.	n.a.	n.a.
58	E	n.a.	n.a.	n.a.
59	W	n.a.	n.a.	n.a.
60	P			60,817
61	I	6,849	120,243	55,380
62	L	8,036	124,435	50,336
63	S	8,999	122,121	57,920
64	S	7,559	115,285	55,774
65	G	7,767	110,236	42,073
66	D	7,349	120,756	50,766
67	V	8,482	122,142	59,923
68	Y	9,139	129,849	57,455
69	S	8,241	120,957	53,806
70	G	n.a.	n.a.	41,429
71	G	8,057	108,707	40,893
72	S	8,871	122,954	54,20
73	P			
74	G	7,533	106,861	42,502
75	A	8,410	124,411	51,016
76	D	8,551	119,038	51,517
77	R	9,189	121,278	50,515
78	V	8,708	116,481	57,526
79	V	8,035	122,954	56,847
80	F	8,034	123,719	n.a.
81	N	8,457	119,613	47,260
82	E	7,404	115,659	55,38
83	N	7,180	116,156	49,227
84	N	8,045	116,262	50,372
85	Q	7,660	114,406	50,587
86	L	8,347	125,254	52,948
87	A	8,946	131,095	48,977
88	G	7,018	128,824	41,930
89	V	7,795	120,876	58,743
90	I	8,572	120,041	56,847
91	T	9,189	112,747	56,596
92	H	9,219	125,011	53,305

Nr.	Amino- säure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$
93	T	9,149	124,368	62,284
94	G	8,770	115,659	42,073
95	A	7,681	123,833	47,403
96	S	8,256	115,985	54,414
97	G	8,483	112,324	44,041
98	N	n.a.	n.a.	51,982
99	N??	7,729	117,711	50,479
100	F	n.a.	n.a.	54,915
101	V	9,165	113,588	57,455
102	E	8,507	120,848	54,593
103	C	8,462	122,362	55,559
104	T	8,372	120,434	60,46
	Wsc	8,821	130,663	
<i>minor</i>				
25	K	n.a.	n.a.	n.a.
27	H	n.a.	n.a.	n.a.
50	F	7,554	122,604	51,874
51	S	8,951	116,921	57,133
52	V	6,873	113,147	56,632
53	S	n.a.	n.a.	n.a.
54	G	7,784	106,748	n.a.
55	N	n.a.	n.a.	n.a.
78	V	8,679	115,879	57,491
79	V	n.a.	n.a.	n.a.
80	F	n.a.	n.a.	n.a.
81	N	n.a.	n.a.	n.a.
82	E	n.a.	n.a.	n.a.
83	N	7,273	117,328	49,263
84	N	8,047	116,286	50,372
85	Q	7,548	114,430	50,622
86	L	8,313	125,260	52,912
87	A	8,952	131,206	49,013
88	G	6,911	128,660	41,966
89	V	7,749	120,707	58,707

Tab. 8-12 Rückfaltungsraten von RNase T1 (S54G/P55N) bei pH 6.0 und 10 °C nach einzelnen Amidprotonen für den nativen Zustand aufgelistet. Die Fehler resultieren aus der nichtlinearen Anpassung an eine monoexponentielle Funktion. Reste, die keine Rückfaltungskinetik zeigen, sind nicht aufgelistet.

Position	Amino	k	error	Position	Amino	k	error
	säure	[min ⁻¹]			säure	[min ⁻¹]	
13	S	0,0093	0,0010	27	H	0,0044	0,0003
14	S	0,0030	0,0033	29	D	0,0051	0,0003
15	D	0,0065	0,0005	30	G	0,0053	0,0003
16	V	0,0058	0,0006	31	E	0,0055	0,0004
17	S	0,0060	0,0005	32	T	0,0046	0,0002
19	A	0,0051	0,0003	33	V	0,0056	0,0005
20	Q	0,0065	0,0005	34	G	0,0052	0,0004
21	A	0,0065	0,0005	35	S	0,0051	0,0004
22	A	0,0043	0,0003	37	S	0,0047	0,0003
23	G	0,0050	0,0005	56	Y	0,0051	0,0029
24	Y	0,0076	0,0007	59	W	0,0045	0,0007
25	K	0,0051	0,0003	61	I	0,0052	0,0005
26	L	0,0043	0,0005	62	L	0,0048	0,0003

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
63	S	0,0104	0,0011
64	S	0,0097	0,0009
65	G	0,0053	0,0005
67	V	0,0066	0,0005
68	Y	0,0069	0,0011
69	S	0,0036	0,0004
71	G	0,0056	0,0003
72	S	0,0059	0,0003
74	G	0,0063	0,0007
75	A	0,0067	0,0007
77	R	0,0032	0,0004

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
78	V	0,0055	0,0006
79	V	0,0027	0,0036
83	N	0,0057	0,0006
84	N	0,0074	0,0010
85	Q	0,0055	0,0008
87	A	0,0049	0,0006
88	G	0,0051	0,0008
101	V	0,0083	0,0008

Tab. 8-13 Rückfaltungsraten von RNase T1 (S54G/P55N) bei pH 6.0 und 10 °C nach einzelnen Amidprotonen für den intermediären Zustand (abnehmende Signalintensität) aufgelistet. Die Fehler resultieren aus der nichtlinearen Anpassung an eine monoexponentielle Funktion. Reste, die keine Rückfaltungskinetik zeigen oder nicht aufgelöst werden konnten, sind nicht aufgelistet.

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
11	Y	0,0094	0,0021
15	D	0,0054	0,0004
16	V	0,0047	0,0004
18	T	0,0066	0,0003
19	A	0,0054	0,0002
21	A	0,0068	0,0002
22	A	0,0051	0,0002
23	G	0,0070	0,0007
24	Y	0,0071	0,0006
25	K	0,0059	0,0003
26	L	0,0060	0,0003
29	D	0,0072	0,0006
30	G	0,0067	0,0005
31	E	0,0065	0,0003
34	G	0,0055	0,0002
37	S	0,0094	0,0005
62	L	0,0056	0,0005

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
65	G	0,0042	0,0003
68	Y	0,0062	0,0012
69	S	0,0061	0,0004
71	G	0,0055	0,0002
72	S	0,0059	0,0002
74	G	0,0068	0,0006
79	V	0,0062	0,0008
83	N	0,0062	0,0004
85	Q	0,0044	0,0003
87	A	0,0054	0,0006
88	G	0,0059	0,0006
92	H	0,0090	0,0007
101	V	0,0047	0,0008
102	E	0,0083	0,0019

Tab. 8-14 Rückfaltungsraten von RNase T1 (S54G/P55N) bei pH 6.0 und 10 °C während der Katalyse durch 10 % SlyD*. Die Amidprotonen für den nativen Zustand sind einzeln aufgelistet. Die Fehler resultieren aus der nichtlinearen Anpassung an eine monoexponentielle Funktion. Reste, die keine Rückfaltungskinetik zeigen, sind nicht aufgelistet.

