

**"Strukturaufklärung von Biomolekülen mit Hilfe der mehrdimensionalen
Kernspinresonanz: Proteine aus der Signaltransduktion und der Regulation von
Zellkernprozessen"**

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Peter Bayer

geb. am: 19. Mai 1965 in: Falkenau

Gutachter/in

1. Prof. Dr. G. Fischer, Halle
2. Prof. Dr. R. Goody, Dortmund
3. Prof. Dr. H.-D. Lüdemann, Regensburg

Halle (Saale),

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Die Strukturaufklärung von Makromolekülen</u>	1
1.1	Historisches zur Kernspinresonanz	1
1.2	Röntgenkristallographie und Kernspinresonanz	2
2.	<u>Ziele der Arbeit</u>	3
3.	<u>Zusammenfassung der Forschungsergebnisse</u>	4
3.1	Klassische Proteinstrukturaufklärung: SUMO-1 und die Regulation des Kerntransports	4
3.1.1	SUMO-1	4
3.1.2	Strategie zur Strukturaufklärung von SUMO	4
3.1.2.1	COSY und NOESY	4
3.1.2.2	Das Chaintracing	6
3.1.2.3	Sekundärstrukturelemente	6
3.1.2.4	Die Chemische Verschiebung	7
3.1.2.5	Die skalare Kopplung	7
3.1.2.6	D ₂ O Spektren	8
3.1.2.7	Empirische Daten	8
3.1.2.8	Die Berechnung der Struktur von SUMO-1	9
3.1.3.	Die Struktur von SUMO	10
3.1.4	Aussagen über die biologische Funktion von SUMO	11
3.2	Proteine mit repetitiven Sequenzen: Der Tumorsuppressor APC	11
3.2.1	Die Armadillo-Domäne	11
3.2.2	β-Catenin und APC	12
3.2.3	Die Strategie zur Strukturaufklärung des Armadillo-Motivs	12
3.2.4	Die Struktur des einfachen Repeats aus APC	13
3.2.5	Nachfolgende Strukturuntersuchungen	14
3.3	Proteine mit amyloidalen Peptidsequenzen: Das β-Amyloid A4 und die Tachykinin-Rezeptorbindung	14
3.3.1	Das β-Amyloid A4 Peptid	14
3.3.2	Vorangegangene strukturelle Untersuchungen an β-A4 Amyloid Fragmenten	14
3.3.3	Strategie zu Strukturuntersuchungen am β-Amyloid(1-40)	15
3.3.4	Die Struktur des β-Amyloids in 2,2,2-Trifluorethanol/Wasser (40/60, v/v)	15
3.3.5	Nachfolgende Arbeiten an der Struktur des β-Amyloids	16
3.4	Proteine mit Bindungsdomänen: Effektoren von „Molekularen Schaltern“ .	17
3.4.1	Kleine GTPasen	17
3.4.2	Die GTPasen Ras und Ral	17

3.4.3	Der Austauschfaktor Rlf	17
3.4.4	Vorarbeiten	18
3.4.5	Strategie zur Strukturuntersuchung von Rlf	18
3.4.6	Die dreidimensionale Struktur von Rlf	18
3.4.7	Die Eingrenzung des Bindungsinterfaces	19
3.4.8	Weiterführende Arbeiten an Rlf-RBD	20
3.5	Proteolytische Fragmentierung von Proteinen: WASP - ein Mediator des Cytoskeletts	20
3.5.1	Das Wiskott-Aldrich-Syndrom	20
3.5.2	Das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)	20
3.5.3	Strategien zur Strukturuntersuchung von WASP und seines Cdc42-Komplexes ..	21
3.5.4	Fluoreszenz-,CD- und Biacorestudien	22
3.5.5	NMR Strukturuntersuchungen der WASP Fragmente	22
3.5.6	Nachfolgende Arbeiten an der Struktur des WASP/Cdc42 Komplexes	24
3.6	Proteine im Komplex mit RNA: U1A - ein Regulatorprotein der RNA-Prozessierung	24
3.6.1	Strukturinformation aus dipolaren Wechselwirkungen	24
3.6.2	Residuale dipolare Kopplungen	24
3.6.3	Das U1A-RNA System	25
3.6.4	Vorangegangene Arbeiten an U1A	25
3.6.5	Strategie zum „Refinement“ der U1A-RNA-Struktur	25
3.6.6	Die Messung und Auswertung der dipolaren Restkopplungen	26
3.6.7	Metamorphe Phasen und dipolare Kopplungen	26
3.6.8	Anwendung der Methode auf den U1A-RNA Komplex	27
3.6.9	Bedeutung der Arbeiten an U1A-RNA	28
4.	<u>Zusammenfassung</u>	29
5.	<u>Literatur</u>	31
6.	<u>Publikationen</u>	37
7.	<u>Curriculum vitae</u>	39
8.	<u>Anhang: Veröffentlichungen</u>	40
9.	Erklärung	70

1. Die Strukturaufklärung von Makromolekülen

Max Perutz und Sir John Kendrew gelang 1957 die Strukturaufklärung der Proteine Hämoglobin und Myoglobin mit Hilfe der Röntgenkristallographie durch Lösung des sogenannten „Phasenproblems“. Ein historischer Siegeszug der Röntgenstrukturanalyse nahm damit seinen Anfang. Erstmals konnten Makromoleküle in atomarem Detail untersucht und studiert werden. Die Moleküle mußten jedoch zur Anwendung des Verfahrens kristallisiert werden, eine Voraussetzung, die, wie bald erkannt wurde, nicht immer erfüllbar war. Die Suche nach Methoden, die eine Strukturuntersuchung auf atomarer Ebene in Flüssigkeiten erlauben sollten, begann. Erst zwanzig Jahre nach der Kristallisation des Hämoglobins konnten erste Makromolekülstrukturen mit Hilfe der sogenannten Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) aufgeklärt werden. Proteine und Nucleinsäuren in wäßrigen Lösungen waren nun den Strukturbiologen und Chemikern zugänglich. Neben der Röntgenstrukturanalyse hat sich die Kernspinresonanz heute als Methode zur Strukturaufklärung von Makromolekülen auf atomarer Ebene etabliert.

1.1 Historisches zur Kernspinresonanz

Im Jahre 1916 unternahmen die Physiker Einstein und DeHaas einen Versuch zur Klärung der Frage nach der Ursache des Ferromagnetismus. Ein an einem Quarzfaden befestigter Eisenstab, der von einer leitenden Spule umgeben war, wurde durch die Entladung eines Kondensatorstroms magnetisiert. Aus der Drehungsbewegung des Stabes konnte das für den Magnetismus verantwortliche atomare magnetische Moment zu einem Wert bestimmt werden, der sich nicht allein aus dem Bahndrehimpuls des kreisenden Elektrons ableiten ließ.

Ein erster Hinweis zur Klärung des Sachverhalts kam schließlich 1925 durch die konzeptionelle Einführung des Eigendrehimpulses des Elektrons, des sogenannten Spins, durch Uhlenbeck und Goudsmit (Uhlenbeck und Goudsmit, 1925, 1926). Die Idee des Spins wurde von Wolfgang Pauli (Pauli, 1940) formell weiterentwickelt und schließlich von Paul Dirac quantenmechanisch begründet (Dirac, 1958).

Schon vor der Einführung des Spins konnten Stern und Gerlach 1921 an neutralen Silberatomen eindrucksvoll zeigen, daß letztere in einem inhomogenen Magnetfeld nur wenige diskrete Einstellungsmöglichkeiten besitzen. Sie demonstrierten auf diese Weise erstmals die Richtungsquantelung des Eigendrehimpulses von Elektronen. 1938 gelang es dem Physiker Isaac Rabi durch Resonanzmessungen in magnetischen Wechselfeldern auch das wesentlich kleinere magnetische Moment von Atomkernen zu messen. Durch Arbeiten mit höherer Teilchenzahl in Festkörpern und Flüssigkeiten wiesen Bloch und Purcell schließlich 1946 die erste Kernspinresonanz nach, was zur Entwicklung einer neuen spektroskopischen Methode führte.

Die Kernspinresonanz-Spektroskopie wurde mit der Konstruktion stärkerer Magnetfelder (Supraleitung) ein wichtiges Instrument zur Aufklärung der Konformation kleiner Moleküle. Die Einführung der gepulsten Fouriertransform-NMR durch Richard Ernst (Ernst, 1966) verbesserte die Empfindlichkeit der Methode, verringerte die Messzeit der Spektren und erlaubte die Durchführung neuartiger Experimente. Jedoch erst mit der Anwendung der

zweidimensionalen NMR-Spektroskopie gelang Kurt Wüthrich 1982 (Wüthrich, 1982) ein entscheidender Schritt zur Strukturaufklärung von Proteinen und anderen Makromolekülen.

Im Rahmen der zeitlichen Entwicklung der Kernspinresonanz wurden Pulsfolgen geschaffen, die detaillierte Aussagen über Korrelationen verschiedener Kerne erlauben. Darunter fallen Wechselwirkungen von Atomen über eine oder mehrere Bindungen hinweg (COSY ähnliche Folgen; COSY = Correlated Spectroscopy) oder Interaktionen, die Auskunft zur räumlichen Nachbarschaft von Kernen (NOESY Spektroskopie; NOESY = Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) liefern. Die Möglichkeit Resonanzfrequenzen miteinander in Beziehung zu setzen, führte schließlich zur Entwicklung der multidimensionalen NMR-Spektroskopie (Griesinger et al., 1989; Kay et al., 1990). Neben kleinen Molekülen können heute Strukturen von Polymeren wie Proteinen und Nukleinsäuren mit Hilfe moderner NMR-Techniken auf atomarer Ebene aufgeklärt werden.

1.2. Röntgenkristallographie und Kernspinresonanz

Trotz des Vorteils, Proteine und Nukleinsäuren unter physiologisch ähnlichen Bedingungen messen zu können, birgt die Kernspinresonanz einen entscheidenden Nachteil. Während die Röntgenkristallographie die Strukturaufklärung von Proteinen und deren Komplexen mit einigen hundert Kilodalton erlaubt (Löwe et al., 1995; Luger et al., 1998), unterliegt die NMR einer erheblichen Größenbeschränkung, die zur Zeit bei etwa 30 bis 40 kDa liegt. Die Aufklärung von Proteinen in diesem Molekulargewichtsbereich mit Hilfe der Kernresonanz ist mit hohem zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden. Obwohl neue vielversprechende Ansätze diese Grenze in Zukunft erhöhen werden (Pervushin et al., 1997), braucht es gegenwärtig Strategien, um strukturelle Aussagen auf atomarer Ebene über Proteine zu gewinnen, die mehrere hundert Aminosäuren enthalten. Solche Ansätze sind immer dann besonders notwendig, wenn durch Proteinaggregation oder andere negative Randbedingungen, kristallographische Verfahren scheitern. Die Strategien zielen darauf hin, „Teile“ von Makromolekülen zu untersuchen, um medizinisch und biochemisch relevante Informationen zu gewinnen. Ein entscheidender Vorteil der NMR gegenüber der Röntgenstrukturanalyse liegt in der Möglichkeit, dynamische Vorgänge wie Konformationsänderungen von Molekülen oder Bewegungen einzelner Strukturelemente in Biopolymeren messen zu können. Das Verständnis um diese Vorgänge ist umso wichtiger als in den letzten Jahren immer häufiger Hinweise auf die Notwendigkeit von Dynamik und Bewegung in Molekülen bei der Durchführung biochemischer Reaktionen an Bedeutung gewonnen haben (Kohen et al., 1999). Ein weiterer Vorteil der NMR besteht darin, Bindungsvorgänge von Liganden an Polymere durch konventionelle und neuentwickelte Pulstechniken untersuchen zu können. Dabei werden aktive „Screeningverfahren“ von Protein-Liganden Wechselwirkungen wie das SAR (Structure-Activity-Relationship; Shuker et al., 1996) oder der Bioaffinity-Assay (Meyer et al., 1997) zunehmend der industriellen Nutzung unterworfen. In dieser Hinsicht hat die sich ständig entwickelnde Kernspinresonanz nicht nur als kompetitive Methode zur Röntgenstrukturanalyse, sondern in zunehmendem Maße als komplementäre Strategie zur Untersuchung von Molekülen in Kristallen an Bedeutung gewonnen.

2. Ziele der Arbeit

Primäres Ziel der Arbeit war die Strukturaufklärung von Proteinen, die wichtige Aufgaben bei der Signaltransduktion (APC, WASP, Rlf, Amyloid, SUMO) übernehmen oder Vorgänge im Zellkern regeln (SUMO, U1A, APC). Alle diese Moleküle sind an der Bildung von Makromolekülkomplexen (Protein-Protein oder Protein-RNA) beteiligt. Mit der Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der Biopolymere und ihrer Wechselwirkungspartner sollten noch offene biochemische und medizinische Fragestellungen geklärt oder neue gezielte molekularbiologische Experimente in Aussicht gestellt werden. Die ausgewählten Proteinstrukturen nehmen Schlüsselstellungen in der Signaltransduktion und der anschließenden Umsetzung des Signals im Zellkern ein: Sie erfüllen neurotrophe Aufgaben durch Rezeptorbindung (Amyloid), dienen als Effektoren „molekularer Schalter“ (Rlf) oder als Mediatoren der Tumorsuppression (APC), beeinflussen die Ausbildung des Cytoskeletts (WASP), sind Vermittler des Kerntransports (SUMO) oder Regulatoren der RNA-Prozessierung (U1A). Anhand dieser ausgewählten Beispiele sollten Strategien aufgezeigt werden, wie der Einsatz der Kernspinresonanz, trotz erheblich großen Molekulargewichts einzelner Proteine oder Proteinkomplexe, zu Aussagen über Struktur oder Bindungseigenschaften von Molekülen herangezogen werden kann. Wo notwendig, sollten neue Techniken weiterentwickelt oder verbessert werden (U1A).

3. Zusammenfassung der Forschungsergebnisse

3.1 Klassische Proteinstrukturaufklärung: SUMO-1 und die Regulation des Kerntransports

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S. Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998): Structure Determination of the Small Ubiquitin-related Modifier SUMO-1. *J. Mol. Biol.*, **280**, 275-286.

3.1.1 SUMO-1

SUMO-1 (small ubiquitin-related modifier) gehört zu einer wachsenden Familie Ubiquitin-ähnlicher Moleküle, die eine Rolle in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen spielen. Die Konjugation von Ubiquitin an andere Proteine erfolgt unter Beteiligung mehrerer Enzyme und wird über die Knüpfung einer Isopeptidbindung zwischen einem Glyzin des Ubiquitin C-Terminus und einer ϵ -Aminogruppe eines Lysins (Lys⁴⁸) des empfangenden Proteins vollzogen (Hochstrasser 1995, 1996 [Review]; Jentsch and Schlenker, 1995; Hershko, 1996; Varshavski, 1997). Wie Ubiquitin kann auch SUMO, das an der Regulation des Kern-Zytoplasma Transports beteiligt ist, kovalent an andere Moleküle gebunden werden (Mahajan et al., 1997). Mehrere vorwiegend im Kern lokalisierte Proteine kommen dabei als Substrate in Frage (Matunis et al., 1996; Johnson et al., 1997; Kamitani et al., 1997)). Das einzige bisher eindeutig identifizierte Substrat ist jedoch RanGAP1, das GTPase aktivierende Protein von Ran (Bischoff et al., 1995). Die posttranslationale Modifikation durch SUMO bringt RanGAP1 an die Kernhülle, wo es an RanBP2/Nup358, eine Komponente des Kernporenkomplexes, bindet (Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997). In Säugerzellen ist diese Konjugation von SUMO und RanGAP1 Voraussetzung für den Kernimport.

Die Sequenzhomologie von SUMO und Ubiquitin ist mit nur 18% gering und gab Anlaß zu der Frage, ob das weitgehend homologe Verhalten im Rahmen der posttranslationalen Modifikation auf der Ebene der Tertiärstruktur beider Proteine seine Widerspiegelung findet.

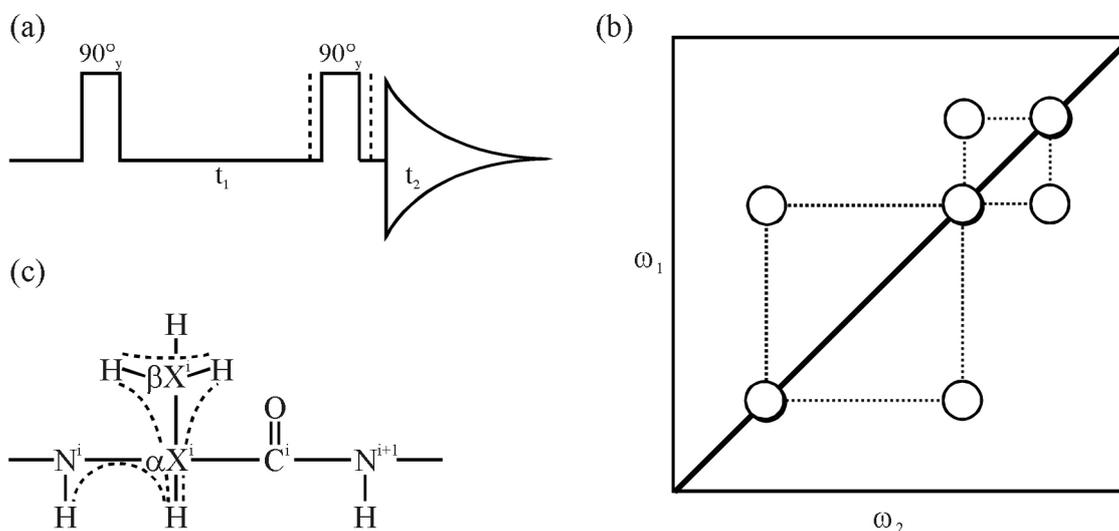
3.1.2 Strategie zur Strukturaufklärung von SUMO

Mit einem Molekulargewicht von 11kDa und einer guten Löslichkeit (bis Konzentrationen um 10mM) eignete sich SUMO zur Strukturaufklärung. Anhand dieses Proteins soll deshalb exemplarisch in kurzer Form der klassische Weg zur Aufklärung der Tertiärstruktur von Proteinen mit Hilfe der zweidimensionalen NMR gezeigt werden (Wüthrich, 1982).

