

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

NMR-spektroskopische Untersuchungen von Proteinen

Adriane Gröger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. F. H. Köhler

Die Dissertation wurde am 17.10.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 15.11.2000 angenommen.

Für Natalie und Christian.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1997 bis September 2000 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Horst Kessler angefertigt.

Ihm möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen für das mir entgegengebrachte Vertrauen, sein Interesse an meiner Arbeit, seine uneingeschränkte Unterstützung in allen Bereichen und besonders für die große Freiheit bei der Ausgestaltung des Themas.

Mein weiterer Dank gilt:

- Prof. Dr. Shimon Schuldiner und seiner Gruppe für die fruchtbare Zusammenarbeit am EmrE-Projekt und vor allem Hagit Yerushalmi für die Probenpräparationen.
- Prof. Dr. Anthony Watts und besonders Dr. Clemens Glaubitz für eine hervorragende Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung bei allen MAS-Problemen, sowie für eine sehr schöne Zeit in Oxford.
- Prof. Dr. Wolfgang Baumeister und seiner Gruppe für die sehr gute Zusammenarbeit an VAT-N und vor allem Dr. Jürgen Peters für die unermüdliche Herstellung der Proben.
- Dr. Manfred Schwaiger für 2 Jahre einer sehr belebenden Zusammenarbeit mit vielen interessanten Diskussionen.
- Dr. Ralph Peteranderl für seine ständige Hilfsbereitschaft bei allen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Problemen.

- Dr. André Pampel für seine ständigen Unterstützungen bei Problemen mit Mizellen und Membranen.
- Dr. Tammo Diercks für die interessante Zusammenarbeit am VAT-N und die zahlreichen Hilfen am Spektrometer.
- Jens Liermann für die gute Zusammenarbeit am VAT-N und die zahlreichen Hilfen am Computer.
- Dr. Murray Coles für die abwechslungsreiche Zusammenarbeit am VAT-N und die Hilfen bei Problemen der Signalzuordnung.
- Dr. Gerd Gemmecker für seine stets kompetenten Antworten und Hilfen bei allen Fragen und Problemen.
- Dr. Rainer Haeßner für seine Hilfsbereitschaft bei allen technischen Problemen.
- Frau Machule und Frau Bruckmaier für ihre professionellen Arbeiten im Sekretariat.
- Allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die angenehme Atmosphäre.
- Allen Korrekturlesern für die erbrachten Mühen.
- Und vor allem meinen Eltern und meiner Familie für ihre vorbehaltlose Unterstützung.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

M. Schwaiger, M. Lebendiker, H. Yerushalmi, M. Coles, A. Gröger, C. Schwarz, S. Schuldiner, H. Kessler; NMR Investigation on the Multidrug Transporter EmrE, an Integral Membrane Protein, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 610-619.

H. Kessler, M. Schwaiger, M. Bürgle, A. Gröger, M. Coles, M. Lebendiker, H. Yerushalmi, S. Schuldiner; The Multidrug-Resistance Protein EmrE – High Resolution NMR Investigations and Secondary Structure, in *The 7th Akabori-Conference* (Proc. 7th Akabori Conference, Japanese-German Symposium on Peptide Chemistry) Heidelberg, **1998**, 30-35.

M. Coles, T. Diercks, J. Liermann, A. Gröger, B. Rockel, W. Baumeister, K. K. Koretke, A. Lupas, J. Peters, H. Kessler; The solution structure of VAT-N reveals a „missing link“ in the evolution of complex enzymes from a simple $\beta\alpha\beta\beta$ element, *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 1158-1168.

C. Glaubitz, A. Gröger, K. Gottschalk, P. Spooner, A. Watts, S. Schuldiner, H. Kessler; ^{31}P -CP-MAS NMR studies on TPP^+ bound to the ion-coupled multidrug transport protein EmrE, *FEBS Lett.* **2000**, *24031*, 1-5.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 NMR-spektroskopische Grundlagen	5
2.1 Allgemeine Grundlagen	5
2.2 Strukturbestimmung von Proteinen in Lösung	8
2.2.1 Einleitung	8
2.2.2 Zuordnung einheitlich ^{13}C -, ^{15}N -markierter Proteine	10
2.2.3 Protein-Ligand-Wechselwirkungen	13
2.3 Festkörper-NMR-Spektroskopie an Membranproteinen	15
2.3.1 Einleitung	15
2.3.2 Statische NMR-Spektroskopie	18
2.3.3 MAS-NMR-Spektroskopie und Kreuzpolarisation	19
2.3.4 MAOSS-Experimente	22
3 Untersuchungen an dem Membranprotein EmrE	25
3.1 Membranen und Membranproteine	25
3.2 Antibiotikaresistenz	28
3.3 Das Membranprotein EmrE	31
3.4 NMR-Untersuchungen in organischen Lösungsmitteln	40
3.4.1 Einleitung	40
3.4.2 Probenvorbereitung	42
3.4.3 NMR-Experimente	43
3.4.4 Zuordnung und Sekundärstrukturbestimmung	43
3.4.5 Bindungsstudien und Relaxationsverhalten	47
3.4.6 Diskussion der Ergebnisse	49
3.5 NMR-Untersuchungen in Mizellen	51
3.5.1 Einleitung	51

3.5.2 Größenabschätzung von EmrE in Mizellen	57
3.5.3 Diskussion der Ergebnisse	60
3.6 NMR-Untersuchungen in Membranen	61
3.6.1 Einleitung	61
3.6.2 Probenpräparation	62
3.6.3 NMR-Untersuchungen	64
3.6.4 Ergebnisse	65
3.6.5 Diskussion der Ergebnisse	69
3.6.6 MAOSS-Experimente	74
4 Untersuchungen an der N-terminalen Domäne des VAT-Proteins	77
4.1 Biochemischer Hintergrund	77
4.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen	78
4.2.1 Einleitung	78
4.2.2 NMR-Experimente	79
4.2.3 Zuordnung der NMR-Resonanzsignale	80
4.2.4 Strukturbestimmung	82
4.2.5 Diskussion der Ergebnisse	84
5 Zusammenfassung	88
6 Literaturverzeichnis	90
7 Anhang	103
7.1 EmrE	103
7.1.1 Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten	103
7.1.2 Experimentelle Parameter	103
7.2 VAT-N	117
7.2.1 Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten	117
7.2.2 Pulsprogramme	118

Abkürzungsverzeichnis

Zur Abkürzung der Aminosäuren werden die Einbuchstabenkodierungen nach Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur verwendet (*Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9 – 37).

Dem Englischen entnommene Fachausdrücke sind *kursiv* gedruckt.

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AAA	<i>ATPases associated with a variety of cellular activities</i>
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ATP	<i>adenosine 5'-triphosphate</i>
ATR-FTIR	<i>attenuated total reflection Fourier transformation infra red</i>
B_0	magnetische Feldstärke
BmrR	<i>Bacillus subtilis multidrug resistance R</i>
c	Konzentration
χ^1	Dihedralwinkel
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CP	<i>cross polarisation</i>
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i>
d	Abstand
δ	Gradientendauer

Δ	Diffusionszeit
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DDM	Dodecylmaltosid
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
D_t	Diffusionskoeffizient der Translation
EDAC	1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)-carbodiimid
<i>emrE</i>	<i>Escherichia coli multidrug resistance E</i> (Gen)
EmrE	<i>Escherichia coli multidrug resistance E</i> (Protein)
ϕ	Torsionswinkel
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FT	<i>Fourier transformation</i>
FTIR	<i>Fourier transformation infra red</i>
g	Gradientenstärke
γ	gyromagnetisches Verhältnis
η	mikroskopische Viskosität
HSQC	<i>heteronuclear single quantum spectroscopy</i>
I	Signalintensität
I_0	Signalintensität ohne angelegten Gradienten
ISDU	<i>isopotential spin-dry ultracentrifugation technique</i>
J	skalare Kopplung
k_B	Boltzmann-Konstante
K_D	Dissoziationskonstante

MAS	<i>magic angle spinning</i>
MAOSS	<i>magic angle oriented sample spinning</i>
<i>mvrC</i>	<i>methylviologen resistance C (Gen)</i>
NEM	N-Ethylmaleinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i>
PASTA	<i>protein assignment by threshold accepting</i>
PCMB	4-Chlormercuro-Benzoesäure
PCMBS	4-Chlormercuro-Benzolsulfonsäure
PISA	<i>polarity index slant angle</i>
PISEMA	<i>polarization inversion spin exchange at the magic angle</i>
ppm	<i>parts per million</i>
r	hydrodynamischer Radius
ROESY	<i>rotating frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smr	<i>small multidrug resistance</i>
T	Temperatur
T ₁	longitudinale Relaxationszeit
T ₂	transversale Relaxationszeit
T ₂ [*]	effektive transversale Relaxationszeit
τ _c	Korrelationszeit
TEXAN	<i>toxin extruding antiporter</i>
T _m	Schmelztemperatur

TM	transmembrane Domäne
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPP	Tetraphenylphosphonium-Ion
TRIS	<i>tris</i> -Hydroxymethylaminomethan
TROSY	<i>transverse relaxation-optimized spectroscopy</i>

[U-¹³C/¹⁵N] einheitlich ¹³C- und ¹⁵N-markiert

VAT	<i>valosine-containing protein like ATPase</i>
VAT-N	N-terminale Substraterkennungsdomäne des VAT-Proteins

1 Einleitung

Durch Bakterien verursachte Krankheiten wurden bisher nicht ausgerottet, aber ihr Rückgang wurde seit dem letzten Jahrhundert aufgrund einer verbesserten Gesundheitspolitik und bedeutender Leistungen der biomedizinischen Forschung und ihrer Anwendung voran getrieben. So ermöglichte in den letzten Jahrzehnten die Entwicklung und der Einsatz einer Vielzahl von Antibiotika wachsende Erfolge bei der Bekämpfung bakteriell bedingter Erkrankungen. Jedoch wurde gleichzeitig durch unvorsichtige, übermäßige oder falsche Verwendung von Antibiotika die Entstehung von Stämmen pathogener Bakterien, die gegen Antibiotika resistent sind, gefördert (1).

Verschiedene Formen der Antibiotikaresistenz wurden im Verlauf der Evolution herausgebildet. Einer dieser Mechanismen ist die Ausscheidung toxischer Substanzen durch die Zellmembran. Um die Resistenz pathogener Bakterien gegen bekannte Antibiotika zu stoppen, ist es sehr wichtig, den Signal- und Stofftransport durch die Membran zu erforschen. Dieser Transport wird durch spezifische Membranproteine ermöglicht, deren Struktur und Wirkungsweise gegenwärtig noch nicht genau verstanden wird.

Eines der Ziele der Membranforschung ist es, hochaufgelöste Strukturen von Membransystemen zu erhalten, die zu dem Verständnis beitragen, wie diese ihre biologische Rolle ausüben. NMR-spektroskopische Untersuchungen an verschiedenen Proteinen lieferten Informationen

darüber, wie sich Proteine falten, andere Moleküle binden und Reaktionen katalysieren (2).

Die Technik der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie ist einzigartig in ihrer Fähigkeit, strukturelle und dynamische Eigenschaften von komplexen biologischen Molekülen unter physiologischen Bedingungen zu messen. Die Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie wurde eine Standardmethode zur Strukturbestimmung von wasserlöslichen Proteinen (3).

Membranproteine sind aufgrund ihrer speziellen Funktion und Wirkungsweise in Lipiddoppelschichten nicht wasserlöslich und zusätzlich relativ groß. Daher können die Methoden der hochauflösenden NMR-Spektroskopie nur angewandt werden, wenn geeignete Untersuchungsmedien zur Verfügung stehen.

Organische Lösungsmittel und kleine Detergenzmizellen sind, bedingt durch ihre kurzen Korrelationszeiten, sehr gut dafür geeignet. Größere Proteine erhalten unter derartigen Bedingungen jedoch nur sehr selten ihre Tertiärstruktur und damit ihre Funktionalität. Unilamellare Phospholipidvesikel sind für die Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie zu groß und erfordern daher Methoden der Festkörper-NMR-Spektroskopie (4 - 7).

Das im Rahmen der vorgelegten Arbeit untersuchte Protein EmrE ist für eine Resistenz der Bakterien gegenüber einer großen Vielfalt zytotoxischer Verbindungen mit verantwortlich. Es ist in der Lage, Antibiotika mit Hilfe des aktiven Transportes durch die Zellmembran aus der Zelle zu schleusen. Dazu arbeitet es als Antiporter, der als Antriebskraft einen Protonengradienten nutzt. Das 12 kDa schwere Membran-

protein gehört zu der Familie der MiniTEXANe und wird aus *Escherichia coli* gewonnen (8).

Aufgrund der guten Löslichkeit des Membranproteins EmrE in organischen Lösungsmitteln wurde zu Beginn dieser Arbeit die Sekundärstruktur, basierend auf den Informationen des Index der chemischen Verschiebungen, der $^3J_{\text{NHH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten und der NOE-Muster, in Lösung recht genau bestimmt (9).

Für weitere Studien war es jedoch erforderlich, EmrE in biologisch relevanten Medien zu untersuchen. Um weiterhin die Methoden der Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie anwenden zu können, wurde das Protein in eine Detergenzmizelle rekonstituiert. Viele, für NMR-spektroskopische Experimente geeignete Detergenzmizellen, beeinflussen jedoch die biologische Aktivität von EmrE negativ. Daher wurde für diese Arbeit eine Mizelle gewählt, in die es funktionell rekonstituiert werden konnte. Die ermittelten Korrelationszeiten des gebildeten Protein-Detergenz-Komplexes sind jedoch für eine NOE-basierende Strukturbestimmung zu lang.

Deshalb wurde künftig zugunsten eines naturidentischen Mediums auf die Vorteile der NMR-Spektroskopie in isotropen Lösungen verzichtet. EmrE wurde in eine künstliche Lipidmembran rekonstituiert und mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Dabei gelang es mit Hilfe von Kreuzpolarisationsexperimenten, neue Aussagen über die Funktionsweise von EmrE zu treffen. In Bindungsstudien mit einem hochaffinen Liganden konnten erstmalig zwei Bindungsstellen mit unterschiedlichen Ligandeigenschaften nachgewiesen und analysiert werden (10).

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit an der Strukturaufklärung eines weiteren Proteins gearbeitet. Das VAT-Protein des Archaeobak-

teriums *Thermoplasma acidophilum* gehört wie andere Mitglieder der Cdc48/p97-Familie zu den AAA-ATPasen und besitzt zwei ATPase-Domänen und eine 185 Aminosäuren lange N-terminale Substraterkennungsdomäne VAT-N. VAT ist aktiv bei der Proteinfaltung und -entfaltung und trägt damit zu den allgemeinen Funktionen der ATPasen in der Zerlegung und / oder dem Abbau von Proteinkomplexen bei (11).

Mit der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie wurde die Lösungsstruktur von VAT-N bestimmt. VAT-N ist in zwei gleich große Subdomänen unterteilt. Die N-terminale Subdomäne VAT-Nn bildet ein Doppel- ψ - β -*Barrel*, die C-terminale Subdomäne VAT-Nc faltet hingegen zu einem neuartigen sechssträngigen β -*Clam*. Die Gesamtstruktur von VAT-N ist kompakt und nierenförmig und stimmt sehr gut mit den Vorhersagen aus elektronenmikroskopischen Studien überein (12).

2 NMR-spektroskopische Grundlagen

2.1 Allgemeine Grundlagen

Die *Nuclear Magnetic Resonance*-Spektroskopie ist neben der Röntgenkristallographie das wichtigste spektroskopische Verfahren zur Strukturaufklärung (13 - 23). Sie wurde 1946 von Bloch (24) und Purcell (25) entwickelt und später durch die Einführung der Fourier-Transform-Technik durch Ernst (26) grundlegend verbessert.

Das Verfahren beruht auf der Resonanz-Wechselwirkung zwischen einem hochfrequenten magnetischem Wechselfeld und bestimmten Atomkernen der zu untersuchenden Substanz, die sich in einem starken äußeren, homogenen Magnetfeld befindet. Grundlage der Messungen ist die Präzessionsbewegung, die Atomkerne mit einem Spin und einem magnetischem Moment μ in einem äußeren Magnetfeld um die Richtung des Magnetfeldes mit einer charakteristischen Frequenz (Larmor-Frequenz ω) ausführen. Die Einstellung von Spin und magnetischem Moment wird durch die Kernspin-Quantenzahl I bestimmt. Übergänge zwischen den Energieniveaus (Zeeman-Aufspaltung) sind nur möglich, wenn sich die Quantenzahl um eine Einheit ändert. Bei Einstrahlung eines elektromagnetischen Wechselfelds kommt es daher genau bei der Larmor-Frequenz zur Resonanzabsorption.

Für die Anwendung der NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung ist es wesentlich, daß das angelegte äußere Magnetfeld durch die Induktionwirkung der Elektronen und durch die Felder benachbarter Kerne abgeschwächt oder verstärkt wird. Dieser Effekt wird als magnetische

Abschirmung bezeichnet. Sie ist von der Art der Kerne und der zugehörigen Elektronenverteilung abhängig. Diese auf der Abschirmung beruhende Verschiebung der Resonanzlinie gegenüber der des isolierten Atomkerns in Abhängigkeit von seiner Umgebung wird als chemische Verschiebung bezeichnet.

Zusätzlich werden die Resonanzsignale von strukturabhängigen Parametern wie der dipolaren Kopplung, der skalaren Kopplung und der Quadrupolkopplung beeinflusst.

Die dipolare Kopplung beruht auf einer Wechselwirkung der magnetischen Dipole untereinander. Sie ist vom Kern-Kern-Abstand und der Orientierung des Kern-Kern-Verbindungsvektors relativ zum Magnetfeld abhängig, jedoch unabhängig von der Stärke des äußeren Magnetfelds. Wie alle orientierungsabhängigen Größen im Spin-Hamilton-Operator kann sie als Tensor dargestellt werden (17). Dieser Tensor ist spurlos und daher in isotropen Medien ohne Einfluß auf die Resonanzsignale.

Die skalare Kopplung beruht auf einer magnetischen Wechselwirkung zwischen den Kernen und wird indirekt über die Elektronen der chemischen Bindung vermittelt. Sie ist ebenfalls von der Stärke des äußeren Magnetfelds unabhängig.

Ein weiteres bedeutendes Phänomen für die Strukturbestimmung ist der *Nuclear Overhauser Effect* (NOE) (27 - 28). Formal kann dieser definiert werden als Änderung der Signalintensität eines gegebenen Kerns, wenn die Resonanz des anderen Kerns, welcher zu seiner Relaxation durch einen Dipol-Dipol-Mechanismus beiträgt, gesättigt ist. Der NOE, der zwischen zwei Kernen beobachtet wird, ist von deren Abstand zueinander abhängig, und somit auch von der Konformation des Moleküls.

Neben Aussagen zur Struktur kann die NMR-Spektroskopie auch Aussagen über das dynamische Verhalten von Substanzen durch Messung der Relaxationszeiten treffen.

Die longitudinale Relaxationszeit T_1 ist ein Maß für die Effizienz, mit der ein angeregter Kernspin durch Energieaustausch mit seiner Umgebung in seinen Grundzustand zurückkehrt. Die transversale Relaxationszeit T_2 ist ein Maß für die Effizienz, mit der die Spins ihre Energie untereinander austauschen. Je wirksamer die Formen des Energieaustauschs sind, um so kürzer werden die Relaxationszeiten (14).

Die transversale Relaxation wird hauptsächlich von der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den Kernen bestimmt. Zusätzlich spielen die Anisotropie der chemischen Verschiebung, das Quadrupolmoment und paramagnetische Effekte eine Rolle. Da diese Wechselwirkungen aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit in Festkörpern dominieren, sind in starren Systemen die T_2 -Zeiten sehr kurz. Die T_1 -Zeiten sind in diesen Systemen hingegen sehr lang (mehrere Sekunden) und führen somit zu extrem langen Meßzeiten.

Die langen T_2 -Zeiten in isotropen Medien ermöglichen den Aufbau von Multiquantenkohärenzen (18) und somit die langen Pulssequenzen, wie sie für Proteinuntersuchungen verwendet werden. Die Linienbreiten der NMR-Resonanzen von Lösungen sind indirekt proportional zur T_2 -Relaxationszeit. Mit zunehmender Molekülgröße nehmen die T_2 -Zeiten ab, die Linien werden breiter und überlappen. Zusätzlich steigt der Verlust an Phasenkohärenz.

2.2 Strukturbestimmung von Proteinen in Lösung

2.2.1 Einleitung

Die meisten NMR-Experimente an Proteinen werden in Wasser (mit einem geringen Zusatz von D₂O für den Lock) durchgeführt. In Wasser können die Amidprotonensignale des Proteinrückgrats beobachtet werden, während sie in reinem D₂O aufgrund des schnellen Austauschs verschwinden. Um die hohe Intensität des Wassersignals (die zu Problemen mit dem dynamischen Bereich des Empfängers und des Analog-Digital-Converters führt) zu unterdrücken, werden zahlreiche Methoden von einfacher Vorsättigung bis hin zu Multipulssequenzen eingesetzt (3, 29 - 31).

Da die NMR-Spektroskopie eine relativ unempfindliche analytische Methode darstellt, sind hohe Konzentrationen wünschenswert. Bei Proteinuntersuchungen werden diese jedoch von der geringen Löslichkeit und Aggregation beeinflusst. Ebenfalls nachteilig wirkt sich die niedrige Temperaturstabilität der Proteine aus, so daß eine Erhöhung der Meßtemperatur zur Verringerung der Linienbreiten und somit zur Erhöhung der Auflösung nicht möglich ist (30).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Tripelresonanz-Pulssequenzen eingeführt und optimiert, die zur Strukturbestimmung von Proteinen mit heteronuklearer multidimensionaler NMR-Spektroskopie genutzt werden (3, 29 - 30, 32). Die Einführung der drei- und vierdimensionalen NMR-Experimente und die Verfügbarkeit ¹³C,¹⁵N-markierter Proteine ermöglichten die Zuordnung der Resonanzen und die Strukturbestimmung in Lösung (33 - 36) bis zu Molekulargewichten von

25 kDa (37 - 38). Der Einsatz partiell deuterierter Proteine verlängert wesentlich die Relaxationszeiten und ermöglicht dadurch Untersuchungen von Proteinen mit Molmassen bis 30 kDa (39 - 40).

Für Proteine mit Molekulargewichten über 30 kDa nimmt die Empfindlichkeit aller Experimente als ein Ergebnis steigender T_2 -Relaxationsgeschwindigkeiten ab. Infolge der starken dipolaren Kopplungen in den C-H-Fragmenten treten diese Probleme besonders in den aliphatischen Seitenketten auf. Eine Erhöhung in der Auflösung und Empfindlichkeit in der ^{13}C -Dimension kann mit Hilfe deuterierter Proteine erreicht werden. Aufgrund des niedrigeren gyromagnetischen Verhältnisses von Deuterium im Vergleich zum Proton ($\gamma(^2\text{H}) \sim 1/6,5 \gamma(^1\text{H})$) sinkt die dipolare Kopplung in dem C-D-Fragment gegenüber dem C-H-Fragment. Dies führt zu längeren Relaxationszeiten für die ^{13}C -Spins, da eine Spindiffusion (41) weitgehend unterbunden ist.

Für Studien von Protein-Ligand-Wechselwirkungen wurde eine effiziente Technik entwickelt, die zur Identifizierung und Entwicklung hochaffiner Liganden in der pharmazeutischen Industrie genutzt wird. Diese Methode basiert auf Änderungen in der chemischen Verschiebung der Amidprotonen und der Stickstoffatome, welche mit der Titration von Bibliotheken potentieller Liganden zu einer Lösung von ^{15}N -markiertem Protein einher geht (42 - 43).

Neuere Entwicklungen verweisen auf residuale dipolare Kopplungen, die bei einer Ausrichtung des Proteins in Lösung beobachtet werden können (44 - 46). Die Winkel- und Abstandsabhängigkeit dieser residualen dipolaren Kopplungen liefern echte Strukturparameter für Bereiche größerer Entfernung. Eine andere Methode verwendet die Winkelabhängigkeit der kreuzkorrelierten Relaxation (47). In Verbindung mit NOE-basierenden Abstandsparametern bzw. mit abgeleiteten Winkelbe-

ziehungen aus den skalaren Kopplungen können sie die erhaltenen Strukturen wesentlich verbessern.

Um immer größere Moleküle mit Molekulargewichten von 50 kDa untersuchen zu können, wurden zusätzliche Techniken eingeführt, die als TROSY-Experimente bezeichnet werden (48 - 54). Sie vermindern die T_2 -Relaxation bei hohen Magnetfeldern durch gegenseitiges Aufheben der Dipol/Dipol-Relaxationsmechanismen und denen der Anisotropie der chemischen Verschiebung.

2.2.2 Zuordnung einheitlich ^{13}C -, ^{15}N -markierter Proteine

Die Korrelation der atomaren Resonanzfrequenzen mit der Konstitution des zu untersuchenden Moleküls ist die Voraussetzung für eine Strukturbestimmung durch die NMR-Spektroskopie und wird allgemein als Zuordnung bezeichnet.

Konventionelle Zuordnungsstrategien für nichtmarkierte Moleküle erfordern eine Kombination von Experimenten mit kohärentem (COSY, TOCSY) und inkohärentem (NOESY, ROESY) Magnetisierungstransfer (55). Dabei nutzt der nichtkohärente Magnetisierungstransfer die stochastisch modulierten, dipolaren Wechselwirkungen und ist von der Struktur abhängig, was besonders bei stark überlagerten Spektren zu fehlerhaften Zuordnungen führen kann.

Heteronukleare Tripelresonanzexperimente in vollständig markierten Systemen, welche ausschließlich die $^1\text{J}/^2\text{J}$ -Kopplungen als Transferwege nutzen, sind in erster Ordnung unabhängig von der Konformation (56 - 57), und daher für die Signalzuordnung komplizierter Spektren geeignet. Da die $^1\text{J}/^2\text{J}$ -Kopplungen relativ groß sind (Abbildung 2.1), er-

möglichen sie einen schnellen Kohärenztransfer, der mit dem Verlust an Magnetisierung als einem Ergebnis der Relaxation während der Pulssequenz konkurrieren kann. Der Transfer über diese Kopplungen bleibt dann selbst für relativ große Moleküle mit kurzen T_2^* -Relaxationszeiten effizient.

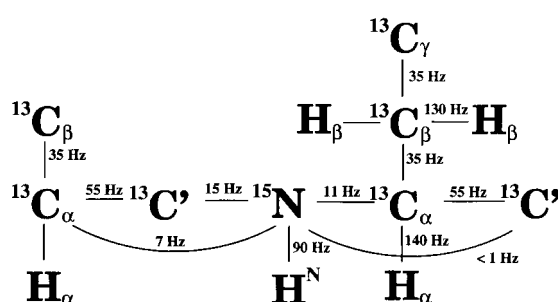


Abbildung 2.1: Spinsystem eines Peptidrückgrats mit $^1J/2J$ -Kopplungskonstanten

Die Nomenklatur für diese Tripelresonanzspektren reflektiert den Magnetisierungstransferweg der Experimente. Kerne, die in den Magnetisierungstransfer einbezogen sind, bilden den Namen des Experiments. Hingegen werden die Spins, über die nur Magnetisierung ohne Entwicklung von chemischer Verschiebung übertragen wird, in Klammern geschrieben.

Ausgehend vom HNC(O)-Experiment (58) mit der höchsten relativen Empfindlichkeit liefern eine Reihe weiterer Spektren wie z. B. HNCA (57 - 60), HN(CO)CA (61), HN(COCA)HA (58, 62), HN(CA)CO (63), H(N)CACO (64), CBCA(CO)NH (65), HBHA(CO)NH (66), HBHA(CBCA)NH (67), HBHA(CBCACO)NH (66), CBCANH (68), HNCACB (69), H(CA)NNH (70), HN(CA)NNH (71), H(NCA)NNH (71), HN(CA)H (72), HN(CA)HA (73) und HA(CAN)HN (74) die Grundlage für eine erfolgreiche Zuordnung der Resonanzen (75 - 76). Beispielsweise können aus einer Kombination vom

CBCA(CO)NH- und CBCANH-Experiment die Resonanzen des Protein-Rückgrates, inklusive den Informationen der β -ständigen Atome der Seitenketten, zugeordnet und sequentielle Konnektivitäten festgestellt werden. Diese Experimente sind relativ empfindlich und liefern die $C\alpha$ - und $C\beta$ -chemischen Verschiebungen zur Sequenzierung. Zusätzlich können daraus weitere wichtige Informationen über den Aminosäuretyp und die Sekundärstruktur abgeleitet werden (32).

Die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen ist eine Voraussetzung für die Analyse der NOE-Wechselwirkungen, welche die für Strukturrechnungen nötigen Abstandsparameter liefern. Die aliphatischen Seitenkettenspinsysteme können mit HCCH-COSY (77), HCCH-TOCSY (78 - 79), HNCCH-TOCSY (80), C(CO)NH (81) und H(CCO)NH (81) identifiziert werden. Daraus werden die $H\alpha/\beta$ - und $C\alpha/\beta$ -chemischen Verschiebungen verwendet, um die Seitenkettenspinsysteme mit den zugeordneten Rückgratresonanzen zu verbinden.

Für die Zuordnung der aromatischen 1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen wurden spezielle Experimente entwickelt (82). Die Zuordnung dieser Resonanzen ist besonders wichtig, wenn die aromatischen Seitenketten an NOE-Kontakten beteiligt sind, die eine Tertiärstruktur definieren (32).

Die chemischen Verschiebungen der Rückgratatomme sind sehr empfindliche Größen bezogen auf die Konformation der Proteine (83 - 87). Daher wurden Methoden entwickelt, um Informationen über die Sekundärstruktur der Proteine aus den $^1H\alpha$ - und $^{13}C\alpha$ -chemischen Verschiebungen (88) bzw. anhand der $^1H\alpha$ -, $^{13}C\alpha$ -, $^{13}C\beta$ - und $^{13}C'$ -chemischen Verschiebungen (89 - 90) zu erhalten.

Ebenfalls wurden Analogien in den chemischen Verschiebungen der Rückgratatomme von sequenzhomologen Proteinen gefunden, die bei der

Zuordnung von neuen Proteinen (91) oder zur Vorhersage der ϕ - und ψ -Rückgratwinkel (92) genutzt werden können.

Als zusätzliche Parameter zur Bestimmung der Sekundärstruktur werden die $^3J(\text{H}^{\text{NH}}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten genutzt (93). Diese sind von dem Torsionswinkel ϕ abhängig und liegen für α -Helices zwischen 3 und 5 Hz bzw. für β -Faltblattstrukturen zwischen 8 und 12 Hz (30).

Weiterhin weisen typische NOE-Muster Sekundärstrukturelemente nach. Eine α -Helix wird durch fortlaufende Serien von starken bis mittleren NOEs ($d_{\text{NN}}(i, i+1)$, $d_{\alpha\text{N}}(i, i)$, $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$), von mittleren bis schwachen NOEs ($d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$, $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$, $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$) und von schwachen NOEs ($d_{\text{NN}}(i, i+2)$, $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$) gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu weisen β -Stränge einige charakteristische NOEs auf. Der $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ ist meist stärker als der $d_{\alpha\text{N}}(i, i)$, und der $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ ist schwach bzw. fehlt. In Abhängigkeit, ob parallele oder antiparallele β -Stränge vorliegen, können zusätzliche NOEs ($d_{\alpha\alpha}(i, j)$, $d_{\text{NN}}(i, j)$ und $d_{\alpha\text{N}}(i, j)$) beobachtet werden (30).

2.2.3 Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Da die NMR-Parameter eines Proteins von dessen dreidimensionaler Struktur und seinen dynamischen Eigenschaften abhängen, stellt die NMR-Spektroskopie eine gute Methode dar, Protein-Ligand- und Protein-Protein-Wechselwirkungen zu studieren (94 - 98).

Diese Protein-Ligand-Wechselwirkungen können mit Konformationsänderungen sowohl im Protein als auch im Liganden verbunden sein. Die NMR-Signale verändern dadurch meist ihre Linienbreite und ihre Position im Spektrum. Wird das Protein beobachtet, können nach erfolgter Zuordnung der Signale die Abschnitte im Protein identifiziert

werden, welche die Bindungstasche bilden. Bei Beobachtung des Liganden können Rückschlüsse für den Entwurf von verbesserten Liganden gezogen werden (96).

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen wird der Ligand zu einer definierten Proteinmenge titriert und verschiedene NMR-Parameter können als Funktion des Protein-Ligand-Verhältnisses beobachtet werden. Hauptsächlich handelt es sich dabei um die chemischen Verschiebungen und um die Signalintensitäten. Die chemischen Verschiebungen sind sehr empfindliche Indikatoren für den Ladungszustand des Liganden und die Umgebung in der Bindungstasche (96).

Aufgrund des hohen Molekulargewichts vieler Protein-Ligand-Komplexe können Kopplungskonstanten nur sehr selten beobachtet werden (96). Änderungen in den T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten geben Einblicke in die dynamischen Aspekte der Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Mit Hilfe von NMR-Diffusionsmessungen können aus den Koeffizienten die Bindungskonstanten bestimmt werden (99). Zusätzliche Informationen über die Bindungskonformation des Liganden können aus Transfer-NOE-Experimenten abgeleitet werden (96).