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
8	S	0,0102	0,0010
10	C	0,0062	0,0019
11	Y	0,0128	0,0045
13	S	0,0074	0,0009
15	D	0,0114	0,0009
16	V	0,0104	0,0007
17	S	0,0076	0,0008
18	T	0,0100	0,0005
19	A	0,0110	0,0004
20	Q	0,0102	0,0007

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
22	A	0,0110	0,0003
23	G	0,0104	0,0005
24	Y	0,0137	0,0012
25	K	0,0111	0,0005
26	L	0,0107	0,0006
27	H	0,0118	0,0006
29	D	0,0118	0,0005
30	G	0,0101	0,0005
31	E	0,0059	0,0020
32	T	0,0112	0,0004

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
33 V		0,0118	0,0006
34 G		0,0115	0,0006
35 S		0,0102	0,0004
37 S		0,0109	0,0006
38 Y		0,0105	0,0007
47 G		0,0116	0,0038
48 F		0,0094	0,0048
50 F		0,0094	0,0026
51 S		0,0177	0,0017
59 W		0,0104	0,0007
61 I		0,0103	0,0006
62 L		0,0109	0,0005
63 S		0,0084	0,0008
65 G		0,0107	0,0007
67 V		0,0161	0,0011
68 Y		0,0126	0,0023
69 S		0,0109	0,0006
71 G		0,0112	0,0005
72 S		0,0103	0,0004
74 G		0,0124	0,0008
75 A		0,0127	0,0010
76 D		0,0170	0,0017

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
77 R		0,0116	0,0013
78 V		0,0122	0,0008
79 V		0,0052	0,0034
80 F		0,0122	0,0013
82 E		0,0134	0,0032
83 N		0,0126	0,0009
84 N		0,0088	0,0012
85 Q		0,0093	0,0006
87 A		0,0109	0,0008
88 G		0,0152	0,0020
89 V		0,0110	0,0025
90 I		0,0061	0,0012
91 T		0,0228	0,0039
92 H		0,0132	0,0008
93 T		0,0059	0,0014
99 N		0,0057	0,0014
101 V		0,0152	0,0011
102 E		0,0096	0,0007
103 C		0,0143	0,0008

Tab. 8-15 Rückfaltungsraten von RNase T1 (S54G/P55N) bei pH 6.0 und 10 °C während der Katalyse durch 10 % SlyD*. Die Amidprotonen für den intermediären Zustand (abnehmende Signalintensität) sind einzeln aufgelistet. Die Fehler resultieren aus der nichtlinearen Anpassung an eine monoexponentielle Funktion. Reste, die keine Rückfaltungskinetik zeigen oder nicht aufgelöst werden konnten, sind nicht aufgelistet.

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
15 D		0,0089	0,0006
16 V		0,0063	0,0007
18 T		0,0124	0,0004
19 A		0,0121	0,0005
21 A		0,0151	0,0008
22 A		0,0125	0,0006
24 Y		0,0141	0,0016
25 K		0,0132	0,0007
26 L		0,0125	0,0007
30 G		0,0192	0,0012
31 E		0,0153	0,0007
34 G		0,0129	0,0006
61 I		0,0053	0,0005
62 L		0,0131	0,0010
63 S		0,0079	0,0011
65 G		0,0078	0,0003

Position	Amino säure	k [min ⁻¹]	error
71 G		0,0123	0,0007
72 S		0,0120	0,0006
74 G		0,0140	0,0006
75 A		0,0099	0,0008
77 R		0,0171	0,0010
79 V		0,0147	0,0015
83 N		0,0146	0,0016
85 Q		0,0073	0,0009
87 A		0,0141	0,0011
88 G		0,0140	0,0012
90 I		0,0133	0,0020
92 H		0,0158	0,0021
101 V		0,0089	0,0006
103 C		0,0073	0,0006

8.3. Pulsprogramme

zgprwg2_15Nfilter.ch:

```
;avance-version (02/05/31)
;1D sequence
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence
with gradients
;filter 15N
;
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol.
NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J.
Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

; tested on slyd at 20/03/08

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

;$OWNER=nmrslu
"p21=32.7u"
"p2=2*p1"
"p22=2*p21"
"p16=1000u"
"p28=40u"
"p17=500u"
"d12=20u"
"d13=3u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d25=2.8m"
"d26=2.7m"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"TAU=d25-p17-d16-4u-p22/2"
"TAU1=d26-p17-d16-4u-p22/2"

1 ze
2 30m pl9:f1
d12 fq=cnst29(bf ppm):f1
d1 cw:f1
d13 do:f1
d12 fq=cnst30(bf ppm):f1
d12 pl1:f1
d1
d12 pl1:f1 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p1 ph0):f1
4u
p17:gp1
d16
TAU
```

```
(CEN_HN2 p2 ph2):f1 (p22 ph0):f3
TAU
p17:gp1
d16 ;pl2:f2
4u
(p1 ph10):f1
4u
p16:gp2
d16
1m
(p1 ph0):f1
4u
p17:gp3
d16
TAU1
(CEN_HN2 p2 ph2):f1 (p22 ph0):f3
TAU1
p17:gp3
d16 ;pl2:f2
4u
(p1 ph11):f1
4u
p16:gp4
d16
1m
p1 ph1
p16:gp1
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*0.231 ph4
46u
p16:gp1
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
30m pl9:f1 mc #0 to 2 F0(zd)
exit

ph0=0
ph2=2
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph11=0
ph1=0 2 0 2 1 3 1 3
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
```

shotzgprwg15Nf.ch:

```

;avance-version (02/05/31)
;1D sequence
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence
with gradients
;filter 15N
;
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol.
NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J.
Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)
;
;CLASS=HighRes
;DIM=1D
;TYPE=
;SUBTYPE=
;COMMENT=

; tested on slyd at 20/03/08

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

;$OWNER=nmrslu
"p21=32.7u"
"p2=2*p1"
"p22=2*p21"
"p16=1000u"
"p28=40u"
"p17=500u"
"d12=20u"
"d13=3u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d25=3.0m"
"d26=2.5m"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"TAU=d25-p17-d16-4u-p22/2"
"TAU1=d26-p17-d16-4u-p22/2"

1 ze
2 30m
3 30m pl9:f1
d1 cw:f1
d13 do:f1
d12 pl1:f1 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p1 ph0):f1
4u
p17:gp1
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph2):f1 (p22 ph0):f3
TAU

