

Biophysikalische Untersuchungen an Amyloidfibrillen

Dissertation

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

Der
Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Monika Baumann
geboren am 3. Mai 1986 in München

Tag der Verteidigung: 19.06.2017

Gutachter:

- (1) Prof. Dr. rer. nat. Jochen Balbach
- (2) Prof. Dr. rer. nat. Kay Saalwächter
- (3) Prof. Dr. rer. nat. Bernd Reif (Technische Universität München)

1	Einleitung	1
1.1	Strukturbiologie und Protein(Fehl)faltung	1
1.2	Amyloidbildende Peptide und Proteine	3
1.2.1	Amyloid β (A β).....	3
1.2.2	Serum Amyloid A (SAA)	10
1.2.3	Parathormon (PTH).....	12
1.3	Aufgabenstellung und Ziele	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Proteine und NMR-Proben	14
2.1.2	Chemikalien	14
2.1.3	Bakterienstämme und Plasmide	15
2.1.4	Nährmedien.....	16
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.6	Geräte und Software	17
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Proteinexpression und –reinigung	19
2.2.2	Absorptionsspektroskopie zur Konzentrationsbestimmung	26
2.2.3	Circulardichroismus (CD) – Spektroskopie	27
2.2.4	Elektronenmikroskopie	28
2.2.5	Photoinduzierte Vernetzung unmodifizierter Proteine.....	28
2.2.6	Röntgenbeugung	29
2.2.7	Thioflavin T Fluoreszenz.....	30
2.2.8	Thermodynamische Stabilität von Amyloidfibrillen.....	33
2.2.9	NMR-Spektroskopie	34
2.2.9.1	^1H - ^{15}N -Korrelationsexperimente.....	34
2.2.9.2	Experimente zur Rückgratzuordnung.....	35
2.2.9.3	Experimente zur Interaktionsmessung	38
2.2.9.4	Amidprotonenaustausch	40
2.2.9.5	Diffusionsmessungen	46
2.2.9.6	Relaxationsmessungen zur Dynamikuntersuchung	50
2.2.9.7	hetNOE	53
2.2.9.8	DEST.....	54
3	Ergebnisse und Diskussion.....	59
3.1	H/D-Austausch an Amyloidfibrillen.....	59
3.1.1	Optimierung des Protokolls	59
3.1.2	Amidprotonenaustausch an Amyloid β -Fibrillen.....	63
3.1.3	Amidprotonenaustausch an Serum Amyloid A -Fibrillen.....	73

Inhaltsverzeichnis

3.2	Untersuchung des Parathormons PTH ₁₋₈₄	78
3.3	Untersuchungen an A β ₁₋₄₀	96
3.3.1	Interaktion von Cyclophilin D mit A β ₁₋₄₀	96
3.3.2	Varianten von A β ₁₋₄₀	104
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	108
5	Abkürzungsverzeichnis.....	I
6	Literaturnachweis.....	IV
7	Zusätzliche Methoden und Messungen.....	XVII
7.1	A β	XVII
7.1.1	Herstellung der Fibrillen und H/D-Austausch.....	XVII
7.1.2	Untersuchung von Varianten.....	XX
7.1.3	Interaktion von A β ₁₋₄₀ mit CypD.....	XXIII
7.2	SAA1.1.....	XXXI
7.3	PTH ₁₋₈₄	XXXV
7.3.1	Herstellung der Fibrillen und H/D-Austausch.....	XXXV
7.3.2	Fibrillierung von PTH ₁₋₈₄	XXXVIII
7.3.3	Untersuchungen am Fibrillen-Monomer-Gleichgewicht.....	XXXVIII
8	NMR-Pulsprogramme.....	XLVI
8.1	¹ H-Spektren.....	XLVI
8.2	¹ H- ¹⁵ N-Korrelationsspektren.....	XLVII
8.3	Experimente zur Rückgratzuordnung.....	L
8.3.1	Klassisch.....	L
8.3.2	Nicht-lineare Detektion.....	LXI
8.4	New Mexico.....	LXVI
8.5	Diffusion.....	LXVII
8.6	Proteindynamik.....	LXIX
8.7	DEST.....	LXXIII
9	Tabellenverzeichnis.....	LXXV
10	Abbildungsverzeichnis.....	LXXVI
11	Lebenslauf.....	LXXIX
12	Eigene Publikationen.....	LXXIX
13	Konferenzbeiträge.....	LXXX
14	Betreute Abschlussarbeiten.....	LXXXI
15	Danksagung.....	LXXXII
16	Eidesstattliche Erklärung.....	LXXXV

1 Einleitung

1.1 Strukturbiologie und Protein(fehlfaltung)

Obwohl Proteine aus nur 20 verschiedenen Bausteinen (Aminosäuren) aufgebaut sind, stellen sie die wohl vielseitigste Klasse der Biomakromoleküle dar. Die Aminosäuresequenz enthält dabei die notwendigen Informationen zur Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur, welche wiederum maßgeblich entscheidend für die physiologische Funktion des Proteins ist. Die Veröffentlichung der ersten Proteinstruktur 1958^[1] kann als Beginn eines interdisziplinären naturwissenschaftlichen Forschungsfeldes angesehen werden, dessen Ziel das grundlegende Verständnis von Funktion und Wirkungsweise der Biomoleküle darstellt. Durch die Entwicklung und Verbesserung verschiedener biochemischer und biophysikalischer Methoden nimmt die Zahl der in Datenbanken erfassten dreidimensionalen (3D) Proteinstrukturen stetig zu. Aktuell sind bereits über 125000 3D Strukturen in der PDB-Datenbank erfasst. Diese Methoden beinhalten die Sequenzierung des Genoms und die Proteinexpression zur Identifikation und Herstellung relevanter Proteine. Dazu kommen als Analysemethoden Röntgenstrukturanalyse, Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Elektronenmikroskopie sowie ergänzend „*in silico*“-Methoden wie Molekulardynamik-Simulationen. Die vorliegende Arbeit befasst sich im Wesentlichen mit Methoden der hochauflösenden NMR in Flüssigkeiten, ergänzt durch andere biophysikalische Methoden. Alle angewendeten Methoden werden in Abschnitt 2.2 (S. 19 ff.) vorgestellt.

So beeindruckend der Aufbau der biomolekularen Maschinen in unserem Körper auch ist, ist er doch anfällig für fehlerhafte Strukturen. Die Strukturbiologie befasst sich daher nicht ausschließlich mit dem Verständnis physiologischer Abläufe sondern auch mit pathologischen Veränderungen. Die Erkenntnisse dienen der Diagnose von Krankheiten und als Grundlage zur Entwicklung von Medikamenten. Insbesondere durch die demographische Entwicklung in den Industrienationen - eine stetig steigende Lebenserwartung verbunden mit einer Erhöhung des Altersdurchschnittes der Bevölkerung bedingt automatisch auch einen Anstieg altersbedingter Krankheiten wie beispielsweise Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2, Krebs sowie vielfältiger Erkrankungen des Nervensystems^[2]. Viele Erkrankungen lassen sich auf Fehlfaltungen von Proteinen zurückführen, welche durch den Verlust der Funktion des betroffenen Proteins und/oder durch Bildung toxischer Strukturen charakterisiert sind^[3-6]. In einigen Fällen gelten diese fehlgefalteten Proteine sogar als infektiös. Diese

Prionenhypothese wurde von Stanley B. Prusiner 1982 postuliert^[7]. Während es dem damaligen Kenntnisstand der molekularen Genetik widersprach, ist diese Hypothese inzwischen anerkannt und wurde 1997 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin bedacht.

Als prominente Vertreter toxischer Proteinspezies gelten derzeit Amyloidfibrillen sowie deren Vorläuferstrukturen, deren Ablagerungen eine typische pathologische Veränderung bei zahlreichen Erkrankungen darstellen. Im Gegensatz zu nativ gefalteten Proteinen, deren Strukturen abhängig von der Aminosäuresequenz starke Unterschiede aufweisen, besitzen alle Amyloidfibrillen eine *Cross*- β -Struktur, also senkrecht zur Fibrillenachse ausgebildete β -Faltblätter^[8,9]. Obwohl amyloide Strukturen ins Zentrum vieler wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt sind und eine Vielzahl wissenschaftlicher Veröffentlichungen aus diversen Fachgebieten darüber existieren, ist der zugrundeliegende Mechanismus dennoch nicht vollständig aufgeklärt. Amyloidfibrillen bilden sich bei erhöhter Proteinkonzentration (durch gesteigerte Produktion oder verringerten Abbau) sowie bei erhöhter Neigung zur Fibrillierung, beispielsweise durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz oder der Umgebung des Proteins. Diese Möglichkeiten involvieren jeweils eine Fülle biochemischer Prozesse. Einige dieser Einflussfaktoren werden in dieser Arbeit untersucht.

Die Fibrillierung lässt sich vereinfacht in zwei Schritten beschreiben: Nach einer geschwindigkeitslimitierenden Nukleationsphase erfolgt während der Wachstumsphase eine Elongation der Fibrillen. Man geht davon aus, dass sich zunächst die Konformation der Polypeptide ändert und sich Oligomere bilden. Diese strukturieren sich zu Protofibrillen und bilden schließlich Amyloidfibrillen^[10,11].

Bei einigen Krankheiten wird diskutiert, welche dieser Spezies für die toxische Wirkung verantwortlich ist. Während zunächst fibrilläre Ablagerungen im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses standen, führte eine Reihe von Beobachtungen in den letzten Jahren zu einer Verschiebung hin zu oligomeren Zuständen. So treten sowohl bei Menschen als auch in Tiermodellen Krankheitssymptome bereits auf, bevor Amyloidablagerungen festgestellt werden können^[12,13]. Darüber hinaus korreliert der Schweregrad der Krankheit besser mit dem Anteil löslicher Aggregate im Gewebe als mit der Menge fibrillärer Plaques^[14-17]. Zahlreiche Studien belegen seitdem die erhöhte Toxizität oligomerer Zustände an verschiedenen Zell- und Tiermodellen^[18-33]. Dennoch sind auch toxische Effekte von Fibrillen bekannt^[34-44]. Aktuell kann somit nicht eindeutig

belegt werden, ob Amyloidfibrillen lediglich eine inerte oder gar Speicherform des jeweiligen Proteins darstellen oder maßgeblich an der Pathogenese beteiligt sind.

Während Amyloidfibrillen zunächst lediglich im Zusammenhang mit pathologischen Effekten auftraten, wurden inzwischen in verschiedenen Organismen auch funktionelle Amyloide bekannt. Diese dienen möglicherweise als Speicherform von Hormonen^[45,46], der Stabilisierung des Zytoskeletts der Zelle^[47-50] oder üben verschiedene Schutzfunktionen aus^[51-56].

Bisher ist weitgehend ungeklärt, warum manche Proteine Fibrillen bilden, andere dagegen nicht. Es existiert die Hypothese unter entsprechenden Bedingungen nahezu jedes Protein in eine amyloide Form umstrukturieren kann oder Sequenzabschnitte besitzt, welche Amyloidfibrillen bilden. Die Ursache hierfür stellt die hohe thermische Stabilität der *Cross-β*-Struktur dar, die Wahrscheinlichkeit hängt allerdings stark von der Aminosäuresequenz ab^[57-61].

In dieser Arbeit werden Amyloidfibrillen verschiedener Modellpeptide (Amyloid β , Parathormon und Serum Amyloid A) charakterisiert. Die drei Modellproteine unterscheiden sich unter anderem in ihrer nativen Struktur: Während das Amyloid β -Peptid intrinsisch entfaltet ist, besitzt das Parathormon sowohl einen α -helikalen als auch einen unstrukturierten Bereich^[62] und die Serum Amyloid A-Proteine sogar eine globuläre, α -helikale Struktur^[63]. Interessanterweise sind dennoch alle drei Modellproteine in der Lage, sich (anders) zu strukturieren und Amyloidfibrillen zu bilden. Darüber hinaus ist der aktuelle Stand der Forschung für die drei Modellpeptide sehr unterschiedlich: Während Amyloid β bereits Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Studien ist, ist über die Amyloidfibrillen von Serum Amyloid A und über die von Parathormon bisher wenig bekannt. Von diesem Kenntnisstand hängt auch die Art der geplanten Untersuchungen ab, die jeweiligen Ziele werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

1.2 Amyloidbildende Peptide und Proteine

1.2.1 Amyloid β (A β)

Morbus Alzheimer

Das Amyloid β Peptid (A β) ist bekannt durch seine Beteiligung an der Alzheimer Krankheit (AK). Diese neurodegenerative Erkrankung wurde erstmals im Jahr 1907 durch den deutschen Arzt Alois Alzheimer beschrieben^[64]. Typischerweise beginnt diese Erkrankung mit einer Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit, insbesondere des Kurzzeitgedächtnisses^[65-67]. Zusätzliche Symptome sind erhöhte Reizbarkeit und

zunehmende Aggression. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Verlust der Feinmotorik, Reduzierung des Sprachvermögens sowie Störungen des Langzeitgedächtnisses^[68-70] und schließlich dem Verlust existentieller Körperfunktionen. Nach einer Diagnose beträgt die mittlere Lebenserwartung 7 Jahre^[71]. Auch wenn es sich bei den Erkrankten beinahe ausschließlich um ältere Menschen zwischen dem 65. und 85. Lebensjahr handelt, stellt Morbus Alzheimer keine reine Alterskrankheit dar. Daher wird zwischen den Unterformen früh beginnender und seniler Alzheimer Krankheit unterschieden. Letztere ist häufig durch Mutationen auf den Genen für das Amyloid-Vorläufer-Protein APP oder Proteinen, welche Funktionen bei der Bildung oder dem Abtransport des Amyloid β -Peptides aufweisen, gekennzeichnet. Sie wird daher als vererbte familiäre Alzheimer Krankheit bezeichnet. Im Gegensatz hierzu herrscht über die Ursache der sporadischen Alzheimer Krankheit weitestgehend Unklarheit^[72-74].

Obwohl die Ursachen unterschiedlich sind, werden bei beiden Verlaufsformen extrazelluläre Amyloidplaques bestehend aus Amyloid β -Peptid^[75] und intrazelluläre Fibrillen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein beobachtet. In dieser Arbeit wird lediglich $A\beta$ untersucht. Dieses Peptid entsteht durch enzymatische Spaltung aus dem Membranprotein APP. Wird APP nicht durch die α -Sekretase innerhalb der $A\beta$ -Sequenz (nicht-amyloidogener Weg) geschnitten^[76,77], sondern durch die β -Sekretase^[78] und anschließend durch die γ -Sekretase^[79] führt dies zu einer Freisetzung von $A\beta$. Beide Sekretasen besitzen unterschiedliche Spaltstellen, so dass $A\beta$ -Peptide unterschiedlicher Längen gebildet werden können. Unter anderem entstehen die in dieser Arbeit untersuchte Hauptform mit 40 Aminosäuren ($A\beta_{1-40}$), N-terminal verkürzte Varianten (z. B. $A\beta_{3-40}$) als auch Varianten, welche am C-Terminus bis Aminosäure 39, 42 oder 43 ($A\beta_{1-39/42/43}$) reichen^[13,80].

Als Ursache für vermehrte Ablagerung von Amyloidfibrillen kommen eine erhöhte proteolytische Prozessierung von APP, verändertes Aggregationsverhalten durch Mutationen, posttranslationale chemische Modifikation oder veränderte chemische Umgebung, Interaktion mit anderen Biomolekülen, sowie verringerter Abbau von $A\beta$ in Frage^[81]. In dieser Arbeit wird der Einfluss verschiedener Fibrillierungsbedingungen, Modifikationen der $A\beta$ -Peptidsequenz sowie der Einfluss der Interaktion einer PPIase auf Bildung und Struktur der Amyloidfibrillen untersucht.

Strukturmodelle

Eine einheitliche Sekundärstruktur der Fibrillen aus A β wurde bisher nicht gefunden. Typischerweise werden in der Literatur zwei β -Faltblattstränge beschrieben, deren exakte Position in der Aminosäuresequenz je nach verwendeter Untersuchungsmethode und experimentellen Bedingungen variiert (vgl. z. B. Abbildung 27, S. 70). Uneinigkeit herrscht zudem über die Existenz eines dritten Faltblattes im Bereich der N-terminalen Aminosäuren E3 bis D7. Auch bezüglich der Tertiär- und Quartärstruktur existieren verschiedene Modelle, welche sich deutlich unterscheiden. Exemplarisch sind in Abbildung 1 drei Strukturvorschläge dargestellt. Am häufigsten wird eine β -Haarnadel-Struktur beschrieben, wobei sich die beiden langen β -Faltblattstränge parallel zueinander und senkrecht zur Fibrillenachse anordnen (Abbildung 1A)^[82-84] Diese Sekundärstruktur bildet sich aufgrund von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen (Salzbrücke zwischen K28 und D23). Die Fibrillenstruktur wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Faltblättern verschiedener Peptide stabilisiert. Es existieren jedoch auch Strukturmodelle mit dreizähliger Symmetrie basierend auf Festkörper-NMR- und Elektronenmikroskopie-Untersuchungen (Abbildung 1B)^[41,85,86]. Die Sekundärstruktur besteht auch hier aus einem β -Haarnadel-Motiv, jedoch häufig mit wesentlich kürzeren β -Faltblattabschnitten.

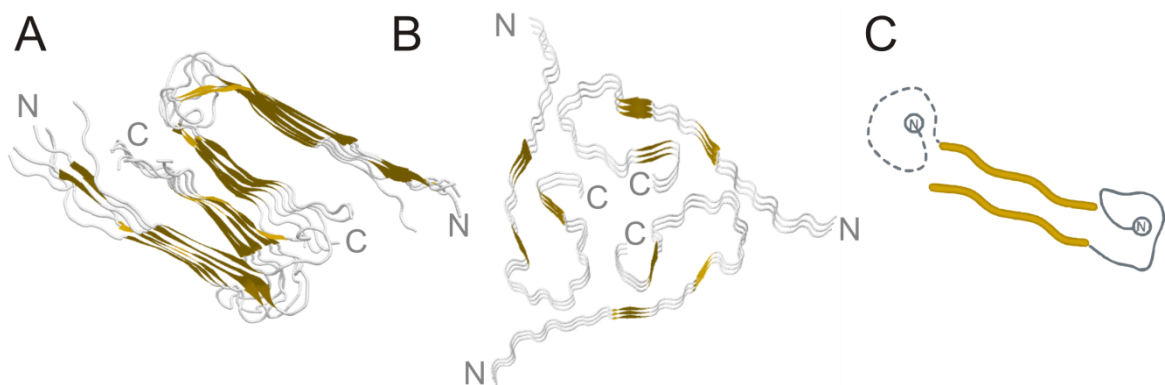


Abbildung 1: Strukturmodelle von A β ₁₋₄₀ Fibrillen. Die Fibrillenachse ist jeweils senkrecht zur Seite orientiert, die ockerfarbenen Pfeile repräsentieren die *Cross*- β -Struktur, also die β -Faltblätter, welche sich zwischen den A β Molekülen ausbilden. Es existieren NMR-Strukturen mit zweizähliger Symmetrie (A: PDB-2LMN) und dreizähliger Symmetrie (B: PDB-2M4J) sowie ein Strukturmodell basierend auf Kryoelektronenmikroskopie-Aufnahmen (C: Sachse *et al.*^[87]).

In Abbildung 1C ist ein Strukturmodell basierend auf Kryoelektronenmikroskopie-Daten dargestellt. Dieses unterscheidet sich von den anderen Modellen, da anstelle der U-Form eine gestreckte Form der Peptide mit jeweils nur einem β -Faltblattstrang angenommen wird. Die Struktur wird statt durch intramolekulare Wechselwirkungen ausschließlich durch Wechselwirkungen mit den Seitenketten eines zweiten Peptides stabilisiert und die Fibrille durch Stapel solcher Dimere aufgebaut^[87]. Auch Festkörper-NMR-Untersuchungen

unterstützen ein solches Dimer-Modell^[88]. Der N-terminale Bereich (Aminosäure D1 und A2) wird übereinstimmend als überwiegend flexibel und unstrukturiert beschrieben.

Einfluss der Fibrillierungsbedingungen auf die Fibrillenstruktur

Die verschiedenen Strukturmodelle resultieren womöglich aus unterschiedlichen Analysemethoden. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass sich die A β -Peptide zu unterschiedlich strukturierten Fibrillen zusammenlagern. Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von Fibrillen, welche unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gebildet wurden, zeigen häufig Fibrillen mit sehr heterogenen Morphologien. Aber auch unter identischen Fibrillierungsbedingungen entstehen häufig unterschiedliche Filamente. Dieser sogenannte Polymorphismus wurde für eine Vielzahl amyloider Fibrillen beobachtet und kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kommt eine unterschiedliche Tertiärstruktur der einzelnen Peptide in Frage und zum anderen eine unterschiedliche Anzahl oder räumliche Anordnung der Protofilamente^[41,89-93].

Diese Beobachtungen implizieren, dass sich möglicherweise *in vitro* gebildete Fibrillen signifikant von den Amyloidablagerungen im Gehirn der Patienten unterscheiden könnten. Es existieren widersprüchliche Aussagen darüber, ob *in vitro* gebildete Fibrillen typische Eigenschaften besitzen, beispielsweise die Fähigkeit, Amyloidablagerungen in Mausmodellen zu beschleunigen (*Seeding*)^[94,95]. Solche Unterschiede würde die Relevanz aller Untersuchungen *in vitro* deutlich schmälern. Ein experimenteller Ansatz, physiologische Bedingungen zu imitieren, stellt die Untersuchung amyloider A β -Strukturen aus bakteriellen Einschlusskörpern dar^[96]. Hier konnten *on-pathway* Intermediate nachgewiesen werden. Durch weitere *in vitro* Inkubation erzeugte Amyloidfibrillen unterscheiden sich nicht signifikant von rein *in vitro* gebildeten Fibrillen^[96]. Frühere Festkörper-NMR-Studien^[41,85,97,98] befassten sich ebenfalls mit dieser Thematik, konnten diese Frage jedoch nicht eindeutig klären. Für diese Untersuchungen wurden Fibrillen aus dem Gehirn von zwei Patienten extrahiert und als *Seeds* für isotonenmarkiertes A β verwendet. Für beide Patienten wurden zwei verschiedene Fibrillenmorphologien mit geringfügig unterschiedlichen Anteilen beobachtet. Rein *in vitro* gebildete Fibrillen wiesen dagegen einen ausgeprägteren Polymorphismus auf^[97]. In einer weiteren Arbeit mit einem leicht modifizierten Extraktionsprotokoll konnten auch Unterschiede zwischen den Fibrillenstrukturen verschiedener Patienten festgestellt werden^[85].

In dieser Arbeit wird diese Thematik durch den Vergleich unterschiedlicher Fibrillierungsbedingungen auf die Struktur der Monomereinheiten in den Fibrillen adressiert. Dafür werden Fibrillen in Zerebrospinalflüssigkeit, Phosphatpuffer und Zellkultur erzeugt und anschließend unter identischen Bedingungen mittels H/D-Austausch untersucht.

Pyroglutamatmodifiziertes Amyloid β_{3-40} (pA β_{3-40})

Obwohl der N-Terminus in den bisher publizierten Strukturmodellen der Amyloidfibrillen als eher unstrukturiert beschrieben wird, scheint er dennoch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit zu spielen. In den amyloiden Plaques wurden beispielsweise N-terminal modifizierte Peptide nachgewiesen. A β A2V steht in Zusammenhang mit vererbbarer familiärer Alzheimer Krankheit, während A β A2T vor der Erkrankung schützt^[99-101].

Darüber hinaus ist ein signifikanter Anteil der als Amyloid abgelagerten Peptide N-terminal verkürzt und pyroglutamatmodifiziert (pE-modifiziert)^[102-107]. Über deren Einfluss auf die Kinetik der Fibrillierung existieren unterschiedliche Beobachtungen: Während in den meisten Studien von einer beschleunigenden Wirkung der pE-Modifizierung die Rede ist^[103,108-110], gehen andere von einer inhibitorischen Wirkung aus^[111]. Desweiteren wurde die Bildung kleinerer, toxischerer Aggregate nachgewiesen^[109,110,112,113]. Auch von unterschiedlichen Effekten abhängig vom C-Terminus (pA β_{3-40} bzw. 42) wurde berichtet^[114].

Der Einfluss der oben genannten N-terminalen Modifikation auf die molekulare Architektur wurde in dieser Arbeit untersucht.

Untersuchung von A β mit Punktmutationen

Zum Verständnis des lokalen Einflusses bestimmter Wechselwirkungen wird häufig die Auswirkung von gezielten Punktmutationen auf die Funktion, Struktur und Dynamik von Peptiden und Proteinen untersucht. Für A β wurde beispielsweise bereits ein systematischer Alanin-^[115] und Prolin-Scan^[116] durchgeführt. Darüber hinaus sind einige krankheitsrelevante Mutationen in Zusammenhang mit vererbaren Formen der Alzheimer Krankheit bekannt. Diese betreffen neben einigen N-terminalen Aminosäuren (A2T^[117], A2V^[118], H6R^[119], D7N^[120]) vor allem Aminosäuren im Kern der *Cross- β* -Struktur (A21G^[121], E22K^[122], E22Q^[123], E22G^[124] und E22 Δ ^[125], D23N^[126]). Außerdem ist eine Variante an Position 34 (L34V^[127]) bekannt. Der Einfluss dieser Mutationen auf die Fibrillierung lässt indirekt Rückschlüsse auf oligomere Zustände und reife Fibrillen zu. Um

ein grundlegendes Verständnis des Fibrillierungsprozesses zu erzielen, wird in dieser Arbeit der Einfluss lokaler Veränderungen auf die Fibrillierungskinetik und Fibrilleneigenschaften untersucht. Hierfür wurden die Aminosäuren Phenylalanin 19 und Leucin 34 ausgewählt, da diese in der fibrillären Struktur einen hydrophoben Kontakt bilden. Die untersuchten Peptide sind in Abbildung 2 aufgelistet. Trotz der zahlreichen Strukturmodelle von A β Fibrillen, welche sich in vielen Details unterscheiden, herrscht überwiegend Konsens über den hydrophoben Kontakt dieser Aminosäuren^[82,84,86,128,129].

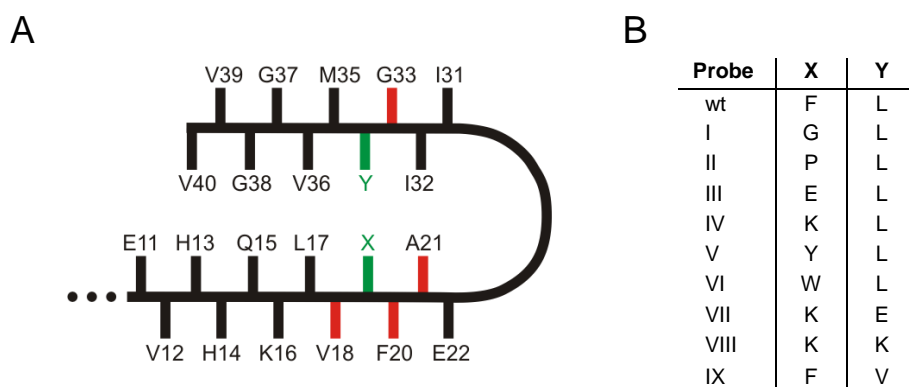


Abbildung 2: Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten A β ₁₋₄₀ Varianten. A: Schematische Darstellung der isotopenmarkierten Aminosäuren für die Festkörper-NMR-Untersuchungen (rot) und des hydrophoben Kontaktes zwischen Aminosäure 19 und 34 (grün). Dieser wird durch die in B aufgelisteten Mutationen untersucht. Abbildung nach Ref.^[130].

Der Einfluss der Varianten I-VIII wurde bereits untersucht^[130]. Mit diesen Varianten kann der Einfluss struktureller Flexibilität (F19G und F19P), elektrostatischer Wechselwirkungen (F19K, F19E, F19K L34E und F19K L34K) sowie des Wasserstoffbrückennetzwerkes (F19Y, F19W) bestimmt werden. Eine einzige Punktmutation hat zwar Einfluss auf die Kinetik der Fibrillenbildung, nicht aber auf die Morphologie der Fibrillen. Auch das Einbringen von zwei repulsiven Ladungen (F19K L34K) anstelle des hydrophoben Kontaktes unterdrückt die Fibrillierung nicht. Die geladenen Aminosäuren ragen vermutlich aus dem Kern der Fibrille heraus. Lediglich zwei sich anziehende Ladungen (F19K L34E) führen zu einer Unterdrückung der Fibrillierung für mindestens zwei Monate. Mit dieser Variante sollte untersucht werden, ob der hydrophobe Kontakt durch eine Salzbrücke ersetzt werden kann. Vermutlich stabilisiert aber diese Salzbrücke die monomere Struktur und führt so zu einer höheren Energiebarriere für die Fibrillenbildung. Die Stabilität der Monomere könnte auch die unterschiedlichen *Lag*-Zeiten der anderen Varianten erklären. Der Einfluss der Punktmutationen auf die Monomere wurde im Rahmen einer von mir betreuten Bachelor-Arbeit untersucht^[131].

Interaktion mit Chaperonen

Chaperone, also Proteinfaltungshelfer, interagieren spezifisch mit aggregationsanfälligen Proteinen und beschleunigen die korrekte Faltung. Somit stellen sie einen Abwehrmechanismus gegen fehlgefaltete, zur Aggregation neigende Proteine dar. In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen verschiedenen molekularen Chaperonen und Amyloidablagerungen im Gehirn von AK-Patienten hergestellt. Die Hitzeschockproteine α B-Kristallin, Hsp20 und HspB8 werden beispielsweise im Gehirn von AK-Patienten überexprimiert^[132]. Sie schützen zerebrovaskuläre Zellen vor A β , vermutlich indem sie die Aggregation an der Zelloberfläche inhibieren^[133,134]. Die Interaktion zwischen α B-Kristallin und A β wurde bereits NMR-spektroskopisch charakterisiert^[135,136]. Ähnliche Effekte wurden kürzlich für Brichos-Domänen^[137] und sorLA^[138] beschrieben.

Cyclophiline gehören zur den Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen (PPIasen). In dieser Arbeit wurde das mitochondriale Cyclophilin D (CypD) untersucht. Dieses besitzt neben der PPIase-Aktivität noch folgende Aufgaben: Es bindet die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA), FK506 sowie Rapamycin und steuert außerdem die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore^[139]. Die Öffnung dieser Pore führt zu Ca²⁺ Einstrom, osmotischer Schwellung und schließlich zum Zelltod^[140-142]. Die Inhibierung von CypD blockiert die Permeabilitätspore, schützt somit die Zellen vor mitochondrialer Dysfunktion und stellt folglich einen erfolversprechenden Therapieansatz bei Ischämie, Reperfusionsschäden und neurodegenerativen Erkrankungen dar^[143-149]. Die Fehlfunktion von Mitochondrien wurde auch im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit beobachtet^[150-154]. Studien an Patienten und Mäusen weisen darauf hin, dass A β sich bereits vor der Bildung extrazellulärer Plaques in Mitochondrien akkumuliert und multiple Effekte auslöst^[155-161]. Dazu zählen unter anderem die Störung der Atmungskette in den Mitochondrien sowie die Senkung von deren Membranpotential^[162].

Die Wechselwirkung zwischen A β und CypD wurde *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen^[163]. Die Abwesenheit von CypD schützt Nervenzellen und führt in Alzheimer-Mausmodellen zu verbesserten Lern- und Gedächtnisleistungen^[163-165]. Diese Daten implizieren, dass die Wechselwirkung von A β und CypD mitochondrialen, neuronalen und synaptischen Stress verstärkt und schließlich zur Schädigung von Neuronen sowie Entwicklung der spät beginnenden AK führt^[162,166,167]. Folglich könnte die Inhibierung von CypD auch bei der Alzheimerschen Erkrankung einen therapeutischen Ansatz darstellen.

Die Interaktion zwischen A β und CypD auf molekularer Ebene, sowie das Fibrillierungsverhalten von A β in Gegenwart von CypD wurde in Zusammenarbeit mit der

Forschungsgruppe von Dr. Cordelia Schiene-Fischer (Department für Enzymologie, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bzw. früher Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) sowie Marcus Fändrich (Institut für Pharmazeutische Biotechnologie, Universität Ulm bzw. früher Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) untersucht.

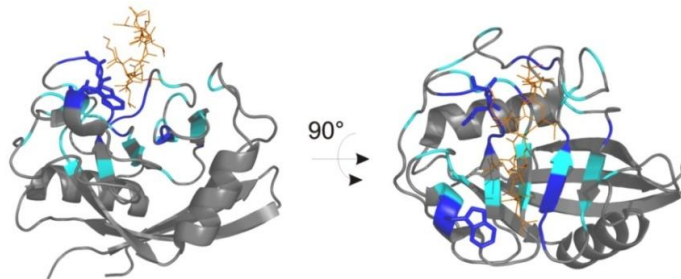


Abbildung 3: Die Interaktion zwischen CypD und A β ₁₋₄₀ erfolgt im aktiven Zentrum von CypD. Dargestellt ist die Röntgenkristallstruktur des CypD-Cyclosporin A-Komplexes^[168]. Die Bindung von Cyclosporin A (orange) erfolgt im aktiven Zentrum von CypD (grau/blau)^[168]. Die an der Bindung von A β ₁₋₄₀ beteiligten Aminosäuren (blau starke bzw. türkis schwache Änderung der chemischen Verschiebung im ¹H-¹⁵N-HSQC-NMR-Spektrum) befinden sich ebenfalls im aktiven Zentrum von CypD^[169,170].

Im Rahmen meiner Diplomarbeit^[170] konnte bereits die Interaktionsstelle von A β im aktiven Zentrum von CypD lokalisiert werden (Abbildung 3) und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren von A β , K16-D23 lokalisiert werden. Der molekulare Mechanismus und die Dynamik der Interaktion werden im Rahmen dieser Arbeit weiter charakterisiert^[169].

1.2.2 Serum Amyloid A (SAA)

Ein weiteres Modellprotein für die Charakterisierung amyloider Fibrillen stellt das Serum Amyloid A (SAA) dar. Die SAA Proteine wurden sowohl in wirbellosen Tieren als auch in Vertebraten nachgewiesen^[171]. Evolutionär derartig konservierte Proteinsequenzen üben meist entscheidende Funktionen aus. Die im Wesentlichen in der Leber produzierten SAA-Proteine gehören zu den Apolipoproteinen^[172] und transportieren somit hydrophobe Lipide wie beispielsweise Cholesterin im Blut. Darüber hinaus sind sie an der Rekrutierung von Immunzellen zu Entzündungsherden und der Aktivierung von Enzymen, welche die extrazelläre Matrix verdauen, beteiligt^[171,173].

Man unterscheidet anhand des Zeitpunktes der SAA-Sekretion zwischen zwei Hauptgruppen, welche sich wiederum in verschiedene Unterformen aufteilen. In der Akutphase einer entzündlichen Erkrankung werden die Akutphasen-Proteine SAA1 bis 3 überexprimiert. Ihre Konzentration im Blutplasma steigt von ca. 3mg/ml bei gesunden 10 |

Menschen auf über 2000 mg/ml an. Das konstitutive SAA (SAA4) wird immer nur in geringeren Mengen gebildet. Fragmente einiger Akutphasen-SAA-Proteine bilden in der Folge chronischer Entzündungen Amyloidablagerungen in der Leber, Milz, dem Gastrointestinaltrakt, dem Herzen oder der Niere. Die Symptome dieser AA-Amyloidose variieren abhängig vom Ablagerungsort^[174-176].

Die Nomenklatur ist häufig Anlass für Irrtümer und wurde 1999 neu festgelegt^[177]. Diese Arbeit befasst sich mit Fibrillen des SAA1.1 der Maus (mSAA1.1), dessen Fragmente die Hauptbestandteile der Fibrillen bei AA-Amyloidosen sind^[178]. Dieses Protein ist insofern besonders interessant, da es sich lediglich in neun bzw. fünf Aminosäuren von mSAA2.1 bzw. mSAA2.2 unterscheidet (s. Abbildung 4), welche *in vivo* und *in vitro* resistent gegen Amyloidbildung sind^[179]. Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz wurden in Abbildung 4 farbig hervorgehoben. Sie korrelieren nicht direkt mit den Bereichen in denen eine höhere Aggregationswahrscheinlichkeit aus der Aminosäuresequenz berechnet wird^[180].

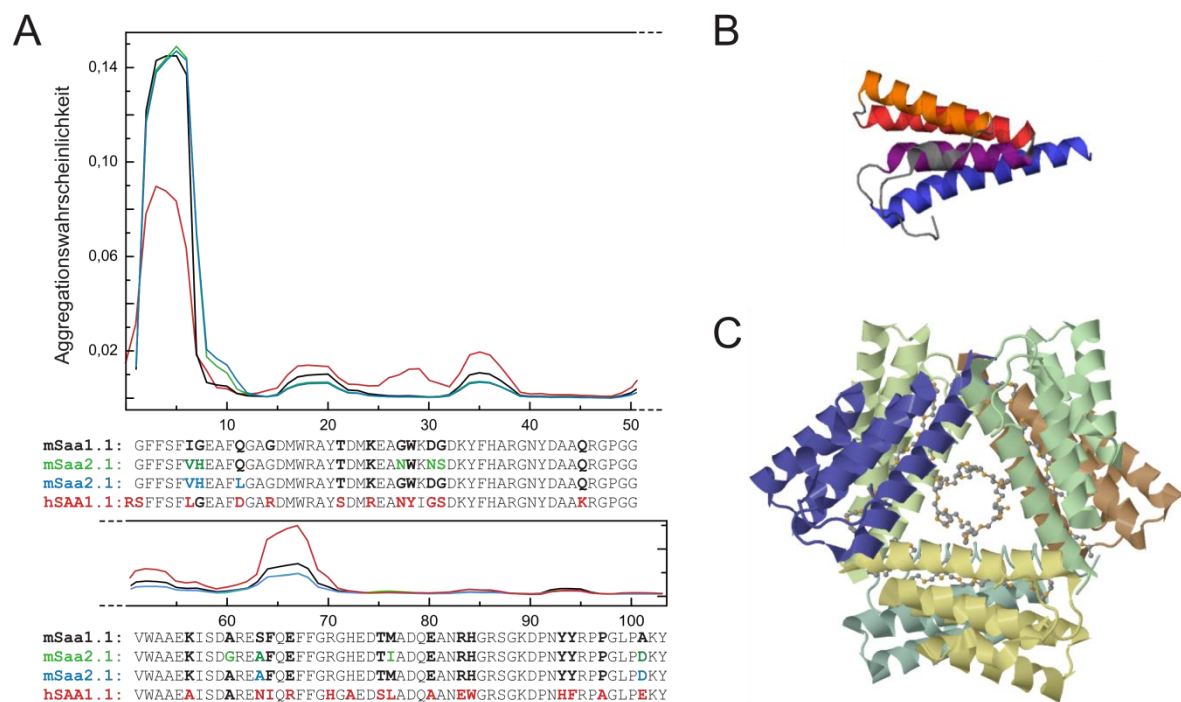


Abbildung 4: Aggregationswahrscheinlichkeit und Struktur von Serum Amyloid A-Proteinen.

A: Aggregationswahrscheinlichkeit der drei murinen SAA Varianten mSAA1.1 (schwarz), mSAA2.1 (grün) und mSAA2.2 (blau) sowie des humanen SAA1.1 (rot) berechnet nach dem PASTA2.0-Algorithmus^[180] über der Aminosäuresequenz. Eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht hauptsächlich für die Aminosäuren 1-8, die Bereiche 15-21, 33-38, 49-55, 62-68 sowie 91-96 weisen ebenfalls leicht erhöhte Wahrscheinlichkeiten auf. Zwischen den mSAA-Varianten sind nur geringfügige Unterschiede festzustellen, welche überraschenderweise nicht im Bereich der Mutationen liegen (farbig hervorgehoben). Die Aggregationswahrscheinlichkeit des hSAA 1.1 ist für die N-terminalen Aminosäuren 1-8 vergleichsweise geringer, für alle anderen vorhergesagten Bereiche dagegen höher als die der murinen Varianten. Zusätzlich wird eine höhere Aggregationswahrscheinlichkeit für die Aminosäuren 25-32 berechnet. B, C: Kristallstrukturen des humanen SAA1.1 (PDB 4IP8 und 4IP9)^[63]. In B ist ein Monomer dargestellt, während in C die native Form als Hexamer abgebildet ist.

Diese Vorhersage konnte bisher allerdings noch nicht verifiziert werden, da für dieses Protein bisher kein Strukturmodell der Amyloidfibrillen verfügbar ist. Lediglich für die humane Variante hSAA1.1, welche sich in 27 Aminosäuren (26%) von der murinen Variante unterscheidet, existieren Röntgenkristallstrukturen der monomeren und hexameren Form (s. Abbildung 4B und C^[63]). Der Nachweis C-terminal verkürzter Fragmente dieses Proteins (1-50/64/76/80/89)^[181] in Amyloidablagerungen *in vivo* sowie die Untersuchung der Fibrillierungseigenschaften von Varianten (G8D, Δ1-11)^[182] und Fragmenten (1-27, 32-40, 32-48, 50-71 und 73-88)^[63] des hSAA1.1 dienen als Indiz für die Bedeutung der N-terminalen Aminosäuren bei der Bildung von Amyloidfibrillen. Strukturelle Informationen über diese toxischen Fibrillen sind sowohl medizinisch als auch für das grundlegende mechanistische Verständnis relevant. Ziel dieser Arbeit ist, die lösungsmittel-exponierten und -geschützten Bereiche mittels NMR-detektiertem Amidprotonenaustausch zu lokalisieren.

1.2.3 Parathormon (PTH)

Als drittes Modellprotein dient das humane Parathormon. Die physiologische Aufgabe dieses Hormons stellt die Regelung der Kalzium- und Phosphatkonzentration im Blut dar. Dies geschieht unter anderem durch indirekte Stimulierung der Osteoklasten und damit des Knochenabbaus^[183]. In den Nebenschilddrüsen wird zunächst ein aus 115 Aminosäuren bestehendes Präkursor-Protein gebildet. Die beiden Signalsequenzen am N- und C-Terminus sind erforderlich, um das Protein effektiv zum Endoplasmatischen Retikulum^[184,185] und anschließend zum Golgiapparat^[186] zu transportieren und werden danach direkt proteolytisch abgespalten^[187,188]. Das mature Parathormon 1-84 (PTH₁₋₈₄) wird bis zur Freisetzung ins Blut, welche bei Anstieg der Phosphatkonzentration oder Abnahme der Ca²⁺ Konzentration erfolgt, in sekretorischen Granulae gespeichert^[184]. In diesen Granulae liegen häufig sehr hohe Proteinkonzentrationen vor, was zu einer Zusammenlagerung der Proteine führen kann. Manche Hormone, darunter Insulin^[189], Glucagon^[189] und PTH^[190], sind in der Lage *in vivo* oder *in vitro* unter bestimmten Bedingungen Amyloidfibrillen zu bilden^[46]. In der Literatur wird beschrieben, dass einige Hormone in den Granulae in Form von funktionellen Amyloiden gelagert werden^[46].

PTH₁₋₈₄ lässt sich gut in größeren Mengen herstellen und stellt somit ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der Fibrillierung dar. In dieser Arbeit wurde untersucht, unter welchen Bedingungen PTH₁₋₈₄ *in vitro* Amyloidfibrillen bildet und inwiefern diese Fibrillen als Speicherform des Hormons in Frage kommen. Der Fibrillenkern wird mittels

H/D-Austausch-Experimente lokalisiert. Außerdem werden weitere strukturelle und dynamische Untersuchungen durchgeführt werden.

1.3 Aufgabenstellung und Ziele

Das Ziel dieser Arbeit ist die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Amyloidfibrillen verschiedener Modellpeptide mittels biophysikalischer Methoden. Als Modellpeptide standen Amyloid β , Parathormon und Serum Amyloid A zur Verfügung. Diese unterscheiden sich unter anderem in ihren Strukturen, dem jeweiligen Stand der Forschung und ihrer (patho)physiologischen Bedeutung. Daraus ergeben sich jeweils unterschiedliche Untersuchungsmethoden und Ziele:

Aufgrund der Bedeutung des A β -Fibrillen in Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit ist dieses Peptid Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Studien. Die strukturellen Untersuchungen wurden jedoch überwiegend an *in vitro* gebildeten Fibrillen durchgeführt, welche sich möglicherweise von *in vivo* Fibrillen unterscheiden. Diese Frage sollte hier durch die Untersuchung von Fibrillen, welche unter physiologischeren Bedingungen (in Zerebrospinalflüssigkeit bzw. in Zellkultur) gebildet wurden, beantwortet werden. Die Bedeutung bestimmter Aminosäuren bzw. lokaler Wechselwirkungen wird über Varianten von A β ermittelt. Dies beinhaltet zum einen die pathophysiologisch relevante Variante pA β_{3-40} und zum anderen Varianten mit Punktmutationen. Letztere wurden basierend auf den vorhandenen strukturellen Daten in der Literatur entworfen, um den Einfluss lokaler Wechselwirkungen auf die unterschiedlichen Spezies von A β (Monomere, Fibrillen) zu untersuchen.

Im Gegensatz zu A β existieren zu den SAA- und PTH-Fibrillen relativ wenig bzw. noch keine strukturellen Untersuchungen in der Literatur. Das Ziel der vorliegenden Arbeit stellt die Bestimmung des jeweiligen Fibrillenkerns mittels H/D-Austausch dar.

Amyloidfibrillen aus PTH wurden bereits 1976 beschrieben^[190], seither aber nicht genauer untersucht. Die detaillierte Charakterisierung ist Teil dieser Arbeit. Der Einfluss verschiedener *in vitro* Bedingungen auf die Kinetik der Fibrillierung sowie die Morphologie der Fibrillen sollte untersucht werden. Eine Voraussetzung für PTH Fibrillen als Speicherform ist, dass sich monomeres PTH wieder von der Fibrille ablösen kann. Dieser Prozess sollte thermodynamisch untersucht werden. Der chemische Austausch zwischen monomerem PTH und Amyloidfibrillen sollte mittels NMR quantifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Proteine und NMR-Proben

In dieser Arbeit werden folgende Proteine verwendet:

- humanes Amyloid β_{1-40} ($A\beta_{1-40}$, zur Verfügung gestellt von AG Fändrich, Institut für Pharmazeutische Biotechnologie, Universität Ulm bzw. früher Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle)
- pyroglutamatmodifiziertes Amyloid β_{3-40} ($pA\beta_{3-40}$, zur Verfügung gestellt von AG Fändrich bzw. von der Außenstelle Halle für Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung MWT bzw. Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI Leipzig, Biozentrum, Halle)
- Varianten des humanen Amyloid β_{1-40} Peptides, selbst rekombinant hergestellt bzw. mittels Proteinsynthese hergestellt und zur Verfügung gestellt von AG Huster (Institut für Medizinische Physik, Universität Leipzig)^[130,191]
- mitochondriales Cyclophilin D (CypD, zur Verfügung gestellt von AG Schiene-Fischer, Department für Enzymologie, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bzw. früher Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle)
- Parathormon PTH_{1-84} (selbst rekombinant hergestellt)
- Serum Amyloid A (zur Verfügung gestellt von AG Fändrich)

Sofern nicht explizit anders erwähnt, werden ausschließlich rekombinant erzeugte Peptide und Proteine untersucht.

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (>99%), ^{13}C -Glukose (>99%)	Euriso-Top (Cambridge, UK)
6x MassRuler DNA Loading Dye	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D)
BME Vitamine, Guanidiniumchlorid (GdnHCl), Coomassie Brilliant Blue G, Lysozym aus Hühnereiweiß, d-TFA (>99,5% D), L-Pyroglutaminsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Extran, Glycerin Pepton aus Casein	Merck KgaA (Darmstadt, D)
D-Glukose- $^{13}\text{C}_6$ (>99% ^{13}C , > 97% D)	Isotec, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
D_2O (>99,8%)	CortecNet (Voisins Le Bretonneux, F)
d_6 -DMSO (<0,02% H)	C.E.A Sacley (Gif-sur-Yvette, F)
DNA-Oligonukleotide (100 pmol/ μl)	biomers.net GmbH (Ulm, D)
DPN1, Fast-Digest-Puffer, PEG-6000, Lambda DNA/Eco130I (StyI)	Fermentas (Waltham, MA, USA)
IPTG	Gerbu (Gaiberg, D)
T4-Ligase, T4-Ligase-Puffer, MgCl_2 -Lösung, T7-Primer, Unstained Low Range Protein Ladder, GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific GmbH (Schwerte, D)
Taq-Polymerase, Taq-Puffer	Jena Bioscience (Jena, D)
Turbo-Pfu-Polymerase, Turbo-Pfu-Puffer, Nukleotide	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Uranylacetat	Plano GmbH (Wetzlar, D)

Sofern nicht anders angegeben stammen alle Chemikalien von Roth (Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, D). Zur Reinigung benötigte Pufferlösungen werden über einen Membranfilter mit 0,22 µm Porengröße filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Die SUMO-Protease ULP1 steht innerhalb der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Sie wurde wie beschrieben hergestellt^[192].

2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Produktion von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli*-Stamm TOP10 eingesetzt, während die Proteinexpression in den beiden weiteren in Tabelle 2 aufgelisteten Stämmen erfolgte.

Tabelle 2: Eingesetzte Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lac</i> X74 <i>recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	B F <i>dcm ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^+$), <i>galY</i> (DE3)	Stratagene (Heidelberg, D)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) CodonPlus® RIL	F- <i>ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>dcm</i> +Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> The [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	Agilent Technologies Corp. (Santa Clara, USA)
<i>Escherichia coli</i> RV308 (DE3)	Δ (<i>lac</i>) χ 74 <i>galPO-308::IS2 rpsL</i> ^[193]	DSMZ GmbH (Braunschweig, D)

Folgende Plasmide wurden zur Expression der jeweiligen Proteine eingesetzt:

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

pMALC2TEVhA β	Plasmid für humanes A β ₁₋₄₀ an Maltosebindeprotein gebunden, enthält Ampicillin-Resistenz	zur Verfügung gestellt von AG Fändrich
pET SUMOadapt	Plasmid für Ubiquitin-ähnliches Protein Smt3p aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ., enthält Kanamycin-Resistenz, der pETSUMO-Vektor der Firma Invitrogen wurde um eine kurze DNA-Sequenz als <i>multiple cloning site</i> erweitert	zur Verfügung gestellt von E. Bosse-Doenecke ^[194]
pRK793	Plasmid für TEV-Protease (S219V) ^[195]	Addgene (Cambridge, USA)

2.1.4 Nährmedien

Die Nährmedien wurden bei 121 °C und 1bar Überdruck für 20 Minuten dampfsterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde das jeweilige Antibiotikum mit einer Endkonzentration von 300 µg/ml (Ampicillin, Carbenicillin, Chloramphenicol), bzw. 30 µg/ml (Kanamycin), zugegeben. In Tabelle 4 sind die Zusammensetzungen der Nährmedien aufgeführt:

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

dYT-Vollmedium:	16 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro 1 l H ₂ O	
feste Nährböden	dYT-Medium mit 1,5 % (m/V) Agar-Agar	
Kryostocks	700 µl Glycerol (87 %) autoklaviert 300 µl Zellsuspension aus Übernachtskultur	
M9 Minimalmedium	200 ml	5xM9
	775 ml	H ₂ O
	2 ml	TS2-Lösung
	2 ml	1M MgSO ₄
	1 ml	0,1M CaCl ₂
	1 ml	10mM Fe(III)citrat (sterilfiltriert)
	20 ml	20 % (m/V) Glukose (sterilfiltriert) bzw. 10 % (m/V) bei ¹³ C-Markierung
5xM9	85 g	Na ₂ HPO ₄ •12 H ₂ O
	15 g	KH ₂ PO ₄
	2,5 g	NaCl
	5 g	NH ₄ Cl
	pro 1 l	H ₂ O
TS2-Lösung	20 mg	ZnSO ₄ •7 H ₂ O
	6 mg	MnCl ₂ •4 H ₂ O
	60 mg	H ₃ BO ₃
	40 mg	CoCl ₂ •6 H ₂ O
	4 mg	NiCl ₂ •6H ₂ O
	2 mg	CuCl ₂ •2H ₂ O
	180 mg	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O
	4 mg	NiCl ₂ •6H ₂ O
	pro 200 ml	H ₂ O
MSMCHP2-Minimalmedium ^[196]	100 ml	10xMSMCHP2
	875 ml	H ₂ O
	5 ml	1M MgSO ₄
	20 ml	40 % (m/V) Glukose (sterilfiltriert)
	500 µl	200 mg/ml Thiamin (sterilfiltriert)
10xMSMCHP2	146 g	KH ₂ PO ₄
	40,72 g	NaH ₂ PO ₄ •2 H ₂ O
	20 g	Na ₂ SO ₄
	29,6 g	NH ₄ Cl
	20 ml	Spurenelementelösung
	pro 1 l	H ₂ O
Spurenelementelösung	20,1 g	Na ₂ - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
	16,7 g	FeCl ₃ x 6 H ₂ O
	0,74 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	0,24 g	CoSO ₄
	0,085 g	ZnCl ₂
	0,065 g	CaCl ₂
	0,142 g	MnCl ₂
	pro 1 l	H ₂ O

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

NMR-Röhrchen (5 mm)	New Era (Vineland, NY, USA)
Dialysesystem QuixSep (500 µl, 100 µl)	scienova GmbH (Jena, D)
Falcon-Röhrchen	TPP (Trasadingen, CH)
GelPrep Kit, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, D)
3,05mm Kupfernetzchen (unbeschichtet bzw. kohlenstoff- bedampft, mit Formvarfilm überzogen), Micafilm	Plano GmbH (Wetzlar, D)
Konzentratoren VivaSpin 15R (5000 MWCO)	Sartorius (Aubagne Cedex, F)
Mikrotiterplatten (F-Bottom, Chimney Well, µClear®, 96 Well, Black) & Ampliseal™ (Transparente Mikrotiterplatten Abdeckfolie)	Greiner Bio One (Kremsmünster, A)
Millipore-Sterilfilter (Porengrößen 0,45 µm und 0,22 µm)	Millipore (Bedford, USA)
NMR-Probenröhrchen	New Era Enterprises Inc. (Vineland, USA)
Pipetten, Pipettenspitzen	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Plasmid Mini-Prep Kit	Jena Bioscience (Jena, D)
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil®	Hellma (Mühlheim, D)
Spectro/Por-Dialyseschläuche (Ausschlussgrenze 3000 Da) und Klammern	Spectrum (L.A., CA, USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit 250	Qiagen (Hilden, D)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, D)

2.1.6 Geräte und Software

Tabelle 5 und Tabelle 6 enthalten eine Auflistung der verwendeten Geräte beziehungsweise Software.

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Agarose-Gelelektrophorese:	
Mini Gel Caster	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Äkta Purifier, FPLC und Prime	GE Healthcare (München, D)
Autoklav LTA 275	Zirbus technology GmbH (Linden, D)
Autoklav VX-95	Systec (Wettenberg, D)
Brutschrank	Heraeus (Hanau, D)
Dampfsterilisator Omega Media 5l	Prestige Medical (Blackburn, UK)
DiliPhotometer OD600	Implen GmbH (München, D)
Eppendorf MasterCycler personal	Eppendorf GmbH (Wesseling-Berzdorf, D)
Flockeneisbereiter AF-200	Acotsman Ice System (Pine Brook, USA)
Fluostar Omega	BMG Labtech (Ortenberg, D)
FP 6500 Spectrofluorometer	Jasco (Groß-Ulmstadt, D)
Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 1-4 LSC	Christ (Osterode, D)
Geldokumentationsanlage Gel iX20 Imager	Intas Science Imaging Instruments (Göttingen, D)
Heraeus Biofuge PrimoR	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)
Homogenisierer Emulisiflex 05	Avestin (Mannheim, D)
Jasco-650 Spektrophotometer	Jasco (Groß-Ulmstadt, D)
Jasco-815 CD-Spektrometer	Jasco (Groß-Ulmstadt, D)
Kapillarviskosimeter m-VROC	Rheosense (Sam Ramon, CA)
Kühlzentrifuge Sorvall RC5B plus	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)
Magnetrührer IKAMAG® RCT	IKA-Labortechnik (Staufen, D)
NMR-Spektrometer:	
Bruker Avance III 600 (600 MHz, 14,1 T mit QXI- bzw. TXI-Probenkopf), AG Biophysik, MLU Halle	Bruker (Karlsruhe, D)
Bruker Avance III 800 (800 MHz, 18,8 T, TCI-Kryoprobenkopf), AG Biophysik, MLU Halle	
Bruker Avance III (600 MHz, 14,1 T, QCI-Kryoprobenkopf), Biomolekulare NMR-Spektroskopie, Masaryk Universität, Brünn	

Material und Methoden: Material

Präzisionswaage Atilon ATL-4202	Acculab (Ettlingen, D)
Präzisionswaage Analytical Standard	OHAUS (Pine Brook, USA)
Multiple Gel Caster SE245RK-1	Hoefer, Inc. (Holliston, MA, USA)
4 Gel Caster SE275	Hoefer, Inc. (Holliston, MA, USA)
SE250 Mighty Small II Mini Vertical	Hoefer, Inc. (Holliston, MA, USA)
Electrophoresis Unit für 8*7 cm Gele	
Power Supply EV231	Consort bvba (Turnhout, BE)
Power Supply EV245	PEQLAB GmbH (Erlangen, D)
Temperiergerät R22 C6	LAUDA DR. R. WOBSE GmbH&Co. KG (Lauda-Königshofen, D)
Royal Intas Gel Ix 20	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, D)
Reinstwassersystem GenPure UF	TKA (Niederelbert, D)
Schüttelinkubatoren Innova 40 und 43	New Brunswick Scientific (D)
Tischzentrifugen Eppendorf 5415D & 5804R	Eppendorf (Hamburg, D)
Tischzentrifugen Biofuge Primo R & Haraeus Pico 17	Thermo Scientific GmbH (Schwerte, D)
Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM900	Carl Zeiss AG (Oberkochen, D)
Unocycler	VWR (Leicestershire, UK)
Ultraschallbad Power Sonic 405	HWAShin Technology Co. (Seoul, ROK)
Ultraschallaufschlussgerät Sonifier W-250 D	Branson (Dietzenbach, D)
Ultra Low Temperatur Freezer 4570	New Brunswick Scientific (D)

Tabelle 6: Verwendete Software

Bruker TopSpin 2.1/3.1	Bruker, Karlsruhe, D	Messung der NMR-Spektren, Auswertung von 1D Spektren
NMRPipe	^[197]	Prozessierung der NMR-Spektren
NMRViewJ 8.0	One Moon Scientific, Inc. Newark, NJ, USA	Auswertung der 2 und 3D NMR-Spektren
Sparky 3	T. D. Goddard and D. G. Kneller, University of California, San Francisco	Resonanzzuordnung mittels 5D NMR-Spektren
CCPNmr Analysis 2.4.1	^[198]	Resonanzzuordnung mittels 3D NMR-Spektren
Intas Gel Capture Entry	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, D)	Gelphotos
Omega V5.10 und MARS V3.10	BMG Labtech GmbH (Ortenberg, D)	ThT-Fluoreszenzkinetiken
SpectraManager 2.0	Jasco, Great Dunmow, UK	UV-, CD und Fluoreszenz-Messungen
Pymol Molecular Graphics System, Version 1.1r2pre	Schrödinger, LLC	Darstellung von Molekülstrukturen
Origin 7.5G	OriginLab Corporation	Auswertungen
OligoCalc V3.26	^[199]	Design der Oligo-Primer
Unicorn 5.0	GE Healthcare	Proteinreinigung
Microsoft Office 2007	Microsoft GmbH, Unterschleißheim, D	Auswertungen
Corel Draw® X4	Corel Corporation	Erstellen von Abbildungen
iTEM	Olympus Soft Imaging GmbH	Elektronenmikroskopie
CrystalClear 1.3.6SP3 r6	RIGAKU Corp., Tokyo, Japan	Röntgenbeugung
ImageJ 1.46r	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA	Bildanalyse (Elektronenmikroskopie)
SpectraManager 2.0	Jasco Inc., Easton, USA	UV-Absorptionsmessungen

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinexpression und –reinigung

Bestimmung der Bakteriendichte

Die Bestimmung der Bakteriendichte während der Zellanzucht für die Expression erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}). Es wurde jeweils das entsprechende Nährmedium als Referenz verwendet. Eine OD_{600} von 1,0 entspricht dabei einer Bakteriendichte von circa 1×10^9 Zellen pro ml.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Fragmenten nach Mutagenese verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde 0,8 % bzw. 1,6 % Agarose in TAE-Puffer (Tabelle 7) durch Aufkochen gelöst und in die Gelkammer gegossen. Ein vor dem Abkühlen in das Sammelgel gesteckter Kamm schafft Taschen zum Auftragen der Proben. Durch weitere Abkühlung entsteht ein ausgehärtetes Gel mit netzartiger Struktur, in der durch Anlegung einer Spannung von 120 V die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt wird. Den DNA-Proben wurde DNA-Ladepuffer zugesetzt und die Mischung in die Taschen des Gels pipettiert. Parallel zu den Proben wurde ein Größenstandard verwendet. Das Anfärben der DNA-Banden erfolgte in TAE-Puffer, welcher mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt wurde. Dieses lagert sich in die DNA-Doppelhelix ein, wodurch die Fluoreszenz-Emission unter UV-Licht erhöht und die DNA-Banden sichtbar werden.

Tabelle 7: Verwendete Lösungen bei der Gelelektrophorese

SDS-	X % Polyacrylamid, 0,083 % Ammoniumperoxodisulfat (APS), 0,06 % TEMED,
Gelzusammensetzung	1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), 0,1 % SDS, pH 8,45 Trenngel: X=6, Sammelgel X=15
Probenpuffer	Endkonzentration: 50 mM Tris, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 0,001 % Bromphenol Blau, 25 mM Dithiothreitol
Anodenpuffer	0,2 M Tris, pH 8,9
Kathodenpuffer	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS
Färbelösung	50 % (V/V) Methanol, 10 % Essigsäure (m/V), 3 mM Coomassie Brilliant Blue
Entfärbelösung	5 % (V/V) Methanol, 10 % Essigsäure (m/V)
TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8,0

Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proteine erfolgt zunächst eine Auftrennung nach ihrer Größe mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). SDS entfaltet die Proteine und überdeckt ihre Eigenladung, so dass sie eine zur Größe proportionale negative Ladung tragen. Sie wandern daher im elektrischen Feld Richtung Anode. Aufgrund der netzartigen Struktur des Polyacrylamid-Gels kommt es zu einer Größenauftrennung abhängig vom Molekulargewicht. Zusätzlich erfolgt die Elektrophorese unter

reduzierenden Bedingungen zur Spaltung von Disulphidbrücken. Alle Proben wurden vor dem Auftragen für 3 min auf 100 °C erhitzt. In dieser Arbeit werden Peptide bzw. Proteine geringer Größe untersucht, deshalb werden ausschließlich Gele mit 15 % Polyacrylamid verwendet. Diese trennen Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 6,5 und 66 kDa besonders gut. Die Elektrophorese erfolgt in einem vertikalen Gel, das sich aus einem Trenngel und einem Sammelgel zusammensetzt. Letzteres bewirkt zunächst eine Stapelbildung der Proteine nach Molekulargröße, welche sich nach Anlegen einer Spannung (max. 300 V, 45 mA pro Gel) mit gleicher Geschwindigkeit bewegen. Sobald diese in das Trenngel übertreten erfolgt die Größenauftrennung. Um die freiwerdende Wärme abzuführen, wird die Kammer gekühlt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteinbanden, wird ein gebrauchsfertiger Marker mit Proteinbanden bekannter Größe aufgetragen. Die Färbung erfolgt mittels in einer Coomassie Brilliant Blue-Lösung, überschüssiger Farbstoff wird mit einer Entfärbelösung entfernt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 7 aufgelistet.

TEV-Protease

Die Expression der TEV-Protease erfolgte in *Escherichia coli* BL21 (DE3) CodonPlus® RIL Zellen. Das dYT-Vollmedium wurde mit Chloramphenicol und Ampicillin (0,3 mg/ml) versetzt und mit Zellen aus einem *Kryostock* angeimpft. Nach Inkubation der Vorkulturen für ca. 12 Stunden bei 37 °C und 300 Upm werden diese zum Animpfen der Hauptkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,05 verwendet. Die Induktion der Zielproteinsynthese erfolgte nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0 bis 2,0 durch Zugabe von sterilfiltriertem IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 7000 g und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde bei -80 °C bis zur Reinigung gelagert. Nach dem Auftauen wurde das es in Resuspensionspuffer (50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, 25 mM Imidazol) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe des Microfluidizers bei einem Druck von 500 bis 1000 bar und 4 °C. Nach drei Durchläufen konnte eine effektive Zelllyse erzielt werden. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von Polyethylenimin mit einer Endkonzentration von 0,1 %. Nach vollständiger Durchmischung wurde das Zelllysats für 45 min bei 47810 g und 4 °C zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde durch einen Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert und auf eine bereits mit Lysepuffer äquilibrierte Nickel-Affinitätssäule (*Ni Sepharose High Performance*, Säulenvolumen 18 ml) geladen. Die Elution erfolgte mittels eines Stufengradienten von jeweils

2 Säulenvolumen mit 50mM, 100mM und 200mM Imidazol. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Alle Fraktionen, welche die TEV-Protease enthielten wurden vereinigt und bei 4 °C dreimal für jeweils 12h gegen Lagerpuffer (25 mM Tris, 200mM NaCl, 0,5 mM EDTA, pH 8) dialysiert. Die Lagerung erfolgte in Aliquots mit einer Konzentration von 0,88 mg/ml bei -80 °C.

Amyloid β

Mutagenese

Die Plasmide für die A β Varianten wurden mittels QuikChange Polymerasekettenreaktion (PCR) entsprechend der Anleitung erzeugt (Stratagene). Die benötigten Oligo-Primer wurden mit dem Online-Programm Oligo Calc V3.26^[199] optimiert und sind im Anhang in Tabelle 13 (Seite XX) aufgelistet.

Für die Polymerasekettenreaktionen wurden folgende Programme verwendet:

		QuikChange x = 16		Kolonie-PCR x = 35	
Schritt		Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung		94 °C	2 min	94 °C	2 min
x Zyklen	{ Denaturierung <i>Annealing</i> Elongation	94 °C	30 s	94 °C	30 s
		T _A °C	30 s	52 °C	30 s
		72 °C	7 min	72 °C	1 min
finale Elongation		72 °C	10 min	72 °C	10 min
Kühlung		4 °C		4 °C	

Zunächst wurde die Temperatur T_A des *Annealing*-Schrittes für eine optimale Bindung des jeweiligen Primer-Paares an das Plasmid optimiert und das Ergebnis mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Mit den so bestimmten Temperaturen erfolgte dann die eigentliche Reaktion. Das Reaktionsprodukt wurde mittels PCR-Purification Kit (QIAquick) gereinigt und die ursprüngliche DNA mittels DPN1, welches spezifisch methylierte DNA angreift, verdaut. Anschließend erfolgten eine erneute Reinigung und die Ligation der linearen Ziel-DNA zu einem zirkulären Plasmid mittels T4-Ligase. Das Produkt wurde zur Amplifikation in *E. coli* Top 10 Zellen transformiert und ausplattiert. Von den gewachsenen Bakterienkolonien wurden jeweils 10 mittels einer PCR-Reaktion auf das Vorhandensein eines Plasmides korrekter Länge überprüft und parallel dazu in einem 100ml Ansatz vermehrt. Die DNA der als richtig eingestuften Kolonien wurde aus den Zellen isoliert (QIAprep oder Plasmid Mini Prep) und zur Sequenzierung an Seqlab GmbH (Göttingen, D) gesendet. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für die Polymerasekettenreaktionen, DPN1-Verdau und T4-Ligation

QuikChange		Kolonie-PCR		DPN1-Verdau		T4-Ligation	
75 µl	Wasser	67 µl	Wasser	+ 5 µl	Fast-Digest-Puffer	+ 4 µl	T4-Ligase-Puffer
10 µl	Puffer	10 µl	Taq-Puffer				
2x4 µl	Primer	10 µl	MgCl ₂	+ 14 µl	Wasser	+ 1 µl	T4-Ligase
2 µl	Plasmid	3 µl	Nukleotide	+ 1 µl	DPN1	+ 4 µl	PEG-6000
3 µl	Nukleotide	2x4 µl	T7-Primer	45-60 min, 37 °C,		2h, 22 °C, 400 Upm	
2 µl	TurboPfu-Polymerase	4 µl	Taq-Polymerase	400 Upm; dann 5 min 70 °C			

Auf diese Weise konnten Plasmide für alle Aβ-Varianten erzeugt werden. Für Aβ F19P musste das Protokoll leicht abgewandelt werden: Um die Bildung von Strukturelementen in den Primern zu verringern, wurde dem Reaktionsansatz 5 % DMSO zugesetzt. Da dieses eine hemmende Wirkung auf die Polymerase ausübt, wurde die Polymerase-Konzentration verdoppelt. Außerdem wurde die Ausbeute durch Variieren der *Annealing*-Temperatur zwischen 57,6 und 57,0 °C (Touch-Down-PCR), sowie durch Verlängerung des Elongationsschrittes auf jeweils 10 min, erhöht.

Expression

Das Animpfen der Vorkultur erfolgte durch Überführen einer Einzelkultur aus frisch transformierten Zellen mit einer Pipettenspitze in 5 ml dYT-Vollmedium. Als Antibiotikum wurde jeweils Carbenicillin mit einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml zugegeben. Die Vorkulturen wurden jeweils für ca. 12 Stunden bei 37 °C und 300 Upm inkubiert. Die Expression erfolgt in MSMCHP2-Minimalmedium. Für eine maximale Wachstumsrate wurden die Zellen zunächst an dieses Medium angepasst, indem eine 5 ml Kultur für ca. 12 Stunden inkubiert wird. Anschließend wird die nächste Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft wurde. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach vollendeter Gewöhnung konnte eine OD₆₀₀ von 8 bis 10 erreicht werden, die angepassten Zellen wurden als *Kryostock* bei -80 °C gelagert. Zur Expression wurden diese Zellen zunächst in 5 ml MSMCHP2-Medium überführt. Nach 12 h Inkubation wurde daraus eine 100 ml Vorkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft, welche nach Weiterkultivierung zum Animpfen der Hauptkultur verwendet wurde. Zur Isotopenmarkierung wurde das Medium mit ¹⁵N markiertem Ammoniumchlorid und ggf. ¹³C markierter Glukose versetzt. Die Induktion der Zielproteinsynthese erfolgte nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,1 durch Zugabe von sterilfiltriertem IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM. Nach 4 Stunden Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 7000 g und 4 °C geerntet. Die Zellausbeute betrug etwa 2 g Zellen (Nassgewicht) je Liter Kulturmedium. Das Zellpellet wurde bei -80 °C bis zur Reinigung gelagert.

Reinigung

Zur Reinigung wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Pufferlösungen verwendet. Nach dem Auftauen wurde das Zellpellet in Resuspensionspuffer (circa 10 ml pro g Zellen) resuspendiert und Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) mit einer Endkonzentration von 1 mM, Lysozym von 0,5 mg/ml und DNase mit 10 µg/ml zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe des Microfluidizers bei einem Druck von 500 bis 1000 bar und 4 °C. Nach drei Durchläufen konnte eine effektive Zelllyse erzielt werden. Das Zellysate wurde dann für eine Stunde bei 47810 g und 4 °C zentrifugiert.

Tabelle 9: Verwendete Pufferlösungen zur Reinigung von A β ₁₋₄₀

Resuspension		20 mM Tris/HCl 150 mM NaCl	pH 9
Amylose	Laufpuffer	20 mM Tris/HCl 150 mM NaCl	pH 8
	Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 20 mM Maltose	pH 8
IMAC	Laufpuffer	20 mM Tris/HCl 150 mM NaCl	pH 8
	Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 500 mM Imidazol	pH 8
RPC	Laufpuffer	99,9 % Wasser 0,1 % TFA	
	Elutionspuffer	99,9 % Acetonitril 0,1 % TFA	

Die Reinigung erfolgte im Wesentlichen nach einem etabliertem Protokoll^[200], jedoch mit Änderungen: Das Maltosebindeprotein(MBP)–Fusionsprotein wurde über eine Amylose-Säule isoliert (*Amylose Resin High Flow*, New England Biolabs Inc.). Die Spaltung des Fusionsproteinen erfolgte durch Zugabe von TEV-Protease (molares Verhältnis 1:250 TEV:MalA β) sowie PMSF mit 1 mM Endkonzentration und Inkubation für 18 h bei 4 °C. Durch eine Nickel-Affinitätschromatographie wurden A β ₁₋₄₀ und Maltosebindeprotein separiert. Der letzte Reinigungsschritt bestand aus einer *Reversed Phase* – Chromatographie (RPC) (Source 15RPC, GE Healthcare, Freiburg, DE). Die Proteinausbeute lag zwischen 0,1 und 0,3 mg lyophilisiertes Peptid bei je Liter Kulturmedium.

Parathormon (PTH)

Die Expression und Reinigung wurde entsprechend dem bereits publiziertem Protokoll durchgeführt^[194,201]. Jedoch konnte bei diesem Protoll SUMO nach der Spaltung nicht vollständig von PTH₁₋₈₄ abgetrennt werden, wodurch Änderungen erforderlich waren. Diese sind in der Masterarbeit von Madlen Stephani für zwei Varianten mit Punktmutationen (V2C und Q84C) beschrieben^[202]. Das in dieser Arbeit verwendete Reinigungsprotokoll weist weitere Änderungen auf, weshalb nachfolgend die Expression und Reinigung ausführlich beschrieben werden.

Expression

Allen Nährmedien wurden als Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol mit einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml zugesetzt. Eine Einzelkultur aus frisch transformierten Zellen wurde in 5 ml dYT-Vollmedium überführt und für circa 12 Stunden bei 37 °C und 300 Upm geschüttelt. Hiervon wurde ein *Kryostock* zur weiteren Verwendung angefertigt. Zur Isotopenmarkierung wurde M9-Minimalmedium mit 15N markiertem Ammoniumchlorid und ggf. ¹³C markierter Glukose verwendet. Für optimales Zellwachstum wurden diese in drei Schritten an das Medium angepasst. Dies erfolgte durch die Inkubation einer 5 ml Kultur für ca. 12 h bei 37 °C und 300 Upm, mit welcher jeweils die nächste Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft wurde. Nach erfolgter Anpassung wurden die Zellen in eine 100 ml Vorkultur überführt, mit welcher nach Inkubation über Nacht die Hauptkultur angeimpft wurde. Diese wurde bei 37 °C und 250 Upm inkubiert und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 1,2 erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation für 15 min bei 8000 g und 4 °C. Die Ausbeute betrug etwa 15 g Zellen (Nassgewicht) je Liter Medium.

Reinigung

Die Reinigung erfolgte wie in^[202] beschrieben, jedoch mit den in Tabelle 10 aufgelisteten Pufferlösungen. Das Zellpellet wurde in ca. 5 ml Nickel-Laufpuffer pro Gramm Zellen gelöst und nach Zugabe von 10 µl Protease Inhibitorcocktail (1:100 Verdünnung) je Milliliter Zellsuspension, MgCl₂ mit einer Endkonzentration von 1 mM, DNase I mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml, sowie von Lysozym mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Microfluidizer, nach drei Durchläufen bei einem Druck von 500-1000 bar und 4 °C wurden durch Zentrifugation bei 47810 g und 4 °C die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt.

Der Überstand wurde auf eine Säule mit *Ni Sepharose High Performance* (Säulenvolumen 18ml) aufgetragen und das Fusionsprotein auf diese Weise isoliert. Dieses besitzt N-terminal einen Hexahistidin-Tag (*His-Tag*) und bindet daher spezifisch an Nickel-Sepharose der Säulenmatrix. Die Elution erfolgte durch einen Stufengradienten auf 250mM Imidazol, welches eine höhere Affinität zum Ni^{2+} bindet als der *His-Tag*. Das Fusionsprotein wurde über Nacht NaCl- und Imidazol-frei dialysiert (MWCO 3500Da), gleichzeitig erfolgte die Spaltung durch die SUMO-Protease Ulp1.

Als nächster Reinigungsschritt wurde eine Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) verwendet. Die Trennung der Peptide beruht auf der Wechselwirkung unpolarer Oberflächen der Peptide bzw. Proteine mit einer hydrophoben stationären Phase (hier: Butylsepharose), welche durch erhöhte Salzkonzentration (Ammoniumsulfat) in der Lösung entsteht bzw. verstärkt wird. Die Peptidlösung wurde zunächst auf 1.4M Ammoniumsulfat eingestellt und dabei entstehende Präzipitate durch Zentrifugation für 1 h bei 13000 g und Filtration (Porengröße 0,45 μm) entfernt. Die Elution durch sinkende Ammoniumsulfatkonzentration erfolgt für SUMO erfolgt zwischen 1.4M und 1 M, die des PTH₁₋₈₄ zwischen 0,7M und 0 M Ammoniumsulfat, wodurch eine effektive Trennung der beiden Peptide erfolgt.

Tabelle 10: Verwendete Pufferlösungen zur Reinigung von PTH₁₋₈₄

IMAC	Laufpuffer	50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl 10 mM Imidazol	pH 8,0
	Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl 500 mM Imidazol	pH 8,0
Dialyse		50 mM Natriumphosphat 100 mM NaCl 10 mM Imidazol	pH 8,0
Igepal-Spaltpuffer (Endkonzentration)		20 mM Tris 1,5 M NaCl 10 mM DTT 2 % (m/V) Igepal	pH 8,0
HIC (Butylsepharose)	Laufpuffer	50 mM Natriumphosphat 100 mM NaCl 1.4 M Ammoniumsulfat 5 mM EDTA	pH 8,0
	Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat 5 mM EDTA	pH 8,0
Gelfiltration S75		25 mM NH_4HCO_3	pH 5,5

Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie eingesetzt. Auf eine *HiLoad Superdex 75 prep grade* mit einem Säulenvolumen von 120 ml wurden nach der Äquilibration jeweils 5 ml der Proteinlösung aufgetragen. Bei dieser Methode besteht das Gelbett aus einer Matrix mit porösen Kügelchen. Kleinere Peptide und Proteine können leicht in die Matrixkavitäten eindringen, während größere Proteine quasi ungehindert durch die Zwischenräume laufen und das Säulenmaterial auf kürzerem Weg, also schneller passieren können. Die Trennung erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Nach jeder Fraktion wurde die Säule mit 30 ml Gelfiltrationspuffer nachgewaschen. Alle PTH₁₋₈₄-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde bis zur Nutzung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2 Absorptionsspektroskopie zur Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Peptid- und Proteinlösungen wurde spektroskopisch bei 280 nm an einem Jasco-650 Spektrophotometer bestimmt. Hierzu wurden UV-Absorptionsspektren im Bereich von 240 bis 340 nm mit einer Geschwindigkeit von 200 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 nm bei 20 °C aufgenommen. Typischerweise wurden Quarzküvetten mit Schichtdicken von 1 cm oder 4 mm verwendet. Das Spektrum wurde jeweils um das zugehörige, unter identischen Bedingungen aufgenommene Pufferspektrum korrigiert. Die Peptid- bzw. Proteinkonzentration berechnet sich aus dem LAMBERT-BEERschen Gesetz:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

A_{λ} : Absorption bei der Wellenlänge λ

ε_{λ} : Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

c : Konzentration der Proteinlösung

d : optische Weglänge

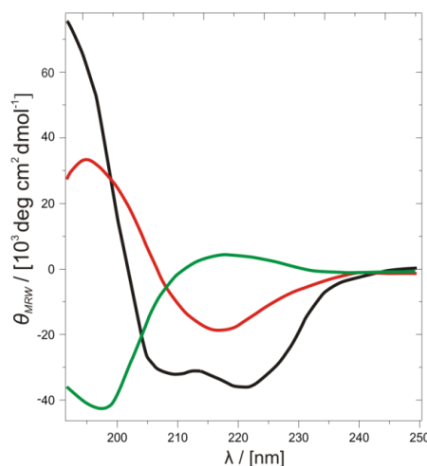
Die Extinktionskoeffizienten können nach Gill und Hippel^[203] direkt aus der Aminosäuresequenz berechnet werden. Streng genommen gilt diese Berechnung ausschließlich für entfaltete Proteine oder Peptide, weshalb diese üblicherweise mit 6 M Guanidiniumchlorid versetzt wurden. In guter Näherung können diese Werte auch auf native Proteine (oder Peptide) in Wasser oder wässriger Pufferlösung übertragen

werden^[203]. Die Extinktionskoeffizienten für die verwendeten Peptide und Proteine sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Protein	ϵ_{280} in $l\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$
A β_{1-40}	1490
CypD	9867
PTH $_{1-84}$	5500
mSAA1.1	24750

2.2.3 Circular dichroismus (CD) – Spektroskopie

Circulardichroismus bezeichnet die Eigenschaft optisch aktiver (chiraler) Moleküle, rechts und links zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich zu absorbieren. Darüber hinaus hängt die Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Polarisation des Lichts ab. Diese Unterschiede werden im Fern-UV-Bereich (170-250nm) im Wesentlichen vom Proteinerückgrat beeinflusst und ermöglichen es, die Anteile der Sekundärstrukturelemente abzuschätzen. In Abbildung 5 sind die typischen Verläufe der mittleren residuellen Elliptizität für die Sekundärstrukturelemente dargestellt.



$$\theta_{MRW} = \frac{\theta}{d \cdot c \cdot N} \quad (2.2)$$

θ_{MRW} : mittlere residuelle Elliptizität

θ : gemessene Elliptizität (mdeg)

d : Schichtdicke

c : molare Konzentration

N : Anzahl der Aminosäuren

Abbildung 5: Repräsentative CD-Spektren von Polypeptiden mit verschiedenen Sekundärstrukturen. Dargestellt sind Peptide mit α -Helix (schwarz), β -Faltblatt (rot) und Zufallsknäuel (grün). Nach Referenz^[204].

Die Fern-UV-CD-Spektren wurden an einem Jasco J-815 CD-Spektrometer aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 25 °C in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1cm über dem spektralen Bereich von 195-260nm. Die Spektren wurden zur Verbesserung des Signal/ Rauschverhältnis aus 10 Akkumulationen gemittelt. Bei einer Bandbreite von 1 nm und einer Integrationszeit von 1 s betrug die Messgeschwindigkeit

50 nm/min. Die gemessene Elliptizität θ wurde im Anschluss mit Gleichung (2.2) in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure θ_{MRW} (*mean residue weight*) umgerechnet.

2.2.4 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wird bereits seit den 1950er Jahren angewendet, um amyloide Strukturen sichtbar zu machen^[205]. Dabei wurde die Methode der Negativ-Kontrastierung (*negative staining*) mit Atomen mit hohen Ordnungszahlen angewendet, um den Hintergrund undurchlässig zu gestalten, während die Struktur von Partikeln abgebildet werden kann. Diese bewährte Methode wird auch heute noch eingesetzt. Die benötigten Proben wurden nach zwei Verfahren hergestellt:

„Floating Carbon“ – Methode

Bei dieser Methode werden 5 μ l der Suspension zwischen die Schichten eines kohlenstoffbeschichteten Micafilms (Beschichtung durch Senthil Kumar, mittels Denton Vacuum Desk 5, Pfeiffer, Asslar, D) eingebracht. Eine gleichmäßige Bindung der Partikel an den Kohlenstofffilm wird durch eine dreiminütige Inkubation erreicht. Anschließend wird der Micafilm so auf einem Uranylacetattropfen (50 μ l, 1 % (m/V)) platziert, dass sich die Kohlenstoffschicht vom Micafilm ablöst und auf dem Tropfen schwimmt. Innerhalb der nächsten Minute wird dieser Film mit Hilfe eines Kupfernetzchens von der Färbelösung entfernt und getrocknet.

Präparation vorbeschichteter Kupfernetzchen

Es wurden jeweils 5 μ l einer Proteinlösung auf ein kohlebedampftes, mit Formvarfilm überzogenes Kupfernetzchen gegeben. Nach 3 min Inkubation erfolgte ein dreimaliges Waschen des Netzchens durch Eintauchen in je 40 μ l Wasser für insgesamt 60 s. Die Negativ-Kontrastierung wurde durch dreimaliges Eintauchen in je 40 μ l Uranylacetattropfen (1 % (m/V)) für insgesamt 60 s erzielt. Danach wurde die Flüssigkeit mit Filterpapier vom Netzchen abgesaugt und dieses getrocknet.

Die auf diese Arten präparierten Proben wurden an einem Transmissions-elektronenmikroskop (Zeiss EM900) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV analysiert.

2.2.5 Photoinduzierte Vernetzung unmodifizierter Proteine

Die photoinduzierte Vernetzung unmodifizierter Proteine (PICUP) stellt eine Methode zur Bestimmung der Größenverteilung von Oligomeren dar^[206,207]. Dies ist mit anderen Methoden schwierig zu ermitteln, da diese Aggregate typischerweise in metastabilen

Mischungen vorliegen, in denen die Assoziation und Dissoziation von Monomeren an Oligomere sowie an größere Komplexe simultan erfolgt. Eine Stabilisierung dieser Komplexe durch kovalente Bindungen kann durch die Photooxidation von Ruthenium Ru^{2+} zu Ru^{3+} mittels Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Gegenwart eines Elektronenakzeptors erfolgen. Ru^{3+} wirkt als Oxidationsmittel und führt zur Bildung von Proteinradikalen, welche in der Folge kovalente Bindungen zu anderen Proteinen ausbilden. Die Wahl geeigneter Bedingungen ermöglicht es, die Vernetzung auf bereits bestehende Proteinkomplexe zu beschränken^[206,207].