Voraussetzungen für derartige Untersuchungen sind große Mengen an Protein, die für NMR-spektroskopische Untersuchungen stabil sind. Zusätzlich sollte der Ligand im gleichen Lösungsmittel in hohen Konzentrationen löslich sein, um große Verdünnungen der Proteinprobe im Laufe der Titration zu vermeiden. Der nachzuweisende Protein-Ligand-Komplex muß auf der NMR-Zeitskala stabil sein.

2.3 Festkörper-NMR-Spektroskopie an Membranproteinen

2.3.1 Einleitung

Die Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie erfordert schnelle isotrope Molekülbewegungen, um die starken orientierungsabhängigen Wechselwirkungen auszumitteln. Aus diesem Grund ist ihr Einsatz für Untersuchungen von natürlichen Membranen problematisch. Besonders gut ist jedoch die Festkörper-NMR-Spektroskopie geeignet, deren Methoden für die Untersuchung immobiler und anisotroper Systeme optimiert wurden (16, 21, 100).

In Festkörpern dominieren die orientierungsabhängigen Spinwechselwirkungen und das Relaxationsverhalten der Spinsysteme die NMR-Spektren. Die unvollständige Ausmittlung dieser Wechselwirkungen aufgrund anisotroper Molekülbewegungen führt zu Spektren, die auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Anisotropien der chemischen Verschiebungen (entstehen von der Asymmetrie in der Elektronendichte um den Atomkern) und Quadrupolwechselwirkungen basieren. Da in kristallinen Festkörpern und amorphen Systemen alle Molekülorientierungen vorhanden sind, werden Spektren mit Linienbreiten von mehreren kHz erhalten.

Die kurzen T_2 -Zeiten verhindern Pulssequenzen zur Entwicklung von Multiquantenkohärenzen, wie sie in der Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie eingesetzt werden. Die langen T_1 -Zeiten bedingen lange Wartezeiten zwischen den *Scans*, damit das Spinsystem in sein thermisches Gleichgewicht zurückkehren kann.

Aufgrund der anisotropen Wechselwirkungen werden detaillierte, strukturelle und dynamische Studien erschwert. Gleichzeitig liegt darin

der Vorteil der Festkörper-NMR-Spektroskopie, diese Besonderheiten beobachten zu können (101 - 102).

Für Strukturaussagen stehen zwei komplementäre Methoden zur Verfügung. Zum einen können die tensoriellen Wechselwirkungen, die auf anisotrope Molekülbewegungen zurückzuführen sind, gemessen werden (101). Zum anderen werden MAS-Techniken (103) oder Techniken der Spin-Entkopplung (104) zur Ausmittelung der Tensorwechselwirkungen verwendet, so daß nur die isotropen Anteile der chemischen Verschiebung und die J-Kopplungen erhalten bleiben. Durch Kombination dieser Methoden ist es im Prinzip möglich, alle notwendigen Strukturparameter zu erhalten.

Für die meisten NMR-spektroskopischen Studien von Proteinen werden die ^1H -, ^{15}N - und ^{13}C -Kerne benutzt. Aufgrund ihres größten magnetischen Moments, sind die Protonen die empfindlichsten von diesen drei Kernen und prinzipiell am besten geeignet. Ihre hohe natürliche Häufigkeit und ihr großes Dipolmoment sind allerdings auch die Hauptprobleme in starren Systemen (101). Die starke homonukleare dipolare Kopplung zwischen vielen Protonen ermöglicht eine sehr schnelle Spindiffusion in alle Teile des Spinsystems. Diese führt zu homogenen Verbreiterungen der ^1H -Spektren (103, 105 - 106), deren die Linienbreiten nicht einfach durch MAS und homonukleare Entkopplungssequenzen reduziert werden (103 - 104, 106 - 107) können.

Die ^{13}C - und ^{15}N -Spektren von starren Systemen werden hingegen von der Anisotropie der chemischen Verschiebung und der heteronuklearen Dipol-Dipol-Wechselwirkung dominiert. Die relativ niedrige natürliche Häufigkeit der ^{13}C -Isotope von etwa einem Prozent ist noch ausreichend für die Detektion und gleichzeitig niedrig genug, um Probleme mit ho-

monuklearen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zu vermeiden. Hingegen erfordern die geringe natürliche Häufigkeit und das kleine gyromagnetische Moment der ^{15}N -Kerne eine Isotopenanreicherung (101).

Allgemein wird eine starke Protonenentkopplung genutzt, um klare Pulverspektren für spezifisch angereicherte Proben zu erhalten. Aus diesen Spektren können dann die Tensorhauptachsenwerte der chemischen Verschiebung bestimmt werden (108). Die ^1H - ^{15}N -dipolare Aufspaltung wird für die Bestimmung der Orientierung von Peptidbindungsebenen in orientierten Proben herangezogen (5, 6, 109).

MAS-NMR-Studien werden allgemein mit Kreuzpolarisation und Hochleistungs-Protonenentkopplung kombiniert, um hochaufgelöste Spektren zu erhalten, die nur die isotropen chemischen Verschiebungen enthalten. Aufgrund der großen Anzahl nichtäquivalenter Kohlenstoffatome in Proteinen sind die ^{13}C -Kerne am besten für strukturelle Studien von Membranproteinen geeignet. Eine 10 %ige unspezifische Anreicherung verbessert das Signal-Rausch-Verhältnis signifikant ohne zunehmenden Einfluß der homonuklearen dipolaren Kopplungen (101). Der Nachteil einer allgemeinen Beobachtung von ^{13}C -Kernen in der Festkörper-NMR-Spektroskopie ist die lange Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 (101).

Vielen Methoden zur Untersuchung von Membranproteinen mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie basieren auf einer makroskopischen Probenorientierung. Dafür ist es erforderlich, die Ausrichtung der Phospholipide in Doppelschichten zu prüfen. Die Anisotropie der ^{31}P -chemischen Verschiebung ist ein guter Indikator und wird aus statischen Festkörper-NMR-Spektren bestimmt (110). Für Phospholipide, die sich einer schnellen Rotation um eine Achse senkrecht zur Ebene der Doppelschichten unterziehen, ist der CSA-Tensor axialsymmetrisch

mit den Hauptachsenwerten σ_{\perp} und σ_{\parallel} . Für durchschnittliche, unorientierte Lipiddispersionen werden breite strukturlose Pulverspektren erhalten, deren spektrale Breite durch $\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$ beschrieben wird. Für ein spezielles Phospholipid in einer orientierten Doppelschicht in der $L\alpha$ -Phase besteht das ^{31}P -NMR-Spektrum aus einer Resonanzlinie, deren Frequenz ν_{CSA} mit dem Winkel θ zwischen der Membrannormalen und dem magnetischen Feld gemäß $\nu_{\text{CSA}}(\theta) = (2/3 \Delta\sigma) (3\cos^2\theta - 1)$ zunimmt (111).

2.3.2 Statische NMR-Spektroskopie

Die orientierungsabhängigen Größen sowie die Abstandsabhängigkeit der dipolaren Kopplung liefern Informationen über das zu untersuchende System, die in Lösungen aufgrund der schnellen unorientierten Molekülbewegungen verloren gehen (101).

Die häufig verwendete Methode zur Untersuchung von Proteinen mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie ist die von Opella und Mitarbeitern (6, 112 - 117) entwickelte Technik zur Nutzung der Anisotropie der chemischen Verschiebung und der heteronuklearen dipolaren Kopplungen. Dazu wird das in die Membran rekonstituierte Protein auf dünne Glasplättchen gleichmäßig aufgetragen und hydratisiert. Anschließend werden diese Glasplatten gestapelt und in einem speziell konstruierten Probenkopf mit flacher Spule untersucht. Bei vollständiger Orientierung des Proteins in der Membran reduziert sich die Linienbreite im Spektrum deutlich gegenüber dem unorientierten Pulverspektrum. Aus den erhaltenen Parametern können die Orientierung

der Peptidbindungsebenen im Proteinrückgrat und somit die Orientierung von α -helikalen Domänen in Membranen abgeleitet werden.

Weiterhin wurde von Opella und Mitarbeitern (118) ein Experiment entwickelt, um die $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -dipolare Kopplung mit der ^{15}N -chemischen Verschiebung in einem 2D-Spektrum zu korrelieren. Diese PISEMA-Spektren liefern eine verbesserte Auflösung in der Dimension der dipolaren Kopplungen. Eine Ausdehnung zu einer dritten Dimension durch Einbeziehung der ^1H -chemischen Verschiebung verbesserte zusätzlich die Auflösung der ^{15}N -Resonanzen (119 - 120).

Neueste Arbeiten beschreiben charakteristische Muster in PISEMA-Spektren von orientierten ^{15}N -markierten Peptiden in Membranen. Diese sogenannten PISA-*wheels* reflektieren die helikalen *wheel*-Projektionen der Aminosäurereste von transmembranen und planaren Helices und liefern daher direkte Hinweise auf die Sekundärstruktur und die Topologie der Membranproteine in Phospholipiddoppelschichten (121).

2.3.3 MAS-NMR-Spektroskopie und Kreuzpolarisation

Das *Magic Angle Spinning* ist eine Technik, die von Andrew und Lowe (122 - 124) zur Unterdrückung der Dipol-Dipol-Kopplungen in Festkörper-NMR-Spektren entwickelt wurde. Sie ist sehr effektiv, wenn die Größe der Kopplungen und Anisotropien kleiner ist, als die erreichbaren Rotationsgeschwindigkeiten.

Sowohl die dipolare Kopplung als auch die Anisotropie der chemischen Verschiebung kann in richtungsabhängige und richtungsunabhängige Einflüsse zerlegt werden. Um in polykristallinen Proben eine räumliche

Ausmittlung dieser Wechselwirkungen zu erreichen, müssen die orientierungsabhängigen Einflüsse durch mechanische Probenrotation um den magischen Winkel eliminiert werden. Bezogen auf das äußere Magnetfeld gilt für den richtungsabhängigen Anteil, ausgedrückt in Termen des Rotationswinkels der Probe $(3\cos^2\beta - 1) = 0$. Diese Gleichung ist erfüllt, wenn $\beta = 54,7^\circ$ ist.

Die resultierenden MAS-Spektren bestehen im Idealfall aus schmalen Resonanzlinien bei ihren isotropen chemischen Verschiebungen mit den isotropen J-Kopplungen. Flankiert werden sie von Rotationsseitenbänden im Abstand der Rotationsfrequenz, die durch Modulation der Richtungsabhängigkeit bei der Probenrotation entstehen (101).

Aufgrund der starken homonuklearen, dipolaren Kopplungen zwischen den Protonen werden nur unter Umständen hochaufgelöste ^1H -MAS-NMR-Spektren erhalten. Im Gegensatz zu den inhomogenen Hamilton-Operatoren, welche die Anisotropie der chemischen Verschiebung und die heteronukleare dipolare Kopplung beschreiben, ist der Hamilton-Operator für die homonukleare dipolare Kopplung homogen (103). Dadurch kann er nicht durch MAS ausgemittelt werden, wenn die Rotationsgeschwindigkeit kleiner ist als die dipolare Kopplung (i. a. über 30 kHz).

Die erforderliche Isotopenanreicherung ist für die ^{15}N -Kerne aufgrund ihrer hohen Verdünnung im Protein leicht möglich. Für die ^{13}C -Kerne ist es wesentlich schwieriger, da die Membranlipide und die vielen Kohlenstoffatome im Protein zu einem sehr komplexen Hintergrundspektrum führen (101).

Zur Verbesserung der Signalintensitäten von unempfindlichen Kernen in Festkörper-NMR-Spektren wurde das Kreuzpolarisationsexperiment eingeführt. Dazu werden die starken dipolaren Kopplungen zwischen

den Kernen mit niedriger natürlicher Häufigkeit und den Protonen ausgenutzt. Die Kreuzpolarisation wird häufig mit der MAS-Technik kombiniert (125).

Das Kreuzpolarisationsexperiment in Festkörpern verläuft in drei Stufen (100):

1. Die Spintemperatur (126) des häufigen ^1H -Spinreservoirs wird durch einen 90°_x -Puls gesenkt.
2. Der Polarisationsstransfer erfolgt von dem häufigen ^1H -Spinreservoir auf das seltene X-Spinreservoir durch Energieanpassung. Dies wird durch gleichzeitige Einstrahlung eines Spin-Lock-Felds auf beide Spintypen erreicht. Die Transfargeschwindigkeit ist maximal, wenn die Hartmann-Hahn-Bedingung $\gamma_{\text{H}}B_{\text{H}} = \gamma_{\text{X}}B_{\text{X}}$ erfüllt ist.
3. Nach Abschalten des Spin-Lock-Felds auf dem X-Spin wird dieser beobachtet. Der Spin-Lock auf dem ^1H -Spin wird während der Detektion der X-Spins aufrecht erhalten. Dadurch wird der FID nicht von der heteronuklearen dipolaren Kopplung beeinflusst, die FT liefert ein dipolar entkoppeltes Spektrum von X.

Am Ende der Spin-Lock-Periode auf ^1H wird mit einem 90°_x -Puls die verbliebene kohärente Magnetisierung zurück in die z-Richtung geklappt.

Die Verbesserung des X-Spin-Signals ist proportional zu $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{X}}$. Ein weiterer Vorteil ist, daß mehrere Spektren mit kürzeren Wartezeiten akkumuliert werden können, da $T_1(\text{H}) < T_1(\text{X})$ ist. Dabei ist es nicht notwendig, eine vollständige Repolarisation des ^1H -Spinreservoirs abzuwarten, da nicht die gesamte Magnetisierung transferiert wird.

Der Kreuzpolarisationstransfer ist in starren Systemen besonders effizient, da die dipolare Kopplung in Systemen mit größerer Beweglichkeit teilweise ausgemittelt und somit die Magnetisierung nur noch unvoll-

ständig übertragen wird. Daher kann die Kreuzpolarisation auch indirekt für dynamische Untersuchungen als „Filter“ genutzt werden (127 - 129). Diese Experimente beruhen auf der Tatsache, daß relativ unbewegliche Protonen viel schneller relaxieren als frei bewegliche und somit einen Effizienzunterschied im Polarisationstransfer aufweisen. Dabei ändert sich die Signalintensität als Funktion der Kontaktzeit (130).

2.3.4 MAOSS-Experimente

Werden die Rotationsgeschwindigkeiten kleiner als die dominierenden inhomogenen anisotropen Wechselwirkungen gewählt, weist das MAS-Spektrum schmale, gut aufgelöste Rotationsseitenbanden neben der isotropen Linie auf. Eine Intensitätsanalyse dieser MAS-Seitenbanden (103, 131 - 132) liefert die Hauptachsenwerte des chemischen Verschiebungstensors sowie die isotrope chemische Verschiebung. Diese Werte sind stark von der Konformation des Moleküls abhängig. Mit Hilfe moderner MAS-Methoden können auch Abstands- und Torsionswinkel-Zwänge aus nicht orientierten Systemen abgeleitet werden (5). In MAS-Spektren von orientierten Schichten zeigen die Seitenbandenintensitäten eine zusätzliche Abhängigkeit von der Orientierung des Proteins in der Membran (133).

Zur Messung dieser Abhängigkeit entwickelte Glaubitz (134) eine Methode zur Anwendung der MAS-NMR-Spektroskopie auf orientierte Membranen (MAOSS). Dazu wird das Lipid-Protein-Gemisch gleichmäßig auf dünnen Glasplättchen verteilt (135 - 136). Anschließend werden diese in einem MAS-Rotor gestapelt, welcher im Spektrometer langsam um den magischen Winkel rotiert (Abbildung 2.2). Dadurch sind die

Richtungen aller anisotropen Wechselwirkungen in bezug auf die Proteinstruktur festgelegt. Die Orientierung des Proteins in der Membran kann bestimmt werden, wenn die Lage des Hauptachsensystems der gewählten NMR-Wechselwirkung (Dipol-, Quadrupolkopplung oder Anisotropie der chemischen Verschiebung) in der Molekülstruktur bekannt ist (137).

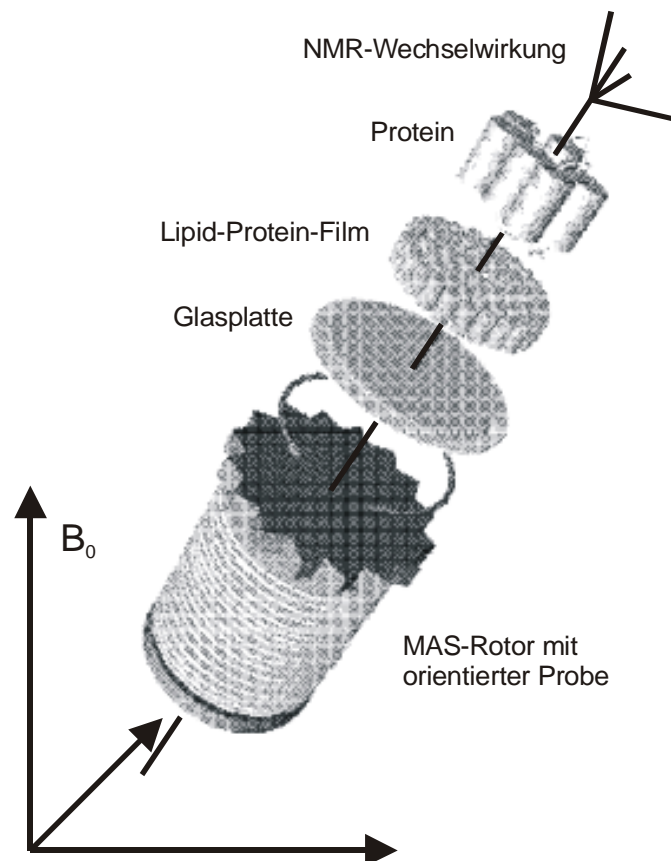


Abbildung 2.2: Experimenteller Aufbau für MAOSS-Experimente (137)

Die Probenorientierung verursacht bereits unter statischen Bedingungen eine deutliche Reduktion der Linienbreite. Durch langsame Probenrotation können zusätzlich Linienverbreiterungen im Spektrum

unterdrückt werden, die auf verbliebene Unordnungen im System zurückzuführen sind. Diese niedrigen Rotationsgeschwindigkeiten bewirken noch keine Zerstörung der Probe, da die wirkenden Zentrifugalkräfte zu gering sind (134). Dennoch sind die niedrigen Rotationsgeschwindigkeiten ausreichend, um hochaufgelöste MAS-NMR-Spektren zu erhalten.

Für MAOSS-Experimente werden kommerzielle Probenköpfe eingesetzt. Diese sind wesentlich empfindlicher als eigens konstruierte und liefern somit deutlich höher aufgelöste Spektren.

3 Untersuchungen an dem Membranprotein EmrE

3.1 Membranen und Membranproteine

Zellmembranen sind asymmetrische, flüssig-kristalline Strukturen, die hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen in einem Gewichtsverhältnis von 1:4 bis 4:1 bestehen (2). Ebenfalls enthalten sie Kohlenhydrate, die mit Lipiden und Proteinen verknüpft sind (Abbildung 3.1). Die Dicke der meisten Membranen liegt zwischen 6 und 10 nm. Der hydrophobe Kern von Membranen ist etwa 3 nm breit und kann von einer α -Helix aus 20 Aminosäureresten überbrückt werden (138).

Membranlipide sind relativ kleine Phosphoglyceride mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Anteil. Sie bilden in wäßrigen Medien spontan geschlossene, meist bimolekulare Schichten aus. Diese Lipiddoppelschichten stellen Barrieren für die Passage polarer Moleküle dar. Um einen selektiven Signal- und Stofftransport durch diese Schichten zu gewährleisten, sind in ihnen spezifische Membranproteine eingebettet, die als Pumpen, Kanäle, Rezeptoren, Energieüberträger und Enzyme fungieren (2).

Die Fettsäureketten der Lipidmoleküle können in einem geordneten, starren Zustand (Gelphase $L\beta$) oder in einem relativ ungeordneten, flüssigen Zustand (flüssig-kristalline Phase $L\alpha$) vorliegen (139). Im geordneten Zustand haben alle C-C-Bindungen eine *trans*-Konformation, während im ungeordneten Zustand einige in der *gauche*-Konformation vorliegen (*trans-gauche*-Isomerisierung $\sim 10^{-11}$ s (140 - 141)). Der Phasenübergang erfolgt bei Überschreitung der Schmelztemperatur T_m , die von der Kettenlänge und ihrem Sättigungsgrad abhängt.

Die Protein- und Lipidmoleküle in der Membran werden durch nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehalten. Sie diffundieren rasch in der Membranebene ($\sim 10^{-10}$ bis 10^{-9} s (140 - 141)), wenn sie nicht durch spezifische Wechselwirkungen festgehalten werden. Dagegen bewegen sie sich sehr selten und langsam senkrecht zur Membranebene ($\sim 10^{-6}$ bis 10^{-3} s (140 - 141)). Membranen können daher als zweidimensionale Lösungen gerichteter Proteine und Lipide betrachtet werden.

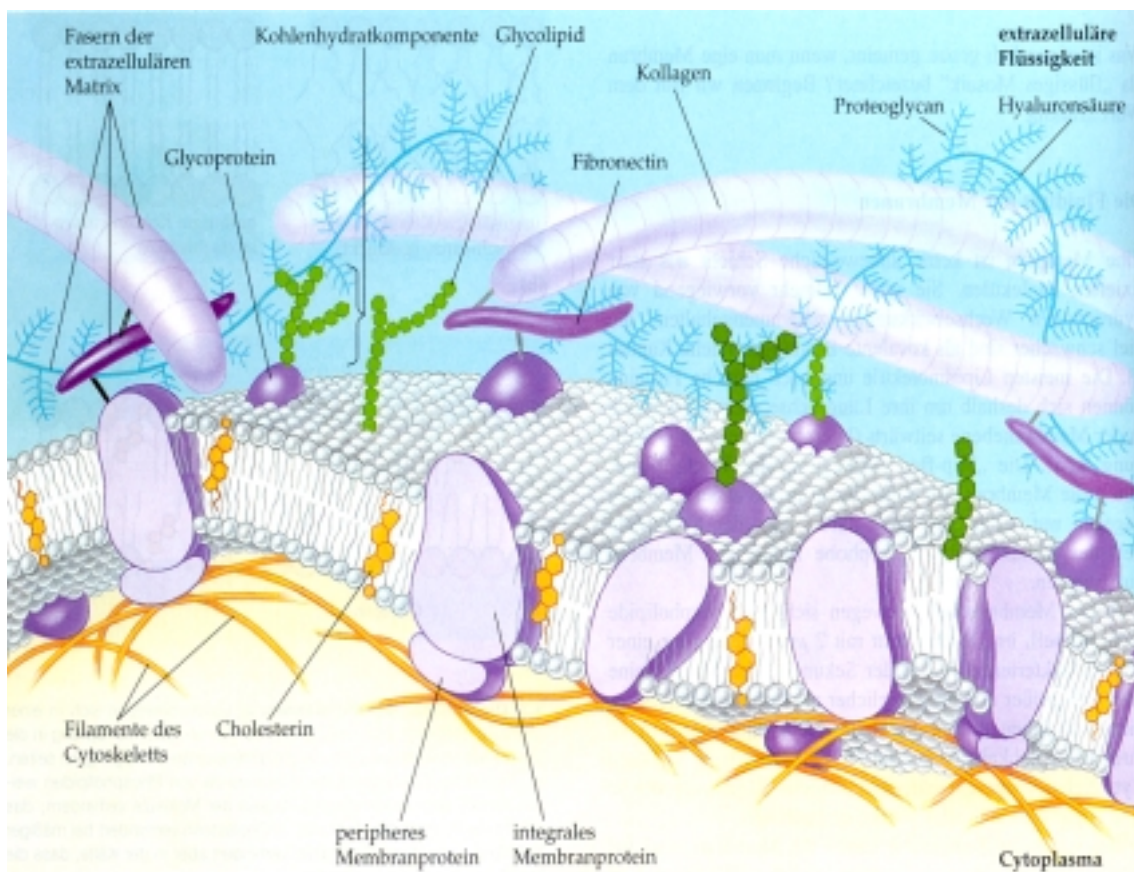


Abbildung 3.1: Struktur der Plasmamembran einer Tierzelle (Querschnitt) (1)

Membranproteine werden in periphere und integrale Proteine unterteilt. Fast alle bekannten integralen Membranproteine durchspannen die

Lipiddoppelschicht (Transmembranproteine). Dagegen sind periphere Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken an die Membran gebunden, die durch Salzzugabe oder pH-Änderungen zerstört werden können. Die meisten peripheren Membranproteine sind an die Oberfläche integraler Membranproteine gekoppelt. Andere sind über eine kovalent gebundene, hydrophobe Kette in der Lipiddoppelschicht verankert.

Einige gereinigte Membranproteine sind in detergenzhaltiger Lösung funktionell aktiv. Wichtige Eigenschaften, wie z. B. die Aktivität von Membrankanälen oder die Wirkung eines Spannungs- bzw. pH-Gradienten, werden aber nur in der intakten Membran nachgewiesen.

Aus gereinigten Komponenten können funktionsfähige Membransysteme rekonstituiert werden. Bei Zugabe eines Proteins zu synthetischen Phospholipiden bilden sich in Lösung spontan proteinhaltige Phospholipidvesikel aus. Ein wichtiger Unterschied zwischen rekonstituierten und nativen Membranen besteht darin, daß Proteine in Vesikeln meist zufällig orientiert sind. Dennoch kann ihre Funktion in eine Richtung untersucht werden. Die Rekonstitution funktionell aktiver Membransysteme aus gereinigten Komponenten ist eine wichtige experimentelle Methode zur Aufklärung von Membranprozessen.

Kanäle (passive Transportsysteme) ermöglichen einen schnellen Ionenfluß durch Membranen in eine thermodynamisch begünstigte Richtung. Pumpen (aktive Transportsysteme) hingegen nutzen Quellen freier Energie, um den Transport anzutreiben. Dieser aktive Transport kann entweder ATP-, licht- oder aufgrund von Konzentrationsunterschieden eines bestimmten Ions gradientengetrieben erfolgen. Somit bestimmt die Änderung der freien Energie des transportierten Stoffs die Einteilung in aktive oder passive Transportprozesse. Die Transportgeschwindigkeiten durch Kanäle unterscheiden sich um Größenordnungen von denen

durch Pumpen. Generell ist der aktive Transport viel langsamer als der passive. Werden mindestens zwei Stoffe gleichzeitig transportiert, so wird zwischen Symportern und Antiportern unterschieden. Ein Symportersystem transportiert zwei Stoffe in die gleiche Richtung durch eine Membran, ein Antiportersystem in entgegengesetzte Richtungen.

Von Bakterien wird oft ein Protonengradient für den aktiven Transport von lebenswichtigen Stoffen benutzt. Dabei folgen die Protonen ihrem thermodynamischen Gradienten. In verschiedenen Versuchen an rekonstituierten Vesikeln, die nur aus dem gereinigten Membranprotein und einer Phospholipiddoppelschicht bestehen, läßt sich bei angelegtem pH-Gradienten die Transportaktivität messen.

In Bezug auf die durchgelassenen Ionen arbeiten solche Membrankanäle sehr selektiv. Sie sind im Ruhezustand geschlossen und nur während des Transports für sehr kurze Zeit (typisch: 1 ms) geöffnet. Dies geschieht durch zyklische Konformationsänderungen des Proteins, die sowohl die Orientierung als auch die Affinität der Bindungsstellen für die zu transportierenden Spezies beeinflussen.

3.2 Antibiotikaresistenz

Die Pharmakaresistenz ist eines der Hauptprobleme in der Medizin und in der Landwirtschaft. In der Medizin ist ihr Auftreten ein ernsthaftes Hindernis bei der Behandlung verschiedener Tumore und infektiöser Erkrankungen. In der Landwirtschaft ist die Kontrolle von Resistenzen gegenüber Pflanzengiften vor allem ein ökonomisches Interesse (142).

Resistenzen existierten jedoch schon lange bevor Pharmaka entdeckt wurden. Möglicherweise wurden sie entwickelt, um einer Vielzahl zyto-

toxischer Verbindungen, welche Teil der natürlichen Umgebung lebender Zellen sind, gewachsen zu sein. Nur die Organismen, die sich während der Evolution mit einer breiten Vielfalt von Verbindungen erfolgreich auseinandersetzen konnten, überleben (142). Einer der herausgebildeten Mechanismen (143) ist die Ausscheidung toxischer Substanzen durch *multidrug*-Transporter (Abbildung 3.2).

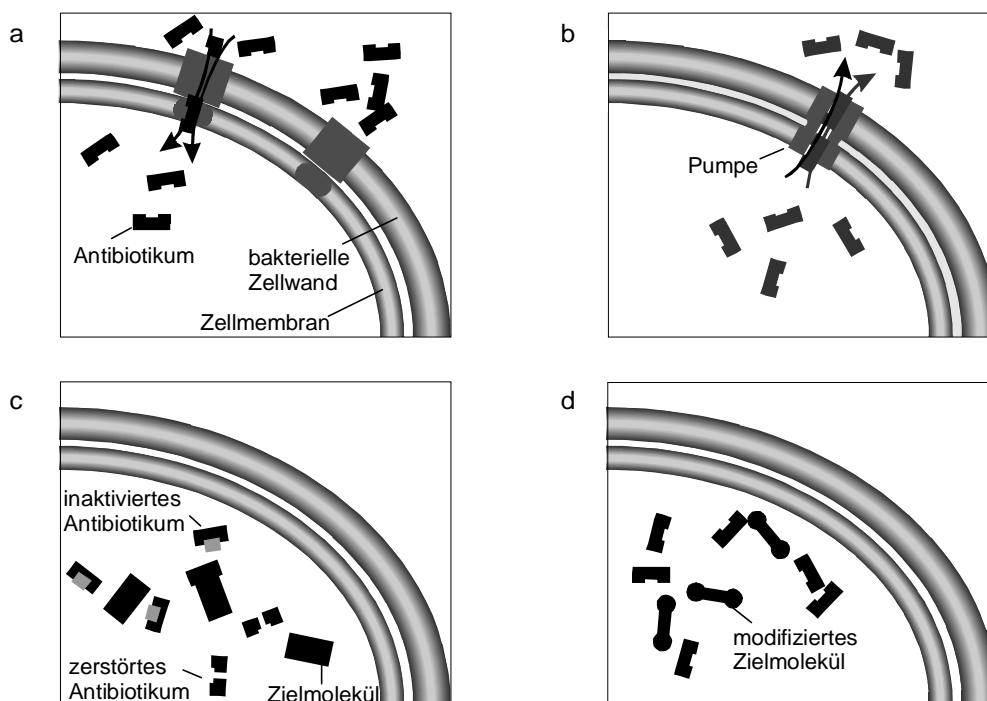


Abbildung 3.2: Verschiedene Formen der Antibiotikaresistenz: a) verminderte Permeabilität der Bakterienmembran, b) Ausschleusen des Antibiotikums, c) Inhibierung oder enzymatische Zerstörung des Antibiotikums, d) Veränderung des Zielmoleküls durch Mutation (145)

Es stellt sich die allgemeine Frage nach der wirklichen Funktion dieser Transporter. Wirken diese Proteine ausschließlich zum Schutz des Organismus gegen toxische Verbindungen oder haben sie eine andere sehr spezifische Funktion? Stellt die Funktion als *multidrug*-Transporter

nur eine unselektive Nebenwirkung dar? Die Fragestellung ist sehr komplex und gegenwärtig noch nicht vollständig zu beantworten (142).

1928 entdeckte der britische Bakteriologe Sir Alexander Fleming, daß *Penicillium notatum* eine Substanz absondert, die Bakterien abtötet. Bereits 1945 warnte er vor möglichen unerwünschten Folgen eines breiten Einsatzes von Antibiotika. Er hatte beobachtet, daß Bakterienkulturen, die anfangs gegen Penicillin empfindlich waren, plötzlich trotz gesteigerter Wirkstoffkonzentration wieder wuchsen (144).

Schon in den fünfziger Jahren bemerkten japanische Ärzte, daß einige Krankenhauspatienten an einer bakteriellen Erkrankung litten, die nicht durch die bisher bei dieser Art von Infektion wirksamen Antibiotika geheilt werden konnten. Wahrscheinlich hatten bestimmte Stämme von *Shigella* eine Resistenz gegen diese Antibiotika entwickelt. Viele Jahre später begannen Forscher die spezifischen Gene zu untersuchen, die bei vielen pathogenen Bakterien zur Antibiotikaresistenz führen. Einige dieser Gene codieren Enzyme, die bestimmte Antibiotika selektiv zerstören. Diese Resistenzgene liegen nicht auf dem Chromosom, sondern auf einer speziellen Klasse von Plasmiden, die durch Konjugation von einer Zelle auf eine andere übertragen werden können (1).

Gemäß der Evolutionstheorie nimmt die Zahl der Bakterien, die Gene für Antibiotikaresistenz besitzen, zu, da nur sensitive Bakterien mit den bekannten Antibiotika abgetötet werden. Dadurch verbreiten sich resistente pathogene Stämme immer stärker, die Behandlung bestimmter bakterieller Infektionen wird immer schwieriger (1).