```

```

p17:gp1
d16 ;pl2:f2
4u
(p1 ph10):f1
4u
p16:gp2
d16
1m
(p1 ph0):f1
4u
p17:gp3
d16
TAU1
(CEN_HN2 p2 ph2):f1 (p22 ph0):f3
TAU1
p17:gp3
d16 ;pl2:f2
4u
(p1 ph11):f1
4u
p16:gp4
d16
1m

p1 ph1
p16:gp1
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*0.231 ph4
46u
p16:gp1
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
30m wr #0 if #0 zd
lo to 3 times td1

exit

ph0=0
ph2=2
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph11=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph1=0 2 0 2 2 0 2 0 2 0 2 0 0 2 0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 2 2 0

```

jbshtprwg2.uw:

```
;avance-version (02/05/31)
;1D sequence
```

```
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
; tested on ubiquitin at 23/11/06
```

```
;$OWNER=nmrslu
"p16=1000u"
"p28=40u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=3u"
"d16=100u"
"d19=60u"
```

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

```
1 ze
2 d11
3 d12 pl1:f1
  d12 fq=cnst29(bf ppm):f1
  d1 cw:f1
  d13 do:f1
  d12 fq=cnst30(bf ppm):f1
```

```
d12 pl1:f1
p1 ph1
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*0.231 ph4
46u
p16:gp1
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 zd
lo to 3 times td1
exit
```

```
ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 2 2 0
```

fhsqcN15.uw:

```
;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using States-TPPI method
;with decoupling during acquisition
;S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O'Neil-Johnson
& P.C.M. van Zijl,
; J. Magn. Reson. B 108, 94-98 (1995)
```

```
; tested on ubiquitin at 22/11/06
```

```
;$OWNER=nmrslu
```

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

```
"in0=inf1/2"
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=60u"
"d26=2.5m"
```

```
"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"
"d0=(in0-(p21*1.273+6u+4*p3))*0.5"
;;"l3=(td1/2)"
```

```
1 ze
  d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
  3m
3 d11
4 d12 pl1:f1
  50u UNBLKGRAD
  (p1 ph0)
  4u
  p16:gp1
  d16
  TAU pl3:f3
  (CEN_HN2 p2 ph0) (p21 ph0 3u p22 ph1 3u p21
ph0):f3
  TAU
  4u
  p16:gp1
```

d16 pl2: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 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:gp3
 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 0 0 2 2 2 2
 ph6=0 0 2 2
 ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

sgtrosy.uw:

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

;\$OWNER=nmrsu
 #include <Avance.incl>
 #include <Grad.incl>
 #include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"

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

"d0=4u"
 "d11=30m"
 "d16=100u"
 "d19=60u"
 "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 pl1:f1 pl2:f2 pl3: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 pl18: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

```

newmex_fhsqc.uw:

```

;$OWNER=nmrslu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

```

```

"in0=inf1/2"
"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d4=5.5m"
"d5=55m"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=60u"
"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"
"DELTA3=5.5m-4u-p16-d16"
"DELTA4=5.4m-p16-d16"
"p19=d8-1.200m" ;; d8 = mixing time
"TAU=d26-p16-4u"
"CEN_HN1=(p21-p2)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"

```