3.1.2.1 COSY und NOESY

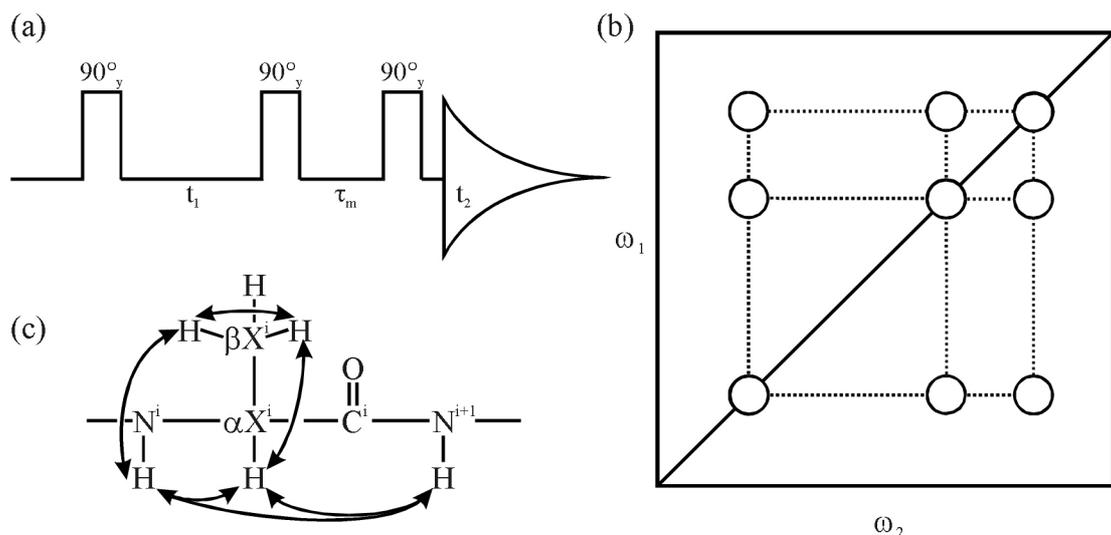
Protonen, die über zwei (geminal) oder drei (vicinal) Bindungen miteinander verknüpft sind, geben in Spektren des ¹H-¹H-COSY-Typs Anlaß zu Kreuzresonanzsignalen, die außerhalb der Diagonale liegen (Figur 1). Die Diagonale selbst bildet im Spektrum das eindimensionale NMR Experiment ab. Wie in Figur 1 am Beispiel des Alanins gezeigt, äußert sich jede

Aminosäure eines Proteins im COSY Spektrum durch ein charakteristisches Muster von Resonanzsignalen, das sogenannte Spinsystem. Eine Weiterentwicklung des COSYs stellt das sogenannte TOCSY-Spektrum dar, in dem alle Diagonalpeaks eines Spinsystems durch Kreuzresonanzsignale miteinander verbunden werden können.



Figur 1: Spinsysteme im COSY Spektrum. a, Pulsfolge des einfachen COSY Experiments. b, Schema des Magnetisierungstransfers im Protonennetzwerk der Aminosäure Alanin. c, Spinsystem von Alanin im zweidimensionalen ^1H - ^1H -COSY Spektrum. Die Resonanzen sind durch Kreise dargestellt.

Im Gegensatz zu Spektren des COSY-Typs bilden homonukleare ^1H - ^1H -NOESY Spektren die räumliche Verknüpfung zweier Protonen in Form von Kreuzresonanzsignalen (NOEs) ab. Kerne, deren Abstand kleiner als 6\AA voneinander ist, führen zu einem NOE außerhalb der Diagonale, dessen Integral mit der Distanz der Kerne korreliert werden kann (Figur 2).

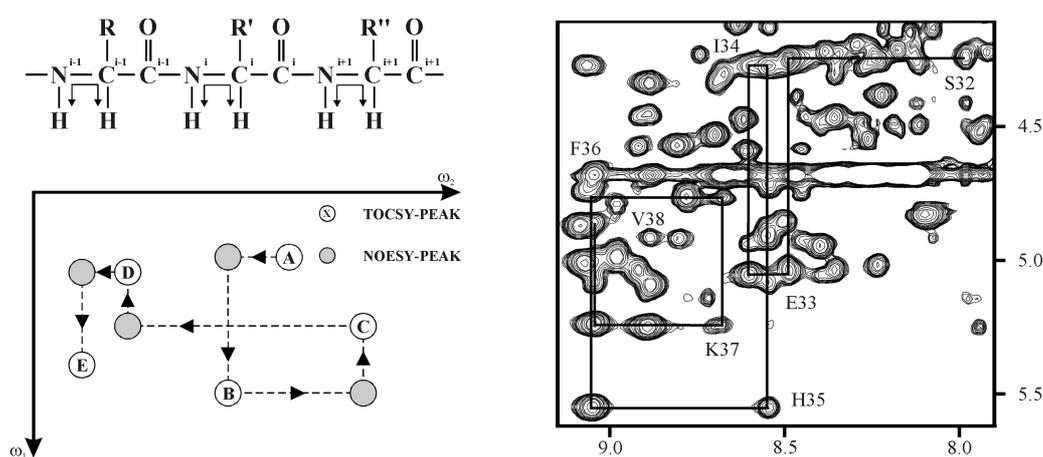


Figur 2: NOESY Spektrum. a, Pulsfolge für das NOESY-Experiment. b, Abstände von Protonen kleiner 6\AA in der Aminosäure Alanin. c, Resonanzen im NOESY-Spektrum von Alanin.

Die Kombination von COSY- und NOESY-Spektren ermöglicht es, jedes einzelne Proton eines Proteins genau einer Resonanzlinie zuzuordnen („Assignment“). In einem ersten Schritt werden COSY und NOESY Spektren überlagert, worauf mit der Zuordnung des Proteinrückrats begonnen werden kann („Chaintracing“).

3.1.2.2 Das Chaintracing

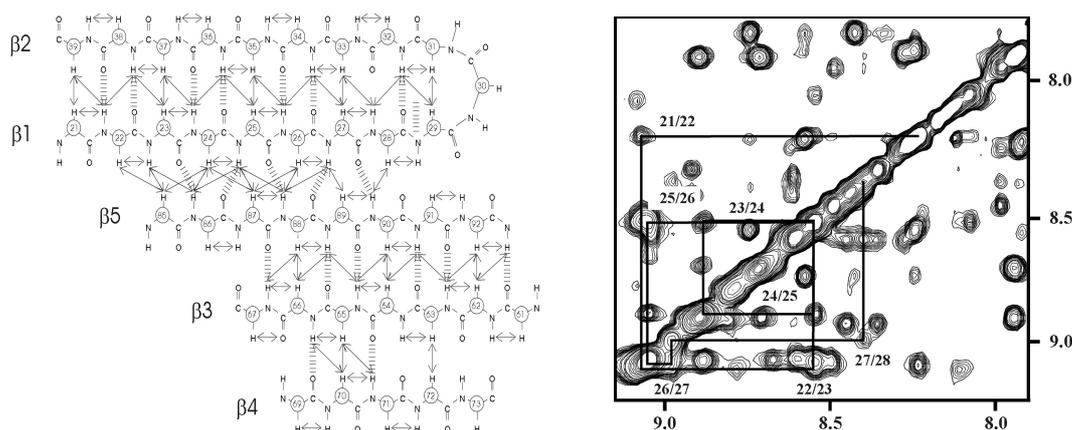
Figur 3a zeigt das Verfahren des „Chaintracing“. Ausgehend von einer $H\alpha$ -HN-Kreuzresonanz von Aminosäure A im COSY- oder TOCSY-Spektrum kann die entsprechende $H\alpha$ -HN-Resonanz der in der Kette folgenden Aminosäure B (Richtung C-Terminus) dadurch identifiziert werden, daß sie die chemische Verschiebung des $H\alpha$ -Protons von A ($H\alpha(i)$) und des HN-Protons von B ($HN(i+1)$) aufweisen muß. An der Kreuzungsstelle der beiden $H\alpha$ -HN-Resonanzen zweier benachbarter Aminosäuren im COSY Spektrum muß deshalb eine Kreuzresonanz im NOESY Spektrum zu finden sein. Das Chaintracing ist anhand eines realen Beispiels von SUMO-1 in Figur 3b dargestellt.



Figur 3: Das „Chaintracing“-Verfahren. 3a (links), Ausschnitt aus einer Peptidkette. Pfeile kennzeichnen die Kopplung von Protonen, die zu TOCSY-Resonanzen führen. Darunter ist schematisch der Ablauf des „Chaintracing“ mit überlagerten TOCSY- und NOESY-Spektren abgebildet. 3b (rechts), „Chaintracing“ am Beispiel der Aminosäuren Ser³² bis Val³⁸ im NOESY-Spektrum von SUMO-1.

3.1.2.3 Sekundärstrukturelemente

Neben den erwähnten NOESY-Kreuzresonanzen kommt es bei der Ausbildung von Sekundärstrukturen im Molekül zu zusätzlichen NOEs zwischen Resonanzen von Protonen des Proteinrückgrats. In Figur 4a ist das β -Faltblattemuster von SUMO-1 schematisch dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die kurze Distanz von $H\alpha$ - und HN- Kernen benachbarter β -Stränge. In Abbildung 4b ist das entsprechende Kreuzresonanzsignalmuster zwischen ausgewählten HN-Kernen im NOESY-Spektrum von SUMO zu sehen. Helizes hingegen äußern sich in NOESY-Spektren von Proteinen durch das Auftreten von NOEs zwischen $H\alpha(i)$ und $H\beta(i+3)$, $H\alpha(i)$ und $HN(i+3)$ sowie $H\alpha(i)$ und $HN(i+4)$.



Figur 4: Sekundärstrukturelemente. 4a (links), β -Faltblatt-Schema von SUMO-1. NOEs zwischen den Protonen im NOESY Spektrum sind durch Pfeile markiert, Wasserstoffbrücken durch gestrichelte Linien. 4b (rechts), NOEs zwischen HN-Protonen in β -Faltblätter am Beispiel von Aminosäure 21 bis 28 im NOESY-Spektrum von SUMO-1. Linien markieren das „Chaintracing“ innerhalb eines β -Faltblattstranges.

3.1.2.4 Die Chemische Verschiebung

Auch die Chemische Verschiebung kann zur Identifizierung von Sekundärstrukturelementen herangezogen werden. Durch Bildung von Helizes und β -Faltblattsträngen ändern sich die Resonanzfrequenzen der beteiligten Protonen. $H\alpha$ -Resonanzen von α -Helizes werden zu höherem Feld, solche in β -Faltblättern zu niederem Feld verschoben. Die Differenz zwischen dieser chemischen Verschiebung und der von $H\alpha$ -Resonanzen von identischen Protonen in unstrukturierten kurzen Peptiden dient als Maßzahl für das sogenannte Wishartverfahren. Dabei erhalten alle $H\alpha$ -Resonanzen mit Differenzen größer +0.1 ppm (parts per million, 1 ppm entspricht bei 500MHz einer Verschiebung von 500 Hz) den Index +1 und alle kleiner -0.1 ppm den Index -1. Die Darstellung des Wishartplots von SUMO in Abbildung 5b zeigt deutlich eine Häufung von +1 Indizes in β -Faltblättern und von -1 Indizes in α -Helizes.

3.1.2.5 Die skalare Kopplung

Eine besondere Variante des COSY-Experiments, das sogenannte Doppelquanten-gefilterte COSY (DQF-COSY) ermöglicht es, die Stärke der Kopplung (skalare oder J-Kopplung) zwischen dem $H\alpha$ - und dem HN-Protonen einer Aminosäure zu bestimmen (Rance et al, 1983). Ihre Stärke (in Hz) kann mit den dihedralen Winkel der Peptidbindung von Aminosäuren korreliert werden (Karplus, 1970). Bei hohen Konzentrationen (5-10mM) zeigte SUMO eine Tendenz zur Oligomerisierung. Die daraus resultierende Linienverbreiterung führte zu einer erhöhten apparenten Kopplungskonstante von 7-14 Hz. Die Umrechnung in den jeweiligen dihedralen Winkel wurde deshalb reskaliert, so daß Konstanten größer 11Hz Winkeln von $-120 \pm 40^\circ$ und Konstanten kleiner 9.5Hz Winkeln von $-60^\circ \pm 20^\circ$ entsprachen. Tabelle 1 zeigt die aus DQF-COSY-Spektren von SUMO erhaltenen skalaren Kopplungskonstanten.

3.1.2.6 D₂O Spektren

Sekundärstrukturelemente in Proteinen zeichnen sich durch ihren reichen Anteil an Wasserstoffbrück zwischen Atomen des Proteinerückgrats aus. Die darin involvierten HN-Protonen sind gegenüber ungebundenen Kernen durch einen langsameren Austausch mit dem wässrigen Lösungsmittel gekennzeichnet. Diese Eigenschaft nutzt man aus, um Wasserstoffbrücken in Proteinen mit Hilfe der NMR zu identifizieren.

Table 1: Liste einiger $^3J_{H\alpha-HN}$ Kopplungskonstanten in Hz. Die Kopplungskonstanten wurden aus DQF-COSY-Spektren von SUMO durch Fitten der Resonanzlinien mit Hilfe des Ndee Simplex-Algorithmus gewonnen.

Y23	12.9	T44	10.9	D75	12.6
K25	13.5	L46	9.7	N76	11.2
L26	14.2	K47	9.3	K80	9.1
V28	11.1	L49	10.8	E81	9.9
I29	11.4	Q55	9.4	M84	8.4
Q31	8.9	V59	9.5	E85	9.9
D32	10.4	S63	11.1	E86	11.3
S34	9.4	L64	9.6	E87	11.3
E35	11.4	R65	11.1	D88	11.9
I36	12.9	F66	13.2	V89	14.5
H37	12.9	L67	13.9	E91	13.9
K39	12.5	F68	13.4	Y93	12.1
V40	12.1	E69	8.9	Q94	10.4
K41	12.5	Q71	9.5	E95	11.4
M42	10.3	I73	13.5	Q96	13.0
T43	12.7	A74	10.9	T97	12.3

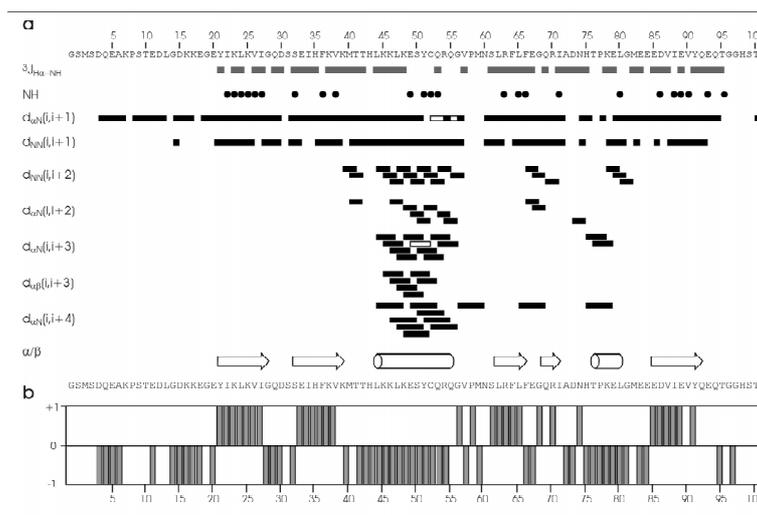
Die Proteine werden nach vorangegangener Lyophilisation in „100%“ D₂O gelöst. HN-Protonen, die nach mehreren Stunden noch NMR Signale liefern, können als Wasserstoffbrücken-Donatoren angesehen werden. Darüberhinaus lassen sich manche aliphatische H α -Protonen nur in D₂O- NOESY und -TOCSY Spektren beobachten, da sie hier nicht mehr durch die Resonanzlinie des nahen Lösungsmittelsignals überdeckt werden. H α -H α -NOEs sind besonders kennzeichnend für β -Faltblattstränge.

3.1.2.7 Empirische Daten

Ausgewählte gemessenen Distanzen und Winkel werden häufig in den am Beispiel von SUMO-1 in Figur 5 gezeigten Diagrammen dargestellt. Deutlich in Erscheinung treten dabei die charakteristischen NOEs im Bereich der α -Helizes und die langsam austauschenden HN-Protonen in β -Faltblattregionen. Neben den für die Sekundärstruktur typischen NOEs lassen sich weitere NOEs von Resonanzen der Rückgrat- und der Seitenkettenprotonen für Abstandsangaben gewinnen.

3.1.2.8 Die Berechnung der Struktur von SUMO-1

Grundlage für die Strukturberechnung ist ein geeignetes Computerprogramm, daß die gesammelten Daten mit Hilfe der bekannten Peptidsequenz in ein Tertiärstrukturmodell umwandeln kann. Im Falle aller Strukturen dieser Arbeit wurde das von Axel Brünger (Brünger, A.T., 1993, 1996) erstellte Programm X-PLOR verwendet (Vers. 3.1 und 3.845). X-PLOR besitzt Parameterdateien und Topologiedateien, die Referenzwerte über Bindungslängen und Bindungswinkel in Peptiden enthalten sowie Informationen über Masse und Ladungen der Atome. Abweichungen von diesen Referenzwerten werden während des



Figur 5: Daten aus NMR Experimenten. a, „NOE-Diagramm“. Eindeutig bestimmte NOEs zwischen zwei Protonen sind in Form von schwarzen Balken dargestellt, weiße Rechtecke kennzeichnen NOEs, deren Bestimmung nicht eindeutig ist. HN-Protonen, die in D_2O nach sechs Stunden nicht vollständig gegen Deuteronen ausgetauscht wurden sind durch schwarze Kreise markiert. Graue Balken geben wieder an welcher Stelle in der Proteinsequenz $J_{H\alpha-HN}$ -Kopplungskonstanten meßbar waren.

