

Technische Universität München  
Fakultät für Chemie

Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung

**NMR-spektroskopische Studien  
zur strukturellen Dynamik  
des  
Grün-fluoreszierenden Proteins  
und der  
cAMP-abhängigen Protein Kinase**

Markus Hans-Jürgen Seifert

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. J. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

2. Univ.-Prof. Dr. M.-E. Michel-Beyerle, i.R.

Die Dissertation wurde am 17.5.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 2.7.2002 angenommen.



## Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht:

Markus H. J. Seifert, Dorota Ksiazek, M. Kamran Azim, Pawel Smialowski, Nediljko Budisa und Tad A. Holak: *Slow Exchange in the Chromophore of a Green Fluorescent Protein Variant*, J. Am. Chem. Soc., Band 124(27), Seiten 7932-7942, 10.7.2002

Markus H. J. Seifert, Christine Breitenlechner, Dirk Bossemeyer, Robert Huber, Tad A. Holak und Richard A. Engh: *Phosphorylation and Flexibility of cyclic-AMP-dependent Protein Kinase (PKA) using  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy*, Biochemistry, Band 41(19), Seiten 5968-5977, 14.5.2002

Weitere Veröffentlichungen:

Georg Wiegand, Axel Parbel, Markus H. J. Seifert, Tad A. Holak, Robert Huber, Wolfgang Reuter: *Purification, Crystallization, NMR Spectroscopy and Biochemical Analyses of  $\alpha$ -Phycocyanin Peptides*, Eur. J. Biochem., eingereicht

Ruth Pfänder, David Reverter, Salvador Ventura, Markus H.J. Seifert, Irantzu Pallarés, Josep Vendrell, Francesc X. Avilés and Tad A. Holak:  *$^{15}\text{N}$  NMR Relaxation Studies of Leech Carboxypeptidase Inhibitor (LCI) Determined Free in Solution and in Complex with Carboxypeptidase*, Eur. J. Biochem., eingereicht

## Abbkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
4FW	4-fluoro-tryptophan
5FW	5-fluoro-tryptophan
6FW	6-fluoro-tryptophan
AFP	adiabatic fast passage
AIP	Alkalische Phosphatase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPPNP	$\beta, \gamma$ imino-adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
$B_0$	äusseres Magnetfeld
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFP	cyan fluorescent protein
CSA	chemical shift anisotropy
DD	Dipol-Dipol
$\Delta\sigma$	Anisotropie des Tensors der chemischen Abschirmung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
$f$	NOE Verstärkungsfaktor
FID	free induction decay
$\gamma$	gyromagnetisches Verhältnis
$\eta$	Asymmetrie des Tensors der chemischen Abschirmung
$\varepsilon$	CSA-DD Kreuzkorrelationsrate
$\hbar$	Plancksches Wirkungsquantum
GFP	green fluorescent protein
hetNOE	heteronuklearer Overhauser Effekt
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
INEPT	insensitive nuclei enhanced by polarization transfer
$J$	spektrale Dichtefunktion
$J_{AB}$	Kopplungskonstante zwischen Kern A und Kern B



$k_A$	Austauschrate $k_{A \rightarrow B}$
$k_B$	Austauschrate $k_{B \rightarrow A}$
$k_{ex}$	Gesamtaustauschrate $k_{ex} = k_A + k_B$
$\bar{K}$	Gleichgewichtskonstante
kDa	Kilodalton
$\mu_0$	magnetische Permeabilität
MFY	meta-fluoro-tyrosin
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	Nuclearer Overhauser Effekt
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
$\omega$	Larmorfrequenz
OFF	ortho-fluoro-phenylalanin
$p_A$	Population des Zustandes A
$p_B$	Population des Zustandes B
PKA	cAMP-abhängige Protein Kinase
PFG	pulsed field gradient
ppm	parts per million
$Q$	Ladung
R	Gaskonstante
$R_1$	longitudinale Relaxationsrate
$R_2$	transversale Relaxationsrate
ROESY	rotating frame Overhauser effect spectroscopy
$\sigma$	Tensor der chemischen Abschirmung
$S$	verallgemeinerter Ordnungsparameter
SE	sensitivity enhancement
$\tau_c$	Korrelationszeit
$T_1$	longitudinale Relaxationszeit
$T_2$	transversale Relaxationszeit
TFA	Trifluoroessigsäure
TROSY	transverse relaxation optimized spectroscopy
W	Tryptophan
$W$	Übergangswahrscheinlichkeit
YFP	yellow fluorescent protein



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen der NMR Relaxation</b>	<b>5</b>
2.1	Zeeman-Aufspaltung . . . . .	5
2.2	Dipol-Dipol-Wechselwirkung . . . . .	6
2.3	Anisotropie der chemischen Verschiebung . . . . .	8
2.4	Kreuzkorrelierte Relaxation . . . . .	10
2.5	Austauschprozesse . . . . .	10
2.6	Zusammenfassung . . . . .	12
<b>3</b>	<b>Messmethoden</b>	<b>15</b>
3.1	Einleitung . . . . .	15
3.2	$T_1$ -Relaxation . . . . .	16
3.3	$T_2$ -Relaxation . . . . .	16
3.4	Heteronuklearer NOE . . . . .	17
3.5	DD-CSA Kreuzkorrelation . . . . .	17
3.6	Austauschprozesse . . . . .	18
3.7	Datenauswertung . . . . .	21
3.8	Zusammenfassung . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Spektroskopie mit optimierter transversaler Relaxation</b>	<b>25</b>
4.1	Einleitung . . . . .	25
4.2	Das TROSY Prinzip . . . . .	26
4.3	Intermolekulare Kohärenzen . . . . .	29
4.4	Optimierung von TROSY Programmen . . . . .	29
4.5	Diskussion . . . . .	37

<b>5</b>	<b>Grün-fluoreszierendes Protein</b>	<b>39</b>
5.1	Einleitung . . . . .	40
5.2	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ NMR Spektroskopie an GFPuv . . . . .	44
5.2.1	Methoden, Experimente und Datenanalyse . . . . .	44
5.2.2	Zuordnung der Signale . . . . .	48
5.2.3	HD-Austausch und pH-Titration . . . . .	49
5.2.4	$^{15}\text{N}$ Relaxation . . . . .	51
5.2.5	Translatorische Diffusion . . . . .	54
5.2.6	Histidin-selektive Markierung . . . . .	55
5.2.7	Die Mutante GFPuv H148G . . . . .	56
5.3	$^{19}\text{F}$ NMR Spektroskopie an EGFP, ECFP und EYFP . . . . .	59
5.3.1	Methoden, Experimente und Datenanalyse . . . . .	59
5.3.2	Vergleich verschiedener Markierungsstrategien . . . . .	62
5.3.3	Fluoro-Tryptophan markiertes EGFP und ECFP . . . . .	64
5.4	Diskussion . . . . .	75
5.4.1	Flexibilität des Proteinerückgrats und die Rolle von H148 in GFP . . . . .	75
5.4.2	Langsamer Austausch im Chromophor von CFP . . . . .	78
5.4.3	Schlussfolgerungen . . . . .	85
<b>6</b>	<b>cAMP-abhängige Protein Kinase</b>	<b>87</b>
6.1	Einleitung . . . . .	88
6.2	$^{31}\text{P}$ NMR Spektroskopie . . . . .	93
6.2.1	Methoden und Experimente . . . . .	93
6.2.2	Signalzuordnung . . . . .	95
6.2.3	$^{31}\text{P}$ -Relaxation . . . . .	97
6.2.4	Wechselwirkung mit alkalischer Phosphatase . . . . .	99
6.2.5	Wechselwirkung mit AMP-PNP . . . . .	99
6.3	Diskussion . . . . .	101
6.3.1	Signalzuordnung . . . . .	101
6.3.2	Flexibilität . . . . .	101
6.3.3	Flexibilität und Funktion . . . . .	104
6.3.4	Schlussfolgerungen . . . . .	108
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>109</b>

<b>A</b>	<b>Ergänzende NMR-spektroskopische Daten von GFPuv</b>	<b>113</b>
A.1	Verwendete Spektren von GFPuv . . . . .	113
A.2	Zuordnungstabelle für GFPuv . . . . .	116
A.3	$^{15}\text{N}$ Relaxationsraten für GFPuv . . . . .	123
A.4	pH-Titration an GFPuv . . . . .	129
A.5	HD-Austausch an GFPuv . . . . .	130
<b>B</b>	<b>Ergänzende NMR Spektren von ECFP</b>	<b>131</b>
B.1	Einfluss von Licht auf $^{19}\text{F}$ Spektren von 6FW ECFP . . . . .	131
B.2	Konzentrationsabhängigkeit der $^{19}\text{F}$ Spektren von 6FW ECFP . . . . .	132
<b>C</b>	<b>Ergänzende Informationen zu den Diffusionsmessungen</b>	<b>133</b>
C.1	Herleitung des b-Wertes bei sinusförmigen Gradienten . . . . .	133
C.2	Eichung der Gradientenstärke . . . . .	136
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>137</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>139</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

Seit der Entdeckung des Spins als neuer atomarer Eigenschaft 1921 durch Otto Stern und Walther Gerlach, dem Nachweis der Kernspinresonanz an freien Atomen 1938 durch Isidor Rabi und in kompakter Materie 1946 durch Felix Bloch und Edward Purcell, hat sich die Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) schnell als leistungsfähige Methode bei der Untersuchung von Molekülen etabliert. Die NMR zeichnet sich dabei durch einige vorteilhafte Eigenschaften aus: Erstens sind die "Sensoren", die Atomkerne, die in NMR Experimenten befragt werden, räumlich sehr genau lokalisiert. Sieht man von der thermischen Bewegung der Atome und Moleküle ab, sind sie auf ein Gebiet von wenigen Femtometern eingeschränkt. Zweitens sind die Wechselwirkungen der Atomkerne mit ihrer Umgebung so schwach, dass die Umgebung der Kerne nahezu störungsfrei untersucht werden kann. Dennoch sind die Wechselwirkungen sehr sensitiv auf die Umgebungsbedingungen. Und drittens können durch Kopplungen zwischen Atomkernen genaue Abstands- und Winkelinformationen gewonnen werden. Dies erlaubt insbesondere die Untersuchung der Molekülstruktur mit einer atomaren Auflösung. Die NMR Experimente bestehen dabei immer aus einer Anregung von Spins, die in einem Magnetfeld ausgerichtet sind, mittels elektromagnetischer Wellen der entsprechenden Resonanzfrequenz und der Registrierung der resultierenden Spinmagnetisierung.

Auf den ersten Blick mag es verwunderlich erscheinen, dass mit einer Methode, die üblicherweise mit Radiofrequenzwellen, d.h. mit Wellenlängen im Bereich von Metern bis Zentimetern arbeitet, Auflösungen im atomaren Bereich erzielt werden können. Bei den meisten Spektroskopiemethoden ist die räumliche Auflösung aufgrund von optischen Effekten auf Abmessungen in der Größenordnung der verwendeten Wellenlänge beschränkt. Dass dies in dieser Form auf die NMR nicht zutrifft, liegt an zwei Eigenheiten der NMR:

Zum einen wird in der NMR die relevante Information im Abstand der Energieniveaus kodiert. Dies reduziert die Messung auf eine reine Bestimmung der Übergangsfrequenzen und die Frequenz kann mit beliebiger Genauigkeit bestimmt werden, vorausgesetzt genügend Zeit steht zur Verfügung. In der Realität werden der Genauigkeit durch Relaxationsprozesse und beschränkte Messzeit Grenzen gesetzt. Dennoch stellt die Frequenzkodierung der Information einen großen Vorteil der NMR gegenüber Streutechniken wie Röntgen- oder Neutronenbeugung dar, da dort kurze Wellenlängen und damit hohe Energien benötigt werden, um die erforderliche räumliche Auflösung zu erreichen, was wiederum zur Zerstörung der Materialien führen kann. Im Gegensatz dazu ist NMR eine zerstörungsfreie Technik, vor allem für Biomoleküle eine wichtige Eigenschaft. Die Kodierung der Information in den Übergangsfrequenzen hat allerdings den Nachteil, dass sich die Auswertung dieser indirekten Informationen, verglichen z.B. mit der einfachen Fouriertransformation in der Röntgenkristallographie, wesentlich umständlicher gestaltet. Soll nur eine räumliche Auflösung von Mikro- bis Zentimetern erzielt werden, ist es auch möglich mittels Magnetfeldgradienten die Resonanzfrequenzen der Kernspins direkt ortsabhängig zu machen.

Zum anderen ist die NMR-Spektroskopie als Nahfeldtechnik anzusehen, da bei der Detektion der Spinmagnetisierung mittels Hochfrequenzspulen nicht die ausgestrahlte elektromagnetische Welle sondern direkt die rotierende Magnetisierung des Spinensembles registriert wird [1]. Auch in der optischen Spektroskopie und Bildgebung werden Nahfeldtechniken zur Überwindung der Auflösungsbeschränkungen eingesetzt.

Das Phänomen der NMR ist aber nicht nur mit elektromagnetischen Detektionsmethoden zugänglich, sondern ebenfalls über die schon eingangs erwähnte Atomstrahlmethode von Stern, Gerlach und Rabi, oder der Detektion über die spinabhängige Anisotropie der radioaktiven  $\beta$ -Emission (Abb.1.1). Auch mechanische Methoden, bei denen direkt die Kraftwirkung der Spinmagnetisierung nachgewiesen wird, sind heute im Gespräch. Dennoch findet die NMR Spektroskopie mit gepulsten Hochfrequenzwellen die meiste Anwendung. Insbesondere die Möglichkeit, mit relativ geringem Aufwand neue Pulsfolgen und damit neue Experimente programmieren zu können, aber auch die Durchlässigkeit biologischer Materie für Radiofrequenzen machen diese Art der kernmagnetischen Resonanz heute zu einer Standardtechnik in vielen Bereichen. Die Anwendungen reichen von Chemie, Biophysik und medizinischer Bildgebung bis hin zu Quantenrechnern.

NMR-Spektroskopie an Proteinen ist heute neben der Röntgenkristallographie die zweite Methode zur Strukturaufklärung an Proteinen. Die Möglichkeit der Strukturaufklärung mittels



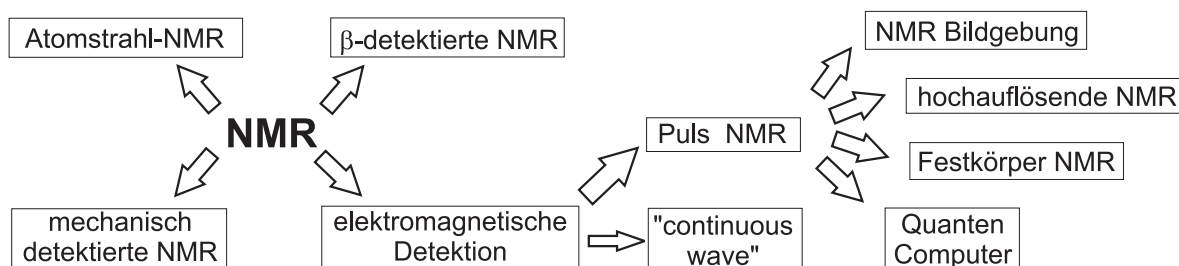


Abbildung 1.1: Detektions- und Anwendungsmöglichkeiten der NMR

NMR beruht sowohl auf speziellen spektroskopischen Techniken, als auch auf der Möglichkeit, nicht-NMR-aktive Isotope, die in Proteinen vorkommen, vor allem  $^{12}\text{C}$  und  $^{14}\text{N}$  durch NMR-aktive Spin- $\frac{1}{2}$ -Isotope zu ersetzen. Die relativ geringe Sensitivität der NMR stellt eine nicht unerhebliche Limitierung der Anwendbarkeit der NMR auf große Proteine dar. Neue Strukturaufklärungsmethoden wie die residualen dipolaren Kopplungen [2], sensitivitätssteigernde Techniken wie die Spektroskopie mit optimierter transversaler Relaxation (TROSY) [3] und kryogen gekühlte Detektionsspulen versprechen aber, die Anwendungsmöglichkeiten der NMR Spektroskopie auf immer größere Proteine zu erweitern. Dennoch bietet die Röntgenkristallographie zur Zeit klare Vorteile bei der Strukturaufklärung sehr großer Moleküle (Molekulargewicht  $> 100$  kDa). Die Vorteile der NMR liegen insbesondere in der Untersuchung von dynamischen und funktionellen Prozessen.

NMR erlaubt sowohl die Identifizierung von schwach bindenden Liganden, die oftmals den Ausgangspunkt für das Design von Medikamenten darstellen [4, 5], als auch einen tiefen Einblick in die Dynamik von Proteinen durch die Messung der NMR Relaxation. So kann die Beweglichkeit und Thermodynamik des Proteinerückgrats mit Hilfe von  $^{15}\text{N}$  Relaxationsmessungen untersucht werden [6, 7]. Informationen über die Potentialoberfläche in Proteinen können mittels  $^{17}\text{O}$  und  $^2\text{H}$  Relaxationsmessungen gewonnen werden [8]. Die Dynamik von Seitenketten ist durch  $^{13}\text{C}$  oder  $^{19}\text{F}$  Relaxationsmessungen zugänglich [6, 9–11]. Phosphoproteine können mittels  $^{31}\text{P}$  NMR untersucht werden [12]. Diese Vielzahl an zugänglichen Kernen zusammen mit einer Vielfalt an spektroskopischen Methoden zeigt die Möglichkeiten, die die NMR Spektroskopie zur Erforschung dynamischer Vorgänge bietet. Besonders im Zusammenhang mit dem immer noch ungeklärten Problem der Proteinfaltung gewinnt die Erforschung von kollektiven Bewegungen [13], angeregten Proteinzuständen [10, 14] und der Potentialbarrieren zwischen

verschiedenen Proteinkonformationen [8] mit Hilfe von NMR-Methoden immer mehr Bedeutung.

Diese Arbeit beschäftigt sich im speziellen mit drei Anwendungen der NMR Relaxation: Der Optimierung von TROSY Pulssequenzen und der Untersuchung der Dynamik des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) und der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA). In Kapitel 2 werden die Grundlagen der NMR Relaxation erläutert. Die dafür relevanten Messmethoden werden in Kapitel 3 dargestellt. Kapitel 4 beschreibt die Grundlagen der Spektroskopie mit optimierter transversaler Relaxation (TROSY) und die Optimierung einer 2D/3D-TROSY-Pulssequenz in Bezug auf Sensitivität und Artefaktunterdrückung. Kapitel 5 beinhaltet die Untersuchung der Dynamik des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP). Zum ersten Mal wird dabei GFP sowohl mit  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Methoden als auch mittels  $^{19}\text{F}$  NMR untersucht. Mit  $^{31}\text{P}$  NMR Spektroskopie zur Aufklärung der Dynamik der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) im Vergleich mit Daten aus der Röntgenkristallographie beschäftigt sich Kapitel 6.

# Kapitel 2

## Grundlagen der NMR Relaxation

### 2.1 Zeeman-Aufspaltung

Die Energieniveaus von Atomkernen mit Spinquantenzahl  $m$  spalten im Magnetfeld in  $2m + 1$  Zustände auf. Für zwei gekoppelte Spin- $\frac{1}{2}$  Kerne I und S führt dies zu dem in Abbildung 2.1 gezeigten Termschema. Dabei können folgende Übergänge auftreten: Die Einquantenübergänge  $W_1^I$  und  $W_1^S$ , der Zweiquantenübergang  $W_2^{IS}$  und der Nullquantenübergang  $W_0^{IS}$  mit den Frequenzen  $\omega(W_1^I) = \omega_I = \gamma_I B_0$ ,  $\omega(W_1^S) = \omega_S = \gamma_S B_0$ ,  $\omega(W_2^{IS}) = \omega_I + \omega_S$  und  $\omega(W_0^{IS}) = \omega_I - \omega_S$ . Die Intensität der Übergänge ist zum einen proportional zu der Besetzungsdifferenz der zugehörigen Zustände. Zum anderen hängt die Rate, mit der die Übergänge stattfinden, von der quantenmechanischen Übergangswahrscheinlichkeit ab.

In der NMR sind sowohl Übergänge durch spontane als auch induzierte Emission aufgrund der kleinen Energieaufspaltung vernachlässigbar [1, 15]. Die Relaxation angeregter Zustände in den Gleichgewichtszustand beruht auf der Kopplung der Spins mit ihrer Umgebung. Diese wird durch stochastische Schwankungen des Magnetfeldes vermittelt: Aufgrund der Brownschen Rotationsdiffusion der Moleküle in einer Flüssigkeit entstehen lokale Schwankungen des Magnetfeldes am Ort eines Atomkerns. Die Schwankungen können zum einen in Komponenten parallel und senkrecht zum Hauptmagnetfeld und zum anderen mit Hilfe der Fourieranalyse in ihre Frequenzkomponenten zerlegt werden. Die transversalen Komponenten des lokalen Magnetfeldes, die den Übergängen entsprechende Frequenzen enthalten, induzieren diese Übergänge und führen zu einem Energietransport zwischen Spinsystem und Umgebung. Longitudinale Komponenten erzeugen Schwankungen in den Larmorfrequenzen verschiedener Spins. Dies führt zu einer Dephasierung der nach einer kohärenten Anregung zwischen den Spins bestehenden

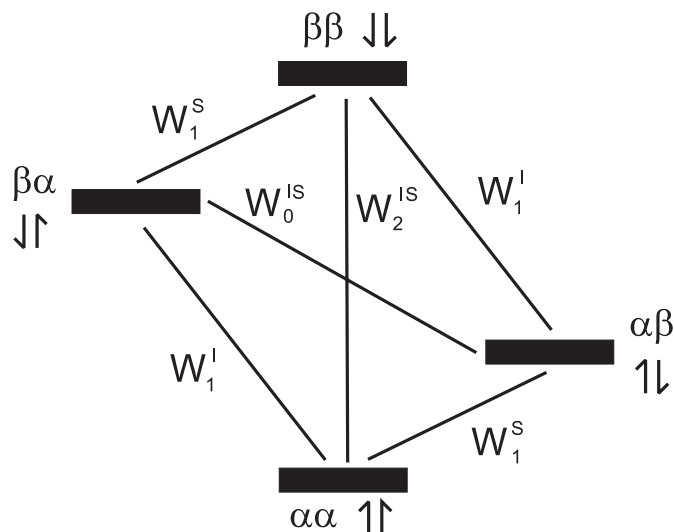


Abbildung 2.1: Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus im Magnetfeld

Die Energieniveaus zweier gekoppelter Spin- $\frac{1}{2}$  Kerne I und S spalten in einem Magnetfeld in vier Zustände auf. Diese werden durch die Einquantenübergänge  $W_1^I$  und  $W_1^S$ , den Zweiquantenübergang  $W_2^{IS}$  und den Nullquantenübergang  $W_0^{IS}$  miteinander verbunden.

Phasenkohärenz, ohne dass dabei die Besetzung der Zustände geändert oder Energie mit der Umgebung ausgetauscht wird. Da die Schwankungen des Magnetfeldes am Kernort von den dynamischen Prozessen in seiner Umgebung bestimmt werden, erlaubt die Messung des Relaxationsverhaltens Rückschlüsse auf Bewegungen im Molekül. Wieviel Energie einem Kern von der Umgebung zur Verfügung gestellt wird um Übergänge zu induzieren, wird durch die spektrale Dichtefunktion  $J$  beschrieben. Mathematisch gesehen ist diese die Fouriertransformierte der Autokorrelationsfunktion der diffusiven Rotationsbewegung des Moleküls. Wie effektiv diese Energie aber für Relaxationsvorgänge genutzt wird hängt von dem speziellen Relaxationsmechanismus ab. Dies wird im folgenden für die wichtigsten Relaxationsmechanismen erläutert.

## 2.2 Dipol-Dipol-Wechselwirkung

Eine der Ursachen für die sich ändernden lokalen Magnetfelder  $\pm\Delta B_z^{DD}$  und damit für die NMR Relaxation ist die Dipol-Dipol-Wechselwirkung (DD-Wechselwirkung) zwischen räumlich benachbarten Spins, wie in Abbildung 2.2 am Beispiel einer Amidgruppe veranschaulicht wird. Bei einer bestimmten Ausrichtung  $\Theta$  des Verbindungsvektors  $r_{NH}$  der beiden Kerne zum äußeren

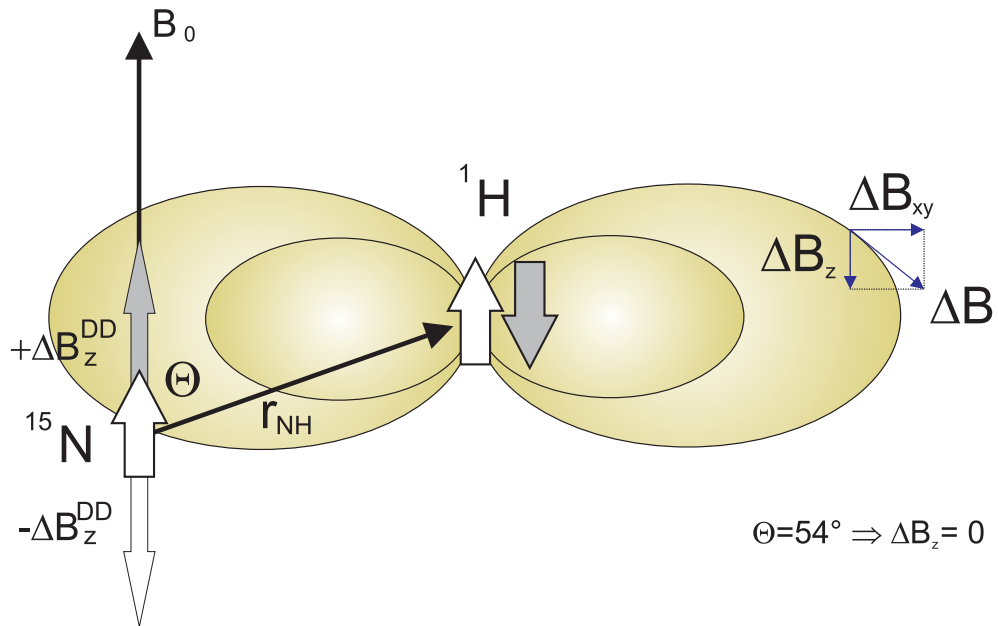


Abbildung 2.2: Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Spins

Abhängig vom Winkel des Verbindungsvektors der beiden Kerne zum äusseren Magnetfeld und dem jeweiligen Spinzustand verändert sich das lokale Magnetfeld am Ort der dipolar gekoppelten Spins. Bei dem "magischen" Winkel  $\Theta = 54^\circ$  verschwindet die Komponente  $B_0^z$ , damit tritt auch keine Interaktion mehr auf. Umklappen eines Spin führt zu einem Vorzeichenwechsel des Dipolfeldes am Ort des anderen Kerns.

Magnetfeld  $B_0$ , dem sogenannten "magischen" Winkel  $\Theta = 54^\circ$ , verschwindet die Komponente des Dipolfeldes parallel zum Magnetfeldes  $B_0^z$ , was zu einer Aufhebung der Wechselwirkung führt. Die quantenmechanische Berechnung der Übergangswahrscheinlichkeiten  $W$  aufgrund der DD-Wechselwirkung ergibt folgende Abhängigkeiten von der spektralen Dichte  $J$  der Molekülbewegung [16]:

$$\begin{aligned}
 W_0^{IS} &= \frac{1}{20} K^2 J(\omega_I - \omega_S) \\
 W_1^I &= \frac{3}{40} K^2 J(\omega_I) \\
 W_1^S &= \frac{3}{40} K^2 J(\omega_S) \\
 W_2^{IS} &= \frac{1}{20} K^2 J(\omega_I + \omega_S)
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

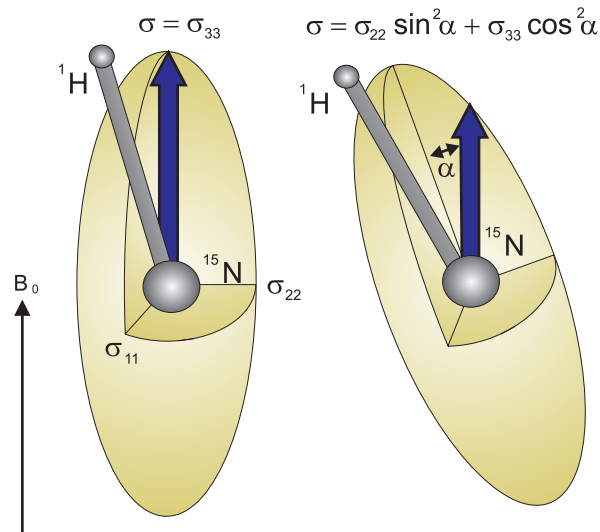


Abbildung 2.3: Anisotropie der chemischen Verschiebung

Je nach Orientierung  $\alpha$  des Tensors der chemischen Abschirmung  $\sigma$  zum äußeren Magnetfeld  $B_0$  verändert sich das Magnetfeld am Ort des Atomkerns. Der isotrope Anteil des Tensors bestimmt dabei die chemische Verschiebung, während der anisotrope Anteil einen zusätzlichen Beitrag zur Relaxation angeregter Spinzustände liefert

mit  $K = (\mu_0/4\pi)\hbar\gamma_I\gamma_Sr_{IS}^{-3}$ . Die Übergangswahrscheinlichkeiten sind folglich proportional zu den spektralen Dichten der Molekülbewegung bei der Frequenz des jeweiligen Überganges. Die dipolare Relaxation ist der dominierende Relaxationsmechanismus für Protonen und Stickstoff.

## 2.3 Anisotropie der chemischen Verschiebung

Die Larmorfrequenz  $\omega_0$  eines spezifischen Kerns hängt vom äußeren Magnetfeld  $\vec{B}_0$  und dem Tensor der chemischen Abschirmung  $\sigma$  ab:

$$\omega_0 = \frac{\gamma}{2\pi} \vec{B}_0 (1 - \sigma) \quad (2.2)$$

Der isotrope Anteil des Tensors erklärt die in Lösungen, d.h. bei freier Rotationsdiffusion des Moleküls, gemessenen chemischen Verschiebungen  $\delta = 10^6 (\sigma_{iso}^{Referenz} - \sigma_{iso}^{Kern})$ :

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3} (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}) \quad (2.3)$$

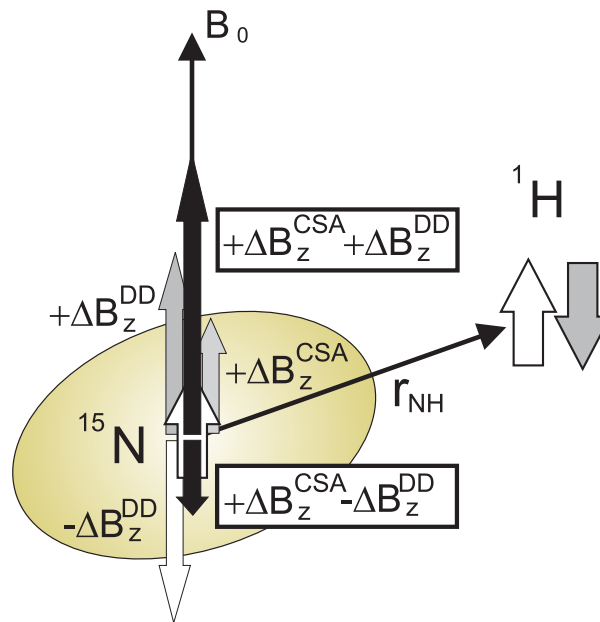


Abbildung 2.4: Kreuzkorrelation zwischen DD- und CSA-Relaxation

Die Beiträge von DD- und CSA-Wechselwirkung überlagern sich und führen abhängig von den Spin-zuständen zu unterschiedlichen starken Amplituden der Magnetfeldänderung. Diese Kreuzkorrelation verursacht unterschiedliche Linienbreiten der gekoppelten Resonanzen.

Der anisotrope Anteil von  $\sigma$  (CSA) führt aufgrund der Rotationsdiffusion und anderer Bewegungen des Moleküls zu einem zeitlich veränderlichen Magnetfeld am Kernort, wie in Abbildung 2.3 gezeigt wird. Der anisotrope Anteil von  $\sigma$  wird durch die Größen *Anisotropie*  $\Delta\sigma := \sigma_{33} - \frac{1}{2}(\sigma_{11} + \sigma_{22})$  und *Asymmetrie*  $\eta := \frac{\sigma_{11} - \sigma_{22}}{\sigma_{33} - \sigma_{iso}}$  beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit des Überganges  $W_1^S$  aufgrund der CSA-Wechselwirkung mit dem äußeren Magnetfeld ist folgendermaßen mit der spektralen Dichte der Molekülbewegung korreliert:

$$W_1^S = \frac{1}{15} \omega_S^2 \Delta\sigma^2 \left( 1 + \frac{\eta^2}{3} \right) J(\omega_S) \quad (2.4)$$

Bei höheren Magnetfeldstärken ist die Anisotropie der chemischen Verschiebung der dominierende Relaxationsmechanismus bei Phosphorkernen.

## 2.4 Kreuzkorrelierte Relaxation

Die Relaxationsprozesse aufgrund von DD- und CSA-Wechselwirkung sind nicht unabhängig voneinander, sondern es tritt eine sogenannte Kreuzkorrelation auf, wie in Abbildung 2.4 veranschaulicht wird. Die Magnetfeldänderungen aufgrund von DD- und CSA-Wechselwirkung überlagern sich und bewirken im Falle paralleler Spins eine kleinere effektive Magnetfeldänderung ( $\Delta B_z^{\uparrow\uparrow} = +\Delta B_z^{CSA} - \Delta B_z^{DD}$ ) als bei antiparallelen Spins ( $\Delta B_z^{\uparrow\downarrow} = +\Delta B_z^{CSA} + \Delta B_z^{DD}$ ). Dies führt zu unterschiedlichen transversalen Relaxationsraten  $R_2^S = R_2^0 \pm \varepsilon$  für parallele und antiparallele Spinzustände und damit zu unterschiedlichen Linienbreiten  $\Delta \nu_S = \pi^{-1} R_2^S$  der Duplett Komponenten der gekoppelten Spins. Auf diesem Effekt beruht der in Kapitel 4 diskutierte TROSY-Effekt. Die Kreuzkorrelationsrate  $\varepsilon$  ist dabei durch folgende Beziehung gegeben [17]:

$$\varepsilon = \frac{K}{2} \omega_S \Delta \sigma \sqrt{1 + \frac{\eta^2}{3}} [3J(\omega_S) + 4J(0)] P_2(\cos \theta) \quad (2.5)$$

$P_2$  ist dabei das Legendre-Polynom 2. Ordnung  $P_2(x) = (3x^2 - 1)/2$ .  $\theta$  gibt den Winkel zwischen den Hauptachsen von  $\sigma$  und des Tensors der dipolaren Wechselwirkung an.

## 2.5 Austauschprozesse

Der Begriff Austausch umfasst die Umwandlung von Konformationen  $A \leftrightarrow B$ , Liganden-Bindung  $A + L \leftrightarrow B$  und Aggregation  $nA \leftrightarrow B$ . Derartige Umwandlungen sind meist mit einer Veränderung der chemischen Verschiebung der davon betroffenen Atomkerne verbunden. Dies hat natürlich Auswirkungen auf die beobachteten NMR-Spektren.

Mathematisch wird der Austauschprozess durch folgende Differentialgleichung für die Konzentrationen der Zustände A und B beschrieben [18]:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} [A](t) \\ b[B](t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -p_B k_{ex} & p_A k_{ex} \\ p_B k_{ex} & -p_A k_{ex} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} [A](t) \\ b[B](t) \end{bmatrix} \quad (2.6)$$

wobei  $b = 1$  für Konformationsaustausch und Ligandenbindung und  $b = n$  für die Aggregation gilt. Normierung  $p_A + p_B = 1$  und Massenerhaltung  $p_A k_A = p_B k_B$  führen zu den Ausdrücken für die Austauschkonstante  $k_{ex} = 1/\tau = k_A + k_B = k_A/p_B = k_B/p_A$ , und für die Gleichgewichtskonstante  $\bar{K} = p_A/p_B = k_B/k_A$ . Setzt man diese Gleichungen in die bekannten Bloch-Gleichungen [19] ein, die semiklassisch das Verhalten der Magnetisierung  $M$  beschreiben, so



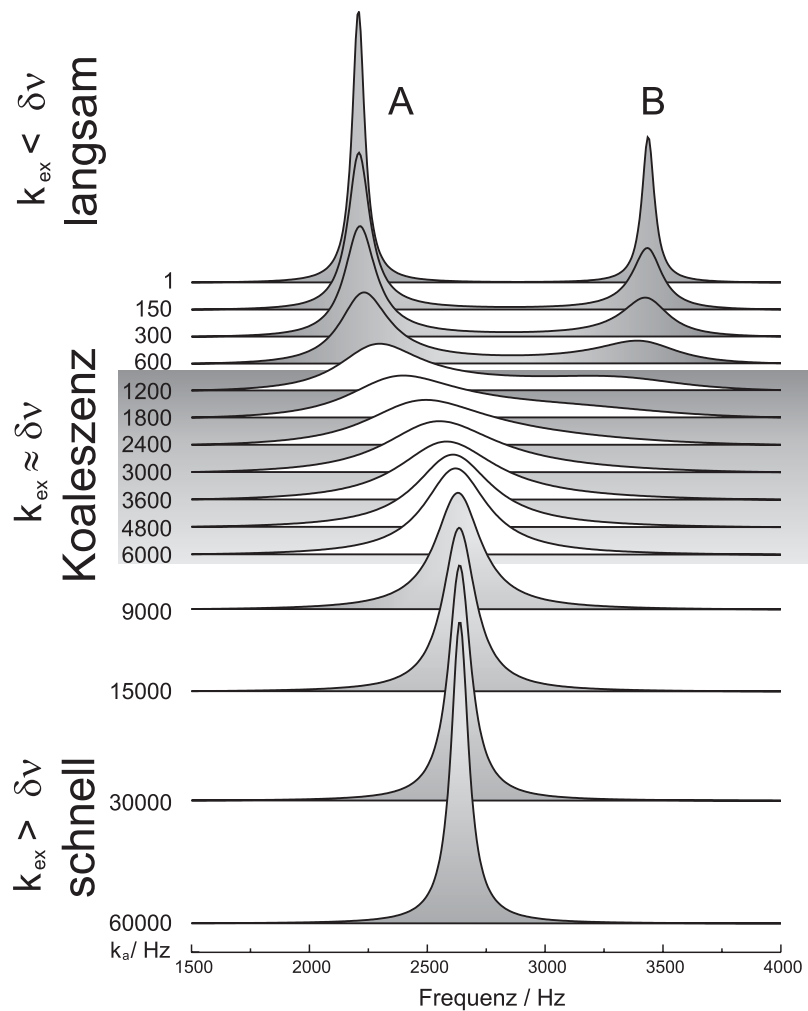


Abbildung 2.5: Schneller und langsamer Austausch

Austauschprozesse führen zu Veränderungen in NMR-Spektren: Sind die Austauschraten klein relativ zum Frequenzunterschied der beiden Zustände dann treten deutlich zwei getrennte Resonanzen zu Tage (langsamer Austausch). Mit steigender Austauschrate verschmelzen die beiden Resonanzen zu einer verbreiterten Resonanz (Koaleszenz). An diesem Punkt tritt die maximale Linienverbreiterung auf. Bei noch höheren Raten nimmt die Linienverbreiterung wieder ab (schneller Austausch). Bei schnellem Austausch ist nur eine Resonanz bei der chemischen Verschiebung sichtbar, die dem mit den Zustandspopulationen gewichteten Mittelwert der chemischen Verschiebungen der Einzelzustände entspricht.

erhält man die sogenannten McConnell-Gleichungen [20]:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} M_A^+(t) \\ M_B^+(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -i\Omega_A - R_{2A}^0 - p_B k_{ex} & p_A k_{ex} \\ p_B k_{ex} & -i\Omega_B - R_{2B}^0 - p_A k_{ex} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} M_A^+(t) \\ M_B^+(t) \end{bmatrix} \quad (2.7)$$

Löst man diese Differentialgleichungen und fouriertransformiert das Ergebnis, erhält man schließlich das Spektrum  $I(\nu) = FT[M_A^+(t) + M_B^+(t)]$ , das in Abbildung 2.5 für verschiedene Austauschraten beispielhaft dargestellt wird [21]:

$$I(\nu) = -C \frac{P[1 + \tau(R_{2A}p_B + R_{2B}p_A)] + QR}{P^2 + R^2}, \quad (2.8)$$

$$\begin{aligned} \text{wobei } P &= \tau[R_{2A}R_{2B} - 4\pi^2\Delta\nu^2 + \pi^2(\delta\nu)^2] + p_A R_{2A} + p_B R_{2B} \\ Q &= \tau[2\pi\Delta\nu - \pi\delta\nu(p_A - p_B)] \\ R &= 2\pi\Delta\nu[1 + \tau(R_{2A} + R_{2B})] + \pi\delta\nu\tau(R_{2B} - R_{2A}) + \pi\delta\nu(p_A - p_B) \\ \delta\nu &= \nu_A - \nu_B \\ \Delta\nu &= \frac{1}{2}(\nu_A - \nu_B) - \nu. \end{aligned}$$

Das Verhältnis der Austauschrate zur Differenz der chemischen Verschiebung der beiden austauschenden Zustände bestimmt dabei, ob schneller, intermediärer oder langsamer Austausch vorliegt. Das Vorhandensein von schnellem Austausch ist dabei nur aufgrund der Linienverbreiterung festzustellen [22]:

$$R_2^{obs} = R_{2A}p_A + R_{2B}p_B + 4\pi^2 \frac{p_A p_B (\delta\nu)^2}{k_A + k_B}. \quad (2.9)$$

Langsamer Austausch ist durch das Auftreten von mehr als einer Resonanz pro Kern wesentlich einfacher nachzuweisen. Für stark unterschiedliche Populationen, bei denen sowohl bei langsamen als auch bei schnellem Austausch der weniger besetzte Zustand meist nicht nachgewiesen werden kann, erlaubt die quadratische Magnetfeldabhängigkeit der Verbreiterung  $\propto (\delta\nu)^2$  dennoch Rückschlüsse auf den Austauschprozess.

## 2.6 Zusammenfassung

Fasst man die beschriebenen Effekte zusammen, so können die messbaren Relaxationsparameter  $T_1$ ,  $T_2$  und heteronuklearer NOE berechnet werden.

Die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$  eines ungekoppelten Spins S wird durch die Übergangswahrscheinlichkeit des zugehörigen Überganges  $W_1^S$  bestimmt. Aufgrund der Zwei- und Nullquantenübergänge in einem gekoppelten Spinsystem sind die longitudinale I und S Relaxation aber nicht unabhängig. Deshalb gehen auch die Übergangswahrscheinlichkeiten  $W_0^{IS}$  und  $W_2^{IS}$  mit ein. Zur transversalen Relaxationszeit  $T_2$  tragen alle Übergänge  $W_1^I$ ,  $W_1^S$ ,  $W_0^{IS}$  und  $W_2^{IS}$  bei, wobei außerdem ein Beitrag der spektralen Dichte bei Frequenz Null miteingeht, der die Dephasierung der transversalen Phasenkohärenz beschreibt<sup>1</sup>. Der heteronukleare NOE auf Spin S wird durch Sättigung des Spins I gemessen. Unter dieser Randbedingung erhält man für den NOE Verstärkungsfaktor  $f = \frac{\gamma_I}{\gamma_S} (W_2^{IS} - W_0^{IS}) / (2W_1^S + W_2^{IS} + W_0^{IS})$ .

Damit ergeben sich die folgenden Gleichungen für die Relaxation eines Spins S, der zum einen mit dem Spin I dipolar wechselwirkt und zum anderen aufgrund seiner eigenen CSA relaxiert [16]:

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{T_1^S} = R_1^S &= \frac{1}{20} K^2 [J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_S) + 6J(\omega_I + \omega_S)] \\
 &\quad + \frac{1}{15} \omega_S^2 \Delta\sigma^2 \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) J(\omega_S) \\
 \frac{1}{T_2^S} = R_2^S &= \frac{1}{40} K^2 [4J(0) + J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_S) + 6J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S)] \\
 &\quad + \frac{1}{90} \omega_S^2 \Delta\sigma^2 \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) [3J(\omega_S) + 4J(0)] + R_{ex} \\
 \frac{I}{I_0} - 1 = f^S &= \frac{1}{20} \frac{\gamma_I}{\gamma_S} K^2 [6J(\omega_I + \omega_S) - J(\omega_I - \omega_S)] / R_1^S
 \end{aligned} \tag{2.10}$$

wobei  $K = \frac{\mu_0}{4\pi} \hbar \gamma_I \gamma_S r^{-3}$  und  $r$  der Abstand der beiden dipolar wechselwirkenden Spins ist. Die Kreuzkorrelation wird dabei allerdings nicht berücksichtigt. Der Austauschterm  $R_{ex} = R_2^{obs} - R_2^0$  berücksichtigt Beiträge zu  $T_2$  aufgrund der Linienverbreiterung durch Austauschvorgänge. In Abschnitt 5.3.3 wird z.B. eine auf diesen Gleichungen basierende Simulation der <sup>19</sup>F-Relaxation gezeigt.

---

<sup>1</sup>Für genaue Herleitungen siehe [15]



# Kapitel 3

## Messmethoden

### 3.1 Einleitung

Messungen der Relaxationszeiten können sowohl mittels ein- als auch mehrdimensionaler Spektren durchgeführt werden. Je nachdem welcher Kern betrachtet wird, erzwingt die durch den Kern vorgegebene Sensitivität der NMR-Spektren und die auftretende Signalüberlagerung die Verwendung bestimmter Techniken.  $^{19}\text{F}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Spektren enthalten meist nur wenige Resonanzen, sodass auch mit eindimensionalen Spektren Relaxationsinformationen gewonnen werden können. Bei  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -Relaxationsmessungen ist dagegen wegen der starken Signalüberlagerung die Verwendung mehrdimensionaler Experimente meist unerlässlich. Abbildung 3.1 zeigt das Schema eines zweidimensionalen Relaxationsexperiments. Auf eine allge-

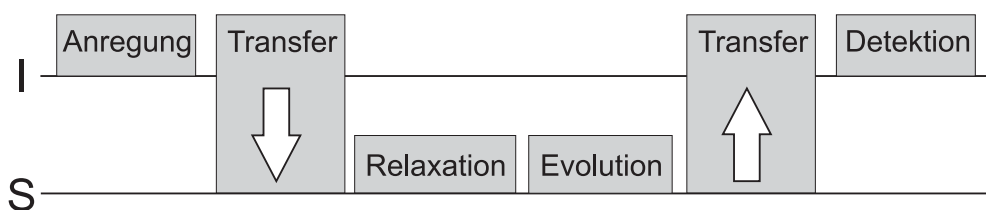


Abbildung 3.1: Schema eines 2D Relaxationsexperiments

Ein typisches 2D-Relaxationsexperiment für den Kern S besteht aus Anregung des Kerns I, Magnetisierungstransfer auf Kern S, dem eigentlichen Relaxationsexperiment, einer Evolutionszeit zur Frequenzbestimmung auf dem Kern S, dem Rücktransfer der Magnetisierung auf den Kern I und der abschließenden Detektion der Magnetisierung. Der Magnetisierungstransfer erfolgt dabei üblicherweise mittels einer INEPT-Sequenz [23]

meine Beschreibung der mehrdimensionalen NMR Spektroskopie soll an dieser Stelle verzichtet werden, da in der Literatur gute Erläuterungen zur Verfügung stehen [15, 22, 24]. Typischerweise basieren mehrdimensionale Relaxationsmessungen auf Spektren von heteronuklearen Einquantenkohärenzen (HSQC [25] oder TROSY [26]). Zur Messung der verschiedenen Relaxationskonstanten werden in solche Experimente verschiedene Relaxationsmodule eingesetzt, die im folgenden beschrieben werden [27].

### 3.2 $T_1$ -Relaxation

Zur Messung der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  wird nach dem Magnetisierungstransfer die longitudinale S-Magnetisierung invertiert ("inversion recovery"). Nach einer variablen Zeitverzögerung wird die durch longitudinale Relaxation entstandene Magnetisierung wieder in eine dazu proportionale transversale S-Magnetisierung überführt. Diese liefert nach der Evolutionszeit und dem Rücktransfer auf den Kern I die gewünschte Messgröße. Messpunkte mit verschiedenen Relaxationszeiten können mit einer exponentiellen Funktion gefittet werden. Daraus berechnet sich die zu messende longitudinale Relaxationszeit  $T_1$ . Zur Unterdrückung von zeitabhängigen Effekten der dipolaren IS-Kreuzrelaxation und der DD-CSA Kreuzkorrelation wird während der Relaxationszeit eine Entkopplungssequenz auf den Kern I angewendet. Durch direkte Messung des S-Kerns kann eine analoge Methode auch mittels eindimensionaler Spektren durchgeführt werden.

### 3.3 $T_2$ -Relaxation

Zur Messung der transversalen Relaxationszeit  $T_2$  wird eine Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz (CPMG) verschiedener Länge auf den Kern S angewendet [28, 29]. Der Kern I wird währenddessen mit synchronen  $180^\circ$ -Pulsen entkoppelt. Der Abstand der  $180^\circ$ -Pulse der CPMG-Sequenz muss so kurz gewählt werden, dass keine Verfälschung der Ergebnisse durch J-Kopplungseffekte auftritt. Austauschprozesse führen zu einer Abhängigkeit der Messergebnisse vom zeitlichen Abstand  $\tau_{cp}$  der  $180^\circ$ -Pulse in der CPMG-Sequenz. Dabei kann der Austauschbeitrag zu  $R_2$  folgendermaßen abgeschätzt werden [30]:

$$R_{ex} = p_{APB} \frac{(\delta\omega)^2}{k_{ex}} \left( 1 - \frac{2}{k_{ex}\tau_{cp}} \tanh \left[ \frac{k_{ex}\tau_{cp}}{2} \right] \right) \quad (3.1)$$

Die Verwendung von adiabatischen Pulsen verbessert die Refokussierungseigenschaften der  $180^\circ$ -Pulse und damit die Genauigkeit der Ergebnisse wesentlich [31]. Die transversale Relaxationszeit  $T_2$  wird dabei immer durch Anpassung einer Exponentialfunktion an die Messpunkte mit verschiedener Dauer der CPMG-Sequenz gewonnen. In eindimensionalen Spektren kann die transversale Relaxationszeit  $T_2$  aus der Linienbreite  $\Delta\nu = 1/\pi T_2$  abgeschätzt werden. Allerdings ist dies fehleranfällig, da auch die instrumentelle Magnetfeldhomogenität die Ergebnisse beeinflusst.