```

1 ze
d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
3m

```

```

3 d11
4 d12 pl1:f1
50u UNBLKGRAD
(p1 ph0)
d4 pl3:f3
(p21 ph0):f3
d5
p16:gp1
d16
(p1 ph1)
4u
p16:gp2
d16
DELTA3
(CEN_HN1 p2 ph2) (p21 ph5):f3
DELTA4
p16:gp2
d16
(p1 ph7) (p21 ph6):f3
4u
p16:gp3
d16
p19:gp4
d16
(p1 ph0)
4u
p16:gp5
TAU
(CEN_HN2 p2 ph0) (p22 ph0):f3
4u
p16:gp5
TAU

```

(p1 ph2)
4u
p16:gp6
d16
(p21 ph3):f3
d0
(p2 ph0)
d0
(p21 ph0):f3
4u
p16:gp6
d16
(p1 ph4)
DELTA1
p16:gp7
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph8
d19*2
p28*0.692 ph8
d19*2
p28*1.462 ph8
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph9

d19*2
p28*0.692 ph9
d19*2
p28*0.231 ph9
4u
p16:gp7
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 pl16:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 mc #0 to 2 F1PH(ip3, id0)
exit

ph0=0
ph1=0 0 2 2
ph2=1
ph3=0 2
ph4=2 2 0 0
ph5=0 0 0 0 2 2 2 2
ph6=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph7=2
ph8=1
ph9=3
ph31=0 2

trhnca.uw:

;avance-version

;\$OWNER=nmrsl
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/4"
"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
;p14/sp3 G3.256
;p13/sp2 rect100
;p14/sp5 G3.256 -117ppm offset
;p15/sp13 rect100
;p13/sp8 rect100
"d3=12.4m"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d17=200u"
"d19=60u"
"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+3u+p22"
"DELTA1=4u"
"DELTA2=d26-p16-d17-4u"

"DELTA3=0.5*(p16+d17+8u-p28*4.770-d19*10-
p22-DELTA1)"
"DELTA4=DELTA2-p28*4.77-d19*10"
"TAU1=p14"
"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"
"spoffs2=0"
"spoffs3=0"
"spoffs5=23500"
"spoffs8=0"
"spoffs13=0"
"in30=in10" ;; nd0 = 4
aqseq 321

1 ze
d11
2 d11
d1 pl11:f1 pl2:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(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	TAU
d16	(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
(p1 ph3)	4u
4u	TAU
p16:gp2*EA	p16:gp4
d16	d16
(p21 ph7):f3	(p1 ph2)
d3	DELTA1
(p14:sp3 ph10):f2	(p21 ph1):f3
3u	4u
(p22 ph0):f3	p16:gp5
3u	d17 pl18:f1
TAU1	DELTA2
d3 pl1:f1	DELTA3
(p21 ph1):f3	(p22 ph0):f3
4u	DELTA3
	p28*0.231 ph0
(p13:sp2 ph8):f2	d19*2
d0	p28*0.692 ph0
(p2 ph0):f1	d19*2
3u	p28*1.462 ph0
(p14:sp5 ph10):f2	d19*2
3u	p28*1.462 ph2
(p22 ph0):f3	d19*2
d0	p28*0.692 ph2
(p15:sp13 ph11):f2	d19*2
DELTA	p28*0.231 ph2
(p2 ph2):f1	4u
3u	DELTA4
(p14:sp5 ph12):f2	p16:gp5
4u	d17
(p13:sp8 ph13):f2	(p21 ph5):f3 ;; ph7=0 . invert for second FID
4u	4u
	p16:gp3*0.1013
(p21 ph6):f3	d16
d30	4u BLKGRAD
(p14:sp5 ph10):f2	go=2 ph31
d30	d11 mc #0 to 2
(p14:sp3 ph11):f2	F1PH(rd10 & rd30 & ip8, id0)
3u	F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10 &
(p22 ph9):f3	dd30 & ip6*2 & ip31*2)
3u	exit
TAU1	
d29	ph0=0
d10	ph1=1
(p14:sp5 ph12):f2	ph2=2
d10	ph3=3
d28	ph4=1
p16:gp3*EA	ph5=0
d16 pl11:f1	ph6=1 3
(p11 ph0):f1	ph7=0
4u	ph8=0 0 2 2
20u pl1:f1	ph9=0 0 0 0 2 2 2 2
4u	ph10=0
(p1 ph4)	ph11=0
4u	ph12=0
p16:gp4	ph13=0
d16	ph31=0 2 2 0

trhncacb.uw:

;avance-version

;\$OWNER=nmrsl

#include <Avance.incl>

#include <Grad.incl>

#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"

"in10=inf2/4"

"p2=p1*2"

"p4=p3*2"

"p22=p21*2"

"p16=1m"

"p28=40u"

;p14/sp3 Q3.1000

;p14/sp5 Q3.1000 131ppm offset

"d3=12.4m"

"d11=30m"

"d16=100u"

"d17=200u"

"d19=60u"

"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+3u+p22"

"DELTA1=4u"

"DELTA2=d26-p16-d17-4u"

"DELTA3=0.5*(p16+d17+8u-p28*4.770-d19*10-
p22-DELTA1)"

"DELTA4=DELTA2-p28*4.77-d19*10"

"TAU1=p14"

"CEN_HN1=(p21-p1)/2"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"

"CEN_CN2=(p14-p22)/2"

"CEN_HC2=(p14-p2)/2"

"spoffs3=0"

"spoffs5=26360"

"in30=in10" ;; nd0 = 4

aqseq 321

1 ze

d11

2 d11

d1 pl11:f1 pl2:f2 pl3:f3

50u UNBLKGRAD

(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

3u

(p22 ph0):f3

3u

TAU1

d3 pl1:f1 pl2:f2

(p21 ph1):f3

4u

(p3 ph8):f2

4u

d23 pl0:f2

(p14:sp5 ph0):f2

4u

d23 pl2:f2

(p4 ph10):f2

4u

d23 pl0:f2

(p14:sp5 ph0):f2

4u

d23 pl2:f2

(p3 ph12):f2

4u

d0 pl0:f2

(p2 ph0):f1

3u

(p14:sp5 ph10):f2

3u

(p22 ph0):f3

d0

4u pl2:f2

(p4 ph10):f2

4u

DELTA pl0:f2

(p2 ph2):f1

3u

(p14:sp5 ph7):f2

10u

4u pl2:f2

(p3 ph11):f2

4u

d23 pl0:f2

(p14:sp5 ph10):f2

4u

d23 pl2:f2

(p4 ph0):f2

4u

d23 pl0:f2

(p14:sp5 ph0):f2

4u

d23 pl2:f2

```

(p3 ph13):f2
4u

(p21 ph6):f3
d30 pl0:f2
(p14:sp5 ph10):f2
d30
(p14:sp3 ph11):f2
3u
(p22 ph9):f3
3u
TAU1
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
d17 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
d17
(p21 ph5):f3
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAD
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)
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

```

trhncocacb.uw:

```
;avance-version
```

```
;$OWNER=nmrslu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

```

```

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/4"
"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
;p14/sp3 G3.256
;p13/sp2 G4

```