3.3 Das Membranprotein EmrE

Multidrug-Transporter können viele verschiedene Substrate in einem energieabhängigen Prozeß aktiv ausscheiden und somit deren Konzentration in der Zelle senken. Aufgrund ihrer Strukturen und Eigenschaften werden solche Transporter in drei Familien unterteilt:

1. den ABC-(*ATP Binding Casette*)-Typ, der für die Resistenz von Tumorzellen verantwortlich ist und ATP für den aktiven Transport nutzt,
2. die TEXANe (*Toxin EXtruding ANtiporter*), die Resistenzen von Pilzen und Bakterien gegenüber Antibiotika bzw. Fungiziden erzeugen, zwischen 400 bis 500 Aminosäuren lang sind und als Antiporter mit Hilfe eines elektrochemischen Protonengradienten arbeiten (146),
3. die MiniTEXANe, die Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika verursachen, nur zwischen 107 und 115 Aminosäuren lang sind und in *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* und gram-negativen Bakterien identifiziert wurden. (Diese Familie wird auch als Smr-(*Small Multidrug Resistance*)-Familie bezeichnet und ist aufgrund ihrer Größe sehr gut zur Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Mechanismen geeignet (147 - 148).)

Die Identifizierung und Klonierung des *emrE*-(*Escherichia coli multidrug resistance E*)-Gens (auch als *mvrC*-(*methylviologen resistance C*)-Gen bezeichnet), welches als Voraussetzung für Resistenzen gegenüber den Zellgiften Ethidiumbromid (149) und Methylviologen (150) gilt, ermöglichte Yerushalmi et al. (8) 1995 die Expression und Reinigung des EmrE-Proteins (Abbildung 3.3).

EmrE, bestehend aus 110 Aminosäuren, ist ein stark hydrophobes 12-kDa-Protein mit einer geringen Anzahl geladener Reste, dessen Se-

quenzanalyse zur Identifizierung von vier transmembranen Segmenten führt. In ihren Studien stellten Yerushalmi et al. (8) fest, daß EmrE ein Antiporter ist, der Ethidium, Methylviologen und eine Serie anderer quarternärer Verbindungen gegen ein oder mehrere Protonen austauscht. Weiterhin fanden sie eine sehr gute Löslichkeit des Proteins in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (1:1), was sich vorteilhaft für dessen Extraktion (mehr als 85 %, keine weiteren Komponenten auf SDS-PAGE) und Reinigung erwies. Eine Rekonstitution des gereinigten Proteins in Proteoliposomen zeigte eine ΔpH -getriebene Aufnahme von Ethidium und [^{14}C]-Methylviologen in die Vesikel (Abbildung 3.3). Außerdem konnten sie durch eine konkurrierende Inhibierung der [^{14}C]-Methylviologen-Aufnahme den Transport anderer Kationen wie TPP, Acriflavin, Reserpin, Tetracyclin und MPP indirekt verfolgen.

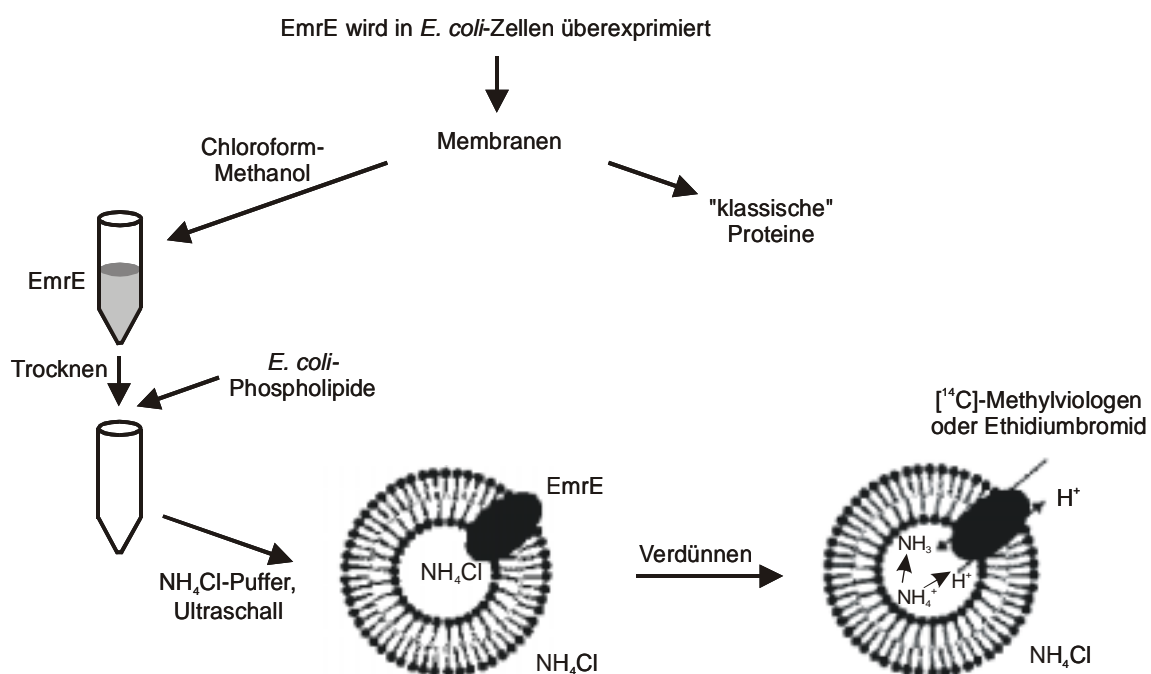


Abbildung 3.3: Reinigung und Rekonstitution von EmrE (142)

Arkin und Mitarbeiter (151) bestimmten mit Hilfe von Transmissions-FTIR- und orientierter ATR-FTIR-Spektren die Sekundärstrukturanteile und deren Orientierung in EmrE in Lösung und in Phospholipiddoppelschichten. Ihre Messungen ergaben einen α -helikalen Anteil von $78 \% \pm 5 \%$ für EmrE getrocknet aus Chloroform und Methanol bzw. von $80 \% \pm 5 \%$ in DMPC. Diese Daten stimmen sehr gut mit denen aus einer Hydrophobizitätsanalyse (152) an der EmrE-Sequenz überein, die vier transmembrane Domänen ähnlicher Größe (TM1: Y4 - M21, TM2: L30 - I54, TM3: I58 - G80, TM4: L85 - S105) lieferte. Das entspricht einem transmembranen Anteil von 78% (86 Aminosäuren). Außerdem wurden in dieser Analyse kurze, verbindende, extramembrane Schleifen vorhergesagt. Daß die Sekundärstruktur von EmrE in Lösung erhalten bleibt, stimmt mit den gefundenen Daten anderer Membranproteine im selben Lösungsmittelgemisch sehr gut überein. Begründet in der Länge der Sequenz (110 Aminosäuren) kann die Zahl der transmembranen α -Helices nicht größer als vier sein.

Weiterhin stellten sie (151) fest, daß der Amidprotonen-H/D-Austausch im rekonstituierten Protein sehr langsam, hingegen bei gelöstem EmrE quantitativ verläuft. Daraus schlußfolgerten sie einen erfolgreichen Einbau des Proteins in die Lipiddoppelschicht, der Voraussetzung für die Bestimmung der Orientierung der Helices ist. So ergaben ihre Messungen einen durchschnittlichen Neigungswinkel aller Helices gegenüber der Membrannormalen von $\beta = 27^\circ$. Dieser Wert stimmt sehr gut mit denen anderer vergleichbarer Membranproteine überein.

Weitere biochemische Arbeiten in der Gruppe von Prof. Shimon Schuldiner zur Aufklärung struktureller und funktioneller Eigenschaften von EmrE führten zu wichtigen Ergebnissen. Lebendiker et al. (153) unter-

suchten den Einfluß der drei nativen Cystein-Reste auf die Transporteigenschaften des Proteins. Ihre Studien zeigten die Unzugänglichkeit der Cysteine für geladene sowie kleine hydrophile und hydrophobe Reagenzien. Jedoch hemmt 4-Chlormercuro-Benzoesäure (PCMB) den Transport des EmrE-Wildtyps, da es als Substrat fungiert und somit die aktiven Domänen erreichen kann. Daraufhin wurde simultan jeder Cystein-Rest durch einen Serin-Rest ausgetauscht. Diese Mutante zeigte eine signifikante Substrataufnahme (mit geringerer Rate), was auf keine essentielle Notwendigkeit der Cysteine für die Transportaktivität schließen läßt. Weiterhin stellten sie Mutanten mit nur einem Cystein-Rest an jeder nativen Position her und fanden, daß nur zwei der drei Cysteine (C41 und C95, nicht aber C39) mit PCMB reagierten. 4-Chlormercuro-Benzolsulfonsäure (PCMBS), ein sehr schwacher Inhibitor, reagierte auf ähnliche Weise (mit C41 und C95, nicht aber mit C39) wie PCMB, mit C95 aber nur von der Membranaußenseite und mit C41 nur von der Innenseite. Daraus leiteten sie eine kovalente Bindung von PCMB an die zwei exponierten Cystein-Reste ab, wenn das Substrat durch das Protein geschleust wird. Hingegen konnte es nicht mit C39 reagieren, da dieses in der Helix auf der entgegengesetzten Seite relativ zu C41 liegt. Die verschiedene Reaktivität zu PCMBS deutet auf eine unterschiedliche Lage der zwei reagierenden Cystein-Reste in der Membran hin.

In weiteren Studien argumentierten Yerushalmi et al. (154) für den oligomeren Zustand des kleinsten bekannten ionengekoppelten Transportproteins mit nur vier transmembranen Helices. EmrE kann aromatische Kationen, wie Methylviologen, Ethidium, Acriflavin und Tetraphenylphosphonium (TPP), gegen Protonen austauschen (Abbildung 3.4). Bekannte Transportproteine mit ähnlichen Eigenschaften

verfügen jedoch sehr oft über 12 transmembrane Helices. Für die Untersuchungen hinsichtlich eines oligomeren Zustands des intakten Proteins sollten spezielle Mutanten dienen. Entscheidend für die Wahl der Substitutionsstellen waren die in allen MiniTEXANen konservierten Reste und zusätzlich die bedeutenden Reste im homologen Smr-Protein aus *Staphylococcus aureus*. Deshalb setzten sie drei verschiedene inaktive Mutanten (an den Stellen E14, Y60 und W63) ein und testeten ihre Funktion durch Rekonstitution der gereinigten Proteinmutanten in Proteoliposome und Messung der pH-getriebenen [¹⁴C]-Methylviologen-Aufnahme.

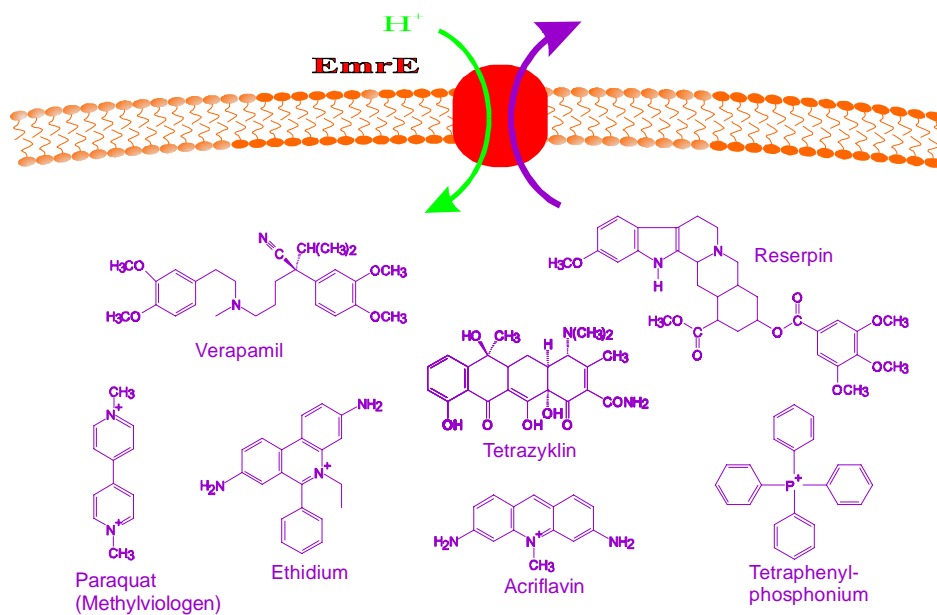


Abbildung 3.4: Ausgewählte Substrate von EmrE

Im Gegensatz zum Wildtyp zeigten die Mutanten in diesem Test keine Aktivität. Des weiteren führten sie *in vitro*-Versuche durch, in denen sie das gereinigte Protein und die verschiedenen Mutanten mischten und

rekonstituierten. Dazu wählten sie zwei verschiedene Vorgehensweisen, um mögliche Fehlerquellen weitgehend zu minimieren. In einem Versuch gaben sie unterschiedliche Mengen an inaktiven Mutanten zu einer festen Menge des Wildtyps. Im zweiten Experiment blieb die absolute Proteinmenge konstant, nur das Verhältnis zwischen Wildtyp und inaktiven Mutanten variierte. Wie erwartet, zeigten diese Tests keine Inhibierung bei niedrigen Mutantenkonzentrationen und maximale Inhibierung bei den höchsten Konzentrationen.

Daraus schlußfolgerten sie, daß Oligomere aus dem Wildtyp und den Mutanten gebildet werden müssen. Jedoch gelang ihnen keine quantitative Analyse der Daten in bezug auf die genaue Größe des Oligomers. Ursachen dafür waren zum einen die theoretische Annahme, daß bereits ein Oligomer, welches nur ein inaktives Molekül enthält, vollständig inaktiv ist. Zum anderen konnten die Rekonstitutionsexperimente nicht hinreichend reproduziert werden.

Neuere Arbeiten von Yelin et al. (155) zeigten EmrE als gutes Modellsystem für Studien an Vakuolen. Ein Protein, das als Transporter Giftstoffe aus der Zelle von Prokaryonten schleust, verleiht auch Resistenz durch Toxinabsonderung in Vakuolen eukaryontischer Zellen.

Die Studien von Steiner Mordoch et al. (156) weisen auf eine strukturelle Veränderung des Proteins während der Substrataufnahme hin. Dazu wurden, auf der Grundlage der *N*-Ethylmaleinimid (NEM)-Unzugänglichkeit der drei nativen Cysteinreste, in einer Serie 49 Aminosäurereste einzeln gegen Cystein ersetzt (Abbildung 3.5). Diese Methode zum Test der Cysteinzugänglichkeit wird häufig zum Identifizieren exponierter Reste zu hydrophilen Transportwegen ligandaktivierter Kanäle genutzt. Im Fall ionengekoppelter Transporter liefert diese Methode

transmembrane Domänen, da diese für NEM unzugänglich sind. Bei den Arbeiten an EmrE wurde weiterhin an jeder Mutante *in vivo* die Resistenz gegenüber Ethidium, Acriflavin oder Methylviologen bei der Expression und nach Reinigung und Rekonstitution *in vitro* die Transportaktivität untersucht. Insgesamt zeigten 43 dieser Mutanten ähnliche Transporteigenschaften wie der Wildtyp, 6 lieferten inaktive Mutanten bzw. konnten unter den speziellen Bedingungen nicht exprimiert werden. Möglicherweise haben diese Aminosäurereste, gemäß Abbildung 3.5, einen entscheidenden Einfluß auf die Faltung und Stabilität des Proteins.

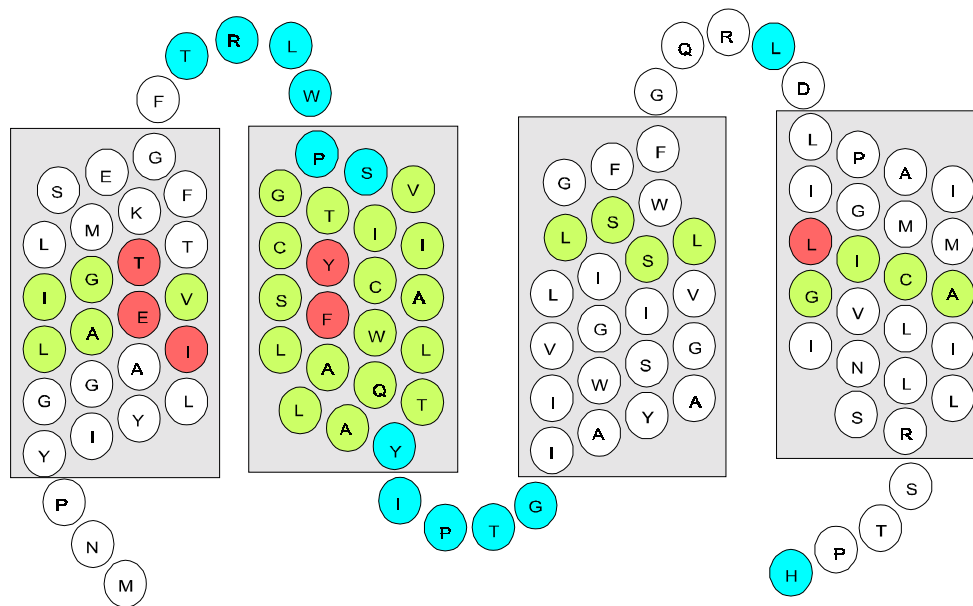


Abbildung 3.5: Sekundärstruktur von EmrE. ●: gegen Cystein substituierte Reste liefern inaktive Mutanten, ●: Reste sind nach Substitution für NEM unzugänglich, ●: Reste sind NEM-zugänglich (156).

Die Ergebnisse von Steiner Mordoch et al. (156) weisen auf ein dicht gepacktes vier-helikales antiparalleles Bündel hin, dessen Hauptteil in die

Membran eingebettet ist. Das Substrat wird während des Transports wahrscheinlich durch einen hydrophoben Kanal geschleust. Diese Bewegung erfordert einen Bruch sowie anschließende Reorganisation der existierenden Struktur. In der Literatur wird ein ähnliches Phänomen mit TPP als Substrat an BmrR, ein *multidrug*-Transporter von *Bacillus subtilis* beschrieben (157 - 158).

Neueste Untersuchungen über den Einfluß der geladenen Reste in EmrE auf seine Transporteigenschaften von Yerushalmi et al. (159) bestätigen die Notwendigkeit des hoch konservierten Aminosäurerests E14 für die Proteinaktivität von EmrE. Das Protein enthält 5 kationische (K22, R29, R82, R106 und H110) und 3 anionische Reste (E14, E25 und D84), die alle außer E14 lösungsmittelzugänglich sind. Jeder dieser Reste wurde systematisch durch Cystein bzw. einen anderen Aminosäurerest mit der selben Ladung ersetzt. Die erzeugten Mutanten wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf ihre Aktivitäten getestet. Dabei wurde festgestellt, daß die kationischen Reste für den Transportprozeß nicht essentiell sind und ohne Verlust an Aktivität ersetzt werden können. Bei Mutation der zwei anionischen Aminosäurereste E25 und D84 sank die Aktivität. Jedoch erzeugte eine Veränderung von E14 eine inaktive Mutante.

Um diese Mutationsversuche zu bestätigen, prüften sie den Einfluß der Carboxylreste mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), welches Carboxylgruppen in hydrophober Umgebung kovalent modifiziert, bzw. mit Hilfe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDAC) als hydrophiles Carbodiimid. Dabei stellten sie fest, daß die Aktivität der E25C- und D84C-Mutanten durch DCCD ähnlich wie beim Wildtyp inhibiert wurde. EDAC hatte darauf keinen Einfluß. Demnach ist der Aminosäurerest E14 für die Transportaktivität entscheidend.

Während die Mutante E14C keine Transporteigenschaften zeigt, erniedrigt E14D lediglich diese Prozesse. Daraus wird besonders die Not-

wendigkeit der negativen Ladung an der Position 14 für die Substraterkennung und den aktiven Transport deutlich, die gleichzeitig für die pH-Abhängigkeit aller Transportreaktionen verantwortlich ist. Dies zeigen die gemessenen pH-Profile, die für den Wildtyp und die Mutationen an den Positionen 25 und 84 identisch sind, jedoch für E14D erheblich abweichen.

In weiteren Studien untersuchten Muth et al. (160) die Notwendigkeit von E14 sowohl für die Substrat- und Protonenbindung als auch für die Freigabe vom Transporter. Dazu nutzen sie die hohe Bindungsaffinität von TPP. Die Untersuchungen erfolgten an EmrE mit einem zusätzlichen Myc- und His-Tag, um das detergenzgelöste Protein an einem Metallchelate-Absorbens zu immobilisieren. Daran wurde die Fähigkeit der spezifischen Bindung von [³H]-TPP geprüft und mit Ethidiumbromid bzw. Acriflavin inhibiert. Gleichfalls bestimmten sie daran die Bindungsaffinität von TPP zu Myc-His-EmrE mit einem K_D -Wert von 10 nmol und ermittelten ein Verhältnis von Myc-His-EmrE zu TPP von 1 zu 0,25 bis 0,30. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, daß EmrE einen trimeren Komplex mit einem Molekül TPP in der Bindungstasche bildet.

Um die Hypothese zu testen, daß E14 einen Teil der Bindungstasche formt und direkt mit dem Substratmolekül und / oder dem Proton bei dem aktiven Transport in Wechselwirkung tritt, bestimmten Muth et al. (160) die Aktivität der Myc-His-EmrE-E14D- und -E14C-Mutanten. Dabei zeigten Myc-His-EmrE-E14D eine sehr geringe und Myc-His-EmrE-E14C keine Aktivität. Daraus schlossen sie, daß die negative Ladung in der Bindungstasche essentiell für das zu bindende Substrat sein muß. Des weiteren überprüften sie die pH-Abhängigkeit der Substrataufnahme und -freigabe an Myc-His-EmrE und Myc-His-EmrE-E14D. Dabei stellten sie fest, daß zur Substratbindung die Freigabe von Protonen

erforderlich ist und daß die Freigabe von gebundenem TPP erst nach Protonenbindung an den Transporter erfolgen kann.

3.4 NMR-Untersuchungen in organischen Lösungsmitteln

3.4.1 Einleitung

Die Lösungsstruktur von integralen Membranproteinen kann mit den gleichen NMR-spektroskopischen Methoden bestimmt werden, wie sie für wasserlösliche Proteine gebräuchlich sind. Dafür müssen die Proteine in ein geeignetes Medium rekonstituiert werden können. Organische Lösungsmittel und kleine Detergenzmizellen sind potentielle Medien für eine NOE-basierende Strukturaufklärung. Zusätzlich kann die NMR-Spektroskopie zur Untersuchung dynamischer Eigenschaften im Zusammenhang mit allgemeinen Strukturmerkmalen und Wechselwirkungen mit anderen Molekülen genutzt werden (4).

Die hohe Hydrophobizität von Membranproteinen erfordert den Einsatz organischer apolarer Lösungsmittel. Das erste Membranprotein, welches in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol NMR-spektroskopisch untersucht wurde, war die Untereinheit *c* des F_0 -Teils der F_1F_0 -ATPase. Moleküle, die hoch amphiphile Helices bilden, aggregieren sehr oft bei hohen Konzentrationen, die für NMR-Untersuchungen erforderlich sind. Die erhaltenen Spektren sind aufgrund sehr breiter Signale nicht mehr zu interpretieren. Die Aggregation ist oft ein irreversibler Prozeß, bei dem aufgrund des hohen β -Bildungspotentials vieler apolarer Aminosäuren ausgedehnte β -Faltblatt-Strukturen gebildet werden. Im Laufe dieses Prozesses nehmen die Intensitäten der Signale des Monomers im NMR-Spektrum

ab. Neue Resonanzen des sich bildenden Aggregats werden jedoch nicht sichtbar, da die Linienbreite zu groß ist (4).

Methanol erwies sich in diesen Fällen oft als ideales Lösungsmittel. Seine sehr niedrige Viskosität führt zu kurzen Rotationskorrelationszeiten und schmalen Signalen. Außerdem können Protonenaustauschexperimente durchgeführt werden, welche wichtige strukturelle und dynamische Aussagen liefern (4). Ein langsamer Amidprotonenaustausch deutet auf feste Wasserstoffbrückenbindungen hin.

Jedoch sind bei quantitativen Schlußfolgerungen einige Fehlerquellen zu beachten. Der pH-Wert kann nicht exakt gemessen werden, da sich die Ionisation des Wassers in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln reduziert und Variationen des Wassergehalts grundlegende Effekte bedingen. In einem Gemisch aus Chloroform und Methanol ist die Konzentration katalytischer Ionen sehr gering und daher reduziert sich der Amidprotonenaustausch (4).

Aufgrund der guten Löslichkeit von EmrE in einer Mischung aus Chloroform und Methanol zogen Yerushalmi et al. (8) den Schluß, daß es für Strukturuntersuchungen mit Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie sehr gut geeignet sei, wenn seine Konformation im organischen Lösungsmittel erhalten bleibt.

Wenig später berichteten Schuldiner et al. (142), das Protein EmrE erhalte seine Sekundärstruktur in einer Lösung aus Chloroform und Methanol, was mit den Studien an der Untereinheit *c* der H⁺-F₁F₀-ATPase und am Bakteriorhodopsin übereinstimmt.

Diese zwei entscheidenden Aussagen wurden zur Grundlage einer Zusammenarbeit mit der Gruppe von Shimon Schuldiner der Hebräischen Universität von Jerusalem. Darin sollte die Struktur des Membranpro-

teins EmrE in organischen Lösungsmitteln durch die hochauflösende NMR-Spektroskopie untersucht werden. Jedoch erfordert die Untersuchung von Membranproteinen die bereits beschriebenen Besonderheiten gegenüber wasserlöslichen Proteinen. Die Nutzung eines biologisch weniger relevanten Mediums kann die Vorteile für die NMR-spektroskopischen Experimente drastisch beeinflussen.

3.4.2 Probenvorbereitung

Die für NMR-spektroskopische Untersuchungen der Proteinstruktur notwendigen EmrE-Proben wurden in der Gruppe von Shimon Schuldiner exprimiert und gereinigt. Anschließend wurden sie im getrockneten, tiefgefrorenen Zustand geliefert und erst bei Bedarf aufgelöst.

Aufgrund der spezifischen Eigenschaften von EmrE erwies es sich als sehr schwierig, für die hochauflösende NMR-Spektroskopie geeignete und reproduzierbare Probenbedingungen zu finden. Besonders die Konzentration und die Temperatur mußten hinsichtlich der Probenstabilität, Auflösung und Signalintensität im ^{15}N -HSQC-Spektrum optimiert werden. Verschiedene Lösungsmittelgemische, pH-Werte und Salzkonzentrationen wurden getestet. Als geeignetes Solvatationssystem erwies sich ein Gemisch aus d_1 -Chloroform, d_3 -Methanol und Wasser im Volumenverhältnis von 6 : 6 : 1 mit einer Salzkonzentration von 100 mM Ammoniumazetat bei einem abgeschätzten pH-Wert von 6. Die Messungen wurden bei 300 K durchgeführt, da das gelöste Protein nur in einem sehr kleinen Temperaturbereich stabil ist (9).

Trotz weitgehender Optimierung der Probenbedingungen konnte keine langfristige Stabilität der Probe erreicht werden. Im ^{15}N -HSQC-Spek-

trum kann nach wenigen Tagen eine stetige Abnahme der Signalintensität ohne Veränderung der Linienform oder Position gemessen werden. Da keine neuen Signale im Spektrum auftreten, wird angenommen, daß sich das Protein langsam in β -Faltblattaggregate umlagert. Dieses Phänomen wird in der Literatur mehrfach beschrieben und könnte mit Hilfe von Lichtstreuungsexperimenten oder Größenausschluß-Chromatographie zeitlich verfolgt werden (9).

3.4.3 NMR-Experimente

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden einheitlich ^{15}N -, einheitlich $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ - und 75% deuterierte, einheitlich $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierte EmrE-Proben verwendet und wie oben beschrieben gelöst. Die Experimente wurden bei 300 K an einem DMX-Spektrometer von Bruker bei einer Protonenfrequenz von 750 MHz durchgeführt. Die Referenzierung der ^1H -chemischen Verschiebung erfolgte mit einem internen Tetramethylsilan-Standard. Die ^{15}N - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen wurden über die Frequenzverhältnisse Ξ (161) geeicht. Weitere Parameter sind im Anhang aufgezeichnet.

3.4.4 Zuordnung und Sekundärstrukturbestimmung

Die Zuordnung der Resonanzen erfolgte nach bekannten Strategien mit Hilfe verschiedener, einheitlich ^{13}C -, ^{15}N - und ^2H -markierter Proben (9).

Lücken sind auf nachfolgend erklärte proteinspezifische Probleme zurückzuführen.

Die geringe Signaldispersion (im Bereich der Amidprotonen 1,7 ppm) und damit verbundene Überlagerungen werden durch die überwiegend α -helikale Struktur mit ihrem hohen Anteil gleichartiger hydrophober Aminosäurereste bedingt. Zusätzliche Schwierigkeiten ergeben sich aus den unterschiedlichen Signalintensitäten der einzelnen Reste. Viele Resonanzen der ersten und letzten Helix liefern scharfe, intensive Signale, hingegen weisen die Signale der mittleren zwei Helices sehr hohe Linienbreiten mit sehr geringen relativen Intensitäten auf (Abbildung 3.6).

Da das ^{15}N -TOCSY-HSQC-Spektrum (162 - 163) einer $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -markierten EmrE-Probe nur etwa 60 % der erwarteten Kreuzsignale aufweist, konnte die Zuordnung nicht direkt über TOCSY- und NOESY-Experimente (164 - 165) erfolgen. Daher wurden mit Hilfe eines HNHA-Spektrums (93) alle $\text{H}\alpha$ -Protonen bzw. mit Hilfe eines HNHB-Spektrums (166) mehr als 90 % der $\text{H}\beta$ -Protonen zugeordnet. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Sequenzierung und die ^1H -Seitenkettenzuordnung mit Hilfe des ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektrums.

Für die Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen und die Sequenzierung wurden an $[\text{U-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]$ -markierten Proben HNCA- und HNCO-Experimente (60) durchgeführt. Aufgrund der schlechten Signalintensitäten, besonders der mittleren zwei Helices, konnten nur etwa 80 % der Signale aufgeklärt werden. Zur Zuordnung der Seitenketten wurde ein HCCH-TOCSY-Spektrum (167) aufgenommen.

Die Signalzuordnung wurde durch H(CCO)NH- und C(CCO)NH-Experimente (168 - 169) an einer $[\text{75}\%^2\text{H}, \text{U-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]$ -Probe vervollständigt.

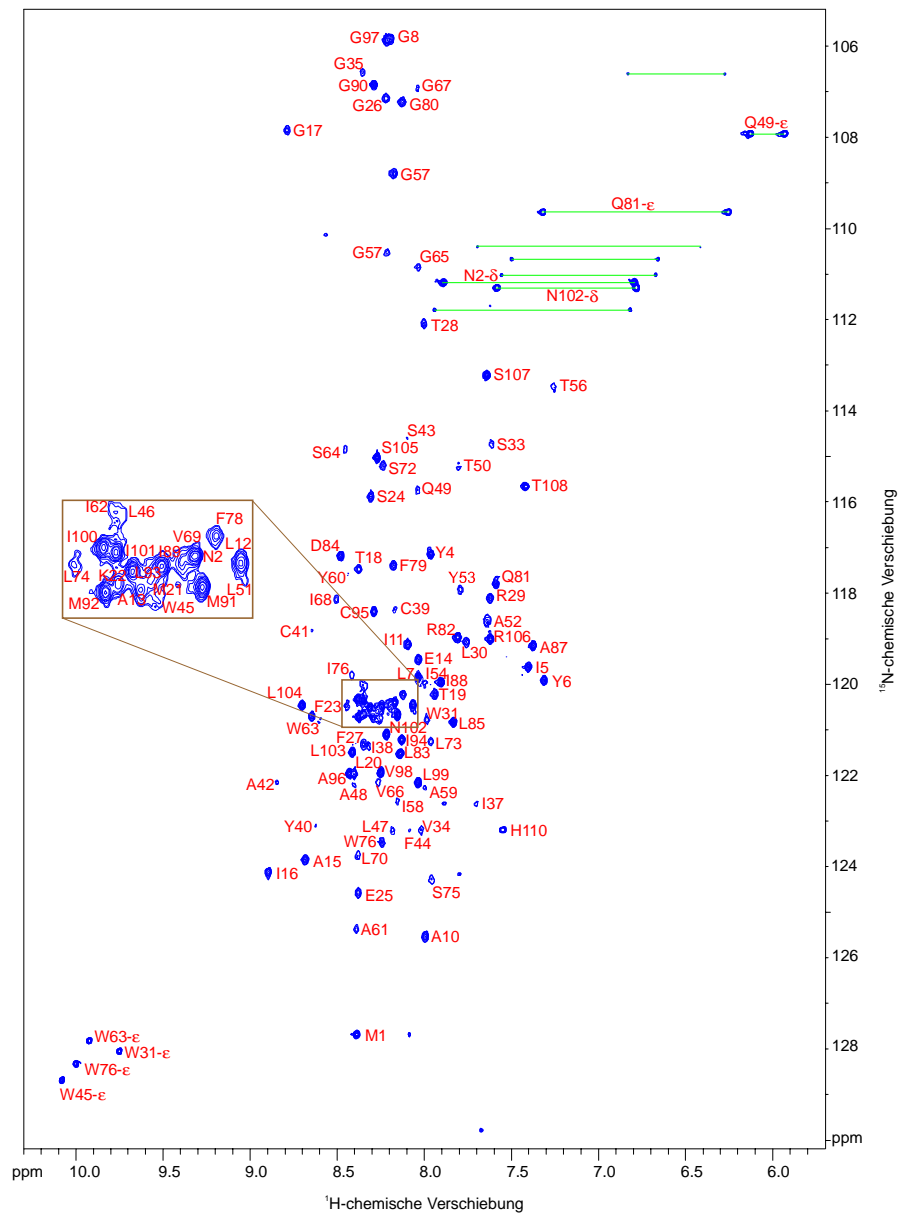


Abbildung 3.6: ^{15}N -HSQC-Spektrum (170) von EmrE bei 750 MHz

Eine qualitative Analyse der NOE-Wechselwirkungen und der $^3\text{J}(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten (93) sowie die charakteristischen Abweichungen der Rückgratresonanzen von ihren *random coil*-Verschiebungswerten geben Auskunft über die Sekundärstruktur des Proteins. Die hohe Anzahl starker $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ -NOEs sowie $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ - und $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ -NOEs wei-

sen deutlich auf eine α -helikale Sekundärstruktur hin. Unterstützt wird diese Aussage durch die typischen kleinen $^3J(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten ($< 4,5$ Hz). Zusätzlich zeigen die ermittelten Indizes der chemischen Verschiebungen (89) für $\text{H}\alpha$ ($= -1$), $\text{C}\alpha$ ($= +1$) und CO ($= +1$) eindeutig eine helikale Struktur. Die berechneten Werte für $\text{C}\beta$ ($= 0$) können nicht miteinbezogen werden (Abbildung 3.7).