### 3.4 Heteronuklearer NOE

Der heteronukleare NOE, d.h. die Auswirkung der Sättigung von Kern I auf Kern S, wird durch den Vergleich von zwei Spektren gemessen, wobei ein Spektrum mit Sättigung und ein Spektrum ohne Sättigung des Kerns I aufgenommen wird. Der NOE ergibt sich aus dem Verhältnis der Intensitäten  $NOE = I_{sat}/I_{ref}$ . Der NOE-Verstärkungsfaktor berechnet sich daraus zu  $f = (I_{sat} - I_{ref})/I_{ref} = NOE - 1$ . In einem mehrdimensionalen Experiment geschieht die Sättigung durch eine Abfolge von  $120^\circ$ -Pulsen auf dem Kern I. Wie in Abschnitt 2.6 beschrieben hängt der NOE hauptsächlich vom Verhältnis der Relaxationen auf dem Null- und Zweiquantenpfad ab. Da dieses besonders sensitiv auf molekulare Bewegungen im Piko- bis Nanosekundenbereich ist, erhält man mit den NOE-Experimenten einen schnellen Überblick über molekulare Bewegungen auf diesen Zeitskalen.

### 3.5 DD-CSA Kreuzkorrelation

Die DD-CSA Kreuzkorrelationsrate  $\varepsilon$  wird durch den Vergleich von zwei Spektren bestimmt [32]: Abbildung 3.2 zeigt schematisch das verwendete Relaxationsmodul. Für das erste Spektrum (Referenz) werden nur die Pulse auf den Kern S angewandt, das zweite Spektrum entsteht durch Pulse auf beide Kerne.

Nach dem Magnetisierungstransfer von I auf S steht bei beiden Experimenten zu Beginn des gezeigten Relaxationsmoduls eine Antiphasenmagnetisierung  $I_y S_z$  zur Verfügung. Die beiden S-Duplett Komponenten werden durch  $I_y S_z \pm I_y/2$  beschrieben. Beide relaxieren mit unterschiedlichen Raten  $R_2^0 \pm \varepsilon$ . Bei beiden Experimenten liegt nach der Zeit  $2\Delta$  also folgende, transversale Magnetisierung vor:  $M = I_y S_z (\varepsilon^+ + \varepsilon^-) + I_y (\varepsilon^+ - \varepsilon^-)/2$ , wobei  $\varepsilon^\pm = \exp[-2\Delta(R_2^0 \pm \varepsilon)]$ . Danach wird bei beiden Experimenten die S-Magnetisierung wieder in z-Richtung geklappt.

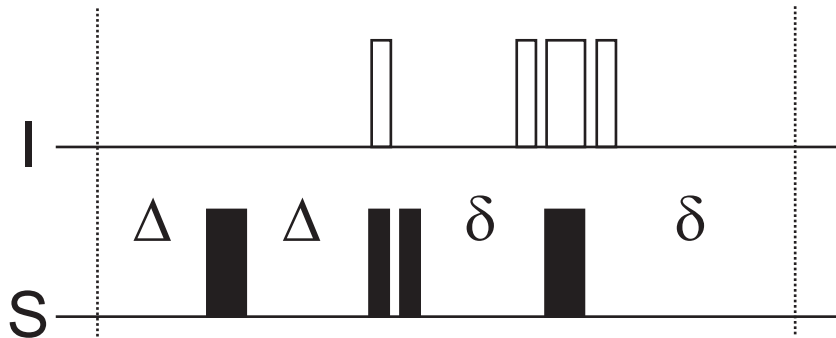


Abbildung 3.2: Relaxationsmodul zur Messungen der DD-CSA Kreuzkorrelationsrate

Zur Bestimmung der Kreuzkorrelationsrate werden zwei Spektren verglichen: Das Referenzexperiment wird ohne die Pulse auf den Kern I durchgeführt, während die eigentliche Messung mit den Pulsen auf I erfolgt. Dicke Balken stehen für  $180^\circ$ , dünne Balken für  $90^\circ$ -Pulse. Für  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Messungen wird die Zeitdauer  $\delta$  auf 2,67 ms gesetzt. Die Zeitdauer  $\Delta$  kann variabel gewählt werden. Für  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Messungen ist 22 ms ein geeigneter Wert.

Der Unterschied bei den Experimenten entsteht durch die Pulse auf den Kern I: Bei dem Referenzexperiment ohne die I-Pulse wird auch die  $I_z S_z$  Magnetisierung wieder in Antiphasenmagnetisierung zurückverwandelt und detektiert. Bei dem zweiten Experiment mit den I-Pulsen wird der Antiphasenanteil der  $S_z$ -Magnetisierung durch den  $90^\circ$ -Puls auf den Kern I zerstört. Die Inphasenkomponente wird danach zu einer Antiphasenmagnetisierung umgewandelt und nach Evolution und Rücktransfer detektiert. Vergleicht man die Intensitäten der Resonanzen in beiden Experimenten so erhält man:

$$I/I_{\text{Referenz}} = (\varepsilon^- - \varepsilon^+) / (\varepsilon^- + \varepsilon^+) = \tanh(2\Delta\varepsilon) \quad (3.2)$$

Daraus kann die Rate  $\varepsilon$  berechnet werden. Die Bestimmung der Kreuzkorrelationsrate ist insbesondere von Bedeutung, da sie eine von Austauschprozessen unbeeinflusste Bestimmung der spektralen Dichtefunktion  $J$  erlaubt [33, 34].

### 3.6 Austauschprozesse

Zum Nachweis von Austauschprozessen und zur Bestimmung der Austauschraten und Zustandspopulationen stehen mehrere Methoden zur Verfügung:

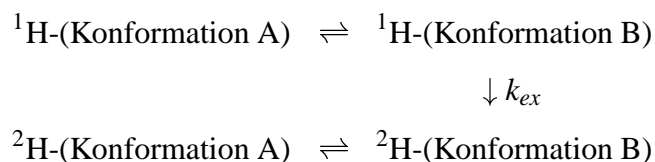


### Analyse der Linienform

Die Analyse der Linienform in eindimensionalen NMR-Spektren ist eine etablierte Technik zur Untersuchung von  $\mu\text{s}$ -ms Austauschprozessen. Dabei werden die McConnell Gleichungen (Gl. 2.8) an die gemessenen Linienformen angepasst ("complete bandshape" (CBS) Methode [21]). Die Anpassungsparameter liefern direkt die gesuchten Größen. Bei langsamen Austausch können die Austauschraten, Zustandspopulationen und transversalen Relaxationsraten gleichzeitig bestimmt werden, sofern auch der weniger besetzte Zustand als separate Resonanz nachweisbar ist [21]. Durch Messungen der Linienform bei verschiedenen Temperaturen kann auf die Entropie- ( $\Delta S_0$ ) und Enthalpiedifferenzen ( $\Delta H_0$ ) der austauschenden Zustände zurückgeschlossen werden. Dabei werden die gemessenen Austauschraten  $k$  entsprechend der Arrhenius Beziehung  $k_A/k_B \propto \exp[-(\Delta H_0 - T\Delta S_0)/RT]$  analysiert<sup>1</sup>.

### <sup>1</sup>H-<sup>2</sup>H-Austausch

In Proteinen gibt es eine weitere Möglichkeit, langsame Konformationsänderungen nachzuweisen [35]: In Wasserstoffbrücken gebundene Protonen tauschen normalerweise nur sehr langsam gegen Deuteronen aus, wenn das Protein statt in H<sub>2</sub>O in D<sub>2</sub>O gelöst wird. Konformationsänderungen und Fluktuationen in der Proteinstruktur, die Wasserstoffbrücken aufbrechen und Lösungsmittel eindringen lassen, beschleunigen den Austausch wesentlich. Üblicherweise geht man von folgendem Reaktionsschema aus [13]:



Dabei stehen A und B für geschlossene und offene Konformationen. Ein bekanntes Beispiel für Fluktuationen, die zu einem beschleunigten <sup>1</sup>H-<sup>2</sup>H-Austausch führen, sind Atmungsbewegungen in  $\beta$ -Faltblättern [13].

### <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N Methoden

In mehrdimensionalen NMR-Experimenten wird die Linienbreite der Resonanzen durch die digitale Auflösung bestimmt, da die Anzahl der Messpunkte in den indirekten Richtungen durch

---

<sup>1</sup> siehe dazu auch Kapitel 5.3.1

die Gesamtmesszeit limitiert wird. Damit ist aber eine direkte Analyse der Linienform nicht möglich [18]. Um diese Schwierigkeit zu umgehen wurden Techniken entwickelt, die die Bestimmung von Raten und Populationen auf Intensitätsvergleiche in mehrdimensionalen Spektren zurückführen. Hier sind besonders folgende Experimente zu nennen: Die Bestimmung des  $\varepsilon/R_2$ -Verhältnisses [17], das zz-Austausch-Experiment [36, 37] für langsamen Austausch, das  $R_{1\rho}$ - $R_1$ -Experiment [38] und das Relaxationskompensierte-CPMG-Experiment [39].

Im Fall der  $^{15}\text{N}$  Relaxation enthält das Verhältnis der Kreuzkorrelationsrate  $\varepsilon$  zur Rate der transversalen Relaxation  $R_2$  keinen signifikanten, direkten Beitrag der spektralen Dichte  $J$ , da die hochfrequenten Beiträge  $J(\omega_H - \omega_N)$ ,  $J(\omega_H)$  und  $J(\omega_H + \omega_N)$  der spektralen Dichte zu  $R_2$  im Vergleich zu  $J(\omega_N)$  und  $J(0)$  meist vernachlässigt werden können [40]:

$$\frac{\varepsilon}{R_2} \propto \Delta\sigma \sqrt{1 + \frac{\eta^2}{3} P_2(\cos\theta)}. \quad (3.3)$$

Damit verbleiben zur Erklärung von Schwankungen in  $\varepsilon/R_2$  nur Unterschiede in den Tensoren der chemischen Verschiebung oder Austauschbeiträge  $R_{\text{ex}}$  zu  $R_2$ . Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis  $\varepsilon/R_2$  besonders sensitiv auf Austauschbeiträge  $R_{\text{ex}}$  ist [17].

Eine weitere Möglichkeit Austauschvorgänge nachzuweisen ist die zz-Spektroskopie. Darunter fallen auch NOESY und ROESY Spektren, die aber bei großen Molekülen entweder zu viele Resonanzen zeigen (NOESY) oder nur wenig sensitiv sind (ROESY). Man kann zz-Experimente auch HSQC-basiert durchführen [36]. Dabei wird nach der üblichen Evolutionszeit auf dem Heterokern die transversale Magnetisierung in die z-Richtung geklappt und eine NOESY-artige Mischperiode eingefügt. Danach wird die Magnetisierung wie üblich zur Detektion auf den anderen Kern transferiert. Dies führt zum Erscheinen von Austauschresonanzen, die die Resonanzen austauschender Konformation verbinden.

Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben kann der Austauschbeitrag zu  $R_2$  mit Hilfe von  $T_2$ -Messungen abgeschätzt werden, die mit verschiedenen Interechozeiten  $\tau_{cp}$  aufgenommen wurden. Dieser Effekt liegt auch dem Relaxationskompensierten-CPMG Experiment [39] zu Grunde. Verschiedene Interechozeiten  $\tau_{cp}$  können dabei als verschiedene effektive Radiofrequenzfeldstärken angesehen werden. Dies ist analog zu Messungen im rotierenden Bezugssystem [38], bei denen die Relaxationszeit  $R_{1\rho}$  in Abhängigkeit von der Radiofrequenzfeldstärke eines Spinlock-Pulses gemessen wird. Derartige Messungen werden als Messung der Relaxationsdispersion bezeichnet.

In letzter Zeit wurden auch TROSY-basierte<sup>2</sup> Experimente sowohl zum Nachweis als auch

---

<sup>2</sup>siehe Kapitel 4

zur Unterdrückung von Austauschwirkungen in  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Spektren vorgeschlagen [41, 42]

### 3.7 Datenauswertung

In den Gleichungen 2.10 stehen den drei Messgrößen,  $T_1$ ,  $T_2$  und NOE, fünf zu bestimmende Unbekannte  $J(0)$ ,  $J(\omega_S)$ ,  $J(\omega_I - \omega_S)$ ,  $J(\omega_I)$  und  $J(\omega_I + \omega_S)$  gegenüber. Deshalb sind geeignete Auswertungsverfahren und Näherungen vonnöten, um von den Messgrößen auf die spektrale Dichte und damit auf die molekulare Bewegungen zurückzuschließen. Die spektrale Dichte  $J$  kann z.B. mit Hilfe des modellfreien Ansatzes von Lipari und Szabo [43, 44] definiert werden:

$$J(\omega) = \frac{2S^2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} + \frac{2(1 - S^2)\tau_e}{1 + \omega^2\tau_e^2} \quad (3.4)$$

dabei setzt sich die Korrelationszeit  $\tau_e^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_i^{-1}$  aus der Korrelationszeit der Rotationsdiffusion  $\tau_c$  und der Korrelationszeit der internen Bewegung  $\tau_i$  zusammen. Damit reduziert sich die Anzahl der Unbekannten auf drei: der verallgemeinerte Ordnungsparameter  $S^2$  und die Korrelationszeiten  $\tau_e$  und  $\tau_i$ . Treten allerdings Austauschbeiträge zur transversalen Relaxation auf, so kompliziert sich die Auswertung mit Hilfe des Lipari-Szabo Modells. In dieser Arbeit wurde zur Auswertung mit dem Lipari-Szabo Modell das Programm TENSOR<sup>3</sup> [45] verwendet.

Eine weitere Möglichkeit ist die Auswertung der Relaxationsdaten mit Hilfe der Methode der reduzierten spektralen Dichte [46]. Dabei wird angenommen, dass die hochfrequenten Beiträge zur spektralen Dichte ungefähr gleich sind  $J(\omega_I \pm \omega_S) \approx J(\omega_I)$ . Dieser Ansatz kann verbessert werden, indem man die spektrale Dichte mit  $J(\omega) = \frac{\lambda_1}{\omega^2} + \lambda_2$  ansetzt und fordert, dass  $6J(\omega_I + \omega_S) - J(\omega_I - \omega_S) = AJ(\omega_q)$ , wobei  $A = \text{const}$  und  $\omega_q$  eine einzelne, äquivalente Frequenz darstellt. Im Fall der  $^{15}\text{N}$  Relaxation können die Terme in den Gleichungen 2.10 folgendermaßen genähert werden ( $I \hat{=} H$ ,  $S \hat{=} N$ ) [47]:

$$\begin{aligned} 6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N) &= 5J(0,870\omega_H) \\ J(\omega_H - \omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N) &= 7J(0,921\omega_H) \\ J(\omega_H - \omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N) &= 13J(0,955\omega_H). \end{aligned} \quad (3.5)$$

Dies führt auf ein Gleichungssystem mit drei Unbekannten,  $J(0)$ ,  $J(\omega_N)$  und  $J(0,87\omega_H)$ , da  $J(\alpha\omega_H) = (0,87/\alpha)^2 J(0,87\omega_H)$ .

<sup>3</sup>Im Internet unter <http://www.ibs.fr/ext/labos/LRMN/softs/welcome.htm> verfügbar

Auch die Verwendung weiterer Messgrößen, wie der DD-CSA Kreuzkorrelationsrate  $\varepsilon$  oder von Messungen bei verschiedenen Magnetfeldstärken [48], erlaubt die Bestimmung der spektralen Dichte.  $J(0)$  kann z.B. aus den beiden mit Hilfe des Kreuzkorrelationsexperiments gemessenen Intensitäten  $I$  und  $I_{ref}$  berechnet werden [49]. Die Messung der DD-CSA Kreuzkorrelationsrate erlaubt außerdem die Trennung der Austauschbeiträge von den Einflüssen einer anisotropen Rotationsdiffusion [40].

### 3.8 Zusammenfassung

Die NMR-Spektroskopie bietet vielfältige Möglichkeiten die Dynamik von biologischen Makromolekülen, wie z.B. Proteinen, zu untersuchen. Bei vorhandener Zuordnung der NMR-Signale zu bestimmten Aminosäuren liefert die NMR ein Abbild der Dynamik in Proteinen auf einer großen Zeitskala in atomarer Auflösung. Abbildung 3.3 zeigt einen Überblick über die NMR-Messmethoden im Verhältnis zu den Zeitskalen der in Proteinen vorkommenden Bewegungen.

Untersuchungen auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala werde heute bei Proteinen standardmäßig mit Hilfe von  $^{15}\text{N}$  Relaxationsmessungen durchgeführt. Die Aufklärung der Dynamik auf längeren Zeitskalen von Mikro- zu Millisekunden ist deutlich schwieriger, da die auf dieser Zeitskala auftretenden Austauschvorgänge nur selten durch verdoppelte Resonanzen klar zu Tage treten und in vielen Fällen nur vage Hinweise, wie z.B. reduzierte  $T_2$ -Zeiten, auf das Vorhandensein von Austauschprozessen hindeuten. Eine weitere Schwierigkeit entsteht bei der Verwendung des erweiterten Lipari-Szabo Modells, in dem auch Austauschsterme berücksichtigt werden, da Fehler in der Bestimmung des Diffusionstensors zu dem scheinbaren Auftauchen von Austauschbeiträgen führen [50].

Die Vorgänge auf der Mikro- zu Millisekunden-Zeitskala sind allerdings für viele funktionelle Eigenschaften von Proteinen, wie z.B. der Bindung von Liganden oder dem Übergang von aktiven zu inaktiven Zuständen, äußerst wichtig. Beispielsweise konnten Eisenmesser et al. [51] die katalytische Funktion eines Enzyms anhand von  $^{15}\text{N}$  Relaxationsmessungen verfolgen.  $^{15}\text{N}$  Relaxationsmessungen leisten auch einen erheblichen Beitrag zur Klärung der Frage, wie sich stabile Strukturen in Proteinen herausbilden [52].

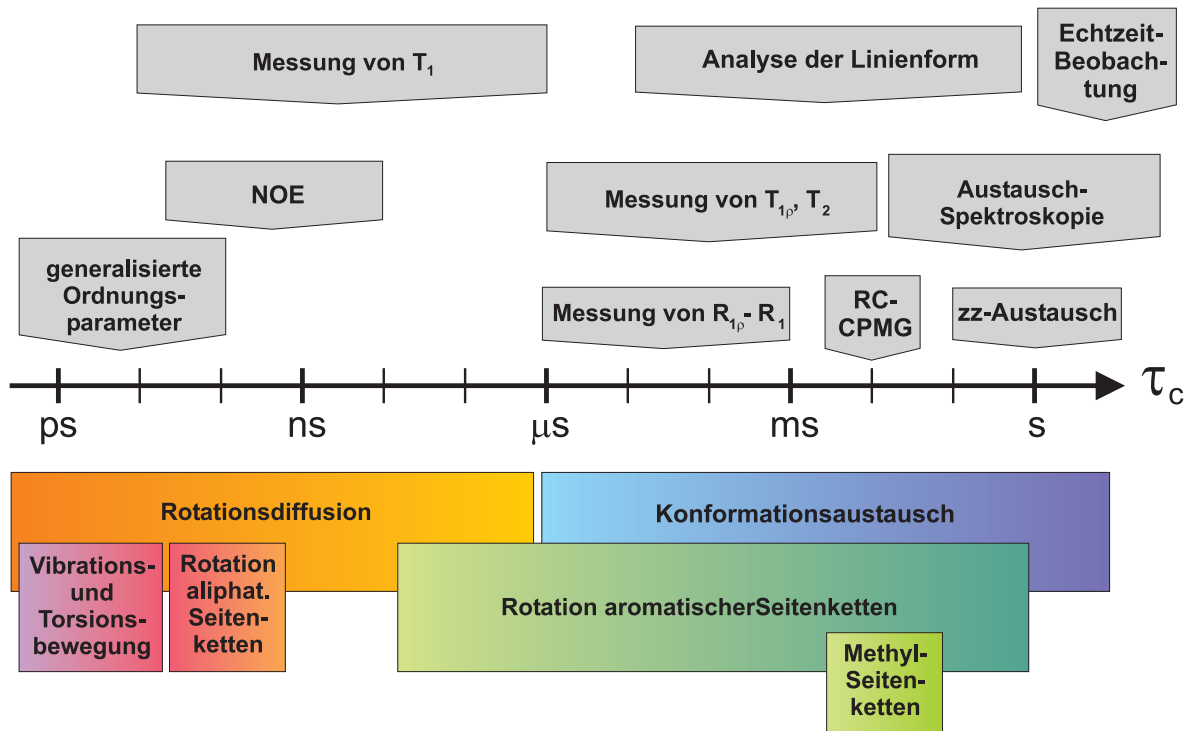


Abbildung 3.3: NMR-Messmethoden und Zeitskalen der Bewegung in Proteinen  
 NMR-Messmethoden erlauben die Untersuchung der Proteindynamik über den ganzen Bereich der vorkommenden Bewegungszeitskalen, beginnend von schnellen (Pikosekunden) Torsions- und Vibrationsbewegungen bis hin zu langsamen (Sekunden bis Stunden) Konformationsänderungen.



# Kapitel 4

## Spektroskopie mit optimierter transversaler Relaxation

### 4.1 Einleitung

Ein Problem der NMR-Spektroskopie an Proteinen ist die abnehmende Sensitivität mit zunehmender Proteingröße, da durch die verlangsamte Rotationsdiffusion großer Moleküle die transversale Relaxationszeit  $T_2$  immer mehr abnimmt, was zu einer Linienverbreiterung führt. Schon bei Proteinen in der Größe von 30 kDa ist die Anwendung der konventionellen NMR-Techniken - je nach Eigenschaften des Proteins - mit nicht unerheblichen Schwierigkeiten verbunden. Insbesondere wird die Zuordnung der Signale immer zeitaufwändiger und fehleranfälliger, da die Zahl der Signale mit der Proteingröße zu, die Qualität der Spektren jedoch abnimmt. Um diese Beschränkungen in der Proteingröße zu überwinden wurde von Pervushin et al. [3] die Methode der optimierten transversalen Relaxation entwickelt (TROSY). Besonders bei hohen Magnetfeldstärken ist diese Methode gegenüber konventionellen, HSQC-basierten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Korrelationsspektren [25] im Vorteil. Bei bis jetzt unerreichten Feldstärken von ca. 1000 MHz sollte nach bisherigen Berechnungen die transversale Relaxation in Amidgruppen ihr Minimum erreichen [53]. Mittels TROSY konnte eine Signalzuordnung für ein Protein, das als symmetrisches Oktamer mit insgesamt 110 kDa vorlag, durchgeführt werden [54]. Für sehr große Proteine wurden auch optimierte TROSY-Sequenzen mit dem sogenannten CRINEPT Magnetisierungstransfer vorgeschlagen [55]. Da die Linienbreite in einem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY-Spektrum durch die Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Amidprotonen mit anderen Protonen bestimmt wird, können die Linienbreiten durch Deuterierung von nicht-austauschenden Protonen in Proteinen weiter

verringert werden [3, 56].

Der Ansatz von TROSY basiert auf der schon länger bekannten Beobachtung, dass in einem gekoppelten Spinsystem die einzelnen aufgespaltenen Resonanzen unterschiedliche Linienbreiten zeigen. Anstatt nun, wie konventionell, die Aufspaltung durch Entkopplung zu beseitigen, was zu einer gemittelten Linienbreite führt, selektiert TROSY allein die schmalste Resonanz. Obwohl damit 3 der 4 Signalkomponenten in einem gekoppelten 2-Spin- $\frac{1}{2}$ -System unterdrückt werden, führt dies ab einer von der Magnetfeldstärke abhängigen Molekülgröße zu einem Auflösungs- und Sensitivitätsgewinn.

Die Selektion der schmalsten Signalkomponente kann mittels eines geeigneten Phasenzklus oder mit Magnetfeldgradienten [57–59] erfolgen. Dabei bieten Magnetfeldgradienten Vorteile gegenüber Phasenzyklen. Mattiello et al. [60] zeigten, dass Magnetfeldgradienten, die im sogenannten “magischen Winkel”<sup>1</sup> zum statischen Magnetfeld ausgerichtet sind, die Refokussierung von intermolekularen Kohärenzen zwischen Wassermolekülen verhindern. Diese intermolekularen Kohärenzen, die durch Dipol-Dipol Kopplung entstehen, sind eine Hauptursache für die störende Wassermagnetisierung während der Datenakquisition. Mattiello et al. [60] demonstrierten, dass mit Magnetfeldgradienten im “magischen Winkel” die Wasserunterdrückung in einem Mehrquanten-gefilterten  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Korrelationsexperiment (COSY) deutlich verbessert werden kann. Sie fanden allerdings keine Verbesserung der Wasserunterdrückung in HSQC-basierten Experimenten.

In diesem Kapitel wird die Optimierung von TROSY-Experimenten bezüglich der Wasser- und Artefaktunterdrückung beschrieben. Außerdem werden verschiedene HSQC- und TROSY-Methoden hinsichtlich der Sensitivität verglichen. Die Messungen wurden am Beispiel des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) durchgeführt, das mit seinen 27 kDa und seiner Tendenz zu aggregieren<sup>2</sup> ein gutes Modellsystem für ein Protein an der Grenze des mit konventionellen Methoden Machbaren darstellt.

## 4.2 Das TROSY Prinzip

Schon bei Proton-Larmorfrequenzen von 600 MHz tritt die unterschiedliche Linienverbreiterung<sup>3</sup> der Signalkomponenten in einem gekoppelten HSQC-Spektrum deutlich zu Tage (Abb. 4.1): Die

---

<sup>1</sup> siehe Kapitel 2.2

<sup>2</sup> siehe Kapitel 5

<sup>3</sup> siehe Kapitel 2.4



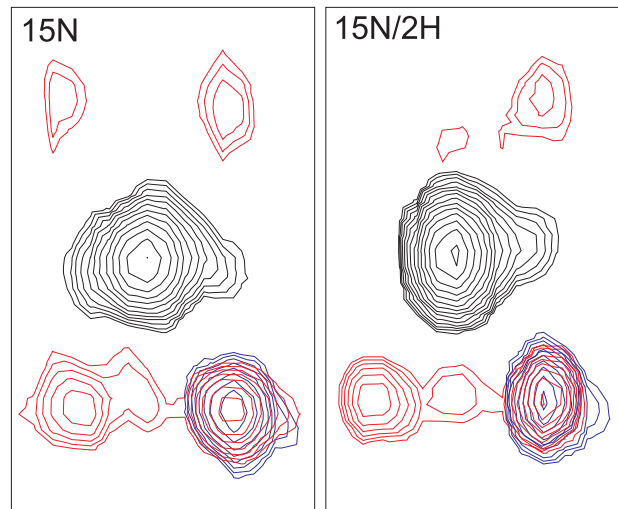


Abbildung 4.1: Der TROSY-Effekt bei 600 MHz am Beispiel von Alanin 37 in GFPuv: Deutlich ist die unterschiedliche Linienbreite der einzelnen Signalkomponenten des nicht-entkoppelten Spektrums zu sehen (rot). Entkopplung führt zu einer gemittelten Linienbreite (schwarz). Die Selektion der schmalsten Komponente (TROSY) führt zu einer deutlich erhöhten Auflösung (blau). Deuterierung von nicht-austauschenden Protonen verstärkt den Effekt.

Kreuzkorrelation zwischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung und der Anisotropie der chemischen Verschiebung führt bei bestimmten Spineinstellungen zu einer Verstärkung oder Abschwächung der Wechselwirkung der beiden Kerne.

Um diesen Effekt zur Steigerung der Auflösung von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Korrelationsspektren zu benutzen, muss ein Weg gefunden werden nur die schmalste Komponente des Quartetts zu selektieren. Eine Möglichkeit hierzu ist die Verwendung eines doppelten  $\text{S}^3\text{CT}$ -Elements (“spin state selective coherence transfer”, [57, 61]), wie in Abbildung 4.2 dargestellt. Das TROSY Experiment beginnt wie jedes heteronukleare Korrelationsexperiment mit dem Magnetisierungsübertrag von einem sensitiven Kern I auf den weniger sensitiven, gekoppelten Kern S. Nach der Evolutionsperiode zur Frequenzbestimmung auf dem Heterokern S muss nun die geeignete Kohärenz selektiert und auf dem I Kern detektiert werden. Die schmalste Komponente des I-S-Quartetts wird durch den Operator  $I^\beta S^\pm$  repräsentiert. Das erste  $\text{S}^3\text{CT}$ -Element überführt die transversale Antiphasenmagnetisierung  $I^\beta S^\pm$  von Kern S in eine Null- (Antiecho) oder Doppelquantenkohärenz (Echo). Durch das Verhältnis der Gradientenstärken  $G_2/G_6$  zu  $G_3/G_7$  wird die jeweils nicht gewünschte Kohärenz dephasiert. Das zweite  $\text{S}^3\text{CT}$ -Element transferiert die nicht dephasierte Mehrquantenkohärenz wiederum in eine transversale Antiphasenmagnetisierung

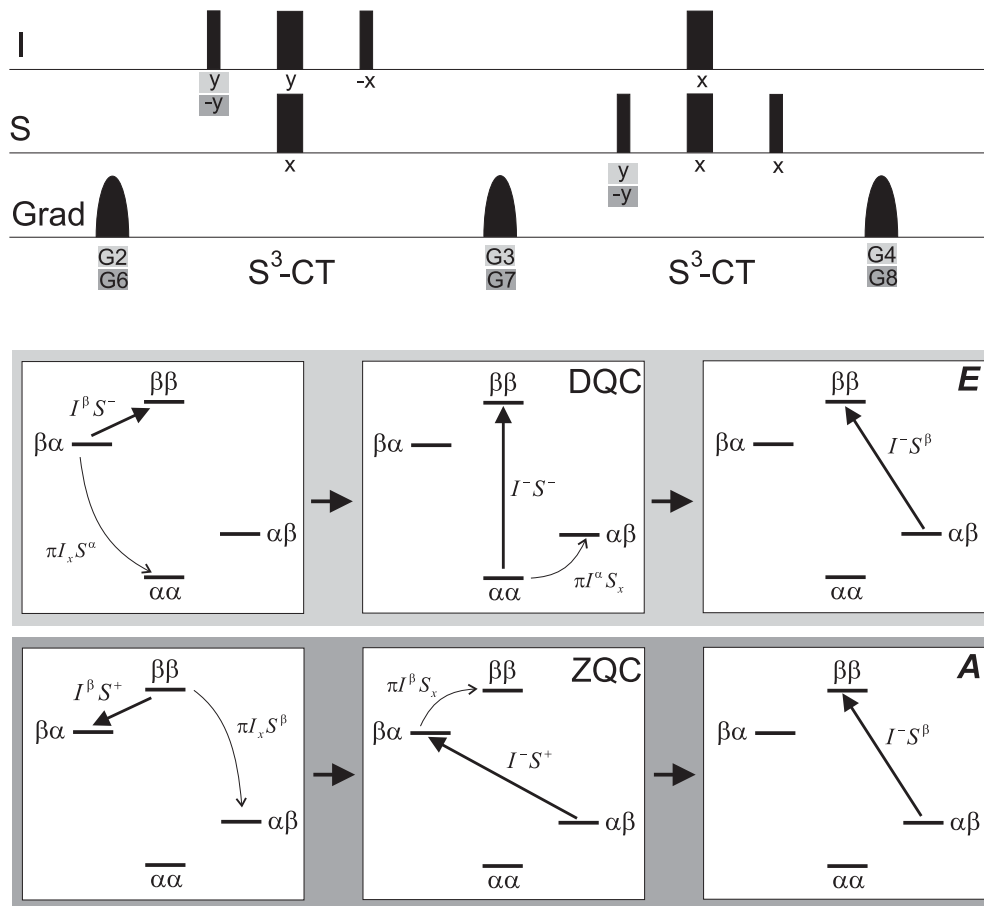


Abbildung 4.2: Selektion der TROSY-Komponente durch ein doppeltes  $S^3CT$ -Element  
 Wie im Text beschrieben erfolgt die Selektion der schmalsten Komponente eines  $^1H$ - $^{15}N$  Quartetts  $I^\beta S^\pm$  über den Zwischenschritt einer Null- bzw. Doppelquantenkohärenz  $I^- S^\pm$  zur abschliessenden Detektion der  $I^- S^\beta$ -Komponente. Ein  $S^3CT$ -Element besteht aus zwei  $90^\circ$ - und zwei  $180^\circ$ -Pulsen zusammen mit Gradienten, die der Kohärenzselektion dienen. E und A kennzeichnen dabei die Wege bei Echo- bzw. Antiechodetektion. Die Gradientenstärken G2 bis G8 müssen so angepasst werden, dass für die gewünschte Kohärenz zuletzt eine verschwindende Phase vorliegt, d.h.  $\gamma_I G2 = (\gamma_I \pm \gamma_S) G3 = \gamma_I G4$  bei gleichlangen Gradientenpulsen.

$I^-S^\beta$  von Kern I, die detektiert wird. Bei passendem Verhältnis der Gradientenstärken  $G3/G7$  zu  $G4/G8$  wird die nicht gewünschte Kohärenzkomponente dephasiert. Durch die Kohärenzselektion mittels Gradienten ist ein einziger weiterer Phasenzyklus notwendig, um die Axialartefakte auf dem Heterokern zu unterdrücken. Außerdem verbessert die Verwendung von Gradienten die Wasserunterdrückung und die Unterdrückung von  $t_1$ -Rauschen, wie im folgenden gezeigt wird.

### 4.3 Intermolekulare Kohärenzen

Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung führt neben den schon in Abschnitt 2.2 erwähnten Effekten auch zu intermolekularen Kohärenzen, wenn die entsprechenden Spins in sehr hoher Konzentration vorliegen. Dies trifft z.B. auf die Protonenspins in Wasser zu. Dabei können "unmögliche" Korrelationsresonanzen und "unmögliche" Echos auftreten, die nach der üblichen Hochtemperaturnäherung der Dichtematrix in der NMR nicht auftreten dürften [62]. Man würde erwarten, dass sich derartige Kohärenzen aufgrund der Rotationsdiffusion der Moleküle in einer Lösung herausmitteln. Dies trifft aber nur auf einer kleinen Längenskala ( $\approx 10\mu\text{m}$ ) zu, während sich über lange Distanzen Kohärenzen ausbilden können. Zusammen mit dem Einfluss der Strahlungsdämpfung<sup>4</sup> kann dies sogar zu einem chaotischen Verhalten der Magnetisierung führen [63]. Die theoretische Arbeit von Warren et al. [64] hat gezeigt, dass die Refokussierung von intermolekularen Zweiquantenkohärenzen durch Magnetfeldgradienten wiederum von dem Legendre Polynom 2. Ordnung  $P_2(\cos\Theta)$  abhängt, wobei  $\Theta$  der Winkel zwischen dem Magnetfeldgradienten und dem Hauptmagnetfeld darstellt. Da unter dem magischen Winkel  $\Theta = 54,7^\circ$  die DD-Wechselwirkung verschwindet, ist auch die Refokussierung von intermolekularen Kohärenzen minimal. Experimentell wurde dies z.B. anhand von Gradienten-selektierten Mehrquanten-Korrelationsexperimenten (MQF-COSY) demonstriert [60].

### 4.4 Optimierung von TROSY Programmen

#### Pulssequenz und experimentelle Parameter

Abbildung 4.3A zeigt eine 2D-TROSY Pulssequenz, die mit Hilfe des Einschubs in Abbildung 4.3B zu einer 3D-TROSY-HNCA Sequenz erweitert werden kann. Die Kohärenzselektion erfolgt da-

---

<sup>4</sup>"radiation damping"

bei mittels Magnetfeldgradienten. Die Sequenz besteht aus einem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  INEPT Magnetisierungstransfer, einer Evolutionszeit auf dem Heterokern und einem  $(\text{S}^3\text{CT})^2$  Schritt zum Magnetisierungstransfer und der Selektion der TROSY-Resonanz. Am Punkt 1 der Sequenz existiert, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben und mittels einer POMA-Simulation [65] verifiziert wurde, eine reine Null- oder Doppelquantenresonanz:

$$\begin{aligned} & -\cos(\pi J_{NH}t_1) [\sin(\omega_N t_1) H_x N_x + \cos(\omega_N t_1) H_x N_y] \\ & + \sin(\pi J_{NH}t_1) [\sin(\omega_N t_1) H_y N_x + \cos(\omega_N t_1) H_y N_y] \end{aligned} \quad (4.1)$$

Wie zuvor beschrieben werden die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Mehrquantenresonanzen in detektierbare Einquantenkohärenzen umgewandelt. Die Existenz der Mehrquantenresonanzen zum Zeitpunkt 1, wenn also der Gradient G3/G7 angewendet wird, legt die Vermutung nahe, dass ebenso wie bei dem MQF-COSY Experiment von Mattiello et al. [60] die Verwendung von Gradienten im magischen Winkel deutliche Verbesserungen in der Wasserunterdrückung bringen sollte.

Dies wurde mit Experimenten an  $^{15}\text{N}$ , 99% $^2\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , 70% $^2\text{H}$  markierten Proben von GFP verifiziert. Alle Experimente wurden an einem Bruker DRX600 Spektrometer bei einer Temperatur von 310K durchgeführt. Dabei wurde ein Tripel-Resonanz Probenkopf mit xyz-Gradienten mit einer maximalen Gradientenstärke von nominell 500 mT/m bei einer Anstiegszeit von 12  $\mu\text{s}$  verwendet. Die maximale eingesetzte Gradientenstärke lag bei 375 mT/m mit einer Gradientendauer von 1,6 ms. Bei den 2D-Experimenten wurden jeweils 16 FIDs pro  $t_1$ -Schritt akquiriert. Insgesamt wurden pro Experiment 128  $t_1$ -Schritte aufgenommen, die während der Datenprozessierung auf 256 Punkte extrapoliert und auf 512 Punkte mit Nullen aufgefüllt wurden. Es kam keine Basislinienkorrektur zum Einsatz. Außerdem wurden ein konventionelles 3D-HNCA [68], ein 3D-TROSY-HNCA und ein 3D-TROSY-HNCO an der  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , 70% $^2\text{H}$  Probe von GFP aufgenommen. Insgesamt wurden 2k ( $^1\text{H}$ )  $\times$  80 ( $^{15}\text{N}$ )  $\times$  80 ( $^{13}\text{C}$ ) Messpunkte akquiriert. Dabei wurden bei dem konventionellen HNCA für jeden der 80  $\times$  80 Messpunkte in den indirekten Richtungen 32 FIDs gemittelt. Die Frequenzbreiten betragen 10 kHz  $\times$  2,5 kHz  $\times$  8 kHz. Die gemessenen Daten wurden dann auf 2k  $\times$  128  $\times$  256 Datenpunkte mittels Extrapolation und Nullauffüllung prozessiert. Bei dem 3D-TROSY-HNCA und 3D-TROSY-HNCO wurden 64 FIDs pro Messpunkt in den indirekten Richtungen aufgenommen. Die Prozessierung erfolgte mit dem Programm XWINNMR (Bruker Analytik GmbH, Ettlingen, Deutschland).

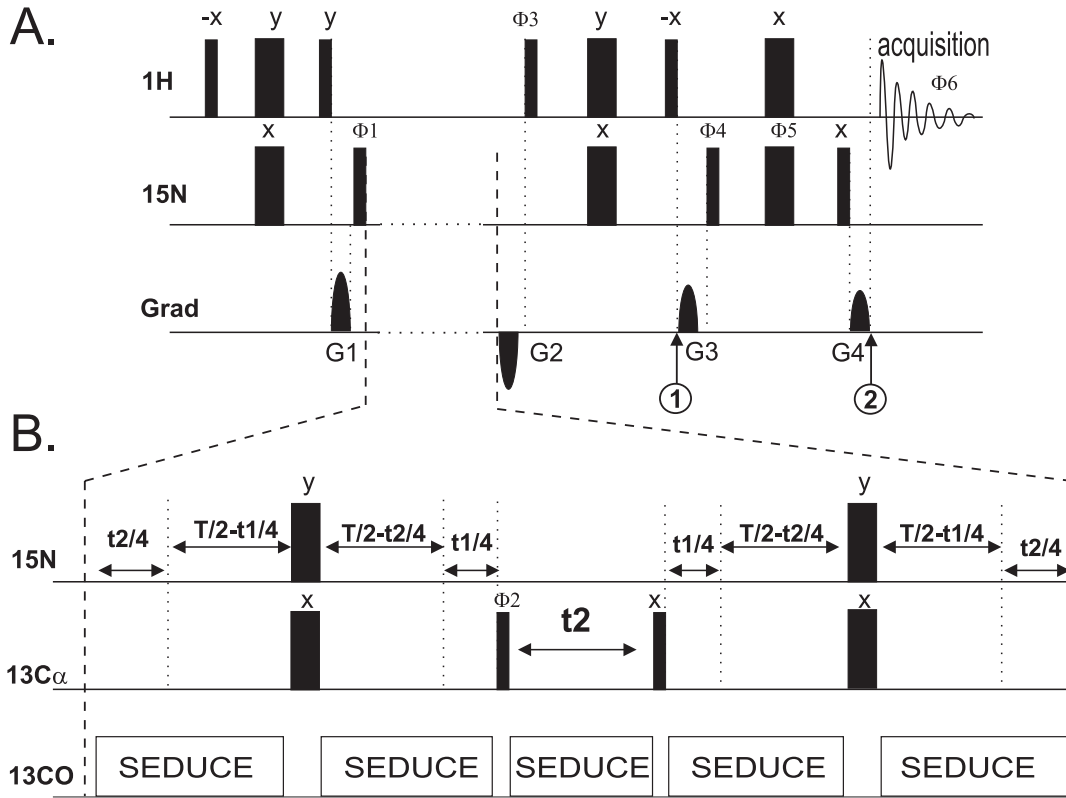


Abbildung 4.3: Pulssequenz eines 2D-TROSY und 3D-TROSY-HNCA Experiments

Die Sequenz eines 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY Experiments (A) kann durch Einfügen eines weiteren Magnetisierungstransfers von  $^{15}\text{N}$  auf  $^{13}\text{C}_\alpha$  und zurück (B) in Verbindung mit einer weiteren Evolutionszeit  $t_2$  zu einer 3D-TROSY-HNCA Sequenz erweitert werden. Die Gradientenstärken werden wie in Abb. 4.2 eingestellt:  $G_1 = -350\text{mT/m}$ ,  $G_2 = 350\text{mT/m}$ ,  $G_3 = -150\text{mT/m}$ ,  $G_4 = -100\text{mT/m}$  (echo) und  $G_1 = 375\text{mT/m}$ ,  $G_2 = -375\text{mT/m}$ ,  $G_3 = -125\text{mT/m}$ ,  $G_4 = -100\text{mT/m}$  (antiecho). Der Phasenzklus lautet:  $\phi_1 = (x, -x)$ ,  $\phi_2 = (8 \times x, 8 \times -x)$ ,  $\phi_3 = y$ ,  $\phi_4 = (y, y, -y, -y)$  und  $\phi_5 = (x, x, y, y, -x, -x, -y, -y)$ . Die Empfängerphase ist  $\phi_6 = (x, -x, -x, x, x, -x, -x, x)$  für das 2D-TROSY und  $\phi_6 = (x, -x, -x, x, x, -x, -x, x, -x, -x, x, x, -x, -x, x, x, -x)$  für das 3D-TROSY-HNCA. Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  IN-EPT Zeitdauer wird auf  $2.7\text{ms}$  und  $T$  auf  $24\text{ms}$  gesetzt. Die Frequenzkodierung in der indirekten  $^{15}\text{N}$  Richtung wird mit Hilfe der Echo/Antiecho Methode erreicht ( $180^\circ$  Phasenverschiebung auf  $\phi_3$  und  $\phi_4$ , zusammen mit den oben beschriebenen Veränderungen der Gradientenstärken). In der indirekten  $^{13}\text{C}$  Richtung wird TPPI auf  $\phi_2$  angewandt. Eine selektive SEDUCE [66] Sequenz dient der Entkopplung der CO-Kerne. Dieses 3D-TROSY-HNCA kann durch Vertauschen der  $\text{C}_\alpha$ - und CO-Frequenzen in ein 3D-TROSY-HNCO verwandelt werden. Die Phasen der Pulse sind so gestaltet, dass ein Zurückklappen der Wassermagnetisierung in die z-Richtung vor der Datenakquisition erreicht wird. "Radiation damping" während der Evolutionszeit wird durch die Gradienten  $G_1/G_4$  unterdrückt. Der  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}_\alpha$ - $^{15}\text{N}$  Einschub ist ähnlich dem in [54] publizierten TROSY-HNCA. In der  $^{15}\text{N}$ -Richtung wird eine Sensitivitätsverbesserung (SE) durch den Erhalt gleichwertiger Kohärenzpfad [67] erreicht.

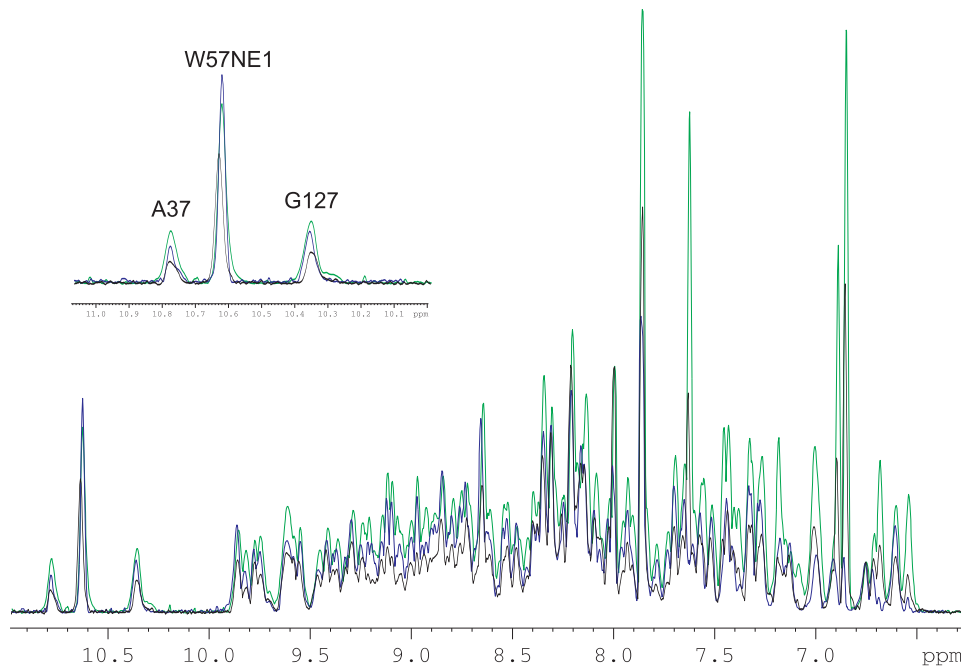


Abbildung 4.4: Sensitivität von HSQC, PFG-SE HSQC und PFG-SE TROSY

Der Vergleich von 1D-Projektionen von HSQC (grün), PFG-SE HSQC (schwarz) und PFG-SE TROSY (blau) zeigt Unterschiede in der Sensitivität der Experimente, wobei eine gewisse Abhängigkeit von der jeweils betrachteten Resonanz auffällt. Das konventionelle HSQC zeigt dabei bei GFP meist die beste Sensitivität, gefolgt von TROSY und PFG-HSQC.