```

;p14/sp5 G3.256 -130ppm offset
;p15/sp13 rect100
;p13/sp8 g4tr
;p12/sp12 rect100
;p14/sp7 G3.256 +130ppm offset
"d3=12.4m"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d17=200u"
"d19=60u"
"d0=10u"
"d10=4u"
"d23=3.5m-p16-d16"
"d24=4.4m"
"d26=2.65m"

```

"d30=d3*0.5"	d24
"d29=d30-d10"	(p14:sp3 ph10):f2
"d28=d29-p16-d16+p21*1.273+DELTA1-p11-28u"	4u
"TAU=d26-p16-d16-4u"	(p14:sp5 ph11):f2
"DELTA=d0*2-10u+3u+p22"	d24
"DELTA1=4u"	(p13:sp8 ph12):f2
"DELTA2=d26-p16-d17-4u"	4u
"DELTA3=0.5*(p16+d17+8u-p28*4.770-d19*10-	50u fq=cnst27(bf ppm):f2
p22-DELTA1)"	20u
"DELTA4=DELTA2-p28*4.77-d19*10"	p16:gp6
"TAU1=p14"	d16
"CEN_HN1=(p21-p1)/2"	(p12:sp12 ph8):f2 ;; starting CA evolution
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"	4u
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"	p16:gp7
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"	d16
"spoffs2=0"	d23
"spoffs3=0"	(p15:sp13 ph10):f2
"spoffs5=-26000"	4u
"spoffs7=26000"	p16:gp7
"spoffs8=0"	d16
"spoffs12=0"	d23
"spoffs13=0"	(p12:sp12 ph13):f2
"in30=in10" ;; nd0 = 4	4u
aqseq 321	d0
	(p2 ph0)
1 ze	3u
d11	(p14:sp7 ph0):f2
2 d11	3u
d1 pl11:f1 pl0:f2 pl3:f3	(p22 ph0):f3
50u UNBLKGRAD	d0
(p11 ph3)	4u
4u	(p15:sp13 ph15):f2
20u pl1:f1	4u
4u	DELTA
(p1 ph0)	(p2 ph2)
4u	3u
p16:gp1	(p14:sp7 ph10):f2
d16	10u
TAU fq=cnst26(bf ppm):f2	4u
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3	
4u	(p12:sp12 ph16):f2
TAU	4u
p16:gp1	p16:gp8
d16	d16
(p1 ph3)	d23
4u	(p15:sp13 ph11):f2
p16:gp2*EA	4u
d16	p16:gp8
(p21 ph7):f3	d16
d3	d23
(p14:sp3 ph10):f2	(p12:sp12 ph17):f2
3u	4u
(p22 ph0):f3	50u fq=cnst26(bf ppm):f2
3u	4u
TAU1	(p13:sp2 ph12):f2
d3 pl1:f1	4u
(p21 ph1):f3	d24
4u	(p14:sp5 ph11):f2
	4u
(p13:sp2 ph10):f2	(p14:sp3 ph10):f2
4u	d24
(p14:sp5 ph11):f2	(p14:sp5 ph11):f2

<pre> 4u (p13:sp8 ph10):f2 (p21 ph6):f3 d30 pl0:f2 (p14:sp5 ph10):f2 d30 (p14:sp3 ph11):f2 3u (p22 ph9):f3 3u TAU1 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 d17 pl18:f1 DELTA2 DELTA3 (p22 ph0):f3 DELTA3 p28*0.231 ph0 d19*2 p28*0.692 ph0 </pre>	<pre> 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 d17 (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) 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=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 ;cnst26 : frequency CO 173 ppm ;cnst27 : frequency CA 42 ppm </pre>
--	---

n15noesy.uw:

```

;avance-version
;3D 15N-edited NOESY
;phase sensitive using States-TPPI method in both
indirect dimensions
;optimized pulse sequence for exchanging protons
;S. Talluri and G. Wagner
; J. Magn. Reson. B 112, 200-205 (1996)
;using composite pulses for C13-decoupling

;Author: Kristian Schweimer, 04.12.97
;
;Setup:

```

```

;F1 = 15N
;F2, F3 = 1H

;$OWNER=nmrslu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"

```

```

"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d0=4u"
"d10=4u"
"d22=d10*2+p22*2+p4*2+12u+3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=60u"
"d26=2.5m"
"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"
"DELTA3=p3*4+6u+d0*2"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_CN1=(p22-p3*4-6u)/2"
"CEN_HC1=(p3*4+6u-p2)/2"
"l3=(td1/2)"
"l13=(td2/2)"
aqseq 312

1 ze
  d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
  6m
3 3m
4 3m
5 3m
6 3m
  d11 fq=cnst26(bf ppm):f2      ;; set carbon
transmitter in the aliphatic center 42 ppm
  d12 pl3:f3
  d12 pl2:f2
  d12 pl1:f1
  (p1 ph1)
  d10          ; H1-Evolution
  (p3 ph13 3u p4 ph14 3u p3 ph13):f2
  3u
  (p21 ph13 3u p22 ph14 3u p21 ph13):f3
  d10
  (p2 ph4)      ; spin-echo for avoiding phase
evolution
  d22
  (p1 ph3)
  50u UNBLKGRAD
  d8 fq=cnst27(bf ppm):f2      ; mixing time, set
C13-transm. to 115 ppm
  p16:gp1        ; scrambling residual transv.
magnetization
  d16
  (p1 ph4)
  4u
  p16:gp2
  d16
  TAU pl3:f3
  (CEN_HN2 p2 ph4) (p22 ph5):f3
  4u
  TAU
  p16:gp2
  d16

```

```

(p1 ph6)
4u
p16:gp3
d16
(p21 ph7):f3
d0          ; N15-Evolution
(CEN_HC1 p2 ph8) (p3 ph13 3u p4 ph14 3u p3
ph13):f2
d0
(p22 ph13):f3
DELTA3
(p21 ph9):f3
4u
p16:gp3
d16
(p1 ph10)
DELTA1
p16:gp4
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph11
d19*2
p28*0.692 ph11
d19*2
p28*1.462 ph11
DELTA
(p22 ph13):f3
DELTA
p28*1.462 ph12
d19*2
p28*0.692 ph12
d19*2
p28*0.231 ph12
4u
p16:gp4
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 pl16:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 wr #0 if #0 zd  ; ph7 = States-TPPI phase
for N15
  3m ip7
  3m ip5
  lo to 3 times 2
  3m id0          ; incrementing N15 Evolution
  lo to 4 times l3
  3m ip1 rd0      ; ph1 = States-TPPI phase for
H1, resetting N15-Evol.
  lo to 5 times 2
  3m id10        ; incrementing H1-Evolution
  lo to 6 times l13
exit

ph1=0
ph2=0 0 0 0 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2
ph4=0
ph5=0
ph6=1
ph7=0 2
ph8=0 0 0 0 2 2 2 2
ph9=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ph10=2

```



```
ph11=1
ph12=3
ph13=0 0 0 0 2 2 2
ph14=1 1 1 1 3 3 3 3
```

```
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2
```

```
;cnst26 : frequency ali 42 ppm
;cnst27 : frequency aro 115 ppm
```

n15tocsy.uw:

```
;avance-version
;3D X-nucleus edited TOCSY

;Author: Kristian Schweimer, 14.03.98

;$OWNER=nmrslu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

;; setting pi-pulses

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p6=25u"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d0=4u"
"d10=4u"
"d22=d10*2+p22"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=60u"
"d26=2.5m"
"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"
"DELTA3=p3*4+6u+d0*2"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"CEN_HN1=(p22-p2)/2" ;; centering pi-pulses
"CEN_CN1=(p22-p3*4-6u)/2"
"CEN_HC1=(p3*4+6u-p2)/2"
"I3=td1/2"
"I13=td2/2"
"FACTOR1=(d9/(p6*172.659))/2+0.5"
"I1=FACTOR1*2"
"d6=p6*1.599"
aqseq 312