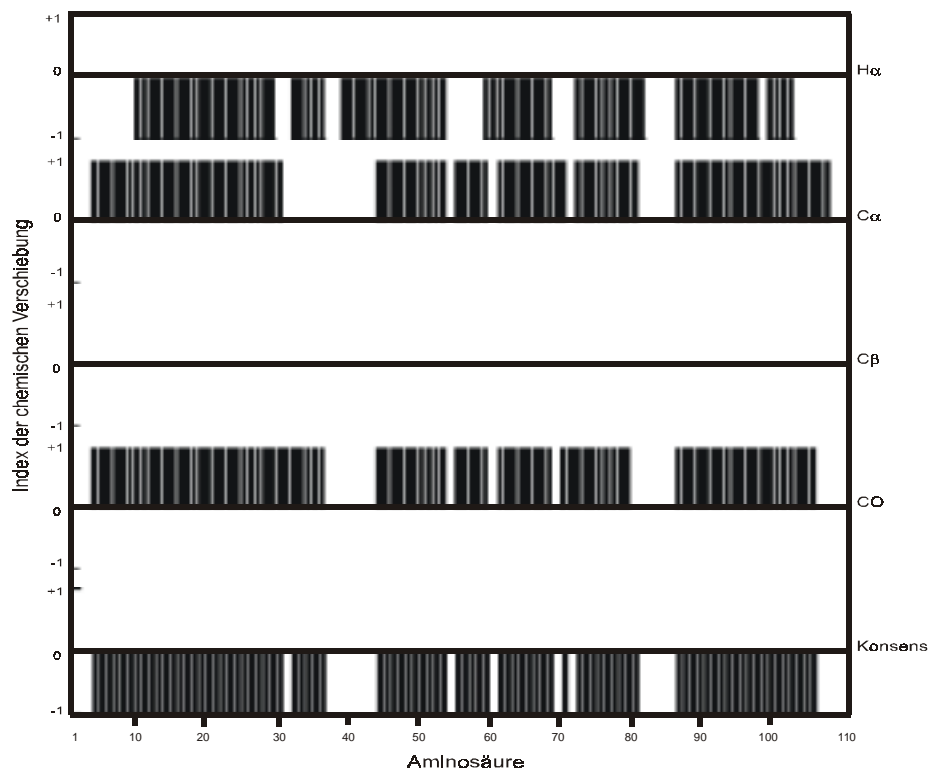


Abbildung 3.7: Index der chemischen Verschiebungen von EmrE

Zusammenfassend konnte das Sekundärstrukturmodell bestehend aus vier, annähernd gleich langen α -Helices mit kurzen Schleifen (TM1: Y4 - G26, TM2: P32 - Y53, TM3: I58 - F79, TM4: L85 - R106) durch NMR-spektroskopische Methoden in Chloroform, Methanol und Wasser bestätigt werden.

3.4.5 Bindungsstudien und Relaxationsverhalten

Die Grundlage für alle Protein-Ligand-Wechselwirkungen ist die Erkennung einer definierten Bindungsstelle durch den Liganden, damit dieser seine Funktion ausführen kann. Ein Verständnis der spezifischen Wechselwirkungen könnte ermöglichen, Liganden mit veränderten Bindungseigenschaften zu entwerfen oder aufzudecken und somit in biochemische Prozesse gezielt einzugreifen (96).

Aktivitätstests suggerierten, daß die Extraktion mit Chloroform und Methanol keine wesentlichen, irreversiblen Änderungen in der Struktur induziert (8). Daher wurden nachweislich bindende Liganden wie TPP, Ethidiumbromid und Acriflavin zu gelösten Proteinproben gegeben. Der entsprechende Ligand wurde schrittweise zur Proteinlösung (in folgenden Verhältnissen: Protein : Ligand = 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:1,5, 1:2) zutitriert.

Vor und nach jedem Titrationsschritt wurde unter exakt gleichen Meßbedingungen ein ^{15}N -HSQC-Spektrum aufgenommen. Wenn EmrE in einem aktiven Zustand im Chloroform-Methanol-Gemisch vorliegt, sollten Verschiebungen der Signale im ^{15}N -HSQC-Spektrum auftreten, da die Amidprotonen am empfindlichsten auf Veränderungen reagieren. Aus der Zuordnung dieser Signale könnte die mögliche Bindungstasche aufgeklärt werden. Zusätzlich sollte ein Endpunkt erreicht werden, an dem sich die Spektren bei weiterer Konzentrationserhöhung des Liganden nicht mehr verändern. Daraus wären Abschätzungen über die Größe des Oligomers möglich. Jedoch konnten bei allen drei getesteten Liganden keine Änderungen detektiert werden. Um Vermutungen auszuschließen, daß der Puffer bereits die möglichen Bindungsstellen

blockiert, wurden diese Studien noch einmal ohne Puffer wiederholt. Die Ergebnisse waren jedoch reproduzierbar.

Aus den von Tammo Diercks durchgeführten Relaxationsmessungen können aufgrund der schlechten und ständig abnehmenden Signalintensitäten keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Stark unterschiedliche Beweglichkeiten der vier Helices deuten darauf hin, daß es keine ausgeprägte Tertiärstruktur des Proteins in Chloroform und Methanol gibt.

Der heteronukleare $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE, gemessen bei 600 und 750 MHz, ist im Bereich der Termini (M1 - L7 und S107 - H110) sowie im Schleifenbereich zwischen TM3 und TM4 negativ bzw. deutlich niedriger als sein Maximalwert. Dies deutet für die betreffenden Bereiche auf Beweglichkeiten mit Korrelationszeiten unter 1 ns und hohen Amplituden hin. Im übrigen Bereich erreicht der $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE weitgehend seinen Maximalwert und bestätigt die aufgefundenen helikalen Sekundärstrukturen.

Messungen der T_1 - und T_2 -Zeiten der Amidstickstoffresonanzen bei 600 und 750 MHz liefern nur für TM4 und unter Einschränkung für TM1 verwertbare Ergebnisse. Für beide Helices ergeben sich aus dem Verhältnis $\frac{T_1}{T_2}$, unter Annahme der Gültigkeit des *isotrop-overall-tumbling*-

Modells, unterschiedliche Korrelationszeiten τ_c in Abhängigkeit von der Feldstärke:

	TM1	TM4
600 MHz	$\tau_c = 13,0$ ns	$\tau_c = 11,0$ ns
750 MHz	$\tau_c = 11,8$ ns	$\tau_c = 9,8$ ns.

Für TM2 und TM3 können die T_1 - und T_2 -Zeiten nur tendenziell ausgewertet werden. Ein Anstieg der T_1 -Zeiten bei gleichzeitigem Abfall der

T_2 -Zeiten liefert ein größeres Verhältnis $\frac{T_1}{T_2}$ und somit deutlich längere

Korrelationszeiten.

Aus der inversen Feldabhängigkeit von τ_c werden entweder eine große Anisotropie der molekularen Bewegung und / oder deutliche Eigenbewegungen von TM1 und TM4 gegenüber TM2 und TM3 gefolgert. Auf jeden Fall kann ausgeschlossen werden, daß langsame konformative Bewegungen von TM2 und TM3 für die beobachteten niedrigen Signalintensitäten maßgeblich verantwortlich sind, da hier keine feldabhängigen Effekte auftreten.

Des Weiteren kann aus der Größe der Korrelationszeiten eine Zusammenlagerung einzelner Helices abgeleitet werden. Es wird angenommen, daß sich in Chloroform und Methanol TM2 und TM3 relativ dicht aneinander lagern und TM1 sowie TM4 sich relativ frei bewegen. Eine Oligomerisierung ist nicht auszuschließen. Diese Schlußfolgerungen werden von den niedrigen relativen Signalintensitäten besonders von TM2 und TM3 gestützt.

3.4.6 Diskussion der Ergebnisse

Aufgrund der für NMR-Untersuchungen günstigen langen T_2 -Zeiten, die strukturelle Studien basierend auf NOE-Experimenten erlauben, wird die Wahl des Untersuchungsmediums stark zu Gunsten des biologisch fragwürdigen organischen Lösungsmittels verschoben. Aktivitätstests von Transportproteinen in isotropen Umgebungen sind allgemein unmöglich. Daher ist es auch sehr schwierig zu bestimmen, wie gut die ermittelte Konformation in Lösung die native Form des Proteins wider-

spiegelt. Da das Membranprotein EmrE nach Extraktion und Reinigung mit Chloroform und Methanol jedoch in seiner aktiven Form in Proteoliposome rekonstituiert werden kann, bedingt das gewählte Lösungsmittelgemisch keine vollständige und irreversible Denaturierung und ermöglicht weitere Untersuchungen. Die Ergebnisse der NMR-Experimente im organischen Lösungsmittelgemisch zur Ermittlung der Sekundärstruktur stimmen eindeutig mit den Daten aus Hydrophobizitätstests und aus Infrarot-Studien im organischen Lösungsmittelsystem und in Vesikeln überein. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß die α -helikale Struktur der nativen Konformation entspricht. Aussagen über eine Tertiärstruktur des Proteins können jedoch im Chloroform-Methanol-Gemisch nicht getroffen werden, da keine Weitbereichskontakte zwischen den einzelnen Sekundärstrukturelementen gefunden wurden.

Schwierigkeiten, Weitbereichskontakte zu erkennen, liegen einerseits in der sehr geringen Dispersion und hohen Überlagerung der Signale, die jedoch für ein fast vollständig helikales Protein mit sehr ähnlichen Aminosäureresten zu erwarten sind. Andererseits können für das Fehlen interhelikaler NOEs sehr kurze T_2 -Zeiten die Ursache sein, die evtl. durch Oligomerisierung und Zusammenlagerung von TM2 und TM3 bedingt werden. Unterstützt wird diese Annahme durch die reproduzierbar hohen Linienbreiten besonders im Bereich dieser zwei Helices. Konformative Austauschprozesse zeigen hingegen feldabhängige Effekte, die hier nicht beobachtet werden.

Wahrscheinlicher ist ein Zerfall tertiärer Kontakte im Lösungsmittelgemisch. Besonders bei Proteinen mit mehreren transmembranen Helices wird das Fehlen tertiärer Wechselwirkungen beobachtet, was einen entscheidenden Nachteil bei der Verwendung organischer Lösungsmittel darstellt. Ein Nachweis für interhelikale Kontakte kann

darin nicht erbracht werden (4). Negative Bindungsstudien unterstützen diese Vermutung. Experimente zur Fluoreszenzlöschung könnten ergänzend hinzugezogen werden. Außerdem deuten Aussagen von Arkin und Mitarbeitern (151) auf ähnliche Schlußfolgerungen. In ihren Arbeiten stellten sie fest, daß der Amidprotonen-H/D-Austausch im rekonstituierten Protein sehr langsam, hingegen bei in Chloroform und Methanol gelöstem EmrE quantitativ verläuft.

In diesem Teil der Arbeit mußte festgestellt werden, daß organische Lösungsmittelsysteme nicht allgemein für alle integralen Membranproteine geeignet sind. Daher wurden für weitere Untersuchungen biologisch relevantere Medien, wie z. B. Mizellen herangezogen, in denen die Methoden der Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie unter Einhaltung verschiedener Kriterien anwendbar sind.

3.5 NMR-Untersuchungen in Mizellen

3.5.1 Einleitung

Aufgrund der Ergebnisse in organischen Lösungsmitteln wurde in diesem Teil der Arbeit versucht, die Methoden der Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie auf ein System anzuwenden, welches die natürliche Umgebung eines Membranproteins besser widerspiegelt. Dazu wurde EmrE in einem, entsprechend den Aktivitätstests geeigneten Detergenz gelöst. Derartige Bedingungen erfordern einige Besonderheiten in der Durchführung von NMR-Experimenten, die im Folgenden genauer untersucht werden.

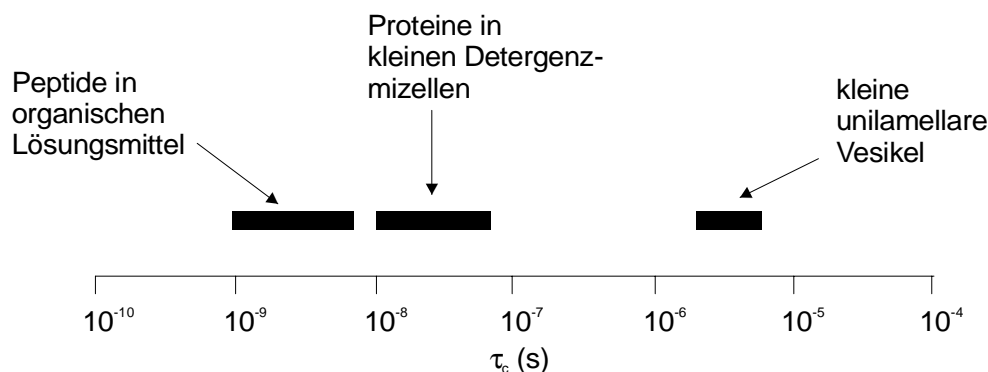


Abbildung 3.8: Korrelationszeiten für Proteine in verschiedenen deuterierten Medien (4)

Zur Lösung von Membranproteinen sind drei Medien möglich: organische Lösungsmittel, Detergenzmizellen und kleine unilamellare Phospholipidvesikel. Bei der Wahl des Mediums sind Faktoren wie Partikelgröße, biologische Relevanz, biologische Aktivität und nativer Zustand entscheidend. Die biologisch akzeptableren Medien führen zu langen Korrelationszeiten τ_c (Abbildung 3.8), welche wiederum sehr kurze T_2 -Zeiten und eine hohe Spindiffusion bewirken. Kurze T_2 -Zeiten sind jedoch besonders bei mehrdimensionalen Experimenten sehr ungünstig. Demnach sind strukturelle Studien basierend auf intramolekularen NOE-Experimenten auf Moleküle beschränkt, die in organischen Lösungsmitteln oder kleinen Detergenzmizellen gut löslich sind (4). Die ideale Mizelle sollte die native Struktur des Proteins weitgehend erhalten und eine ungeordnete, schnelle Bewegung des Lipid-Protein-Aggregats in Lösung für die Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie ermöglichen (171).

Ein entscheidender Nachteil für die NMR-Spektroskopie ist das zusätzliche Molekulargewicht der gebundenen Detergenzmoleküle. Bei der Wahl einer geeigneten Detergenzmizelle sind solche Eigenschaften wie die kritische mizellare Konzentration, die Aggregationszahl, die Mizel-

lengröße und -ladung, der pH-Wert, die Temperaturabhängigkeit, der Einfluß von Gegenionen, die Verfügbarkeit deuterierter Formen und mitunter die chemische Verschiebung von Bedeutung. Geladene Detergenzien mit linearen Alkylketten, wie z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS), denaturieren viele Proteine. Für die meisten ^1H -Experimente sind per-deuterierte Detergenzien essentiell, da diese nicht nur wichtige Resonanzsignale überlagern können, sondern auch die Spindiffusionseffekte in der Mizelle wesentlich reduzieren. Die für NMR-Untersuchungen am besten geeigneten Detergenzien bilden kleine sphärische Mizellen mit einem aggregierten Molekulargewicht von weniger als 25 kDa. In einigen Fällen erwies sich auch Dodecylmaltosid (DDM) als geeignet, welches durchschnittlich Mizellen von 60 kDa bildet (4).

Soll die Bildung von Oligomeren verhindert werden, sind hohe Detergenzkonzentrationen erforderlich. Diese konzentrierten Lösungen können jedoch sehr viskos und daher ungeeignet sein. Zur Messung der Größe des Protein-Detergenz-Komplexes sind Größenausschlußchromatographie, Ultrazentrifugation und Lichtstreuung geeignet. Die Korrelationszeit des Komplexes kann z. B. direkt aus den T_1 -Werten des α -Kohlenstoffatoms bestimmt werden. Nicht immer sind diese Komplexe homogen. Werden einheitliche, kleine Komplexe gebildet, können die Signalzuordnung und die Strukturbestimmung nach konventionellen Methoden erfolgen. Der hohe α -helikale Anteil der meisten Membranproteine bedingt jedoch kleine $\text{NH-C}^\alpha\text{H}$ -Kopplungskonstanten und eine geringe Dispersion der chemischen Verschiebung, was zu einer schlechten Auflösung in den Spektren führt. Zusätzlich ist bei der Auswertung von NOESY-Spektren darauf zu achten, daß sich mit steigenden τ_c -Werten die Spindiffusion erhöht und zu Fehlern bei den abgeleiteten Abständen führt (4).

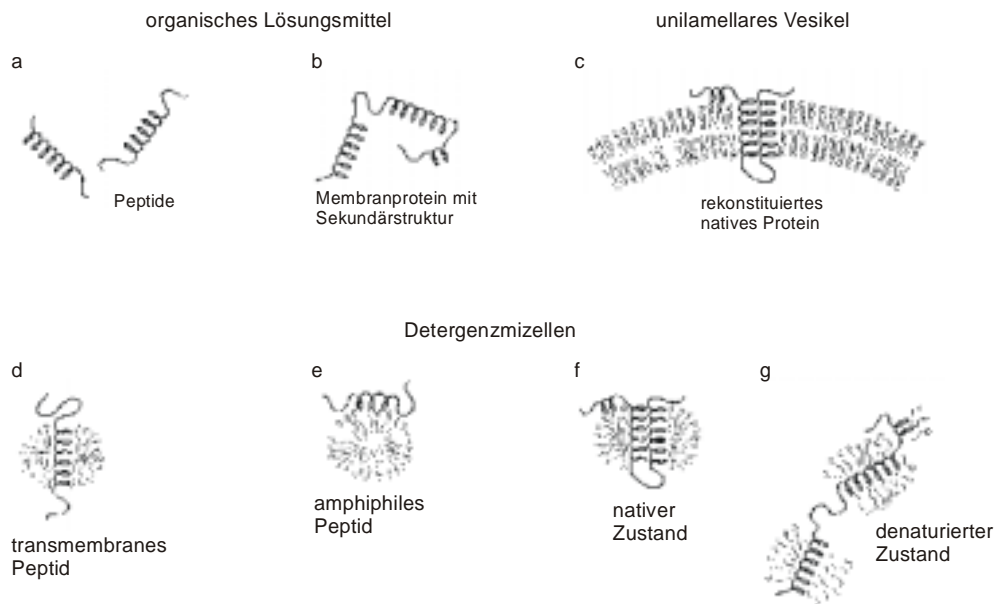


Abbildung 3.9: Untersuchungsmedien für die NMR-Spektroskopie an Membranproteinen und Peptiden (4)

Die häufigsten Schwierigkeiten bei der Verwendung von Detergenzien zur Untersuchung von Membranproteinen sind die Induktion nicht nativer Sekundärstrukturen und der Zerfall von tertiären Wechselwirkungen (Abbildung 3.9). Besonders bei Proteinen mit mehreren transmembranen Helices wird das Fehlen tertiärer Wechselwirkungen beobachtet. Dies ist wahrscheinlich ein entscheidender Nachteil bei der Verwendung organischer Lösungsmittel, in denen kein Nachweis interhelikaler Kontakte detektiert werden kann. Gleiche Probleme können auch in Detergenzien auftreten, wenn die Wechselwirkungen zum Detergenz denen zum Protein bevorzugt werden (4).

Für Untersuchungen von aktiven Membranproteinen in Mizellen ist es wichtig, über genaue Kenntnisse des oligomeren Zustands des Proteins zu verfügen. Diese Aussagen können beispielsweise mit *cross-linking*-Experimenten getroffen werden. Liegt das Protein auch in Mizellen als

Oligomer vor, kann der Protein-Mizellen-Komplex die Grenzen für die Molmasse leicht überschreiten. In den NMR-Spektren werden, abgesehen evtl. vom His-Tag, zu wenige Signale erhalten. Dies kann durch einen zu schnellen Austausch der Amidprotonen mit Wasser erfolgen, was jedoch bei Einbau des aktiven integralen Membranproteins in die Mizelle vernachlässigbar klein sein sollte. Wesentlich wahrscheinlicher ist die Überschreitung der Größe des Lipid-Protein-Aggregats, welche die Linienbreite der Signale von unbeweglicheren Teilen des Proteins sehr stark erhöht. Daher ist es sehr wichtig, das Gewicht des Komplexes im Vorfeld möglichst genau zu bestimmen. Dabei ist darauf zu achten, daß die Anzahl der Detergenzmoleküle, die eine proteinhaltige Mizelle bilden, nicht detergenzspezifisch ist. Somit können keine allgemeinen Aussagen getroffen werden, sondern die Größe muß für jeden Komplex neu bestimmt werden. Ist der Komplex zu groß, können einige Parameter (Detergenz-Protein-Verhältnis, Salzkonzentration, pH-Wert, Kettenlänge der Detergenzmoleküle, Temperatur) variiert werden, jedoch werden meist nur Verbesserungen in den Spektren bei günstigerer Wahl des Detergenz erreicht (172).

Anhand ihrer negativen Ergebnisse bei Untersuchungen der *Escherichia coli*-Diacylglycerol-Kinase in Mizellen stellten Vinogradova et al. (172) allgemein gültige Hinweise auf. Im Vorfeld von NMR-spektroskopischen Untersuchungen muß die Aktivität des Proteins in der Mizelle und die effektive Molmasse des Detergenz-Protein-Komplexes geprüft werden, damit diese nicht die Grenzen für die NMR-Analyse überschreitet. Für erste Abschätzungen ist es hilfreich, die einfache Summe aus der Masse des Proteins im oligomeren Zustand und aus der Masse der proteinfreien Mizelle zu bilden. Jedoch ist die effektive Aggregationszahl in der proteinhaltigen Mizelle deutlich höher und von der Größe der hydrophoben Oberfläche des Proteins abhängig, die durch Wechselwirkungen

mit unpolaren Ketten des Detergenz stabilisiert werden muß. Daher kann die Masse des Komplexes nur sehr schwer vorhergesagt werden. Meist ist eine experimentelle Bestimmung unbedingt notwendig, bevor NMR-spektroskopische Methoden für weitere Untersuchungen herangezogen werden können.

In weiterführenden Studien nutzten Vinogradova et al. (171) feldgradientenbasierende NMR-Diffusionsmessungen zur Größenabschätzung von Protein-Detergenz-Komplexen. Die Messungen wurden bei hoher Detergenz- und niedriger Proteinkonzentration durchgeführt, um Proteinaggregation zu vermeiden. Die Konzentration der proteinhaltigen Mizellen

$$= \frac{\text{totale Detergenzkonzentration} - \text{kritische mizellare Konzentration}}{\text{Aggregationszahl}} \quad (3.1)$$

muß in NMR-spektroskopisch erfaßbaren Größen liegen. Aus einer Serie von feldgradientenbasierenden Diffusionsmessungen konnten sie nach Signalintegration gemäß Gleichung 3.2 den Diffusionskoeffizienten der Translation D_t für das Protein in der Mizelle bestimmen:

$$I = I_0 \exp[-(\gamma\delta g)^2 (\Delta - \frac{\delta}{3}) D_t] \quad (3.2)$$

mit

γ gyromagnetisches Verhältnis

δ Gradientendauer

g Gradientenstärke

Δ Dauer zwischen den Gradientenpulsen = Diffusionszeit

D_t Diffusionskoeffizient

I_0 Signalintensität ohne angelegten Gradienten.

Bei den untersuchten Detergenzien konnten sie keine allgemeine Korrelation zwischen dem Diffusionskoeffizienten und der Größe der proteinfreien korrespondierenden Mizelle ableiten.

3.5.2 Größenabschätzung von EmrE in Mizellen

In der Gruppe von Shimon Schuldiner wurden mehrere verschiedene Detergenzien getestet, um EmrE in Mizellen NMR-spektroskopisch zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, daß EmrE durch eine für NMR sehr gut geeignete SDS-Mizelle denaturiert (156). Auch viele andere Detergenzien lieferten ähnliche Ergebnisse bei Aktivitätstests. Nach längeren Studien wurde Dodecylmaltosid (DDM) als Detergenz gefunden, in dem das Protein aktiv ist.

Für die NMR-Untersuchungen wurde eine vollständig ^{15}N -markierte Proteinprobe mit einer Konzentration von etwa 5 - 6 mg EmrE-Myc-His/mL (etwa 0,8 % nichtdeuteriertes DDM, 0,15 M NaCl, 0,02 % Na-Azid, 0,015 M Tris-Cl, 45 μl D_2O , pH = 7,5) verwendet. Sie wies keine Anzeichen für Denaturierung des Proteins auf. Die Messungen erfolgten bei 300 K an einem 600- bzw. 750-MHz-Spektrometer. Bereits im ^1H -Spektrum und im ^{15}N -HSQC-Spektrum sind nur sehr wenige Signale enthalten, die vermutlich vom Myc-His-Tag stammen. Als Ursache für das Fehlen fast aller Signale wurde die Größe des Protein-Detergenz-Komplexes vermutet. Daher wurden wie von Vinogradova et al. (171) beschrieben, Diffusionsmessungen zur Bestimmung der Mizellengröße durchgeführt. Für die Diffusionskoeffizienten D_t wurden nach Gleichung 3.2 folgende Werte erhalten:

D_{Mizelle}	$= 6,425 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$	bei 0,92 ppm
D_{Mizelle}	$= 6,448 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$	bei 1,33 ppm
D_{Tris}	$= 8,041 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	bei 3,78 ppm
D_{Wasser}	$= 2,312 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$	bei 4,80 ppm.

Die Werte für den Tris-Puffer und Wasser wurden als Referenz zur Absicherung der Ergebnisse mit ausgewertet. Sie stimmen sehr gut mit den aus der Literatur bekannten Werten überein (173).

Aus dem erhaltenen Diffusionskoeffizienten für die Mizelle D_{Mizelle} wurde nach Gleichung 3.3 der hydrodynamische Radius r der Mizelle berechnet:

$$r_{\text{Mizelle}} = \frac{k_B T}{6\pi D_{\text{Mizelle}} \eta_{\text{Lösung}}} \quad (3.3)$$

mit

k_B Boltzmann-Konstante

T Temperatur

η mikroskopische Viskosität.

Unter Annahme von $\eta_{\text{Lösung}} = \eta_{\text{Wasser}}$ wurde ein Mizellenradius von 37,9 Å erhalten. Daraus konnte die molekulare Korrelationszeit unter Annahme eines kompakten, starren, isotropen Rotators mit 49,5 ns bestimmt werden:

$$\tau_{\text{rot,star}} = \frac{4}{3} \pi r^3 \frac{\eta}{k_B T} \quad (3.4)$$

mit

r hydrodynamischer Radius

k_B Boltzmann-Konstante

T Temperatur

η mikroskopische Viskosität.

Die Diffusionskoeffizienten des Proteins wurden aus dessen Amid-Signalen bestimmt. Bei einem erfolgreichen Einbau von EmrE-Myc-His

in die Mizelle und einem hohen Konzentrationsverhältnis von proteinhaltiger zu proteinfreier Mizelle sollte D_{Mizelle} mit D_{EmrE} gut übereinstimmen. Nach Gleichung 3.2 wurden folgende Ergebnisse für aufgelöste, relativ intensive Signale berechnet:

$$D_{\text{EmrE}} = 6,487 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s} \quad \text{bei } 8,11 \text{ ppm}$$

$$D_{\text{EmrE}} = 6,624 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s} \quad \text{bei } 7,26 \text{ ppm}$$

$$D_{\text{EmrE}} = 6,400 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s} \quad \text{bei } 7,14 \text{ ppm.}$$

Die starken Schwankungen für D_{EmrE} sind auf die zu geringen Signalintensitäten zurückzuführen. Dennoch kann daraus der Einbau des Proteins in die Mizelle bestätigt werden.

Weiterhin wurde versucht, die Masse des Protein-Detergenz-Komplexes zu ermitteln. Gemäß den Angaben von Schuldiner wurde die aktuelle Mizellen- und Proteinkonzentration nach Gleichung 3.1 berechnet. Daraus ergeben sich folgende Werte:

$$C_{\text{Mizelle}} = 0,183 \text{ mM}$$

$$C_{\text{EmrE}} = 0,366 \text{ mM} \quad \text{für Monomer}$$

$$C_{\text{EmrE}} = 0,183 \text{ mM} \quad \text{für Dimer}$$

$$C_{\text{EmrE}} = 0,122 \text{ mM} \quad \text{für Trimer.}$$

Anhand der wesentlich höheren Proteinkonzentration gegenüber der Mizellenkonzentration muß das Protein als Oligomer eingebaut sein.

Da die einfache Summe aus der Masse des Proteins im oligomeren Zustand und der Masse der proteinfreien Mizelle keine sicheren Aussagen über das Gesamtgewicht des Komplexes (etwa 100 kDa) liefert, wurde eine Gewichtsabschätzung basierend auf dem ermittelten hydrodynamischen Radius durchgeführt. Der Abschätzung liegen eine Kugelsymmetrie des Komplexes sowie eine dem Wasser vergleichbare Dichte zugrunde, die nicht unbedingt den wahren Verhältnissen entsprechen. Mit diesen Annahmen leitet sich eine Masse von 137 kDa für den Protein-Detergenz-Komplex ab.

Aussagen von Schuldiner über die Gesamtmasse des Komplexes, bestimmt aus Gel-Permeations-Chromatographie-Experimenten, weisen auf etwa 130 kDa hin.

Aufgrund der abgeschätzten Mizellengröße wurde ein ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektrum bei 750 MHz aufgenommen, um eine deutliche Zunahme an Intensität und Auflösung im Spektrum zu erreichen. Jedoch war die Anzahl der erhaltenen Signale immer noch viel zu gering, so daß keine weiteren Experimente basierend auf der TROSY-Methode durchgeführt wurden.

3.5.3 Diskussion der Ergebnisse

Ursachen der zu niedrigen Signalintensitäten in den aufgenommenen Spektren sind die Größe des Protein-Detergenz-Komplexes mit seiner zugehörigen relativ langsamen Korrelationszeit sowie die fehlende Deuterierung der Mizellen. Weiterhin wirken sich neben der sehr schnellen Relaxation auch die geringe Konzentration und erhöhte Viskosität der mizellaren Lösung negativ auf die Linienbreiten aus.

Möglichkeiten zur Verbesserung der Meßergebnisse würden die Abspaltung des unnötigen Myc-His-Tags, die Verwendung von volldeuterten Mizellen und evtl. das Auffinden anderer Detergenzien zur Reduzierung der Molmasse des Protein-Detergenz-Komplexes darstellen.

Aufgrund der schweren Zugänglichkeit von weiteren biologisch aktiven, detergenzgelösten Proteinproben war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Bedingungen für Methoden der Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie zu optimieren. Daher wurde es im weiteren Verlauf der Arbeit notwendig, das Membranprotein EmrE in einem naturiden-

tischen Medium zu untersuchen und die Methoden der Festkörper-NMR-Spektroskopie anzuwenden.

3.6 NMR-Untersuchungen in Membranen

3.6.1 Einleitung

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Clemens Glaubitz an der Universität von Oxford durchgeführt (10).

Neben biochemischen Methoden ist besonders die Festkörper-NMR-Spektroskopie zur Untersuchung von Membranproteinen in ihrer natürlichen Umgebung geeignet, um spezifische Informationen über Substraterkennung, -bindung und -transport zu erhalten (6, 174 - 175). Dafür ist es oft effizienter, das Substrat selbst unter dem Einfluß des Transporters zu beobachten (176). Spezielle Kreuzpolarisationsexperimente werden zur Unterscheidung zwischen gebundenem und freiem Substrat eingesetzt. Oberhalb von 273 K verbleibt die Membran in einem flüssigen Zustand, in dem es mit Hilfe der Kreuzpolarisation unmöglich wird, ungebundene Substrate zu beobachten (176 - 178).