In dieser Arbeit wurden Proben mit $150\ \mu\text{M}$ frisch gelöstem PTH_{1-84} bzw. mit $1\ \text{mM}$ fibrilliertem PTH_{1-84} in $10\ \text{mM}$ Natriumacetat, $300\ \text{mM}$ Natriumsulphat, $\text{pH}\ 5,3$ untersucht. Direkt nach der Zugabe von $1\ \mu\text{l}$ $80\ \text{mM}$ APS und $1\ \mu\text{l}$ einer $4\ \text{mM}$ Tris(2,2'-bipyridyl)-dichlororuthenium (II)-hexahydrat-Lösung zu $18\ \mu\text{l}$ Probe wurden die Proben dreimal für jeweils $200\ \text{ms}$ mit weißem Licht ($50\ \text{W}$) belichtet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Probenpuffer (Endkonzentration $50\ \text{mM}$ Tris, 2% SDS, 10% Glycerol, $0,001\%$ Bromphenol Blau, $25\ \text{mM}$ Dithiothreitol) und Erhitzen auf $95\ ^\circ\text{C}$ für $5\ \text{min}$ gestoppt. Die gesamte Probenpräparation erfolgte in einer Dunkelkammer. Die Ergebnisse wurden mittels SDS--PAGE analysiert (s. S. 19).

2.2.6 Röntgenbeugung

Die für Amyloidfibrillen charakteristische β -Kreuzstruktur (*Cross*- β -Struktur), also β -Faltblatt-Strukturen senkrecht zur Fibrillenachse kann mittels Röntgenbeugung nachgewiesen werden. Die Streuung der Röntgenstrahlung an periodischen Objekten führt entsprechen der Bragg-Bedingung unter bestimmten Winkeln zu konstruktiver Interferenz, also zu Reflexen im Streumuster. Bei der *Cross*- β -Struktur können somit die zwei charakteristischen Abstände der β -Faltblätter nachgewiesen werden. Sind die Fibrillen ungeordnet, ergeben sich zwei Ringe, bei parallel orientierten Fibrillen beobachtet man je zwei aufeinander senkrecht stehende Reflexe.

Zur Probenvorbereitung wurden Fibrillenlösungen mit mindestens $1\ \text{mg}$ Protein ultrazentrifugiert (Sorvall RC M120GX, Rotor Thermo Scientific S120, $1\ \text{h}$, $100000\ \text{g}$, $4\ ^\circ\text{C}$). Das hydratisierte Pellet wurde auf einen Objektträger überführt und im Strahlengang zentriert. Die Röntgenstrahlung wurde an einer rotierenden Kupferanode mit $50\ \text{kV}$ Beschleunigungsspannung und $100\ \text{mA}$ Stromstärke erzeugt. Die Datenaufnahme erfolgte mittels eines R-Axis IV++ Bildplattendetektors (RIGAKU Corp., Tokyo, Japan) mit einem Proben Detektor-Abstand von $2\ \text{m}$ und einer Expositionszeit von $1\ \text{min}$. Die

Messungen wurden in der Abteilung für Physikalische Biochemie am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

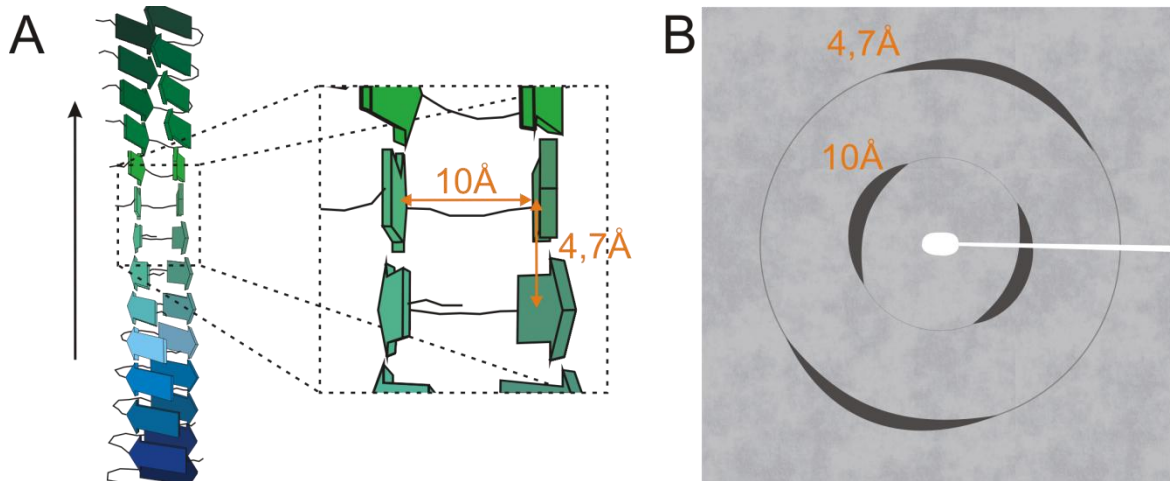


Abbildung 6: Cross- β -Struktur von Amyloidfibrillen erzeugt ein charakteristisches Streumuster bei Röntgenbeugung. A: Modell der Cross- β -Struktur, in der regelmäßige Stapel von β -Strängen (dargestellt durch Pfeile) durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen entlang der Fibrillenachse (Pfeil) zu β -Faltblättern verbunden sind. Für Fibrillen verschiedener Polypeptide ergeben sich charakteristische Abstände von ca. 10 Å zwischen seitlich benachbarten Blattblättern und 4,7 Å zwischen den Blattblättern entlang der Fibrillenachse^[9]. B: Schematische Darstellung des Röntgenbeugungsmusters einer Amyloidfibrille. Die charakteristischen Abstände führen bei parallel orientierten Fibrillen zu je zwei senkrecht aufeinander stehenden Reflexionen^[9].

2.2.7 Thioflavin T Fluoreszenz

Aromatische Farbstoffe wie Thioflavine und Kongorot besitzen eine starke Affinität zu amyloiden β -Faltblattstrukturen und werden daher in der Pathologie und bei biophysikalischen Studien der Proteinaggregation als klassische Nachweismethode verwendet^[208]. In dieser Arbeit wurde das Benzothiazolatsalz Thioflavin T eingesetzt, welches bei Bindung an β -faltblattreiche Amyloidstrukturen eine verstärkte Emission sowie eine Rotverschiebung der Emission (Maximum bei 482 nm) aufweist^[208-210].

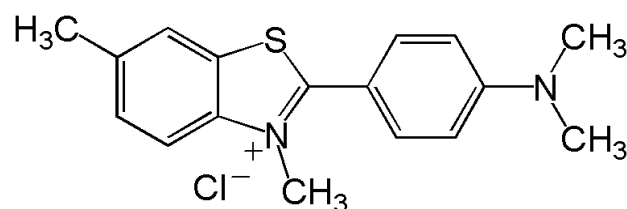


Abbildung 7: Thioflavin T-Molekül

Der Mechanismus der Fluoreszenzänderung ist noch nicht eindeutig aufgeklärt, meist wird angenommen, dass in Lösung eine Rotationsrelaxation an der Einfachbindung zwischen dem Benzamidring und dem Benzothiazol-Ringsystem erfolgt. Durch die Bindung an die Cross- β -Faltblattstruktur ist diese Rotation nicht mehr frei möglich, wodurch das

π -Elektronensystem stabilisiert wird. Dies führt zu einer höheren Quantenausbeute der Fluoreszenz^[211-214]. Die Detektion der Fluoreszenzemission ermöglicht nicht nur den Nachweis amyloider Fibrillen in einer Proteinlösung, sondern auch die Verfolgung des Fibrillierungsprozesses und daraus die Bestimmung kinetischer Parameter.

In der praktischen Anwendung ergeben sich allerdings einige Grenzen: Der Farbstoff weist eine starke pH-Abhängigkeit auf und ist in saurem und basischem Milieu nahezu nicht brauchbar. Bei niedrigen pH-Werten ($\text{pH} \leq 3$) kommt es zu Protonierung des Stickstoffes an der Dimethylaminogruppe, während bei hohen pH-Werten ($\text{pH} \geq 9$) das Molekül hydroxiliert wird. Beides führt zum Löschen der ThT-Fluoreszenz, wobei eine saure Umgebung eine sofortige „Alles-Oder-Nichts“-Löschung der Fluoreszenz bewirkt, basische Umgebung dagegen eine langsame Abnahme der Fluoreszenzausbeute zur Folge hat^[215].

Detektion von ThT-Spektren

Die ThT-Fluoreszenz-Emissionsspektren wurden von 465 nm bis 550 nm an einem Jasco-FP 6500 Spectrophotometer bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm aufgenommen (Schlitzweite jeweils 5 nm). Die Proben enthielten jeweils 35 μM PTH₁₋₈₄ und 50 μM ThT in 50 mM Boratpuffer, pH 9. Die monomere Probe enthielt frisch gelöstes PTH₁₋₈₄, die fibrilläre Probe wurde durch Inkubation von 1 mM PTH₁₋₈₄ für 12 Stunden bei 65 °C erzeugt und anschließend auf 35 μM verdünnt. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette mit 4x10 mm.

Fibrillierungskinetik mittels ThT-Fluoreszenz

Die Fibrillierungskinetiken wurden in einer 96 Loch-Mikrotiterplatte (Greiner Bio One, Frickenhausen, D) in einem BMG Fluostar Omega Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Für A β erfolgte die Datenpunktaufnahme alle 30 min. Vor jeder Messung wurde die Platte 10s mit 300 Upm geschüttelt. Für PTH erfolgte die Datenpunktaufnahme alle 100 bis 400s. Vor jeder Messung wurde die Platte 30s mit 100 Upm geschüttelt. Die Anregung von ThT erfolgte bei 450 nm, die Emission wurde bei 490 nm durch den Plattenboden gemessen. Um Verdunstung zu verhindern, erfolgte der Verschluss der Platten mit Microplatten-Abdeckfolien (Ampliseal, Greiner Bio One).

Typischerweise ergeben sich sigmoide Kurvenverläufe. Vereinfacht wird dieser Kurvenverlauf durch folgende Phasen erklärt^[10,11]: Während der *Lag-Zeit* (t_{lag}) erfolgt eine Konformationsänderung der Monomere und es bilden sich kleine, lösliche Aggregate

(Oligomere). Diese wachsen anschließend zu strukturierten, kurzen, dünnen Protofibrillen und weiter zu langen Fibrillen (Geschwindigkeitskonstante k).

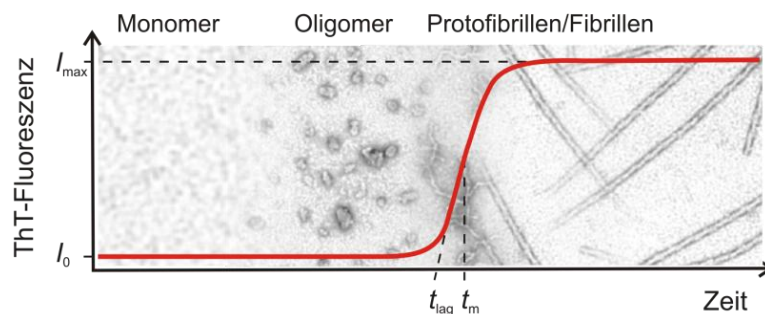


Abbildung 8: Bildung amyloider Fibrillen. Während der Nukleationsphase (*Lag-Zeit* t_{lag}) verändert sich zunächst die Konformation der monomeren A β -Peptide man beobachtet oligomere Strukturen. Mit zunehmender Zeit bilden sich filamentartige Aggregate (Protofibrillen, Fibrillen). Der Fibrillierungsprozess kann beispielsweise durch die verstärkte ThT-Fluoreszenz nach Bindung an β -Faltblatt-reiche Strukturen verfolgt werden (rote Linie).

Diese Parameter können durch Anpassung der folgenden Funktion an die Messdaten ermittelt werden:

$$I(t) = I_0 + \frac{I_{max} - I_0}{1 + e^{k(t_m - t)}} \quad (2.3)$$

$$t_{lag} = t_m - \frac{2}{k} \quad (2.4)$$

I : ThT-Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t , zu Beginn (Index 0), Ende (Index max)

t : Zeit

t_m : Mittelpunkt des Übergangs

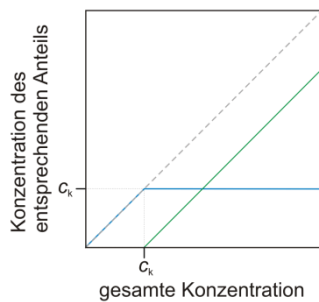
t_{lag} : Verzögerungszeit (*Lag-Zeit*)

k : Geschwindigkeitskonstante

Die maximale Intensität I_{max} hängt von der maximal möglichen Quantenausbeute der Fluoreszenz ab. Diese kann bei verschiedenen Umgebungsbedingungen variieren und korreliert nicht zwangsläufig mit dem Anteil gebildeter Fibrillen. Außerdem lassen die beiden experimentell bestimmbaren Parameter keine direkten Rückschlüsse auf die tatsächlichen Geschwindigkeitskonstanten der zugrundeliegenden mikroskopischen Prozesse zu. Um die real beobachteten Kurven zu erklären, muss neben der primären Nukleation ein oberflächenkatalysierter, sekundärer Nukleationsprozess an den Fibrillen und/oder eine Fragmentierung der Fibrillen angenommen werden^[216]. Simulierte Kurven zeigen, dass die *Lag-Zeit* nicht ausschließlich von der primären Nukleationsrate abhängt, sondern von allen Geschwindigkeitskonstanten beeinflusst wird^[216].

2.2.8 Thermodynamische Stabilität von Amyloidfibrillen

Die thermodynamische Stabilität von Amyloidfibrillen kann aus Messungen der kritischen Konzentration abgeschätzt werden. Die Bildung von Amyloidfibrillen wird üblicherweise als nuklationsabhängiger Prozess beschrieben. Charakteristisch für diese Prozesse ist, dass unterhalb einer bestimmten Konzentration, der kritischen Konzentration, keine Fibrillen beobachtet werden. Der exakte Wert ist auf diese Weise allerdings schwierig zu ermitteln. Übersteigt die Gesamtkonzentration die kritische Konzentration, steigt die Fibrillenkonzentration an, während die Monomerkonzentration konstant bleibt:



$$\Delta G = -RT \ln \left(\frac{1M}{c_k} \right) \quad (2.5)$$

ΔG : Änderung der Gibbs-Energie

R : Universelle Gaskonstante

T : Temperatur

c_k : kritische Konzentration

Abbildung 9: Konzept der kritischen Konzentration. Dargestellt ist die gesamte Konzentration (grau, unterbrochene Linie), die Konzentration des löslichen Anteils (blau) und die Konzentration des unlöslichen Anteil (grün) in Abhängigkeit der gesamten Konzentration. Als kritische Konzentration gilt die Konzentration, ab welcher ein unlöslicher Anteil (beispielsweise Amyloidfibrillen) auftritt. Häufig ist diese identisch mit dem löslichen Anteil in Gegenwart von Amyloidfibrillen. Rechts ist die Formel für den Zusammenhang zwischen kritischer Konzentration und thermodynamischer Stabilität der Fibrillen angegeben^[116,217,218].

Das Fibrillenwachstum kann durch die Assoziation monomerer Peptide M an die Enden der Fibrillen F_n als Reaktion zweiter Ordnung beschrieben werden:



Hierbei bezeichnet k_{on} die Assoziationsrate und k_{off} die Dissoziationsrate und der Index n die Anzahl der Peptide, aus denen die Fibrille aufgebaut ist. Da in einer Fibrille n sehr groß ist, ist der Unterschied zwischen F_n und F_{n+1} vernachlässigbar. Im Gleichgewicht gilt daher:

$$k_{\text{on}}[M][F_n] = k_{\text{off}}[F_{n+1}]$$

bzw.:
$$K = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{[F_{n+1}]}{[M][F_n]} \approx \frac{1}{[M]} \quad (2.7)$$

Somit stellt die Monomerkonzentration im Gleichgewicht $[M]$ bzw. die kritische Konzentration c_k ein Maß für die Gleichgewichtskonstante K der Fibrillierungsreaktion dar und kann zur Abschätzung der thermodynamischen Stabilität der Fibrillen genutzt werden^[116,217,218].

2.2.9 NMR-Spektroskopie

Mit dem experimentellen Nachweis des Kernspins durch Otto Stern und Walter Gerlach im Jahr 1922 durch ein Molekularstrahl-Experiment wurde der Grundstein für die NMR-Spektroskopie gelegt. Seither wurde diese Methode rasant weiterentwickelt und spielt eine entscheidende Rolle in verschiedenen naturwissenschaftlichen Disziplinen. Dies belegen nicht zuletzt die zahlreichen Nobelpreise, welche für Arbeiten in diesem Fachgebiete verliehen wurden. Seit der Entwicklung der hochauflösenden NMR-Spektroskopie mit mehrdimensionalen Experimenten ist es möglich, die Struktur und Dynamik von biologischen Makromolekülen zu untersuchen und hat sich somit zu einer wichtigen Methode der Biophysik entwickelt. In den folgenden Abschnitten sollen die in dieser Arbeit genutzten Methoden vorgestellt werden.

2.2.9.1 ^1H - ^{15}N -Korrelationsexperimente

Der entscheidende Vorteil der NMR-Spektroskopie gegenüber anderen spektroskopischen Methoden ist die atomare bzw. aminosäurespezifische Auflösung der relevanten Informationen. Dies erfolgte meist durch die Aufnahme von ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren, bei welchen die Stickstoffkerne mit den zugehörigen Amidprotonen über die skalare Kopplung korreliert werden. Somit erzeugt theoretisch jede NH-Bindung, also jede Aminosäure (mit Ausnahme von Prolin) zumindest ein Kreuzsignal im Spektrum. Diese Spektren ermöglichen beispielsweise die Detektion von Amidprotonenaustausch oder für Bindungspartner das Lokalisieren der Interaktionsstellen. Außerdem dienen sie üblicherweise als Basis für die Resonanzzuordnung.

Abhängig von Protein und experimentellen Bedingungen wurden als Korrelationsspektren fHSQC-^[219] (*fast Heteronuclear Single Quantum Coherence*), TROSY-^[220] (*sensitivity and gradient enhanced Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy*) oder SOFAST-HMQC-Spektren^[221] (*band-Selective Optimized Flip Angle Short Transient - Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) verwendet.

Sofern nicht explizit anders angegeben, erfolgte die Wasserunterdrückung durch Vorsättigung, *Water-Flip-Back*-Pulse, Gradientenselektion, selektive Anregung und/oder die WATERGATE-Sequenz (*Water suppression by gradient tailored excitation*^[222,223]). Die Anzahl der *scans* pro Inkrement, die Anzahl der Datenpunkte und die spektrale Weiten wurden jeweils angepasst um eine ausreichende Auflösung und ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen. Die phasensensitive Quadraturdetektion erfolgte mittels States-TPPI (*Time-proportional phase increments*^[224] und/oder Echo-Antiecho^[225]). Die

Spektren wurden mit einfachem *zero-filling* und mit einer \cos^2 -Funktion als Fensterfunktion prozessiert.

2.2.9.2 Experimente zur Rückgratzuordnung

Um die aminosäurespezifische Auflösung zur Gewinnung struktureller oder dynamischer Informationen nutzen zu können, ist es zunächst erforderlich, die NMR-Signale den jeweiligen Aminosäuren der Proteinsequenz zuzuordnen. Entscheidend für die Wahl der Zuordnungsstrategie ist die Länge der Polypeptidkette und zudem die Struktur des Proteins. Bei kleinen Peptiden ist es möglich, die Protonenresonanzen lediglich mit Hilfe von ^1H - ^1H -Korrelationsspektren zuzuordnen. Mit zunehmender Größe der Proteine und bei unstrukturierten Molekülen werden zunehmend komplexe Experimente notwendig. Für diese ist eine Isotopenmarkierung des Proteins mit ^{15}N und/oder ^{13}C erforderlich.

Bei den verwendeten Experimenten wird die Magnetisierung hierbei durch die skalare Kopplung (J-Kopplung) entlang der chemischen Bindung von einer Kernspezies zu einer anderen transferiert und in mindestens drei Dimensionen detektiert. Experimentell wird der Transfer meist über INEPT-Blöcke (*Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer*) realisiert, welche in Abbildung 10A schematisch für ein zweidimensionales Experiment (^1H - ^{15}N -HSQC^[226]) dargestellt sind. Der Transferweg wird zum einen durch die Phase und Frequenz der Pulse (Resonanzfrequenz der jeweiligen Atome) und zum anderen über die Dauer der Wartezeiten zwischen den Pulsen (Wirkung der skalaren Kopplung) bestimmt (s. Abbildung 10B).

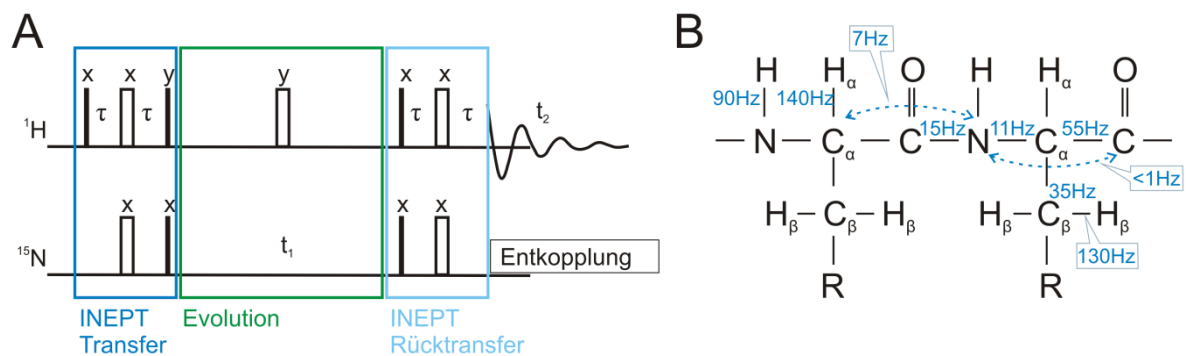


Abbildung 10: Pulssequenz zum Magnetisierungstransfer über J-Kopplungen und charakteristische J-Kopplungskonstanten in Proteinen. A: HSQC-Pulssequenz zur inversen Detektion der chemischen Verschiebungen von ^{15}N korreliert mit den ^1H -Verschiebungen. Dieses Experiment besteht aus zwei INEPT-Transferschritten, nach der Anregung im Protonenkanal erfolgt der erste INEPT-Transfer zu ^{15}N ($^1J_{\text{NH}}$), anschließend nach einer Entwicklungszeit t_1 der Rücktransfer auf den Protonenkanal und die Aufzeichnung. Währenddessen wird üblicherweise Breitbandentkopplung angewendet. Die Spektren zeigen dann ausschließlich Kreuzsignale von stickstoffgebundenen Protonen ohne zusätzliche Aufspaltungen durch die skalare Kopplung. Ein weiterer INEPT-Transferschritt kann auch angewendet werden, um die Magnetisierung von ^{15}N weiter zu ^{13}C zu übertragen und diese Magnetisierungen in einer oder mehreren weiteren Dimensionen aufzuzeichnen. B: Charakteristische J-Kopplungskonstanten für die chemischen Bindungen in der Polypeptidkette^[227].

Die Benennung der verwendeten Pulssequenzen entspricht dabei den Kohärenztransferwegen, wobei die nicht detektierten Atome in Klammern aufgezählt werden. Aus Sensitivitätsgründen beginnt und endet der Magnetisierungstransfer für alle verwendeten Pulssequenzen bei den empfindlichsten Atomen, den Protonen. Erfolgt der Rücktransfer entlang dem gleichen Weg, wird er bei der Nomenklatur häufig nicht explizit erwähnt. Der Transferschritt von ^{15}N - zu $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atomen erfolgt aufgrund der ähnlichen Kopplungskonstanten (7 und 11 Hz) immer zur eigenen und zur Vorgängeraminosäure (s. Abbildung 10B), wodurch in diesen Experimenten sequenzielle Informationen enthalten sind. Experimente, bei denen der Magnetisierungstransfer über die Carbonyl-Kohlenstoffe ^{13}CO erfolgt, enthalten aufgrund unterschiedlicher Kopplungskonstanten (15 und 1 Hz) nur Signale der Vorgängeraminosäure. Typischerweise werden diese Spektren daher paarweise aufgenommen (z. B. HNCA und HN(CO)CA). Der Vergleich dieser Experimente ermöglicht die Unterscheidung zwischen eigener und Vorgängeraminosäure. Die aminosäurespezifischen chemischen Verschiebungen aller detektierten Kerne sind für unstrukturierte Polypeptidketten bekannt^[228]. Dies ermöglicht den Einstieg in die sequenzielle Zuordnung.

In den folgenden Abschnitten werden die verwendeten Experimente beschrieben.

Zuordnungsstrategie mittels dreidimensionalen Tripelresonanzexperimenten

Es wurden folgende Tripelresonanzexperimente in dieser Arbeit verwendet: trHNCA^[229,230], trHN(CO)CA^[229,230], trHNCACB^[231], trHN(CO)CACB^[231], trHNCO^[232], trHN(CA)CO^[233]. Die Experimente wurden TROSY-basiert aufgenommen, dies hat HSQC-basierten Experimenten gegenüber den Vorteil höherer Sensitivität und geringerer Linienbreite^[220]. Zudem ist während der Inkrementierung der ^{15}N -Dimension und der Akquisition keine Entkopplung nötig. Die Detektion der chemischen Verschiebungen erfolgte hierbei jeweils in drei Dimensionen.

Für A β_{1-40} in Puffer (35 mM HEPES, pH 7,8, 8°C) konnten 35 von 40 Aminosäuren (87,5%) zugeordnet werden. Für mSAA1.1 und PTH $_{1-84}$ in DMSO gelang aufgrund der geringen Dispersion über diese Experimente nur eine Zuordnung der Hälfte der Aminosäuren.

Zuordnungsstrategie mittels fünfdimensionalen Tripelresonanzexperimenten

Insbesondere bei entfalteten Proteinen gelingt eine eindeutige Zuordnung der Resonanzen aufgrund der geringen Dispersion der chemischen Verschiebungen mit dreidimensionalen Experimenten häufig nicht. Die Erhöhung der Dimensionen führt zu besserer Auflösung

der einzelnen Resonanzen, sind jedoch aufgrund der zusätzlichen Evolutionszeiten mit Relaxationsverlusten verbunden. Entfaltete Proteine weisen allerdings eine hohe lokale Beweglichkeit und damit geringere Relaxationsverluste auf^[234]. Um die Aufnahmedauer und die Datenmengen zu reduzieren, wurde eine nichtlineare Aufnahmemethode verwendet. Die Auswahl der Datenpunkte erfolgte mittels *Poisson Disk Sampling*, zur Prozessierung wurde eine multidimensionale Fouriertransformation angewendet^[235-239]. Mit lediglich 0,0004% der Datenpunkte lassen sich gute Ergebnisse erzielen, dies entspricht beispielsweise einer Aufnahmezeit von einigen Stunden statt mehreren hunderten Jahren^[234].

In dieser Arbeit wurden die 5D-Experimente HabCabCONH und HN(CA)CONH verwendet^[238]. Der Magnetisierungstransfer erfolgt dabei wie in Abbildung 11 dargestellt. Beim HabCabCONH werden zunächst an die C_α und C_β gebunden Protonen angeregt, und die Magnetisierung über die direkt gebundenen Kohlenstoffkerne, die Carbonylgruppe und den Stickstoffkern der nachfolgenden Aminosäure auf das Amidproton übertragen und detektiert. Beim HN(CA)CONH sind zwei Transferwege möglich: Zum einen ausgehend vom Amidproton über den Stickstoffkern, C_α und die Carbonylgruppe der eigenen Aminosäure zur Amidgruppe der nachfolgenden Aminosäure (grün markiert in Abbildung 11B). Zum anderen vom Amidproton über den Stickstoffkern zum C_α der vorgehenden Aminosäure und über dessen Carbonylgruppe zurück zur Amidgruppe der eigenen Aminosäure (rot markiert in Abbildung 11B).

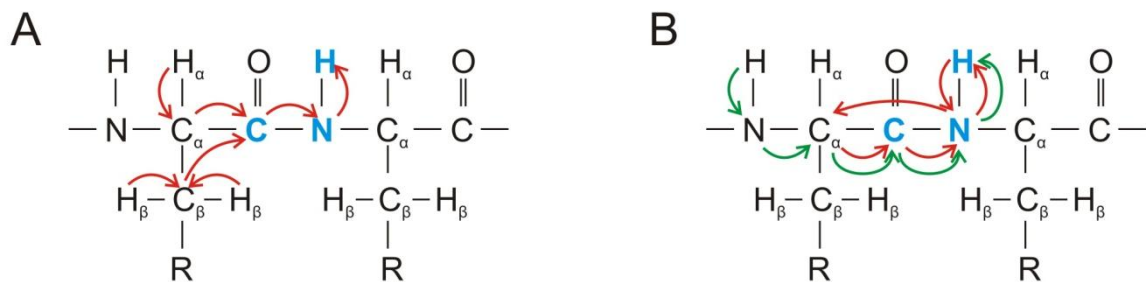


Abbildung 11: Magnetisierungstransfer der fünfdimensionalen Experimente HabCabCONH (A) und HN(CA)CONH^[238] (B). Unterschiedliche Farben (rot und grün) stellen dabei unterschiedliche Magnetisierungstransferwege dar. Die Kerne, deren chemischen Verschiebungen im HNCO bereits bestimmt wurden, sind blau hervorgehoben.

Die Grundlage dieser Experimente stellt ein 3D-HNCO-Experiment dar. In diesem werden die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen, des Stickstoffkernes und des Kohlenstoffs der Carbonylgruppe (¹H, ¹⁵N und ¹³CO) bestimmt. Als Vereinfachung wird bei der folgenden Erklärung angenommen, dass jeder dieser Signalsätze einer Aminosäure entspricht. Die Prozessierung der 5D-Experimente erfolgt über das Programm

Sparse MFT^[235,238]. Hierbei werden die chemischen Verschiebungen von ^1H , ^{15}N und ^{13}CO aus dem HNCO festgehalten und für jede Aminosäure die beiden übrigen Dimensionen prozessiert. Im HabCabCONH entstehen $\text{H}_{\omega\beta}\text{-C}_{\omega\beta}$ -Korrelationsspektren, welche jeweils nur die chemischen Verschiebungen der Vorgängeraminosäure enthalten und eine Zuordnung des Aminosäuretyps ermöglichen. Im HN(CA)CONH entstehen auf diese Weise $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren, welche jeweils nur zwei Resonanzen enthalten: Die der eigenen und der Vorgängeraminosäure. Dies ermöglicht dann die sequenzielle Zuordnung.

2.2.9.3 Experimente zur Interaktionsmessung

Eine Anwendung hochauflösender NMR-Spektroskopie sind Bindungsstudien. Besitzen gebundener und freier Zustand unterschiedliche chemische Verschiebungen, Kopplungskonstanten oder Relaxationsraten, kann dies untersucht werden. Der Begriff „chemischer Austausch“ bezieht sich nicht nur auf Interaktionsprozesse sondern auf alle reversiblen Prozesse mit zwei oder mehreren verschiedenen Zuständen, beispielsweise auch Konformationsänderungen oder chemische Reaktionen^[240].

Der einfachste Fall ist ein Zweizustandsmodell, bei welchem sich die NMR-Resonanzfrequenzen der beiden Zustände um $\Delta f = f_2 - f_1$ unterscheiden und mit der Geschwindigkeitskonstante k ineinander übergehen. Ein Zustand existiert durchschnittlich während der Zeit $1/k$ und geht dann in den anderen Zustand über. Bei einem Titrationsexperiment wird die Population p_2 des substratgebundenen Zustandes (Resonanzfrequenz f_2) schrittweise durch Zugabe des Liganden erhöht, die Population des ungebundenen Zustandes p_1 (Resonanzfrequenz f_1) nimmt somit ab.

Diese beiden Parameter k und $\Delta f = |f_2 - f_1|$ bestimmen die Zeitskala für den chemischen Austausch. Man unterscheidet folgende Grenzfälle:

Langsamer Austausch

Ist die Geschwindigkeitskonstante deutlich kleiner als der Unterschied der Resonanzfrequenzen ($k \ll \Delta f$) wird dies als langsamer Austausch bezeichnet. In diesem Fall sind beide Zustände getrennt detektierbar. Das Verhältnis der Signalintensitäten hängt dabei von den Populationen der beiden Zustände ab. Bei einem Titrationsexperiment nimmt die Intensität der Resonanz des ungebundenen Zustandes mit jedem Schritt ab, und die des substratgebundenen Zustandes zu. Dies kann in der vorletzten Zeile von Abbildung 12 von A nach D verfolgt werden.

Schneller Austausch

Ist die Geschwindigkeitskonstante deutlich größer als der Unterschied der Resonanzfrequenzen ($\Delta f \ll k$) wird dies als schneller Austausch bezeichnet. In diesem Fall können die Resonanzen der entsprechenden Populationen nicht mehr NMR-spektroskopisch aufgelöst werden. Man beobachtet stattdessen eine einzige Resonanz bei einer populationsgewichteten Frequenz $f_m = f_1 p_1 + f_2 p_2$. Im Fall eines Titrationsexperimentes führt dies zu einer schrittweisen Verschiebung der gemittelten Resonanzfrequenz. Dieses Austauschregime wurde in Abbildung 12 in der obersten Zeile dargestellt. In einem $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrum kann die relative mittlere Verschiebung $\Delta\delta$ durch folgende Gleichung berechnet werden^[241]:

$$\Delta\delta[\text{ppm}] = \sqrt{\frac{\Delta\delta(^1\text{H})^2 + \frac{1}{25}\Delta\delta(^{15}\text{N})^2}{2}} \quad (2.8)$$

Intermediärer Austausch

Weisen k und Δf dieselbe Größenordnung auf, so beobachtet man den so genannten intermediären Austausch. Hierbei kommt es zu einer Intensitätsabnahme der Kreuzsignale durch Linienverbreiterung. Dies ermöglicht bei bekannten Zuordnungen der beiden Zustände eine direkte Abschätzung der Geschwindigkeitskonstante, die exakte Untersuchung des Austauschregimes gestaltet sich jedoch schwierig^[240,242,243].

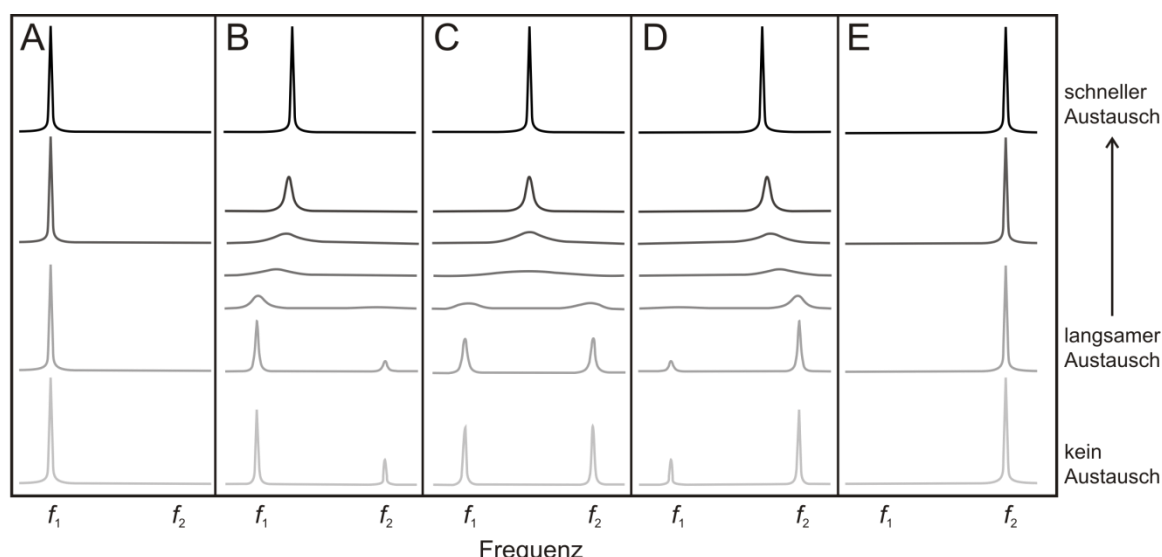


Abbildung 12: Chemischer Austausch für ein Zweizustandsmodell mit verschiedenen Populationen der Zustände. A: $p_1=1$ $p_2=0$, B: $p_1=3p_2$, C: $p_1=p_2=0.5$, D: $p_2=3p_1$ und E: $p_1=0$ $p_2=1$; Die Austauschrate wird von oben nach unten verringert^[240], die entstehenden Resonanzen bei gleicher Austauschrate und unterschiedlichen Populationen sind jeweils auf derselben Höhe und zusätzlich durch unterschiedliche Graustufen gekennzeichnet.

Bei allen Titrationen wurden die Signalintensitäten sowie die Änderung der chemischen Verschiebung in den ^1H - und ^{15}N -Dimensionen ausgewertet.

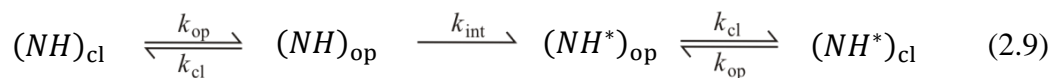
2.2.9.4 Amidprotonenaustausch

Grundlagen

Amidprotonen können aufgrund der starken Polarität der N-H-Bindung mit Protonen polarer Lösungsmittel wie Wasser austauschen. Die Austauschraten hängen von der Art des Lösungsmittels, dem pH-Wert und der Temperatur ab. Darüber hinaus spielt bei entfalteten Proteinen nur der Aminosäuretyp, sowohl der eigenen als auch der benachbarten Aminosäuren, eine entscheidende Rolle. Somit können intrinsische Austauschraten k_{int} für jede Aminosäure einer Polypeptidkette berechnet werden. Diese Werte liegen in der Größenordnung von Millisekunden bis Sekunden^[244].

Bei gefalteten Proteinen spielt die Abschirmung vom Lösungsmittel zusätzlich eine Rolle. Ist die N-H-Bindung in einer Wasserstoffbrückenbindung involviert oder nicht lösungsmittlexponiert kann kein Austausch stattfinden. Jedoch liegen selbst bei sehr stabilen Proteinen nicht alle Proteinketten in der vollständig gefalteten Form vor, vielmehr geht man von einem Gleichgewicht zwischen gefalteter Form (cl) und (teil-)entfalteter Form (op) aus^[245]. In den transient existierenden entfalteten Bereichen des Proteins ist Amidprotonenaustausch möglich. Somit ist der Amidprotonenaustausch im Vergleich zu einer entfalteten Kette verlangsamt. Dieser Schutz hängt vom Zeitanteil, während dem austauschkompetente Strukturen vorliegen, also von der Öffnungsrate k_{op} und Schließrate k_{cl} , ab. Die experimentellen Austauschraten für gefaltete Proteine liegen typischerweise im Bereich von Stunden bis Wochen^[244,246].

Diese Austauschreaktion kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:



Die Rückreaktion ist bei den üblicherweise gewählten experimentellen Bedingungen vernachlässigbar. Der Amidprotonenaustausch kann näherungsweise als Dreizustandsmodell mit folgender Austauschmatrix beschrieben werden^[247]:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} (NH)_{\text{cl}}(t) \\ (NH)_{\text{op}}(t) \\ (NH^*)_{\text{cl}}(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{\text{op}} & k_{\text{cl}} & 0 \\ k_{\text{op}} & -k_{\text{cl}} - k_{\text{int}} & 0 \\ 0 & k_{\text{int}} & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} (NH)_{\text{cl}}(t) \\ (NH)_{\text{op}}(t) \\ (NH^*)_{\text{cl}}(t) \end{pmatrix} \quad (2.10)$$

Die Berechnung der Eigenwerte dieser Austauschmatrix liefert die experimentell beobachtbare Austauschrate k_{ex} :

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \left[(k_{\text{op}} + k_{\text{int}} + k_{\text{cl}}) - \sqrt{(k_{\text{op}} + k_{\text{int}} + k_{\text{cl}})^2 - 4k_{\text{op}}k_{\text{int}}} \right] \quad (2.11)$$

Das Verhältnis zwischen intrinsischer Austauschrate und experimentell beobachteter Austauschrate wird als Schutzfaktor P bezeichnet:

$$P = \frac{k_{\text{int}}}{k_{\text{ex}}} \quad (2.12)$$

Meist lassen sich Proteine nach einem der nachfolgenden Grenzfälle auswerten:

Gefaltete, stabile Proteine ($k_{\text{cl}} \gg k_{\text{op}}$)

Für ein gefaltetes Protein ($k_{\text{cl}} \gg k_{\text{op}}$) ergibt sich die experimentell beobachtbare Austauschrate k_{ex} :

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{2} \frac{k_{\text{op}}k_{\text{int}}}{k_{\text{cl}} + k_{\text{int}}} \quad (2.13)$$

EX1-Mechanismus ($k_{\text{int}} \gg k_{\text{cl}}$)

Ist die Schließrate wesentlich kleiner als die intrinsische Austauschrate ($k_{\text{int}} \gg k_{\text{cl}}$) spricht man vom EX1-Mechanismus. Dieser entspricht einer Reaktion erster Ordnung (unabhängig vom pH-Wert und von der Proteinkonzentration) und ermöglicht eine direkte Aussage über die Öffnungsrate k_{op} . Die Gleichung (2.13) vereinfacht sich zu:

$$k_{\text{ex}} = k_{\text{op}} \quad (2.14)$$

EX2-Mechanismus ($k_{\text{cl}} \gg k_{\text{int}}$)

Ist die Schließrate groß im Vergleich zur intrinsischen Austauschrate ($k_{\text{cl}} \gg k_{\text{int}}$), vereinfacht sich Gleichung (2.13) und (2.12) folgendermaßen:

$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{op}}k_{\text{int}}}{k_{\text{cl}}}; \quad P = \frac{k_{\text{cl}}}{k_{\text{op}}} \quad (2.15)$$

Man kann somit aus den experimentell bestimmten Austauschraten k_{ex} und den theoretisch berechneten intrinsischen Austauschraten k_{int} den Schutzfaktor P berechnen. In diesem Grenzfall sind darin direkt Informationen über das Gleichgewicht der Konformationen und somit auch über die thermodynamische Stabilität des untersuchten Proteins enthalten^[248]. Dieser Grenzfall wird als EX2-Mechanismus bezeichnet, da es sich um eine Reaktion

2. Ordnung handelt. Sie ist abhängig von der Proteinkonzentration und der Konzentration der Austauschprotonen, somit also vom pH-Wert.

Experimentelle Bestimmung der Austauschrate für nativ gefaltete Proteine

Üblicherweise erfolgt die Bestimmung der Amidprotonen-Austauschraten durch H/D-Austausch. Dabei wird zunächst das protonierte Lösungsmittel gegen ein deuteriertes ersetzt^[249] und anschließend eine zeitaufgelöste Serie von ¹H/¹⁵N-Korrelationspektren aufgenommen. N-D-Gruppen weisen im Gegensatz zu N-H-Gruppen keine Kreuzsignale in diesen Spektren auf, wodurch es zu einer exponentiellen Abnahme der Signalintensitäten kommt. Aus diesem Verlauf lassen sich die Austauschraten bestimmen.

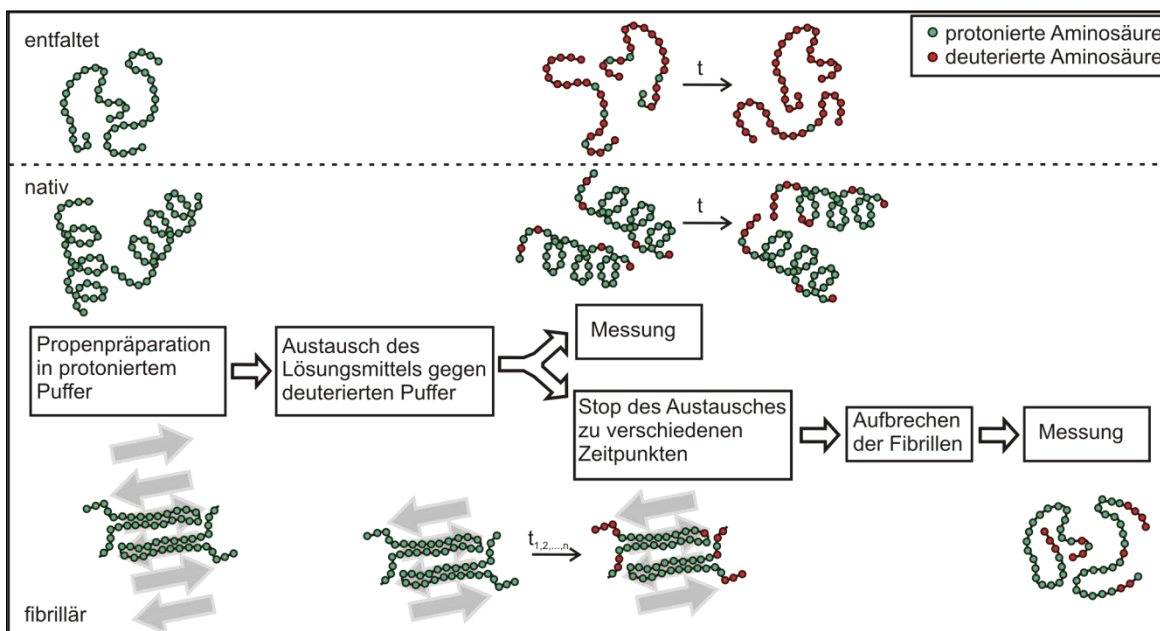


Abbildung 13: H/D-Austausch-Protokoll für direkt NMR-detektierbare Spezies (entfaltet und nativ gefaltet) sowie für nicht direkt NMR-detektierbare Spezies (in dieser Arbeit Amyloidfibrillen). Der Austausch von protonierten (grüne Kreise) zu deuterierten Amidgruppen (rote Kreise) verlangsamt sich durch Abschirmung vom Lösungsmittel oder Einbau in Wasserstoffbrücken-Bindungen. Die Probe wird üblicherweise zunächst in protonierter Pufferlösung präpariert. Anschließend wird der Austausch gestartet, indem der Puffer gegen deuterierten getauscht wird. Direkt NMR-detektierbare Spezies werden anschließend unmittelbar ins Spektrometer gebracht und eine Serie von ¹H-¹⁵N-Korrelationspektren aufgenommen. Für Amyloidfibrillen erfolgt der Austausch außerhalb des Spektrometers, die Probe wird hierfür aliquotiert und der Austausch zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. Anschließend werden die Fibrillen aufgebrochen und für jedes Aliquot ¹H-¹⁵N-Korrelationspektren aufgenommen. Aus dem beobachteten Signalabfall mit der Zeit kann für alle Spezies die Amidprotonenaustauschrate für jede Aminosäure bestimmt werden.

Amyloide Aggregate (Oligomere, Protofibrillen und Fibrillen) besitzen aufgrund ihrer Größe üblicherweise hohe transversale Relaxationsraten^[250]. Durch die damit einhergehenden Linienverbreiterungen sind sie mit diesen Methoden nicht direkt detektierbar, so dass ein komplexeres Protokoll angewendet werden muss. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

Die Amidprotonen der Ausgangsprodukte, beispielsweise entfaltetes A β ₁₋₄₀, besitzen dagegen häufig so hohe Austauschraten, dass mit dieser Methode bereits während der Präparationszeit alle Amidprotonen durch Deuterium ersetzt wären. Für diesen Fall werden spezielle Pulssequenzen angewendet.

Diese beiden Methoden zur Bestimmung von Amidprotonenaustauschraten werden in den nächsten Abschnitten ausführlich vorgestellt.

Experimentelle Bestimmung der Austauschrate für Amyloidfibrillen

Da die Beobachtung von NMR-Resonanzen größerer Spezies in Lösung (z. B. Proteinkomplexe, Oligomere und Amyloidfibrillen) aufgrund hoher transversaler Relaxationsraten nicht direkt möglich ist, wird ein spezielles Protokoll angewendet^[251,252]. Dieses ermöglicht es, Informationen über die Amyloidfibrillen auf NMR-detektierbare Monomere zu übertragen. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt. Die Amyloidfibrillen wurden wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben hergestellt (A β ₁₋₄₀ s. Abschnitt 7.1.1 S. XVII, PTH₁₋₈₄ s. Abschnitt 7.3.1 S. XXXV, mSAA1.1. Abschnitt 7.2, S. XXXIII) und aliquotiert. Der Austausch des Lösungsmittels erfolgte durch Zentrifugation und anschließendem Waschen mit deuteriertem Puffer. Dies stellt den Start des Amidprotonenaustausches dar, die Aliquots wurden für bestimmte Zeiten inkubiert. Der Austausch wurde anschließend durch Zentrifugation gestoppt und der Überstand möglichst vollständig entfernt. Ein zusätzlicher Waschschritt mit reinem D₂O war erforderlich, um Puffer-Rückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung bei -80°C gelagert. Die Amyloidfibrillen wurden dann in einer Mischung aus deuteriertem Dimethylsulfoxid (d₆-DMSO) und deuterierter Trifluoressigsäure (d-TFA) resuspendiert. Das Lösungsmittel DMSO ist dafür bekannt, fibrilläre Amyloidstrukturen aufzubrechen^[253] und besitzt keine austauschenden Protonen.

Somit können nun ¹H-¹⁵N-Korrelationsspektren aufgenommen werden, deren Signalintensitäten (I_{HD}) strukturelle Informationen über die Amyloidfibrillen enthalten. Als Referenz wurde das Protokoll analog mit protoniertem Puffer (I_H) durchgeführt. Durch die Aliquotierung und die nachfolgende Probenpräparation unterscheiden sich die Peptidkonzentrationen in den Aliquots.

Zur Berechnung des Protonierungslevels PL wurde daher eine Konzentrationskorrektur durchgeführt:

$$PL = \frac{I_{HD} \cdot c_H}{I_H \cdot c_{HD}} \quad (2.16)$$

- PL : Protonierungslevel
- I_{HD} : Intensität eines Kreuzsignals der deuterierten Probe
- I_H : Intensität eines Kreuzsignals der Referenzprobe
- c_{HD} : Konzentration der deuterierten Probe
- c_H : Konzentration der Referenzprobe

Die Kontamination mit H_2O oder D_2O in den NMR-Proben und damit verbundener Rückaustausch bzw. weiterer Austausch könnten schnell zu starken Veränderungen des Austauschmusters führen. Der Effekt von DMSO/Wassergemischen auf die Amidprotonenaustauschraten wurde bereits 1995 für verschiedene Proteine untersucht^[254]. Dabei zeigte sich eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert und der enthaltenen Wassermenge. In der Literatur wird sowohl ein Gefriertrocknungsschritt^[84,251,252,255-257] vor dem Auflösen der Fibrillen in DMSO als auch direktes Auflösen des nassen^[258-264] oder mittels Filterpapier getrockneten Pellets^[265] beschrieben.

Um eine Kontamination mit Wasser während der Präparation zu vermeiden, kann die gesamte Präparation unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt werden^[265]. Einige Arbeitsgruppen geben auch eine definierte Menge D_2O und/oder H_2O in die NMR-Probe^[251,252,255-257,259,260]. Werden nach dem Auflösen eine Serie von Experimenten aufgezeichnet, ermöglicht die Extrapolation mittels einer einfachen Exponentialfunktion Rückschlüsse auf die ursprünglichen Werte („*Backfitting*“)^[255,258-260]. Die verschiedenen Protokolle ergaben jedoch keine signifikanten Veränderungen, so dass in dieser Arbeit darauf verzichtet wurde. In Abschnitt 3.1.1 (S. 59) ist der Einfluss von definierten Mengen H_2O bzw. D_2O auf die Amidprotonen-Austauschraten der einzelnen Aminosäuren in DMSO/TFA-Gemischen beschrieben. Eine derartige Vorgehensweise wurde bereits in der Literatur beschrieben^[84,261-264].

Experimentelle Bestimmung von hohen Amidprotonen-Austauschraten

Beobachtet man den Austausch von Protonen zu Deuteriumkernen, so entsteht durch die Probenpräparation eine Totzeit von einigen Minuten. Dazu kommt zusätzlich die benötigte Zeit für die Detektion einer Serie von ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren. Auch mit in den letzten Jahren publizierten ultraschnellen Methoden^[221,266-270] liegt die Zeit pro Spektrum in der Größenordnung von Sekunden bis Minuten. Für Amidprotonenaustausch-Reaktionen im Millisekundenbereich wurden daher spezielle NMR-Pulssequenzen entwickelt^[271-274]. Die Detektion des Amidprotonenaustausches erfolgt hierbei nicht über zwei Kerne mit unterschiedlichen Eigenschaften (H/D-Austausch) sondern durch NMR-spektroskopische Präparation der Protonen zu detektierbaren und nichtdetektierbaren Protonen.

Im newMEXICO (*Magnetization EXchange in Isotopically labelled COmpounds*) Experiment^[271,273,274] wird dies folgendermaßen realisiert: Zunächst werden alle Protonen in die transversale Ebene gebracht und dephasiert, also in einen nichtdetektierbaren Zustand überführt. Die longitudinale Relaxation der Wasserprotonen erfolgt aufgrund von *radiation Damping* schnell^[275]. Während einer Zeit von 55 ms baut sich die Gleichgewichtsmagnetisierung wieder auf. Die Magnetisierung der Protein-Protonen bleibt dagegen in der transversalen Ebene, wird durch einen Gradienten dephasiert und ist somit im Folgenden nicht detektierbar. Darüber hinaus werden alle stickstoffgebundenen Protonen durch einen ^{15}N -Filter erneut dephasiert. Hierdurch wird effektiv sichergestellt, dass zu Beginn einer variablen Wartezeit keine detektierbaren Amidprotonen vorhanden sind. Nach dieser Wartezeit wird ein fHSQC-Spektrum^[219] gemessen. Es können somit nur die Amidprotonen detektiert werden, für die während einer variablen Wartezeit Austausch mit Wasserprotonen stattgefunden hat. Die Intensitätszunahme I mit steigender Wartezeit t wird durch folgende Gleichung beschrieben^[276,277]:

$$I(t) = \frac{k_{\text{ex}}}{R_{1\text{NH}} + k_{\text{ex}} - R_{1\text{W}}} \cdot [e^{-R_{1\text{W}}t} - e^{-(R_{1\text{NH}} + k_{\text{ex}})t}] \quad (2.17)$$

Mit dieser Gleichung kann die Austauschrate zwischen Wasser und Amidprotonen k_{ex} bestimmt werden. Außerdem hängt die Signalstärke von den longitudinalen Relaxationsraten der Amidprotonen $R_{1\text{NH}}$ und des Wassers $R_{1\text{W}} = (0,33 \pm 0,05) \text{ s}^{-1}$ ab.

2.2.9.5 Diffusionsmessungen

Die Diffusion ist ein ohne Krafteinwirkung von außen natürlich ablaufender, physikalischer Prozess in Flüssigkeiten und Gasen. Aufgrund der thermischen (oder Brownschen) Bewegung kommt es zu einer ungerichteten Ortsveränderung der Teilchen (z. B. Atome oder Moleküle). Diese Zufallsbewegungen führen bei ungleichmäßigen Verteilungen mit der Zeit zu einer Durchmischung, da sich aus Bereichen mit hoher Konzentration statistisch mehr Teilchen herausbewegen als umgekehrt. Ein solcher makroskopischer Stofftransport stellt eine Möglichkeit dar, die mikroskopische Diffusion zu beobachten. Eine weitere Möglichkeit ist, die Selbstdiffusion in homogenen Lösungen mittels NMR-Spektroskopie zu detektieren.

Die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten D erfolgt durch die Verwendung bipolarer, gepulster Feldgradienten^[278-281]. Diese erzeugen eine Ortsabhängigkeit der Larmorfrequenz und somit eine ortsabhängige Phaseninformation der Kernspins. Diese unterschiedliche Phaseninformation der Spins trägt makroskopisch zu einer Abschwächung des detektierbaren Signals bei. Ohne Diffusion ist es möglich, diese Abschwächung durch einen weiteren Feldgradienten aufzuheben (stimuliertes Echoexperiment^[282]), während diese Refokussierung nur unvollständig erfolgen kann, wenn sich die Position der Spins in der Zwischenzeit verändert hat (siehe Abbildung 14). Die somit entstehende Signalabnahme $S(G,\Delta)$ mit zunehmender Diffusionszeit Δ oder Gradientenstärke G wird für die in Abbildung 15A dargestellte Pulssequenz mit der Stejskal-Tanner-Gleichung^[282] beschrieben:

$$S(G, \Delta) = S(0) \underbrace{\exp \left[-\left(\frac{2\tau_1}{T_2} \right) - \left(\frac{2\tau_2}{T_1} \right) \right]}_{\text{Relaxationsterm } R} \underbrace{\exp \left[-\gamma^2 G^2 \delta^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right]}_{\text{Diffusionsterm}} \quad (2.18)$$

Hierbei stellt T_1 und T_2 die longitudinale bzw. transversale Relaxationsrate und γ das gyromagnetische Verhältnis von Protonen dar. Die Bedeutung der Zeiten kann Abbildung 14 bzw. 15A entnommen werden. Experimentell wird die Messung üblicherweise realisiert, indem ausschließlich die Gradientenstärke variiert wird, somit bleibt der Relaxationsterm konstant und ist vernachlässigbar.

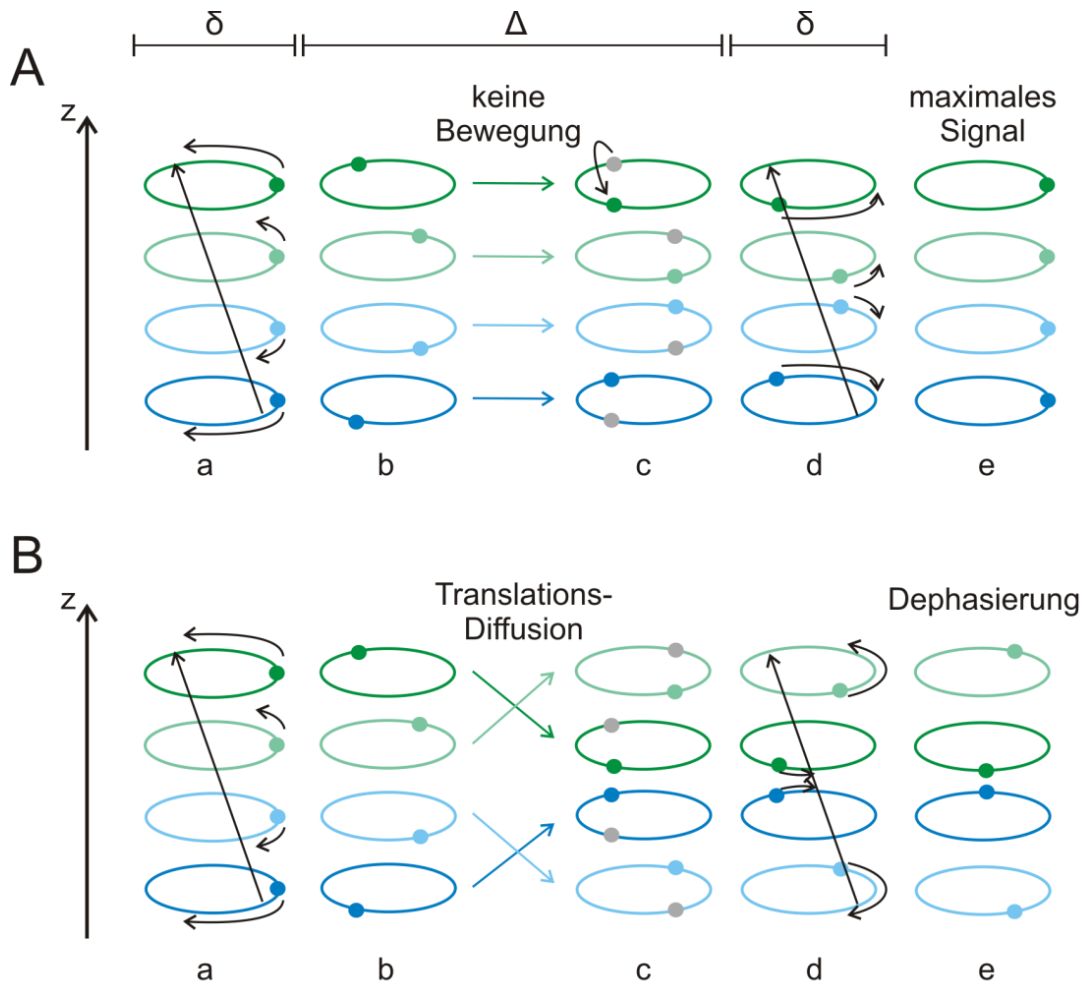


Abbildung 14: Prinzip der Messung von Diffusionskoeffizienten mittels NMR-Spektroskopie. Die in unterschiedlichen Schichten angeordneten Kernspins (dargestellt durch geschlossene Kreise) erfahren durch den Gradienten der Dauer δ in z-Richtung (schwarzer Pfeil) eine Ortskodierung bzw. Dephasierung (a \rightarrow b). In Abbildung A ist die Refokussierung ohne Translations-Bewegung der Spins während der Diffusionszeit Δ dargestellt. Zunächst werden die Spins durch zwei 90° -Pulse gespiegelt (c), woraufhin ein identischer Gradient alle Kernspins rephasiert (d \rightarrow e). In Abbildung B wird eine Translationsdiffusion der Kernspins angenommen (b \rightarrow c), wodurch der zweite Gradient keine vollständige Rephasierung bewirkt. Da nur kohärente Magnetisierung detektiert werden kann, führt dies zu einer Abnahme der Signalintensität. Nach Referenz^[283].

Die Diffusionskoeffizienten lassen sich je nach Fragestellung mit einer Serie eindimensionaler Protonenspektren (pseudo2D-Experiment) bestimmen. Liegen mehrere Proteine in der Probe vor, können diese mittels Isotopenmarkierung und Filter separat untersucht werden^[284-286]. Zusätzlich ist es möglich, Diffusionskoeffizienten basierend auf dem Kreuzsignal jeder einzelnen Aminosäure mittels einer Serie von ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren (pseudo3D-Experiment) zu bestimmen. Hierfür wurde eine Pulssequenz mit ^{15}N -Filter^[284] um eine zusätzliche Evolutionszeit ergänzt. Für diese Pulssequenz gilt die Stejskal-Tanner-Gleichung in einer etwas abgewandelten Form^[284]:

$$S(G, \Delta) = S(0) R \exp \left[-4 \gamma^2 G^2 \delta^2 D \left(\Delta + \frac{3}{2J} \right) \right] \quad (2.19)$$

Hier stellt J die ^1H - ^{15}N -Kopplungskonstante und R einen Relaxationsterm dar, die Nomenklatur der Zeiten ist in Abbildung 15B ersichtlich.

Die Stokes-Einstein-Gleichung^[287-290] stellt einen Zusammenhang zwischen dem Diffusionskoeffizient D und dem hydrodynamischen Radius r_H sowie der Viskosität des Lösungsmittels η her:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (2.20)$$

Sie hängt von der absoluten Temperatur T ab. k_B bezeichnet die Boltzmann-Konstante. Somit ist es bei bekannter Viskosität der Probe möglich, den hydrodynamischen Radius zu berechnen und die Größe der untersuchten Moleküle zu bestimmen. Die Viskositätsbestimmung erfolgte entweder mittels Dioxan als interner Standard^[291] oder nach Abschluss der NMR-Messungen mittels Kapillarviskosimeter m-VROC (Rheosense, Sam Ramon, CA). Zur theoretischen Abschätzung des hydrodynamischen Radius in Abhängigkeit von der Aminosäurezahl N wurden folgende Gleichungen verwendet^[292]:

native Proteine:
$$r_H = (4,75\text{\AA} \pm 1,11\text{\AA}) N^{0,29 \pm 0,02} \quad (2.21)$$

entfaltete Proteine:
$$r_H = (2,21\text{\AA} \pm 1,07\text{\AA}) N^{0,57 \pm 0,02} \quad (2.22)$$

Die Stokes-Einstein-Gleichung gilt streng betrachtet nur für die Diffusion größerer sphärischer, kolloidaler Partikel in einem Dispersionsmedium mit kleiner Reynolds-Zahl. Die Bewegung dieser Partikel ist aufgrund ihrer Größe typischerweise um mehrere Größenordnungen langsamer, als die des Lösungsmittels, womit die Diffusion als Bewegung in einem homogenen Lösungsmittel beschrieben werden kann.

Näherungsweise ist diese Gleichung für Proteine in wässriger Lösung anwendbar, jedoch können sich Abweichungen aufgrund von hohen Konzentrationen, Bindungsereignissen oder der Form der Proteine ergeben. Für Proteine in konzentrierten Lösungen wird die Gültigkeit der Stokes-Einstein-Gleichung kontrovers diskutiert^[293-297]. In dieser Arbeit wurden vergleichsweise geringe Peptidkonzentrationen eingesetzt, so dass davon auszugehen ist, dass die Bedingungen der Stokes-Einstein-Gleichung erfüllt sind. Abweichungen sollten sich also lediglich durch transiente Interaktionen ergeben^[295], welche somit durch die Messung des Diffusionskoeffizienten untersucht werden können.

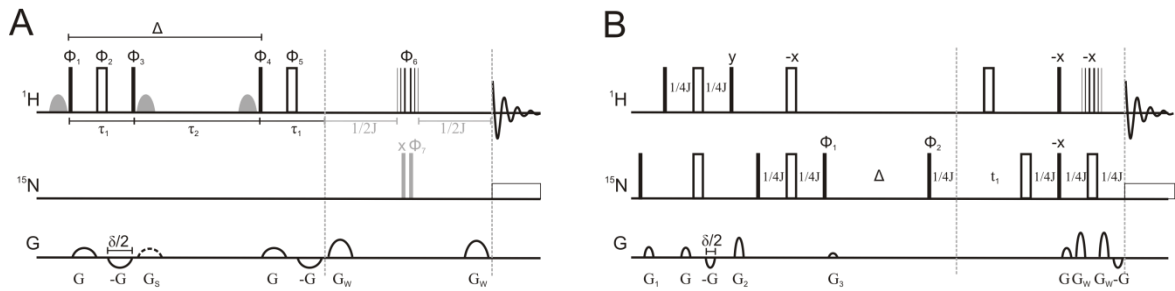


Abbildung 15: Verwendete Pulssequenzen zur Messung des Diffusionskoeffizienten D eines Proteins. In Abbildung A ist die Pulssequenz zur Messung eindimensionaler Protonenspektren dargestellt. Diese kann nur mit Protonenpulsen angewendet werden. In diesem Fall lauten die Phasen der einzelnen Pulse $\Phi_1 = x$; $\Phi_2 = \Phi_5 = 4x, 4(-x)$; $\Phi_3 = 8x, 8(-x)$; $\Phi_4 = \Phi_5 = x, y, -x, -y$ und der Empfängerphase $\Phi_{\text{rec}} = 2(x, y, -x, -y), 2(-x, -y, x, y)$. Liegen verschiedene Proteine in der Probe vor, können diese mittels Isotopenmarkierung und Filter separat untersucht werden^[285]. Der Isotopenfilter besteht aus zwei zusätzlichen, während des Watergate^[222,223] integrierten, Pulsen (grau dargestellt). Mit geeigneter Wahl der Phasen der einzelnen Pulse ($\Phi_1 = \Phi_2 = 8x, 8(-x)$; $\Phi_3 = x, y, -x, -y$, $\Phi_4 = \Phi_5 = x, y, -x, -y, -x, -y, x, y$; $\Phi_6 = 4x, 4(-x)$; $\Phi_7 = x, -x$) und der Receiverphase können so die ^{15}N -gebundenen Protonen selektiv ausgewählt ($\Phi_{\text{rec}} = 4x, 8(-x), 4x$) oder unterdrückt ($\Phi_{\text{rec}} = 8(x, -x)$) werden. Zur Wasserunterdrückung wurden hier zusätzlich *Water-Flipback*-Pulse eingesetzt, deren Phase immer entgegengesetzt zu der des entsprechenden nicht-selektiven Pulses gewählt wurde. Die Gradientenstärken zur Ortskodierung G wurden bei beiden Varianten von 5 bis 95 % der maximalen Gradientenstärke variiert. $G_s = 17.13\%$ (Spoilgradient); $G_w = 35\%$ (Wasserunterdrückung); $G_{\text{max}} = 0,535\text{ T/m}$ bzw. mit $0,34\text{ T/m}$ nach Korrektur um den Formfaktor für einen sinusförmigen Gradienten.

Abbildung B: Pulssequenz zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten anhand einzelner Aminosäuren^[284]. Wird zusätzlich zum Isotopenfilter eine weitere Evolutionszeit implementiert, können ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren für verschiedene Gradientenstärken gemessen werden. Sofern nicht in der Abbildung explizit beschriftet, lautet die Phase der Pulse x , $\Phi_1 = 2(y, -y)$; $\Phi_2 = 2y, 2(-y)$. Die Gradientenstärken wurden wie folgt gewählt: $G_1 = 20\%$, $G_2 = 40\%$, $G_3 = 10\%$, $G_w = 50\%$, die Gradientenstärke zur Ortskodierung wurde von 5 bis 95 % der maximalen Gradientenstärke variiert.

Alle Diffusionsexperimente wurden bei 600 MHz Protonenfrequenz aufgenommen. Für die ^1H -Protonenexperimente erfolgte die Datenaufnahme mit 1024 komplexen Punkten und 49 ms Akquisitionszeit. Zur Prozessierung wurden eine \cos^2 -Fensterfunktion und *zero-filling* auf 4096 komplexe Datenpunkte vor der Fouriertransformation mit Topspin 3.0 angewendet. Die Intensitätsabschwächung in Abhängigkeit der Gradientenstärke wurde durch Integration über zwei charakteristische Bereiche bestimmt (Amidbereich: 6,6 bis 8,9 ppm; aliphatischer Bereich 0,5 bis 3,4 ppm).

Die ^{15}N -editierten Diffusionsexperimente wurden als Pseudo-3D-Experiment mit 32 *scans* pro Inkrement aufgenommen, die Zahl der Datenpunkte beträgt 1024 (^1H direkte Dimension (dir. Dim.)) x 256 (^{15}N) x 14 (Zahl der Gradientenstärken). Es wurden zuerst die Gradientenstärken und anschließend die ^{15}N -Dimension inkrementiert. Die spektralen Weiten betragen 7812 (^1H) x 1278 (^{15}N) Hz bei Transmitterfrequenzen von 4,7 (^1H) x 117,5 (^{15}N) ppm. Die Spektren wurden mit NMRPipe prozessiert, die direkte Dimension wurde mit einer \cos^2 -Fensterfunktion gewichtet. Die Signalintensitäten der Kreuzsignale wurden mittels NMRView ermittelt. Dieses Programm wurde auch für die Anpassung einer Exponentialfunktion an die Intensitäten in Abhängigkeit von G^2 genutzt.

2.2.9.6 Relaxationsmessungen zur Dynamikuntersuchung

Relaxation bezeichnet die Vorgänge, die ein System nach einer Anregung in seinen Gleichgewichtszustand zurückkehren lassen. In der NMR-Spektroskopie versteht man unter Relaxation sowohl die Abnahme transversaler Relaxation als auch die tatsächliche Rückkehr zum Gleichgewichtszustand durch den Aufbau longitudinaler Magnetisierung. Diese Vorgänge beruhen auf verschiedenen Relaxationsmechanismen und ermöglichen Rückschlüsse auf die interne Dynamik von Proteinen. Verschiedene NMR-Parameter ermöglichen die Untersuchung der Dynamik auf einer großen Zeitskala, von pico-Sekunden bis zu Echtzeitkinetiken im Bereich von Tagen (s. Abbildung 16). Hier sollen nun die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Bestimmung der longitudinalen (R_1) und der transversalen (R_2) Relaxationsrate, sowie der Dispersion der transversalen Relaxationsrate unter Verwendung der Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Spinecho-Sequenz (CPMG) vorgestellt werden.

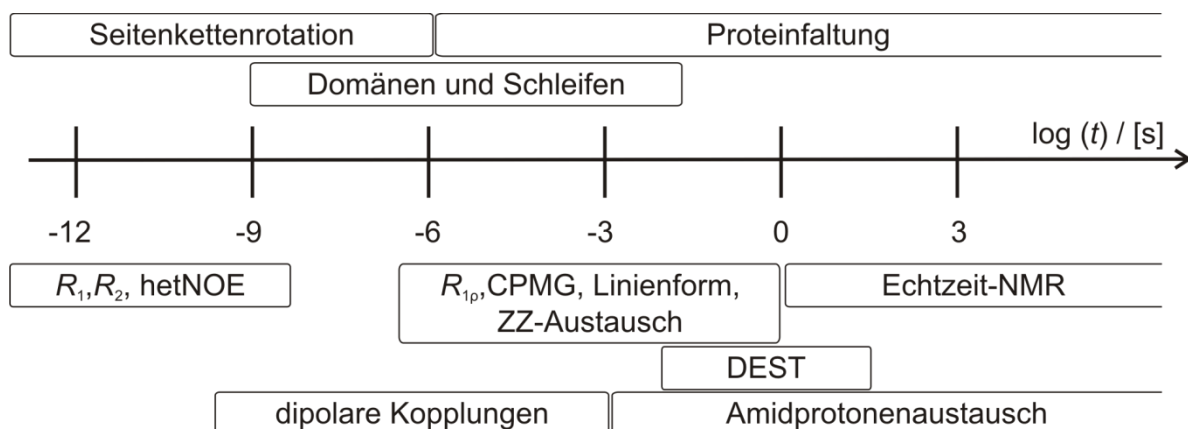


Abbildung 16: Logarithmische NMR-Zeitskala^[298]. Die verschiedenen Prozesse der Proteindynamik sind oberhalb, mögliche Messmethoden unterhalb der Zeitachse dargestellt. Auf die in der Arbeit verwendeten Methoden wird in den entsprechenden Abschnitten genauer eingegangen.

Die Relaxationstheorie verknüpft über die spektrale Leistungsdichtefunktion $J(\omega)$ die experimentell zugänglichen Relaxationsraten mit Magnetfeldfluktuationen und somit mit Fluktuationen der Kernspinorientierungen. Die spektrale Leistungsdichtefunktion ist letztlich abhängig von der Korrelationszeit τ_c und der Frequenz ω , welche dem Fluktuationsprozess zugrunde liegt.

Für ein ^{15}N -Protonen-Paar ergeben sich folgende Gleichungen^[299]:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (2.23)$$

$$R_1 = \frac{d^2}{4} \{J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)\} + \frac{1}{3} \omega_N^2 \Delta\omega^2 J(\omega_N) \quad (2.24)$$

$$R_2 = \frac{d^2}{8} \{4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)\} \\ + \frac{1}{18} \omega_N^2 \Delta\sigma^2 \{4J(0) + 3J(\omega_N)\} + R_{\text{ex}} \quad (2.25)$$

$$\text{mit } d = \frac{\mu_0 h \gamma_H \gamma_N}{8\pi^2} \langle r_{\text{NH}} \rangle^{-3} \quad (2.26)$$

Hierbei stellt μ_0 die magnetische Feldkonstante, h das Plancksche-Wirkungsquantum, γ_H bzw. γ_N das gyromagnetische Verhältnis und ω_H bzw. ω_N die Larmorfrequenz des Protons bzw. des ^{15}N -Kernes dar. $\Delta\omega$ beschreibt die Differenz der Parallel- und Senkrechtkomponente der ^{15}N chemischen Verschiebungsanisotropie, welche üblicherweise in der Größenordnung von -160 ppm liegt^[300]. Der Parameter d stellt die Kopplungskonstante der Dipol-Dipol-Wechselwirkung von über den Raum wechselwirkenden Kernspins dar. Die mittlere Bindungslänge zwischen Proton und ^{15}N -Kern wird mit $\langle r_{\text{NH}} \rangle$ bezeichnet. Mittels des Austauschterms R_{ex} wird möglicher Konformationsaustausch (chemischer Austausch) auf der ms-Zeitskala berücksichtigt.

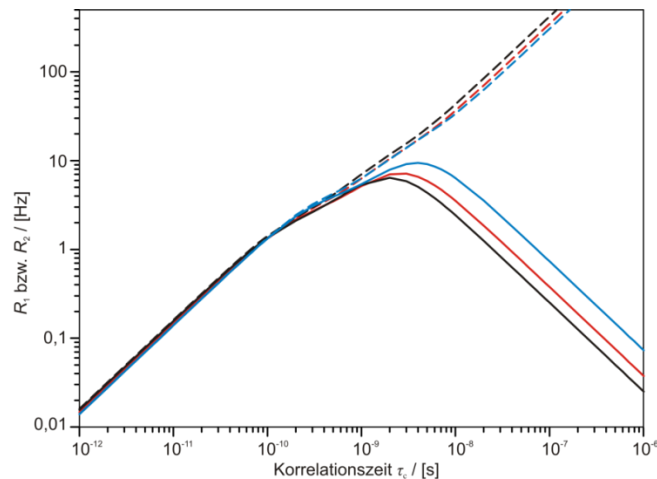


Abbildung 17: Simulierte doppellogarithmische Darstellung der longitudinalen und transversalen Relaxationsrate in Abhängigkeit der Rotationskorrelationszeit und der magnetischen Feldstärke. Die Relaxationsraten R_1 (durchgezogene Linien) und R_2 (gestrichelte Linien) sind in Abhängigkeit der Korrelationszeit τ_c dargestellt. Es wurde ein Abstand $\langle r_{\text{NH}} \rangle = 0,102$ nm zwischen ^{15}N -Kern und Proton angenommen. Außerdem ist die Abhängigkeit der Relaxationsraten von der magnetischen Flussdichte B_0 dargestellt ($B_0 = 9,4$ T in blau, $B_0 = 14,1$ T in rot und $B_0 = 18,8$ T in schwarz).

Liegt kein chemischer Austausch vor, lassen sich die transversale und longitudinale Relaxationsrate entsprechend Gleichung (2.24) und (2.25) in Abhängigkeit der Korrelationszeit graphisch darstellen (Abbildung 17). Man erkennt, dass die R_2 Relaxationsraten mit zunehmender Rotationskorrelationszeit, also mit steigender Molekülgröße bzw. abnehmender Flexibilität ansteigen. Die R_1 -Relaxationsrate nimmt zunächst ebenfalls mit der Korrelationszeit zu, erreicht jedoch ein Maximum bei $\omega\tau_c \approx 1$ und fällt mit weiter steigender Korrelationszeit ab.

Möchte man den Einfluss des chemischen Austausch auf die transversale Relaxation untersuchen, variiert man die Anzahl der CPMG-Module ($\tau_{CP}-180^\circ-\tau_{CP}$) bei konstanter Relaxationszeit T . Die Berechnung der effektiven transversalen Relaxationsrate $R_{2,eff}$ für jeden τ_{CP} -Wert erfolgt aus einem Referenzexperiment ohne (I_0) und mit CPMG-Block ($I(\tau_{CP})$):

$$R_{2,eff} = \frac{1}{T} \ln \left(\frac{I_0}{I(\tau_{CP})} \right) \quad (2.27)$$

Die Auftragung der $R_{2,eff}$ -Werte gegen τ_{CP} ermöglicht die Bestimmung der Besetzungszahlen der austauschenden Spezies, der Austauschrate und der individuellen Relaxationsraten der beiden Spezies allgemein^[301-303] oder für bestimmte Grenzfälle des chemischen Austausches^[302,304-306].

Die Pulssequenzen zur Messung der R_1 - und R_2 -Raten der ^1H - $^{13}\text{C}_{\text{aro}}$ -Kerne^[307] wurden von Ulrich Weininger für die ^1H - ^{15}N -Kerne modifiziert. Die CPMG-Pulssequenz basiert auf Loria *et al.*^[308], wurde jedoch von Ulrich Weininger ebenfalls bzgl. der transversalen Relaxation optimiert^[307]. Die verwendeten Pulssequenzen sind in Abschnitt 8.6 aufgeführt. Die ^{15}N -Relaxationsmessungen wurden bei 600 MHz als Pseudo-3D-Experimente mit 24 *scans* pro Inkrement detektiert. Die Zahl der Datenpunkte beträgt 1024 (^1H dir. Dim.) x 256 (^{15}N) x 9 (R_1 & R_2) bzw. 15 (R_2 -Dispersion). In der dritten Dimension wurden die Relaxationszeiten zwischen 0 und 1,5 s (R_1), 0 und 160 ms (R_2) bzw. die CPMGFrequenzen zwischen 0 und 1000 Hz bei einer Relaxationszeit von 120 ms variiert. Die spektralen Weiten betragen 7812 (^1H) x 1278 (^{15}N) Hz bei Transmitterfrequenzen von 4,7 (^1H) x 117,5 (^{15}N) ppm. Die Spektren wurden mit NMRPipe prozessiert und die direkte Dimension mit einer \cos^2 -Fensterfunktion gewichtet. Die Signalintensitäten der Kreuzsignale wurden mittels NMRView ermittelt, dieses Programm wurde auch für die Anpassung einer Exponentialfunktion an die Intensitäten in Abhängigkeit der Zeit genutzt (R_1 und R_2).

2.2.9.7 hetNOE

Der Kern-Overhauser-Effekt (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE) beruht auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zweier gekoppelter Kernspins (beispielsweise ^{15}N und ^1H). Durch einen Radiofrequenz-Puls werden Protonen-Übergänge induziert, bis dieser Übergang gesättigt ist, also die Populationen der Zustände gleich sind und kein Gleichgewichtszustand mehr herrscht. Über dipolare Wechselwirkung erfolgt nun Relaxation. Da quantenmechanisch nur bestimmte Übergänge erlaubt sind, führt dies zu einer detektierbaren Veränderung des Besetzungszahlunterschiedes, also der detektierbaren Magnetisierung und somit der Signalintensitäten I im gesättigten Experiment (sat) verglichen mit einem Referenzexperiment (ref) ohne Sättigungspuls:

$$\text{hetNOE} = \frac{I_{\text{sat}}}{I_{\text{ref}}} \quad (2.28)$$

Auch dieser Effekt lässt sich über die spektrale Leitungsdichtefunktion $J(\omega)$ mit der Rotationskorrelationszeit verknüpfen^[299]:

$$\text{hetNOE} = 1 + \frac{d^2}{4R_1} \frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{N}}} \{6J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}}) - J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}})\} \quad (2.29)$$

Hier stellt R_1 die longitudinale Relaxationsrate aus Gleichung (2.24) und d die Kopplungskonstante der Dipol-Dipol-Wechselwirkung (s. Gleichung (2.26)) dar. Somit ergibt sich ein definierter Kurvenverlauf mit einem Wertebereich von $-4 < \text{hetNOE} < 0,9$. Ein kleiner Wert steht für eine geringe Rotationskorrelationszeit und somit hohe Beweglichkeit des NH-Bindungsvektors (Abbildung 18).

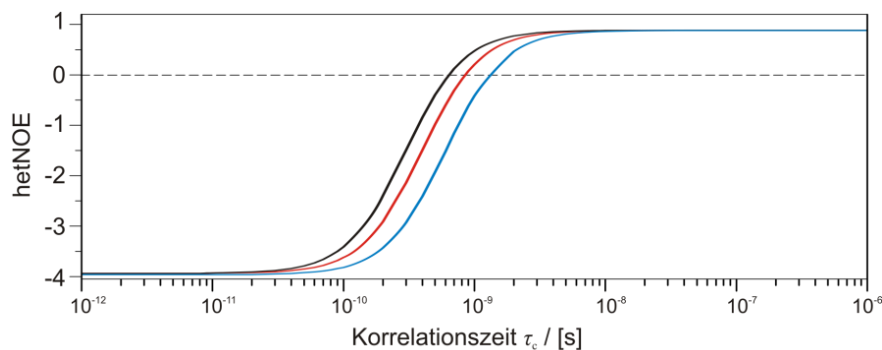


Abbildung 18: Logarithmische Darstellung des mit Gleichung (2.29) simulierten heteronuklearen NOE-Effektes in Abhängigkeit der Korrelationszeit τ_c . Es wurde ein Abstand $\langle r_{\text{NH}} \rangle = 0,102\text{nm}$ zwischen ^{15}N -Kern und Proton angenommen. Außerdem ist die Abhängigkeit der Relaxationsraten von der magnetischen Flussdichte B_0 dargestellt ($B_0 = 9,4\text{T}$ in blau, $B_0 = 14,1\text{T}$ in rot und $B_0 = 18,8\text{T}$ in schwarz).