1 ze
  d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
  6m
3 15m
4 6m
5 3m
6 d11
  d12 pl1:f1 ;; high power on F1 (1H)
  d12 pl2:f2
  d12 pl3:f3 ;; high power on F3 (15N)
```

```
d12 fq=cnst26(bf ppm):f2 ;; set carbon
transmitter in the aliphatic center 42 ppm
50u UNBLKGRAD
3u
(p1 ph1):f1 ;; ph1 = 02
d10 ;; H1-evolution
(CEN_CN1 p3 ph13 3u p4 ph11 3u p3 ph13):f2
(p22 ph2):f3
d10
(p2 ph4):f1
d22 ;; refocusing initial shift evolution
(p1 ph4):f1 ;; ph3 = 0022
3u
p16:gp1 ;; z-filter gradient
d16 pl10:f1 ;; switching to power level for
DIPSI
```

```
7 p6*2.000 ph23
d6
p6*1.556 ph23
p6*3.556 ph25
d6
p6*1.000 ph25
p6*3.000 ph23
d6
p6*0.222 ph23
p6*2.222 ph25
d6
p6*0.944 ph25
p6*0.333 ph23
p6*1.389 ph25
d6
p6*1.333 ph25
p6*3.333 ph23
d6
p6*0.833 ph23
p6*2.833 ph25
d6
p6*0.111 ph25
p6*2.111 ph23
d6
p6*2.000 ph23
p6*2.000 ph25
d6
p6*1.556 ph25
p6*3.556 ph23
d6
p6*1.000 ph23
p6*3.000 ph25
d6
p6*0.222 ph25
p6*2.222 ph23
d6
p6*0.944 ph23
```

p6*0.333 ph25	p6*2.000 ph23
p6*1.389 ph23	lo to 7 times l1
d6	3u
p6*1.333 ph23	p16:gp2 ;; second z-filter gradient
p6*3.333 ph25	d16 pl1:f1 ;; high power on 1H
d6	(p1 ph4)
p6*0.833 ph25	4u
p6*2.833 ph23	p16:gp3
d6	TAU pl3:f3
p6*0.111 ph23	(CEN_HN2 p2 ph4) (p22 ph5):f3
p6*2.111 ph25	4u
d6	p16:gp3
p6*2.000 ph25	TAU fq=cnst27(bf ppm):f2 ;; set C13-transm. to
p6*2.000 ph25	115 ppm
d6	(p1 ph6)
p6*1.556 ph25	4u
p6*3.556 ph23	p16:gp4
d6	d16
p6*1.000 ph23	(p21 ph7):f3
p6*3.000 ph25	d0 ; N15-Evolution
d6	(CEN_HC1 p2 ph8) (p3 ph13 3u p4 ph11 3u p3
p6*0.222 ph25	ph13):f2
p6*2.222 ph23	d0
d6	(p22 ph13):f3
p6*0.944 ph23	DELTA3
p6*0.333 ph25	(p21 ph9):f3
p6*1.389 ph23	4u
d6	p16:gp4
p6*1.333 ph23	d16
p6*3.333 ph25	(p1 ph10)
d6	DELTA1
p6*0.833 ph25	p16:gp5
p6*2.833 ph23	d16 pl18:f1
d6	p28*0.231 ph11
p6*0.111 ph23	d19*2
p6*2.111 ph25	p28*0.692 ph11
d6	d19*2
p6*2.000 ph25	p28*1.462 ph11
p6*2.000 ph23	DELTA
d6	(p22 ph13):f3
p6*1.556 ph23	DELTA
p6*3.556 ph25	p28*1.462 ph12
d6	d19*2
p6*1.000 ph25	p28*0.692 ph12
p6*3.000 ph23	d19*2
d6	p28*0.231 ph12
p6*0.222 ph23	4u
p6*2.222 ph25	p16:gp5
d6	d16
p6*0.944 ph25	4u BLKGRAD
p6*0.333 ph23	DELTA2 pl16:f3
p6*1.389 ph25	go=2 ph31 cpd3:f3
d6	d1 do:f3 wr #0 if #0 zd ; ph7 = States-TPPI phase
p6*1.333 ph25	for N15
p6*3.333 ph23	3m ip7
d6	3m ip5
p6*0.833 ph23	lo to 3 times 2
p6*2.833 ph25	3m id0 ; incrementing N15 Evolution
d6	lo to 4 times l3
p6*0.111 ph25	3m ip1 rd0 ; ph1 = States-TPPI phase for
p6*2.111 ph23	H1, resetting N15-Evol.
d6	lo to 5 times 2

```
3m id10 ; incrementing H1-Evolution
lo to 6 times l13
exit
```

```
ph1=(4) 0 0 2 2
ph2=(4) 0 0 0 2 2 2 2
ph3=(4) 0
ph4=(4) 0
ph5=(4) 0
ph6=(4) 1
ph7=(4) 0 2
ph8=(4) 0 0 0 2 2 2 2
```

```
ph9=(4) 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph10=(4) 1
ph11=(4) 1
ph12=(4) 3
ph13=(4) 0
ph23=(4) 3
ph25=(4) 1
ph31=(4) 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2
```

```
;cnst26 : frequency ali 42 ppm
;cnst27 : frequency aro 115 ppm
```

b_hncagp3d_new.rp:

```
;avance-version (07/08/30)
;best-HNCA
;3D sequence with
; inverse correlation for triple resonance using
multiple
; inept transfer steps
;
; F1(H) -> F3(N) -> F2(Ca,t1) -> F3(N,t2) ->
F1(H,t3)
;
;on/off resonance Ca and C=O pulses using shaped
pulse
;phase sensitive (t1)
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient
selection (t2)
;using constant time in t2
;(use parameterset )
;
;P. Schanda, H. v. Melckebeke & B. Brutscher,
; J. Am. Chem. Soc. 128, 9042-9043 (2006)
;E. Lescop, P. Schanda & B. Brutscher,
; J. Magn. Reson. 187 163-169 (2007)
;(S. Grzesiek & A. Bax, J. Magn. Reson. 96, 432 -
440 (1992))
;(J. Schleucher, M. Sattler & C. Griesinger,
; Angew. Chem. Int. Ed. 32, 1489-1491 (1993))
;(L.E. Kay, G.Y. Xu & T. Yamazaki, J. Magn.
Reson. A109,
; 129-133 (1994))
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>