### Vergleich der Sensitivität von HSQC und TROSY

Abbildung 4.4 zeigt einen Vergleich der Sensitivitäten von HSQC [25], PFG-SE HSQC<sup>5</sup> [67] und PFG-SE TROSY (Abb. 4.3). Das konventionelle HSQC bietet dabei bei GFP (27 kDa) meist die beste Sensitivität, insbesondere bei den Seitenketten, die in den TROSY-Experimenten weitgehend unterdrückt werden. Das PFG-SE HSQC lieferte im Durchschnitt die schlechtesten Ergebnisse. Das TROSY Experiment stellt eine Verbesserung gegenüber dem PFG-SE HSQC dar, ist aber immer noch insensitiver als das HSQC. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Meissner et al. [57] an einem 20 kDa Protein bei 750 MHz und von Czisch et al. [69] an einem ca. 30 kDa Protein bei 600 MHz. Fushman und Cowburn [70] konnten zeigen, dass der Winkel zwischen DD- und CSA-Tensor einen deutlichen Einfluss auf die Effektivität der Kompensation von DD- und CSA-Wechselwirkung hat. Dies beeinflusst unter anderem die opti-

<sup>5</sup>“pulsed field gradient and sensitivity enhanced” HSQC, Bruker Pulssequenz *invif3gssi*

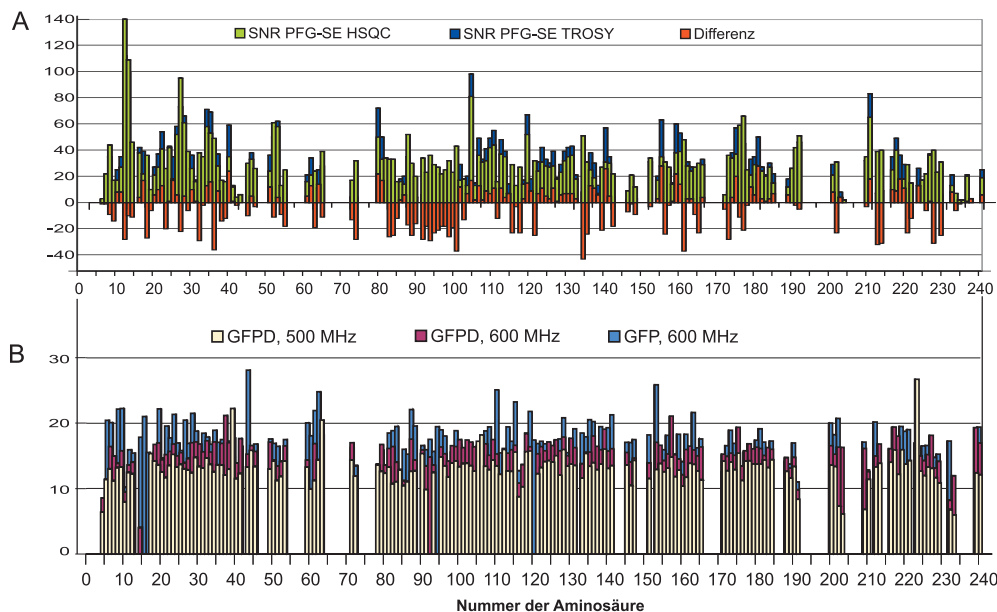


Abbildung 4.5: TROSY Sensitivität und DD-CSA Kreuzkorrelation

A. Unterschiede im Signal-zu-Rauschen Verhältnis von PFG-SE TROSY und PFG-SE HSQC, gemessen an GFPuv bei 600 MHz. Positive Differenzen entsprechen einer Verbesserung bei TROSY gegenüber dem HSQC. B. Verschiedene Messungen der DD-CSA Kreuzkorrelationsraten von GFP. In diesem Fall konnte keine eindeutige Beziehung zwischen der DD-CSA Kreuzkorrelationsrate und der Sensitivität von TROSY festgestellt werden.

male TROSY-Feldstärke. Insgesamt wird durch diesen Effekt eine Abhängigkeit von der lokalen Amidgruppengeometrie eingeführt. Vergleicht man die Sensitivitätsunterschiede von HSQC und TROSY mit der DD-CSA-Kreuzkorrelationsrate  $\varepsilon$  (Abb. 4.5) oder mit dem  $\varepsilon/R_2$ -Verhältnis (siehe Abb. 5.6), so ließ sich für GFP keine eindeutige Abhängigkeit feststellen. Vergleiche der HSQC- und TROSY-Sensitivität bei 750 MHz ergaben ähnliche Resultate. Eventuell spielt hier auch noch die Anisotropie der Rotationsdiffusion eine Rolle, die aber für GFP aufgrund Aggregationseffekten nicht eindeutig bestimmt werden konnte<sup>6</sup>.

Es kann also nicht generell davon ausgegangen werden, dass TROSY-Experimente bei Proteinen dieser Größenordnung eine verbesserte Sensitivität zeigen. Eine Verbesserung der Auflösung der Spektren konnte aber trotz der relativ geringen Feldstärken von 600 MHz beobachtet werden (Abbildung 4.1). Die Ursache für die teilweise geringere Sensitivität von PFG-SE

<sup>6</sup>siehe Kapitel 5.2.4

TROSY und PFG-SE HSQC gegenüber dem konventionellen HSQC dürfte auf die Relaxationseffekte während der doch deutlich längeren Pulssequenzen zurückzuführen sein. Vergleicht man die beiden ungefähr gleich langen Sequenzen von PFG-SE TROSY und PFG-SE HSQC, so kann man aber eine geringfügig bessere Sensitivität von TROSY feststellen. Bei größeren Proteinen und höheren Feldstärken ist jedoch zu erwarten, dass TROSY den konventionellen Experimenten deutlich überlegen ist.

### **Abhängigkeit der Wasserunterdrückung von Stärke und Winkel der Gradienten**

Abbildung 4.6 stellt die Variation der Wasserunterdrückung in Abhängigkeit von der Gradientenstärke dar. Wie erwartet führt eine verstärkte Dephasierung aufgrund stärkerer Gradienten zu einer besseren Wasserunterdrückung. Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen TROSY-Spektren, in denen die Gradienten in verschiedenen Richtungen relativ zum Hauptmagnetfeld angelegt wurden. Dabei wird deutlich, dass die Wasserresonanz (4,7 ppm) ein klares Intensitätsminimum bei Winkeln von  $\Theta \approx 50^\circ$  aufweist. Maximale Intensität der Wassermagnetisierung ergibt sich bei rein transversalen Gradienten. Die große Intensität der Wasserlinie führt zu einem starken Austrahlen der Wasserresonanz, was Resonanzen nahe der Wasserlinie verdecken kann (Abb. 4.8C). Die Ursache hierfür liegt höchstwahrscheinlich in der zylindrischen Probengeometrie, da durch den kleinen transversalen Durchmesser nur eine geringe Gesamtdphasierung erzielt wird. Bei einer aktiven Probenlänge von ca. 1,5 cm und einem Probendurchmesser von 0,5 cm wird bei gleicher Gradientenstärke mit longitudinalen Gradienten eine dreimal stärkere Dephasierung als bei transversalen Gradienten erreicht. Dies würde den Faktor 3 in der beobachteten Wasserintensität erklären.

### **Artefaktunterdrückung durch Gradienten im “magischen Winkel”**

Abbildung 4.9 zeigt die  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Projektionen eines konventionellen 3D-HNCA im Vergleich zu einem 3D-TROSY-HNCA mit Gradienten im magischen Winkel. Aufgrund von Imidazol-Verunreinigungen treten im konventionellen HNCA starke Artefakte durch  $t_1$ -Rauschen auf. Diese werden durch Gradienten im magischen Winkel beseitigt, außerdem erkennt man eine verbesserte Wasserunterdrückung.



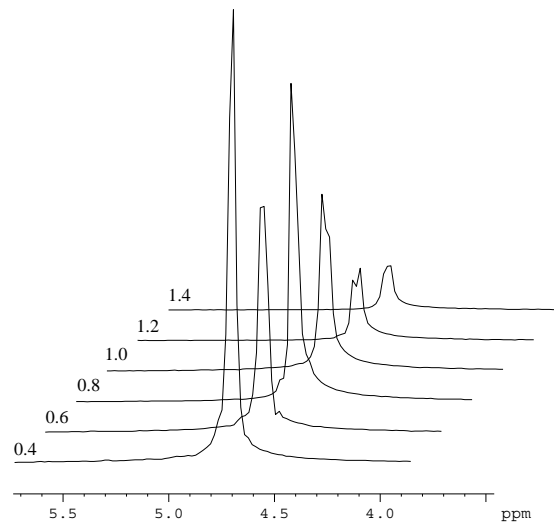


Abbildung 4.6: Wasserunterdrückung und Gradientenstärke

Die Intensität der Wasserresonanz nimmt mit steigender Gradientenstärke ab. Die Gradientenstärke wird relativ zu 375 mT/m angegeben.

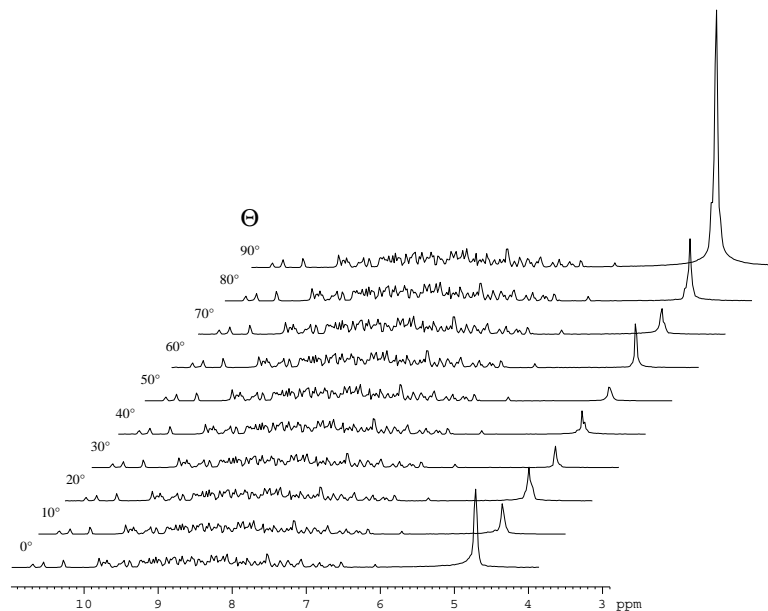


Abbildung 4.7: Wasserunterdrückung und Gradientenwinkel - 1D Spektren

1D-Projektionen von 2D-TROSY Spektren mit verschiedenen Gradientenrichtungen in Bezug auf das Hauptmagnetfeld zeigen deutlich ein Minimum der Wasserresonanz bei Winkeln  $\approx 50^\circ$ .

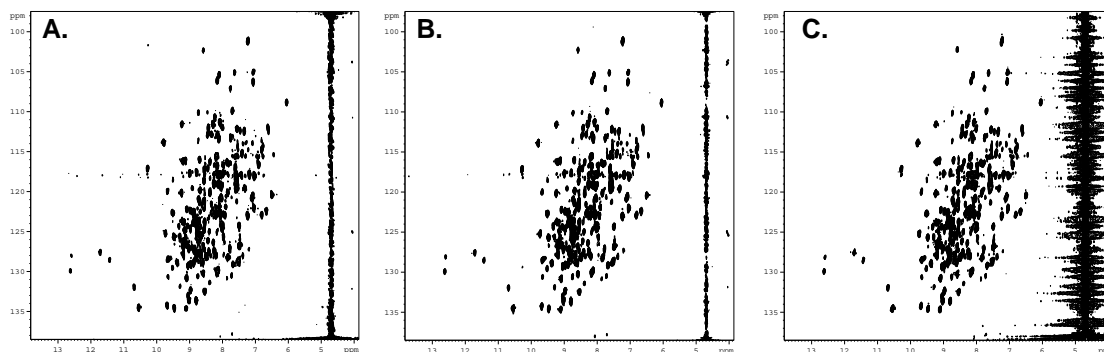


Abbildung 4.8: Wasserunterdrückung und Gradientenwinkel - 2D-Spektren  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY Spektren mit Gradienten parallel zum Hauptmagnetfeld ( $\Theta = 0^\circ$ , A), im magischen Winkel ( $\Theta \approx 50^\circ$ , B) und senkrecht zum Hauptmagnetfeld ( $\Theta = 90^\circ$ , C). Die beste Wasserunterdrückung wird bei Winkeln um den magischen Winkel erreicht.

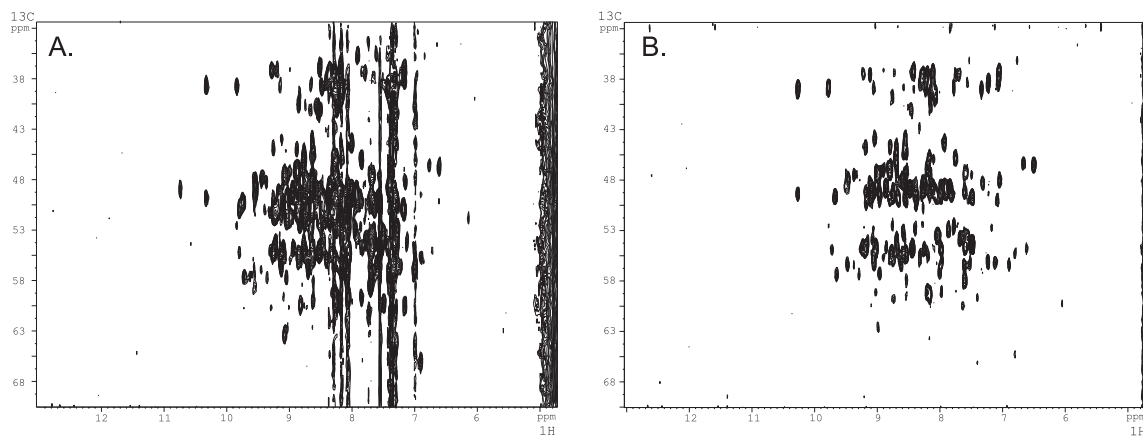


Abbildung 4.9: Artefaktunterdrückung durch Gradienten im "magischen Winkel"  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Projektionen eines konventionellen 3D-HNCA (A) im Vergleich zu einem 3D-TROSY-HNCA (B) mit Gradienten im magischen Winkel zeigen deutlich die Verbesserung der Artefaktunterdrückung.

## 4.5 Diskussion

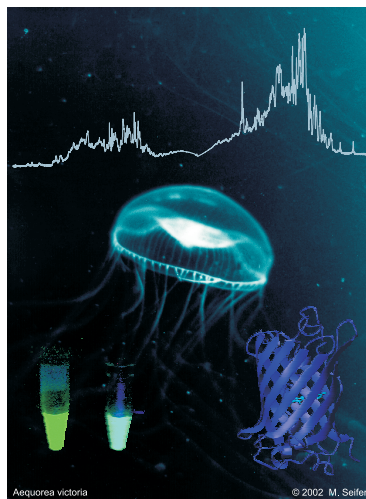
Im Ergebnis wurde festgestellt, dass der TROSY-Ansatz für Proteine in der Größenordnung von 30 kDa und bei Feldstärken im Bereich von 600 MHz bis 750 MHz zwar nur eine geringfügige Verbesserung der Sensitivität gegenüber HSQC-basierten Experimenten aufweist, sich aber die Auflösung der Spektren mittels TROSY deutlich steigern lässt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Gradienten im magischen Winkel deutliche Verbesserungen bezüglich der Wasser- und Artefaktunterdrückung bringt. Dadurch werden weniger Resonanzen von den Artefakten und Ausläufern der Wasserresonanz überlagert.

Umgekehrt bestätigen die Experimente auch, dass intermolekulare Kohärenzen einen grossen Beitrag zur störenden Wassermagnetisierung während der Datenakquisition leisten.



# Kapitel 5

## Grün-fluoreszierendes Protein



## 5.1 Einleitung

### Biologischer Hintergrund

Viele Coelenterata (Hohltiere) wie Quallen, Korallen und Anemonen sind bekannt für ihr vielfältiges Farbspiel. Die Qualle *Aequorea victoria* reagiert auf elektrische oder mechanische Reize mit dem Aufleuchten von grünen Punkten am Rand ihres Schirmes [71]. Dieses Licht wird durch die Wechselwirkung des lichterzeugenden Proteins Aequorin und einem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) erzeugt [72–74]. Durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviertes Aequorin katalysiert die Oxidation eines gebundenen Coelenterazins zu Coelenteramid, welches Licht bei einer Wellenlänge von 470 nm emittiert. In Gegenwart von GFP wird die Energie strahlungslos von dem Lichtemitter in Aequorin auf den Chromophor von GFP übertragen. Der Chromophor von GFP fluoresziert hauptsächlich mit einer Wellenlänge von 508 nm, was genau der Lichtemission der Qualle entspricht [75]. Auch in verwandten Coelenteraten-Gattungen wie der Qualle *Phialidium* und der Koralle *Renilla* finden sich Proteine mit sehr ähnlichen Eigenschaften und Funktionsweisen [76]. Da die Fluoreszenz von GFP keine weiteren prosthetischen Gruppen benötigt, findet GFP vielfache Anwendung als Fusionsprotein in Fluoreszenz-Mikroskopie-Studien. Die Fusion von GFP mit Cyklinen erlaubt z.B. die Untersuchung des Zeitverlaufs der Expression und der Lokalisierung von Cyklinen im Laufe des Zellteilungszyklus [77]. GFP wurde inzwischen in das Genom vieler Pflanzen und Tiere integriert. Damit wurde beispielsweise der retrovirale Gentransfer auf Primaten studiert [78].

### Optische Eigenschaften von GFP

Die optischen Absorptions-, Fluoreszenz- und Fluoreszenzdynamikeigenschaften von GFP werden üblicherweise mit einem Modell erklärt, in dem drei Chromophorzuständen angenommen werden [79–81]: Dabei befindet sich der Chromophor entweder in einem neutralen ( $\text{A-A}^*$ , 395 nm) oder einem anionischen Zustand, wobei der anionische Zustand in einer thermodynamisch instabilen ( $\text{I-I}^*$ , 493 nm) und einer stabilen ( $\text{B-B}^*$ , 475 nm) Form vorliegen kann<sup>1</sup>. Die Dynamik der Fluoreszenz wird durch einen intramolekularen Förster-Zyklus [81, 82] verständlich (siehe Abbildung 5.1): Eine optische Anregung des neutralen Zustands  $\text{A} \rightarrow \text{A}^*$  führt zu einer Deprotonierung des Chromophors. Der daraus resultierende, angeregte anionische Zustand  $\text{I}^*$  kehrt durch Emission von Fluoreszenzstrahlung in seinen Grundzustand I zurück [83]. Protonierung

---

<sup>1</sup>Der Stern (\*) kennzeichnet dabei jeweils eine elektronische Anregung des dazugehörigen Zustandes

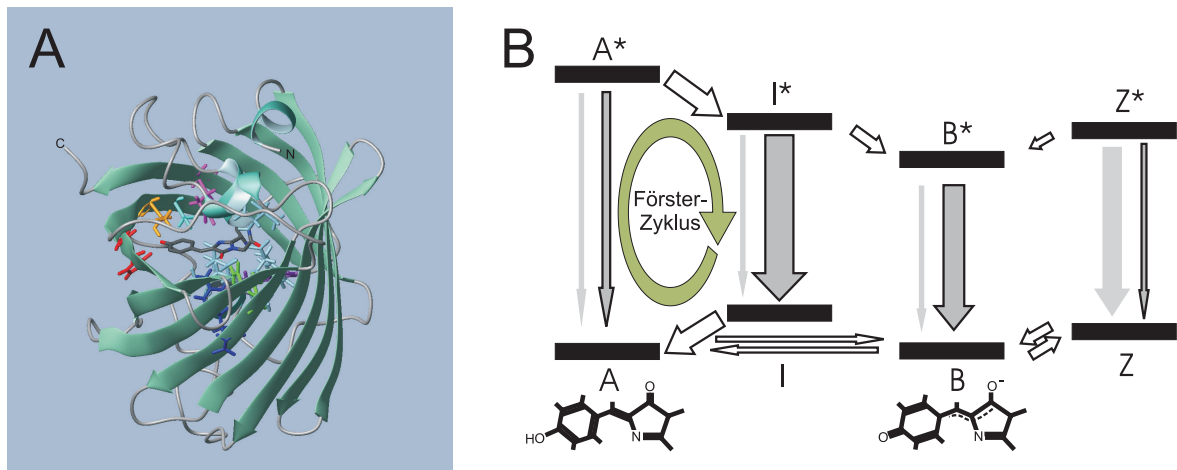


Abbildung 5.1: Struktur von GFP (A) und Energieniveaus des Chromophors (B): Der Chromophor befindet sich im Zentrum eines Zylinders aus 11 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (schwarz). Wichtig für die spektralen Eigenschaften von GFP sind die Aminosäuren W57 (violett), Q94 (grün), R96 (blau), H148 (rot), T203 (orange), S205 (cyan) und E222 (magenta). Das Modell der elektronischen Chromophorzustände geht von 3 (bis 4) Zuständen aus: Neutral (A, A\*), intermediär (I, I\*), anionisch (B, B\*) und eventuell einem weiteren Dunkelzustand (Z, Z\*). Strahlungslose Prozesse sind hellgrau dargestellt, Fluoreszenz-Übergänge dunkelgrau. Der Förster-Zyklus verläuft auf dem Weg  $A \rightarrow A^* \rightarrow I^* \rightarrow I \rightarrow A$ .

von Zustand I führt wieder auf den neutralen Zustand A. Der Übergang von  $I^*$  nach  $B^*$  findet nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit statt, deshalb erreicht nur die Bestrahlung mit intensiven UV-Licht bei GFP eine Umwandlung in den anionischen Zustand B (Photokonversion) [79, 84]. Die Umwandlung ist sehr langlebig, obwohl nicht völlig klar ist, ob sie überhaupt reversibel ist. Röntgenstrukturen von intensiv bestrahltem Wildtyp-GFP legen nahe, dass die Photokonversion auf eine Dekarboxylierung von E222 zurückgeht [85]. Dies steht aber im Widerspruch zu der Beobachtung, dass im Dunkeln eine Relaxation in den ursprünglichen Zustand A stattfindet [79]. Bei Einzelmolekülmessungen an GFP Mutanten konnte das Molekül durch Einstrahlen von bestimmten Lichtwellenlängen zwischen fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zuständen hin- und hergeschaltet werden [86–89]. Diese Beobachtung kann nicht ohne Probleme mit dem üblichen 3-Zustands-Modell erklärt werden und führte zur Postulierung eines sogenannten Dunkelzustands Z [90].

### Struktur von GFP

Die Struktur von Wild-Typ GFP aus *Aequorea victoria* (27 kDa, 238 Aminosäuren) wurde mittels Röntgenkristallographie gelöst [91, 92]. Mit 18 bekannten Strukturen verschiedener GFP Mutanten<sup>2</sup> ist GFP eines der am besten untersuchten Proteine mit einer  $\beta$ -Zylinder Faltung (engl. "β-barrel", siehe Abbildung 5.1): Die Chromophor-tragende, zentrale  $\alpha$ -Helix wird von einem Zylinder umschlossen, der aus 11 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern besteht. Der Chromophor, p-Hydroxy-Benzyliden-Imidazolion, wird bei der Proteinfaltung autokatalytisch durch Zyklisierung und Oxidation aus der Aminosäuresequenz S65-Y66-G67 gebildet [93]. Die Aminosäuren in der Umgebung des Chromophors, vor allem Q94, R96, H148, T203, S205 und E222, spielen eine wichtige Rolle für die optischen Eigenschaften, insbesondere für die Quantenausbeute der Fluoreszenz. Diese Aminosäuren bilden ein enges Wasserstoffbrückennetzwerk mit dem Chromophor. Dieses stabilisiert den Chromophor und sorgt für den Protontransfer, der bei optischer Anregung auftritt. Im allgemeinen werden GFP Mutanten<sup>3</sup> anhand der farbbestimmenden Mutationen in vier Klassen eingeteilt [76]:

- anionisches GFP (EGFP, Mutation S65T, nur eine Fluoreszenzwellenlänge),
- gelb-fluoreszierendes Protein (YFP, Mutation T203HWFY),
- cyan-fluoreszierendes Protein (CFP, Mutation Y66W),
- blau-fluoreszierendes Protein (BFP, Mutation Y66H).

GFP aus *Aequorea victoria* ist nur ein Vertreter einer Reihe von Proteinen mit sehr ähnlicher Struktur. Das rot-fluoreszierende Protein DsRed aus der Koralle *Discosoma* besitzt ebenfalls eine vergleichbare Struktur [94–98]. Auch die nicht-fluoreszierenden Chromoproteine aus der Anemone *Anemonia sulcata* gehören zur GFP-Strukturfamilie. Diese zeigen allerdings eine neuartige Chromophorbildung, bei der das Protein in zwei Fragmente zerfällt [99, 100]. Sogar in völlig anderen Funktionszusammenhängen finden sich Proteine mit ähnlicher Struktur: Das Perlecan-bindende Fragment von Nidogen-1 aus der Maus kann der GFP-Struktur mit einer mittleren Abweichung der  $C_{\alpha}$ -Atome von 2,5Å überlagert werden, obwohl praktisch keine Sequenzhomologie vorliegt [101]. Selbst das verkürzte  $\beta$ -Faltblatt  $\beta_7$  in GFP findet sich in Nidogen-1 wieder.

<sup>2</sup><http://www.rcbs.org>

<sup>3</sup>Anmerkung: In dieser Arbeit wird die genaue Bezeichnung der GFP-Variante, z.B. ECFP, verwendet, wenn die Unterscheidung zu anderen Varianten für die Aussage entscheidend ist. Wird nur die generelle Bezeichnung, z.B. CFP, angegeben, so trifft die gemachte Aussage auf alle zu dieser Gruppe gehörenden Varianten zu.



### Dynamische Prozesse in GFP

Röntgenkristallographie und eine Vielzahl von physikochemischen Methoden lieferten Hinweise auf eine außerordentliche Stabilität der GFP Faltung mit einem starren Chromophor, eingebettet in ein Molekül mit geringer Konformationsflexibilität [102]. Die Stabilität von GFP gegenüber Detergenzien und Proteasen ist sehr hoch [76]. Die Schmelztemperaturen von *Aequorea*, *Renilla* und *Phialidium* GFP liegen bei 78°C, 70°C und 69°C [103]. Dennoch lieferten Studien der UV-Absorption von GFP durch Ward et al. Hinweise auf eine gewisse Flexibilität der Konformation an der Bindungsstelle des Chromophor [104]. Eine Vielzahl von Fluoreszenz-, Kristallographie- und Simulationsstudien beschäftigten sich mit den Beiträgen verschiedener, schneller, dynamischer Prozesse zu den Fluoreszenzeigenschaften von GFP [90, 105–108].

Denaturiertes GFP oder Modellchromophore in Lösung zeigen bei Raumtemperatur keinerlei Fluoreszenz [106, 109]. Werden sie aber in Ethanolglas bei 77K eingefroren entsteht eine starke Fluoreszenz [106]. Dies zeigt deutlich die Bedeutung der Chromophor-Isomerisierung für die Fluoreszenzeigenschaften. Eingebettet im Protein reagiert der Chromophor sehr empfindlich auf Mutationen der umgebenden Aminosäuren [105, 107]. Der Wettstreit zwischen strahlungsloser Photoisomerisierung und Fluoreszenzemission wird als Erklärung für die unterschiedliche Quantenausbeute der Fluoreszenz in den verschiedenen GFP Mutanten herangezogen [105, 110]. Mögliche Isomerisierungswege führen über eine Rotation um die beiden Bindungen, die die beiden Chromophorringe verbinden, oder über einen sogenannten "hula-twist" [90]. Auch Vibrationsbewegungen spielen eine Rolle für die Dynamik des Chromophors [79, 84].

### Vorgehensweise

Bis heute wurde dem Auftreten von langsamen Konformationsänderungen in GFP wenig bis gar keine Aufmerksamkeit geschenkt. Obwohl NMR schon von Prendergast 1999 als besonders wertvolle Methode für die GFP-Forschung vorgeschlagen wurde [81], ist bis heute keine einzige NMR-spektroskopische Studie an GFP veröffentlicht worden. Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben bietet gerade die NMR-Spektroskopie viele Möglichkeiten dynamische Prozesse auf einer breiten Skala von Zeitkonstanten mit einer atomaren Auflösung zu untersuchen. Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der Charakterisierung der Flexibilität des Proteinrückgrats von GFP, der speziellen Rolle des Histidins 148 und der Chromophor-Dynamik in CFP.

Die Flexibilität des Proteinrückgrats wird nach erfolgter  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Signalzuordnung mit Hilfe von  $^{15}\text{N}$  Relaxationsmessungen untersucht. Der Effekt der Mutation H148G wird anhand von

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Spektren und Messungen des heteronuklearen Overhauser-Effekts gezeigt. Da sich die Signalzuordnung des Chromophors in GFPuv mit  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -Methoden als äußerst schwierig herausstellte, wurden  $^{19}\text{F}$ -NMR Methoden benutzt, um den Chromophor in GFP, CFP und YFP zu untersuchen, der entweder aus Tyrosin oder Tryptophan gebildet wird und somit mit dem Isotop  $^{19}\text{F}$  markiert werden kann. Durch diese selektive Markierung wird die Zuordnung der Signale gegenüber  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -Spektren deutlich vereinfacht. Aufgrund des großen Beitrages der paramagnetischen Abschirmung in  $^{19}\text{F}$  ist die  $^{19}\text{F}$  chemische Verschiebung sehr sensitiv auf Veränderung in der lokalen Umgebung, auf van-der-Waals Wechselwirkungen und auf lokale elektrische Felder [111]. Üblicherweise wird von einer geringen sterischen Veränderung aufgrund des Fluoreinbaus ausgegangen [111], obwohl Hinweise existieren, dass der Einbau von Fluor die katalytische Aktivität beeinflussen [112] und geringfügige Änderungen von Seitenkettenkonformationen verursachen kann [113].

$^{19}\text{F}$  Relaxationsmessungen geben Aufschluss über Bewegungsvorgänge in Proteinen [11, 114, 115].  $^{19}\text{F}$  NMR Spektroskopie erlaubt zudem die Untersuchung von Proteinen, die sich aufgrund ihrer Größe ( $30 \text{ kDa} < M < 100 \text{ kDa}$ ) nicht unbedingt für  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Spektroskopie eignen. Die  $^{19}\text{F}$ -NMR wurde bereits für Bindungs- [116] und Faltungsstudien [117, 118] verwendet, und um Konformationsänderungen [111] und lichtinduzierte Strukturänderungen [119] nachzuweisen. Deshalb stellt  $^{19}\text{F}$  NMR das ideale Werkzeug dar, um Konformationsänderungen im Chromophor und seiner Umgebung zu untersuchen.

## 5.2 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ NMR Spektroskopie an GFPuv

### 5.2.1 Methoden, Experimente und Datenanalyse

#### Probenherstellung

Die Methoden zur Herstellung der  $^{15}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}/^2\text{H}$  markierten Proben von GFPuv (Q80R, F99S, M153T, V163A, auch bekannt als "cycle 3" [120]) können in [121] nachgelesen werden. Standardmäßig war das Protein in PBS (115 mM NaCl, 8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) Puffer bei pH 7,3 gelöst.

Die Erzeugung der Mutation H148G in GFPuv erfolgte mit Hilfe des "QuikChange"-Bausatzes zur Mutagenese an spezifischen Stellen. Damit wurde die Punktmutation Histidin 148 zu Glyzin eingeführt. Nach der Herstellung spezieller Mutagenese-Primer für diese Mutation (MWG-DNS) und der PCR-Reaktion wurden die Produkte mit dem Restriktionsenzym Dpn1 (10 U/l) verdaut

(37°C, 1 Stunde) und in kompetente *Epicurian Coli XL1 Blue* Zellen transformiert. Die Inkubation der Transformationsplatten dauerte 16 Stunden bei 37°C. DNS von 8 verschiedenen Kolonien wurde sequenziert, wobei 7 von ihnen die gewünschte Mutation enthielten. Die Expression von GFP<sub>UV</sub> H148G erfolgte in *Escherichia Coli*. Die Expression wurde unter der Kontrolle eines T7 Promoters durchgeführt. Nach der Induktion mit 0,5 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) wurde GFP<sub>UV</sub>, dem 6 Histidine am C-Terminus angehängt worden waren, in BL21DE3 Zellen überexpressiert. Eine 1L-Kultur mit LB-Medium nahm 6 Stunden bei 37°C in Anspruch. Die Zellpaste wurde in 50 ml Lysis-Puffer (300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8) mit 1 mg DNase, 1 mg RNase, 1 mg MgCl<sub>2</sub> und 0,1 M Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF) resuspendiert, mittels Micro-Tip sonifiziert und für 45 Minuten bei 80.000 U/min zentrifugiert. Die Proteinreinigung erfolgte mittels einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätssäule. Ni-NTA Harz (Qiagen) wurde mit dem Überstand eine Stunde lang bei 4°C inkubiert, auf die Säule gegeben und mit 100 ml Lysis Puffer gewaschen. Das Protein wurde mit 20 ml Waschpuffer (300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM Imidazol, pH 8,0) von der Säule gewaschen. Dann wurde das Protein gegen PBS-Puffer (115 mM NaCl, 8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0) dialysiert und mittels einer Centricon 10 (Millipore) bis zu einer Konzentration von 15-20 mg/ml aufkonzentriert. Nach einer Gelfiltration über eine Superdex 75 Säule (Pharmacia) wurde das Protein wiederum bis zu einer Konzentration von 20-25 mg/ml aufkonzentriert.

Die selektiv  $^{15}\text{N}$ -Histidin markierte Probe von GFP<sub>UV</sub> wurde mit Hilfe des *in-vitro* Transkriptions- und Translationssystems (Roche Applied Science) hergestellt. Nach Zentrifugation der Reaktionsmischung wurde eine Gelfiltration (Sephadex G25, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Die Reinigung des Proteins erfolgte mit einer immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) [122] auf einer Ni-NTA Säule. Das Protein wurde einkonzentriert und gegen PBS Puffer (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) dialysiert. Die  $\{\text{FTIVY}\}$ - $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ ,  $\{\text{X}\}$ - $^2\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Probe von GFP<sub>UV</sub> wurde mit der in [123] beschriebenen und an das Protokoll zur Herstellung der deuterierten GFP<sub>UV</sub> Proben [121] angepassten Methodik hergestellt.

### NMR Experimente

Alle  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  NMR wurden an Bruker DRX 500, DRX 600 und DMX 750 Spektrometern durchgeführt. Falls nicht anders angegeben erfolgten die Messungen bei 310K. Die Spektrometer sind jeweils mit 5 mm  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  TXI Tripelresonanz-Probenköpfen mit Dreiachsengradienten (DRX 600, DMX 750) oder z-Gradienten (DRX 500) ausgestattet. Üblicherweise wurden

die Spektren mit Frequenzbreiten von 17.5 ppm für  $^1\text{H}$  und 42 ppm für  $^{15}\text{N}$  aufgenommen. Zur Zuordnung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  Resonanzen wurden die in Anhang A.1 aufgeführten Spektren aufgenommen und analysiert. Die Zuordnung des Protein-Rückgrates basierte dabei hauptsächlich auf HNCA, TROSY-HNCA, HN(CO)CA, HNCO und CBCA(CO)NH Spektren [15]. Da die CBCA(CO)NH Spektren nur ein geringes Signal-zu-Rauschen Verhältnis aufwiesen, wurden ein CBCA(CO)NH und ein HBHA(CACO)NH Spektrum mit Hilfe eines Kryoprobekopfes der Firma Bruker aufgenommen. Die Analyse von 2D-NOESY, 3D-NOESY-HSQC [15] und zahlreichen HSQC Spektren von selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten Proben erleichterte die Zuordnung des Proteinrückgrats. Zahlreiche fehlende Resonanzen erschwerten die Auswertung der 2D-TOCSY und 3D-H(C)CH-TOCSY [15] Spektren. Alle Spektren wurden mit dem Programm XWINNMR 2.6 (Bruker) prozessiert und mit dem Programm SPARKY [124] analysiert.

### **pH Titration und HD Austausch**

Die Beobachtung der spektralen Veränderungen während der pH-Titration und des  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ -Austauschexperiment [35] erfolgte mittels  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Experimenten [25]. Bei der Titration wurde der pH in einer  $^{15}\text{N}$ -markierten GFPuv Probe in PBS-Puffer in Schritten von 0,1 von pH 7,7 auf pH 6,1 reduziert, indem die passende Menge 1%iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$  zugegeben wurde. Bei jedem Schritt wurde der pH-Wert mit einer pH-Elektrode überprüft und ein HSQC-Spektrum aufgenommen.

Bei dem  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ -Austauschexperiment wurde eine  $^{15}\text{N}$ -markierte GFPuv Probe lyophilisiert und danach in 99.996%  $\text{D}_2\text{O}$  aufgelöst. Sofort im Anschluss wurde eine Serie von 16 HSQC-Spektren bei einer konstanten Temperatur von 310K aufgezeichnet. Die Messdauer pro Spektrum betrug dabei eine Stunde. Im folgenden Monat wurde pro Woche ein weiteres Spektrum gemessen. Zum Schluss wurden drei Spektren nach 2, 3 und 5 Monaten gemessen. Zwischen den Messungen wurde die Probe bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert. Amidprotonen, die schon zum Zeitpunkt des ersten Spektrums, d.h. 15 Minuten nach Auflösen des Proteins in  $\text{D}_2\text{O}$ , ausgetauscht waren, werden im folgenden als "schnell" austauschend bezeichnet. Amidprotonen mit Halbwertszeiten im Bereich von Stunden werden als "mittel" schnell austauschend und bei Halbwertszeiten im Bereich von Monaten als "langsam" austauschend bezeichnet. Amidprotonen, die selbst nach fünf Monaten keinen nennenswerten Austausch zeigten, gelten als "sehr langsam" austauschend.

### $^{15}\text{N}$ Relaxationsmessungen

Die Relaxationsparameter  $T_1$  [27],  $T_2$  [31] und heteronuklearer  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE [16] werden zur Ermittlung der Flexibilität des Proteinerückgrats benötigt. Diese Parameter wurden an verschiedenen  $^{15}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ - $^2\text{H}$ -markierten Proben von GFP<sub>UV</sub> gemessen. Die Inversionszeiten bei dem  $T_1$ -Experiment betragen 12,4 ms, 260,4 ms, 508,4 ms, 756,4 ms und 1004,4 ms. Die Echozeiten des  $T_2$ -Experiment waren 20,8 ms, 41,6 ms, 124,8 ms und 166,4 ms. Die Vorsättigung bei dem heteronuklearer  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE Experiment erfolgte mit einer Pulsfolge von  $120^\circ$ -Pulsen im Abstand von 5 ms über eine Zeitdauer von 4,5 s. Die Kreuzkorrelationsrate zwischen DD- und CSA-Wechselwirkung wurde wie beschrieben ermittelt<sup>4</sup>. Die Messung der Relaxationsraten der  $^{15}\text{N}$ -99% $^2\text{H}$ -markierten Probe erfolgte sowohl bei 500 MHz als auch bei 600 MHz. Die Daten wurden hauptsächlich mit Hilfe der Methode der reduzierten spektralen Dichte analysiert. Die dazu verwendeten AWK-Skripte sind in [49] nachzulesen. Die Auswertung mit dem Lipari-Szabo-Modell wurden mit dem Programm TENSORv2 durchgeführt [45]. Die Korrelationszeit der Rotationsdiffusion kann mit Hilfe der Beziehung  $\tau_c = (2\omega_N)^{-1} \sqrt{6T_1/T_2 - 7}$  in strukturierten Abschnitten des Proteins ( $\text{HetNOE} > 0,6$ , keine Anzeichen für Austausch) abgeschätzt werden [125].

### Messungen der Diffusionskonstanten

NMR-Messungen zur Bestimmung der translatorischen Diffusionskonstanten [126] an Proteinlösungen dienen der Untersuchung der Proteinaggregation oder -dimerisierung [127, 128]. Dazu wurde eine modifizierte 1D-WATERGATE-Sequenz [129] verwendet, bei der die Gradientenpulse soweit verstärkt wurden, dass eine messbare Diffusionsabschwächung erreicht wurde. Die Dauer der sinusförmigen Gradienten vor und nach dem selektiven  $180^\circ$ -Puls (WATERGATE-5) betrug  $\delta = 15 \text{ ms}$  ( $\Delta = 17 \text{ ms}$ ). Die Gradientenstärke  $G$  erfolgte mittels 1D-Bildgebung an einer Wasserprobe, in der sich ein 3,5 mm langer Teflonstopfen befand. Der maximale  $b$ -Wert<sup>5</sup> betrug dabei  $b = (\gamma_H G \delta / \pi)^2 [4\Delta - \delta] = 29560 \text{ s/mm}^2$ . Die Diffusionskonstante  $D$  wurde mit einer nichtlinearen Anpassung entsprechend  $\text{Signal} \propto \exp -bD$  ermittelt. Die scheinbare Proteinmasse kann mit der von der Stokes-Einstein-Relation abgeleiteten Formel

$$M = \left( \frac{kT}{6\pi\eta FD} \right)^3 \frac{4\pi N_A}{3(\bar{V}_2 + \kappa\bar{V}_1)} \quad (5.1)$$

<sup>4</sup>siehe Kapitel 3

<sup>5</sup>Herleitung siehe Anhang C.1

berechnet werden [130]. Dabei wurden die Parameter Proteinformfaktor  $F = 1,03$ , Hydratation des Proteins  $\kappa = 0,34$ , spezifisches Proteinvolumen  $\bar{V}_2 = 0,731 \text{ cm}^3/\text{g}$ , spezifisches Wasservolumen  $\bar{V}_1 \approx 1 \text{ m}^3/\text{kg}$  und Viskosität von Wasser im Bereich von 278 K bis 310 K,  $\eta = (1,51 - 6,97) \cdot 10^{-3} \text{ Ns/m}^2$  verwendet.  $k$  bezeichnet die Boltzmannkonstante und  $N_A$  die Avogadrokonstante.

## 5.2.2 Zuordnung der Signale

Abbildung 5.2 zeigt ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Korrelationsspektrum mit der Zuordnung der Resonanzen zu den jeweiligen Amidgruppen. Anhang A.2 listet die chemischen Verschiebungen der Amidgruppen, der  $C\alpha$ - und der Carbonylatome in GFPuv auf. Wie in Abbildung 5.3 veranschaulicht, konnten mittels der Tripelresonanzspektren 80% der Resonanzen den spezifischen Amidgruppen zugeordnet werden. Die Zuordnung der zentralen  $\alpha$ -helix und der  $\beta$ -Faltblätter 7, 8 und 10 konnte nicht vervollständigt werden. Wie später noch dargelegt wird, dürfte die Ursache dafür in der unerwartet langen Korrelationszeit der Rotationsdiffusion ( $\tau_c = 22 \text{ ms}$ ) und dem Vorhandensein von Austauschprozessen zu suchen sein. Die Zuordnung wurde durch die Analyse von mehrdimensionalen NOE-Spektren komplementiert. Dabei erwies sich das bei 750 MHz aufgenommene 3D-NOESY-HSQC der 99% deuterierten,  $^{15}\text{N}$ -markierten Probe von GFPuv als besonders hilfreich. 2D-NOESY Spektren waren meist aufgrund von starkem Signalüberlapp nur schwer zu analysieren. Verwendet man die Markierungsstrategie, wie in [123] beschrieben, so lassen sich mehr Informationen aus den NOESY Spektren extrahieren. Dabei liegen bestimmte, besonders interessante Aminosäuren protoniert vor, während die restlichen Aminosäuren deuteriert und  $^{15}\text{N}$ -markiert werden. Durch Unterdrückung der  $^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäuren mittels eines Isotopenfilters im 2D-NOESY Experiment können die NOE-Kontakte zwischen den interessanten Aminosäuren herausgearbeitet werden, wie in Abbildung 5.4 gezeigt wird. In der GFPuv Probe lagen die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Isoleuzin, Valin und Threonin protoniert vor. Im speziellen Fall von GFP sollte es mit dieser Markierung möglich sein, die NOE Kontakte zum Chromophor zu finden, da dieser selbst aus einem Tyrosin gebildet wird und von Phenylalanin 165, Threonin 203, Tyrosin 145, Valin 61 und 150 umgeben ist.

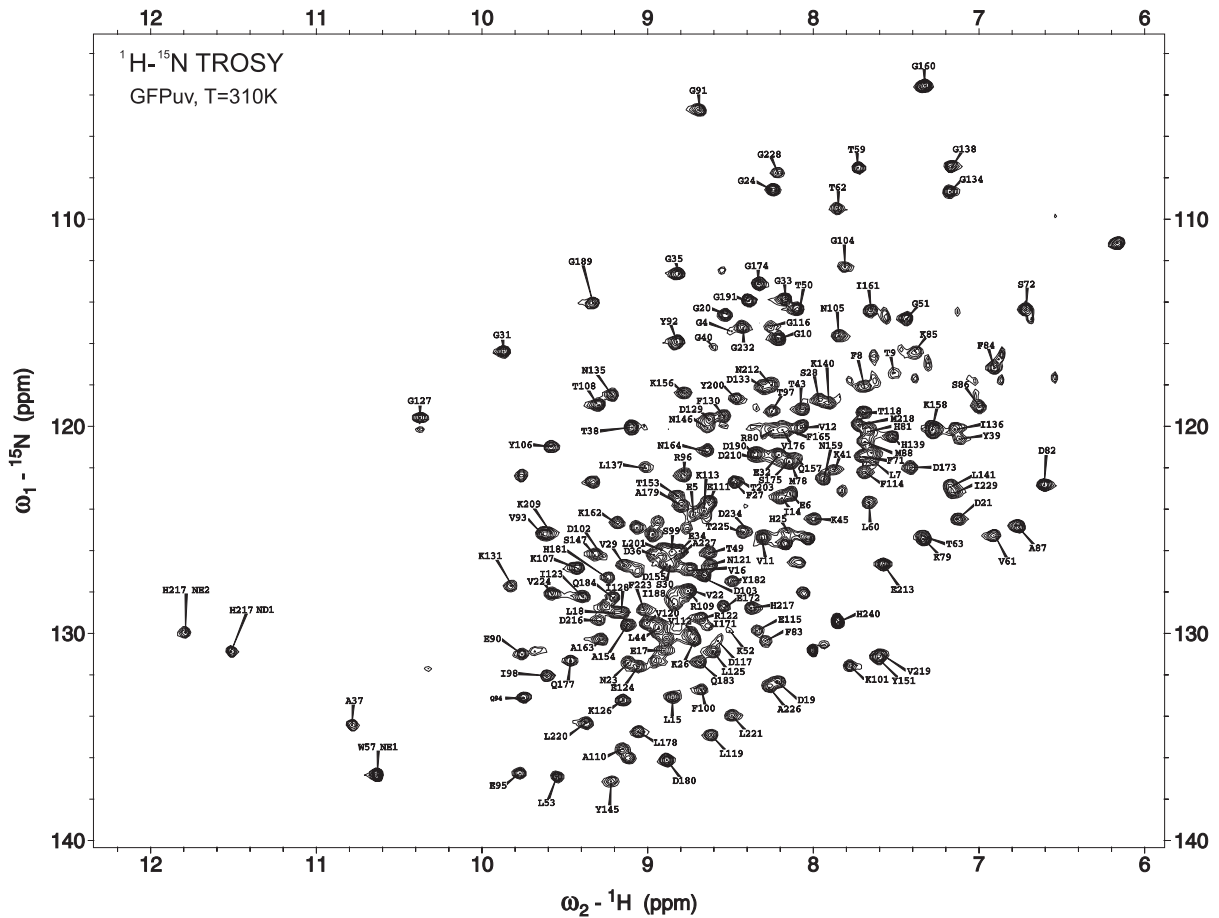


Abbildung 5.2: 2D-TROSY Spektrum von GFPuv mit Signalzuordnung

Das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY Spektrum zeigt die Signalzuordnung von GFPuv bei einer Temperatur von 310K und einem pH-Wert von 7,3. 80% der Amidgruppen des Proteinrückgrates konnten zugeordnet werden.

### 5.2.3 HD-Austausch und pH-Titration

Die pH-Titration<sup>6</sup> zeigte, dass die chemische Verschiebung der Aminosäuren Asp21 - Lys26, Gly40, Gly104, Gly116, Gly127, Gly134, Leu137 - His139, Thr203 und Gly228 - Ile229 eine pH-Abhängigkeit aufweisen. Mit Ausnahme von Thr203, Gly134 und Leu137 - His139 sind alle pH-sensitiven Aminosäuren in Schleifen lokalisiert und dem Lösungsmittel zugewandt. Der Abschnitt von 134 bis 139 gehört zu einer  $\alpha$ -helikalen Struktur, die ebenfalls dem Lösungsmittel zugewandt ist. Thr203 befindet sich in der Umgebung des Chromophors.

Das HD-Austausch-Experiment<sup>7</sup> ergab, dass die  $\beta$ -Faltblätter 1, 3, 11, 4, 5 und 6 einen lang-

<sup>6</sup>siehe Anhang A, Abb. A.1

<sup>7</sup>siehe Anhang A, Abb. A.2 und auch Abb. 5.6 und Abb. 5.11

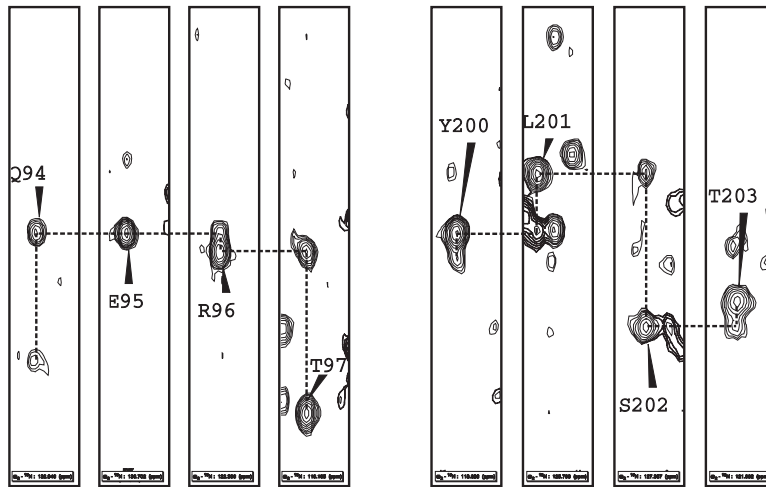


Abbildung 5.3: Sequentielle Zuordnung mit Tripelresonanz-Spektren (HNCA)

Wie hier am Beispiel der Aminosäuresequenzen Q94 bis T97 und Y200 bis T203 in einem HNCA-Spektrum dargestellt, erfolgt die sequentielle Zuordnung in Tripelresonanzspektren durch das Verknüpfen von intra- und interresidualen Resonanzen in verschiedenen Ebenen des Spektrums.