Die ^{15}N -hetNOE-Messungen wurden bei 600 MHz als Pseudo-3D-Experimente mit 64 scans pro Inkrement detektiert. Die Zahl der Datenpunkte beträgt 1024 (^1H dir. Dim.) x

256 (^{15}N) x 2. In der dritten Dimension werden ein Referenz-Experiment und ein Experiment mit einer Sättigungszeit von 9s aufgenommen. Die Sättigung der Amidprotonen erfolgte durch eine Serie von 900 Reburp-Pulsen (180°)^[309] von je 1,6ms Dauer eingestrahlt im Zentrum des Amidprotonenbereiches (7,5ppm). Die spektralen Weiten betragen 7812 (^1H) x 1278 (^{15}N) Hz bei Transmitterfrequenzen von 4,7 (^1H) x 117,5 (^{15}N)ppm. Die Spektren wurden mit NMRPipe prozessiert, die direkte Dimension wurde mit einer \cos^2 -Fensterfunktion gewichtet. Die Signalintensitäten der Kreuzsignale wurden mittels NMRView ermittelt.

2.2.9.8 DEST

Zur Charakterisierung des Austausches von NMR-sichtbaren Spezies mit NMR-unsichtbaren Spezies, welche transient an einen hochmolekularen Komplex binden, wurde die Methode DEST (*Dark State Exchange Saturation Transfer*) entwickelt^[310,311]. Die stark erhöhte Rotationskorrelationszeit im gebundenen Zustand führt zu hohen transversalen Relaxationsraten. Somit ist eine direkte Beobachtung mit traditionellen NMR-Methoden in Lösung nicht möglich. Die hiermit einhergehende Linienverbreiterung lässt sich aber indirekt nutzen, indem man eine schwache Radiofrequenz-Strahlung weit off-resonant einstrahlt. Diese hat praktisch keine Auswirkung auf die ungebundene Form, während der gebundene Zustand selektiv, wenn auch nur partiell, gesättigt wird. Diese Sättigung wird auf die beobachtbare Spezies übertragen, sofern der chemische Austausch auf der richtigen Zeitskala (10ms bis 1s) erfolgt. In diesem Fall beobachtet man eine Abschwächung der Signalintensitäten.

Nach Fawzi *et al.*^[310] stellt die Assoziation der monomeren Peptide an Oligomere (bzw. in dem in dieser Arbeit untersuchten Fall an Fibrillen) zwar wie in Abschnitt 0 (S. 33) eine Reaktion zweiter Ordnung dar, kann jedoch auch als Reaktion Pseudo-Erster-Ordnung mit scheinbarer Assoziationsrate $k_{\text{on}}^{\text{app}}$ beschrieben werden. Die Dissoziationsrate k_{off} ist für beide Beschreibungen identisch. Eine Herleitung dieses Zusammenhanges ist im Anhang in Abschnitt 7.3.3 (S. XLIII) zu finden. Es kann nicht zwischen unspezifischer Bindung an der Fibrilloberfläche und Aufwachsen an den Enden der Fibrille unterschieden werden.

Die Signalstärke der beobachtbaren Magnetisierung I_Z^A kann über eine erweiterte McConnell-Gleichungen beschrieben werden^[310]:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} E/2 \\ I_x^A \\ I_y^A \\ I_z^A \\ I_x^B \\ I_y^B \\ I_z^B \\ S_x^A \\ S_y^A \\ S_z^A \\ S_x^B \\ S_y^B \\ S_z^B \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_I^A + k_{on}^{app} & \Omega_I^A & -\omega_y & -k_{off} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\Omega_I^A & \lambda_I^A + k_{on}^{app} & \omega_x & 0 & -k_{off} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -2\Theta_I^A & \omega_y & -\omega_x & \rho_I^A + k_{on}^{app} & 0 & 0 & -k_{off} & 0 & 0 & \sigma_A & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{on}^{app} & 0 & 0 & \lambda_I^B + k_{off} & \Omega_I^B & -\omega_y & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{on}^{app} & 0 & -\Omega_I^B & \lambda_I^B + k_{off} & \omega_x & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -2\Theta_I^B & 0 & 0 & -k_{on}^{app} & \omega_y & -\omega_x & \rho_I^B + k_{off} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \sigma_B \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \lambda_S^A + k_{on}^{app} & \Omega_S^A & -\omega_y & -k_{off} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -\Omega_S^A & \lambda_S^A + k_{on}^{app} & \omega_x & 0 & -k_{off} & 0 \\ -2\Theta_S^A & 0 & 0 & \sigma_A & 0 & 0 & 0 & \omega_y & -\omega_x & \rho_S^A + k_{on}^{app} & 0 & 0 & -k_{off} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -k_{on}^{app} & 0 & 0 & \lambda_S^B + k_{off} & \Omega_S^B & -\omega_y \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -k_{on}^{app} & 0 & -\Omega_S^B & \lambda_S^B + k_{off} & \omega_x \\ -2\Theta_S^B & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \sigma_B & 0 & 0 & -k_{on}^{app} & \omega_y & -\omega_x & \rho_S^B + k_{off} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} E/2 \\ I_x^A \\ I_y^A \\ I_z^A \\ I_x^B \\ I_y^B \\ I_z^B \\ S_x^A \\ S_y^A \\ S_z^A \\ S_x^B \\ S_y^B \\ S_z^B \end{pmatrix}$$

(Formel 2.30)

Hier stellt A die beobachtbare (monomere) Spezies im chemischen Austausch mit der nicht direkt detektierbaren Spezies B (fibrillär) dar. Das Ein-Spin-Modell von Helgstrand *et al.*^[312] wurde von Fawzi *et al.*^[310] erweitert, um Kreuzrelaxation zwischen Amidprotonen I und aliphatischen Protonen S zuzulassen. Dies ist nötig, um die Breite des Sättigungsprofils der Referenzprobe (frisch gelöstes PTH₁₋₈₄ mit vernachlässigbarem Fibrillenanteil) zu erklären. Die Breite dieses Profils entspricht dem gesamten Bereich der chemischen Verschiebungen des Monomers (~ 5 kHz). ρ und λ bezeichnen die longitudinale bzw. transversale Relaxationsrate der jeweiligen Spezies, σ die Kreuz-Relaxationsrate zwischen den Spins I und S . Diese wird in der monomeren Form als klein angenommen, wobei die anderen Parameter für einen großen Wertebereich ($\sigma = -0,5$ bis $3,0 \text{ s}^{-1}$) nicht variieren. In der fibrillengebundenen Form wird die Kreuz-Relaxationsrate σ als groß (-500 s^{-1}) angenommen, wobei der exakte Wert keine Rolle spielt, da für entsprechend große R_2 -Raten in dieser Form I und S gleichermaßen durch den CW-Puls beeinflusst werden. E ist ein Einheitsoperator und Θ bezeichnet die Gleichgewichtsmagnetisierungen. Das Experiment wird typischerweise für mindestens zwei Stärken des Sättigungspulses ω wiederholt. Die numerische Lösung für I_Z^A , die experimentell beobachtbare Magnetisierung nach einer festen Sättigungszeit t in Abhängigkeit des Offsets Ω wurde mit Matlab als Matrixexponentialfunktion berechnet^[311]. Diese Formel konnte an die experimentellen Sättigungsprofile mit Ausnahme des Bereiches der Resonanzfrequenz $\pm 2,5$ kHz gut angepasst werden. Dieser Bereich ist aufgrund der hohen Spinanzahl in diesem Modell schlecht repräsentiert.

Experimentell wurde das ^1H DEST Experiment bei 600 MHz aufgenommen. Die verwendete Pulssequenz ist in Abbildung 19 schematisch dargestellt. Die Sättigung des fibrillären Zustandes erfolgte mit einem Radiofrequenzpuls mit einer Dauer von 1 s und einer Stärke ω von 180, 350 oder 500 Hz. Der Offset Ω von der Wasserresonanz wird zwischen 35 kHz bis -35 kHz variiert. Während dieser Sättigungszeit ist auch ein Sättigungstransfer von einem oligomeren (fibrillären) zu einem monomeren Zustand möglich. Direkt nach dem Sättigungspuls wurde ein *Jump-Return*-Schema zur Wasserunterdrückung verwendet. Dieses wurde zur Anregung der Amidprotonen optimiert. Zusätzlich wird ein selektiver Reburp-Puls verwendet, welcher von zwei sinusförmigen Gradienten eingerahmt wird, um verbliebenes Wassersignal zu unterdrücken.

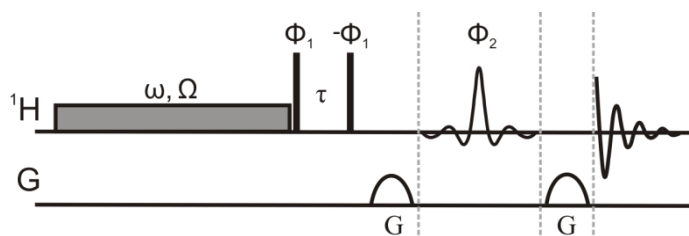


Abbildung 19: Pulssequenz für das ^1H -DEST-Experiment. Die Sättigung des fibrillären Zustandes erfolgt mit einem Radiofrequenzpuls der Dauer 1 s und einer Stärke von $\omega = 180, 350$ oder 500 Hz. Der Offset Ω von der Wasserresonanz wird von -35 kHz bis 35 kHz variiert. Die Anregung und Wasserunterdrückung erfolgte mit einem *Jump-Return*-Schema, welches für eine optimale Anregung des Amidprotonenbereiches optimiert wurde ($\tau = 404$ ms zentriert bei $9,7$ ppm). Zusätzlich wurde ein selektiver Reburp-Puls (Dauer $2,083$ ms, eingestrahlt bei $8,9$ ppm) flankiert von sinusförmigen Gradienten (300 ms, $0,27$ T/m) verwendet. Die Phasen der einzelnen Pulse betragen $\Phi_1 = x, -x$; $\Phi_2 = -x, -x, -y, -y, x, x, y, y$ und die Receiverphase $\Phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x$.

Die Datenaufnahme erfolgt mit 2048 komplexen Punkten und 130 ms Akquisitionszeit. Zur Prozessierung wurden eine \cos^2 -Fensterfunktion und *zero-filling* auf 8192 komplexe Datenpunkte vor der Fouriertransformation mit Topspin 3.0 angewendet. Die Intensitätsabschwächung im Vergleich zu einem Referenzspektrum ohne Sättigungspuls wurde durch Integration über den Amidbereich ($6,6$ bis $8,7$ ppm) bestimmt.

Fawzi *et al.* veröffentlichten 2011 eine erweiterte Methode um den DEST-Effekt mit aminosäurespezifischer Auflösung zu untersuchen^[313]. Hierbei erfolgt die Sättigung während des Relaxationsblocks eines heteronuklearen R_1 -Experimentes. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ^{15}N -markiertes PTH_{1-84} untersucht. Die Sättigung erfolgt hierbei auf die ^{15}N Kerne mit einem kontinuierlichen Sättigungspuls von 450 ms Dauer. Die Frequenz des Sättigungspulses wird zwischen -32 kHz bis 32 kHz (Abstand von der ^{15}N -Transmitterfrequenz) variiert und für mindestens zwei verschiedene Stärken des

RF-Pulses (hier 600 und 800 Hz) mittels einer Serie von ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren detektiert.

Die Datenaufnahme und Prozessierung erfolgte analog zum in Abschnitt 2.2.9.6 (S.52 f.) beschriebenen R_1 -Experiment. Für jedes Korrelationsspektrum wurden die Intensitäten aller Kreuzsignale mittels NMRView ermittelt. Es erfolgte jeweils eine Normierung auf die Mittelwerte aus zwei Referenzexperimenten ohne Sättigungspuls.

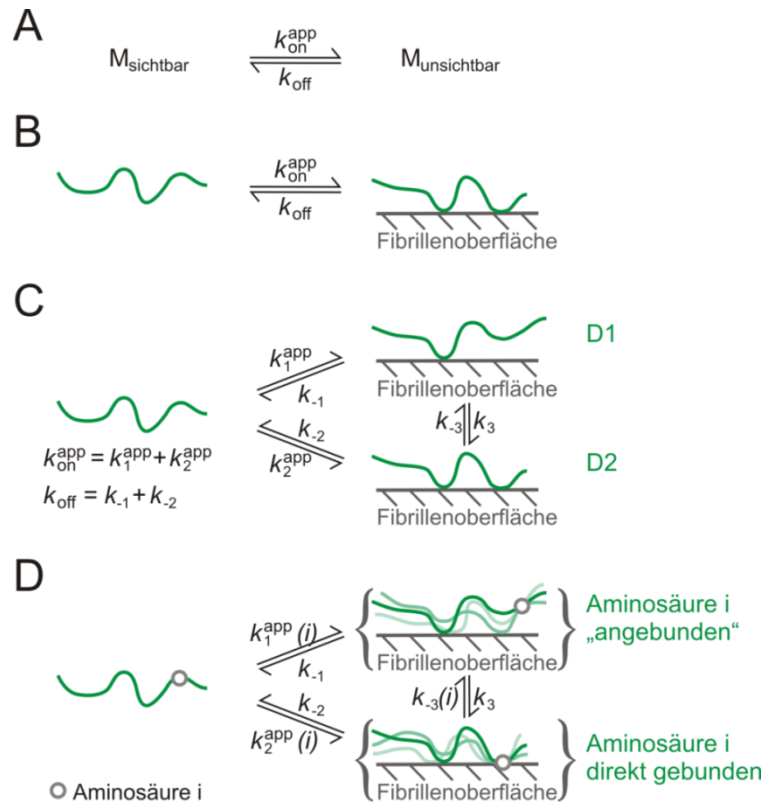


Abbildung 20: Zusammenfassung der kinetischen Modelle im DESTfit Programm^[311]. A: Der Übergang zwischen einem NMR-sichtbarem und einem NMR-unsichtbarem Molekül kann als (Pseudo-)Zweizustandsmodell beschrieben werden. Dieses Gleichgewicht wird durch eine Assoziationsrate $k_{\text{on}}^{\text{app}}$ und eine Dissoziationsrate k_{off} charakterisiert. Abbildung B bezeichnet ein solches Modell, wobei nur ein NMR-unsichtbarer Zustand angenommen wird. In Abbildung C ist ein Dreizustandsmodell dargestellt. Es werden zwei thermodynamisch unterschiedliche NMR-unsichtbare Zustände populiert. Hierbei können auch verschiedene Spezialfälle betrachtet werden: D1 könnte ein *on-pathway* Intermediat ($k_{-2}=k_2^{\text{app}}=0$) oder einen *off-pathway* Zustand ($k_{-3}=k_3=0$) darstellen. Darüber hinaus kann für beide Zustände eine identische Dissoziationsrate angenommen werden ($k_{-1}=k_{-2}$). In D ist ein Pseudo-Zweizustandsmodell dargestellt. Der unsichtbare Zustand wird hier in zwei aminosäureabhängige Zustandsensembles unterteilt: Zum einen kann ein direkter Kontakt zwischen der i -ten Aminosäure und der Fibrillenoberfläche bestehen. Andererseits sind auch Zustände vorstellbar, bei denen diese Aminosäure nur über die Peptidkette mit der Fibrille verbunden ist („angebundener“ Zustand). Das Modell wird ebenfalls durch eine gemeinsame Assoziations- ($k_1^{\text{app}}(i)+k_2^{\text{app}}(i)=k_{\text{on}}^{\text{app}}$) und Dissoziationsrate ($k_{-1}=k_{-2}=k_{\text{off}}$) für alle Aminosäuren i gekennzeichnet. Die Abbildung wurde nach Fawzi *et al.* gestaltet^[311].

Anschließend erfolgte die Anpassung verschiedener Austauschmodelle an die experimentellen Sättigungsprofile mittels Matlab^[311]. Die in der Fitroutine zur Verfügung stehenden Modelle für den chemischen Austausch zwischen monomerem und fibrillärem Zustand sind in Abbildung 20 schematisch dargestellt, die entsprechenden

Differentialgleichungen sind im Anhang in Abschnitt 7.3.3 (S. XLIV) aufgelistet^[313]. Alle Modelle berücksichtigen die experimentell ermittelten R_1 - und R_2 -Relaxationsraten einer Referenzprobe mit vernachlässigbarem fibrillärem Anteil sowie einer Probe mit signifikantem Fibrillenanteil. Das einfachste Modell stellt wie für das ^1H -DEST-Experiment ein Zweizustandsmodell dar, bei dem freie Monomere im Gleichgewicht mit transient an den Fibrillen gebundenen Peptiden stehen. Dies wird durch eine globale Assoziationsrate Pseudo-Erster-Ordnung $k_{\text{on}}^{\text{app}}$ und Dissoziationsrate k_{off} charakterisiert. Die Aminosäuren unterscheiden sich lediglich in ihren ^{15}N - R_1 - und ^{15}N - R_2 -Relaxationsraten im freien und gebundenen Zustand. Dieses einfache Zweizustandsmodell reichte für $\text{A}\beta_{1-40}$ im Gleichgewicht zwischen Monomeren und Protofibrillen nicht aus um alle experimentellen Daten simultan zu erfassen und wurde deshalb zu einem Dreizustandsmodell mit einem *on-* oder *off-pathway* Intermediat erweitert. Eine gute Anpassung konnte erst mit einem noch komplexeren Modell mit aminosäurespezifischen Raten erzielt werden^[313].

3 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vorgestellt. Dies beinhaltet die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Amyloidfibrillen verschiedener Modellpeptide (Amyloid β , Parathormon und Serum Amyloid A) mittels biophysikalischer Methoden.

3.1 H/D-Austausch an Amyloidfibrillen

3.1.1 Optimierung des Protokolls

Im Gegensatz zum klassischen H/D-Austausch an entfalteten oder nativen Proteinen ist bei Fibrillen nur eine indirekte Beobachtung struktureller Eigenschaften der Amyloidfibrillen möglich. Das angewendete Protokoll ermöglicht es, das Protonierungsmuster der Amyloidfibrillen auf NMR-detektierbare Monomere zu übertragen. Um den Einfluss wässriger Rückstände in den finalen Proben möglichst gering zu halten, können verschiedene Protokolle angewendet werden (s. Kapitel 2.2.9.4). Letztlich ist es allerdings unmöglich, völlig wasserfreie Proben zu präparieren. Der Einfluss dieser Wasserrückstände soll daher zunächst bestimmt werden. Hierfür wurden verschiedene NMR-Parameter in Abhängigkeit des Wasseranteils der Probe (99,98 % d_6 -DMSO/0,02 % d-TFA) bestimmt. Aus diesen lassen sich Kalibrierkurven ableiten (Abbildung 21).

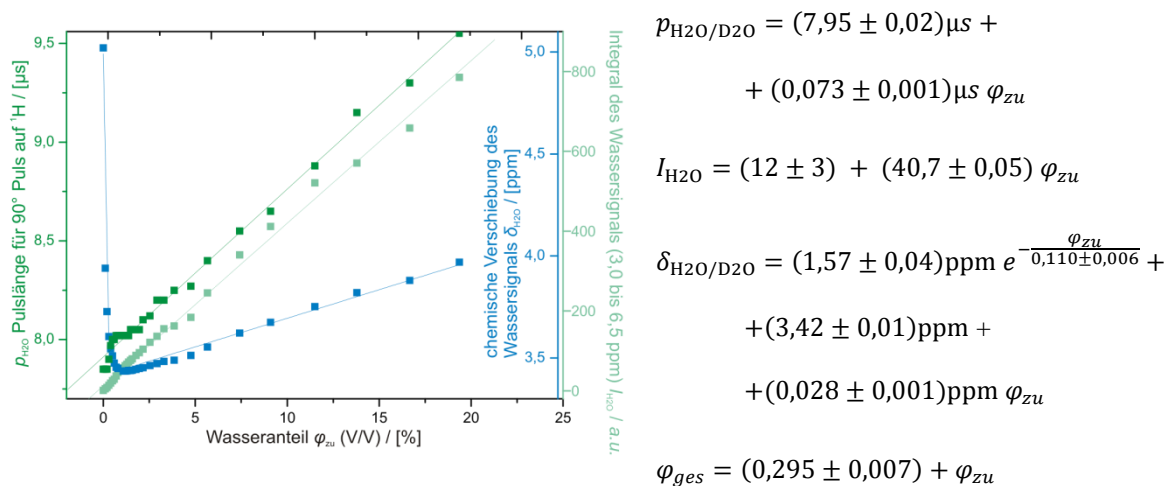


Abbildung 21: Kalibrierkurven zur Bestimmung des Restwasseranteils auf NMR-Parameter. Die Pulslänge eines 90° Pulses p_{H_2O/D_2O} , die chemische Verschiebung des Wassersignals δ_{H_2O/D_2O} sowie das Integral des Wassersignals I_{H_2O} hängen direkt von der zugegebenen H_2O -Menge φ_{zu} ab. Der gesamte Wasseranteil ergibt sich durch Extrapolation der Integralkurve auf $I_{H_2O}=0$.

Mit deren Hilfe können die H_2O und D_2O -Mengen anhand der experimentell gemessenen Spektren abgeschätzt werden. Die Pulslänge p_{H_2O/D_2O} und die chemische Verschiebung δ_{H_2O/D_2O} werden von H_2O und D_2O gleichermaßen beeinflusst und dienen der Abschätzung

der gesamten Wassermenge. D₂O liefert allerdings keinen Beitrag zum detektierten Wassersignal I_{H_2O} im Protonenspektrum, so dass dieses zur Bestimmung des H₂O-Anteils verwendet werden kann. Die A β_{1-40} -Proben enthielten eine Gesamtmenge von 3 bis 6 % Wasser. Dies entspricht einer molaren Konzentration $c_{H_2O/D_2O} = 1,6 \dots 3,3 M$. Für das Parathormon PTH₁₋₈₄ ergaben sich im Überstand vor der zweiten Zentrifugation identische Wasserrückstände. Durch erneute Zentrifugation wurde der Wasseranteil auf 0,2 bis 0,4 % bzw. $c_{H_2O/D_2O} = 0,1 \dots 0,2 M$ reduziert. Für Serum Amyloid A 1.1 (mSAA1.1) schwankte der Wasseranteil in den Proben von 1 bis 3 % bzw. 0,5 bis 1,6 M. Der Wasserrückstand setzte sich in allen Proben aus etwa 30 % H₂O und 70 % D₂O zusammen.

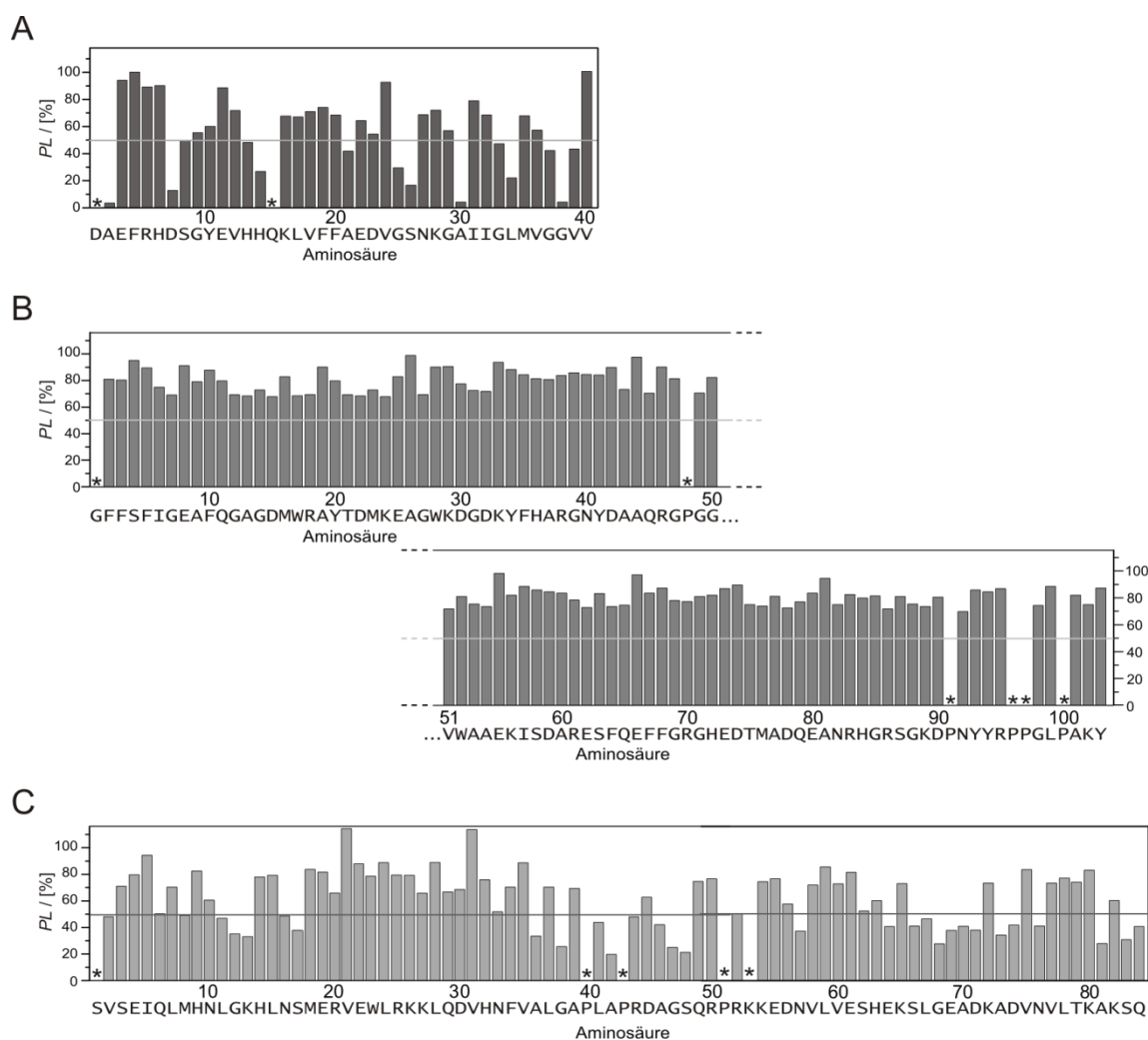


Abbildung 22: Protonierungslevel von A β_{1-40} (A), mSAA1.1 (B) und PTH₁₋₈₄ (C) nach Inkubation in d₆-DMSO/D₂O. Die Zusammensetzung entsprach den maximal in den Proben vorhandenen Wasserrückständen. Die Inkubationszeit wurde entsprechend der Präparations- und Messzeit der Experimente gewählt (A β_{1-40} : 6 % D₂O, 85 min; mSAA1.1: 3 % D₂O, 30 min; PTH₁₋₈₄: 0,5 % D₂O, 65 min). Für alle Peptide können so verlässlich detektierbare Aminosäuren identifiziert werden. Alle Reste, welche bei diesem Experiment ein Protonierungslevel signifikant unter 50 % aufweisen, werden bei den H/D-Austauschexperimenten als unzuverlässig eingestuft und nicht zur Auswertung herangezogen. Dieser *Cutoff*-Wert ist durch graue Linien gekennzeichnet. Nicht detektierbare Aminosäuren wurden mit * gekennzeichnet.

Die Peptidkonzentration für alle Peptide lag im Bereich von 100 bis 300 μM , somit ergibt sich ein signifikanter Wasserüberschuss in der Größenordnung von 10^2 bis 10^5 . Der Einfluss dieses Wasserrückstandes auf die detektierten Protonierungslevel soll im Folgenden detailliert untersucht werden. Hierzu wurde einer frisch präparierten Probe des jeweiligen Peptides in d_6 -DMSO der maximal beobachtete Wasserrückstand φ_{ges} (reines D_2O) zugesetzt und die Abnahme der Signalintensität in Abhängigkeit der Zeit durch eine Serie von ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren beobachtet.

Ausgewertet wurden jeweils die Spektren, deren Inkubationszeit der maximalen Präparations- und Messzeit bei den H/D-Austauschexperimenten an Amyloidfibrillen entspricht. Dabei weisen für mSAA1.1 alle Aminosäuren ein Protonierungslevel höher als 67% auf, im Mittel sogar $80\% \pm 8\%$. Es ist davon auszugehen, dass die Wasserrückstände bei diesen Proben keine relevante Rolle spielen. Ein deutlich heterogeneres Bild zeigt sich bei $\text{A}\beta_{1-40}$ und PTH_{1-84} , wobei das mittlere Protonierungslevel $57\% \pm 27\%$ bzw. $61\% \pm 22\%$ beträgt. Hier ist ein starker Einfluss der Wasserrückstände auf die detektierten Protonierungslevel zu erwarten. Aus diesen Referenzmessungen lassen sich Austauschraten k für die jeweiligen Messbedingungen bestimmen.

Geht man davon aus, dass sich die in DMSO gelösten Peptide keine nennenswerten Strukturen ausbilden, kann der Austauschvorgang folgendermaßen beschrieben werden:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} (NH)(t) \\ (ND)(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k\varphi_{\text{D}_2\text{O}} & k\varphi_{\text{H}_2\text{O}} \\ k\varphi_{\text{D}_2\text{O}} & -k\varphi_{\text{H}_2\text{O}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} (NH)(t) \\ (ND)(t) \end{pmatrix} \quad (3.1)$$

Demnach ergibt sich folgender Verlauf des Protonierungslevels abhängig von der Präparations- bzw. Messzeit:

$$PG(t) = \frac{(NH)(t)}{(NH)(t) + (ND)(t)} = \frac{\varphi_{\text{H}_2\text{O}}}{\varphi_{\text{ges}}} + \left(PL_0 - \frac{\varphi_{\text{H}_2\text{O}}}{\varphi_{\text{ges}}} \right) e^{-kt} \quad (3.2)$$

Abhängig von der Größe des ursprünglichen Protonierungslevels bei Ende des Amidprotonenaustausches (PL_{real}) weisen die Messwerte $PL(t)$ einen systematischen Fehler auf. Es ergibt sich ein exponentiell steigender (bzw. fallender) Kurvenverlauf für $PL_{\text{real}} > \varphi_{\text{H}_2\text{O}}/\varphi_{\text{ges}}$ (bzw. $PL_{\text{real}} < \varphi_{\text{H}_2\text{O}}/\varphi_{\text{ges}}$). Bei bekannter Präparationszeit t , bekannten Austauschraten $k_{\text{ex}}(\varphi_{\text{ges}})$ für die jeweiligen Wasserrückstände φ_{ges} , sowie bekannter $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Zusammensetzung wäre es demnach möglich, die ursprünglichen Protonierungslevel PL_{real} zu ermitteln.

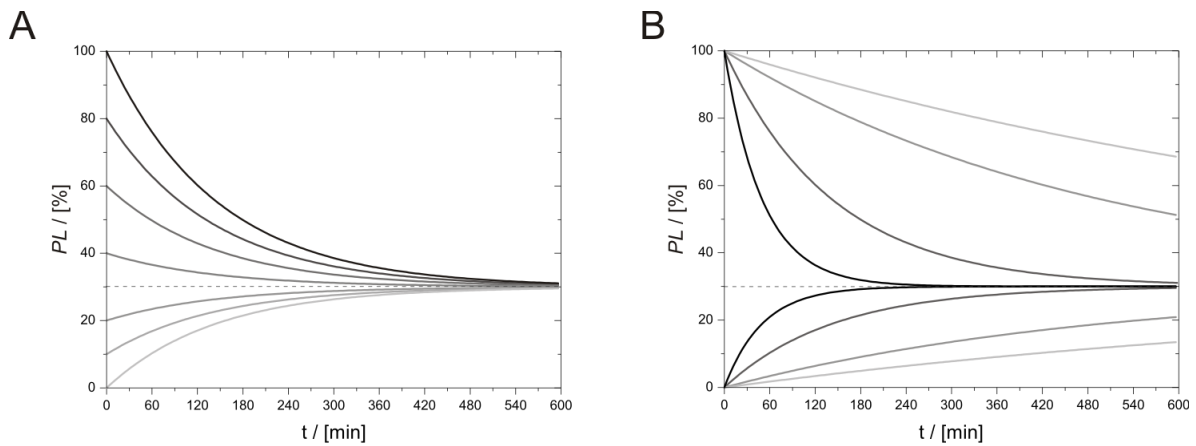


Abbildung 23: Simulierter Verlauf der Protonierungslevel für verschiedene Startwerte (A) und verschiedene Austauschraten (B). In Abbildung A wurde als Austauschrate $0,007 \text{ min}^{-1}$ angenommen und die Protonierungslevel für verschiedene Startwerte zwischen 100 % und 0 % dargestellt. In Abbildung B wurde für zwei Startwerte (100 % und 0 %) die Abhängigkeit von verschiedenen Austauschraten dargestellt: $0,02 \text{ min}^{-1}$ (schwarz); $0,007 \text{ min}^{-1}$ (dunkelgrau); $0,002 \text{ min}^{-1}$ (grau) und $0,001 \text{ min}^{-1}$ (hellgrau). Es wurde ein Verhältnis $\varphi_{\text{H}_2\text{O}}/\varphi_{\text{ges}} = 30 \%$ angenommen.

Während für PTH₁₋₈₄ und mSAA1.1 die Kernbereiche der Amyloidfibrillen ermittelt werden sollen, werden für A β in dieser Arbeit Fibrillen mit verschiedenen Morphologien verglichen. Der Fokus lag hier somit auf relativen Änderungen zwischen verschiedenen Proben bei gleichem Amidprotonenaustausch-Protokoll. Der systematische Fehler durch die Wasserrückstände ist vergleichbar und wird vernachlässigt. Aminosäuren, welche im Kontrollexperiment eine Änderung von mehr als 50 % erfahren, werden als unzuverlässig eingestuft und in den jeweiligen Abbildungen entsprechend markiert.

3.1.2 Amidprotonenaustausch an Amyloid β -Fibrillen

Einfluss unterschiedlicher Fibrillierungsbedingungen

Aufgrund seiner Bedeutung im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit ist das Amyloid β -Peptid Gegenstand zahlreicher Studien. Ein Großteil der strukturellen Untersuchungen erfolgt allerdings an *in vitro* gebildeten Fibrillen, während *in vivo* gebildete Fibrillen nicht direkt für hochauflösende strukturelle Untersuchungen zugänglich sind. In den letzten Jahren wurden daher Bestrebungen unternommen, die natürlichen Wachstumsbedingungen besser zu imitieren, wobei es zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen kam^[41,85,97,98]. Letztlich konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob *in vitro* gebildete Fibrillen dieselben Eigenschaften wie pathogene A β -Ablagerungen im Gehirn besitzen. Deshalb wurde der Einfluss unterschiedlicher Wachstumsbedingungen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Proteinbiochemie der Universität Ulm (Marcus Fändrich, Megan Garvey und Melanie Wulff) untersucht^[314].

Das zerebrale Ventrikelsystem ist mit einer Flüssigkeit (Zerebrospinalflüssigkeit, ZSF) gefüllt, welche das Gehirn und Rückenmark umgibt. Somit stellt es die natürliche Umgebung von extrazellulärem A β im Gehirn dar. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit Fibrillen untersucht, welche in ZSF unterschiedlicher Spender gebildet wurden (ZSF-Fibrillen). Während zunächst ausschließlich extrazelluläre A β -Ablagerungen beobachtet wurden, stellte sich bereits 1989 heraus, dass das Peptid auch in Neuronen akkumuliert^[315]. Daher wurden zusätzlich Fibrillen untersucht, welche aus einem Zellkulturmodell extrahiert wurden (ZK-Fibrillen).

Während die Umgebung einen starken Einfluss auf die Kinetik der Fibrillenbildung^[73,314,316,317] und die Morphologie der gebildeten Fibrillen (Abbildung 24A-D^[314]) ausübt, beeinflusst es einige typische Eigenschaften der gebildeten Amyloidfibrillen nicht. So zeigen alle untersuchten Aggregate die für die *Cross*- β -Struktur typischen Röntgenbeugungsmuster, erhöhte ThT-Fluoreszenz und charakteristische FTIR-Spektren^[314]. Außerdem wirken alle Aggregate zytotoxisch und die Zugabe von unter verschiedenen Bedingungen vorgeformten Fibrillen beschleunigt die Fibrillierung unter identischen bzw. unterschiedlichen Bedingungen (*Seeding* bzw. *Cross-Seeding-Effekt*)^[314].

Die Protonierungslevel nach 48h H/D Austausch zeigen ein relativ ähnliches Muster für ZSF-Fibrillen verschiedener Spender (Abbildung 24E, F), ZK-Fibrillen (Abbildung 24H) und in Phosphatpuffer gebildete Fibrillen (P-Fibrillen, Abbildung 24G). Vergleicht man

die Austauschmuster der beiden ZSF-Fibrillen, zeigt sich eine gute Korrelation ($R=0,944$, Abbildung S1A, S. XVIII). Die Austauschmuster der beiden ZSF-Fibrillen gleichen wiederum bis auf kleinere Abweichungen bei den Aminosäuren E11 und V12 denen der P-Fibrillen ($R=0,977$, Abbildung S1B, S. XVIII) und der ZK-Fibrillen ($R=0,961$, Abbildung S1C, S. XVIII).

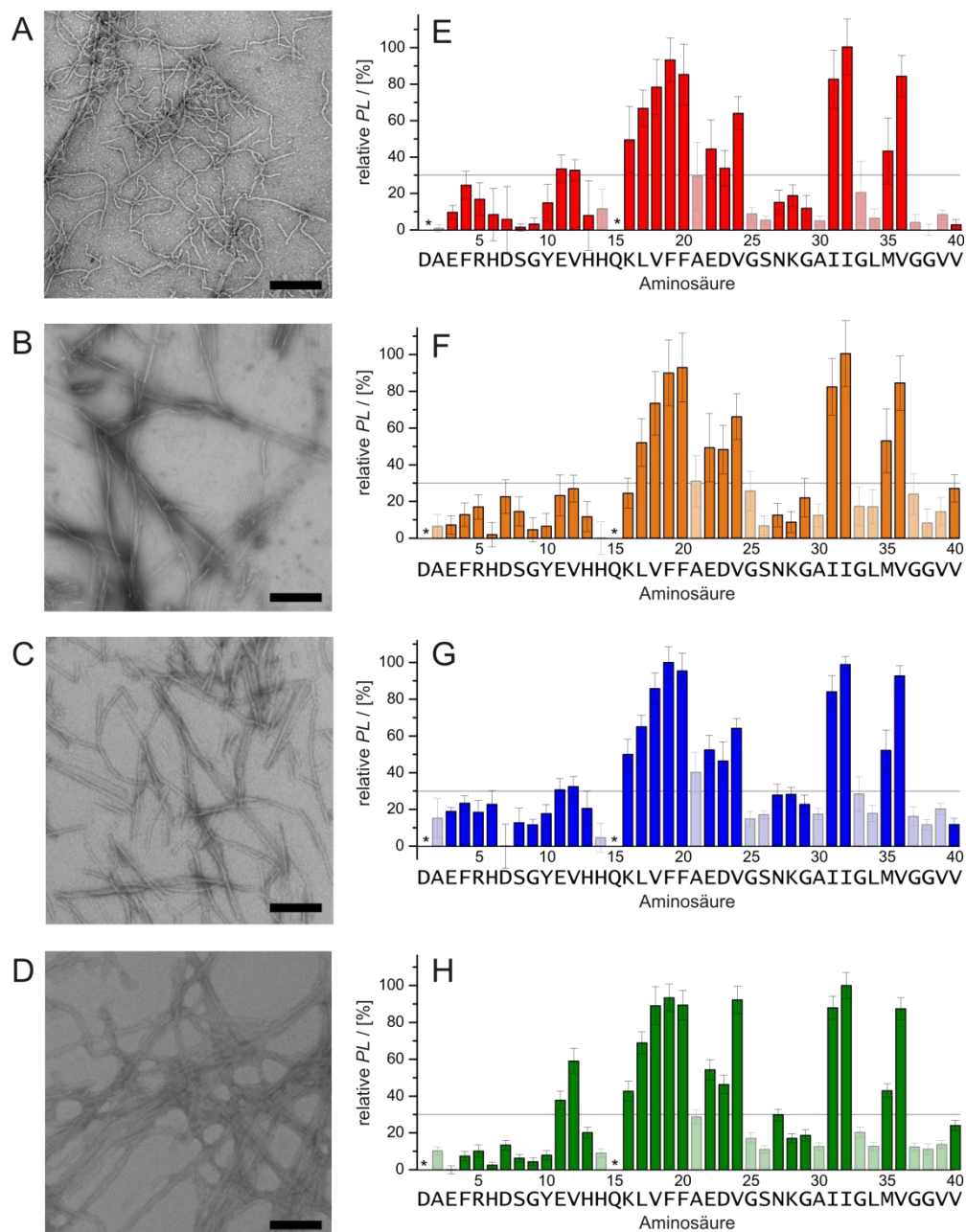


Abbildung 24: Einfluss unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Morphologie und Amidprotonenaustausch-Muster von $A\beta_{1-40}$ Amyloidfibrillen.^[314] A-D: TEM Aufnahmen von Fibrillen unterschiedlicher Morphologie. Die Maßstabsskala entspricht 100 nm. Die TEM-Untersuchungen wurden von Megan Garvey durchgeführt. E-H: Aminosäureabhängige Protonierungslevel nach 48 Stunden HD-Austausch für Fibrillen unterschiedlicher Morphologie. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Messungen. Die bei der Kontrollmessung in d_6 -DMSO rasch austauschenden Aminosäuren wurden durch pastellfarbene Balken dargestellt, nicht detektierbare Aminosäuren sind durch * gekennzeichnet. Die schwarze Linie bei einem Protonierungslevel von 30% entspricht der typischen Zusammensetzung der H_2O/D_2O -Rückstände in den gemessenen

Proben. Die Fibrillenbildung erfolgte in Zerebrospinalflüssigkeit von Spender #1 (A, E) bzw. Spender #2 (B,F), Phosphatpuffer (C,G) bzw. wurden aus Zellkulturen extrahiert (D,H).

Obwohl die Protonierungslevel nur indirekte Rückschlüsse auf vorhandene Sekundärstrukturelemente erlauben, ist in diesem Fall davon auszugehen, dass die langsam austauschenden, lösungsmittelunzugänglichen Amidgruppen Teil der geordneten *Cross*- β -Struktur sind. Die Aminosäuren K16-V24 und I31-I32/M35-V36 sind besonders gut vor Amidprotonenaustausch geschützt, während der N-terminale Teil des Peptides keinen signifikanten Schutz aufweist. Dies ist konsistent mit bereits publizierten Strukturmodellen für $A\beta_{1-40}$, in welchen der N-Terminus übereinstimmend als relativ ungeordnet beschrieben wird (s. Abbildung 27, S. 70). Auf die publizierten Unterschiede in den *Cross*- β -Bereichen wird in der zusammenfassenden Diskussion detaillierter eingegangen (S. 69). In dieser Arbeit wurde der H/D-Austausch für alle Fibrillenproben nach demselben Protokoll durchgeführt um eine maximale Vergleichbarkeit herzustellen. Die erhobenen Daten legen nahe, dass die Peptide in den ZSF-, ZK- und P-Fibrillen trotz morphologischer Unterschiede gleich gefaltet sind. Die unterschiedlichen Morphologien resultieren vermutlich aus einer unterschiedlichen Anzahl oder Anordnung der Protofilamente.

Einfluss von N-terminalen verkürztem, pyroglutamyliertem A β

Neben unterschiedlichen chemischen Umgebungen unterscheiden sich *in vitro* gebildete Fibrillen von den Amyloidablagerungen *in vivo* durch ihre Zusammensetzung. *In vitro* werden meist Fibrillen untersucht, welche aus einer einzigen Spezies A β bestehen, während sich die Ablagerungen *in vivo* aus Peptiden unterschiedlicher Längen, mit posttranslationalen chemischen Modifikationen oder Mutationen zusammensetzen. Im folgenden Abschnitt soll daher der Einfluss von N-terminal verkürztem, pyroglutamyliertem A β (pA β_{3-40}) untersucht werden.

Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Proteinbiochemie der Universität Ulm (Marcus Fändrich und Melanie Wulff)^[318]. Die Modifikationen scheinen keinen Einfluss auf die Struktur der disaggregierten, frisch gelösten Peptide zu haben^[318,319], aufgrund der geringen Löslichkeit von pA β_{3-40} in wässrigem Puffer waren weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen nicht möglich. Dennoch wirkt sich schon eine reine N-terminale Verkürzung (A β_{3-40}) stark auf die Kinetik der Fibrillierung aus^[318]. Eine zusätzliche pE-Modifikation verstärkt den Effekt noch^[318]. Es treten dabei sowohl eine verkürzte *Lag*-Zeit als auch höhere Wachstumsraten auf^[318]. Dies impliziert, dass sowohl die Bildung von Fibrillenkeimen als auch die Elongation durch die Modifikation begünstigt werden. Einen weiteren Hinweis hierauf stellen die aus Messungen der kritischen Konzentrationen abgeleiteten thermodynamischen Stabilitäten (ΔG) von A β_{1-40} , A β_{3-40} und pEA β_{3-40} Fibrillen ($-34,7 \pm 0,2$ kJ/mol, $-36,3 \pm 0,1$ kJ/mol und $-35,9 \pm 0,3$ kJ/mol) dar^[318].

Obwohl die gebildeten Aggregate charakteristische Eigenschaften von Amyloidfibrillen aufweisen (charakteristische Banden in FTIR-Spektren, charakteristisches Röntgenbeugungsmuster, Kongorot-Bindung, erhöhte ThT-Fluoreszenz, Antikörper-B10-Bindung und Fähigkeit zum *Cross-Seeding*)^[318], unterscheidet sich die Fibrillenmorphologie der verkürzten Varianten stark von A β_{1-40} . Es sind sehr kurze Aggregate ohne deutlich sichtbare Einschnürungen (*cross-over*) zu beobachten (Abbildung 26A,B).

Die zugrundeliegende Struktur dieser Aggregate sollte mittels NMR-detektiertem H/D-Austausch untersucht werden. Hierfür ist zunächst eine Zuordnung der Kreuzsignale von pA β_{3-40} in d_6 -DMSO im ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum erforderlich. Für H6-H14 und K16-V40 ließ sich die Zuordnung eindeutig von A β_{1-40} übertragen (Abbildung 25A). Das Kreuzsignal bei 7,75/121,85 ppm entspricht relativ genau der Resonanz von L-Pyroglutaminsäure unter identischen Bedingungen und konnte somit zugeordnet werden.

Auf eine weitere Resonanzzuordnung der verbliebenen Kreuzsignale wurde verzichtet, da diese nach 100h Austausch alle nicht mehr detektierbar sind und eine Unterscheidung keinen zusätzlichen Informationsgewinn ermöglicht (Abbildung 25B).

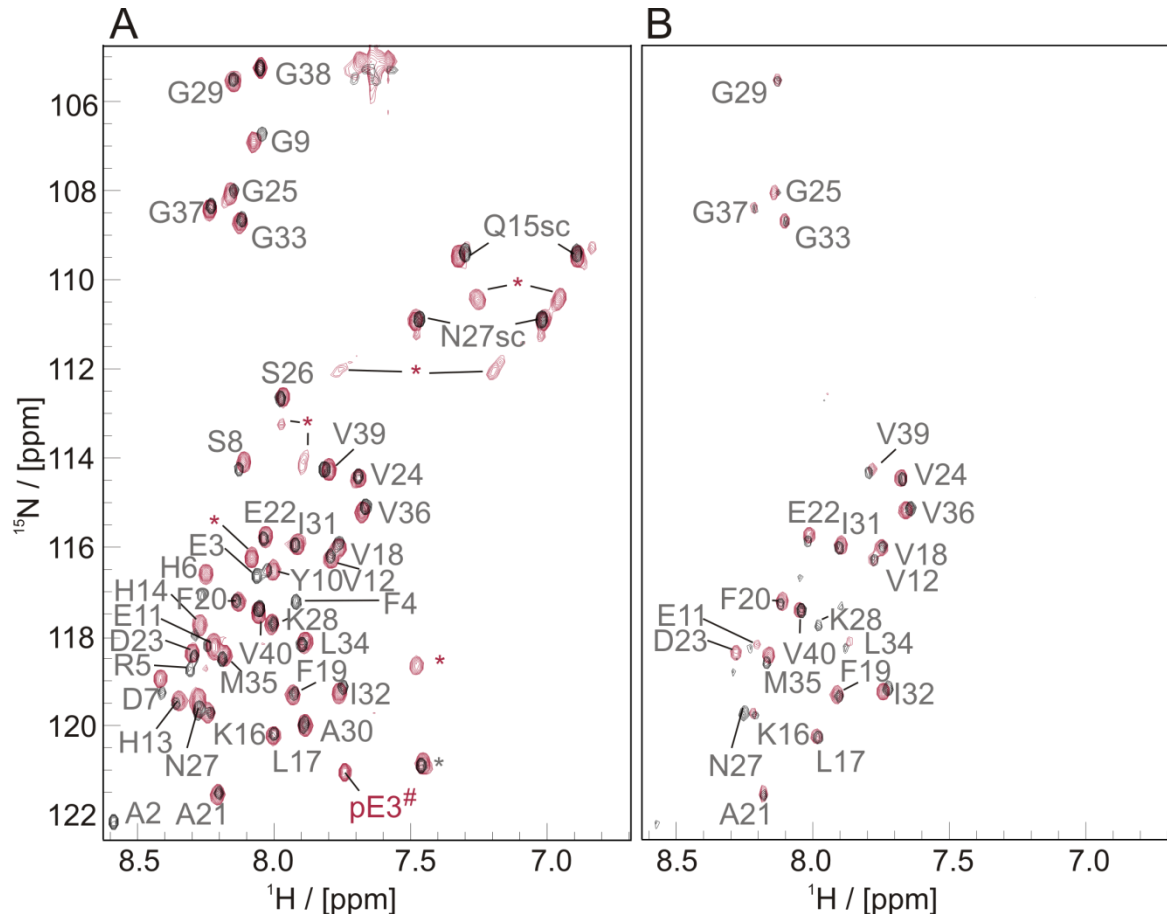


Abbildung 25: ^1H - ^{15}N -Korrelationspektren von $\text{A}\beta_{1-40}$ (schwarz) und $\text{pA}\beta_{3-40}$ (weinrot) in 99,98% $\text{d}_6\text{-DMSO}/0,02\% \text{d-TFA}$. In Abbildung A sind die Referenzspektren dargestellt, in Abbildung B erfolgte H/D-Austausch für 100h bei 25°C. Die Kreuzsignale der Amidgruppen und Seitenketten (sc) sind beschriftet, Sternchen kennzeichnen nicht zugeordnete Kreuzsignale. Die tentative Zuordnung von pE3 ist durch # gekennzeichnet.

Vergleicht man die Spektren von $\text{pA}\beta_{3-40}$ mit denen von $\text{A}\beta_{1-40}$ nach 100h ergibt sich qualitativ ein sehr ähnlicher Eindruck. Dies bestätigt sich bei Betrachtung der quantifizierten Protonierungslevel (Abbildung 26A,B) und des Korrelationsplots ($R=0,952$, Abbildung S1D, S. XVIII). Auch für die $\text{pA}\beta_{3-40}$ -Fibrillen ergibt sich ein besonders hoher Schutz gegen Amidprotonenaustausch für die Aminosäuren K16-V24 und I31-I32/M35-V36 und kein signifikanter Schutz der N-terminalen Aminosäuren. Es ist davon auszugehen, dass sich die Monomereinheiten bei diesen Varianten ähnlich strukturieren. Dafür spricht auch, dass bei *Cross-Seeding*-Experimenten eine beschleunigende Wirkung durch die Zugabe von vorgeformten Fibrillen des jeweils anderen Peptides beobachtet wird, sich die Längeneigenschaften aber nicht auf die

Tochterfilamente übertragen lassen^[318]. Mittels Immunogoldmarkierung konnte nachgewiesen werden, dass sich die gebildeten Filamente aus beiden A β -Varianten bestehen und deren durchschnittliche Länge mit der Zusammensetzung der Peptide korreliert^[318]. Wäre dies nicht der Fall, würde es auf einen Zusammenhang zwischen der Struktur und der Morphologie der Filamente hinweisen. Als Ursache für die Verkürzung der pA β -Filamente konnte eine verstärkte Fragmentierung der Fibrillen aufgrund geringerer Stabilität gegen thermischen und physischen Stress identifiziert werden^[318].

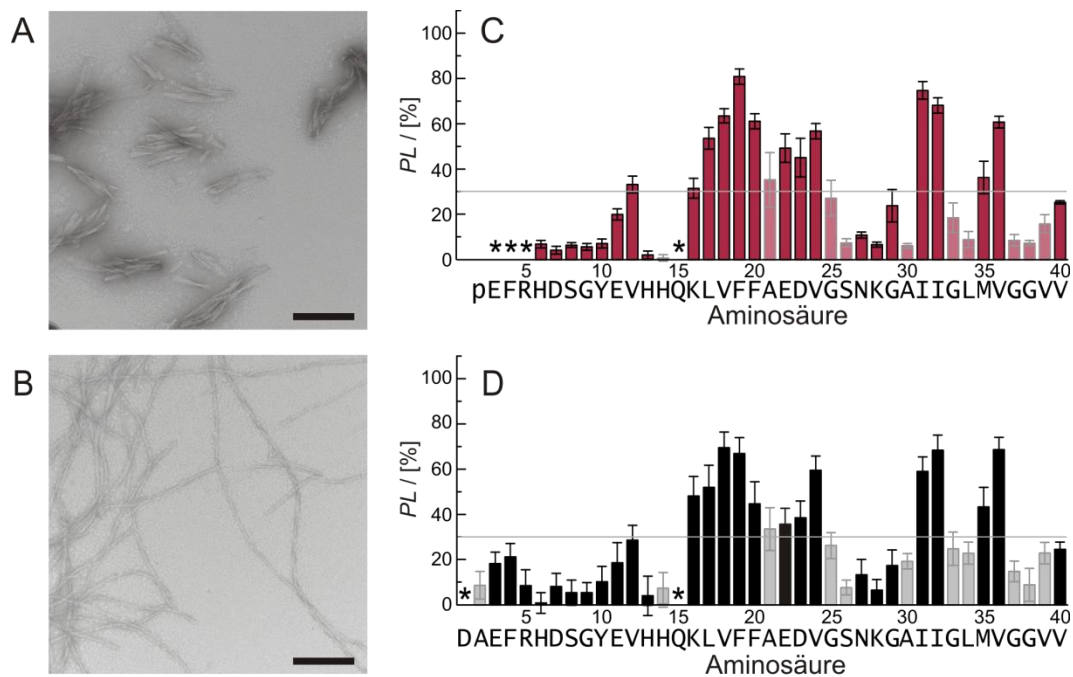


Abbildung 26: Einfluss einer N-terminalen Pyroglutamat-Modifizierung (pA β_{3-40} , A, C) verglichen mit Wildtyp A β_{1-40} (B, D) auf Morphologie und Amidprotonenaustausch-Muster der Amyloidfibrillen.^[318] A, B: TEM Aufnahmen von Fibrillen unterschiedlicher Morphologie. Die Maßstabsskala entspricht 200 nm. Die TEM-Untersuchungen wurden von Melanie Wulff durchgeführt^[318] C, D: Aminosäureabhängige Protonierungslevel nach 100 Stunden HD-Austausch für Fibrillen unterschiedlicher Morphologie. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Messungen. Die bei der Kontrollmessung in d₆-DMSO rasch austauschenden Aminosäuren wurden durch pastellfarbene Balken dargestellt, nicht detektierbare bzw. nicht zugeordnete Aminosäuren sind durch * gekennzeichnet. Die graue Linie bei einem Protonierungslevel von 30% entspricht der typischen Zusammensetzung des H₂O/D₂O-Restwasseranteils in den gemessenen Proben.

Zusammenfassende Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Fibrillierungsbedingungen (ZSF, ZK, P) sowie einer N-terminalen Modifikation ($pA\beta_{3-40}$) auf die Struktur der gebildeten Amyloidfibrillen mittels NMR-detektiertem H/D-Austausch untersucht. Die Ergebnisse legen nahe, dass die grundlegende *Cross- β* -Struktur sehr robust gegen äußere Einflüsse und Modifikationen des unstrukturierten Bereichs ist. Unterschiedliche Fibrillenmorphologien, also unterschiedliche Dicken, Längen und *Cross-over*-Abstände, sind nicht auf grundlegend unterschiedlich strukturierte Peptide zurückzuführen, sondern ergeben sich vermutlich durch die Anordnung der Protofilamente. Die Unterschiede liegen also in der übergeordneten Struktur, während die grundlegende Monomerstruktur erhalten bleibt.

Für $A\beta_{1-40}$ wurden ausschließlich lange Filamente beobachtet, wovon die Morphologie der verkürzten Varianten ($A\beta_{3-40}$ und $pA\beta_{3-40}$)^[318] deutlich abweicht. Der Einfluss verschiedener Parameter (*Cross-Seeding*, gemeinsame Fibrillierung von $A\beta_{3-40}$ und $pA\beta_{3-40}$, Schüttelgeschwindigkeit)^[318] auf die Fibrillierungskinetik und Längeneigenschaften der Aggregate zeigt, dass die beobachteten kürzeren Filamente durch eine verstärkte Fragmentierung der Fibrillen entstehen. Dies spielt eine entscheidende Rolle bei der Kinetik der Fibrillierung, da aufgrund der verstärkten Fragmentierung mehr Fibrillierungskeime zur Verfügung stehen. Darüber hinaus stellt es eine Erklärung für die in der Literatur beschriebene höhere Toxizität von $pA\beta_{3-40}$ -Aggregaten dar^[111,320,321], da kleineren Aggregaten allgemein eine höhere spezifische Aktivität zugeschrieben wird^[322]. Diese Beobachtung legt zudem nahe, dass die N-terminalen Aminosäuren für die Fibrillen eine entscheidende stabilisierende Rolle besitzen. Obwohl der N-terminale Teil der Peptidkette in der Literatur übereinstimmend als unstrukturiert beschrieben wird (s. Abbildung 27) deuten auch frühere NMR und kryo-EM Studien auf eine gewisse N-terminale Stabilität in bestimmten $A\beta$ Aggregaten hin^[82,87,323-325].

Die mittels H/D-Austausch identifizierten Kernbereiche der Fibrille (K16-V24 und I31-I32/M35-V36) unterscheiden sich weder für die untersuchten Fibrillierungsbedingungen noch für die $A\beta$ -Modifikation. Für die pyroglutamylierte Variante wurde dieses Ergebnis auch durch Festkörper-NMR-Untersuchungen bestätigt^[326]. In der Literatur werden übereinstimmend zwei Bereiche mit β -Faltblättern beschrieben, welche sich in der Region zwischen Aminosäure 10 und 25 bzw. 25 und 40

ausbilden. Die exakte Anzahl, Position und Länge der β -Faltblattstränge unterscheidet sich jedoch (Abbildung 27).

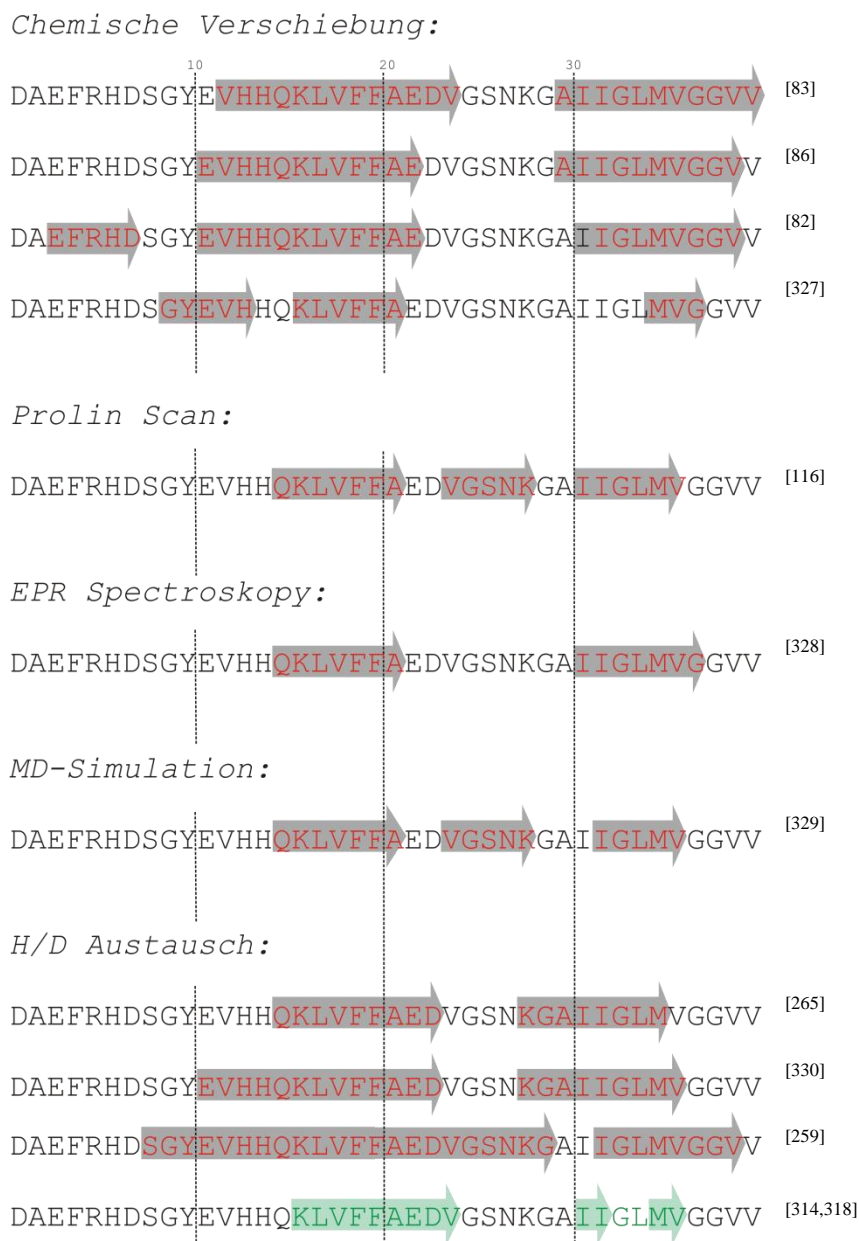


Abbildung 27: Vergleich der Sekundärstrukturelemente von $A\beta_{1-40}$ Fibrillen in der Literatur. Die in dieser Arbeit identifizierten Aminosäuren mit hohem Schutz gegen H/D-Austausch (grün) im Vergleich zu bisher mittels verschiedener Methoden und unter verschiedenen Bedingungen identifizierten β -Faltblatt-Bereiche. Die Abbildung wurde nach Huber *et al.*^[331] erstellt.

Diese Abweichungen könnten einerseits auf tatsächlich existierende, unterschiedliche Fibrillenstrukturen zurückzuführen sein, andererseits aber auch durch die unterschiedlichen Methoden bzw. Protokolle entstehen. Daher wurden in dieser Arbeit alle Fibrillen unter identischen experimentellen Bedingungen untersucht, um einen Einfluss des Protokolls auszuschließen. In Abschnitt 3.1.1 (S. 59) wurde der Einfluss von Wasserrückständen auf die Protonierungslevel untersucht. Insbesondere die Aminosäuren H14, A21 G25, S26, 70 |

A30 G33, I34, V36-V39 reagieren besonders empfindlich auf bereits geringe Wasserrückstände, welche sich nur schwer vermeiden lassen. So ist es nicht verwunderlich, dass sich für diese Bereiche häufig unterschiedliche Angaben finden.

Unsere Ergebnisse stehen in Kontrast zu bisherigen Untersuchungen, bei denen sich die Fibrillenmorphologie durch *Seeds* auf die Tochterfibrillen übertragen lässt^[41]. Die Verwendung von Gehirnextrakten als *Seeds* ermöglicht dann, strukturelle Informationen über die Amyloidablagerungen im Gehirn durch die Untersuchung der *in vitro* gebildeten Tochterfibrillen^[85,97,98]. Für die Tochterfibrillen unterschiedlicher Patienten und rein *in vitro* gebildeter Fibrillen wurden mittels Festkörper-NMR jeweils verschiedene chemische Verschiebungen beobachtet und daraus ein unterschiedlicher Aufbau der Fibrillenstruktur abgeleitet. Dies legt den Schluss nahe, dass bei den Patienten möglicherweise unterschiedliche Fibrillenmorphologien auftreten und diese durch *in vitro* gebildete Fibrillen nicht gut repräsentiert werden. Die Beobachtungen hängen zum Teil vom verwendeten Extraktionsprotokoll ab, wobei bei Verwendung stärker gereinigter Fibrillen-*Seeds* geringere Unterschiede beobachtet wurden. Da die Fibrillenmorphologie sehr stark von der chemischen Umgebung bei der Fibrillierung abhängt, ist der Einfluss anderer zellulärer Bestandteile neben den *Seeds* fraglich. Letztlich lässt sich diskutieren ob die Bildung in Zerebrospinalflüssigkeit oder das *Seeding* mit Gehirnextrakten die *in vivo* gebildeten Fibrillen besser repräsentiert. Die Analyse und statistische Auswertung mit größerer Fallzahl (37 Gewebeproben von 18 Patienten) weist auf eine dominante Fibrillenstruktur bei Patienten mit verschiedenen klinischen Subtypen der AK hin^[98]. Diese aktuellste Studie steht in Einklang mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit. Auch eine Studie mit amyloiden A β -Strukturen aus bakteriellen Einschlusskörpern zeigte keinen Grund zur Annahme relevanter struktureller Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* gebildeten amyloiden Strukturen^[96].

Die Beobachtung einer grundlegend erhaltenen Peptidstruktur schließt die Möglichkeit geringer struktureller Unterschiede, insbesondere im N-terminalen Bereich, nicht aus. So können konformationeller Unterschiede in unterschiedlichen Fibrillenproben, bei verschiedenen Fibrillenmorphologien oder an unterschiedlichen Positionen innerhalb eines Filamentes auftreten. Mittels NMR-detektiertem H/D-Austausch beobachtet man immer ein Ensemble von Peptiden und es ist unmöglich, solche Unterschiede zu detektieren. Kryoelektronenmikroskopie- und Festkörper-NMR-Untersuchungen zeigten ebenfalls eine gemeinsame grundlegende Struktur mit unterschiedlichen Detailkonformatio-

nen^[41,82,83,85,86,97,332]. Betrachtet man die unterschiedlichen Strukturmodelle für *in vitro* gebildete Fibrillen, ist davon auszugehen, dass die detaillierte Struktur der Amyloidablagerungen im Gehirn von Patienten noch einige Zeit im Fokus der Forschung stehen wird. Die in dieser Arbeit untersuchten Fibrillen wurden unter möglichst realistischen Bedingungen (in ZSF und Zellkultur) gebildet. Die Ergebnisse liefern keinen Grund zur Annahme systematischer Abweichungen zwischen den Fibrillen im Gehirn und *in vitro*. Wir gehen vielmehr davon aus, dass die grundlegende Struktur der Peptide sehr robust gegen Änderung der Fibrillierungsbedingungen und Modifikation der Peptidkette ist. Für diese Schlussfolgerung spricht auch der geringe Einfluss systematischer Änderungen^[115,116,130,131,191] oder krankheitsrelevanter Mutationen^[117-127] der Peptidsequenz auf die Bildung von Amyloidfibrillen.

3.1.3 Amidprotonenaustausch an Serum Amyloid A-Fibrillen

Ergebnisse

Einige Serum Amyloid A Proteine werden in Zusammenhang mit Entzündungen vermehrt ausgeschüttet. In Folge chronischer Entzündungen können sich Amyloidablagerungen in verschiedenen Organen bilden, welche aus Fragmenten dieser Akutphasenproteine bestehen. Den Hauptbestandteil bildet hier das SAA1.1^[178], während andere SAA-Proteine trotz ähnlicher Aminosäuresequenz in geringeren Mengen oder gar nicht in den Fibrillen enthalten sind^[179]. In dieser Arbeit sollen daher die Amyloidfibrillen aus SAA1.1 der Maus (mSAA1.1) mittels NMR detektiertem H/D-Austausch charakterisiert werden.

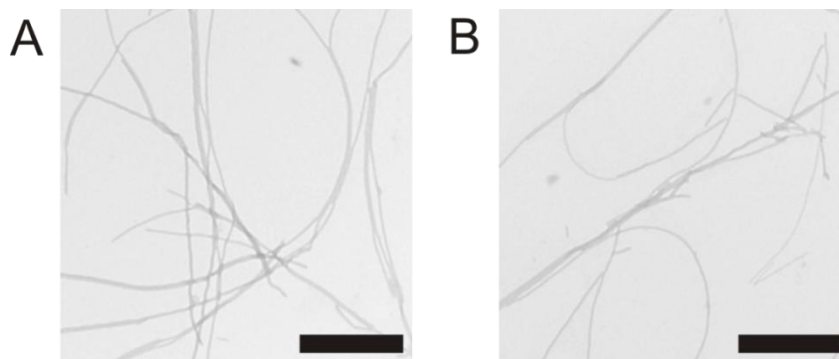


Abbildung 28: Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahmen von mSAA1.1 Fibrillen vor (A) und nach (B) dem H/D-Austauschexperiment. Die Fibrillen bleiben während der Inkubationszeit unverändert erhalten. Die Maßstabsskala entspricht 1 µm.

Hierfür ist zunächst eine Zuordnung der Kreuzsignale in den ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren von mSAA1.1 in d_6 -DMSO/ d -TFA erforderlich. Mittels 3D-Zuordnungsspektren (HNCA, HNCACB; HN(CO)CA; HN(CO)CACB, HNCO, HN(CA)CO, ^{15}N -NOESY-HSQC, ^{15}N -TOCSY-HSQC) konnten aufgrund der geringen Dispersion der chemischen Verschiebungen aller Kerne lediglich 50% der Kreuzsignale zugeordnet werden. Erst die höhere Auflösung der 5D HabCabCONH und HN(CA)CONH Spektren ermöglichte eine vollständige Zuordnung aller Kreuzsignale (Abbildung 29 bzw. Tabelle 17 S. XXXI). In Abbildung 29 sind die ^1H - ^{15}N -SOFAS-HMQC-Spektren nach 30 Stunden Amidprotonenaustausch (C,D) im Vergleich zu einer vollständig protonierten Referenzprobe dargestellt (A,B). In diesen Korrelationsspektren können die Signalintensitäten von 27 der 99 Kreuzsignale aufgrund überlagerter Signale ($\Delta\delta < 0,02$ ppm) nicht eindeutig ausgewertet werden. Qualitativ lässt sich ein hoher Schutz über die gesamte Peptidkette, jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen geschützten und ungeschützten Aminosäuren erkennen. Dieser Eindruck bestätigt sich auch nach der Quantifizierung der Protonierungslevel nach unterschiedlich langen Austauschzeiten

(Abbildung 30A). Möglicherweise könnte durch längere Austauschzeiten eine deutlichere Unterscheidung erzielt werden, jedoch ist dies aufgrund der Stabilität der Polypeptidketten gegen Fragmentierung in den Fibrillen schwierig. Nach 30 Stunden wurden noch keine Abbauprodukte in den NMR-Spektren beobachtet und es kam zu keiner detektierbaren Veränderung der Morphologie der Fibrillen (Abbildung 28).

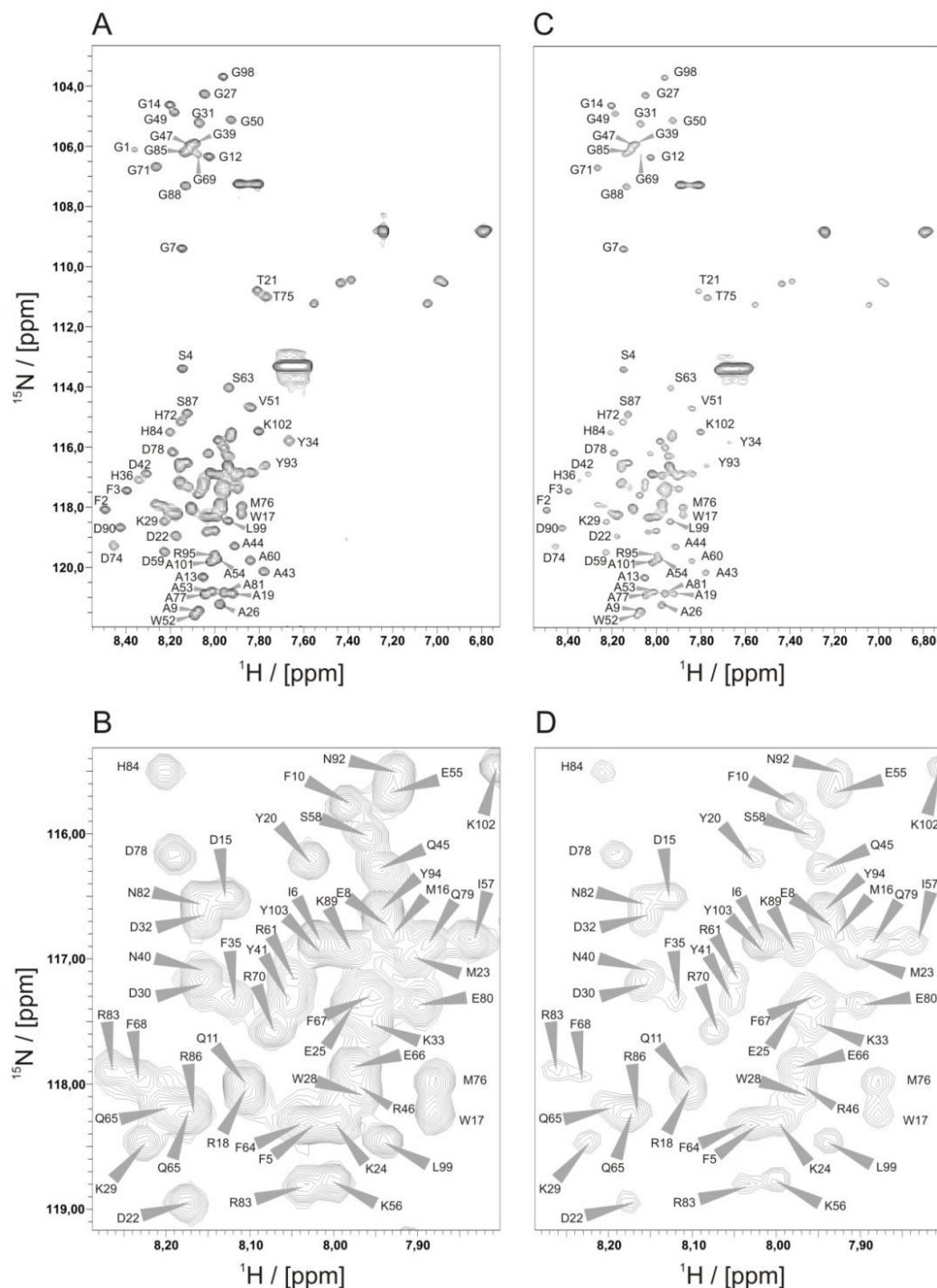


Abbildung 29: ^1H - ^{15}N -SOFAST-HMQC Spektren von ^{15}N -markiertem mSAA1.1 in 99,98% d_6 -DMSO/0,02% d -TFA. A, B: Referenz-Spektren vollständig protonierter Proben C, D: Spektrum nach 30h Amidprotonenaustausch bei 25 °C in 10mM Tris, pH/pD8.5. In Abbildung A und C sind die vollständigen Spektren dargestellt, während in Abbildung C und D die zentralen Bereiche vergrößert wurden.

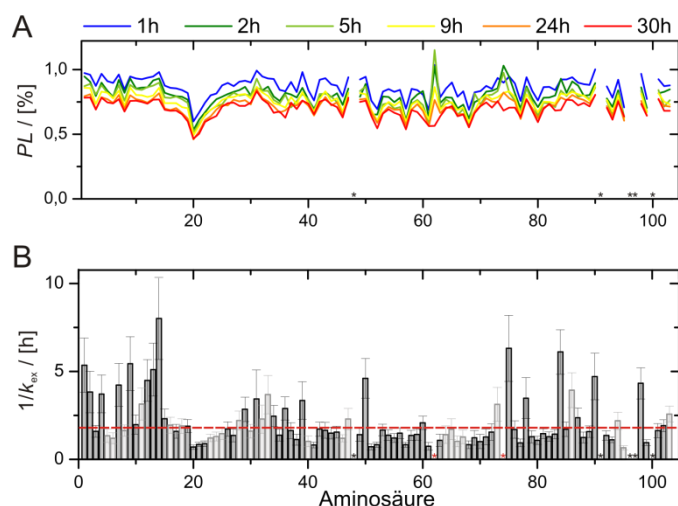


Abbildung 30: Protonierungslevel von mSAA1.1 nach unterschiedlichen Austauschzeiten (A) und daraus bestimmte Amidprotonenaustauschraten (B) in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz. Die rote unterbrochene Linie in Abb. B kennzeichnet den Mittelwert ($1/k_{ex} = 2,1$ h). Die Balken der Aminosäuren, deren Intensitäten aufgrund von Überlappung der Kreuzsignale ($\Delta\delta < 0,02$ ppm) nicht eindeutig auswertbar sind, sind transparent dargestellt. Schwarze Sternchen markieren Proline, rote Sternchen Aminosäuren bei denen keine exponentielle Anpassung möglich war.

Die Messungen zu verschiedenen Austauschzeiten ermöglichten die Bestimmung von aminosäurespezifischen Austauschraten k_{ex} durch die Anpassung einer Exponentialfunktion an die Protonierungslevel in Abhängigkeit der Austauschzeit (Formel S.1, S. XXXIV). Es zeigt sich ein relativ langsamer Austausch ($1/k_{ex} > \overline{1/k_{ex}} = 2,1$ h) für die Aminosäuren G1-A19, W28-G39, G50, A60, T75, D78, H84, S87, D90, G98 und K102. Verlangsamter Austausch kann einerseits durch Schutz in der fibrillären Struktur auftreten, Unterschiede ergeben sich jedoch auch allein durch die Natur der eigenen Seitenkette sowie der benachbarten Aminosäure. Die Berechnung der intrinsischen Austauschraten einer entfalteten Polypeptidkette unter identischen Bedingungen^[244] ermöglicht die Bestimmung von Schutzfaktoren k_{int}/k_{ex} . Ein hoher Schutz ($k_{int}/k_{ex} > \overline{k_{int}/k_{ex}} = 1,26 \cdot 10^6$) ergibt sich für die Aminosäuren F2, S4, G7, A9, Q11-G14, G31, H36, G39, G50, G71, N82-G88 und G98 (Abbildung S10, S. XXXIV). Dies setzt allerdings die verlässliche Bestimmung der intrinsischen Austauschraten voraus. Die Grundlage der Berechnung bilden Messungen an Di- und Oligopeptiden, jedoch liegt der beim Austausch vorliegende hohe pH-Wert (pD=8,5) außerhalb des Messbereichs^[244], was zu signifikanten Fehlern der intrinsischen Austauschraten führen kann. Dies könnte auch die Ursache für den auffällig hohen Anteil von Glycinen mit hohen Schutzfaktoren darstellen. Als Kriterien für ein β -Faltblatt werden daher sowohl kleine Austauschraten als auch hohe Schutzfaktoren für mindestens drei benachbarte Aminosäuren bestimmt. Dies trifft insbesondere für die N-terminalen Aminosäuren G1 bis G14 zu.

Zusammenfassende Diskussion

Ziel der Untersuchungen war es, die an der Bildung der *Cross*- β -Struktur im Kern der Amyloidfibrillen beteiligten Aminosäuren zu bestimmen. Aufgrund der Protonierungslevel zu verschiedenen Zeitpunkten und der Austauschraten konnten keine eindeutig geschützten Bereiche identifiziert werden. Es ergibt sich ein sehr hoher Schutz für die gesamte Polypeptidkette.

Als Ursache kommen einerseits Fehler bei der Präparation und andererseits intrinsische Eigenschaften der mSAA1.1-Fibrillen in Frage. Die indirekte Detektion des Amidprotonenaustausches nach dem Aufbrechen der Fibrillen erweist sich als sehr anfällig gegen Wasserrückstände in den finalen NMR-Proben (3.1.1, S59 ff.). Aus diesem Grund wurde das Pellet nach dem Amidprotonenaustausch lyophilisiert, wodurch geringere Wasserrückstände erreicht wurden und weiterer bzw. Rückaustausch während der Messung vergleichsweise gut unterdrückt wird (Abbildung 22, S. 60). In der Literatur wird darüber hinaus die Möglichkeit von Austauschreaktionen zwischen Amidprotonen diskutiert^[255,333]. Falls ein solcher Flip-Flop-Effekt stattfindet, würde dies zu homogeneren Protonierungsleveln führen. Relativ homogene, hohe Protonierungslevel für alle Aminosäuren resultieren auch, wenn die gesamte Polypeptidkette in den Fibrillen gut strukturiert bzw. schlecht lösungsmittelzugänglich ist. Geht man davon aus, dass nur ein geringer Anteil der Aminosäuren an der *Cross*- β -Struktur beteiligt ist, müssten die übrigen Aminosäuren ebenfalls Sekundärstrukturelemente ausbilden. Diese Möglichkeit wurde beispielsweise in Abschnitt 3.1.2 (S. 66 ff.) für die N-terminalen Aminosäuren von Amyloid β diskutiert. Alternativ könnte auch eine Zusammenlagerung von Protofibrillen eine geringere Lösungsmittelzugänglichkeit bewirken. Außerdem geht man davon aus, dass selbst nach abgeschlossener Fibrillierung ein gewisser Anteil des Proteins in löslicher Form vorliegt (s. Abschnitt 0, S. 33). Für SAA ist dies vernachlässigbar, sofern diese Spezies nicht oder in langsamen Austausch miteinander stehen, da dann die Monomere durch die Sedimentationsschritte abgetrennt werden und nicht zum detektierten Signal beitragen. Handelt es sich dagegen um ein dynamisches Gleichgewicht, kommt es während der Austauschzeit zur Assoziation von zunächst löslichen Proteinen an die Fibrillen, welche durch Sedimentation nicht abgetrennt werden können. In diesem Fall repräsentieren die gemessenen Protonierungslevel sowohl die lösliche als auch die fibrilläre Form. Die Struktur des löslichen mSAA1.1 ist nicht bekannt, jedoch geht man aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den SAA-Varianten in verschiedenen Spezies von einer ähnlichen Proteinstruktur aus^[63]. Diese entspricht einem globulären

Protein mit vier α -helikalen Bereichen, welche ebenfalls einen hohen Schutz gegen Amidprotonenaustausch aufweisen dürften. Dies erschwert die Bestimmung der Austauschraten der einzelnen Amidgruppen in der fibrillären Struktur und somit die Identifizierung des Fibrillenkernes. Vergleicht man die hier bestimmten Protonierungslevel bzw. Austauschraten mit denen anderer amyloidbildender Proteine, zeigt sich, dass sich bei längeren Polypeptiden^[251,252,255,257,261-264] selten so deutliche Unterschiede ergeben wie für kurze Peptide^[84,256,258-260,265]. Vermutlich wird aus diesem Grund häufig eine logarithmische Darstellung der Austauschraten gezeigt^[84,258,261-264]. Dennoch stellen die bestimmten Austauschraten und Schutzfaktoren ein weiteres Indiz dafür da, dass die N-terminalen Aminosäuren G1 bis G14 an der *Cross*- β -Struktur im Fibrillenkern beteiligt sein könnten. Dies wurde bereits aufgrund der *in silico* berechneten Aggregationswahrscheinlichkeit sowie der Untersuchung von Fragmenten und Varianten des humanen SAA1.1 angenommen^[63,181,182].

3.2 Untersuchung des Parathormons PTH₁₋₈₄

Amyloidfibrillen bestehend aus PTH₁₋₈₄ wurden zwar bereits 1976 in der Literatur beschrieben, seitdem allerdings nicht näher charakterisiert^[190]. Die Fähigkeit des humanen Parathormons PTH₁₋₈₄ zur Bildung von Amyloidfibrillen wird in dieser Arbeit unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Inkubiert man PTH₁₋₈₄ bei 65 °C, pH 9 (Boratpuffer) können bereits nach wenigen Minuten Aggregate beobachtet werden^[45]. Diese weisen charakteristische Eigenschaften amyloider Fibrillen auf: Erhöhte Fluoreszenzausbeute von Thioflavin T, charakteristisches Röntgenbeugungsmuster mit Reflexen bei 4,7 Å und 10 Å sowie sichtbare längliche, kurvilineare Aggregate im Transmissionselektronenmikroskop (Abbildung 31). Während das CD-Spektrum von frisch gelöstem PTH₁₋₈₄ charakteristische Eigenschaften eines Zufallsknäuels mit α -helikalem Anteil besitzt, besitzt fibrilläres PTH₁₋₈₄ eine geringere negative molare Elliptizität bei 225 nm und 200 nm auf (Abbildung 37 bzw. Ref.^[45]). Mittels CD-Spektroskopie ist also eine Abnahme des unstrukturierten und α -helikalen Anteils nachweisbar, jedoch keine signifikante Zunahme der β -Faltblattstruktur. Es ist daher davon auszugehen, dass die *Cross- β* -Struktur im Fibrillenkern aus relativ wenigen Aminosäuren besteht. Dies wird besonders deutlich im Vergleich zu CD-Spektren anderer Amyloidfibrillen, beispielsweise von A β ^[45].