In diesem Teil der Arbeit wurde das Membranprotein EmrE in einer Umgebung untersucht, die den natürlichen Bedingungen am nächsten kommt. Dazu wurde es notwendig, das gereinigte Transportprotein in eine künstliche Membran zu rekonstituieren und anschließend mit Methoden der Festkörper-NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Beson-

ders interessante Ergebnisse wurden in den Bindungsstudien mit Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP) erzielt. Dabei wurde das gebundene TPP mit der ^{31}P -CP-MAS-NMR-Spektroskopie beobachtet. Die Kreuzpolarisation ermöglichte eine exakte Unterscheidung zwischen gebundenen TPP-Spezies und der flüssigen Membran. TPP wurde aufgrund seiner hohen Substrataffinität gegenüber EmrE ($K_D = 10 \text{ nM}$ (160)) und den günstigen magnetischen Eigenschaften des ^{31}P -Kerns (100% natürliche Häufigkeit, Spin- $\frac{1}{2}$ -Kern mit hoher Empfindlichkeit) als Ligand für diese Experimente ausgewählt. Die Beobachtung des Liganden war ferner von Vorteil, da das Protein keine Signale im ^{31}P -NMR-Spektrum liefert. Einzig die verwendete Lipidmembran (DMPC) zeigt ein scharfes Signal mit bekannter chemischer Verschiebung.

Für weitreichendere MAOSS-Experimente wurden vorbereitende Arbeiten zur Orientierung des Proteins in der Membran durchgeführt.

3.6.2 Probenpräparation

Zur Rekonstitution des gereinigten Proteins (8, 151) wurde seine Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln ausgenutzt. Dazu wurden 2,5 mg EmrE und 9,3 mg Dimyristoylphosphatidylcholin (L- α -DMPC) jeweils in einem 1:1-Gemisch aus Chloroform und Methanol gelöst und anschließend vereinigt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die Probe für mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet. Die Rehydratisierung erfolgte mit einer wässrigen Pufferlösung (0,015 M TRIS, 0,15 M NaCl) bei einem pH-Wert von 7,5. Abschließend wurde die überstehende Salzlösung abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mehrfach in flüssigem Stickstoff gefroren, um relativ gleichgroße, einschich-

tige Proteoliposome zu formen (8). Zusätzlich wurde es in einem schwachen Ultraschallbad für kurze Zeit behandelt, bevor es in den MAS-Rotor überführt wurde. Das Molverhältnis von Protein:Lipid betrug 1:60, um mögliche Konzentrationsausfällungen zu verhindern. (Das von Arkin und Mitarbeitern (151) genutzte Protein:Lipid-Verhältnis entsprach etwa 1:10 bis 1:20 Gewichtsanteilen.)

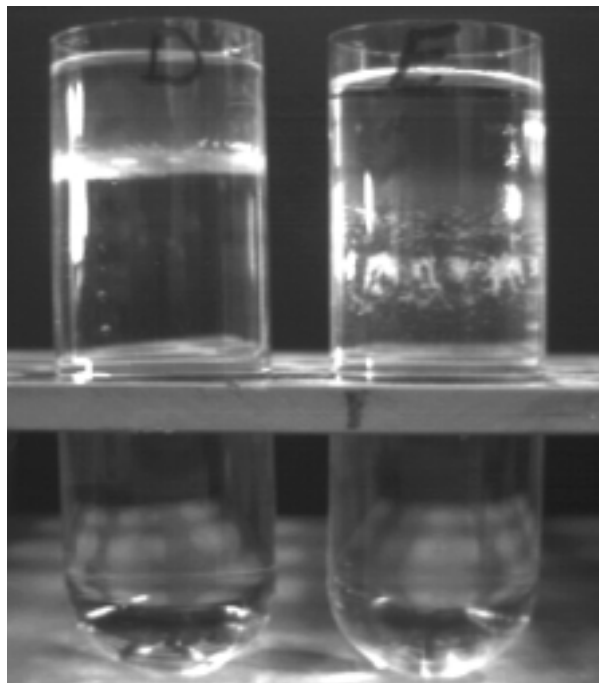


Abbildung 3.10: Ergebnis der Ultrazentrifugation. D: DMPC, E: EmrE in DMPC

Mit Hilfe der Ultrazentrifugation konnte der erfolgreiche Einbau des Proteins in die Membran sowie die Homogenität der Probe überprüft werden. Dazu wurde ein Teil des Pellets erneut in Pufferlösung resuspendiert und auf einen linearen Zuckergradienten von 0 bis 50 % gelegt. 12-stündiges Zentrifugieren bei 278 K mit 90000 g ergab eine einheitliche Schicht zwischen 25 und 28 % Zucker (Abbildung 3.10), was auf

eine homogen rekonstituierte Proteinprobe schließen läßt. Zur Kontrolle wurde reines DMPC aufgegeben, welches bei 17 % eine Schicht ausbildete.

Für die TPP-Bindungsstudien wurde eine wäßrige 0,07 M Tetraphenylphosphoniumbromidlösung hergestellt und schrittweise jeweils 3 μL zu der Probe im MAS-Rotor titriert. Um die Stabilität der Probenrotation über alle Experimente zu gewährleisten, mußte auf eine gleichmäßige Probenverteilung im Rotor geachtet werden. Das erforderte die Zugabe geringer Mengen einer hochkonzentrierten Lösung, da bereits die kleinste zugegebene Menge an TPP im NMR-Experiment beobachtbar sein sollte. Gleichzeitig mußte eine größtmögliche Oberfläche ohne Probenverlust benetzt werden. Daher wurde die Probe während einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 305 K rotiert.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der Bindungsstudien wurden die Titrations mit TPP an mehreren rekonstituierten Proteinproben durchgeführt. Um eine Bindung des Liganden an die Membran auszuschließen, wurden proteinfreie DMPC-Vesikel in gleicher Weise mit der TPP-Lösung versetzt.

3.6.3 NMR-Untersuchungen

Alle NMR-Experimente wurden an einem DMX400-Spektrometer von Bruker bei 161,3 MHz für ^{31}P bzw. bei 400,13 MHz für ^1H in einem 7mm-Doppelresonanz-MAS-Probenkopf durchgeführt. Für die Kreuzpolarisation und zur Protonenentkopplung wurde eine Protonenfeldstärke von 55 kHz angelegt. Die Feldstärke für die ^{31}P -Kerne wurde ent-

sprechend der Hartmann-Hahn-Bedingung für die Kreuzpolarisation gewählt. Die CP-Kontaktzeit wurde zwischen 0,1 und 5,0 ms variiert. Da es für die durchgeführten Experimente nicht erforderlich war, die Anisotropie der chemischen Verschiebung zu Null auszumitteln, wurde bei einer Rotationsfrequenz von 2500 Hz gearbeitet. Sie konnte so gewählt werden, daß keine Überlagerungen der DMPC-Seitenbanden mit dem TPP-Signal auftraten. Beobachtet wurde die Probe sowohl in der flüssigkristallinen $L\alpha$ -Phase bei 30 °C sowie in der Gelphase $L\beta'$ bei 7 °C.

3.6.4 Ergebnisse

Das protonenentkoppelte ^{31}P -MAS-NMR-Spektrum einer DMPC-Probe mit TPP (Abbildung 3.11) zeigt neben der isotropen Linie des DMPCs sowie deren Seitenbanden ein scharfes Signal des zugegebenen TPPs bei 23,2 ppm. Dieser Wert der chemischen Verschiebung stimmt mit den bekannten Daten aus der Literatur überein (179). Nach Kreuzpolarisation fehlt in dem entsprechenden ^{31}P -CP-MAS-NMR-Spektrum die Resonanzlinie des TPPs, was auf sich isotrop verhaltendes TPP hindeutet. Wäre das Substrat an die Membran gebunden, würde auch unter CP-Bedingungen das Signal im Spektrum erhalten bleiben. Demnach kann eine Bindung des TPPs an das DMPC sicher ausgeschlossen werden.

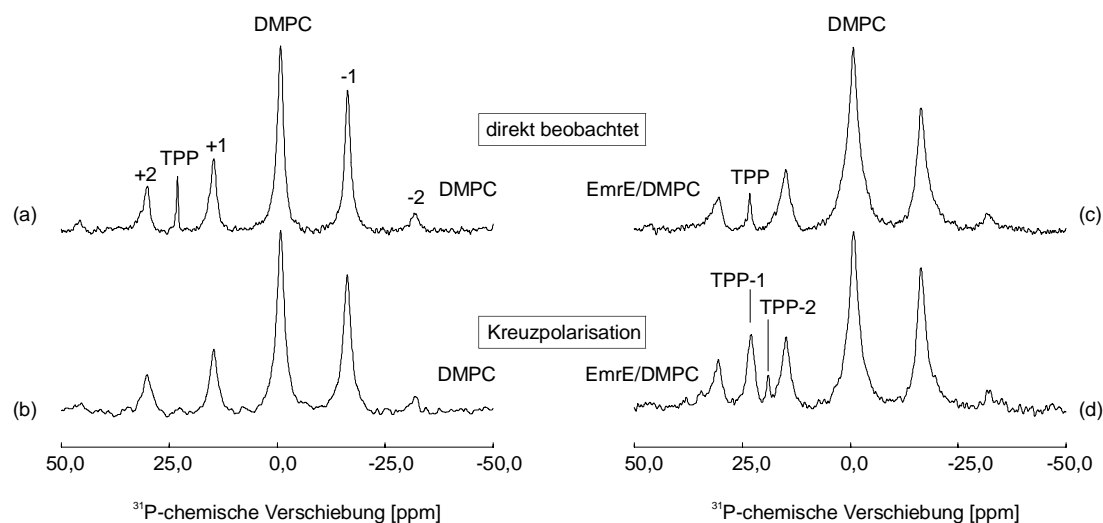


Abbildung 3.11: ^1H -entkoppelte ^{31}P -MAS-NMR-Spektren und ^{31}P -CP-MAS-NMR-Spektren von DMPC mit TPP bzw. von EmrE in DMPC mit TPP

Das protonenentkoppelte ^{31}P -MAS-NMR-Spektrum von rekonstituiertem EmrE in DMPC und TPP (Abbildung 3.11) zeigt neben den Signalen des DMPCs eine scharfe Resonanz des TPPs. Unter CP-Bedingungen treten jedoch im Gegensatz zur proteinfreien Probe zwei intensive Signale bei 22,9 ppm (TPP-1) und 19,0 ppm (TPP-2) hervor. Die daraus abzuleitende Immobilität des Substrats im Millisekundenbereich kann nur durch eine Bindung des Liganden an das Protein erklärt werden. Des weiteren kann aus den Differenzen der chemischen Verschiebungen zum freien TPP (TPP-1: -0,3 ppm, TPP-2: -4,2 ppm) auf unterschiedlich starke Wechselwirkungen zwischen Protein und Liganden geschlossen werden.

Übereinstimmend zu den Schlußfolgerungen anhand der Differenzen der chemischen Verschiebungen weisen die zwei an das Protein gebundenen TPP-Spezies auch Unterschiede in ihrem dynamischen Verhalten auf (Abbildung 3.12). Dies belegen die CP-MAS-NMR-Spektren mit unterschiedlichen Kontaktzeiten.

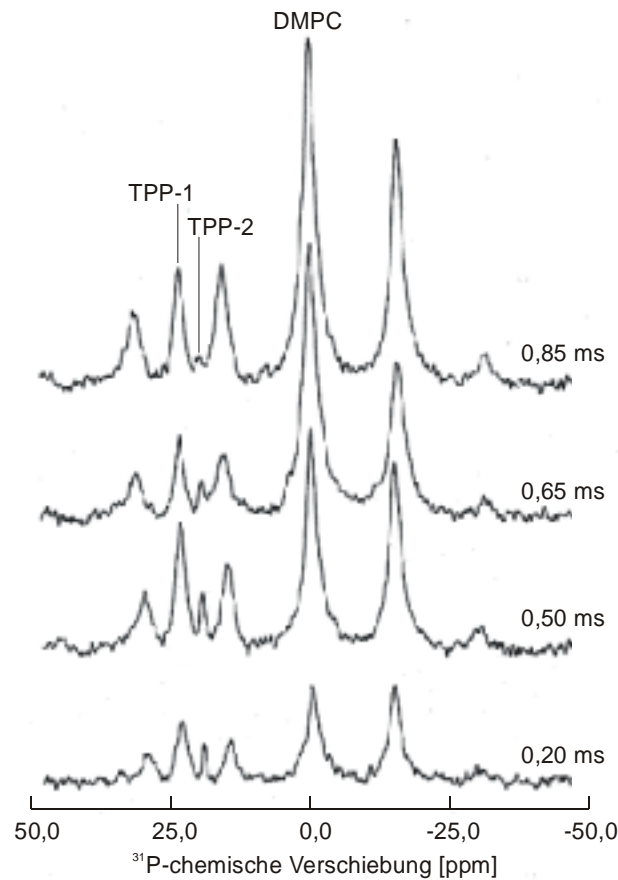


Abbildung 3.12: ^{31}P -CP-MAS-NMR-Spektren von EmrE in DMPC mit TPP bei verschiedenen Kontaktzeiten

Die Dynamik der Membran kann qualitativ über die CP-Aufbauzeiten von verschiedenen Membrankomponenten untersucht werden. Lipide in flüssig-kristallinen Membranen sind hoch beweglich. Daher werden die ^1H - ^{31}P -dipolaren Kopplungen reduziert und die Kreuzpolarisation wird ineffizient. Lange Kontaktzeiten von 5 ms werden benötigt, um optimale Signalintensitäten für das DMPC zu erreichen (Abbildung 3.13), bevor die Intensitäten wieder langsam abnehmen. Die Signale der zwei interessierenden TPP-Spezies erreichen jedoch schon bei Kontaktzeiten von

1,6 ms (TPP-1) bzw. 0,5 ms (TPP-2) ihre maximale Intensität. Dies bedeutet, daß an EmrE gebundene TPP ist deutlich unbeweglicher als die Lipidmembran. TPP-2 zeigt dabei eine stärkere Immobilität verglichen mit TPP-1. Die beobachteten Fluktuationen in den ersten 0,5 bis 1 ms sind typisch für CP-Aufbaukurven von dynamischen Molekülen.

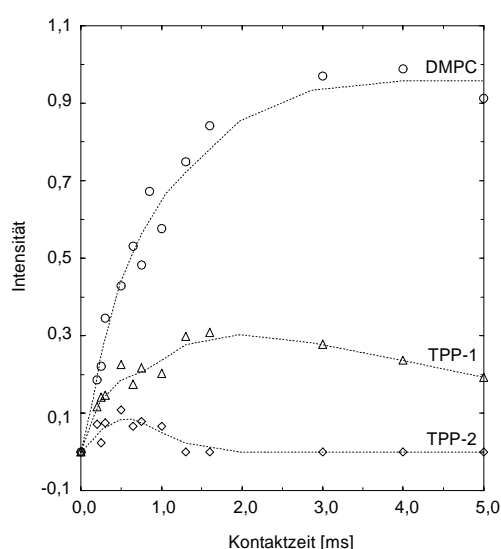


Abbildung 3.13: CP-Aufbaukurven

Unterstützend zu diesen Messungen wurde eine Titrationskurve von TPP aufgenommen. Dazu wurde schrittweise die Menge an TPP erhöht und die Intensitäten der beiden TPP-Signale im CP-MAS-NMR-Spektrum relativ zueinander bestimmt. Das Maximum wurde bei einem Molverhältnis von EmrE:TPP von 1:2,5 erhalten. Das Verhältnis der beiden Spezies entspricht etwa 5:1 für TPP-1:TPP-2. Bei weiterer Zugabe von TPP zur Probe nahm die Signalintensität von TPP-1 weiter zu, die Intensität von TPP-2 blieb hingegen konstant.

3.6.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Kreuzpolarisationsexperimente zeigen deutlich einen im Millisekundenbereich stabilen Komplex zwischen dem Substrat TPP und dem Transportprotein EmrE, rekonstituiert in eine DMPC-Lipidmembran. Diese Aussage stimmt sehr gut mit der aus der Literatur bekannten hohen Bindungsaffinität von TPP an EmrE ($K_D = 10$ nM) überein (160).

Besonders interessant ist das Auftreten des ^{31}P -TPP-2-Signals bei -4,2 ppm im Gegensatz zu TPP in Lösung. Für diese starke Abweichung in der chemischen Verschiebung des ^{31}P -Kerns können nur konformative Änderungen des Moleküls oder Änderungen in seiner Umgebung verantwortlich sein. Obwohl Änderungen der elektrischen Ladung nicht notwendigerweise zu derart großen Differenzen in der chemischen Verschiebung führen sollten (180), könnten sie mit anderen Parametern wie Bindungsgeometrie, Elektronegativität des Substituenten und relative Anzahl der π -Bindungen verbunden sein. Ebenfalls können Ringströme der aromatischen Reste zu Änderungen in der chemischen Verschiebung des Phosphors führen. Diese Bedingungen sind erfüllt, wenn der Ligand spezifisch mit dem Protein in Wechselwirkung tritt und dabei, aufgrund der stark abweichenden Umgebung, seine Konformation wesentlich ändern muß.

Aus der Literatur bekannt ist die dichte Packung des Proteins mit einer hydrophoben Pore (156). Ein geladenes Substrat wie das TPP⁺-Ion kann demnach nur durch eine direkte Wechselwirkung mit dem Protein diese Pore passieren. Das erfordert Änderungen sowohl in der Protein- als auch in der Substratstruktur. Zusätzlich wurde in der Literatur be-

schrieben, daß der geladene Rest E14 für die Bindung des Liganden unbedingt erforderlich ist (159 - 160).

Analog dazu wird in der Literatur (157 - 158) über Studien am BmrR, ein Transcriptionsaktivierungsprotein des Multidrug-Resistenz-Transporters Bmr des *Bacillus subtilis* berichtet, welches ebenfalls in der Lage ist, lipophile Kationen wie TPP zu binden. Die Struktur von BmrR wurde mit Hilfe der Röntgenkristallographie in Gegenwart und Abwesenheit von TPP bestimmt. Sie zeigt ein TPP-induziertes Auffalten und Umorientieren einer α -Helix, welche die interne Bindungstasche bildet. In dieser Bindungstasche treten Van-der-Waals-Kontakte mit verschiedenen hydrophoben Resten auf. Die für die Substratselektivität entscheidende elektrostatische Wechselwirkung existiert jedoch zwischen dem negativ geladenen Rest E134 und dem positiv geladenen Substrat TPP, welches selbst in seiner Struktur gestört ist (Abbildung 3.14). Die strukturellen Änderungen im Protein sollen von Ligandmolekülen rühren, die mit den geladenen Resten in Wechselwirkung treten.

Demnach kann angenommen werden, daß auch bei der starken Bindung von TPP an das dicht gepackte Protein EmrE eine ähnliche strukturelle Veränderung am Liganden eintritt. Dies würde sehr gut die große Differenz von -4,2 ppm in der chemischen Verschiebung von TPP-2 erklären (181 - 185).

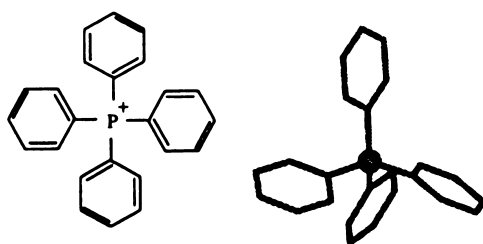


Abbildung 3.14: Struktur von TPP in der Bindungstasche von BmrR (158)

Die zweite beobachtete Spezies TPP-1 bindet ebenfalls an das Protein, jedoch wesentlich schwächer und unspezifisch. Die Änderung der chemischen Verschiebung beträgt für TPP-1 nur -0,3 ppm, was auf geringfügige Veränderungen in der Struktur und / oder in der Umgebung schließen läßt. Im Vergleich zu dem fest bindenden TPP-2 ist TPP-1 weniger in seiner Beweglichkeit eingeschränkt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß eine niedrig affine, unspezifische Bindung des Liganden an geladene Reste in der hydrophilen Schleifenregion stattfindet. Von allen in EmrE vorkommenden geladenen Resten ist nur E14 in die Membran eingebettet, während alle anderen für das Lösungsmittel zugänglich sind. Demnach wäre eine Bindung des TPP⁺-Ions über elektrostatische Wechselwirkungen zu den negativ geladenen Resten E25 und D84 wahrscheinlich, die sich auf der selben Seite der Membran befinden. Solch eine Bindung würde die geringe Differenz in der chemischen Verschiebung und die nicht so stark eingeschränkte Beweglichkeit des TPP-1 erklären.

Fraglich ist, ob diese zusätzliche Substratbindung für den Transport erforderlich ist, oder ob es sich nur um einen weniger bedeutenden Nebeneffekt handelt. Gemäß den Untersuchungen von Yerushalmi et al. (159) ist keiner der fünf kationischen Reste für den Transport essentiell. Eine Mutation der beiden anionischen Reste E25 und D84 in den Schleifen bewirkt hingegen einen Verlust an Aktivität, was auf eine indirekte Rolle in der Substraterkennung und im Transportprozeß weist. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß bei der Titration des Liganden zur Probe die Signalintensität von TPP-1 stetig ansteigt. Die Intensität von TPP-2 erreicht jedoch bei einem Verhältnis von TPP:EmrE größer 2 ihr Maximum und bleibt danach konstant.

Zheleznova et al. (158) diskutierten, daß der Ligand TPP die strukturellen Änderungen im Protein BmrR durch Wechselwirkungen mit geladenen Resten induziert. Ähnliche kooperative Prozesse wie beim BmrR könnten auch beim EmrE stattfinden und das Signal für das schwach gebundene TPP-1 erklären. Demnach würden der N- und der C-Terminus von EmrE (orientiert in der Membran) in den extrazellulären Raum zeigen, während die Reste E25 und D84 auf der gegenüberliegenden Seite notwendig sind, um mit dem Substrat in der Zelle in Wechselwirkung zu treten und aus der Zelle zu schleusen. Diese Annahme wird durch EmrE-Modellrechnungen von Kay Gottschalk unterstützt.

Genaue stöchiometrische Aussagen sind sehr schwierig, da eine exakte Korrelation zwischen den beobachteten CP-Intensitäten für DMPC, TPP-1 und TPP-2 und ihren Konzentrationen sowohl von deren dynamischen Verhalten als auch von den Kontaktzeiten abhängt. Wird angenommen, daß die Effizienz der Kreuzpolarisation für TPP-1 und TPP-2 gleich ist, liegt das Intensitätsverhältnis von TPP-1:TPP-2 zwischen 4:1 und 6:1. Die an der Oberfläche exponierten negativ geladenen Reste E25 und D84 erlauben schwache Bindungen zu mehreren Molekülen als der Rest E14 in einer hydrophoben Pore im Inneren des Proteins.

Weiterhin müßten für die Aufnahme exakter Titrationskurven unter MAS-Bedingungen mehrere Proben mit unterschiedlichen Substratmengen hergestellt werden. Dies war aufgrund der geringen Proteinmengen nicht möglich, weshalb auf eine stufenweise Zugabe des Substrats zu einer Probe in den MAS-Rotor ausgewichen wurde. Diese Methode liefert aufgrund von Mischungsproblemen während der Probenrotation nur qualitative Ergebnisse für größere Titrationschritte. Aufgrund der Rekonstitution von EmrE in eine künstliche Lipidmembran sind beide Orientierungen des Proteinmoleküls

gleichermaßen wahrscheinlich. Müssen für einen aktiven Transport alle drei Proteinmoleküle im Trimer die gleiche Orientierung in der Membran aufweisen, hat dies einen nicht unbedeutenden Einfluß auf das Ergebnis. Sicher kann ein TPP-Molekül eine spezifische Bindung (wie im Fall von TPP-2) nur zu einem nativen Trimer eingehen, jedoch ist eine unspezifische Bindung (wie bei TPP-1) evtl. zu einem nicht symmetrischen Trimer möglich.

Es konnte erstmalig nachgewiesen werden, daß zwei verschiedene Bindungsstellen für den zu transportierenden Liganden TPP im nativen Protein vorhanden sind. Wahrscheinlich bedingt eine schwache Wechselwirkung des Liganden mit der Oberfläche des Proteins die für einen aktiven Transport nötige konformative Änderung im Protein (156). Erst nach Aufweitung der Pore kann der sterisch gehinderte und positiv geladene Ligand in der hydrophoben Tasche des Proteins binden.

Diese Aussagen über zwei verschiedene Spezies von Liganden (TPP-1 und TPP-2) stehen nicht im Widerspruch zu denen aus der Literatur, die mit biochemischen Methoden getroffen wurden (8, 154, 156). Bei diesen Versuchen wurde die Menge an Substrat detektiert, die in die Proteoliposome transportiert wurde. Schwache Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und der Oberfläche des Proteins müssen auf diese Weise nicht erkennbar sein. In Bindungsstudien mit [³H]-TPP an EmrE in Detergenzien konnte ebenfalls nur eine Bindungsstelle detektiert werden (160), wofür jedoch Detergenzeffekte eine mögliche Ursache sein können, die eine schwache Substratbindung an die Oberfläche des Proteins verhindern.

Für genauere Aussagen über das Protein sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich. Eine Möglichkeit wäre, die durchgeführten Bin-

dungsstudien mit TPP an zwei verschiedenen Mutanten zu wiederholen. Zum einen weisen Yerushalmi et al. (159) in ihren Arbeiten nach, daß TPP nicht an die Proteinmutante E14C bindet. Sind die aufgestellten Hypothesen richtig, sollte das TPP-2-Signal in den Kreuzpolarisationsexperimenten verschwinden, das TPP-1-Signal jedoch erhalten bleiben. Steht die TPP-1-Spezie wirklich in Wechselwirkung mit den zwei negativ geladenen Resten in der Schleifenregion, sollte in den ^{31}P -MAS-NMR-Untersuchungen mit der E25C-D84C-Mutante nur das Signal von TPP-2 auftreten, nicht aber das Signal von TPP-1.

Eine weitere, jedoch weniger aussagekräftige Möglichkeit wäre die Durchführung von Inhibierungsexperimenten mit Ethidiumbromid bzw. Acriflavin. Diese sollten die TPP-Bindung reduzieren und die zwei TPP-Signale im CP-Experiment beeinflussen. Das Signal der spezifisch bindenden TPP-2-Spezie sollte an Intensität verlieren, da diese Bindung bereits durch das Ethidiumbromid bzw. das Acriflavin inhibiert wird. Anhand der Signalintensität des unspezifisch gebundenen TPP-1s könnte abgeleitet werden, ob diese Bindungsstelle auch von anderen Substraten besetzt wird oder nicht. Aufgrund der wesentlich niedrigeren Bindungsaffinität von Ethidiumbromid und Acriflavin gegenüber TPP ist die Durchführung jedoch sehr umstritten.

3.6.6 MAOSS-Experimente

Da sowohl bei einem Ausschleusen des Substrats durch die Membran als auch bei dem korrespondierenden Einschleusen des Protons von Konformationsänderungen innerhalb des Proteins ausgegangen wird

(156, 159), sollte in aufbauenden Experimenten das Protein direkt beobachtet werden.

Mit Hilfe des MAOSS-Experiments ist es möglich, die ^{15}N -markierten Kerne des orientierten Proteins mit und ohne Liganden zu beobachten. Die bessere spektrale Auflösung bei MAOSS-Experimenten gegenüber Messungen an unorientierten Systemen läßt eine Konformationsänderung im Protein deutlich erkennbar werden. Voraussetzung ist eine sehr gute makroskopische Orientierung der Probe, welche für große Membranproteine nicht einfach zu realisieren ist.

Daher wurde eine weitere Probe wie oben beschrieben für das geplante MAOSS-Experiment hergestellt. Nach der Rehydratisierung mit Pufferlösung mußte mehrfach mit Wasser gewaschen werden, um später evtl. sich bildende Salzkristalle zwischen den Glasplättchen zu vermeiden. Anschließend wurde die wäßrige Lipidlösung vorsichtig auf kleine Glascheiben aufgetragen und getrocknet. Unter einem Polarisationsmikroskop wurde die gleichmäßige Beschichtung überprüft, um spätere Störungen im Spektrum zu vermeiden. Danach wurden die Glasplättchen vorsichtig im MAS-Rotor gestapelt und sehr langsam rehydratisiert. Für eine gute Orientierung ist eine vollständige Hydratisierung Voraussetzung. Da am Übergang zwischen flüssigkristalliner und Gelphase Lipidmembranen am meisten Wasser aufnehmen können, wurde der Rotor abwechselnd bei 4 °C und Raumtemperatur gelagert.

Da die Anisotropie der ^{31}P -chemischen Verschiebung der Phospholipide von deren Ausrichtung in Doppelschichten abhängt (110), wurden zur Kontrolle der Probenorientierung für das MAOSS-Experiment statische ^{31}P -NMR-Spektren unter dem Magischen Winkel aufgenommen. Nach

mehreren Tagen trat langsam die isotrope Linie des DMPC aus dem Pulverspektrum hervor. Jedoch konnte bei der beschriebenen Probenpräparation keine vollständige Orientierung erreicht werden. Teile des Pulverspektrums blieben auch nach mehreren Wochen erhalten. Daher ist es für weitere Orientierungsexperimente erforderlich, nach einer allgemeinen Methode zur makroskopischen Orientierung von biologischen Membranen für strukturelle, funktionelle und dynamische Studien an großen Membranproteinen (über 30 kDa) mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie vorzugehen (135, 186). Dieses Verfahren basiert auf einer speziellen Ultrazentrifugationstechnik (*Isopotential Spin-Dry Ultracentrifugation technique*) (187 - 188), bei der eine Membran-Protein-Suspension in Wasser auf Glasplatten zentrifugiert wird unter gleichzeitiger Trocknung der Probe.

Aufgrund unzureichender Mengen an ^{15}N -gelabelten Protein wurden keine weiteren Studien zur Orientierung sowie MAOSS-Experimente durchgeführt. Die Versuche zeigen, daß die angenommenen Konformationsänderungen des Proteins bei Aufnahme des Liganden beobachtet werden können.

4 Untersuchungen an der N-terminalen Domäne des VAT-Proteins

4.1 Biochemischer Hintergrund

Die AAA-(*ATPases Associated with a variety of cellular Activities*)-Familie der ATPasen erlangte großes biochemisches Interesse, da ihre Mitglieder in vielen zellulären Prozessen, wie Membranfusion, Proteinabbau, Spindelbildung während der Meiose und Mikrotubulizerlegung, eine zentrale Rolle einnehmen (189). Das Erkennungsmerkmal der AAA-Proteine ist die sogenannte AAA-Domäne oder auch konservierte ATPase-Domäne, eine hochkonservierte Region von etwa 230 Aminosäuren, welche die Walker-Motive A und B enthält, die für P-Schleifen enthaltende Nukleosidtriphosphatasen typisch sind. Aufgrund ihrer Struktur zeigen sie eine enge Verwandtschaft zu der Clp/Hsp100-Familie der molekularen Chaperone. AAA-Proteine tendieren zur Bildung von oligomeren (meist hexameren) Ringen, wie für eine Reihe von verschiedenen Proteinen, u. a. auch für VAT (*Valosine-containing protein like ATPase*) von *Thermoplasma acidophilum* (190 - 191), beobachtet wurde. Eine gemeinsame Funktion dieser Proteine ist die Zerlegung und / oder der Abbau von Makromolekülen. Die Mitglieder der AAA-Familie besitzen entweder eine (Typ 1) oder zwei (Typ 2) AAA-Domänen. Des Weiteren verfügen die Proteine über eine zusätzliche Substraterkennungsdomäne an ihrem N-Terminus. Bei den Typ-2-Proteinen sind diese Domänen entfernt verwandt und weisen ähnliche strukturelle Eigenschaften auf (11), weshalb auf eine allgemeine Funktion geschlossen werden kann.

Das VAT-Protein von dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* verfügt, wie alle anderen Mitglieder der Cdc48/p97-Familie der AAA-ATPasen, über zwei ATPase-Domänen und eine N-terminale Substraterkennungsdomäne (VAT-N) von 185 Aminosäuren. VAT zeigt Aktivität in der Proteinfaltung und -entfaltung und trägt somit zu der allgemeinen Funktion von ATPasen bei, Proteinkomplexe zu zerlegen und / oder abzubauen.

Dieses Protein wurde als ein Modell von besonderer phylogenetischer Position und hoher thermischer Stabilität gewählt, welche sich für biophysikalische Untersuchungen und zur Strukturbestimmung als geeignet erwies. Die erhaltene Struktur liefert eine physikalische Grundlage dafür, daß VAT-N, Polypeptide zu binden vermag, Proteinaggregation verhindert und die Rückfaltung von erlaubten Substraten katalysiert (11). Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von VAT-N suggerieren, daß es einen Vorreiter in der Evolution von Proteinasen mit einem $\beta\alpha\beta$ -Strukturelement darstellt.