Rechenvorgangs mit einer „Energie bestraft“. Dabei werden die einzelnen Bindungs- und Winkelabweichungen in Form harmonische Terme beschrieben, deren Summe das sogenannte Kraftfeld(Potentialfunktion) darstellt. Ziel der Strukturberechnung ist die Minimierung dieser Energiefunktion (Targetfunktion). X-PLOR verwendet das bekannte Kraftfeld „Charmm“ (Abbildung 6a). Auch die experimentell bestimmten Abstände und Winkel werden durch je einen harmonischen Term ins Feld eingefügt (Figur 6b).

$$E(R) = \sum_{\text{Bindung}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{Bindungswinkel}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{Dihedral\&Improper Winkel}} K_\phi \left[1 + \cos(n\phi - \delta) \right] + \sum_{\text{Paare (i,j)}} \left[\frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \right]$$

$$E_{\text{NOE}}(R) = \sum_{\text{Paare (i,j)}} K_{\text{NOE}} (r_{ij} - r_{ij}^0)^2$$

Figur 6: Das Charmm-Kraftfeld. a (links), Die Potentialfunktion ist in Form harmonischer Terme angegeben. Die einzelnen Buchstaben bedeuten: K_x , jeweiligen Kraftkonstante; b , aktuelle Bindungslänge; θ , aktueller Bindungswinkel; ϕ , aktueller dihedraler Winkel oder Improperwinkel; r_{ij} , aktueller Abstand der Kerne i und j voneinander; b_0 , θ_0 , r_{ij}^0 , die jeweiligen Referenzwerte; A, B , Lennard-Jones-Terme; q_x , Ladung des Kerns x ; D , modifizierte Dielektrizitätskonstante. b (rechts), Der harmonische Potentialterm für die NOE-Einbindung.

Zwei unterschiedliche Strategien haben sich für die Strukturberechnung mit X-PLOR etabliert. Die Distanzgeometrie (Grippen und Harvel, 1988) stellt ein mathematisches Verfahren dar, das bekannte Atomabstände in Form einer Distanzmatrix zusammenfaßt. Nach Metrisierung und anschließender Diagonalisierung lassen sich Eigenwerte und Eigenvektoren gewinnen, aus denen sich schließlich die Koordinaten ableiten.

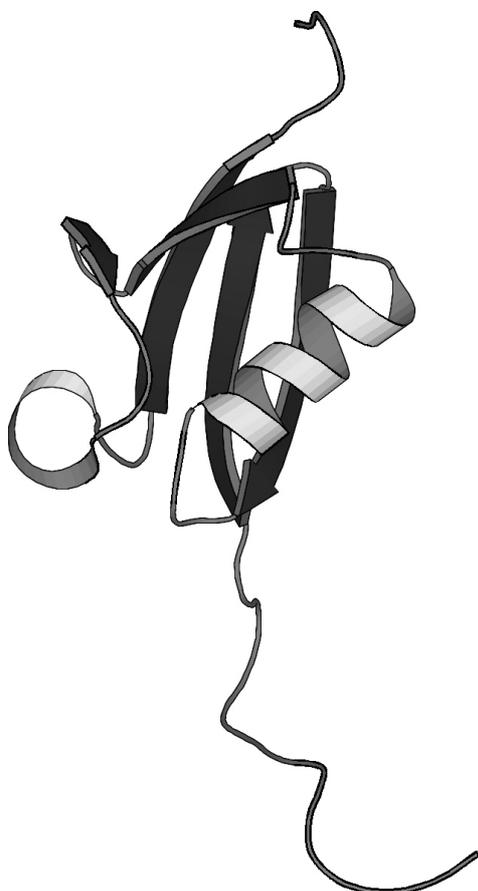
Eine Alternativmethode ist das sogenannte „Simulated Annealing“ oder SA-Verfahren. Beim SA werden den Atomen des Peptids im Computer hohe Startgeschwindigkeiten gemäß einer Maxwell-Verteilung zugeschrieben, was einer fiktiven hohen Temperatur gleichgesetzt werden kann. Während einer langsamen „Abkühlungsphase“, gefolgt von stufenweisen Energieminimierungsschritten, nehmen die Atome zueinander Positionen ein, die mit der Erfüllung der Daten und der chemischen Referenzwerte einhergehen.

Sowohl im Distanzgeometrie- als auch im SA-Verfahren werden Moleküldynamik-Schritte eingebaut. Dabei basiert die Berechnung der jeweiligen Atomkoordinaten und deren zeitliche Änderung auf der Lösung der Newton'schen Bewegungsgleichungen, die eine Simulation der Atombewegungen im Femto- oder Pikosekundenbereich zulassen.

Distanzgeometrie und Simulated-Annealing führen zu einer Schar von Strukturen, deren Konvergenz von der Zahl und Güte der experimentellen Daten abhängt. Im Falle von SUMO wurden 1192 Abstände für die spätere Strukturberechnung herangezogen. Zusätzlich konnten 48 Winkelinformationen verwendet und 23 Wasserstoffbrücken identifiziert werden.

3.1.3 Die Struktur von SUMO

Die Strukturrechnungen ergaben, daß SUMO-1 aus einem 5-strängigen β -Faltblatt und zwei α -Helizes besteht und aufgrund der Strukturhomologie in die Familie der Ubiquitin-



„Superfolds“ eingeordnet werden muß (Orengo et al., 1994). Zu der Familie der Ubiquitinähnlichen zählen Mitglieder, die sich trotz geringer Sequenzhomologie durch eine ähnliche Tertiärstruktur auszeichnen, wie die B1/B2 Domäne des Proteins G aus *Streptococcus* (Achari et al., 1992; Galagher et al., 1994), [2F-2S]-Ferrodoxin (Tsukihara et al., 1990) und einige Ras-bindende Domänen wie z.B. Rlf (Esser et al., 1998). Die Sekundärstrukturelemente in SUMO-1 sind nach einem $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Muster angeordnet (Figur 7). $\beta 1$ und $\beta 5$ liegen dabei parallel zueinander. Die Helixachse von $\alpha 1$ (Leu⁴⁴ bis Gln⁵⁵) ist um etwa 45° (im Uhrzeigersinn) relativ zum ersten β -Faltblatt ($\beta 1$ - $\beta 2$) geneigt. Die erste α -Helix in SUMO ist wie in Ubiquitin amphipatisch und bildet mit hydrophoben Aminosäuren der Faltblattstränge den hydrophoben Kern des Proteins. Beteiligt sind dabei vorwiegend die Seitenketten von Leu²⁴, Ile³⁴, Phe³⁶, Phe⁶⁴, Phe⁶⁶ und Ile⁸⁸ aus den Faltblättern und Leu⁴⁴, Leu⁴⁷, Lys⁴⁸, Tyr⁵¹, Gln⁵³ und Gln⁵⁵ aus der Helix $\alpha 1$. Die zweite kleine Helix in SUMO besteht lediglich aus fünf Aminosäuren.

Figur 7: Molscript Darstellung der dreidimensionalen Struktur von SUMO-1

Auffallend an der Struktur des Proteins ist der flexible N-Terminus von 20 Aminosäuren, der in anderen Ubiquitinähnlichen Molekülen fehlt. Er ist möglicherweise für die spezifische Funktion von SUMO verantwortlich und könnte eine Rolle bei der Protein-Protein Interaktion spielen. Die beiden konservierten Glyzine (Gly 96 und Gly97), die für die Konjugation an Zielproteine notwendig sind, sind in SUMO wie in Ubiquitin im flexiblen C-Terminus lokalisiert. Dagegen ist die für die Polymerisation von Ubiquitin wichtige Aminosäure Lys⁴⁸ an identischer Position in der Tertiärstruktur von SUMO durch Gln⁶⁹ ersetzt.

3.1.4 Aussagen über die biologische Funktion von SUMO

Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von SUMO-1 läßt mehrere Schlußfolgerungen zu. Die Konservierung der beiden Glyzine am flexiblen C-Terminus des Proteins läßt auf einen ähnlichen Konjugationsmechanismus schließen, wie er im Ubiquitinsystem genutzt wird. Die hinzukommende Konservierung des gesamten Faltungstypus weist auch auf eine strukturelle Ähnlichkeit des zur Konjugation notwendigen Enzymapparats mit demjenigen der Ubiquitinkonjugierenden Enzyme hin. Der Austausch von Lys⁴⁸ zu Gln⁶⁹ verhindert eine „Polysumotylierung“, die für den Kerntransport nicht notwendig ist, ihn vermutlich sogar behindern würde. Aufgrund der nun vorliegenden atomaren Details können gezielte Mutationsstudien an SUMO neue Einsichten in den Transportmechanismus geben. So sollte sich z.B. durch die Deletion der 20 N-Terminalen Aminosäuren die Aufgabe des unstrukturierten Teils von SUMO in zellbiologischen Versuchen besser charakterisieren lassen.

Durch den Strukturvergleich von SUMO und Ubiquitin kann ein Einblick in die Strategie der Evolution gewonnen werden, ein einmal erfolgreiches System durch geringfügige Abwandlungen in atomaren Details für neue Aufgaben zu nutzen.

3.2 **Proteine mit repetitiven Sequenzen: Der Tumorsuppressor APC**

Hirschl, D., Bayer, P., and Müller, O. (1996): Secondary structure of an armadillo single repeat from the APC protein. *FEBS Lett.*, **383**, 31-36.

3.2.1 Die Armadillo-Domäne

Die Armadillo-Domäne besteht aus 7 bis 12 Kopien eines sich wiederholendem Sequenzmotivs von 42 Aminosäuren und wurde erstmals in einem für die Embryonalentwicklung notwendigem Genprodukt, genannt *Armadillo*, in *Drosophila Melanogaster* gefunden (Riggelman et al., 1989). Mittlerweile kennt man mehrere Proteine unterschiedlicher Funktion, in deren Sequenz das Armadillo-Motiv (Figur 8) vorhanden ist (Peifer et al., 1994). Dazu gehören die an α -Catenin oder Cadherin bindenden Zelladhäsionsproteine β -Catenin und Plakoglobin, der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor smgGDS, das Signalerkennungsprotein SRP1, p120 und das Tumorsuppressor Genprodukt APC (Adenomatous Polyposis Coli).

a.
LMKLSFDDEE**RHA**-MNE**L****GGL**-**QAIAELL**QVDCEMYGLTNDHYSI-9AS
LTNLTFGDVANK**ATLCS**M**KGCM**R**ALVA**QL**KSESE**-DLQ**QVIAS**-V
LRNLSWRADVNSK**KT**L**RE**VGS**VKAL**ME**CALEV**K**KE**ST**LKSVLS**-A
LWNLSA**HCTEN**K**ADIC**AVD**GALAF**L**VGTL**TYRSQ**TNTLAI**IESGG-2AS
LRNVS**SLIAT**NEDHRQILREN-N**CLQ**T**LLQHL**K**SHSL**TIV--**SNA**-3AS
LWNLSA**RNP**PKD**QEAL**WDMAGV-S**MLK**N**L**I**HS**-**KHK**M**I**AMGSAA-A
LRNLM**ANR**PAKYKDANIMSPG-**SSL**P**SLHVR**-**KQK**A**LEA**ELDA-Q

b.
LRNLSA+*****N**+**A*******MGG***-**AL******LL******K**+***LL*******S**-A

c.
L+NLS+*****N**+***ALL******GGL**-**PALV**+**LL*****S**+***E******L******-AA***-A

A	II	I	I
	VV	V	V

Figur 8: a, Die sieben sich wiederholenden Sequenzen des Armadillo-Motivs aus APC. Fettgedruckt sind identisch positionierte Aminosäuren. b, Konsensussequenz des Armadillo-Motivs aus APC und c, aus allen bekannten Armadillo-Proteinen (Peifer et al., 1994).

3.2.2 β -Catenin und APC

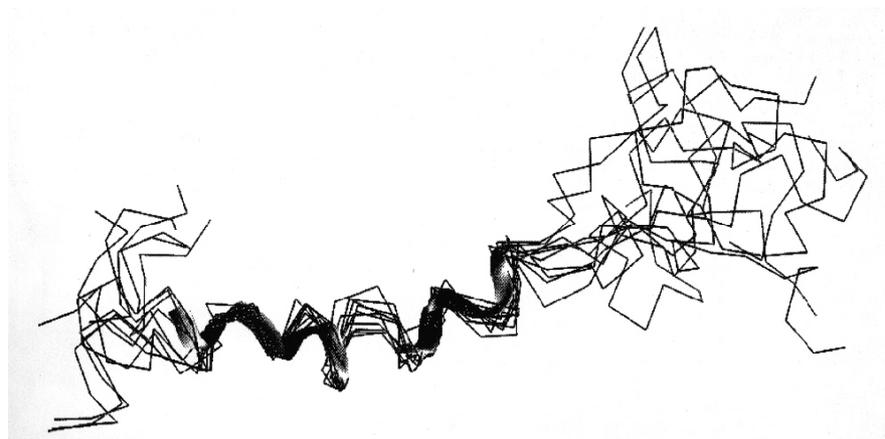
Der Cadherin-Catenin-Komplex ist ein Zielprodukt verschiedener regulatorischer Signale, die die Zelladhäsion und Zellmobilität regeln. In Säugerzellen interagiert β -Catenin mit dem Tumorsuppressor Genprodukt APC (Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993). Mutationen in APC sind mit vererbarem und sporadischen Darmkrebs assoziiert (Kinzler und Vogelstein, 1996). Zellen, in denen das APC Protein fehlt oder in denen seine β -Cateninbindungsstelle mutiert ist, zeigen ein erhöhtes β -Catenin-Vorkommen, eine Erhöhung der Transkriptionsaktivierung mittels Bildung eines β -Catenin-Tcf-Komplexes (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1997) und eine damit verbundene onkogene Transformation der Zelle. APC selbst scheint an der Zellmigration (Näthke et al., 1996) und an der Zelladhäsion (Barth et al., 1997) beteiligt zu sein.

3.2.3 Die Strategie zur Strukturaufklärung des Armadillo-Motivs

Das Vorkommen des Armadillomotivs in Proteinen mit unterschiedlichen Aufgaben legte die Vermutung auf eine strukturelle Ähnlichkeit dieser Domänen nahe. Das hohe Molekulargewicht selbst des kleinsten sieben Kopien Motivs (>30kDa) lag jenseits der mit herkömmlichen NMR Methoden routinemäßig aufklärbaren Größe. Jedoch bot das sich wiederholende Sequenzmotiv die Möglichkeit, einen einzelnen Repeat auf atomarer Ebene zu untersuchen und gegebenenfalls Schlüsse auf die Struktur der gesamten Domäne ableiten zu können. Dazu wurde der sechste Repeat aus APC als 42 Aminosäure langes Peptid chemisch synthetisiert (Knut Adermann, IPF, Hannover) und einer NMR-Strukturaufklärung unterworfen (Hirschl et al., 1996).

3.2.4 Die Struktur des einfachen Repeats aus APC

Aufgrund der geringen Größe des Peptids waren zweidimensionale homonukleare $^1\text{H-NMR}$ Techniken in H_2O und D_2O zur Strukturaufklärung ausreichend. 189 NOEs konnten zur Beschreibung und Berechnung der Sekundärstruktur herangezogen werden. Die geringe Dispersion der HN Resonanzen zwischen 7.85ppm und 8.65ppm wiesen auf hohen Anteil an „random-coil“ hin. Das Armadillo-Peptid besitzt zwei kurze α -Helizes von Aminosäure Asn⁸ bis Trp¹⁶ und Ala²⁰ bis Asn²⁶, deren Rückgrat-RMSD-Werte bei 1.13 Å bzw. 1.35 Å liegen (Figur 9). Die beiden Helizes werden von drei Aminosäuren unterbrochen. Der N-terminale Teil des Peptids ist ungeordnet.



Figur 9: Die Struktur des sechsten Armadillo-„Repeats“ aus dem APC-Protein. Dargestellt sind zehn überlagerte X-PLOR Strukturen (Drahtmodelle). Die helikalen Bereiche von Aminosäure Asn⁸ bis Trp¹⁶ und Ala²⁰ bis Asn²⁶ sind als Bandmodell abgebildet.



Auch der C-Terminus des Armadillo-Armes liegt nach den X-PLOR-Berechnungen unter den gegebenen Lösungsmittelbedingungen ungeordnet vor, weist aber zwei helixtypische $\alpha\beta_{i,i+3}$ NOEs von Aminosäure Ser³⁰ bis Lys³³ und Met³⁷ bis Ala⁴⁰ auf. Diese einzelnen NOEs deuteten auf die mögliche Ausbildung eines weiteren Sekundärstrukturelements unter Anwesenheit der restlichen sechs Armadillo-Sequenzen hin und damit auf ein neues Strukturmotiv.

Figur 10: Struktur der Armadillo-Domäne aus β -Catenin (2.1Å). Helizes sind als Zylinder dargestellt. Die gesamte Domäne setzt sich aus zwölf einzelnen Repeats zusammen.

3.2.5 Nachfolgende Strukturuntersuchungen

Eine Bestätigung der Sekundärstruktur des einfachen Repeats und der Ausbildung einer weiteren Helix an seinem C-Terminus erbrachte schließlich die röntgenkristallographische Aufklärung der Armadillo-Domäne (Figur 10) aus β -Catenin (Huber et al., 1997). Die zwölf einzelnen sich wiederholenden Sequenzen bilden je drei Helizes, die zu einer Superhelix aufgerollt sind und eine stark positiv geladene „Grube“ erzeugen. Die β -Catenin-Bindungsregionen von Cadherinen, Tcfs und dem APC-Protein sind negativ geladen. Das legt den Schluß nahe, daß diese positive Grube die eigentliche Bindungstasche von β -Catenin darstellt.

3.3 **Proteine mit amyloidalen Peptidsequenzen: Das β -Amyloid A4 und die Tachykinin-Rezeptorbindung**

Sticht, H., Bayer, P., Willbold, D., Dames, S., Hilbich, C., Beyreuther, K., Frank, R., and Rösch, P. (1995): Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 293-298.

3.3.1 Das β -Amyloid A4 Peptid

Das Amyloid A4 Vorläufer Protein ist ein membranständiges Glykoprotein, welches in mehreren Isoformen in Neuronen gebildet wird und eine Konsensusregion von 694 Aminosäuren aufweist. Durch proteolytische Spaltung entsteht das β -amyloid (β A; β A4) Peptid (39 bis 43 Aminosäuren), das als Ablagerung in Form von neuritischen Plaques als pathologisches Charakteristikum der Alzheimer Krankheit angesehen wird (Kang et al., 1987). Neuere Erkenntnisse weisen auch auf eine Beteiligung des Caspase-Systems bei der Spaltung des APP während der Apoptosis hin (Gervais et al., 1999). Isolierte oder chemisch synthetisierte Amyloidpeptide aggregieren in wässriger Systemen zu Fibrillen, ähnlich denen, die auch im Gehirn von Alzheimerpatienten *post mortem* gefunden werden. Neben diesen neurotoxischen Befunden scheint das β -Amyloid auch neurotrophe Aufgaben im Gehirn durch Bindung an Tachykinin-Rezeptoren zu vermitteln (Yanker et al., 1990; Shimohigashi et al., 1993).