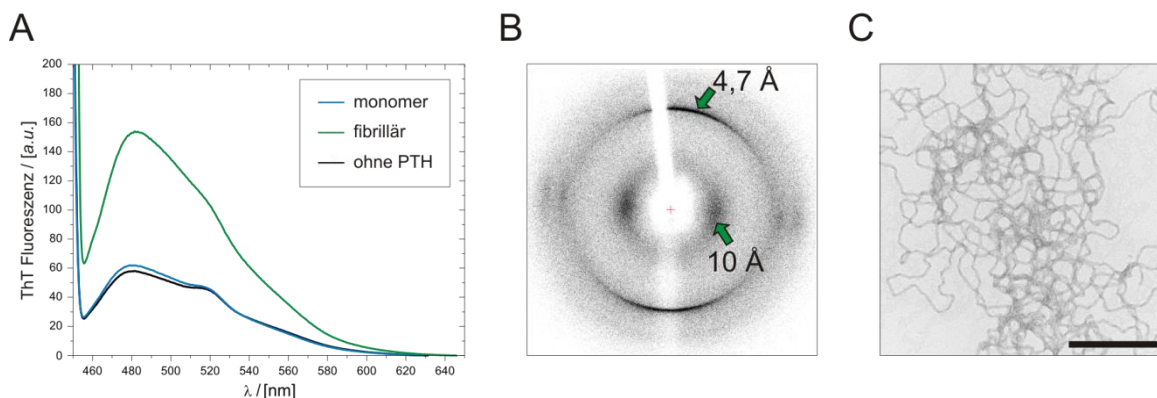


Abbildung 31: PTH₁₋₈₄-Aggregate weisen charakteristische Eigenschaften amyloider Fibrillen auf.

A: Fluoreszenzintensität von Thioflavin T (ThT) in 50 mM Natriumboratpuffer pH 9 (schwarz), sowie in Gegenwart von frisch gelöstem PTH₁₋₈₄ (blau) und bei 65 °C für 20h vorinkubiertem PTH₁₋₈₄ (grün). B: Röntgenbeugungsbild von PTH₁₋₈₄ Fibrillen mit typischen Reflexen bei 4,7 und 10 Å. C: Transmissionselektronenmikroskopaufnahmen von PTH₁₋₈₄. Die Maßstabsskala entspricht 500 nm.

Wählt man die Inkubationszeit ausreichend lang, lassen sich auch bei niedrigeren Temperaturen Amyloidfibrillen beobachten. Diese zeigen teilweise unterschiedliche Morphologien. So entstehen bei 65 °C Fibrillen mit einer durchschnittlichen Dicke von 20 nm, bei 45 °C konnte zudem eine zweite Spezies mit nur durchschnittlich 7 nm

beobachtet werden. Nach Inkubation bei 37 °C für 99 h treten noch ringförmige Aggregate mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 35 nm auf, welche vermutlich Vorstufen der Fibrillen darstellen (Abbildung 32). Eine direkte Beobachtung der Fibrillierungskinetik mittels ThT-Fluoreszenz in saurem oder basischem Milieu ist aufgrund mangelnder Stabilität des Farbstoffes nicht möglich. Deshalb kann die Fibrillierung unter diesen Bedingungen nur indirekt beobachtet werden. Dies erfolgte durch Inkubation von Aliquots für verschiedene Zeitpunkte sowie die nachträgliche Zugabe von ThT. Auf diese Weise konnte unter diesen Bedingungen eine sehr kurze *Lag*-Phase und eine sehr schnelle Fibrillierung nachgewiesen werden^[45].

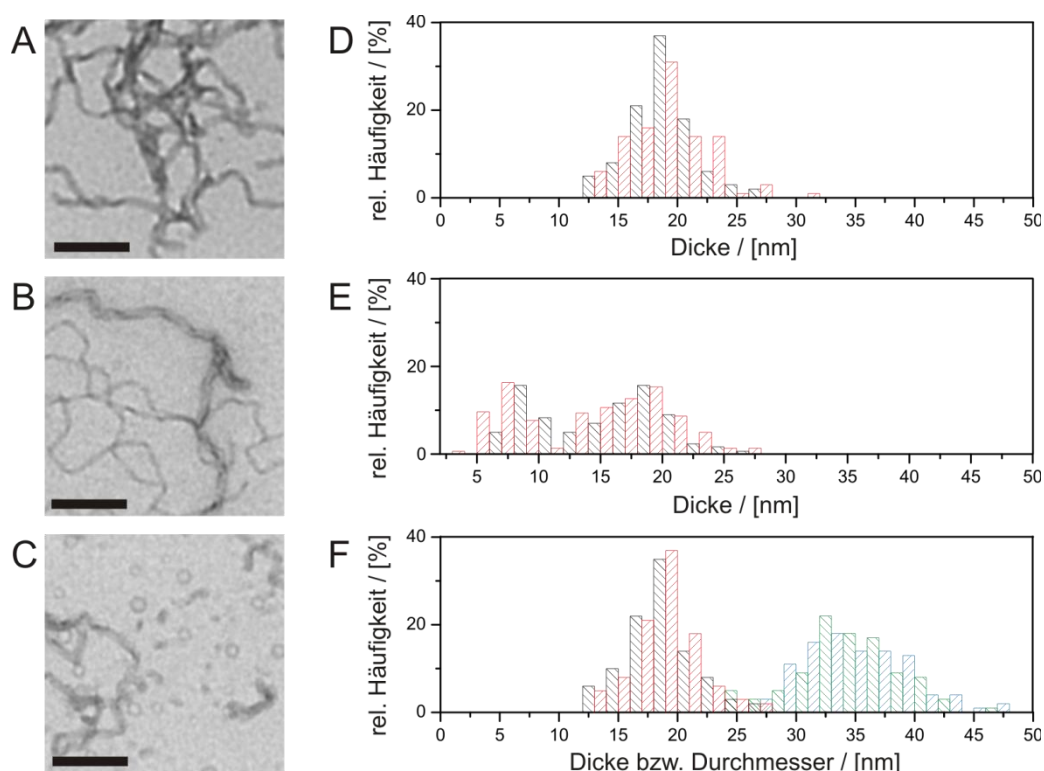


Abbildung 32: Morphologie der PTH₁₋₈₄-Fibrillen, welche durch Inkubation für 100 h bei verschiedenen Temperaturen erzeugt wurden. A-C: TEM-Abbildungen von Aggregaten erzeugt bei 65 °C (A), 45 °C (B) und 37 °C (C). Die Maßstabsskala entspricht 50 nm. D-F: Histogramme der Fibrillendickenmessung der jeweiligen TEM-Abbildungen (Klassenbreite 2 nm, n=100). Es wurde jeweils an Aufnahmen an zwei verschiedenen Positionen des Probengitters ausgewertet (rot und schwarz). Bei 37 °C konnten zusätzlich ringförmige Aggregate mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 35 nm beobachtet werden (blau und grün).

Für niedrigere pH-Werte ist es möglich, die Fibrillierungskinetik direkt zu beobachten. Die Fibrillierung läuft schneller mit zunehmender PTH₁₋₈₄- und Salzkonzentration sowie steigendem pH-Wert (Abbildung 33 bzw. Abbildung S11, S. XXXVIII). Die unterschiedlichen Kurvenverläufe der Duplikate beruhen auf der Heterogenität der Fibrillierung^[200]. Dieser Effekt ist jedoch geringer als die Änderungen bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. Die beobachtete

Konzentrationsabhängigkeit ist typisch für Aggregationsreaktionen. Erwartungsgemäß erfolgt die Fibrillierung im Bereich des isoelektrischen Punktes von PTH₁₋₈₄ (pI=9,1) besonders schnell. Die Salzabhängigkeit lässt sich durch verstärkte Abschirmung geladener Gruppen in Gegenwart von Salz erklären. Somit werden abstoßende Coulombkräfte verringert und das Zusammenlagern der Peptidketten begünstigt. Möglicherweise wird jedoch auch der bekannte α -helikale Anteil der N-terminalen Aminosäuren 15-34^[62] destabilisiert und die Bildung von Fibrillen begünstigt.

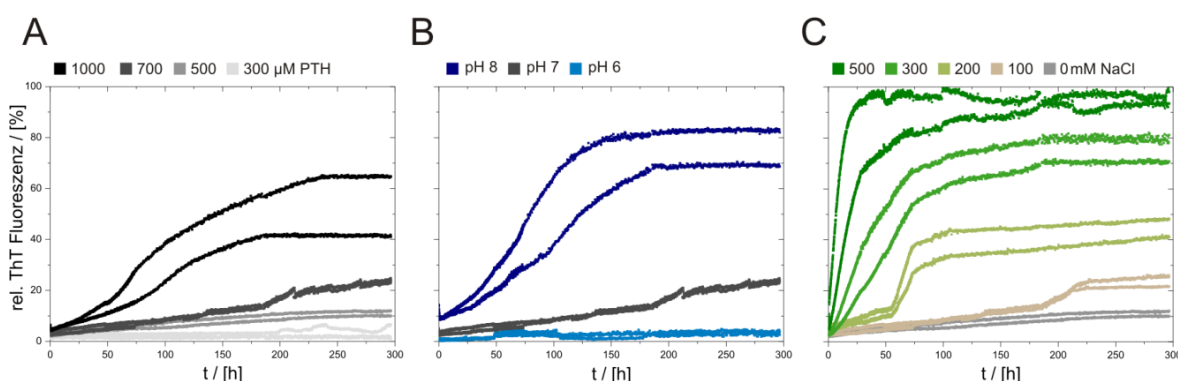


Abbildung 33: ThT basierte Messungen der Aggregationskinetik von PTH₁₋₈₄ in Abhängigkeit der Peptidkonzentration (A), des pH-Wertes (B) sowie der Salzkonzentration (C). Steigende Peptid-Konzentration, pH-Wert sowie zunehmende Salzkonzentration beschleunigt die Fibrillierung. Die Aggregationskinetiken wurden bei 37 °C in 50 mM Natriumphosphatpuffer aufgenommen, die PTH₁₋₈₄-Konzentration betrug 700 μ M (B) bzw. 500 μ M (C), der pH-Wert 7 (A, C). Die übrigen Parameter wurden jeweils variiert und können den Legenden entnommen werden. Vor der Messung wurde jeweils für 30 s mit 300 Upm geschüttelt, das Messintervall betrug 100 s während der ersten drei Tage und anschließend 400 s. Die Farbcodierung wurde entsprechend der Legenden verwendet, es sind jeweils Duplikate dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde auf den maximalen und minimalen Wert (aller Kurven) normiert.

Mittels H/D-Austausch an den Fibrillen soll nun der Kernbereich der Fibrillen identifiziert werden. Hierfür wurden zunächst alle Kreuzsignale in 99,96 % d₆-DMSO/0,04 % d-TFA mittels 5D HabCabCONH- und HN(CA)CONH-Spektren zugeordnet (Tabelle 18, Seite XXXVI/Abbildung 34). Trotz vollständiger Zuordnung sind die Intensitäten von 16 der 80 Kreuzsignale aufgrund von Überlagerung ($\Delta\delta < 0,02$ ppm) nicht eindeutig auswertbar. Vergleicht man die ¹H-¹⁵N-Korrelationspektren nach Amidprotonenaustausch mit einer Referenzprobe, ergibt sich auch nach 14 Tagen H/D-Austausch bei pH 9 und 25 °C noch ein signifikanter Protonierungsgrad für einen großen Teil der Aminosäuren, was für hohe Abschirmung der N-H-Gruppen gegen das Lösungsmittel spricht. Qualitativ lassen sich jedoch intensitätsschwächere Kreuzsignale erkennen: M18&E19, K26-L28 und K53, V58-V60 sowie H63 (Abbildung 34).

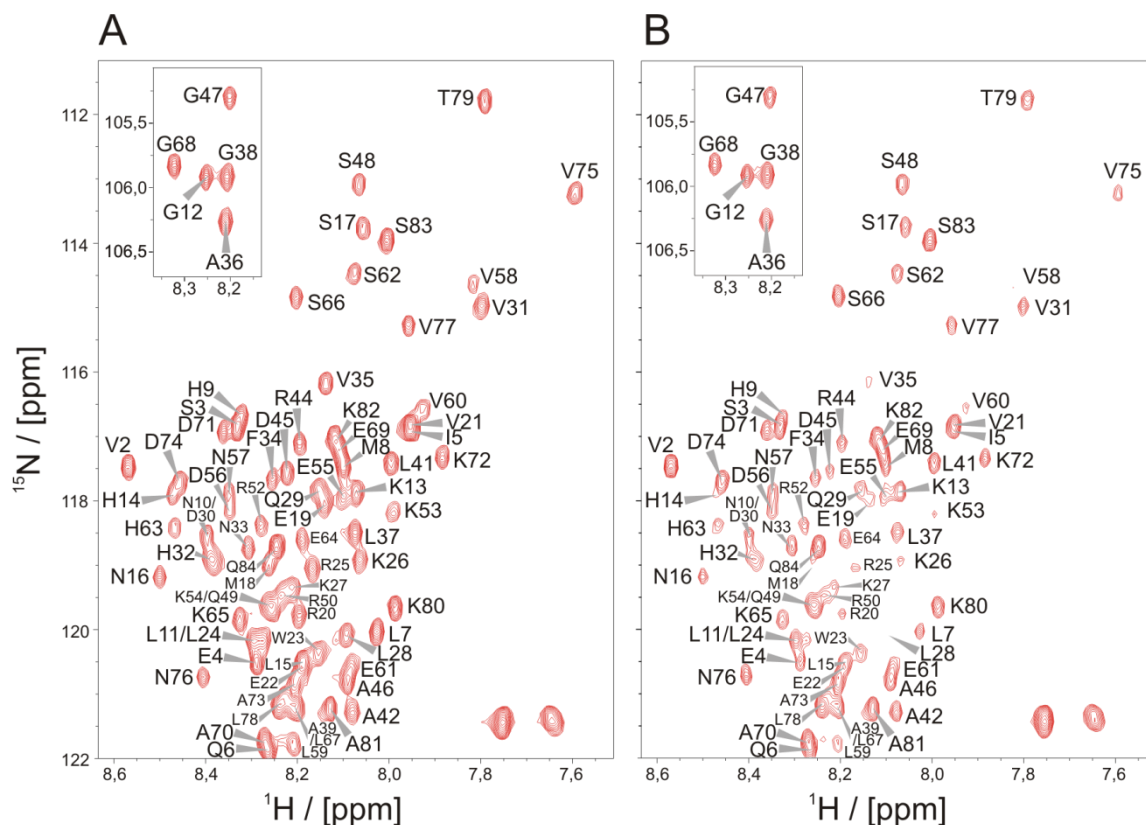


Abbildung 34: ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektren von PTH₁₋₈₄ nach 3 Wochen H/D-Austausch (B) verglichen mit einer Referenzprobe (A). Die stärksten Signalabnahmen der Kreuzsignale ergeben sich in den Bereichen von M18&R19, R25-L28 und K53, V58-V60, H63.

Bestimmt man die jeweiligen Protonierungslevel und trägt diese über der Aminosäuresequenz auf (Abbildung 35), ist keine so deutliche Unterscheidung zwischen geschützten und ungeschützten Abschnitten möglich, wie es bei anderen amyloiden Fibrillen beobachtet wurde (z. B. A β , Kapitel 3.1.2, S. 63 ff.). Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass Wasserrückstände während der Präparation und Messzeit wie in Abschnitt 3.1.1 (S. 59 ff.) diskutiert, zu signifikantem weiteren Amidprotonenaustausch führt, welcher ein Angleichen der ursprünglichen Protonierungslevel an die H₂O/D₂O-Zusammensetzung des Wasserrückstandes bewirkt (s. Abschnitt 3.1.1, S. 59 f.). Dies wurde in Abbildung 35 in Grautönen codiert, je dunkler umso weniger Amidprotonenaustausch wurde für das entsprechende Kreuzsignal unter Messbedingungen beobachtet und umso verlässlicher ist das bestimmte Protonierungslevel. Geht man davon aus, dass alle Protonierungslevel mit zunehmender Messzeit einem Wert von 30% entgegenstreben, würde ein Messwert >30% einen scheinbar zu geringen Schutz verzeichnen, während ein Messwert <30% durch Rückaustausch einen scheinbar zu hohen Protonierungsgrad liefert. Definiert man dies als Grenzwert, ergibt sich für V2, S17,

R20-R25, Q29, V35, A36, G38, A42, G47, S48, D56, N57, S62, S66, G68-D71, A73, D74, N76, A81 und S83 ein signifikanter Schutz. Im Gegensatz dazu sind E4, L7, H14, M18, E19, K27, L28, H32-F34, V58-V60, V75 und K80 besonders lösungsmittelzugänglich. Für alle übrigen Aminosäuren ist keine eindeutige Aussage möglich. Es ergibt sich insgesamt ein eher heterogenes Bild mit relativ kurzen geschützten bzw. ungeschützten Abschnitten. Diese können nicht eindeutig den β -Faltblattbereichen der *Cross*- β -Struktur einer Amyloidfibrille zugeordnet werden. Die Bestimmung von Austauschraten k_{ex} und Schutzfaktoren (Daten nicht gezeigt) führt nicht zu einem aussagekräftigeren Muster. In einer von mir betreuten Bachelor-Arbeit^[334] wurde das Experiment mit einem etwas abgewandelten Protokoll mit zusätzlichem Gefriertrocknungsschritt durchgeführt. Die auf diese Weise bestimmten Protonierungslevel stimmen relativ gut mit den hier bestimmten Werten überein, wobei sich für die C-terminalen Aminosäuren D45-S83 ein etwas höherer Schutz ergab.

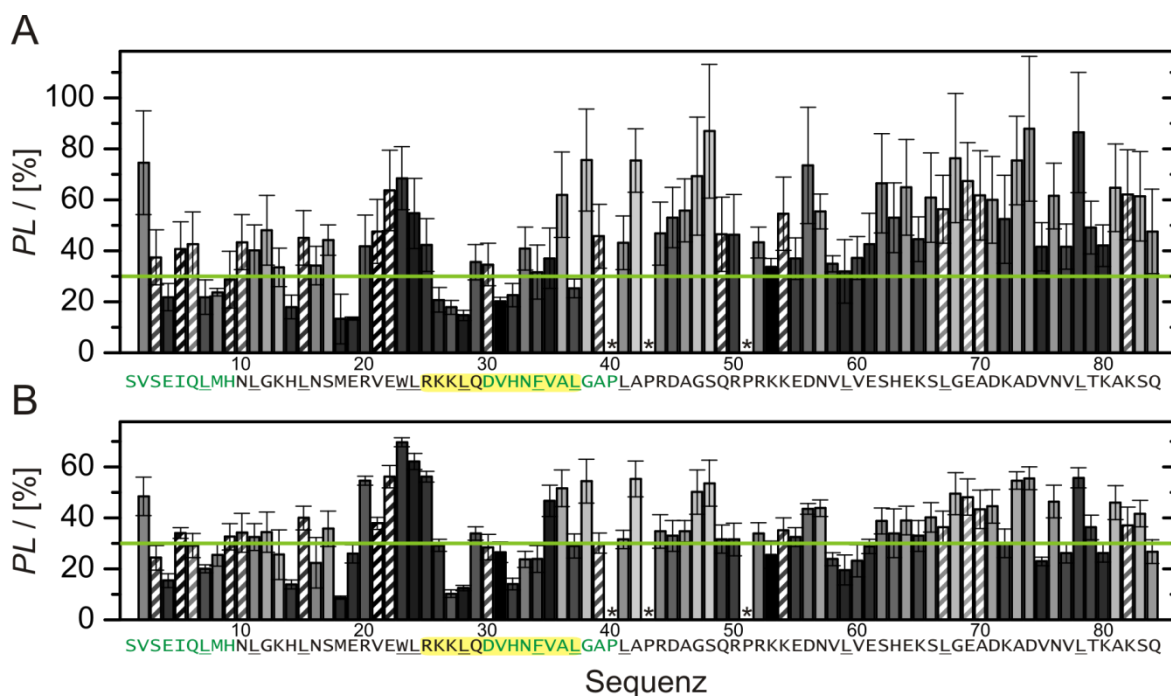


Abbildung 35: Protonierungslevel von PTH₁₋₈₄ nach verschiedenen Austauschzeiten (A: 72h, B: 21d) in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz. Die Farbcodierung des Balkendiagrammes entspricht der erwarteten Stärke des in Abschnitt 3.1 (S. 59 ff.) diskutierten Rückaustausches bzgl. weiteren Austausches. Die Farbskala von schwarz nach weiß bedeutet kein bis vollständiger Austausch während der Messzeit und stellt somit ein Maß für die Verlässlichkeit der Werte dar. Die Balken der Aminosäuren, deren Intensitäten aufgrund von Überlappung der Kreuzsignale ($\Delta\delta < 0,02$ ppm) nicht eindeutig auswertbar sind, sind schraffiert abgebildet. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen. Die hellgrüne Linie markiert die H₂O/D₂O-Zusammensetzung des Wasserrückstandes in den NMR-Proben. In der Sequenz sind die *in silico* Vorhersagen des β -Faltblattbereiches mittels PASTA und WALTZ grün markiert. Mittels MALDI-TOF und ESI-MS-MS konnte nach limitierter Proteolyse in den Fibrillen ein nicht verdauter Bereich identifiziert werden. Dieser ist in der Sequenz gelb hinterlegt. Alle möglichen Schnittstellen von Chymotrypsin wurden unterstrichen^[45].

Mittels *in silico* Vorhersagen wurde für die Aminosäuren S1-H9 und D30-P40 eine erhöhte Aggregationswahrscheinlichkeit berechnet und der Bereich von R25 bis L37 wird bei der limitierten Proteolyse mit Chymotrypsin nicht abgebaut^[45] (s. Sequenz in Abbildung 35). Diese Bereiche korrelieren schlecht mit den gemessenen Protonierungslevel. Basierend auf Festkörper-NMR-Untersuchungen konnten einige Aminosäuretypen identifiziert werden, welche in flexiblen bzw. strukturierten Bereichen der Polypeptidkette liegen und deren chemische Verschiebungen charakteristisch für ein β -Faltblatt bzw. für eine α -Helix sind^[45]. Mit Ausnahme des Isoleucin kommen alle diese Aminosäuren häufig in der PTH₁₋₈₄-Sequenz vor und lassen keine eindeutigen Schlüsse zu.

Das H/D-Austauschexperiment wird, wie bereits diskutiert, durch weiteren bzw. Rückaustausch während der Präparation der NMR-Proben beeinflusst. Zudem ist bekannt, dass ein Gleichgewicht von $(90 \pm 2,6)\%$ fibrillärem und $(10 \pm 2,6)\%$ löslichem PTH₁₋₈₄ bei einer Gesamtkonzentration von $740 \mu\text{M}$ vorliegt. Dies entspricht einer Konzentration von $(74 \pm 25) \mu\text{M}$ löslichem PTH₁₋₈₄^[45]. Dies dürfte sich auf die verschiedenen Untersuchungsmethoden zur Fibrillenstruktur unterschiedlich auswirken: Für die Festkörper-NMR-Untersuchungen werden die Fibrillen nicht resuspendiert, so dass hier kein Einfluss zu erwarten ist. Bei limitierter Proteolyse und Amidprotonenaustausch-Experimenten ist ein Einfluss wahrscheinlicher. Wie sich die Proteolyse auf das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Fibrillen auswirkt, lässt sich lediglich spekulieren. Beim Amidprotonenaustausch sind zwei Szenarien vorstellbar: Liegen löslicher Anteil und Fibrillen in einem sehr langsamen Austausch vor, ist der Einfluss vernachlässigbar, da durch das angewendete Protokoll der lösliche Anteil zu Beginn und zum Ende der Austauschzeit durch Sedimentation abgetrennt wird. Existiert dagegen ein dynamisches Gleichgewicht, bei dem Peptidketten während der Austauschzeit an den Fibrillen aufwachsen und sich wieder lösen, spielen bei der Detektion des Protonierungslevels beide Aggregationszustände eine Rolle. Das Austauschmuster entspräche in diesem Fall einer Mischung. Lösliches PTH₁₋₈₄ weist jedoch kaum Strukturelemente und somit gegen Amidprotonenaustausch geschützte Bereiche auf, dies sollte lediglich zu einer gleichmäßigen Abnahme der Signale führen.

Um den Einfluss dennoch zu verringern, wäre es von Interesse, das Gleichgewicht in Richtung des fibrillierten Zustandes zu verschieben. Für andere Amyloidfibrillen ist bekannt, dass die thermodynamische Stabilität der Fibrillen von der chemischen Umgebung abhängt^[335]. Nachfolgend wurde dieses Verhältnis bei unterschiedlichen

experimentellen Bedingungen bestimmt (Abbildung 36A). Bei allen getesteten Bedingungen stellte sich ein ähnliches Verhältnis ein. Der lösliche Anteil beträgt $(7,6 \pm 0,5)\%$ beziehungsweise $(72 \pm 3)\mu\text{M}$. Dies entspricht im Rahmen des Messfehlers den bereits bei geringerer Gesamtkonzentration bestimmten Wert von $(74 \pm 25)\mu\text{M}$. Nach Gleichung (2.5, S. 33) ergibt sich für diese kritische Konzentration $\Delta G = (-27 \pm 10)\text{kJ/mol}$. Im Vergleich zu anderen Amyloidfibrillen ist diese kritische Konzentration relativ hoch bzw. die thermodynamische Stabilität relativ gering^[335].

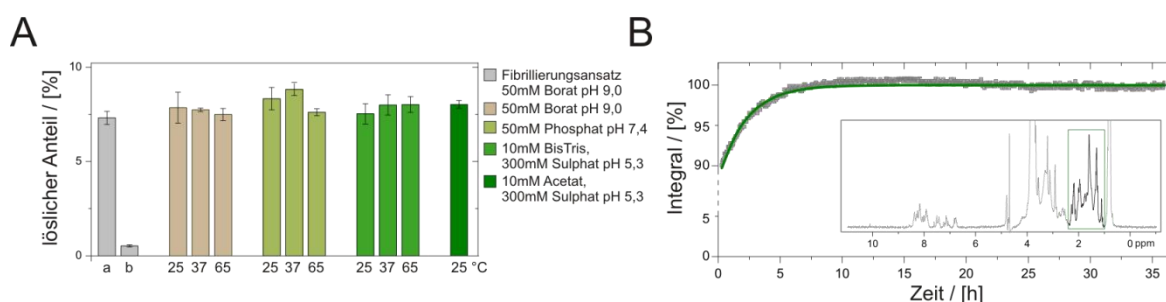


Abbildung 36: Fibrillen stehen im Gleichgewicht dem mit löslichem Anteil von PTH₁₋₈₄.

A: Im Fibrillierungsansatz (1 mM PTH₁₋₈₄, 50 mM Borat pH 9, mindestens 12 Stunden Inkubation bei 65°C) befindet sich ca. 92,5% fibrilläres und 7,5% lösliches PTH₁₋₈₄ (a). Entfernt man den löslichen Anteil durch Sedimentation (16000 g, 1 h, 4°C) und resuspendiert das Pellets in identischem Volumen, ist zunächst kein lösliches PTH₁₋₈₄ nachweisbar (b). Das Gleichgewicht stellt sich unabhängig vom verwendeten Puffer und Temperatur (siehe Legende) innerhalb von 24 h wieder ein. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über UV-Absorption bei 280 nm nach Entfaltung in 6 M GdnHCl.

B: Zunahme der NMR-Signalintensität mit der Zeit nach dem Resuspendieren des Pellets. Die Präparationszeit betrug 17 min, anschließend wurde eine Serie von ¹H-NMR-Spektren aufgenommen. Dargestellt ist das Integral über das NMR-Signal (Insert) von 2,4 bis 1,0 ppm (grün hervorgehoben). Der maximale Wert wurde auf 100% normiert. Die Anpassung der monoexponentiellen Funktion $I(t) = 1 + (I_0 - 1) e^{-kt}$ an die Daten (grüne Kurve) liefert folgende Werte: $I_0 = 0,882 \pm 0,002$ und $k = 0,46 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Nach der Präparationszeit von 17 min beträgt die Signalintensität bereits 90% des Plateauwertes, was entweder durch eine schnelle, nicht-detektierbare erste Phase oder durch einen Beitrag des fibrillären PTH₁₋₈₄ zum detektierbaren Signal begründet ist.

Dieser hohe Anteil an löslichem PTH₁₋₈₄ erschwert einerseits die strukturelle Charakterisierung der Amyloidfibrillen mittels H/D-Austausches. Andererseits liegt somit eine signifikante Menge NMR-detektierbarer Spezies im Gleichgewicht mit Fibrillen vor, so dass eine Reihe anderer Messungen möglich ist. Als experimentelle Bedingungen wurde 10 mM Natriumacetat, 300 mM Natriumsulphat pH 5,3 („NMR-Puffer“) und 25°C gewählt, da die Zuordnung der ¹H-¹⁵N-Kreuzsignale unter diesen Bedingungen bekannt ist (Abbildung S13^[201]). Bei diesem pH-Wert konnte bisher keine Fibrillenbildung beobachtet werden, so dass Proben aus frisch gelöstem PTH₁₋₈₄ über lange Zeit untersucht werden können. Bereits geformte Fibrillen sind dennoch unter diesen Pufferbedingungen stabil, zumindest konnten keine Veränderungen der Fibrillenmorphologie nach Inkubation für circa 3 Wochen (Abbildung 37A und B) verglichen mit frisch geformten Fibrillen in

Boratpuffer (pH 9) festgestellt werden. Auch die CD-Spektren zeigen für beide Puffer-Bedingungen identische Kurven (Abbildung 37D).

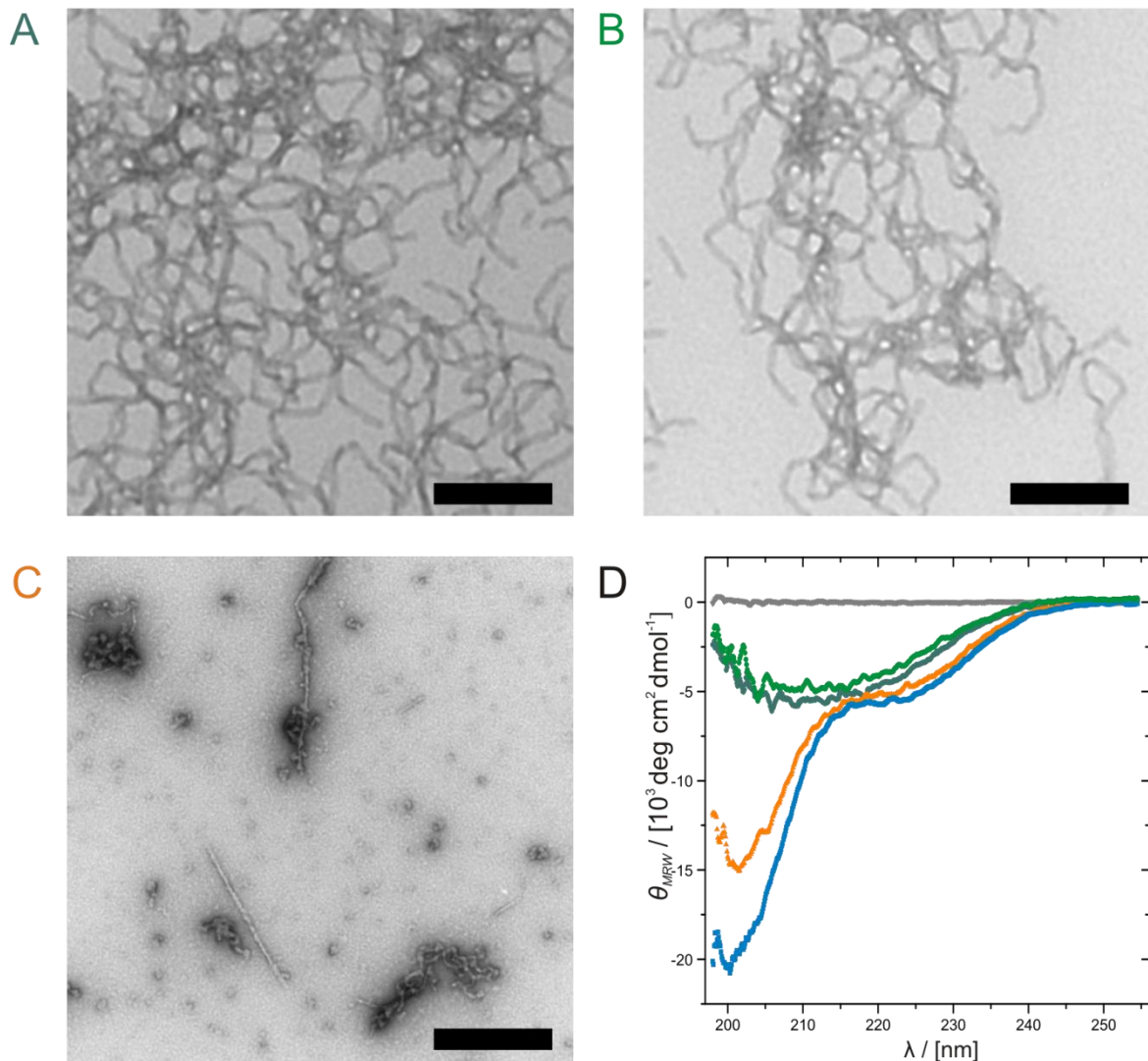


Abbildung 37: TEM Aufnahmen (A-C) und Fern-UV-CD-Spektren (D) von PTH₁₋₈₄.

A bzw. D dunkelgrün: Direkt nach Inkubation von 1 mM PTH₁₋₈₄ in 50 mM Natriumborat pH 9 bei 65 °C.

B bzw. D grün: Nach Abschluss aller NMR-Messungen (nach Sedimentation und Resuspendieren in 10 mM Natriumacetat, 300 mM Natriumsulphat pH 5,3).

C bzw. D orange: Überstand nach Sedimentation der Fibrillen.

Die TEM-Aufnahmen der Referenzprobe mit frisch gelöstem PTH₁₋₈₄ (D, blau) sowie von Puffer (grau) enthielten keine sichtbaren Fibrillen oder andere Aggregate und wurden nicht mit abgebildet. Die Maßstabsskala entspricht 200 nm.

Bringt man bereits geformte Fibrillen durch Sedimentation und Waschen in diesen NMR-Puffer, ist es möglich, das Einstellen des Gleichgewichtszustandes mittels NMR-Spektroskopie zu beobachten (Abbildung 36B). Es ergibt sich zunächst eine exponentielle Zunahme der Signalintensität ($k=0,46 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), nach ca. 7 Stunden ist der Sättigungswert erreicht. Nach der Präparationszeit von 17 min beträgt die Signalintensität bereits 90 % des

Plateauwertes, was entweder durch eine schnelle, nicht-detektierbare erste Phase oder durch einen Beitrag des fibrillären PTH₁₋₈₄ zum detektierbaren Signal begründet ist.

Es werden nun weitere Eigenschaften von monomerem PTH₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen untersucht. Die folgenden Messungen beziehen sich auf den Vergleich zwischen frisch gelöstem PTH₁₋₈₄ (150 μM) und löslichem PTH₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen (Gesamtkonzentration 1 mM) unter identischen Pufferbedingungen.

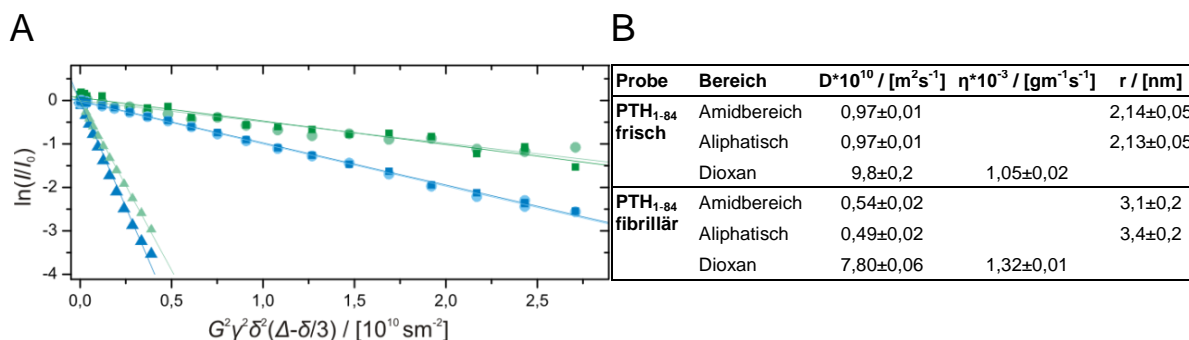


Abbildung 38: Diffusion von PTH₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen (grün) verglichen mit einer frisch präparierten Probe (blau). Dargestellt sind die Integral über das NMR-Signal über den Amidbereich (6,6 bis 8,9 ppm, dunkle Quadrate) und den aliphatischen Bereich (2,4 bis 1,0 ppm, helle Kreise). Zur Bestimmung der Viskosität wurde den Proben anschließend Dioxan zugesetzt (3,4 bis 3,7 ppm, Dreiecke). Die Gradientendauer δ und Diffusionszeit Δ wurde jeweils optimiert (PTH₁₋₈₄: $\delta=6$ ms, $\Delta=100$ ms, Dioxan: $\delta=4$ ms, $\Delta=60$ ms), um vergleichbare Kurven zu erhalten, erfolgte die Auftragung von $\ln(I/I_0)$ über $G^2 \gamma^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$. Die Steigungen entsprechen somit direkt den Diffusionskoeffizienten. Die resultierenden Werte sind in B zusammengefasst.

Der Diffusionskoeffizient ist in Gegenwart von Fibrillen um fast 50% langsamer (Abbildung 38). Die Diffusionskoeffizienten sind dabei unabhängig von der Diffusionszeit (50 ms bis 100 ms). Der Unterschied ist nicht allein auf die erhöhte Viskosität (25%) in Gegenwart von Fibrillen zurückzuführen, sondern spiegelt sich auch in den hydrodynamischen Radien wieder. Der gemessene hydrodynamische Radius der frisch gelösten Probe mit $2,14 \pm 0,05$ nm liegt zwischen den theoretisch berechneten Werten für ein globuläres und ein entfaltetes Protein mit 84 Aminosäuren ($1,7 \pm 0,4$ nm, bzw. $2,8 \pm 1,4$ nm)^[292]. In Gegenwart von Fibrillen beträgt der apparente hydrodynamische Radius dagegen $3,1 \pm 0,2$ nm. Die Messungen wurden mit aminosäurespezifischer Auflösung wiederholt. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede für die Kreuzsignale der verschiedenen Aminosäuren beobachtet (Abbildung S15, S. XLII). Die Mittelwerte entsprechen mit $D=(0,51 \pm 0,07) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ bzw. $(1,05 \pm 0,06) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ den Ergebnissen der eindimensionalen Messungen.

Mittels photoinduzierter Vernetzung (Abbildung 39) wurden in der fibrillären Probe nach Abschluss aller NMR-Messungen ein hoher Anteil an Dimeren und Trimeren (50 bzw. 9% des löslichen PTH₁₋₈₄) nachgewiesen. In der Referenzprobe wurden diese Spezies ebenfalls beobachtet, jedoch lag der Monomeranteil deutlich höher (86%).

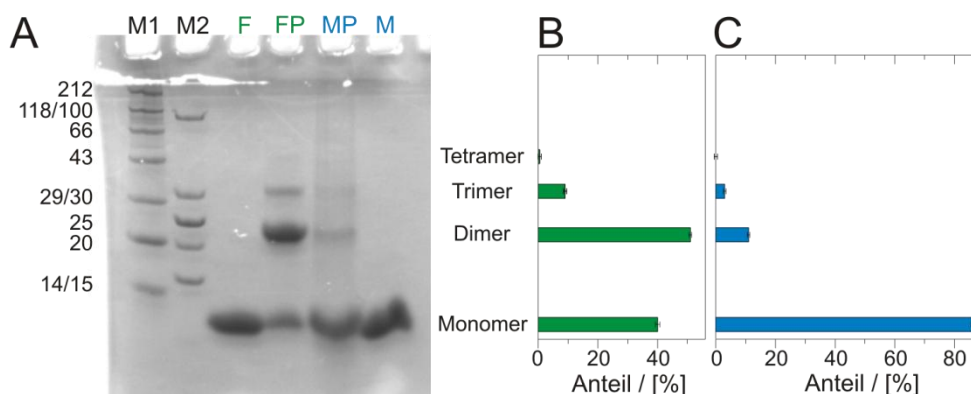


Abbildung 39: Analyse der Größenverteilung der PTH₁₋₈₄-Spezies durch photoinduzierte Vernetzung (PICUP) und Größenauftrennung mittels Gelelektrophorese.

A: SDS-PAGE von frisch gelöstem PTH₁₋₈₄ (M, MP) und fibrillärem PTH₁₋₈₄ (F, FP). Es wurde jeweils eine Referenzprobe (M,F) und eine PICUP-behandelte Probe (MP, FP) aufgetragen. Für alle Spuren wurden 7 µg PTH₁₋₈₄ eingesetzt. Als Größenstandard wurde Roti® Mark Standard (M1) und Page Ruler™ Low Range Protein Ladder (M2) verwendet. Seitlich sind die entsprechenden Größen in kDa angegeben.

B,C: Densitometrische Analyse der Spuren FP (B) und MP (C) aus Abbildung A. Angegeben ist der Anteil der Spezies (Monomer, Dimer, Trimer, Tetramer) von gesamten löslichen Peptid. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Analysen.

Der NMR-detektierbare Anteil der fibrillären Probe zeigt Änderungen der Signalintensität und der Position der Kreuzsignale im ¹H-¹⁵N-Korrelationsspektrum (Abbildung 40A/41). Die stärksten Verschiebungen treten in den Bereichen von Q6-E19, H32-L37 und K54-H63, E69, D71, D74 auf. Die Änderung der Signalintensität betrifft die N-terminalen Hälfte der Aminosäuren sowie S62, H63 und E64 besonders stark. Entfernt man die Fibrillen durch Sedimentation, verschieben sich die Signale wieder in Richtung des ursprünglichen Spektrums und die Signalintensitäten nehmen zu (Abbildung 40B/41). Auch im CD-Spektrum sinkt die molare Elliptizität bei 200 und 220 nm und gleicht somit wieder dem des frisch gelösten Peptides (Abbildung 37D). Allerdings wird der Ausgangszustand auf diese Weise nicht wieder erreicht, da durch die Zentrifugation die Fibrillen nicht vollständig abgetrennt werden konnten (Abbildung 37C).

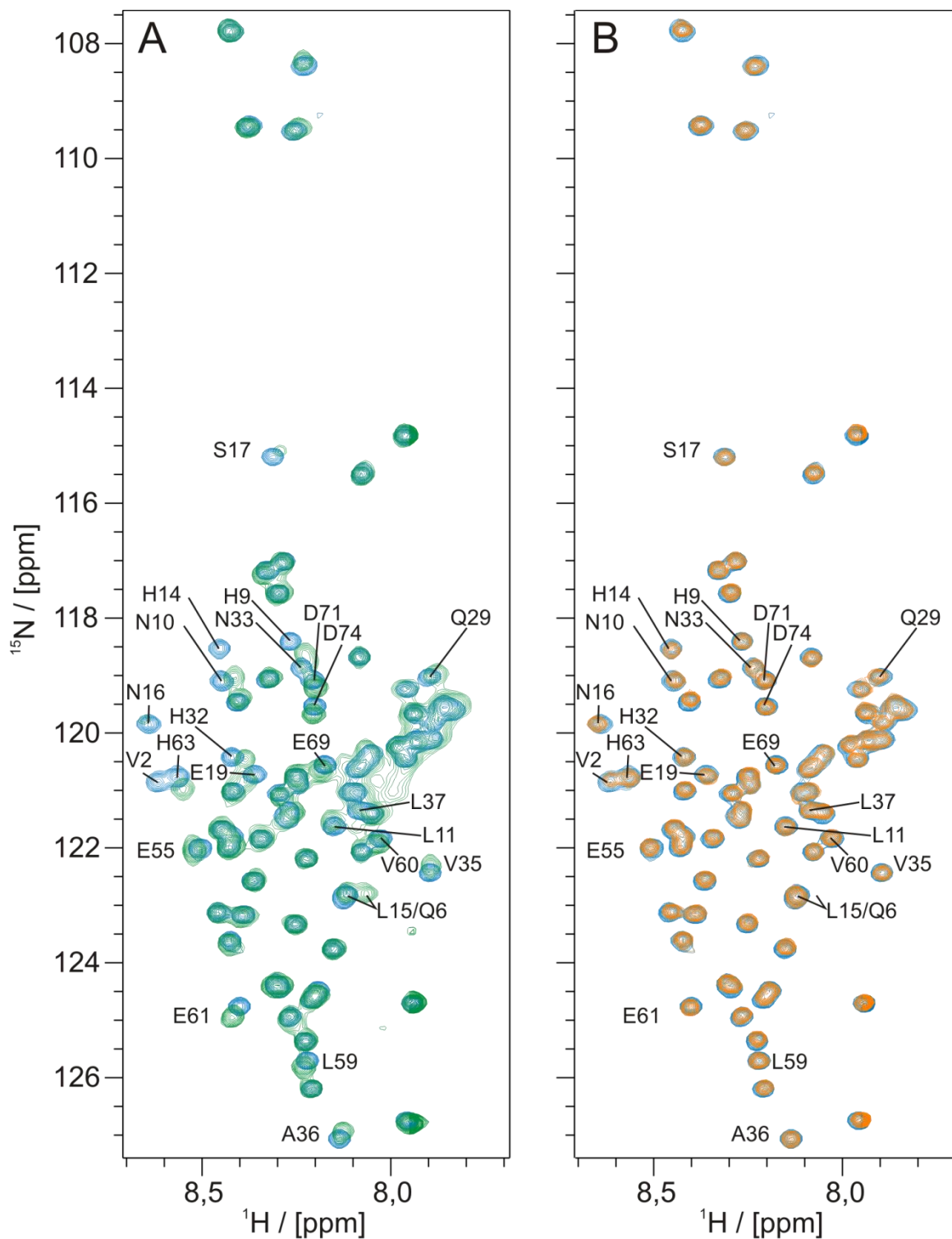


Abbildung 40: Änderungen der chemischen Verschiebung und der Signalintensität der ^1H - ^{15}N -Kreuzsignale von PTH_{1-84} in Gegenwart von Fibrillen (grün, A) bzw. im Überstand nach Sedimentation der Fibrillen (16000 g, 4°C , 1h) (orange, B) verglichen mit einer frisch präparierten Probe (blau, A und B). In Gegenwart von Fibrillen treten Änderungen in drei Abschnitte der Aminosäuresequenz auf: Q6-E19, H32-L37 und K54-D74. Entfernt man die Fibrillen durch Sedimentation, wird das ursprüngliche Spektrum wiederhergestellt. Um die Abbildung übersichtlich zu gestalten, wurden nur die Kreuzsignale beschriftet, welche in Gegenwart von Fibrillen starke Änderungen der chemischen Verschiebung oder Intensität aufweisen. In Abbildung S13, S. XL befinden sich die Spektren mit vollständiger Beschriftung der Zuordnung.

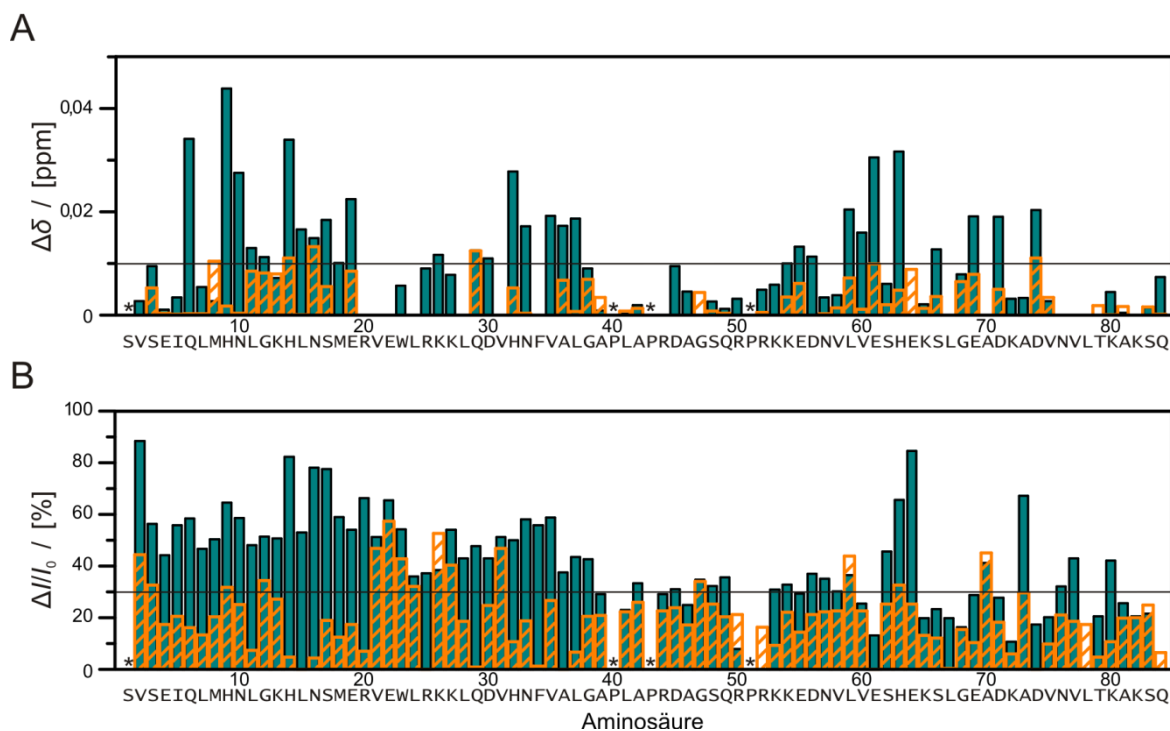


Abbildung 41: Änderung der chemischen Verschiebung (A) und der Abnahme der Signalintensität (B) der ^1H - ^{15}N -Kreuzsignale in Gegenwart von Fibrillen (türkis) bzw. im Überstand nach Sedimentation der Fibrillen (16000 g, 4 °C, 1h) (orange) verglichen mit einer frisch präparierten Probe. In Gegenwart von Fibrillen verschieben sich die Kreuzsignale in den Bereichen von Q6-E19, H32-L37 und K54-H63, E69, D71, D74 ($\Delta\delta > 0,01$, schwarze Linie in A). Zudem nimmt die Signalintensität in der N-terminalen Hälfte und für die Reste S62, H63 und E64 besonders stark zu ($\Delta I/I_0 > 30\%$, schwarze Linie in B). Entfernt man die Fibrillen durch Sedimentation, verschieben sich die Signale wieder in Richtung des ursprünglichen Spektrums und die Signalintensitäten nehmen zu. Nicht detektierbare Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet.

Bei Untersuchungen zur Proteindynamik wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den N-terminalen Aminosäuren L7-N33 verglichen mit dem Abschnitt L37-T79 festgestellt. So ist für den N-terminalen Bereich die longitudinale Relaxationsrate der Stickstoffkerne durchschnittlich um den Faktor 1,2 erhöht, während die transversale Relaxationsrate und der heteronukleare NOE-Effekt doppelt so hoch sind (Abbildung 42). Diese Unterschiede innerhalb der Sequenz sind sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Fibrillen zu beobachten und deuten auf eine geringe Beweglichkeit bzw. höhere strukturelle Ordnung des N-terminalen Bereichs hin. Eine Wiederholung des Experimentes mit deutlich geringerer Salzkonzentration führt zu wesentlich schwächer ausgeprägten Unterschieden innerhalb der Peptidsequenz (Abbildung S14, S. XLI).

Beim Vergleich der beiden Proben ergeben sich die größten Unterschiede bei den transversalen Relaxationsraten, welche in Gegenwart von Fibrillen für alle Aminosäuren erhöht sind (Faktor $2,3 \pm 0,6$). Diese Unterschiede sind unabhängig von der Magnetfeldstärke und die absoluten Änderungen zeigen Variationen entlang der Peptidsequenz (Abbildung 42 bzw. S16, S. XLII): Die Änderung der transversalen

Relaxationsrate beträgt im Mittel $7,5 \pm 2s^{-1}$ für die N-terminalen Aminosäuren S3-A39 und $3,0 \pm 1s^{-1}$ für den C-terminalen Bereich L41-Q84.

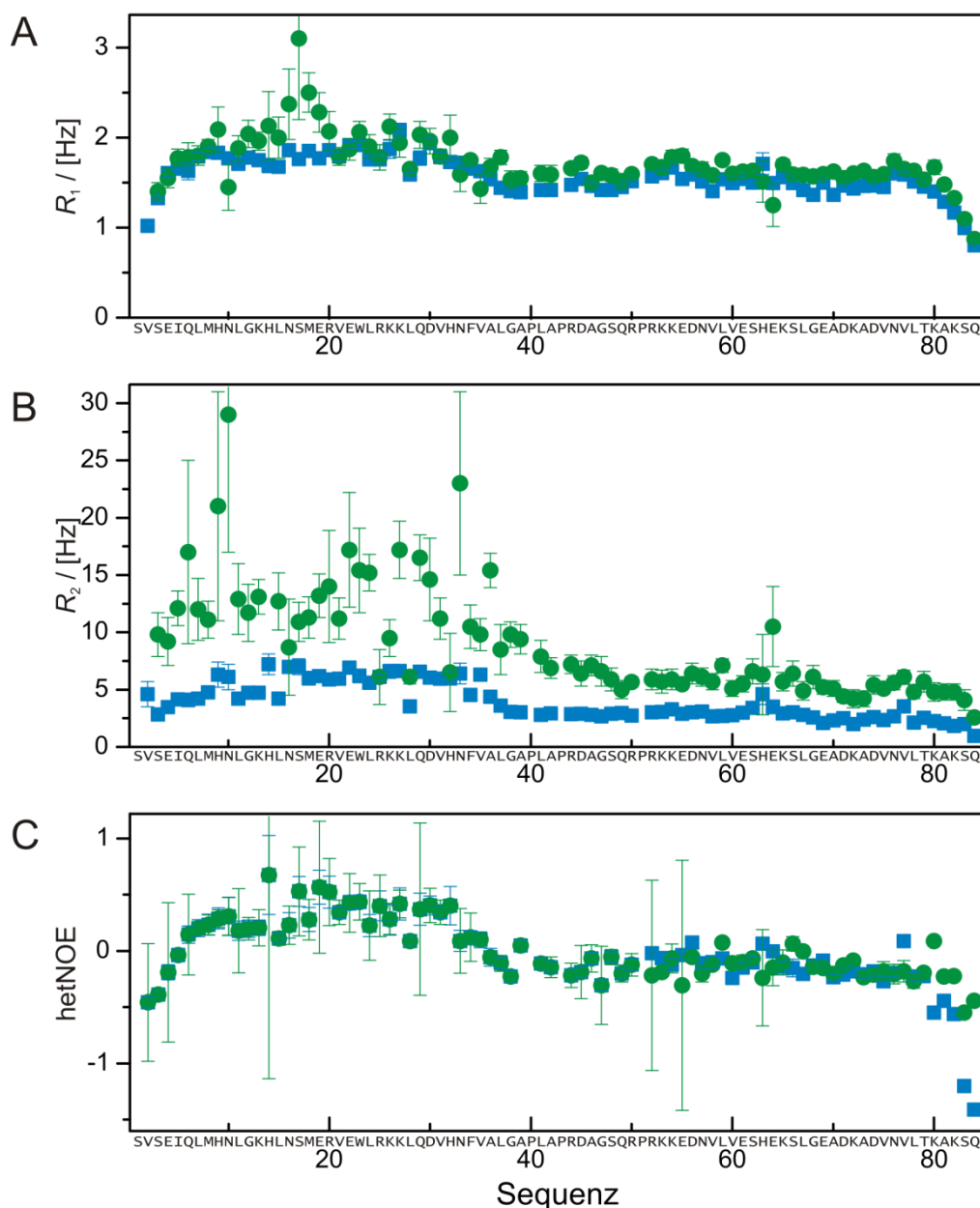


Abbildung 42: Longitudinale Relaxationsrate R_1 (A), transversale Relaxationsrate R_2 (B) und heteronuklearer NOE-Wert (C) für PTH₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen (grün) verglichen mit einer frisch gelösten Probe (blau). Die Messungen erfolgten bei 298 K und $B_0 = 14,1$ T.

Die longitudinale Relaxationsraten sind für die Aminosäuren H14-E19 in Gegenwart von Fibrillen deutlich ($>25\%$), alle anderen lediglich im Mittel um 10% erhöht. Die bestimmten hetNOE-Werte sind für die Aminosäuren V2-R50 identisch und für R52-Q84 kommt es bei beiden Proben zu einer Streuung der Werte um Null.

Da im Wesentlichen nur die transversale Relaxation durch die Anwesenheit von Fibrillen beeinflusst wird, ist davon auszugehen, dass dies auf chemischem Austausch beruht. Findet

dieser Austausch auf einer Millisekunden-Zeitskala statt, kann er durch Relaxations-Dispersions-Experimente nachgewiesen werden. Eine Variation der CPMG-Frequenz von 33 Hz bis 1000 Hz ergab jedoch bei beiden Proben keine signifikanten Unterschiede (Abbildung S17, S. XLIII).

Eine andere Möglichkeit, den Austausch zwischen einer NMR-detektierbaren Spezies mit großen Aggregaten wie beispielsweise Amyloidfibrillen zu untersuchen, stellt das DEST-Experiment dar. Die großen R_2 -Raten von Amyloidfibrillen ermöglichen eine partielle Sättigung durch schwache Radiofrequenz-Pulse auch bei großem Abstand von der Resonanzfrequenz. Diese Sättigung kann durch chemischen Austausch auf die NMR-detektierbare Spezies übertragen und als Abschwächung des NMR-Signals detektiert werden. Während bei der Referenzprobe bereits für schwach off-resonante Pulse ($\Delta f > 7000$ Hz) kein Einfluss beobachtet wird, ist in Gegenwart von Fibrillen auch für weit off-resonante Pulse ($\Delta f > 20000$ Hz) eine Signalabschwächung detektierbar. Dies lässt sich nur durch chemischen Austausch der NMR-detektierbaren mit sehr hochmolekularen Spezies, also Fibrillen erklären. Eine Anpassung des Modells in Gleichung 2.30 (S. 55) an die Messwerte des ^1H -DEST-Experimentes ergibt folgende Parameter: $k_{\text{on}}^{\text{app}} = 3,4 \pm 2,7 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 33 \pm 56 \text{ s}^{-1}$, $R_{2,\text{dark1}} = 350 \pm 1000 \text{ s}^{-1}$, $R_{2,\text{dark2}} = 16000 \pm 22000 \text{ s}^{-1}$. Die entsprechenden simulierten Kurven sind in Abbildung 43B und in A die zugehörigen Residuen dargestellt. Die Abweichungen von den Messwerten und die hohen Unsicherheiten der bestimmten Parameter legen nahe, dass das Modell die Realität nicht ideal repräsentiert.

Eine detailliertere Analyse erfolgte durch die Bestimmung aminosäurespezifischer Sättigungskurven. Weder durch die Anpassung eines Zweizustandsmodells noch eines Dreizustandsmodells mit gemeinsamen Raten für alle Aminosäuren (Abbildung 20B bzw. C, S. 57) konnte gute Übereinstimmungen der simulierten Kurven mit den experimentellen Werten für alle Aminosäuren erzielt werden. Dies gelang erst durch die Anpassung eines Dreizustandsmodells mit aminosäurespezifischen Raten (Abbildung 20D, S. 57). Diese liefert folgende globale Parameter: $k_{\text{on}}^{\text{app}} = 4,9 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 0,8 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, $R_{2,\text{dark2}} = 5200 \pm 4200 \text{ s}^{-1}$. In Abbildung 43C-E sind zudem die aminosäurespezifischen Parameter dargestellt. Diese weisen auf ein unterschiedliches Verhalten der N-terminalen Aminosäuren S3-D30 verglichen mit dem C-terminalen Abschnitt L41-Q84 hin.

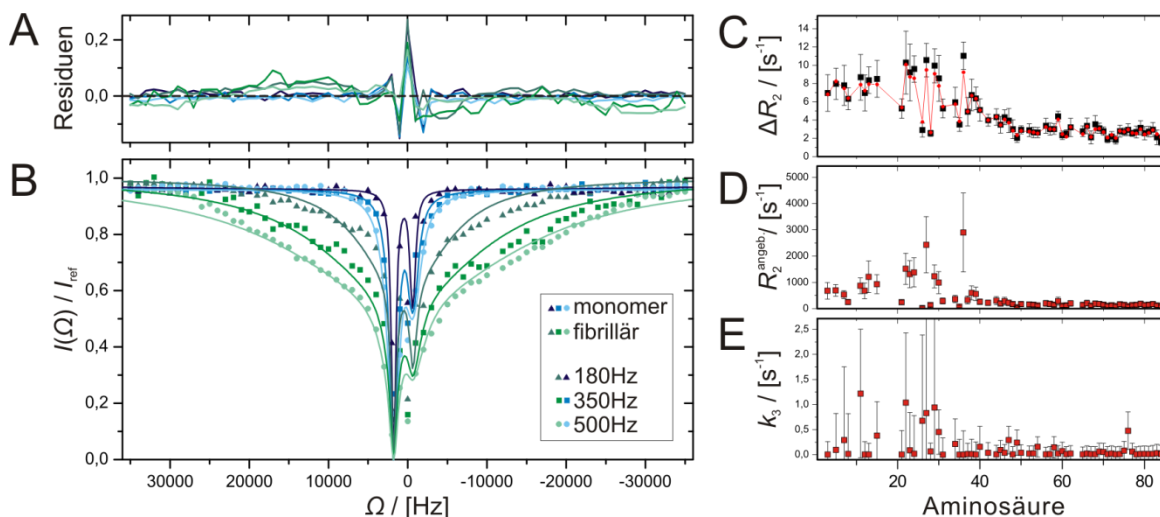


Abbildung 43: Untersuchung des Gleichgewichtes zwischen löslichem und fibrillärem PTH₁₋₈₄ mittels DEST-Effekt. A, B: Abschwächung des NMR-Signals durch Sättigungstransfer von Fibrillen auf die NMR-detektierbare Spezies. Die Abschwächung der integrierten Intensität der Amidprotonen (6,6-8,7ppm) in Abhängigkeit der Trägerfrequenz des eingestrahnten RF-Pulses ist für verschiedene Sättigungspulsstärken aufgetragen (180Hz helle Kreise, 350Hz mittlere Quadrate und 500Hz dunkle Dreiecke). Die Signalabschwächung ist in Gegenwart von Fibrillen (grün) deutlich stärker ausgeprägt als bei der Referenzprobe ohne Fibrillen (blau). Die Linien entsprechen den simulierten Kurven nach einer globalen Anpassung der McConnell-Gleichung für ein Zweizustandsmodell eines dipolar gekoppelten Zweispinsystems mit zwei verschiedenen $R_{2,\text{dark}}$ -Raten (Gleichung 2.30, S. 55). Es wurden folgende Parameter bestimmt: $k_{\text{on}}^{\text{app}} = 3,4 \pm 2,7 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 33 \pm 56 \text{ s}^{-1}$, $R_{2,\text{dark}1} = 350 \pm 1000 \text{ s}^{-1}$, $R_{2,\text{dark}2} = 16000 \pm 22000 \text{ s}^{-1}$. In (A) sind die Residuen (Messwerte - berechnete Werte) dargestellt. Die größten Abweichungen ergeben sich im Bereich der Resonanzfrequenz ($|\Omega| < 2 \text{ kHz}$) da die reale Sättigung durch die hohe Anzahl an Kernspins im Modell nicht gut repräsentiert ist. Aber auch in anderen Bereichen wird die Abschwächung leicht unter- bzw. überschätzt.

C-E: Eine detailliertere Analyse erfolgte durch die Bestimmung aminosäurespezifischer Sättigungskurven mittels ¹⁵N-DEST-Experimenten. Die Anpassung eines Dreizustandsmodells mit aminosäurespezifischen Raten (Abbildung 20D, S. 57) liefert neben globalen Parameter ($k_{\text{on}}^{\text{app}} = 4,9 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 0,8 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, $R_{2,\text{dark}2} = 5200 \pm 4200 \text{ s}^{-1}$) auch aminosäurespezifische Parameter: In C sind die simulierten ΔR_2 -Raten (rot) verglichen mit den experimentell bestimmten Werten (schwarz) dargestellt. Abbildung D zeigt die simulierten R_2 -Raten im „angebundenen“ Zustand und in E sind die Raten für den Übergang vom „angebundenen“ zum direkt gebundenem Zustand dargestellt. Die aminosäurespezifischen Parameter weisen auf ein unterschiedliches Verhalten der N-terminalen Aminosäuren S3-D30 verglichen mit den C-terminalen Abschnitt L41-Q84 hin.

Zusammenfassende Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PTH₁₋₈₄ unter verschiedenen Bedingungen in der Lage ist, Amyloidfibrillen zu bilden. Dabei wurde ein starker Einfluss der Peptidkonzentration, der Temperatur, der Salzkonzentration und des pH-Wertes auf die Kinetik der Fibrillierung festgestellt. Diese Parameter wirken sich jedoch nicht auf das resultierende Gleichgewicht aus Fibrillen und löslichem PTH₁₋₈₄ aus. Dies legt nahe, dass elektrostatische Wechselwirkungen zur Stabilisierung der Monomere beitragen, bei Fibrillen jedoch eine untergeordnete Rolle spielen. Die Fibrillen besitzen eine vergleichsweise geringe thermodynamische Stabilität sowie einen geringeren Anteil an β -Faltblattstruktur. Dies verhindert zwar die exakte Lokalisierung der β -Faltblattstruktur im Fibrillenkern mittels H/D-Austausch, ermöglicht aber die Untersuchung des Gleichgewichtszustandes.

In Gegenwart von Fibrillen ist die gemessene Diffusion deutlich verlangsamt. Dafür kommen im Wesentlichen drei Erklärungen in Frage: Zum einen besteht die Möglichkeit, dass bewegliche Anteile der fibrillären Peptide zum NMR-Signal beitragen. In diesem Fall wären aber unterschiedliche Beiträge für verschiedene spektrale Bereiche zu erwarten, was im Rahmen der Messunsicherheit nicht beobachtet werden konnte. Außerdem sollte statt einem monoexponentiellen Abfall der Signalintensität in Abhängigkeit von G^2 ein biexponentieller Zusammenhang zu beobachten sein.

Die zweite mögliche Erklärung wäre, dass das lösliche PTH₁₋₈₄ in Gegenwart von Amyloidfibrillen nicht ausschließlich als Monomer vorliegt. Der gemessene hydrodynamische Radius der frisch gelösten Probe mit $2,14 \pm 0,05$ nm liegt zwischen den theoretisch berechneten Werten für ein globuläres und ein entfaltetes Protein mit 84 Aminosäuren ($1,7 \pm 0,4$ nm, bzw. $2,8 \pm 1,4$ nm)^[292]. Es ist bekannt, dass der N-terminale Bereich L15-F34 unter ähnlichen Bedingungen eine α -helikale Struktur bildet^[62], das Peptid also teilweise strukturiert ist^[62]. Die Bildung von Oligomeren geht typischerweise mit deutlichen strukturellen Änderungen einher, entfaltete Oligomere erscheinen sehr unwahrscheinlich. Somit ist als Vergleich für den hydrodynamischen Radius in Gegenwart von Fibrillen die globuläre Version relevanter. Der Anstieg des apparenten hydrodynamischen Radius in Gegenwart von Fibrillen auf $3,1 \pm 0,2$ nm entspricht theoretisch einem globulären Protein mit 500 bis 800 Aminosäuren, liegt somit in der Größenordnung eines Hexamers bis Dekamers (Abbildung S12, S. XXXVIII). Die relativ geringen Änderungen der chemischen Verschiebung in den ¹H-¹⁵N-Korrelationsspektren impliziert, dass ein geringer Anteil der NMR-detektierbaren Spezies in Form eines

strukturierten Oligomers vorliegt. Um als Ursache für die langsamere Diffusion in Frage zu kommen, müssten die Oligomere daher noch deutlich größer sein, womit sie wahrscheinlich kein NMR-detektierbares Signal mehr besäßen. Es wurden auch keine solchen Oligomere bei TEM-Aufnahmen beobachtet. Mittels photoinduzierter Vernetzung konnten signifikante Dimer- und Trimeranteile in Gegenwart von Fibrillen (50 bzw. 9 % des löslichen PTH₁₋₈₄) nachgewiesen werden. Diese reichen jedoch nicht aus, um den Anstieg des Diffusionskoeffizienten zu erklären.

Als dritte Erklärung kommt eine transiente Bindung der Monomere an die Fibrillen in Frage. Die Diffusion dieser großen Strukturen ist im Vergleich zu der der Peptide vernachlässigbar, so dass in diesem Fall nur die Diffusion des ungebundenen Zustandes während einer effektiven Diffusionszeit Δ_{eff} berücksichtigt werden muss. Für die gemessenen Diffusionskoeffizienten ergibt sich $\Delta_{\text{eff}} = \frac{1}{2} \Delta = 50 \text{ ms}$. Für diese Erklärung spricht auch der Anstieg der transversalen Relaxationsrate für alle Aminosäuren.

Letztlich ist davon auszugehen, dass sowohl die Bildung kleiner Oligomere als auch eine transiente Bindung an die Fibrillen einen Beitrag zum gemessenen Diffusionskoeffizient liefert.

Die Änderung der chemischen Verschiebung und der Signalintensitäten in Gegenwart von Fibrillen zeigt, dass die Monomere auf einer intermediären bis schnellen NMR-Zeitskala in chemischem Austausch mit einer oder mehreren weiteren Spezies stehen. Als zweite Spezies kommen prinzipiell unterschiedlich strukturierte Monomere, Oligomere oder Amyloidfibrillen in Frage.

Für die Interaktion mit großen Spezies wie Amyloidfibrillen wird typischerweise keine Änderung der chemischen Verschiebungen beobachtet^[310,311,313], so dass diese vermutlich aus dem Austausch mit kleineren Spezies resultieren. Der gleichmäßige Anstieg der transversalen Relaxationsraten für alle Aminosäuren, unabhängig von der magnetischen Feldstärke (Abbildung S16, S. XLII) ist dagegen charakteristisch für den Austausch mit einer hochmolekularen Spezies, deren Linien wesentlich breiter sind als mögliche Änderungen der chemischen Verschiebung. Dies führt zu einem schnellen Abfall der transversalen Magnetisierung im gebundenen Zustand. In diesem Fall entspricht die maximale Änderung der R_2 -Rate der apparenten Assoziationsrate $k_{\text{on}}^{\text{app}[310,311,313]}$. Für einen solchen Austausch spricht auch die Beobachtung eines Sättigungseffektes durch schwache Radiofrequenz-Pulse auch bei großem Abstand von der Resonanzfrequenz ($\Delta f > 20000 \text{ Hz}$) über den DEST-Effekt. Eine Abschätzung der Assoziationsrate durch die Änderung der

R_2 -Rate ist für dieses System aufgrund der Komplexität nicht direkt möglich, die Parameter aus der Anpassung der Modelle deuten auf Austausch der NMR-detektierbaren Spezies (Monomere, Dimere und Trimere) mit den Amyloidfibrillen auf einer Zeitskala von 1 bis 10s^{-1} hin. Die beobachteten Unterschiede zwischen den N-terminalen und C-terminalen Aminosäuren weisen darauf hin, dass der N-terminale Bereich eher direkt gebunden wird und möglicherweise die *Cross*- β -Struktur bildet. Dies steht im Einklang mit den Aggregationsvorhersagen und den Ergebnissen der limitierten Proteolyse^[45].

Ein solches dynamisches Gleichgewicht stellt einen Widerspruch zu der Vorstellung sehr robuster, thermisch stabiler Amyloidstrukturen dar. Es ist dennoch eine Grundvoraussetzung für die Sekretion der als Amyloidfibrillen gespeicherten Hormone und wurde bereits für andere amyloidbildende Hormone nachgewiesen^[46,336]. Aufgrund dieses dynamischen Gleichgewichtes zwischen den löslichen Formen und Amyloidfibrillen des PTH₁₋₈₄ stellen die Fibrillen eine ideale Speicherform des Hormons dar.

3.3 Untersuchungen an A β ₁₋₄₀

3.3.1 Interaktion von Cyclophilin D mit A β ₁₋₄₀

Die Wechselwirkung zwischen Cyclophilin D (CypD) und A β und ihr Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf der Alzheimer Krankheit wurden bereits nachgewiesen^[162-167]. Diese Interaktion soll nun detaillierter charakterisiert werden. Zunächst wurde der Einfluss von CypD auf die Kinetik der Fibrillierung von A β ₁₋₄₀ untersucht^[169]. Als Maß für die Bildung von Amyloidfibrillen wurde dabei die Fluoreszenzausbeute von ThT verwendet, zusätzlich wurden die Proben mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Bereits eine substöchiometrische Menge CypD (1:25 CypD:A β ₁₋₄₀) bewirkt eine vollständige Unterdrückung der Bildung von Fibrillen für mindestens 90 Stunden (Abbildung 44A,E). Es ist somit von einer transienten Bindung von A β ₁₋₄₀ an CypD auszugehen. Die Anwesenheit von CypD wirkt sich im Wesentlichen auf die *Lag*-Zeit der Fibrillenbildung aus, was charakteristisch für eine Unterdrückung der primären Nukleation ist^[337]. Dieser Effekt ist reversibel, die Zugabe von MM258 oder Cyclosporin A, welche am aktiven Zentrum von Cyclophilinen binden, inhibiert die Wirkung von CypD, so dass die Bildung von Fibrillen wieder erfolgt. Diese kompetitive Wirkung stellt ein erstes Indiz für das aktive Zentrum von CypD als Bindungsstelle von A β ₁₋₄₀ dar.

Bei der Interaktion von CypD und A β ₁₋₄₀ werden sowohl Änderungen der chemischen Verschiebung als auch der Signalintensitäten der Kreuzsignale beobachtet (Abbildung S3, S4 S. XXIII bzw. Abb. 45). Sie liegt somit für nahezu alle Kreuzsignale im Bereich des intermediären Austausches auf der NMR-Zeitskala. Solcher Austausch ist schwer zu quantifizieren, zudem aufgrund der Löslichkeit beider Komponenten keine vollständige Population des gebundenen Zustandes möglich ist. Die zusätzliche Zugabe von MM258 bewirkt eine nahezu vollständige Wiederherstellung der Signalintensitäten und Positionen (Abbildung 45C, D). Dies gilt als zweites Indiz für die kompetitive Wirkung des Inhibitors MM258 und somit für die Bindung von A β ₁₋₄₀ im aktiven Zentrum. Im Rahmen meiner Diplomarbeit^[170] konnte ich bereits zeigen, dass alle sich bei Zugabe von A β ₁₋₄₀ verändernden Kreuzsignale von CypD in dessen aktivem Zentrum liegen (Abbildung S4, S. XXVII). Das aktive Zentrum stellt also eindeutig die Bindungsstelle für A β ₁₋₄₀ dar.

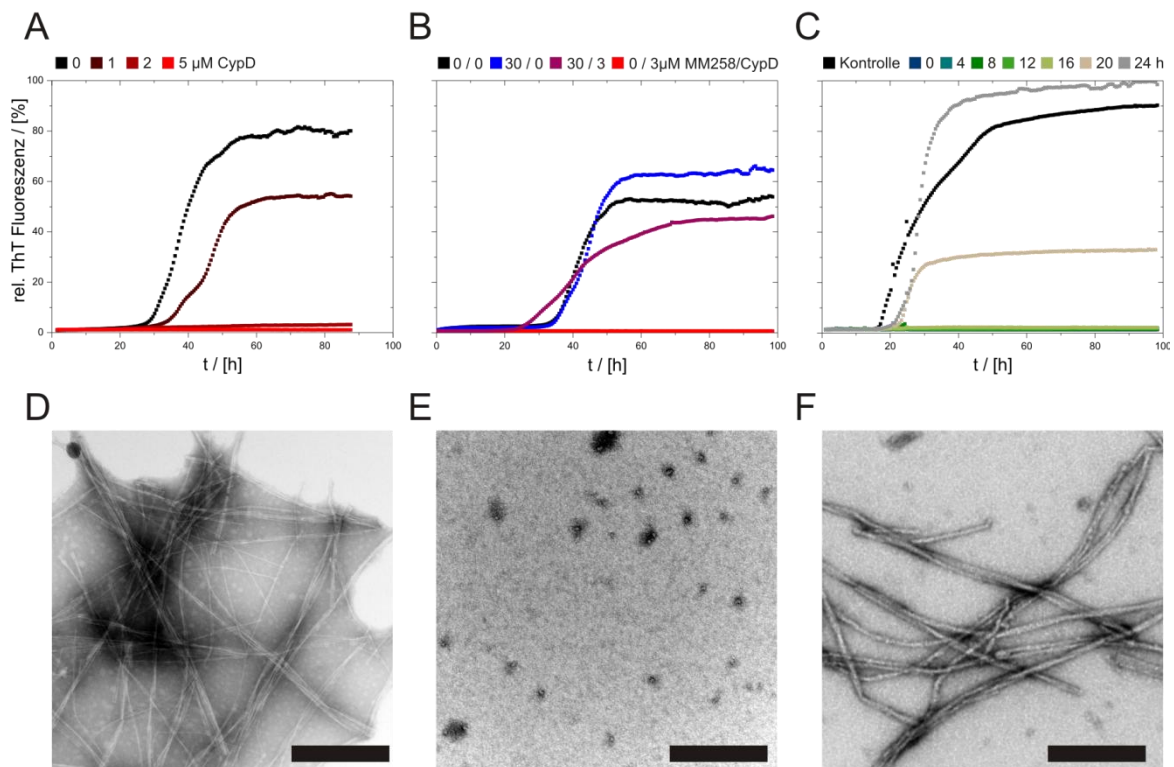


Abbildung 44: Einfluss von CypD auf die Fibrillierung von A β ₁₋₄₀.

A-C: ThT basierte Messungen der Fibrillierungskinetik von A β ₁₋₄₀ (50 μ M). A: Die Gegenwart von CypD in einem molaren Verhältnis von 1:25 (CypD:A β ₁₋₄₀) verlangsamt die Fibrillierung (dunkelrote Kurve) im Vergleich zur Kontrollmessung in Abwesenheit von CypD (schwarz). Ab einem Verhältnis von 1:10 bzw. 1:16 wird die Fibrillierung für mindestens 90 Stunden vollständig unterdrückt (weinrote und rote Kurve in A bzw. rote Kurve in B). B: Die Zugabe von MM258 (violette Kurve) zu A β ₁₋₄₀/CypD inhibiert die Wirkung von CypD. Alleinige Zugabe von MM258 hat keinen signifikanten Einfluss (blaue Kurve) auf die Fibrillierungskinetik. C: Verzögerte Zugabe von CypD in einem Verhältnis von 1:10 unterdrückt die Fibrillierung bei Zugabe bis maximal 16 h nach Start der Fibrillierung (grüne Kurven). Spätere Zugabe hat keinen nennenswerten Einfluss (ocker und grau). Alle Messungen erfolgten in 35 mM HEPES, pH 7,8, 10 mM Natriumazid, 1 % DMSO, 20 μ M ThT, 37 °C, doppelt-orbitales Schütteln alle 30 min für 10 s.

D-F: TEM Aufnahmen von A β ₁₋₄₀ (D) alleine und in Gegenwart von CypD (E) bzw. CypD und MM258 (F). Die Fibrillierungsbedingungen entsprechen den in B gezeigten Kurven, die Probenentnahme erfolgte nach 80 h. Die Maßstabsskala entspricht 100 μ m. Die Messungen wurden von Marten Villmow (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) durchgeführt.

Die Fibrillierung kann jedoch nur unterdrückt werden, wenn die Cyclophilin-Zugabe spätestens 16 Stunden nach Start der Fibrillierung erfolgt (Abb. 44C). Dies legt nahe, dass CypD ausschließlich mit Monomeren oder Aggregaten interagiert, die sich zu Beginn der Fibrillierung bilden. Mittels photoinduzierter Vernetzung (PICUP kombiniert mit SDS-PAGE und *Western Blot*) bzw. Größenausschlusschromatographie konnte gezeigt werden, dass es bei der Fibrillierungsreaktion zunächst zur Bildung von Dimeren und Trimeren kommt, welche im weiteren Verlauf der Fibrillierungsreaktion durch große Aggregate ersetzt werden^[169]. In Anwesenheit von CypD wird die Bildung von Dimeren, Trimeren und großen Oligomeren ($n > 25$) unterdrückt. Allerdings bildet ein kleiner Teil des A β ₁₋₄₀ größere Oligomere (25-30 kDa)^[169]. Dieser konnte durch das PICUP-Experiment, nicht

aber mittels Größenausschlusschromatographie, nachgewiesen werden und der Anteil wird dabei möglicherweise überschätzt.

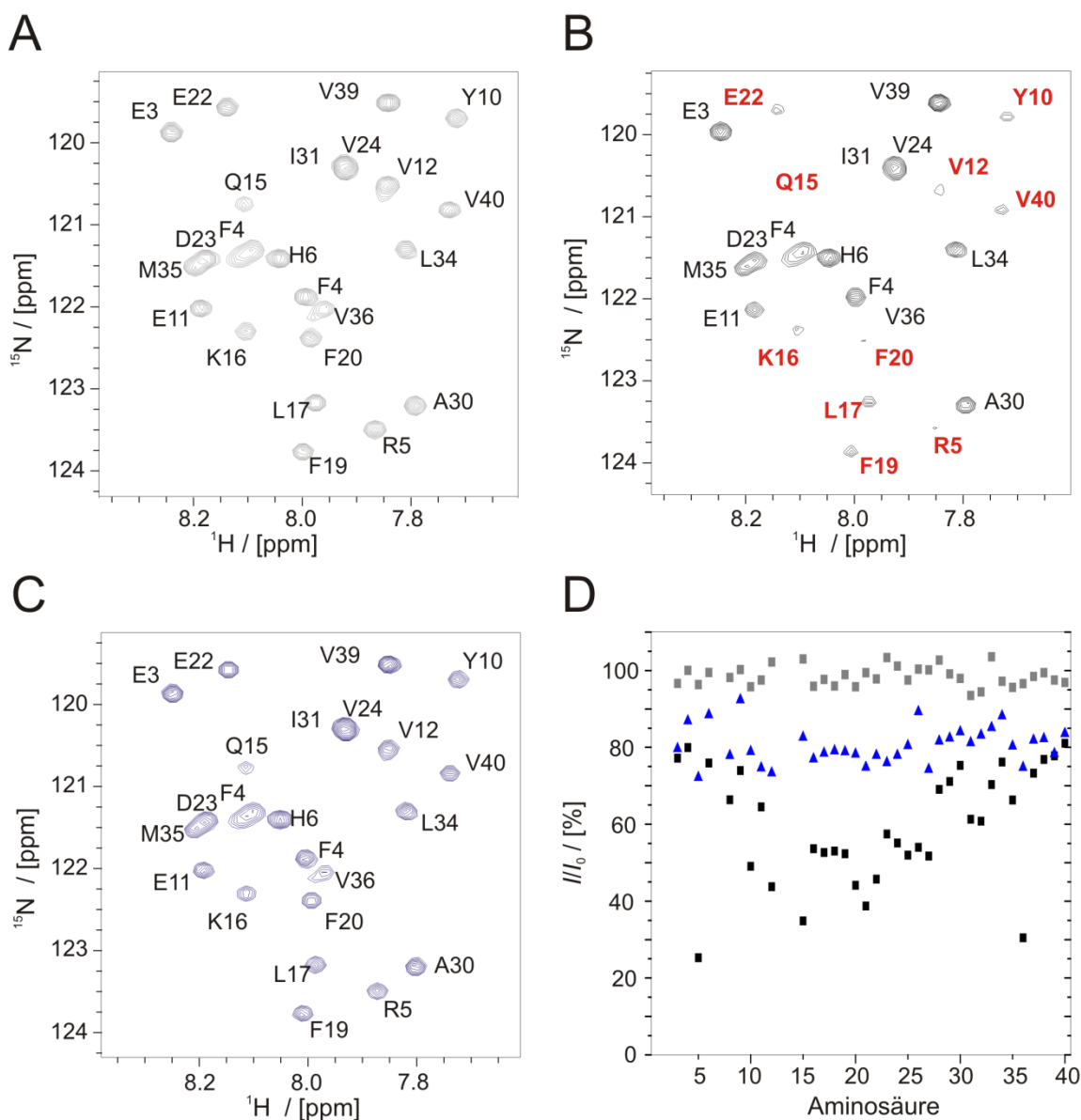


Abbildung 45: MM258 Bindung an CypD stellt die reduzierten Signalintensitäten der A β ₁₋₄₀-Kreuzsignale wieder her. A-C: Detailansicht der ¹H-¹⁵N-fHSQC Spektren von ¹⁵N markiertem A β ₁₋₄₀ in Abwesenheit von CypD (A), in Gegenwart von CypD (B) bzw. CypD/MM258 (C). D: Intensitäten der A β ₁₋₄₀-Kreuzsignale in Gegenwart von CypD (schwarze) bzw. CypD/MM258 (blau) verglichen mit den Kreuzsignal-Intensitäten von A β ₁₋₄₀ ohne Interaktionspartner (grau). Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 8 °C. Da MM258 schlecht wasserlöslich ist, wurde es in Ethanol gelöst. Alle Proben enthielten daher 1 % Ethanol. Die Intensitäten wurden auf ein Referenzspektrum ohne Ethanol normiert.