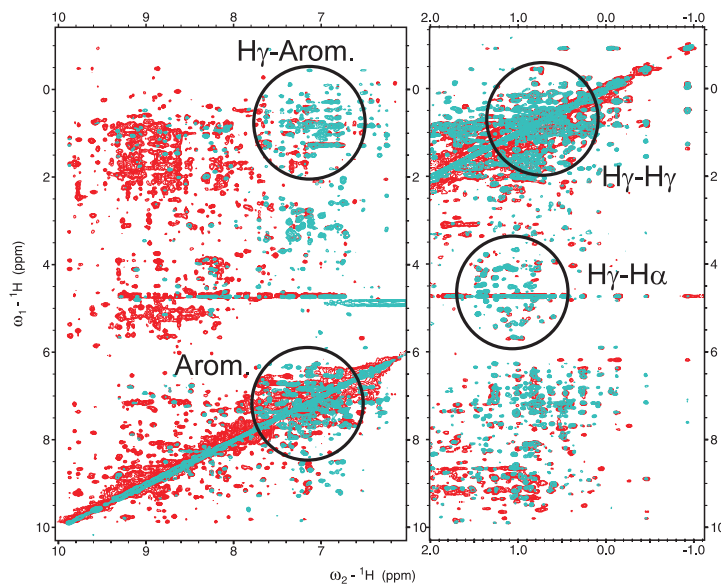


Abbildung 5.4: 2D-NOESY Spektrum der  $\{FTIVY\}$ -<sup>1</sup>H-<sup>14</sup>N,  $\{X\}$ -<sup>2</sup>H-<sup>15</sup>N Probe

Durch die angewandte Markierungsstrategie (cyan) treten im Vergleich zu dem 2D-NOESY Spektrum der 70% deuterierten, <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C markierten Probe (rot) die NOE Kontakte zwischen den H<sub>γ</sub>, H<sub>α</sub>, aromatischen Protonen und Amidprotonen der protonierten Aminosäuren besonders gut zu Tage.



sameren HD-Austausch als die  $\beta$ -Faltblätter 2, 7, 8, 9 und 10 aufweisen. Wie in Abschnitt 3.6 beschrieben ist dies ein Hinweis darauf, dass in den  $\beta$ -Faltblättern 7, 8, 9 und 10 verstärkt langsame Bewegungen auftreten.

## 5.2.4 $^{15}\text{N}$ Relaxation

### Bestimmung der spektralen Dichtefunktion

Die Korrelationszeit der Rotationsdiffusion von GFP<sub>UV</sub> wurde mit  $\tau_c = 22\text{ns}$  bei einer Temperatur von 310 K abgeschätzt. Für ein monomerisches Protein der Größe von GFP (245 Aminosäuren) würde man aufgrund der Stokes-Einstein-Relation eine Gesamtkorrelationszeit von ungefähr  $\tau_c \approx 14\text{ns}$  erwarten. So wurde bei dem Maltose-bindenden Protein (MBP, 370 Aminosäuren) ein  $\tau_c = 17\text{ns}$  (310 K) gemessen [131]. Dies zeigt deutlich, dass GFP nicht in Monomerform in Lösung vorliegt, sondern eher als Dimer oder als Aggregat aus zwei bis drei Monomeren.

Die Ergebnisse für die Relaxationszeiten, für den heteronuklearen Overhauser-Effekt und die Kreuzkorrelationsrate sind in Abbildung 5.5 dargestellt und werden in Anhang A.3 detailliert aufgelistet. Da die aus den Kristallstrukturen bekannten GFP-Dimere stark von einer sphärischen Form abweichen, muss zur Auswertung der Daten mit dem Lipari-Szabo-Modell die Anisotropie der Rotationsdiffusion berücksichtigt werden. Dies geschieht durch die Anpassung des Tensors der Rotationsdiffusion an die experimentellen Daten. Was aber nicht möglich war, da kein Tensor sinnvoll an die gemessenen Daten angepasst werden konnte. Die Annahme eines ungeeigneten Diffusionstensors führt bei dem Lipari-Szabo-Modell sehr leicht zu falschen Austauschbeiträgen. Zieht man in Betracht, dass GFP in Lösung eventuell als unspezifisches Dimer vorliegt, so werden diese Schwierigkeiten erklärbar. Deshalb wurde die Auswertung mit der Methode der reduzierten spektralen Dichte vorgenommen, wie in Kapitel 3 beschrieben. Um das Vorhandensein von Austauschprozessen zu überprüfen, wurden Messungen der Kreuzkorrelationsrate herangezogen.

### Piko- bis Nanosekunden Zeitskala

Abbildung 5.6 zeigt die Zusammenfassung der ermittelten Relaxationsdaten. Die spektrale Dichte ist mit Ausnahme des N- und C-Terminus weitgehend einheitlich. Eine Abnahme von  $J(0)$  zusammen mit einer Zunahme von  $J(\omega)$  und  $J(0.87\omega_H)$  deutet auf eine erhöhte interne Flexibilität hin. Die Werte von  $J(0.87\omega_H)$  können mit Ausnahme des N- und C-Terminus als Null

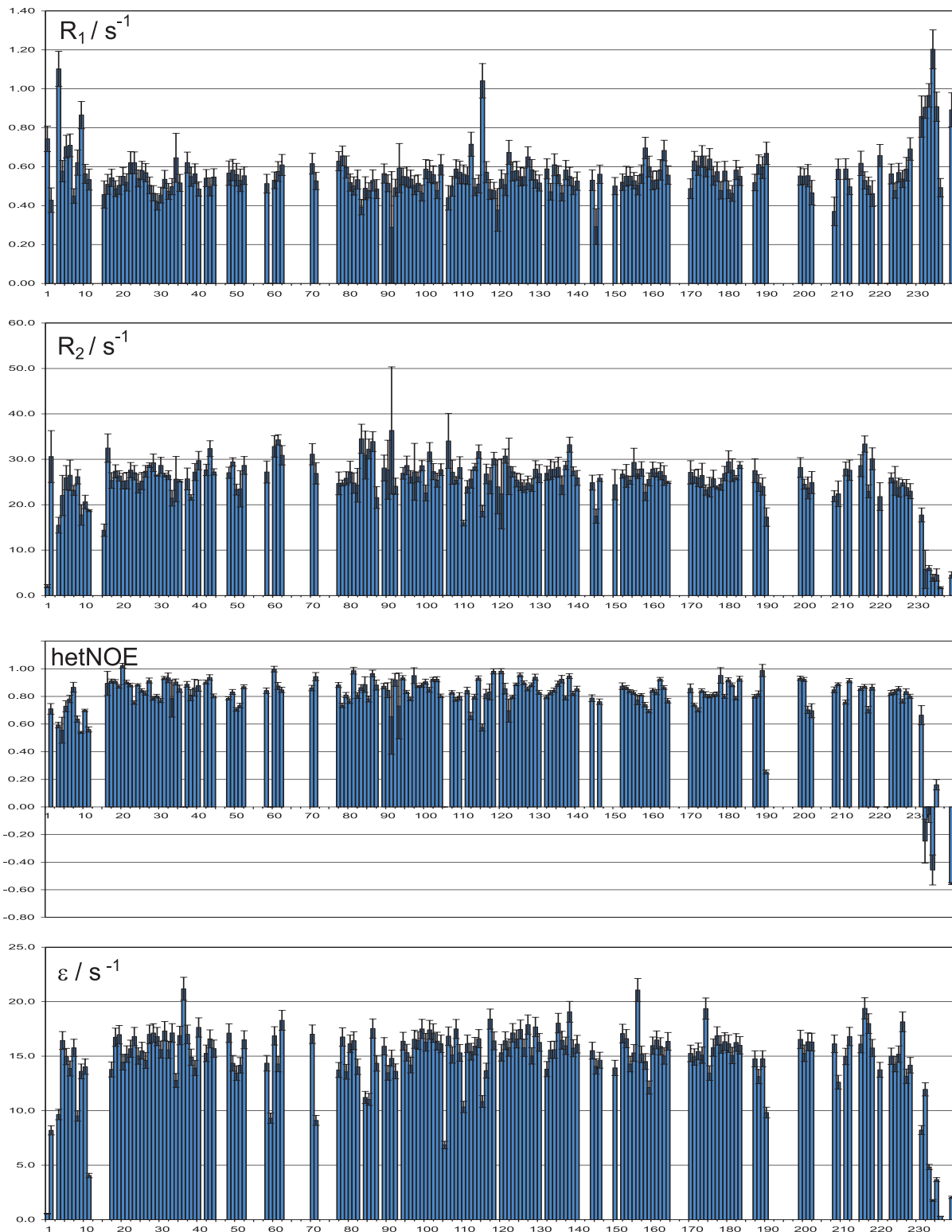


Abbildung 5.5: Relaxationsraten von GFPuv

Die experimentell ermittelten  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsraten  $R_1$ ,  $R_2$ , HetNOE und DD-CSA Kreuzkorrelationsrate  $\epsilon$  von GFPuv (99% deut.) bei 310K sind über der Aminosäurennummer aufgetragen.

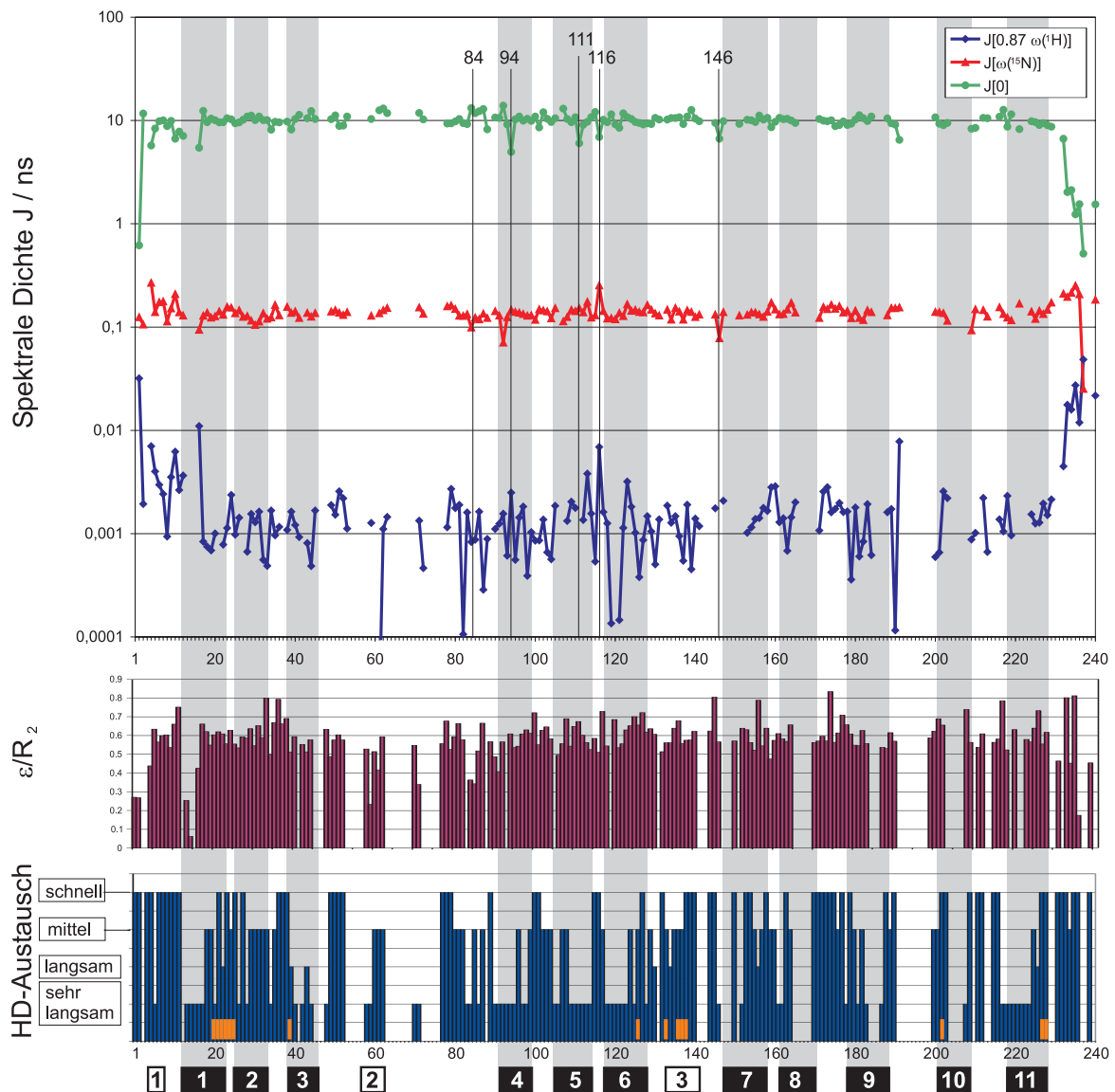


Abbildung 5.6: Spektrale Dichte in GFPuv

Die spektrale Dichte  $J$ , das Verhältnis der Kreuzkorrelationsrate  $\varepsilon$  zur transversalen Relaxationsrate  $R_2$  und das HD-Austauschverhalten werden in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz gezeigt.  $\beta$ -Faltblätter sind mit ausgefüllten Kästen symbolisiert und in den Diagrammen grau hinterlegt.  $\alpha$ -Helizes werden durch nicht ausgefüllte Kästen angedeutet. Die  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helizes werden entsprechend der Aminosäuresequenz nummeriert. pH-sensitive Aminosäuren werden durch rote Kästen im Austauschdiagramm dargestellt. Aminosäuren mit abweichender spektraler Dichte werden durch vertikale Striche gekennzeichnet.

innerhalb der Fehlergrenzen angenommen werden. Außer den Termini, die wie erwartet eine erhöhte Flexibilität zeigen, weichen die Aminosäuren Gln94, Gly116, Asn146 deutlich und Phe84 und Glu111 mit geringer Amplitude vom Verhalten des übrigen Proteinerückgrats ab. Besonders Gly116, das in einer Verbindungsstelle zweier  $\beta$ -Faltblätter lokalisiert ist, weist eine erhöhte Flexibilität auf. Auch Phe84 und Asn146 verbinden zwei  $\beta$ -Faltblätter, was die erhöhte Flexibilität erklärt. Gln94 und Glu111 befinden sich in  $\beta$ -Faltblatt 4 und 5. Insgesamt zeigt sich, dass GFP auf der hier untersuchten Piko- bis Nanosekunden Zeitskala mit Ausnahme der Termini eine geringe Flexibilität aufweist.

### Mikro- bis Millisekunden Zeitskala

Sowohl das Verhältnis der Kreuzkorrelationsrate  $\epsilon$  zur transversalen Relaxationsrate  $R_2$  als auch das HD-Austauschverhalten zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz. In den  $\beta$ -Faltblättern 1, 4, 5, 6 und 11 tritt wie erwartet eine niedrige HD-Austauschrates aufgrund der Bindung der Protonen in Wasserstoffbrücken auf. Wie in Abschnitt 3.6 erklärt deutet ein vom Durchschnitt abweichendes  $\epsilon/R_2$ -Verhältnis auf das Vorhandensein von Austauschprozessen hin. Das  $\epsilon/R_2$ -Verhältnis zeigt in GFP eine umgekehrte Abhängigkeit wie der HD-Austausch: In der Mitte der  $\beta$ -Faltblätter ist das  $\epsilon/R_2$ -Verhältnis geringfügig größer als in den Verbindungsstücken zwischen den  $\beta$ -Faltblättern. Besonders deutlich tritt dieses Verhalten in der  $\alpha$ -Helix 1 auf: Am Rand des Strukturelements geht das  $\epsilon/R_2$ -Verhältnis fast bis auf Null zurück. Diese Helix befindet sich am N-Terminus von GFP und kann dadurch verschiedene Konformationen annehmen.  $\beta$ -Faltblatt 2 weist deutlich erhöhte Austauschraten, aber keine signifikante Abweichung des  $\epsilon/R_2$ -Verhältnisses vom Durchschnitt auf. Allgemein weisen die  $\beta$ -Faltblätter 1, 4, 5, 6 und 11 eine starrere Struktur als der Rest des Proteins auf. Da keine herausragenden Abweichungen der transversalen Relaxationsrate  $R_2$  vom Durchschnitt auftreten, können langsame Austauschbewegungen nicht definitiv nachgewiesen werden. Erhöhte HD-Austauschrates deuten aber auf die Anwesenheit von Austauschprozessen hin.

### 5.2.5 Translatorische Diffusion

Mit Hilfe der gemessenen translatorischen Diffusionskonstanten von GFP<sub>uv</sub> wurden in Abhängigkeit von der Temperatur die in Abbildung 5.7B angegebenen Diffusionskonstanten und scheinbaren Proteinmassen ermittelt. Wie man sieht, ist die scheinbare Masse immer größer als die Masse eines GFP-Monomers (27 kDa) und hängt außerdem stark von der Temperatur ab. Da

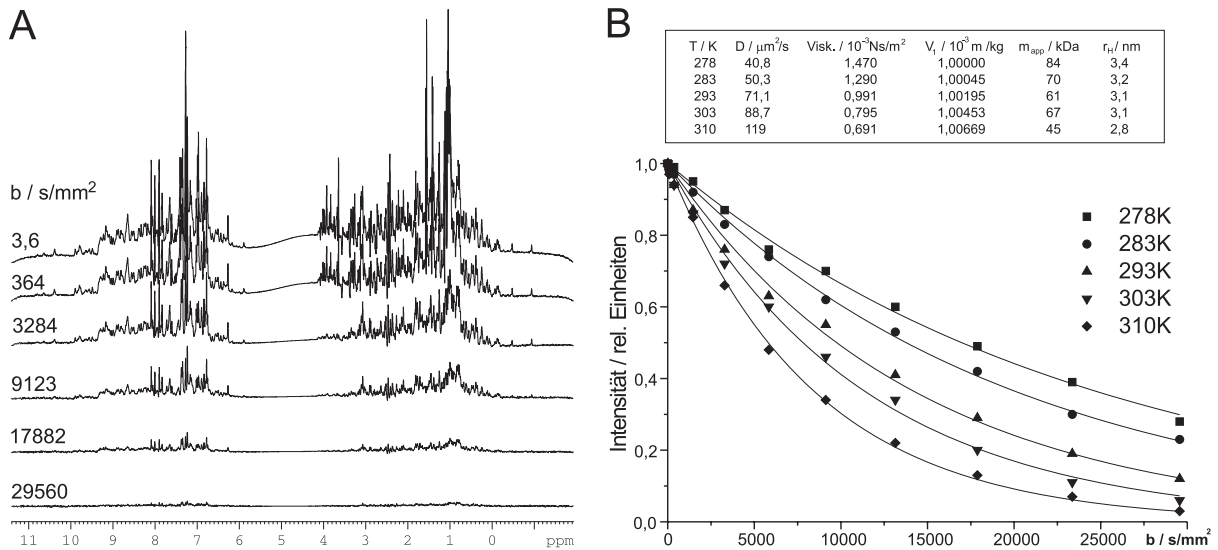


Abbildung 5.7: Diffusionsmessung an GFPuv

A. Diffusionsmessung an GFPuv (99% deut.) bei 310K. B. Mit zunehmender Gradientenstärke nimmt die Intensität der Resonanzen entsprechend  $S \propto \exp(-bD)$  ab. Mit steigender Temperatur nimmt die Diffusionskonstante zu, was zu einer schnelleren Signalabschwächung führt. Die Tabelle fasst die Messergebnisse, die berechneten scheinbaren Proteinmassen  $m_{app}$  und die scheinbaren hydrodynamischen Proteinradien  $r_H$  zusammen.

die Änderung der Viskosität von Wasser mit der Temperatur in der Berechnung berücksichtigt wird, kann diese scheinbare Massenänderung nur durch eine Veränderung des Aggregationszustandes des Proteins verursacht werden. Obwohl der genaue Wert der scheinbaren Masse von den verwendeten Berechnungsparametern abhängt, zeigt dieses Ergebnis, dass GFP in Lösung nicht als Monomer vorliegt und, abhängig von der Temperatur, in verschiedenen Aggregationszuständen vorliegt.

### 5.2.6 Histidin-selektive Markierung

Um die Rolle von Histidin 148 in der Dynamik von GFP zu untersuchen, wurde die selektiv  $^{15}\text{N}$ -Histidin markierte Probe von GFPuv verwendet. Da eine Zuordnung von H148 mittels der Tripelresonanzspektren nicht möglich war, wurde die Mutante GFPuv H148G ebenfalls selektiv  $^{15}\text{N}$ -Histidin markiert. In der Mutante GFPuv H148G fehlen zwei Resonanzen, die wahrscheinlich zwei Konformationen von His148 zugeordnet werden können. Das C-terminale His231 weist ebenfalls mehrere Konformationen auf. Es wurde eine Temperaturvariation von 290K bis 310K

durchgeführt, mit deren Hilfe sich die Resonanzen aufgrund der zur Proteinreinigung verwendeten His-6 Sequenz zuordnen ließen. Eine pH-Titration im Bereich von pH 8,0 bis pH 7,0 zeigte keinerlei Änderung der chemischen Verschiebung der His148 Resonanzen.

### 5.2.7 Die Mutante GFPuv H148G

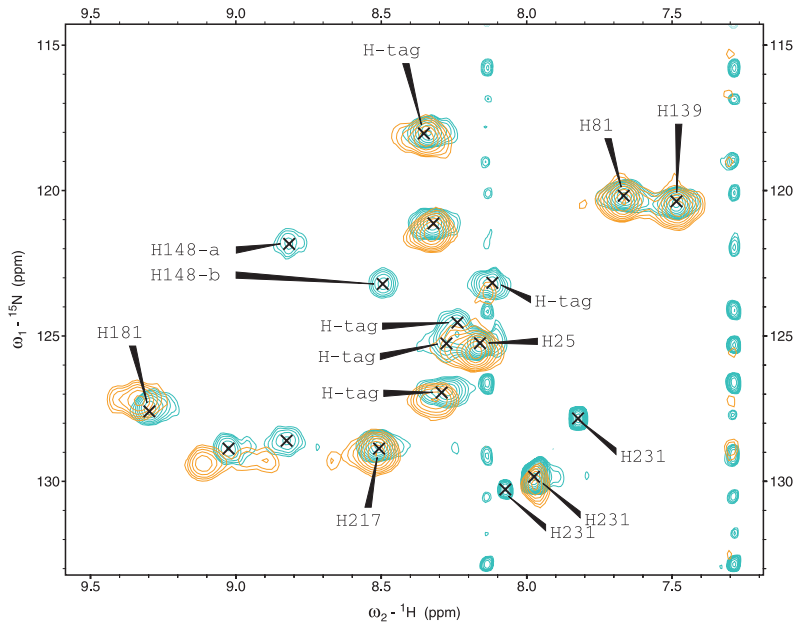
#### UV-Spektroskopie

Abbildung 5.9 zeigt einen Vergleich der UV-VIS Absorptionsspektren von GFPuv und GFPuv H148G. In der Mutante fällt die starke Reduktion der Absorption bei 470 nm auf. Dies lässt entweder den Schluss zu, dass der Zustand B in der Mutante weniger besetzt ist oder dass er schneller wieder in den Grundzustand A zurückfällt.

#### NMR-Spektroskopie

Beim Vergleich der HSQC-Spektren von GFPuv und GFPuv H148G fällt besonders auf, dass manche Resonanzen von GFPuv in der Mutante als doppelte Resonanzen vorliegen (siehe Abb. 5.10). Dies liefert einen Hinweis auf einen langsamen Konformationsaustausch des Proteinrückgrats. Davon sind folgende Aminosäuren mit bekannter Zuordnung betroffen: Thr43, Thr49, Thr59, Thr62, Ser72, Phe83, Thr97, Ile98, Phe100, Phe130, Lys158, Leu178, Tyr182, Thr203, His217, Val224 und Ala226. Der Wert des heteronuklearen NOE war bei den Aminosäuren Gly33, Glu34, Gly40, Lys41, Phe84, Phe100, Gly116, Asn164 und Phe165 deutlich reduziert ( $\approx 0,3$ ). Insgesamt wies die Proteinprobe von GFPuv H148G bei 37 °C auch eine verstärkte Tendenz zum Ausfallen des Proteins auf.

Abbildung 5.11 zeigt eine Darstellung der Aminosäuren, die doppelte Resonanzen aufweisen, in Bezug auf die Struktur von GFPuv. Die betroffenen Aminosäuren sind meist auf einer Seite des Proteins und nahe dem Chromophor konzentriert. Da dies möglicherweise ein Artefakt der nicht vollständigen Zuordnung ist, kann ein allosterischer Effekt nicht ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich ist das ganze Protein von den Veränderungen betroffen. Bekanntermaßen treten in  $\beta$ -Zylinder-Strukturen niederfrequente Bewegungen, das sogenannte Atmen, auf [13, 132]. Die Mutation von Histidin 148 zu Glyzin in GFPuv scheint diese Atmung noch zu verstärken oder zumindest die Zeitskala des Austausches zu verändern. Wachter et al. [94] und Elsiger et al. [95] zeigten, dass die Mutation von Histidin 148 zu Glyzin in YFP den Abstand zu den benachbarten  $\beta$ -Faltblättern in der Nähe der Aminosäuren 148 und 168 vergrößert. Außerdem verlagert sich die Seitenkette von Ile167 an die Stelle, die zuvor von dem Imidazolring von

Abbildung 5.8: HSQC des selektiv  $^{15}\text{N}$ -Histidin markierten GFPuv

HSQC-Spektren von GFPuv (grün) und GFPuv H148G (orange) bei 290K erlauben die Zuordnung von His148. Resonanzen aufgrund der zur Proteinreinigung verwendeten His-6 Sequenz sind mit "His-tag" gekennzeichnet. Das  $t_1$ -Rauschen wird von einer geringen Imidazol-Verunreinigung verursacht.

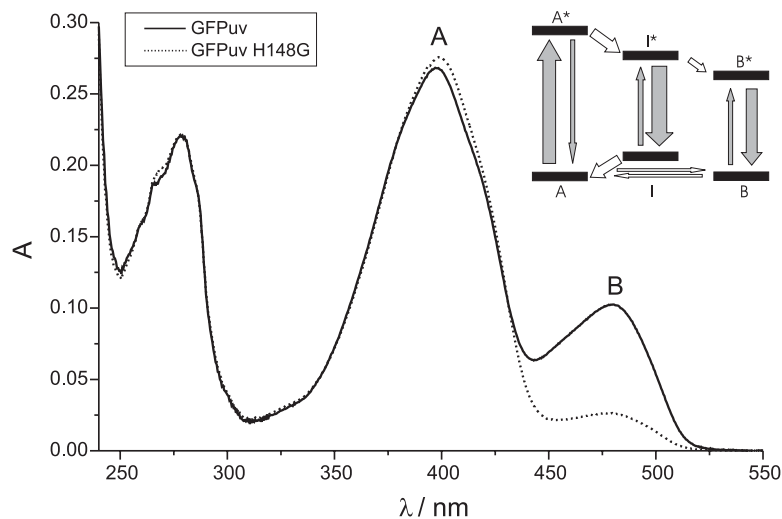


Abbildung 5.9: UV-Spektren von GFPuv und GFPuv H148G

Die Absorption von GFPuv H148G (gestrichelte Linie) bei 470 nm ist gegenüber GFPuv (durchgezogene Linie) deutlich reduziert. Der Einschub zeigt das Modell des Förster-Zyklus zwischen den Zuständen A (390 nm), I und B (470 nm).

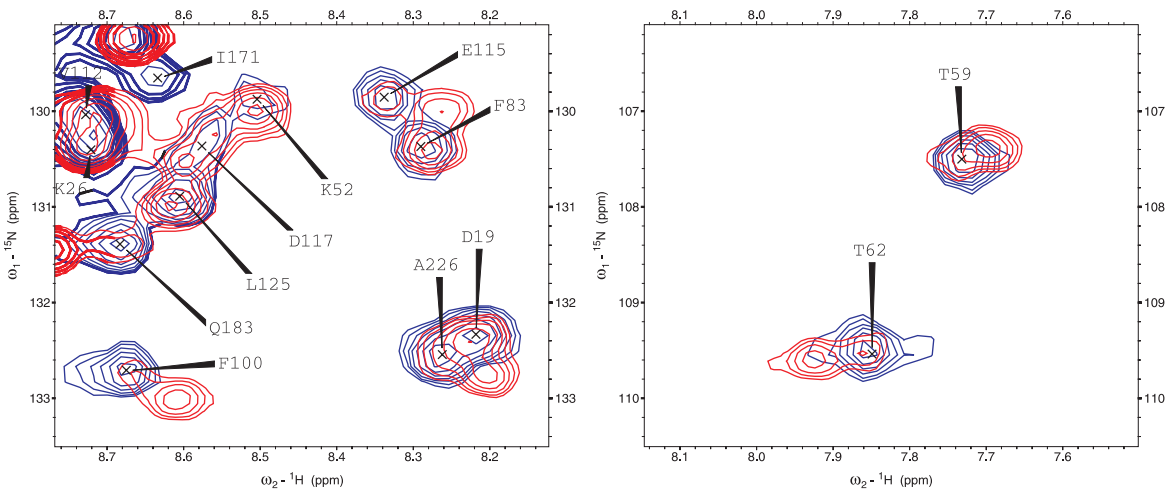


Abbildung 5.10: Ausschnitte der HSQC-Spektren von GFPuv und GFPuv H148G  
Bei verschiedenen Aminosäuren tritt in der Mutante GFPuv H148G eine Verdopplung der Resonanzen auf, die Hinweise auf eine geänderte Dynamik von Konformationsänderungen liefert.

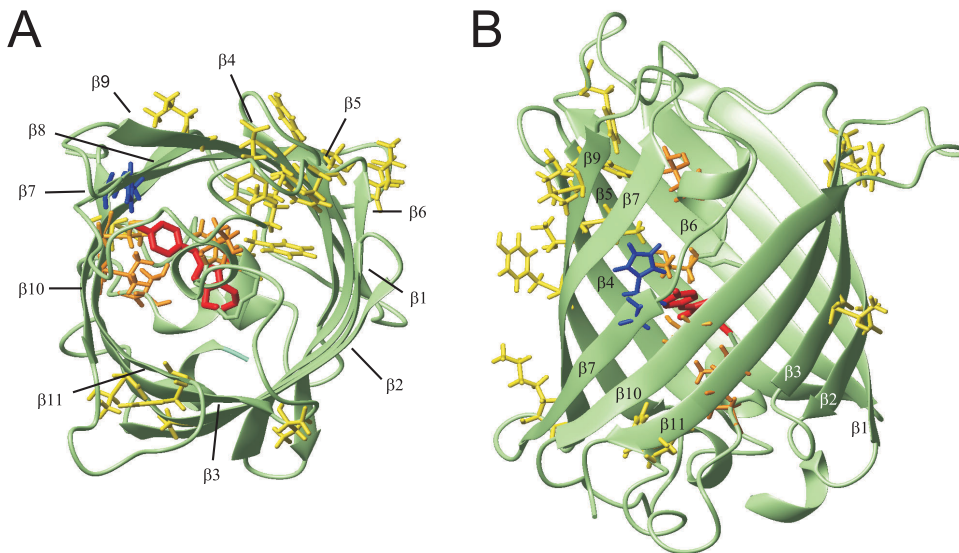


Abbildung 5.11: Resonanzen in GFPuv H148G, die in zwei Zuständen existieren  
Aufsicht (A) und Seitenansicht (B) der GFPuv Struktur. Aminosäuren, die in GFPuv H148G eine Resonanzverdopplung erfahren, sind gelb (in der Zylinderstruktur) und orange (in der zentralen  $\alpha$ -Helix) dargestellt. Der Chromophor wurde mit rot gekennzeichnet. His148 ist blau gezeichnet.



His148 eingenommen wurde. YFP H148G weist zudem zwei größere Hohlräume in der Nähe des Chromophors auf.

Da zur Herstellung der Mutante dasselbe Protokoll wie für die anderen Proben verwendet wurde, ist eine Kontamination mit Verunreinigungen höchst unwahrscheinlich. Die Entfernung der Histidin-Seitenkette erhöht folglich die konformationelle Flexibilität von GFP und ruft zwei Proteinrückgrat-Konformationen hervor, die in langsamen Austausch stehen. Die Reduktion der Absorption von Zustand B in den UV-Spektren kann auf eine weniger effektive Deprotonierung des Chromophors aufgrund des fehlenden Imidazolrings zurückgeführt werden.

## 5.3 <sup>19</sup>F NMR Spektroskopie an EGFP, ECFP und EYFP

### 5.3.1 Methoden, Experimente und Datenanalyse

#### Probenherstellung

Der Einbau der fluorinierten Analoge 4-Fluoro-Trp (4FW), 5-Fluoro-Trp (5FW), 6-Fluoro-Trp (6FW), Ortho-Fluoro-Phenylalanin (OFF) und Meta-Fluoro-Tyrosin (MFY) in die Proteine Clontech GFPuv (F99S, M153T, V163A), Clontech EGFP (F64L, S65T), Clontech ECFP (F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A) und Clontech EYFP (S65G, V68L, S72A, T203Y) erfolgte mit Hilfe der Inkorporation unter selektivem Druck (SPI) [133, 134]. Der Trp-auxotrophe Proteinexpressionswirt *E. coli* ATCC49980 wurde routinemäßig mit zwei Plasmiden kotransformiert: Ampicillin-resistentem pQE-30-PP4, das die GFP, CFP oder YFP Gensequenzen unter der Kontrolle eines T5-Promotors beinhaltet, und Kanamycin-resistentem pREP4 mit dem Repressorgen lacIq. Sowohl die nativen als auch die fluorinierten Proteine wurden mit Ni-NTA Säulen gereinigt. Die Reinheit wurde mit einer SDS-PAGE Gelelektrophorese überprüft. Der quantitative Austausch der Trp-Aminosäuren mit Fluoro-Trp wurde mit Elektrospray-Massenspektroskopie (ESI-MS) verifiziert. Außerdem wurden UV-Absorptionsspektren der Proteine in PBS-Puffer (pH 7,3) aufgenommen. Vor der Akquisition der NMR-Spektren wurden die Proteine gegen bidestilliertes Wasser dialysiert und auf 5-10 mg/ml konzentriert. Den NMR Proben wurde 10% (vol.) D<sub>2</sub>O zugesetzt.

#### UV-VIS Spektroskopie

Zur Aufnahme der UV-VIS Absorptionsspektren wurden die Proteine in 115 mM NaCl, 8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Puffer bei pH 7,3 aufgelöst. Alle Messungen erfolgten mit einem

Perkin-Elmer Lambda 17 UV/VIS Spektrophotometer bei Raumtemperatur. Um die Ergebnisse von EGFP und ECFP vergleichen zu können, wurden die Spektren entsprechend den molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm von  $25850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (CFP) und  $20770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (GFP) skaliert.

### NMR Spektroskopie

Die  $^{19}\text{F}$ -NMR Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 303K an einem Bruker DRX500 Spektrometer durchgeführt, das mit einem dualen  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  Probenkopf ausgestattet war. Die Larmorfrequenz von Fluor betrug 470 MHz. Zur Vermeidung des starken Signalverlust aufgrund des negativen  $\{^1\text{H}\}$ - $^{19}\text{F}$  NOE Verstärkungsfaktors wurde keine Protonenentkopplung verwendet. Wie in Abbildung 5.12B gezeigt, hat dies keine Auswirkung auf die Linienform der Resonanzen. Alle  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektren wurden auf die Resonanzfrequenz einer externen Referenzprobe, bestehend aus 10 mM TFA in 90%  $\text{H}_2\text{O}$ , 10%  $\text{D}_2\text{O}$ , bei einer Temperatur von 303K geeicht. Typische Aufnahmeparameter für  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektren waren: Frequenzbreite 14 kHz, Relaxationszeit von einer Sekunde und 10.000 Mittelungen. Verzerrungen der Basislinie aufgrund einer relativ langen Wartezeit ( $200\mu\text{s}$ ) zwischen Anregung und Beginn der Datenakquisition wurden manuell korrigiert.

Die longitudinale  $^{19}\text{F}$  Relaxationszeit  $T_1$  wurde mit einer 1D "inversion recovery"-Sequenz gemessen. Die Inversionszeiten betragen 0,2 ms, 10 ms, 100 ms, 0,5 s, 1 s und 2 s und die Wartezeit bis zur nächsten Anregungen war 3 s. Der heteronukleare  $\{^1\text{H}\}$ - $^{19}\text{F}$  NOE wurde durch Vergleich von  $^{19}\text{F}$ -Spektren, die mit und ohne Protonenvorsättigung aufgenommen wurden, ermittelt ( $\text{hetNOE} = I_{\text{sat}}/I_{\text{ref}}$ ) [114]. Im allgemeinen wird zur hetNOE-Messung statt der Vorsättigung auf einer bestimmten Frequenz eine breitbandige Entkopplungssequenz verwendet. Wie in Abbildung 5.12A gezeigt wird, ergeben sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Methoden, wie schon von Hull et al. festgestellt wurde [114]. Deshalb konnte die Vorsättigungsmethode verwendet werden, die sich durch eine geringere Probenerhitzung auszeichnet.

Die J-Kopplungskonstanten von Fluoro-Tryptophan wurden in reinen Proben von 4, 5 und 6-Fluoro-Tryptophan gemessen. Die pH-Titration von 4FW CFP und 6FW CFP erfolgte in 50 mM Borat-Puffer bei pH 9,1 mit 100 mM NaCl. Der pH-Wert wurde von pH 9,1 bis auf pH 6,1 durch Beigabe der entsprechenden Menge von 1%iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$  gesenkt. Die  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektren wurden bei pH 9,1, 8,1 und 7,1 aufgenommen. Die Zugabe von Harnstoff und Erhitzen auf  $95^\circ\text{C}$  entfaltete 6FW CFP. An dieser Probe wurde ebenfalls ein  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektrum akquiriert.

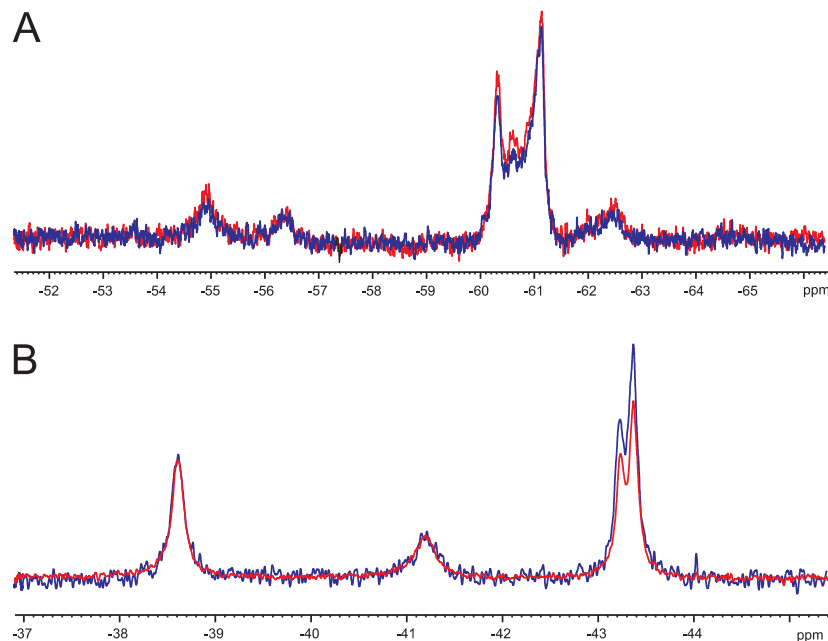


Abbildung 5.12: Protonenentkopplung in  $^{19}\text{F}$ -Spektren

Der negative  $\{^1\text{H}\}$ - $^{19}\text{F}$  NOE Verstärkungsfaktor führt zu einem starken Signalverlust in den  $^{19}\text{F}$ -Spektren, wenn die Protonen gesättigt werden. Das Beispiel von MFY YFP zeigt aber, dass kein signifikanter Unterschied zwischen einer Vorsättigung (1 Sekunde auf die Wasserresonanz, rot) und der Verwendung einer Breitband-Entkopplungssequenz (1 Sekunde GARP, blau) auftritt (A). Am Beispiel von 6FW CFP sieht man deutlich, dass  $^{19}\text{F}$ -Spektren, die mit (16.000 Mittelungen, blau) oder ohne (8.000 Mittelungen, rot) Vorsättigung aufgenommen wurden, keine Veränderungen der Linienform zeigen (B). Auffallend ist der äußerst starke Signalverlust bei der Verwendung der Protonenentkopplung.

Als Maß für die Korrelationszeit der Rotationsdiffusion diente der für GFPuv ermittelte Wert<sup>8</sup>. Der Einfluss der Proteinkonzentration auf die  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektren wurde durch eine Serie von  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektren an verdünnten 6FW ECFP Proben untersucht. Die Spektren wurden mit 8k (Proteinkonzentration 8 mg/ml, 0,3 mM), 16k (4 mg/ml, 0,16 mM), 32k (2 mg/ml, 0,08 mM), 64k (1 mg/ml, 0,04 mM) und 128k Mittelungen (0,5 mg/ml, 0,02 mM) aufgenommen.

### Datenanalyse

Eine monoexponentielle Funktion wurde an die  $T_1$ -Daten angepasst [114]. Die Anpassung erfolgte mit dem Levenberg-Marquardt Algorithmus. Die Linienintegrale und die Linienbreiten berechnen sich aus den Parametern der Anpassung von Lorentzfunktionen. Die Zustandspopulationen und Austauschraten des Chromphors wurden für Resonanzen von Trp66 (W66) an der

<sup>8</sup>siehe Abschnitt 5.2.4

6FW CFP Probe bei den gemessenen Temperaturen sowohl mittels McConnell-Gleichungen (Gl. 2.8) [20] entsprechend der CBS-Methode<sup>9</sup> als auch durch Anpassen von Lorentzfunktionen ermittelt. Im Grenzfall von langsamen Austausch erlaubt die CBS-Methode die gleichzeitige Ermittlung der Population, der Raten und der transversalen Relaxationszeit  $T_2$  ohne Austausch. Deshalb hat die instrumentelle Magnetfeldinhomogenität keine Auswirkung auf die Ergebnisse. Dabei lag die Annahme zugrunde, dass die transversale Relaxationszeit  $T_2$  für beide Zustände gleich ist. Dabei stellte sich heraus, dass  $T_2$  für die ermittelten Raten und Populationen keine Rolle spielt, solange sie nicht unrealistisch lang gesetzt wird. Die Vernachlässigung der  $T_2$ -Terme in Gleichung 2.8 hatte ebenfalls keinen systematischen Einfluss auf die Ergebnisse. Um dies sicherzustellen, wurden die Ergebnisse mit den Ergebnissen aus der Lorentz-Anpassung verifiziert. Die Gleichgewichtskonstante ergibt sich dabei aus  $\bar{K} = k_B/k_A = p_A/p_B$ . Die freie Energie  $\Delta G_0$ , die Enthalpie  $\Delta H_0$  und Entropie  $\Delta S_0$  wurden durch Anpassung der Arrhenius-Beziehung  $\bar{K} = \exp[-(\Delta H_0 - T\Delta S_0)/RT]$  berechnet, wobei  $\Delta G_0 = \Delta H_0 - T\Delta S_0$  [21]. Die Aktivierungsenergie des Austauschprozesses wurde mit der Beziehung  $\Delta G_{act}^{A,B} = aT[10,319 + \log(T/k_{A,B})]$ ,  $a = 19,14 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  abgeschätzt, die aus der Eyring-Gleichung abgeleitet wurde [21].

### 5.3.2 Vergleich verschiedener Markierungsstrategien

Für die Ermittlung der optimalen Markierungsstrategie wurden die Proben von GFP verglichen, die mit fluoriniertem Tryptophan, Phenylalanin oder Tyrosin markiert waren. (Abb. 5.13 und Abb. 5.14). In den Meta-Fluoro-Tyrosin GFPuv und YFP Proben ist auch der Chromophor mit Fluor markiert. Bei Betrachtung von Abbildung 5.14 wird deutlich, dass eine Zuordnung in diesen Spektren nicht möglich ist, da die Spektren zu viele Unterschiede aufweisen. Darüber hinaus enthält GFP neben dem Chromophor zehn weitere und YFP sogar elf weitere Tyrosine. Der daraus resultierende Signalüberlapp in den  $^{19}\text{F}$ -Spektren erschwert eine Zuordnung. Die hetNOE-Experimente an den Meta-Fluoro-Tyrosin GFPuv und YFP Proben zeigten aber, dass sich flexible Aminosäuren durch eine geringere Signalreduktion bei Protonenvorsättigung auszeichnen<sup>10</sup>. Wenig flexible Aminosäuren weisen einen NOE Verstärkungsfaktor  $f \approx -1$  auf, was einer kompletten Signalauslöschung entspricht, während  $f > -1$  für flexible Aminosäuren typisch ist.

<sup>9</sup>siehe Abschnitt 3.6

<sup>10</sup>vgl. dazu die Simulation der  $^{19}\text{F}$ -Relaxation in Abb. 5.20

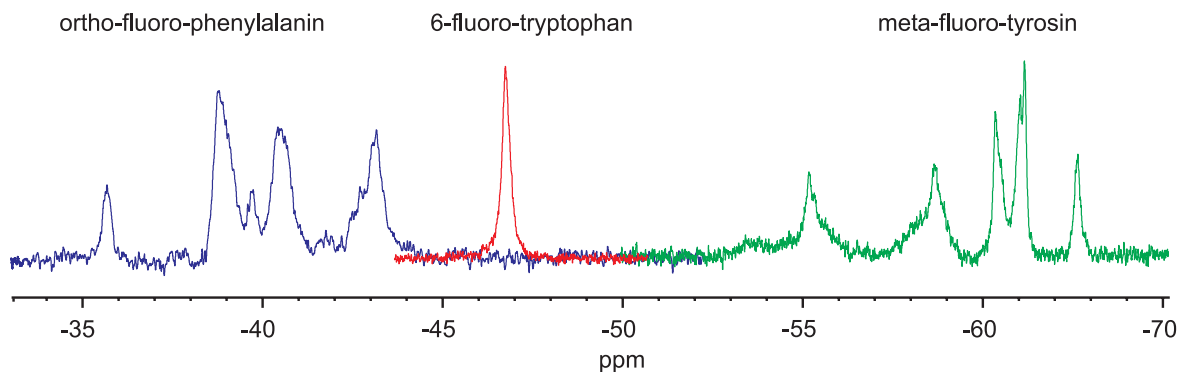


Abbildung 5.13:  $^{19}\text{F}$ -Spektren von OFF, 6FW und MFY markiertem GFPuv  
 Die  $^{19}\text{F}$ -Spektren zeigen deutlich die grosse Dispersion der  $^{19}\text{F}$  chemischen Verschiebung. Die entsprechenden Protonenresonanzen sind in eindimensionalen  $^1\text{H}$ -Spektren kaum zu trennen.

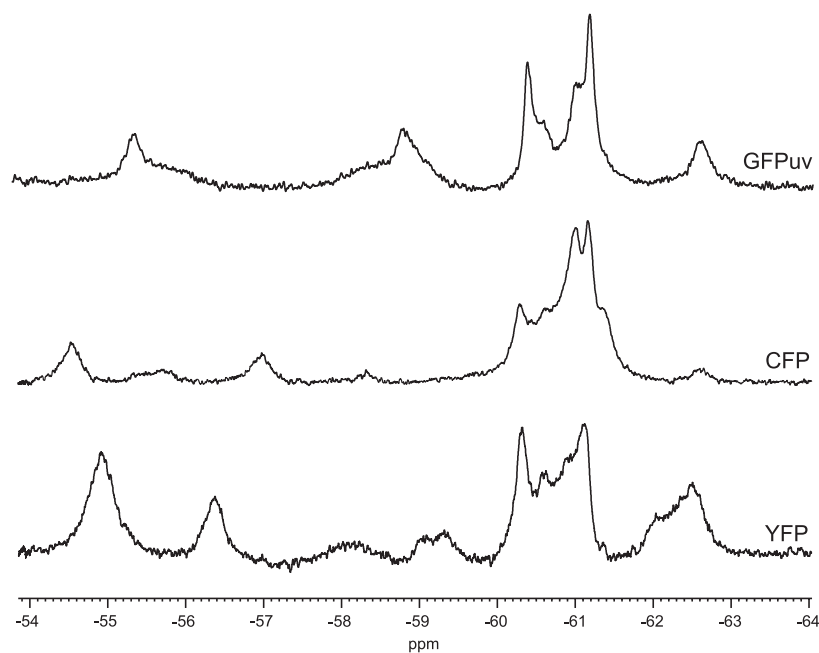


Abbildung 5.14:  $^{19}\text{F}$ -Spektren von MFY markiertem GFP, CFP und YFP  
 Die  $^{19}\text{F}$ -Spektren von MFY markiertem GFP, CFP und YFP, die jeweils 10, 9 und 11 weitere Tyrosine neben dem Chromophor enthalten, zeigen immer noch ein nicht unerhebliches Ausmass an Signalüberlappung. Auch die chemische Verschiebung der einzelnen Resonanzen weist deutliche Unterschiede in den verschiedenen Proben auf. Mittels der hetNOE Experimente konnten die Resonanzen im Bereich von 60 ppm bis 61,5 ppm flexiblen Aminosäuren zugeordnet werden, die höchstwahrscheinlich an der Aussenseite der GFP-Struktur liegen.

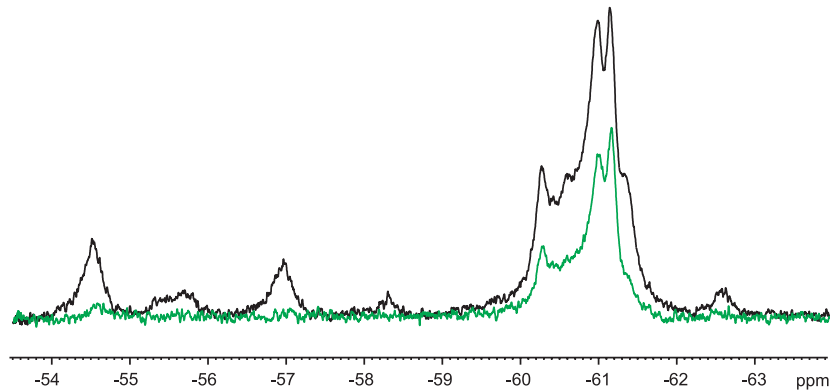


Abbildung 5.15: Identifizierung der flexiblen Aminosäuren

Flexible Aminosäuren treten in hetNOE Experimente aufgrund der geringeren Signalreduktion hervor. Dies wird hier am Beispiel von MFY CFP veranschaulicht. Das Spektrum ohne Protonenvorsättigung ist schwarz dargestellt, das mit Protonenvorsättigung grün.