3.3.2 Vorangegangene strukturelle Untersuchungen an β -A4 Amyloid Fragmenten

Die Struktur von Amyloidfragmenten hängt stark von den Lösungsmittelbedingungen ab. Als Mechanismus der Fibrillenbildung wird eine Umwandlung von α -Helix zu β -Faltblatt und eine daran anschließende Aggregation angenommen (Barrow et al., 1992; Fraser et al., 1991) Unterstützt wird diese These durch zwei Beobachtungen: Mit Hilfe der Circular dichroismus (CD) Spektroskopie konnten Übergänge von Amyloidfragmenten (25-35 und 11-25) von random-coil zu β -Faltblatt (Terzi et al., 1994) und von α -Helix zu β -Faltblatt (Holloosi et al., 1989) beobachtet werden. Eine mehr detailliertere Studie über die Struktur des β -Amyloids (1-28) konnte mit Hilfe der Kernspinresonanz-Technik in einem 2,2,2-Trifluorethanol/Wasser (60/40) Gemisch durchgeführt werden (Zagorski and Barrow, 1992). Dabei wurden eine

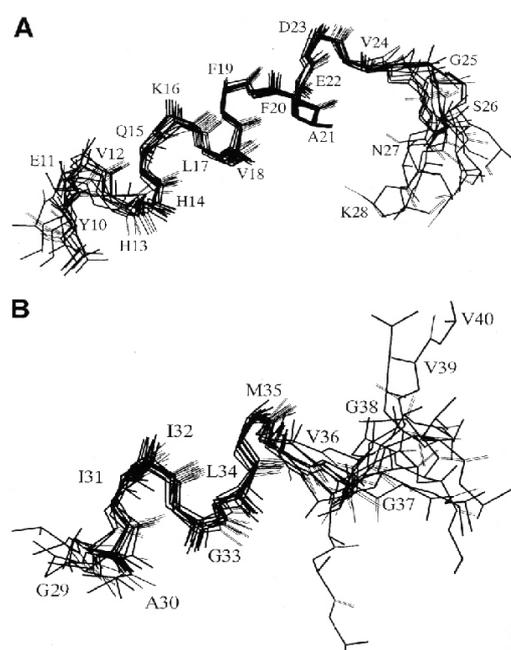
schwache α -Helix von Ala² bis His⁶ und eine stark ausgeprägte Helix von Tyr¹⁰/Gln¹¹ bis Ser²⁶ festgestellt.

3.3.3 Strategie zu Strukturuntersuchungen am β -Amyloid(1-40)

Um mehr Einsicht in die Entstehung von Fibrillen und die Lokalisation von Sekundärstrukturelementen zu erhalten, wurde das medizinisch interessante β -Amyloid(1-40) chemisch synthetisiert und mit Hilfe von CD- und NMR- Spektroskopie strukturell charakterisiert (Sticht et al., 1995). Die starke Tendenz des Amyloids zur Aggregation in wässrigen Systemen führte zur Suche nach geeigneten Solvatationsbedingungen. Wie festgestellt wurde, verlangsamten saure Pufferbedingungen (pH 2-3) zwar die Aggregation, eine langfristige NMR-technische Untersuchung im Bereich von mehreren Stunden wurde jedoch durch die einsetzende Oligomerisierung verhindert. Nach Studien in DMSO und Methanol (Daten nicht publiziert), wurde auf ein bereits erfolgreich eingesetztes 2,2,2-Trifluorethanol/Wasser (40/60) Gemisch zurückgegriffen (Sticht et al., 1994). Trifluorethanol ist als sekundärstruktur-induzierendes (schwach Helix-stabilisierendes) Lösungsmittel bekannt (Goodman, 1974; Thomas und Dill, 1993; Sönnichsen et al., 1994;) hat aber die Eigenschaft hydrophobe Wechselwirkungen zu schwächen und damit die Tertiärstruktur von Peptiden und Proteinen zu zerstören (z.B. Sticht et al., 1994). Durch die Wirkungsweise von TFE sollten Bereiche definiert und eingeschränkt werden, die im Peptid zur Ausprägung von Sekundärstrukturelementen in der Lage sind.

3.3.4 Die Struktur des β -Amyloids in 2,2,2-Trifluorethanol/Wasser (40/60, v/v)

Wegen des geringen Molekulargewichts des β -Amyloid(1-40)-Peptids waren zwei-dimensionale homonukleare ¹H-NMR Experimente (NOESY, DQF-COSY, TOCSY) für die Strukturauflösung ausreichend. Insgesamt wurden 596 NOEs zur Kalkulation der Sekundärstruktur herangezogen. Das Amyloidpeptid besitzt unter den gegebenen Bedingungen zwei ausgeprägte



Helizes (Figur 11). Die erste Helix von Gln¹⁵ bis Asp²³ bestätigte die Befunde von Zagorski und Barrow, jedoch konnte die schwache N-terminale Helix von Ala² bis His⁶ nicht gefunden werden. Ein mögliche Erklärung für den Verlust der N-terminalen Helix und der Verkürzung der nachfolgenden Helix liefert der um 20% geringere Anteil von TFE (40% statt 60%) im vorliegenden Gemisch. Zusätzlich zu der Helix von Gln¹⁵ bis Asp²³ konnte im β A(1-40) noch eine kürzere α -Helix von Aminosäure Ile³¹-Met³⁵ identifiziert werden.

Figur 11: Die Helizes des β -Amyloids. Zehn überlagerte Strukturen der a, ersten Helix von Gln¹⁵ bis Asp²³ und b, der zweiten Helix mit der Tachykinin-Region von Ile³¹ bis Met³⁵.

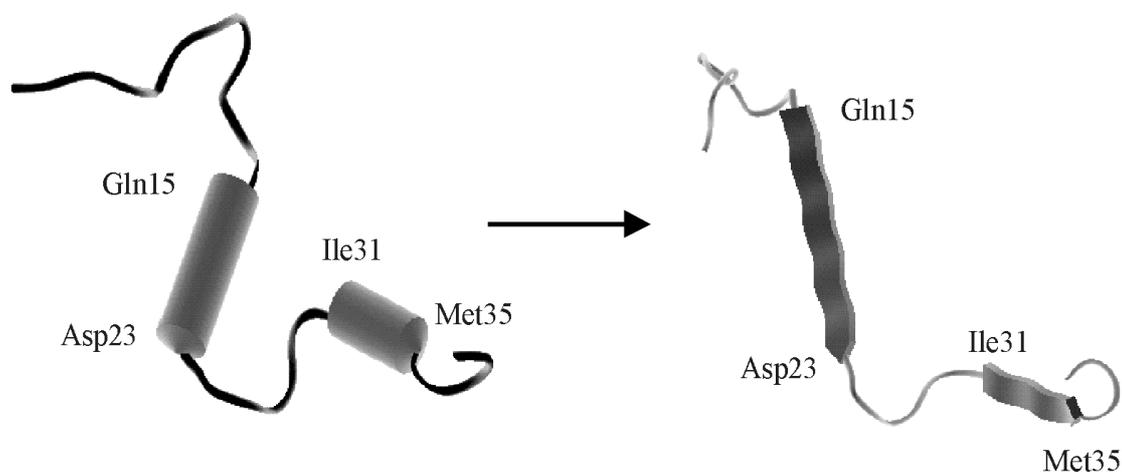
Erstaunlicherweise korreliert dieser Bereich der zweiten Helix mit dem Bereich der Tachykinin-Bindungsregion und weist eine hohe Homologie zu Tachykinin Neuropeptiden auf (Tabelle 2). Die in TFE als α -Helix vorliegende Region ist die für die Rezeptorbindung notwendige Konsensussequenz von Tachykininen.

Tabelle 2: Sequenzvergleich von Tachykininen und β A(25-35). „*“ bedeutet, daß keine erkennbare Homologie existiert und „X“ weist auf den konservierten hydrophober Charakter der Aminosäure hin.

A β (25-35)	-G-S-N-K-G-A-I-I-G-L-M-
Substance P	R-P-K-P-Q-Q-F-F-G-L-M-NH ₂
Neurokinin A	H-K-T-D-S-F-V-G-L-M-NH ₂
Neurokinin B	D-M-H-D-F-F-V-G-L-M-NH ₂
Pysalaemin	pE-A-D-P-N-K-F-I-G-L-M-NH ₂
Eledoisin	pE-P-S-K-D-A-F-I-G-L-M-NH ₂
Konsensus	*-*-*-*-*-*-*X-X-G-L-M

3.3.5 Nachfolgende Arbeiten an der Struktur des β -Amyloids

Die zum erstenmal entdeckte Helix von Ile³¹-Met³⁵ konnte durch zeitlich folgende unabhängige Arbeiten bestätigt werden (El-Agnaf et al., 1998). Weitergehende Untersuchungen basierend auf diesen Befunden konnten belegen, daß Amyloidpeptide (25-35) in Acetonitril/Wasser mit steigendem organischem Lösungsmittelanteil ausgeprägte β -Faltblattanteile zeigen (El-Agnaf et al., 1998). Und schließlich wurde für das Peptid A β [Phe³¹,Nle³⁵](25-35)amid in TFE/Wasser mit steigendem TFE-Gehalt ein Übergang von β -Faltblatt in α -Helix nachgewiesen. Diese Daten untermauern die Hypothese eines α -Helix- β -Faltblatt-Übergangs im β -Amyloid (Figur 12) bei der Entstehung der neuritischen Plaques in Alzheimerpatienten.



Figur 12: Hypothetisches Modell des α -Helix- β -Faltblatt-Übergangs im β A(1-40).

Röntgenstrukturdaten an einzelnen Amyloidfibrillen weisen darauf hin, daß 24 β -Faltblätter notwendig sind um ein Helixwindung um die Fibrillenachse zu vollziehen (Sunde et al., 1997). Das momentane Modell der Fibrillenbildung geht von 48 Amyloid-Monomeren aus, in denen die Aminosäuren 17-21 und 31-36 den hydrophoben Kernbereich der Fibrillen bilden.

3.4 Proteine mit Bindungsdomänen: Effektoren von „Molekularen Schaltern“

Esser, D., Bauer, B. Wittinghofer, W., Cool, R.H., and Bayer, P. (1998): Structure determination of the Ras-binding domain of the Ral-specific guanine exchange factor Rlf. *Biochemistry*, **37**, 13453-13462.

3.4.1 Kleine GTPasen

Kleine GTP-bindende Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion (Ras, Rac, Rho, Cdc42, Ral, usw.) und bei wesentlichen Transportvorgängen in der Zelle, wie dem Kernimport und -export (Ran) (Drivas et al., 1990; Ren et al., 1993; Moore and Blobel, 1993; Melchior, et al., 1993) und dem vesikulären Transport (Rab) (Haubruck et al., 1987; Touchot et al., 1987; Tachibana et al., 1987; Pluntner et al., 1991). Sie steuern und regulieren verschiedenste zelluläre Funktionen, wobei sie in einer (in der Regel) aktiven GTP- (Guaninnukleotid-Triphosphat) und einer inaktiven GDP- (Guaninnukleotid-Diphosphat) gebundenen Form vorliegen können. In ihrer GTP-gebundenen Form sind sie in der Lage Effektoren zu aktivieren, die wiederum nachfolgende Prozesse in Gang setzen können (Bourne et al., 1990). Das „Umschalten“ von der aktiven in die inaktive Konformation („Molekularer Schalter“) wird durch Proteine reguliert (Boguski et al., 1993), die entweder die schwache intrinsische GTP-Hydrolyse stimulieren (GAP = GTPase activating protein) oder die langsame intrinsische GDP-Dissoziationsrate beschleunigen (GEF = Guanine nucleotide exchange factor).

3.4.2 Die GTPasen Ras und Ral

Forschungsarbeiten der letzten Jahre belegen, daß die Signaltransduktion nicht nur in linearen Prozessen abläuft. Kleine GTPasen wie Ras und Ral (Chardin et al., 1986) können mit vielen Effektormolekülen interagieren und wiederum zur Aktivierung oder Hemmung anderer paralleler Signalketten beitragen. Ras wechselwirkt unter anderem mit der Ser/Thr-Kinase c-Raf-1 (Dickson et al., 1992) als auch mit Ral-spezifischen Austauschfaktoren (GEFs) wie RalGDS (Albright et al., 1993), Rgl (Kikuchi et al., 1994) und Rlf (Wolthuis et al., 1996).

3.4.3 Der Austauschfaktor Rlf

Der Ral-spezifische Guaninnukleotid-Austauschfaktor Rlf (RalGDS like factor) steuert einen Ras-abhängigen parallel zu der Raf/Mek/Erk-Kinase-Kaskade verlaufenden Signalweg, ähnlich wie RalGDS und Rgl. Als mögliches Effektormolekül dient vermutlich Rlip (auch

RalBP-1 oder RIP), daß mit der GTP-gebundenen Form von Ral wechselwirkt (Jullien-Floris et al., 1995; Park et al., 1995; Cantor et al., 1995). Rlip besitzt eine RhoGAP-Domäne die mit Rac oder Cdc42 interagieren kann.

3.4.4 Vorarbeiten

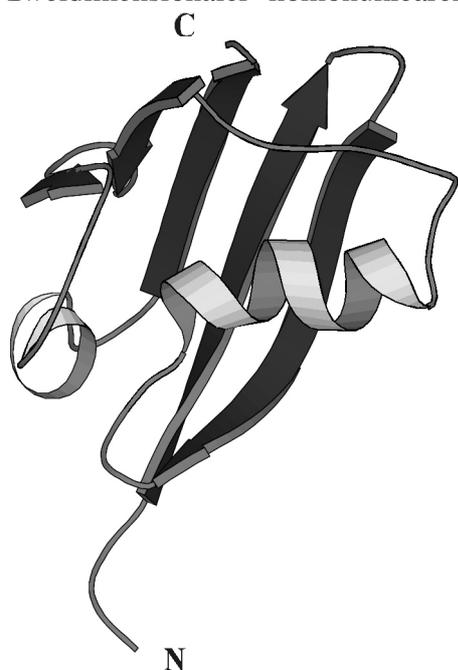
Die dreidimensionale Struktur der Ras-bindenden Domäne (RBD) von c-Raf-1 (Emmerson et al., 1995) und die seines Komplexes mit einer Rap1A-Mutante (Nassar et al., 1995; Nassar et al., 1996) lagen bereits vor. Ebenso konnte die Tertiärstruktur der RBD des Ral-spezifischen Austauschfaktors RalGDS parallel zu der vorliegenden Arbeit an Rlf mit Hilfe der Kernspinresonanz aufgeklärt werden (Geyer et al., 1997).

3.4.5 Strategie zur Strukturuntersuchung von Rlf

Das 778 Aminosäuren große Rlf konnte wegen des hohen Molekulargewichts nicht auf atomarer Ebene mit Hilfe der NMR untersucht werden. Aufgrund der Homologien zu anderen Ras-interagierenden Proteinen wurde eine 90 Aminosäuren große Ras-bindende Domäne (Rlf-RBD) kloniert (Esser et al., 1998) und als GST-Fusionsprotein in E.coli expremiert. Durch eine anschließende Thrombinspaltung wurde die Bindungsdomäne als freies Protein gewonnen. Die kompakte Faltung der Domäne zeigte sich bereits in ersten 1D-Spektren, so daß eine Strukturuntersuchung mit Hilfe der mehrdimensionaler Kernspinresonanz folgen konnte.

3.4.6 Die dreidimensionale Struktur von Rlf

Die Struktur der Ras-bindenden Domäne von Rlf (Aminosäuren 646 bis 735) wurde mit Hilfe zweidimensionaler homonuklearer ^1H -NMR Techniken (TOCSY, NOESY, DQF-COSY) sowie mit zwei- (HSQC, HMQC) und dreidimensionalen (HMQC-TOCSY, NOESY-HMQC) heteronuklearen ^1H - ^{15}N -Experimenten aufgeklärt. Durch die Verwendung von heteronuklearen Experimenten konnten überlappende Resonanzen in den homonuklearen Spektren den Atomen der einzelnen Aminosäuren eindeutig zugeordnet werden. In die Strukturberechnungen (modifizierte „simulated-annealing“ Protokolle der X-PLOR 8.143 Bibliothek) von Rlf-RBD gingen 2228 NOEs und 47 $^3\text{J}_{\text{HN-H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten ein (Esser et al., 1998). Rlf-RBD läßt sich gemäß seiner Tertiärstruktur in die Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine einordnen (Figur 13).