Um zu überprüfen, ob es sich dabei um *on-* oder *off-pathway* Intermediate handelt, wurde Cyclophilin zeitverzögert mit MM258 inhibiert. Eine längere Inkubation mit CypD bewirkt dabei eine leicht steigende *Lag-Zeit* (gemessen ab Beginn der MM258-Zugabe) (Abbildung S6, S. XXVIII)^[169]. Somit kann die Bildung von *on-pathway* Intermediaten in Gegenwart von CypD ausgeschlossen werden, es muss sich um *off-pathway* Intermediate

handeln. Diese können nicht stark populiert sein, da sonst der Einfluss auf die *Lag*-Phase und die Änderung der chemischen Verschiebung von A β ₁₋₄₀ in Gegenwart von CypD stärker ausfallen müssten (Abbildung S3, S. XXIII). Beide Spektren sind jedoch charakteristisch für ein überwiegend monomeres, unstrukturiertes Peptid. Signifikante Änderungen ($\Delta\delta > 0,015$ ppm) der ¹H-¹⁵N-chemischen Verschiebungen wurden für die Aminosäuren Y10, K16, L17, V18, A21, I32 and G33 festgestellt. Außerdem kommt es zu einer starken Abnahme der Signalintensität ($I/I_0 < 25\%$) für die zentralen Aminosäuren L17-E22. Zusammenhängende Bereiche mit starken Änderungen sind wahrscheinlich auf chemischen Austausch zwischen A β ₁₋₄₀ und CypD zurückzuführen und markieren die Interaktionsstelle. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die kompetitive Wirkung von CsA und MM258 sowie durch *Peptide Spot*-Experimente belegt^[169].

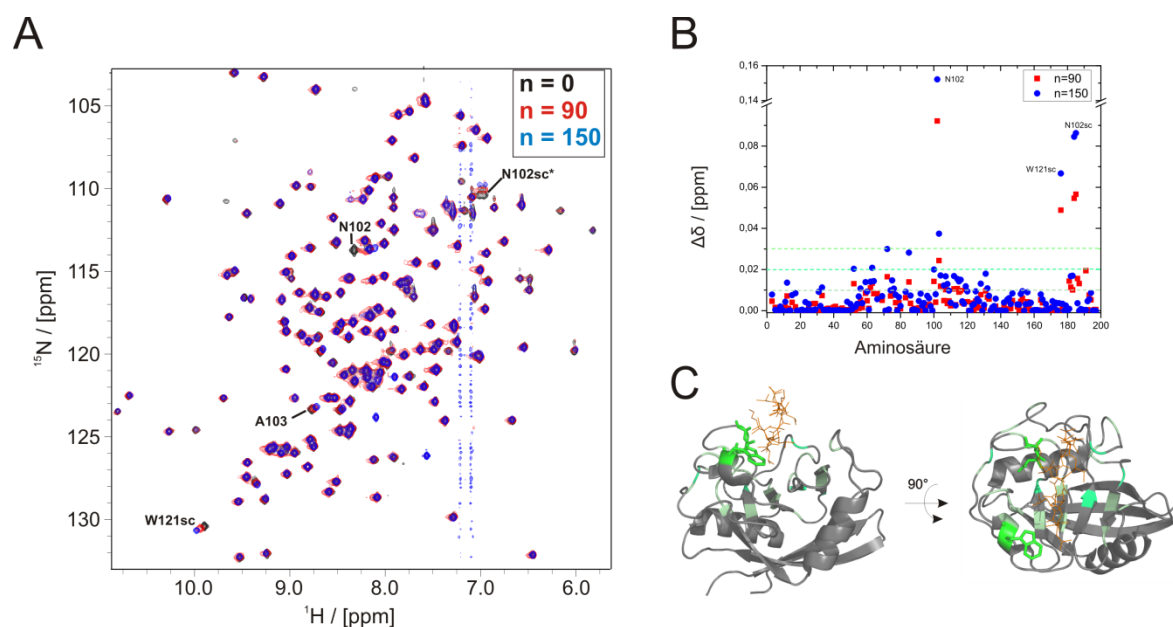


Abbildung 46: Interaktion von CypD mit A β ₁₆₋₂₀ (KLVFF). A: ¹H-¹⁵N-Korrelationsspektrum von 50 μ M CypD (schwarz) und in Gegenwart eines 90fachen (rot) bzw. 150fachen (blau) molarem Überschuss von KLVFF. Die Messung erfolgte in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 25 °C. B: Änderung der chemischen Verschiebung der Kreuzsignale von CypD in Anwesenheit von 90fachem (blau) bzw. 150fachem (rot) molarem Überschuss von A β ₁₋₄₀. Die grünen unterbrochenen Linien markieren Änderungen von 0,01 ppm bzw. 0,02 ppm bzw. 0,03 ppm. Die zugehörigen Aminosäuren sind in der Kristallstruktur von CypD in den entsprechenden Grüntönen hervorgehoben (C). Diese Aminosäuren liegen alle im aktiven Zentrum von CypD, welches durch die Position der Bindung von Cyclosporin A (orange) gekennzeichnet ist.

Zur weiteren Verifizierung wurde die Interaktion von A β ₁₆₋₂₀ (KLVFF) mit CypD untersucht. Die größten Änderungen der chemischen Verschiebung der ¹H- und ¹⁵N-Kerne befinden sich wie für A β ₁₋₄₀ im aktiven Zentrum von CypD (Abbildung 46). Bei dieser Titration konnte kein Sättigungseffekt beobachtet werden, stattdessen führt weitere Erhöhung der KLVFF-Menge über 5 mg/ml (7,5 mM bzw. 1:150 CypD:KLVFF) nahezu zur Wiederherstellung der ursprünglichen chemischen Verschiebungen. Die Ursache ist

eine Abnahme des löslichen KLVFF durch die Bildung von Amyloidfibrillen (Abbildung S7, S. XXIX). Die Interaktion erfolgt also zwischen dem aktiven Zentrum von CypD und monomeren oder kleinen oligomeren Zuständen von KLVFF. Übereinstimmend dazu konnte die Interaktion mittels isothermer Titrationskalorimetrie sowie eine reversible Inhibierung der PPIase Aktivität von CypD durch KLVFF nachgewiesen werden^[169].

Um die Interaktion zwischen CypD und A β ₁₋₄₀ weiter zu charakterisieren, wurden die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffkerne im Peptidrückgrat von A β ₁₋₄₀ untersucht (Abbildung S5, S. XXVIII). Eine Veränderung dieser chemischen Verschiebungen zu kleineren Werten wird mit einem Verlust von α -helikalen Anteilen oder einer Erhöhung von β -Faltblatt Anteilen assoziiert. Diese strukturellen Änderungen sind charakteristisch für die Bildung von amyloiden Strukturen. Die Änderung der chemischen Verschiebungen der C α -Kerne ergibt ein heterogenes Bild mit lediglich einem zusammenhängenden Abschnitt mit erhöhten Werten von I31 bis M35. Die wesentlich kleineren Änderungen der chemischen Verschiebungen der Carboxyliere zeigen in Gegenwart von CypD höhere Werte für V18-E22 und G29 bis V39 und kleinere Werte für Q15-L18 sowie D23-K28. Dies stellt ein weiteres Indiz dafür dar, dass CypD einen Einfluss auf die Struktur von A β ₁₋₄₀ ausübt.

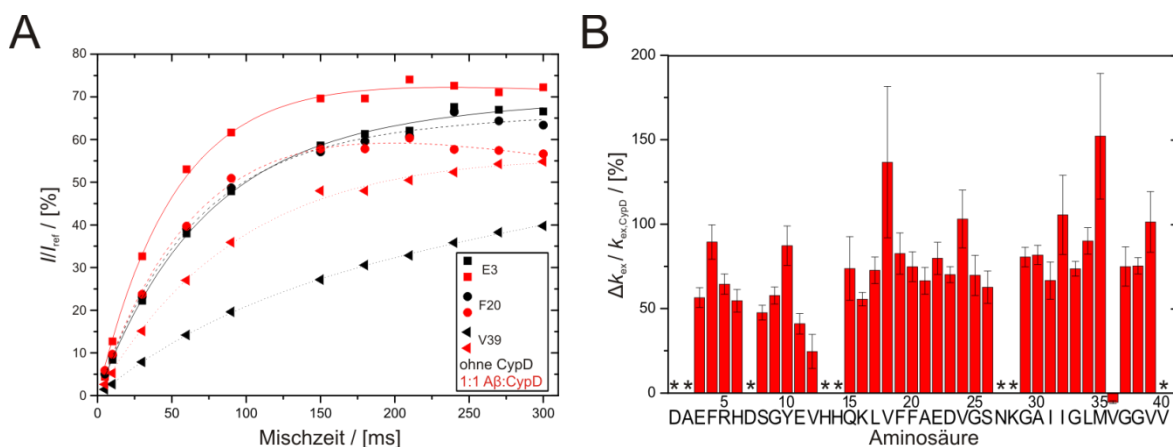


Abbildung 47: CypD beschleunigt den Amidprotonenaustausch von A β ₁₋₄₀.

A: Bestimmung der Amidprotonenaustauschraten k_{ex} . Die Austauschkurven zeigen exemplarisch die Zunahme der Signalintensität mit zunehmender Mischzeit für E3 (Quadrate), F20 (Kreise) und V39 (Dreiecke) in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit (rot) von CypD mit einem molaren Verhältnis von 1:1 (CypD:A β ₁₋₄₀). Die Linien stellen die jeweils besten Regressionsergebnisse bei Anpassung von Gleichung (2.17) an die Messwerte dar.

B: Relativer Unterschied der Amidprotonenaustauschraten in Abwesenheit verglichen mit den entsprechenden Raten in Gegenwart von CypD ($k_{ex,CypD}-k_{ex}$)/ $k_{ex,CypD}$. In Abbildung S8 (S. XXIX) sind die absoluten Werte und absoluten Änderungen der Austauschraten $k_{ex,CypD}-k_{ex}$ dargestellt. Sternchen kennzeichnen nicht detektierbare Aminosäuren bzw. Aminosäuren für welche keine Anpassung nach Gleichung (2.17) möglich war.

Außerdem wurden die Amidprotonenaustauschraten von A β ₁₋₄₀ in Abwesenheit und Gegenwart von CypD mittels newMEXICO bestimmt. Der Aufbau der messbaren

Magnetisierung mit zunehmender Mischzeit erfolgt dabei in Gegenwart von CypD überraschenderweise deutlich schneller (Abbildung 47A, exemplarisch für E3, F20 und V39). Dies spiegelt sich auch in den quantifizierten Austauschraten wieder, welche für alle Aminosäuren im Mittel um 75 % erhöht sind (Abbildung 47B) und widerspricht dem üblichen schützenden Effekt durch eine Substratbindung. Eine mögliche Erklärung ist, dass CypD das Gleichgewicht von einem lösungsmittelunzugänglichen Zustand (beispielsweise Oligomeren oder partiell strukturierten Monomeren) zu einem lösungsmittelzugänglicheren Zustand verschiebt. Ebenso könnten auch die Assoziations- und Dissoziationsrate gleichermaßen durch die CypD-A β 1-40-Interaktion beeinflusst werden, also „dynamischere“ Oligomere selektiert werden. Die von Fawzi *et al.*^[310] unter ähnlichen Bedingungen bestimmte Assoziations- und Dissoziationsrate von Monomeren zu Oligomeren liegen mit 3 s^{-1} und 73 s^{-1} in der gleichen Größenordnung wie der Amidprotonenaustausch mit Austauschraten zwischen 5 s^{-1} und 150 s^{-1} (Abbildung S8A, S. XXIX). Um dies zu überprüfen, wurde der Austauschmechanismus durch Variation des pH-Wertes untersucht (Abbildung S9, S. XXX). Die Resonanzzuordnung konnte mittels pH-Titration für 83 % bzw. 75 % der Aminosäuren (pH 6,8 bzw. 8,8) eindeutig übertragen werden. Die Erhöhung des pH-Wertes führt in Abwesenheit von CypD im Mittel zu einer Erhöhung der Austauschraten um das Fünffache (pH 6,8 auf pH 7,8) bzw. das Vierfache (pH 7,8 auf pH 8,8). In Gegenwart von CypD ist eine mittlere Erhöhung um das Achtfache (pH 6,8 auf pH 7,8) bzw. eine Verdoppelung (pH 7,8 auf pH 8,8) zu beobachten. Diese Erhöhung der Austauschraten weist von pH 6,8 auf pH 7,8 eine starke Abhängigkeit von der Aminosäure auf, während von pH 7,8 auf pH 8,8 ein gleichmäßigerer Effekt für alle Aminosäuren beobachtet wurde. Diese Ergebnisse implizieren, dass der Übergang zwischen EX1- und EX2-Mechanismus für die meisten Aminosäuren in der Umgebung von pH 7,8 liegt, wobei die exakte Position auch durch die jeweiligen intrinsischen Austauschraten beeinflusst wird und somit aminosäurespezifisch ist (Abbildung S9D, S. XXIX). Der EX1 Beitrag zur Amidprotonenaustauschrate bewirkt einen Anstieg der messbaren Austauschraten mit zunehmender Dissoziationsrate, während die Assoziationsrate keinen signifikanten Einfluss hat (Abbildung S9C, S. XXIX). Die Gegenwart von CypD führt also zu einer Erhöhung der Dissoziationsrate. Dieses Ergebnis wird durch Größenausschlusschromatografie und PICUP-Experimente unterstützt^[169].

Zusammenfassende Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, dass CypD die Fibrillierung von A β ₁₋₄₀ bereits unter substöchiometrischen Konzentrationen unterdrückt. Die Interaktion erfolgt dabei mit Spezies, welche sich zu Beginn der Fibrillierungsreaktion bilden, also Monomeren oder kleinen Oligomeren. Du *et al.* wiesen für CypD sogar eine deutlich höhere Affinität zu Oligomeren als zu Monomeren nach^[163]. Die Bindungsstöchiometrie oder die exakte Größe der Oligomere wurde nicht bestimmt. Sie besitzen einen Durchmesser von 15 bis 20 nm^[338], womit Trimere bis 100mere assoziiert werden^[19,20,339-341]. Wir haben vier unabhängige Beobachtungen, welche implizieren, dass der Haupteffekt von CypD die Disaggregation oligomerer Spezies darstellt: Die photochemische Vernetzung und Größenausschlusschromatografie zeigten eine Abnahme von Dimeren und Trimeren in Gegenwart von CypD^[169]. Die verzögerte Zugabe eines Inhibitors zu einem Fibrillierungsansatz mit A β ₁₋₄₀/CypD führte nicht zu geringeren *Lag*-Zeiten, was gegen die Anwesenheit von *on-pathway*-Intermediaten spricht^[169]. Zuletzt beschleunigt die Gegenwart von CypD den Amidprotonenaustausch in A β ₁₋₄₀, was nur durch erhöhte Dissoziationsraten erklärt werden kann. Es muss sich daher um eine hochdynamische, transiente Interaktion handeln.

Die Interaktionsstelle beinhaltet die Aminosäuren K16-E22 von A β ₁₋₄₀, welche typischerweise dem Fibrillenkern zugeschrieben werden^[82,83,86,116,259,265,327-330]. Dieser Bereich stellt auch ein typisches Ziel bekannter Inhibitoren des Fibrillierungsprozesses dar^[342-347]. Die Bindung von A β ₁₋₄₀ konnte im aktiven Zentrum der Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerisierung lokalisiert werden. Ähnliche Effekte anderer PPIasen auf Aggregationsreaktionen verschiedener amyloidogener Proteine sind bekannt^[348-350]. Dies ist insbesondere von Interesse, da in der Aminosäuresequenz von A β ₁₋₄₀ kein Prolin enthalten ist. Allerdings können ratenlimitierende konformationelle Änderungen auch für andere Aminosäuren auftreten, so dass auch hier eine *cis/trans*-Isomerisierung eine Rolle spielen mag^[351,352]. Allerdings konnte für RNase T1 P39A keine katalytische Aktivität von Cyclophilinen auf Prolylbindungen nachgewiesen werden^[353] und die Varianten CypA R55A bzw. CypD R97A sind trotz sehr geringer PPIase Aktivität in der Lage, die Bildung von Amyloidfibrillen zu unterdrücken^[169].

Obwohl *in vitro* für CypA und CypD ähnliche Effekte nachgewiesen wurden^[169], sind die Beobachtungen *in vivo* gegensätzlich: CypA übt eine schützende Wirkung aus^[354,355] während die Interaktion von A β mit CypD mit pathophysiologischen Prozessen assoziiert

wird^[140,163,164]. Diese Unterschiede konnten nicht auf unterschiedliche Bindungsmechanismen oder die Bildung verschiedenartiger Aggregate in Gegenwart der Cyclophiline zurückgeführt werden^[169]. Die beiden Cyclophiline sind allerdings auch in unterschiedlichen chemischen Umgebungen zu finden: Das infolge von Entzündungsprozessen und oxidativem Stress ausgeschüttete CypA liegt in hoher Konzentration im extrazellulären Raum vor^[356]. Die schützende Wirkung erfolgt dort über verschiedene molekulare Signalwege^[354]. CypD dagegen ist in den Mitochondrien lokalisiert und in zahlreiche physiologische Wechselwirkungen involviert^[139]. Die Wechselwirkung mit A β führt zu Störungen des axonalen Transports und Ca²⁺ induzierter Schwellung der Mitochondrien^[140,163,164]. Die Inhibierung von CypD durch CsA besitzt dagegen *in vitro* entgegengesetzte Wirkung^[164]. *In vivo* ist kein Einfluss von CsA auf den Verlauf der Alzheimer Krankheit zu erwarten, da CsA die Blut-Hirn-Schranke normalerweise nicht überwinden kann^[357]. Dennoch wären in Folge eines Mangels an CypD durch die Inhibierung mit A β ähnliche Effekte zu erwarten. Dies legt nahe, dass die pathophysiologischen Prozesse nicht ausschließlich durch einen Mangel an CypD verursacht werden, wahrscheinlicher ist die Stabilisierung toxischer A β -Spezies durch CypD.

3.3.2 Varianten von A β ₁₋₄₀

Neben dem Einfluss unterschiedlicher chemischer Umgebungen auf den Fibrillierungsprozess wurde auch die Auswirkung von Punktmutationen untersucht. Als Ziel wurden die Aminosäuren Phenylalanin 19 und Leucin 34 ausgewählt, welche einen hydrophoben Kontakt in der Fibrillenstruktur ausbilden sollen^[82,84,86,128,129]. Zunächst wurde dafür die kodierende DNA mittels QuikChange Polymerasekettenreaktion erzeugt (s. S. 21 f.) und das Produkt mittels DNA-Sequenzierung überprüft (Seqlab GmbH, Göttingen). Nach der Transformation in *E. coli* RV308 Zellen wurde zunächst eine Testexpression durchgeführt, wobei sich für einige Varianten ein deutlich verringertes Expressionslevel verglichen mit A β ₁₋₄₀ Wildtyp zeigt (Abbildung 48A). Die Reinigung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1 (S. 22 ff.) beschrieben. Die Ausbeute lag bei 0,1 bis 0,3 mg lyophilisiertes Peptid pro Liter Kulturmedium.

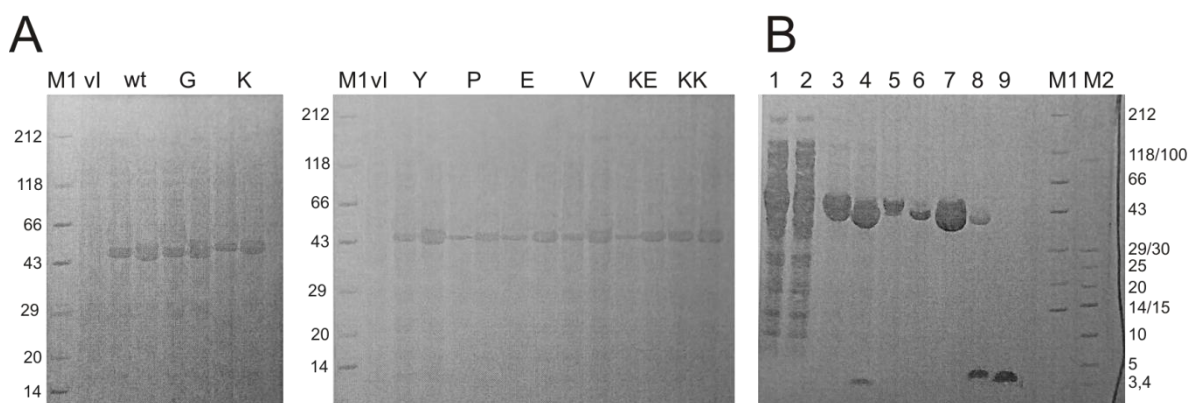


Abbildung 48: SDS-PAGE Analyse während der Herstellung der Varianten von A β ₁₋₄₀.

A: Expressionstest für alle Varianten von A β ₁₋₄₀. vI: Vor der Induktion der Proteinexpression, wt: Wildtyp, G: F19G, K: F19K Y: F19Y, P: F19P, E: F19E, V: F19V, KE: F19K L34E, KK: F19K L34K. Die Expression erfolgte jeweils für 2,5 (erste Spur pro Variante) und 4 Stunden (zweite Spur pro Variante).

B: Exemplarischer Reinigungsverlauf für A β ₁₋₄₀ wt. 1: Zellysate, 2: Durchlauf der Amylose-Affinitätschromatografie, 3,5: Elutionsfraktion der Amylose-Affinitätschromatografie, 4,6: Elutionsfraktion der Amylose-Affinitätschromatografie nach TEV-Spaltung, 7: Elutionsfraktion der Nickel-Affinitätschromatografie, 8: Durchlauf der Nickel-Affinitätschromatografie, 8: Elutionsfraktion der Reverse Phase Chromatografie.

M1: Roti® Mark Standard M2: Page Ruler™ Low Range Protein Ladder. Seitlich sind die entsprechenden Größen in kDa angegeben.

Der Einfluss von acht Varianten wurde bereits untersucht^[130]. Die Mutationen dienen dazu, den Einfluss struktureller Flexibilität (F19G und F19P), elektrostatischer Wechselwirkungen (F19K, F19E, F19K L34E und F19K L34K) sowie des Wasserstoffbrückennetzwerkes (F19Y, F19W) auf die Bildung von Amyloidfibrillen zu bestimmen. Während Unterschiede in den kinetische Parametern der Fibrillenbildung (Ref.^[130] bzw. Abbildung 49A) beobachtet wurden, hatten sieben der acht Varianten keinen Einfluss auf die Bildung von Fibrillen und deren Morphologie. Mittels Festkörper-NMR

konnten charakteristische lokale Änderungen der Struktur und Dynamik festgestellt werden. Dies zeigt, dass der Mechanismus der Fibrillierung sehr stabil gegen lokale Änderungen der Aminosäuresequenz ist. Es erscheint fraglich, ob diese kleinen Änderungen signifikante Auswirkungen auf die Amidprotonenaustauschraten in den Fibrillen hätten. Aus diesem Grund und aufgrund der geringen Ausbeute bei der rekombinanten Herstellung von A β ₁₋₄₀ wurde auf diese Untersuchung verzichtet.

Wesentlich interessanter erscheint die Frage nach der Ursache der unterschiedlichen kinetischen Parameter. Die Bildung der Fibrillen wird als nukleationsabhängige Reaktion betrachtet, wobei die primäre Nukleation einen geschwindigkeitslimitierenden Schritt darstellt. A β liegt zu Beginn der Fibrillierung als überwiegend unstrukturiertes Peptid vor. Möglicherweise bewirken die Punktmutationen eine Stabilisierung des intrinsisch entfalteten Peptides. Durch die energetisch günstigere Struktur der löslichen Peptide resultiert dann eine höhere Energiebarriere für die Bildung von Fibrillen. Insbesondere die Variante A β ₁₋₄₀ F19K L34E, für welche keine Bildung von Fibrillen beobachtet wurde, könnte durch eine zusätzliche Salzbrücke zwischen Lysin 19 und Glutaminsäure 34 stabilisiert werden.

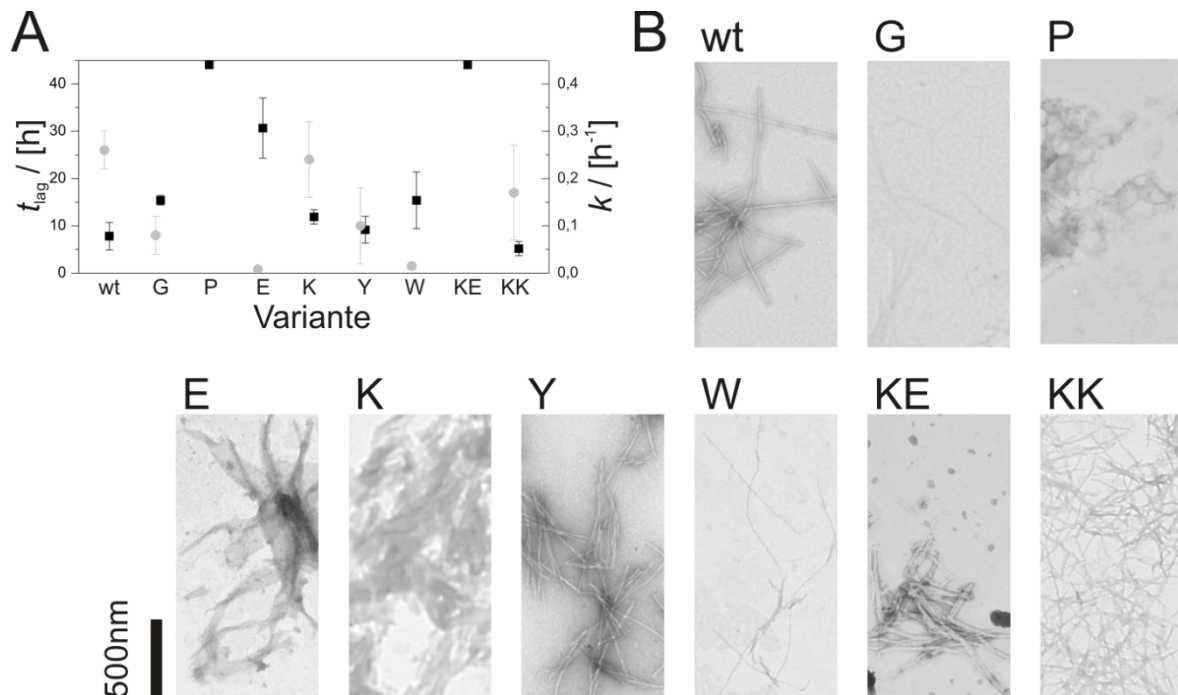


Abbildung 49: Einfluss der Varianten auf die Bildung von Amyloidfibrillen.

A: Geschwindigkeitskonstanten der Fibrillierungsreaktion: Elongationsgeschwindigkeit k (graue Kreise) und Lag-Phasen (schwarze Quadrate). Für A β ₁₋₄₀ F19P und F19K L34E konnte während der beobachteten Zeit kein signifikanter Anstieg der ThT-Fluoreszenz festgestellt werden. Die Messungen erfolgten bei 28 °C und 300 Upm. Die Messungen wurden von Bruno Voigt durchgeführt^[131].

B: TEM-Aufnahmen der gebildeten Aggregate. Die Präparation erfolgte nach 53 Stunden Inkubation bei 28 °C und 300 Upm. Die Maßstabsskala ist für alle Aufnahmen identisch. Die Abkürzungen entsprechen den untersuchten Varianten von A β ₁₋₄₀: wt: Wildtyp, G: F19G, K: F19K Y: F19Y, P: F19P, E: F19E, V: F19V, KE: F19K L34E, KK: F19K L34K.

Daher sollte der Einfluss der Mutationen auf frisch gelöstes A β untersucht werden. Alle Messungen erfolgten im Rahmen einer von mir betreuten Bachelor-Arbeit von Bruno Voigt^[131]. Alle Proben wurden wie auf Seite XX beschrieben präpariert. Zunächst erfolgte die Bestimmung der hydrodynamischen Radien der frisch gelösten Peptide mittels NMR (Abbildung 50A). Diese zeigen kleine Unterschiede, welche jedoch im Rahmen der Messunsicherheit nicht relevant erscheinen. Insbesondere sind die hydrodynamischen Radien für A β ₁₋₄₀ wt und A β ₁₋₄₀ F19K L34E mit $1,54 \pm 0,03$ nm und $1,56 \pm 0,02$ nm praktisch identisch. Auch die ¹H-¹⁵N-Korrelationsspektren (Abbildung S2, S. XXII) zeigen keine signifikanten Unterschiede der chemischen Verschiebungen und entsprechen überwiegend unstrukturierten Peptiden. Zusätzlich wurden die Amidprotonenaustauschraten für A β ₁₋₄₀ wt und A β ₁₋₄₀ F19K L34E bestimmt (Abbildung 50B), welche jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Allerdings konnte für rekombinant hergestellte Peptide ein geringer Anstieg der ThT-Fluoreszenzausbeute sowie einige filamentförmige Aggregate in den TEM-Aufnahmen beobachtet werden (Abbildung 49).

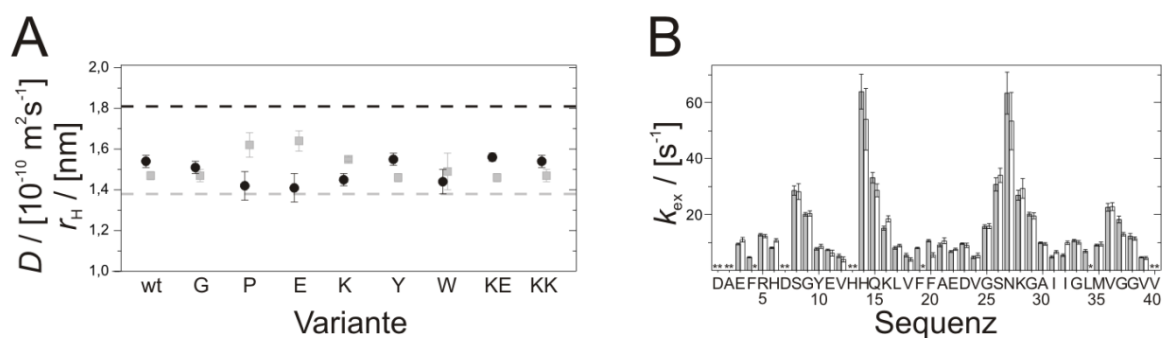


Abbildung 50: NMR-Untersuchungen an frisch gelöstem A β .

A: Diffusionskoeffizienten (graue Symbole) und hydrodynamische Radien (schwarze Symbole) der Varianten von A β ₁₋₄₀: wt: Wildtyp, G: F19G, K: F19K Y: F19Y, P: F19P, E: F19E, V: F19V, KE: F19K L34E, KK: F19K L34K. Die Bestimmung erfolgte bei 25 °C. Zusätzlich sind theoretisch berechnete hydrodynamische Radien für ein globuläres (graue unterbrochene Linie) und ein unstrukturiertes Peptid (schwarze unterbrochene Linie) mit einer Länge von 40 Aminosäuren eingezeichnet.

B: Amidprotonenaustauschraten von A β ₁₋₄₀ wt (grau) und A β ₁₋₄₀ F19K L34E (weiß) bei 8 °C und pH 7,4. Sterne markieren nicht zugeordnete Aminosäuren. Die Messungen wurden von Bruno Voigt durchgeführt^[131].

Zusammenfassende Diskussion

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss lokaler Änderungen auf die Eigenschaften der Monomere und die Bildung von Amyloidfibrillen untersucht. Hierzu wurden Varianten des A β ₁₋₄₀-Peptides mit Punktmutationen der Aminosäuren Phenylalanin 19 und Leucin 34 ausgewählt. Es konnte kein Einfluss dieser Mutationen auf die Diffusion, die chemischen Verschiebungen der ¹H und ¹⁵N-Kerne sowie der Amidprotonenaustauschraten der frisch gelösten Peptide festgestellt werden. Die hydrodynamischen Radien variieren zwischen 1,41 und 1,56 nm und liegen damit im Bereich der erwarteten hydrodynamischen Radien für ein Peptid mit 40 Aminosäuren von 1,38 ± 0,32 nm im globulär gefalteten und von 1,81 ± 0,88 nm im entfalteten Zustand^[244]. Es konnte keine Korrelation zwischen den hydrodynamischen Radien und den kinetischen Parametern der Fibrillenbildung der Varianten festgestellt werden. Die bei geringerer Peptidkonzentration (100 nM) mittels Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie bestimmten hydrodynamischen Radien^[191] dieser Varianten stimmen gut mit den mittels NMR bestimmten überein. Allerdings konnte eine Abnahme dieser Radien mit zunehmender Inkubationszeit beobachtet werden, was durch Ausbildung einer kompakteren Struktur der Peptide, wahrscheinlicher aber durch Dissoziation kleiner Oligomere begründet werden kann^[358]. Dimere und Trimere wurden unter nahezu identischen Bedingungen für A β ₁₋₄₀ wt mittels PICUP und Größenausschlusschromatografie nachgewiesen^[169].

Im Gegensatz zu bisherigen Studien^[130] wurden für alle untersuchten Varianten Anstiege der ThT-Fluoreszenz sowie filamentförmige Aggregate in den TEM-Aufnahmen beobachtet. Die Ursache hierfür stellt möglicherweise die unterschiedliche Temperatur während der Inkubation dar. In dieser Arbeit erfolgte die Inkubation bei 28 °C statt bei 37 °C. Eine höhere Temperatur begünstigt möglicherweise die Bildung kinetisch favorisierter *off-pathway* Intermediate und unterdrückt auf diese Weise die Bildung von Fibrillen.

Insgesamt erweist sich der Mechanismus der Fibrillenbildung als sehr stabil gegen lokale Änderungen. Diese Beobachtung gilt nicht nur für die hier untersuchten, sondern auch für verschiedene pathologisch relevante oder systematisch untersuchte Varianten von Amyloid β ^[115-127,318]. Die dominierende Wechselwirkung in der *Cross- β* -Struktur scheint auf das Proteinrückgrat zu entfallen, während lokale Wechselwirkungen oder Störungen dieser Wechselwirkungen durch die Seitenketten eine untergeordnete Rolle spielen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Amyloidfibrillen dreier Modellpeptide untersucht: Amyloid β , Serum Amyloid A und das Parathormon. Diese Peptide unterscheiden sich in ihrer Größe, der Aminosäuresequenz und der nativen Struktur, bilden aber dennoch Aggregate mit einem gemeinsamen Strukturmotiv: β -Faltblattstränge senkrecht zur Fibrillenachse. Auch der Stand der Forschung unterscheidet sich bei den untersuchten Peptiden stark, woraus sich jeweils unterschiedliche Fragestellungen ergaben.

Amyloid β wurde aufgrund seiner pathophysiologischen Bedeutung in Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit sehr eingehend untersucht. Hochaufgelöste strukturelle Untersuchungen sind allerdings nicht direkt an *in vivo* gebildeten Amyloidfibrillen möglich, so dass die bisherigen Studien vornehmlich an *in vitro* gebildeten Fibrillen durchgeführt wurden. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob signifikante Unterschiede zwischen diesen Spezies bestehen. Dafür wurden physiologische Fibrillierungsbedingungen durch Zerebrospinalflüssigkeit sowie durch ein Zellkulturmodell imitiert. Diese Fibrillen zeigen keine generischen Unterschiede zu rein *in vitro* gebildeten Fibrillen. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung einer pathophysiologisch relevanten ($pA\beta_{3-40}$) und designten ($A\beta_{1-40}$ F19* L34*) Varianten von $A\beta$. Die Ergebnisse zeigen, dass auch unstrukturierte Bereiche eine Rolle bei der Stabilisierung der Amyloidfibrillen spielen. Die Bildung von Fibrillen erfolgt allerdings aufgrund der dominierenden Wechselwirkungen des Peptidrückgrates unabhängig von lokalen Änderungen der Aminosäuresequenz. Im Gegensatz dazu besitzt die Interaktion mit Cyclophilinen einen starken Einfluss auf Bildung von Fibrillen. Bereits substöchiometrische Mengen von CypD unterdrücken die Fibrillierungsreaktion und beeinflussen das Gleichgewicht zwischen Monomeren und oligomeren Vorstufen.

Für SAA und PTH existieren kaum Studien zu ihren Amyloidfibrillen. Daher sollte für SAA1.1 zunächst die Kernstruktur der Fibrille bestimmt werden. Es wurde ein hoher Schutz von G1-G14 gegen Amidprotonenaustausch beobachtet. Dieser Bereich ist somit an der Bildung der *Cross*- β -Struktur beteiligt. Interessanterweise weisen die nicht-fibrillierende Varianten mSAA2.1 und 2.2 in diesem Bereich Punktmutationen auf (I6V, G7H, Q11L). Die Vermutung, dass diese Aminosäuren relevant für die Bildung von Amyloidfibrillen sind, liegt daher nahe.

Für PTH wurde von uns erstmals die Fibrillenbildung systematisch untersucht. Die physiologische Aufgabe von PTH ist die Regulierung des Calcium und Phosphatspiegels im Blut. Die beobachteten Eigenschaften der Amyloidfibrillen legen nahe, dass diese eine ideale Speicherform des Hormons darstellen. Zum einen ist die Bildung von Amyloidfibrillen stark abhängig von der Salzkonzentration und dem pH-Wert. Diese Untersuchungen könnten nun auf unterschiedliche Ionen (beispielsweise Calcium) ausgeweitet werden. Zudem wird ein dynamisches Gleichgewicht zwischen einer fibrillären Spezies, Monomeren und Dimeren beobachtet. Unabhängig von der Fibrillenkonzentration und den untersuchten Pufferbedingungen liegen im Gleichgewicht 75 μM lösliches PTH im schnellen Austausch mit den Fibrillen vor. Dies ermöglicht jederzeit eine Ausschüttung des Hormons aus den sekretorischen Granulae. Diese Hypothese müsste nun an histologischen Proben untersucht werden. Interessant wäre auch eine strukturelle Untersuchung der Dimere in Gegenwart der Fibrillen oder isoliert nach photoinduzierter Vernetzung mit dem Ziel die molekulare Organisation besser zu verstehen.

Die Bildung von Amyloidfibrillen ist somit sowohl in pathophysiologische Prozesse als auch in funktional relevanten Prozessen involviert. Ein vollständiges Verständnis dieses faszinierenden Prozesses und aller Einflussfaktoren wird wohl noch einige wissenschaftliche Studien erfordern. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass keine generischen Unterschiede zwischen *in vivo* und rein *in vitro* gebildeten Amyloidfibrillen. Somit ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse systematischer Untersuchungen an *in vitro* gebildeten Fibrillen durchaus physiologische Relevanz besitzen und neue Therapieansätze liefern könnten.

5 Abkürzungsverzeichnis

^{13}C	Kohlenstoffisotop
^{15}N	Stickstoffisotop
1D /2D/...nD	eindimensional/zweidimensional/... n-dimensional
AK	Alzheimer Krankheit
APP	Amyloid Vorläufer-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
$A\beta_{X-Y}$	Amyloid β (X-Y)
A_λ	Absorption bei der Wellenlänge λ
B	Magnetische Flussdichte
CD	Cirkulardichroismus
CsA	Cyclosporin A
CypA	Cyclophilin A
CypD	Cyclophilin D
D	Diffusionskoeffizient
d	deutert
D ₂ O	deutertes Wasser
(d ₆ -)DMSO	deutertes Dimethylsulfoxid
ddH ₂ O	doppelt entionisiertes Wasser
DEST	<i>Dark State Exchange Saturation Transfer</i>
dir. Dim.	direkte Dimension
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f. bzw. ff.	folgend bzw. folgende
FID	freier Induktionsabfall
g	Gramm bzw. Schwerebeschleunigung an der Erdoberfläche (9,81 m/s ²)
GdnHCl	Guanidiniumchlorid
h	Plancksches Wirkungsquantum
H/D-Austausch	Amidprotonenaustausch von Wasserstoff zu Deuterium

Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>His-Tag</i>	Hexahistidin-Tag
HSQC/fHSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence/fast HSQC</i>
I	Intensität
INEPT	<i>Insensitive Nuclei enhanced by polarization transfer</i>
IPTG	Iso-propyl-β-D-thiogalactopyranosid
J-Kopplung	skalare Kopplung
k_B	Boltzmann-Konstante
m/V	Massenkonzentration
M	molar = mol/l
MWCO	<i>Molecular Weight CutOff</i>
MRW	<i>mean residue weight</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , kernmagnetische Resonanzspektroskopie
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
P-Fibrillen	in Phosphatpuffer gebildete Fibrillen
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	pH-Wert
pI	isoelektrischer Punkt
PICUP	<i>PhotoInduced Crosslinking of Unmodified Proteins</i> , Photoinduzierte Vernetzung unmodifizierter Proteine
pE-modifiziert	pyroglutamatmodifiziert
PL	Protonierungslevel
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIase	Peptidyl-Prolyl Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> Isomerase
PTH	Parathormon
Ref.	Referenz
RF	Radiofrequenz
SAA	Serum Amyloid A

sc	Seitenkette
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i> , kleiner Ubiquitin-verwandter Modifikator
T	Temperatur
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
(d-)TFA	(deuterierte) Trifluoressigsäure
ThT	Thioflavin T
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TPPI	<i>Time-proportional phase increments</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
V/V	Volumenkonzentration
WATERGATE	<i>Water suppression by gradient tailored excitation</i>
wt	Wildtyp
ZK	Zellkultur
ZK-Fibrillen	aus einer Zellkultur extrahierte Fibrillen
ZSF	Zerebrospinalflüssigkeit
ZSF-Fibrillen	in Zerebrospinalflüssigkeit gebildete Fibrillen
γ	gyromagnetisches Verhältnis

6 Literaturnachweis

- [1] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, D. C. Phillips, *Nature* **1958**, *181*, 662-666.
- [2] C. Tesch-Römer, S. Wurm, E. Hoffmann, S. Menning, T. Schelhase, A. Saß, S. Wurm, T. Ziese, T. Lampert, L. E. Kroll, B. Schütz, S. M. List, S. Mardorf, A. Hokema, D. Sulmann, K. Böhm, M. Nöthen, *Gesundheit und Krankheit im Alter*, Statistisches Bundesamt, Deutsches Zentrum für Altersfragen, Robert-Koch-Institut, Berlin, **2009**.
- [3] S. Campioni, Monsellier, E. and Chiti, F., *Why Proteins Misfold in Protein Misfolding Diseases: Current and Emerging Principles and Therapies* - John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2010**.
- [4] D. N. Hebert, M. Molinari, *Physiol Rev* **2007**, *87*, 1377-1408.
- [5] P. J. Waters, *Curr Issues Mol Biol* **2001**, *3*, 57-65.
- [6] K. F. Winklhofer, J. Tatzelt, C. Haass, *EMBO J* **2008**, *27*, 336-349.
- [7] S. B. Prusiner, *Science* **1982**, *216*, 136-144.
- [8] M. Sunde, C. Blake, *Adv Protein Chem* **1997**, *50*, 123-159.
- [9] M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, C. C. Blake, *J Mol Biol* **1997**, *273*, 729-739.
- [10] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, *426*, 884-890.
- [11] C. M. Dobson, M. Karplus, *Curr Opin Struct Biol* **1999**, *9*, 92-101.
- [12] W. L. Klein, G. A. Krafft, C. E. Finch, *Trends Neurosci* **2001**, *24*, 219-224.
- [13] L. Mucke, E. Masliah, G. Q. Yu, M. Mallory, E. M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood, L. McConlogue, *J Neurosci* **2000**, *20*, 4050-4058.
- [14] Y. Gong, L. Chang, K. L. Viola, P. N. Lacor, M. P. Lambert, C. E. Finch, G. A. Krafft, W. L. Klein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 10417-10422.
- [15] Y. M. Kuo, M. R. Emmerling, C. Vigo-Pelfrey, T. C. Kasunic, J. B. Kirkpatrick, G. H. Murdoch, M. J. Ball, A. E. Roher, *J Biol Chem* **1996**, *271*, 4077-4081.
- [16] L. F. Lue, Y. M. Kuo, A. E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J. H. Kurth, R. E. Rydel, J. Rogers, *Am J Pathol* **1999**, *155*, 853-862.
- [17] C. A. McLean, R. A. Cherny, F. W. Fraser, S. J. Fuller, M. J. Smith, K. Beyreuther, A. I. Bush, C. L. Masters, *Ann Neurol* **1999**, *46*, 860-866.
- [18] S. Barghorn, V. Nimmrich, A. Striebinger, C. Krantz, P. Keller, B. Janson, M. Bahr, M. Schmidt, R. S. Bitner, J. Harlan, E. Barlow, U. Ebert, H. Hillen, *J Neurochem* **2005**, *95*, 834-847.
- [19] S. Chimon, M. A. Shaibat, C. R. Jones, D. C. Calero, B. Aizezi, Y. Ishii, *Nat Struct Mol Biol* **2007**, *14*, 1157-1164.
- [20] M. Hoshi, M. Sato, S. Matsumoto, A. Noguchi, K. Yasutake, N. Yoshida, K. Sato, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 6370-6375.
- [21] R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, *Science* **2003**, *300*, 486-489.
- [22] M. D. Kirkitadze, G. Bitan, D. B. Teplow, *J Neurosci Res* **2002**, *69*, 567-577.
- [23] M. Knobloch, M. Farinelli, U. Konietzko, R. M. Nitsch, I. M. Mansuy, *J Neurosci* **2007**, *27*, 7648-7653.
- [24] M. P. Lambert, A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft, W. L. Klein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 6448-6453.

- [25] G. M. Shankar, S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini, D. J. Selkoe, *Nat Med* **2008**, *14*, 837-842.
- [26] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condrón, D. B. Teplow, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 22364-22372.
- [27] M. Arrasate, S. Mitra, E. S. Schweitzer, M. R. Segal, S. Finkbeiner, *Nature* **2004**, *431*, 805-810.
- [28] M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson, M. Stefani, *Nature* **2002**, *416*, 507-511.
- [29] B. Caughey, P. T. Lansbury, *Annu Rev Neurosci* **2003**, *26*, 267-298.
- [30] K. M. Danzer, D. Haasen, A. R. Karow, S. Moussaud, M. Habeck, A. Giese, H. Kretschmar, B. Hengerer, M. Kostka, *J Neurosci* **2007**, *27*, 9220-9232.
- [31] B. L. Kagan, Y. Hirakura, R. Azimov, R. Azimova, *Brain Res Bull* **2001**, *56*, 281-284.
- [32] T. Takahashi, S. Kikuchi, S. Katada, Y. Nagai, M. Nishizawa, O. Onodera, *Hum Mol Genet* **2008**, *17*, 345-356.
- [33] B. Winner, R. Jappelli, S. K. Maji, P. A. Desplats, L. Boyer, S. Aigner, C. Hetzer, T. Loher, M. Vilar, S. Campioni, C. Tzitzilonis, A. Soragni, S. Jessberger, H. Mira, A. Consiglio, E. Pham, E. Masliah, F. H. Gage, R. Riek, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 4194-4199.
- [34] P. Desplats, H. J. Lee, E. J. Bae, C. Patrick, E. Rockenstein, L. Crews, B. Spencer, E. Masliah, S. J. Lee, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 13010-13015.
- [35] O. M. El-Agnaf, R. Jakes, M. D. Curran, D. Middleton, R. Ingenito, E. Bianchi, A. Pessi, D. Neill, A. Wallace, *FEBS Lett* **1998**, *440*, 71-75.
- [36] C. Hansen, E. Angot, A. L. Bergstrom, J. A. Steiner, L. Pieri, G. Paul, T. F. Outeiro, R. Melki, P. Kallunki, K. Fog, J. Y. Li, P. Brundin, *J Clin Invest* **2011**, *121*, 715-725.
- [37] S. Lesne, M. T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C. G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, K. H. Ashe, *Nature* **2006**, *440*, 352-357.
- [38] J. Y. Li, E. Englund, J. L. Holton, D. Soulet, P. Hagell, A. J. Lees, T. Lashley, N. P. Quinn, S. Rehn Crona, A. Bjorklund, H. Widner, T. Revesz, O. Lindvall, P. Brundin, *Nat Med* **2008**, *14*, 501-503.
- [39] Y. Nekooki-Machida, M. Kurosawa, N. Nukina, K. Ito, T. Oda, M. Tanaka, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 9679-9684.
- [40] V. Novitskaya, O. V. Bocharova, I. Bronstein, I. V. Baskakov, *J Biol Chem* **2006**, *281*, 13828-13836.
- [41] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. Guo, W. M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko, *Science* **2005**, *307*, 262-265.
- [42] P. H. Ren, J. E. Lauckner, I. Kachirskaja, J. E. Heuser, R. Melki, R. R. Kopito, *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, 219-225.
- [43] W. Yang, J. R. Dunlap, R. B. Andrews, R. Wetzel, *Hum Mol Genet* **2002**, *11*, 2905-2917.
- [44] L. Pieri, K. Madiona, L. Bousset, R. Melki, *Biophys J* **2012**, *102*, 2894-2905.
- [45] M. Gopalswamy, A. Kumar, J. Adler, M. Baumann, M. Henze, S. T. Kumar, M. Fändrich, H. A. Scheidt, D. Huster, J. Balbach, *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1854*, 249-257.
- [46] S. K. Maji, M. H. Perrin, M. R. Sawaya, S. Jessberger, K. Vadodaria, R. A. Rissman, P. S. Singru, K. P. Nilsson, R. Simon, D. Schubert, D. Eisenberg, J. Rivier, P. Sawchenko, W. Vale, R. Riek, *Science* **2009**, *325*, 328-332.
- [47] V. A. Iconomidou, G. D. Chryssikos, V. Gionis, A. S. Galanis, P. Cordopatis, A. Hoenger, S. J. Hamodrakas, *J Struct Biol* **2006**, *156*, 480-488.
- [48] J. M. Kenney, D. Knight, M. J. Wise, F. Vollrath, *Eur J Biochem* **2002**, *269*, 4159-4163.

- [49] J. E. Podrabsky, J. F. Carpenter, S. C. Hand, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2001**, 280, R123-131.
- [50] S. M. Uptain, S. Lindquist, *Annu Rev Microbiol* **2002**, 56, 703-741.
- [51] M. R. Chapman, L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, S. J. Hultgren, *Science* **2002**, 295, 851-855.
- [52] I. Cherny, L. Rockah, O. Levy-Nissenbaum, U. Gophna, E. Z. Ron, E. Gazit, *J Mol Biol* **2005**, 352, 245-252.
- [53] D. Claessen, R. Rink, W. de Jong, J. Siebring, P. de Vreugd, F. G. Boersma, L. Dijkhuizen, H. A. Wosten, *Genes Dev* **2003**, 17, 1714-1726.
- [54] M. L. de Vocht, I. Reviakine, H. A. Wosten, A. Brisson, J. G. Wessels, G. T. Robillard, *J Biol Chem* **2000**, 275, 28428-28432.
- [55] M. F. Gebbink, D. Claessen, B. Bouma, L. Dijkhuizen, H. A. Wosten, *Nat Rev Microbiol* **2005**, 3, 333-341.
- [56] A. H. Kwan, R. D. Winefield, M. Sunde, J. M. Matthews, R. G. Haverkamp, M. D. Templeton, J. P. Mackay, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 3621-3626.
- [57] F. Chiti, C. M. Dobson, *Nat Chem Biol* **2009**, 5, 15-22.
- [58] A. L. Fink, *Fold Des* **1998**, 3, R9-23.
- [59] L. Goldschmidt, P. K. Teng, R. Riek, D. Eisenberg, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, 3487-3492.
- [60] M. Sunde, C. C. Blake, *Q Rev Biophys* **1998**, 31, 1-39.
- [61] M. Fandrich, C. M. Dobson, *EMBO J* **2002**, 21, 5682-5690.
- [62] U. C. Marx, K. Adermann, P. Bayer, M. Meyer, W. G. Forssmann, P. Rosch, *J Biol Chem* **1998**, 273, 4308-4316.
- [63] J. Lu, Y. Yu, I. Zhu, Y. Cheng, P. D. Sun, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, 111, 5189-5194.
- [64] A. Alzheimer, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und physisch-Gerichtliche Medizin* **1907**, 146-148.
- [65] G. A. Carlesimo, M. Oscar-Berman, *Neuropsychol Rev* **1992**, 3, 119-169.
- [66] H. Forstl, A. Kurz, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **1999**, 249, 288-290.
- [67] E. W. Twamley, S. A. Ropacki, M. W. Bondi, *J Int Neuropsychol Soc* **2006**, 12, 707-735.
- [68] E. M. Frank, *J S C Med Assoc* **1994**, 90, 417-423.
- [69] M. H. Tabert, X. Liu, R. L. Doty, M. Serby, D. Zamora, G. H. Pelton, K. Marder, M. W. Albers, Y. Stern, D. P. Devanand, *Ann Neurol* **2005**, 58, 155-160.
- [70] G. Waldemar, B. Dubois, M. Emre, J. Georges, I. G. McKeith, M. Rossor, P. Scheltens, P. Tariska, B. Winblad, *Eur J Neurol* **2007**, 14, 1-26.
- [71] P. K. Molsa, R. J. Marttila, U. K. Rinne, *Acta Neurol Scand* **1986**, 74, 103-107.
- [72] R. W. Mahley, K. H. Weisgraber, Y. Huang, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 5644-5651.
- [73] W. J. Strittmatter, A. M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G. S. Salvesen, A. D. Roses, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, 1977-1981.
- [74] S. C. Waring, R. N. Rosenberg, *Arch Neurol* **2008**, 65, 329-334.
- [75] P. Tiraboschi, L. A. Hansen, L. J. Thal, J. Corey-Bloom, *Neurology* **2004**, 62, 1984-1989.
- [76] F. S. Esch, P. S. Keim, E. C. Beattie, R. W. Blacher, A. R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, P. J. Ward, *Science* **1990**, 248, 1122-1124.
- [77] S. S. Sisodia, E. H. Koo, K. Beyreuther, A. Unterbeck, D. L. Price, *Science* **1990**, 248, 492-495.
- [78] P. Seubert, T. Oltersdorf, M. G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D. L. Davis, K. Bryant, L. C. Fritz, D. Galasko, L. J. Thal, et al., *Nature* **1993**, 361, 260-263.

- [79] W. T. Kimberly, M. J. LaVoie, B. L. Ostaszewski, W. Ye, M. S. Wolfe, D. J. Selkoe, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 6382-6387.
- [80] O. M. El-Agnaf, D. S. Mahil, B. P. Patel, B. M. Austen, *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *273*, 1003-1007.
- [81] M. P. Mattson, *Nature* **2004**, *430*, 631-639.
- [82] I. Bertini, L. Gonnelli, C. Luchinat, J. Mao, A. Nesi, *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 16013-16022.
- [83] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 16742-16747.
- [84] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 17342-17347.
- [85] J. X. Lu, W. Qiang, W. M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, R. Tycko, *Cell* **2013**, *154*, 1257-1268.
- [86] A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W. M. Yau, R. Tycko, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 18349-18354.
- [87] C. Sachse, M. Fändrich, N. Grigorieff, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 7462-7466.
- [88] J. M. Lopez del Amo, M. Schmidt, U. Fink, M. Dasari, M. Fändrich, B. Reif, *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51*, 6136-6139.
- [89] M. Fändrich, J. Meinhardt, N. Grigorieff, *Prion* **2009**, *3*, 89-93.
- [90] J. Meinhardt, C. Sachse, P. Hortschansky, N. Grigorieff, M. Fändrich, *J Mol Biol* **2009**, *386*, 869-877.
- [91] J. D. Harper, C. M. Lieber, P. T. Lansbury, Jr., *Chem Biol* **1997**, *4*, 951-959.
- [92] C. S. Goldsbury, S. Wirtz, S. A. Muller, S. Sunderji, P. Wicki, U. Aebi, P. Frey, *J Struct Biol* **2000**, *130*, 217-231.
- [93] S. B. Malinchik, H. Inouye, K. E. Szumowski, D. A. Kirschner, *Biophys J* **1998**, *74*, 537-545.
- [94] M. Meyer-Luehmann, J. Coomaraswamy, T. Bolmont, S. Kaeser, C. Schaefer, E. Kilger, A. Neuenschwander, D. Abramowski, P. Frey, A. L. Jatón, J. M. Vigouret, P. Paganetti, D. M. Walsh, P. M. Mathews, J. Ghiso, M. Staufenbiel, L. C. Walker, M. Jucker, *Science* **2006**, *313*, 1781-1784.
- [95] J. Stöhr, J. C. Watts, Z. L. Mensinger, A. Oehler, S. K. Grillo, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, K. Giles, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 11025-11030.
- [96] M. Dasari, A. Espargaro, R. Sabate, J. M. Lopez del Amo, U. Fink, G. Grelle, J. Bieschke, S. Ventura, B. Reif, *Chembiochem* **2011**, *12*, 407-423.
- [97] A. K. Paravastu, I. Qahwash, R. D. Leapman, S. C. Meredith, R. Tycko, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 7443-7448.
- [98] W. Qiang, W. M. Yau, J. X. Lu, J. Collinge, R. Tycko, *Nature* **2017**, *541*, 217-221.
- [99] P. Das, B. Murray, G. Belfort, *Biophys J* **2015**, *108*, 738-747.
- [100] B. Murray, M. Sorci, J. Rosenthal, J. Lippens, D. Isaacson, P. Das, D. Fabris, S. Li, G. Belfort, *Proteins* **2016**.
- [101] X. Zheng, D. Liu, R. Roychaudhuri, D. B. Teplow, M. T. Bowers, *ACS Chem Neurosci* **2015**, *6*, 1732-1740.
- [102] D. R. Thal, J. Walter, T. C. Saido, M. Fändrich, *Acta Neuropathol* **2015**, *129*, 167-182.
- [103] N. Sergeant, S. Bombois, A. Ghestem, H. Drobecq, V. Kostanjevecki, C. Missiaen, A. Watez, J. P. David, E. Vanmechelen, C. Sergheraert, A. Delacourte, *J Neurochem* **2003**, *85*, 1581-1591.
- [104] S. Schilling, U. Zeitschel, T. Hoffmann, U. Heiser, M. Francke, A. Kehlen, M. Holzer, B. Hutter-Paier, M. Prokesch, M. Windisch, W. Jagla, D. Schlenzig, C. Lindner, T. Rudolph, G. Reuter, H. Cynis, D. Montag, H. U. Demuth, S. Rossner, *Nat Med* **2008**, *14*, 1106-1111.

- [105] A. Rijal Upadhaya, I. Kosterin, S. Kumar, C. A. von Arnim, H. Yamaguchi, M. Fändrich, J. Walter, D. R. Thal, *Brain* **2014**, *137*, 887-903.
- [106] A. Piccini, C. Russo, A. Gliozzi, A. Relini, A. Vitali, R. Borghi, L. Giliberto, A. Armirotti, C. D'Arrigo, A. Bachi, A. Cattaneo, C. Canale, S. Torrassa, T. C. Saido, W. Markesbery, P. Gambetti, M. Tabaton, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 34186-34192.
- [107] J. W. Geddes, T. L. Tekirian, M. P. Mattson, *Neurobiol Aging* **1999**, *20*, 75-79.
- [108] Y. Harigaya, T. C. Saido, C. B. Eckman, C. M. Prada, M. Shoji, S. G. Younkin, *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *276*, 422-427.
- [109] Y. M. Kuo, M. R. Emmerling, A. S. Woods, R. J. Cotter, A. E. Roher, *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *237*, 188-191.
- [110] D. Schlenzig, S. Manhart, Y. Cinar, M. Kleinschmidt, G. Hause, D. Willbold, S. A. Funke, S. Schilling, H. U. Demuth, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7072-7078.
- [111] D. Schlenzig, R. Rönicke, H. Cynis, H. H. Ludwig, E. Scheel, K. Reymann, T. Saido, G. Hause, S. Schilling, H. U. Demuth, *J Neurochem* **2012**, *121*, 774-784.
- [112] W. He, C. J. Barrow, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10871-10877.
- [113] S. Schilling, T. Lauber, M. Schaupp, S. Manhart, E. Scheel, G. Böhm, H. U. Demuth, *Biochemistry* **2006**, *45*, 12393-12399.
- [114] J. O. Matos, G. Goldblatt, J. Jeon, B. Chen, S. A. Tatulian, *J Phys Chem B* **2014**, *118*, 5637-5643.
- [115] A. D. Williams, S. Shivaprasad, R. Wetzel, *J Mol Biol* **2006**, *357*, 1283-1294.
- [116] A. D. Williams, E. Portelius, I. Kheterpal, J. T. Guo, K. D. Cook, Y. Xu, R. Wetzel, *J Mol Biol* **2004**, *335*, 833-842.
- [117] M. L. Peacock, J. T. Warren, Jr., A. D. Roses, J. K. Fink, *Neurology* **1993**, *43*, 1254-1256.
- [118] G. Di Fede, M. Catania, M. Morbin, G. Rossi, S. Suardi, G. Mazzoleni, M. Merlin, A. R. Giovagnoli, S. Prioni, A. Erbetta, C. Falcone, M. Gobbi, L. Colombo, A. Bastone, M. Beeg, C. Manzoni, B. Francescucci, A. Spagnoli, L. Cantu, E. Del Favero, E. Levy, M. Salmona, F. Tagliavini, *Science* **2009**, *323*, 1473-1477.
- [119] J. C. Janssen, J. A. Beck, T. A. Campbell, A. Dickinson, N. C. Fox, R. J. Harvey, H. Houlden, M. N. Rossor, J. Collinge, *Neurology* **2003**, *60*, 235-239.
- [120] Y. Wakutani, K. Watanabe, Y. Adachi, K. Wada-Isoe, K. Urakami, H. Ninomiya, T. C. Saido, T. Hashimoto, T. Iwatsubo, K. Nakashima, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **2004**, *75*, 1039-1042.
- [121] L. Hendriks, C. M. van Duijn, P. Cras, M. Cruts, W. Van Hul, F. van Harskamp, A. Warren, M. G. McInnis, S. E. Antonarakis, J. J. Martin, et al., *Nat Genet* **1992**, *1*, 218-221.
- [122] Tagliavini F, Rossi G, Padovani A, Magoni M, Andora G, Sgarzi M, Bizzi A, Savoiardo M, Carella F, Morbin M, Giaccone G, B. O., *Alzheimer's Reports*. **1999**, *2*, 28.
- [123] E. Levy, M. D. Carman, I. J. Fernandez-Madrid, M. D. Power, I. Lieberburg, S. G. van Duinen, G. T. Bots, W. Luyendijk, B. Frangione, *Science* **1990**, *248*, 1124-1126.
- [124] C. Nilsberth, A. Westlind-Danielsson, C. B. Eckman, M. M. Condron, K. Axelman, C. Forsell, C. Stenh, J. Luthman, D. B. Teplow, S. G. Younkin, J. Naslund, L. Lannfelt, *Nat Neurosci* **2001**, *4*, 887-893.
- [125] T. Tomiyama, T. Nagata, H. Shimada, R. Teraoka, A. Fukushima, H. Kanemitsu, H. Takuma, R. Kuwano, M. Imagawa, S. Ataka, Y. Wada, E. Yoshioka, T. Nishizaki, Y. Watanabe, H. Mori, *Ann Neurol* **2008**, *63*, 377-387.
- [126] T. J. Grabowski, H. S. Cho, J. P. Vonsattel, G. W. Rebeck, S. M. Greenberg, *Ann Neurol* **2001**, *49*, 697-705.
- [127] L. Obici, A. Demarchi, G. de Rosa, V. Bellotti, S. Marciano, S. Donadei, E. Arbustini, G. Palladini, M. Diegoli, E. Genovese, G. Ferrari, S. Coverlizza, G. Merlini, *Ann Neurol* **2005**, *58*, 639-644.
- [128] M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, T. Sato, S. Ahuja, S. Aimoto, J. I. Elliott, W. E. Van Nostrand, S. O. Smith, *Nat Struct Mol Biol* **2010**, *17*, 561-567.

- [129] M. Chandrakesan, S. B., V. S. Mithu, R. Abhyankar, D. Bhowmik, S. Nag, B. Sahoob, R. Shah, S. Gurav, R. Banerjee, S. Dandekar, J. C. Jose, N. Sengupta, P. K. Madhu, S. Maiti, *Chemical Physics Letters* **2013**, *422*, 80-87.
- [130] J. Adler, H. A. Scheidt, M. Kruger, L. Thomas, D. Huster, *Phys Chem Chem Phys* **2014**, *16*, 7461-7471.
- [131] B. Voigt, *Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von Varianten des Alzheimerpeptids Amyloid β (1 - 40)*, Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2014**.
- [132] M. M. Wilhelmus, I. Otte-Holler, P. Wesseling, R. M. de Waal, W. C. Boelens, M. M. Verbeek, *Neuropathol Appl Neurobiol* **2006**, *32*, 119-130.
- [133] M. M. Wilhelmus, W. C. Boelens, I. Otte-Holler, B. Kamps, R. M. de Waal, M. M. Verbeek, *Brain Res* **2006**, *1089*, 67-78.
- [134] M. M. Wilhelmus, W. C. Boelens, I. Otte-Holler, B. Kamps, B. Kusters, M. L. Maat-Schieman, R. M. de Waal, M. M. Verbeek, *Acta Neuropathol* **2006**, *111*, 139-149.
- [135] S. Narayanan, B. Kamps, W. C. Boelens, B. Reif, *FEBS Lett* **2006**, *580*, 5941-5946.
- [136] A. Mainz, J. Peschek, M. Stavropoulou, K. C. Back, B. Bardiaux, S. Asami, E. Prade, C. Peters, S. Weinkauff, J. Buchner, B. Reif, *Nat Struct Mol Biol* **2015**, *22*, 898-905.
- [137] S. I. Cohen, P. Arosio, J. Presto, F. R. Kurudenkandy, H. Biverstal, L. Dolfe, C. Dunning, X. Yang, B. Frohm, M. Vendruscolo, J. Johansson, C. M. Dobson, A. Fisahn, T. P. Knowles, S. Linse, *Nat Struct Mol Biol* **2015**, *22*, 207-213.
- [138] Y. Kitago, M. Nagae, Z. Nakata, M. Yagi-Utsumi, S. Takagi-Niidome, E. Mihara, T. Nogi, K. Kato, J. Takagi, *Nat Struct Mol Biol* **2015**, *22*, 199-206.
- [139] M. Crompton, *J Physiol* **2000**, *529 Pt 1*, 11-21.
- [140] L. Guo, H. Du, S. Yan, X. Wu, G. M. McKhann, J. X. Chen, S. S. Yan, *PLoS One* **2013**, *8*, e54914.
- [141] A. P. Halestrap, E. Doran, J. P. Gillespie, A. O'Toole, *Biochem Soc Trans* **2000**, *28*, 170-177.
- [142] V. Petronilli, C. Cola, S. Massari, R. Colonna, P. Bernardi, *J Biol Chem* **1993**, *268*, 21939-21945.
- [143] C. Zhang, J. P. Steiner, G. S. Hamilton, T. P. Hicks, M. O. Poulter, *J Neurosci* **2001**, *21*, RC156.
- [144] L. C. Costantini, D. Cole, P. Chaturvedi, O. Isacson, *Eur J Neurosci* **2001**, *13*, 1085-1092.
- [145] A. Schedlbauer, B. Hoffmann, G. Kontaxis, S. Rudisser, U. Hommel, R. Konrat, *J Biomol NMR* **2007**, *38*, 267.
- [146] A. C. Schinzel, O. Takeuchi, Z. Huang, J. K. Fisher, Z. Zhou, J. Rubens, C. Hetz, N. N. Danial, M. A. Moskowitz, S. J. Korsmeyer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 12005-12010.
- [147] P. G. Sullivan, M. B. Thompson, S. W. Scheff, *Exp Neurol* **1999**, *160*, 226-234.
- [148] T. A. Seaton, J. M. Cooper, A. H. Schapira, *Brain Res* **1998**, *809*, 12-17.
- [149] A. P. Halestrap, C. P. Connern, E. J. Griffiths, P. M. Kerr, *Mol Cell Biochem* **1997**, *174*, 167-172.
- [150] J. P. Blass, *Ann NY Acad Sci* **2000**, *924*, 170-183.
- [151] S. M. Cardoso, I. Santana, R. H. Swerdlow, C. R. Oliveira, *J Neurochem* **2004**, *89*, 1417-1426.
- [152] M. T. Lin, M. F. Beal, *Nat Med* **2006**, *12*, 1241-1243.
- [153] M. T. Lin, M. F. Beal, *Nature* **2006**, *443*, 787-795.
- [154] J. P. Sheehan, R. H. Swerdlow, S. W. Miller, R. E. Davis, J. K. Parks, W. D. Parker, J. B. Tuttle, *J Neurosci* **1997**, *17*, 4612-4622.
- [155] C. Caspersen, N. Wang, J. Yao, A. Sosunov, X. Chen, J. W. Lustbader, H. W. Xu, D. Stern, G. McKhann, S. D. Yan, *FASEB J* **2005**, *19*, 2040-2041.
- [156] L. Devi, B. M. Prabhu, D. F. Galati, N. G. Avadhani, H. K. Anandatheerthavarada, *J Neurosci* **2006**, *26*, 9057-9068.

- [157] P. Fernandez-Vizarra, A. P. Fernandez, S. Castro-Blanco, J. Serrano, M. L. Bentura, R. Martinez-Murillo, A. Martinez, J. Rodrigo, *Histol Histopathol* **2004**, *19*, 823-844.
- [158] K. Hirai, G. Aliev, A. Nunomura, H. Fujioka, R. L. Russell, C. S. Atwood, A. B. Johnson, Y. Kress, H. V. Vinters, M. Tabaton, S. Shimohama, A. D. Cash, S. L. Siedlak, P. L. Harris, P. K. Jones, R. B. Petersen, G. Perry, M. A. Smith, *J Neurosci* **2001**, *21*, 3017-3023.
- [159] J. W. Lustbader, M. Cirilli, C. Lin, H. W. Xu, K. Takuma, N. Wang, C. Caspersen, X. Chen, S. Pollak, M. Chaney, F. Trinchese, S. Liu, F. Gunn-Moore, L. F. Lue, D. G. Walker, P. Kuppusamy, Z. L. Zewier, O. Arancio, D. Stern, S. S. Yan, H. Wu, *Science* **2004**, *304*, 448-452.
- [160] M. Manczak, T. S. Anekonda, E. Henson, B. S. Park, J. Quinn, P. H. Reddy, *Hum Mol Genet* **2006**, *15*, 1437-1449.
- [161] A. A. Starkov, F. M. Beal, *Nat Med* **2008**, *14*, 1020-1021.
- [162] J. X. Chen, S. S. Yan, *J Alzheimers Dis* **2010**, *20 Suppl 2*, 569-578.
- [163] H. Du, L. Guo, F. Fang, D. Chen, A. A. Sosunov, G. M. McKhann, Y. Yan, C. Wang, H. Zhang, J. D. Molkenstin, F. J. Gunn-Moore, J. P. Vonsattel, O. Arancio, J. X. Chen, S. D. Yan, *Nat Med* **2008**, *14*, 1097-1105.
- [164] H. Du, L. Guo, X. Wu, A. A. Sosunov, G. M. McKhann, J. X. Chen, S. S. Yan, *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1842*, 2517-2527.
- [165] H. Du, L. Guo, W. Zhang, M. Rydzewska, S. Yan, *Neurobiol Aging* **2011**, *32*, 398-406.
- [166] M. Manczak, P. Mao, M. J. Calkins, A. Cornea, A. P. Reddy, M. P. Murphy, H. H. Szeto, B. Park, P. H. Reddy, *J Alzheimers Dis* **2010**, *20 Suppl 2*, S609-631.
- [167] K. E. Muirhead, E. Borger, L. Aitken, S. J. Conway, F. J. Gunn-Moore, *Biochem J* **2010**, *426*, 255-270.
- [168] K. Kajitani, M. Fujihashi, Y. Kobayashi, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, K. Miki, *Proteins* **2008**, *70*, 1635-1639.
- [169] M. Villmow, M. Baumann, M. Malesevic, R. Sachs, G. Hause, M. Fändrich, J. Balbach, C. Schiene-Fischer, *Biochem J* **2016**, *473*, 1355-1368.
- [170] M. Baumann, *Charakterisierung molekularer Wechselwirkungen des Alzheimer-Peptides A β* , Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2011**.
- [171] P. N. Manley, J. B. Anclin, R. Kisilevsky, *Med Hypotheses* **2006**, *66*, 784-792.
- [172] C. M. Uhlar, A. S. Whitehead, *Eur J Biochem* **1999**, *265*, 501-523.
- [173] N. Zhang, M. H. Ahsan, A. F. Purchio, D. B. West, *J Immunol* **2005**, *174*, 8125-8134.
- [174] G. Chevrel, C. Jenvrin, B. McGregor, P. Miossec, *Rheumatology (Oxford)* **2001**, *40*, 821-825.
- [175] C. Ensari, A. Ensari, N. Tumer, E. Ertug, *Nephrol Dial Transplant* **2005**, *20*, 1721-1725.
- [176] M. A. Gertz, R. A. Kyle, *Medicine (Baltimore)* **1991**, *70*, 246-256.
- [177] J. Sipe, *Amyloid* **1999**, *6*, 67-70.
- [178] J. J. Liepnieks, B. Kluge-Beckerman, M. D. Benson, *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1270*, 81-86.
- [179] J. Yu, H. Zhu, J. T. Guo, F. C. de Beer, M. S. Kindy, *Lab Invest* **2000**, *80*, 1797-1806.
- [180] I. Walsh, F. Seno, S. C. Tosatto, A. Trovato, *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, 301-307.
- [181] C. Röcken, R. Menard, F. Bühling, S. Vöckler, J. Raynes, B. Stix, S. Krüger, A. Roessner, T. Kähne, *Ann Rheum Dis* **2005**, *64*, 808-815.
- [182] H. Patel, J. Bramall, H. Waters, M. C. De Beer, P. Woo, *Biochem J* **1996**, *318(Pt 3)*, 1041-1049.
- [183] S. L. Teitelbaum, *Science* **2000**, *289*, 1504-1508.
- [184] M. W. Freeman, K. M. Wiren, A. Rapoport, M. Lazar, J. T. Potts, Jr., H. M. Kronenberg, *Mol Endocrinol* **1987**, *1*, 628-638.

- [185] A. C. Karaplis, S. K. Lim, H. Baba, A. Arnold, H. M. Kronenberg, *J Biol Chem* **1995**, 270, 1629-1635.
- [186] D. V. Cohn, J. Elting, *Recent Prog Horm Res* **1983**, 39, 181-209.
- [187] J. F. Habener, M. Rosenblatt, P. C. Dee, J. T. Potts, Jr., *J Biol Chem* **1979**, 254, 10596-10599.
- [188] K. M. Wiren, J. T. Potts, Jr., H. M. Kronenberg, *J Biol Chem* **1988**, 263, 19771-19777.
- [189] P. Westermark, *Histochemistry* **1974**, 38, 27-33.
- [190] I. Kedar, M. Ravid, E. Sohar, *Isr J Med Sci* **1976**, 12, 1137-1140.
- [191] J. Adler, M. Baumann, B. Voigt, H. A. Scheidt, D. Bhowmik, T. Haupl, B. Abel, P. K. Madhu, J. Balbach, S. Maiti, D. Huster, *Chemphyschem* **2016**, 17, 2744-2753.
- [192] E. Mossesso, C. D. Lima, *Mol Cell* **2000**, 5, 865-876.
- [193] R. Maurer, B. Meyer, M. Ptashne, *J Mol Biol* **1980**, 139, 147-161.
- [194] E. Bosse-Doenecke, U. Weininger, M. Gopalswamy, J. Balbach, S. M. Knudsen, R. Rudolph, *Protein Expr Purif* **2008**, 58, 114-121.
- [195] R. B. Kapust, J. Tozser, J. D. Fox, D. E. Anderson, S. Cherry, T. D. Copeland, D. S. Waugh, *Protein Eng* **2001**, 14, 993-1000.
- [196] C. Piotrowski, C. H. Ihling, A. Sinz, *Methods* **2015**, 89, 121-127.
- [197] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, *J Biomol NMR* **1995**, 6, 277-293.
- [198] W. F. Vranken, W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides, E. D. Laue, *Proteins* **2005**, 59, 687-696.
- [199] W. A. Kibbe, *Nucleic Acids Res* **2007**, 35, W43-46.
- [200] P. Hortschansky, V. Schroeckh, T. Christopeit, G. Zandomenighi, M. Fändrich, *Protein Sci* **2005**, 14, 1753-1759.
- [201] A. Kumar, M. Gopalswamy, C. Wishart, M. Henze, L. Eschen-Lippold, D. Donnelly, J. Balbach, *ACS Chem Biol* **2014**, 9, 2465-2470.
- [202] M. Stephani, *Charakterisierung von Chimären zwischen synthetischen und biologischen Polymeren*, Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2015**.
- [203] S. C. Gill, P. H. von Hippel, *Anal Biochem* **1989**, 182, 319-326.
- [204] N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* **1969**, 8, 4108-4116.
- [205] A. S. Cohen, E. Calkins, *Nature* **1959**, 183, 1202-1203.
- [206] G. Bitan, A. Lomakin, D. B. Teplow, *J Biol Chem* **2001**, 276, 35176-35184.
- [207] D. A. Fancy, T. Kodadek, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, 6020-6024.
- [208] G. T. Westermark, K. H. Johnson, P. Westermark, *Methods Enzymol* **1999**, 309, 3-25.
- [209] M. R. Nilsson, *Methods* **2004**, 34, 151-160.
- [210] P. Westermark, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, A. S. Cohen, B. Frangione, S. Ikeda, C. L. Masters, G. Merlini, M. J. Saraiva, J. D. Sipe, *Amyloid* **2007**, 14, 179-183.
- [211] M. Biancalana, K. Makabe, A. Koide, S. Koide, *J Mol Biol* **2009**, 385, 1052-1063.
- [212] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S. A. Carter, V. Krishna, R. K. Grover, R. Roy, S. Singh, *J Struct Biol* **2005**, 151, 229-238.
- [213] V. I. Stsiapura, A. A. Maskevich, V. A. Kuzmitsky, V. N. Uversky, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, *J Phys Chem B* **2008**, 112, 15893-15902.
- [214] L. S. Wolfe, M. F. Calabrese, A. Nath, D. V. Blaho, A. D. Miranker, Y. Xiong, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, 16863-16868.
- [215] E. V. Hackl, J. Darkwah, G. Smith, I. Ermolina, *Eur Biophys J* **2015**, 44, 249-261.
- [216] P. Arosio, T. P. Knowles, S. Linse, *Phys Chem Chem Phys* **2015**, 17, 7606-7618.

- [217] J. D. Harper, P. T. Lansbury, Jr., *Annu Rev Biochem* **1997**, *66*, 385-407.
- [218] F. Oosama, S. Asakura, *Thermodynamics of polymerisation of protein.*, Academic Press, London, **1975**.
- [219] S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O. Johnson, P. C. van Zijl, *J Magn Reson B* **1995**, *108*, 94-98.
- [220] J. Weigelt, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10778-10779.
- [221] P. Schanda, B. Brutscher, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 8014-8015.
- [222] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *J Biomol NMR* **1992**, *2*, 661-665.
- [223] M. Liu, X.-A. Mao, C. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *J. Magn. Reson.* **1997**, *132*, 125-129.
- [224] D. J. States, R. A. Haberkorn, D. J. Ruben, *J Magn Reson* **1982**, *48*, 286-292.
- [225] J. Schleucher, M. Sattler, C. Griesinger, *Angew Chem Int Ed Engl* **1993**, *32*, 1489-1491.
- [226] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chemical Physics Letters* **1980**, *69*, 185-189.
- [227] M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1999**, *34*, 93-158.
- [228] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, WILEY, New York, **1986**.
- [229] M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659-4667.
- [230] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax., *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 496-514.
- [231] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6291-6293.
- [232] M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, K. Wüthrich, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 13585-13590.
- [233] M. Salzmann, G. Wider, K. Pervushin, H. Senn, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 844-848.
- [234] V. Motackova, J. Novacek, A. Zawadzka-Kazimierczuk, K. Kazimierczuk, L. Zidek, H. Sanderova, L. Krasny, W. Kozminski, V. Sklenar, *J Biomol NMR* **2010**, *48*, 169-177.
- [235] K. Kazimierczuk, A. Zawadzka, W. Kozminski, *J Magn Reson* **2009**, *197*, 219-228.
- [236] K. Kazimierczuk, A. Zawadzka, W. Kozminski, I. Zhukov, *J Biomol NMR* **2006**, *36*, 157-168.
- [237] K. Kazimierczuk, A. Zawadzka, W. Kozminski, I. Zhukov, *J Magn Reson* **2007**, *188*, 344-356.
- [238] K. Kazimierczuk, A. Zawadzka-Kazimierczuk, W. Kozminski, *J Magn Reson* **2010**, *205*, 286-292.
- [239] J. Stanek, W. Kozminski, *J Biomol NMR* **2010**, *47*, 65-77.
- [240] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, N. J. Skelton, M. Rance, *Protein NMR Spectroscopy, Second Edition: Principles and Practice*, Elsevier, **2007**.
- [241] S. Grzesiek, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, A. Bax, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10256-10261.
- [242] A. K. Downing, *Protein NMR Techniques, Vol. 278*, 2 ed., Humana Press, **2004**.
- [243] J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, **1995**.
- [244] Y. Bai, J. S. Milne, L. Mayne, S. W. Englander, *Proteins* **1993**, *17*, 75-86.
- [245] T. Szyperski, J. L. Mills, D. Perl, J. Balbach, *Eur Biophys J* **2006**, *35*, 363-366.
- [246] Y. Bai, T. R. Sosnick, L. Mayne, S. W. Englander, *Science* **1995**, *269*, 192-197.
- [247] M. Kovermann, *Strukturelle Charakterisierung von Proteinfaltungsintermediaten mit NMR-Spektroskopie*, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2001**.
- [248] Y. Bai, J. S. Milne, L. Mayne, S. W. Englander, *Proteins* **1994**, *20*, 4-14.
- [249] A. Hvidt, K. Linderstrom-Lang, *Biochim Biophys Acta* **1954**, *14*, 574-575.
- [250] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Curr Opin Chem Biol* **1998**, *2*, 564-570.

- [251] A. T. Alexandrescu, *Pac Symp Biocomput* **2001**, 67-78.
- [252] M. Hoshino, H. Katou, Y. Hagihara, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto, *Nat Struct Biol* **2002**, 9, 332-336.
- [253] N. Hirota-Nakaoka, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto, *J Biochem* **2003**, 134, 159-164.
- [254] Y. Z. Zhang, Y. Paterson, H. Roder, *Protein Sci* **1995**, 4, 804-814.
- [255] M. Hoshino, H. Katou, K. Yamaguchi, Y. Goto, *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1768, 1886-1899.
- [256] K. Kuwata, T. Matumoto, H. Cheng, K. Nagayama, T. L. James, H. Roder, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, 14790-14795.
- [257] K. Yamaguchi, H. Katou, M. Hoshino, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto, *J Mol Biol* **2004**, 338, 559-571.
- [258] S. T. Kumar, J. Meinhardt, A. K. Fuchs, T. Aumuller, J. Leppert, B. Buchele, U. Knüpfer, R. Ramachandran, J. K. Yadav, E. Prell, I. Morgado, O. Ohlenschlager, U. Horn, T. Simmet, M. Gorch, M. Fändrich, *ACS Nano* **2014**, 8, 11042-11052.
- [259] A. Olofsson, M. Lindhagen-Persson, A. E. Sauer-Eriksson, A. Ohman, *Biochem J* **2007**, 404, 63-70.
- [260] A. Olofsson, A. E. Sauer-Eriksson, A. Ohman, *J Biol Chem* **2006**, 281, 477-483.
- [261] C. Ritter, M. L. Maddelein, A. B. Siemer, T. Lühns, M. Ernst, B. H. Meier, S. J. Saupe, R. Riek, *Nature* **2005**, 435, 844-848.
- [262] M. Vilar, H. T. Chou, T. Lühns, S. K. Maji, D. Riek-Loher, R. Verel, G. Manning, H. Stahlberg, R. Riek, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, 105, 8637-8642.
- [263] L. Wang, S. K. Maji, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, R. Riek, *PLoS Biol* **2008**, 6, 195.
- [264] L. Wang, D. Schubert, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, R. Riek, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, 49, 3904-3908.
- [265] N. A. Whittemore, R. Mishra, I. Kheterpal, A. D. Williams, R. Wetzel, E. H. Serpersu, *Biochemistry* **2005**, 44, 4434-4441.
- [266] H. S. Atreya, T. Szyperski, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, 9642-9647.
- [267] L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, 15858-15862.
- [268] E. Lescop, P. Schanda, B. Brutscher, *J Magn Reson* **2007**, 187, 163-169.
- [269] P. Schanda, E. Kupce, B. Brutscher, *J Biomol NMR* **2005**, 33, 199-211.
- [270] P. Schanda, H. Van Melckebeke, B. Brutscher, *J Am Chem Soc* **2006**, 128, 9042-9043.
- [271] G. Gemmecker, W. Jahnke, H. Kessler, *J Am Chem Soc* **1993**, 115, 11620-11621.
- [272] T. L. Hwang, P. C. van Zijl, S. Mori, *J Biomol NMR* **1998**, 11, 221-226.
- [273] S. Koide, W. Jahnke, P. E. Wright, *J Biomol NMR* **1997**, 6, 306-312.
- [274] S. Mori, P. C. van Zijl, D. Shortle, *Proteins* **1997**, 28, 325-332.
- [275] N. Bloembergen, R. V. Pound, *Phys. Rev.* **1954**, 95, 8-12.
- [276] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *The Journal of Chemical Physics* **1979**, 71, 4546.
- [277] A. L. Schwartz, J. D. Cutnell, *Journal of Magnetic Resonance* **1983**, 53, 398-411.
- [278] D. H. Wu, A. D. Chen, C. S. Johnson, *J. Magn. Reson.* **1995**, 115, 260-264.
- [279] J. E. Tanner, E. O. Stejskal, *The Journal of Chemical Physics* **1968**, 49, 1768-1777.
- [280] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, 42, 288-292.
- [281] E. O. Stejskal, *The Journal of Chemical Physics* **1965**, 43, 3597-3603.
- [282] J. E. Tanner, *The Journal of Chemical Physics* **1970**, 52, 2523-2526.
- [283] A. Dehner, H. Kessler, *Chembiochem* **2005**, 6, 1550-1565.