4.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen

4.2.1 Einleitung

In diesem Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Murray Coles, Tammo Diercks und Jens Liermann mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die Struktur der N-terminalen Domäne des VAT-Proteins (VAT-N) in Lösung bestimmt (12). Die untersuchte N-terminale Domäne des VAT-Proteins wurde von Dr. Jürgen Peters aus dem Arbeitskreis

von Prof. Wolfgang Baumeister am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in *Escherichia coli* exprimiert und gereinigt (11).

4.2.2 NMR-Experimente

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden einheitlich ^{15}N -markierte und einheitlich $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierte wäßrige VAT-N-Proben mit 10 % D_2O bei einem pH-Wert von 5,9 verwendet. Die Experimente wurden bei 320 K an DMX-Spektrometern von Bruker bei Protonenfrequenzen von 600 und 750 MHz durchgeführt. Weitere Parameter sind im Anhang aufgezeichnet.

Die Meßtemperatur von 320 K wurde aus einer Reihe von ^{15}N -HSQC-Spektren mit Temperaturvariation als Optimum ausgewählt. Aufgrund der verbesserten Relaxationseigenschaften wurde die Temperatur möglichst hoch gewählt. Jedoch nimmt bei Temperaturen oberhalb von 325 K der Amidprotonenaustausch stark zu. Zusätzlich treten bei derart hohen Temperaturen Probleme mit der physikalischen Probenstabilität (Rückfluß des Lösungsmittels im NMR-Röhrchen) auf, die besonders bei längeren Experimenten unterdrückt werden mußten.

VAT-N zeigte trotz seiner Größe von 185 Aminosäuren ungewöhnlich hohe Intensitäten und geringe Linienbreiten im ^{15}N -HSQC-Spektrum (Abbildung 4.1). Dennoch treten aufgrund vieler identischer Aminosäuren und struktureller Homologien einige Überlagerungen auf. Dies erforderte eine ungewöhnliche Vielfalt an Experimenten mit unterschiedlichen Kombinationen der chemischen Verschiebungsdimensionen, um die Vielzahl an Signalen aufzulösen.

4.2.3 Zuordnung der NMR-Resonanzsignale

Für die sequentielle Zuordnung der Proteinerückgratresonanzen von VAT-N wurde das automatische Zuordnungsprogramm PASTA (192) genutzt, basierend auf den $C\alpha$ -, $C\beta$ -, $H\alpha$ - und $H\beta$ -chemischen Verschiebungsinformationen. Aufgrund der ungewöhnlich vielen Doppeldeutigkeiten in den $H\alpha$ - bzw. $C\alpha$ -chemischen Verschiebungswerten mußten in diesem Fall zusätzlich die $H\beta$ - bzw. $C\beta$ -Informationen zur Sequenzierung mit herangezogen werden. Diese wurden aus einer Reihe von Tripelresonanzexperimenten (HNCA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HN(CA)HA, HN(COCA)HA, HNHAHB und HBHA(CO)NH) abgeleitet. Insgesamt konnten, außer den Prolinen, 173 von 177 Aminosäureresten vollständig zugeordnet werden. Für die vier verbleibenden Reste M1, E2, S16 und T17 konnten keine Signale identifiziert werden, weder in den Tripelresonanz- noch in den verschiedenen NOESY-Spektren. Die $C\alpha$ -, $C\beta$ -, $H\alpha$ - und $H\beta$ -chemischen Verschiebungsdaten für alle Proline konnten aus den sequentiellen (i-1)-Signalen in den Tripelresonanzexperimenten extrahiert werden. Zusätzlich konnten die ^{13}C -Carbonylkohlenstoffatome mit Hilfe eines HNCO-Experiments zugeordnet werden.

Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Seitenkettenresonanzen erfolgte basierend auf den $H\beta$ - bzw. $C\beta$ -Informationen aus der sequentiellen Zuordnung über die dreidimensionalen H(C)CH-TOCSY- und (H)CCH-COSY-Experimente. Die Seitenkettenamidprotonen der Asparagin- und Glutamin-Reste wurden stereospezifisch unter Nutzung einer Kombination von CBCA(CO)NH₂- und 2D-H₂NCO-E.COSY-Experimenten (193) zugeordnet.

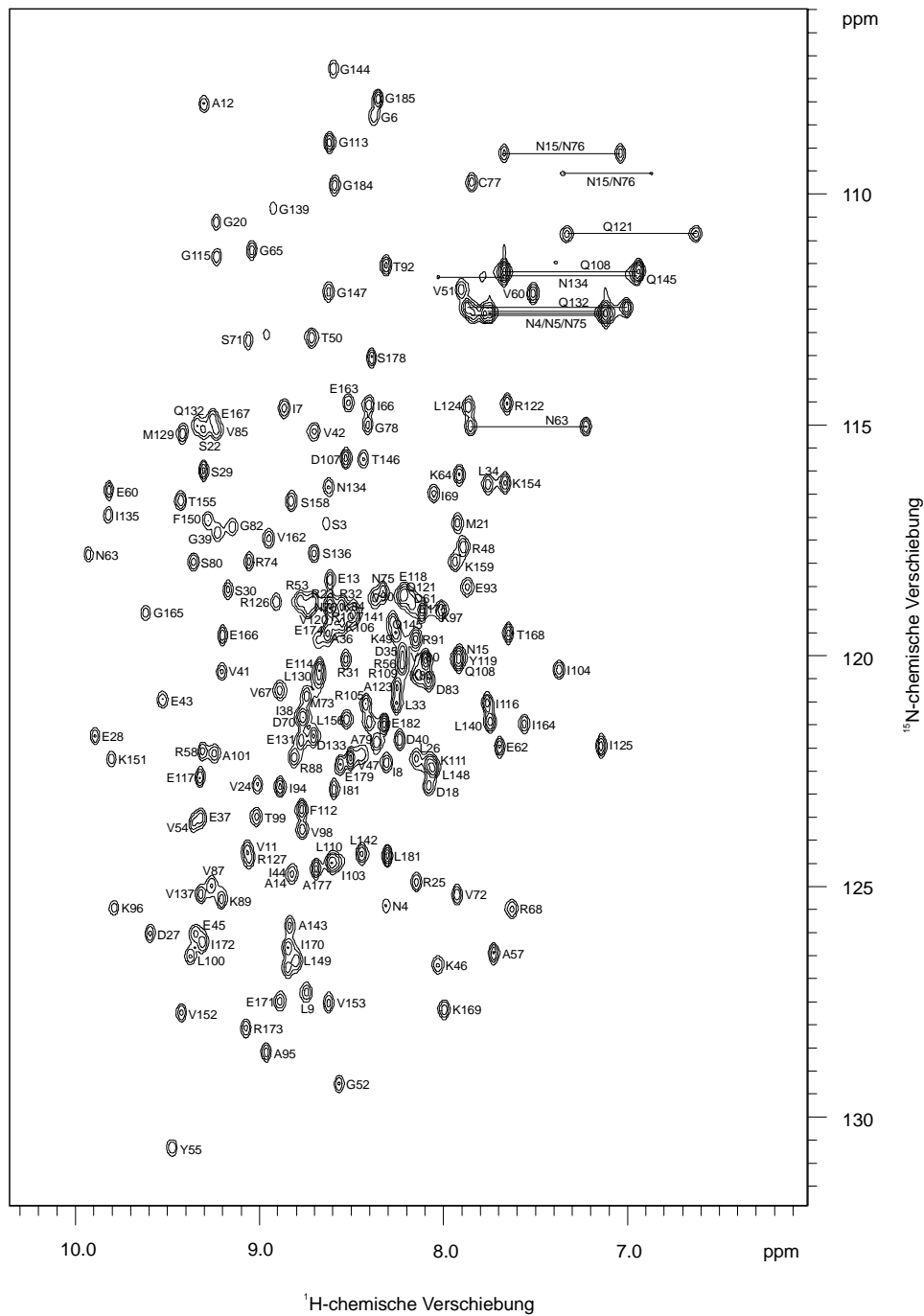


Abbildung 4.1: ^{15}N -HSQC-Spektrum von VAT-N

Auf diese Weise verblieben sehr wenige aliphatische Seitenketten-signale, die nicht zugeordnet werden konnten. Diese befinden sich hauptsächlich in längeren Seitenketten und in den Seitenketten der

Aminosäurereste, deren Rückgratresonanzen nicht auffindbar waren. Es war nicht möglich, die Aminogruppen in den Seitenketten der Arginine und Lysine aufgrund ihrer schwachen Signale und der ausgedehnten Mehrdeutigkeiten zuzuordnen. Eine stereospezifische Zuordnung der prochiralen H β -Kerne erfolgte für 50 Aminosäurereste aus den NOE-Mustern und den $^3J_{N-H\beta}$ -Kopplungskonstanten, die aus dem HNHB-Spektrum erhalten wurden. Ebenfalls wurden 18 von 20 prochiralen Methylgruppen der Valin-Reste stereospezifisch zugeordnet, außer den Signalen von V87 und V180, die nur unzureichend aufgelöst werden konnten. Somit wurden 99 % der Proteinrückgrat- und 95 % der Seitenkettenresonanzen vollständig zugeordnet.

4.2.4 Strukturbestimmung

Anhand des Indexes der chemischen Verschiebungen für H α , C α , C β und CO (89) konnte die Sekundärstruktur ermittelt werden (Abbildung 4.2).

Mit den NOE-Konnektivitäten, den $^3J_{HNH\alpha}$ -Kopplungskonstanten und den Austauschraten der Amidprotonen war es anschließend möglich, die exakte Faltungstopologie des Proteins (Abbildung 4.3) zu bestimmen. Demzufolge kann VAT-N in zwei Subdomänen gleicher Größe und annähernd gleichen Anteilen an α -Helices und β -Faltblättern unterteilt werden. Die N-terminale Subdomäne VAT-Nn erstreckt sich von M1 bis T92 und bildet ein β -*Barrel*, bestehend aus 6 β -Strängen und zwei kurzen α -Helices. Die C-terminale Subdomäne VAT-Nc besteht hingegen aus 6 β -Strängen und einer langen α -Helix. Sie erstreckt sich über die

Aminosäurereste E93 bis G185.

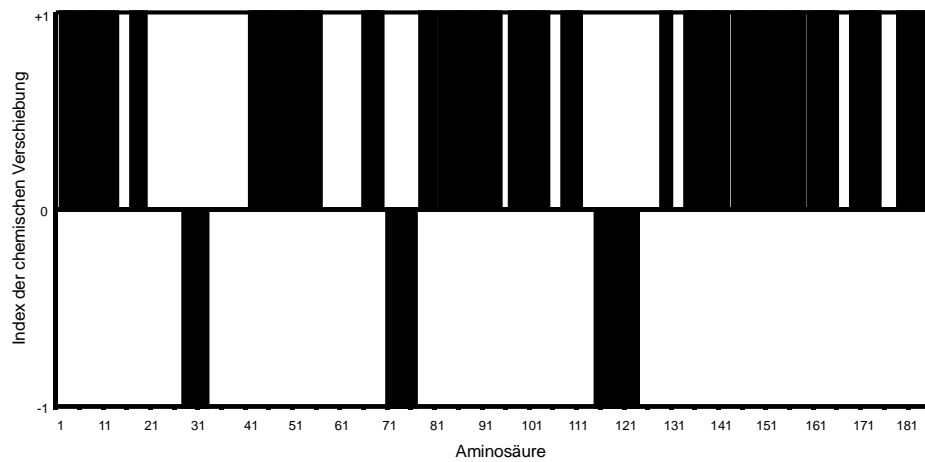


Abbildung 4.2: Index der chemischen Verschiebung (Konsens) von VAT-N

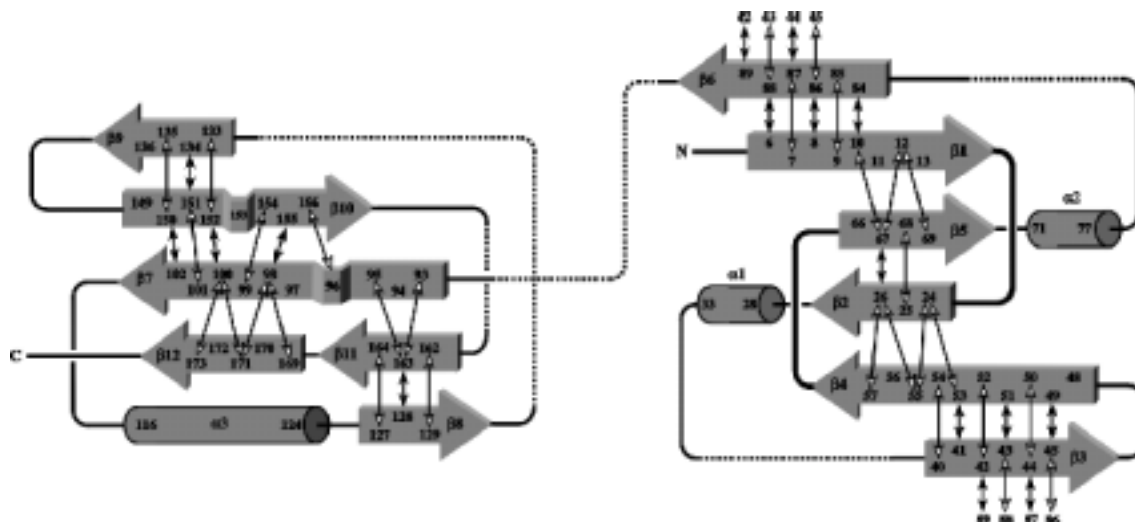


Abbildung 4.3: Faltungstopologie von VAT-N

Die für eine Strukturrechnung notwendigen NOE-Daten wurden aus einer Reihe komplementärer dreidimensionaler NOESY-Experimente bestimmt, welche pseudo-vierdimensionale Informationen der chemischen Verschiebung lieferten. Unterstützend zum ^{15}N -HSQC-NOESY-Spektrum wurden die CNH-NOESY- und NNH-NOESY-Spektren aufgenommen. Das ^{13}C -HSQC-NOESY-Experiment wurde durch das CCH-NOESY- und das NCH-NOESY-Experiment erweitert. Diese waren aufgrund der hohen Überlappungen besonders im Bereich der Methylgruppen notwendig und lieferten insgesamt 1834 verwertbare Kreuzsignale. Die NOE-Signale wurden gemäß der Intensitätsverteilung der zugrundeliegenden HSQC-Spektren skaliert und in Molekülabstände konvertiert. Basierend auf den $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten aus dem HNHA-Experiment wurden die Torsionswinkel ϕ im Proteinerückgrat definiert. Für 101 identifizierte Rotamere von Aminosäureresten wurden Dihedralwinkel χ^1 in den Seitenketten benutzt. Aus den MEXICO-Experimenten wurden zusätzlich die Austauschraten für die Amidprotonen mit Wasser bestimmt und in die Rechnungen einbezogen. Die Strukturrechnung erfolgte mit dem Programmpaket XPLOR.

4.2.5 Diskussion der Ergebnisse

Die aus NMR-spektroskopischen Daten erhaltene Lösungsstruktur der N-terminalen Domäne des VAT-Proteins kann als allgemeines Strukturmodell der N-terminalen Domänen der Typ-2-AAA-Proteine angesehen werden und liefert einen Ausgangspunkt für weitere Studien, den Mechanismus der Proteinfaltung und -entfaltung in der Cdc48/p97-Familie besser zu verstehen.

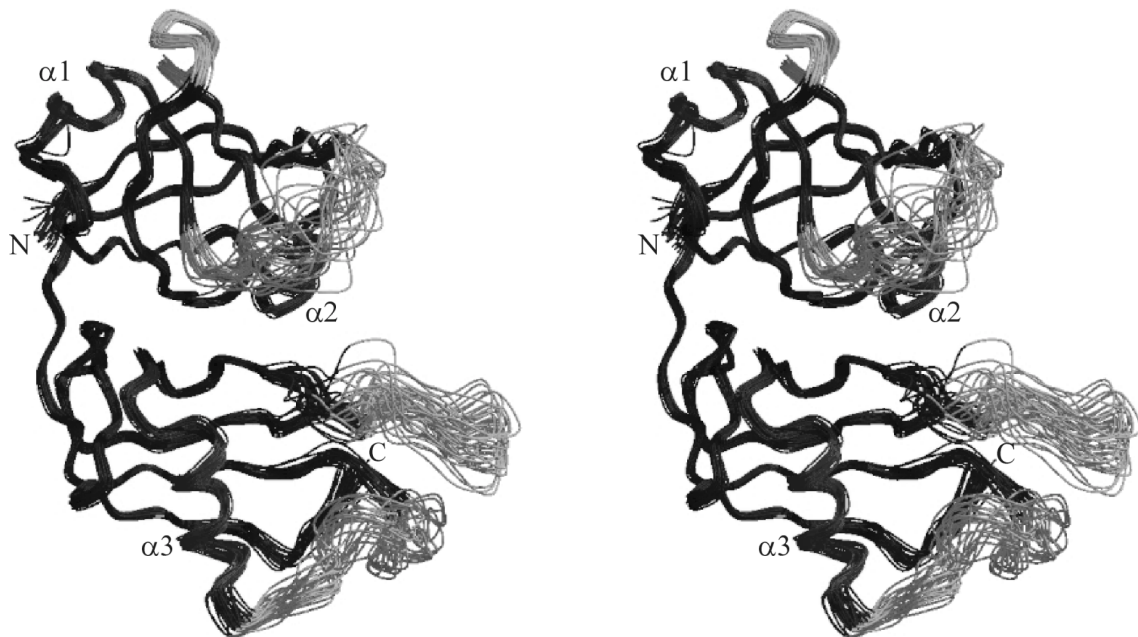


Abbildung 4.4: Struktur von VAT-N

VAT-N besitzt eine kompakte nierenförmige Struktur (Abbildung 4.4), die aus zwei gleich großen Subdomänen VAT-Nn und VAT-Nc gebildet wird. Die N-terminale Subdomäne VAT-Nn unterteilt sich wiederum in zwei strukturell identische und zu 38 % sequenzanalogue Untereinheiten, die jeweils ein $\beta\beta\alpha\beta$ -Faltungsmotiv vorweisen. Gemeinsam bilden die 6 β -Faltblätter ein Doppel- ψ - β -*Barrel* mit 4 antiparallelen und 2 parallelen Strängen. Die zwei kurzen α -Helices liegen symmetrisch über den Enden des *Barrels*, mit ihren Achsen senkrecht zu der Achse des *Barrels*. Die C-terminale Subdomäne VAT-Nc bildet im Gegensatz zu VAT-Nn kein geschlossenes *Barrel* sondern eine Art offene β -*Clam*-Struktur, bestehend aus 6 β -Faltblättern und einer langen α -Helix quer über der Mulde. Die Orientierung der zwei Subdomänen zueinander ist mit 29 NOE-Kontakten relativ gut bestimmt. Sie sind im Gegensatz zu

bekannten hantelförmigen Strukturen dicht zueinander geneigt und bilden so eine nierenförmige Gesamtstruktur.

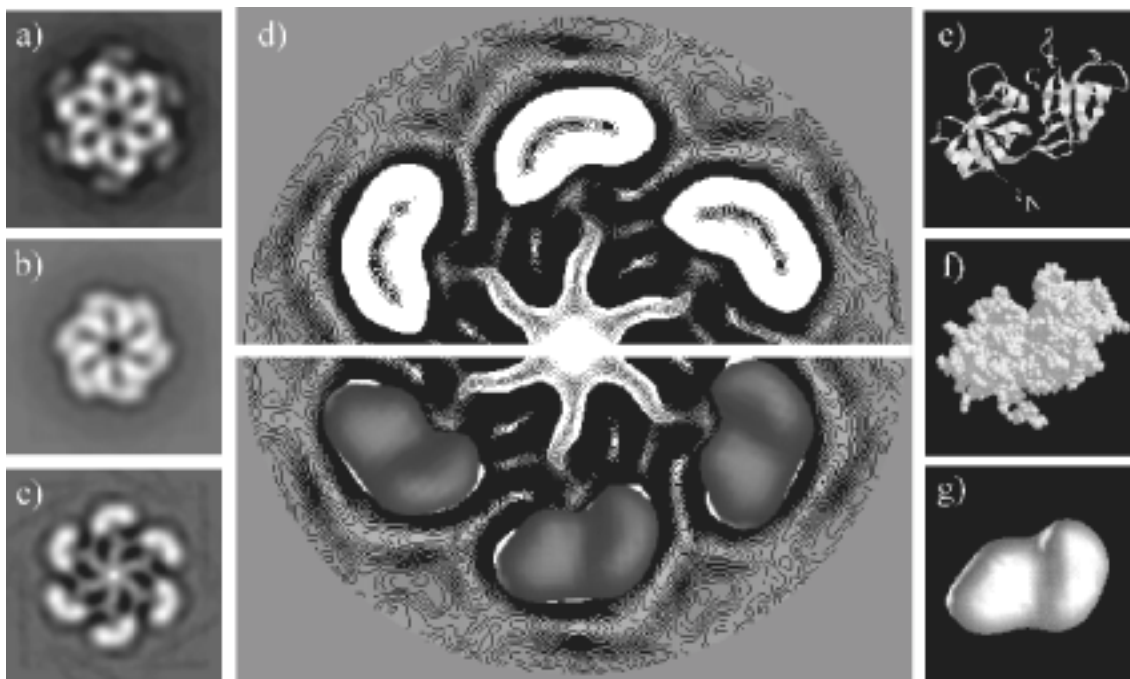


Abbildung 4.5: Differenzbild von VAT-N

Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Pamnani et al. (190) ist bekannt, daß VAT einen hexameren Ring von etwa 15,5 nm im Durchmesser ausbildet. Aus einer weiteren elektronenmikroskopischen Studie des Proteins ohne N-terminale Domäne VAT- Δ N von Rockel et al. (191) resultiert eine konstruierte Differenzabbildung (Abbildung 4.5), welche die Form von VAT-N und dessen Position im Hexamer definiert. Die aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen erhaltene Struktur von VAT-N stimmt in ihrer Größe und Form sehr gut mit der vorgegebenen Struktur in der Differenzabbildung überein. Somit kann die

Orientierung der N-terminalen Domäne innerhalb des VAT-Proteins sehr gut festgelegt werden.

In biophysikalischen Studien des VAT-Komplexes und der isolierten VAT-N-Domäne wurde von Golbik et al. (11) gefunden, daß beide Proteine denaturierte Substratproteine binden und deren Rückfaltung katalysieren können. Im Fall von Cyclophilin, dessen Rückfaltung kein ATP erfordert, war VAT-N genau so wirksam wie das vollständige Protein. Dieses Experiment zeigt, daß VAT-N als Substratbindungsdomäne im VAT-Komplex fungiert.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden NMR-spektroskopische Experimente zur Struktur und Wirkungsweise des Membranproteins EmrE und der N-terminalen Domäne des VAT-Proteins durchgeführt.

Den Schwerpunkt der Arbeit bildeten die Studien an dem *multidrug*-Transportprotein EmrE. Ausgehend von seiner guten Löslichkeit in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol war es möglich, für Strukturuntersuchungen die Vorteile der hochauflösenden kernmagnetischen Resonanzspektroskopie in isotropen Lösungen zu nutzen. Unter diesen Bedingungen konnten aus einer Reihe ^{15}N - und ^{13}C -editierter 3D-NMR-Spektren die Resonanzen des Proteinrückgrats und der Seitenketten nahezu vollständig zugeordnet werden. Ausgehend von diesen Informationen konnte die Sekundärstruktur in Lösung sehr gut bestimmt werden (9).

Aufgrund nicht vollständig ausgebildeter Tertiärstrukturen im organischen Lösungsmittel wurden für weitere NMR-spektroskopische Experimente biologisch relevantere Untersuchungsmedien ausgewählt. In biochemischen Aktivitätstests konnte nur eine geeignete Detergenzmizelle gefunden werden. Der gebildete Protein-Detergenz-Komplex besitzt basierend auf seiner Größe jedoch für ergänzende Strukturbestimmungen zu lange Korrelationszeiten.

Daher wurden schließlich für fortführende Arbeiten Modellsysteme verwendet, die einer natürlichen Membran sehr ähnlich sind. Sie bedingen jedoch die Anwendung der Festkörper-NMR-Spektroskopie. Das gereinigte Protein wurde erfolgreich in einer Lipidmembran rekonstituiert

und mit speziellen Methoden der MAS-NMR-Spektroskopie untersucht. In durchgeführten Bindungsstudien mit einem hochaffinen Liganden konnten zwei Bindungsstellen mit unterschiedlichen Ligandeigenschaften analysiert werden (10).

Zusätzlich zu den Studien am Membranprotein EmrE wurde die N-terminale Domäne des VAT-Proteins untersucht. Dabei gelang es die Struktur von VAT-N in Lösung sehr genau zu bestimmen (12). Aufgrund seiner Sequenzhomologie wird die Struktur von VAT-N als allgemeines Modell für die N-terminalen Domänen der Typ2-AAA-Proteine angesehen und liefert damit einen Ausgangspunkt für mechanistische Studien zur Proteinfaltung und -entfaltung in der Cdc48/p97-Familie.

6 Literaturverzeichnis

- (1) N. A. Campbell, *Biology*; The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., **1996**.
- (2) L. Stryer, *Biochemistry*; W. H. Freeman and Company: New York, **1995**.
- (3) J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy - Principles and Practice*; Academic Press: San Diego, **1996**.
- (4) G. D. Henry, B. D. Sykes, *Methods in Enzymology*; Academic Press, Inc., **1994**; 239, 515 - 535.
- (5) R. G. Griffin, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 508 - 512.
- (6) S. J. Opella, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 845 - 848.
- (7) A. Watts, *Curr. Opin. Biotechnology* **1999**, 10, 48 - 53.
- (8) H. Yerushalmi, M. Lebendiker, S. Schuldiner, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 6856 - 6863.
- (9) M. Schwaiger, M. Lebendiker, H. Yerushalmi, M. Coles, A. Gröger, C. Schwarz, S. Schuldiner, H. Kessler, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 254, 610 - 619.
- (10) C. Glaubitz, A. Gröger, K. Gottschalk, P. Spooner, A. Watts, S. Schuldiner, H. Kessler, *FEBS Lett.* **2000**, 24031, 1 - 5.
- (11) R. Golbik, A. Lupas, K. K. Koretke, J. Peters, W. Baumeister, *Biol. Chem.* **1999**, 380, 1049 - 1062.
- (12) M. Coles, T. Diercks, J. Liermann, A. Gröger, B. Rockel, W. Baumeister, K. K. Koretke, A. Lupas, J. Peters, H. Kessler, *Curr. Biol.* **1999**, 9, 1158 - 1168.

-
- (13) A. Abragam, *The principles of nuclear magnetism*; Oxford University Press: Oxford, **1961**.
- (14) T. C. Farrar, E. D. Becker, *Pulse and fourier transform NMR: introduction to theory and methods*; Academic Press: New York, **1971**.
- (15) I. Ando, G. A. Webb, *Theory of NMR parameters*; Academic Press: London, **1983**.
- (16) M. Mehring, *Principles of High Resolution NMR in Solids*; Springer Verlag: Berlin, **1983**.
- (17) R. K. Harris, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*; Longman: Burnt Mill, **1986**.
- (18) R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two Dimensions*; Clarendon Press: Oxford, **1987**.
- (19) R. Freeman, *A handbook of nuclear magnetic resonance*; Longman Scientific and Technical: Harlow, **1988**.
- (20) R. J. Abraham, J. Fisher, P. Loftus, *Introduction to NMR Spectroscopy*; Wiley: Chichester, **1988**.
- (21) C. P. Slichter, *Principles of Magnetic Resonance*; Springer Verlag: Berlin, **1989**.
- (22) J. K. M. Sanders, B. K. Hunter, *Modern NMR Spectroscopy*; Oxford University Press: Oxford, **1992**.
- (23) D. M. Grant, R. K. Harris, *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance*; Wiley: New York, **1995**.
- (24) F. Bloch, W. W. Hansen, *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 127.
- (25) E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37 - 38.
- (26) R. R. Ernst, W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instr.* **1966**, *37*, 93 - 102.

-
- (27) J. H. Noggle, R. E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser Effect, chemical applications*; Academic Press: New York, **1971**.
- (28) D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*; VCH: New York, **1989**.
- (29) G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *NMR of Proteins*; MacMillan: Basingstoke, **1993**.
- (30) J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*; Oxford University Press: Oxford, **1995**.
- (31) C. Dalvit, G. Shapiro, J.-M. Böhlen, T. Parella, *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 7 - 14.
- (32) M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 93 - 158.
- (33) G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Science* **1991**, *252*, 1390.
- (34) C. Weber, G. Wider, B. von Freyberg, R. Traber, W. Braun, H. Widmer, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6563.
- (35) S. W. Fesik, R. T. J. Gampe, H. L. Eaton, G. Gemmecker, E. T. Olejniczak, P. Neri, T. F. Holzman, D. A. Egan, R. Edalji, R. Simmer, R. Helfrich, J. Hochlowski, M. Jackson, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6574.
- (36) M. Ikura, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, G. Zhu, C. B. Klee, A. Bax, *Science* **1992**, *256*, 633.
- (37) R. H. Fogh, D. Schipper, R. Boelens, R. Kaptein, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 123.
- (38) M. L. Remerowski, T. Domke, A. Groenewegen, H. A. M. Pepermans, C. W. Hilbers, F. J. M. van de Ven, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 257.
- (39) S. Grzesiek, J. Anglister, H. Ren, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4369 - 4370.

- (40) T. Yamazaki, W. Lee, M. Revington, D. L. Mattiello, F. W. Dahlquist, C. H. Arrowsmith, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6464 - 6465.
- (41) A. Kalk, H. J. C. Berendsen, *J. Magn. Reson.* **1976**, *24*, 343 - 366.
- (42) S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531.
- (43) P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1997**, *278*, 497.
- (44) J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, J. H. Prestegard, *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 292.
- (45) N. Tjandra, J. G. Omichinski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, A. Bax, *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 732.
- (46) N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, *278*, 1111.
- (47) B. Reif, M. Hennig, C. Griesinger, *Science* **1997**, *276*, 1230.
- (48) K. V. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366 - 12371.
- (49) K. V. Pervushin, G. Wider, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1999**.
- (50) M. Czisch, R. Boelens, *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 158 - 160.
- (51) M. Rance, J. P. Loria, A. G. Palmer III, *J. Magn. Reson.* **1999**, *136*, 92 - 101.
- (52) D. Yang, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2571 - 2575.
- (53) D. Yang, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 3 - 10.
- (54) D. Fushman, D. Cowburn, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 139 - 147.
- (55) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507 - 554.
- (56) B. H. Oh, W. M. Westler, P. Derba, J. L. Markley, *Science* **1988**, *240*, 90821.
- (57) M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659 - 4667.

-
- (58) L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 496 - 514.
- (59) B. T. Farmer, R. A. Venters, L. D. Spicer, M. G. Wittekind, L. Müller, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 195 - 202.
- (60) S. Grzesiek, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 432 - 440.
- (61) A. Bax, M. Ikura, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 99 - 104.
- (62) R. T. Clubb, G. Wagner, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 389 - 394.
- (63) R. T. Clubb, V. Thanabal, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 213 - 217.
- (64) S. Seip, J. Balbach, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 233 - 237.
- (65) S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6291 - 6293.
- (66) S. Grzesiek, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 185 - 204.
- (67) A. C. Wang, P. J. Lodi, J. Qin, G. W. Vuister, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *J. Magn. Reson. B* **1994**, *105*, 196 - 198.
- (68) S. Grzesiek, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1992**, *99*, 201 - 207.
- (69) M. Wittekind, L. Müller, *J. Magn. Reson. B* **1993**, *101*, 201 - 205.
- (70) L. E. Kay, M. Ikura, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 84 - 92.
- (71) R. Weisemann, H. Rüterjans, W. Bermel, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 113 - 120.
- (72) S. Seip, J. Balbach, H. Kessler, *J. Magn. Reson.* **1992**, *100*, 406 - 410.
- (73) R. T. Clubb, V. Thanabal, G. Wagner, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 203 - 210.
- (74) T. Szyperski, G. Wider, J. H. Bushweller, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 127 - 132.
- (75) K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley New York: New York, **1986**.
- (76) K. Wüthrich, *Science* **1989**, *243*, 45 - 50.

- (77) A. Bax, G. M. Clore, P. C. Driscoll, A. M. Gronenborn, M. Ikura, L. E. Kay, *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 620 - 627.
- (78) A. Bax, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1990**, *88*, 425 - 431.
- (79) S. W. Fesik, H. L. Eaton, E. T. Olejniczak, E. R. P. Zuiderweg, L. P. McIntosh, F. W. Dahlquist, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 886.
- (80) R. Weisemann, F. Löhr, H. Rüterjans, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 587 - 593.
- (81) S. Grzesiek, J. Anglister, A. Bax, *J. Magn. Reson. B* **1993**, *101*, 114 - 119.
- (82) J. J. Prompers, A. Groenewegen, C. W. Hilbers, H. A. M. Pepermans, *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 68 - 75.
- (83) A. Pastore, V. Saudek, *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 165 - 176.
- (84) M. Williamson, *Biopolymers* **1990**, *29*, 1423 - 1431.
- (85) D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311 - 333.
- (86) K. Ösapay, D. A. Case, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 215 - 230.
- (87) A. Pardi, G. Wagner, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **1983**, *137*, 445 - 454.
- (88) P. Luginbühl, T. Szyperski, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1995**, *109*, 229 - 233.
- (89) D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647 - 1651.
- (90) D. S. Wishart, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171 - 180.
- (91) D. S. Wishart, M. S. Watson, R. F. Boyko, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 329 - 336.
- (92) G. Cornilescu, F. Delaglio, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289 - 302.
- (93) G. W. Vuister, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7772 - 7777.