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

"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d23=14.5m"
"d26=2.4m"
```

```
"p29=300u"
"d0=3u"
"d10=3u"
"d30=d23-p43"
"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"
"in30=in10"
"TAU=larger(p14,p22)"
"DELTA=d0*2+larger(p44,TAU)-p14"
"DELTA1=d26-p29-d16-p41*cnst41-p42*cnst40"
"DELTA2=d23-larger(p14,p44)-d10-p16-d16"
"DELTA3=d26-p19-d16-p42/2"
"DELTA4=d26-p29-d16-p43*cnst43-p42*cnst42"
"DELTA5=p16+d16+de+8u"
"spoff2=0"
"spoff3=0"
"spoff5=bf2*(cnst21/1000000)-o2"
"spoff8=0"
"spoff25=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff26=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff27=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff28=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff29=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff30=0"
aqseq 321
```

```
1 d11 ze
d11 pl26:f3
2 d11 do:f3
3 d1
50u UNBLKGRAD
```

```
(p41:sp25 ph1)
p29:gp3
d16
DELTA1 pl3:f3
(center (p42:sp26 ph1) (p22 ph1):f3 )
DELTA1
p29:gp3
d16
(p41:sp27 ph2):f1
```

```
p16:gp4
d16
```

```
(p21 ph3):f3
```

d23 (center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3) d23 (p21 ph2):f3	F2EA(igrad EA & ip6*2, id10 & dd30 & ip8*2 & ip31*2) TAU exit
p16:gp5 d16	ph1=0 ph2=1 ph3=0 0 2 2 ph4=0 2 ph5=0 2 ph6=1 3 ph7=0 0 2 2 ph8=1 ph31=0 2 2 0
(p13:sp2 ph4):f2 d0 (center (p44:sp30 ph1) (p14:sp5 ph1):f2 (p22 ph7):f3) d0 4u (p14:sp3 ph1):f2 DELTA (p14:sp5 ph1):f2 4u (p13:sp8 ph1):f2	;pl3 : f3 channel - power level for pulse (default) ;pl26: f3 channel - power level for CPD/BB low power decoupling ;sp2: f2 channel - shaped pulse 90 degree (Ca on resonance) ;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca on resonance) ;sp5: f2 channel - shaped pulse 180 degree (C=O off resonance) ;sp8: f2 channel - shaped pulse 90 degree (Ca on resonance)
p16:gp6 d16	; for time reversed pulse
(p21 ph8):f3 d10 (p44:sp30 ph1) (p14:sp5 ph1):f2 DELTA2 p16:gp1*EA d16 (center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph7):f3) d30	;sp25: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000) ;sp26: f1 channel - shaped pulse 180 degree (Reburp.1000) ;sp27: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Pc9_4_90.1000)
(p43:sp28 ph1) (p21 ph5):f3 p19:gp7 d16 DELTA3 (center (p42:sp26 ph1) (p22 ph1):f3) DELTA3 p19:gp7 d16 (p21 ph6):f3	; for time reversed pulse ;sp28: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2.1000) ;sp29: f1 channel - shaped pulse 90 degree (Eburp2tr.1000)
(p43:sp29 ph2) p29:gp8 d16 DELTA4 (center (p42:sp26 ph1) (p22 ph1):f3) DELTA4 p29:gp8 d16 (p43:sp28 ph1) DELTA5 (p42:sp26 ph1) 4u p16:gp2 d16 pl26:f3 4u BLKGRAD go=2 ph31 cpd3:f3 d11 do:f3 mc #0 to 2 F1PH(rd10 & rd30 & ip4, id0)	; for time reversed pulse ;sp30: f1 channel - shaped pulse 180 degree (Bip720,50,20.1) ;p13: f2 channel - 90 degree shaped pulse ;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse ;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec] ;p19: gradient pulse 2 [500 usec] ;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse ;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse ;p29: gradient pulse 3 [300 usec] ;p41: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation ; Pc9_4_90.1000 (3.0ms at 600.13 MHz) ;p42: f1 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing ; Reburp.1000 (2.0ms at 600.13 MHz) ;p43: f1 channel - 90 degree shaped pulse for excitation

```

;          Eburp2.1000/Eburp2tr.1000 (1.92ms
at 600.13 MHz)
;p44: f1 channel - 180 degree shaped pulse for
refocussing
;          Bip720,50,20.1      (200us at
600.13 MHz)
;d0 : incremented delay (F1 in 3D)          [3
usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d10: incremented delay (F2 in 3D)          [3
usec]
;d11: delay for disk I/O                    [30
msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d23: 1/(4J(NCa))                          [14.5
msec]
;d26: 1/(4J'(NH))                          [2.4 msec]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d23-p43
;cnst19: H(N) chemical shift (offset, in ppm)
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;cnst22: Calpha chemical shift (offset, in ppm)
;cnst40: compensation of chemical shift evolution
during p42
;          Reburp.1000: 0.5
;          compensate to the extend the other delays
allow
;cnst41: compensation of chemical shift evolution
during p41
;          Pc9_4_90.1000: 0.529
;cnst42: compensation of chemical shift evolution
during p42
;          Reburp.1000: 0.5
;cnst43: compensation of chemical shift evolution
during p43
;          Eburp2.1000: 0.5
;o2p: Calpha chemical shift (cnst22)
;inf1: 1/SW(Ca) = 2 * DW(Ca)
;inf2: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(2 * SW(Ca)) = DW(Ca)
;nd0: 2
;in10: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)

```

```

;nd10: 2
;in30: = in10
;NS: 8 * n
;DS: >= 16
;aq: <= 50 msec
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2      td2 max = 2
* d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F2
;cpd3: decoupling according to sequence defined by
cpdprg3: garp4.p62
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence

```

```

;use gradient ratio:
; gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4 : gp 5 : gp6 : gp7 : gp8
; 80 : 8.1 : 7 : -40 : -50 : 60 : -5 : 5

```

```

;for z-only gradients:

```

```

;gpz1: 80%
;gpz2: 8.1%
;gpz3: 7%
;gpz4: -40%
;gpz5: -50%
;gpz6: 60%
;gpz7: -5%
;gpz8: 5%

```

```

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.32
;gpnam4: SINE.100
;gpnam5: SINE.100
;gpnam6: SINE.100
;gpnam7: SINE.50
;gpnam8: SINE.32

```