Da eine Zuordnung der Chromophorresonanz in den GFP und YFP Proben nicht möglich war, wurde im weiteren die GFP-Variante CFP verwendet, deren Chromophor aus einem Tryptophan gebildet wird und nur ein weiteres Tryptophan enthält, also insgesamt zwei Resonanzen zuzuordnen sind.

### 5.3.3 Fluoro-Tryptophan markiertes EGFP und ECFP

#### UV Spektroskopie

Die UV-Absorptionsspektren (Abb. 5.16) von EGFP und ECFP zeigen, dass in EGFP nur der anionische Zustand des Chromophors bei 488 nm vorliegt. Im Spektrum von ECFP fällt die Aufspaltung in zwei, bei 434 nm und 452 nm absorbierende, Zustände auf. In Fluoreszenzspektren sind ebenfalls zwei Emissionswellenlängen sichtbar. Die Tatsache, dass CFP zwei Zustände aufweist, ist schon länger bekannt [76], die Ursache dafür wurde aber bis heute noch nicht näher untersucht.

#### J-Kopplung in Fluoro-Tryptophanen

Die  $^{19}\text{F}$ -Resonanzen von ungebundenem 4-Fluoro-Tryptophan spaltet in ein Quartett auf ( $^3J_{FH} = 12\text{Hz}$ ,  $^5J_{FH} = 4,6\text{Hz}$ ), während die Resonanzen von ungebundenem 5- and 6-Fluoro-Tryptophan

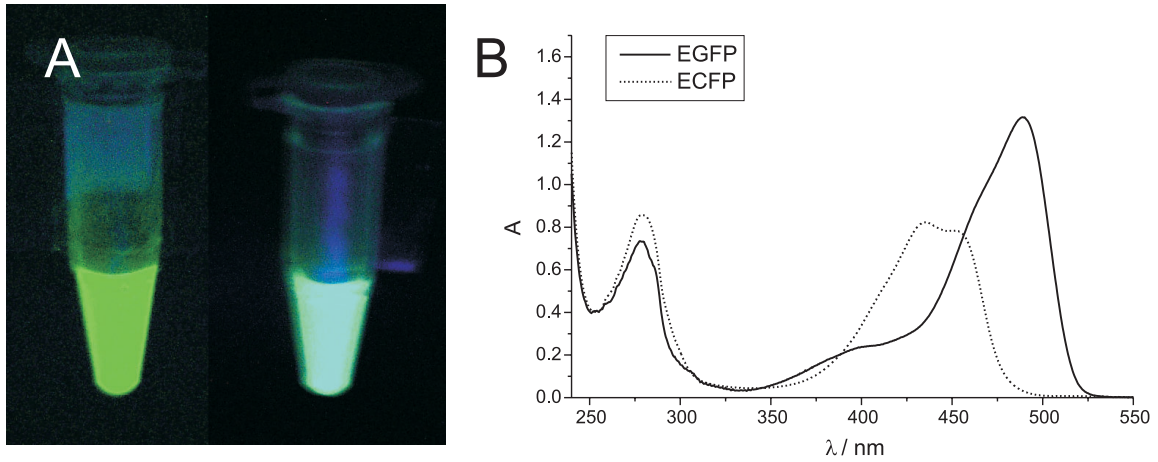


Abbildung 5.16: Fluoreszenz und UV-Spektren von GFP und CFP

A. Fluoreszenz von EGFP (links) und ECFP (rechts) bei Bestrahlung mit UV-Licht. B. UV-Absorptionsspektren von EGFP (durchgezogene Linie) und ECFP (gestrichelte Linie). Die Absorption von EGFP hat ein Maximum bei 488 nm, die ECFP Absorption bei 434 nm und 452 nm.

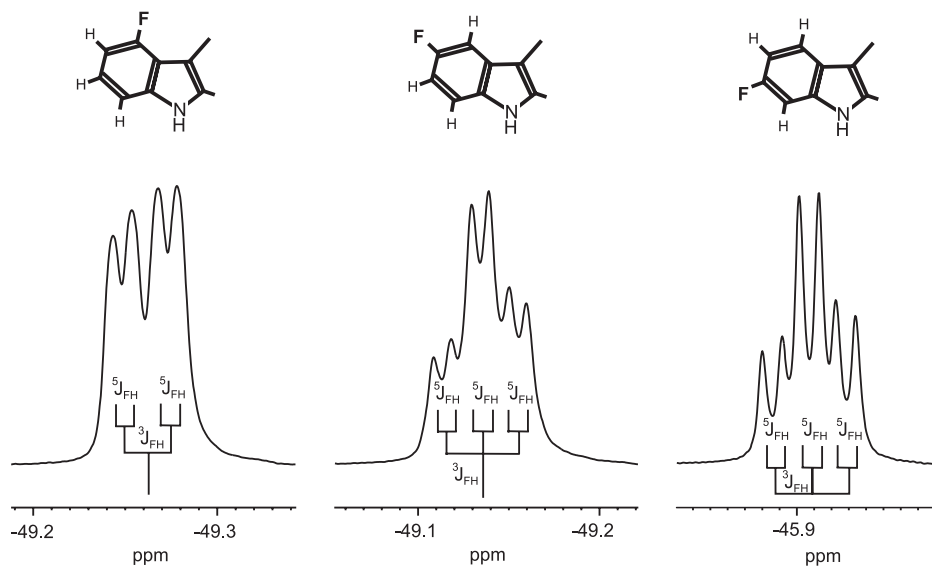


Abbildung 5.17: J-Kopplung in Fluorotryptophanen

Aufgrund der  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  J-Kopplung in den aromatischen Ringen spaltet die  $^{19}\text{F}$ -Resonanz von 4-Fluorotryptophan (links) in ein Quartett, die von 5- (Mitte) und 6-fluoro-Tryptophan (rechts) in ein Sextett auf.

eine Sextett-Struktur aufweisen ( ${}^3J_{FH} = 11\text{Hz}$ ,  ${}^5J_{FH} = 5,5\text{Hz}$ ). In den wesentlich breiteren Signalen der an ein Protein gebundenen Fluoro-Tryptophane sind derartige Aufspaltungen nicht mehr sichtbar.

### Signalzuordnung

Die  ${}^{19}\text{F}$  NMR Spektren von ECFP und EGFP, die mit 4-, 5-, oder 6-Fluoro-Tryptophan markiert wurden, zeigen doppelt so viele Resonanzen wie erwartet (Abb. 5.18): CFP enthält zwei Tryptophane, W57 und im Chromophor W66, dagegen hat GFP nur ein Tryptophan, W57. In den Spektren sind aber vier bzw. zwei Resonanzen sichtbar, d.h. jedes Tryptophan liegt in zwei Zuständen vor. Die mehr und weniger besetzten Zustände werden im folgenden mit A und B gekennzeichnet.

Die Resonanzen in den Spektren von 4FW und 6FW ECFP können durch den Vergleich mit den entsprechenden EGFP Spektren eindeutig zugeordnet werden. Die Zuordnung in dem 5FW ECFP gestaltet sich komplizierter, da keine zweite Resonanz in dem Spektrum von 5FW EGFP sichtbar ist. Deshalb wurde auf die Integrale der Resonanzen (Tabelle 5.1) zurückgegriffen. Da W66 und W57 in einem 1:1-Verhältnis in das Protein eingebaut werden, muss die Summe der Integrale über beide Zustände sowohl für W57 als auch für W66 denselben Wert ergeben. Resonanzen, die mit dieser Methode zugeordnet wurden, sind in Tabelle 5.1 mit einem Stern gekennzeichnet. Das Verhältnis der Integrale der Zustände A und B von W57 und W66 ist konsistent bei der 4FW und 5FW ECFP Probe ( $W66_A:W66_B = 0,3$  und  $W57_A:W57_B = 0,2$ ). In 6FW ECFP ergeben sich Verhältnisse von  $W66_A:W66_B = 0,6$  und  $W57_A:W57_B = 0,6$ . Dieser Unterschied könnte von einer speziellen Wechselwirkung von 6-Fluoro-Tryptophan mit umgebenden Aminosäuren herrühren. Da eine Kohlenstoff-Fluor-Bindung eine umgekehrte Ladungsverteilung wie eine Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung aufweist, könnte der Einbau von Fluoro-Tryptophan die Dynamik der betreffenden Seitenkette durch eine Veränderung des Dipolmoments beeinflussen. Diese Möglichkeit wird im Zusammenhang mit dem CFP Strukturmodell diskutiert werden.

Der Unterschied der chemischen Verschiebung der beiden Chromophorzustände  $W66_A$  und  $W66_B$  beträgt 2,6 ppm in den Spektren von 4FW und 6FW ECFP. Die  ${}^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 4FW und 6FW GFPuv (siehe Abb. 5.13) weisen keine doppelten Resonanzen auf, was auf eine veränderte Zeitskala des Austausches schließen lässt. Die unterschiedliche Verbreiterung der Chromophorresonanzen  $W66_A$  und  $W66_B$  gibt einen ersten deutlichen Hinweis auf das Vorhandensein eines langsamen Austauschprozesses zwischen den beiden Zuständen. Um dies



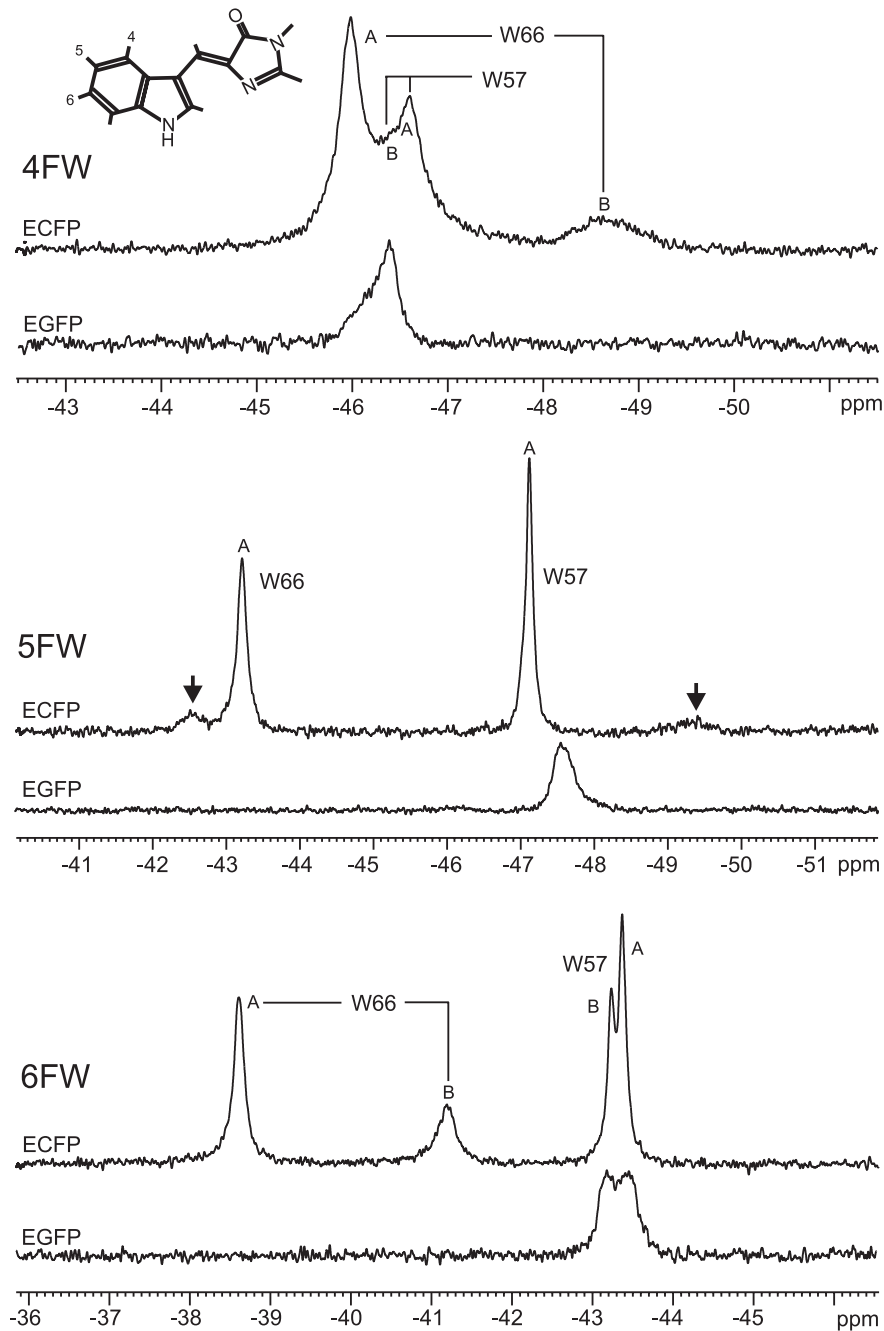


Abbildung 5.18: Signalzuordnung in 4-, 5- und 6FW CFP

Der Vergleich von  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 4-, 5- und 6FW CFP und GFP erlaubt die Zuordnung der Signale von W66 und W57. W66 entspricht dem Chromophor-Tryptophan von CFP. In allen Spektren tritt eine Verdopplung der Resonanzen auf. Dies liefert einen ersten Hinweis auf einen langsamen Austauschprozess. Oben links ist ein Modell der CFP Chromophorstruktur dargestellt. Die Pfeile in dem Spektrum von 5FW ECFP markieren die schwachen Resonanzen.

allerdings zu beweisen, wären weitere Experimente nötig, unter anderem die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Linienformen und das Verhalten bei Entfaltung des Proteins.

### **<sup>19</sup>F Relaxation**

Tabelle 5.1 fasst die gemessenen Relaxationsdaten an ECFP zusammen. Die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$  liegt im Bereich von 0,42 s bis 1,0 s. Es treten Linienbreiten von 47 Hz bis 360 Hz auf. Die daraus berechnete, effektive transversale Relaxationszeit  $T_2^*$  bewegt sich im Bereich von 0,9 ms bis 7 ms. Die hetNOE-Werte liegen zwischen 0,1 bis 0,2.

Um die gemessenen <sup>19</sup>F NMR Relaxationsdaten interpretieren können, wurde die <sup>19</sup>F-Relaxation am Beispiel von 5-fluoro-Tryptophan simuliert. Dabei wurde die DD-Wechselwirkung mit umgebenden Protonen und der Einfluss der <sup>19</sup>F-CSA berücksichtigt. Der CSA-Beitrag wurde mit  $\Delta\sigma\sqrt{1+(\eta^2/3)} = -93.5$  ppm [135] angenommen. Die <sup>19</sup>F Larmorfrequenz lag bei 470 MHz, was einer Protonenfrequenz von 500 MHz entspricht. Die spektrale Dichte wurde mit der modellfreien Methode angesetzt (siehe Abbildung 5.19). Als Korrelationszeit der Rotationsdiffusion wurde der vorher bei GFPuv bestimmte Wert von  $\tau_c = 22$  ns verwendet. Für jeden der Relaxationsparameter  $T_1$ ,  $T_2$  und  $f$  wurde die Abhängigkeit von der Korrelationszeit der internen Bewegung  $\tau_i$  für verschiedene Werte des Ordnungsparameters  $S^2$  (0.2, 0.5, 0.8) simuliert, wie in Abbildung 5.20 gezeigt wird. Die Simulation erfolgte mit Mathematica (Wolfram Research).

Der Vergleich von Messwerten und Simulation zeigt, dass die gemessenen transversalen Relaxationszeiten wesentlich kürzer als erwartet ausfallen. Auch wenn man die versteckte J-Kopplung und mögliche Beiträge der Magnetfeldinhomogenität berücksichtigt, weisen diese kleinen Werte für  $T_2^*$  auf eine Austauschverbreiterung der Resonanzen hin. Bei beiden Tryptophanen, W57 und W66, schließen die sehr kleinen hetNOE-Werte die Existenz von starken Bewegungen auf der Piko- bis Nanosekunden-Skala aus. Die Werte der Relaxationszeit  $T_1$  sprechen für eine geringe Beweglichkeit auf noch kürzeren Zeitskalen, wie sich aus Abbildung 5.20 durch die eingezeichneten Wertebereiche und den damit verträglichen Möglichkeiten der Bewegungszeitskala ablesen lässt. Die Linienbreiten in den <sup>19</sup>F NMR Spektren deuten auf eine große Flexibilität auf einer Zeitskala von Mikrosekunden und länger hin.

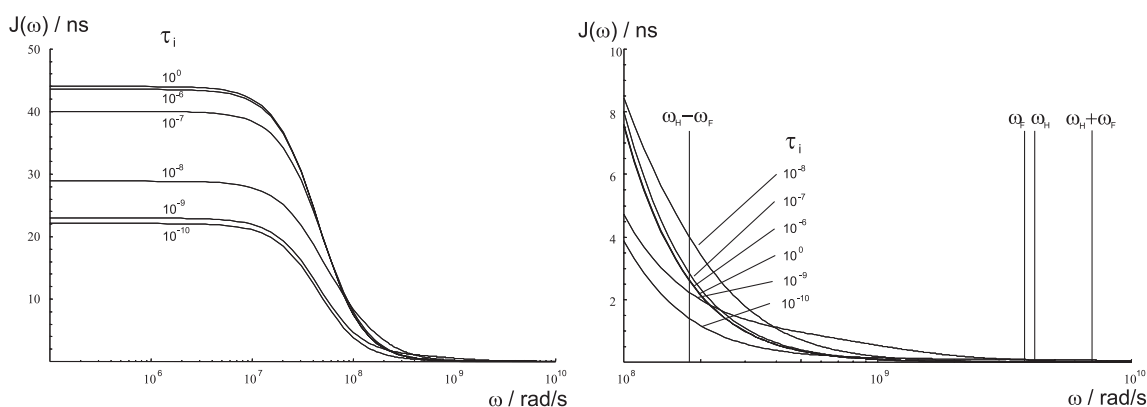
### **Temperaturabhängigkeit**

Die Temperaturabhängigkeit der <sup>19</sup>F NMR Spektren gemessen an 6FW ECFP liefert weitere Hinweise, die auf die Existenz eines langsamen Austauschprozesses hindeuten (siehe Abb.

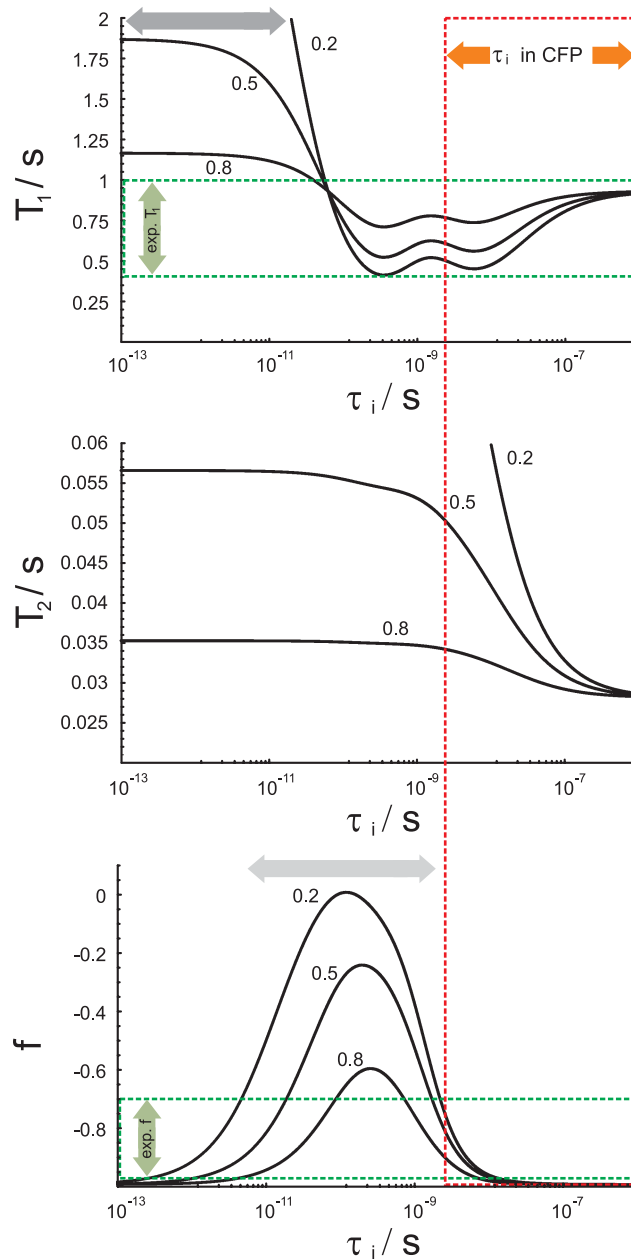
Tabelle 5.1:  $^{19}\text{F}$  Relaxation von ECFP

Peak	$\delta / \text{ppm}^a$	$A_{\text{rel}}^b$	$T_1 / \text{s}^c$	$\Delta v_{\text{exp}} / \text{Hz}^d$	Het.NOE $^e$
<b>4FW</b>					
W66 <sub>A</sub>	-46.0	$0.87 \pm 0.03$	$0.85 \pm 0.02$	$123 \pm 3$	0.19
W57 <sub>A</sub>	-46.4	$1.00 \pm 0.06$	-	$320 \pm 18$	-
W57 <sub>B</sub>	-46.8	$0.25 \pm 0.07$	$0.87 \pm 0.04$	$104 \pm 15$	0.19
W66 <sub>B</sub>	-48.6	$0.30 \pm 0.01$	$1.00 \pm 0.28$	$290 \pm 19$	0.30
<b>5FW</b>					
W57 <sub>B</sub> *	-42.5	$0.18 \pm 0.03$	-	$168 \pm 33$	<0.1
W66 <sub>A</sub>	-43.2	$0.84 \pm 0.02$	$0.64 \pm 0.07$	$72 \pm 2$	0.13
W57 <sub>A</sub>	-47.1	$1.00 \pm 0.01$	$0.55 \pm 0.04$	$55 \pm 1$	0.21
W66 <sub>B</sub> *	-49.3	$0.26 \pm 0.03$	-	$361 \pm 67$	-
<b>6FW</b>					
W66 <sub>A</sub>	-38.6	$1.00 \pm 0.02$	$0.57 \pm 0.01$	$72 \pm 1$	0.14
W66 <sub>B</sub>	-41.2	$0.56 \pm 0.02$	$0.42 \pm 0.03$	$118 \pm 5$	0.13
W57 <sub>B</sub>	-43.2	$0.56 \pm 0.02$	$0.58 \pm 0.01$	$47 \pm 2$	0.16
W57 <sub>A</sub>	-43.4	$0.96 \pm 0.02$	$0.61 \pm 0.01$	$51 \pm 1$	0.20

<sup>a</sup> chemische Verschiebung, <sup>b</sup> Resonanzintegral, <sup>c</sup> longitudinale Relaxationszeit  $T_1$ , <sup>d</sup> Linienbreiten (FWHM) und <sup>e</sup> hetNOE-Werte, gemessen bei  $T=303\text{K}$  an den 4-, 5- und 6-fluoro-Tryptophan ECFP-Proben. Sterne markieren Resonanzen, die aufgrund der Resonanzintegrale zugeordnet wurden.

Abbildung 5.19: Modell der spektralen Dichte für  $^{19}\text{F}$  bei 470 MHz

Die spektrale Dichte  $J$  zeigt einen Lorentzförmigen Verlauf, mit einer starken Abnahme hin zu höheren Frequenzen. Schnelle interne Bewegungen verringern den Wert der spektralen Dichte bei kleinen Frequenzen und erhöhen ihn bei hohen Frequenzen. Rechts wird ein Ausschnitt der spektralen Dichte bei hohen Frequenzen gezeigt.

Abbildung 5.20: Simulation der  $^{19}\text{F}$  Relaxation bei 470 MHz

Die Relaxationsparameter  $T_1$ ,  $T_2$  und  $f$  werden in Abhängigkeit von der Korrelationszeit der internen Bewegung  $\tau_i$  für verschiedene Werte des Ordnungsparameters  $S^2$  (0.2, 0.5, 0.8) bei fester Gesamtkorrelationszeit des Proteins von  $\tau_c = 22 \text{ ns}$  dargestellt. Ein kleinerer Ordnungsparameter bedeutet dabei eine grössere Bewegungsamplitude. Der Wertebereich der gemessenen Daten wird durch grüne Pfeile und Linien angedeutet. Die mit den Messwerten vertägliche Zeitskala der internen Bewegung wird durch den roten Kasten symbolisiert. Starke Bewegungen im Bereich von  $10^{-12} \text{ s}$  bis  $10^{-9} \text{ s}$  werden durch die gemessenen HetNOE-Werte ausgeschlossen (hellgrauer Pfeil). Signifikante Amplituden von Bewegungen im Bereich von  $10^{-15} \text{ s}$  bis  $10^{-12} \text{ s}$  sind nicht mit den experimentellen  $T_1$ -Werten vereinbar (dunkelgrauer Pfeil). Bewegungen liegen folglich nur im Bereich von  $10^{-9} \text{ s}$  und länger vor.

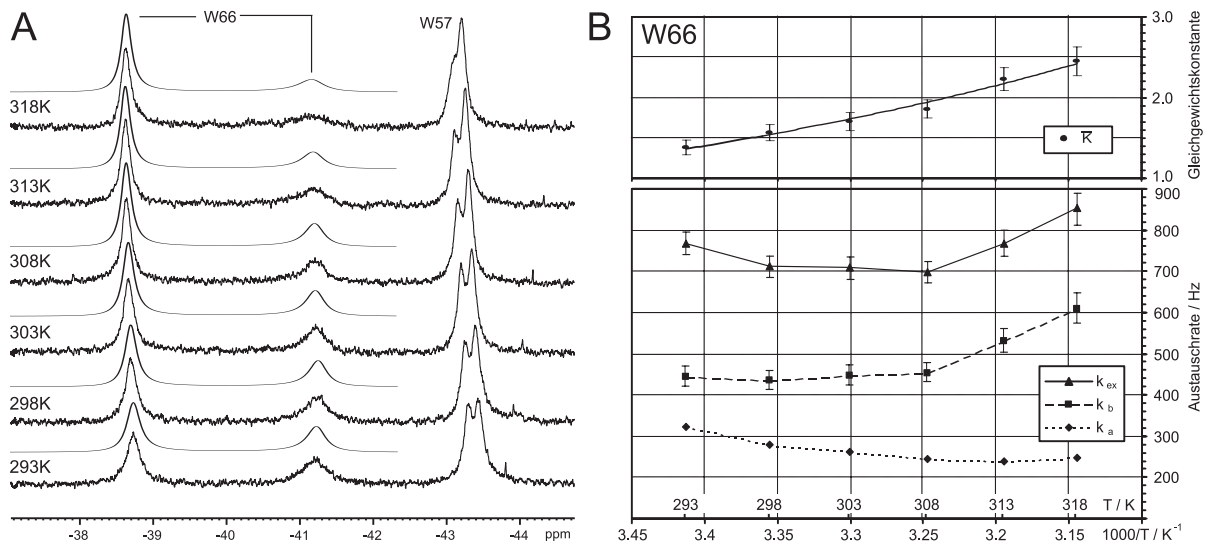


Abbildung 5.21: Temperaturabhängige Messungen an 6FW ECFP

A.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 6FW ECFP im Bereich von 293 K bis 318 K. Die angepassten McConnell-Funktionen sind als durchgezogene Striche dargestellt. B. Abhängigkeit der ermittelten Austauschraten  $k_A$ ,  $k_B$ ,  $k_{ex} = k_A + k_B$  und  $\bar{K} = k_B/k_A$  von dem Inversen der absoluten Temperatur.

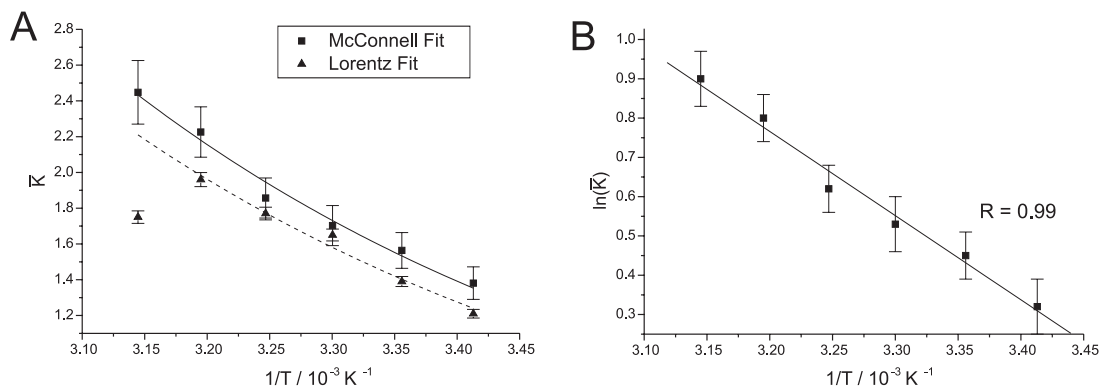


Abbildung 5.22: Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten für W66

A. Vergleich der Gleichgewichtskonstanten, die mit Lorentz- oder McConnell-Anpassung ermittelt wurden. B. Der natürlich Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten aus der McConnell-Anpassung in Abhängigkeit von dem Inversen der absoluten Temperatur.

5.21A). Es ist auffällig, dass eine Resonanz,  $W66_A$ , mit steigender Temperatur schmaler wird, während die andere,  $W66_B$ , eine Verbreiterung erfährt. Dies ist ein typisches Phänomen bei langsamen Austauschprozessen [21]. Die ermittelten Zustandspopulationen und Austauschraten sind in Tabelle 5.2 und Abbildung 5.21B zusammengefasst. Die mittlere Lebensdauer der beiden Zustände von  $W66$  wurde, je nach Temperatur, mit  $\tau_{ex} = k_{ex}^{-1} = 1,2 \text{ ms}$  bis  $1,4 \text{ ms}$  bestimmt. Bemerkenswerterweise nimmt die Rate der Umwandlung von  $W66_A$  nach  $W66_B$  ( $k_A$ ) mit steigender Temperatur ab, während die Rate des Umkehrprozesses  $W66_B$  nach  $W66_A$  ( $k_B$ ) zunimmt. Dies führt zu einem Minimum der Gesamtaustauschrate  $k_{ex} = k_A + k_B$  bei einer Temperatur von ungefähr 303 K. Die Resonanzen von  $W57$  wurden nicht weiter ausgewertet, da für eine verlässliche Anpassung der McConnell-Gleichung zwei gut getrennte Resonanzen vorliegen sollten.

Es wurden zwei Methoden zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten verwendet (siehe Abb. 5.22 und Tab. 5.2): Zum einen wurden Lorentzfunktionen den Resonanzen angepasst und aus den Populationen die Gleichgewichtskonstante  $\bar{K}_{Lorentz} = p_A : p_B$  bestimmt. Zum anderen wurde die McConnell-Gleichung verwendet, wobei  $\bar{K}_{McConnell} = k_B : k_A$ . Trotz einer geringfügigen Verschiebung der Kurven, wie in Abbildung 5.22 sichtbar, stimmen die ermittelten Entropie- und Enthalpiewerte im Rahmen des Messfehlers überein. Der Messpunkt bei 318 K wurde im Fall der Auswertung mit Lorentzfunktionen vernachlässigt, da aufgrund der Nähe zum Koaleszenzpunkt dieser Wert nicht zuverlässig ermittelt werden konnte. Insgesamt scheinen die Ergebnisse der McConnell-Anpassung zuverlässiger zu sein, weil für diese Gleichung keine Beschränkung des Anwendungsbereiches gilt. Obwohl die einzelnen Austauschraten von einem einfachen Arrhenius-Verhalten abweichen, verläuft der Graph von  $\ln(\bar{K})$  in Abhängigkeit von der inversen Temperatur  $T^{-1}$  hochgradig linear (Abb. 5.22B). In den meisten Untersuchungen wird angenommen, dass keine Abweichung vom Arrhenius-Verhalten in dem verwendeten Temperaturbereich auftritt [136]. Im Fall von CFP trifft dies zumindest auf die Gleichgewichtskonstante zu. Daher ist es zulässig durch einfache Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Kurve der Gleichgewichtskonstanten die Entropie- und Enthalpiedifferenzen zu ermitteln.

Damit erhält man eine molare Enthalpiedifferenz von  $\Delta H_0 = (18,2 \pm 3,8) \text{ kJ mol}^{-1}$  und eine molare Entropiedifferenz von  $\Delta S_0 = (64,6 \pm 3,8) \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . Bei einer Temperatur von ca. 303 K kompensieren sich Entropie ( $T\Delta S_0 = (19,6 \pm 1,2) \text{ kJ mol}^{-1}$ ) und Enthalpie, was zu einem Minimum in der Gibbschen freien Energie  $\Delta G_0 = -RT \ln \bar{K} = -(1,3 \pm 0,1) \text{ kJ mol}^{-1}$  führt. Das negative Vorzeichen von  $\Delta G_0$  bedeutet aber in diesem Fall nicht, dass eine exotherme Reaktion vorliegt, sondern resultiert einzig und allein aus der Definition der beiden

Tabelle 5.2: Zustandspopulation und Austauschraten W66 in 6FW CFP

T / K <sup>a</sup>	Lorentzian fit				$\bar{K}_{\text{Lorentzian}} = p_A / p_B$ <sup>f</sup>
	$\Delta\nu_A$ / Hz <sup>b</sup>	$p_A$ <sup>c</sup>	$\Delta\nu_B$ / Hz <sup>d</sup>	$p_B$ <sup>e</sup>	
293	95 ± 2	0.55 ± 0.01	168 ± 5	0.45 ± 0.01	1.21 ± 0.02
298	82 ± 1	0.58 ± 0.01	154 ± 4	0.42 ± 0.01	1.39 ± 0.03
303	79 ± 1	0.62 ± 0.01	145 ± 4	0.38 ± 0.01	1.65 ± 0.03
308	73 ± 1	0.64 ± 0.01	167 ± 4	0.36 ± 0.01	1.77 ± 0.04
313	71 ± 1	0.66 ± 0.01	201 ± 7	0.34 ± 0.01	1.96 ± 0.04
318	71 ± 1	0.64 ± 0.01	330 ± 17	0.36 ± 0.01	1.75 ± 0.04

T / K <sup>a</sup>	McConnell fit				$\bar{K}_{\text{McConnell}} = k_B / k_A$ <sup>k</sup>
	$k_A$ / Hz <sup>g</sup>	$p_A$ <sup>h</sup>	$k_B$ / Hz <sup>i</sup>	$p_B$ <sup>j</sup>	
293	322 ± 4	0.58 ± 0.01	445 ± 24	0.42 ± 0.01	1.38 ± 0.09
298	278 ± 3	0.61 ± 0.01	435 ± 23	0.39 ± 0.01	1.56 ± 0.10
303	263 ± 3	0.63 ± 0.01	448 ± 24	0.37 ± 0.01	1.70 ± 0.11
308	244 ± 2	0.65 ± 0.01	453 ± 24	0.35 ± 0.01	1.86 ± 0.11
313	238 ± 2	0.69 ± 0.01	530 ± 29	0.31 ± 0.01	2.23 ± 0.14
318	248 ± 3	0.71 ± 0.01	607 ± 37	0.29 ± 0.01	2.45 ± 0.18

<sup>a</sup> Temperatur, <sup>b</sup> Linienbreite Zustand W66<sub>A</sub>, <sup>c</sup> Population Zustand W66<sub>A</sub>, <sup>d</sup> Linienbreite Zustand W66<sub>B</sub>, <sup>e</sup> Population Zustand W66<sub>B</sub>, <sup>f</sup> Gleichgewichtskonstante  $\bar{K}$  ermittelt durch Lorentzfit, <sup>g</sup> Austauschrate W66<sub>A</sub>→W66<sub>B</sub>, <sup>h</sup> Population Zustand W66<sub>A</sub>, <sup>i</sup> Austauschrate W66<sub>B</sub>→W66<sub>A</sub>, <sup>j</sup> Population Zustand W66<sub>B</sub>, <sup>k</sup> Gleichgewichtskonstante  $\bar{K}$  ermittelt durch McConnell-Fit.

Zustände. Bei der hier vorliegenden endothermen Reaktion führt eine Temperaturerhöhung zu einem Anwachsen der Produkte. Deshalb kann der Zustand W66<sub>A</sub> einem Zustand des Chromophors zugeordnet werden, der energetisch höher als der von W66<sub>B</sub> liegt. Die Differenz in der freien Energie entspricht in etwa der thermischen Energie bei der verwendeten Temperatur  $RT_{303K} = 2,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Die Aktivierungsenergie des Austauschprozesses wurde mit  $57 \text{ kJ mol}^{-1}$  bis  $63 \text{ kJ mol}^{-1}$  abgeschätzt.

### Einfluss von Proteinfaltung, Proteinkonzentration und pH-Wert

Um den Ursprung der zwei Zustände von ECFP herauszufinden, wurden  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von entfaltetem 6FW ECFP aufgenommen (siehe Abbildung 5.23A). Durch die Proteinfaltung werden die Resonanzen um 3 bis 5 ppm hochfeldverschoben. Dies ist durch Veränderung der Fluorumgebung von einer eher hydrophoben Umgebung im Proteininneren zu der hydrophilen Umgebung in der Lösung erklärbar. Die hochfeldverschobene Resonanz mit derselben

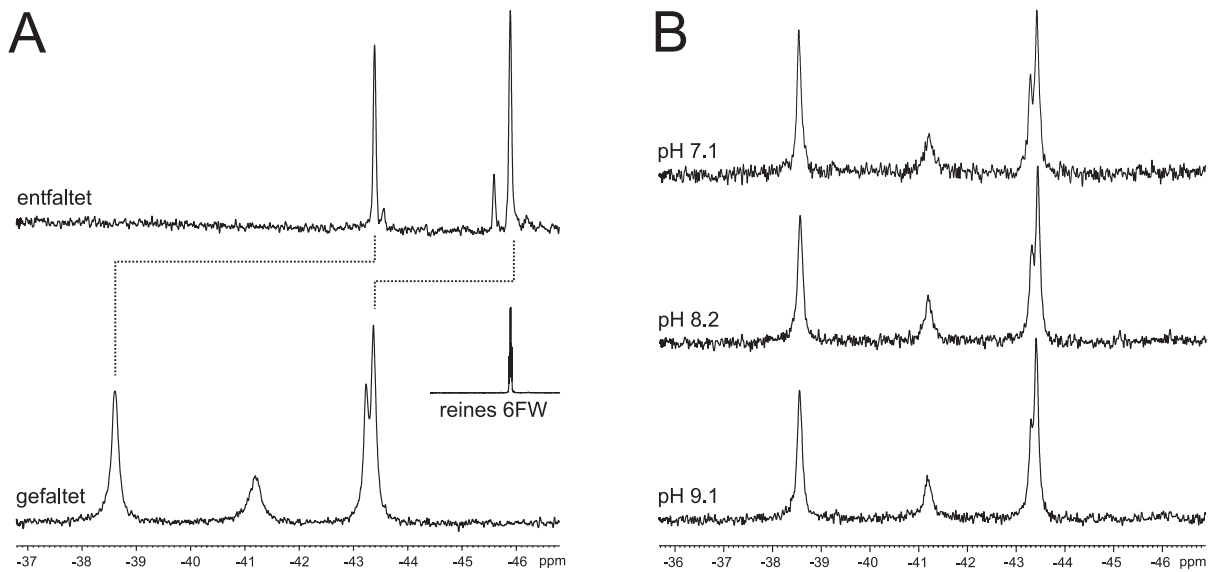


Abbildung 5.23: Entfaltung und pH-Titration von 6FW CFP

A.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von gefaltetem und ungefaltetem 6FW ECFP und reinem 6FW. B. Die pH-Titration mit 6FW ECFP zeigt keine pH-Abhängigkeit der W66-Resonanzen, während bei den W57-Resonanzen eine kleine Veränderung festgestellt werden konnte.

chemischen Verschiebung wie reines 6FW in Lösung wird der Aminosäure W57 zugeordnet, da der Chromophor W66 sich durch die Indol-Imidazol-Verbindung chemisch deutlich von einem normalen Tryptophan unterscheidet. Deshalb wird die Resonanz bei -43.4 ppm der Aminosäure W66 zugewiesen. Trotz der Entfaltung sieht man weiterhin eine zweite Resonanz nahe W57. Sie wird höchstwahrscheinlich von der *cis* und *trans* Konformation der Proline [137] in der P56-W57-P58 Aminosäuresequenz verursacht. Auch in der Nähe der W66 Resonanz erkennt man eine, wenn auch wesentlich kleinere Resonanz, die aber nicht verlässlich zugeordnet werden konnte. Insgesamt sind die Resonanzen in ungefaltetem ECFP schärfer, was eine höhere Flexibilität und die Abwesenheit von Austauschprozessen anzeigt. Der "Grundzustand" W66<sub>B</sub> ist sowohl im gefalteten als auch im ungefalteten Protein hochfeldverschoben gegenüber dem "angeregten Zustand" W66<sub>A</sub>. Da aber viele verschiedene Effekte zu der  $^{19}\text{F}$  chemischen Verschiebung beitragen [138], konnte für diese Beobachtung keine spezifische Ursache gefunden werden.

Die pH-Titration an 6FW ECFP zeigt keine pH-Abhängigkeit der W66 Resonanzen (siehe Abb. 5.23B), während eine geringfügige Veränderung bei W57 festgestellt werden konnte. Die Linienbreite von W57 nimmt mit dem sinkendem pH-Wert leicht ab. In den  $^{19}\text{F}$  Spektren



von verdünnten 6FW ECFP Proben konnte bis auf die zu erwartende Abnahme des Signal-zu-Rauschen Verhältnisses keinerlei Abhängigkeit der Spektren von der Proteinkonzentration festgestellt werden (siehe Anhang B.2). Auch die Experimente mit 6FW ECFP Proben, die vor Aufnahme der NMR-Spektren über mehrere Stunden mit UV-Licht bestrahlt wurden, zeigten keine Veränderungen, wie sie z.B. in GFP wegen der Photokonversion erwartet werden würden (siehe Anhang B.1).

## 5.4 Diskussion

### 5.4.1 Flexibilität des Proteinrückgrats und die Rolle von H148 in GFP

Abbildung 5.24 fasst die experimentell bestimmten Dynamikeigenschaften zusammen. Bis auf das  $\beta$ -Faltblatt  $\beta_3$  konnten alle  $\beta$ -Faltblätter mit hauptsächlich langsamem HD-Austausch vollständig zugeordnet werden. Langsamer HD-Austausch führt zu kleinen Linienbreiten der betroffenen Amingruppen, was eine nicht unerhebliche Erleichterung der Zuordnung darstellt. Diese  $\beta$ -Faltblätter befinden sich so gut wie alle auf der Histidin 148 abgewandten Seite des Proteins. Schneller HD-Austausch der in Wasserstoffbrücken gebundenen Protonen deutet wiederum auf nicht unerhebliche Fluktuationen in der Proteinstruktur hin. Dies tritt vor allem in den nicht vollständig zugeordneten  $\beta$ -Faltblättern  $\beta_7$ ,  $\beta_8$  und  $\beta_{10}$  auf.  $\beta_7$  enthält das besonders interessante Histidin 148. Auch die Veränderungen aufgrund der H148G Mutation treten hauptsächlich auf dieser Seite des Proteins auf, wobei sie aber relativ weit verteilt sind, so dass man fast von einem allosterischen Effekt sprechen kann. Die Mutation scheint eine ähnliche Wirkung auf die Stabilität der  $\beta$ -Faltblätter zu besitzen wie sie in den Röntgenstrukturen von YFP H148G beobachtet wurde [94, 95]. In den meisten Röntgenstrukturen von GFP scheint dagegen das  $\beta$ -Faltblatt  $\beta_7$  deutlich kürzer zu sein als die benachbarten  $\beta$ -Faltblätter. Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass hier eine geringere Bindung zwischen den Faltblättern vorliegt, wodurch das Auftreten von Konformationsänderungen begünstigt wird.

Die pH-sensitiven Aminosäuren sind wie erwartet auf die flexiblen Abschnitte des Proteins konzentriert, die die Sekundärstrukturelemente verbinden. Eine Ausnahme davon ist Thr203, das ebenfalls eine wichtige Rolle in der Chromphor-Dynamik spielt. Unerwarteterweise titrierte in den Experimenten mit der His-selektiv markierten Probe von GFPuv keine der Resonanzen im Bereich von pH 7-8, die H148 zugeordnet werden könnten. Auch in der pH-Titration mit uniform  $^{14}\text{N}$ -markierten GFPuv im Bereich von pH 6-7 zeigten die betreffenden Resonanzen keine

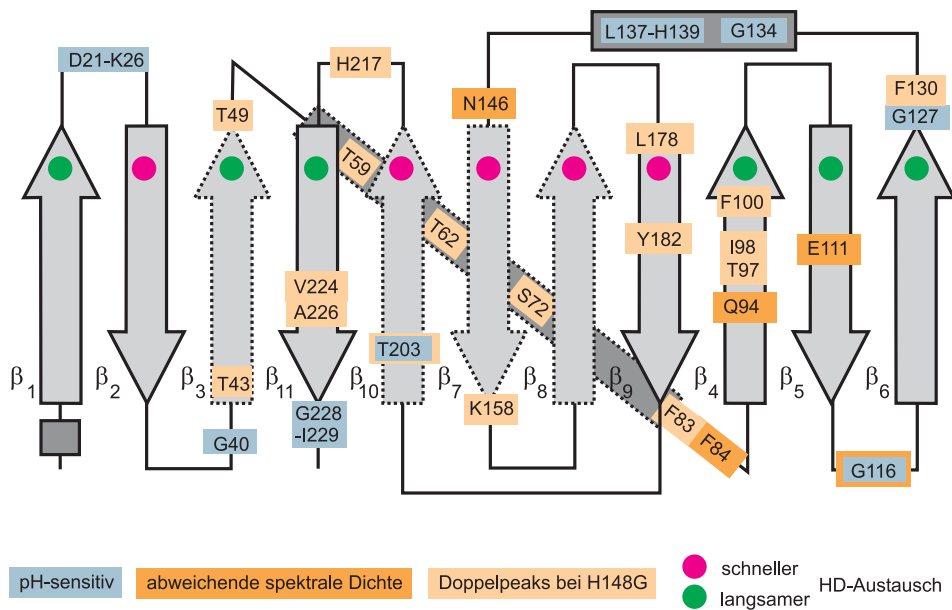


Abbildung 5.24: Faltungsschema und strukturelle Dynamik von GFP

Die Faltung von GFP besteht aus 11 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (hellgrau) und 3  $\alpha$ -Helizes (dunkelgrau). Gestrichelt umrandete Senkundärstrukturelemente sind nicht vollständig zugeordnet. pH-sensitive Aminosäuren sind cyan, Aminosäuren mit abweichender spektraler Dichte orange und Aminosäuren mit doppelten Resonanzen in der H148G Mutante gelb hinterlegt. Schneller und langsamer HD-Austausch in  $\beta$ -Faltblättern wird durch magentafarbene und grüne Punkte symbolisiert.

signifikante Veränderung. Kneen et al. [139] bestimmten mittels UV-Messungen einen  $pK_a$ -Wert für verschiedene GFP-Varianten im Bereich von 6,0. Eine gewisse Änderung der spektralen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften des Chromphors sollte aber auch bei den verwendeten pH-Werten auftreten. Eine Änderung der Protonierung der Seitenkette von H148 würde sich wiederum auf die chemische Verschiebung der Amidgruppe auswirken. Da im Gegensatz zu den starken Verschiebungen der anderen Histidin-Amide die chemische Verschiebung von H148 stabil bleibt, stellt sich die Frage, ob das Modell einer Hauptrolle von H148 bei der Chromophorprotonierung, das z.B. von Palm [140] vorgeschlagen wurde, überdacht werden muss. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass bei den hier durchgeführten Experimenten kleine Veränderungen gerade im interessanten pH-Bereich von pH 6-7 durch den Signalüberlapp in der uniform markierten Probe verdeckt wurden <sup>11</sup>.