- [284] F. Ferrage, M. Zoonens, D. E. Warschawski, J. L. Popot, G. Bodenhausen, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 2541-2545.
- [285] I. V. Nesmelova, D. Idiyatullin, K. H. Mayo, *J Magn Reson* **2004**, *166*, 129-133.
- [286] M. L. Tillett, M. A. Horsfield, L. Y. Lian, T. J. Norwood, *J Biomol NMR* **1999**, *13*, 223-232.
- [287] A. Einstein, *Ann. Phys. (Leipzig)* **1906**, *4*.
- [288] A. Einstein, *Ann. Phys. (Leipzig)* **1911**, *34*, 170-402.
- [289] A. Einstein, *Investigations on the Theory of 'The Brownian Movement'*, Dover, New York **1956**.
- [290] G. Stokes, *Trans. Cambridge Philos. Soc.* **1856**, *9*.
- [291] J. A. Jones, D. K. Wilkins, L. J. Smith, C. M. Dobson, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 199-203.
- [292] D. K. Wilkins, S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson, J. A. Jones, L. J. Smith, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16424-16431.
- [293] P. Licinio, M. Delaye, *J. Phys.* **1988**, *49*, 975-981.
- [294] M. Roos, S. Link, J. Balbach, A. Krushelnitsky, K. Saalwächter, *Biophys J* **2015**, *108*, 98-106.
- [295] M. Rothe, T. Gruber, S. Gröger, J. Balbach, K. Saalwächter, M. Roos, *Phys Chem Chem Phys* **2016**, *18*, 18006-18014.
- [296] Y. Wang, C. Li, G. J. Pielak, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 9392-9397.
- [297] S. Zorrilla, M. A. Hink, A. J. Visser, M. P. Lillo, *Biophys Chem* **2007**, *125*, 298-305.
- [298] M. Zeeb, J. Balbach, *Methods* **2004**, *34*, 65-74.
- [299] A. Abraham, *The Principles of Nuclear Magnetism.*, Clarendon Press Oxford, **1961**.
- [300] Y. Hiyama, C. H. Niu, J. V. Silverton, A. Bavoso, D. A. Torchia, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2378-2383.
- [301] D. G. Davis, M. E. Perlman, R. E. London, *J Magn Reson B* **1994**, *104*, 266-275.
- [302] C. P. Carver, R. E. Richards, *J. Magn. Reson.* **1972**, *6*, 89-105.
- [303] J. Jen, *J. Magn. Reson.* **1978**, *30*.
- [304] R. Ishima, D. A. Torchia, *J Biomol NMR* **1999**, *14*, 369-372.
- [305] M. Tollinger, N. R. Skrynnikov, F. A. Mulder, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay, *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 11341-11352.
- [306] Z. Luz, S. Meiboom, *The Journal of Chemical Physics* **1963**, *39*, 366-370.
- [307] U. Weininger, C. Diehl, M. Akke, *J Biomol NMR* **2012**, *53*, 181-190.
- [308] J. P. Loria, M. Rance, A. G. Palmer, 3rd, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 151-155.
- [309] F. Ferrage, D. Cowburn, R. Ghose, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 6048-6049.
- [310] N. L. Fawzi, J. Ying, D. A. Torchia, G. M. Clore, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 9948-9951.
- [311] N. L. Fawzi, J. Ying, D. A. Torchia, G. M. Clore, *Nat Protoc* **2012**, *7*, 1523-1533.
- [312] M. Helgstrand, T. Hard, P. Allard, *J Biomol NMR* **2000**, *18*, 49-63.
- [313] N. L. Fawzi, J. Ying, R. Ghirlando, D. A. Torchia, G. M. Clore, *Nature* **2011**, *480*, 268-272.
- [314] M. Garvey, M. Baumann, M. Wulff, S. T. Kumar, D. Markx, I. Morgado, U. Knüpfer, U. Horn, C. Mawrin, M. Fändrich, J. Balbach, *Amyloid* **2016**, *23*, 76-85.
- [315] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, L. George, Y. C. Tung, K. S. Kim, H. M. Wisniewski, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86*, 2853-2857.
- [316] T. Wisniewski, E. Castano, J. Ghiso, B. Frangione, *Ann Neurol* **1993**, *34*, 631-633.
- [317] M. Garvey, K. Tepper, C. Haupt, U. Knüpfer, K. Klement, J. Meinhardt, U. Horn, J. Balbach, M. Fändrich, *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *409*, 385-388.

- [318] M. Wulff, M. Baumann, A. Thummler, J. K. Yadav, L. Heinrich, U. Knüpfer, D. Schlenzig, A. Schierhorn, J. U. Rahfeld, U. Horn, J. Balbach, H. U. Demuth, M. Fändrich, *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 5081-5084.
- [319] N. Sun, R. Hartmann, J. Lecher, M. Stoldt, S. A. Funke, L. Gremer, H. H. Ludwig, H. U. Demuth, M. Kleinschmidt, D. Willbold, *J Pept Sci* **2012**, *18*, 691-695.
- [320] O. Wirths, C. Erck, H. Martens, A. Harmeier, C. Geumann, S. Jawhar, S. Kumar, G. Multhaup, J. Walter, M. Ingelsson, M. Degerman-Gunnarsson, H. Kalimo, I. Huitinga, L. Lannfelt, T. A. Bayer, *J Biol Chem* **2010**, *285*, 41517-41524.
- [321] J. M. Nussbaum, S. Schilling, H. Cynis, A. Silva, E. Swanson, T. Wangsanut, K. Tayler, B. Wiltgen, A. Hatami, R. Rönicke, K. Reymann, B. Hutter-Paier, A. Alexandru, W. Jagla, S. Graubner, C. G. Glabe, H. U. Demuth, G. S. Bloom, *Nature* **2012**, *485*, 651-655.
- [322] W. F. Xue, A. L. Hellewell, W. S. Gosal, S. W. Homans, E. W. Hewitt, S. E. Radford, *J Biol Chem* **2009**, *284*, 34272-34282.
- [323] C. Haupt, J. Leppert, R. Rönicke, J. Meinhardt, J. K. Yadav, R. Ramachandran, O. Ohlenschlager, K. G. Reymann, M. Görlach, M. Fändrich, *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51*, 1576-1579.
- [324] H. A. Scheidt, I. Morgado, S. Rothemund, D. Huster, *J Biol Chem* **2012**, *287*, 2017-2021.
- [325] H. A. Scheidt, I. Morgado, S. Rothemund, D. Huster, M. Fändrich, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 2837-2840.
- [326] H. A. Scheidt, J. Adler, M. Krueger, D. Huster, *Sci Rep* **2016**, *6*, 33531.
- [327] K. A. Ball, A. H. Phillips, D. E. Wemmer, T. Head-Gordon, *Biophys J* **2013**, *104*, 2714-2724.
- [328] M. Torok, S. Milton, R. Kayed, P. Wu, T. McIntire, C. G. Glabe, R. Langen, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 40810-40815.
- [329] J. T. Guo, R. Wetzel, Y. Xu, *Proteins* **2004**, *57*, 357-364.
- [330] I. Kheterpal, M. Chen, K. D. Cook, R. Wetzel, *J Mol Biol* **2006**, *361*, 785-795.
- [331] M. Huber, O. Y. Ovchinnikova, A. K. Schütz, R. Glockshuber, B. H. Meier, A. Böckmann, *Biomol NMR Assign* **2015**, *9*, 7-14.
- [332] M. Schmidt, A. Rohou, K. Lasker, J. K. Yadav, C. Schiene-Fischer, M. Fändrich, N. Grigorieff, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 11858-11863.
- [333] M. Vilar, L. Wang, R. Riek, *Methods Mol Biol* **2012**, *849*, 185-198.
- [334] M. Lehmann, *NMR-Untersuchungen an amyloiden Fibrillen des Parathyroidhormons*, Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2014**.
- [335] A. J. Baldwin, T. P. Knowles, G. G. Tartaglia, A. W. Fitzpatrick, G. L. Devlin, S. L. Shammis, C. A. Waudby, M. F. Mossuto, S. Meehan, S. L. Gras, J. Christodoulou, S. J. Anthony-Cahill, P. D. Barker, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 14160-14163.
- [336] S. K. Maji, D. Schubert, C. Rivier, S. Lee, J. E. Rivier, R. Riek, *PLoS Biol* **2008**, *6*, e17.
- [337] P. Arosio, T. C. Michaels, S. Linse, C. Mansson, C. Emanuelsson, J. Presto, J. Johansson, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, T. P. Knowles, *Nat Commun* **2016**, *7*, 10948.
- [338] Y. Yan, Y. Liu, M. Sorci, G. Belfort, J. W. Lustbader, S. S. Yan, C. Wang, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1724-1731.
- [339] G. Bitan, M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek, D. B. Teplow, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 330-335.
- [340] H. A. Lashuel, D. Hartley, B. M. Petre, T. Walz, P. T. Lansbury, Jr., *Nature* **2002**, *418*, 291.
- [341] H. A. Lashuel, D. M. Hartley, B. M. Petre, J. S. Wall, M. N. Simon, T. Walz, P. T. Lansbury, Jr., *J Mol Biol* **2003**, *332*, 795-808.
- [342] J. N. Buxbaum, Z. Ye, N. Reixach, L. Friske, C. Levy, P. Das, T. Golde, E. Masliah, A. R. Roberts, T. Bartfai, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 2681-2686.

- [343] I. Morgado, K. Wieligmann, M. Bereza, R. Rönicke, K. Meinhardt, K. Annamalai, M. Baumann, J. Wacker, P. Hortschansky, M. Malesevic, C. Parthier, C. Mawrin, C. Schiene-Fischer, K. G. Reymann, M. T. Stubbs, J. Balbach, M. Görlach, U. Horn, M. Fändrich, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 12503-12508.
- [344] M. M. Pallitto, J. Ghanta, P. Heinzelman, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3570-3578.
- [345] P. Kumaraswamy, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, *J Agric Food Chem* **2013**, *61*, 3278-3285.
- [346] X. Li, X. Zhang, A. R. Ladiwala, D. Du, J. K. Yadav, P. M. Tessier, P. E. Wright, J. W. Kelly, J. N. Buxbaum, *J Neurosci* **2013**, *33*, 19423-19433.
- [347] K. Watanabe, K. Nakamura, S. Akikusa, T. Okada, M. Kodaka, T. Konakahara, H. Okuno, *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, *290*, 121-124.
- [348] A. Deleersnijder, A. S. Van Rompuy, L. Desender, H. Pottel, L. Buee, Z. Debyser, V. Baekelandt, M. Gerard, *J Biol Chem* **2011**, *286*, 26687-26701.
- [349] A. Smajlovic, S. Berbic, C. Schiene-Fischer, M. Tusek-Znidaric, A. Taler, S. Jenko-Kokalj, D. Turk, E. Zerovnik, *FEBS Lett* **2009**, *583*, 1114-1120.
- [350] T. Ikura, N. Ito, *Protein Eng Des Sel* **2013**, *26*, 539-546.
- [351] G. Pappenberger, H. Aygun, J. W. Engels, U. Reimer, G. Fischer, T. Kiefhaber, *Nat Struct Biol* **2001**, *8*, 452-458.
- [352] G. Scherer, M. L. Kramer, M. Schutkowski, U. Reimer, G. Fischer, *J Am Chem Soc* **1998**, *120*, 5568-5574.
- [353] C. Scholz, G. Scherer, L. M. Mayr, T. Schindler, G. Fischer, F. X. Schmid, *Biol. Chem.* **1998**, *379*, 361-365.
- [354] L. J. Kanyenda, G. Verdile, R. Martins, B. P. Meloni, J. Chieng, F. Mastaglia, S. M. Laws, R. S. Anderton, S. Boulos, *J Alzheimers Dis* **2014**, *39*, 545-556.
- [355] Y. S. Ge, W. Y. Teng, C. D. Zhang, *Chin Med J (Engl)* **2009**, *122*, 716-724.
- [356] H. Hoffmann, C. Schiene-Fischer, *Biol Chem* **2014**, *395*, 721-735.
- [357] A. Tsuji, I. Tamai, A. Sakata, Y. Tenda, T. Terasaki, *Biochem Pharmacol* **1993**, *46*, 1096-1099.
- [358] S. Nag, B. Sarkar, A. Bandyopadhyay, B. Sahoo, V. K. Sreenivasan, M. Kombrabail, C. Muralidharan, S. Maiti, *J Biol Chem* **2011**, *286*, 13827-13833.
- [359] L. Hou, M. G. Zagorski, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 9260-9261.

7 Zusätzliche Methoden und Messungen

7.1 A β

7.1.1 Herstellung der Fibrillen und H/D-Austausch

Einfluss unterschiedlicher Wachstumsbedingungen

Die Herstellung der A β ₁₋₄₀ Fibrillen erfolgte durch Megan Garvey wie in der Literatur beschrieben^[314]. Die Fibrillen wurden die Fibrillen folgendermaßen hergestellt:

- Fibrillen aus Phosphatpuffer (P-Fibrillen): 100 μ M A β ₁₋₄₀, 5 mM Phosphat, 10 mM NaCl, pH 7,4, Inkubation bei 37 °C, 300 Upm für 90 h
- Fibrillen aus Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF-Fibrillen): 100 μ M A β ₁₋₄₀, 95 % ZSF, Inkubation bei 37 °C, 300 Upm für 90 h. Die Zerebrospinalflüssigkeit wurde *post-mortem* durch das Institut für Neuropathologie, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg entnommen. Die für den Amidprotonenaustausch verwendeten Proben stammen von Spender #1 (männlich, 47 Jahre) und #2 (weiblich, 76 Jahre)
- Fibrillen aus Zellkultur (ZK-Fibrillen): THP-1 monozytische Zellen wurden in Makrophagen differenziert und fünfmal mit ¹⁵N-markiertem A β ₁₋₄₀ gefüttert (Endkonzentration 60 μ g/ml). Bei der ersten Fütterungs-Prozedur wurden zusätzlich 100 ng/ml vorgeformte Fibrillen als *Seeds* zur Beschleunigung der Fibrillierung zugesetzt. Die Zellen wurden einen Tag nach der letzten Fütterung geerntet und die Fibrillen extrahiert.

Der H/D-Austausch wurde durch Zentrifugation (30 min, 12000 g) und Resuspendieren in deuteriertem Puffer (10 mM Phosphat, pH 7,4) gestartet. Nach 48 h bei 25 °C erfolgte ein weiterer Sedimentationsschritt um den Austausch zu stoppen. Zum Entfernen von Pufferrückständen wurden die Fibrillen mit D₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Probenaufbewahrung erfolgte bei -80 °C bis zu Messung. Referenzproben wurden identisch präpariert, wobei ausschließlich protonierter Puffer verwendet wurde.

Einfluss der Pyroglutamat-Modifikation

Die Herstellung der Fibrillen aus pyroglutamyliertem A β ₃₋₄₀ (pA β ₃₋₄₀) erfolgte durch Inkubation von 20 μ M Peptid in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) für 7 d bei 37 °C und 100 Upm. Für den H/D-Austausch wurden die Fibrillen sedimentiert (60 min, 15000 g) und in deuteriertem Puffer (50 mM Phosphat, pD 7,4) resuspendiert. Der Amidprotonenaustausch erfolgte für 100 h bei 25 °C. Der Austausch wurde durch Zentrifugation, Waschen in D₂O und Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Die Proben wurden bei -80 °C bis zur Messung gelagert. Zusätzlich wurden identisch präparierte Referenzproben mit protoniertem Puffer während der Austauschzeit untersucht. Zum Vergleich wurde das Experiment unter identischen Bedingungen mit A β ₁₋₄₀ durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

Die aufgetauten Proben wurden in 99,98 % deuteriertem Dimethylsulfoxid (d₆-DMSO) und 0,02 % deuterierter Trifluoressigsäure (d-TFA) gelöst. Die Proben wurden ca. 2 min gevortext um die Fibrillen vollständig zu disaggregieren. Anschließend wurde eine Serie von 15 ¹H-¹⁵N-HSQC Spektren aufgenommen. Zur Konzentrationskorrektur wurde zuvor und anschließend jeweils ein ¹H-Spektrum aufgenommen und die Konzentration durch das Integral der Signalintensität von 0 bis 2,07 ppm bestimmt. Alle Messungen waren spätestens 85 min nach dem Auflösen der Proben abgeschlossen.

Die ¹H-¹⁵N-Korrelationsspektren wurden mittels NMRPipe prozessiert und die Intensitäten der Kreuzsignale mittels NMRView ermittelt. Die Position der Kreuzsignale hängt stark von den Wasserrückständen in den finalen NMR-Proben ab. Für A β ₁₋₄₀ konnte die Zuordnung durch eine Titration mit H₂O eindeutig von der Literatur^[201] auf die experimentellen Bedingungen übertragen werden. Diese Zuordnung konnte für die Aminosäuren 6-40 auch für pA β ₃₋₄₀ übertragen werden. Das zusätzlich auftretende Kreuzsignal bei 7,75/121,85 ppm entspricht relativ genau der Resonanz, welche unter identischen Bedingungen bei L-Pyroglutaminsäure (Sigma-Aldrich) beobachtet werden kann (7,90/121,10 ppm) und wurde dieser zugeordnet. Zusätzliche Kreuzsignale konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Zuordnungen sind in Tabelle 12 aufgelistet.

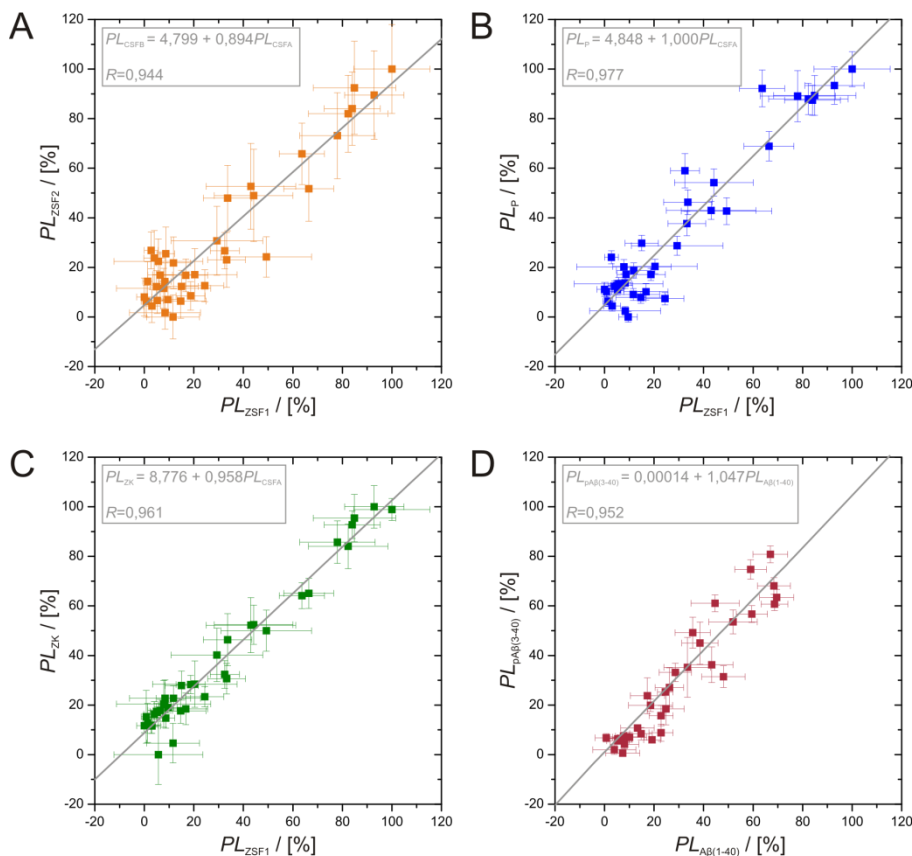


Abbildung S1: Korrelation der Protonierungslevel der verschiedenen A β ₁₋₄₀-Fibrillen nach HD-Austausch.

A-C: Dargestellt sind die Protonierungslevel der ZSF- (Spender #2) (A), der P- (B) und der ZK-Fibrillen (C) in Abhängigkeit der Protonierungslevel der ZSF-Fibrillen (Spender #1). D: Vergleich der Protonierungslevel der pA β ₃₋₄₀-Fibrillen mit A β ₁₋₄₀-Fibrillen. Die graue Linie entspricht einer linearen Regression, in der Legende sind die entsprechenden Parameter angegeben.

Tabelle 12: Zuordnung der ^1H - ^{15}N -Kreuzsignale von Aβ₁₋₄₀ bzw. pAβ₃₋₄₀ in 99,98 % d₆-DMSO/0,02 % d-TFA mit Wasserrückständen von ca. 3 %.

Aβ ₁₋₄₀			pAβ ₃₋₄₀		
Aminosäure	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	Aminosäure	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]
D1					
A2	8,57	122,09			
E3	8,05	116,54	pE3	7,75	121,85
F4	7,91	117,14	F4		
R5	8,29	118,66	R5		
H6	8,25	116,95	H6	8,23	116,59
D7	8,40	119,12	D7	8,40	118,94
S8	8,11	114,15	S8	8,10	114,08
G9	8,04	106,70	G9	8,06	106,90
Y10	8,01	116,42	Y10	7,99	116,49
E11	8,23	118,11	E11	8,21	118,21
V12	7,78	116,16	V12	7,78	116,25
H13	8,35	119,40	H13	8,33	119,42
H14	8,28	117,82	H14	8,25	117,72
Q15			Q15		
K16	8,22	119,68	K16	8,22	119,71
L17	7,99	120,17	L17	7,99	120,23
V18	7,75	115,90	V18	7,75	115,99
F19	7,92	119,24	F19	7,92	119,29
F20	8,12	117,14	F20	8,11	117,19
A21	8,19	121,46	A21	8,19	121,55
E22	8,02	115,71	E22	8,01	115,72
D23	8,28	118,33	D23	8,28	118,33
V24	7,68	114,37	V24	7,67	114,44
G25	8,14	107,96	G25	8,15	108,02
S26	7,96	112,56	S26	7,96	112,60
N27	8,26	119,53	N27	8,26	119,48
K28	8,00	117,66	K28	8,00	117,73
G29	8,13	105,46	G29	8,14	105,55
A30	7,87	119,91	A30	7,87	119,97
I31	7,90	115,87	I31	7,90	115,91
I32	7,74	119,12	I32	7,74	119,28
G33	8,11	108,61	G33	8,11153	108,72
L34	7,88	118,07	L34	7,87071	118,09
M35	8,17	118,40	M35	8,16295	118,44
V36	7,66	115,07	V36	7,66597	115,20
G37	8,22	108,32	G37	8,22175	108,43
G38	8,04	105,17	G38	8,03336	105,22
V39	7,80	114,19	V39	7,78564	114,24
V40	8,04	117,36	V40	8,04301	117,45
N27sc1	7,47	110,83	N27sc1	7,47698	110,88
N27sc2	7,01	110,84	N27sc2	7,00944	110,90
Q15sc1	7,31	109,37	Q15sc1	7,31777	109,45
Q15sc2	6,89	109,37	Q15sc2	6,88251	109,44
			?	7,46846	118,64
			?	7,88262	114,08
			?	7,95987	113,22
			?	8,06891	116,20
			sc?	7,24496	110,42
			sc?	6,95101	110,43
			sc?	7,75191	112,02
			sc?	7,18858	111,99

7.1.2 Untersuchung von Varianten

Tabelle 13: Sequenz und Eigenschaften der verwendeten Primer für die QuikChange PCR. Die Positionen der zu veränderten Aminosäuren sind farbig hinterlegt (19 gelb, 34 hellgrün).

A β ₁₋₄₀ Variante	ursprüngliche DNA-Sequenz bzw. verwendete Primer	GC-Gehalt / [%]	Anzahl Basenpaare	Schmelztemperatur / [°C]	T _A / [°C]
Wildtyp	... CAT CAC CAG AAA CTG GTA TTC TTC GCA GAA GAC GTG GGT TCT AAC AAA GGC GCT ATC ATC GGT CTG ATG GTT GGC GGT GTA GTT ...				
F19G	for: CAG AAA CTG GTA GGC TTC GCA GAA GAC GTG rev: TT CTG CGA AGC CTA CCA GTT TCT GGT G	53	30	64,4	63,0
F19P	for: G AAA CTG GTA CCG TTC GCA GAA GAC rev: GTC TTC TGC GAA CGG TAC CAG TTT CTG	54	28	62,9	TD57, 6-
F19E	for: G AAA CTG GTA GAA TTC GCA GAA GAC GTG GG rev: CAC GTC TTC TGC GAA TTC TAC CAG TTT CTG	50	30	63,0	60,4
F19K	for: G AAA CTG GTA AAA TTC GCA GAA GAC GTG GG rev: CGT CTT CTG CGA ATT TTA CCA GTT TCT GGTG	47	30	61,6	60,4
F19Y	for: GAA ACT GGT ATA TTT CGC AGA AGA CGT GGG rev: CGT CTT CTG CGA AAT ATA CCA GTT TCT	47	30	61,6	60,4
F19K	for: GGC GCT ATC ATC GGT GAA ATG GTT GGC GGT G rev: CTA CAC CGC CAA CCA TTT CAC CGA TGA TAG C	58	31	67,0	65,6
L34E	for: GGC GCT ATC ATC GGT AAA ATG GTT GGC GGT G rev: CTA CAC CGC CAA CCA TTT TAC CGA TGA TAG C	55	31	65,7	61,9
F19K	for: GGC GCT ATC ATC GGT GTT ATG GTT GGC GGT G rev: CTA CAC CGC CAA CCA TAA CAC CGA TGA TAG C	48	31	63,0	
L34V	for: GGC GCT ATC ATC GGT GTT ATG GTT GGC GGT G rev: CTA CAC CGC CAA CCA TAA CAC CGA TGA TAG C	58	31	67,0	64,3
		52	31	64,4	

Präparation der Proben

Alle Peptide wurden zunächst mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml in 25 mM Na₂HPO₄; 150 mM NaCl; 0,01 % (m/V) NaN₃; pH 9,0 gelöst und bei 4 °C zweimal für mindestens 2 h gegen denselben Puffer mit pH 7,4 dialysiert. Anschließend wurde die Peptidkonzentration auf 50 μ M eingestellt. Alle Proben enthielten 90 % H₂O und 10 % D₂O.

Die Resonanzzuordnung basiert veröffentlichten Daten^[359] und wurde mittels ¹H-¹⁵N-TOCSY-HSQC und ¹H-¹⁵N-NOESY-HSQC auf die experimentellen Bedingungen sowie auf A β ₁₋₄₀ F19K L34E übertragen. Für A β ₁₋₄₀ F19K L34E konnten die mit * markierten Kreuzsignale bei 8,15/126,4 ppm bzw. 7,94/122,3 ppm (¹H/¹⁵N) nicht eindeutig zugeordnet werden.

Tabelle 14: Zuordnung und Amidprotonenaustauschraten der ^1H - ^{15}N -Kreuzsignale von A β_{1-40} bzw. A β_{1-40} F19K L34E in 25 mM Na $_2$ HPO $_4$, 150 mM NaCl, pH 7,4, 0,03 % (m/V) NaN $_3$ bei 8 °C^[131].

A β_{1-40}				A β_{1-40} F19K L34E			
Aminosäure	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	k_{ex} / [s $^{-1}$]	Aminosäure	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	k_{ex} / [s $^{-1}$]
D1				D1			
A2				A2			
E3	8,27	120,30	9,44 \pm 0,32	E3	8,28	120,27	10,97 \pm 0,82
F4	8,05	122,20	4,69 \pm 0,23	F4	8,04	120,96	12,02 \pm 0,50
R5	7,94	123,61	12,77 \pm 0,45	R5	7,94	123,61	12,28 \pm 0,58
H6	8,10	121,59	8,11 \pm 0,26	H6	8,10	121,59	10,72 \pm 0,64
D7				D7			
S8	8,23	116,52	8,11 \pm 0,26	S8	8,23	116,54	28,15 \pm 2,82
G9	8,34	110,66	20,08 \pm 0,65	G9	8,35	110,64	20,37 \pm 0,97
Y10	7,75	119,98	7,72 \pm 0,47	Y10	7,76	120,02	8,60 \pm 0,74
E11	8,20	122,48	7,35 \pm 0,27	E11	8,20	122,45	6,19 \pm 4,10
V12	7,89	121,04	5,19 \pm 0,63	V12	7,98	120,96	3,95 \pm 0,93
H13				H13			
H14	8,00	121,04		H14	8,04	120,96	54,03 \pm 10,99
Q15	8,21	121,35	33,13 \pm 1,90	Q15	8,20	121,16	28,62 \pm 2,31
K16	8,21	122,90	15,11 \pm 0,71	K16	8,19	122,61	18,44 \pm 1,10
L17	8,07	123,71	8,06 \pm 0,51	L17	8,04	123,56	8,89 \pm 7,90
V18	7,81	121,36	5,47 \pm 0,67	V18	7,89	120,96	3,92 \pm 0,66
F19	8,08	124,23	8,04 \pm 0,22	K19			
F20	8,04	122,85	10,60 \pm 0,40	F20	8,11	122,60	5,52 \pm 0,82
A21	8,06	126,08	9,09 \pm 0,66	A21	8,08	125,57	10,59 \pm 1,04
E22	8,18	119,89	6,76 \pm 0,33	E22	8,16	119,95	7,56 \pm 0,41
D23	8,23	121,61	9,56 \pm 0,25	D23	8,25	121,66	8,97 \pm 0,78
V24	7,96	120,52	4,70 \pm 0,47	V24	7,98	120,49	5,34 \pm 0,83
G25	8,36	111,70	15,67 \pm 0,65	G25	8,36	111,73	15,83 \pm 0,92
S26	7,98	115,49	30,75 \pm 2,34	S26	7,99	115,48	34,01 \pm 2,58
N27	8,31	120,55	63,37 \pm 7,48	N27	8,32	120,60	53,37 \pm 10,26
K28	8,16	121,65	26,86 \pm 1,80	K28	8,16	121,68	29,31 \pm 3,53
G29	8,24	109,52	20,16 \pm 0,66	G29	8,25	109,67	19,51 \pm 1,10
A30	7,85	123,48	9,92 \pm 0,28	A30	7,87	123,55	9,46 \pm 0,50
I31	7,80	120,59	4,82 \pm 0,44	I31	8,06	120,41	6,58 \pm 0,50
I32	8,10	126,01	5,43 \pm 0,45	I32	8,12	125,41	9,90 \pm 6,76
G33	8,28	112,95	10,68 \pm 0,41	G33	8,32	113,35	10,02 \pm 0,64
L34	7,87	121,58	6,91 \pm 0,52	E34			
M35	8,27	121,82	9,04 \pm 0,35	M35	8,32	121,92	9,41 \pm 0,71
V36	8,08	122,48	22,55 \pm 1,43	V36	8,06	122,39	22,80 \pm 1,46
G37	8,41	113,02	18,17 \pm 1,22	G37	8,43	113,09	12,93 \pm 0,64
G38	8,08	108,64	12,25 \pm 0,98	G38	8,08	108,68	11,38 \pm 0,60
V39	7,90	119,80	4,71 \pm 0,22	V39	7,90	119,86	4,42 \pm 0,54
V40	7,64	128,50		V40	7,65	128,62	
R5sc	7,38	112,71		R5sc	7,12	121,42	
N27sc1	6,71	112,69		N27sc1	7,39	112,68	
N27sc2	7,46	113,11		N27sc2	6,71	112,68	
Q15sc1	6,75	113,09		Q15sc1	7,46	113,13	
Q15sc2	7,12	121,45		Q15sc2	6,75	113,13	
				?	8,15	126,4	
				?	7,94	122,3	

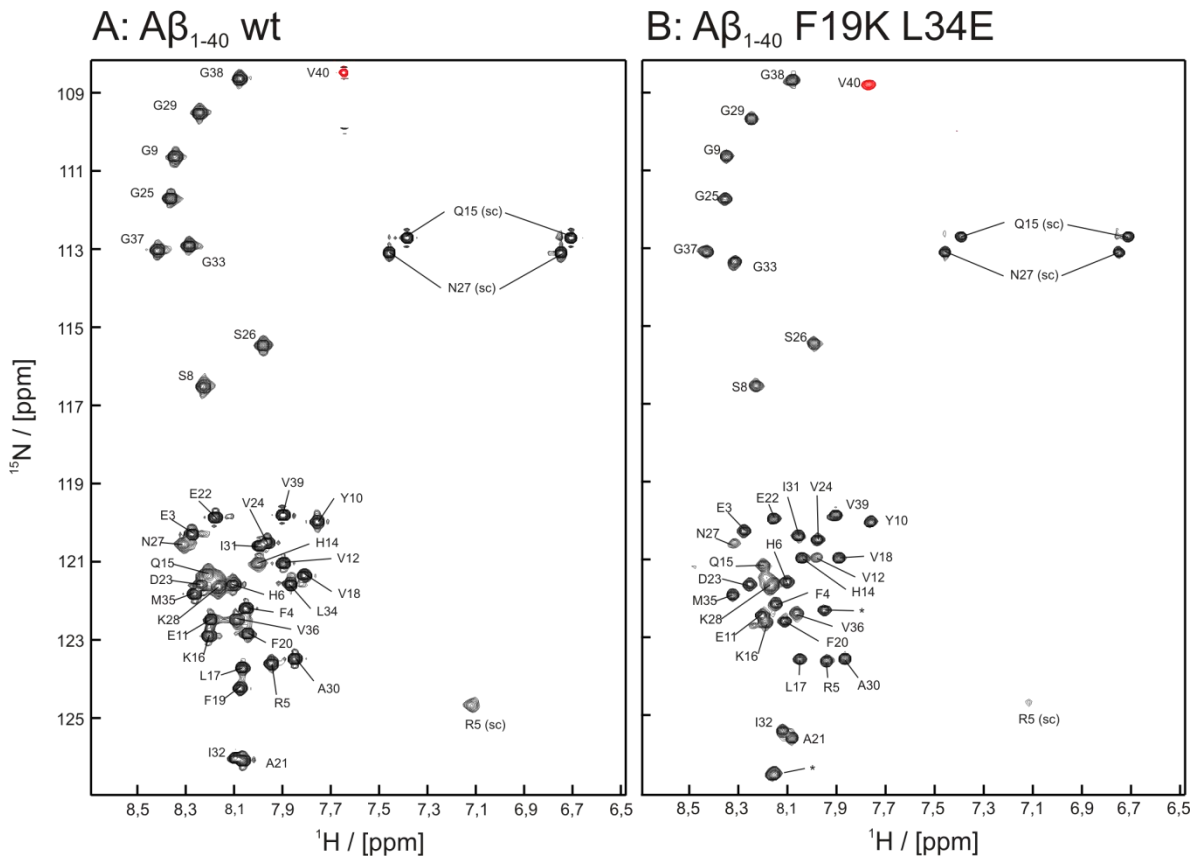


Abbildung S2: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von A β_{1-40} wt (A) und A β_{1-40} F19K L34E (B). Die Amidgruppen und Seitenkettensignale (sc) sind beschriftet. Für A β_{1-40} F19K L34E konnten die mit * markierten Kreuzsignale bei 8,15/126,4 ppm und 7,94/122,3 ppm nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Messungen erfolgten mit einer Peptidkonzentration von 50 μM in 25 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl , pH 7,4, 0,03 % (m/V) NaN_3 bei 8 $^\circ\text{C}$.

7.1.3 Interaktion von A β ₁₋₄₀ mit CypD

Die Resonanzzuordnung der Kreuzsignale im ^1H - ^{15}N -HSQC von A β ₁₋₄₀ basiert veröffentlichten Daten^[359] und wurde mittels ^1H - ^{15}N -TOCSY-HSQC und ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC auf die experimentellen Bedingungen übertragen. Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Die Zuordnung von CypD basiert auf ebenfalls auf publizierten Daten^[145]. Diese wurden mittels ^1H - ^{15}N -TOCSY-HSQC, ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC, HNCA-, HNCACB und HNCOCACB-Spektren auf die experimentellen Bedingungen übertragen^[170]. Alle Proben enthielten 90% H₂O und 10% D₂O. Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 16 aufgelistet.

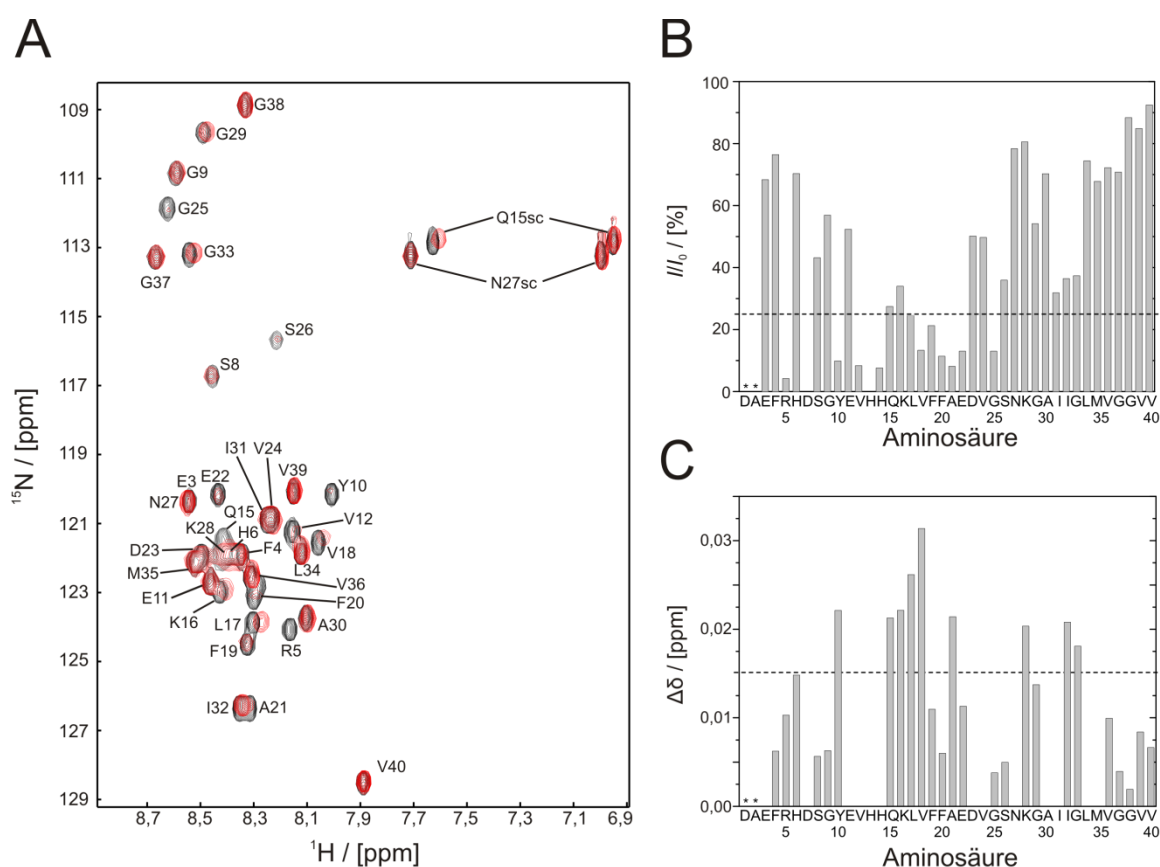


Abbildung S3: Interaktion von A β ₁₋₄₀ mit CypD.

A: ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum von 50 μM A β ₁₋₄₀ (schwarz) und in Gegenwart CypD (1:1,5 A β ₁₋₄₀: CypD). Die Messung erfolgte in 35mM HEPES, pH 7,8 bei 8 °C.

B, C: Abnahme der Signalintensität (B) und Änderung der chemischen Verschiebung (C) infolge der Zugabe eines 1,5 fachen molaren Überschusses von CypD. Die unterbrochenen Linien markierten einen Signalabfall auf 25 % des Ausgangswertes (B) bzw. eine Änderung der chemischen Verschiebung von $\Delta\delta = 0,015$ ppm. Die Messung wurde von Rolf Sachs durchgeführt.

Zusätzliche Methoden und Messungen: A β

Tabelle 15: Zuordnung der ^1H - ^{15}N -Kreuzsignale von A β_{1-40} in Abwesenheit und Anwesenheit von CypD. Die Messung wurde von Rolf Sachs durchgeführt.

Aminosäure	A β_{1-40}			A β_{1-40} mit 1,5 fachem Überschuss CypD			I _S / I ₀ [%]	$\Delta\delta$ / [ppm]
	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	I ₀ / [a.u.]	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	I _S / [a.u.]		
D1								
A2								
E3	8,284	120,132	18,1	8,284	120,132	8,7	48,1	0,000
F4	8,088	121,785	18,4	8,097	121,791	9,9	53,8	0,006
R5	7,904	123,873	13,0	7,889	123,878	0,4	3,0	0,010
H6	8,137	121,664	11,9	8,116	121,678	5,9	49,5	0,015
D7								
S8	8,196	116,560	7,9	8,202	116,531	2,4	30,4	0,006
G9	8,336	110,663	10,8	8,328	110,638	4,3	40,1	0,006
Y10	7,751	119,978	16,6	7,752	119,822	1,2	7,0	0,022
E11	8,207	122,466	19,2	8,207	122,466	7,1	36,9	0,000
V12	7,894	121,001	18,9	7,894	121,001	1,1	5,9	0,000
H13								
H14	7,898	121,178	15,9	7,898	121,178	0,9	5,4	0,000
Q15	8,156	121,204	7,3	8,132	121,293	1,4	19,4	0,021
K16	8,171	122,799	10,9	8,146	122,700	2,6	23,9	0,022
L17	8,044	123,737	16,9	8,015	123,620	2,9	17,3	0,026
V18	7,801	121,373	19,3	7,779	121,180	1,8	9,4	0,031
F19	8,068	124,282	15,7	8,069	124,205	2,4	15,0	0,011
F20	8,040	122,905	16,8	8,032	122,889	1,4	8,0	0,006
A21	8,057	126,180	18,3	8,044	126,044	1,1	5,7	0,021
E22	8,176	119,966	18,1	8,173	120,045	1,7	9,2	0,011
D23	8,243	121,796	21,3	8,243	121,796	7,5	35,3	0,000
V24	7,972	120,665	22,6	7,972	120,665	7,9	35,0	0,000
G25	8,364	111,696	11,4	8,359	111,684	1,0	9,2	0,004
S26	7,956	115,488	4,8	7,953	115,457	1,2	25,3	0,005
N27	8,288	120,232	16,7	8,288	120,232	9,2	55,2	0,000
K28	8,167	121,742	8,3	8,143	121,659	4,7	56,7	0,020
G29	8,231	109,505	8,2	8,217	109,440	3,1	38,1	0,014
A30	7,842	123,557	16,6	7,842	123,557	8,2	49,5	0,000
I31	7,989	120,709	26,8	7,989	120,709	6,0	22,4	0,000
I32	8,095	126,176	23,4	8,082	126,044	6,0	25,7	0,021
G33	8,284	113,028	15,3	8,264	112,953	4,0	26,3	0,018
L34	7,865	121,675	20,4	7,865	121,675	10,7	52,4	0,000
M35	8,260	121,946	17,9	8,260	121,946	8,6	47,8	0,000
V36	8,058	122,236	20,9	8,044	122,247	10,6	50,9	0,010
G37	8,412	113,069	11,6	8,407	113,059	5,8	49,9	0,004
G38	8,073	108,679	14,0	8,071	108,676	8,7	62,2	0,002
V39	7,891	119,881	25,5	7,889	119,822	15,3	59,8	0,008
V40	7,630	128,358	20,5	7,628	128,312	13,3	65,1	0,007
R5sc	7,113	112,478	-0,4	7,113	112,478	-0,2	57,6	0,000
N27sc1	7,370	112,651	22,6	7,346	112,612	3,6	15,9	0,017
N27sc2	6,694	112,665	22,7	6,687	112,612	9,2	40,4	0,009
Q15sc1	7,454	113,054	16,8	7,451	113,051	4,1	24,1	0,002
Q15sc2	6,739	113,049	21,1	6,733	113,043	11,2	53,0	0,004

Tabelle 16: ^1H und ^{15}N Verschiebungen von CypD in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 25°C, referenziert auf DSS. Hervorgehoben wurden die Aminosäuren, welche in Gegenwart eines fünffachen Überschusses an A β 1-40 Änderungen der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta > 0,01$ bzw. $\Delta\delta > 0,02$) oder der Signalintensität ($I_s/I_0 < 40\%$) aufweisen. Die Messung wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt^[170].

Aminosäure	CypD alleine			In Gegenwart von fünffachem A β 1-40 Überschuss			$\Delta\delta$ / [ppm]	I_s/I_0 / [%]
	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	I_0 / [a.u.]	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	I_s / [a.u.]		
S1								
G2								
N3	8,184	122,616	10,28	8,184	122,616	4,743	0,000	78,0
P4								
L5	8,478	121,908	14,85	8,478	121,908	3,877	0,000	44,2
V6	9,079	115,702	12,08	9,079	115,702	3,112	0,000	43,6
Y7	8,664	117,233	12,80	8,661	117,231	3,353	0,002	44,3
L8	8,944	116,946	10,30	8,941	116,946	2,804	0,002	46,1
D9	9,130	126,611	10,25	9,130	126,611	2,835	0,000	46,8
V10	8,095	119,489	21,11	8,092	119,484	6,403	0,002	51,3
D11	9,493	128,094	10,64	9,492	128,054	2,673	0,006	42,5
A12	8,550	119,237	13,03	8,552	119,279	4,044	0,006	52,5
N13	9,253	126,369	10,49	9,253	126,384	3,524	0,002	56,8
G14	8,777	104,734	7,19	8,777	104,734	2,691	0,000	63,4
K15	7,647	122,599	19,59	7,647	122,599	6,023	0,000	52,0
P16								
L17	9,733	123,326	6,01	9,730	123,324	1,493	0,003	42,0
G18	7,632	105,578	16,45	7,630	105,578	4,865	0,002	50,0
R19	8,235	122,086	13,53	8,235	122,086	4,317	0,000	54,0
V20	9,484	127,181	9,72	9,482	127,201	2,565	0,003	44,7
V21	8,856	127,435	14,18	8,854	127,433	3,543	0,002	42,3
L22	9,573	129,535	9,84	9,572	129,533	2,689	0,001	46,2
E23	8,581	123,310	12,55	8,584	123,310	3,668	0,002	49,5
L24	8,422	125,188	16,08	8,418	125,166	7,123	0,004	74,9
K25	8,831	125,801	11,22	8,830	125,8177	3,202	0,002	48,3
A26	8,140	129,294	16,32	8,142	129,294	4,878	0,001	50,6
D27	9,024	114,753	16,34	9,023	114,753	5,012	0,001	51,9
V28	7,548	120,371	15,64	7,548	120,380	4,582	0,001	49,6
V29	8,218	114,337	14,78	8,219	114,329	4,141	0,001	47,4
P30								
K31	10,713	123,181	5,11	10,719	123,189	1,427	0,004	47,3
T32	10,293	125,314	4,81	10,286	125,304	1,284	0,005	45,2
A33	9,215	126,282	14,52	9,213	126,266	4,313	0,003	50,3
E34	7,991	118,203	18,64	7,993	118,212	5,156	0,002	46,8
N35	7,067	115,595	14,14	7,065	115,591	3,933	0,001	47,0
F36	7,016	117,951	12,72	7,014	117,971	3,487	0,003	46,4
R37	8,844	119,884	12,91	8,844	119,884	3,802	0,000	49,8
A38	8,385	118,736	15,76	8,382	118,742	4,230	0,002	45,4
L39	7,882	122,778	13,14	7,883	122,752	3,784	0,004	48,7
C40	7,852	120,710	14,76	7,853	120,714	4,258	0,001	48,8
T41	7,981	107,788	15,11	7,981	107,788	3,946	0,000	44,2
G42	7,746	108,837	13,01	7,744	108,825	3,508	0,002	45,6
E43	7,954	119,182	13,00	7,954	119,182	3,476	0,000	45,2
K44	9,080	119,285	11,02	9,076	119,287	3,142	0,003	48,2
G45	7,917	106,281	14,34	7,917	106,251	4,012	0,004	47,3
F46	6,357	114,400	11,84	6,353	114,400	3,623	0,003	51,8
G47	7,644	105,301	13,10	7,637	105,315	4,413	0,005	57,0
Y48	6,820	113,917	9,88	6,804	113,807	2,650	0,019	45,4
K49	8,412	125,129	25,62	8,412	125,126	7,123	0,000	47,0
G50	9,671	118,442	6,73	9,670	118,416	1,657	0,004	41,7
S51	8,516	116,962	9,61	8,515	116,937	3,136	0,004	55,2
T52	9,622	107,912	1,14	9,571	107,040	0,427	0,039	63,4
F53	8,400	121,638	8,10	8,387	121,611	2,039	0,009	42,6
H54	7,396	120,470	3,84	7,417	120,486	1,375	0,016	60,5
R55	6,735	124,656	7,68	6,728	124,544	2,050	0,017	45,2
V56	9,306	129,415	7,21	9,306	129,397	2,163	0,003	50,8
I57	8,564	128,337	12,06	8,544	128,271	3,091	0,016	43,4
P58								
S59	9,620	115,704	8,13	9,618	115,684	2,460	0,003	51,2
F60	7,528	115,243	16,61	7,509	115,130	4,860	0,021	49,5
M61	8,094	112,739	11,59	8,069	112,796	2,316	0,020	33,8
C62	8,417	116,143	9,03	8,415	115,961	3,001	0,026	56,3
Q63	9,400	128,377	7,54	9,385	128,471	2,013	0,017	45,2
A64	7,960	126,897	7,35	7,980	126,797	2,356	0,021	54,2
G65								
D66	10,021	125,247	2,57	10,010	125,188	0,767	0,012	50,5
F67								
T68								

Zusätzliche Methoden und Messungen: A β

Aminosäure	CypD alleine			In Gegenwart von fünffachem A β_{1-40} Überschuss			$\Delta\delta$ / [ppm]	I_5/I_0 / [%]
	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	I_0 [a.u.]	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	I_5 [a.u.]		
N69	8,593	121,188	6,52	8,611	121,203	1,722	0,013	44,7
H70								
N71	7,555	113,165	10,48	7,561	113,208	2,91	0,007	47,0
G72	9,707	110,962	1,14	9,683	110,911	0,47	0,018	70,0
T73	7,965	113,197	12,10	7,965	113,197	3,47	0,000	48,5
G74	8,565	113,953	11,19	8,538	113,807	2,34	0,028	35,4
G75	8,030	109,996	4,30	7,990	109,688	1,31	0,052	51,5
K76	6,987	116,254	10,35	6,961	116,391	1,88	0,027	30,7
S77	7,726	115,105	13,64	7,749	115,153	1,97	0,018	24,4
I78	8,590	112,425	8,79	8,590	112,425	2,55	0,000	49,0
Y79	8,033	121,230	12,70	8,030	121,191	3,85	0,006	51,3
G80	7,108	106,961	5,07	7,126	106,961	1,60	0,013	53,2
S81								
R82								
F83	9,102	118,684	10,83	9,086	118,725	2,59	0,013	40,5
P84								
D85	8,729	120,491	12,30	8,731	120,514	3,37	0,003	46,3
E86	9,282	132,652	6,45	9,294	132,740	1,90	0,015	49,8
N87	6,996	107,673	14,68	6,100	107,643	5,05	0,005	58,2
F88	8,265	113,804	13,23	8,265	113,818	3,86	0,002	49,3
T89	8,513	118,817	18,60	8,513	118,817	5,69	0,000	51,7
L90	8,100	119,455	19,95	8,099	119,455	5,72	0,001	48,5
K91	8,261	119,244	13,41	8,260	119,277	4,07	0,005	51,3
H92	10,828	124,106	2,51	10,823	124,151	0,93	0,007	62,7
V93	7,002	114,549	11,85	7,001	114,523	3,75	0,004	53,6
G94	7,269	106,301	16,85	7,269	106,309	4,65	0,001	46,7
P95								
G96	8,975	110,531	7,45	8,972	110,549	2,11	0,003	47,9
V97	6,611	120,236	12,50	6,605	120,249	3,48	0,005	47,1
L98	7,348	130,468	10,74	7,332	130,491	2,90	0,011	45,7
S99	8,245	122,085	12,81	8,245	122,085	3,83	0,000	50,6
M100	8,524	124,045	12,50	8,490	123,988	2,69	0,025	36,5
A101	8,171	127,025	6,87	8,202	126,947	1,36	0,025	33,4
N102	8,377	114,409	13,30	8,326	114,390	0,49	0,036	6,2
A103	8,814	123,968	7,23	8,781	123,907	1,24	0,025	28,9
G104	8,153	109,990	16,68	8,112	109,836	2,60	0,036	26,4
P105								
N106	8,927	119,492	9,98	8,917	119,519	3,06	0,008	51,8
T107	10,324	111,345	5,06	10,309	111,322	1,69	0,011	56,6
N108	7,078	120,836	15,43	7,070	120,730	4,49	0,016	49,2
G109	9,144	111,602	8,49	9,136	111,534	1,85	0,011	36,9
S110	8,844	117,848	9,56	8,788	117,833	1,02	0,040	18,0
Q111								
F112	8,746	119,607	6,27	8,755	119,699	1,80	0,015	48,5
F113	9,691	115,891	7,38	9,699	115,943	2,25	0,009	51,6
H114	8,725	118,119	8,96	8,743	118,097	2,90	0,013	54,8
C115	9,086	126,314	11,51	9,061	126,194	3,29	0,025	48,3
T116	8,823	114,265	9,06	8,854	114,271	2,36	0,022	44,0
I117	7,581	118,829	14,46	7,574	118,808	4,16	0,006	48,7
K118	8,253	121,666	19,58	8,255	121,643	3,39	0,004	29,3
T119	7,797	121,965	8,74	7,802	122,007	2,70	0,007	52,3
D120	8,374	122,304	13,55	8,368	122,264	4,26	0,007	53,2
W121	7,337	118,933	19,12	7,337	118,987	4,07	0,008	36,0
L122	7,092	120,749	13,38	7,077	120,704	5,03	0,012	63,7
D123	7,535	123,525	14,22	7,528	123,470	4,46	0,009	53,2
G124	9,487	112,184	5,79	9,480	112,186	1,71	0,005	50,0
K125	7,844	116,311	13,82	7,831	116,347	3,96	0,010	48,5
H126	7,498	119,990	15,62	7,450	120,047	3,61	0,008	39,1
V127	8,526	125,243	11,36	8,511	125,243	2,73	0,011	40,7
V128	9,624	103,732	-5,85	9,606	103,688	-1,59	0,015	46,0
F129	8,204	118,310	19,62	8,204	118,310	5,91	0,000	51,0
G130	7,256	108,089	15,26	7,256	108,089	4,16	0,000	46,1
H131	8,431	119,733	14,17	8,431	119,704	3,90	0,004	46,6
V132	8,640	123,232	12,65	8,638	123,280	3,24	0,007	43,4
K133	9,561	132,871	6,25	9,562	132,887	1,76	0,002	47,7
E134	7,898	116,396	17,22	7,898	116,396	5,03	0,000	49,4
G135	8,831	110,580	-7,32	8,828	110,582	-1,97	0,002	45,5
M136	8,997	122,951	1,03	8,992	122,951	0,69	0,004	113,8
D137	9,130	116,963	2,02	9,121	116,963	1,33	0,006	111,6
V138	7,434	124,649	15,23	7,434	124,649	4,80	0,000	53,4
V139	7,517	121,608	25,50	7,517	121,608	8,10	0,000	53,8
K140	8,121	117,883	15,60	8,120	117,855	4,70	0,004	51,0
K141	7,531	121,608	20,41	7,531	121,608	6,27	0,000	52,0

Aminosäure	CypD alleine			In Gegenwart von fünffachem A β_{1-40} Überschuss			$\Delta\delta$ / [ppm]	I_S/I_0 / [%]
	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	I_0 / [a.u.]	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	I_S / [a.u.]		
I142	8,104	121,779	12,31	8,104	121,789	3,68	0,001	50,6
E143	8,215	118,306	16,07	8,215	118,306	4,66	0,000	49,0
S144	7,300	114,106	12,07	7,300	114,094	4,02	0,002	56,4
F145	7,688	120,358	15,46	7,688	120,358	4,54	0,000	49,6
G146	7,800	106,050	14,42	7,800	106,058	4,21	0,001	49,4
S147	8,227	110,813	14,12	8,222	110,825	4,63	0,004	55,4
K148								
S149								
G150	8,059	113,980	12,79	8,048	113,885	4,01	0,016	53,0
R151	7,306	119,891	17,48	7,312	119,893	5,14	0,004	49,7
T152	8,783	117,110	10,55	8,788	117,063	3,69	0,007	59,2
S153	9,519	117,263	-5,62	9,517	117,283	-1,61	0,003	48,4
K154	7,341	118,949	22,67	7,342	118,949	6,07	0,000	45,3
K155	8,419	123,463	9,79	8,419	123,463	3,92	0,000	67,7
I156	9,317	103,988	-7,61	9,315	103,927	-2,61	0,009	57,9
V157	8,634	128,941	13,03	8,634	128,925	3,72	0,002	48,3
I158	8,993	126,619	8,26	8,993	126,619	2,48	0,000	50,8
T159	8,794	126,193	12,89	8,793	126,193	3,50	0,000	45,9
D160	8,058	115,954	17,80	8,058	115,954	4,78	0,000	45,4
C161	8,181	116,188	19,65	8,181	116,188	5,67	0,000	48,8
G162	6,520	132,749	-10,34	6,519	132,746	-2,86	0,001	46,7
Q163	9,083	121,557	12,08	9,081	121,557	3,50	0,001	49,0
L164	9,069	127,856	8,57	9,069	127,856	2,52	0,000	49,7
S165	8,076	121,124	18,43	8,073	121,124	6,87	0,002	63,1
N3sc1	6,924	111,851		6,926	111,833	6,88	0,003	
N3sc2	7,970	111,851		7,970	111,833	7,92	0,003	
N69sc1	7,420	111,685		7,424	111,662	7,37	0,004	
N69sc2	6,636	111,685		6,637	111,662	6,59	0,003	
N87sc1	7,828	116,792		7,825	116,787	7,78	0,002	
N87sc2	6,559	116,792		6,559	116,787	6,51	0,001	
N106sc1	7,764	117,241		7,765	117,254	7,72	0,002	
N106sc2	7,128	117,241		7,128	117,254	7,08	0,002	
N108sc1	7,556	113,175		7,561	113,207	7,51	0,006	
N108sc2	5,898	113,175		5,910	113,207	5,86	0,010	
W121sc	9,933	131,028		10,055	131,246	10,01	0,092	
Q163sc1	7,968	111,192		7,968	111,192	7,92	0,000	
Q163sc2	7,153	111,192		7,153	111,192	7,10	0,000	

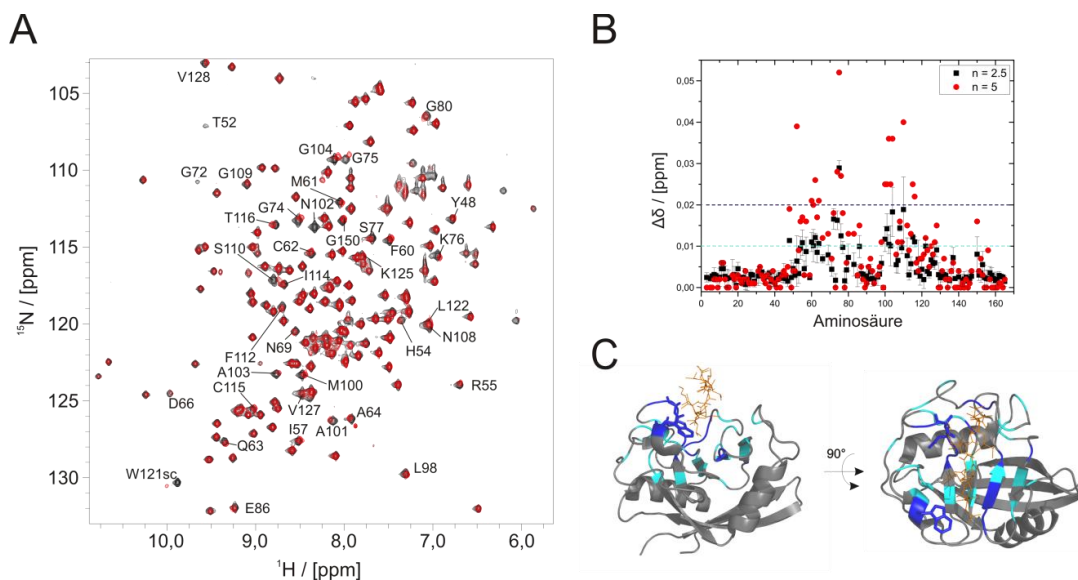


Abbildung S4: Interaktion von A β_{1-40} mit CypD. A: ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum von 60 μM CypD (schwarz) und in Gegenwart eines fünffachen molaren Überschusses A β_{1-40} . Die Messung erfolgte in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 25 $^\circ\text{C}$. B: Änderungen der chemischen Verschiebungen der Kreuzsignale von CypD in Anwesenheit von 2,5fachem (schwarz) bzw. 5fachem (rot) molarem Überschuss von A β_{1-40} . Die türkise bzw. blaue unterbrochene Linie markiert Änderungen von 0,01 ppm bzw. 0,02 ppm. C: Kristallstruktur von CypD mit Cyclosporin A (orange), welches im aktiven Zentrum von CypD bindet. Die Aminosäuren, welche Änderungen der chemischen Verschiebung unter 0,01 ppm aufweisen sind grau dargestellt, für $0,01 \text{ ppm} < \Delta\delta < 0,02 \text{ ppm}$ wurden die Aminosäuren türkis bzw. für $\Delta\delta > 0,02 \text{ ppm}$ blau hervorgehoben. Die Messung wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt^[170].

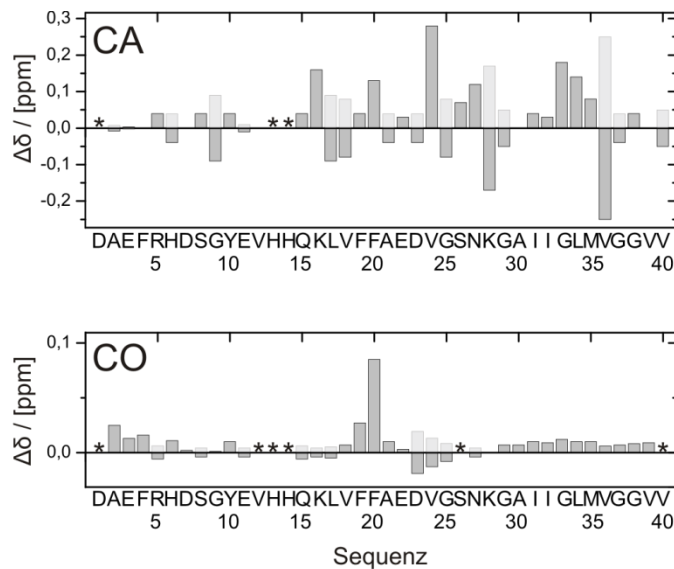


Abbildung S5: Änderungen der chemischen Verschiebung der C α bzw. CO-Kerne von A β ₁₋₄₀ durch die Interaktion mit CypD. Die Änderung wurde folgendermaßen berechnet: $\Delta\delta = \delta_{\text{mit CypD}} - \delta_{\text{ohne CypD}}$. Zusätzlich transparent dargestellt sind die Beträge $|\Delta\delta|$. Nicht zugeordnete Aminosäuren sind durch * gekennzeichnet.

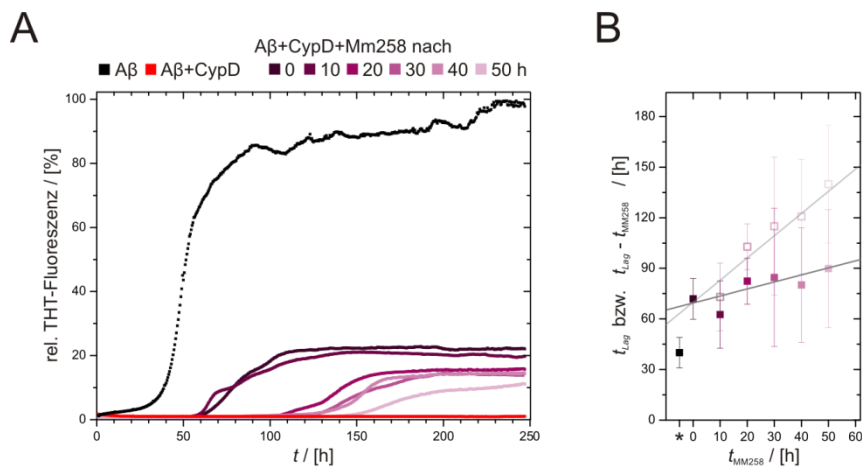


Abbildung S6: Einfluss der verzögerten Zugabe von MM258 auf die Kinetik der Bildung von A β ₁₋₄₀ Fibrillen. Es wurden jeweils 50 μM A β ₁₋₄₀, 5 μM CypD und 12 μM MM258 eingesetzt. Die Fibrillierung erfolgte in 35 mM HEPES pH 7,8, 1% DMSO, 10 mM Natriumazid, 20 μM ThT bei 37 °C. Die Proben wurden alle 30min für 10s doppelt-orbital geschüttelt. A: ThT-Fluoreszenzemission während der Fibrillierung in Abhängigkeit von der Zeit. Die Zusammensetzung der Proben sowie der Zeitpunkt der MM258-Zugabe kann der Legende entnommen werden. B: Dargestellt sind die durch Anpassung von Gleichung (2.3) an die Kurven aus Abbildung A ermittelte Lag-Zeiten t_{lag} in Abhängigkeit des Zeitpunktes der MM258-Zugabe t_{MM258} (transparente, offene Symbole). Diese wurden zusätzlich auf die Zeit der MM258-Zugabe normiert ($t_{\text{lag}} - t_{\text{MM258}}$) und ebenfalls in Abhängigkeit von t_{MM258} dargestellt (geschlossene Symbole). Die linearen Anpassungen an die Messwerte ergaben folgende Kurven: $t_{\text{lag}} = (70 \pm 5) + (1,3 \pm 0,4)t_{\text{MM258}}$ (hellgrau) bzw. $t_{\text{lag}} - t_{\text{MM258}} = (70 \pm 5) + (0,3 \pm 0,4)t_{\text{MM258}}$ (grau). Die Messung wurde von Marten Villmow durchgeführt.

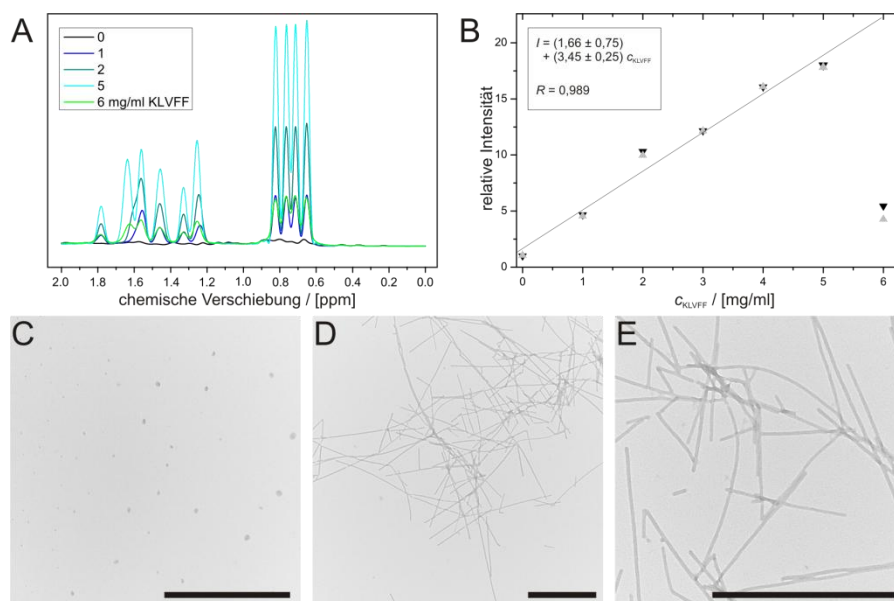


Abbildung S7: Untersuchung der Interaktion von CypD mit A β_{16-20} (KLVFF).

A: Änderung der ^1H -Spektren bei schrittweiser Zugabe von KLVFF. Während die Signalintensität bis zu einer Konzentration von 5mg/ml kontinuierlich steigt, ist bei einer Konzentration von 6 mg/ml eine Abnahme der Signalintensität zu beobachten.

Diese Beobachtung ist in B quantitativ dargestellt. Bis zu einer Konzentration von 5mg/ml erfolgt eine stetige Zunahme der Signalintensität (Integral über den Bereich 0,55 bis 0,91 ppm), welche relativ gut mit einer linearen Funktion beschrieben werden kann. Bei 6 mg/ml nimmt die Signalintensität stark ab. Das gemessene Spektrum entspricht etwa einer Konzentration von 2mg/ml. Bei dieser Konzentration kann außerdem ein Unterschied zwischen dem Protonenspektrum, welches vor (schwarz) bzw. nach (grau) der Detektion eines ^1H - ^{15}N -HSQC Spektrums aufgezeichnet wurde, beobachtet werden.

C-E Die TEM-Aufnahmen zeigen bei 5 mg/ml praktisch keine größeren Aggregate (C), während bei 6 mg/ml fibrilläre Aggregate beobachtet werden können (D, E). Die Maßstabsskala entspricht 1 μm .

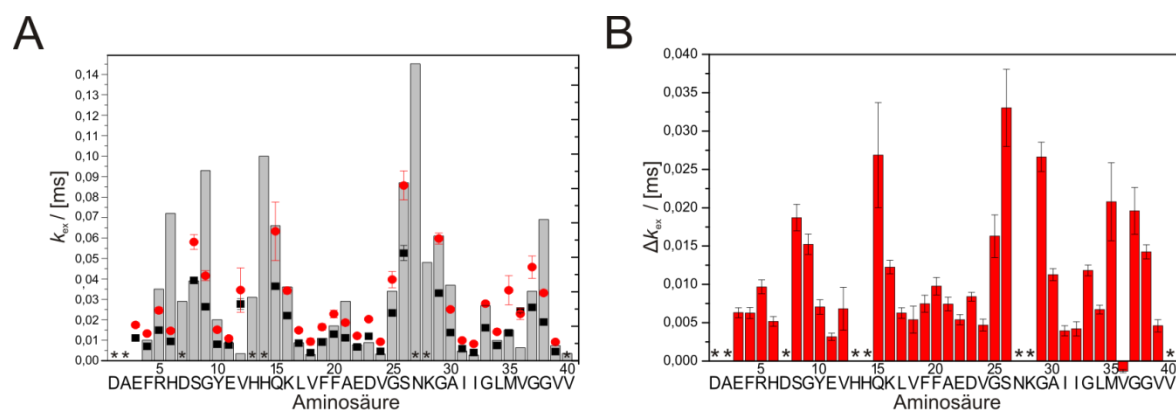


Abbildung S8: CypD beschleunigt den Amidprotonenaustausch von A β_{140} .

A: Amidprotonenaustauschraten k_{ex} von A β_{140} in Abwesenheit (schwarz) und Gegenwart (rot) von CypD mit einem molaren Verhältnis von 1:1 (CypD:A β_{140}). Die grauen Balken entsprechen nach Bai *et al.*^[244] theoretisch berechneten intrinsischen Austauschraten einer entfalteten Polypeptidkette für die entsprechenden experimentellen Bedingungen.

In B ist der absolute Unterschied der Amidprotonenaustauschraten in Abwesenheit und Gegenwart von CypD dargestellt. Sternchen kennzeichnen nicht detektierbare Aminosäuren bzw. Aminosäuren für welche keine Anpassung der Gleichung (2.17) möglich war.

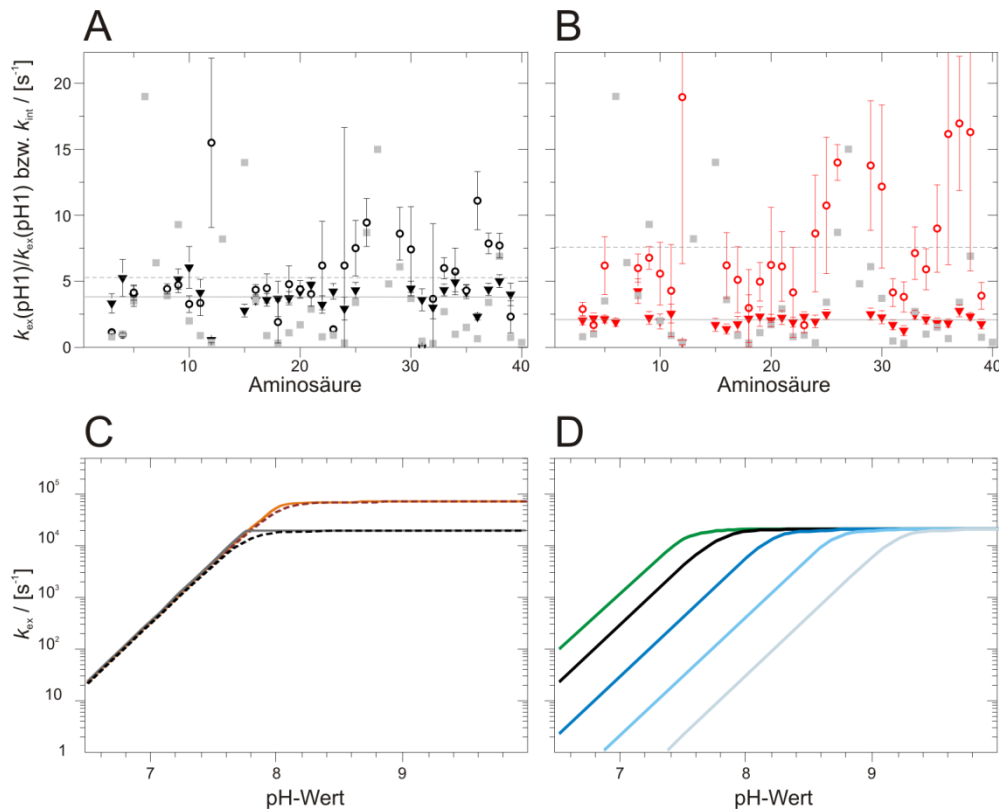


Abbildung S9: Abhängigkeit des Amidprotonenaustausches vom pH-Wert.

A,B: Die Erhöhung des pH-Wertes um eine pH-Einheit bewirkt in Abwesenheit von CypD (A) eine mittlere Erhöhung der Amidprotonenaustauschraten von A β ₁₋₄₀ um das das Fünffache von pH 6,8 auf 7,8 ($k_{\text{ex}}(\text{pH } 7,8)/k_{\text{ex}}(\text{pH } 6,8)=5,2\pm 3,2$ - offene runde Symbole, unterbrochene Linie) bzw. das Vierfache von pH 7,8 auf 8,8 ($k_{\text{ex}}(\text{pH } 8,8)/k_{\text{ex}}(\text{pH } 7,8)=3,9\pm 1,0$ - dreieckige Symbole und Linie). In Gegenwart von CypD (B) ist ein stärkerer Unterschied bei Variation des pH-Wertes von 6,8 auf 7,8 ($k_{\text{ex}}(\text{pH } 7,8)/k_{\text{ex}}(\text{pH } 6,8)=7,7\pm 4,9$ - offene runde Symbole, unterbrochene Linie) und ein geringerer Unterschied bei Variation von pH 7,8 auf pH 8,8 ($k_{\text{ex}}(\text{pH } 8,8)/k_{\text{ex}}(\text{pH } 7,8)=2,1\pm 0,3$ - dreieckige Symbole und Linie) festzustellen. Die Variation für die unterschiedlichen Aminosäuren ist sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von CypD bei der Variation von pH 6,8 auf 7,8 deutlich stärker ausgeprägt als bei der Variation von pH 7,8 auf pH 8,8. Dies impliziert eine Abhängigkeit von den intrinsischen Austauschraten (graue Symbole, exemplarisch für pH 6,8)^[244].

In Abbildung C und D sind die nach Gleichung (2.11, S. 41) berechneten Austauschraten in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. Dafür wurde folgender Zusammenhang zwischen intrinsischen Austauschraten und pH-Wert angenommen^[244]: $k_{\text{int},\text{pH}}=k_{\text{int},0}\cdot 10^{(\text{pH}-\text{pH}_0)}$.

In Abbildung C wurde $k_{\text{int},0}=80\text{ s}^{-1}$ bei $\text{pH}_0=7,8$ eingesetzt. k_{op} und k_{cl} wurden ausgehend von den publizierten Austauschraten für A β Monomere im Gleichgewicht mit Oligomeren mit $k_{\text{off}}\triangleq k_{\text{op}}=73\text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{on}}\triangleq k_{\text{cl}}=3\text{ s}^{-1}$ (schwarze, unterbrochene Kurve) variiert: eine Verringerung der Assoziationsrate ($k_{\text{on}}=0,03\text{ s}^{-1}$, graue Kurve) bewirkt nur einen schärferen Übergang von EX2- zum EX1-Mechanismus. Erhöhung beider Raten um den Faktor 1,75 führt zu nahezu identischen Raten für $\text{pH}<7,5$ und höheren Raten für $\text{pH}>7,5$ (rote unterbrochene Kurve, $k_{\text{op}}=128\text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cl}}=5,25\text{ s}^{-1}$). Eine nahezu identische Kurve ergibt sich bei ausschließlicher Erhöhung der Dissoziationsrate (orange Kurve: $k_{\text{op}}=128\text{ s}^{-1}$ $k_{\text{cl}}=3\text{ s}^{-1}$).

D: Der Einfluss der intrinsischen Austauschraten auf die messbaren Amidprotonenaustauschraten wurde für $k_{\text{op}}=73\text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cl}}=3\text{ s}^{-1}$ untersucht. Eine Verringerung der intrinsischen Raten verschiebt die Kurve nach rechts ($k_{\text{int},0}=150\text{ s}^{-1}/80\text{ s}^{-1}/30\text{ s}^{-1}/10\text{ s}^{-1}/3\text{ s}^{-1}$, grüne/schwarze/dunkel-/mittel-/hellblaue Kurve).

7.2 SAA1.1

Resonanzzuordnung

Die Resonanzzuordnung von 300 μ M mSAA1.1 in 99,98 % d_6 -DMSO/0,02 % dTFA erfolgte mittels 3D HNCO, 5D HN(CA)CONH und 5D HabCabCONH Experimenten. Alle Daten wurden an einem 600MHz Bruker Avance Spektrometer, welches mit einem $^1\text{H}^{31}\text{P}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -QCI-Kryoprobekopf ausgestattet ist. Alle Spektren wurden mit 4 *scans* pro Inkrement und nichtlinearem Sampling in den indirekt detektierten Dimensionen aufgenommen. Die Messpunktlisten wurden mit dem Softwarepaket RSPack erzeugt, wobei *Poisson Disk Sampling* mit Dichtebeschränkung entsprechend einer Gaußverteilung ($\sigma=0,5$) mit Hinblick auf die maximalen Evolutionszeiten gewählt wurde. Alle Experimente wurden mit einem Interscan-Abstand von 1,2s aufgenommen.

Das HNCO wurde mit spektralen Weiten von 8370 (^1H dir. Dim.) x 1600 (^{15}N) x 2000 ($^{13}\text{C}'$) Hz aufgenommen, die maximalen Evolutionszeiten betragen 80ms (^{15}N) bzw. 60ms ($^{13}\text{C}'$). Insgesamt wurden 600 Punkte in den indirekten Dimensionen aufgenommen. Das Experiment wurde mittels *Multidimensional Fourier Transform* Algorithmus und Artefakt-Reduzierungs-Algorithmus prozessiert. Die direkte Dimension wurde mit einer \cos^2 -Fensterfunktion gewichtet und mit einfachem *zero-filling* auf 2048 komplexe Punkte ergänzt. Die Anzahl der spektralen Punkte wurde vor der Prozessierung auf 2048 (^1H) x 768 (^{15}N) x 1024 (^{13}C) festgelegt.

Das 5D HN(CA)CONH wurde mit spektralen Weiten von 5000 (^1HN) x 1600 (^{15}N) x 2000 ($^{13}\text{C}'$) x 1600 (^{15}N) x 8370 (^1H dir. Dim.) Hz und maximalen Evolutionszeiten von 40 (^{15}N) x 40 ($^{13}\text{C}'$) Hz x 22,5 (^{15}N) x 18 (^1HN)ms aufgenommen. In den indirekten Dimensionen wurden insgesamt 900 Punkte detektiert. Beim 5D HabCabCONH betragen die spektralen Weiten 5000 (^1Hab) x 10,000 (^{13}Cab) x 2000 ($^{13}\text{C}'$) Hz x 1600 (^{15}N) x 8370 (^1H dir. Dim.) und die maximalen Evolutionszeiten 12 (^1Hab) x 6,5 (^{13}Cab) Hz x 40 ($^{13}\text{C}'$) x 22,5 (^{15}N)ms. Es wurden 1000 Punkte in den indirekten Dimensionen aufgezeichnet. Die direkte Dimension der beiden 5D Experimente wurde mit einer \cos^2 -Fensterfunktion gewichtet und mittels *zero-filling* auf 2048 komplexe Punkte ergänzt. Die Zahl der spektralen Punkte wurde vor der Prozessierung auf 768 in allen indirekten Dimensionen festgelegt. Für jedes Kreuzsignal im HNCO wurden die ^1H -, ^{15}N - und $^{13}\text{C}'$ -Frequenzen bestimmt und für die Prozessierung der 5D-Datensätze fixiert. Mittels SMFT Algorithmus wurden an diesen Positionen 2D-Schnittbilder der 5D-Datensätze berechnet.

Auf diese Weise wurde eine vollständige Zuordnung der ^1H - ^{15}N -Resonanzen erreicht.

Tabelle 17: Zuordnung von mSAA1.1 in 99,98 % d_6 -DMSO/0,02 % d-TFA bei 25 °C (referenziert auf Wasser bei 4.7 ppm).