```

;$Id: b_hncagp3d,v 1.1.2.1 2007/09/14 16:17:35
ber Exp $

```

8.4. Felix-Macros

add.mac:

```

cl
get 'start' start
get 'end' end
mul 0
stb 1
for row &start &end
  loa &row 0
  adb 1
  ty &row $
next
ldb 1
dr
ty

```

```

quit:
end

```

gv1.mac:

```

get 'points(F2)' p1
for row 1 &p1
  gv &row val
  ty &val
next
ty
end

```


9. Eigene Publikationen

- (1) Weininger, U., Haupt, C., Schweimer, K., Graubner, W., Kovermann, M., Brüser, T., Scholz, C., Schaarschmidt, P., Zoldak, G., Schmid, F. X. und Balbach, J. (2009). "NMR solution structure of SlyD from Escherichia coli: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function." *J. Mol. Biol.* **387**(2), 295-305.
- (2) Löw, C., Neumann, P., Tidow, H., Weininger, U., Haupt, C., Friedrich-Epler, B., Scholz, C., Stubbs, M. T. und Balbach, J. (2009). "Structural, Dynamic and Functional Characterization of the Metallochaperone SlyD from Thermus thermophilus." *J. Mol. Biol.*, in Bearbeitung.

Weitere Publikationen (Diplomarbeit, TU Dresden, 2005):

- (3) Dong, C., Flecks, S., Unversucht, S., Haupt, C., van Pée, K. H. und Naismith, J. H. (2005). "Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination." *Science* **309**(5744), 2216-2219.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Caroline **Haupt**

Bertramstr. 3
06110 Halle/ Saale

Tel. (0345) 2391768
Caroline.Haupt@physik.uni-halle.de

Geboren am 28. Juni 1980 in Karlsburg

Familienstand: ledig

Fremdsprachen: Englisch, Französisch, Russisch

Ausbildung

5. Polytechnische Oberschule Berlin-Hellersdorf	1987 – 1989
7. Polytechnische Oberschule Berlin-Hellersdorf, Klasse mit erweitertem Russischunterricht	1989 – 1991
21. Grundschule Berlin-Hellersdorf	1991 – 1993
4. Gymnasium Berlin-Hellersdorf	1993 – 2000 Abitur
Technische Universität Dresden	2000 bis 2005 Studium der Chemie mit Vertiefungsrichtung Biochemie im Hauptstudium Diplom in Chemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg	2005 bis heute Promotion in der AG Biophysik, Institut für Physik bei Prof. Dr. Jochen Balbach

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Biophysik unter Leitung von Prof. Dr. Jochen Balbach angefertigt. Ich möchte mich ganz besonders bei ihm für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas bedanken. Seine hilfreichen Ratschläge, die Einführung in die NMR-Problematik und die ständige Diskussionsbereitschaft haben mich tatkräftig unterstützt. Vielen Dank für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung!

Mein Dank gilt Frau Dr. Cordelia Schiene-Fischer und PD Dr. Hauke Lilie, die mir stets mit offenen Ohren zur Seite standen und in wissenschaftlich anregenden Diskussionen weiterhalfen. Ich möchte mich bei Cordelia auch für die Messzeit in der Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ bedanken und bei Hauke für die Durchführung von analytischen Ultrazentrifugationsmessungen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank PD Dr. Antonio J. Pierik an der Universität Marburg für die Durchführung der EPR-Messungen und für die ausführliche Betrachtung und Diskussion der Ergebnisse.

Unseren Kooperationspartnern Franz X. Schmid und seiner Arbeitsgruppe Biochemie an der Universität Bayreuth sowie Christian Scholz danke ich für die ideenreichen und immer wieder auflebenden Diskussionen rund um das SlyD-Projekt. Vielen lieben Dank euch allen: Franz Schmid, Gabriel Zoldak, Stefan Lorenz, Roman Jakob, Barbara Eckert, Insa Kather, Steffi, Anne und Christian Scholz!

Für die gute Zusammenarbeit im Labor und für die eine oder andere ablenkende Kaffeerunden-Diskussion möchte ich mich recht herzlich bei meinen Laborkolleginnen und -kollegen bedanken: Christian Löw, Ulrich Weininger, Michael Kovermann, Rolf Sachs, Rica Patzschke, Mohanraj Gopalswamy, Tobias Gruber, Matthias Henze, Stefan Gröger und insbesondere Kathrin Waldheim, die mir im Labor immer tatkräftig zur Seite stand. Ein besonderer Dank gilt Christian, der mich in der schwierigen Anfangsphase unterstützt hat. Vielen lieben Dank auch euch, Uli und Kovi, dass ihr mich mit den Methoden der NMR-Spektroskopie vertraut gemacht habt, und Rica, für die Optimierung der BEST-HNCA-Sequenz.

Ferner gilt mein Dank auch Mathias Müller aus der Arbeitsgruppe von Andrea Sinz, Institut für Pharmazie, MLU Halle. Er hat mir in kürzester Zeit die Prinzipien der

Massenspektrometrie zur sequentiellen Analyse von Proteinen beigebracht. Vielen Dank für die so kurzfristig ermöglichten Messzeiten!

Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1026 „*Conformational transitions in macromolecular interactions*“, insbesondere Milton T. Stubbs (Leiter des GRKs) und Mechtild Wahle (Koordinatorin des GRKs), möchte ich für die Integration ins GRK und für die sehr anspruchsvollen Seminare und Meetings danken.

Für die finanzielle Unterstützung während der ganzen Zeit meiner Promotion und für die Möglichkeit der Teilnahme an zwei internationalen Konferenzen im Ausland möchte ich dem Graduiertenkolleg 1026 ebenfalls danken.

Meinen Freunden und meinen Mannschaftskollegen möchte ich für die Zeit nach der Laborarbeit danken und dafür, dass sie mir die nötige Ablenkung gaben, um wieder mit neuem Eifer weiterzumachen.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie und Frank, die während der ganzen Zeit immer für mich da waren und mich mit allen Kräften unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

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

Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht anderweitig versucht habe, diese Dissertation einzureichen oder einer Prüfungsbehörde einer anderen Hochschule vorzulegen. Ich selbst habe mich noch keiner Doktorprüfung unterzogen.

Halle/ Saale, den 8. Oktober 2009

Caroline Haupt