Die Abweichungen in der spektralen Dichte sind insgesamt relativ gering, was darauf hindeutet, dass GFP eine rigide Struktur besitzt. Dies steht im Einklang mit der bekannten Robust-

<sup>11</sup> siehe Abb. A.1

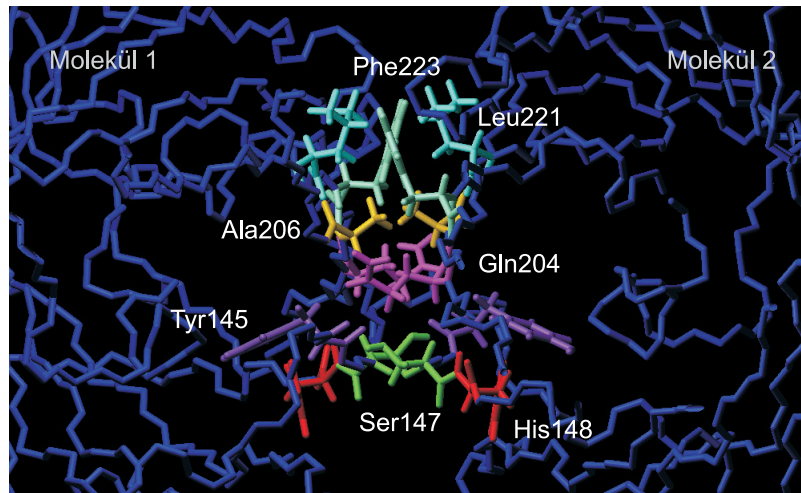


Abbildung 5.25: Dimerkontakte in GFPuv

In Kristallen von GFPuv bilden zwei leicht verkantete, antiparallel ausgerichtete GFP-Moleküle (PDB 1b9c) ein Dimer, das wiederum in zwei Formen vorliegt. In einer Elementarzelle befindet sich also ein Tetramer. Die Dimerkontakte entsprechen weitgehend denen von Wildtyp-GFP. In der hier gezeigten Aufsicht auf die GFP-Zylinder scheinen sich gleiche Aminosäuren zu berühren, in der hier nicht gezeigten Seitenansicht sieht man allerdings, dass sie aufgrund der antiparallelen Ausrichtung der Moleküle auf unterschiedlichen Höhen liegen. Das Proteinrückgrat ist blau dargestellt.

heit von GFP gegenüber Denaturierung, sei es durch Temperatur oder chemische Einflüsse. Die lange Korrelationszeit der Rotationsdiffusion und die kleine translatorische Diffusionskonstante lassen auf eine Aggregation oder Dimerisierung von GFP schließen. Das deckt sich mit den Beobachtungen der Röntgenkristallographie, wo GFP meist als Dimer im Kristall vorlag. In der Kristallstruktur von GFPuv [96] z.B. beinhaltet die Kontaktstelle der beiden dimerisierenden Moleküle unter anderem die Aminosäuren Ser147, Gln204, Ala206, Leu221 und Phe223, wobei insgesamt 17 Wasserstoffbrücken auf einer Kontaktfläche von  $910 \text{ \AA}^2$  gebildet werden (siehe Abb. 5.25). Der Dimerkontakt findet also zwischen den  $\beta$ -Faltblättern  $\beta_7$ ,  $\beta_{10}$  und  $\beta_{11}$  in beiden Molekülen statt. Dies entspricht im Fall von  $\beta_7$  und  $\beta_{10}$  den mittels NMR schwierig zuzuordnenden  $\beta$ -Faltblättern. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Dimerbildung die NMR-Messungen nicht nur durch Steigerung der Korrelationszeit der Rotationsdiffusion, sondern auch durch das Auftreten von spezifischen Störungen in den betroffenen  $\beta$ -Faltblättern erschwert. Es fällt auf, dass wiederum das Faltblatt  $\beta_7$  betroffen ist, in dem auch die Aminosäure His148 liegt. Da die Zuordnung des Chromophors mit konventionellen heteronuklearen Spektren nicht möglich war, musste für die Untersuchung der Chromophordynamik auf andere Methoden zurückgegriffen werden, deren Ergebnisse im folgenden diskutiert werden.

## 5.4.2 Langsamer Austausch im Chromophor von CFP

### Existenz eines langsamen Austauschprozesses

Das Vorliegen eines langsamen Austauschprozesses wird durch mehrere experimentelle Tatsachen untermauert:

ECFP absorbiert UV-Licht in zwei Banden bei den Wellenlängen 434 nm und 452 nm. Beide Banden werden mit verschiedenen Chromophorzuständen in Verbindung gebracht. Da die Absorption von Licht auf einer Zeitskala von Femtosekunden stattfindet - und damit wesentlich schneller als jeder strukturelle Prozess in Proteinen ist - beschränkt sich die damit verfügbare Information über dynamische Prozesse in Proteinen auf ein auf dieser Zeitskala gemittelttes Abbild der unmittelbaren Umgebung der absorbierenden Einheit [141]. NMR dagegen ist in der Lage, Bewegungen in Proteinen auf einer wesentlich größeren Zeitskala zu charakterisieren.

Die kurzen  $T_1$ -Zeiten zusammen mit den kleinen hetNOE-Werten lassen auf eine geringe Flexibilität im Bereich von Piko- bis Nanosekunden schließen. Die Linienbreiten in den  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren deuten auf eine große Flexibilität auf einer Zeitskala von Mikrosekunden und länger hin. Folglich kann sowohl der Chromophor als auch W57 als starr auf kurzen Zeitskalen und flexibel auf langen Zeitskalen betrachtet werden. Sowohl W57 als auch W66 zeigen in  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von ECFP jeweils zwei Resonanzen, was einen ersten klaren Hinweis auf einen Austauschprozess liefert, der verglichen mit der Zeitskala der chemischen Verschiebung langsam abläuft. Die Veränderungen der  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 6FW ECFP mit der Temperatur und bei Entfaltung des Proteins liefern schließlich den klaren Nachweis für die Existenz eines langsamen Austauschprozesses. Ähnliche Austauschprozesse, die durch  $^{19}\text{F}$  NMR nachgewiesen wurden, sind aus der Literatur bekannt: Ropson et al. konnten die Anwesenheit eines austauschenden Faltungsintermediats bei Entfaltungsexperimenten nachweisen [142]. Kwon et al. beobachteten Konformationsfluktuationen in DNS, die mit einer Topoisomerase komplexiert war [143]. Cho et al. wandten eine zu dieser Arbeit ähnliche Methodik an, um die Heterogenität der Konformation des Karzinogens 7-Fluoro-N-Acetyl-2-Aminofluorene in verschiedenen strukturellen Kontexten zu charakterisieren [144].

Bei ECFP wurde eine mittlere Lebensdauer der beiden Chromophorzustände,  $W66_A$  und  $W66_B$  von 1,2 ms bis 1,4 ms im Temperaturbereich von 293 K bis 318 K gemessen. Bei Temperaturen um 303 K beobachtet man eine Kompensation von Entropie und Enthalpie. Diese Entropie-Enthalpie-Kompensation tritt in biologischen Systemen sehr häufig auf [145] und ist auch bei Ordnungs-Unordnungs-Phasenübergängen typisch [8, 10]. Im Fall von CFP spre-

chen aber die gemessenen  $^{19}\text{F}$  Relaxationsparameter gegen einen Ordnungs-Unordnungs-Phasenübergang: Die vergleichbaren heteronuklearen NOE-Werte bei beiden Zuständen und der kürzere  $T_1$ -Wert des Grundzustandes  $W66_B$  im Vergleich zum energetisch höhergelegenen  $W66_B$  deuten eher auf eine verringerte Beweglichkeit des angeregten Zustandes hin. Die ermittelten Entropie- und Enthalpiedifferenzen stimmen in der Grössenordnung gut mit den von Mulder et al. für einen Konformationsaustausch in einer Mutanten von T4 Lysozym gefundenen Werten überein [10].

Das Vorliegen eines langsamen Konformationsaustausches im Chromophor wird auch durch die beiden Absorptions- und Fluoreszenzwellenlängen von CFP nahegelegt. Die pH-Titration zeigt deutlich, dass die beiden Zustände in CFP nicht auf verschiedene Protonierungszustände des Chromophors wie in GFP zurückgeführt werden können.

### **Allosterische Effekte**

Nach dem die Existenz eines langsamen Austauschprozesses als gesichert angenommen werden darf, stellt sich die Frage nach der strukturellen Ursache. Diese Ursache könnte in Vorgängen zu suchen sein, die das gesamte Protein betreffen. Dies ist aber, wie im folgenden erläutert wird, wenig plausibel:

Es fällt auf, dass sowohl  $W57$  als auch  $W66$  in ECFP in zwei austauschenden Zuständen existieren. Daraus könnte man schließen, dass dieses Phänomen allgemein bei Tryptophanen in Proteinen auftritt. Allerdings widerlegen die  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von GFPuv diese Hypothese, da hier nur eine einzelne Resonanz für  $W57$  auftritt. Eine weitere, mögliche Erklärung sind kollektive Bewegungen mehrerer Aminosäuren im Proteinzentrum. In letzter Zeit sind einige Untersuchungen zu kollektiven Bewegungen in Proteinen erschienen: Es gibt Hinweise, dass z.B. nur spezielle Bewegungsmoden in natürlichen Proteinen auftreten [146, 147]. Der Austausch zwischen den verschiedenen Konformationen und eine partielle Entfaltung von Proteinen sind im Zusammenhang mit der Bindung von Liganden diskutiert worden [10, 148].  $W57$  und  $W66$  sind in CFP über die zentrale  $\alpha$ -Helix verbunden, die möglicherweise in der Lage ist, kollektive Bewegungen zu vermitteln. Um aber einen Nachweis dafür zu liefern, müsste eine wesentlich größere Anzahl von Aminosäuren untersucht werden. Insgesamt erscheint diese Erklärung aber als wenig wahrscheinlich, da es mehrere, naheliegendere Erklärungen für die experimentellen Ergebnisse gibt.

Da GFP und CFP bekanntermaßen zu einer Dimerisierung neigen, liegt die Vermutung

nahe, dass die beiden Zustände von W66 und W57 einem Monomer- und Dimerzustand entsprechen. Diese Erklärung ist aber aus verschiedenen Gründen höchst unwahrscheinlich:

Für GFP wurde eine Dissoziationskonstante der Dimerisierung von 0,1 mM abgeschätzt [76]. Nimmt man an, dass dieser Wert in etwa auch für ECFP und EGFP zutrifft, so würde man im verwendeten Bereich der Probenkonzentrationen von ungefähr 0,3 mM eine starke Abhängigkeit der Zustandspopulationen von der Proteinkonzentration erwarten. Es konnte jedoch experimentell gezeigt werden, dass in den NMR Spektren keinerlei Konzentrationsabhängigkeit der relativen Resonanzintegrale und Linienbreiten auftritt.

Außerdem äußert sich eine Dimerisierung oder Aggregation in NMR Spektren im allgemeinen nur durch eine Linienverbreiterung, solange keine völlig asymmetrischen Dimerpartner vorliegen. In GFP Röntgenstrukturen sind die Dimerpartner aber völlig symmetrisch. Außerdem ist schwerlich vorstellbar, dass eine Dimerisierung von GFP Molekülen einen derartig starken Unterschied in der chemischen Verschiebung in zwei im Inneren des Proteins liegenden Aminosäuren hervorruft. Die  $^{19}\text{F}$  chemische Verschiebung ist besonders sensitiv auf kurzreichweitige Wechselwirkungen ( $\propto r^{-6}$ ) und lokale elektrische Felder ( $\propto r^{-1}$ ), wobei allerdings gezeigt wurde, dass selbst Oberflächenladungen keine Auswirkungen mehr haben [138]. Die Entfernung der Chromophor-Tryptophans in CFP zur Oberfläche des Dimerpartners beträgt aber im Schnitt 10Å, sodass die beobachtete chemische Verschiebung nicht durch eine Dimerisierung verursacht werden kann. Im besten Fall ist eine indirekte Wechselwirkung durch Vermittlung des Histidins 148 denkbar, das nahe der Dimerkontaktfläche liegt. Der Einfluss von H148 wird später noch genauer diskutiert.

Allosterische Effekte scheiden also als Erklärung aus. Die Verdopplung beider Resonanzen, W57 und W66, in den  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren kann aber genauso gut auf unterschiedliche Ursachen zurückgehen, da die beiden Signale von W57 durch den Austausch zwischen *cis* und *trans* Konformation [137] in der P56-W47-P58 Sequenz und die beiden W66 Signale z.B. durch zwei Chromophorkonformationen verursacht werden könnten.

### Strukturelle Ursache des Austauschprozesses

Mittels  $^{19}\text{F}$  NMR konnten, wie zuvor diskutiert, die Zeitskala und die thermodynamischen Eigenschaften des Austauschprozesses zwischen zwei verschiedenen Konformationen von W66 in ECFP vollständig charakterisiert werden. Da allosterische Effekte ausscheiden, muss die genaue molekulare Ursache für den Konformationsaustausch von W66 noch geklärt werden. Im Prinzip gibt es zwei Möglichkeiten, die experimentellen Daten für W66 zu erklären:

- Erstens könnte der Austausch zwischen verschiedenen Chromophorkonformationen stattfinden (a),
- oder zweitens eine dem Chromophor benachbarte Seitenkette tauscht zwischen zwei Zuständen aus (b).

Um diese Frage zu entscheiden, wäre eine hochauflösende Kristallstruktur von Nutzen. Da aber Kristallisationsversuche an fluorierten CFPs bis jetzt nicht erfolgreich waren, wurde die Struktur von CFP basierend auf einer Struktur des nahe verwandten 4-Amino-Tryptophan CFP modelliert (siehe Abbildung 5.27) [149]. Dieses Modell berücksichtigt zwar nicht den Einbau von Fluor in den Chromophor, kann aber dennoch einen ersten Eindruck von der Chromophorumgebung in CFP vermitteln, der die Interpretation der NMR Daten erleichtern sollte.

**(a) Austausch im Chromophor** Aromatische Ringe in Proteinen sind häufig von langsamen Austauschvorgängen zwischen verschiedenen Rotationskonformationen betroffen [150]. Um die Möglichkeit, dass der CFP Chromophor selbst in einen derartigen Austauschprozess involviert ist, zu untersuchen, ist ein Blick auf die bekannten GFP Strukturen sinnvoll.

In GFP wird der Chromophor mit einem Netzwerk von Wasserstoffbrücken stabilisiert, dessen Hauptbestandteile die phenolische Hydroxylgruppe des Chromophors und die Seitenketten der Aminosäuren H148 und T203 sind. Obwohl rund um den Chromophor eine dichte Packung der Seitenketten vorliegt, wurde mittels Molekulardynamiksimulationen gezeigt, dass der Chromophor "hula-twist"-Bewegungen ausführen kann, bei denen er gleichzeitig um die zwei Bindungen, die die Chromophorringe verbinden, rotiert [90, 151].

Im Vergleich mit GFP zeigt das Modell der CFP-Struktur wie erwartet eine ähnliche Gesamtstruktur. Eine Rotation des Chromophorindols um die  $\phi$ -Achse ist aber sehr unwahrscheinlich, da eine Rotation des Indols um seine lange Achse von den umgebenden Seitenketten verhindert wird. Eine Drehung um die  $\tau$ -Achse zusammen mit einer Drehung des Imidazolringes um seine Normale scheint aber möglich zu sein (siehe Abb. 5.26), da beide so gebildeten Rotameren,  $\tau = 0^\circ$  und  $\tau = 90^\circ$ , in den Chromophorhohlraum passen.

Weber et al. konnten zeigen, dass die *cis* und *trans* Isomere des GFP Chromophors bei gleichem Protonierungszustand vergleichbare Bildungswärmen aufweisen ( $< 5$  kJ/mol) [90]. Angewandt auf CFP deckt sich dies mit dem gemessenen kleinen  $\Delta G_0$ . Weber et al. berechneten außerdem die Energiebarrieren für die Rotationen um die Bindungen im GFP Chromophor [90]. Die meisten davon sind in der Größenordnung von 100 - 200 kJ/mol, mit Ausnahme

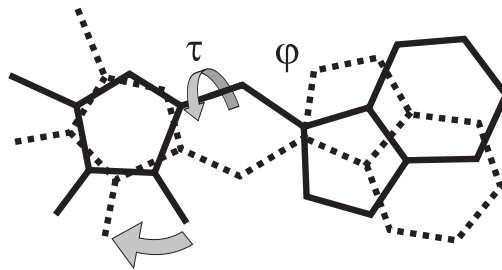


Abbildung 5.26: Mögliche Chromophor-Rotamere in CFP

Eine Rotation des Chromophors um die  $\tau$ -Achse zusammen mit einer Drehung des Imidazol-Ringes führt zu einem Rotamer des Chromophors, das einen ähnlichen Raum wie der ursprüngliche Chromophor einnimmt.

der  $\phi$ -Rotation im neutralen und anionischen Zustand und der  $\tau$ -Rotation im zwitterionischen Zustand, die kleinere Barrieren aufweisen. Im Fall von ECFP wurde die Aktivierungsenergie mit 57-63 kJ/mol abgeschätzt, sodass wahrscheinlich auch in CFP Drehungen um die Bindungen im Chromophor möglich sind. Genaue quantenchemische Berechnungen für den CFP-Chromophor sind jedoch nicht verfügbar, wodurch keine definitive Aussage möglich ist. Man kann natürlich dagegen einwenden, dass in CFP eine Wasserstoffbrücke zwischen T203 und dem Chromophor existieren kann. Das Aufbrechen dieser Brücke ist einem Energieaufwand von typischerweise 20 kJ/mol verbunden, also nur einem Bruchteil der gesamten Energiebarriere des Austauschprozesses von geschätzten 60 kJ/mol. Außerdem könnte eine erhöhte Unordnung in den benachbarten Seitenketten die beobachtete Entropie-Enthalpie-Kompensation erklären.

Da aber der Chromophor in den Kristallstrukturen von GFP, bis auf einige wenige Ausnahmen [96], gut definiert ist und auch in dem Modell der CFP Struktur keine Hinweise auf eine zweite Chromophorkonformation vorliegen, bleibt eine Chromophorisomerisierung höchst spekulativ.

**(b) Austausch in der Nähe des Chromophors** Die zweite Möglichkeit, um die experimentellen Beobachtungen zu erklären, ist der Austausch zwischen verschiedenen Konformationen von dem Chromophor benachbarten Seitenketten, die sich auch auf die chemische Verschiebung des Chromophors auswirken. Zuerst wieder ein kurzer Blick auf die Struktur von GFP: Dort kommen zwei Aminosäuren, H148 und T203, dem Chromophor am nächsten. In vielen Kristallstrukturen von GFP ist die Struktur der  $\beta$ -Faltblätter rund um H148 gestört. So sind z.B.



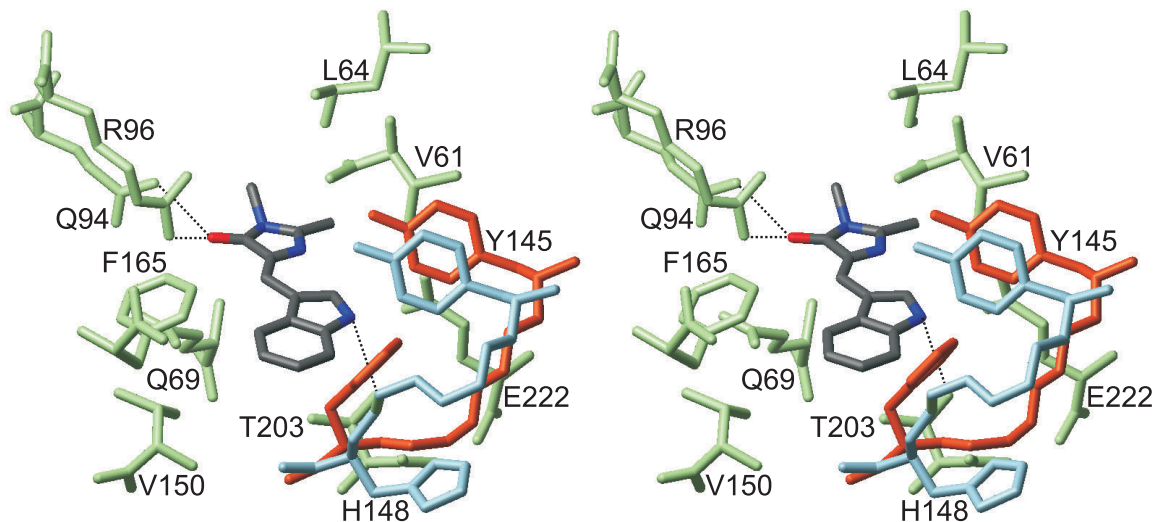


Abbildung 5.27: Modell für die Chromophorumgebung in CFP

Der Chromophor (schwarz) in CFP wird von den Aminosäuren V61, L64, Q69, Q94, R96, Y145, H148, V150, F165, T203 und E222 (grün) umgeben. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Zwei mögliche Konformationen des Proteinsrückgrates in der Umgebung von Histidin 148 sind in rot und blau dargestellt.

die Aminosäuren 144 bis 150 nicht durch Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren 165 bis 170 im benachbarten  $\beta$ -Faltblatt verbunden [94]. Dies deutet auf eine erhöhte Flexibilität der Konformation auf dieser Seite des GFP-Zylinders hin.

Der Vergleich des CFP-Strukturmodells mit den bekannten GFP-Strukturen zeigt, dass es für den Imidazolring von H148 möglich ist, zwei Konformationen einzunehmen (siehe Abb. 5.27): Der Imidazolring kann in einer dem Chromophor zugewandten Konformation, wie in den meisten GFP-Strukturen, oder einer dem Lösungsmittel zugewandten Konformation vorliegen. In beiden Konformationen würden sich auch zwangsläufig unterschiedliche Konformationen des Proteinrückgrates ergeben. Die Wasserstoffbrücke zwischen H148 und dem Chromophor fehlt in CFP, zumindest in einer der H148 Konformationen.

Diese unterschiedlichen Ausrichtungen des Imidazolringes würden die auf Veränderungen in der elektronischen Umgebung sehr empfindliche chemische Verschiebung eines Fluorkerns im Chromophor beeinflussen. Eine nach außen gewandte Histidinseitenkette öffnet außerdem einen Kanal, in dem das Lösungsmittel weiter Richtung Chromophor vordringen kann. Die pH-Titration an 6FW ECFP zeigt allerdings, dass der Chromophor nicht signifikant von pH-Ände-

rungen betroffen ist. Entweder wird also der Zutritt von Wasser durch benachbarte, hydrophobe Aminosäuren verhindert, oder die Iminogruppe im Chromophor titriert nicht im betrachteten pH-Bereich. Angenommen, die dem Lösungsmittel zugewandte H148 Konformation liegt energetisch höher als die dem Chromophor zugewandte, dann könnte eine erhöhte Anzahl von Freiheitsgraden des Chromophors die beobachtete Entropie-Enthalpie-Kompensation erklären.

Da die strukturelle Inhomogenität in der Umgebung von H148 schon in mehreren GFP und YFP Kristallstrukturen beobachtet wurde [94], erscheint diese Erklärung für die experimentellen Beobachtungen am wahrscheinlichsten. Endgültigen Aufschluss werden aber erst weitere kristallographische oder NMR-spektroskopische Studien bringen.

### **Einfluss der Fluorierungsstelle auf den Austauschprozess**

Wie zuvor erwähnt ist der energetisch niedrigere Zustand in 6FW CFP (W66<sub>B</sub>) mehr besetzt als in 4FW und 5FW CFP. Der Unterschied in  $\Delta G_0 = -RT \ln(p_B/p_A)$  zwischen 6FW CFP ( $p_B/p_A = 0,6; \Delta G_0 = 1 \text{ kJ/mol}$ ) und 4FW/5FW CFP ( $p_B/p_A = 0,3; \Delta G_0 = 3 \text{ kJ/mol}$ ) beträgt ungefähr  $\Delta \Delta G_0 = 2 \text{ kJ/mol}$ . Diese Größenordnung von  $\Delta \Delta G_0$  deutet auf eine schwache Dipol-induzierte-Dipol Wechselwirkung oder auf London-Dispersionskräfte als Ursache hin. Der Einbau von Fluor an unterschiedlichen Stellen des Chromophor moduliert die Wechselwirkungsenergie mit den umgebenden Aminosäuren, da eine Kohlenstoff-Fluor-Bindung eine andere Polarität als eine Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung aufweist. Eine veränderte Wechselwirkungsenergie beeinflusst auch die Austauschrate und die Zustandspopulationen, egal ob der Austausch zwischen verschiedenen H148 oder Chromophor-Konformationen verursacht wird. Im Falle, dass der Chromophor zwischen zwei Konformationen austauscht, legt das CFP-Strukturmodell zwei Wechselwirkungspartner nahe, um das  $\Delta \Delta G_0$  zu erklären: Die polare Seitenkette von T203 liegt nahe der Position 6 im Chromophorindol in beiden Rotamerzuständen. In einer der beiden Rotamerzustände sind die Position 4 und 5 der E222 Seitenkette benachbart. Es bleibt aber festzuhalten, dass der Austauschprozess zwar von der Position des Fluoreinbaus moduliert wird, aber die Zeitskala und das Austauschregime erhalten bleibt.

### **Auswirkungen des Austauschprozesses auf die optischen Eigenschaften**

Die Quantenausbeute der Fluoreszenz bei CFP ( $QY = 0.4$ ) ist etwa nur halb so groß wie bei GFP ( $QY = 0.8$ ) [76]. Die Unterschiede in der Quantenausbeute werden üblicherweise mit dem Verhältnis von fluoreszierenden zu strahlungslosen Übergangsmöglichkeiten erklärt [90]. Eine Möglichkeit des strahlungslosen Übergangs ist die Photoisomerisierung, d.h. die Änderung

der Chromophorstruktur aufgrund der Lichtabsorption. Der große, indoltragende Chromophor von CFP sollte eine geringere Isomerisierungsrate besitzen als Phenol- und Imidazoltragenden Chromophore. Dies deckt sich mit der beobachteten Reihenfolge der Quantenausbeuten in verschiedenen GFP-Chromophorvarianten ( $Phe < His < Trp$ ) [90]. Trotzdem reicht die CFP ( $Trp$ ) Fluoreszenz nicht an die GFP ( $Tyr$ ) Fluoreszenz heran. Es besteht die Möglichkeit, dass dies mit dem in den NMR-Spektren beobachteten Austauschprozess zusammenhängt. Der Austausch findet zwar auf einer wesentlich längeren Zeitskala (1,3 ms) als die Lebensdauer der angeregten elektronischen Zustände (z.B. 3,3 ns bei GFP [79, 80]) statt, dennoch besteht die Möglichkeit, dass dadurch die Fluoreszenz beeinflusst wird: Beispielsweise kann der Konformationsaustausch von H148 das Eindringen von Fluoreszenzunterdrückern wie u.a. Sauerstoff erleichtern. Tryptophan ist bekannt für seine Sensitivität auf derartige Einflüsse, vor allem aufgrund seiner Tendenz, im angeregten Zustand Elektronen abzugeben [141]. Außerdem deutet das Vorhandensein des Austausches auf eine erhöhte Flexibilität der Proteinkonformation im Umkreis des Chromophors hin, was wiederum das Auftreten einer Photoisomerisierung begünstigt.

### Optimierung der optischen Eigenschaften

Die Erkenntnis, dass in CFP ein Konformationsaustausch vorliegt, kann dazu beitragen, neue Ansatzpunkte für die Optimierung von GFP-Varianten zu finden: Falls H148 die Ursache der strukturellen Inhomogenität ist, so sollte es gegen eine Aminosäure ausgetauscht werden, die nicht in Kontakt mit dem Chromophor treten kann und außerdem die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrücken zwischen den  $\beta$ -Faltblättern in ihrer Umgebung begünstigt. Falls der Chromophor zwischen mehreren Konformationen austauscht, so muss er stabilisiert werden. Dies kann z.B. durch die Einführung einer aromatischen Aminosäure geschehen, die mit dem Chromophor ein gestapeltes  $\pi$ -Elektronensystem wie in YFP bildet. Eine weitere Möglichkeit ist die Ausnutzung von Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Seitenketten und dem Chromophor, mit denen signifikante Wechselwirkungsenergien erzeugt werden können (8,8 - 14,2 kJ/mol) [152]. Dies könnte u.a. mit den Mutationen F165K oder E222K erreicht werden.

### 5.4.3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend ergeben sich aus den an GFPuv gewonnenen experimentellen Daten folgende Schlussfolgerungen für die Dynamik des GFP Proteinrückgrates:

- GFP liegt in Lösung nicht als Monomer vor
- GFP besitzt insgesamt eine rigide Struktur, die aber auf der Seite des Zylinders, auf der H148 liegt, eine Tendenz zu Konformationsfluktuationen zeigt
- Die chemische Verschiebung der Amidgruppe von H148 ist im Bereich von pH 6-8 nicht signifikant pH-sensitiv
- H148 spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität des Gesamtproteins.

Die Untersuchungen der Chromophordynamik mittels  $^{19}\text{F}$  NMR Spektroskopie an CFP haben deutlich gemacht, dass

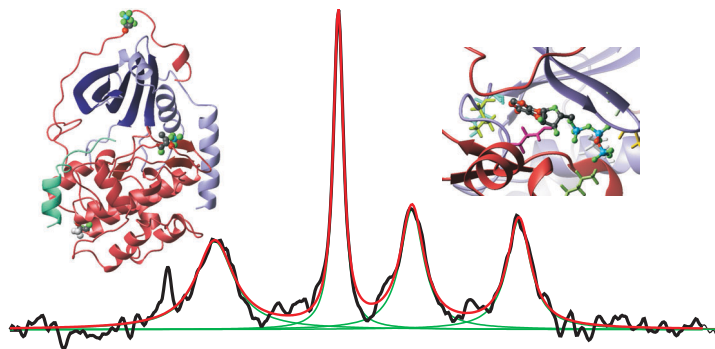
- ein langsamer Austauschprozesses auf der Millisekunden-Zeitskala (1,3 ms) existiert,
- die Ursache dafür entweder in einer Ringdrehung im Chromophor selbst oder einem Austausch zwischen zwei Konformationen von H148 liegt,
- eine Entropie-Enthalpie-Kompensation vorliegt,
- und der Einbau von Fluor geringen, aber nicht vernachlässigbaren Einfluss auf die Dynamik des Austauschprozesses hat.

Dabei konnte aber keine besondere Flexibilität des Chromophors auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala festgestellt werden. Die festgestellte Enthalpie-Entropie-Kompensation ist charakteristisch für kollektive Prozesse in Proteinen.

Die verbreitete Ansicht in  $^{19}\text{F}$  NMR-Studien, dass Fluor aufgrund der geringen sterischen Veränderungen in Röntgenstrukturen fluorierter Proteine als nicht wechselwirkendes "Reporter"-Atom benutzt werden kann, wird durch die diskutierten experimentellen Ergebnisse etwas relativiert. Da aber die Zeitskala der Bewegungen auch bei einem Einbau von Fluor grundsätzlich erhalten bleibt, gewinnt man mit Fluor NMR wichtige Informationen zur Proteindynamik. Durch den Fluoreinbau lassen sich weit geringere Störungen in ein Protein einführen als dies mit Mutationen möglich ist. Aus den Auswirkungen dieser "atomaren Mutation" können weitere Erkenntnisse über die Dynamik von Proteinen gewonnen werden. Fluor NMR kann einen großen Beitrag zur Aufklärung der Proteindynamik leisten, auch bei Proteinen, bei denen konventionelle heteronukleare NMR Studien an ihre Grenzen stoßen.

# Kapitel 6

## cAMP-abhängige Protein Kinase



## 6.1 Einleitung

### Biologischer Hintergrund

Die Steuerung der Aktivität von Proteinen durch Phosphorylierung ist der vorherrschende Mechanismus der Signalübertragung in zellularen Signalketten, die z.B. die Zellproliferation, Stressantwort und Apoptose regeln (siehe Abbildung 6.1). Phosphorylierung und Dephosphorylierung werden von Proteinkinasen und Phosphatasen katalysiert. Meist werden diese Enzyme dabei selbst durch Phosphorylierung gesteuert. Die stufenweise Phosphorylierung in Regelkreisläufen und andere Prozesse zur Signalweitergabe erfordern das exakte Zusammentreffen mehrerer Faktoren, um das Auftreten von Fehlsteuerungen zu vermeiden. Zu den Pathologien, die durch fehlgeleitete Signalweiterleitung entstehen, gehört auch Krebs, da bei den meisten Krebsarten eine oder mehrere Proteinkinasen fehlerhaft aktiviert werden [153].

Die Kontrolle der Aktivität von Proteinkinasen durch Phosphorylierung erfolgt über verschiedene Mechanismen. Phosphorylierung kann zur Bildung von Erkennungsstellen für die Proteinkinase-Proteinsubstrat oder zu einer Proteinkinase-Proteininhibitor Bindung führen. Dies erfolgt üblicherweise über die Wechselwirkung von Phosphotyrosin und einer SH2-Domäne<sup>1</sup>. Phosphorylierung kann auch an Stellen auftreten, an denen sie die Substratbindung blockiert und damit die Kinase inaktiviert. Andere Phosphorylierungsstellen können die Kinase aktivieren: Allen Proteinkinasen ist gemeinsam, dass sie durch die Phosphorylierung der "Aktivierungsschleife" aktiviert werden. Im unphosphorylierten Zustand blockiert sie den Zugang zur ATP Bindungsstelle oder verhindert die Ausbildung einer katalytisch funktionsfähigen aktiven Stelle, wodurch die Kinase deaktiviert wird<sup>2</sup>.

Verschiedene Eigenschaften von Proteinkinasen führen zu Schwierigkeiten bei ihrer Erforschung: Die intrinsische Flexibilität der Proteinkinasen erklärt ihre Neigung zur Bildung von Einschlusskörpern, wenn sie in einem Expressionssystem mit hohem Gewinn überexpressiert werden, und zur Aggregation in Lösung. Außerdem gestaltet sich die Renaturierung meist sehr schwierig. Die Phosphorylierung von rekombinanten Proteinkinasen kann auch an nicht-physiologischen Stellen erfolgen oder findet womöglich gar nicht statt. Die Proteinproben sind meist heterogen in Bezug auf die Phosphorylierungsstellen und das Ausmaß der Phosphorylierung. Die Flexibilität führt auch zu strukturellen Inhomogenitäten. Zusammengefasst

---

<sup>1</sup>Src-Homologie-Domäne Nr. 2: Zur Tyrosin-spezifischen Proteinkinase Src homologer Abschnitt.

<sup>2</sup>aktuelle Übersichtsartikel finden sich in [154, 155]

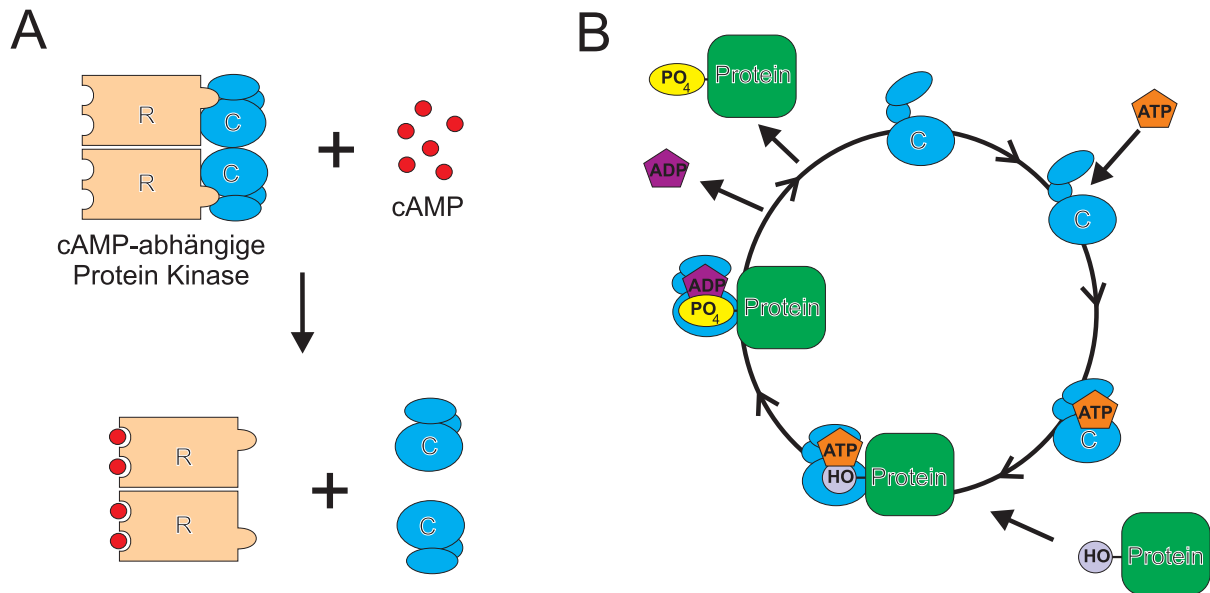


Abbildung 6.1: Funktionsweise der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) besteht aus zwei regulatorischen Einheiten R und zwei katalytischen Einheiten C. Das "second-messenger"-Molekül cAMP setzt die katalytischen Einheiten frei, die dadurch aktiviert werden (A). Dieser Vorgang kann z.B. *in-vivo* mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen YFP-markierten katalytischen Einheiten und CFP-markierten regulatorischen Einheiten von PKA verfolgt werden [156]. Die katalytische Einheit C phosphoryliert andere Proteine (B). Zuerst wird ATP gebunden, wodurch ein Übergang von offenen zur geschlossenen Konformation induziert wird. Nach der Bindung des Zielproteins wird eine Phosphatgruppe von ATP auf das Protein übertragen, das daraufhin wieder freigesetzt wird und der Zyklus von vorne beginnt. Damit wird eine Signalkaskade aufgebaut, die auf kleine Mengen von Botenstoffen mit der Aktivierung einer grossen Anzahl von Zielproteinen reagiert. So genügt z.B. eine Adrenalin-Konzentration von  $10^{-10}$  M im Blut, um in einer Leberzelle  $10^{-6}$  M cAMP freizusetzen, das wiederum auf dem Weg über PKA, Glykogenphosphorylasekinase und Glykogenphosphorylase schliesslich zu einer Freisetzung von  $10^{-2}$  M Glukose führt, was einer Signalverstärkung um den Faktor  $10^8$  entspricht [157].

schränken diese Eigenschaften die Verfügbarkeit von Protein ein, komplizieren die Interpretation von experimentellen Ergebnissen und erschweren die Kristallisation von Proteinkinasen.

### Struktur von PKA

Die katalytische Untereinheit (40 kDa) der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) wurde intensiv mittels Röntgenkristallographie untersucht<sup>3</sup>. PKA zeigt die den Proteinkinasen konservierte Faltung<sup>4</sup>, und besteht aus zwei Domänen (siehe Abbildung 6.2): Die kleinere N-terminale Domäne beinhaltet fünf  $\beta$ -Faltblätter und einer konservierten  $\alpha$ -Helix (C-Helix). Diese Domäne ist über ein Verbindungsstück, das die Purin-Verankerungsstelle der ATP Bindungstasche bildet, mit der größeren, mehrheitlich  $\alpha$ -helikalen C-terminalen Domäne verbunden. Die ATP Bindungstasche befindet sich dabei an der Schnittstelle zwischen den beiden Domänen. Diese Anordnung der zwei Domänen ermöglicht Schanierbewegungen, die ein Öffnen und Schließen der aktiven Tasche erlauben [159]. Das Besondere an PKA sind zwei Segmente, eine zusätzliche N-terminale  $\alpha$ -Helix (A-Helix) und ein C-terminales  $\beta$ -Faltblatt, mit denen die beiden Domänen ineinandergreifen.

Um die volle Aktivität zu erreichen müssen zwei Aminosäuren von PKA, Thr197 und Ser338 phosphoryliert werden. Es wird angenommen, dass Thr197, das wie bei vielen anderen Proteinkinasen auch in der Aktivierungsschleife nahe der aktiven Tasche liegt, PKA aktiviert, indem diese Schleife außerhalb der Bindungstasche verankert wird und den Zutritt des Substrates ermöglicht. Außerdem trägt es zur Strukturierung der katalytisch aktiven Aminosäuren bei. Welche Rolle Ser338 bei der Aktivierung von PKA spielt, ist weit weniger klar. Dennoch deutet die Tatsache, dass eine Ser338Ala Mutante nicht aus *E. coli* isoliert werden konnte, während dies bei der ähnlich phosphorylierbaren Mutante Ser338Glu möglich war [160], auf eine gewisse Funktion von Ser338 hin. Zwei andere Phosphorylierungsstellen in PKA, Ser139 und Ser10, sind wahrscheinlich Artefakte der Expression in *E. coli*. Phosphorylierung [161] oder Mutation [160] von Ser139 hat keinen offensichtlichen Effekt auf die Aktivität oder die Löslichkeit von PKA. Das Verhalten von Ser10 ist komplexer. Es befindet sich in einem Segment, das in den meisten Kristallstrukturen ungeordnet ist. Die Autophosphorylierung erfolgt in Abhängigkeit von einer Deamidierung [162, 163]. Außerdem hat die Phosphorylierung von Ser10 keine Auswirkung auf die PKA Aktivität, obwohl Ser10Ala und Ser10Glu Mutanten in *E. coli* meist unlöslich

---

<sup>3</sup>siehe Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

<sup>4</sup>für einen Vergleich von PKA und CDK2 siehe [158]



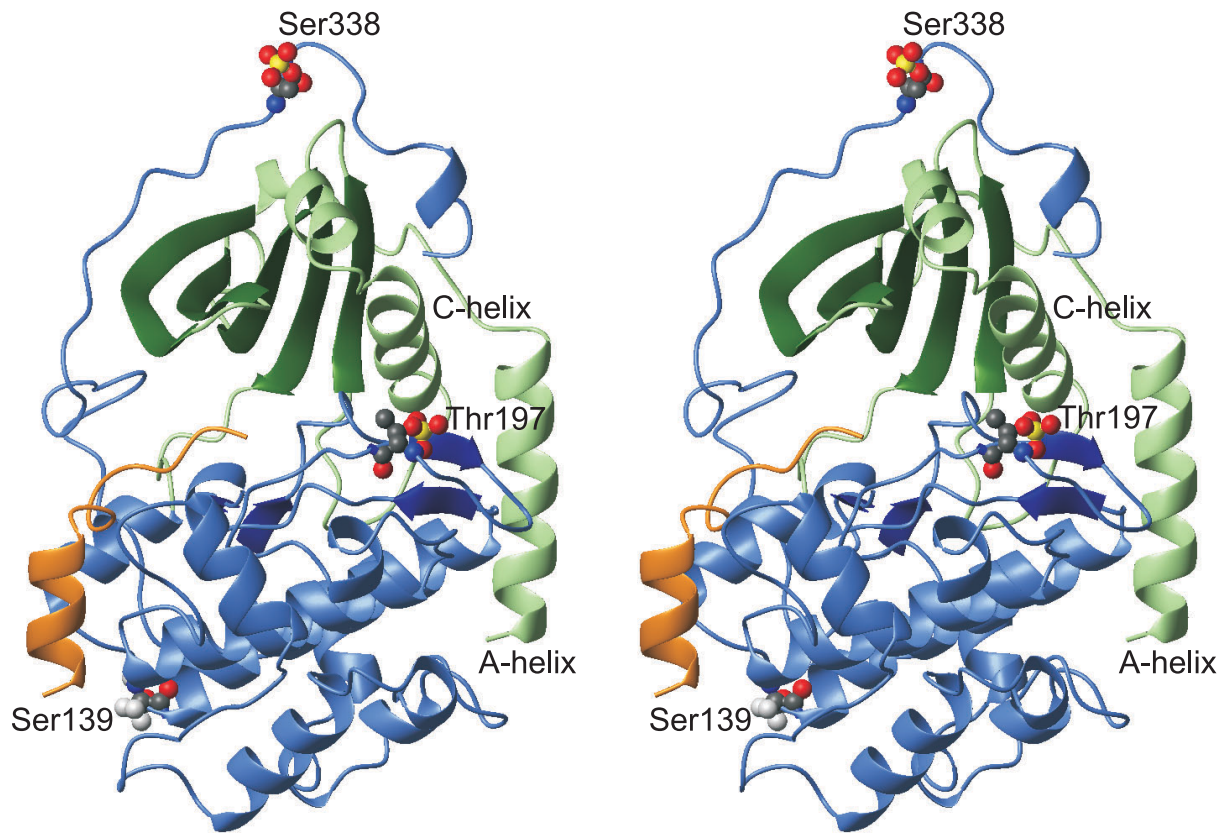


Abbildung 6.2: Struktur der katalytischen Untereinheit von PKA

Die katalytischen Untereinheit von PKA weist die typische Faltung einer Proteinkinase auf, wie sie z.B. auch bei den Kinasen des Zellzyklus (CDKs) auftritt [157]. Die kleinere N-terminale Domäne (grün) besteht hauptsächlich aus  $\beta$ -Faltblättern, der A-Helix und der konservierten C-Helix. Diese Domäne ist mit der grösseren,  $\alpha$ -helikalen Domäne (blau) verbunden. Das Verbindungsstück bildet die Purinbindungsstelle, die zwischen den beiden Domänen liegt. Auffällig ist, dass der C-Terminus, der Ser338 beinhaltet, die N-terminale Domäne umfasst und die N-terminale A-Helix mit der C-terminalen Domäne interagiert. Die Proteinbindungsstelle wird durch ein Inhibitorpeptid (orange) angedeutet. Von den bekannten Phosphorylierungsstellen sind in dieser Struktur Thr197, Ser338 und Ser139 sichtbar. Das in manchen PKA-Präparationen phosphorylierte Ser10 liegt im ungeordneten Teil der A-Helix und bleibt in den meisten Kristallstrukturen unsichtbar. Die Zweidomänenstruktur von PKA erlaubt das Umschalten zwischen offener und geschlossener Konformation. Diese Abbildung wurde auf der Grundlage der Koordinaten 1STC aus der PDB-Datenbank erstellt.

und selbst in der löslichen Fraktion inaktiv sind [160]. PKA Varianten mit einem kürzeren N-Terminus sind aber löslich und aktiv [164, 165]. Die Löslichkeit von PKA Mutanten, die in *E. coli* expremiert werden, ist zudem mit der Phosphorylierung von Thr197 korreliert. Diese Phosphorylierung kann durch Koexpression des Wildtyp-Proteins erreicht werden [166].

### **<sup>31</sup>P NMR Spektroskopie**

Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie sind NMR Techniken, sofern einzelne Resonanzen aufgelöst werden können, gut geeignet, sowohl statische als auch dynamische Eigenschaften in Proteinen zu untersuchen, selbst wenn die Proben in ihrer Zusammensetzung und Struktur heterogen sind. <sup>31</sup>P NMR-Spektroskopie [167] erlaubt die Identifizierung spezifischer Phosphorylierungsstellen, die Analyse der Kinetik von Phosphortransfervorgängen und die Untersuchung dynamischer Vorgänge, bei denen ein Phosphoratom beteiligt ist. Derartige Untersuchungen wurden an Aminosäuren [168], Peptiden [169], alkalischer Phosphatase [170], dem Komplex von G-Aktin mit ATP [171, 172], der Flavoproteinkomponente von *E. coli* Sulfid-Reduktase [173], Troponin T und I aus dem Rinderherzen [174, 175] und anderen Proteinen [176–180] durchgeführt. Einige dieser Studien beschäftigen sich mit der Anwendung der <sup>31</sup>P NMR-Spektroskopie zur Ermittlung der internen Flexibilität z.B. in DNS [181] und Proteinen [180, 182].

<sup>31</sup>P NMR-Spektroskopie besitzt mehrere Vorteile gegenüber <sup>15</sup>N und <sup>13</sup>C Relaxationsstudien, wie sie heute routinemäßig zur Charakterisierung von Proteinbewegungen auf der Piko- bis Millisekunden Zeitskala angewandt werden. Erstens ist keine Isotopenmarkierung notwendig. Zweitens kann bei hohen Feldstärken davon ausgegangen werden, dass die <sup>31</sup>P Relaxation durch den CSA-Mechanismus dominiert wird und somit eine einfache Auswertung der Daten möglich ist [12, 171, 172]. Bei bekanntem CSA-Tensor kann direkt aus den Werten der Relaxationszeit  $T_2$  auf die Korrelationszeit der zugrundeliegenden Bewegung der Phosphoratome geschlossen werden, sofern keine Linienverbreiterung durch Austauschprozesse vorliegt. CSA-Tensoren für verschiedene Phosphorverbindungen wurden bereits bestimmt [183] und können in den <sup>31</sup>P Relaxationsstudien verwendet werden [181, 182]. Falls schneller Konformationsaustausch vorhanden ist, wird die <sup>31</sup>P Linienbreite durch Kombination von interner Bewegung, Rotationsdiffusion des Gesamtmoleküls und Austauschverbreiterung bestimmt. In diesem Fall können Linienbreiten und Korrelationszeiten der Bewegung auftreten, die die Korrelationszeit des Gesamtmoleküls übersteigen [21].

### Dynamische Prozesse in PKA

In PKA existieren eine Vielzahl von dynamischen Prozessen: In Kristallstrukturen konnten Bewegungen der N- und C-terminalen Domänen nachgewiesen werden, die durch die ATP Bindung hervorgerufen werden und die ATP Bindungstasche öffnen oder schließen. Die Bindung von Inhibitoren kann ebenfalls eine Zustandsänderung der ATP Bindungstasche verursachen und darüber hinaus Verschiebungen der Glyzinschleife, die den ATP Phosphor verankert, und anderer Seitenketten hervorrufen [184]. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Anisotropie Messungen wurden die Flexibilitäten von fünf ausgewählten Stellen in PKA untersucht [185].

Die <sup>31</sup>P NMR-Spektroskopie wurde bereits verwendet, um die Substratspezifität und die Reaktionskinetik von Proteinkinasen zu erforschen [186–188]. Die Analyse der Phosphorylierungsstellen einer Proteinkinase mittels <sup>31</sup>P NMR-Spektroskopie wurde bisher nur an der Phosphorylasekinase durchgeführt [176]. Im folgenden wird die Charakterisierung der Anzahl der Phosphorylierungsstellen in verschiedenen PKA-Proben und ihre Flexibilität beschrieben. Weiterhin wird der Effekt von pH-Änderungen, der Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase und der Bindung von AMP-PNP analysiert. Die Ergebnisse werden mit den Erkenntnissen aus den bekannten Kristallstrukturen verglichen, um so die lokale Flexibilität und Zugänglichkeit zu bestimmen.

## 6.2 <sup>31</sup>P NMR Spektroskopie

### 6.2.1 Methoden und Experimente

#### Probenherstellung

Die katalytische C<sub>α</sub> Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase wurde in löslicher Form in *E. coli* expremiert und mit einer PKI 5-24 Affinitätssäule gereinigt [189]. Die unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen wurden mittels Ionenaustauscher Chromatographie getrennt, wobei ein LiCl Gradient von 0 bis 300 mM LiCl Bis-Tris-Propan bei pH 8,5 verwendet wurde. Das Protein wurde vor der Messung durch Zentrifugation mit einer Ultrafree-10kDa (Millipore) Membran auf ca. 12 mg/ml einkonzentriert. Um die NMR Resonanzen zu trennen, wurde der Puffer später auf 5 mM MES-BisTris, 70 mM LiCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT bei pH 6,9 umgestellt.