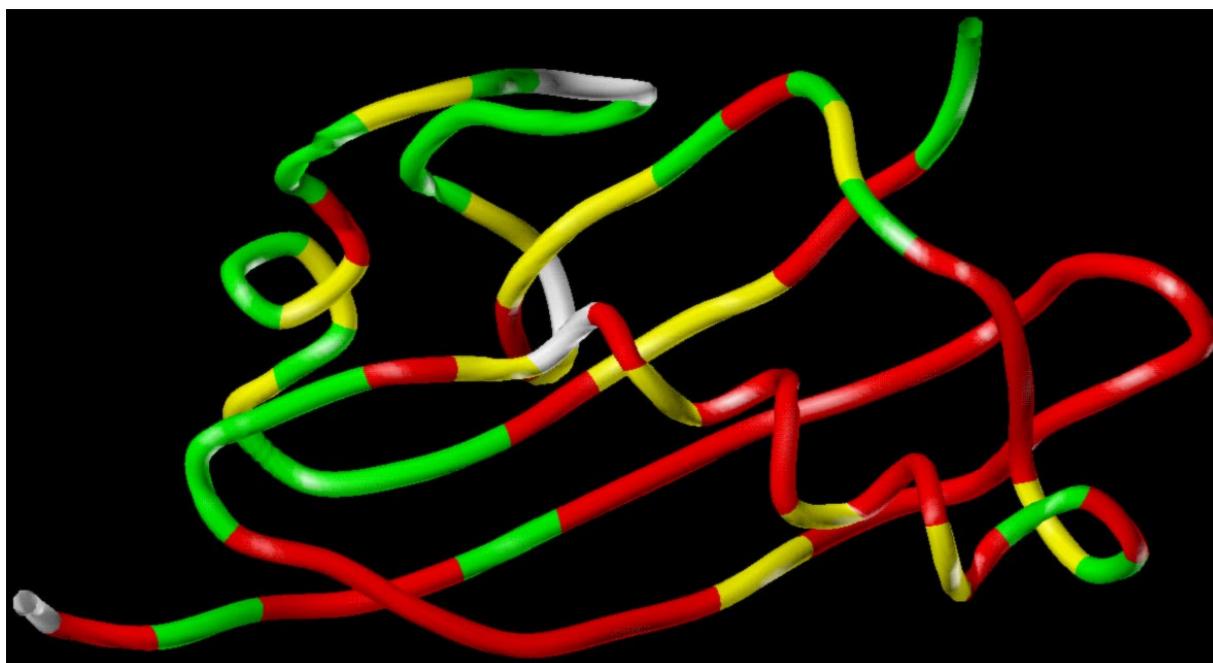


Figur 13: Molscript-Darstellung der Ras-bindenden Domäne von Rlf

Es besitzt fünf β -Faltblattstränge und zwei α -Helizes, die in einem $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motiv angeordnet sind. Trotz der geringen Sequenzhomologie zwischen den Domänen von Rlf (bzw. RalGDS) und Raf sind die Faltungstopologien der unterschiedlichen RBDs nahezu identisch. Jedoch zeigten Fluoreszenztitrationsstudien, daß die drei Domänen unterschiedliche Affinitäten zu H-Ras aufweisen. Die gemessenen Dissoziationskonstanten liegen bei $0.02\mu\text{M}$ (Raf-RBD), $0.09\mu\text{M}$ (Rlf-RBD) und $1.0\mu\text{M}$ (RalGDS).

3.4.7 Die Eingrenzung des Bindungsinterfaces

Die Bestimmung des Rlf-Bindungsinterfaces erfolgte über ein „Chemical shift mapping“ Verfahren. Dazu wurden ^1H - ^{15}N HSQC Spektren von Rlf-RBD im freien und im GTPase gebundenen Zustand aufgenommen und die Unterschiede in der chemischen Verschiebung der ^1H - ^{15}N -Resonanzen gemessen. Änderungen traten vor allem bei HN-Resonanzen in den ersten beiden Faltblättern, dem ersten Loop und dem C-Terminus der $\alpha 1$ -Helix von Rlf-RBD auf (Figur 14). Die entsprechenden Regionen in Raf sind an der Bindung an Rap1A beteiligt. Ein Hinweis darauf, daß die Protein-Protein-Wechselwirkung in beiden Komplexen über die gleiche Bindungsregion vermittelt wird. Unterschiede in den Ladungen im Interface der drei RBDs könnten die Ursache für ihre unterschiedliche Affinitäten zu Ras sein. Während RalGDS z.B. in Loop 1 und 3 stark negativ geladen ist, ist Rlf stark positiv geladen. Raf trägt an dieser Stelle keine Ladung.



Figur 14: Darstellung der chemischen Verschiebungsdifferenzen der NH-Protonen von Rlf im gebundenen und ungebundenen Zustand. Rot: Verschiebungen größer 0.05 auf der ^1H -Skala und/oder größer 0.5 ppm auf der ^{15}N -Skala. Gelb: Verschiebungen zwischen 0.02 und 0.05 ppm auf der ^1H -Skala und/oder zwischen 0.15 und 0.5 ppm auf der ^{15}N -Skala. Grün: Nicht verschobene NH-Protonen. Weiß: Proline oder keine Aussage machbar.

3.4.8 Weiterführende Arbeiten an Rlf-RBD

Bisher ist keine Struktur des Komplexes aus Rlf und Ras bekannt. Die Änderungen der Chemischen Verschiebung einiger Resonanzen im HSQC von Rlf-RBD bei Zugabe von Ras wurden deshalb als experimentelle Daten für ein neuartiges Protein-Protein-Docking Verfahren verwendet, das zur Berechnung der potentiellen Konformationen Geometric-Hashing-Techniken einsetzt und die erhaltenen Strukturen mit einer geometrischen Fitness-Funktion bewertet (H.P.Lenhof, 1995). Die vorläufigen unpublizierten Daten zeigen ein ähnliches Bindungsverhalten der beiden Partner wie im Raf-Rap1A-Komplex.

3.5 **Proteolytische Fragmentierung von Proteinen: WASP - ein Mediator des Cytoskeletts**

Rudolph, M., Bayer, P., Abo, A., Kuhlmann, J., Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (1998): The Cdc42/Rac Interactive Binding Region Motif of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) Is Necessary but Not Sufficient for Tight Binding to Cdc42 and Structure Formation to Cdc42. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18067-18076.

3.5.1 Das Wiskott-Aldrich-Syndrom

Bei dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) handelt es sich um eine Immundefizienz, deren Ursache in der Mutation eines X-chromosomalen Gens liegt. Dieses Gen kodiert für das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP). T-Lymphozyten und Blutblättchen der von dieser Krankheit betroffenen männlichen Patienten weisen eine irreguläre Bildung des Zytoskeletts und meist einen Verlust der Mikrovilli (Kenney et al., 1986; Molina et al., 1992; Rosen et al., 1995[Review]) auf.

3.5.2 Das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)

Das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) ist ein 503 Aminosäure langes Molekül. Es bindet als Effektor an Cdc42 (Aspenström et al., 1996; Kolluri et al., 1996), einem Vertreter der Familie der Rho-ähnlichen GTPasen, die in Säugerzellen die Polymerisation von Aktin und das Assembly von fokalen Komplexen an der Plasmamembran durch extrazellulären Stimulus kontrollieren (Nobes et Hall, 1995). WASP besitzt mit anderen Cdc42/Rac Effektoren wie p65^{PAK} ein gemeinsames Konsensusmotiv (Tabelle 3) (Burbelo et al., 1995). Im Falle von p65^{PAK} dient dieser 40 Aminosäure großen Bereich als GTPase-Bindungsregion (CRIB Region = Cdc42/Rac interactive binding region).

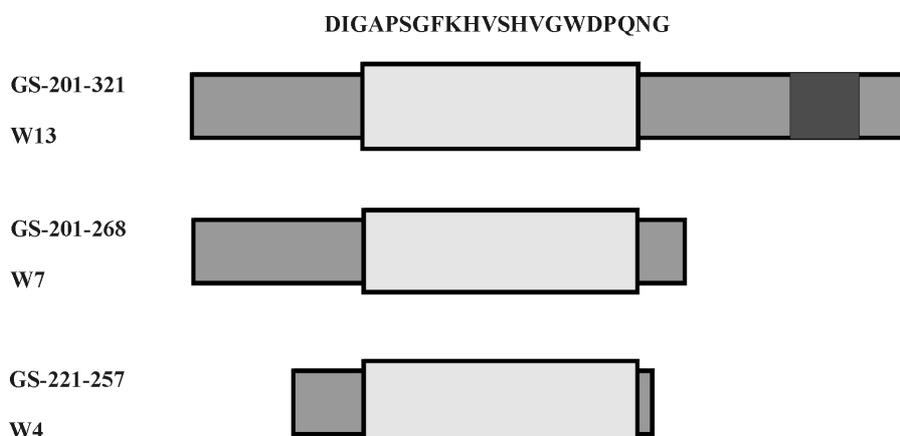
Tabelle 3: CRIB-Konsensussequenz einiger Cdc42/Rac Effektoren. Konservierte Positionen sind durch mindestens viermaliges Vorkommen identischer Aminosäuren unter den fünf aufgeführten Proteinen definiert. Ein „+“ bedeutet den Erhalt der positiven Ladung in mindestens vier Sequenzen an dieser Position.

P65 ^{PAK} α (rat)	PEISLP.SDFEHTIHVGFD
WASP (human)	ADIGAP.SGFKHVSHVGWD
DPR2 (drosophila)	EMISKPQNDFKHTGHVGID
MSE55 (human)	DMISHPLGDFRHTMHVGRG
MLK3 (human)	ERISMP.LDFKHRITVQAS
Konsensus	**IS*P**DF+H**HVG**

Neben der CRIB-Region besitzt WASP eine polyprolin-reiche Sequenz, die vermutlich durch SH3-Domänen interagierender Proteinen erkannt wird (Derry et al., 1994, 1995; Rivero-Lezcano et al., 1995). Aus Fusionsstudien mit Antikörpern ist bekannt, daß WASP auch direkt an der Aktin-Polymerisation beteiligt zu sein scheint (Symons et al., 1996).

3.5.3 Strategien zur Strukturuntersuchung von WASP und seines Cdc42-Komplexes

Nach den bereits bekannten *in vivo*- und *in vitro*-Studien der Cdc42/WASP-Wechselwirkung sollten Untersuchungen auf atomarer Ebene Aufschluß über die genaue Rolle der CRIB-Region bei der Komplexbildung mit Cdc42 geben. Dazu war es notwendig, die Bindungsregion von WASP auf den essentiell notwendigen Teil einzuschränken. Durch proteolytische Spaltung des WASP(wt)-Proteins mit Thrombin wurden drei Fragmente von 4 kDa, 7 kDa und 13 kDa (W4, W7, W13) gewonnen (Rudolph et al., 1998), die jeweils das konservierte CRIB-Motiv enthielten und unterschiedlich viele weitere N- oder C-terminale Aminosäuren (Figur 15). Diese Fragmente konnten dann auf ihre Bindungsfähigkeit an Cdc42 getestet und mit Hilfe der NMR Spektroskopie ungebunden und im Komplex untersucht werden.



Figur 15: Schematische Skizze der durch WASP(wt)-Thrombinspaltung erzeugten WASP-Fragmente. Das weiße Kästchen kennzeichnet die CRIB-Region, deren Sequenz über den drei Fragmenten angegeben ist. Das schwarze Kästchen markiert eine prolinreiche Sequenz, die vermutlich zur Bindung von SH3-Domänen notwendig ist.

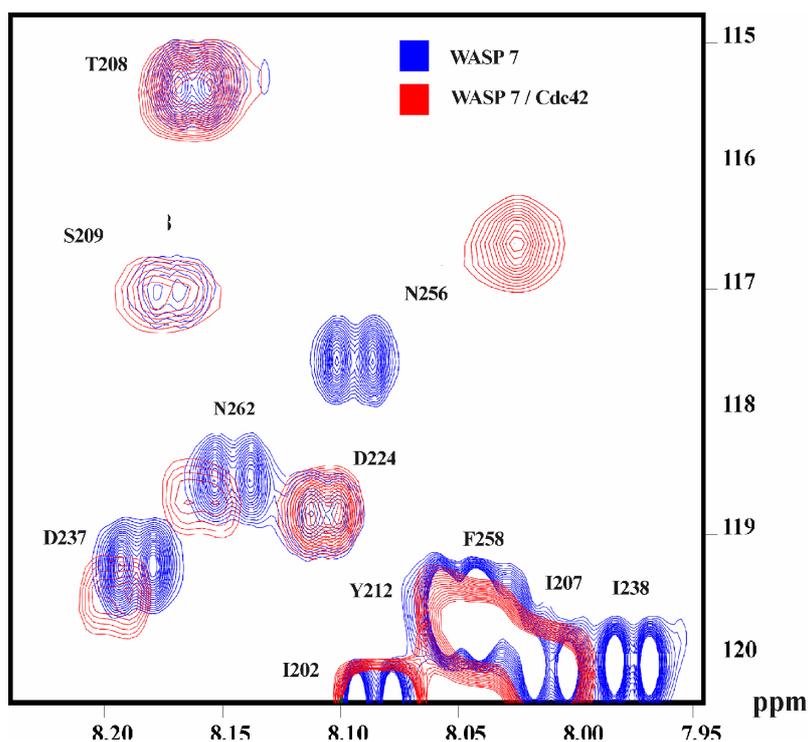
3.5.4 Fluoreszenz-, CD- und Biacorestudien

Die verschiedenen Fragmente wurden mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie auf ihre Eigenschaft hin untersucht, nukleotid-abhängig an Cdc42 zu binden. Messungen der Dissoziation des nicht-hydrolyisierbaren, fluoreszenzmarkierten GTP-analogons (mGpp(NH)p) aus dem Cdc42•mGpp(NH)p-Komplex zeigten einen mit steigender Fragmentkonzentration zunehmenden dissoziationsinhibierender Effekt (GDI-Effekt) aller Peptide. Die K_D -Werte der unterschiedlichen Fragmente wurden durch Biacore- und Fluoreszenztitrationsexperimente ermittelt (W4 und W7 \approx 500 nM und W13 \approx 60-80 nM). W13 bindet an Cdc42•GDP ca. 500 fach schwächer als an das entsprechende Cdc42•mGpp(NH)p bindet. Schließlich konnte durch CD-Spektroskopie gezeigt werden, daß nur das W13 Fragment Anteile von Sekundärstrukturelementen (α -Helix) enthält, während die kürzeren beiden Peptide keine solchen Strukturen aufweisen.

3.5.5 NMR Strukturuntersuchungen der WASP Fragmente

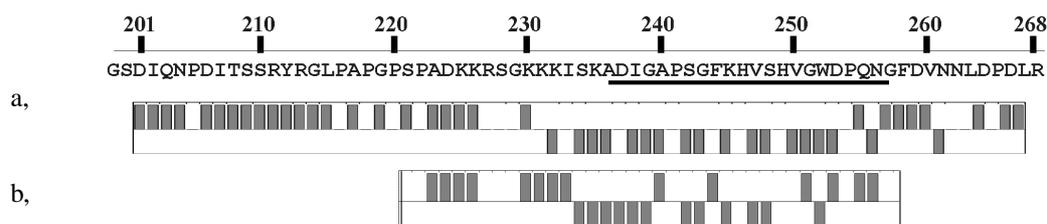
Die drei Fragmente wurden mit Hilfe der zweidimensionalen ^1H -homonuklearen NMR Spektroskopie untersucht. Bei den kürzeren Fragmente W4 und W7 ließ sich eine komplette Zuordnung aller Resonanzen in TOCSY und COSY Spektren erreichen. Beide Peptide haben keine ausgeprägte Sekundärstruktur. Nur für das C-terminale Ende des 7 kDa Fragments (Aminosäuren 257-268) ließen sich drei helixtypische NOEs finden, ein Hinweis für den Beginn einer möglichen regulären α -Helix in diesem Bereich. Eine solche Helix sollte in längeren Fragmenten sichtbar sein. Diese Hypothese wurde durch die CD-Spektren des 13kDa-Fragments gestützt. Wegen starker Überlappungen konnte jedoch eine eindeutige Zuordnung der Resonanzen zu den Protonen im W13 mit homonuklearer ^1H -NMR nicht getroffen werden. Erschwert wurde die NMR spektroskopische Arbeit am 13 kDa Peptid auch durch eine Di- oder Oligomerisierung bei millimolaren Konzentrationen, die für die Strukturaufklärung mit Hilfe der Kernspinresonanz notwendig sind. Daher wurde auf weitere Experimente mit diesem Fragment verzichtet.

Um Bindungsstudien auf atomarer Ebene vorzunehmen, wurden die beiden kürzeren löslichen Fragmente W4 und W7 mit dem Stickstoffisotop ^{15}N markiert und die Resonanzen der gewonnenen heteronuklearen ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren den einzelnen Atomen der Peptide zugeordnet. Bei Bindung an Cdc42•mGpp(NH)p sollte es durch die Änderung der chemischen Umgebung und die Ausbildung von Wasserstoff- und Salzbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen zu einer Verschiebung solcher Resonanzen in W4 und W7 kommen, die entweder an der Bildung der Kontaktfläche zu Cdc42 oder der Bildung neuer Sekundärstrukturelemente beteiligt sind. Figur 16 zeigt einen Ausschnitt der beiden HSQC Spektren des 7 kDa Fragments im freien (blau) und im Cdc42-gebundenen (rot) Zustand. Deutlich zu erkennen sind die Verschiebungen einiger „Peaks“ (z.B. Asn²⁵⁶), während dagegen andere keinen Änderungen unterworfen sind (z.B. Asp²²⁴). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Figur 17. Die verschobenen Resonanzen oder solche die durch Linienverbreiterung bei Komplexbildung nicht sichtbar waren, werden hier durch einen „Balken nach unten“ relativ zur Mittellinie gekennzeichnet, nichtverschobene Resonanzen durch einen „Balken nach oben“.



Figur 16: Ausschnitt aus einem ^1H - ^{15}N -HSQC von W7 in freiem Zustand (blau) und im Cdc42-Komplex (rot). Auf der Ordinate sind die ppm-Werte für die ^{15}N -Verschiebungen und auf der Abszisse für die ^1H -Verschiebungen angegeben. Die jeweiligen Resonanzen sind gekennzeichnet.

Im Vergleich mit der Peptidsequenz zeigt sich eindeutig, daß die CRIB Region direkt an der Komplexbildung beteiligt ist. Die Bindungsregion des W7 beginnt mit Aminosäure Lys²³¹ und endet mit Asp²⁵³. Im Gegensatz zu W4 scheinen im Falle von W7 auch Aminosäuren um Position 260 an der Wechselwirkung beteiligt zu sein.



Figur 17: Änderungen der Chemischen Verschiebungen bei Komplexbildung. Ein Balken nach oben bedeutet keine Änderung der Chemischen Verschiebung einer Resonanz im HSQC des WASP-Fragmentes a, W7 und b, W4 nach Zugabe von Cdc42. Ein Balken nach unten bedeutet eine meßbare Chemische Verschiebung der Resonanz.

Aufgrund des niederen K_D -Wertes des W13 Fragments (im Vergleich zu W4 und W7) sollte das längere Peptid in der Lage sein, eine bessere Kontaktfläche auszubilden. Die CD-Ergebnisse deuteten auf die Involvierung der der CRIB-Region nachfolgenden α -Helix hin. Die Untersuchung des W13/Cdc42-Komplexes konnte wegen der fehlenden Resonanzzuordnung, des großen Molekulargewichts (ca. 40kDa) und des Oligomerisierungsverhaltens des Fragments nicht durchgeführt werden.