- (94) G. C. K. Roberts, *NMR of Macromolecules: a Practical Approach*; Oxford University Press: Oxford, **1993**.
- (95) R. E. Handschumacher, I. M. Armitage, *NMR Methods for Elucidating Macromolecule-Ligand Interactions: An Approach to Drug Design*; Pergamon: Oxford, **1989**.
- (96) D. J. Craik, *NMR in Drug Design*; CRC: Boca Raton, **1995**.
- (97) G. Otting, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 760 - 768.
- (98) S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2937 - 2945.
- (99) M. L. Tillett, M. A. Horsfield, L.-Y. Lian, T. J. Norwood, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 223 - 232.
- (100) B. C. Gerstein, C. R. Dybrowki, *Transient techniques in NMR of solids*; Academic Press: London, **1985**.
- (101) J. H. Davis, M. Auger, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *35*, 1 - 84.
- (102) F. C. L. Almeida, S. J. Opella, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 481 - 495.
- (103) M. M. Maricq, J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 3300 - 3316.
- (104) G. E. Maciel, C. E. Bronnimann, B. L. Hawkins, *Adv. Magn. Reson.* **1990**, *14*, 125 - 150.
- (105) A. M. Portis, *Phys. Rev.* **1953**, *91*, 1071 - 1078.
- (106) J. H. Davis, M. Auger, R. S. Hodges, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1917 - 1932.
- (107) S. Hafner, H. W. Spiess, *Solid State NMR* **1997**, *8*, 17.
- (108) G. Harbison, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4752 - 4754.
- (109) R. R. Vold, R. S. Prosser, A. J. Deese, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 329 - 335.
- (110) J. Seelig, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *515*, 105 - 140.
- (111) P. R. Cullis, M. J. Hope, *Nature* **1978**, *271*, 672 - 674.

- (112) F. M. Marassi, S. J. Opella, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 640 - 648.
- (113) F. M. Marassi, A. Ramamoorthy, S. J. Opella, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8551 - 8556.
- (114) T. A. Cross, S. J. Opella, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 574 - 581.
- (115) S. J. Opella, Y. Kim, P. McDonnell, *Meth. Enzymol.* **1994**, *239*, 536 - 560.
- (116) S. J. Opella, P. L. Stewart, K. G. Valentine, *Quart. Rev. Biophys.* **1987**, *19*, 7 - 49.
- (117) S. J. Opella, P. L. Stewart, *Meth. Enzymol.* **1989**, *176*, 242 - 275.
- (118) C. H. Wu, A. Ramamoorthy, S. J. Opella, *J. Magn. Reson. A* **1994**, *109*, 270 - 272.
- (119) A. Ramamoorthy, C. H. Wu, S. J. Opella, *J. Magn. Reson. B* **1995**, *107*, 88 - 90.
- (120) C. H. Wu, A. Ramamoorthy, L. M. Gierasch, S. J. Opella, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6148 - 6149.
- (121) F. M. Marassi, S. J. Opella, *J. Magn. Reson.* **2000**, *144*, 150 - 155.
- (122) E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659.
- (123) E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1959**, *183*, 1802.
- (124) I. J. Lowe, *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285.
- (125) E. O. Stejskal, J. D. Memory, *High resolution NMR in the solid state. Fundamentals of CP/MAS*; Oxford University Press: New York, **1994**.
- (126) M. Goldman, *Spin temperature and NMR in solids*; Oxford University Press: London, **1970**.
- (127) D. L. Demco, J. Tegenfeldt, J. S. Waugh, *Phys. Rev.* **1975**, *11*, 4133 - 4151.

- (128) J. Schäfer, E. O. Stejskal, H. Buchdahl, *Macromolecules* **1977**, *10*, 384 - 405.
- (129) E. O. Stejskal, J. Schäfer, R. A. McKay, *J. Magn. Reson.* **1984**, *57*, 471 - 485.
- (130) G. S. Harbison, J. E. Roberts, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7221 - 7223.
- (131) J. Herzfeld, A. E. Berger, *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 6021 - 6040.
- (132) H. J. M. de Groot, S. O. Smith, A. C. Kolbert, J. M. L. Courtin, C. Winkel, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 30 - 38.
- (133) C. Glaubitz, G. Gröbner, A. Watts, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1463*, 151 - 161.
- (134) C. Glaubitz, A. Watts, *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 305 - 316.
- (135) G. Gröbner, A. Taylor, P. T. F. Williamson, G. Choi, C. Glaubitz, J. A. Watts, W. J. de Grip, A. Watts, *Anal. Biochem.* **1997**, *254*, 132 - 138.
- (136) R. Smith, F. Separovic, F. C. Bennet, B. A. Cornell, *Biophys. J.* **1992**, *63*, 469 - 474.
- (137) C. Glaubitz, *Concepts in Magnetic Resonance* **2000**, *12*, 137 - 151.
- (138) W. D. Stein, *Transport and Diffusion across Cell Membranes*; Academic Press: Orlando, **1986**.
- (139) D. L. Melchior, *Curr. Top. Membr. Transp.* **1982**, *17*, 263 - 316.
- (140) J. Stohrer, G. Gröbner, D. Reimer, K. Weiß, C. Mayer, G. Kothe, *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 672 - 678.
- (141) K. Weiß, G. Gröbner, C. Mayer, J. Stohrer, G. Kothe, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1100 - 1112.
- (142) S. Schuldiner, M. Lebendiker, H. Yerushalmi, *J. Exp. Biol.* **1997**, *200*, 335 - 341.
- (143) H. Nikaido, *Science* **1994**, *264*, 382 - 388.

- (144) A. Adremont, D. Corpet, P. Courvalin, *Spektrum der Wissenschaft* **1997**, 7, 50 - 57.
- (145) J. Travis, *Science* **1994**, 264, 360 - 362.
- (146) S. Schuldiner, A. Shirvan, M. Linial *Physiological Reviews* **1995**, 75, 369 - 392.
- (147) L. L. Grinius, G. Dreguniene, E. B. Goldberg, C. H. Llia, S. J. Projan, *Plasmid* **1992**, 27, 119 - 129.
- (148) L. T. Paulsen, R. A. Skurray, R. Tam, M. H. Saier, R. J. Turner, H. Weiner, E. B. Goldberg, L. L. Grinius, *Mol. Microbiol.* **1996**, 19, 1167 - 1175.
- (149) A. S. Purewal, *FEMS Microbiology Lett.* **1991**, 82, 229 - 232.
- (150) M. Morimyo, E. Hongo, H. Hama-Inaba, I. Machida, *Nucleic Acids Research* **1992**, 20, 3159 - 3165.
- (151) I. T. Arkin, W. P. Russ, M. Lebendiker, S. Schuldiner, *Biochemistry* **1996**, 35, 7233 - 7238.
- (152) J. Kyte, R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* **1982**, 157, 105 - 132.
- (153) M. Lebendiker, S. Schuldiner, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 21193 - 21199.
- (154) H. Yerushalmi, M. Lebendiker, S. Schuldiner, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 31044 - 31048.
- (155) R. Yelin, D. Rotem, S. Schuldiner, *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 949 - 956.
- (156) S. Steiner Mordoch, D. Granot, M. Lebendiker, S. Schuldiner, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 19480 - 19486.
- (157) M. Ahmed, C. M. Borsch, S. S. Taylor, N. Vazquez-Laslop, A. A. Neyfakh, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 28506 - 28513.
- (158) E. E. Zheleznova, P. N. Markham, A. A. Neyfakh, R. G. Brennan, *Cell* **1999**, 96, 353 - 362.

- (159) H. Yerushalmi, S. Schuldiner, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5264 - 5269.
- (160) T. R. Muth, S. Schuldiner, *The EMBO Journal* **2000**, *19*, 234 - 240.
- (161) D. S. Wishart, C. G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H. J. Dyson, E. Oldfield, J. L. Markley, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 135 - 140.
- (162) D. Marion, P. C. Driscoll, L. E. Kay, P. T. Wingfield, A. Bax, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6150 - 6156.
- (163) A. J. Shaka, J. Keeler, T. Frenkiel, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1983**, *52*, 335 - 338.
- (164) E. R. P. Zuiderweg, S. W. Fesik, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2387 - 2391.
- (165) D. Marion, L. E. Kay, S. W. Sparks, D. A. Torchia, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1515 - 1517.
- (166) S. J. Archer, M. Ikura, M. B. Sporn, D. A. Torchia, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1991**, *95*, 636 - 641.
- (167) L. E. Kay, G. Xu, A. U. Singer, D. R. Muhandiram, J. D. Forman-Kay, *J. Magn. Reson.* **1993**, *101*, 333 - 337.
- (168) B. T. Farmer II, R. A. Venters, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4187 - 4188.
- (169) R. M. Gschwind, G. Gemmecker, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1998**, *11*, 191 - 198.
- (170) S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12593 - 12594.
- (171) O. Vinogradova, F. D. Sönnichsen, C. R. Sanders II, *J. Biomol. NMR* **1998**, *4*, 381 - 386.
- (172) O. Vinogradova, P. Badola., L. Czerski, F. D. Sönnichsen, C. R. Sanders II, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2688 - 2701.
- (173) *Bruker Almanach*, **1998**.

- (174) S. O. Smith, K. Aschheim, M. Groesbeek, *Q. Rev. Biophys.* **1996**, *29*, 395 - 449.
- (175) A. Watts, I. J. Burnett, C. Glaubitz, G. Gröbner, D. A. Middleton, P. J. R. Spooner, P. T. F. Williamson, *Eur. Biophys. J.* **1998**, *28*, 84 - 90.
- (176) P. J. R. Spooner, N. G. Rutherford, A. Watts, P. J. F. Henderson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 3877 - 3881.
- (177) D. A. Middleton, R. Robins, X. L. Feng, M. H. Levitt, I. D. Spiers, C. H. Schwalbe, D. G. Reid, A. Watts, *FEBS Lett.* **1997**, *410*, 269 - 274.
- (178) P. T. F. Williamson, G. Gröbner, K. Miller, A. Watts, *Biochemistry* **1998**, *37*, 10854 - 10859.
- (179) S. O. Grim, W. McFarlane, E. F. Davidoff, T. J. Marks, *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 581 - 585.
- (180) J. R. Van Wazer, L. H. Letcher, *³¹P-NMR*; Wiley: New York, **1967**.
- (181) D. G. Gorenstein, *³¹P-NMR*; Academic Press: New York, **1984**.
- (182) B. D. N. Rao, *³¹P-NMR*; Academic Press: New York, **1984**.
- (183) J. L. Bock, B. Sheard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *66*, 24 - 30.
- (184) J. F. Chlebowski, I. M. Armitage, P. P. Tuas, J. E. Coleman, *J. Biol. Chem.* **1976**, *254*, 1207 - 1216.
- (185) W. E. Hull, S. E. Halford, H. Gutfreund, B. D. Sykes, *Biochemistry* **1976**, *15*, 1547 - 1561.
- (186) G. Gröbner, I. Burnett, C. Glaubitz, G. Choi, J. Mason, A. Watts, *Nature* **2000**, *405*, 810 - 813.
- (187) N. A. Clark, K. J. Rothschild, D. A. Luippold, B. A. Simon, *Biophys. J.* **1980**, *31*, 65 - 96.

- (188) K. J. Rothschild, K. M. Rosen, N. A. Clark, *Biophys. J.* **1980**, *25*, 45 - 52.
- (189) M. L. S. Patel, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 65 - 71.
- (190) V. Pamnani, T. Tamura, A. Lupas, J. Peters, Z. Cejka, W. Ashraf, W. Baumeister, *FEBS Lett.* **1997**, *404*, 263 - 268.
- (191) B. Rockel, J. Walz, R. Hegerl, J. Peters, D. Typke, W. Baumeister, *FEBS Lett.* **1999**, *451*, 27 - 32.
- (192) M. Leutner, R. M. Gschwind, J. Liermann, C. Schwarz, G. Gemmecker, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1998**, *11*, 31 - 43.
- (193) F. Löhr, H. Rüterjans, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 255 - 258.
- (194) T. Parella, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 467 - 495.
- (195) A. G. Palmer III, J. Cavanagh, P. E. Wright, M. Rance, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 151 - 170.
- (196) L. E. Kay, P. Keifer, T. Saarinen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10663 - 10665.
- (197) A. A. Maudsley, A. Wokaun, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1978**, *55*, 9 - 14.
- (198) R. E. Hurd, B. K. John, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 648 - 653.
- (199) R. Powers, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 209 - 213.

7 Anhang

7.1 EmrE

7.1.1 Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten

Die ^{15}N -, ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats und der Seitenketten sowie die $^3\text{J}(\text{H}^{\text{NH}^\alpha})$ -Kopplungskonstanten sind in der BioMagRes-Datenbank unter Account-Nr. 4136 abgelegt. Die $^3\text{J}(\text{H}^{\text{NH}^\alpha})$ -Kopplungskonstanten wurden aus dem HNHA-Spektrum nach Vuister et al. (93) bestimmt.

7.1.2 Experimentelle Parameter

Alle NMR-Experimente wurden bei 300 K an einem Vierkanal-Bruker-DMX750-Spektrometer mit Gradienteneinheit und Tripelresonanzprobenkopf durchgeführt. Die ^1H -chemische Verschiebung wurde auf internes Tetramethylsilan, die ^{15}N - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen in Termen von Frequenzverhältnissen Ξ referenziert (161). In allen Experimenten mit Amidprotonendetektion wurden gepulste Feldgradienten (194) zur Kohärenzselektion genutzt in Kombination mit *sensitivity enhancement* (195 - 196) bzw. Echo-Antiecho-Technik (197 - 198). Die Anzahl der komplexen Punkte und der *sweep*-Weiten in den Amiddimensionen betrug 512 Punkte bzw. 12,0 ppm für ^1H und 46 Punkte bzw. 25,0 ppm für ^{15}N . Die Quadraturdetektion in der

indirekten Dimension wurde unter Nutzung der States-TPPI-Methode (162) ausgeführt. Die ^{15}N -Dimension in den HNCA-, HNC0-, H(CCO)NH- und C(CCO)NH-Experimenten wurde gemäß *constant time* (199) aufgenommen.

Die NMR-Spektren wurden mit den Programmen UXNMR, AURELIA und SYBYL bearbeitet. In den indirekten Dimensionen erfolgte die *linear prediction* mittels *zero filling* auf die nächste Potenz von 2 und die Apodisierung mit einer 90° verschobenen quadratischen Sinus-Kurve. In der direkten Dimension wurde mit *zero filling* auf 1024 Punkte erweitert, mit einer 60° verschobenen quadratischen Sinus-Kurve apodisiert und eine Basislinienkorrektur durchgeführt.

Kanalbelegung, Pulsleistungen, Pulsbezeichnungen, Entkopplungsprogramme:

^1H (F_1):

- pl1: Pulsleistung für Standardprotonenpulse p1 (90°) und p2 (180°).
- pl11: Pulsleistung für Protonenentkopplung pl11 (90°), cpds1 (dipsi2-y).
- pl21: Pulsleistung für selektive Pulse auf Wasserresonanz p21 (90°).

^{13}C (F_2):

- pl2: Pulsleistung für halbselektive 90° -Kohlenstoffpulse p3.
- pl12: Pulsleistung für halbselektive 180° -Kohlenstoffpulse p4.
- sp5, sp6: Pulsleistung für selektive 180° -Kohlenstoffpulse p5, p6 (hermite08.256).

^{13}C (F_3 Carbonylfrequenz für Messungen an nicht deuterierten Proben):

- pl3: Pulsleistung für halbselektive 90° -Carbonylkohlenstoffpulse p5.

- pl13: Pulsleistung für halbselektive 180° -Carbonylkohlenstoffpulse p6.

^2H (F_3 für Messungen an deuterierten Proben):

- pl3: Pulsleistung für Deuteriumentkopplung p23 oder p20 (90°), cpds3 (waltz-16).

^{15}N (F_4 für Messungen an $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Proben, F_2 für Messungen an ^{15}N -markierten Proben).

- pl4: Pulsleistung für Standardstickstoffpulse p7 (90°) und p8 (180°).
- pl14: Pulsleistung für Stickstoffentkopplung cpds4 (garp).

Standard-Intervallbelegungen:

Schaltintervalle:

- d11: Phasen- oder Intervallinkrementierungen (10-30ms)
- d12: langer Delay (z.B. Phasenverlauf für selektive Pulse, Entkopplungssequenzen ein/ausschalten; 20 μs)
- d13: kurzer Delay (z.B. Leistung schalten, Gradientenvorlauf; 5 μs)

Kopplungsintervalle:

- d2: $1/(2J(\text{HN}))$
- d4: $1/(4J(\text{HN}))$
- d5, d15, d8, d18: $1/(4J(\text{NC}^\alpha))$ oder $1/(4J(\text{NCO}))$
- d24: $1/(2J(\text{HN}))$ Refokussierungsintervall
- d19: $1/(2J(\text{HN}))$ Defokussierungsintervall

Evolutionszeiten:

- d8/d18: ^{15}N -*constant time*-Evolution

- d0: erste indirekte Dimension bei nicht-*constant time*-Evolution
- d10: zweite indirekte Dimension

Weitere Intervalle:

- d1: Relaxationsintervall (1,0-1,2 s für nichtdeuterierte, 2 s für deuterierte Proteine)
- d16: *eddy current*-Intervall nach Gradienten (200-500 μ s)
- d20: Phasenrefokussierungsintervall in indirekter Dimension
- d21: Phasenrefokussierungsintervall vor Akquisitionszeit

Quadraturdetektion:

- erste indirekte Dimension: Stickstoff (MC1: echo-antiecho ND0 = 2; Standardphaseninkrement für *sensitivity enhancement*: ip5 Standardloop l4)
- zweite indirekte Dimension: Kohlenstoff oder Protonen (MC2: states-tpi ND10=2; Standardloop l4)

Pulsprogramme:

Messungen an ^{15}N -markiertem Protein:

^{15}N -HSQC mit water flipback:

```

;hsqcxfb          GRADIENT(cnst21)
#include <Avance.incl>  d16
#include <Grad.incl>    (p3 ph9):f2
                    GRADIENT(cnst22)
"p2=p1*2"          d16
"p4=p3*2"          (p3 ph3):f2
"d0=3u" d0
"d11=30m"          (p2 ph11)
"d20=p16+d16+50u" d0
"d21=d4-p16-d16"  (p4 ph11):f2
"d22=(p6-p2)/2"  d24
                    "d23=(p4-p2)/2" (p3 ph11):f2
                    "d24=(d0+d0+p2)"GRADIENT(cnst23)
                                d16
1 ze      (p1 ph10)
  d11 pl12:f2      d4
2 d1 do:f2      (d23 p2 ph11) (p4 ph11):f2
3 d11  GRADIENT(cnst24)
  d11  d16 pl12:f2
4 (p1 ph10)      d21 BLKGRAD
  d4 pl2:f2      go=2 ph31 cpd2:f2
  (d23 p2 ph11) (p4 ph11):f2      d1 do:f2 wr
#0 if #0 ip3 zd

```

d4 lo to 3 times 2
 (d23 p1 ph4) (p3 ph7):f2 d11 ip31
 d20 d11 ip31 id0
 (p4 ph11):f2 lo to 4 times l3
 50u UNBLKGRAD exit

ph2=1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 3
 ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
 ph4=1 3
 ph7=1 1 3 3
 ph9=3
 ph10=0
 ph11=1
 ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

TOCSY-HSQC:

```
;dipsihsqc.3d p6*2.944 ph11
#include <Avance.incl> p6*4.111 ph12
#include <Grad.incl> lo to 9 times 2
      p6*3.555 ph11
"d5=(p3-p1)/2" p6*4.555 ph12
"d6=(p4-p2)/2" p6*3.222 ph11
"d24=2*d0+p2" p6*3.166 ph12
"d25=2*d10+p4" p6*0.333 ph11
      p6*2.722 ph12
1 ze p6*4.166 ph11
2 d11 do:f2 p6*2.944 ph12
  d11 p6*4.111 ph11
3 d11 lo to 8 times l5
  d11 d27 pl1:f1
  d11 p1 ph2
4 d11 p17 ph3
  d11 d2
5 d11 (d6 p2 ph0) (p4 ph0):f2
  d11 d2 UNBLKGRAD
  d11 (p1 ph21)
6 d12 pl19:f1 GRADIANT(cnst21)
  d1 cw:f1 d16
  d13 do:f1 (p3 ph22):f2
  d12 pl1:f1 d0
  d12 pl2:f2 p2 ph0
7 p1 ph1 d0
  d10 (p4 ph0):f2
  (p4 ph0):f2 d24
```

```
d10 (p3 ph23):f2
p2 ph0 GRADIANT(cnst22)
d25 (p1 ph23)
p1 ph0 d2 BLKGRAD
d26 pl10:f1 (d6 p2 ph0) (p4 ph0):f2
8 p6*3.555 ph11 d2 pl12:f2
  p6*4.555 ph12 go=2 ph6 cpd2:f2
  p6*3.222 ph11 d11 do:f2 wr #0 if #0
  p6*3.166 ph12 d11 ip22 zd
  p6*0.333 ph11 lo to 3 times 2
  p6*2.722 ph12 d11 ip6
  p6*4.166 ph11 d11 ip6
  p6*2.944 ph12 d11 id0
  p6*4.111 ph11 lo to 4 times l4
9 p6*3.555 ph12 d11 rd0
  p6*4.555 ph11 d11 ip1
  p6*3.222 ph12 lo to 5 times 2
  p6*3.166 ph11 d11 ip6
  p6*0.333 ph12 d11 ip6
  p6*2.722 ph11 d11 id10
  p6*4.166 ph12 lo to 6 times l3
      exit
```

```
ph0=0
ph1=0 2
ph2=0 0 2 2
ph3=1 1 3 3
ph6=0 2 2 0 2 0 0 2
;ph6=0 2 0 2 2 0 2 0
ph11=0
ph12=2
ph21=1
ph22=0 0 0 0 2 2 2 2
ph23=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
```

NOESY-HSQC:

```
;noesyhsqc3 (p1 ph2):f1 (p21 ph3):f3
#include <Avance.incl> d0
#include <Grad.incl> (p2 ph5):f1
      d0
"d20=p16+d16+p2+d0*2" GRADIANT(cnst21)
"d21=d26-p16-d13-4u" d16
"d22=2*d10+p22" (p22 ph4):f3
"d30=(p22-p2)/2" d20
```

```

(d30 p1 ph1):f1 (p21 ph4):f3
1 ze d26
d11 pl16:f3 (d30 p2 ph1):f1 (p22 ph1):f3
2 d1 do:f3 d13
3 d11*7 GRADIENT(cnst22)
4 d11 d21 pl16:f3
d11 4u BLKGRAD
5 d11 go=2 ph31 cpd3:f3
d11 d1 do:f3 wr #0 if #0 zd
6 d12 pl3:f3 lo to 3 times 2
(p1 ph7):f1 d11 id0
d10 d11 ip3
(p22 ph1):f3 d11 ip3
d10 d11 ip6
(p2 ph1):f1 d11 ip6
d22 d11 ip31
(p1 ph8):f1 d11 ip31
d8 lo to 4 times l3
(p1 ph1):f1 d11 rd0
d26 d11 ip7
(d30 p2 ph1):f1 (p22 ph6):f3 lo to 5 times
2
d26 UNBLKGRAD d11 ip31 id10
p28 ph1 d11 ip31
d13 lo to 6 times l4
exit

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

HNHA:
;hnha.3d d10
#include <Avance.incl> (p6 ph8):f2
#include <Grad.incl> d10
(p2 ph0):f1
"d5 =p16+d16+d13" d24
"d6 =(13m-d8-p6-p16-d16-d13)" (p1 ph4)

"d7 =13m-d2-p5-p16-d16-d13" d13
"d8 =(13m+13m-d2-p5+p2-p6)/2 -p16-d16-d13"
GRADIENT(cnst23)
"d11=30m" d16
"d12=20u" d28
"d13=3u" (p6 ph9):f2
"d24=(d10+d10+p6)" d26
"d26 =(13m-d28-p6-p16-d16-d13)" (p2 ph5)
"d27 =13m-d2-p5-p16-d16-d13" d27
"d28 =(13m+13m-d2-p5+p2-p6)/2 -p16-d16-
d13" d13
"l3=td2/2" GRADIENT(cnst24)
"l4 =td1/2" d16
(p5 ph9):f2
1 ze d2 pl13:f2 BLKGRAD
2 d11 do:f2 (p1 ph6)
3 d11 go=2 ph31 cpd3:f2
d11 d11 do:f2 wr #0 if #0 ip7 zd
d11 lo to 3 times 2
d11 d11 id6 ip31
4 d11 d11 dd8 ip31
d11 d11 dd26
d11 d11 id28
5 d11 lo to 4 times l3
d11 d11 rd6 ip1
6 d12 pl9:f1
d1 cw:f1 d11 rd8 ip2
d13 do:f1 d11 ip3 rd26
d12 pl1:f1 d11 rd28
(p1 ph1):f1 lo to 5 times 2
d2 pl3:f2 UNBLKGRAD d11 id10 ip31
(p5 ph7):f2 d11 ip31
d13 lo to 6 times l4
GRADIENT(cnst21) exit
d16
d7
(p2 ph2)
d6
(p6 ph9):f2
d8
d13
GRADIENT(cnst22)
d16
(p1 ph3)

```

```

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

HNHB:
;hnhb.3d      d10
#include <Avance.incl> (p4 ph0):f2
#include <Grad.incl>   d30
      d5
"d11=30m"      (p1 ph2):f1
"d12=20u"      d0
"d13=3u"       (p4 ph3):f2
"d2=2.5m"      d0
"d3=27m"       (p2 ph0):f1
"d26=(p4-p2)/2" d31
"d30=2*d10+p2" (p1 ph0):f1
"d31=2*d0+p4"  ;d13
"d5=d3-d13-p16-d16" ;GRADIENT(cnst23)
"d6=d3-d13-p16-d16" ;d16
      d6

1 ze      (p3 ph0):f2
2 d1 do:f2      GRADIENT(cnst24)
3 d11  d16
      d11  (p1 ph0):f1
4 d11  d2 BLKGRAD
      d11  (d26 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2
5 d11  d2 pl16:f2
      d11  go=2 ph31 cpd2:f2
6 d12 pl1:f1    d1 do:f2 wr #0 if #0 ip2 zd
      (p1 ph0):f1    lo to 3 times 2
      d2 pl2:f2 UNBLKGRAD  d11 id0 ip31
      (d26 p2 ph0):f1 (p4 ph1):f2      d11 ip31
      d2      lo to 4 times l3
      p28 ph0      d11 rd0
      (p1 ph1):f1  d11 ip4
      GRADIENT(cnst21)      lo to 5 times 2
      d16  d11 id10 ip31
      (p3 ph4):f2      d11 ip31
      d10  lo to 6 times l4
      (p2 ph0):f1      exit

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

```

Messungen an $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem Protein:

```

CT-HNCA:
;hncase (d27 p6 ph1):f3 (p4 ph1):f2
;f1-  $^1\text{H}$   d17
;f2-  $^{15}\text{N}$  (d14 p3 ph1):f2 (p5 ph4):f3
;f3-  $^{13}\text{C}\alpha$       d10
;f4-  $^{13}\text{C}'$  (d31 p8 ph1):f4 (p4 ph1):f2
#include <Avance.incl>  d10
#include <Grad.incl>   (p6 ph1):f3
#include <Delay.incl>  d30
      (p8 ph1):f4

"d0=2u" 3u
"d10=2u" (d14 p5 ph1):f3 (p3 ph1):f2
"d11=30m" d25
"d13=3u" (p8 ph1):f4
"l3=(td1/2)" d0
"l4=(td2/2)" (d27 p6 ph1):f3 (p4 ph1):f2
"d28=(p4-p2)/2" d20
"d27=(p4-p6)/2" d13 do:f1
"d29=(p3-p1)/2" GRADIENT(cnst22)
"d31=(p4-p8)/2" d16

```



```

"d14=(p3-p5)/2" d23 pl1:f1
"d21=5.5m" (p3 ph5):f2
"d22=6.9m" (p1 ph1):f1
"d17=12.4m" d26
"d20=d17-d21-d13" (d28 p2 ph1):f1 (p4
ph1):f2
"d23=d21-p16-d16" d26
"d0=d17-d25-p8" (d29 p1 ph2):f1 (p3 ph6):f2
"d30=2*d10-3u" d26
"d26=2.5m" (d28 p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2
"d18=d26-p15-d16" d26
(p1 ph1):f1
1 ze 1.5m
d11 (p2 ph1):f1
2 d1 do:f2 GRADIENT(cnst23)
d11*2 d16 pl16:f2 BLKGRAD
3 d11*2 go=2 ph31 cpd2:f2
4 d11*2 d1 do:f2 wr #0 if #0 zd
5 d11*3 d11 ip6
6 d12 pl1:f1 pl2:f2 d11 ip6
(p1 ph1):f1 lo to 3 times 2
d26 pl3:f3 pl4:f4d11 dd0
(d28 p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2 d11 id20
d26 UNBLKGRAD
p28 ph1 lo to 4 times l3
2u d11 rd0 ip4
(p1 ph2):f1 d11 rd20
GRADIENT(cnst21) lo to 5 times 2
d16 d11 id10

(p3 ph3):f2 d11 ip31

d21 pl19:f1 d11 ip31

d22 cpds1:f1 lo to 6 times l4
exit

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

```

CT-HNCO:

```

;hncose (d14 p3 ph1):f2 (p5 ph4):f3
;****Channel assignments**** d10
;f1- 1H (d31 p8 ph1):f4 (p4 ph1):f2
;f2- 15N d10
;f3- 13Ca (p6 ph1):f3
;f4- 13C d30
#include <Avance.incl> (p8 ph1):f4
#include <Grad.incl> 3u
#include <Delay.incl> (d14 p5 ph1):f3 (p3
ph1):f2
"d0=2u" d25
"d10=2u" (p8 ph1):f4
"d11=30m" d0
"d13=3u" (d27 p6 ph1):f3 (p4 ph1):f2
"l3=(td1/2)" d20
"l4=(td2/2)" d13 do:f1
;****pulse centering delays****
GRADIENT(cnst22)
"d28=(p4-p2)/2" d16
"d27=(p4-p6)/2" d23 pl1:f1
"d29=(p3-p1)/2" (p3 ph5):f2
"d31=(p4-p8)/2" (p1 ph1):f1
"d14=(p3-p5)/2" d26
;****constant-time delays**** (d28 p2
ph1):f1 (p4 ph1):f2
"d21=5.5m" d26
"d22=6.9m" (d29 p1 ph2):f1 (p3 ph6):f2
"d17=12.4m" d26
"d20=d17-d21-d13" (d28 p2 ph1):f1 (p4
ph1):f2
"d23=d21-p16-d16" d26
"d0=d17-d25-p8" (p1 ph1):f1
;****phase correction**** 1.5m
"d30=2*d10-3u" (p2 ph1):f1
"d26=2.5m" GRADIENT(cnst23)
"d18=d26-p15-d16" d16 pl16:f2 BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
1 ze d1 do:f2 wr #0 if #0 zd
d11 d11 ip6
2 d1 do:f2 d11 ip6
d11*2 lo to 3 times 2
3 d11*2 d11 dd0

```

4 d11*2 d11 id20
 5 d11*3 lo to 4 times l3
 6 d12 pl1:f1 pl2:f2 d11 rd0 ip4
 (p1 ph1):f1 d11 rd20
 d26 pl3:f3 pl4:f4lo to 5 times 2
 (d28 p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2 d11 id10
 d26 UNBLKGRAD d11 ip31
 p28 ph1 d11 ip31
 2u lo to 6 times l4
 (p1 ph2):f1 exit
 GRADIENT(cnst21)
 d16 ph1=0
 (p3 ph3):f2 ph2=1
 d21 pl19:f1 ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
 d22 cpds1:f1 ph4=0 2
 (d27 p6 ph1):f3 (p4 ph1):f2 ph5=0 0 2 2
 d17 ph6=3 3 1 1
 ph31=0 2 2 0 2 0 2