### NMR Spektroskopie

Die Aufnahme der  $^{31}\text{P}$  NMR Spektren von PKA erfolgte an einem Bruker DRX 600 14,1 T Spektrometer bei einer Temperatur von 300K. Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm  $^1\text{H}$ -X Breitbandprobenkopf ausgestattet. Die Larmorfrequenz von Phosphor beträgt 242 MHz. Die Spektren wurden typischerweise mit einer Frequenzbreite von 8 kHz, 8000 Mittelungen pro FID, 16 k Messzeitpunkten einer Relaxationsdauer von 5 s und Protonentkopplung akquiriert. Vor der Fouriertransformation wurde exponentielle Fensterfunktion (LB 8 Hz) angewandt, um das spektrale Rauschen zu reduzieren. Die chemische Verschiebung wurde auf die Resonanz von freiem Phosphat bei pH 8,5 kalibriert. Die Proton  $T_2$  Relaxationszeiten wurden mit einer Spin-Echo-Sequenz mit variabler Echozeit gemessen. Dabei wirkte der  $180^\circ$ -Puls selektiv auf die Amidprotonen, um den Einfluss der  $\text{H}_\alpha$ - $\text{H}_N$  J-Kopplung zu vermeiden. Die Proton- $T_2$ -Zeit wurde durch Anpassen einer exponentiellen Kurve an die Daten und die Phosphor- $T_2^*$ -Zeit durch Anpassen einer Lorentzfunktion an die jeweiligen Resonanzen ermittelt. Die verschiedenen Beiträge zur Phosphorlinienbreite und damit zur Phosphor- $T_2^*$ -Relaxationszeit können durch  $\Delta\nu = (\pi T_2^*)^{-1} = \pi^{-1}[(T_2^{CSA})^{-1} + (T_2^{DD})^{-1} + (T_2^{inhom})^{-1}]$  beschrieben werden. Der Dipol-Dipol-Term  $T_2^{DD}$  kann bei den verwendeten Magnetfeldstärken gegenüber dem CSA-Term  $T_2^{CSA}$  vernachlässigt werden. Der Beitrag der Magnetfeldinhomogenität zur Linienbreite wurde mittels der Linienbreite von freiem Phosphat und AMP-PNP abgeschätzt und liegt im ungünstigsten Fall in einer Größenordnung von kleiner 1-2 Hz. Dies ist gegenüber den viel breiteren Proteinresonanzen vernachlässigbar. Um die Proteinfaltung zu kontrollieren, wurden vor, während und nach den Experimenten eindimensionale Protonspektren aufgenommen.

### Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase

Vor der Dephosphorylierung wurde ein  $^{31}\text{P}$  Referenzspektrum von 4-fach phosphoryliertem PKA aufgenommen. Zur Einleitung der Dephosphorylierung wurde der Proteinlösung 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  [190] und 0,075 U/ml alkalische Phosphatase (AIP) zugegeben. Ohne zeitliche Verzögerung wurde ein zweites  $^{31}\text{P}$  Spektrum mit identischen Aufnahmeparametern akquiriert. Danach lag aber nur eine unvollständige Dephosphorylierung vor. Deshalb wurde eine weitere identische Portion AIP und zusätzlich 10 mM EDTA zugegeben, und wiederum vier  $^{31}\text{P}$  Spektren aufgenommen. Die effektiven Zeitpunkte dieser Messungen sind durch die Mitte der Akquisitionszeit definiert und betragen 8, 24, 40 und 56 Stunden nach Zugabe von AIP und EDTA.

### Wechselwirkung mit AMP-PNP

Um die Wechselwirkung von PKA mit AMP-PNP zu charakterisieren, wurden 0,45 mM AMP-PNP und 0,9 mM MgCl<sub>2</sub> zu einer 0,4 mM Probe von dreifach phosphoryliertem PKA bei pH 8,5 gegeben. Ein Referenzspektrum von AMP-PNP allein wurde unter denselben Pufferbedingungen wie bei der Proteinprobe aufgenommen. Bei beiden Spektren betrug die Frequenzbreite 16 kHz und es wurden 1536 (AMP-PNP allein) und 10 k (AMP-PNP + PKA) Mittelungen verwendet. Es wurde eine exponentielle Fensterfunktion mit einer Linienverbreiterung von 10 Hz angewendet. Die im Text genannten Linienbreiten sind um diesen Betrag korrigiert.

#### 6.2.2 Signalzuordnung

Die Phosphorylierungsstellen von zwei-, drei- und vierfach phosphoryliertem PKA (2P-, 3P- und 4P-PKA) sind wie folgt beschrieben worden [160]: 2P-PKA (Thr197, Ser338), 3P-PKA (Thr197, Ser338, Ser10) und 4P-PKA (Thr197, Ser338, Ser10, Ser139). Die <sup>31</sup>P NMR Spektren zeigen bei pH 8,5 drei Signale (1,85 ppm, 1,48 ppm und 0,60 ppm), die den Proteinphosphaten zugeordnet werden können (siehe Abbildung 6.3). Nach Skalierung der Spektren auf die Resonanz bei 1,85 ppm, die in allen Spektren in ähnlicher Intensität vorhanden ist, lassen sich die Resonanzintegrale zur Abschätzung der Phosphorylierung heranziehen: Das Verhältnis der Integrale beträgt 1,0 : 0,5 : 1,0 in 2P-PKA, 1,0 : 0,9 : 0,9 in 3P-PKA und 1,0 : 1,9 : 2,6 in 4P-PKA. Unter der Annahme, dass sich diese ungeraden Verhältnisse aufgrund einer unvollständigen Trennung der unterschiedlich phosphorylierten Fraktionen ergeben, können die Resonanzen in den Spektren von 2P-PKA (1,85 ppm; 0,60 ppm), 3P-PKA (1,85 ppm; 1,48 ppm; 0,60 ppm) und 4P-PKA (1,85 ppm; 1,48 ppm; doppelte Resonanz bei 0,60 ppm) zugeordnet werden: Am schmalsten ist in allen Spektren die Resonanz bei 1,48 ppm. In 2P-PKA ist diese Resonanz deutlich reduziert gegenüber den Spektren von 3P- und 4P-PKA. 4P-PKA zeigt eine deutlich stärkere Resonanz bei 0,60 ppm als 2P- und 3P-PKA. Um die Signalüberlappung bei 0,60 ppm aufzulösen, wurde der pH-Wert auf 6,9 gesenkt. Dies führte zu einer deutlichen Trennung der Resonanz bei 0,60 ppm in zwei Signale bei 0,60 ppm und -0,03 ppm (siehe Abbildung 6.4). Das Signal bei 1,48 ppm verschob sich auf 1,07 ppm, während die chemische Verschiebung der Resonanz bei 1,85 ppm und eine der Resonanzen bei 0,60 ppm unverändert blieb. Das Verhältnis der Integrale bei pH 6,9 betrug 1,0 : 1,0 : 0,9 : 0,8.

Die Unterschiede in den Spektren der verschiedenen PKA-Proben, die erkennbaren Flexibilität und die pH-Sensitivität der Signale lassen auf folgende Zuordnung der Signale zu den

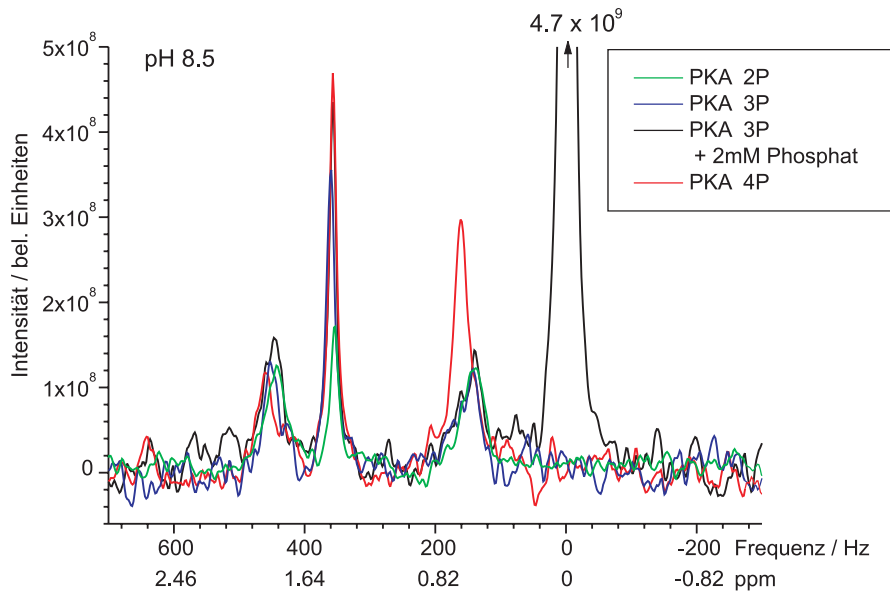


Abbildung 6.3:  $^{31}\text{P}$  NMR Spektren von PKA 2P, 3P und 4P bei pH 8,5

Die Spektren von PKA 2P, 3P und 4P zeigen drei Resonanzen, die in den Proben in unterschiedlichen Verhältnissen vorliegen. Daraus kann auf die Zuordnung der Signale zu den einzelnen Phosphorylierungsstellen geschlossen werden.

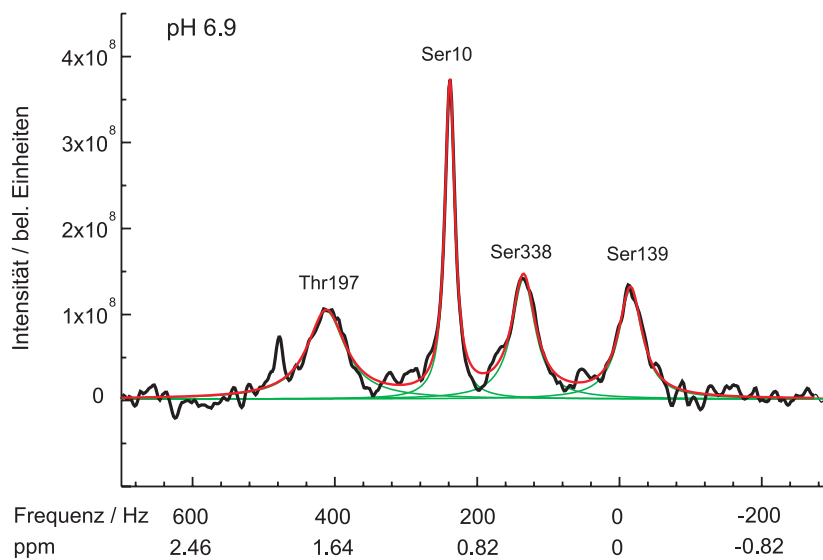


Abbildung 6.4:  $^{31}\text{P}$  NMR Spektrum von PKA 4P bei pH 6,9

Das Spektrum von PKA 4P bei pH 6,9 zeigt getrennte Resonanzen für alle vier Phosphorylierungsstellen. Die Zuordnung beruht auf der im Text angeführten Argumentation. Die an die Resonanzen angepassten Lorentzkurven sind in grün, und die Summe der angepassten Kurven in rot dargestellt.

bekannten Phosphorylierungsstellen [160] schließen: Thr197 (1,85 ppm), Ser10 (1,48 ppm), Ser139 und Ser338 (beide 0,60 ppm). In den Kristallstrukturen ist Ser10 üblicherweise ungeordnet (siehe Tabelle 6.2). Dies legt die Zuordnung von Ser10 zur schmalsten Resonanz bei 1,48 ppm nahe. Außerdem ist diese Resonanz pH-sensitiv, was ebenfalls zu einer Lösungsmittel-exponierten Aminosäure passt. Die Ser10-Resonanz in 2P-PKA stammt wahrscheinlich von einer Verunreinigung mit 3P-PKA in dieser Probe. Die Kristallstrukturen von PKA aus Säugetierzellen zeigen, dass die Phosphatgruppe von Thr197 an die sie umgebenden, geladenen Gruppen gebunden ist, und daher wenig pH-sensitiv, starr und außerdem noch chemisch verschieden von Phosphoserin ist. Dies führt auf die Zuordnung von Thr197 zur Resonanz bei 1,85 ppm. Damit können die verbleibenden Resonanzen bei 0,60 ppm den Phosphatgruppen von Ser338 und Ser139 zugeordnet werden. Eine Kristallstruktur von PKA mit phosphoryliertem Ser139 ist bekannt und zeigt, dass hier keine Wasserstoffbrücken die Phosphatgruppe mit dem Protein verbinden. In vielen PKA Strukturen mit phosphorylierten Ser338 ist die Phosphatgruppe durch ein lokales Wasserstoffbrückennetzwerk mit den umgebenden Aminosäuren (Arg336-Lys342) teilweise vom Lösungsmittel abgeschirmt. Daher kann die relativ pH-insensitive Resonanz bei 0,60 ppm (pH 8,5 und 6,9) Ser338 zugeordnet werden, während die pH-sensitive Resonanz bei 0,60 ppm (pH 8,5) und 0,03 ppm (pH 6,9) höchstwahrscheinlich von Ser139 herrührt. Die beobachtete pH-Sensitivität ist im Einklang mit Messungen an isolierten Phosphoserin [168].

### 6.2.3 <sup>31</sup>P-Relaxation

Die NMR Relaxationsparameter wurden in dem Spektrum von 4P-PKA bei pH 6,9 ermittelt. Die Ergebnisse für die Linienbreiten, die durch Anpassung von Lorentzkurven berechnet wurden, sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Bei hohen Magnetfeldstärken ist der CSA-Mechanismus der dominierende Beitrag zur <sup>31</sup>P Relaxation. Deshalb können die entsprechenden Korrelationszeiten  $\tau_c$  der Bewegung direkt aus den Linienbreiten  $\Delta\nu$  berechnet werden, solange der Einfluss der instrumentellen Magnetfeldinhomogenität vernachlässigt werden kann [171, 172]:

$$\tau_c = \left[ \frac{4}{45\pi} \omega_p^2 (\Delta\sigma)^2 \left( 1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \right]^{-1} \Delta\nu, \quad (6.1)$$

wobei  $\omega_p$  die <sup>31</sup>P Larmorfrequenz,  $\eta$  die Asymmetrie und  $\Delta\sigma$  die Anisotropie des <sup>31</sup>P CSA-Tensors darstellt. Diese Formel gilt für Moleküle mit einer Rotationskorrelationszeit, die nicht in den Grenzfall extremer Linienverschmälerung fällt. Für ein Protein von der Grösse von PKA

Tabelle 6.1:  $^{31}\text{P}$  Relaxation in PKA

Signal	chem. Versch. / ppm	Linienbreite / Hz	$T_2$ / ms	CSA (AMP) $\tau_c$ / ns	CSA (HPA2) $\tau_c$ / ns
THR 197	1.77	$56.7 \pm 2.6$	$5.6 \pm 0.2$	45	90
SER 10	1.07	$8.71 \pm 0.36$	$37 \pm 1$	6.9	14
SER 338	0.66	$32.0 \pm 1.4$	$9.9 \pm 0.4$	25	51
SER 139	-0.03	$32.2 \pm 1.6$	$9.9 \pm 0.4$	25	51

ist diese Annahme in sehr guter Näherung erfüllt. Die berechneten effektiven Korrelationszeiten der Phosphatgruppen hängen stark von dem verwendeten Modell für den CSA-Tensor ab. Da keine gemessenen Werte für den CSA-Tensor in Phosphoserin oder -threonin in der Literatur gefunden werden konnten, wurden zwei bekannte CSA-Tensoren verwendet, die den möglichen Wertebereich für phosphorylierte Aminosäuren umschließen. Zum einen wurde AMP ( $\eta = 0,82$ ,  $\Delta\sigma = 126 \text{ ppm}$  [171, 172]) als Modellschubstanz verwendet, und zum anderen das Phospholipid HPA2 (1-Hexadecyl-2-deoxyglycerophosphorsäure-Monohydrat,  $\eta = 1,001$ ,  $\Delta\sigma = 84,7 \text{ ppm}$  [191]), das als gutes Modell für Phosphormonoester wie Phosphoserin und Phosphothreonin gilt. Die meisten der publizierten CSA-Tensoren streuen um  $\Delta\sigma \approx 100 \text{ ppm}$ , sodass der wahre Wert für Phosphoserin und -threonin zwischen den Werten von AMP und HPA2 liegen wird. Werden die berechneten Werte für  $\tau_c$  mit der Korrelationszeit der Rotationsdiffusion  $\tau_c^{\text{gesamt}}$  des gesamten Proteins verglichen, so kann auf interne Flexibilitäten  $\tau_c < \tau_c^{\text{gesamt}}$  und Austauschverbreiterungen  $\tau_c > \tau_c^{\text{gesamt}}$  geschlossen werden. Durch Messung der Proton- $T_2$ -Zeiten kann eine Abschätzung der Gesamtkorrelationszeit  $\tau_c^{\text{gesamt}}$  durchgeführt werden. Die gemessene Amidproton Relaxationszeit von  $T_2=5 \text{ ms}$  entspricht der oberen Grenze für  $\tau_c^{\text{gesamt}} \approx 40 \text{ ns}$ , wobei die Formel  $\tau_c^{\text{gesamt}} \approx 1/(5 \cdot 10^9 \cdot T_2)$  verwendet wurde [192]. Vergleicht man die Werte in Tabelle 6.1 mit diesem Schätzwert für  $\tau_c^{\text{gesamt}}$ , so fällt auf, dass Ser10 auf jeden Fall eine erhöhte interne Flexibilität und Thr197 höchstwahrscheinlich eine Austauschverbreiterung aufweist, egal welchen CSA-Tensor man zur Berechnung heranzieht.



### 6.2.4 Wechselwirkung mit alkalischer Phosphatase

Zur Untermauerung der Signalzuordnung wurde ein Dephosphorylierungsexperiment mit alkalischer Phosphatase (AIP) durchgeführt (siehe Abbildung 6.5). Dabei verringert sich die Intensität der Resonanz von Ser10 bei 1,3 ppm am schnellsten. Nach 16 Stunden ist die Dephosphorylierung von Ser10 unvollständig, wobei die Resonanz etwas verschoben erscheint. Die Resonanz von Thr197 ändert sich nicht signifikant, wenn man das nicht unerhebliche spektrale Rauschen in Betracht zieht. Die Resonanzen von Ser139 und Ser338 werden leicht verschoben. Eine Resonanz von freiem Phosphat ist nach 16 Stunden noch nicht zu erkennen. Deshalb wurde nochmals AIP zugegeben, diesmal zusammen mit EDTA, das die Phosphatase reaktiviert. Im weiteren Verlauf zeigte sich zunehmende Reduktion und Verschiebung der Resonanzen von Ser10 und Ser139, wobei auch die Möglichkeit besteht, dass statt Ser139 eine neue Resonanz auftaucht, die auf die phosphorylierte Phosphatase zurückzuführen ist. Die Zugabe von EDTA führt zu einer Dephosphorylierung von AIP und damit zum Erscheinen der Resonanz von freiem Phosphat bei -1,1 ppm. Die Signale von Thr197 und Ser338 werden weiter reduziert, aber nicht verschoben. Die Ergebnisse untermauern die Signalzuordnung, da bekannt ist, dass Thr197 und Ser338 einer Dephosphorylierung am stärksten widerstehen können [193].

### 6.2.5 Wechselwirkung mit AMP-PNP

Die Zugabe des nicht-hydrolysierbaren ATP-Derivats AMP-PNP zu 3P-PKA bewirkt im Vergleich zu dem Referenzspektrum das Auftauchen dreier neuer Resonanzen im <sup>31</sup>P NMR Spektrum bei -3,4 ppm, -7,9 ppm und -12,6 ppm (siehe Abbildung 6.6A). Diese Resonanzen können durch Vergleich mit dem aus der Literatur bekannten Spektrum von AMP-PCP [12] dem  $\gamma$  (-3,4 ppm),  $\beta$  (-7,9 ppm) und  $\alpha$ -Phosphoratom (-12,6 ppm) von AMP-PNP zugeordnet werden. Diese Resonanzen zeigen die selbe chemische Verschiebung wie frei in Lösung befindliches AMP-PNP (siehe Abbildung 6.6B), allerdings werden die Signale durch die PKA-AMP-PNP Bindung deutlich verbreitert. Die Dupletts des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphors in freiem AMP-PNP besitzen Linienbreiten von  $(7,0 \pm 0,2)$  Hz,  $(5,3 \pm 0,3)$  Hz ( $\alpha$ ) bzw.  $(17 \pm 1)$  Hz,  $(15 \pm 1)$  Hz ( $\beta$ ). Im Komplex mit PKA kollabieren die Dupletts zu Singletts mit Linienbreiten von  $(69 \pm 5)$  Hz ( $\alpha$ ) und  $(99 \pm 7)$  Hz ( $\beta$ ). Das Singlett der  $\gamma$ -Resonanz verbreitert sich durch die Bindung an PKA von  $(14,1 \pm 0,3)$  Hz auf  $(40 \pm 2)$  Hz. Bei einem 1:1 Verhältnis der Konzentrationen von PKA und AMP-PNP sind keine weiteren Resonanzen von ungebundenem AMP-PNP sichtbar. Die Linienbreite der PKA Resonanz von Thr197 erhöht sich durch die AMP-PNP Bindung von  $(33 \pm 2)$  Hz auf  $(43 \pm 3)$  Hz. Die

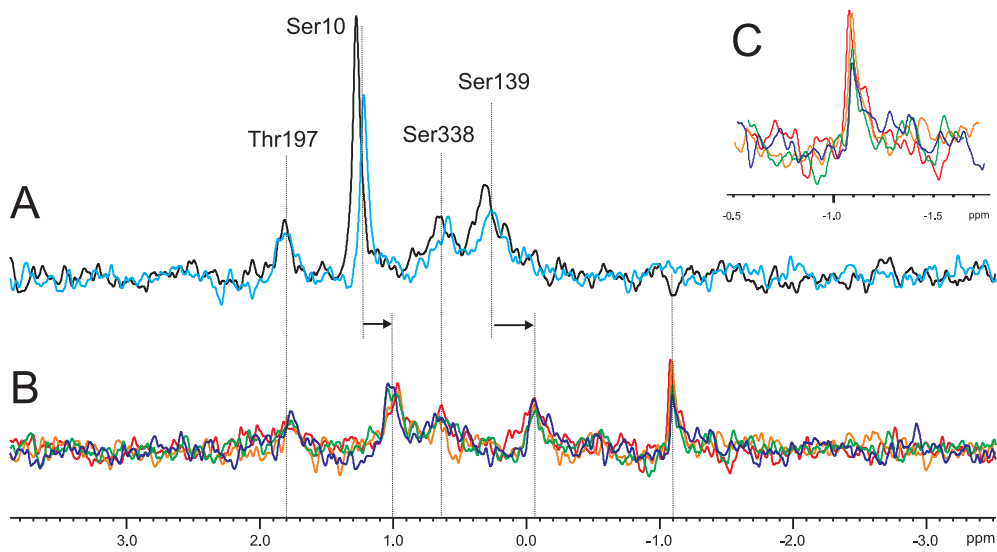


Abbildung 6.5: Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Die  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren (A, B) von PKA während der Reaktion mit alkalischer Phosphatase (AIP) sind in schwarz (vor der Reaktion), blau (nach 8 Stunden), violett (nach erneuter Zugabe von AIP und EDTA, 8 Stunden), grün (24 Stunden), orange (40 Stunden) und rot (56 Stunden) dargestellt. Der Einschub C zeigt das Anwachsen der Resonanz von freiem Phosphat. Der pH während der Reaktion betrug 6,9.

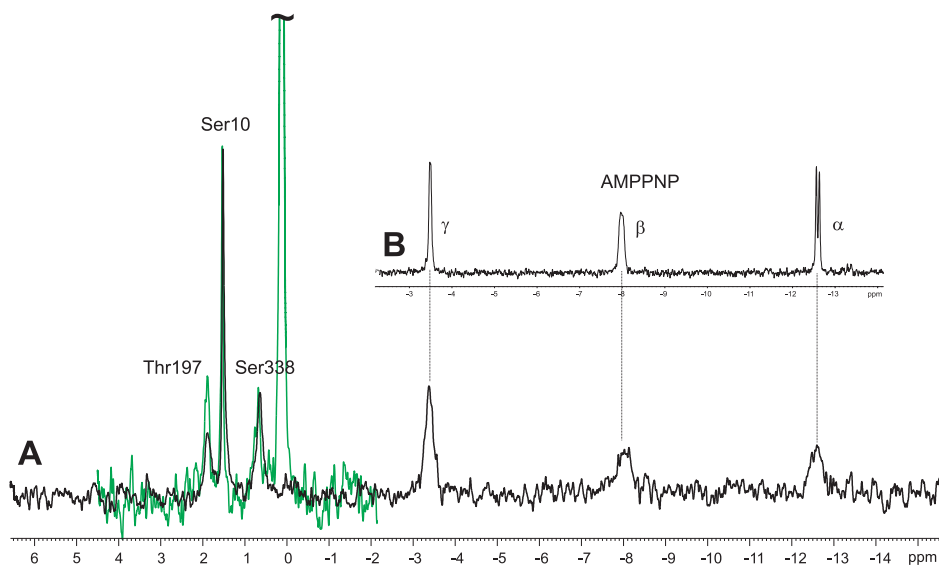


Abbildung 6.6: Bindung von AMP-PNP mit PKA

Die  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren von 3P-PKA nach der Zugabe von AMP-PNP im Verhältnis 1:1 (A, schwarz), das Referenzspektrum von 3P-PKA und freiem Phosphat (A, grün) und das Spektrum von freiem AMP-PNP (Einschub B) zeigen deutlich die Bindung von AMP-PNP and PKA.

PKA Resonanzen von Ser10 und Ser338 sind vor und nach der Bindung an AMP-PNP identisch. Die Veränderung der Thr197 Phosphatgruppe deutet daraufhin, dass sich die Flexibilität der Konformation um Thr197 ändert. Die unveränderten Resonanzen von Ser10 und Ser338, die nicht in der Nachbarschaft der ATP Bindungstasche liegen, unterstreichen die Richtigkeit der Signalzuordnung.

## 6.3 Diskussion

### 6.3.1 Signalzuordnung

Basierend auf den Unterschieden in den Spektren der 2P-, 3P- und 4P-PKA Proben, auf den Auswirkungen der Dephosphorylierung und aufgrund der AMP-PNP Bindung können die Signale eindeutig den jeweiligen phosphorylierten Aminosäuren zugeordnet werden. Die Zuordnung von Thr197 zur Resonanz bei 1,85 ppm und von Ser338 zur Resonanz bei 0,60 ppm beruht auf mehreren Überlegungen: Erstens ist zu erwarten, dass aufgrund der chemischen Verschiedenheit von Serin und Threonin kein Signalüberlapp auftritt. Zweitens deutet die Veränderung der Linienbreite der Resonanz bei 1,85 ppm durch die AMP-PNP Bindung auf einen geringen Abstand zur Bindungstasche hin. Und drittens sind beide Signale wenig sensitiv auf pH-Veränderungen, was dem dichten Wasserstoffbrückennetzwerk der Phosphatgruppen von Thr197 und Ser338 entspricht (siehe Abbildung 6.7A,B). Die Zuordnung von Ser10 zu der schmalen Resonanz bei 1,48 ppm ist im Einklang mit dem ungeordneten Zustand dieser Aminosäure in allen bekannten Kristallstrukturen. Die teilweise Phosphorylierung dieser Resonanz in der 2P-PKA Probe stimmt mit Daten überein, die auf eine *in-vitro* Autophosphorylierung von Ser10 hindeuten [162]. Die Zuordnung von Ser139 zu der pH-sensitiven Resonanz bei 0,60 ppm passt zu der Lösungsmittel-exponierten Lage von Ser139 (PDB: 2CPK) [194] und der Verteilung der Signalintensitäten zwischen den verschiedenen PKA-Proben.

### 6.3.2 Flexibilität

Wie in Tabelle 6.1 dargestellt, zeigen die Phosphatgruppen von Thr197, Ser139, Ser338 und Ser10 in absteigender Reihenfolge immer kürzere Korrelationszeiten der Rotationsbewegung. Die numerischen Werte der Korrelationszeiten sind stark vom gewählten Modell für den CSA-Tensor abhängig. Deshalb wurden zwei Modelle gewählt, die den möglichen Wertebereich einklammern. Die effektive Korrelationszeit von Thr197 liegt im Bereich von 45 ns bis 90 ns, die

Tabelle 6.2: Veröffentlichte Röntgenstrukturen von PKA

PDB ID	Beschreibung	Nominelle Auflösung	Phosphorylierte Aminosäuren	Modellierte Phosphorylierung (mittlerer Phosphor B-Faktor in Å <sup>2</sup> )	modellierter N-Terminus (B-Factor)	Bemerkung
1BKX	PKA (Maus) Adenosin (ATP)	2.6	10 197 338	197(60) 338(90)	Q12(70)	
1BX6	PKA (Maus) Balanol (ATP)	2.1	197 338	197(30) 338(80)	Q12(60)	
1APM	PKA (S139A, Maus), PKI (5-24), MEGA-8	2.0	10 197 338	10(100) 197(20) 338(50)	S10 (Seitenkette 100, Rückgrat 40)	Einige Atome, inclusive des Phosphors, von S10 besitzen B-factor 99.99
1CMK	PKA (Schwein) PKI (5-24, iodiert)	2.9	197 338	197(-) 338(-)	G1(-)	Keine B-Faktoren verfeinert
1CTP	PKA (Schwein) PKI (5-24, di-iodiert)	2.9	197	197(20)	K7(40)	
2CPK	PKA (Maus) PKI(5-24)	2.7	139 197 338	139(70) 197(10) 338(40)	V15(60)	pSER 139 hat keine Wasserstoffbrücke zum Protein
1ATP	PKA (Maus) PKI (5-24), MgATP	2.2	197 338	197(30) 338(60)	V15(60)	
1JLU	PKA (Maus) Inhibitor, N-OCTANE	2.25	197 338	197(20) 338(50)	Q12(100)	
1JBP	PKA (Maus) ADP, N-OCTANE	2.2	10 197 338	10(90) 197(10) 338(50)	G9(70)	Einige Atome der Reste 9 und 10 haben B-Faktor 99.99
1FOT	PKA (Hefe)	2.8	197	197(60)	N-terminale alpha helix und Teil der alpha-beta Verbindung abgeschnitten	C-terminales Verbindungsstück ungeordnet, andere Säugetier-PKA Phosphorylierungsstellen fehlen in der Sequenz, Position äquivalent zu Ser338 liegt nahe der Einfügung und ist unterschiedlich gegen KcD gepackt, befindet sich aber in ähnlicher Lage, Phosphor der Aktivierungsschleife ist flexibler
1FMO	PKA (Maus, Hase) Inhibitor Protein	2.2	197 338	197(20) 338(60)	E13(90)	Einige Rückgratatome von Rest 19 besitzen B-Faktor 100
1STC	PKA (Rind), Staurosporin	2.3	197 338	197(30) 338(60)	V15(50)	
1CDK	PKA (Schwein) PKI, AMP-PNP	2.0	197	197(30,20)	K8(50,80)	Zwei Ketten in asymmetrischer Einheitszelle
1YDR	PKA (Rind)	2.2	10	197	V15	
1YDS		2.2	197	(10,10,20)	(40,30,50)	
1YDT	PKI, H-Inhibitoren	2.3	338	338 (50,50,50)		

Literaturstellen zu den genannten Strukturen: 1BKX [195], 1BX6 [196], 1APM [197], 1CMK [198], 1CTP [199], 2CPK [194], 1ATP [200], 1JLU/1JBP [201], 1FOT [165], 1FMO [202], 1STC [184], 1CDK [203] und 1YDR/1YDS/1YDT [189].

von Ser139 und Ser338 bei 25 ns bis 50 ns und die von Ser10 bei 7 ns bis 14 ns. Diese Ergebnisse spiegeln im großen und ganzen die bekannten Werte der Temperaturfaktoren in den verfeinerten PKA Kristallstrukturen wieder (siehe Tabelle 6.2). Ausgehend von der theoretischen Beziehung der verfeinerten B-Faktoren zu den mittleren atomaren Verschiebungen  $\Delta u$

$$B = \frac{8}{3}\pi^2 \langle \Delta u^2 \rangle \quad (6.2)$$

wurden in den Kristallstrukturen mittlere Abweichungen der Phosphatgruppen von den Gleichgewichtspositionen von 0,9Å ( $B \approx 20\text{Å}^2$ ) für Thr197, von 1,5Å ( $B \approx 60\text{Å}^2$ ) für Ser338, von 1,6Å ( $B = 70\text{Å}^2$  in 2CPK) für Ser139 und von mehr als 1,9Å für Ser10 ( $B$  auf  $100\text{Å}^2$  gesetzt, sofern überhaupt modelliert) gefunden.

Für PKA (40 kDa) wurde mit Hilfe der Stokes-Einstein Gleichung die Korrelationszeit der Rotationsdiffusion mit ungefähr 20 ns abgeschätzt [130], wobei eine Abweichung von einer sphärischen Geometrie diesen Wert noch verlängern kann. Mit Fluoreszenz-Anisotropie Messungen wurde für PKA eine Korrelationszeit der Rotationsdiffusion von 25 ns ermittelt [185]. Die Abschätzung dieser Gesamtkorrelationszeit aufgrund der Messung der transversalen Protonrelaxation ergibt eine obere Grenze von 40 ns in den stark konzentrierten NMR Proben. Trotz der hohen Proteinkonzentration lassen die Proton-1D-Spektren auf eine geringe Tendenz von PKA zur Aggregation schließen. Aufgrund der vielfältigen Einflüsse auf die Protonrelaxation kann der Wert von 40 ns als eine Abschätzung der oberen Grenze für die Gesamtkorrelationszeit betrachtet werden und widerspricht somit nicht den genannten, kürzeren Werten. Erst die Analyse der  $^{15}\text{N}$  Relaxation in PKA kann hier wirklich Klarheit schaffen. Dennoch lassen sich aufgrund dieser ersten Abschätzung folgende Schlussfolgerungen ziehen:

Die Korrelationszeit von Thr197 ist auf jeden Fall länger als die Gesamtkorrelationszeit des Proteins, was auf die Existenz eines Austauschprozesses auf der Mikrosekunden bis Millisekunden Zeitskala und der daraus resultierenden Austauschverbreiterung schließen lässt. Die Phosphoratome von Ser139 und Ser338 sind relativ starr in das Protein eingebunden, da ihre Korrelationszeit ungefähr der des Gesamtmoleküls entspricht. Im Gegensatz dazu besitzt Ser10, unabhängig vom verwendeten Modell für den CSA-Tensor, eine Korrelationszeit, die wesentlich kürzer als die des Proteins ist, was auf einen hohen Grad an Flexibilität dieser Phosphatgruppe hindeutet.

Beim Vergleich der Flexibilitäten, die mittels NMR und Röntgenkristallographie ermittelt wurden, muss allerdings berücksichtigt werden, dass schnelle Translationsbewegungen, die zu den B-Faktoren beitragen, nur einen geringen Beitrag zur CSA-Relaxation leisten, da diese

hauptsächlich durch Rotationsbewegungen verursacht wird. Vor allem bei Ser338, das mit Wasserstoffbrücken eng an das Protein gebunden ist, können sich Abweichungen der mit beiden Methoden gefundenen Flexibilitäten ergeben. Trotzdem zeigen die Methoden für PKA dasselbe Bild, sofern man berücksichtigt, dass die Dynamik eines Konformationsaustausches, wie sie ohne Probleme mit NMR beobachtet werden kann, in der Röntgenkristallographie nicht direkt zugänglich ist.

### 6.3.3 Flexibilität und Funktion

#### Offene und geschlossene Zustände

Es ist bekannt, dass in Proteinkinasen eine Vielzahl von dynamischen und plastischen Flexibilitäten auftreten, unter anderen Liganden-induzierte Seitenkettenbewegungen, Umorientierung der Glyzin-reichen Schleife in der ATP-Bindungstasche (siehe Abb. 6.7C), Rückfaltungsübergänge der Aktivierungsschleife als Funktion der Phosphorylierung und der Wechsel zwischen offenen und geschlossenen Konformationen der N- und C-terminalen Domänen<sup>5</sup>. Die offenen und geschlossenen Konformationen beider Domänen stehen im Zusammenhang mit der Liganden-, Substrat- und Inhibitorenbindung und sind deshalb wichtig für die Assoziierung von ATP und die Dissoziierung von ADP. In Kristallstrukturen von PKA erkennt man offene, geschlossene und intermediäre Zustände. Die geschlossenen Zustände treten typischerweise bei gebundenem ATP oder ATP Mimetika auf, während die offenen Zustände in Kristallstrukturen ohne ATP sichtbar sind und die intermediären Zustände bei nicht-physiologischen PKA-Inhibitor Komplexen beobachtet werden. Insbesondere die nicht-komplexierte katalytische Untereinheit von PKA liegt in Lösung wahrscheinlich im Gleichgewicht zwischen verschiedenen Konformationen vor [198]. Da bis heute keine Struktur von unphosphoryliertem PKA zur Verfügung steht, konnte die genaue strukturelle Rolle der aktivierenden Phosphorylierung nicht ermittelt werden. Im allgemeinen sorgt die Phosphorylierung einer Aminosäure im Aktivierungssegment des Enzyms für die richtige Orientierung der katalytischen Aminosäuren [203] und, vielleicht noch wichtiger, für die Bildung der P+1 Substratbindungsstelle am C-terminalen Ende des Aktivierungssegments [204, 205]. Beim Übergang von der offenen zur geschlossenen Konformation treten Änderungen im Wasserstoffbrückennetzwerk von Phosphothreonin Thr197 auf [159]. Im geschlossenen Zustand existiert eine Wasserstoffbrücke zwischen der Phosphatgruppe von Thr197 und der Seitenkette von His87, die vermutlich dazu beiträgt, die C-Helix (Aminosäuren

---

<sup>5</sup>Für Übersichtsartikel und Literaturstellen dazu siehe [154, 155]

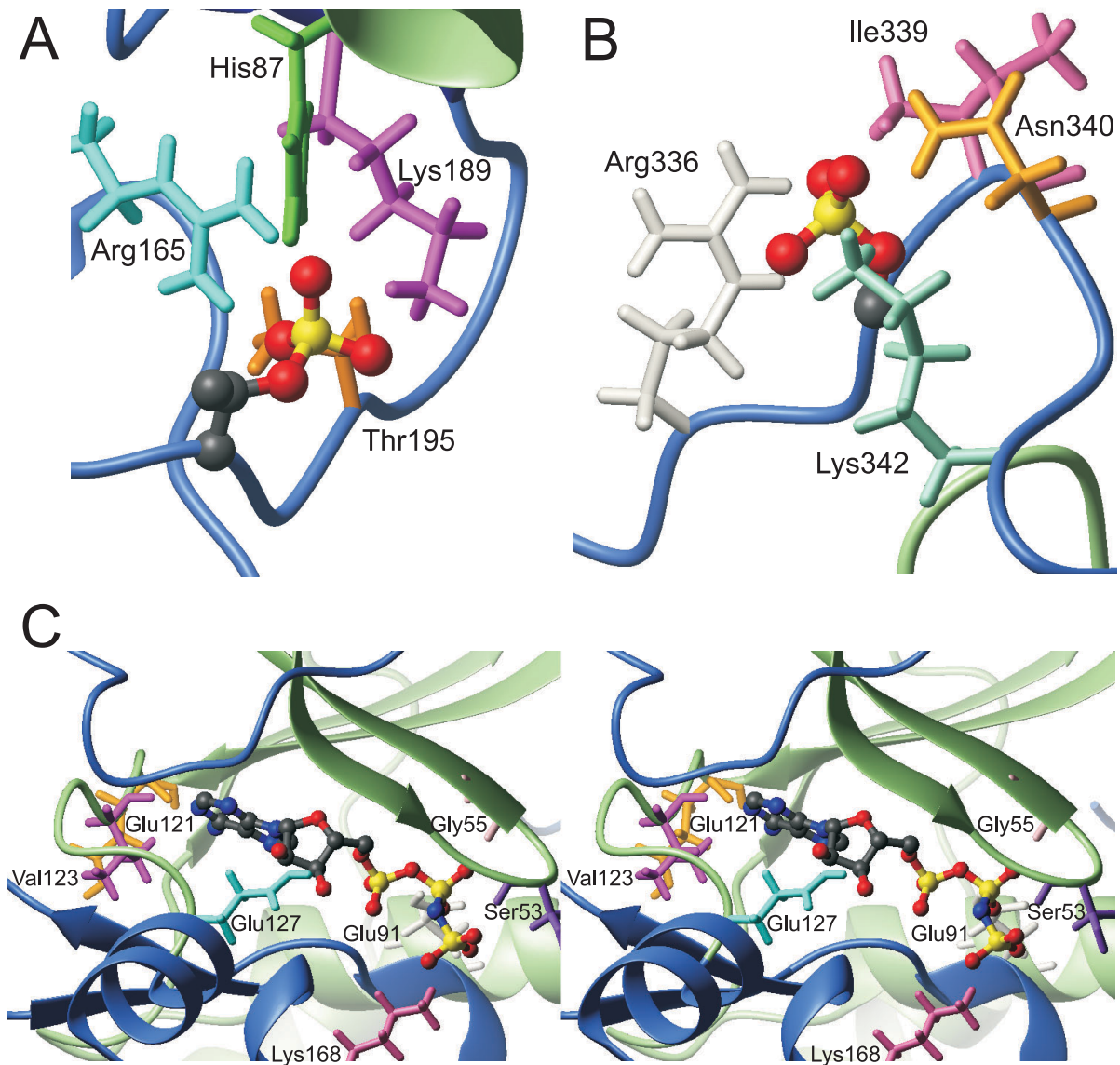


Abbildung 6.7: Phosphorylierungsstellen in PKA und AMP-PNP Bindungstasche

Die Proteinumgebung von Thr197 (A), Ser338 (B) und ein Stereobild der AMP-PNP Bindungstasche (C) sind dargestellt. A und B zeigen PKA im Komplex mit Stauosporin (PDB: 1STC), während C auf der Struktur von PKA im Komplex mit PKI und AMP-PNP beruht (PDB: 1CDK). Thr197 interagiert hauptsächlich mit den Aminosäuren Arg165, His87 und Lys189. Der Abstand von Thr197 zu His87 gilt als Maß für die offene oder geschlossene Konformation des Proteins. Die Phosphatgruppe von Ser338 ist über Wasserstoffbrücken mit den benachbarten Aminosäuren Arg336, Ile339, Asn340 und Lys342 verbunden. Die AMP-PNP Bindungstasche liegt zwischen den beiden Domänen von PKA. AMP-PNP wechselwirkt vorrangig mit den Aminosäuren Ser53, Gly55, Glu91, Glu121, Val123, Glu127 und Lys168. Gly55 gehört zur im Text erwähnten Glyzin-reichen Schleife. His87 und Glu91 sind Bestandteil der C-Helix.

84-97) in die katalytisch aktive Konformation zu bringen. Beim Übergang in den offenen Zustand wird diese Wasserstoffbrücke aufgebrochen, während sich N- und C-terminale Domäne voneinander entfernen. Diese direkte Beteiligung von Thr197 an dem Konformationsübergang ist höchstwahrscheinlich die Ursache für die beobachtete Austauschverbreiterung der  $^{31}\text{P}$  NMR Resonanz von Thr197. Da, wie schon erwähnt, keine Struktur von nicht oder einfach phosphoryliertem PKA vorliegt, bleibt die genaue Struktur beider Zustände spekulativ. Die intrinsische Dynamik dieser Konformationen erklärt die bekannten Schwierigkeiten bei der Kristallisation von nicht-phosphoryliertem PKA. Die bekannten Kristallstrukturen stellen womöglich nur eingeforene Konformationen dar. Um die genauen Vorgänge bei dem Konformationswechsel zu klären, sind weitere Studien an PKA in Lösung notwendig.

### N-Terminus

Im N-Terminus von PKA treten verschiedenartige ko- und posttranslationale Modifikationen auf, wie beispielsweise Myristillierung der N-terminalen Glyzine und die Deamidierung von Asn2 zu Asp2 und Iso-Asp2 in einem Drittel der C $\alpha$  und C $\beta$  Enzympopulation aus Säugetierzellen [163, 206]. Die Phosphorylierung von Ser10 wurde bis jetzt jedoch nicht in Enzymproben festgestellt, die aus Säugetierzellen extrahiert wurden. Die Deamidierung von Asn2 führt allerdings *in-vitro* bei Zugabe von MgATP zu einer Phosphorylierung von Ser10 [162], d.h. die Struktur der zweiten N-terminalen Aminosäure bestimmt den Substratcharakter von Ser10. Verschiedene andere Hinweise legen nahe, dass die Phosphorylierung von Ser10 eine physiologische Rolle spielt. So besitzt die Proteinkinase SRC ein ähnliches Myristillierungsmotiv in seinem N-Terminus, in dem sich auch eine Phosphorylierungsstelle befindet, die die Loslösung von Membranen kontrolliert [207]. Sowohl Deamidierung [208] als auch (De)Phosphorylierung sind Kennzeichen eines "elektrostatischen Myristoylschalters" [209]. Myristilliertes PKA in einem regulatorischem PKA-RII Komplex bindet *in-vitro* an Mizellen, höchstwahrscheinlich indem die RII Bindung strukturelle Veränderungen in der katalytischen Domäne verursacht [210]. Die Phosphorylierungsstelle und die Aminosäuren, die mit der RRxS Konsensussequenz der PKA Phosphorylierung kompatibel sind, sind in allen Tierspezies und Proteinisoformen hochgradig konserviert [211]. Keine der bekannten PKA Strukturen ist am N-Terminus vollständig geordnet. Die Struktur am Anfang der A-Helix hängt von der Myristillierung oder der Anwesenheit eines Detergenz ab, wobei in beiden Fällen die Struktur ab Ser10 geordnet wird. In Abwesenheit einer Myristillierung oder eines Detergenz beginnt die A-Helix eine Umdrehung später. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Ser10 in Peptiden zu einer Destabilisie-



rung der Schleifenstruktur (unter polaren Bedingungen) oder der Helixstruktur (unter apolaren Bedingungen) führt [212]. Diese Einzelbeobachtungen haben noch nicht zu einem vollständigen Überblick über die physiologische Rolle der Myristillierung, Ser10 Phosphorylierung und der Flexibilität des N-Terminus geführt.

### **C-Terminus**

Die Funktion und der Aktivierungsmechanismus von Ser338 sind bis jetzt ungeklärt. Es wurde vorgeschlagen, dass Ser338 den C-Terminus auf der Oberfläche der kleinen Domäne verankert [159], obwohl die Kristallstrukturen keinen Hinweis auf eine direkte Wechselwirkung der Phosphoryl-Gruppe von Ser338 mit Aminosäuren aus der N-terminalen Domäne geben. Das Netzwerk der Wasserstoffbrücken mit benachbarten Aminosäuren kann allerdings dazu beitragen, das Segment um Ser338 zu strukturieren und die Bindungsaffinität mit der N-terminalen Domäne zu beeinflussen. Die geringe Flexibilität von Ser338, wie sie in dieser Studie gefunden wurde, und die im allgemeinen konservierte Struktur in dieser Region unterstützen die Interpretation, dass dieser Proteinabschnitt an der N-terminalen Domäne verankert ist. Man könnte über eine Rolle in Protein-Substrat-Erkennung spekulieren, aber dafür gibt es keine experimentellen Beweise.

### **Dephosphorylierung**

Es wurde gezeigt, dass Ser10 und Ser139 am schnellsten durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert werden. Dies ist im Einklang mit ihrer großen Empfindlichkeit auf pH-Änderungen und führt zu einem in sich stimmigen Bild ihrer Flexibilität und Zugänglichkeit. Sowohl Ser10 als auch Ser139 haben im Gegensatz zu Thr197 keine klare physiologische Bedeutung. Die geringere Empfindlichkeit von Ser338 für Dephosphorylierung ist seit langem bekannt [193,213]. Eine höhere Empfindlichkeit für die Phosphatasewirkung bei Ser10 und Ser139 beeinträchtigt auch die Möglichkeit, eine physiologische Rolle *in-vivo* aufzudecken, besonders wenn eine schnelle Phosphatasewirkung physiologisch notwendig ist, um kurzlebige Signale zu unterdrücken.

### **Bindung von AMP-PNP**

Obwohl Thr197 nicht direkt in die AMP-PNP Bindung involviert ist, wird die <sup>31</sup>P Resonanz von Thr197 bei der Bindung von Thr197 verbreitert. Dies deutet auf eine Auswirkung der AMP-PNP

Bindung auf die Konformationseigenschaften benachbarter Proteinsegmente hin. Man könnte die Linienverbreiterung zuerst auf eine verringerte Flexibilität der Thr197 Phosphatgruppe zurückführen. Die Kristallstrukturen von PKA zeigen, dass die geschlossene und die offene Domänenorientierung mit der An- oder Abwesenheit eines Liganden in der ATP Bindungstasche korreliert sind. Der Übergang von dem offenen zum geschlossenen Zustand wird von einer Erweiterung der Thr197 Phosphat–Arg165–Lys189 Wechselwirkung um His87 begleitet (siehe Abb. 6.7). Dies würde eine verringerte Flexibilität der Phosphatgruppe von Thr197 durchaus erklären. Wie allerdings schon zuvor erwähnt wurde, liegt die Korrelationszeit der Bewegung von Thr197 deutlich über der Korrelationszeit der Rotationsdiffusion des Gesamtproteins, was einen deutlichen Hinweis auf die Anwesenheit einer Austauschverbreiterung liefert. Die Resonanzverbreiterung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Veränderung der Zeitskala der Konformationsfluktuationen, der chemischen Verschiebung oder der Relaxationseigenschaften der beteiligten Zustände zurückgeführt werden. Die naheliegendste Erklärung für die Beobachtungen ist, dass die Bindung von AMP-PNP den Austausch verlangsamt und ihn damit aus dem Bereich des schnellen Austausches näher an den Koaleszenzpunkt, d.h. den Punkt maximaler Verbreiterung, heranbringt.