Aminosäure	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	$^{13}\text{C}'$ / [ppm]	^1Ha / [ppm]	^{13}Ca / [ppm]	^1Hb / [ppm]	^{13}Cb / [ppm]
G1	8,361	106,123		3,489	42,174	-	-
F2	8,571	118,102	168,609	4,66	55,859	2,740 / 3,076	40,08
F3	8,463	117,448	173,774	4,668	55,904	2,818 / 3,069	39,61
S4	8,214	113,408	174,147	4,41	57,145	3,621	64,057
F5	8,101	118,346	172,992	4,767	55,895	2,901 / 3,127	39,27
I6	8,086	116,841	173,785	4,236	59,189	1,779	38,693
G7	8,22	109,417	174,316	3,812	44,015	-	-
E8	8,012	116,63	171,75	4,364	53,777	1,763 / 1,918	29,23
A9	8,141	121,436	173,879	4,301	50,314	1,22	20,207

Zusätzliche Methoden und Messungen: SAA1.1

Amino-säure	¹ H / [ppm]	¹⁵ N / [ppm]	¹³ C' / [ppm]	¹ Ha / [ppm]	¹³ Ca / [ppm]	¹ Hb / [ppm]	¹³ Cb / [ppm]
F10	8,053	115,776	175,267	4,555	55,965	2,881 / 3,101	39,22
Q11	8,177	117,998	174,145	4,283	54,594	1,854 / 1,942	30
G12	8,099	106,396	174,615	3,808	44,089	-	-
A13	8,122	120,338	171,82	4,337	50,615	1,294	20,239
G14	8,274	104,653	175,921	3,779	44,177	-	-
D15	8,198	116,513	172,094	4,637	51,663	2,61 / 2,724	38,168
M16	7,999	116,807	173,833	4,339	54,315	1,875	33,718
W17	7,953	118,256	174,082	4,598	55,559	3,040 / 3,196	29,595
R18	8,167	118,112	174,548	4,36	54,026	1,573 / 1,714	31,256
A19	7,996	120,898	173,885	4,347	50,267	1,268	20,648
Y20	8,097	116,198	175,352	4,562	56,434	2,785 / 2,989	38,51
T21	7,875	110,813	174,397	4,319	60,097	4,027	68,899
D22	8,252	118,938	172,855	4,682	51,624	2,620 / 2,783	38,1
M23	7,973	116,984	173,648	4,379	54,15	1,909	33,961
K24	8,065	118,309	174,062	4,278	54,535	1,587 / 1,707	33,39
E25	8,022	117,342	174,646	4,309	53,86	1,789 / 1,958	29,55
A26	8,043	121,215	173,899	4,296	50,409	1,247	20,512
G27	8,124	104,323	175,582	3,747	43,943	-	-
W28	8,043	118,125	171,75	4,643	55,534	3,001 / 3,204	29,98
K29	8,285	118,5	174,779	4,334	54,529	1,592 / 1,749	33,39
D30	8,239	117,224	174,752	4,645	51,833	2,639 / 2,784	38,23
G31	8,138	105,242	174,189	3,72 / 3,883	44,23	-	-
D32	8,234	116,72	171,939	4,65	51,753	2,581 / 2,763	38,28
K33	8,019	117,519	173,794	4,183	54,792	1,533	33,203
Y34	7,755	115,837	174,177	4,47	55,95	2,672 / 2,922	38,76
F35	8,182	117,305	174,284	4,571	56,023	2,868 / 3,046	39,43
H36	8,41	117,007	174,116	4,669	53,555	3,077	29,377
A37	8,237	122,374	172,535	4,366	50,627	1,322	20,302
R38	8,33	117,873	175,788	4,394	54,199	1,610 / 1,774	31,565
G39	8,167	105,901	174,573	3,875	43,742	-	-
N40	8,223	117,146	171,498	4,648	51,653	2,423 / 2,605	39,46
Y41	8,125	117,454	174,189	4,377	56,866	2,740 / 2,991	38,49
D42	8,38	116,833	174,335	4,611	51,808	2,600 / 2,797	37,98
A43	7,836	120,125	173,365	4,315	50,36	1,272	20,13
A44	7,98	119,278	174,903	4,323	50,366	1,278	20,194
Q45	8,005	116,213	175,254	4,295	54,251	1,797 / 1,930	30,12
R46	8,047	117,949	174,251	4,394	54,199	1,610 / 1,774	31,55
G47	8,167	105,901	174,573	?	?	-	-
P48	-	-	?	4,359	62,03	1,953 / 2,089	31,47
G49	8,274	104,992	175,241	3,771	44,071	-	-
G50	8,008	105,177	172,323	3,833	44,082	-	-
V51	7,902	114,796	171,869	4,247	59,685	1,999	32,819
W52	8,155	121,533	174,042	4,614	55,456	3,000 / 3,187	29,6
A53	8,073	120,789	174,337	4,346	50,337	1,258	20,266
A54	8,06	119,698	175,027	4,332	50,303	1,262	20,137
E55	7,994	115,62	175,3	4,328	53,878	1,85	29,7
K56	8,063	118,711	174,138	4,354	54,31	1,703 / 1,580	33,31
I57	7,912	116,849	174,479	4,282	58,967	1,784	38,897
S58	8,022	115,944	174,088	4,387	56,944	3,629	64,051
D59	8,303	119,455	173,238	4,662	51,585	2,759 / 2,587	38
A60	7,905	119,748	173,368	4,307	50,509	1,255	20,149
R61	8,119	117,124	175,281	4,31	54,215	1,752 / 1,580	31,16
E62	7,957	117,267	174,306	4,368	53,774	1,761 / 1,930	29,94
S63	8,004	114,013	174,063	4,358	56,562	3,598	63,975
F64	8,125	118,343	173,052	4,613	55,953	2,864 / 3,112	39,368
Q65	8,267	118,133	174,115	4,291	54,319	1,795 / 1,920	30,1
E66	8,038	117,82	174,274	4,293	53,905	1,779 / 1,832	29,908
F67	8,021	117,166	173,925	4,589	55,772	2,802 / 3,032	39,59

Aminosäure	¹ H / [ppm]	¹⁵ N / [ppm]	¹³ C' / [ppm]	¹ Ha / [ppm]	¹³ Ca / [ppm]	¹ Hb / [ppm]	¹³ Cb / [ppm]
F68	8,3	117,936	174,108	4,592	56,054	2,888 / 3,091	39,6
G69	8,182	106,167	174,41	3,838	44,078	-	-
R70	8,147	117,625	171,951	4,373	54,328	1,605 / 1,781	54,328
G71	8,34	106,682	174,881	3,81	44,05	-	-
H72	8,221	115,15	171,918	4,692	53,678	3,085	29,399
E73	8,245	118,196	172,891	4,344	54,114	1,845 / 1,959	29,66
D74	8,523	119,213	174,465	4,733	51,685	2,601 / 2,812	37,92
T75	7,833	111,033	173,872	4,269	60,403	4,078	68,553
M76	7,96	118,031	173,016	4,434	54,003	1,867 / 2,011	34
A77	8,105	120,878	174,038	4,308	50,442	1,281	20,084
D78	8,261	116,136	175,58	4,589	51,783	2,596 / 2,766	37,93
Q79	7,946	116,839	173,812	4,277	54,561	1,801 / 1,943	29,97
E80	8,047	117,362	174,474	4,29	54,044	1,818 / 1,979	29,32
A81	8,021	120,804	174,095	4,319	50,381	1,263	20,118
N82	8,226	116,466	175,455	4,589	51,816	2,548 / 2,650	38,99
R83	8,113	118,813	174,461	4,267	54,536	1,534 / 1,771	30,43
H84	8,282	115,401	174,572	4,62	53,972	3,065 / 3,217	28,97
G85	8,203	106,171	173,278	3,85	44,05	-	-
R86	8,228	118,174	171,879	4,475	54,076	1,598 / 1,766	31,69
S87	8,192	114,794	174,447	4,378	57,234	3,672	64,027
G88	8,213	107,364	173,429	3,85	44,16	-	-
K89	8,037	116,894	171,725	4,347	53,929	1,534 / 1,680	33,82
D90	8,49	118,567	174,426	?	?	?	?
P91	-	-	?	4,33	61,665	31,242	1,799
N92	8,002	115,497	174,384	4,537	51,977	2,401 / 2,601	39,14
Y93	7,844	116,644	173,918	4,353	56,588	2,644 / 2,700	38,3
Y94	8,004	116,579	173,803	4,46	56,513	2,799 / 2,933	38,8
R95	8,043	119,481	173,78	?	?	?	?
P96	-	-	?	?	?	?	?
P97	-	-	?	4,336	61,567	1,902 / 2,084	31,39
G98	8,048	103,794	174,97	3,719	43,732	-	-
L99	7,996	118,466	171,729	4,403	61,241	1,888 / 2,084	31,18
A101	8,094	119,867	174,393	4,269	50,342	1,248	20,129
K102	7,87	115,48	175,18	4,307	54,114	1,553 / 1,692	33,73
Y103	8,085	116,909	174,434	?	?	?	?

Fibrillierungsbedingungen

Die untersuchten Fibrillen wurden durch Inkubation von 1 mg/ml mSAA1.1 in 10mM Tris, pH 8 bei 37 °C erzeugt.

H/D-Austausch

Der H/D-Austausch wurde durch Zentrifugation (30 min, 12000 g) und Resuspendieren in deuteriertem Puffer (10 mM Tris, pD8,5) gestartet. Nach Inkubation für verschiedene Zeitpunkte (1h, 2h, 5h, 9h, 24h und 30h) bei 25 °C erfolgte ein weiterer Sedimentationsschritt um den Austausch zu stoppen. Um Pufferrückstände zu entfernen wurden die Fibrillen mit D₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden gefriergetrocknet und anschließend bei -80 °C aufbewahrt. Die Referenzproben wurden identisch präpariert, wobei ausschließlich protonierter Pufferlösungen verwendet wurde.

NMR-Spektroskopie

Die aufgetauten Proben wurden in 99,98 % deuteriertem Dimethylsulfoxid (d₆-DMSO) und 0,02 % deuterierter Trifluoressigsäure (d-TFA) gelöst. Die Proben wurden ca. 2 min gevortext um die Fibrillen vollständig zu disaggregieren. Anschließend wurde eine Serie von drei ¹H-¹⁵N-SOFAST-HMQC Spektren aufgenommen. Zur Konzentrationskorrektur wurde zuvor und anschließend jeweils ein ¹H-Spektrum aufgenommen und die Konzentration durch das Integral der Signalintensität von 0,65 bis 2,3 ppm bestimmt. Alle Messungen waren spätestens 30 min nach dem Auflösen der Proben abgeschlossen.

Die ¹H-¹⁵N-Korrelationsspektren wurden mittels NMRPipe prozessiert und die Intensitäten der Kreuzsignale mittels NMRView ermittelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Austauschraten durch Anpassung einer exponentiell abfallenden Funktion: $PL(t)=A+e^{-kt}$ (Formel S.1) mittels Origin 7.5. Der Parameter A berücksichtigt dabei, dass das Lösungsmittel während der austauschzeit nicht zu 100 % deuteriert ist, wodurch die Kurven selbst bei unendlich langem Austausch nicht auf 0 abklingen.

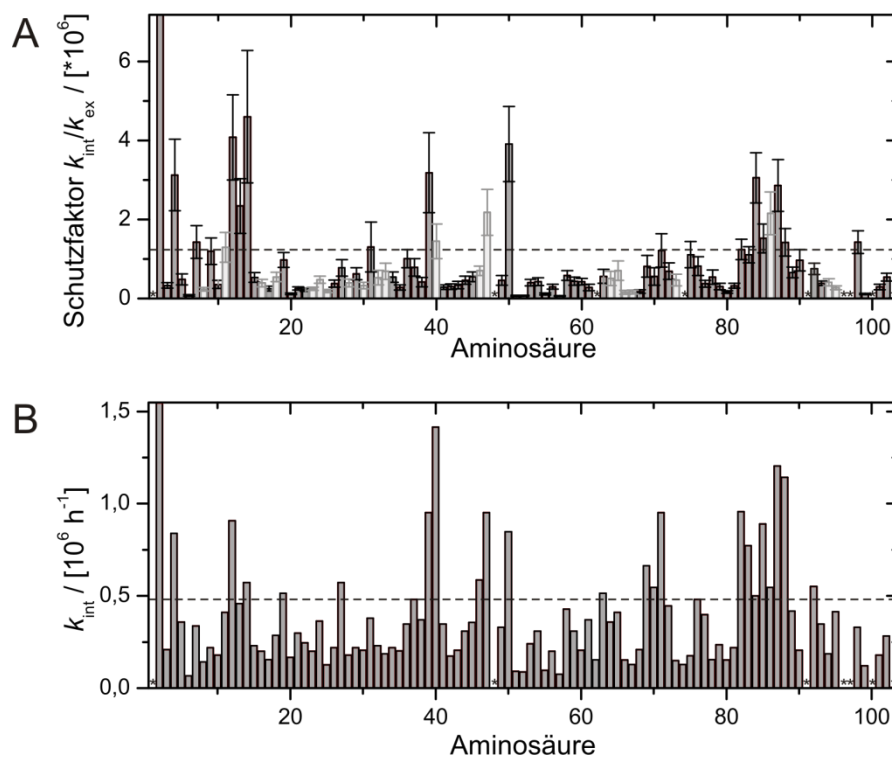


Abbildung S10: Schutzfaktoren von mSAA1.1-Fibrillen (A) verglichen mit den nach Ref.^[244] berechneten intrinsischen Austauschraten (B). Die Balken der Aminosäuren, deren Intensitäten aufgrund von Überlappung der Kreuzsignale ($\Delta\delta < 0,02$ ppm) nicht eindeutig auswertbar sind, sind transparent dargestellt. Sternchen markieren Proline bzw. nicht zugeordnete Aminosäuren. Die unterbrochenen Linien markieren die Mittelwerte ($\overline{k_{int}/k_{ex}} = 1,26 \cdot 10^6$ bzw. $\overline{k_{int}} = 0,48 \cdot 10^6 \text{ h}^{-1}$).

7.3 PTH₁₋₈₄

7.3.1 Herstellung der Fibrillen und H/D-Austausch

Fibrillierungsbedingungen

Die untersuchten Fibrillen wurden durch Inkubation von 1 mM PTH₁₋₈₄ in 50 mM Boratpuffer, pH 9 bei 65 °C für mindestens 10h erzeugt.

H/D-Austausch

Der H/D-Austausch wurde durch Zentrifugation (20 min, 16000 g) und Resuspendieren in deuteriertem Puffer (50 mM Borat, pD 9,4) gestartet. Nach Inkubation für verschiedene Zeitpunkte bei 25 °C erfolgte ein weiterer Sedimentationsschritt um den Austausch zu stoppen. Um Pufferrückstände zu entfernen wurden die Fibrillen mit D₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt. Referenzproben wurden identisch präpariert, wobei ausschließlich protonierter Pufferlösungen verwendet wurde.

NMR-Spektroskopie

Die aufgetauten Proben wurden in 100 % d₆-DMSO resuspendiert. Die unlöslichen Fibrillen wurden erneut zentrifugiert (10 min, 16000 g) und das Pellet in 99,96 % deuteriertem Dimethylsulfoxid (d₆-DMSO) und 0,04 % deuterierter Trifluoressigsäure (d-TFA) gelöst. Die Proben wurden ca. 2 min gevortext um die Fibrillen vollständig zu disaggregieren. Anschließend wurde eine Serie von 10 ¹H-¹⁵N-TROSY Spektren aufgenommen. Zur Konzentrationskorrektur wurde zuvor und anschließend jeweils ein ¹H-Spektrum aufgenommen und die Konzentration durch das Integral der Signalintensität von 0,6 bis 0,99 ppm bestimmt. Alle Messungen waren spätestens 65 min nach dem Auflösen der Proben abgeschlossen. Die ¹H-¹⁵N-Korrelationspektren wurden mittels NMRPipe prozessiert und die Intensitäten der Kreuzsignale mittels NMRView ermittelt.

Resonanzzuordnung

Die Resonanzzuordnung von 400 μM PTH₁₋₈₄ in 99,96 % d₆-DMSO/0,04 % d-TFA erfolgte mittels 3D HNCO, 5D HN(CA)CONH und 5D HabCabCONH Experimenten. Alle Daten wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer, welches mit ¹H/¹³C/¹⁵N-TCI-Kryoprobenkopf ausgestattet ist. Alle Spektren wurden mit 8 *scans* pro Inkrement und nichtlinearem Sampling in den indirekt detektierten Dimensionen aufgenommen. Die Messpunktlisten wurden mit dem Softwarepaket RSPack erzeugt, wobei *Poisson Disk Sampling* mit Dichtebeschränkung entsprechend einer Gaußverteilung ($\sigma=0,5$) mit Hinblick auf die maximalen Evolutionszeiten gewählt wurde. Alle Experimente wurden mit einem Interscan-Abstand von 1,2s aufgenommen.

Das HNCO wurde mit spektralen Weiten von 12019 (¹H dir. Dim.) x 1800 (¹⁵N) x 2800 (¹³C') Hz aufgenommen, die maximalen Evolutionszeiten betragen 80 ms (¹⁵N) bzw. 60 ms (¹³C'). Insgesamt wurden 600 Punkte in den indirekten Dimensionen detektiert. Das Experiment wurde mittels *Multidimensional Fourier Transform* Algorithmus und Artefakt-Reduzierungs-Algorithmus prozessiert. Die direkte Dimension wurde mit einer \cos^2 -Fensterfunktion gewichtet und mit einfachem *zero-filling* auf 2048 komplexe Punkte

ergänzt. Die Anzahl der spektralen Punkte wurde vor der Prozessierung auf 2048 (^1H) x 768 (^{15}N) x 1024 (^{13}C) festgelegt.

Das 5D HN(CA)CONH wurde mit spektralen Weiten von 7000 (^1HN) x 1800 (^{15}N) x 2800 ($^{13}\text{C}'$) x 1800 (^{15}N) x 12019 (^1H dir. Dim.) Hz und maximalen Evolutionszeiten von 40 (^{15}N) x 40 ($^{13}\text{C}'$) Hz x 22,5 (^{15}N) x 18 (^1HN) ms aufgenommen. In den indirekten Dimensionen wurden insgesamt 900 Punkte detektiert. Beim 5D HabCabCONH betragen die spektralen Weiten 7000 (^1Hab) x 14,000 (^{13}Cab) x 2800 ($^{13}\text{C}'$) Hz x 1800 (^{15}N) x 12019 (^1H dir. Dim.) und die maximalen Evolutionszeiten 12 (^1Hab) x 6,5 (^{13}Cab) Hz x 40 ($^{13}\text{C}'$) x 22,5 (^{15}N) ms. Es wurden 1000 Punkte in den indirekten Dimensionen aufgezeichnet. Die direkte Dimension der beiden 5D Experimente wurde mit einer \cos^2 -Fensterfunktion gewichtet und mittels *zero-filling* auf 2048 komplexe Punkte ergänzt. Die Zahl der spektralen Punkte wurde vor der Prozessierung auf 768 in allen indirekten Dimensionen festgelegt. Für jedes Kreuzsignal im HNCO wurden die ^1H , ^{15}N und $^{13}\text{C}'$ -Frequenzen bestimmt und für die Prozessierung der 5D-Datensätze fixiert. Mittels SMFT Algorithmus wurden an diesen Positionen 2D-Schnittbilder der 5D Datensätze berechnet.

Auf diese Weise wurde eine vollständige Zuordnung der ^1H - ^{15}N -Resonanzen erreicht.

Tabelle 18: Zuordnung von PTH_{1,84} in 99,96% d₆-DMSO/0,04% d-TFA bei 25 °C (referenziert auf Wasser bei 4,7 ppm).

Aminosäure	^1H / [ppm]	^{15}N / [ppm]	$^{13}\text{C}'$ / [ppm]	^{13}Ca / [ppm]	^1Ha / [ppm]	^{13}Cb / [ppm]	^1Hb / [ppm]	$^1\text{Hb2}$ / [ppm]
S1	?	?	?	54,475	3,954	61,004	3,741	-
V2	8,42	116,836	167,156	57,965	4,335	31,361	2,015	-
S3	8,184	116,211	170,971	55,38	4,35	62,06	3,595	-
E4	8,155	119,966	170,849	52,831	4,264	27,447	1,757	1,914
I5	7,804	116,226	171,947	57,727	4,109	36,86	1,683	-
Q6	8,097	121,202	171,654	53,073	4,168	27,786	1,836	-
L7	7,878	119,363	171,848	51,644	4,246	40,764	1,438	-
M8	7,947	116,754	172,975	52,677	4,251	31,695	1,842	-
H9	8,167	115,966	171,874	51,99	4,566	27,35	2,951	3,069
N10	8,265	117,883	170,181	50,474	4,518	37,21	2,494	2,6
L11	8,159	119,539	171,562	51,911	4,231	40,667	1,503	-
G12	8,188	105,136	172,940	42,485	3,691	-	-	-
K13	7,918	117,325	169,244	52,667	4,244	31,6	1,598	1,492
H14	8,325	117,155	172,056	51,926	4,584	27,28	3,1	2,98
L15	8,051	119,724	170,098	51,461	4,317	41,166	1,446	-
N16	8,337	118,371	172,685	50,029	4,608	37,45	2,503	2,567
S17	7,972	113,472	171,656	?	?	?	?	-
M18	8,132	118,483	0,000	52,757	4,304	31,68	1,934	1,843
E19	7,995	117,301	171,932	52,761	4,208	27,432	1,777	1,878
R20	8,036	119,025	171,845	52,871	4,269	27,445	1,911	1,757
V21	7,815	116,186	172,012	58,558	4,09	30,735	1,945	-
E22	8,039	119,787	171,532	52,58	4,232	27,726	1,839	1,757
W23	8,018	119,632	171,741	53,863	4,553	27,75	2,944	3,109
L24	8,116	119,406	172	51,792	4,271	41,121	1,46	-
R25	8,033	118,235	172,824	?	?	?	?	-
K26	7,928	118,272	?	52,963	4,21	?	?	-
K27	8,045	118,571	172,083	53,055	4,163	31,355	1,521	-
L28	7,949	119,217	172,151	51,602	4,257	40,872	1,461	-
Q29	7,97	117,016	172,503	52,51	4,228	28,58	1,749	1,858
D30	8,23	118,032	171,849	49,864	4,571	36,144	2,529	2,691
V31	7,629	114,381	171,005	58,295	4,102	30,73	1,93	-

Amino- säure	¹ H / [ppm]	¹⁵ N / [ppm]	¹³ C' / [ppm]	¹³ Ca / [ppm]	¹ Ha / [ppm]	¹³ Cb / [ppm]	¹ Hb / [ppm]	¹ Hb2 / [ppm]
H32	8,23	118,33	171,309	51,693	4,591	27,46	3,016	2,92
N33	8,146	117,953	169,946	50,141	4,53	37,48	2,393	2,515
F34	8,065	116,893	171,368	54,308	4,538	37,6	3,018	2,818
V35	7,976	115,549	170,956	58,189	4,127	30,955	1,945	-
A36	8,052	123,847	170,911	48,437	4,311	18,305	1,204	-
L37	7,912	117,838	172,403	51,407	4,273	41,395	1,442	-
G38	8,067	105,279	172,646	42,02	3,68	-	-	-
A39	8,057	120,552	168,554	?	?	?	?	-
P40	-	-	?	59,784	4,318	29,31	1,797	2,012
L41	7,854	116,717	171,698	51,115	4,234	40,941	1,422	-
A42	7,901	120,514	171,969	?	?	?	?	-
P43	-	-	?	59,85	4,331	29,41	1,811	2,042
R44	8,059	116,422	172,224	52,583	4,195	29,208	1,689	1,544
D45	8,11	116,865	171,777	49,754	4,531	36,192	2,535	2,744
A46	7,918	120,138	170,741	49,006	4,22	18,437	1,219	-
G47	8,079	104,132	172,929	42,329	3,756	-	-	-
S48	7,919	112,56	169,223	55,285	4,33	62,227	3,569	-
Q49	8,106	119,048	170,493	52,567	4,248	28,06	1,698	1,922
R50	8,079	118,732	171,722	?	?	?	?	-
P51	-	-	?	59,722	4,356	29,57	1,773	2,063
R52	8,153	117,753	172,185	52,641	4,197	29,192	1,537	1,689
K53	7,881	117,706	171,795	55,918	4,233	61,87	3,6	-
K54	8,119	118,943	170,800	52,832	4,212	31,48	1,5	1,66
E55	7,96	117,29	171,884	52,72	4,247	28,075	1,737	1,903
D56	8,206	117,461	171,379	49,796	4,538	36,534	2,484	2,68
N57	8,19	117,211	170,996	50,214	4,571	37,266	2,399	2,525
V58	7,673	114,131	171,215	58,105	4,125	30,87	1,975	-
L59	8,061	121,082	171,167	51,674	4,314	40,76	1,461	-
V60	7,751	115,829	172,457	58,342	4,104	30,597	1,943	-
E61	7,94	119,84	171,421	52,152	4,285	27,7	1,722	1,877
S62	7,921	113,806	171,666	55,537	4,248	61,924	3,56	-
H63	8,315	117,663	170,580	52,011	4,596	27,16	2,979	3,135
E64	8,057	117,92	170,239	52,682	4,247	27,695	1,757	1,901
K65	8,167	119,224	171,676	52,701	4,298	31,807	1,523	1,654
S66	8,062	114,218	171,909	55,264	4,328	62,01	3,589	-
L67	8,051	120,561	170,607	51,636	4,276	41,102	1,479	-
G68	8,117	105,276	172,858	42,336	3,707	-	-	-
E69	7,955	116,65	169,150	52,122	4,283	27,975	1,729	1,883
A70	8,112	121,035	171,248	48,524	4,25	18,471	1,217	-
D71	8,214	116,24	172,779	49,875	4,515	36,158	2,519	2,707
K72	7,727	116,743	170,838	52,474	4,233	31,82	1,502	1,654
A73	8,05	120,168	171,304	48,372	4,277	18,673	1,221	-
D74	8,302	116,974	172,887	49,817	4,569	35,97	2,497	2,712
V75	7,438	112,637	170,643	57,409	4,202	31,522	1,938	-
N76	8,257	120,058	170,932	50,08	4,621	37,78	2,423	2,548
V77	7,8	114,695	171,563	58,367	4,116	30,514	2,029	-
L78	8,085	120,392	171,315	51,72	4,325	40,528	1,502	-
T79	7,638	111,13	172,645	58,622	4,179	66,902	3,967	-
K80	7,837	119,048	170,235	52,68	4,23	31,47	1,522	1,691
A81	7,996	120,719	171,719	48,744	4,236	18,379	1,228	-
K82	7,962	116,393	172,703	52,68	4,25	31,692	1,53	1,695
S83	7,87	113,383	171,838	55,466	4,3	62,055	3,592	-
Q84	8,076	118,047	170,300	?	?	?	?	-

7.3.2 Fibrillierung von PTH₁₋₈₄

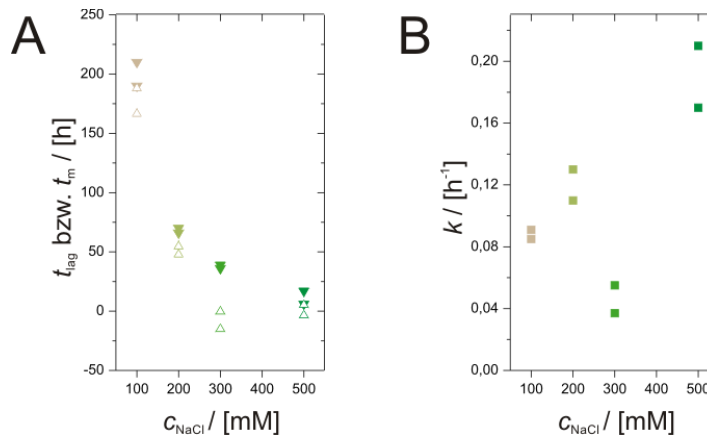


Abbildung S11: Abhängigkeit der Lag-Zeit und Geschwindigkeitskonstante der Fibrillenbildung von PTH₁₋₈₄ von der Salzkonzentration. Der Mittelpunkt des Überganges t_m (A, gefüllte Dreiecke) und die Geschwindigkeitskonstante der Elongation der Fibrillen k (B) wurden durch Anpassung von Gleichung (2.3) an die Messdaten aus Abbildung 33C (S. 80) bestimmt. Aus diesen wurde mittels Gleichung (2.4) (S. 32) die Lag-Zeiten berechnet (A, leere Dreiecke).

7.3.3 Untersuchungen am Fibrillen-Monomer-Gleichgewicht

Probenpräparation

Die untersuchten NMR-Proben enthielten 150 μ M frisch gelöstes PTH₁₋₈₄ (Referenzprobe) bzw. 1 mM PTH₁₋₈₄ (fibrilläre Probe). Alle Messungen erfolgten in 10 mM Natriumacetat, 300 mM Natriumsulphat, pH 5,3 (NMR-Puffer) bei 25 °C. Alle Proben enthielten 90 % H₂O/10% D₂O.

Die Fibrillen wurden durch Inkubation von 1 mM PTH₁₋₈₄ in 50 mM Natriumborat, pH 9 bei 65 °C für mindestens 12h erzeugt und durch zweimalige Sedimentation (16000 g, 1h, 4 °C) und Resuspendieren in den NMR-Puffer überführt.

Resonanzzuordnung

Die Resonanzzuordnung basiert auf publizierten Daten^[201].

A

	Anzahl Aminosäuren	r_H / [nm] globuläres Protein	r_H / [nm] unstrukturierte Polypeptidkette
Monomer	84	1,7±0,4	2,8±1,4
Dimer	168	2,1±0,5	4,1±2,0
Trimer	252	2,4±0,6	5,2±2,5
Tetramer	336	2,6±0,7	6,1±3,0
Pentamer	420	2,7±0,7	6,9±3,4
Hexamer	504	2,9±0,8	7,7±3,8
Heptamer	588	3,0±0,8	8,4±4,2
Oktamer	672	3,1±0,8	9,0±4,5
Nonamer	756	3,2±0,9	9,7±4,9
Dekamer	840	3,3±0,9	10,3±5,1

B

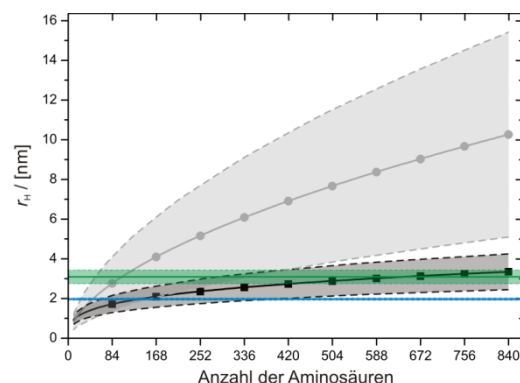
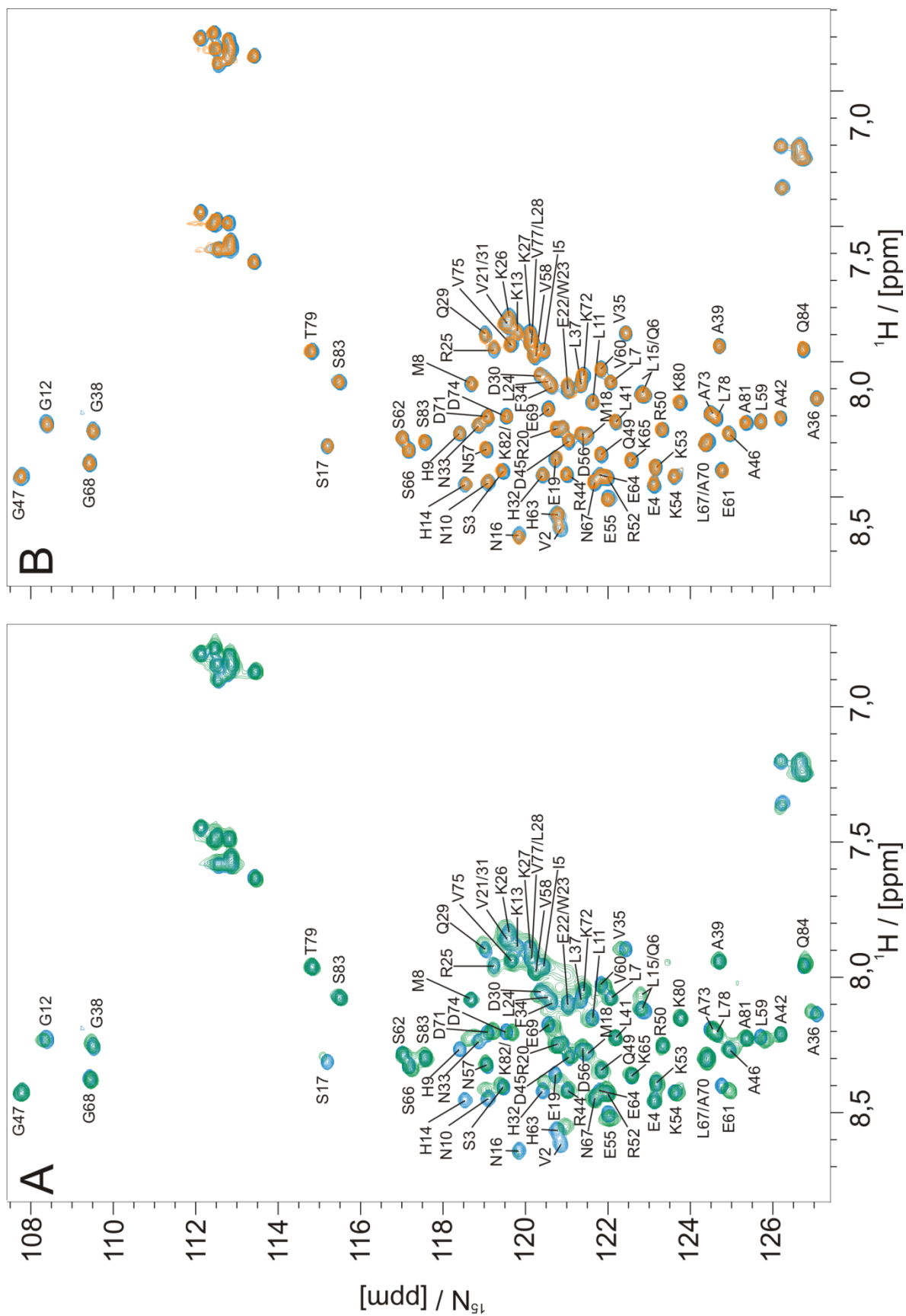


Abbildung S12: Hydrodynamische Radien für Proteine mit unterschiedlicher Länge berechnet nach Gleichung (2.21) bzw. (2.22), S. 48.^[292] Die in A aufgelisteten Werte sind in B graphisch dargestellt. Dabei entspricht die schwarze Kurve den Werten für ein globuläres Protein, die graue Kurve einer unstrukturierten Polypeptidkette. Farblich dargestellt sind die Messergebnisse der frisch gelösten Probe (blau) und in Gegenwart von Fibrillen (grün). Die unterbrochenen Linien markierten jeweils die Messunsicherheit.



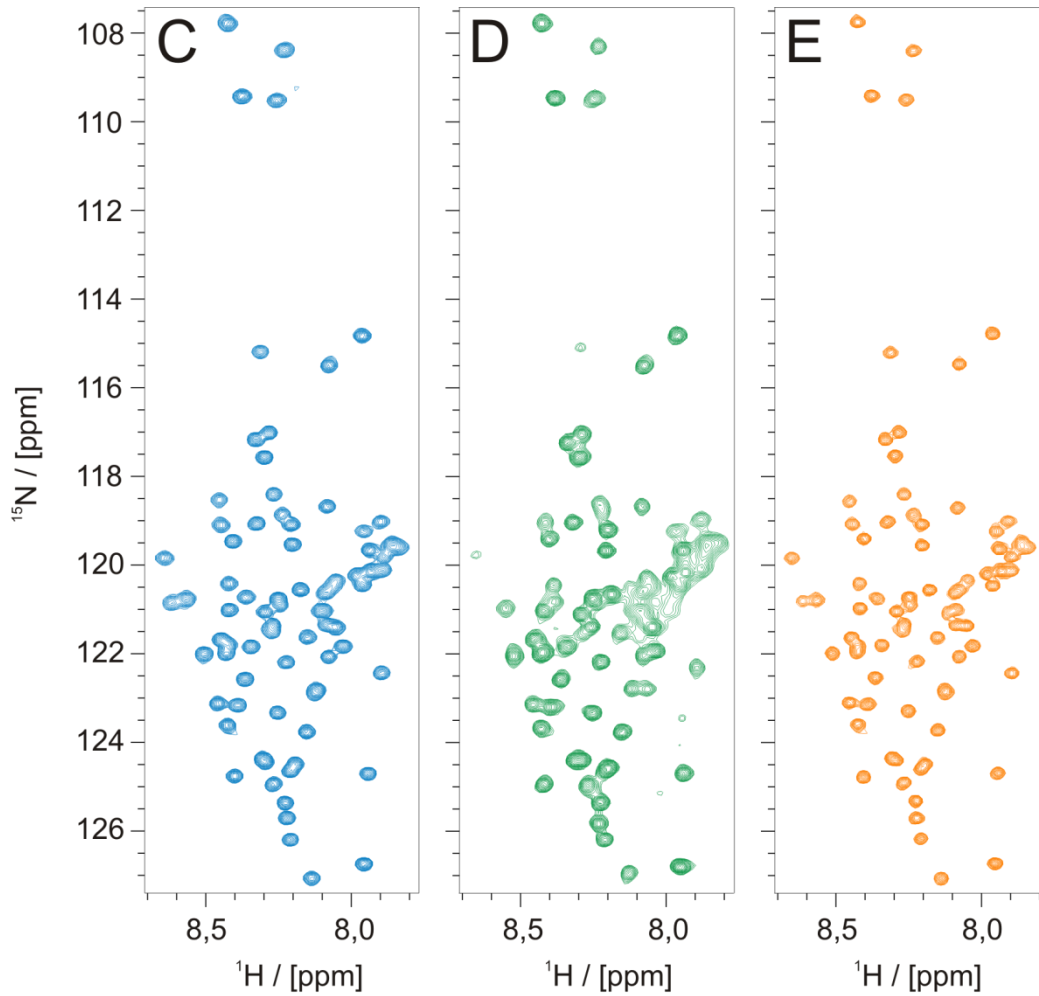


Abbildung S13: Änderungen der chemischen Verschiebung und der Signalintensität der ^1H - ^{15}N -Kreuzsignale von $\text{PTH}_{1,84}$ in Gegenwart von Fibrillen (grün, A, D) bzw. im Überstand nach Sedimentation der Fibrillen (16000 g, 4°C , 1h) (orange, B, E) verglichen mit einer frisch präparierten Probe (blau, A- C). In Gegenwart von Fibrillen treten Änderungen in drei Abschnitte der Aminosäuresequenz auf: Q6-E19, H32-L37 und K54-D74. Entfernt man die Fibrillen durch Sedimentation, wird das ursprüngliche Spektrum wiederhergestellt. Im Haupttext in Abbildung 40 (S. 88) wurden nur die Kreuzsignale beschriftet, welche in Gegenwart von Fibrillen starke Änderungen der chemischen Verschiebung oder Intensität aufweisen.

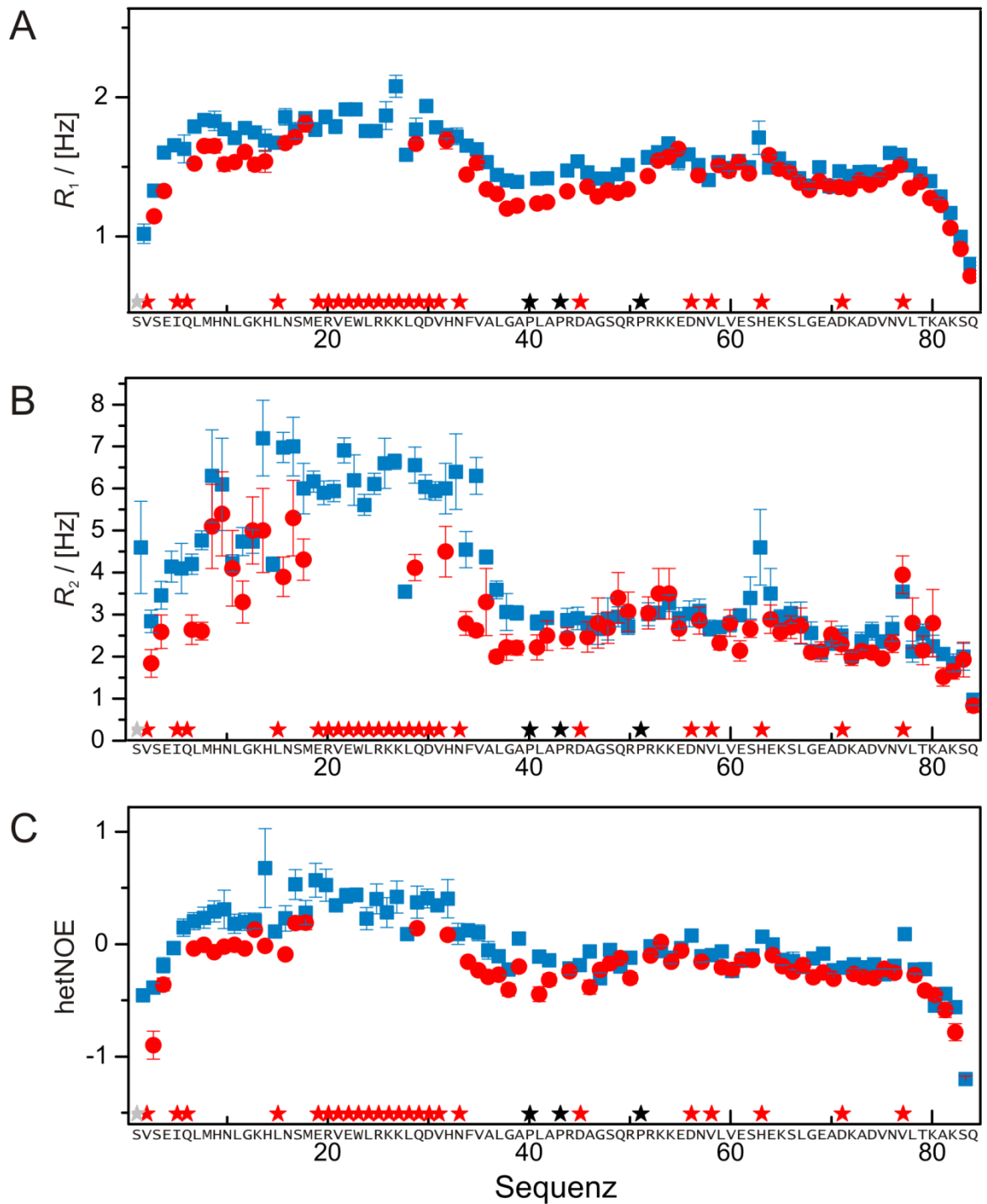


Abbildung S14: Longitudinale Relaxationsrate R_1 (A), transversale Relaxationsrate R_2 (B) und heteronuklearer NOE-Wert (C) für PTH₁₋₈₄ in Gegenwart von 0 mM (rot) bzw. 300 mM Natriumsulphat (blau). Die Zuordnung wurde durch eine Titration übertragen. Die Aminosäuren, bei denen eine eindeutige Übertragung nicht möglich war, sind durch rote Sterne gekennzeichnet. Proline bzw. nicht detektierbare Aminosäuren sind durch schwarze bzw. graue Sterne markiert. Die Messungen erfolgten an 150 μ M PTH₁₋₈₄ in 10 mM Natriumacetat, pH 5,3 bei 298 K und $B_0 = 14,1$ T.

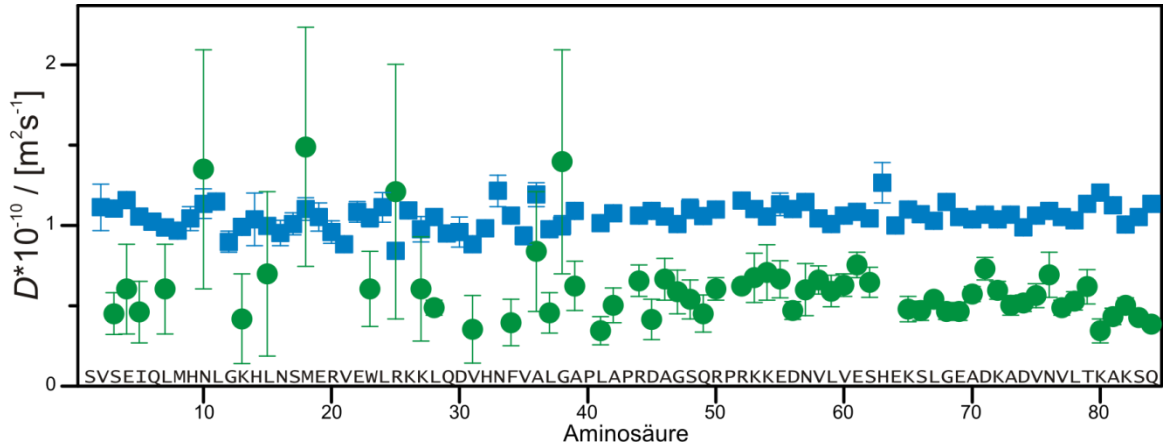


Abbildung S15: Diffusionskoeffizienten von PTH_{1,84} in Gegenwart von Fibrillen (grün) verglichen mit einer frisch präparierten Probe (blau) für die einzelnen Kreuzsignale. Aufgrund der relativ langen Diffusionszeit ($\delta=2$ ms, $\Delta=500$ ms) konnten in Gegenwart von Fibrillen nicht alle Kreuzsignale mit ausreichendem Signal-zu-Rausch-Verhältnis detektiert werden. Die sehr hohen Werte von N10, M18, R25 und G38 weisen aus diesem Grund sehr hohe Fehlerbalken auf. Ignoriert man diese Werte, ergibt sich ein relativ homogenes Bild über die gesamte Aminosäuresequenz. Der durchschnittliche Diffusionskoeffizient beträgt $D=(0,51\pm 0,07)*10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ in Gegenwart von Fibrillen und $D=(1,05\pm 0,06)*10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ für die frisch gelöste Probe. Diese Werte entsprechen im Rahmen der Fehlertoleranz den Ergebnissen des eindimensionalen Diffusionsexperimentes (Abbildung 38, S. 86).

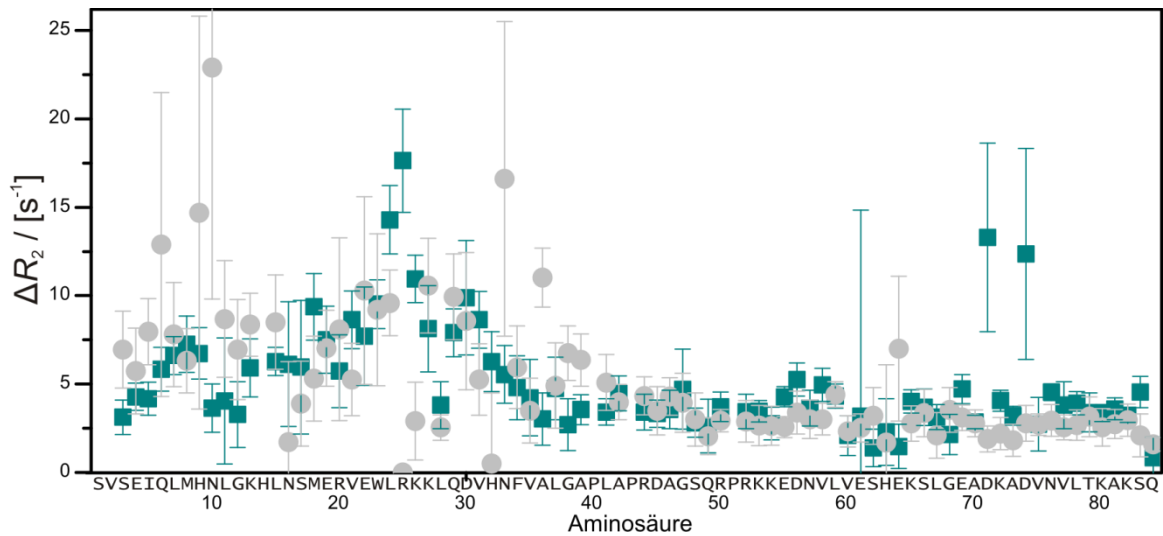


Abbildung S16: Differenz der transversalen Relaxationsraten der ¹⁵N-Kerne in Gegenwart von Fibrillen verglichen mit frisch gelöstem PTH_{1,84}. Die Messungen wurden bei unterschiedlichen Magnetfeldstärken durchgeführt (grau: 14,1 T, türkis: 18,8 T).

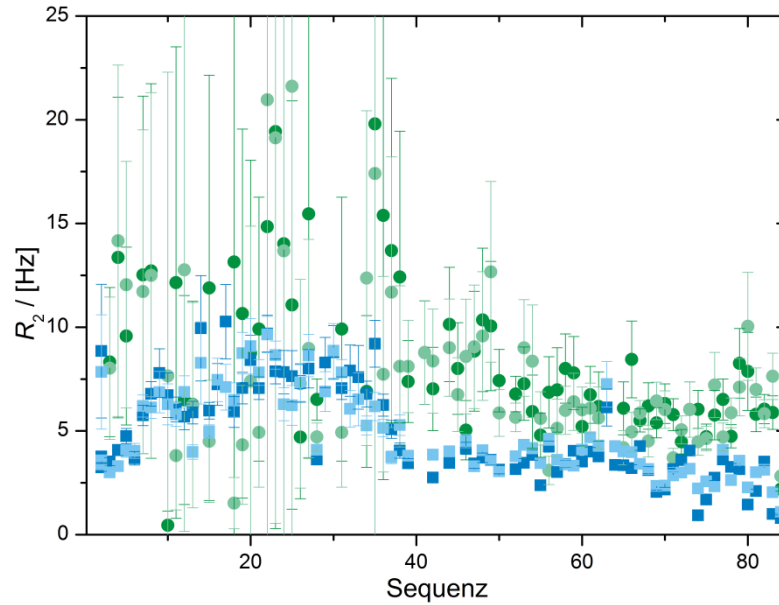


Abbildung S17: Transversale Relaxationsrate R_2 von PTH_{1,84} in Gegenwart von Fibrillen (grün) verglichen mit einer frisch gelösten Probe (blau). Messungen erfolgten bei unterschiedlichen CPMG-Frequenzen (hell 33 Hz, dunkel 1000 Hz). Die Fehlerbalken wurden aus dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie der Abweichung von zwei separaten Messungen abgeschätzt. Im Rahmen dieser Genauigkeit konnte keine Abhängigkeit von der CPMG-Frequenz beobachtet werden.

Bindungsmodell

Das Gleichgewicht zwischen Amyloidfibrillen und Monomeren wird, wie in Schema (2.6, S. 33) dargestellt, durch eine Assoziationsrate zweiter Ordnung k_{on} und eine Dissoziationsrate 1. Ordnung k_{off} beschrieben. Mittels der DEST-Experimente ist es nicht möglich, zwischen einer „unspezifischen“ Bindung der Monomere an die Fibrilloberfläche und einer Assoziation an der Enden der Fibrille, also einer Fibrillenelongation, zu unterscheiden. Allgemein gilt:



Hier stellt $[M]$ die Konzentration der freien Monomere dar. Für eine unspezifische Assoziation entspricht $[F_X]$ der Konzentration der freien Bindungsstellen in der Fibrillen und $[F_Y]$ der Konzentration der besetzten Bindungsstellen der Fibrillen. Für die Assoziation an den Fibrillenenden entspricht F_X einer Fibrille aus x bzw. F_Y aus $y = x+1$ Monomereinheiten.

Im Gleichgewicht gilt:

$$k_{on}[M][F_X] = k_{off}[F_Y] \quad (\text{S.3})$$

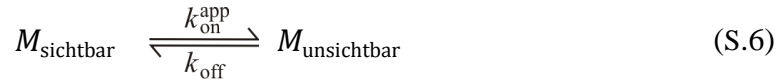
Definiert man folgende apparenten Assoziationsrate:

$$k_{on}^{app} = k_{on}[F_X] \quad (\text{S.4})$$

So vereinfacht sich Formel (S.4):

$$k_{on}^{app}[M] = k_{off}[F_Y] = k_{off}[M_{unsichtbar}] \quad (S.5)$$

Dies entspricht einem Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen Monomeren entsprechend Abbildung 20A:



Ein solches Zweizustandsmodell reicht häufig nicht, um die gemessenen DEST-Sättigungsprofile ausreichend zu beschreiben. Daher wurde das Modell entsprechend Abbildung 20 (S. 57) zu einem Dreizustandsmodell bzw. einem Pseudozweizustandsmodell, bei welchem der unsichtbare Zustand in zwei aminosäurespezifische Zustandsensembles unterteilt wird, ergänzt. Alle Modelle können durch erweiterte McConnell-Gleichungen beschrieben werden^[310]:

Zweizustandsmodell

Für ein Zweizustandsmodell mit isolierten Spins gilt^[310-312]:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} E/2 \\ I_x^A \\ I_y^A \\ I_z^A \\ I_x^B \\ I_y^B \\ I_z^B \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_l^A + k_{on}^{app} & \Omega_l^A & -\omega_y & -k_{off} & 0 & 0 \\ 0 & -\Omega_l^A & \lambda_l^A + k_{on}^{app} & \omega_x & 0 & -k_{off} & 0 \\ -2\Theta_l^A & \omega_y & -\omega_x & \rho_l^A + k_{on}^{app} & 0 & 0 & -k_{off} \\ 0 & -k_{on}^{app} & 0 & 0 & \lambda_l^B + k_{off} & \Omega_l^B & -\omega_y \\ 0 & 0 & -k_{on}^{app} & 0 & -\Omega_l^B & \lambda_l^B + k_{off} & \omega_x \\ -2\Theta_l^B & 0 & 0 & -k_{on}^{app} & \omega_y & -\omega_x & \rho_l^B + k_{off} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} E/2 \\ I_x^A \\ I_y^A \\ I_z^A \\ I_x^B \\ I_y^B \\ I_z^B \end{pmatrix} \quad (S.7)$$

Hier stellt A die beobachtbare (monomere) Spezies im chemischen Austausch mit der nicht direkt detektierbaren Spezies B (fibrillär) dar. ρ und λ bezeichnen die longitudinalen bzw. transversalen Relaxationsraten der jeweiligen Spezies für jede Aminosäure. Die aminosäurespezifischen Sättigungsprofile ergeben sich in diesem Modell ausschließlich durch die unterschiedlichen Relaxationsraten. E ist ein Einheitsoperator und Θ bezeichnet die Gleichgewichtsmagnetisierungen. Das Experiment wird typischerweise für mindestens zwei Stärken des Sättigungspulses ω wiederholt. Die numerische Lösung für I_z^A , die experimentell beobachtbare Magnetisierung nach einer festen Sättigungszeit t in Abhängigkeit des Offsets Ω wurde mit Matlab als Matrixexponentialfunktion berechnet^[311].

Dreizustandsmodell

Für ein Dreizustandsmodell mit isolierten Spins gilt^[310-312]:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} E/2 \\ I_x^A \\ I_y^A \\ I_z^A \\ I_x^B \\ I_y^B \\ I_z^B \\ I_x^C \\ I_y^C \\ I_z^C \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_I^A + k_{on}^{app} & \Omega_I^A & -\omega_y & -k_{-1} & 0 & 0 & -k_{-2} & 0 & 0 \\ 0 & -\Omega_I^A & \lambda_I^A + k_{on}^{app} & \omega_x & 0 & -k_{-1} & 0 & 0 & -k_{-2} & 0 \\ -2\Theta_I^A & \omega_y & -\omega_x & \rho_I^A + k_{on}^{app} & 0 & 0 & -k_{-1} & 0 & 0 & -k_{-2} \\ 0 & -k_1^{app} & 0 & 0 & \lambda_I^B + k_3 + k_{-1} & \Omega_I^B & -\omega_y & -k_{-3} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_1^{app} & 0 & -\Omega_I^B & \lambda_I^B + k_3 + k_{-1} & \omega_x & 0 & -k_{-3} & 0 \\ -2\Theta_I^B & 0 & 0 & -k_1^{app} & \omega_y & -\omega_x & \rho_I^B + k_3 + k_{-1} & 0 & 0 & -k_{-3} \\ 0 & -k_2^{app} & 0 & 0 & -k_3 & 0 & 0 & \lambda_I^C + k_{-2} + k_{-3} & \Omega_I^C & -\omega_y \\ 0 & 0 & -k_2^{app} & 0 & 0 & -k_3 & 0 & -\Omega_I^C & \lambda_I^C + k_{-2} + k_{-3} & \omega_x \\ -2\Theta_I^C & 0 & 0 & -k_2^{app} & 0 & 0 & -k_3 & \omega_y & -\omega_x & \rho_I^C + k_{-2} + k_{-3} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} E/2 \\ I_x^A \\ I_y^A \\ I_z^A \\ I_x^B \\ I_y^B \\ I_z^B \\ I_x^C \\ I_y^C \\ I_z^C \end{pmatrix} \quad (\text{Formel S.8})$$

Die Bedeutung der dargestellten Raten kann Abbildung 20C (S. 57) entnommen werden. Es gilt:

$$\begin{aligned} k_{on}^{app} &= k_1^{app} + k_2^{app} \\ k_{off} &= k_{-1} + k_{-2} \end{aligned} \quad (\text{S.9})$$

A stellt die beobachtbare (monomere) Spezies im chemischen Austausch mit der nicht direkt detektierbaren Spezies dar. Dabei wird zwischen einem direkt gebundenen (C) und einem intermediären Zustand (B) unterschieden. ρ und λ bezeichnen die longitudinalen bzw. transversalen Relaxationsraten der jeweiligen Spezies für jede Aminosäure. Die aminosäurespezifischen Sättigungsprofile ergeben sich in diesem Modell ausschließlich durch die unterschiedlichen Relaxationsraten. E ist ein Einheitsoperator und Θ bezeichnet die Gleichgewichtsmagnetisierungen. Das Experiment wird typischerweise für mindestens zwei Stärken des Sättigungspulses ω wiederholt. Die numerische Lösung für I_z^A , die experimentell beobachtbare Magnetisierung nach einer festen Sättigungszeit t in Abhängigkeit des Offsets Ω wurde mit Matlab als Matrixexponentialfunktion berechnet^[311].

Pseudozweizustandsmodell

Für ein Pseudozweizustandsmodell, wie in Abbildung 20D (S. 57) dargestellt, gilt ebenfalls Formel S.8, jedoch mit aminosäurespezifischen Assoziationsraten $-k_1^{app}(i)$, $-k_2^{app}(i)$ sowie $-k_3^{app}(i)$. Die numerische Lösung für I_z^A , die experimentell beobachtbare Magnetisierung nach einer festen Sättigungszeit t in Abhängigkeit des Offsets Ω wurde mit Matlab als Matrixexponentialfunktion berechnet^[311].

8 NMR-Pulsprogramme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pulsprogramme wurden innerhalb der Fachgruppe von verschiedenen Personen implementiert und getestet. Dies ist durch die jeweiligen Dateiendungen gekennzeichnet: *.mb: Monika Baumann, *.uw: Ulrich Weininger, *.sg: Stefan Gröger, *.mw: Marcel Weinlich, *.rp: Rica Patzschke, *.mk Michael Kovermann.

8.1 ¹H-Spektren

zg.uw

```

;zg
;avance-version (06/11/09)
;1D sequence
;
; $CLASS=HighRes
; $DIM=1D
#include <Avance.incl>

"acqt0=-p1*2/3.1416"
1 ze
2 30m
d1
p1 ph1
go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - high power pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;NS: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
    
```

zgdprwg.uw

```

;p3919gp
;avance-version (02/05/31)
;1D sequence
;water suppression using 3-9-19 pulse
sequence with gradients
;
;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

"p16=1000u"
"p28=40u"
"d12=20u"
"d13=3u"
"d16=100u"
"d19=60u"

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

1 ze
2 30m p19:f1
d1 cw:f1
d13 do: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
30m p19:f1 mc #0 to 2 F0(zd)
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

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p18
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p18
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;NS: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 4
;for z-only gradients:
;gpz1: 50%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
    
```

zgdprwg2.uw

```

;p3919gp
;avance-version (02/05/31)
;1D sequence
;water suppression using 3-9-19 pulse
sequence with gradients
;
;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

"p16=1000u"
"p28=40u"
"d12=20u"
"d13=3u"
"d16=100u"
"d19=90u"

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

1 ze
2 30m p19: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
30m p19:f1 mc #0 to 2 F0(zd)
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

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p18
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p18
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;NS: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 4
;cnst29: frequency gua in ppm
;cnst30: frequency h2o in ppm

;use gradient ratio: gp 1
;
;for z-only gradients:
;gpz1: 20%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
    
```

8.2 ¹H-¹⁵N-Korrelationspektren*fHSQCNI5.uw*

```

;avance-version          1 ze          ph0=0
;2D H-1/X correlation via double inept  d11 pl16:f3      ph1=1
transfer                2 d1 do:f3      ph2=2
;phase sensitive using States-TPPI method  3m          ph3=3
;with decoupling during acquisition      3 d11          ph4=0 2
;S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O'Neil-  4 d12 pl1:f1      ph5=0 0 0 0 2 2 2 2
Johnson & P.C.M. van Zijl,              50u UNBLKGRAD      ph6=0 0 2 2
; J. Magn. Reson. B 108, 94-98 (1995)    (p1 ph0)          ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
                                         4u
                                         p16:gp1          ;p11 : f1 channel - 1H PL for p1 (high pow)
                                         d16              ;p118: f1 channel - 1H PL for p28 (3-9-19)
                                         TAU pl3:f3       ;p12 : f2 channel - 13C PL for p3 (high pow)
                                         (CEN_HN2 p2 ph0) (p21 ph0 3u p22 ;p13 : f3 channel - 15N PL for p21 (high pow)
                                         ph1 3u p21 ph0):f3 ;p16: f3 channel - 15N PL for pcpd3 (decoup.)
                                         TAU              ;p1 : f1 channel - 90 deg high power pulse
                                         4u              ;p3 : f2 channel - 90 deg high power pulse
                                         p16:gp1          ;p21 : f3 channel - 90 deg high power pulse
                                         d16 pl2:f2       ;p28 : f1 channel - 90 deg pulse (3-9-19)
                                         (p1 ph1)        ;p16 : gradient pulse
                                         4u              ;d16 : delay for gradient recovery
                                         p16:gp2          ;pcpd3: f3 channel - 90 deg dec. pulse at pl16
                                         d16              ;cpdprg3: composite pulse dec. for ch.3 [garp]
                                         (p21 ph4):f3    ;d26 : ca. 1/(2*(N,HN)) [2.5m]
                                         d0              ;d19: delay for binomial water suppression
                                         (CEN_HC2 p2 ph6) (p3 ph0 3u p4 ph1 ; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
                                         3u p3 ph0):f2  ; d19 = 90u for 600 MHz
                                         d0              ;d1 : relaxation delay
                                         (p21 ph5):f3    ;ND0 = 2
                                         4u              ;NS = N*2
                                         p16:gp2          ;DS >= 8
                                         d16              ;phc0(F1) = 90 deg, phc1(F1) = -180 deg
                                         (p1 ph2)        ;gpz1:50%
                                         DELTA1           ;gpz2:80%
                                         p16:gp3         ;gpz3:30%
                                         d16 pl18:f1     ;use sine.100
                                         p28*0.231 ph1   ;d31:in0
                                         d19*2
                                         p28*0.692 ph1
                                         d19*2
                                         p28*1.462 ph1   ;gpnam1: SINE.100
                                         DELTA           ;gpnam2: SINE.100
                                         (p22 ph0):f3    ;gpnam3: SINE.100
                                         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

```

NMR-Pulsprogramme: 1H-15N-Korrelationsspektren

sflmqcf3gpqh.rp

```
;sflmqcf3gpqh
;advance-version (09/11/18)
;SOFAST HMQC
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and
double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;P.Schanda and B. Brutscher, J. Am. Chem. Soc.
127, 8014 (2005)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D

prosol relations=<triple>

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

"d11=30m"
"d12=20u"
"d21=1s/(cnst4*2)"
"i0=inf1"
"d0=in0/2-p21*4/3.1415"
"DELTA1=d21-p16-d16-p39*cnst39"
"DELTA2=p39*cnst39-de-4u"

"spoff23=bf1*(cnst19/1000000)-o1"
"spoff24=bf1*(cnst19/1000000)-o1"

1 ze
d11 p126:f3
2 d1 do:f3
3 d12 p13:f3
50u UNBLKGRAD

p16:gp2
d16

(p39:sp23 ph1):f1
p16:gp1
d16

# ifdef LABEL_CN
(center (p40:sp24 ph2):f1 (p8:sp13 ph1):f2
(DELTA1 p21 ph3 d0 p21 ph4 DELTA1):f3 )
# else
(center (p40:sp24 ph2):f1 (DELTA1 p21 ph3 d0
p21 ph4 DELTA1):f3 )
# endif /*LABEL_CN*/

DELTA2
p16:gp1
d16 p126:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 mc #0 to 2
F1PH(ip3, id0)
exit

ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph31=0 2 2 0

;pl3 : f3 channel - power level for pulse (default)
;pl26: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling (low power)
;sp13: f2 channel - shaped pulse 180 degree (adiabatic)
;sp23: f1 channel - shaped pulse 120 degree
;
(Pc9_4_120.1000 or Q5.1000)
;sp24: f1 channel - shaped pulse 180 degree (Rsnob.1000)
;p8 : f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion (adiabatic)
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p39: f1 channel - 120 degree shaped pulse for excitation
;
Pc9_4_120.1000 (120o) (3.0ms at 600.13 MHz)
;
(or Q5.1000 (90o) (2.0ms at 600.13 MHz) )
;p40: f1 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
;
Rsnob.1000 (1.0ms at 600.13 MHz)
;d0 : incremented delay (2D) = in0/2-p21*4/3.1415
;d1 : relaxation delay
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21 : 1/(2J)NH
;cnst4: = J(NH)
;cnst19: H(N) chemical shift (offset, in ppm)
;cnst39: compensation of chemical shift evolution during p39
;
Pc9_4_120.1000: 0.529
;
Q5.1000: -0.07
;inf1: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/ SW(N) = 2 * DW(N)
;nd0: 1
;NS: 2 * n
;DS: 16
;aq: <= 50 msec
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEC
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3: garp4.p62
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;
use pulse of >= 350 usec

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
;
11 : 7
;for z-only gradients:
;gpz1: 11%
;gpz2: 7%

;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100

;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
;
option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end

;Processing

;PHC0(F1): 90
;PHC1(F1): -180
;FCOR(F1): 1
```

NMR-Pulsprogramme: 1H-15N-Korrelationspektren

trosy.uw

```

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

:$OWNER=nmsu
#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 p11:f1 p12:f2 p13: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 p118: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

:p16: 1ms
:gpz1: 50%
:gpz2: -80%
:gpz3: -30%
:gpz4: -65%

```

8.3 Experimente zur Rückgratzuordnung

8.3.1 Klassisch

n15tocsy.uw

```

;TOCSY-HSQC (n15tocsy.ks)
;avance-version
;3D X-nucleus edited TOCSY
;Author: Kristian Schweimer, 14.03.98
;
#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=90u"
"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"

"l3=td1/2"
"l13=td2/2"

"FACTOR1=(d9/(p6*172.659))/2+0.5"
"l1=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
(pl 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
(pl 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*0.944 ph23
p6*0.333 ph25
p6*1.389 ph23
d6
p6*1.333 ph23
p6*3.333 ph25
d6
p6*0.833 ph25
p6*2.833 ph23
d6
p6*0.111 ph23
p6*2.111 ph25
d6
p6*2.000 ph25
p6*2.000 ph23
d6
p16:gp2
;;second z-filter
gradient
;; high power on 1H
d16 pl1:f1
(pl ph4)
4u
p16:gp3
TAU pl3:f3
(CEN_HN2 p2
ph4) (p22 ph5):f3
4u
p16:gp3
TAU fq=cnst27(bf
ppm):f2 ;; set
C13-transm. to 115
ppm
(pl ph6)
4u
p16:gp4
d16
(p21 ph7):f3

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 ph23
p6*3.333 ph25
d6
p6*0.833 ph23
p6*2.833 ph25
d6
p6*0.111 ph25
p6*2.111 ph23
d6
p6*2.000 ph23
lo to 7 times l1
3u
p16:gp5
;;second z-filter
gradient
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=(4) 0 0 2 2
ph2=(4) 0 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 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 0 0 2

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

;gpz1: 13%
;gpz2: 17%
;gpz3: 30%
;gpz4: 0.6%
;gpz5: 50%

```


NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

n15noesy.uw

```

:NOESY-HSQC ("nsyhsqc_ks")
;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

#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=90u"
"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 p116: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 p13:f3
  d12 p12:f2
  d12 p11: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 p13: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 ;gpz1: 13%
(p22 ph13):f3 ;gpz2: 30%
DELTA3 ;gpz3: 0.6%
(p21 ph9):f3 ;gpz4: 50%
4u
p16:gp3
d16
(p1 ph10)
DELTA1
p16:gp4
d16 p118: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 p116: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
  
```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

trHNCA.uw

```

;TROSY-HNCA
;avance-version

;SOWNER=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"

;GPZ=50-80-(-80)-(-30)-(-65)
;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=90u"

"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=17660"
"spoffs8=0"
"spoffs13=0"

"in30=in10" ;; nd0 = 4

aqseq 321

1 ze
  d11
2 d11
  d1 p11:f1 p12:f2 p13:f3
  50u UNBLKGRAD
  (p11 ph3)
  4u
  20u p11:f1
  4u
  (p1 ph0)
  4u
  p16:gp1
  d16
  TAU
  (CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
  4u
  TAU
  p16:gp1

d16
(p1 ph3)
4u
p16:gp2*EA
d16
(p21 ph7):f3
d3
(p14:sp3 ph10):f2
3u
(p22 ph0):f3
3u
TAU1
d3 p11:f1
(p21 ph1):f3
4u

(p13:sp2 ph8):f2
d0
(p2 ph0):f1
3u
(p14:sp5 ph10):f2
3u
(p22 ph0):f3
d0
(p15:sp13 ph11):f2
DELTA
(p2 ph2):f1
3u
(p14:sp5 ph12):f2
4u
(p13:sp8 ph13):f2
4u

(p21 ph6):f3
d30
(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 p11:f1
(p11 ph0):f1
4u
20u p11:f1
4u
(p1 ph4)
4u
p16:gp4
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp4
d16
(p1 ph2)
DELTA1
(p21 ph1):f3
4u
p16:gp5
d17 p18: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 ;; ph7=0 . invert for
second FID
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
F1PH(rd10 & rd30 & ip8, id0)
F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2,
id10 & dd30 & ip6*2 & ip31*2)
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 2 2 2 2
ph10=0
ph11=0
ph12=0
ph13=0
ph31=0 2 2 0

;gpz1: 50%
;gpz2: 80%
;gpz3: -80%
;gpz4: -30%
;gpz5: -65%

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

trhncoca.sg

```

:trhncocagp3d
:avance-version (07/05/09)
:TROSY-HNCOCA
:3D sequence with inverse correlation for triple resonance via TROSY
and inept transfer steps
;
; F1(H) -> F3(N) -> F2(C=O) -> F2(Ca,t1)
; -> F2(C=O) -> 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 (t2), using
constant time in t2
;with H-1 180degree pulses in t1
;(use parameterset TRHNCOCAGP3D)
;
;M. Salzmann, G. Wider, K. Pervushin, H. Senn & K. Wuethrich,
; J. Am. Chem. Soc. 121, 844-848 (1999)
;(A. Eletsky, A. Kienhoefer & K. Pervushin,
; J. Biomol. NMR 20, 188-180 (2001))
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
prosol relations=<triple>

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

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d12=20u"

"d22=4m"
"d23=12m"
"d26=2.3m"

"d0=3u"
"d10=3u"
"d30=d23-p11-8u-p1"

"in0=inf1/4"
"in10=inf2/2"

"in30=in10"
"DELTA=d0*4+larger(p14,p22)-p14+p2*2-4u"
"DELTA1=d26-p11-p16-d16-8u"
"DELTA2=d22-p14-4u"
"DELTA3=d23-d10-p14-p21*4/3.1416"
"DELTA4=d26-p16-d16"

"l0=1"

"spoff2=0"
"spoff3=0"
"spoff5=bf2*((cnst22-cnst21)/1000000)"
"spoff7=bf2*((cnst21-cnst22)/1000000)"
"spoff8=0"

aqseq 321

1 d11 ze
2 d11
3 d1 p11:f1 fq=cnst21(bf ppm):f2
50u UNBLKGRAD

p1 ph1
4u p10:f1
(p11:sp1 ph3:r):f1
4u
p16:gp1
d16 p11:f1
DELTA1
(center (p2 ph2) (p22 ph1):f3 )
DELTA1
p16:gp1
d16 p10:f1
(p11:sp1 ph4:r):f1
4u
4u p11:f1
(p1 ph4):f1

(p21 ph1):f3
d23
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
d23
(p21 ph2):f3

(p13:sp2 ph5):f2
4u
(p14:sp5 ph1):f2
DELTA2
(p14:sp3 ph1):f2
4u
(p14:sp5 ph1):f2
DELTA2
(p13:sp8 ph2):f2

4u
30u fq=cnst22(bf ppm):f2

(p13:sp2 ph6):f2
d0
(p2 ph1):f1
d0
(center (p14:sp7 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
d0
(p2 ph1):f1
d0
(p14:sp3 ph1):f2
DELTA
(p14:sp7 ph1):f2
4u
(p13:sp8 ph1):f2

4u
30u fq=cnst21(bf ppm):f2

(p13:sp2 ph2):f2
4u
(p14:sp5 ph1):f2
DELTA2
(p14:sp3 ph1):f2
4u
(p14:sp5 ph1):f2
DELTA2
(p13:sp8 ph1):f2

if "l0 %2 == 1"
{
(p21 ph7):f3
}
else
{
(p21 ph8):f3
}

d10
(p14:sp5 ph1):f2
DELTA3
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
d30 p10:f1
(p11:sp1 ph1:r):f1
4u
4u p11:f1

(p1 ph9)
p16:gp2
d16
DELTA4
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
DELTA4
p16:gp2
d16
(center (p1 ph1) (p21 ph9):f3 )
p16:gp3
d16
DELTA1 p10:f1
(p11:sp1 ph3:r):f1
4u
4u p11:f1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
4u p10:f1

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

```

(p11:sp1 ph3:r):f1
DELTA1
p16:gp3
d16 p11:f1
4u BLKGRAD
(p21 ph1):f3
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
    F1PH(rd10 & rd30 & ip6, id0)
    F2EA(ip9*2 & iu0, id10 & dd30)
exit

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

;p0 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;sp1: f1 channel - shaped pulse 90 degree (H2O on resonance)
;sp2: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on resonance)
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on resonance)
;sp5: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca off resonance)
;sp7: f2 channel - shaped pulse 180 degree (C=O off resonance)
;sp8: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on resonance)
;
;    for time reversed pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse [1 msec]
;p13: f2 channel - 90 degree shaped pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;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]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery

;d22: 1/(4J(COCa)) [4 msec]
;d23: 1/(4J(NCO)) [12 msec]
;d26: 1/(4J'(NH)) [2.3 msec]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d23-p11-8u-p1
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;cnst22: Calpha chemical shift (offset, in ppm)
;o2p: Calpha chemical shift (cnst22)
;inf1: 1/SW(Ca) = 2 * DW(Ca)
;inf2: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(4 * SW(Ca)) = (1/2) DW(Ca)
;nd0: 4
;in10: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)
;nd10: 2
;in30: = in10
;NS: 8 * n
;DS: >= 16
;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

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
;                    30 : 18 : 44

;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;gpz2: 18%
;gpz3: 44%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100

;Processing

;PHC0(F2): -90

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

trHNCO.sg

```

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

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

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/4"

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

"d3=12.4m"
"d0=4u"
"d10=4u"
"d19=60u"
"d16=100u"
"d11=30m"
"d26=2.65m"
"d30=d3*0.5"
"d29=d30-d10"
;"d28=d29-p16-d16+p21*1.273+DELTA1-p11-20u"
"d28=d29-p16-d16+p21*1.273+DELTA1"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"DELTA=d0*2-4u"
"DELTA1=4u"
"DELTA2=TAU"
"DELTA3=0.5*(p16+d16+8u-p28*4.770-d19*10-p22-DELTA1)"
"DELTA4=TAU-p28*4.77-d19*10"

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

"in30=in10" ;; nd0 = 4

aqseq 321

1 ze
d11
2 d11
d1 p11:f1 p12:f2 p13:f3
50u UNBLKGRAD
(p1 ph0)
4u
p16:gp1
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp1
d16
(p1 ph3)
4u
; 20u p11:f1
; (p11 ph2)
4u
p16:gp2*EA
d16
(p21 ph7):f3
d3
(p14:sp3 ph10):f2 (CEN_CN2 p22 ph0):f3
d3
(p21 ph1):f3
4u

(p13:sp2 ph8):f2
d0
(p14:sp5 ph10):f2 (CEN_CN2 p22 ph0):f3
d0
(p14:sp3 ph11):f2
DELTA
(p14:sp5 ph12):f2
4u
(p13:sp8 ph13):f2
4u
(p21 ph6):f3
d30
(p14:sp5 ph10):f2
d30

(p14:sp3 ph11):f2 (CEN_CN2 p22 ph9):f3
d29
d10
(p14:sp5 ph12):f2
d10
p16:gp3*EA
d16 p11:f1
; (p11 ph2):f1
; 20u p11:f1
(p1 ph4)
4u
p16:gp4
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp4
d16
(p1 ph2)
DELTA1
(p21 ph1):f3
4u
p16:gp5
d16 p11:8:f1
DELTA2
DELTA3
(p22 ph0):f3
DELTA3
p28*0.231 ph0
d19*2
p28*0.692 ph0
d19*2
p28*1.462 ph0
d19*2
p28*1.462 ph2
d19*2
p28*0.692 ph2
d19*2
p28*0.231 ph2
4u
DELTA4
p16:gp5
d16
(p21 ph5):f3 ;; ph7=0 . invert for second FID
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
F1PH(rd10 & rd30 & ip8, id0)
F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10 & dd30 & ip6*2 & ip31*2)
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 2 2 2 2
ph10=0
ph11=0
ph12=0
ph13=0
ph31=0 2 2 0

;gpz1: 50%
;gpz2: 80%
;gpz3: -80%
;gpz4: -30%
;gpz5: -65%

;p13: length 90 rect.100
;p14: length 180 Q3.1000
;sp2: shape pulse power rect.100
;sp8: shape pulse power rect.100
;sp3: shape pulse power Q3.1000
;sp5: shape pulse power Q3.1000

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

trhncaco.sg

```

;trhncacoetgp3d (p11:sp1 ph2:r):f1
;avance-version (07/08/13) 4u
;TROSY-HNCACO 4u p11:f1
;3D sequence with
; inverse correlation for triple resonance (p1 ph3):f1
; via TROSY and inept transfer steps p16:gp1
; d16
; F1(H) -> F3(N) -> F2(Ca) -> F2(C=O,t1) DELTA1
; -> F2(Ca) -> F3(N,t2) -> F1(H,t3) (center (p2 ph2) (p22 ph1):f3 )
; DELTA1
;on/off resonance Ca and C=O pulses using shaped pulse p16:gp1
;phase sensitive (t1) d16
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection (t2) (p1 ph2):f1
;using constant time in t2
;with H-1 180degree pulses in t1 (p21 ph1):f3
;uncompensated version d25=d26 p16:gp2
;(use parameter set TRHNCACOETGP3D) d16
; DELTA2
; T. Schulte-Herbrueggen & O.W. Sorensen, J. Magn. Reson. 144, (center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
; 123 - 128 (2000) DELTA2
; A. Eletsky, A. Kienhoefer & K. Pervushin, p16:gp2
; J. Biomol. NMR 20, 188-180 (2001) d16
; (M. Salzmann, G. Wider, K. Pervushin, H. Senn & K. Wuethrich, (p21 ph2):f3
; J. Am. Chem. Soc. 121, 844-848 (1999))
;
; $CLASS=HighRes (p13:sp2 ph6):f2
; $DIM=3D 4u
; $TYPE= (p14:sp5 ph1):f2
; $SUBTYPE= p16:gp1
; $COMMENT= d16
; DELTA3
; (p24:sp9 ph1):f2
; prosol relations=<triple> 4u
; (p14:sp5 ph1):f2
; #include <Avance.incl> DELTA3
; #include <Grad.incl> p16:gp1
; #include <Delay.incl> d16
; (p13:sp8 ph2):f2
;
; define list<gradient> EA3 = { 0.8750 1.0000}
; define list<gradient> EA5 = { 1.0000 0.6667}
; define list<gradient> EA7 = { 0.6595 1.0000}
;
; "p2=p1*2" (p13:sp2 ph7):f2
; "p22=p21*2" d0
; "d11=30m" (p2 ph1):f1
; d0
; "d22=4m" (center (p14:sp7 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
; "d23=12m" d0
; "d25=2.3m" (p2 ph1):f1
; "d26=2.3m" d0
;
; "d0=3u" (p14:sp3 ph1):f2
; "d10=3u" DELTA
; "d30=d23/2-d25/2-p14/2-p16/2-d16/2-2u" (p14:sp7 ph1):f2
; 4u
; (p13:sp8 ph1):f2
;
; "in0=inf1/4"
; "in10=inf2/4" 4u
; 30u fq=cnst22(bf ppm):f2
;
; "in30=in10"
;
; "DELTA=d0*4+p2*2+larger(p14,p22)-p14-4u" (p13:sp2 ph2):f2
; "DELTA1=d26-p16-d16" 4u
; "DELTA2=d23-p16-d16" (p14:sp5 ph1):f2
; "DELTA3=d22-p14-p16-d16-4u" p16:gp1
; "DELTA4=d23/2-d25/2-p14/2-d10+p21*2/3.1416" d16
; "DELTA5=d23/2-d25/2-p14/2-d10-p16-d16-p11+p21*2/3.1416-8u" DELTA3
; "DELTA6=d25-p16-d16" (p24:sp9 ph1):f2
; "DELTA7=d26-p11-p16-d16-8u" 4u
; (p14:sp5 ph1):f2
; DELTA3
;
; "spoff2=0" p16:gp1
; "spoff3=0" d16
; "spoff5=bf2*((cnst21-cnst22)/1000000)" (p13:sp8 ph1):f2
; "spoff7=bf2*((cnst22-cnst21)/1000000)"
; "spoff8=0" (p21 ph5):f3
; "spoff9=0" d30
;
; aqseq 321 (p14:sp5 ph1):f2
; d30
;
; 1 d11 ze (center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
; 2 d11 DELTA4
; 3 d1 p11:f1 fq=cnst22(bf ppm):f2 d10
; 50u UNBLKGRAD (p14:sp5 ph1):f2
; d10
; DELTA5
; 4u p10:f1 p16:gp3*EA3

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

```

d16 p10:f1
(p11:sp1 ph3:r):f1
4u
4u p11:f1

(p1 ph8)
p16:gp4
d16
DELTA6
(center (p2 ph2) (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph2):f3 )
DELTA6
p16:gp4
d16
(p1 ph1)

p16:gp5*EA5
d16
4u

(p21 ph1):f3
p16:gp6
d16
DELTA7 p10:f1
(p11:sp1 ph4:r):f1
4u
4u p11:f1
(center (p2 ph2) (p22 ph2):f3 )
4u p10:f1
(p11:sp1 ph4:r):f1
4u
DELTA7
p16:gp6
d16 p11:f1
(p21 ph9:r):f3

p16:gp7*EA7
d16
4u BLKGRAD

go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
    F1PH(rd10 & rd30 & rp5 & rp31 & ip7, id0)
    F2EA(igrad EA3 & igrad EA5 & igrad EA7 & ip8*2 & ip9*2, id10 &
dd30 & ip5*2 & ip31*2)
exit

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

;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 90 degree (H2O on resonance)
;sp2 : f2 channel - shaped pulse 90 degree (on resonance)
;sp3 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (on resonance)
;sp5 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (C=O off resonance)
;sp7 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca off resonance)
;sp8 : f2 channel - shaped pulse 90 degree (on resonance)
;
;      for time reversed pulse
;sp9 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca on resonance)
;
;      sp9 requires higher selectivity than sp3
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p11 : f1 channel - 90 degree shaped pulse      [1 msec]
;p13 : f2 channel - 90 degree shaped pulse
;p14 : f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16 : homospoil/gradient pulse      [1 msec]
;p21 : f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22 : f3 channel - 180 degree high power pulse

;p24: f2 channel - 180 degree shaped pulse (sp9)
;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
;d22: 1/(4J(CaCO))      [4 msec]
;d23: 1/(4J(NCa))      [12 msec]
;d25: 1/(4J'(NH))      [2.3 msec]
;d26: 1/(4J'(NH))      [2.3 msec]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d23/2-d25/2-p14/2-p16/2-d16/2-2u
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;cnst22: Calpha chemical shift (offset, in ppm)
;o2p: CO chemical shift (cnst21)
;inf1: 1/SW(CO) = 2 * DW(CO)
;inf2: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(4 * SW(CO)) = (1/2) DW(CO)
;nd0: 4
;in10: 1/(4 * SW(N)) = (1/2) DW(N)
;nd10: 4
;in30: = in10
;NS: 8 * n
;DS: >= 16
;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

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4 : gp 5 : gp 6 : gp 7
;
;                2 : 2 : -80 : 2 : 30 : 45 : 30.13

;for z-only gradients:
;gpz1: 2%
;gpz2: 2%
;gpz3: -80%
;gpz4: 2%
;gpz5: 30%
;gpz6: 45%
;gpz7: 30.13%

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

;Processing

;PHC0(F2): 22.5

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

trHNCACB.uw

```

;TROSY-HNCACB
;avance-version

;SOWNER=nmsru
#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"

;GPZ=50-80-(-80)-(-30)-(-65)
;p14/sp3 G3.256
;p14/sp5 G3.256 131ppm offset

"d3=12.4m"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d17=200u"
"d19=90u"

"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=19770"

"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
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

```


NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

```

(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
      FIPH(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

;gpz1: 50%
;gpz2: 80%
;gpz3: -80%
;gpz4: -30%
;gpz5: -65%

trhncocacb.uw
:TROSY-HNCOACB
:avance-version

;$OWNER=nmrsm
#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"

:GPZ=50-80-(-80)-(-30)-(-65)
;p14/sp3 G3.256
;p13/sp2 G4
;p14/sp5 G3.256 -117ppm offset
;p15/sp13 rect100
;p13/sp8 g4tr
;p12/sp12 rect100
;p14/sp7 G3.256 +131ppm offset

"d3=12.4m"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d17=200u"
"d19=90u"

"d0=10u"
"d10=4u"
"d23=3.5m-p16-d16"
"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"

"spoffs2=0"
"spoffs3=0"
"spoffs5=-19620"
"spoffs7=19620"
"spoffs8=0"
"spoffs12=0"
"spoffs13=0"

"in30=in10" ;; nd0 = 4

aqseq 321

1 ze
d11
2 d11
d1 pl11:f1 pl0:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p11 ph3)
4u
20u pl1:f1
4u
(p1 ph0)
4u
p16:gp1
d16
TAU fq=cnst26(bf ppm):f2
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp1
d16
(p1 ph3)
4u
p16:gp2*EA
d16
(p21 ph7):f3
d3
(p14:sp3 ph10):f2
3u
(p22 ph0):f3
3u

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