HCCH-TOCSY:

```
; hcchtocsy (p9*3.778 ph22):f3
#include <Avance.incl> (p9*3.889 ph21):f3
#include <Grad.incl> (p9*2.889 ph22):f3
;****Channel assignments**** (p9*3.000
ph21):f3
:f1 1H (p9*0.333 ph22):f3
:f3 13C Caliph. (p9*2.500 ph21):f3
:f2 15N (p9*4.056 ph22):f3
:f4 13CO (p9*2.833 ph21):f3
"d31=(p4-p2)/2" (p9*4.389 ph22):f3
"d12=20u" (p9*2.722 ph22):f3
"d6=1.2ms-p16-d16" (p9*4.389 ph21):f3
"d30=(2*d0+p2+p8)/2" (p9*2.778 ph22):f3
"d26=2*d10+p4+1.7ms" (p9*3.056 ph21):f3
"d24=1.5m-p16-d25" (p9*0.333 ph22):f3
(p9*2.556 ph21):f3
1 ze (p9*4.000 ph22):f3
2 d1 do:f3 (p9*2.722 ph21):f3
3 d11*2 (p9*4.111 ph22):f3
4 d11 (p9*3.778 ph21):f3
5 d11 (p9*3.889 ph22):f3
d11 (p9*2.889 ph21):f3
6 d12 pl1:f1 (p9*3.000 ph22):f3
d12 pl2:f2 (p9*0.333 ph21):f3
```

```
d12 pl3:f3 (p9*2.500 ph22):f3
d12 pl4:f4 (p9*4.056 ph21):f3
50u UNBLKGRAD (p9*2.833 ph22):f3
(p1 ph1):f1 (p9*4.389 ph21):f3
1.7m (p9*2.722 ph22):f3
d10 (p9*4.389 ph21):f3
(p4 ph0):f3 (p9*2.778 ph22):f3
d10 (p9*3.056 ph21):f3
(p2 ph0):f1 (p9*0.333 ph22):f3
d26 (p9*2.556 ph21):f3
(p1 ph4):f1 (p9*4.000 ph22):f3
GRADIENT(cnst21) (p9*2.722 ph21):f3
d16 (p9*4.111 ph22):f3
(p3 ph2):f3 (p9*3.778 ph21):f3
d0 (p9*3.889 ph22):f3
(p8 ph0):f2 (p9*2.889 ph21):f3
300u (p9*3.000 ph22):f3
d16 (p9*0.333 ph21):f3
(p6:sp1 ph0):f4 (p9*2.500 ph22):f3
300u (p9*4.056 ph21):f3
;GRADIENT17(cnst25) (p9*2.833 ph22):f3
d16 pl3:f3 (p9*4.389 ph21):f3
(p2 ph0):f1 (p9*2.722 ph21):f3
d0 (p9*4.389 ph22):f3
(p4 ph9):f3 (p9*2.778 ph21):f3
d30 (p9*3.056 ph22):f3
300u (p9*0.333 ph21):f3
d16 (p9*2.556 ph22):f3
(p6:sp1 ph0):f4 (p9*4.000 ph21):f3
300u (p9*2.722 ph22):f3
;GRADIENT17(cnst25) (p9*4.111 ph21):f3
d16 (p9*3.778 ph22):f3
d30 pl5:f3 (p9*3.889 ph21):f3
(p15 ph6):f3 (p9*2.889 ph22):f3
9 (p9*2.722 ph21):f3 (p9*3.000 ph21):f3
(p9*4.389 ph22):f3 (p9*0.333 ph22):f3
(p9*2.778 ph21):f3 (p9*2.500 ph21):f3
(p9*3.056 ph22):f3 (p9*4.056 ph22):f3
(p9*0.333 ph21):f3 (p9*2.833 ph21):f3
(p9*2.556 ph22):f3 (p9*4.389 ph22):f3
(p9*4.000 ph21):f3 lo to 9 times 3
(p9*2.722 ph22):f3 GRADIENT(cnst22)
(p9*4.111 ph21):f3 d25 pl3:f3
```

```

(d31 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f3      lo to 3 times      "d21=d13+p16+d16+4u"  d16 pl12:f2
2
1.2m  d11 ip31 id0                "d0=d5-p3"          4u BLKGRAD
(d31 p1 ph0):f1 (p3 ph0):f3      d11 ip31            "d15=d5-2*d20+p3-2*p2" go=2 ph31 cpd2:f2
1.5m  lo to 4 times l3                d1 do:f2 wr #0 if #0 zd
(d31 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f3      d11 rd0 ip1        1 ze      3m ip5
d24   lo to 5 times 2                d11 pl12:f2      3m ip5
GRADIENT(cnst23)      d11 ip31 id10      2 d1 do:f2      lo to 3 times 2
d25 BLKGRAD pl20:f3  d11 ip31        6m      d11 dd0
go=2 ph31 cpd3:f3     lo to 6 times l4      3 d11   lo to 4 times l3
d1 do:f3 wr #0 if #0 ip2 zd exit    4 (p1 ph1)      exit
                                        d4 pl2:f2
                                        (cen24 p2 ph1) (p4 ph1):f2      ph1=0
                                        d4      ph2=1
                                        (cen13 p1 ph2) (p3 ph3):f2      ph3=0 2
                                        ((d5 d15 d22) (d0 p4 ph1):f2    ph4=0 0 2 2
                                        (d0 d15 p2 ph1):f1)      ph5=1 1 3 3
                                        d20   ph31=0 2 2 0
                                        (p2 ph1):f1
                                        3u UNBLKGRAD

ph0=0
ph1=0 2
ph2=0 0 2 2
ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
ph4=1
ph6=0
ph7=0
ph8=1
ph9=0
ph21=1
ph22=3
ph31=0 2 2 0

13C -HSQC:
; schsqcct      GRADIENT(cnst21)
#include <Avance.incl>  d16
#include <Grad.incl>   (cen13 p1 ph1) (p3
ph4):f2
"p2=p1*2"      d24
"p4=p3*2"      (cen24 p2 ph1) (p4 ph1):f2
define delay cen13      d24
define delay cen24      (cen13 p1 ph2) (p3
ph5):f2
"cen13=(p3-p1)/2"      d4
"cen24=(p4-p2)/2"      (cen24 p2 ph1) (p4
ph1):f2
"d0=3u"  d4
"d11=30m"  (p1 ph1)
"d13=3u"  d21
"l3=(td1/2)"  (p2 ph1)
"d20=p16+d16+3u"  d13
"d22=p2-p3"  GRADIENT(cnst22)

13C -NOESY-HSQC:
; sc13cnoesy  d18
#include <Avance.incl>  50u UNBLKGRAD
#include <Grad.incl>   GRADIENT(cnst21)
d16
;f1 1H  p1 ph13
;f2 13Caliph.  d4
;f3 13CO      (cen42 p2 ph0) (p4 ph3):f2
;f4 15N  d4
"p2=p1*2"      (p1 ph2) (p3 ph3):f2
"p4=p3*2"      d0
"p8=p7*2"      (p6:sp3 ph0):f3 (cen62 p2
ph7):f1
"d0=3u"      (cen68 p8 ph0):f4
"d10=3u"      d0
"d20=d0*2"    GRADIENT(cnst22)
"d22=d10*2+p8" d16
"d11=10m"     (p4 ph10):f2
"d21=d4-p16-d16-4u"  GRADIENT(cnst23)
"d18=d8-p16-50u-d16" d16
define delay cen42      d20
define delay cen62      (p6:sp3 ph0):f3
define delay cen68      (p3 ph0):f2
define delay cen84      GRADIENT(cnst24)

```

```

"cen42=(p4-p2)/2"      d16          (p2 ph8):f1      3m id10
"cen62=(p6-p2)/2"      (p1 ph4)      d22      3m ip31
"cen68=(p6-p8)/2"      d4            p1 ph12      3m ip31
"cen84=(p8-p4)/2"      (cen42 p2 ph0) (p4          lo to 6 times l4
ph0):f2                exit
"l3=(td1/2)"          d21
"l4=(td2/2)"          GRADIENT(cnst25)
                        d16 pl12:f2      ph0 =0
1 ze      4u BLKGRAD      ph1 =1
2 d1 do:f2      go=2 ph31 cpd2:f2      ph2 =1
3 15m d1 do:f2 wr #0 if #0 zd      ph3 =0 2
4 6m lo to 3 times 2      ph4 =0 0 2 2
5 9m 3m id0      ph7 =1 1 1 1 3 3 3 3
6 d11 pl1:f1      3m ip3      ph8 =0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
d11 pl2:f2      3m ip3      ph10=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
d11 pl3:f3      3m ip31      ph11=0 2
d11 pl4:f4      3m ip31      ph12=2
p1 ph11 lo to 4 times l3      ph13=0
d10 3m rd0      ph14=0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2
(cen84 p4 ph14):f2 (p8 ph0):f4      3m ip11      2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
d10 lo to 5 times 2      ph31=0 0 2 2

```

Messungen an 75% deuteriertem und ^{13}C / ^{15}N markiertem Protein

```

C(CCO)NH:
; ruccconh      (p5:sp5 ph12):f2
#include <Avance.incl>      d6 pl2:f2
#include <Grad.incl>      (p3 ph11):f2
                        d13
:f1  $^1\text{H}$       GRADIENT(cnst23)
:f2  $^{13}\text{C}$ ;  $^{13}\text{CO}$  offresonance      d16 fq1:f2
:f3 2D      (p3 ph3):f2
:f4  $^{15}\text{N}$       10u
                        (p6:sp6 ph12):f2
"p2=p1*2"      d3 pl12:f2
"p8=p7*2"      (d5 p4 ph11):f2 (p8 ph10):f4
"d11=10m"      d9
"d12=20u"      (p6:sp6 ph10):f2
"d4=2.65m"      d14 pl2:f2
"d25=3m"      (p3 ph10):f2
"d14=4.55m"      d13
"d2=5.6m"      GRADIENT(cnst24)
" d7=217.3 * p9 * l7"      d16 pl11:f1
" d5=(p8-p4)/2"      (p12 ph10):f1
" d22=d10*2+p10" 10u cpds1:f1
" d6=d25-10u-p5" (p7 ph4):f4
" d3=13.5m-p6-10u"      d8
" d9=13.5m-d14-p6"      (p6:sp6 ph12):f2
" d8=13.5m-p6-10u"      10u
" d18=13.5m-d2-3u-p12-20u-p11-p6"      (p8
ph11):f4
" d19=d2-d13-p16-d16"      10u
" d24=d13+p16+d16+4u"      (p11:sp11 ph10):f2
" d17=(p7-p1)/2"      10u
" d21=(p8-p2)/2"      (p6:sp6 ph10):f2
                        d18
1 ze      3u do:f1
2 d1 do:f4      (p12 ph12):f1
3 d11 d19 pl1:f1
4 d11 d13

```

```

5 d11 GRADIENT(cnst25)
d11 d16
6 d12 pl1:f1 fq1:f2 (d17 p1 ph0):f1 (p7
ph5):f4
d12 pl2:f2 d4
d12 pl3:f3 (d21 p2 ph0):f1 (p8 ph11):f4
d12 pl4:f4 d4
d12 UNBLKGRAD (d17 p1 ph11):f1 (p7
ph11):f4
(p3 ph1):f2 d4
d10 (d21 p2 ph0):f1 (p8 ph0):f4
(p10:sp10 ph10):f2 (p2 ph10):f1 d4
(p8 ph10):f4 (p1 ph0):f1
d10 pl12:f2 d24
(p4 ph10):f2 (p2 ph11):f1
d22 pl2:f2 d13
(p3 ph11):f2 GRADIENT(cnst26)
d13 d16 pl14:f4
GRADIENT(cnst21) 4u BLKGRAD
d16 pl9:f2 go=2 ph31 cpd4:f4
d7 cpds2:f2 d1 do:f4 wr #0 if #0 zd
d13 do:f2 3m ip5
GRADIENT(cnst22) 3m ip5
d16 fq1:f2 lo to 3 times 2
d13 pl2:f2 3m id18 ip31
(p3 ph2):f2 3m dd8 ip31
10u 3m ip4
(p5:sp5 ph10):f2 3m ip4
d6 pl12:f2 lo to 4 times 13
(p4 ph11):f2 3m rd18

3m rd8 ip1 3m ip31 d10
10u 3m ip31
lo to 5 times 2 lo to 6 times 14
exit

ph0=0
ph1=1 1 1 1 3 3 3 3
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2
ph4=0 2
ph5=0
ph10=0
ph11=1

ph12=2
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

H(CCO)NH:
; ruhccconh2h d25 pl12:f2
#include <Avance.incl> d27
#include <Grad.incl> (p4 ph10):f2
;f1 1H d27
;f2 13C; 13CO offresonance (p2 ph0):f1
;f3 2D d23
;f4 15N d26 pl2:f2
"l3=(td1/2)" (p1 ph11):f1
"l4=(td2/2)" (p23 ph11):f3
"p2=p1*2" 10u cpds3:f3
"p8=p7*2" (p3 ph1):f2
"d11=10m" d13
"d12=20u" GRADIENT(cnst21)
"d4=2.65m" d16 pl1:f1
"d22=3m" d28 pl12:f2
"d14=4.55m" (p4 ph10):f2 (p2 ph10):f1
"d2=5.6m" d13
"d27=2u" GRADIENT(cnst22)
"d15=1.75m" d16
"d25=d15" d28 pl2:f2
"d26=d15" (p3 ph10):f2
"d7=217.3 * p9 * l7" d13 do:f3
"d5=(p8-p4)/2" (p23 ph13):f3
"d6=d22-10u-p5" d13
"d3=13.5m-p6-10u" GRADIENT(cnst23)
"d9=13.5m-d14-p6" d16 pl9:f2
"d8=13.5m-p6-10u" d7 cpds2:f2
"d18=13.5m-d2-3u-p12-20u-p11-p6" d13
do:f2
"d19=d2-d13-p16-d16" GRADIENT(cnst24)
"d24=d13+p16+d16+4u" d16 fq1:f2
"d17=(p7-p1)/2" d13 pl2:f2
"d21=(p8-p2)/2" (p23 ph11):f3
"d23=(d27*2+p4)" 10u cpds3:f3
"d28=d15-d13-p16-d16" (p3 ph2):f2
10u
1 ze (p5:sp5 ph10):f2
2 d11 BLKGRAD d6 pl12:f2
d1 do:f4 (p4 ph11):f2
3m 10u

```

```

3m    (p5:sp5 ph12):f2
3 12m d6 pl2:f2
4 6m   (p3 ph11):f2
5 9m   d13 do:f3
6 d12 pl1:f1 fq2:f1      (p23 ph13):f3
d12 pl2:f2 fq1:f2 20u H2_LOCK
d12 pl3:f3      GRADIENT(cnst25)
d12 pl4:f4      d16 fq1:f2
d12 UNBLKGRAD      (p3 ph3):f2
d12 H2_PULSE 10u
(p1 ph6):f1      (p6:sp6 ph12):f2
d3 pl12:f2      (d17 p1 ph11):f1 (p7 ph11):f4
(d5 p4 ph11):f2 (p8 ph10):f4      d4
d9 fq2:f1      (d21 p2 ph0):f1 (p8
ph0):f4
(p6:sp6 ph10):f2 d4
d14 pl2:f2      (p1 ph0):f1
(p3 ph10):f2      d24
d13   (p2 ph11):f1
GRADIENT(cnst26)      d13
d16 pl11:f1      GRADIENT(cnst28)
(p12 ph10):f1      d16 pl14:f4
10u cpds1:f1      4u
(p7 ph4):f4      go=2 ph31 cpd4:f4
d8      d11 BLKGRAD
(p6:sp6 ph12):f2 d1 do:f4 wr #0 if #0 zd
10u      3m ip5
(p8 ph11):f4      3m ip5
10u      lo to 3 times 2
(p11:sp11 ph10):f2      3m id18 ip31
10u      3m dd8 ip31
(p6:sp6 ph10):f2 3m ip4
d18      3m ip4
3u do:f1      lo to 4 times l3
(p12 ph12):f1      3m rd18
d19 pl1:f1      3m rd8 ip6
d13      lo to 5 times 2
GRADIENT(cnst27)      3m ip31 id27
d16      3m ip31 id25
(d17 p1 ph0):f1 (p7 ph5):f4      3m dd26
d4      lo to 6 times l4
(d21 p2 ph0):f1 (p8 ph11):f4      exit
d4
ph0=0
ph1=1 1 1 1 3 3 3 3
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2
ph4=0 2
ph5=0
ph6=0
ph10=0
ph11=1
ph12=2
ph13=3
ph31=0 2 2 0 2 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

```

Bestimmung von Diffusionskonstanten:

Diffusionsexperiment:

```

;tddiff.2D
      td 20/08/99
;pseudo-2D diffusion experiment with first order
compensation of convection flux
;optional WATERGATE suppression scheme
;Lit:
;A.Jerchow, N.Mueller in JMR 125 (1997), 372-
375
#include <Avance.incl>

```

```

#include <Grad.incl>
##### Important Notes #####
;## Set cnst1:
;## cnst1 = 0: no WATERGATE
;## cnst1 = 1: WATERGATE
;## Start the experiment always only using 'dosy'
command!
;## NEVER use 'multizg' when changing the
gradient ramp!

```

```

;## ALWAYS run diffusion experiments on the
protein AND the water
;## i.e. once with cnst1 = 0, once with cnst1 = 1
;## in order to verify your results: D(H2O) is
tabulated!

```

```

;grdprog = tddiff2Dwg (square gradients)
;      or = tddiff2Dswg (sine gradients)
;only z-spoil gradients matter, e.g.:
;cnst22 = 15, cnst23 = 16 cnst24 = 13 proposed
;cnst21, the diffusion editing gradient, is set by
dosy!
;## Note:
; On changing from square to sine gradients,
; using the SAME gradient ramp (written with
dosy)
; multiply d8 by 2/PI to get equal I(gradient)
curve

```

```

;**** parameters to be set ****
;p0    90degree proton pulse (p18) for fine
tuning of WATERGATE
;p1    90degree proton pulse (p11)
;p16   800us, gradient pulse length for z-spoils
;p17   ca.2ms, gradient length for diffusion
gradients
;p28           ;90degree proton pulse (p18)
for WATERGATE
;d1    relaxation delay
;d8 =BD,ca.80-150ms (gradient ramp 2-80) for
protein
;      ca. 20ms (gradient ramp 2-40) for water
;d17   ca.2*p17, recovery delay for diffusion
gradients
;d16   100us, recovery delay for purge
gradients
;d19   > dw, WATERGATE suppression delay

```

```

;**** calculated parameters ****
define delay LD
define delay BD
"p2=p1*2"
"d3=d8-p17*10/3-d17*3"
"d13=d3*0.5-p16-d16"

```

```

"l20=ds"
;## Evaluation in XWINNMR T1/T2 mode:
;## Setup with 'edt1':
"LD=p17*2"
"BD=d8"
;function type = vargrad: I(grad)=I0*exp[-1e-
5*D*(BD-LD/3)*(2PI*g*LD*grad)^2]
;g = gamma(1H) = 4258*gscal*gshape (in G/cm)
;where
;gshape = 1 for square grads and 2/PI for sine
grads
;gscal = calibrated gradient strength factor (0.67
for TXI on PAT)

```

```

1 ze
LD
BD
2 d1 BLKGRAD
3 50u UNBLKGRAD
p1 ph1 ;start of first PFGE
GRADIEN17(cnst21)
d17
p2 ph2
GRADIEN17(-cnst21)
d17
p1 ph3 ;end of first PFGE
d13 ;start of first diffusion mixing
GRADIEN17(cnst22)
d16
p1 ph4 ;start of rephasing PFGE
GRADIEN17(cnst21)
d17
GRADIEN17(cnst21)
d17
p2 ph5
GRADIEN17(cnst-21)
d17
GRADIEN17(cnst-21)
d17
p1 ph6 ;end of rephasing PFGE
d13 ;start of second diffusion
mixing
GRADIEN17(cnst23)

```

```

d16                                3u pl1:f1
p1 ph7                            ;start of second PFGE      goto 21
GRADIEN17(cnst21)                 20 (p2 ph15):f1      ;no WATERGATE
d17                                21 GRADIEN(cnst24)
p2 ph8                             d16
GRADIEN17(-cnst21)                go=2 ph31
d17                                d1 BLKGRAD wr #0 if #0 zd
  4u                               lo to 3 times td1
GRADIEN(cnst24)                   ;end      of      exit
second PFGE
d16                                ph0=0
if "cnst1 == 0" goto 20            ph1=0 0 1 1 2 2 3 3
3u pl18:f1                         ;WATERGATE          ph2=1 2 2 3 3 0 0 1
p28*0.231 ph13                     ph3=0
d19*2                              ph4=2 2 3 3
p28*0.692 ph13                     ph5=3 3 0 0 3 3 0 0 0 1 1 0 0 1 1
d19*2                              ph6=2
p28*1.462 ph13                     ph7=0
d19*2                              ph8={0}*16 {2}*16
p28*1.462 ph14                     ph13= {0}*16 {1}*16 {2}*16 {3}*16
d19*2                              ph14= {2}*16 {3}*16 {0}*16 {1}*16
p28*0.692 ph14                     ph15= {0}*16 {1}*16
d19*2                              ph31=0 2 0 2 2 0 2 0 2 0 2 0 0 2 0 2
p0*0.231 ph14                      2 0 2 0 0 2 0 2 0 2 0 2 2 0 2 0

```

7.2 VAT-N

7.2.1 Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten

Die ^{15}N -, ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats und der Seitenketten sowie einige Kopplungskonstanten sind in der BioMagRes-Datenbank unter Account-Nr. 4276 abgelegt. Die $^3\text{J}(\text{H}^{\text{NH}}^{\alpha})$ -Kopplungskonstanten wurden aus dem HNHA-Spektrum nach Vuister et al. (93) bestimmt.

7.2.2 Pulsprogramme

Die Kanalbelegung lautet standardmäßig:

F1 = ^1H und F2 = ^{15}N bei H/N-Korrelationsexperimenten und F1 = ^1H , F2 = $^{13}\text{C}_{\text{Aliphaten}}$, F3 = ^{13}CO und F4 = ^{15}N bei Tripelresonanz-Experimenten.

```

Diagonalfreies 3D N,(CH)-NOESY:
;tdNCHnoesy
      21.04.99 td
;3D 15N-HSQC-NOESY-13C-HSQC with
detection on N,C and H(C)
;gradients designed to ensure water flip-back
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

;##### IMPORTANT NOTES #####
;nd0 = 2 for 13C
;nd10 = 2 for 15N
;NS: 4 * n
;DS: 2 * NS * m!!!
;MC2: echo-antiecho (in F1), STATES (in F2)
;grdprog = tdCCHnoesy
;gradient ratios:
; c21 : c22 : c23 : c24 : c25 : c26 : c27 : c28 : c29
; c30 : c31
; 60 : -60 : 80 : -66 : 45 : -87 : 24 : 22 : 55 : -
22 : -55
;selection rules:
;a) coherence selection: (c25-c26) = +/- 4*(c28-
c29)
;b) water flip-back: c21 = - c22
; c27 = c25+c26-c24
; c23 = variable z-spoil
;#####
;## PULSES, DELAYS AND LOOPS:
;#####
;p1 :90 high power pulse on 1H (F1, pl1)
;p3 :90 high power pulse on 13C (F2, pl2)
;p6 :selective 180hermite on CO (F3, sp3)
;p7 :90 high power pulse on 15N (F4, pl4)
;p16 = ca. 800us ;gradient pulse length
;pcpd2 ca. 80us ;90 low power pulse on F2
(13C, pl12) for cpd2
;d1 = 1-5*T1(HN) ;the longer, the better
;d5 :CT delay
;d8 :NOE mixing time ca. 50-80m
;d3 ;<= 1/4JCH (ca. 1.2 ms)
;d4 ;<= 1/4JNH (ca. 2.0 ms)
;d16>100u ;recovery delay for gradients

;##### Fixed Parameters, do not change
#####
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p8=p7*2"
"d0=5u"
"d10=5u"
"d11=10m"
"d18=d8-p16-d16"
"d20=d0*2"
"d21=d10"
"d23=d3-p16"

define delay cen42
define delay cen62
define delay cen64
define delay cen68
define delay cen82
"cen42=p4+3u-p1"
"cen62=(p6-p2)/2"

```

```

"cen64=(p6-p4)/2"
"cen68=(p6-p8)/2"
"cen82=(p8-p2)/2"

"l3=(td1/2)"
"l4=(td2/2)"

1 ze
2 d1 do:f2
3 d11*4
4 d11*3
5 d11*2
6 d11 UNBLKGRAD
   (p1 ph0):f1
      ;start of H,N-HSQC
   d4 pl4:f4
   (cen82 p2 ph1):f1 (p8 ph5):f4
   d4 pl2:f2
   (p1 ph7):f1
   GRADIANT(cnst21)
      ;z-spoil and radiation damping
   d16
   (p7 ph5):f4
   d10
   (cen62 p2 ph6):f1 (cen64 p4 ph0):f2 (p6:sp3
ph0):f3
   d10
   (p8 ph8):f4
   d21
   (cen62 p2 ph1):f1 (cen64 p4 ph0):f2 (p6:sp3
ph0):f3
   d21
   (p7 ph0):f4
   GRADIANT(cnst22)
      ;z-spoil and water rephasing
   d16
   (p1 ph1):f1
   d4
   (cen82 p2 ph1):f1 (p8 ph0):f4
   d4
   (p1 ph2):f1
      ;start of NOE mixing
   d18

GRADIANT(cnst23)
      ;z-spoil
d16
      ; end of NOE
mixing
(p1 ph0):f1
      ;start of C,H-HSQC
d3
(cen42 p2 ph1):f1 (p3 ph3 3u p4 ph13 3u p3
ph3):f2
d3
(p1 ph17):f1
GRADIANT(cnst24)
      ;z-spoil and radiation damping
d16
(p3 ph3):f2
d0 pl3:f3
(cen62 p2 ph16):f1 (p6:sp3 ph0):f3 (cen68 p8
ph0):f4
d0
GRADIANT(cnst25)
      ;coherence selection
d16 pl2:f2
(p4 ph0):f2
GRADIANT(cnst26)
      ;coherence selection
d16 pl3:f3
(cen62 p2 ph1):f1 (p6:sp3 ph0):f3 (cen68 p8
ph0):f4 ;Bloch-Siegert-compensation
d20 pl2:f2
(p3 ph0):f2
GRADIANT(cnst27)
      ;z-spoil and water rephasing
d16
(p1 ph0)
GRADIANT(cnst28)
      ;coherence selection
d23
(cen42 p2 ph0) (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3
ph0):f2
GRADIANT(cnst29)
      ;coherence selection
d23 pl12:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2

```

```

d1 do:f2 wr #0 if #0 zd ;water flip-back using selective pulse
lo to 3 times 2
d11 id0 #include <Avance.incl>
d11 ip3*2 #include <Grad.incl>
d11 ip13*2
d11 ip31*2 ;##### Important notes #####
lo to 4 times 13 ;### This program optionally runs as constant-
d11 rd0 time
d11 ip5 ;### or as non-constant time version for 13C (F2)
lo to 5 times 2 ;### Choose options:
d11 id10 ;### 1) Constant Time version:
d11 ip31*2 ;### set cnst1 = 1 and d5 ca. 3.6ms (see below)
lo to 6 times 14 ;### 2) Non-CT version:
exit ;### set cnst1 = 2 and d5=p6+5u (see below)
;### invert cnst22, i.e. cnst22 = -40
;### Ignore the warning of d10 becoming
;### negative!
;###
;### DS=2*NS*x
;###
;### water must be on-resonant!
;###
;### Reverse = TRUE in F1(15N)
;###
;### grdprog = 7sineeama
;###
;### use gradient ratio:
;###
;### cnst21:cnst22:cnst23:cnst24:cnst25:cnst26:cnst
;### 27:cnst28
;### -20 +/-40 80 40 60 -40 -10.1 10.1
;###
;### Parameters to set up #####
;###
;### p1 ;90 degree hard pulse
;### on 1H (f1) at pl1
;###
;### p3 ;90 degree hard pulse
;### on C (f2) at pl2
;###
;### p7 ;90 degree hard pulse
;### on N (f4) at pl4
;###
;### p6:sp3 ;180deg selective CO
;### pulse on F3 (>220us SEDUCE-1 at sp3)
;###
;### p8 ;180deg 15N pulse on
;### F4 (pl4)
;###
;### p11:sp11 ca. 3ms
;###
;### selective 90deg flip-back pulse on
;### water (G4)
;###
;### p16=1ms ;gradient
;### pulse length

```

Diagonalfreies 3D C,(NH)-NOESY
;tdCNHnoesy ;td 10/03/99
;3D C,N,H-NOESY-HSQC
;C,H-HSQC with 15N and 13CO decoupling
;N,H-HSQC with 13CA and 13CO decoupling
;coherence selection via gradients (echo-
antiecho), sensitivity enhanced
;optionally constant time (CT) for 13C(F2)

```

;pcpd2          ;90 degree soft pulse      "d21=CT-d10-p6"
on X (f2) at pl12          "d0=5u"
;d1>1s          ;relaxation delay          "d11=10m"
;d4             ;ca. 0.7/4JHN, ca. 1.9      "d17=d16+p6+d0*2"
- 2.3 ms          "d18=d8-p16-d16"
;d14           ;ca. 0.7/4JHN to           "d20=d10"
0.7/6JHN, ca. 1.9 - 2.1 ms          "d26=p16+d16"
;Set d5 according to CT or non-CT version (see
NOTES):          "l3=(td1/2)"
;          d5 = p6+5u for cnst1 = 2 i.e. non-
constant time version          "l4=(td2/2)"
;          d5 ca. 1/(8JCC)= ca. 3.6ms for cnst1 =
1 i.e. constant time version          1 ze
;for CT version: FIDRES=1/(2*d5-2*p6)          d20
;          intensity          scaling          =          2 d1 do:f4 BLKGRAD
cos(PI*JCC*2*d5)*exp(-2*d5/T2)          d11
;          i.e. for d5=1/(8JCC): FIDRES =          3 d11*3
76Hz/pnt, scaling ca. 50%          4 d11*2
;d3             ;ca. 0.7/4JHC, ca. 1.3      5 d11*2
- 1.5 ms          6 50u UNBLKGRAD
;d8             ;NOE mixing time          d11 pl1:f1
;recovery delay          ;gradient          (p1 ph0):f1
;d16=200u          ;start of 1.HSQC
recovery delay          d3 pl2:f2
          (cen42 p2 ph0):f1 (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3
          ph0):f2
;##### Calculated Parameters, do not change
#####          d3 pl4:f4
          (p1 ph11):f1
          GRADIENT(cnst21)
          ;z-spoil and phase purge in F1
          d16
          if "cnst1 == 2" goto 7
          ;jump conditionally to non-CT version
          (p3 ph5):f2
          3u pl2:f2
          (p6:sp3 ph0):f3
          ;Bloch-Siegert compensation
          (CT) (d10 p4 ph6):f2 (d10 d21 p6:sp3):f3 (d10
          d21 cen62 p2 ph12):f1 (d10 d21 cen68 p8
          ph0):f4
          3u pl2:f2
          (p3 ph0):f2
          goto 8
;#####For non-CT:
          7 (p3 ph5):f2
          d10 pl3:f3

```

```

(cen62 p2 ph12):f1 (p6:sp3 ph0):f3 (cen68 p8
ph0):f4
d10 pl2:f2
(p4 ph6):f2
d20 pl3:f3
(cen62 p2 ph0):f1 (p6:sp3 ph0):f3 (cen68 p8
ph0):f4
d20 pl2:f2
(p3 ph0):f2
;#####
8 GRADIENT(cnst22)
      ;z-spoil
d16
(p1 ph0):f1
d3
(cen42 p2 ph0):f1 (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3
ph0):f2
d3
(p1 ph1):f1
      ;start of NOE mixing
d18
GRADIENT(cnst23)
d16
(p1 ph0):f1
      ;start of 2.HSQC
d4
(cen82 p2 ph0):f1 (p8 ph0):f4
d4
(p1 ph7):f1
      ;H2O in +y
3u
(p11:sp11 ph0):f1
      ;water flip-back
GRADIENT(cnst24)
      ;z-spoil
d16 pl1:f1
(p7 ph3):f4
      ;start of t2
d0
(cen62 p2 ph0):f1 (cen64 p4 ph0):f2 (p6:sp3
ph0):f3 ;H2O in -z
d0
GRADIENT(cnst25)
d16
(p8 ph4):f4
GRADIENT(cnst26)
d17
(cen71 p1 ph0):f1 (p7 ph10):f4
d14
(cen82 p2 ph0):f1 (p8 ph0):f4
d14
(cen71 p1 ph1):f1 (p7 ph9):f4
d4
(cen82 p2 ph0):f1 (p8 ph0):f4
d4
(cen71 p1 ph2):f1
d26
(p2 ph0):f1
GRADIENT(cnst27)
d16 pl14:f4
go=2 ph31 cpds4:f4
d1 BLKGRAD do:f4 wr #0 if #0 zd
d11 ip9*2
lo to 3 times 2 ;e/a
detection in F1
d11 id0
d11 ip3*2
d11 ip31*2
lo to 4 times l3
d11 rd0
d11 ip5 ;States detection in F2
lo to 5 times 2
5u
if "cnst1 == 2" goto 10
      ;jump conditionally to non-CT version
d11 dd10
goto 11
10 d11 id10
11 d11 ip31*2
lo to 6 times l4
exit
ph0= 0
ph1= 1
ph2= 2
ph3= 0 2 ;axial peak
suppression in F1
ph4= 0

```

```
ph5= 0 0 2 2           ;States phase in F2           ph11={1}*8 {3}*8           ;water suppression
ph6= {0}*4 {1}*4       ;phase and quad           ph12={0}*8 {2}*8           ;MQC suppression in
image purge in F2      F2
ph7= {1}*16 {3}*16     ;water           ph31=0 2 2 0 2 0 2 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
suppression           2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2
ph9= {1}*32 {3}*32     ;sens.enh.           2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2
ph10={0}*32 {2}*32     ;sens.enh.           0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
```