Aus den erhaltenen Daten resultierte ein Modell zur Bindung von WASP an Cdc42, in dem die Aminosäuren 231-253 und 261-263 an der Komplexbildung beteiligt sind. CD- und Fluoreszenzspektroskopie ließen darüberhinaus eine Beteiligung der C-terminal der CRIB-Region gelegenen α -Helix an der Interface-Bildung (niedriger K_D des W13) vermuten.

3.5.6 Nachfolgende Arbeiten an der Struktur des WASP/Cdc42 Komplexes

Im Labor von Micheal Rosen (Abdul-Manan et al., 1999) konnte die Struktur des WASP/Cdc42-Komplexes mit Hilfe multidimensionalen NMR-Methoden und tripel-isotopenmarkierten Komponenten aufgeklärt werden. Dazu wurde eine verkürzte Cdc42(1-179) Minimaldomäne präpariert sowie ein WASP-Fragment, daß die Aminosäure 230 bis 288 enthielt. Der Komplex zeigt Kontaktstellen der Aminosäuren 231-277 in WASP zu den bekannten Switch I und II Regionen, sowie zu $\beta 2$ und $\alpha 5$ in Cdc42. Die Aminosäuren 231 bis 237 formen einen kompakten „Loop“, der mit dem $\beta 2$ - $\beta 3$ „Turn“ der GTPase interagiert. Von den Aminosäuren 240-249 werden intensive Wasserstoffbrücken zum zentralen β -Faltblatt von Cdc42 ausgebildet, während die Reste 252 bis 258 ein kurzes intramolekulares β -Faltblatt ausbilden. Wie aus den Daten von Rudolph et al. vorhergesagt, ist eine α -Helix - C-terminal der CRIB-Region gelegen - mit den Aminosäuren 264 bis 275 an der Bindung beteiligt. Diese Helix ist notwendig für eine effektive Komplexbildung ($K_D \approx 30\text{nM}$).

3.6 **Proteine im Komplex mit RNA: U1A - ein Regulatorprotein der RNA-Prozessierung**

Bayer, P., Varani, L., and Varani, G. (1999): Refinement of the Structure of Protein-RNA Complexes by Residual Dipolar Coupling Analysis. *J. Biomol. NMR*, 14,149-155.

3.6.1 Strukturinformation aus dipolaren Wechselwirkungen

Die Bestimmung dreidimensionaler Molekülstrukturen mit Hilfe der NMR basiert vorwiegend auf lokalen Informationen, wie Winkel (J-Kopplung) und Abstände zweier nah benachbarter Kerne (NOEs). Die Qualität solcher Strukturen könnte jedoch beachtlich gesteigert werden, wenn auch nicht-lokale Informationen über Messungen zugänglich wären. Eine Klasse dieser Observablen bilden NH-, CH- oder CC- Bindungsvektoren, die relativ zu einem Referenzsystem bestimmt werden können. Dipolaren Wechselwirkungen zwischen Kernspins beinhalten diese Informationen und können aus teilweise orientierten Meßproben entnommen werden.

3.6.2 Residuale dipolare Kopplungen

Während der isotropen Bewegung eines Moleküls in Lösung verschwindet die dipolare Wechselwirkungen zweier Kernen auf der NMR Zeitskala im Mittel. In einem Festkörper

hingegen ist diese Interaktion von Null verschieden und trägt zu einer großen Linienverbreiterung bei. Orientiert man aber Moleküle teilweise in Lösung, so bleibt ein kleiner Restanteil der dipolaren Wechselwirkung bestehen. Die Intensität dieser Wechselwirkung birgt Informationen über die Ausrichtung einiger Bindungsvektoren. Die Ausrichtung kann entweder mit Hilfe magnetischer Felder (Tolman et al., 1995) oder durch die Anordnung großer Makromolekülstrukturen (Tjandra und Bax, 1997), die wiederum durch Magnetfelder orientiert werden können, erfolgen. Die verbleibende dipolare Restwechselwirkung führt zu einer Aufspaltung der Resonanzlinien im Spektrum und macht sich als residuale dipolare Kopplungskonstante (RDK-Konstante) bemerkbar. Die individuellen Kopplungskonstanten hängen nicht nur vom Grade der Ausrichtung (Anisotropie) ab, sondern auch von den polaren Koordinaten bezüglich der Ausrichtungsachse und liefern deshalb direkte geometrische Informationen über die Stellung von NH-, CH- und CC-Bindungsvektoren.

3.6.3 Das U1A-RNA System

Viele Proteine, die an der Prozessierung der Prä-mRNA in Zellen beteiligt sind, enthalten eine oder mehrere Kopien einer 70-90 Aminosäure langen Ribonukleoprotein-Domäne (RNP) (Mattaj, I.W., 1993 [Review]). Solche Proteine spielen eine Rolle bei der RNA Reifung, wobei sie Bereiche in den Prä-RNAs oder in snRNAs erkennen. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das U1A Protein (Scherly et al., 1990), daß während des Splicing-Vorgangs an einen internen Loop der untranslatierten 3'-Region seiner eigenen Prä-mRNA bindet und die Polyadenylierung verhindert.

3.6.4 Vorangegangene Arbeiten an U1A

Neben der Kristallstruktur eines U1A(RNP)-RNA Komplexes (Oubridge et al., 1995; Price et al., 1995) war auch die NMR-Struktur des Komplexes aus der RNP-Domäne von U1A und eines Polyadenylierungs-Inhibitors (RNA) bekannt (Howe et al., 1998). Das Assignment des Proteins und der RNA lag vor. Die Bindung von U1A-RNP an die Haarnadelschleife des Inhibierungselements war durch NOEs und Winkelinformationen gut definiert. Dagegen war aus den NMR Spektren keine Information über die Lage und Anordnung der beiden Stammbereiche der RNA zu entnehmen. Die Abstände der Protonen in den beiden Stämmen voneinander ($>6\text{\AA}$) schloßen das Vorhandensein von NOEs aus.

3.6.5 Strategie zum „Refinement“ der U1A-RNA-Struktur

Durch die Nutzung residueller dipolarer Kopplungskonstanten sollte die Lage der beiden helikalen RNA Bereiche zueinander definiert und gleichzeitig ein Refinement des gesamten Komplexes erzielt werden. Dazu mußten in einem ersten Schritt CH- und NH-Kopplungskonstanten in metamorphen Phasen (Flüssigkristallen) gemessen werden und das Verfahren zur Berechnung der relativen Polarkoordinaten der entsprechenden Bindungsvektoren von Proteinen (Tjandra und Bax, 1997) auf RNA und schließlich Protein-RNA-Komplexe erweitert werden.

3.6.6 Die Messung und Auswertung der dipolaren Restkopplungen

Die residualen dipolaren Kopplungen können quantitativ für ein Strukturrefinement eingesetzt werden. Die Kopplungskonstante D^{XH} , in Hz gemessen, zwischen zwei Kernen X und H ist durch Gleichung 1 gegeben

$$D_{\text{XH}} = D_{\text{a}}^{\text{XH}} \{ 3\cos^2\theta - 1 \} + 1.5 D_{\text{r}}^{\text{XH}} (\sin^2\theta \cos 2\phi) \}. \quad (\text{Glg. 1})$$

Dabei repräsentiert D_{a}^{XH} die axiale Komponente des Ausrichtungstensors \mathbf{D} und D_{r}^{XH} ist sein rhombischer Anteil. θ beschreibt den Winkel zwischen dem XH-Bindungsvektor und der z-Achse des Tensors und ϕ den Winkel zwischen der Projektion des letzteren Vektors auf die xy-Ebene und der x-Achse. Symmetrische Tensoren (wie \mathbf{D}) können durch sechs Komponenten beschrieben werden. Drei dieser Komponenten geben Auskunft über die Richtung des Tensors, die anderen drei werden durch die Anisotropie, Asymmetrie und seine Spur definiert. Letztere drei können wiederum durch die Diagonalkomponenten D_{11} , D_{22} und D_{33} des Tensors beschrieben werden und stehen in linearem mathematischen Zusammenhang mit D_{a}^{XH} und D_{r}^{XH} . Wobei mit $R = 1.5(D_{\text{r}}^{\text{XH}}/D_{\text{a}}^{\text{XH}})$ gilt, daß

$$D_{11}^{\text{XH}} = 2 D_{\text{a}}^{\text{XH}} \quad (\text{Glg. 2})$$

$$D_{22}^{\text{XH}} = \{ D_{\text{a}}^{\text{XH}} (1-1.5R) \} \quad (\text{Glg. 3})$$

$$D_{33}^{\text{XH}} = \{ D_{\text{a}}^{\text{XH}} (1+1.5R) \}. \quad (\text{Glg. 4})$$

Da die residualen Kopplungen sowohl von den Winkeln θ und ϕ abhängen, als auch von D_{a}^{XH} und R , kann die geometrische Information über die Bindungsvektoren nur entnommen werden, wenn gleichzeitig alle vier Variablen bestimmbar sind. Dies läßt sich genau dann erreichen, wenn es eine „genügend“ große Anzahl von XH-Vektoren im Molekül gibt und statistisch alle Möglichkeiten zur Winkeleinstellung besetzt sind. Unter diesen Bedingungen kann ein Diagramm erstellt werden, in dem die Stärke der gefundenen Kopplungen gegen deren Häufigkeit aufgetragen wird („powder pattern like distribution“). D_{11} , D_{22} und D_{33} ergeben sich schließlich aus dieser pulverspektrum-ähnlichen Verteilung. D_{11} entspricht dem höchsten absoluten Kopplungswert im Spektrum, das zweite Extremum ist D_{22} , während D_{33} der Kopplung mit höchster Vorkommenswahrscheinlichkeit entspricht.

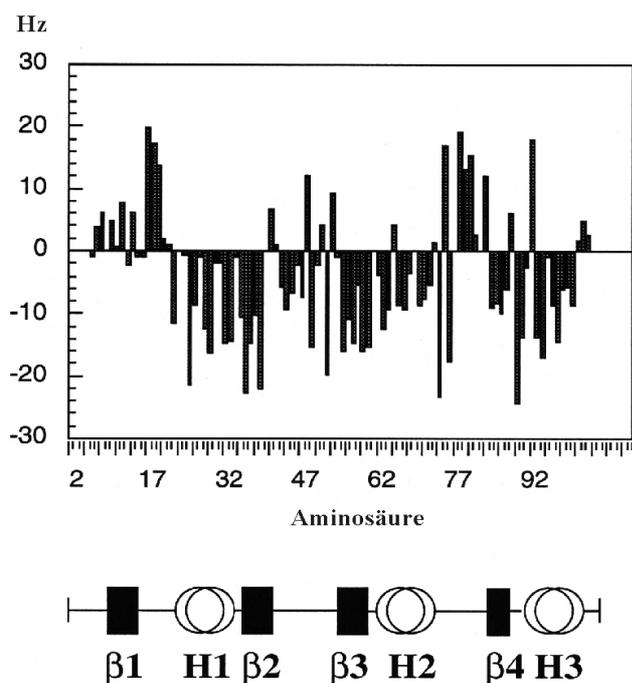
3.6.7 Metamorphe Phasen und dipolare Kopplungen

Die Ausrichtung von Biomoleküle in Lösung wird über den Einsatz flüssigkristalliner Phasen (nematischer Phasen) erreicht, die aus diskusförmigen Makromolekülkomplexen bestehen und sterisch die Bewegung der Zielmoleküle behindern. Für das Refinement des U1A-Komplexes wurden 3-6%ige Lösungen aus DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) und DHPC (1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) (3:1/mol:mol) zur Ausrichtung verwendet. ^1H - ^{15}N - und ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren des freien Proteins (^{15}N markiert), der RNA ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ markiert) und des RNA Proteinkomplexes ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiert) konnten unter diesen Bedingungen aufgenommen werden (Sanders und Schwonek, 1992). Die Differenz aus der

Messung der Kopplungskonstanten in flüssigkristalliner und wässriger Phase ist der residuale dipolare Kopplungsanteil.

3.6.8 Anwendung der Methode auf den U1A-RNA Komplex

Figur 18 zeigt die Auftragung der Intensität (Hz) der RDK-Konstanten gegen die Sequenz des U1A-Proteins im RNA-Komplex. Für das Protein konnten 95 NH-Kopplungen gemessen werden, für die RNA waren es 9 Imino-



NH, 16 CH-Paare in den Basen und 9 CH-Werte in den Zuckern. Das Auftreten positiver Werte für die Imino-NH und aromatischen CH-Kopplungen in den Basen, weist (nach Evaluation von Glg.1) darauf hin, daß die drei α -Helizes H1, H2 und H3 im Protein (negative NH-Kopplungen) senkrecht zu den RNA-Basen orientiert sind. Für das Strukturrefinement war die Bestimmung der Diagonalkomponenten des Ausrichtungstensors **D** notwendig.

Figur 18: Auftragung der Stärke der residualen dipolaren Kopplungskonstante (Hz) gegen die Proteinsequenz im U1A-RNA-Komplex. Darunter sind schematisch die Sekundärstrukturelemente des Proteins eingezeichnet.

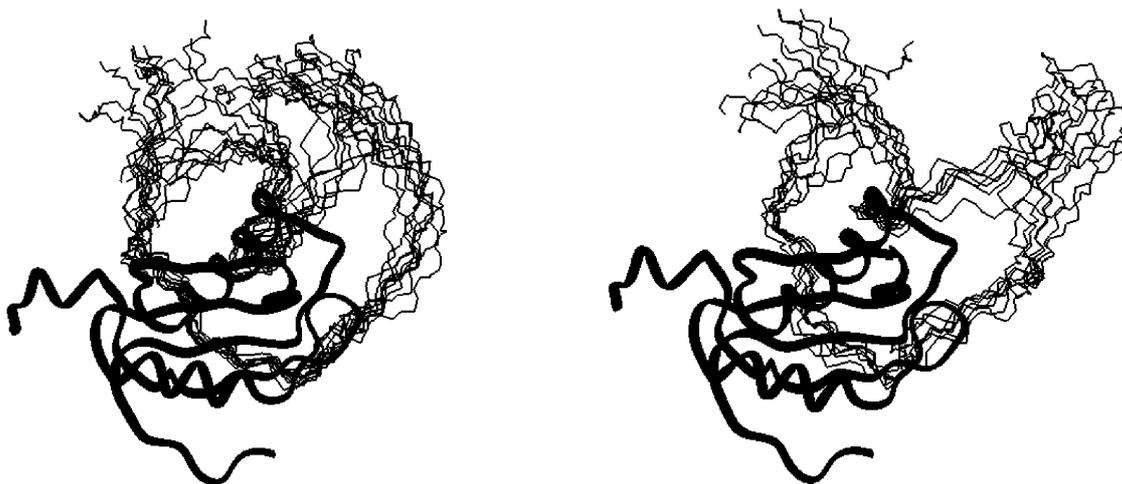
Im Falle des Proteins konnte die Anisotropie aus dem oben beschriebenen (Kap. 3.6.6) Verteilungsspektrum („powder pattern like distribution“) zu -13.4 Hz abgeschätzt werden, da hier eine größere Anzahl von NH-Vektoren statistisch über alle Einstellungsmöglichkeiten verteilt waren. Der aus Gleichung 2 bis 4 berechnete R Wert (Asymmetrie) wurde über eine zusätzliche Variationsmethode (Clare et al., 1998) überprüft und bestätigt. Eine statistische Verteilung der CH-Vektoren in alle Raumrichtungen war wegen der Basenstapelung in der RNA nicht gegeben. Daher wurde die Anisotropie für die CH-Bindungen in der RNA rechnerisch aus dem Verhältnis der magnetogyrischen Konstanten und den reziproken Kuben des Bindungsabstandes (Glg.5)

$$\gamma_{\text{CH}}/(r_{\text{CH}})^3 : \gamma_{\text{NH}}/(r_{\text{NH}})^3 \cdot 2 \quad (\text{Glg. 5})$$

relativ zu der Anisotropie der NH-Bindung ermittelt. 50 Startstrukturen wurden daraufhin mit einer modifizierten X-PLOR Version berechnet. Die RDK-Konstanten konnten durch die Ergänzung der Energietargetfunktion (Tjandra et al., 1997) durch den harmonischen Term

$$E_{\text{dipolar}} = k_{\text{dipolar}} (\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}})^2 \quad (\text{Glg. 6})$$

(δ = dipolare Kopplung in Hz) in die Protokolle zur Strukturberechnung eingegliedert werden. Als Ergebnis wurden zwei unterschiedliche Strukturfamilien erhalten, die sich in der Gesamtenergie der Targetfunktion unterscheiden. Die Verwendung der residualen dipolaren Kopplungen führt in der Familie mit niedriger Energie (bessere Erfüllung der experimentellen Daten) zu einer Reorientierung der Positionen der beiden helikalen Stammbereiche zueinander (Figur 19).



Figur 19: Darstellung des U1A-RNA-Komplexes. Das Protein ist als Bändermodell abgebildet. Von der RNA sind jeweils zehn Strukturen nach der Berechnung ohne (links) und mit (rechts) residualen dipolaren Kopplungen gezeigt. Aus Übersichtsgründen ist nur das C3'-O-P-O-C5'-C4'-Rückgrat der RNA abgebildet.

Es tritt ein relativ großer Winkel zwischen den Achsen der beiden RNA-Helizes auf, was im Gegensatz zu den Ausgangsstrukturen steht. Dies zeigt zum ersten mal, daß nicht-lokale Informationen durch residuale dipolare Kopplungen auch für die Strukturberechnung von RNA, DNA und deren Proteinkomplexe eingesetzt werden kann.

3.6.9 Bedeutung der Arbeiten an U1A-RNA

Das von Nico Tjandra für Proteine demonstrierte Verfahren zur Bestimmung residualer dipolarer Kopplungen konnte im Rahmen der Arbeiten an U1A und gleichzeitig an dem Drosophila-Protein Stauffen (Bayer et al., 1999b) auf Nukleinsäure-Protein Komplexe erweitert werden. Die hierzu entwickelten neuen Techniken und die Einbindung der RDK-Werte von Nukleinsäuren in Moleküldynamik-Programme wie X-PLOR, durch Evaluierung geeigneter harmonischer Terme und Energiekonstanten, ermöglichen es zukünftig, die in den RDKs steckende geometrische Information nun auch für Protein-RNA oder -DNA Komplexe nutzbar zu machen.

4. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Strukturaufklärung von Proteinen, die wichtige Aufgaben bei der Signaltransduktion übernehmen oder Vorgänge im Zellkern regeln. Mit der Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der Biopolymere und ihrer Wechselwirkungspartner mittels multidimensionaler NMR Spektroskopie konnten offene biochemische Fragestellungen geklärt oder neue gezielte molekularbiologische Experimente in Aussicht gestellt werden. Die ausgewählten Proteinstrukturen nehmen Schlüsselstellungen in den biochemischen Zellabläufen ein. Sie erfüllen neurotrophe Aufgaben durch Rezeptorbindung (Amyloid), dienen als Effektoren „molekularer Schalter“ (Rlf) oder als Mediatoren der Tumorsuppression (APC), beeinflussen die Ausbildung des Cytoskeletts (WASP), sind Vermittler des Kerntransports (SUMO) oder Regulatoren der RNA-Prozessierung (U1A).

Das am Kerntransport beteiligte SUMO-1 (small ubiquitin-related modifier) spielt eine Rolle in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur ergab, daß SUMO aus einem 5-strängigen β -Faltblatt und zwei α -Helizes besteht und aufgrund der Strukturhomologie in die Familie der Ubiquitin-„Superfolds“ eingeordnet werden muß. Die Sekundärstrukturelemente in SUMO-1 sind nach einem $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Muster angeordnet.

Auffallend an der Struktur des Proteins ist der flexible N-Terminus von 20 Aminosäuren, der in anderen Ubiquitinähnlichen Molekülen fehlt. Er ist möglicherweise für die spezifische Funktion von SUMO verantwortlich und könnte eine Rolle bei der Protein-Protein Interaktion spielen. Eine gezielte Deletion der 20 N-Terminalen Aminosäuren sollte die Aufgabe des unstrukturierten Teils von SUMO in zellbiologischen Versuchen klären können. Die beiden Glyzine, Gly⁹⁶ und Gly⁹⁷, die für die Konjugation an Zielproteine notwendig sind, sind in SUMO wie im strukturverwandten Ubiquitin, im flexiblen C-Terminus lokalisiert. Die Konservierung der Glyzine im C-Terminus des Proteins läßt auf einen ähnlichen Konjugationsmechanismus schließen, wie er im Ubiquitinsystem genutzt wird. Die hinzukommende Erhaltung des gesamten Ubiquitin-Faltungstypus weist auch auf eine strukturelle Ähnlichkeit des zur Konjugation notwendigen Enzymapparats mit demjenigen der Ubiquitinkonjugierenden Enzyme hin. Dagegen ist die für die Polymerisation von Ubiquitin wichtige Aminosäure Lys⁴⁸ an identischer Position in der Tertiärstruktur von SUMO durch Gln⁶⁹ ersetzt und verhindert eine „Polysumotylierung“.

Das mit Hilfe der zweidimensionalen NMR untersuchte Armadillo-Peptid (42 Aminosäuren) des Tumorsuppressors APC (Adenomatous Polyposis Coli) besitzt zwei kurze α -Helizes von Aminosäure Asn⁸ bis Trp¹⁶ und Ala²⁰ bis Asn²⁶. Die beiden Helizes werden von drei Aminosäuren unterbrochen. Der N-terminale Teil des Peptids ist ungeordnet. Auch der C-Terminus des Armadillo-Armes liegt nach den X-PLOR-Berechnungen unter den gegebenen Lösungsmittelbedingungen ungeordnet vor, weist aber zwei helixtypische $\alpha\beta_{i,i+3}$ NOEs von Aminosäure Ser³⁰ bis Lys³³ und Met³⁷ bis Ala⁴⁰ auf. Diese einzelnen NOEs deuteten auf die mögliche Ausbildung eines weiteren Sekundärstrukturelements (α -Helix) unter Anwesenheit der restlichen sechs Armadillo-Sequenzen hin und ließen ein neues α -helikales Strukturmotiv vermuten, daß 1997 durch die röntgenkristallographische Aufklärung des Armadillopeptids aus β -Catenin bestätigt werden konnte (Huber et al., 1997).

Das untersuchte Amyloidpeptid $\beta(1-40)$ spielt eine Rolle bei der Ausbildung neuritischer Plaques in Alzheimerpatienten und besitzt unter den Versuchsbedingungen (40% Trifluorethanol : 60% Wasser) zwei ausgeprägte α -Helizes. Zusätzlich zu der bereits bekannten Helix von Gln¹⁵ bis Asp²³ konnte im Peptid noch eine kürzere α -Helix von Aminosäure Ile³¹-Met³⁵ identifiziert werden. Dieser Bereich korreliert mit der Konsensussequenz von Tachykinin Neuropeptiden und ist für die Tachykinin-Rezeptorbindung notwendig. Basierend auf diesen Ergebnissen und Röntgenstreudaten geht das momentane Modell der Fibrillenbildung von 48 Amyloid-Monomeren aus, in denen die Aminosäuren 17-21 und 31-36 durch die Ausprägung von β -Faltblattsträngen den hydrophoben Kernbereich der plaque-artigen Amyloidfibrillen bilden.

Der Ras-spezifische Guaninnukleotid-Austauschfaktor Rlf (**R**alGDS like factor) steuert einen Ras-abhängigen parallel zu der Raf/Mek/Erk-Kinase-Kaskade verlaufenden Signalweg, ähnlich wie RalGDS und Rgl und beeinflusst die Aktivität der GTPasen Cdc42 und Rac. Aufgrund der vorliegenden Arbeiten läßt sich die Ras-bindende Domäne von Rlf (Rlf-RBD) in die Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine einordnen. Sie besitzt fünf β -Faltblattstränge und zwei α -Helizes, die in einem $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motiv angeordnet sind. Die Bestimmung des Rlf-Bindungsinterfaces (zu Ras) erfolgte über ein „Chemical shift mapping“ Verfahren. Dazu wurden Unterschiede in der chemischen Verschiebung von ^1H - ^{15}N -Resonanzen von Rlf-RBD im freien und im GTPase gebundenen Zustand gemessen. Änderungen traten vor allem in den Regionen auf, die auch in der RBD des Ras-Effektors c-Raf an der Bindung an die GTPase beteiligt sind. Diese Daten geben einen Hinweis darauf, daß die Protein-Protein-Wechselwirkung in beiden Komplexen über die gleiche Bindungsregion vermittelt wird. Aufgrund der strukturellen Untersuchungen lassen sich Unterschiede in den Ladungen im jeweiligen Interface der RBDs der drei Ras-Effektoren Rlf, RalGDS und c-Raf-1 finden. Diese Ladungsunterschiede können als Ursache der unterschiedlichen Affinitäten zu Ras angesehen werden. Die strukturellen Daten geben neue Hinweise für mögliche gezielte Mutationsstudien im Interfacebereich der RBDs, die eine letztliche Bestätigung dieser Hypothese geben sollten.

Das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) bindet als Effektor an Cdc42 einem Vertreter der Familie der Rho-ähnlichen GTPasen, die in Säugerzellen die Polymerisation von Aktin und das Assembly von fokalen Komplexen an der Plasmamembran kontrollieren. WASP besitzt mit anderen Cdc42/Rac Effektoren ein gemeinsames 40 Aminosäure großes Konsensusmotiv, die sogenannte CRIB Region (Cdc42/Rac interactive binding region). Im Rahmen der strukturellen Untersuchungen konnten drei Fragmente, von 4 kDa, 7 kDa und 13 kDa, gemessen werden, die jeweils das konservierte CRIB-Motiv enthielten und durch proteolytischen Verdau des WASP Proteins gewonnen wurden. Die Fragmente wurden auf ihre Bindungsfähigkeit an Cdc42 getestet und mit Hilfe der NMR Spektroskopie ungebunden und im Komplex untersucht. Wie bei Rlf konnten die Aminosäuren des Bindungsinterfaces von WASP über ein „Chemical shift mapping“ Verfahren identifiziert werden. Aus den erhaltenen Daten resultierte ein Modell zur Bindung von WASP an Cdc42, in dem die Aminosäuren 231-253 und 261-263 der CRIB-Region an der Komplexbildung beteiligt sind. CD- und Fluoreszenzspektroskopie ließen darüberhinaus eine Beteiligung der C-terminal der CRIB-Region gelegenen α -Helix an der Interface-Bildung vermuten. Eine Bestätigung dieser Arbeiten brachte die Strukturaufklärung des WASP/Cdc42-Komplexes (Abdul-Manan et al., 1999).

Das U1A Protein bindet während des Splicing-Vorgangs an einen internen Loop der untranslatierten 3'-Region seiner eigenen Prä-mRNA und verhindert so autoregulatorisch die Polyadenylierung. Für ein strukturelles Refinement des Komplexes aus U1A und des Polyadenylierungsinhibitors PIE wurden residuale dipolare Kopplungskonstanten in flüssigkristalliner Lösung bestimmt, die von Restwechselwirkungen mit den Lösungsmittel (Lipid-Bicellen) herrühren und deren Stärke von der räumlichen Ausrichtung im Molekül (Anisotropie) bestimmt wird. Während für die NH-Kopplungen des Proteins im Komplex die Anisotropie experimentell abgeschätzt werden konnte, gelang es im Falle der RNA, die Anisotropie der CH-Bindungen rechnerisch aus dem Verhältnis der magnetogyrischen Konstanten der beteiligten Kerne und den reziproken Kuben ihres Bindungsabstandes zu ermitteln. Die so gewonne geometrische Information konnte durch Ausarbeitung modifizierter X-PLOR-Protokolle in die Strukturberechnung eingebunden werden. Die Verwendung der residualen dipolaren Kopplungen führt zu einer Reorientierung der Positionen der beiden helikalen Stammbereiche zueinander. Dies zeigt zum ersten mal, daß nicht-lokale Informationen durch residuale dipolare Kopplungen auch für die Strukturberechnung von RNA, DNA und deren Proteinkomplexe eingesetzt werden kann.

5. Literatur

- Achari, A., Hale, S. P., Howard, A. J., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Hardmann, K. D. und Witlow, M. (1992). 1.67 Å structure of the B2 immunoglobulin-binding domain of streptococcal protein G and comparison to the NMR structure of the B1 domain. *Biochemistry*, **31**, 10449-10457.
- Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G.A., Majumdar, A., Querfelli, O., Siminovitich, K.A. und Rosen, M.K. (1999). Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature*, **399**, 379-383.
- Albright, C.F., Giddings, B.W., Liu, J., Vito, M. und Weinberg, R.A. (1993). Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. *EMBO Journal*, **12**, 339-347.
- Aspenström, P., Lindberg, U. und Hall, A. (1996). Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Current Biol.*, **6**, 70-75.
- Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T. und Zagorski, M.G. (1992). Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J. Mol. Biol.*, **225**, 1075-1093.
- Barth, A.I.M., Pollack, A.L., Altschuler, Y., Mostov, K.E. und Nelson, W.J. (1997). NH₂-terminal deletion of β -catenin results in stable colocalization of β -catenin with Adenomatous Polyposis Coli protein and altered MDCK cell adhesion. *J. Cell. Biol.*, **136**, 693-706.
- Bayer, P., Varani, L., and Varani, G. (1999b). Nuclear Magnetic Resonance Methods to Study RNA-Protein Complexes. In: *Methods in Enzymology: RNA-Ligand Interactions, Part A: Structural Biology Methods*, Vol 317, im Druck.
- Bischoff, F., Krebber, H., Kempf, T., Hermes, I. und Ponstingl, H. (1995). Human Ran Gtpase-activating protein RanGap1 is a homolog of yeast Rna1p involved in messenger-RNA processing and transport. *PNAS*, **92**, 1749-1753.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. und McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. [Review] *Nature*, **348**, 125-132.
- Boguski, M.S. und McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. [Review] *Nature*, **366**, 643-654.
- Brünger, A.T., (1993). X-PLOR version 3.1, Howard Hughes Medical Institut und Yale University, New Haven, CT, USA.
- Brünger, A.T., (1996). X-PLOR version 3.854, Howard Hughes Medical Institut und Yale University, New Haven, CT, USA.
- Burbelo, P.D., Drechsel, D. und Hall, A. (1995). A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 und Rac GTPases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29071-29075.
- Cantor, S.B., Urano, T. und Feig LA. (1995). Identification and characterization of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Molecular & Cellular Biology*, **15**, 4578-4584.
- Clore, G.M., Gronenborn, A.M. und Tjandra, N. (1998). Direct structure refinement against residual dipolar couplings in the presence of rhombicity of unknown magnitude. *J. Magn. Res.*, **131**, 159-162.
- Derry, J.M.J., Ochs, H.D. und Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, **78**, 635-644 [Erratum, 1994: Cell, 79, 923.]

Derry, J.M.J., Kerns, J.A., Weinberg, K.I., Ochs, H.D., Volpini, V., Estivill, X., Walker, A.P. und Francke, U. (1995). WASP gene mutation in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 1127-1135.

Dickson, B., Sprenger, F., Morrison, D. und Hafen, E. (1992). Raf functions downstream of Ras1 in the sevenless signal transduction pathway. *Nature*, **360**, 600-603.

Dirac, P.A.M. (1958). The principles of quantum mechanics. Clarendon Press, Oxford.

Drivas, G.T., Shih, A., Coutavas, E., Rush, MG. und D'Eustachio P. (1990). Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Molecular & Cellular Biology*, **10**, 1793-1798.

El-Agnaf, O.M.A., Bodles, A., Harriott, P., Guthrie, D.J.S. und Irvine, G.B. (1998). The N-terminal region of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is responsible for its tendency to assume beta-sheet and aggregate to form fibrils. *Eur.J.Biochem*, **258**, 157-163.

Emerson, S.D., Madison, V.S., Palermo, R.E., Waugh, D.S., Scheffler, J.E., Tsao, K.L., Kiefer, S.D., Liu, S.P. und Fry, D.C. (1995). Solution structure of the Ras-binding domain of c-Raf-1 and identification of its Ras interaction surface. *Biochemistry*, **34**, 6911-6918.

Ernst, R.R. (1966). *Adv. Magn. Res.*, **2**, 1.

Esser, D., Bauer, B., Wittinghofer, A., Cool, R. H. und Bayer, P. (1998). Structure determination of the Ras-specific guanine nucleotide exchange factor Rlf. *Biochemistry*, **37**, 13453-13462.

Fraser, P.E., Nguyen, J.T., Surewicz, W.K. und Kirschner, D.A. (1991). pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides. *Biophys.J.*, **60**, 1190-1201.

Gallagher, T., Alexander, P., Bryan, P. und Gilliland, G. L. (1994) two crystal structures of the B1 immunoglobulin-binding domain of streptococcal protein G and comparison with NMR. *Biochemistry* **33**, 4721-4729.

Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., Clarke, E.E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L.H.T., Ruffolo, S.C., Thornberry, N.A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R.J., Roy, S. und Nicholson, D.W. (1999). Involvement of Caspases in Proteolytic Cleavage of Alzheimer's Amyloid- β Precursor Protein and Amyloidogenic A β Peptide Formation. *Cell*, **97**, 395-406.

Geyer, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Wittinghofer, A. und Kalbitzer, H.R. (1997). Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signalling. *Nature Structural Biology*, **4**, 694-699.

Griesinger, C., Sørensen, O.W., und Ernst, R.R. (1989). Three-dimensional fourier spectroscopy. Application to high-resolution NMR. *J. Magn. Res.*, **84**, 14-63.

Haubruck, H., Disela, C., Wagner, P. und Gallwitz, D. (1987). The ras-related ypt protein is an ubiquitous eukaryotic protein: isolation and sequence analysis of mouse cDNA clones highly homologous to the yeast YPT1 gene. *EMBO Journal*, **6**, 4049-4053.

Hirschl, D., Bayer, P. und Müller, O. (1996). Secondary structure of an armadillo single repeat from the APC protein. *FEBS Letters*, **383**, 31-36.

Hershko, A. (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 445-449.

Hochstrasser, M. (1995) Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opinion Cell Biol.* **7**, 215-223.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation . *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405-439.

- Howe, P.W.A., Allain, F.H.-T., Varani, G. und Neuhaus, D. (1998). Determination of the NMR structure of the complex between U1A protein and its polyadenylation inhibition element. *J. Biomol. NMR*, **11**, 59-84.
- Huber, A.H., Nelson, W.J. und Weis, W.I. (1997). Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin. *Cell*, **90**, 871-882.
- Jentsch, S. und Schlenker, S. (1995). Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* **82**, 881-884.
- Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J. und Blobel, G. (1997a). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J.*, **16**, 5509-5519.
- Jullien-Flores, V., Dorseuil, O., Romero, F., Letourneur, F., Saragosti, S., Berger, R., Tavitian, A., Gacon, G. und Camonis, J.H. (1995). Bridging Ral GTPase to Rho pathways. RLIP76, a Ral effector with CDC42/Rac GTPase-activating protein activity. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 22473-22477.
- Kamitani, T., Nguyen, H. P. und Yeh, E. T., (1997). Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. *J. Biol. Chem.* **272**, 14001-14004.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschick, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.. *Nature*, **325**, 733-736.
- Kay, L.E., Clore, G.M., Bax, A. und Gronenborn, A.M. (1990). Four-dimensional heteronuclear triple-resonance NMR spectroscopy of interleukin-1 beta in solution. *Science*, **249**, 411-414.
- Kenney, D., Cairns, L., Remold-O'Donnell, E., Peterson, J., Rosen, F.S. und Parkman, R. (1986). Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, **68**, 1329-1332.
- Kikuchi, A., Demo, S.D., Ye, Z.H., Chen, Y.W. und Williams, L.T. (1994). RalGDS family members interact with the effector loop of ras p21. *Molecular & Cellular Biology*, **14**, 7483-7491.
- Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-170.
- Kohen, A., Cannio, R., Bartolucci, S. und Klinman, J.P. (1999). Enzyme dynamics and hydrogen tunnelling in a thermophilic alcohol dehydrogenase. *Nature*, **399**, 496-4999.
- Kolluri, R., Tolias, K.F., Carpenter, C.L., Rosen, F.S. und Kirchhausen, T. (1996). Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42. *PNAS*, **93**, 5615-5618.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. und Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*, **275**, 1784-1787.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. und Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, **268**, 533-539.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Mahajan, R., Delphin C., Guan, T., Gerace, L. und Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, **88**, 97-107.
- Mattaj, I.W. (1993). RNA recognition: a family matter?. [Review]. *Cell*, **73**, 837-840.
- Matunis, M. J., Coutavas, E. und Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **135**, 1457-1470.

- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J. und Gerace, L. (1993). Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *Journal of Cell Biology*, **123**, 1649-1659.
- Meyer, B., Weimar, T. und Peters, T. (1997). Screening mixtures for biological activity by NMR. *Eur. J. Biochem.*, **246**, 705-709.
- Molina, I.J., Kenney, D.M., Rosen, F.S. und Remold-O'Donnell, E. (1992). T cell lines characterize events in the pathogenesis of Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Exp. Med.*, **176**, 867-874.
- Moore, M.S. und Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, **365**, 661-663.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. und Kinzler, K.W. (1997). Activation of β -catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*, **275**, 1787-1790.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F. und Wittinghofer A. (1995). The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, **375**, 554-560.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Block, C., Janknecht, R. und Wittinghofer A. (1996). Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nature Structural Biology*, **3**, 723-729.
- Näthke, I.S., Adams, C.L., Polakis, P., Sellin, J.H. und Welson, W.J. (1996). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in cell migration. *J. Cell. Biol.*, **134**, 165-179.
- Nobes, C. und Hall, A. (1995). Rho, Rac, und Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**, 53-62.
- Orengo, C. A., Jones, D. T. und Thornton, J. M. (1994). Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* **372**, 631-634.
- Oubridge, C., Ito, N., Evans, P.R., Teo, C.H. und Nagai, K. (1994) Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature*, **372**, 432-438.
- Park, S.H. und Weinberg, R.A. (1995). A putative effector of Ral has homology to Rho/Rac GTPase activating proteins. *Oncogene*, **11**, 2349-2355.
- Pauli, W. (1940). The connection between spin and statistics. *Phys.Rev.*, **58**, 716.
- Peifer, M., Berg, S. und Reynolds, A.B. (1994). A Repeating Amino Acid Motif Shared by Proteins with Diverse Cellular Roles. *Cell*, **76**, 789-791.
- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. und Wüthrich, K. (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *PNAS*, **94**, 12366-12371.
- Plutner, H., Cox, A.D., Pind, S., Khosravi-Far, R. und Bourne JR. (1991). Schwaninger R. Der CJ. Balch WE. Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *Journal of Cell Biology*, **115**, 31-43.
- Price, S.R., Ito, N., Oubridge, C., Avis, JM. und Nagai K. (1995). Crystallization of RNA-protein complexes. I. Methods for the large-scale preparation of RNA suitable for crystallographic studies. *J. Mol. Biol.*, **249**, 398-408.
- Ren, M., Drivas, G., D'Eustachio, P. und Rush, M.G. (1993). Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *Journal of Cell Biology*, **120**, 313-323

- Riggleman, B., Wieschaus, E. und Schedl, P. (1989). Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes & Development*, **3**, 96-113.
- Rivero-Lezcano, O.M., Marcilla, A., Sameshima, J.H. und Robbins, K.C. (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associated with Nck through Src homology 3 domains. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5725-5731.
- Rosen, F.S., Cooper, M.D. und Wedgwood, R.J.P. (1995). The Primary Immunodeficiencies. *The New Engl. J. Med.*, **333**, 431-440.
- Rudolph, M.G., Bayer, P., Abo, A., Kuhlmann, J., Vetter, I.R. und Wittinghofer, A. (1998). The Cdc42/Rac Interactive Binding Region Motif of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) Is Necessary but not Sufficient for Tight Binding to Cdc42 and Structure Formation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18067-18076.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S. und Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with β -catenin. *Science*, **262**, 1731-1734.
- Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porifiri, E. und Polakis, P. (1997). Stabilization of β -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science*, **275**, 1790-1792.
- Sanders, C.R. und Schwonek J.P. (1992). Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. *Biochemistry*, **31**, 8898-8905.
- Scherly, D., Boelens, W., van Venrooij, W.J., Dathan, N.A., Hamm, J. und Mattaj I.W. (1989) Identification of the RNA binding segment of human U1A protein and definition of its binding site on U1 snRNA. *EMBO J.*, **8**, 4163-7410.
- Shimohigashi, Y., Matsumoto, H., Yakano, Y., Saito, R., Iwata, T., Kamiya, H.-O., and Ohno, M. (1993). Receptor-mediated specific biological activity of a beta-amyloid protein fragment for NK-1 substance P receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **193**, 624-630.
- Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., Fesik, S.W. (1996). Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*, **274**, 1531-1534.
- Sönnichsen, F.D., van Eyk, J.E., Hodges, R.S. und Sykes, B.D. (1992). Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry*, **31**, 8790-8798.
- Stern, O. (1921). Ein Weg zur experimentellen Richtungsquantelung im Magnetfeld. *Z.Phys.*, **7**, 249.
- Stern, O. und Gerlach, W. (1922). Der experimentelle Nachweis des magnetischen Moments des Silberatoms. *Z.Phys.*, **8**, 110.
- Sticht, H., Willbold, D., Ejchart, A., Rosin-Arbesfeld, R., Yaniv, A., Gazit, A. und Rösch, P. (1994). Trifluoroethanol stabilizes a helix-turn-helix motif in equine infectious-anemia-virus trans-activator protein. *Eur.J.Biochem.*, **225**, 855-861.
- Su, L.-K., Vogelstein, B. und Kinzler, K.W. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*, **262**, 1734-1736.
- Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B. und Blake, C.C. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.*, **273**, 729-739.
- Symons, M., Derry, J.M.J., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U. und Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase Cdc42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, **84**, 723-734.

- Tachibana, K., Umezawa, A., Kato, S. und Takano, T. (1988). Nucleotide sequence of a new YPT1-related human cDNA which belongs to the ras gene superfamily. *Nucleic Acids Research*, **16**, 10368.
- Terzi, E., Holzemann, G. und Seelig, J. (1994). Reversible random coil-beta-sheet transition of the Alzheimer beta-amyloid fragment (25-35). *Biochemistry*, **33**, 1345-1350.
- Thomas und Dill, K.A. (1993). Local and nonlocal interactions in globular proteins and mechanisms of alcohol denaturation. *Protein Science*, **2**, 2050-2065.
- Tjandra, N. und Bax, A. (1997). Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science*, **278**, 1111-1114.
- Tjandra, N., Omichinski, J.G., Gronenborn, A.M., Clore, G.M. und Bax, A. (1997). Use of dipolar ¹H-¹⁵N and ¹H-¹³C couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 732-738.
- Tolman, J.R., Flanagan, J.M., Kennedy, M.A. und Prestegard, J.H. (1995). Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: information for structure determination in solution. *PNAS*, **92**, 9279-9283.
- Touchot, N., Chardin, P. und Tavitian, A. (1987). Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *PNAS*, **84**, 8210-8214.
- Tsukihara, T., Fukuyama K., Mizushima, M., Harioka, T., Kusunoki, M., Katsube, Y., Hase, T. und Matsubara, H. (1990) Structure of the [2Fe-2S] ferredoxin I from blue-green algae *Aphanothece sacrum* at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **216**, 399-410.
- Uhlenbeck, G.E. und Goudsmit, S. (1925). Ersetzung der Hypothese vom unmechanischen Zwang durch eine Forderung bezüglich des inneren Verhaltens jedes einzelnen Elektrons. *Naturwiss.*, **13**, 953.
- Uhlenbeck, G.E. und Goudsmit, S. (1926). Spinning electrons and the structure of spectra. *Nature*, **117**, 264.
- Varshavsky, A., (1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 283-287.
- Wolthuis, R.M., Bauer, B., van't Veer, L.J., de Vries-Smits, A.M., Cool, R.H., Spaargaren, M., Wittinghofer, A., Burgering, B.M. und Bos JL. (1996). RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap 1A-associating protein. *Oncogene*, **13**, 353-362.
- Wüthrich, K., Wider, G., Wagner, G. und Braun, W. (1982). Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution proton nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.*, **155**, 311-319.
- Yankner, B.A., Duffy, L.K. und Kirschner, D.A. (1990). Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid β Protein: Reversal by Tachikinin Neuropeptides. *Science*, **250**, 279-282.
- Zagorski, M.G. und Barrow, C.J. (1992). NMR studies of amyloid beta-peptides: proton assignments, secondary structure, and mechanism of an alpha-helix----beta-sheet conversion for a homologous, 28-residue, N-terminal fragment. *Biochemistry*, **31**, 5621-5631.

6. Publikationen

Die mit einem * versehenen Publikationen wurden für die Habilitationsarbeit verwendet.

[1] Sticht, H., Willbold, D., Bayer, P., Ejchart, A., Herrmann, F., Rosin-Arbesfeld, R., Gazit, A., Yaniv, A., Frank, R., and Rösch, P. (1993): Equine infectious anemia virus tat protein is a predominantly helical protein. *Eur.J.Biochem.*, **218**, 973-976.

[2] Kraft, M., Westendorp, M.O., Krammer, P.O., Schuckert, O., Bayer, P., Rösch, P., and Frank, R. (1994): HIV-1 tat protein: Chemical synthesis and structural characterisation. In *Peptides 1994*, H.L.S. Maia, eds. Escom, 349-350.

[3] Leibrock, E., Bayer, P., and Lüdemann, H.-D. (1995): Nonenzymatic hydrolysis of adenosinetriphosphate (ATP) at high temperatures and pressures. *Biophys.Chem.*, **54**, 175-180.

[4] Bayer, P., Kraft, M., Ejchart, A., Westendorp, M., Frank, R., and Rösch, P. (1995): Structural studies of HIV-1 tat protein. *J. Mol. Biol.*, **247**, 529-535.

[5] Marx, U.C., Austermann, S., Bayer, P., Adermann, K., Ejchart, A., Sticht, H., Walter, S., Schmid, F.-X., Jaenicke, R., Forssmann, W.-G., and Rösch, P. (1995): Structure of human parathyroid hormone 1-37 in solution. *J. Biol. Chem.*, **270**, 15194-15202.

[6*] Sticht, H., Bayer, P., Willbold, D., Dames, S., Hilbich, C., Beyreuther, K., Frank, R., and Rösch, P. (1995): Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 293-298.

[7] Kraft, M., Schuckert, O., Wallach, J., Westendorp, M.O., Bayer, P., Rösch, P., and Frank, R. (1995): A synthetic approach to study the structural biology of tat proteins from HIV-1 and EIAV. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, P.T.P. Kaumaya and R.S. Hodges, eds. Kingswinford, Mayflower Scientific Ltd., 21-23.

[8] Rösch, P., Bayer, P., Ejchart, A., Frank, R., Gazit, A., Herrmann, F., Kraft, M., Rosin-Arbesfeld, R., Sticht, H., Willbold, D., and Yaniv, A. (1996): The structure of lentiviral tat proteins in solution. In: *NMR as a structural tool for macromolecules: Current status and future directions*; eds. Rao, B.D.N. and Kemple, M.D.; Plenum Press, New York., 275-285.

[9*] Hirschl, D., Bayer, P., and Müller, O. (1996): Secondary structure of an armadillo single repeat from the APC protein. *FEBS Lett.*, **383**, 31-36.

[10] Beißinger, M., Paulus, C., Bayer, P., Wolf, H., Rösch, P., and Wagner, R. (1996): Sequence specific resonance assignments of the ¹H-NMR spectra and structural characterization in solution of the HIV-1 transframe protein p6*. *Eur. J. Biochem.*, **237**, 383-392.

[11] Klostermeier, D., Bayer, P., Kraft, M., Frank, W.R., and Rösch, P. (1997): Spectroscopic investigation of HIV-1 tat and related peptides in aqueous solution. *Biophys. Chem.*, **63**, 87-96.

- [12] Metzger, A.U., Bayer, P., Willbold, D., Hoffmann, S., Frank, R.W., and Rösch, P. (1997): The Interaction of HIV-1 Tat(32-72) with its Target RNA: A Fluorescence and Nuclear Magnetic Resonance Study. *BBRC.*, **241**, 31-36.
- [13] Marx, U.C., Adermann, K., Bayer, P., Meyer, M., Forssmann, W.-G., and Rösch, P. (1998): Structure-Activity Relation of NH₂-Terminal Human Parathyroid Hormone Fragments. Submitted to *J. Biol. Chem.*, **273**, 4308-4316.
- [14] Willbold, D., Metzger, Sticht, H., A.U., Gallert, K.C., Dank, N., Bayer, P., Krauß, B., Goody, R.S., and Rösch, P. (1998): Equine Infectious Anemia Virus Transactivator is a Homeodomain-type Protein. *J. Mol. Biol.*, **277**, 749-755.
- [15*] Esser, D., Bauer, B. Wittinghofer, W., Cool, R.H., and Bayer, P. (1998): Structure determination of the Ras-binding domain of the Ral-specific guanine exchange factor Rlf. *Biochemistry*, **37**, 13453-13462.
- [16*] Rudolph, M., Bayer, P., Abo, A., Kuhlmann, J., Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (1998): The Cdc42/Rac Interactive Binding Region Motif of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) Is Necessary but Not Sufficient for Tight Binding to Cdc42 and Structure Formation to Cdc42. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18067-18076.
- [17*] Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S. Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998): Structure Determination of the Small Ubiquitin-related Modifier SUMO-1. *J. Mol. Biol.*, **280**, 275-286.
- [18*] Bayer, P., Varani, L., and Varani, G. (1999): Refinement of the Structure of Protein-RNA Complexes by Residual Dipolar Coupling Analysis. *J. Biomol. NMR*, **14**, 149-155.
- [19] Bayer, P., Varani, L., and Varani, G. (1999): Nuclear Magnetic Resonance Methods to Study RNA-Protein Complexes. In: *Methods. in Enzymology: RNA-Ligand Interactions, Part A: Structural Biology Methods*, Vol 317, im Druck.
- [20] Varani, G., Bayer, P., Cole, P., Ramos, A., and Varani, L. (1999): RNA Structure and RNA-Protein Recognition During Regulation of Eukaryotic Gene Expression. In: *RNA Biochemistry and Biotechnology*; eds. Barciszewski, J., and Clark, B.F.C.. Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 195-216.
- [21] Marx, U.C., Adermann, K., Bayer, P., Forssmann, W.-G., and Rösch, P. (1999): Solution Structures of Human Parathyroid Hormone Fragments hPTH(1-34), hPTH(1-39) and Bovine Parathyroid Hormone Fragment bPTH(1-37). Eingereicht bei *J.Biol.Chem.*
- [22] Zarndt, T., Kießig, S., Kipping, M., Reimer, U., Fischer, G., and Bayer, P. (1999): PH Induced Conformational Switch upon Protein Phosphorylation at a Threonine-Proline Moiety. In Bearbeitung für *J.Mol.Biol.*

7. Curriculum vitae

Name	Peter Bayer
Geburtsdatum:	Mai 19, 1965
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig
Privatadresse:	Kleine Marktstr. 4, 06108 Halle, Tel.: 0345-2002911
Dienstadresse:	Max-Planck-Stelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Weinberg 22, 06120 Halle/Saale, Tel.: 0049-345-55-22819, Fax.: 0049-345-55-11597, email: bayer@enzyme-halle.mpg.de
05/1985	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am Goethe-Gymnasium Regensburg
07/1985	Verleihung des Forschungsumweltpreises der Stadt und des Landkreises Regensburg dotiert mit DM 3000,-
06/1986	Verleihung des Forschungspreises für „Jugend Forscht“ im Bereich Nordbayern
10/1986-08/1991	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
11/1990-08/1991	Diplomarbeit im Fach Biophysik an der Universität Regensburg mit der Gesamtnote „Mit Auszeichnung“
10/1991-07/1994	Dissertation am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth
11/1991-11/1993	Stipendium des ‘Fonds der chemischen Industrie Deutschlands’, Kekulee-Stipendiat
07.07.1994	Abschluß der Promotion mit mündlicher Prüfung
08/1994	Studienabschlußstipendium des ‘Fonds der Chemischen Industrie Deutschlands’
08/1994-09/1995	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere an der Universität Bayreuth
03/1994-05/1994	Gastwissenschaftler am ‘Institute for Biology and Biotechnology’, Kreta, Griechenland
10/1995-09/1997	NMR Arbeitsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund
10/1997-09/1998	Forschungsaufenthalt am Medical Research Council, Laboratories of Molecular Biology, in Cambridge, England
10/1997-12/1997	Auslandsstipendium der Max-Planck-Gesellschaft
01/1997-09/1998	Marie-Curie-Research-Stipendium der Europäischen Union
10/1998	Leiter der NMR Forschungsgruppe an der Max-Planck-Stelle für Enzymologie der Proteinfaltung

8. Anhang: Veröffentlichungen

1. Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S. Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998): Structure Determination of the Small Ubiquitin-related Modifier SUMO-1. *J. Mol. Biol.*, **280**, 275-286.
2. Hirschl, D., Bayer, P., and Müller, O. (1996): Secondary structure of an armadillo single repeat from the APC protein. *FEBS Lett.*, **383**, 31-36.
3. Sticht, H., Bayer, P., Willbold, D., Dames, S., Hilbich, C., Beyreuther, K., Frank, R., and Rösch, P. (1995): Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 293-298.
4. Esser, D., Bauer, B. Wittinghofer, W., Cool, R.H., and Bayer, P. (1998): Structure determination of the Ras-binding domain of the Ral-specific guanine exchange factor Rlf. *Biochemistry*, **37**, 13453-13462.
5. Rudolph, M., Bayer, P., Abo, A., Kuhlmann, J., Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (1998): The Cdc42/Rac Interactive Binding Region Motif of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) Is Necessary but Not Sufficient for Tight Binding to Cdc42 and Structure Formation to Cdc42. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18067-18076.
6. Bayer, P., Varani, L., and Varani, G. (1999): Refinement of the Structure of Protein-RNA Complexes by Residual Dipolar Coupling Analysis. *J. Biomol. NMR*, **14**, 149-155.

Hiermit bestätige ich, daß ich die Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt und keine anderen Quellen und Hilfsmitteln als die angegebenen benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Peter Bayer, Halle/Saale, 7.11.99