```

TAU1
d3 pl1:f1
(p21 ph1):f3
4u

(p13:sp2 ph10):f2
4u
(p14:sp5 ph11):f2
d24
(p14:sp3 ph10):f2
4u
(p14:sp5 ph11):f2
d24
(p13:sp8 ph12):f2
4u
50u fq=cnst27(bf ppm):f2
20u
p16:gp6
d16
(p12:sp12 ph8):f2           ;; starting CA evolution
4u
p16:gp7
d16
d23
(p15:sp13 ph10):f2
4u
p16:gp7
d16
d23
(p12:sp12 ph13):f2
4u
d0
(p2 ph0)
3u
(p14:sp7 ph0):f2
3u
(p22 ph0):f3
d0
4u
(p15:sp13 ph15):f2
4u
DELTA
(p2 ph2)
3u
(p14:sp7 ph10):f2
10u
4u

(p12:sp12 ph16):f2
4u
p16:gp8
d16
d23
(p15:sp13 ph11):f2
4u
p16:gp8
d16
d23
(p12:sp12 ph17):f2
4u
50u fq=cnst26(bf ppm):f2
4u
(p13:sp2 ph12):f2
4u
d24
(p14:sp5 ph11):f2
4u
(p14:sp3 ph10):f2
d24
(p14:sp5 ph11):f2
4u
(p13:sp8 ph10):f2

(p21 ph6):f3
d30 pl0:f2
(p14:sp5 ph10):f2
d30
(p14:sp3 ph11):f2
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 & 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
      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

```

8.3.2 Nicht-lineare Detektion

nls_hncogpwg3d_t1sc_1z.mb

```

;nls_hncogpwg3d_t1sc_1z
;avance-version (08/08/04)
;HNCO
;3D sequence with
; inverse correlation for triple resonance using multiple
; inept transfer steps
;
; F1(H) -> F3(N) -> F2(C=O,t1) -> F3(N,t2) ->
F1(H,t3)
;
;on/off resonance Ca and C=O pulses using shaped pulse
;phase sensitive (t1)
;phase sensitive (t2)
;using constant time in t2
;water suppression using watergate sequence
;(use parameterset HNCOPWG3D)
;
;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)
;Semi constant time added 23.10.2009
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>

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

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d12=20u"

"d21=5.5m"
"d23=12.4m"
"d26=2.7m"

"d0=3u"
"d10=d23/2-p14/2"
"d29=d23/2-p14/2-p26-d21-4u"
"d30=d23/2-p14/2"

"in0=inf1/2"

"DELTA=d0*2+larger(p14,p22)-p14"
"DELTA1=d23-d21-p26"
"DELTA2=d26-p16-d16-p11-12u"
"DELTA3=d23-d21-p26-4u"

"TAU1=d23/2-p14/2"
"TAU2=d23/2-p14/2-p26-d21-4u"

"spoff2=0"
"spoff3=0"
"spoff5=bf2*(cnst22/1000000)-o2"
"spoff8=0"

"FACTOR1=TAU1*10000000*2/112"
"in30=FACTOR1/10000000"
"in10=inf2/2-in30"
"in29=in10-in30"

aqseq 321

"cnst10=2.0"
"cnst11=0.0"
"cnst12=0.0"
"COUNTER=110"

1 d11 ze
d11 pl16:f3
2 d11 do:f3
d12
3 d12
d12
4 d12
d12
d12
5 d1 pl1:f1

if "cnst10 > 1.0"
{
4u do:f1
(p26 ph7):f1
d21
(p21 ph1):f3
}

"cnst11=vd*((11/2)-1)"
d12
"d0=3u+in0*cnst11"

d12 ivd
d12
"cnst12=vd*((11/2)-1)"
d12
"d10=TAU2+in10*cnst12"
;"d10=TAU2"
d12
"d29=4u+in29*cnst12"
;"d29=4u"
d12
"d30=TAU1-in30*cnst12"
;"d30=TAU1"
d12
"d28=d10+4u+p26+d21-d29-p14"

d12 ivd
d12
"cnst10=0.0"
}
else
{
200u
}

p1 ph1
d26 pl3:f3
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
d26 UNBLKGRAD
(p1 ph2):f1
4u pl0:f1
(p11:sp1 ph1:r):f1
4u
p16:gp1
d16
(p21 ph3):f3
d21 pl19:f1
(p26 ph2):f1
DELTA1 cpds1:f1 ph1
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
d23
(p21 ph1):f3

(p13:sp2 ph4):f2
d0
(center (p14:sp5 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
d0
(p14:sp3 ph1):f2
3u
(center (p14:sp5 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
3u
(p13:sp8 ph1):f2

4u do:f1
(p26 ph7):f1
4u
p16:gp2
d16 :pl1:f1

(p26 ph2):f1
20u cpds1:f1 ph1
(p21 ph5):f3
d30
(p14:sp5 ph1):f2
d30
(p22 ph8):f3
d29
(p14:sp3 ph1):f2
d28
(p14:sp5 ph1):f2
d10
4u do:f1
(p26 ph7):f1
d21
(p21 ph1):f3
p16:gp3
d16 pl0:f1
(p11:sp1 ph6):f1
4u
4u pl1:f1
(p1 ph1)
4u
p16:gp4
d16
DELTA2 pl0:f1
(p11:sp1 ph6):f1
4u
4u pl1:f1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
4u pl0:f1
(p11:sp1 ph6):f1
4u
DELTA2
p16:gp4
d16 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd3:f3
d11 do:f3 wr #0 if #0 zd
d12 dp5
lo to 3 times 2
d12 ip5*2
d12 ip4
lo to 4 times 2
d12 rp4
d12 rp5
d12
"cnst10=2.0"
lo to 5 times COUNTER
exit
ph1=0
ph2=1
ph3=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph4=0 2
ph5=0 0 2 2
ph6=2
ph7=3
ph8=0 0 0 0 2 2 2 2
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 0 0 2

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

```

;p0 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p119: f1 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp1: f1 channel - shaped pulse 90 degree (H2O on resonance)
;sp2: f2 channel - shaped pulse 90 degree (C=O on resonance)
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (C=O on resonance)
;sp5: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca off resonance)
;sp8: f2 channel - shaped pulse 90 degree (C=O on resonance)
;
; for time reversed pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse [1 msec]
;p13: f2 channel - 90 degree shaped pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p26: f1 channel - 90 degree pulse at p119
;d0 : incremented delay (F1 in 3D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d10: incremented delay (F2 in 3D) = d23/2-p14/2
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: 1/(2J(NH)) [5.5 msec]
;d23: 1/(4J(NCO)) [12 msec]
;d26: 1/(4J(NH)) [2.3 msec]
;d29: incremented delay (F2 in 3D) = d23/2-p14/2-p26-d21-4u
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d23/2-p14/2
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;cnst22: Calpha chemical shift (offset, in ppm)
;o2p: CO chemical shift (cnst21)

;inf1: 1/SW(CO) = 2 * DW(CO)
;inf2: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(2 * SW(CO)) = DW(CO)
;nd0: 2
;in10: 1/(4 * SW(N)) = (1/2) DW(N)
;nd10: 4
;in29: = in10
;in30: = in10
;NS: 8 * n
;DS: >= 16
;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: States-TPPI (or TPPI) in F2
;cpds1: decoupling according to sequence defined by cpdprg1
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
;pcpd1: f1 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 50 : 40 : 60 : 30

;for z-only gradients:
;gpz1: 50%
;gpz2: 40%
;gpz3: 60%
;gpz4: 30%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100

```

hncaconh5d2_nove2.mb

```

$CLASS=HighRes
$DIM=3D

prosol relations=<triple>

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

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d12=20u"

"d3=2.3m"
"d4=13.75m"
"d5=4.55m"
"d6=14.0m"
"d8=14.3m"
"d26=5.4m"
"TAU5=d26-p16-d16-4u"

"DELTA=d3-p21"
"DELTA1=2*d3-p26/2"
"DELTA2=d4/2-2*d3-p26/2"
"DELTA3=d4/2-p12"

"DELTA4=d5-p12/2"
"DELTA5=d8-d5-p12/2"
"d9=d8-p12-4u"

"DELTA6=d6-d5-p22"

"DELTA7=p16+d16+8u"

"FACTOR1=2*d3*10000000/111"
"in4=FACTOR1/10000000"
"in0=1/(2*11)"
"in2=in0-in4"

"FACTOR2=d4*10000000/112"
"in20=FACTOR2/10000000"
"in17=1/(2*12)-in20"
"in19=1/(2*12)-2*in20"

"FACTOR3=2*d6*10000000/113"
"in23=FACTOR3/10000000"
"in21=1/(2*13)"
"in22=in21-in23"

"TAU5=d26-p16-d16-4u"
"d29=d6/2-p12/2-p26-d26-4u"
"d30=d6/2-p12/2"
"in30=inf1/4"

"spoff11=0"
"spoff12=0"
"spoff13=0"
"spoff14=bf2*((cnst22-cnst21)/1000000)"
"spoff16=bf2*((cnst21-cnst22)/1000000)"

"cnst11=0.0"
"cnst12=0.0"
"cnst13=0.0"
"cnst14=0.0"

"cnst10=2.0"
"COUNTER=110"

1 d11 ze
d11 p116:f3
2 d11 do:f3
d12
3 d12
d12
4 d12
5 d12
d12
d12
6 d12
d12
d12
d12
7 d1 p10:f1 p13:f3 fq=cnst22(bf ppm):f2
4u UNBLKGRAD

if "cnst10 > 1.0"
{
d12
d12
}

"cnst11=vd*((11/2)-1)"
d12
"d13=(d3-p22)+in0*cnst11"
;"d13=d3-p22"
d12
"d14=3u+in2*cnst11"
;"d14=3u"
d12
"d15=d3-in4*cnst11"
;"d15=d3"

d12 ivd

d12
"cnst12=vd*((11/2)-1)"
d12
"d17=DELTA2+in7*cnst12"
;"d17=DELTA2"
d12
"d18=DELTA3+in20*cnst12"
;"d18=DELTA3"
d12
"d19=6u+in19*cnst12"
;"d19=6u"
d12
"d20=(d4/2)-in20*cnst12"
;"d20=d4/2"

d12 ivd

d12
"cnst13=vd*((11/2)-1)"
d12
"d21=d5+in21*cnst13"
;"d21=d5"
d12
"d22=6u+in22*cnst13"
;"d22=6u"
d12
"d23=d6-in23*cnst13"
;"d23=d6"

d12 ivd

d12

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

```

"cnst14=vd*((114/2)-1)"      (p21 ph1):f3      ;p10 : 120dB
d12                          d33                      ;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
"d33=d30-in30*cnst14"       (p12:sp14 ph1):f2 ;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
d12                          d33                      ;p16: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
"d32=d30+in30*cnst14"       (center (p12:sp12 ph1):f2 (p22 ph1):f3 ) ;p19: f1 channel - power level for CPD/BB decoupling
d12                          d32                      ;sp1: f1 channel - shaped pulse 90 degree (H2O on resonance)
"d31=d29+in30*cnst14"       (p12:sp14 ph1):f2 ;sp11: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on resonance)
                                d31                  ;sp12: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on resonance)
d12 ivd                      4u do:f1                 ;sp14: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca off resonance)
                                (p26 ph7):f1          ;sp16: f2 channel - shaped pulse 180 degree (C=O off resonance)
d12                          4u                      ;sp13: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on resonance)
"cnst10 = 0.0"               p16:gp2*EA        ;
                                d16                  ; for time reversed pulse
                                TAU5 p11:f1          ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
                                {                    ;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
                                440u                 ;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse [1 msec]
                                }                    ;p13: f2 channel - 90 degree shaped pulse
                                {                    ;p12: f2 channel - 180 degree shaped pulse
                                }                    ;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
                                (p11:sp1 ph13:r):f1 ;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
                                2u                   ;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
                                2u p11:f1           ;p26: f1 channel - 90 degree pulse at p19
                                (p1 ph3)           ;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
                                d13                 ;d11: delay for disk I/O [30 msec]
                                (p22 ph1):f3        ;d16: delay for homospoil/gradient recovery
                                d14                 ;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
                                (p2 ph1)           ;cnst22: Calpha chemical shift (offset, in ppm)
                                d15                 ;NS: 4 * n
                                3u                   ;DS: >= 16
                                (p1 ph2):f1        ;cpds1: decoupling according to sequence defined by cpdprg1
                                4u p10:f1          ;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
                                (p11:sp1 ph2:r):f1 ;pcpd1: f1 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
                                4u                   ;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
                                p16:gp1           ;i1: spectral width [HN]
                                d16                 ;i2: spectral width [N]
                                (p21 ph4):f3        ;i3: spectral width [CO]
                                DELTA1 p119:f1      ;i10: number of indirectly detected points
                                (p26 ph2):f1        ;inf1: 1/SW(N)
                                d17 cpds1:f1 ph1     ;i11: 2*(SW*tmax+1) [HN]
                                (p12:sp16):f2       ;i12: 2*(SW*tmax+1) [N]
                                d18                 ;i13: 2*(SW*tmax+1) [CO]
                                (p12:sp12 ph1):f2   ;i14: 2*(SW*tmax+1) [N]
                                d19                 ;
                                (p22 ph1):f3        ;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
                                d20                 ; 50 : 80 : 8.1 : 31
                                3u                   ;
                                (p12:sp16 ph1):f2   ;for z-only gradients:
                                3u                   ;gpz1: 50%
                                d20                 ;gpz2: 80%
                                (p21 ph1):f3        ;gpz3: 8.1%
                                d12 ip3             ;gpz4: 31%
                                d12 ip13            ;
                                (p13:sp11 ph1):f2     ;use gradient files:
                                DELTA4             ;gpnam1: SINE.100
                                (p12:sp16 ph1):f2   ;gpnam2: SINE.100
                                DELTA5             ;gpnam3: SINE.100
                                ( center (p12:sp12 ph1):f2 ;gpnam4: SINE.100
                                (p22 ph1):f3 )
                                d9
                                (p12:sp16 ph1):f2
                                4u
                                (p13:sp13 ph1):f2
                                "cnst10 = 2.0"

                                4u do:f1           lo to 7 times COUNTER
                                (p26 ph7):f1
                                4u
                                p16:gp4           exit
                                d16 fq=cnst21(bf ppm):f2

                                ph1=0
                                (p26 ph2):f1       ph2=1
                                d12 cpds1:f1 ph1     ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
                                (p13:sp11 ph5):f2     ph4=0
                                d21                 ph5=0 2
                                (p12:sp14 ph1):f2     ph6=3 3 1 1
                                DELTA6             ph7=3
                                (p22 ph1):f3        ph8=0 0 2 2
                                d22                 ph9=2
                                (p12:sp12 ph1):f2     ph13=2 2 2 2 0 0 0 0
                                d23                 ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
                                3u
                                (p12:sp14 ph1):f2
                                3u
                                (p13:sp13 ph1):f2

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratzuordnung

habcabconh5d2_nove2.mb

```

;cbcaconhgp3d
;avance-version (10/02/12)
;CBCACONH
;3D sequence with
; inverse correlation for triple resonance using inept transfer steps
;
; F1(H) -> F2(Caliph.,t1 -> Ca) -> F2(C=O) -> 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-TPPI gradient selection (t2)
;using constant time in t1
;using constant time in t2
;(use parameterset CBCACONHGP3D)
;
;S. Grzesiek & A. Bax, J. Biomol. NMR 3, 185-204 (1993)
;(D.R. Muhandiram & L.E. Kay, J. Magn. Reson. B 103, 203-216 (1994))
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D

prosol relations=<triple>

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

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d12=20u"

"d3=1.1m-larger(p14,p22)" ;tau b
"d4=1.7m" ;tau a
"d21=1.2.4m" ;T N
"d22=3.6m" ;T C
"d23=3.6m" ;tau c
"d24=4.4m" ;tau d
"d25=5.5m" ;tau f
"d26=2.3m" ;tau g
"d27=12.4m" ;tau e

"d10=d21/2-p14/2"
"d29=d21/2-p14/2-p26-d25-4u"
"d30=d21/2-p14/2"

"d5=d4-p14/2"
"d6=d4+p14/2"
"FACTOR1=2*d6*10000000/111"
"in4=FACTOR1/10000000"
"in0=1/(2*11)"
"in2=in0-in4"

"in20=1/(2*12)"
"d40=d27-p14-4u"
"FACTOR2=2*d40*10000000/113"
"in43=FACTOR2/10000000"
"in41=1/(2*13)"
"in42=in41-in43"

"in30=in41/4"

"DELTA1=d22-d3-larger(p14,p22)-p2"
"DELTA2=d23-p14"
"DELTA3=d27-d24-p14/2-p22"
"DELTA4=d25-p16-d16-4u"
"DELTA5=p16+d16+8u"
"d19=d22+3u-p14-8u"

"spoff2=0"
"spoff3=0"
"spoff5=bf2*((cnst21-cnst23)/1000000)"
"spoff7=bf2*((cnst22-cnst21)/1000000)"
"spoff8=0"

"
cnst11=0.0"
"cnst12=0.0"
"cnst13=0.0"
"cnst14=0.0"
"cnst10=2.0"
"COUNTER=110"

1 ze
d11 p116:f3
2 d11 do:f3
d12
d12
3 d12
4 d12
d12
5 d12
d12
6 d12
d12
d12
d12
7 d11 fq=cnst23(bf ppm):f2
d1
if "cnst10 > 1.0"
{
d12
"cnst11=vd*((111/2)-1)"
d12
"d7=d5+in0*cnst11"
;"d7=d5"
d12
"d8=3u+in2*cnst11"
;"d8=3u"
d12
"d9=d6-in4*cnst11"
;"d9=d6"
d12 ivd
d12
"cnst12=vd*((112/2)-1)"
d12
"d0=3u+in20*cnst12"
;"d0=3u"
d12
"d20=d19-in20*cnst12"
;"d20=d19"
d12 ivd
d12
"cnst13=vd*((113/2)-1)"
d12
"d41=(d24-p14/2)+in41*cnst13"
;"d41=(d24-p14/2)"
d12
"d42=3u+in42*cnst13"
;"d42=3u"
d12
"d43=d40-in43*cnst13"
;"d43=d40"
d12 ivd
d12
"cnst14=vd*((114/2)-1)"
d12
"d33=d30-in30*cnst14"
;"d33=d30"
d12
"d32=d10+in30*cnst14"
;"d32=d10"
d12
"d31=d29+in30*cnst14"
;"d31=d29"
d12 ivd
d12
"cnst10=0.0"
}
else
{
400u
}
50u UNBLKGRAD
d12 p11:f1 p10:f2 p13:f3
(p1 ph12):f1

d7
(p14:sp3 ph1):f2
d8
(p2 ph1):f1
d9
3u
(p1 ph2):f1
(p13:sp2 ph3):f2
d0
(center (p14:sp5 ph1):f2 (p22 ph1):f3
)
d3
(p2 ph10)
DELTA1 p119:f1
(p14:sp3 ph1):f2
d20
4u
(p14:sp5 ph1):f2
4u
(p13:sp8 ph1):f2
4u cpds1:f1 ph2
(p14:sp5 ph1):f2
DELTA2
(p14:sp3 ph1):f2
4u
(p14:sp5 ph1):f2
DELTA2
(p13:sp2 ph1):f2
4u do:f1
(p26 ph9):f1
p16:gp1
d16 fq=cnst21(bf ppm):f2
(p26 ph2):f1
20u cpds1:f1 ph1
(p13:sp2 ph4):f2
d41
(p14:sp7 ph1):f2
DELTA3
(p22 ph1):f3
d42
(p14:sp3 ph1):f2
d43
3u
(p14:sp7 ph1):f2
4u
(p13:sp8 ph1):f2
(p21 ph11):f3
d33
(p14:sp7 ph1):f2
d33
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph8):f3
)
d32
(p14:sp7 ph1):f2
d31
4u do:f1
(p26 ph7):f1
4u
p16:gp2*EA
d16
DELTA4 p11:f1
(center (p1 ph1):f1 (p21 ph5):f3 )
d26
(center (p2 ph1):f1 (p22 ph1):f3 )
d26
(center (p1 ph2):f1 (p21 ph6):f3 )
d26
(center (p2 ph1):f1 (p22 ph1):f3 )
d26
(p1 ph1):f1
DELTA5
(p2 ph1):f1
4u
p16:gp3
d16 p116:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd3:f3
d11 do:f3 wr #0 if #0 zd

```

NMR-Pulsprogramme: Experimente zur Rückgratuordnung

```

d12 igrad EA                ;p0 : 0W
d12 ip5*2                   ;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
                             ;p3 : f3 channel - power level for pulse (default)
                             ;p16: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
lo to 3 times 2             ;p19: f1 channel - power level for CPD/BB decoupling
d12 ip4                     ;sp2: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on resonance)
                             ;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on resonance)
lo to 4 times 2             ;sp5: f2 channel - shaped pulse 180 degree (C=O off resonance)
                             ;sp7: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca off resonance)
d12 dp4*2                   ;sp8: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on resonance)
d12 ip3                     ;
                             ; for time reversed pulse
lo to 5 times 2             ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
d12 dp3*2                   ;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
d12 ip12                    ;p13: f2 channel - 90 degree shaped pulse
                             ;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
lo to 6 times 2             ;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
                             ;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
                             ;p27: f3 channel - 180 degree high power pulse
                             ;p26: f1 channel - 90 degree pulse at p119
d12 rp5                     ;d0 : incremented delay (F1 in 3D) [3 usec]
d12 rp4
d12 rp3
d12 rp12
d12
"cnst10=2.0"
                             ;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
                             ;d3 : tau b : 1.1m-p14
                             ;d4 : 1/(4J(CH)) - tau a [1.7 msec]
                             ;d10: incremented delay (F2 in 3D) = d21/2-p14/2
lo to 7 times COUNTER      ;d11: delay for disk I/O [30 msec]
exit                         ;d12: delay for power switching [20 usec]
                             ;d16: delay for homospoil/gradient recovery
                             ;d20: decremented delay (F1 in 3D) = d22+d0-p14-4u
ph1=0                       ;d21: T(N) [12.4 msec]
ph2=1                       ;d22: T(C) [3.6 msec]
ph3=0 2                     ;d23: tau c [3.6 msec]
ph4=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2                 ;d24: tau d [4.4 msec]
ph6=3 3 1 1                 ;d25: tau f [5.5 msec]
ph7=3                       ;d26: 1/(4J(NH)) - tau g [2.3 msec]
ph8=0 0 0 0 2 2 2 2         ;d27: tau e [12.4 msec]
ph9=2                       ;d29: incremented delay (F2 in 3D) = d21/2-p14/2-p26-d25-4u
ph10=0 0 2 2                ;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d21/2-p14/2
ph11=0
ph12=0
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 2 0 2 0 2 2 0 2
                             ;o2p: Caliphatic chemical shift (cnst23)
                             ;inf1: 1/SW(Cali) = 2 * DW(Cali)
                             ;inf2: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
                             ;in0: 1/(2 * SW(Cali)) = DW(Cali)
                             ;nd0: 2
                             ;in10: 1/(4 * SW(N)) = (1/2) DW(N)
                             ;nd10: 4
                             ;in20: = in0
                             ;in29: = in10
                             ;in30: = in10
                             ;NS: 4 * n
                             ;DS: >= 16
                             ;td1: number of experiments in F1 td1
                             max = 2 * d20 / in20
                             ;td2: number of experiments in F2 td2
                             max = 2 * d30 / in30
                             ;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
                             ;FnMODE: echo-antiecho in F2
                             ;cpds1: decoupling according to sequence
                             defined by cpdprg1
                             ;cpd3: decoupling according to sequence
                             defined by cpdprg3
                             ;pcpd1: f1 channel - 90 degree pulse for
                             decoupling sequence
                             ;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for
                             decoupling sequence
                             ;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
                             ;
                             30 : 80 : 8.1
                             ;for z-only gradients
                             ;gpz1: 30%
                             ;gpz2: 80%
                             ;gpz3: 8.1%
                             ;use gradient files:
                             ;gpnam1: SMSQ10.100
                             ;gpnam2: SMSQ10.100
                             ;gpnam3: SMSQ10.100

```

8.4 New Mexico

newmex fhsqc.uw

```

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

"i0=inf1/2"

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d4=5.5m"
"d5=55m"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d26=2.5m"

"d0=(i0-(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 p16:f3
2 d1 do:f3
  3m
3 d11
4 d12 p11:f1
  50u UNBLKGRAD
  (p1 ph0)
  d4 p13: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 p18: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 p16: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

;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p3 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p16: f2 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;p18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse
(watergate)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p19 : mixing time - 1.204m
;p21: f2 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f2 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p18
;d0 : incremented delay (2D) [3
usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d11: delay for disk I/O [30
msec]
;d12: delay for power switching [20
usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in
Hz)
;d26 = 1/(4J(YH))
;cnst4 = J(YH)
;l3: loop for phase sensitive 2D using States-TPPI
method: l3 = td1/2
;i0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined
by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for
decoupling sequence
;gpz1: 13%
;gpz2: -10%
;gpz3: -18%
;gpz4: 1%
;gpz5: 13%
;gpz6: 1%
;gpz7: 50%

```


8.5 Diffusion

stebpgp1s191d.mk

```

;avance-version (07/05/08)
;1D sequence for diffusion measurement using stimulated echo
;using bipolar gradient pulses for diffusion
;using 1 spoil gradient
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;:SCLASS=HighRes
;$DIM=1D
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"d12=20u"
"DELTA1=d20-p1*2-p2-p30*2-d16*3-p19"
"l1=d1/30" ; 30, da 30 versch. SER-Zeilen (entspr. Gradientenzahl)
1 ze
;*** n-ter Gradient***
;*** n=11-40***
;*** 30 mal wiederholen, Gradientenstärke variieren***
i 30m
i+1 d12 p19:f1
d1 cw:f1
d13 do:f1
50u p11:f1 UNBLKGRAD
p1 ph1
p30:gp6
d16
p2 ph2
p30:gp*-1
d16
p1 ph3
p19:gp7
d16

```

```

DELTA1
p1 ph4
p30:gp n
d16
p2 ph2
p30:gp n*-1
d16
p16:gp1
d16 pl18:f1
p27*0.231 ph5
d19*2
p27*0.692 ph5
d19*2
p27*1.462 ph5
d19*2
p27*1.462 ph6
d19*2
p27*0.692 ph6
d19*2
p0*0.231 ph6
4u
p16:gp1
d16
4u BLKGRAD
go=i ph31
30m wr #0 if #0 ze
;*** End Repeat***
lo to 3 times l1
exit

ph1= 0
ph2= 0 0 0 0 2 2 2 2

```

```

ph3= 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph4= 0 1 2 3
ph5= 0
ph6= 2
ph31=0 1 2 3 0 1 2 3 2 3 0 1 2 3 0 1

;p11: f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse
(watergate)
;p0: f1 channel - 90 degree pulse at pl18
;TD: 1024*25*durchlaeufer
; use for fine adjustment
;p1: f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2: f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: gradient pulse (WATERGATE)
;p19: gradient pulse 2 (spoil gradient)
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at pl18
;p30: gradient pulse (little DELTA * 0.5)
;d1: relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d20: diffusion time (big DELTA)
;NS: 8 * n, total number of scans: NS * TDO
;DS: 4 * m
;use gradient ratio: gp 1 : gp 6 : gp7
; -20 : var : -17.13
;for z-only gradients:
;use gradient files: SINE.100
;gpz1: -20%
;gpz7: -17.13% (spoil)
;gpzn: 1...95%

```

stebpgpwg wifN15.mwmb

```

;N15 filtered stimulated echo experiment
;WIF-PGSTE == Watergate Isotope Filtered PGSTE

:wifpgste15N.mb
;avance-version (12/11/21)
;pseudo 2D sequence for diffusion measurement
using stimulated echo
;z-gradient pulses for diffusion
;using 1 spoil gradient
;water suppression using watergate and flip-back
pulse sequence
;with gradients
;
; IV Nesmelova et al., JMR 166 (2004), 129-133
;(PI: KH Mayo)

;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=SG

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

define list<gradient> diff=<Difframp>

"p2=p1*2"
"DELTA1=d20-p30-d16-p1-5u-p12-p19-d16-p12-5u-p1"
;=====
;for N15 d26=1/(2*J)=1/184Hz=5.4m
;=====
"d26=5.4m"
"DELTA2=(d26-p16-d16-p11-4u)"
"acqt0=-p1*2/3.1416"

1 ze
2 30m do:f3
d1 p13:f3
50u p11:f1 UNBLKGRAD
d16 p10:f1
(p12:sp2 ph20):f1

```

```

4u p11:f1
p1 ph1 ; diffusion start
p30:gp6*diff
d16
p2 ph1
p30:gp6*-1*diff
d16
p1 ph2
5u p10:f1
(p12:sp2 ph21):f1
p19:gp7 ;spoiler gradient
d16
DELTA1 ;big DELTA == Diffusion
time (d20)
(p12:sp2 ph22):f1
5u p11:f1
p1 ph3 ;end of diffusion time
p30:gp6*diff
d16
p2 ph3
p30:gp6*-1*diff
d16
;=====
; watergate part&Filter (J-coupling)
p16:gp1
d16 p10:f1
(p11:sp1 ph23:r):f1
4u p11:f1
DELTA2
(p2 ph4):f1 (p21 ph7 4u p21 ph8):f3
4u p10:f1
DELTA2
(p11:sp1 ph23:r):f1
4u
p16:gp1
d16 pl16:f3
4u BLKGRAD
;end watergate part
go=2 ph31 cpd3:f3
30m do:f3 mc #0 to 2 F1QF(igrad diff)
exit
ph20= 2 2 2 2 2 2 2 2 0 0 0 0 0 0 0 0
ph1= 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph2= 0 1 2 3
ph21= 2 3 0 1

```

```

ph3= 0 1 2 3 2 3 0 1
ph22= 2 3 0 1 0 1 2 3
ph4= 0 0 0 0 2 2 2 2
ph23= 2 2 2 2 0 0 0 0
ph7= 0
ph8= 0 2
ph31= 2 2 2 2 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2

;===== N15 =====
;p21: f3 90deg N15
;cpd3: garp N15 dec
;===== H1 =====
;p1: f1 channel - 90 degree high power pulse
;sp1: SINC1.100 90deg selective pulse
;sp2: SINC1.100 90deg selective pulse
;p16: gradient pulse (WATERGATE)
;p19: gradient pulse 2 (spoil gradient)
;p30: gradient pulse (little DELTA)
;d1: relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for gradient recovery
;d20: diffusion time (big DELTA)
;NS: 16 * n, total number of scans: NS
;DS: 16 * m

;===== setup & processing =====
;FnMODE: QF
; use xf2 and DOSY processing
; type dosy for set-up of wanted gradients
; gradients are calculated and stored under
/expno/difflist

;use gradient ratio: gp 1 : gp 6 : gp7
; 35 : var : -17.13

;for z-only gradients:
;gpz1: 35%
;gpz6: 2-95%
;gpz7: -17.13% (spoil)

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam6: SINE.100
;gpnam7: SINE.100

```

NMR-Pulsprogramme: Diffusion

diffN.uw

```
; 15N HSQC for diffusion measurements
; based on Ferrage F (2003) JACS 125 2541
; changed to 2D detection
; using 3-9-19 WATERGATE
; written as pseudo3D

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

define list<gradient> diff=<Difframp>

aqseq 312

"in10=inf2/2"

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

;***** LOOPS *****
;"14=(td2/2)"
;"15=(td1)"

;***** DELAYS *****
"d10=3u"
"d19=90u"
"d21=1/(4.0*cnst21)"
"DELTA1=d21-p16-2*d16"
"DELTA2=d4-6*d21-2*d10-3*p1-10*p21-6u-2*d16-2*p17-2*d10"
"DELTA4=d21-p17-p16-3*d16-p1*3-3u-d19*5+p22/2"
"DELTA5=d19-p22/2"

ze
10u p1:f1 p13:f3
1 31m do:f3
11 2m
2 3m

;***** INEPT *****
3 d1 p13:f3
(p21 ph0):f3
3u UNBLKGRAD
p17:gp1
d16
(p1 ph0):f1
d16
p16:gp2*diff
d16
DELTA1
(center (p2 ph0):f1 (p22 ph0):f3 )
DELTA1

d16
p16:gp2*-1*diff
d16
(p1 ph1):f1
3u
p17:gp3
d16
(p21 ph0):f3
d21
(center (p2 ph2):f1 (p22 ph0):f3 )
d21
(p21 ph5):f3
;***** MAIN DIFFUSION PERIOD *****
3u
p17:gp4
d16
DELTA2
(p21 ph6):f3
;***** t1 LABELING + inphase --> antiphase *****
d21
d10
(p2 ph0):f1
d10
(p22 ph0):f3
d21
;***** Reverse INEPT + WATERGATE *****
(p1 ph2):f1 (p21 ph2):f3
d16
p16:gp2*diff
d16
p17:gp5
d16
DELTA4
p1*0.231 ph2
d19*2
p1*0.692 ph2
d19*2
p1*1.462 ph2
DELTA5
(p22 ph0):f3
DELTA5
p1*1.462 ph0
d19*2
p1*0.692 ph0
d19*2
p1*0.231 ph0
DELTA4
d16
p17:gp5
d16
p16:gp2*-1*diff
d16
BLKGRAD

;***** ACQUISITION *****
go=1 ph31 cpd3:f3
30m do:f3 wr #0 if #0 zd
1m igrad diff
lo to 11 times 15
1m ip6
1m rgrad diff
lo to 2 times 2
1m id10
1m ip5*2
1m ip31*2
lo to 3 times 14
exit

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

;*** VARIABLES SET BY USER ***
;cnst21: JNH [93 Hz]
;d1: recycle delay 1-5*T1
;d4: total diffusion time
;d16 : grad delay [200u]
;d19 : watergate
;d21 : 1/4JNH [2.69m]
;td1: 2* number of complex points
;p1: 1H 90 pulse length @ p11
;p21: 15N 90 pulse length @ p13
;p16: diff gradient [1000u]
;p17: gradient [500u]

;p11: 1H full power
;p13: 15N full power

;gpz1 20%
;gpz2 100%
;gpz3 40%
;gpz4 10%
;gpz5 50%

;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam5: SINE.100
```

8.6 Proteindynamik

rIN.uw

```

; R1 15N Lopt - PEPHSQC detection
; Using channel 3 for 15N
; based on Lopt 13C aro relax experiments
;      1) use vclist for different blocks of T1 delays
;      3) use interleaved acquisition ns - T1 -
hypercomplex - t1
; works for signals between 10.5 and 6.5 ppm @ 600 MHz

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

define list<loopcounter> r1list = <$VCLIST>

aqseq 312

"in10=inf2/2"

;***** PULSES *****
"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p13=1150u"
"p14=1600u"

;***** LOOPS *****
"l4=(td2/2)"
"l5=(td1)"

;***** DELAYS *****
"d10=3u"
"d16=100u"
"d3=50m"
"d21=1/(4.0*cnst21)"
"DELTA1=d20-p28-d16-3u"
"DELTA2=d21-p23-d16-3u"
"DELTA3=d20-p13-3u"

"DELTA4=d3/2-p14/2"

"DELTA6=d21-p18-d16-6u-p2"
"DELTA7=d21-p18-d16-6u"

"spoff5=2500"
"spoff6=-1680"
"spoff7=-1680"

ze
10u p11:f1 p13:f3
1 31m do:f3
11 5m
2 3m
3 10m
"l3=r1list"
12 3u

;***** INEPT *****
d1 p11:f1 p13:f3
(p21 ph4):f3
50u UNBLKGRAD
p20:gp20
d16
(p1 ph4):f1
3u
p28:gp28
d16
DELTA1
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
3u
DELTA1
p28:gp28
d16
(p1 ph1):f1
3u p110:f1
(p13:sp7 ph2):f1
3u p11:f1
(p21 ph7):f3
3u
p23:gp23
d16

DELTA2
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
3u
DELTA2
p23:gp23
d16
;***** T1 *****
(p21 ph1):f3
if "l3 == 0" goto 7
20 DELTA4 p110:f1
(p14:sp5 ph4):f1
DELTA4 p11:f1
lo to 20 times l3
7 (p21 ph5):f3
;***** T1 LABELING + inphase --> antiphase
*****
d10
DELTA6
p18:gp18*EA
d16
(center (p2 ph4):f1 (p4 ph4):f2 )
d10
(p22 ph4):f3
6u
p18:gp18*EA*-1
d16
DELTA7
;***** PEP period *****
(p1 ph4):f1 (p21 ph9):f3
3u p110:f1
(p13:sp7 ph2):f1
DELTA3 p11:f1
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
DELTA3 p110:f1
(p13:sp6 ph1):f1
3u p11:f1
(p1 ph1):f1 (p21 ph8):f3
d20
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
d20
(p1 ph4):f1
3u p110:f1
(p13:sp7 ph4):f1
3u p11:f1
(p2 ph4):f1
3u
50u
p18:gp18*0.2026 ; decode gradient
d16 p116:f3
3u BLKGRAD

; ***** ACQUISITION *****
go=1 ph0 cpd3:f3
30m do:f3 wr #0 if #0 zd
1m r1list.inc
lo to 11 times l5
1m ip9*2
1m igrad EA
1m r1list.res
lo to 2 times 2
1m id10
1m ip5*2
1m ip0*2
lo to 3 times l4
exit

ph0 = 0 2 2 0 2 0 0 2

ph1 = 1
ph2 = 2
ph3 = 3
ph4 = 0
ph5 = 1 3
ph7 = 0 0 0 2 2 2 2

ph8 = 1 1 3 3
;ph8 = 1
ph9 = 0
;ph9 = 0 0 2 2

;*** VARIABLES SET BY USER ***
;cnst21: JNH [93 Hz]
;d1: recycle delay 1-5*T1
;d3: loopdelay T1 = 50ms
;d16: grad delay [100u]
;d20: inept delay 1 [2.5m]
;d21: 1/4JNH [2.69m]
;td1: 2* number of complex points
;p1: 1H 90 pulse length @ p11
;p21: 15N 90 pulse length @ p13
;p18: encoding gradient [1000u]
;p20: gradient purge for 15N [1000u]
;p23: gradient purge for P-element [300u]
;p28: gradient purge for 180 pulse [1000u]

;p11: 1H full power
;p110: 120 dB
;p13: 15N full power

;l3: r1list, timeT1 = l3*50ms

;spnam5: reburp.1000
;spnam6: eburp2.1000
;spnam7: eburp2tr.1000

;gpz18 80%
;gpz20 20%
;gpz23 7.5%
;gpz26 7.5%
;gpz28 6.25%

;gpnam18: SINE.100
;gpnam20: SINE.100
;gpnam23: SINE.32
;gpnam26: SINE.32
;gpnam28: SINE.100

```

NMR-Pulsprogramme: Proteindynamik

r2N.uw

```

; R2 15N Lopt - PEPHSQC detection
; Using channel 3 for 15N
; based on Lopt 13C aro relax experiments
;
; 1) use vclist for different blocks of T2 delays
; 3) use interleaved acquisition ns - T2 -
hypercomplex - t1
; works for signals between 10.5 and 6.5 ppm @ 600 MHz

#include <Avance.incl>
#include <Delay.incl>
#include <Grad.incl>
define list<loopcounter> r2list = <SVCLIST>

aqseq 312

"in10=inf/2"

;***** PULSES *****
;p2=p1*2
;p22=p21*2
;p13=1150u
;p14=1600u

;***** LOOPS *****
"l4=(d2/2)"
"l5=(t1)"

;***** DELAYS *****
"d10=3u"
"d16=100u"
"d3=250u"
"d21=1/(4.0*cnst21)"
"DELTA1=d20-p28-d16-3u"
"DELTA2=d21-p23-d16-3u"
"DELTA3=d20-p13-3u"

"DELTA4=d3-p8/2"

"DELTA6=d21-p18-d16-6u-p2"
"DELTA7=d21-p18-d16-6u"

"spoff5=2500"
"spoff6=-1680"
"spoff7=-1680"

ze
10u p1:f1 p13:f3
1 31m do:f3
11 5m
2 3m
3 10m
"l3=r2list"
12 3u

;***** INEPT *****
d1 p1:f1 p13:f3
(p21 ph4):f3
50u UNBLKGRAD
p20:gp20
d16
(p1 ph4):f1
3u
p28:gp28
d16
DELTA1
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
3u
DELTA1
p28:gp28
d16
(p1 ph1):f1
3u p10:f1
(p13:sp7 ph2):f1
3u p1:f1
(p21 ph7):f3
3u
p23:gp23
d16
DELTA2
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
3u
DELTA2
p23:gp23
d16
(p21 ph1):f3
;***** T2 relaxation *****
if "l3 == 0" goto 7
20 DELTA4 p10:f1 p8:f3
(center (p14:sp5 ph4):f1 (p8 ph4 DELTA4
DELTA4 p8 ph4 DELTA4 DELTA4 p8 ph1
DELTA4 DELTA4 p8 ph3 DELTA4
DELTA4 p8 ph4 DELTA4 DELTA4 p8 ph4
DELTA4 DELTA4 p8 ph3 DELTA4
DELTA4 p8 ph1):f3)
DELTA4
DELTA4
(center (p14:sp5 ph2):f1 (p8 ph4 DELTA4
DELTA4 p8 ph4 DELTA4 DELTA4 p8 ph1
DELTA4 DELTA4 p8 ph3 DELTA4
DELTA4 p8 ph4 DELTA4 DELTA4 p8 ph4
DELTA4 DELTA4 p8 ph3 DELTA4
DELTA4 p8 ph1):f3)
DELTA4 p1:f1 p13:f3
lo to 20 times l3
;***** t1 LABELING + inphase --> antiphase
*****
7 d10
DELTA6
p18:gp18*EA
d16
(center (p2 ph4):f1 (p4 ph4):f2 )
d10
(p22 ph4):f3
6u
p18:gp18*EA*-1
d16
DELTA7
;***** PEP period *****
(p1 ph4):f1 (p21 ph9):f3
3u p10:f1
(p13:sp7 ph2):f1
DELTA3 p1:f1
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
DELTA3 p10:f1
(p13:sp6 ph1):f1
3u p1:f1
(p1 ph1):f1 (p21 ph8):f3
d20
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
d20
(p1 ph4):f1
3u p10:f1
(p13:sp7 ph4):f1
3u p1:f1
(p2 ph4):f1
3u
50u
p18:gp18*0.2026 ; decode gradient
d16 p16:f3
3u BLKGRAD

; ***** ACQUISITION *****
go=1 ph0 cpd3:f3
30m do:f3 wr #0 if #0 zd
1m r2list.inc
lo to 11 times l5
1m ip9*2
1m igrad EA
1m r2list.res
lo to 2 times 2
1m id10
1m ip5*2
1m ip0*2
lo to 3 times l4
exit

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

;*** VARIABLES SET BY USER ***
;cnst21: JNH [93 Hz]
;d1: recycle delay 1-5*T1
;d3 : loopdelay T1 = 50ms
;d16 : grad delay [100u]
;d20 : inept delay 1 [2.5m]
;d21 : 1/4JNH [2.69m]
;td1: 2* number of complex points
;p1: 1H 90 pulse length @ p11
;p21: 15N 90 pulse length @ p13
;p8: 15N CPMG (180) pulse @ p18 [110u]
;p18: encoding gradient [1000u]
;p20: gradient purge for 15N [1000u]
;p23: gradient purge for P-element [300u]
;p28: gradient purge for 180 pulse [1000u]

;p11: 1H full power
;p110: 120 dB
;p13: 15N full power
;p18: 15N CPMG power (calibrate)

;l3: r2list, timeT2 = l3*8ms

;spnam5: reburp.1000
;spnam6: eburp2.1000
;spnam7: eburp2r.1000

;gpz18 80%
;gpz20 20%
;gpz23 7.5%
;gpz24 30%
;gpz28 6.25%

;gpnam18: SINE.100
;gpnam20: SINE.100
;gpnam23: SINE.32
;gpnam24: SINE.32
;gpnam28: SINE.100

```

cpmgN TS2.uw

```

; For Topspin version 2.x
; R2 CPMG - PEPHQC detection
; For measuring microsecond-to-millisecond motions
; Using channel 3 for 15N
; based on N15_CPMG_Rex_NH2_fm_500.c
; Rewritten 2014-05-21 by GÅrån CarlstrÅm, Lund
University, Sweden, to:
; 1) use vclist for different cpmg fields
; 2) use constant relaxation delay T
; 3) use interleaved acquisition ns - cpmg -
hypercomplex - t1
; 4) use same pulse sequence for cpmgloop/2 =
2,6,10,... & cpmgloop/2 = 4,8,12,...
; Fixed bug with loop counter 2014-10-01 / GÅrån
CarlstrÅm
; Have to use different versions for TopSpin version 2 and
version 3.

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

define list<loopcounter> cpmglist = <SVCLIST>

aqseq 312

"in10=inf2/2"

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

;***** LOOPS *****
"l4=(td2/2)"
"l5=(td1)"

;***** DELAYS *****
"d10=3u"
"d2=2.0*p2"
"d19=90u"
"d21=1/(4.0*cnst21)"
"DELTA1=d20-p28-d16-3u"
"DELTA2=d21-p23-d16-3u"
"DELTA3=d20-p26-d16-3u"
"DELTA4=d20-p27-d16-p1*3-3u-d19*5+p22/2"
"DELTA5=d19-p22/2"
"DELTA6=d21-p18-d16-6u-p2"
"DELTA7=d21-p18-d16-6u"
"DELTA8=p18+d16+6u"

ze
10u p11:f1 p13:f3
1 31m do:f3
11 5m
2 3m
3 10m
if "l3==0" goto 12
"l6=cpmglist"
"l2=l6/2"
if "l2==0" goto 12
"l8=(l2+2)/4"
"l18=l8-1"
"d8=(d3/4)/l2-p8/2.0"
"d9=d8-10u"
12 3u

;***** INEPT *****
d1 p13:f3
(p21 ph4):f3
50u UNBLKGRAD
p20:gp20
d16
(p1 ph4):f1
3u
p28:gp28
d16
DELTA1
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
3u
DELTA1
p28:gp28
d16

(p1 ph1):f1
3u
p29:gp29
d16
d5
(p21 ph5):f3

;***** 1st CPMG period *****
if "l3 == 0" goto 7
if "l2 == 0" goto 7
10u BLKGRAD
d9 p18:f3
(p8 ph1):f3
d8*2
(p8 ph1):f3
if "l18 <= 0" goto 21
20 d8
d8
(p8 ph4):f3
d8*2
(p8 ph2):f3
d8*2
(p8 ph1):f3
d8*2
(p8 ph1):f3
lo to 20 times l18

21 d8
if "l2 %4 > 0" goto 7
d8
(p8 ph4):f3
d8*2
(p8 ph2):f3
d8

;***** P element *****
7 3u
3u UNBLKGRAD
p23:gp23
d16 p13:f3
DELTA2
(center (p1 ph1 p2 ph4 p1 ph1):f1 (p21 ph4
p22 ph1 p21 ph4):f3 )
9 3u
DELTA2
p23:gp23
d16

;***** 2nd CPMG period *****
if "l3 == 0" goto 13
if "l2 == 0" goto 13
3u BLKGRAD
d8 p18:f3
(p8 ph4):f3
d8*2
(p8 ph4):f3

if "l18 <= 0" goto 24
23 d8
d8
(p8 ph1):f3
d8*2
(p8 ph3):f3
d8*2
(p8 ph4):f3
d8*2
(p8 ph4):f3
lo to 23 times l18

24 d8 p13:f3
if "l2 %4 > 0" goto 13
d8 p18:f3
(p8 ph1):f3
d8*2
(p8 ph3):f3

;***** equilibrating period *****
d8 p13:f3
13 (p21 ph1):f3
d5 UNBLKGRAD
p24:gp24
d16
(p21 ph8):f3

;***** t1 LABELING + inphase -->
antiphase *****
d10
DELTA6
p18:gp18*EA
d16
(p2 ph4)
d10
(p22 ph4):f3
6u
p18:gp18*EA*-1
d16
DELTA7
;***** PEP period *****
(p1 ph4):f1 (p21 ph9):f3
3u
p26:gp26
d16
DELTA3
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
DELTA3
3u
p26:gp26
d16
(p1 ph1):f1 (p21 ph6):f3
3u
p27:gp27
d16
DELTA4
;(center (p2 ph0) (p22 ph0):f3 )
p1*0.231 ph1
d19*2
p1*0.692 ph1
d19*2
p1*1.462 ph1
DELTA5
(p22 ph0):f3
DELTA5
p1*1.462 ph3
d19*2
p1*0.692 ph3
d19*2
p1*0.231 ph3
DELTA4
p27:gp27
d16
3u
(p1 ph4):f1
DELTA8
(p2 ph4):f1
3u
p18:gp18*0.2026 ; decode
gradient
d16 p116:f3
3u BLKGRAD

; ***** ACQUISITION *****
go=1 ph0 cpd3:f3
30m do:f3 wr #0 if #0 zd
1m cpmglist.inc
lo to l1 times l5
1m ip9*2
1m igrad EA
1m cpmglist.res
lo to 2 times 2
1m id10
1m ip8*2
1m ip0*2
lo to 3 times l4
exit

ph0 = 0 2 2 0
ph1 = 1
ph2 = 2
ph3 = 3
ph4 = 0
ph5 = 0 2 ;phi1
ph6 = 1 1 3 3
ph8 = 1 1 3 3
;ph8 = 1
ph9 = 0
;ph9 = 0 0 2 2 ;phi5
ph11 = 3 ;phi7

```

NMR-Pulsprogramme: Proteindynamik

```
*** VARIABLES SET BY USER ***
;cnst21: JNH [93 Hz]
;d1: recycle delay 1-5*T1
;d3 : total time for CPMG trains [< 60m!]
;d5 : to equi magn (2-3/kex) [2.5m]
;d8 : set by pulse program [delay in cpmg]
;d9 : set by pulse program [d8-10u]
;d16 : grad delay [200u]
;d19 : watergate [500 230u, 600 192u, 800 144u]
;d20 : inept delay 1 [2.35m]
;d21 : 1/4JNH [2.69m]
;td1: 2* number of complex points
;p1: 1H 90 pulse length @ p11
;p21: 15N 90 pulse length @ p13
;p8: 15N CPMG (180) pulse @ p18 [110u]
;p9: 1H H2O selective pulse [1400u]
;p18: encoding gradient [1000u]
;p20: gradient purge for 15N [1000u]
;p23: gradient purge for P-element [300u]

;p24: gradient purge for the z filter [600u]
;p26: gradient purge for 180 pulse [300u]
;p27: gradient purge for WATERGATE [600u]
;p28: gradient purge for 180 pulse [1000u]
;p29: gradient purge for the z filter [500u]

;p11: 1H full power
;p13: 15N full power
;p18: 15N CPMG power (calibrate)
;p19: 1H H2O selective power

;p1: 0=TROSY, 1=anti-TROSY
;i2: set by pulse program to l6/2 [< 52 !]
;i3: 0=no CPMG, 1= CPMG
;l6: multiple of 4! Set from VCLIST [total number of CPMG pulses < 104!]
;i8: set by pulse program
;i18: set by pulse program

;gpz18 80%
;gpz20 20%
;gpz23 7.5%
;gpz24 7.5%
;gpz26 7.5%
;gpz27 50%
;gpz28 6.25%
;gpz29 50%

;gpnam18: SINE.100
;gpnam20: SINE.100
;gpnam23: SINE.32
;gpnam24: SINE.100
;gpnam26: SINE.32
;gpnam27: SINE.100
;gpnam28: SINE.100
;gpnam29: SINE.100

hnoeN.uw
; {1H}-15N NOE; Lopt - PEPHQC detection
; Using channel 3 for 15N
; based on Lopt 13C aro relax experiments
; 1) use vclist for saturation pulses
; 3) use interleaved acquisition ns - T1 - hypercomplex - t1
; works for signals between 10.5 and 6.5 ppm @ 600 MHz

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

define list<loopcounter> noelist = <$VCLIST>

aqseq 312

"in10=inf2/2"

;***** PULSES *****
;p2=p1*2
;p22=p21*2
;p13=1150u
;p14=1600u
;***** LOOPS *****
;l4=(td2/2)
;l5=(td1)
;***** DELAYS *****
;d10=3u
;d16=100u
;d3=10m
;d21=1/(4.0*cnst21)
"DELTA3=d20-p13-3u"
"DELTA4=d3/2-p14/2"
"DELTA5=d1-d3*13"
"DELTA6=d21-p18-d16-6u-p2"
"DELTA7=d21-p18-d16-6u"

"spoff5=2500"
"spoff6=-1680"
"spoff7=-1680"

ze
10u p11:f1 p13:f3
1 31m do:f3
11 5m
2 3m
3 10m
"l3=noelist"
"DELTA5=d1-d3*13"

12 3u

;***** NOE *****
DELTA5 p13:f3

if "l3 == 0" goto 7
20 DELTA4 p110:f1
(p14:sp5 ph4):f1
DELTA4 p11:f1
lo to 20 times l3
7 (p21 ph5):f3

;*** t1 LABELING + inphase --> antiphase ***
d10 p11:f1
DELTA6
p18:gp18*EA
d16
(center (p2 ph4):f1 (p4 ph4):f2 )
d10
(p22 ph4):f3
6u
p18:gp18*EA*-1
d16
DELTA7
;***** PEP period *****
(p1 ph4):f1 (p21 ph9):f3
3u p110:f1
(p13:sp7 ph2):f1
DELTA3 p11:f1
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
DELTA3 p110:f1
(p13:sp6 ph1):f1
3u p11:f1
(p1 ph1):f1 (p21 ph8):f3
d20
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
d20
(p1 ph4):f1
3u p110:f1
(p13:sp7 ph4):f1
3u p11:f1
(p2 ph4):f1
3u
50u
p18:gp18*0.2026 ; decode gradient
d16 p116:f3
3u BLKGRAD

;***** ACQUISITION *****
go=1 ph0 cpd3:f3
30m do:f3 wr #0 if #0 zd
1m noelist.inc
lo to 11 times l5
1m ip9*2
1m igrad EA
1m noelist.res
lo to 2 times 2
1m id10
1m ip5*2
1m ip0*2
lo to 3 times l4
exit

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

;*** VARIABLES SET BY USER ***
;cnst21: JNH [93 Hz]
;d1: recycle delay 1-5*T1
;d3 : loopdelay NOE = 10ms
;d16 : grad delay [100u]
;d20 : inept delay 1 [2.5m]
;d21 : 1/4JNH [2.69m]
;td1: 2* number of complex points
;p1: 1H 90 pulse length @ p11
;p21: 15N 90 pulse length @ p13
;p18: encoding gradient [1000u]
;p11: 1H full power
;p110: 120 dB
;p13: 15N full power
;l3: noelist, timeNOE = l3*10ms

;spnam5: reburp.1000
;spnam6: eburp2.1000
;spnam7: eburp2tr.1000

;gpz18 80%
;gpnam18: SINE.100
```

8.7 DEST

std 2d inkref.mb

```

;Saturation transfer difference
;avance-version (20151214)
;pseude2D sequence
;water suppression using selective re-Burp pulse sequence with gradients
;
; "Kinetics of Abeta Monomer-to-Oligomer Exchange bz NMR Relaxation"
Marius Clore et al, Jacs 2010, 132,9948-9951

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

; tested on ubiquitin at 23/11/06

;$OWNER=nrsu
"p16=300u"
"d12=20u"
"d13=3u"
"d16=100u"
"d1=1"
"p3=2083u"
"l1=td1-2"

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

;define list<frequency> fqlist = { 35000 0}
define list<frequency> fqlist = <$FQ1LIST>
1 ze
3u
;reference experiment before
2 15m pl9:f1
15m
d12
d1
d13
d12 fq=8.7(bf ppm):f1
d12 pl1:f1
;jump return
p1 ph1
d19
p1 ph2
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 fq=8.9(bf ppm):f1
;reburp
(p3:sp3 ph3):f1
d16
p16:gp1
4u BLKGRAD
go=5 ph31
30m pl9:f1 wr #0 if #0 zd
;
;start std experiments
;springen auf zweiten Eintrag
3u fqlist.inc
3 15m pl9:f1
;springt zurueck auf ersten Eintrag
15m fqlist.dec

4 d12 fqlist^:f1
d1 cw:f1
d13 do:f1
d12 fq=8.7(bf ppm):f1
d12 pl1:f1
;jump return
p1 ph1
d19
p1 ph2
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 fq=8.9(bf ppm):f1
;reburp
(p3:sp3 ph3):f1

d16
p16:gp1
4u BLKGRAD
go=3 ph31
30m pl9:f1 wr #0 if #0 zd
lo to 4 times l1

;reference experiment afterwards
5 15m pl9:f1
15m
d12
d1
d13
d12 fq=8.7(bf ppm):f1
d12 pl1:f1
;jump return
p1 ph1
d19
p1 ph2
50u UNBLKGRAD
p16:gp1
d16 fq=8.9(bf ppm):f1
;reburp
(p3:sp3 ph3):f1
d16
p16:gp1
4u BLKGRAD
go=5 ph31
30m pl9:f1 wr #0 if #0 zd

exit

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

ph29=0
ph31=0 2 2 0

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p19: f1 channel - power level for saturation, 360 oder 180Hz
; (precession)
;frequency round B1, T=1/f --> calcpowlev mit
;
; "Newpulselength"= 1/(4*350Hz)=714.29us resp
1/(4*180Hz)=1388.89us
;p16: homospoil/gradient pulse
;p3: REBURP sel 180Grad auf Amidprotonen
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1 (set to 1s for saturation)
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay jump return scheme (set to maximize amide resonances)

;NS: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 4
;cnst29: frequency saturation

;for z-only gradients:
;gpz1: 42G/cm = 76%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100

;define FQ1LIST (irradiation frequencies)
; (list has to be stored in "/u/exp/stan/nmr/lists/fl")

```

NMR-Pulsprogramme: DEST

dest15n.mbuw

```

; R1 15N Lopt - PEPHSC detection
; Using channel 3 for 15N
; based on Lopt 13C aro relax experiments
; 1) use vclist for different blocks of T1 delays
; 3) use interleaved acquisition ns - T1 -
hypercomplex - t1
; works for signals between 10.5 and 6.5 ppm @ 600 MHz
; saturation pulses included for detection of DEST

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

aqseq 312

define list<power> cwpw1 = <$VALIST>
define list<frequency> cwsat = <$FQ1LIST>

"in10=inf2/2"
"cnst0=0"

;***** PULSES *****
"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p13=1150u"
"p14=1600u"

;***** LOOPS *****
"l4=(td2/2)"
"l5=(td1)"

;***** DELAYS *****
"d10=3u"
"d16=100u"
"d3=50m"
"d21=1/(4.0*cnst21)"
"DELTA1=d20-p28-d16-3u"
"DELTA2=d21-p23-d16-3u"
"DELTA3=d20-p13-3u"

"DELTA4=d3/2-p14/2"

"DELTA6=d21-p18-d16-6u-p2"
"DELTA7=d21-p18-d16-6u"

"spoff5=2500"
"spoff6=-1680"
"spoff7=-1680"

ze
10u p1:f1 p13:f3
1 31m do:f3
11 5m
2 3m
3 10m
12 3u fq=cnst0:f3

;***** INEPT *****
d1 p1:f1 p13:f3
(p21 ph4):f3
50u UNBLKGRAD
p20:gp20
d16
(p1 ph4):f1
3u
p28:gp28
d16
DELTA1
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
3u
DELTA1
p28:gp28
d16
(p1 ph1):f1
3u p10:f1
(p13:sp7 ph2):f1
3u p1:f1
(p21 ph7):f3
3u
p23:gp23
d16
DELTA2
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
3u
DELTA2
p23:gp23
d16
.***** T1 *****
(p21 ph1):f3
3u cwsat:f3
3u cwpw1:f3
3u cw:f3 ph6
if "l3 == 0" goto 7
20 DELTA4 p10:f1
(p14:sp5 ph4):f1
DELTA4 p11:f1
lo to 20 times l3
3u do:f3
3u p13:f3
3u fq=cnst0:f3
p18:gp21
d16
7 (p21 ph5):f3
;***** t1 LABELING + inphase --> antiphase
*****
d10
DELTA6
p18:gp18*EA
d16
(center (p2 ph4):f1 (p4 ph4):f2 )
d10
(p22 ph4):f3
6u
p18:gp18*EA*-1
d16
DELTA7
;***** PEP period *****
(p1 ph4):f1 (p21 ph9):f3
3u p10:f1
(p13:sp7 ph2):f1
DELTA3 p11:f1
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
DELTA3 p10:f1
(p13:sp6 ph1):f1
3u p1:f1
(p1 ph1):f1 (p21 ph8):f3
d20
(center (p2 ph4):f1 (p22 ph4):f3 )
d20
(p1 ph4):f1
3u p10:f1
(p13:sp7 ph4):f1
3u p1:f1
(p2 ph4):f1
3u
50u
p18:gp18*0.2026 ; decode gradient
d16 p16:f3
3u BLKGRAD

; ***** ACQUISITION *****
go=1 ph0 cpd3:f3
30m do:f3 wr #0 if #0 zd
1m cwpw1.inc cwsat.inc
lo to 11 times l5
1m ip9*2
1m igrad EA
1m cwpw1.res cwsat.res
lo to 2 times 2
1m id10
1m ip5*2
1m ip0*2
lo to 3 times l4
exit

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

;*** VARIABLES SET BY USER ***
;cnst21: JNH [93 Hz]
;d1: recycle delay 1-5*T1
;d3 : loopdelay T1 = 50ms
;d16 : grad delay [100u]
;d20 : inept delay l [2.5m]
;d21 : 1/4JNH [2.69m]
;td1: 2* number of complex points
;p1: 1H 90 pulse length @ p11
;p21: 15N 90 pulse length @ p13
;p18: encoding gradient [1000u]
;p20: gradient purge for 15N [1000u]
;p23: gradient purge for P-element [300u]
;p28: gradient purge for 180 pulse [1000u]

;p11: 1H full power
;p110: 120 dB
;p13: 15N full power

;l3: r1list, timeT1 = 13*50ms

;spnam5: reburp.1000
;spnam6: eburp2.1000
;spnam7: eburp2r.1000

;gpz18 80%
;gpz20 20%
;gpz23 7.5%
;gpz26 7.5%
;gpz28 6.25%

;gpnam18: SINE.100
;gpnam20: SINE.100
;gpnam23: SINE.32
;gpnam26: SINE.32
;gpnam28: SINE.100

```


9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	14
Tabelle 2: Eingesetzte Bakterienstämme	15
Tabelle 3: Verwendete Plasmide.....	15
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien.....	16
Tabelle 5: Verwendete Geräte.....	17
Tabelle 6: Verwendete Software	18
Tabelle 7: Verwendete Lösungen bei der Gelelektrophorese.....	19
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für die Polymerasekettenreaktionen, DPN1-Verdau und T4-Ligation.....	22
Tabelle 9: Verwendete Pufferlösungen zur Reinigung von A β ₁₋₄₀	23
Tabelle 10: Verwendete Pufferlösungen zur Reinigung von PTH ₁₋₈₄	25
Tabelle 11: Extinktionskoeffizienten	27
Tabelle 12: Zuordnung der ¹ H- ¹⁵ N-Kreuzsignale von A β ₁₋₄₀ bzw. pA β ₃₋₄₀	XIX
Tabelle 13: Sequenz und Eigenschaften der verwendeten Primer für die QuikChange PCR.	XX
Tabelle 14: Zuordnung und Amidprotonenaustauschraten der ¹ H- ¹⁵ N-Kreuzsignale von A β ₁₋₄₀ bzw. A β ₁₋₄₀ F19K L34E	XXI
Tabelle 15: Zuordnung der ¹ H- ¹⁵ N-Kreuzsignale von A β ₁₋₄₀ in Abwesenheit und Anwesenheit von CypD.	XXIV
Tabelle 16: ¹ H und ¹⁵ N Verschiebungen von CypD in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 25°C,.....	XXV
Tabelle 17: Zuordnung von mSAA1.1 in 99.98 % d ₆ -DMSO/0,02 % d-TFA bei 25 °C.....	XXXI
Tabelle 18: Zuordnung von PTH ₁₋₈₄ in 99.96 % d ₆ -DMSO/0,04 % d-TFA bei 25 °C.....	XXXVI

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturmodelle von A β ₁₋₄₀ Fibrillen.....	5
Abbildung 2: Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten A β ₁₋₄₀ Varianten.	8
Abbildung 3: Die Interaktion zwischen CypD und A β ₁₋₄₀ erfolgt im aktiven Zentrum von CypD.....	10
Abbildung 4: Aggregationswahrscheinlichkeit und Struktur von Serum Amyloid A-Proteinen.....	11
Abbildung 5: Repräsentative CD-Spektren von Polypeptiden mit verschiedenen Sekundärstrukturen.	27
Abbildung 6: <i>Cross</i> - β -Struktur von Amyloidfibrillen erzeugt ein charakteristisches Streumuster bei Röntgenbeugung.....	30
Abbildung 7: Thioflavin T-Molekül.....	30
Abbildung 8: Bildung amyloider Fibrillen.	32
Abbildung 9: Konzept der kritischen Konzentration.	33
Abbildung 10: Pulssequenz zum Magnetisierungstransfer über J-Kopplungen und charakteristische J-Kopplungskonstanten in Proteinen.	35
Abbildung 11: Magnetisierungstransfer der fünfdimensionalen Experimente HabCabCONH (A) und HN(CA)CONH ^[238] (B).....	37
Abbildung 12: Chemischer Austausch für ein Zweizustandsmodell mit verschiedenen Populationen der Zustände.	39
Abbildung 13: H/D-Austausch-Protokoll für direkt NMR-detektierbare Spezies (entfaltet und nativ gefaltet) sowie für nicht direkt NMR-detektierbare Spezies (in dieser Arbeit Amyloidfibrillen).	42
Abbildung 14: Prinzip der Messung von Diffusionskoeffizienten mittels NMR-Spektroskopie.	47
Abbildung 15: Verwendete Pulssequenzen zur Messung des Diffusionskoeffizienten <i>D</i> eines Proteins.....	49
Abbildung 16: Logarithmische NMR-Zeitskala ^[298]	50
Abbildung 17: Simulierte doppellogarithmische Darstellung der longitudinalen und transversalen Relaxationsrate in Abhängigkeit der Rotationskorrelationszeit und der magnetischen Feldstärke.	51
Abbildung 18: Logarithmische Darstellung des mit Gleichung (2.29) simulierten heteronuklearen NOE-Effektes in Abhängigkeit der Korrelationszeit τ_c	53
Abbildung 19: Pulssequenz für das ¹ H-DEST-Experiment.	56
Abbildung 20: Zusammenfassung der kinetischen Modelle im DESTfit Programm ^[311]	57
Abbildung 21: Kalibrierkurven zur Bestimmung des Restwasseranteils auf NMR-Parameter.	59
Abbildung 22: Protonierungslevel von A β ₁₋₄₀ (A), mSAA1.1 (B) und PTH ₁₋₈₄ (C) nach Inkubation in d ₆ -DMSO/D ₂ O.	60
Abbildung 23: Simulierter Verlauf der Protonierungslevel für verschiedene Startwerte (A) und verschiedene Austauschraten (B).....	62
Abbildung 24: Einfluss unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Morphologie und Amidprotonenaustausch-Muster von A β ₁₋₄₀ Amyloidfibrillen. ^[314]	64
Abbildung 25: ¹ H- ¹⁵ N-Korrelationsspektren von A β ₁₋₄₀ (schwarz) und pA β ₃₋₄₀ (weinrot) in 99,98 % d ₆ -DMSO/0,02 % d-TFA.	67
Abbildung 26: Einfluss einer N-terminalen Pyroglutamat-Modifizierung (pA β ₃₋₄₀ , A, C) verglichen mit Wildtyp A β ₁₋₄₀ (B, D) auf Morphologie und Amidprotonenaustausch-Muster der Amyloidfibrillen. ^[318]	68

Abbildung 27: Vergleich der Sekundärstrukturelemente von A β ₁₋₄₀ Fibrillen in der Literatur.....	70
Abbildung 28: Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahmen von mSAA1.1 Fibrillen vor (A) und nach (B) dem H/D-Austauschexperiment.....	73
Abbildung 29: ¹ H- ¹⁵ N-SOFAST-HMQC Spektren von ¹⁵ N-markiertem mSAA1.1 in 99,98 % d ₆ -DMSO/0,02 % d-TFA.....	74
Abbildung 30: Protonierungslevel von mSAA1.1 nach unterschiedlichen Austauschzeiten (A) und daraus bestimmte Amidprotonenaustauschraten (B) in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz.....	75
Abbildung 31: PTH ₁₋₈₄ -Aggregate weisen charakteristische Eigenschaften amyloider Fibrillen auf.....	78
Abbildung 32: Morphologie der PTH ₁₋₈₄ -Fibrillen, welche durch Inkubation für 100 h bei verschiedenen Temperaturen erzeugt wurden.....	79
Abbildung 33: ThT basierte Messungen der Aggregationskinetik von PTH ₁₋₈₄ in Abhängigkeit der Peptidkonzentration (A), des pH-Wertes (B) sowie der Salzkonzentration (C).....	80
Abbildung 34: ¹ H- ¹⁵ N-Korrelationspektren von PTH ₁₋₈₄ nach 3 Wochen H/D-Austausch (B) verglichen mit einer Referenzprobe (A).....	81
Abbildung 35: Protonierungslevel von PTH ₁₋₈₄ nach verschiedenen Austauschzeiten (A: 72 h, B: 21 d) in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz.....	82
Abbildung 36: Fibrillen stehen im Gleichgewicht dem mit löslichem Anteil von PTH ₁₋₈₄	84
Abbildung 37: TEM Aufnahmen (A-C) und Fern-UV-CD-Spektren (D) von PTH ₁₋₈₄	85
Abbildung 38: Diffusion von PTH ₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen (grün) verglichen mit einer frisch präparierten Probe (blau).....	86
Abbildung 39: Analyse der Größenverteilung der PTH ₁₋₈₄ -Spezies durch photoinduzierte Vernetzung (PICUP) und Größenauftrennung mittels Gelelektrophorese.....	87
Abbildung 40: Änderungen der chemischen Verschiebung und der Signalintensität der ¹ H- ¹⁵ N Kreuzsignale von PTH ₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen (grün, A) bzw. im Überstand nach Sedimentation der Fibrillen (16000 g, 4 °C, 1 h) (orange, B) verglichen mit einer frisch präparierten Probe (blau, A und B).....	88
Abbildung 41: Änderung der chemischen Verschiebung (A) und der Abnahme der Signalintensität (B) der ¹ H- ¹⁵ N-Kreuzsignale in Gegenwart von Fibrillen (türkis) bzw. im Überstand nach Sedimentation der Fibrillen (16000 g, 4 °C, 1 h) (orange) verglichen mit einer frisch präparierten Probe.....	89
Abbildung 42: Longitudinale Relaxationsrate R ₁ (A), transversale Relaxationsrate R ₂ (B) und heteronuklearer NOE-Wert (C) für PTH ₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen (grün) verglichen mit einer frisch gelösten Probe (blau).....	90
Abbildung 43: Untersuchung des Gleichgewichtes zwischen löslichem und fibrillärem PTH ₁₋₈₄ mittels DEST-Effekt.....	92
Abbildung 44: Einfluss von CypD auf die Fibrillierung von A β ₁₋₄₀	97
Abbildung 45: MM258 Bindung an CypD stellt die reduzierten Signalintensitäten der A β ₁₋₄₀ -Kreuzsignale wieder her.....	98
Abbildung 46: Interaktion von CypD mit A β ₁₆₋₂₀ (KLVFF).....	99
Abbildung 47: CypD beschleunigt den Amidprotonenaustausch von A β ₁₋₄₀	100
Abbildung 48: SDS-PAGE Analyse während der Herstellung der Varianten von A β ₁₋₄₀	104
Abbildung 49: Einfluss der Varianten auf die Bildung von Amyloidfibrillen.....	105
Abbildung 50: NMR-Untersuchungen an frisch gelöstem A β	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung S1: Korrelation der Protonierungslevel der verschiedenen A β ₁₋₄₀ -Fibrillen nach HD-Austausch.	XVIII
Abbildung S2: ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektren von A β ₁₋₄₀ wt (A) und A β ₁₋₄₀ F19K L34E (B).	XXII
Abbildung S3: Interaktion von A β ₁₋₄₀ mit CypD.	XXIII
Abbildung S4: Interaktion von A β ₁₋₄₀ mit CypD.	XXVII
Abbildung S5: Änderungen der chemischen Verschiebung der C α bzw. CO-Kerne von A β ₁₋₄₀ durch die Interaktion mit CypD.	XXVIII
Abbildung S6: Einfluss der verzögerten Zugabe von MM258 auf die Kinetik der Bildung von A β ₁₋₄₀ Fibrillen.	XXVIII
Abbildung S7: Untersuchung der Interaktion von CypD mit A β ₁₆₋₂₀ (KLVFF).	XXIX
Abbildung S8: CypD beschleunigt den Amidprotonenaustausch von A β ₁₋₄₀	XXIX
Abbildung S9: Abhängigkeit des Amidprotonenaustausches vom pH-Wert.	XXX
Abbildung S10: Schutzfaktoren von mSAA1.1-Fibrillen (A) verglichen mit den nach Ref. ^[244] berechneten intrinsischen Austauschraten (B).	XXXIV
Abbildung S11: Abhängigkeit der <i>Lag</i> -Zeit und Geschwindigkeitskonstante der Fibrillenbildung von PTH ₁₋₈₄ von der Salzkonzentration.	XXXVIII
Abbildung S12: Hydrodynamische Radien für Proteine mit unterschiedlicher Länge berechnet nach Gleichung (2.21) bzw. (2.22), S. 49. ^[292]	XXXVIII
Abbildung S13: Änderungen der chemischen Verschiebung und der Signalintensität der ¹ H- ¹⁵ N-Kreuzsignale von PTH ₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen (grün, A, D) bzw. im Überstand nach Sedimentation der Fibrillen (16000 g, 4 °C, 1 h) (orange, B, E) verglichen mit einer frisch präparierten Probe (blau, A- C).	XL
Abbildung S14: Longitudinale Relaxationsrate R_1 (A), transversale Relaxationsrate R_2 (B) und heteronuklearer NOE-Wert (C) für PTH ₁₋₈₄ in Gegenwart von 0mM (rot) bzw. 300mM Natriumsulphat (blau).	XLI
Abbildung S15: Diffusionskoeffizienten von PTH ₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen (grün) verglichen mit einer frisch präparierten Probe (blau) für die einzelnen Kreuzsignale.	XLII
Abbildung S16: Differenz der transversalen Relaxationsraten der ¹⁵ N-Kerne in Gegenwart von Fibrillen verglichen mit frisch gelöstem PTH ₁₋₈₄	XLII
Abbildung S17: Transversale Relaxationsrate R_2 von PTH ₁₋₈₄ in Gegenwart von Fibrillen (grün) verglichen mit einer frisch gelösten Probe (blau).	XLIII

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Monika Baumann
 Geburtsdatum: 03.05.1986
 Geburtsort: München (Deutschland)

Ausbildung

10/2011 – heute wissenschaftlicher Mitarbeiter / Promotion
 Institut für Physik, Arbeitsgruppe Biophysik
 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2005 – 09/2011 Student der medizinischen Physik auf Diplom
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
 Abschluss: Diplom-Physikerin (Medizinphysik)

09/1996 – 07/2005 Christoph-Scheiner-Gymnasium Ingolstadt,
 Abschluss: Abitur, allgemeine Hochschulreife

09/1992 – 07/1996 Grundschule Kösching

12 Eigene Publikationen

- [1] I. Morgado, K. Wieligmann, M. Bereza, R. Rönicke, K. Meinhardt, K. Annamalai, M. Baumann, J. Wacker, P. Hortschansky, M. Malesevic, C. Parthier, C. Mawrin, C. Schiene-Fischer, K. G. Reymann, M. T. Stubbs, J. Balbach, M. Görlach, U. Horn, M. Fändrich, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 12503-12508.
- [2] M. Gopalswamy, A. Kumar, J. Adler, M. Baumann, M. Henze, S. T. Kumar, M. Fändrich, H. A. Scheidt, D. Huster, J. Balbach, *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1854*, 249-257.
- [3] J. Adler, M. Baumann, B. Voigt, H. A. Scheidt, D. Bhowmik, T. Haupl, B. Abel, P. K. Madhu, J. Balbach, S. Maiti, D. Huster, *Chemphyschem* **2016**, *17*, 2744-2753.
- [4] M. Garvey, M. Baumann, M. Wulff, S. T. Kumar, D. Markx, I. Morgado, U. Knüpfer, U. Horn, C. Mawrin, M. Fändrich, J. Balbach, *Amyloid* **2016**, *23*, 76-85.
- [5] A. Kumar, M. Baumann, J. Balbach, *Sci Rep* **2016**, *6*, 22533.
- [6] M. Villmow, M. Baumann, M. Malesevic, R. Sachs, G. Hause, M. Fändrich, J. Balbach, C. Schiene-Fischer, *Biochem J* **2016**, *473*, 1355-1368.
- [7] M. Wulff, M. Baumann, A. Thummler, J. K. Yadav, L. Heinrich, U. Knüpfer, D. Schlenzig, A. Schierhorn, J. U. Rahfeld, U. Horn, J. Balbach, H. U. Demuth, M. Fändrich, *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 5081-5084.

13 Konferenzbeiträge

14.-16.03.2012

„*NMR Investigations of molecular interactions of proteins and of the Self Organization of Amyloid Protein Fibrils*“, Vortrag

1. Retreat SFB TRR 102 (Polymere unter Zwangsbedingungen), Bad Blankenburg

12.-14.10.2012

„*Interaction of Amyloid β (1-40) and Cyclophilin D*“, Poster

23th Faltertage, Regensburg

19.10.2012

„*Amyloid fibrils and Oligomers under high pressure*“, Vortrag

Mini-Workshop SFB TRR 102, Brehna

20.-27.7.2013

„*Analysis of intracellular interaction of Amyloid β (1-40) and Cyclophilin D*“, Poster und Teilnahme

EMBO Kurs: Structure, Dynamics and Function of Biomacromolecules by Solution NMR, Basel, Schweiz

19.-21.9.2013

„*The Inhibition of Amyloid β (1-40) Aggregation by Cyclophilins*“, Poster

Konferenz: Cyclophilins and other Foldases: Cell Signaling Catalysts an Drug Targets, Halle (Saale)

18.-20.10.2013

„*Influence of Cyclophilins in Alzheimer's disease: Analysis of intracellular interaction of Amyloid β (1-40) and Cyclophilin D*“, Poster

24th Faltertage, Regensburg

08.11.2013

„*Recombinant expression and purification of Amyloid beta 1-40 variant*“, Vortrag

Miniworkshop SFB TRR 102, Schkeuditz

17.03.-19.03.14

„*Self-Organisation of Amyloid Fibrils*“, Poster

3. Retreat SFB TRR 102, Wittenberg

5.-8.5.2014

„*Resonance Assignment of Amyloid Forming Proteins for Hydrogen-Deuterium Exchange Experiments*“, Vortrag

4th Bio-NMR Annual User Meeting, Warschau, Polen

10.-15.08.2014

„*Influence of Cyclophilins in Alzheimer's disease: Analysis of intracellular interaction of Amyloid β (1-40) and Cyclophilin D*“, Poster, Teilnahme

EMBO Kurs: Multidimensional NMR in Structural Biology, Joachimsthal

17.-19.10.2014

„*Generic Hydrogen Bonds of Amyloid β (1-40) and their Suppression by Cyclophilins*“, Vortrag

25th Faltertage, Regensburg

21.-22.01.15

„*NMR Investigation of the Self-Organisation and Dynamics of Amyloid Protein Fibrils*“, Poster

Begutachtung des SFB TRR 102, Leipzig

02.10.2015

„*Small Changes - Large Effects? The Influence of A β (1-40) variants on Fibril -Kinetics, -Structure, and -Dynamics*“, Poster

3. Miniworkshop SFB TRR 102, Halle (Saale)

21.-23.10.2016

„*Control of GPCR activation by intrinsically disordered parathyroid hormon*“, Poster

27th Faltertage, Regensburg

14 Betreute Abschlussarbeiten

- [1] J. Schork, *Hochdruck NMR-Spektroskopie am Alzheimer-Peptid A β* , Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2012**.
- [2] M. Weinlich, *NMR-Untersuchungen am Alzheimer-Peptid A β* , Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2013**.
- [3] M. Lehmann, *NMR-Untersuchungen an amyloiden Fibrillen des Parathyroidhormons*, Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2014**.
- [4] B. Voigt, *Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von Varianten des Alzheimerpeptids Amyloid β (1 - 40)*, Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2014**.
- [5] J. Künzl, *NMR- und biophysikalische Charakterisierung des Serum Amyloid Proteins A1.1*, Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2014**.
- [6] F. Teske, *Biophysikalische Untersuchungen zu amyloiden Fibrillen des Parathyroidhormons*, Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2015**.
- [7] P. Lehmann, *Biophysikalische Untersuchungen zu amyloiden Fibrillen des Parathyroidhormons*, Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2016**.
- [8] B. Voigt, *Charakterisierung von Chimären zwischen einem thermoresponsiven Polymer und dem Parathormon*, Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2017**.

15 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Fachgruppe Biophysik unter Leitung von Prof. Dr. Jochen Balbach an der Martin-Luther-Universität angefertigt. Bei ihm möchte ich mich besonders bedanken für die Überlassung des interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft, viele hilfreiche Ratschläge und auch die Freiheit in der Bearbeitung und Durchführung von Projekten und Projektideen.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei allen ehemaligen und derzeitigen Fachgruppenmitgliedern möchte ich mich für die gute Atmosphäre, Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft bedanken: Stefan Gröger, Dr. Ulrich Weininger, Dr. Caroline Haupt, Dr. Michael Kovermann, Dr. Rolf Sachs, Rica Patzschke, Dr. Mathias Henze, Mohanraj Gopalswamy, Dr. Amit Kumar, Prof. Dr. Detlef Reichert, Kathrin Waldheim, Heike Böcker, Susanne Link, Constanze Westphal, Heiner Baier, Andi Klamt, Natalie Breitkopf, Paul Becker, Tobias Gruber und Matthias Altenstein. Besonderer Dank gilt Stefan und Uli für die Unterstützung bei NMR-spektroskopischen Fragen und der Implementierung von Pulssequenzen sowie Tobias und Katrin für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Bachelor- und Masterstudenten bedanken: Judith Schork, Marcel Weinlich, Maria Lehmann, Bruno Voigt, Julia Künzl, Felix Teske und Patrick Lehmann. Besonderer Dank gilt hier Bruno Voigt für einige Ergebnisse der Bachelorarbeit in dieser Arbeit enthalten sind und Julia Künzl für die Zusammenarbeit bei der Implementierung der 5D NMR Pulsprogramme und bei der Zuordnung von mSAA 1.1.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Festkörper-NMR-Gruppe für die gute Atmosphäre im Haus und insbesondere bei Dr. Günther Hempel für zahlreiche Diskussionen über NMR-spektroskopische Grundlagen.

Desweiteren möchte ich mich bei Vladimír Sklenář und Jiří Nováček (Masarykova Universität, Brunn) für die Möglichkeit dort Messungen durchzuführen, sowie Jiří für die Unterstützung bei der Implementierung der 5D Pulssequenzen in unserer Fachgruppe. Mein Dank gilt auch dem Projekt Bio-NMR (*European Commission's Framework Program*) für diese Möglichkeit, die finanzielle Unterstützung dabei und die Einladung als Sprecher zum 4. Bio-NMR User Meeting.

Für die tolle Zusammenarbeit bei verschiedenen Projekten möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Marcus Fändrich, insbesondere bei Dr. Megan Garvey, Senthil Kumar, Melanie Wulff und Katrin Meinhardt, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Daniel Huster, insbesondere bei Juliane Adler sowie der Arbeitsgruppe von Dr. Cordelia Schiene-Fischer, insbesondere bei Marten Villmow bedanken.

Prof. Dr. Milton Stubbs und Dr. Christoph Parthier danke ich für die unkomplizierte Möglichkeit der Durchführung von Röntgenbeugungsmessungen sowie Dr. Hause für die Nutzung des Elektronenmikroskopes.

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotionszeit möchte ich mich bei SFB TRR 102 (Polymere unter Zwangsbedingungen) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken. Außerdem möchte ich bei Susanne Morgan und Thomas Michael für die Verwaltung und Organisation innerhalb des SFB und der integrierten Graduiertenschule, insbesondere für die organisation von Soft-Skill und wissenschaftlichen Workshops und Meetings.

Zuletzt möchte ich mich bei Anna und Andreas Baumann für die spontane Einweisung in die Grundlagen von Matlab und bei Christian Wagner für die richtige Balance zwischen Motivation, Ablenkung und Verständnis für lange Arbeitstage bedanken.

16 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

„Biophysikalische Untersuchungen an Amyloidfibrillen“

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe. Ich habe diese Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer anderen Fakultät vorgelegt.

Halle (Saale), April 2017

Monika Baumann