### 6.3.4 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Reihenfolge der mit  $^{31}\text{P}$  NMR bestimmten Flexibilitäten von Ser10, Ser139 und Ser338 mit der Reihenfolge der entsprechenden b-Werte in den Kristallstrukturen übereinstimmt. Bei dem für die katalytische Funktion wichtigen Phosphothreonin 197 zeigt sich aber eine entscheidende Abweichung: Trotz der geringen Flexibilität in den Kristallstrukturen ist die Phosphatgruppe von Thr197 von PKA in Lösung von einem Konformationsaustausch betroffen. Dieser Austausch findet höchstwahrscheinlich zwischen der offenen und geschlossenen Konformation von PKA statt. Weiterhin beeinflusst die Bindung von Liganden die dynamischen Eigenschaften von Thr197.  $^{31}\text{P}$  NMR kann folglich dazu dienen, die bekannten Modelle für die Funktionsweise von PKA und allgemein von Proteinkinasen wesentlich zu verfeinern.

# Kapitel 7

## Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt unterstreicht diese Arbeit zum einen die Bedeutung von Austauschprozessen für die Funktion von Proteinen und zum anderen zeigt sie die Möglichkeiten, die die NMR-Spektroskopie bietet, um derartige Prozesse zu erforschen. Der Zusammenhang von Austauschprozessen und kollektiven Proteinbewegungen mit der Funktion von Proteinen hat dabei gerade in letzter Zeit einige Aufmerksamkeit auf sich gezogen [8, 10, 51]. Und gerade die NMR Spektroskopie an Proteinen ist prädestiniert hier einen großen Beitrag zu leisten, sofern bei den jeweils untersuchten Proteinen das Zuordnungsproblem lösbar ist. Falls dies mit konventionellen heteronuklearen Methoden zu schwierig ist, bleibt aber stets die Möglichkeit, geeignete Markierungsstrategien und Proteinmutanten zur Zuordnung zu verwenden.

Dies zeigt sich beispielsweise am Grün-fluoreszierenden Protein GFP. An GFP konnte nämlich zum ersten Mal experimentell gezeigt werden, dass trotz einer generell starren Proteinstruktur Konformationsfluktuationen auftreten, die besonders deutlich zu Tage treten, wenn die Aminosäure Histidin 148 gegen Glyzin ausgetauscht wird. Außerdem wurde mittels NMR bestätigt, dass GFP in Lösung nicht als Monomer vorliegt. An der GFP-Variante CFP konnte ein langsamer Austauschprozess auf der Millisekunden-Zeitskala im oder nahe dem CFP-Chromophor nachgewiesen werden. Dieser Austauschprozess zeigt eine für kollektive Bewegungen in Proteinen typische Entropie-Enthalpie-Kompensation. Die an GFP und CFP gewonnenen Erkenntnisse helfen, neue, verbesserte Varianten von GFP herzustellen. Besonders die Erkenntnis, dass H148 eine wichtige Rolle für die Gesamtstabilität des Proteins spielt, eröffnet interessante Optimierungsmöglichkeiten. Es sollte möglich sein, durch Veränderung der Aminosäuren, die in der Umgebung von Histidin 148 liegen, Austauschprozesse im Proteinerückgrat zu unterdrücken und damit die Stabilität des Proteins zu erhöhen und die Fluoreszenzeigenschaften zu

verbessern. Sicherlich werden sich noch weitere Optimierungsmöglichkeiten ergeben, sobald durch Verwendung neuer, optimierter Methoden [123,214] auch der Chromophor von GFP den entsprechenden NMR Resonanzen zugeordnet ist.

Viele Fragen im Zusammenhang mit GFP und seinen Strukturverwandten bleiben allerdings weiterhin bestehen: Gibt es z.B. einen gemeinsamen Vorfahren von so unterschiedlichen Proteinen wie GFP, DsRed aus der Koralle *Discosoma*, den Chromoproteinen aus *Anemonia sulcata*, Nidogen-1 und den Proteinen in der äußeren Membran (Omp [215])? Zwischen den ersten drei chromophortragenden Proteintypen gibt es immerhin noch eine gewisse Funktions- und Sequenzverwandschaft. Woher kommt aber die enge Strukturverwandschaft mit dem am Membranaufbau beteiligten Nidogen-1 und die Ähnlichkeit zu den Omp-Membranproteinen? Gibt es gemeinsame Merkmale in der Dynamik dieser Proteine? Die Forschung an GFP und seinen Verwandten bietet also auch in Zukunft, neben den rein anwendungsorientierten Fragestellungen, ein interessantes Betätigungsfeld für Grundlagenforschung.

Im Fall von PKA konnten Hinweise gesammelt werden, dass die für die katalytische Funktion wichtige Phosphoaminosäure Threonin 197 ebenfalls von einem Konformationsaustausch betroffen ist. Dies steht höchstwahrscheinlich in Zusammenhang mit dem Wechsel von offener und geschlossener Konformation, der durch die Bindung eines ATP-Derivats induziert wird. Das Verständnis der dynamischen Eigenschaften von PKA hilft bei dem Entwurf von neuen Inhibitoren für diese Proteinkinase und kann so zum Auffinden neuer medizinisch verwendbarer Wirkstoffe beitragen.

Für eine vollständige Charakterisierung der internen Beweglichkeit der Phosphatgruppen in Proteinen über die volle Zeitskala von Pikosekunden bis Sekunden ist die Aufnahme eines kompletten Satzes an Relaxationsdaten, inklusive  $^{31}\text{P}$   $T_1$ ,  $T_2$  und hetNOE, notwendig. Dies ist aber häufig aufgrund begrenzter Proteinstabilität und Proteinproduktion nicht möglich. Aber selbst die  $^{31}\text{P}$  NMR Linienformanalyse, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, liefert in kurzer Zeit verfügbare und sehr interessante Informationen über die Phosphorylierung, deren Homogenität, die Zugänglichkeit der Phosphatgruppen für das Lösungsmittel und die scheinbaren Flexibilitäten. Weiterhin können mit  $^{31}\text{P}$  NMR Spektroskopie die Auswirkungen der Komplexbildung mit Kofaktoren und anderer Modifikationen erforscht werden. In Bezug auf PKA kann man mit diesen Methoden sicher die Ereignisse genauer studieren, die die Flexibilität des N-Terminus kontrollieren und die mit der Ligandenbindung zusammenhängen. Mit der Hilfe von  $^{15}\text{N}$  NMR Relaxationsmessungen kann auch die Korrelationszeit der Rotationsdiffusion von PKA präzisiert werden, was eine detaillierte Diskussion der Phosphatkorrelationszeiten ermöglicht.

Trotz der faszinierenden Ergebnisse, die mit NMR erzielt werden können, unterliegt die Anwendbarkeit dieser Methode gewissen Beschränkungen. Die wohl stärkste Beschränkung stellt immer noch die relativ geringe Sensitivität dieser Methoden und die damit verbundene Notwendigkeit sehr großer Proteinkonzentrationen dar. Auch wenn durch Kryoprobeköpfe das Signal-zu-Rauschen Verhältnis (SNR) um etwa den Faktor 2-3 gesteigert werden kann und höhere Magnetfelder auch einige Prozent an Verbesserung erbringen, bleibt ein großes Interesse an einer Verbesserung der Sensitivität. Ein weiterer, in den letzten Jahren intensiv diskutierter Ansatz liegt in der Verwendung neu entworfener Pulssequenzen, insbesondere der Methode der NMR-Spektroskopie mit optimierter transversaler Relaxation (TROSY).

Die Untersuchung der TROSY-Methode in dieser Arbeit zeigte jedoch, dass bei den verwendeten Magnetfeldstärken sich zwar, verglichen mit konventionellen Methoden, die spektrale Auflösung deutlich erhöht, die Sensitivität aber keine große Verbesserung erfährt. Dennoch sollen TROSY-Experimente die Grenze in der Proteingröße für NMR-spektroskopische Studien wesentlich weiter als bisher möglich hinausschieben [3]. Selbst wenn die Akquisition von Spektren guter Qualität bei hohen Magnetfeldstärken gelingt, bleibt die Signalzuordnung als limitierender Faktor. Und gerade bei der Vielzahl an Resonanzen in großen Proteinen werden automatische Computerprogramme an ihre Grenzen stoßen. Die manuelle Signalzuordnung wird aber, sofern keine Symmetrie im Protein vorliegt, mit steigender Proteingröße immer zeitaufwändiger. Dies schränkt die Konkurrenzfähigkeit mit der Röntgenkristallographie ein, insbesondere wenn nicht nur das Proteinrückgrat zugeordnet werden soll.

Die Struktur von Proteinen jedoch, die schlecht oder gar nicht kristallisieren, kann nur mit NMR untersucht werden. Darunter fallen insbesondere Proteine mit vielen flexiblen Abschnitten, starken Domänenbewegungen oder dynamisch ungeordnete Proteine, wie sie z.B. bei Proteinen gefunden werden, die an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind [216]. Seine Stärken kann TROSY aber auch in dem Fall ausspielen, wenn relativ kleine,  $^{15}\text{N}$  markierte Proteindomänen im Komplex mit großen, unmarkierten Proteinen untersucht werden sollen. Die Kombination von TROSY, Kryoprobeköpfen, hohen Magnetfeldstärken und geringer Anzahl von zuzuordnenden Resonanzen wird mit Sicherheit neue Anwendungsgebiete erschließen.



# Anhang A

## Ergänzende NMR-spektroskopische Daten von GFPuv

### A.1 Verwendete Spektren von GFPuv

Datensatz	DRX	Temp.	Spektrum, Probe
trGFPgly0713	600	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Glyzin markiert
trGFPHis0713	600	315	HSQC, invers $^{15}\text{N}$ Histidin markiert
trGFPgly0727	600	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Glyzin markiert, pH 6
trGFPtyr0908	600	310	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Tyrosin markiert
mpiGFPnoe0607	750	315	2D-NOESY, protonierte Probe
mpiGFPdnoe921	750	300	2D-NOESY, protonierte Probe in $\text{D}_2\text{O}$
mzGFPALAhS0602	500	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Alanin markiert
mzGFPASNhs0614	500	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Asparagin markiert
mzGFPGLYhs0615	500	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Glyzin markiert
mzGFPLEUhs0602	500	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Leuzin markiert
mzGFPLYShs0602	500	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Lysin markiert
mzGFPPEHs0602	500	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Phenylalanin markiert
mzGFPTHRhs0614	500	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Threonin markiert
mzGFPVALhs0614	500	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Valin markiert
msGFPLEUhs0907	500	300	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Leuzin markiert
msGFPTYRhs0907	500	310	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Tyrosin markiert

Datensatz	DRX	Temp.	Beschreibung
msGFPASNhs0913	500	310	HSQC, invers $^{15}\text{N}$ Asparagin markiert
trGFPval104	600	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Valin markiert
msGFPMEThs1115	500	310	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Methionin markiert
msGFPASPhs9911	600	315	HSQC, invers $^{15}\text{N}$ Aspartatsäure markiert
msGFPILEhs9912	600	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Isoleuzin
mpiGFPnohs9912	750	310	3D-NOESY-HSQC, $^{15}\text{N}$ markiert
msGFPTHRhs9912	600	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Threonin
msGFPDhncoca99	600	310	HNCA, HN(CO)CA, $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$
msGFPTYRhs0003	600	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Tyrosin, pH 6,5
msGFPphtit0308	600	310	HSQC, pH-Titration 7,7-6,2; $^{15}\text{N}$
msGFPVALph60	600	315	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Valin, pH 6,0
msGFPDtrhnca07	600	310	TROSY-HNCA, $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -70% $^2\text{H}$
msGFPD99noe08	600	310	2D-NOESY, >Frequenzbreite, $^1\text{H}$
mpiGFPhnca0831	750	310	TROSY-HNCA, $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -70% $^2\text{H}$ (Sparky:GFPtrhnca750)
msGFPhcch0011a	600	310	HCCH-TOCSY, $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ (Sparky:GFPhcch)
msGFPcbca0012	600	310	CBCACONH, $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ (Sparky:GFPcbcaconh)
msGFPNnohs00	600	310	$^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC, $^{15}\text{N}$ markiert (Sparky:GFP15Nnohs)
msGFPhnca0101	600	310	HNCA, gereinigte $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ Probe (Sparky:GFPhnca)
msGFPdtoc0101	600	310	2D-TOCSY $\tau_m = 20\text{ms}$ , $^{15}\text{N}$ , in $\text{D}_2\text{O}$ (Sparky:GFPdtocsy20ms)
msGFPdnoe0101	600	310	2D-NOESY $\tau_m = 80\text{ms}$ , $^{15}\text{N}$ , in $\text{D}_2\text{O}$ (Sparky:GFPdnoe80ms)
msGFPD99noe014	600	310	2D-JR-NOESY $\tau_m = 160\text{ms}$ , 99% $^2\text{H}$ (Sparky:GFPD99noe_160ms_*)
msGFPdtoc0104	600	310	2D-TOCSY $\tau_m = 60\text{ms}$ , 99% $^2\text{H}$
ps_GFPuv_his	600	310	HSQC, selektiv $^{15}\text{N}$ Histidin (Sparky:GFPHIS)



Datensatz	DRX	Temp.	Beschreibung
msGFPhnco0109	600	310	HNCO, gereinigte $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ Probe (Sparky: GFPhnco_0109)
gfphbhaconh	600	310	HBHACONH (cryo), $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ Probe
gfpcbcaconh	600	310	CBCACONH (cryo), $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ Probe
msGFDPXnoe02	600	310	$^{15}\text{N}$ -gefiltertes 2D-NOESY, {FTIYV}- $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ -{X}-% $^2\text{H}$ - $^{15}\text{N}$

**A.2 Zuordnungstabelle für GFPuv**

AS	HN	N	C <sub>α</sub>	CO	C <sub>β</sub>	H <sub>α</sub>	H <sub>β</sub>	Seitenketten-NH
M1	7,817	133,1	57,47	-	-	-	-	-
G2	7,316	129,9	46,2	-	-	-	-	-
K3	-	-	57,5	-	34,92	4,359	-	-
G4	8,546	115,5	48,09	175	-	4,07	-	-
E5	8,701	124,4	60,49	173,8	30,18	4,021	2,063	-
E6	8,131	123,4	58,86	176,6	-	-	-	-
L7	7,645	121,9	56,52	175,6	-	3,945	-	-
F8	7,687	118,2	58,8	175	-	-	-	-
T9	7,502	117,7	64,55	174,3	70,05	-	-	-
G10	8,209	115,9	44,71	172	-	4,519	-	-
						3,826		
V11	8,311	125,4	63,94	170,3	-	-	-	-
V12	8,066	120,2	60,26	174,8	-	-	-	-
P13	-	-	63,37	-	33,47	4,911	-	-
I14	8,195	123,6	60,14	173	-	5,463	-	-
L15	8,85	133,1	54,84	174,1	-	5,069	1,617	-
V16	8,745	127	60,87	172,6	-	-	-	-
E17	8,893	130,9	56,36	173,3	35,23	-	-	-
L18	9,196	129,1	55,35	171,9	-	-	-	-
D19	8,222	132,4	54,77	172	-	5,156	2,672	-
G20	8,529	114,6	44,48	172,5	-	-	-	-
D21	7,141	124,7	54,26	170,1	-	5,131	-	-
V22	8,71	128	61,52	174,4	-	-	-	-
N23	9,146	131,8	55,33	172,9	38,11	-	-	-
G24	8,258	108,7	46,45	171,8	-	-	-	-
H25	8,153	125,4	56,17	172,5	-	-	-	-
K26	8,737	130,5	57,04	172,9	34,14	5,201	1,822	-
F27	8,49	122,8	56,44	175,1	-	-	-	-
S28	7,964	118,9	58,44	170,5	-	-	-	-
V29	9,15	126,9	61,12	171,1	-	-	-	-

AS	HN	N	C <sub>α</sub>	CO	C <sub>β</sub>	H <sub>α</sub>	H <sub>β</sub>	Seitenketten-NH
S30	8,882	126,7	57,74	172,4	67,12	5,583	3,998	-
G31	9,863	116,5	46,11	171,6	-	-	-	-
E32	8,204	121,6	55,07	169,6	-	5,281	2,061	-
G33	8,164	114	46,79	173,3	-	-	-	-
34	8,853	126,2	55,84	172,5	34,52	-	-	-
G35	8,831	112,7	44,57	171,9	-	-	-	-
D36	9	126,6	53,2	169,5	-	-	-	-
A37	10,77	134,5	54,79	175,5	21,45	4,717	1,747	-
T38	9,093	120,2	67,2	176,5	-	-	-	-
Y39	7,13	120,8	59,07	173,1	-	-	-	-
G40	8,604	116,3	47,52	-	-	-	-	-
K41	7,881	122,2	55,44	171,5	-	-	-	-
L42	-	-	55,05	-	-	-	-	-
T43	8,065	119,3	61,17	173,2	71,73	5,007	-	-
L44	8,948	129,8	54,83	173,9	-	4,728	-	-
K45	7,993	124,5	55,58	171,4	-	-	-	-
C48	-	-	59,84	-	28,61	-	-	-
T49	8,64	126,3	64,32	173,2	-	4,469	-	-
T50	8,092	114,6	62,14	173,9	69,86	4,572	-	-
G51	7,44	114,9	46,19	172	-	-	-	-
K52	8,503	130,1	55,58	170,2	34,37	4,649	1,673	-
L53	9,56	137,1	54,12	175,4	-	-	-	-
W57	-	-	-	-	-	-	-	H <sub>ε1</sub> 10,63 N <sub>ε1</sub> 137,2
P58	-	-	66,48	-	-	-	-	-
T59	7,739	107,7	65,29	177,6	-	4,194	-	-
L60	7,672	123,9	55,19	172,4	-	4,321	-	-
V61	6,907	125,4	69,45	173,8	-	-	-	-
T62	7,858	109,6	63,95	173,7	-	-	-	-
T63	7,346	125,4	67,58	175	-	-	-	-
Q69	6,936	-	-	-	-	-	-	-
C70	-	-	58,36	-	-	-	-	-

AS	HN	N	C <sub>α</sub>	CO	C <sub>β</sub>	H <sub>α</sub>	H <sub>β</sub>	Seitenketten-NH
F71	7,705	121,5	61,59	170,4	39,55	4,495	-	-
S72	6,723	114,6	60,02	170,2	-	4,08	-	-
H77	-	-	58,72	-	31,88	-	-	-
M78	8,15	121,9	55,61	172,6	35,22	4,55	-	-
K79	7,34	125,5	61,33	173,7	-	3,797	-	-
R80	8,237	120,4	57,95	176,3	29,8	4,19	1,512	-
H81	7,673	120,5	55,95	171,8	31,95	4,354	-	-
D82	6,62	122,9	52,92	171,9	-	-	-	-
F83	8,282	130,5	61,02	173	-	-	-	-
H84	6,902	117,3	60,31	175,3	-	-	-	-
K85	7,387	116,5	60,03	175,5	-	3,812	-	-
S86	6,996	119,1	61,53	177	-	-	-	-
A87	6,761	124,9	52,81	172	20,39	4,336	-	-
M88	7,694	120,9	53,75	174,7	-	-	-	-
P89	-	-	65,03	-	-	-	-	-
E90	9,744	131	62,54	174,5	30,23	4,058	-	-
G91	8,675	104,9	46,14	175,2	-	-	-	-
Y92	8,827	116,1	55,95	172,5	-	5,659	-	-
V93	9,626	125,2	61,81	171,1	-	5,234	-	-
Q94	9,747	133,1	55,8	174,7	-	-	-	-
E95	9,768	136,9	55,92	173,3	35,29	5,494	-	-
R96	8,781	122,5	56,66	173,8	-	-	-	-
T97	8,255	119,3	64,34	175,5	-	-	-	-
I98	9,621	132,1	60,41	171,4	-	-	-	-
S99	8,867	126,2	57,04	170,2	64,77	-	-	-
F100	8,593	132,8	58,91	172,8	-	-	-	-
K101	7,788	131,7	59,3	172,8	-	-	-	-
D102	9,242	126,4	57,07	175,1	41,04	4,344	3,015	-
D103	8,655	127,3	54,41	172,1	-	-	-	-
G104	7,798	112,5	44,78	174,9	-	-	-	-
N105	7,86	115,8	52,28	169	44,63	5,984	2,496	-
Y106	9,597	121,1	53,72	173,5	-	-	-	-

AS	HN	N	C <sub>α</sub>	CO	C <sub>β</sub>	H <sub>α</sub>	H <sub>β</sub>	Seitenketten-NH
K107	9,419	126,9	56,46	173,4	35,71	5,428	1,588 1,968	-
T108	9,295	119	60,19	175	-	-	-	-
R109	8,764	128	57,51	171,7	33,65	-	2,07	-
A110	9,158	135,6	50,6	171,3	26,37	5,973	1,678	-
E111	8,637	123,8	56,42	174,2	-	-	-	-
V112	8,746	130,1	61,29	172,4	-	-	-	-
K113	8,681	124,4	55,78	172,6	36,61	-	-	-
F114	7,708	122,3	60	172,4	-	5,12	-	-
E115	8,354	130	56,63	171,6	35,64	4,453	1,821	-
G116	8,262	115,3	47,84	175	-	-	-	-
D117	8,591	130,5	55,12	172,2	42,48	4,756	2,871	-
T118	7,711	119,4	62,91	173,1	72,33	-	-	-
L119	8,62	135	53,52	169,3	-	-	-	-
V120	9,025	129,6	60,8	172,4	-	-	-	-
N121	8,635	126,8	51,84	171,9	-	5,582	-	-
R122	8,683	129,3	56,81	172,1	-	-	-	-
I123	9,384	128,2	62,25	174,5	-	-	-	-
E124	9,058	131,7	56,24	173,7	34,01	-	-	-
L125	8,605	130,9	54,81	172,5	-	5,013	-	-
K126	9,155	133,3	55,62	172,5	36,7	-	-	-
G127	10,35	119,6	46,13	173,5	-	-	-	-
I128	9,157	129,2	60,69	170,4	43,86	5,262	2,018	-
D129	8,636	119,7	56,49	170,9	39,15	4,315	2,927	-
F130	8,544	119,6	60,12	173,4	-	-	-	-
K131	9,815	127,8	56,46	175,7	-	-	-	-
E132	-	-	60,45	-	30,45	3,9	2,067	-
D133	8,303	118,1	53,15	173,5	41,04	4,687	2,723	-
G134	7,183	108,8	44,83	174,6	-	-	-	-
N135	9,208	118,7	56,48	172,4	39,79	-	-	-
I136	7,168	120,3	64,73	173,1	-	-	-	-
L137	9,01	122,2	57,34	174,4	-	-	-	-

AS	HN	N	C <sub>α</sub>	CO	C <sub>β</sub>	H <sub>α</sub>	H <sub>β</sub>	Seitenketten-NH
G138	7,168	107,6	45,59	176,4	-	-	-	-
H139	7,511	120,5	58,84	172	-	-	-	-
K140	7,906	119	55,76	173,3	-	4,429	-	-
L141	7,187	123	56,81	173,7	-	-	-	-
N144	-	-	56,86	-	-	-	-	-
Y145	9,199	137,1	56,04	174	-	-	-	-
N146	8,664	120,1	53,26	171,1	-	-	-	-
S147	9,316	126,2	58,13	175,6	-	-	-	-
V150	-	-	62,33	-	-	-	-	-
Y151	7,626	131,3	61,06	172,8	-	-	-	-
T153	8,817	123,4	60,36	173,2	72,98	4,734	-	-
A154	9,124	129,6	53,63	170,4	20,83	-	-	-
D155	8,888	126,7	53,12	174,8	-	-	-	-
K156	8,791	118,6	59,33	172	-	-	-	-
Q157	8,086	121,7	58,47	173,3	29,73	4,203	2,184	-
K158	7,286	120,3	55,83	175,2	33,74	4,392	1,412	-
							1,994	
N159	7,946	122,7	54,87	173,5	39,39	4,336	2,611	-
							3,386	
G160	7,327	103,6	45,43	170,1	-	4,077	-	-
I161	7,654	114,7	59,3	171	-	4,99	-	-
K162	9,177	124,8	55,43	172,5	-	-	-	-
A163	9,282	130,3	51,26	176,5	24,31	5,841	1,295	-
N164	8,65	121,3	54,01	173,9	-	5,657	2,824	-
F165	8,151	120,3	57,74	171,8	-	-	-	-
N170	-	-	56,08	-	-	-	-	-
I171	8,632	129,8	60,23	173,7	-	-	-	-
E172	8,539	128,8	59,86	175	31,03	4,223	2,058	-
D173	7,417	122,1	54,65	173,7	41,39	-	-	-
G174	8,34	113,3	45,94	175,1	-	-	-	-
S175	8,139	121,9	58,82	173,7	-	-	-	-

AS	HN	N	C <sub>α</sub>	CO	C <sub>β</sub>	H <sub>α</sub>	H <sub>β</sub>	Seitenketten-NH
V176	8,181	120,4	61,51	170,6	37,65	4,841	1,688	-
Q177	9,459	131,4	53,77	173	-	-	-	H <sub>ε</sub> 7,961 N <sub>ε</sub> 121,2
L178	9,061	134,9	55,38	172,4	37,88	5,267	1,717	-
A179	8,798	123,9	51,35	172,5	22,57	4,712	0,808	-
D180	8,893	136,1	56,43	175,4	43,34	4,687	2,616	-
H181	9,238	127,4	56,73	172,9	-	-	-	-
Y182	8,495	127,6	58,18	171,2	-	-	-	-
Q183	8,686	131,4	54,29	172,4	-	5,354	-	-
Q184	9,206	128,4	55,96	171,4	-	-	-	-
P187	-	-	55,34	-	-	-	-	-
I188	8,843	128,6	64,77	173,5	-	3,927	-	-
G189	9,311	114,1	44,75	175,6	-	-	-	-
D190	8,364	121,5	54,65	171,5	42,91	-	-	-
G191	8,397	114	45,19	175,1	-	-	-	-
T198	-	-	-	-	-	5,609	-	-
H199	-	-	57,05	-	-	-	-	-
Y200	8,475	118,8	55,97	169,1	34,4	5,219	2,169	-
L201	8,868	126	53,14	172,5	42,79	-	-	-
S202	8,874	127,5	60,23	174,4	60,88	-	-	-
T203	8,481	122,2	59,18	176,6	-	-	-	-
S208	-	-	63,08	-	-	-	-	-
K209	9,586	125,2	54,84	176,3	38,75	-	-	-
D210	8,37	121,6	57,19	173,2	-	-	-	-
P211	-	-	65,04	-	-	-	-	-
N212	8,263	118,1	53,73	174,7	40,55	4,739	2,786	-
E213	7,59	126,8	55,77	172,3	-	-	-	-
R215	-	-	56,55	-	-	4,338	-	-
D216	9,275	129,5	57,16	173,8	42,87	-	-	-

AS	HN	N	C $_{\alpha}$	CO	C $_{\beta}$	H $_{\alpha}$	H $_{\beta}$	Seitenketten-NH
H217	8,376	128,9	57,49	174,5	-	-	-	H $_{\delta 1}$ 11,52 N $_{\delta 1}$ 172,3 H $_{\epsilon 2}$ 11,78 N $_{\epsilon 2}$ 171,4
M218	7,75	120	55,61	167,6	-	-	-	-
V219	7,602	131	62,76	171,8	33,05	-	-	-
L220	9,37	134,4	54,42	171	-	-	-	-
L221	8,497	134	54,32	170,9	-	-	-	-
E222	-	-	55,49	-	-	-	-	-
F223	9,042	128,9	56,88	172,2	-	-	-	-
V224	9,578	128,2	61,38	174,2	-	5,229	-	-
T225	8,426	125,2	60,37	173	73,06	5,116	-	-
A226	8,269	132,7	52,09	170,1	20,44	4,803	0,336	-
A227	8,788	126,2	52,5	173,5	23,28	-	-	-
G228	8,186	108	46,09	173,6	-	-	-	-
I229	7,242	123,3	61,35	171,9	-	-	-	-
H231	-	-	57,56	-	-	-	-	-
G232	8,495	115,4	46,16	174,9	-	3,97	-	-
M233	8,355	124,3	56,77	-	-	-	-	-
D234	8,396	124,8	55,48	-	-	-	-	-
E235	8,185	124,5	57,23	-	-	-	-	-
L236	8,079	127,1	56,09	-	-	-	-	-
Y237	7,576	129,4	59,75	-	-	-	-	-
G239	-	-	46,24	-	-	-	-	-
H240	7,882	129,6	58	171,2	-	-	-	-



**A.3 <sup>15</sup>N Relaxationsraten für GFPuv**

AS	R <sub>1</sub> / Hz	Fehler	R <sub>2</sub> / Hz	Fehler	HetNOE	Fehler	ε / Hz
1	0,74	0,07	2,1	0,3	-1,74	-0,23	0,6
2	0,43	0,06	30,6	5,7	0,71	0,04	8,2
4	1,10	0,09	15,5	1,7	0,59	0,02	9,6
5	0,58	0,05	22,0	4,4	0,56	0,09	16,4
6	0,70	0,06	25,9	2,7	0,73	0,04	15,0
7	0,71	0,06	26,5	3,3	0,78	0,03	13,9
8	0,45	0,04	23,2	1,1	0,87	0,04	15,8
9	0,62	0,06	26,2	1,6	0,64	0,02	9,5
10	0,87	0,07	17,7	2,3	0,54	0,01	13,6
11	0,56	0,05	20,6	1,5	0,70	0,01	14,0
12	0,53	0,05	18,7	0,2	0,56	0,02	4,1
16	0,46	0,07	14,4	1,4	-	-	-
17	0,51	0,05	32,5	3,1	0,89	0,09	-
18	0,54	0,04	25,3	1,7	0,91	0,01	13,8
19	0,49	0,04	27,4	1,4	0,91	0,01	16,7
20	0,50	0,05	26,3	1,2	0,87	0,01	17,0
21	0,55	0,04	25,2	1,7	-	0,02	14,4
22	0,52	0,04	25,3	1,8	0,90	0,01	15,2
23	0,62	0,06	27,6	1,7	0,88	0,01	15,7
24	0,62	0,06	27,0	1,6	0,76	0,01	16,8
25	0,54	0,04	24,7	2,1	0,88	0,01	15,0
26	0,58	0,05	25,2	1,9	0,84	0,01	15,5
27	0,49	0,04	26,7	4,0	-	0,02	14,0
27	0,57	0,05	27,4	1,3	0,82	0,02	14,6
28	0,50	0,04	28,7	0,5	0,92	0,02	17,0
29	0,46	0,04	29,2	1,9	0,79	0,01	17,1
30	0,42	0,04	26,4	0,1	0,80	0,01	16,8
31	0,45	0,04	28,7	1,8	0,77	0,01	15,6
32	0,54	0,05	26,5	0,4	0,93	0,01	17,3
33	0,47	0,04	26,5	1,0	0,93	0,03	15,6
34	0,50	0,04	21,4	1,7	0,78	0,13	17,1

AS	R <sub>1</sub> / Hz	Fehler	R <sub>2</sub> / Hz	Fehler	HetNOE	Fehler	ε / Hz
35	0,65	0,13	25,6	5,0	0,90	0,02	12,8
36	0,52	0,04	25,3	0,3	0,86	0,03	16,9
37	-	-	-	-	-	-	21,2
38	0,62	0,05	25,7	2,4	0,89	0,02	17,0
39	0,55	0,05	21,6	0,6	0,81	0,04	14,9
40	0,56	0,05	27,2	1,9	0,86	0,06	13,9
41	0,49	0,04	29,7	2,0	0,88	0,04	17,6
43	0,54	0,04	27,7	1,2	0,90	0,01	15,3
44	0,50	0,05	32,3	1,7	0,94	0,02	16,6
45	0,55	0,04	27,2	0,7	0,80	0,01	15,7
49	0,57	0,06	27,0	1,2	0,79	0,01	17,1
50	0,58	0,06	29,4	0,9	0,83	0,02	14,3
51	0,56	0,06	23,3	1,2	0,71	0,01	13,4
52	0,53	0,06	23,5	4,0	0,73	0,02	14,2
53	0,55	0,05	28,6	2,0	0,87	0,01	16,5
59	0,51	0,05	27,2	2,4	0,84	0,02	14,4
60	-	-	-	-	-	-	9,3
61	0,53	0,04	32,8	2,3	-	0,02	16,9
62	0,58	0,05	34,3	1,1	0,88	0,03	14,3
63	0,61	0,05	30,9	2,1	0,85	0,02	18,3
71	0,62	0,05	31,1	2,3	0,86	0,02	17,0
72	0,53	0,04	26,9	2,3	0,94	0,03	9,1
78	0,63	0,05	24,7	2,5	0,88	0,02	13,7
79	0,65	0,05	24,8	0,7	0,74	0,02	16,8
80	0,60	0,06	25,8	1,4	0,81	0,02	13,6
81	0,52	0,04	27,2	2,4	0,77	0,02	16,1
82	0,50	0,05	24,8	2,3	0,99	0,02	16,4
83	0,53	0,05	24,3	3,7	0,81	0,02	14,0
84	0,39	0,04	34,5	3,2	0,86	0,02	-
85	0,49	0,06	30,9	5,3	0,89	0,06	11,2
86	0,48	0,04	32,2	2,2	0,78	0,02	11,0
87	0,53	0,05	33,9	2,2	0,97	0,02	17,5

AS	R <sub>1</sub> / Hz	Fehler	R <sub>1</sub> / Hz	Fehler	HetNOE	Fehler	ε / Hz
88	0,49	0,05	21,6	2,4	0,88	0,04	14,3
90	0,56	0,05	28,1	2,8	0,87	0,02	15,9
91	0,51	0,04	27,7	6,5	0,84	0,05	13,5
92	0,29	0,29	-	-	0,65	0,27	14,8
93	0,49	0,04	24,1	1,8	0,92	0,05	13,6
94	0,59	0,13	-	-	0,73	0,24	34,9
95	0,55	0,04	26,9	1,3	0,93	0,02	16,4
96	0,55	0,05	28,6	2,1	0,83	0,01	15,3
97	0,54	0,05	26,1	1,4	0,78	0,01	14,2
98	0,50	0,05	27,2	6,3	0,95	0,06	16,6
99	0,51	0,04	26,1	1,1	0,87	0,01	16,4
100	0,46	0,04	28,6	1,1	0,88	0,02	17,5
101	0,59	0,05	22,6	1,8	0,91	0,02	16,3
102	0,58	0,06	31,6	2,1	0,85	0,02	17,4
103	0,56	0,05	27,3	1,8	0,92	0,01	17,1
104	0,48	0,04	25,4	1,5	0,92	0,02	16,4
105	0,61	0,05	27,7	1,3	0,80	0,01	16,1
106	-	-	-	-	-	-	6,9
107	0,44	0,06	34,0	6,1	-	-	16,8
108	0,50	0,05	27,2	2,7	0,83	0,01	15,1
109	0,59	0,05	25,4	0,8	0,78	0,01	17,5
110	0,57	0,06	28,2	2,4	0,80	0,03	15,3
111	0,56	0,05	15,9	0,6	-	-	10,3
112	0,55	0,05	23,9	1,4	0,84	0,02	16,1
113	0,72	0,06	25,7	2,0	0,66	0,03	15,4
114	0,50	0,04	28,3	0,8	0,80	0,02	15,9
115	0,51	0,05	31,7	1,5	0,93	0,02	16,6
116	1,04	0,09	18,5	1,3	0,57	0,03	10,8
117	0,57	0,05	26,8	2,2	0,82	0,03	13,7
118	0,48	0,05	25,3	2,9	0,83	0,06	18,4
119	0,48	0,04	30,1	1,4	0,98	0,02	16,4
120	0,38	0,11	23,9	6,0	-	-	-

AS	R <sub>1</sub> / Hz	Fehler	R <sub>2</sub> / Hz	Fehler	HetNOE	Fehler	ε / Hz
121	0,54	0,05	22,4	7,7	0,98	0,02	15,3
122	0,51	0,06	30,7	1,6	0,86	0,04	16,4
123	0,67	0,06	28,4	6,2	0,70	0,08	15,8
124	0,58	0,05	27,2	1,2	0,80	0,01	17,1
125	0,58	0,05	25,4	1,5	0,89	0,01	16,6
126	0,55	0,05	24,9	1,8	0,96	0,01	17,4
127	0,55	0,04	24,1	1,4	0,90	0,01	15,8
128	0,65	0,05	24,8	1,5	0,85	0,01	17,9
129	0,58	0,05	24,3	1,4	0,88	0,01	15,0
130	0,53	0,04	27,8	1,9	0,94	0,02	17,7
131	0,52	0,04	26,8	2,0	0,83	0,01	16,3
133	0,59	0,05	26,9	1,5	0,80	0,01	13,8
134	0,47	0,04	27,7	2,2	0,83	0,02	15,6
135	0,61	0,06	27,8	1,7	0,84	0,02	15,6
136	0,56	0,05	28,2	2,2	0,89	0,02	18,0
137	0,46	0,04	24,3	2,1	0,92	0,03	16,5
138	0,58	0,05	28,6	0,9	0,79	0,02	16,0
139	0,55	0,05	33,2	1,7	0,95	0,02	19,1
140	0,50	0,04	27,3	1,0	0,82	0,02	15,7
141	0,53	0,05	25,9	1,6	0,86	0,02	16,1
145	0,53	0,05	24,9	1,6	0,79	0,02	15,5
146	0,29	0,09	17,5	1,5	-	-	14,1
147	0,56	0,05	25,8	0,7	0,76	0,02	14,6
151	0,50	0,04	24,4	3,3	1,05	0,03	13,9
153	0,52	0,04	26,7	0,9	0,87	0,02	17,1
154	0,55	0,05	26,3	2,5	0,87	0,01	16,6
155	0,55	0,05	25,4	0,9	0,84	0,01	14,3
156	0,53	0,04	29,3	3,1	0,83	0,01	15,3
157	0,50	0,05	26,8	1,0	0,77	0,03	21,1
158	0,56	0,05	27,9	1,6	0,81	0,01	15,2
159	0,70	0,05	22,7	1,8	0,74	0,02	14,5
160	0,60	0,05	25,6	1,4	0,69	0,01	12,1

AS	R <sub>1</sub> / Hz	Fehler	R <sub>2</sub> / Hz	Fehler	HetNOE	Fehler	ε / Hz
161	0,53	0,05	27,8	1,6	0,84	0,01	16,0
162	0,53	0,05	27,0	1,0	0,83	0,02	16,5
163	0,58	0,05	27,3	1,9	0,93	0,01	15,9
164	0,68	0,05	26,4	2,2	0,86	0,01	15,0
165	0,56	0,05	24,9	0,2	0,77	0,02	16,4
171	0,49	0,05	27,1	2,6	0,86	0,03	15,3
172	0,63	0,05	26,2	1,5	0,74	0,01	14,9
173	0,60	0,05	25,9	1,9	0,70	0,01	15,4
174	0,65	0,06	26,4	2,7	0,84	0,01	15,1
175	0,60	0,05	23,2	1,1	0,81	0,02	19,4
176	0,64	0,05	23,9	2,2	0,80	0,01	13,5
177	0,55	0,05	25,7	1,9	0,81	0,01	15,8
178	0,57	0,05	23,8	0,4	0,82	0,02	16,9
179	0,48	0,04	24,5	1,3	0,95	0,06	16,1
180	0,58	0,05	26,9	1,6	0,80	0,01	16,3
181	0,48	0,05	29,5	2,4	0,92	0,01	16,1
182	0,46	0,04	27,6	2,5	0,88	0,01	15,1
183	0,58	0,05	25,9	0,5	0,79	0,01	16,3
184	0,55	0,05	28,7	0,7	0,93	0,02	16,0
188	0,52	0,04	27,5	2,6	0,80	0,01	14,8
189	0,61	0,05	24,8	1,9	0,82	0,02	13,1
190	0,60	0,06	24,0	1,9	0,99	0,04	14,8
191	0,67	0,06	17,3	2,0	0,25	0,01	9,8
200	0,55	0,05	28,2	2,2	0,93	0,01	16,5
201	0,55	0,04	24,5	1,1	0,92	0,01	15,3
202	0,55	0,06	23,7	2,4	0,70	0,03	16,3
203	0,47	0,06	24,9	2,4	0,70	0,05	16,3
209	0,37	0,07	21,8	1,2	0,85	0,02	16,1
210	0,59	0,05	22,4	2,8	0,89	0,01	12,6
212	0,59	0,05	27,9	1,5	0,76	0,01	15,0
213	0,50	0,04	27,6	2,2	0,91	0,02	16,8
216	0,62	0,06	28,6	2,4	0,86	0,01	16,1

AS	R <sub>1</sub> / Hz	Fehler	R <sub>2</sub> / Hz	Fehler	HetNOE	Fehler	ε / Hz
217	0,53	0,04	33,4	1,8	0,87	0,01	19,4
218	0,50	0,04	22,9	1,4	0,70	0,02	18,0
219	0,46	0,07	30,1	2,4	0,87	0,02	15,7
220	-	-	-	-	-	-	41,1
221	0,66	0,06	21,8	3,0	0,99	0,17	13,7
223	-	-	-	-	-	-	-
224	0,56	0,05	25,9	1,1	0,82	0,02	15,0
225	0,48	0,04	25,3	3,2	0,83	0,02	14,3
226	0,57	0,05	23,8	2,1	0,86	0,02	15,2
227	0,54	0,04	24,8	0,7	0,77	0,01	18,2
228	0,59	0,06	23,7	1,8	0,83	0,02	13,2
229	0,69	0,06	23,0	1,6	0,80	0,01	14,2
232	0,86	0,11	17,7	1,5	0,66	0,07	8,2
233	0,91	0,06	5,8	4,2	-0,25	-0,16	12,0
234	0,97	0,06	6,0	0,6	-0,06	-0,06	4,8
235	1,20	0,10	3,9	0,8	-0,46	-0,11	1,8
236	0,91	0,08	4,5	1,3	0,16	0,04	3,7
237	0,49	0,05	1,7	0,2	-	-	0,3
240	0,89	0,09	4,5	0,7	-0,56	-0,01	2,1

## A.4 pH-Titration an GFPuv

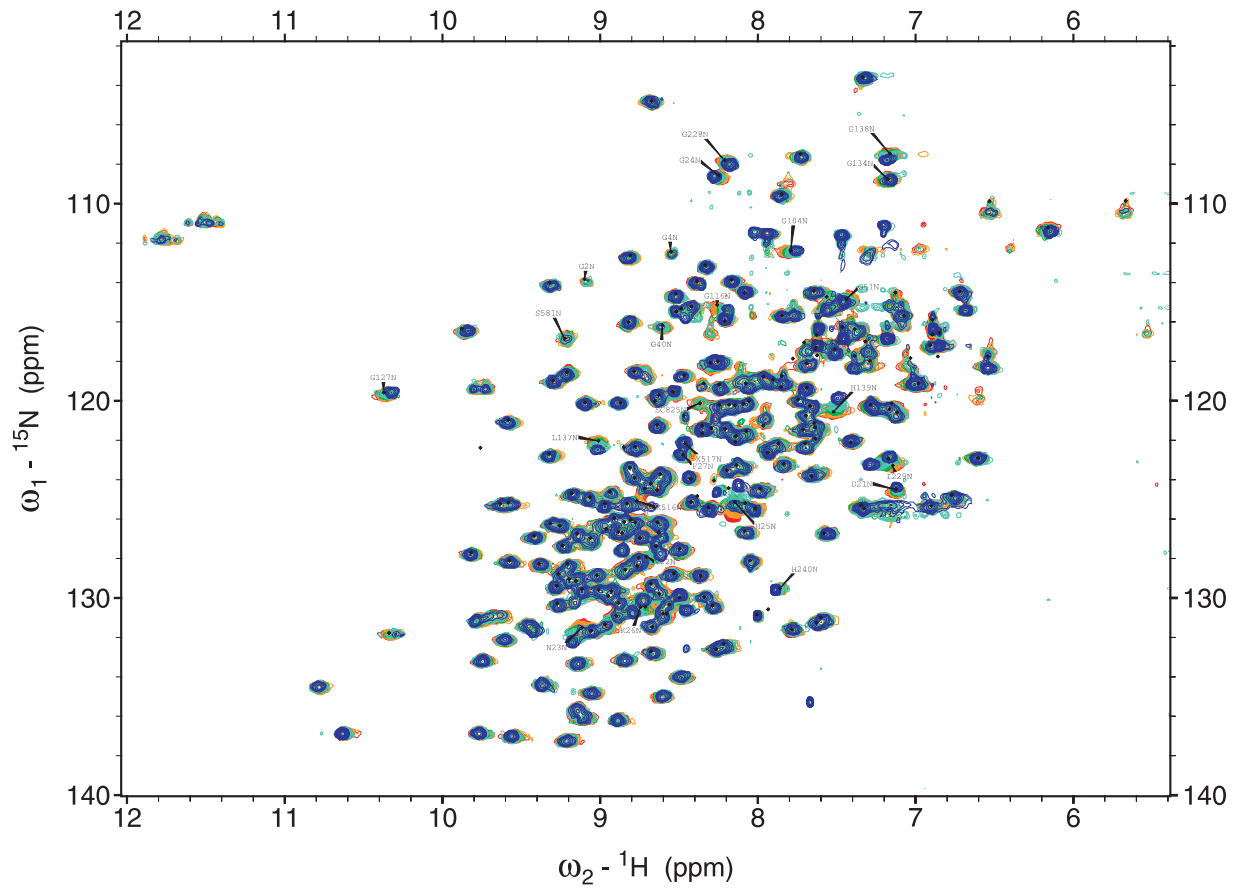


Abbildung A.1: pH Titration an GFPuv

pH-Titration von pH 7,7 (rot) bis pH 6,1 (blau). pH-sensitive Aminosäuren sind markiert.

## A.5 HD-Austausch an GFPuv

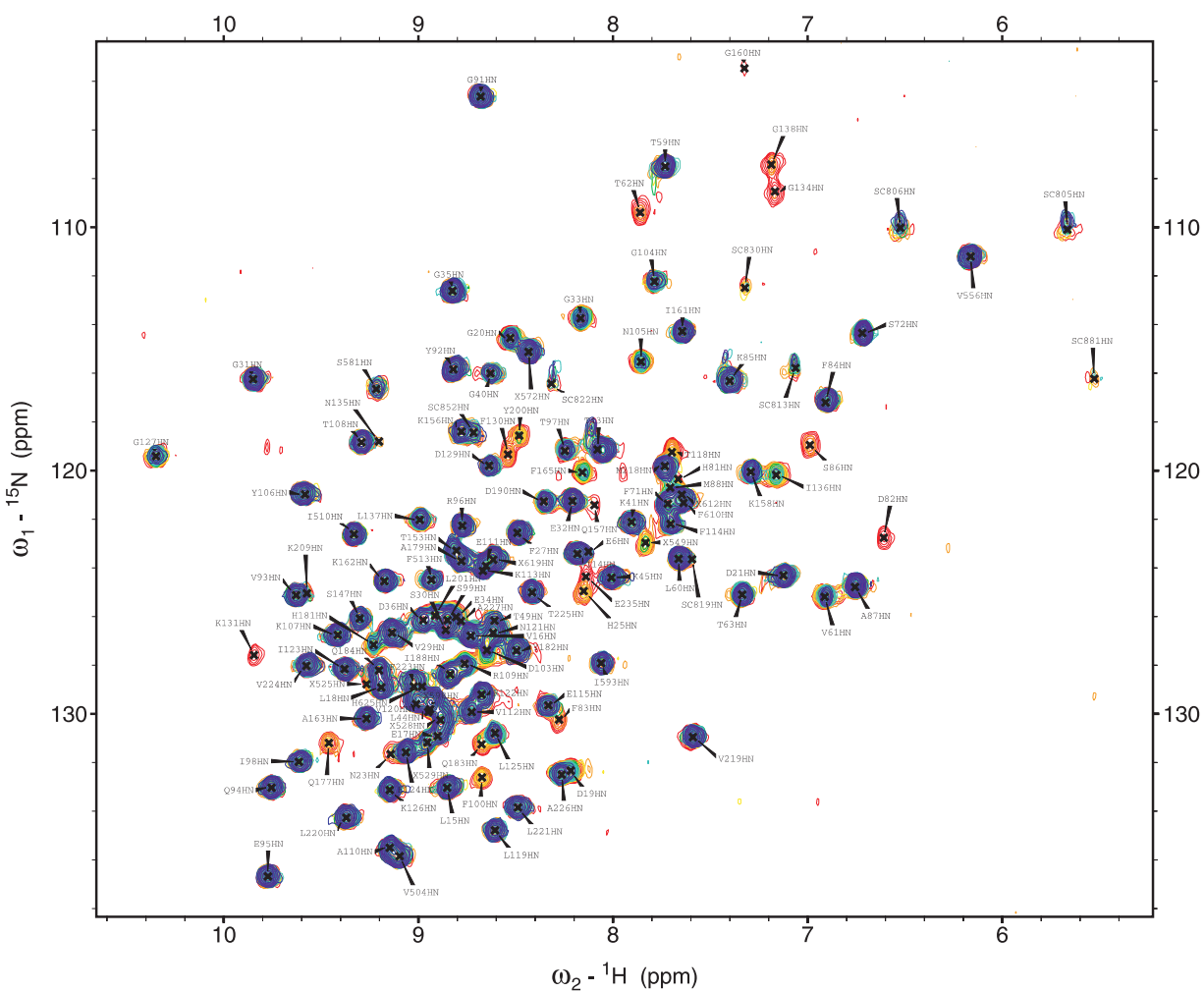


Abbildung A.2: HD-Austausch Experiment an GFPuv

Verlauf des HD-Austausches während der ersten 16 Stunden: 1. (rot), 2. (orange), 3. (gelb), 5. (grün), 8. (cyan) und 16. Stunde (blau).



## Anhang B

### Ergänzende NMR Spektren von ECFP

#### B.1 Einfluss von Licht auf $^{19}\text{F}$ Spektren von 6FW ECFP

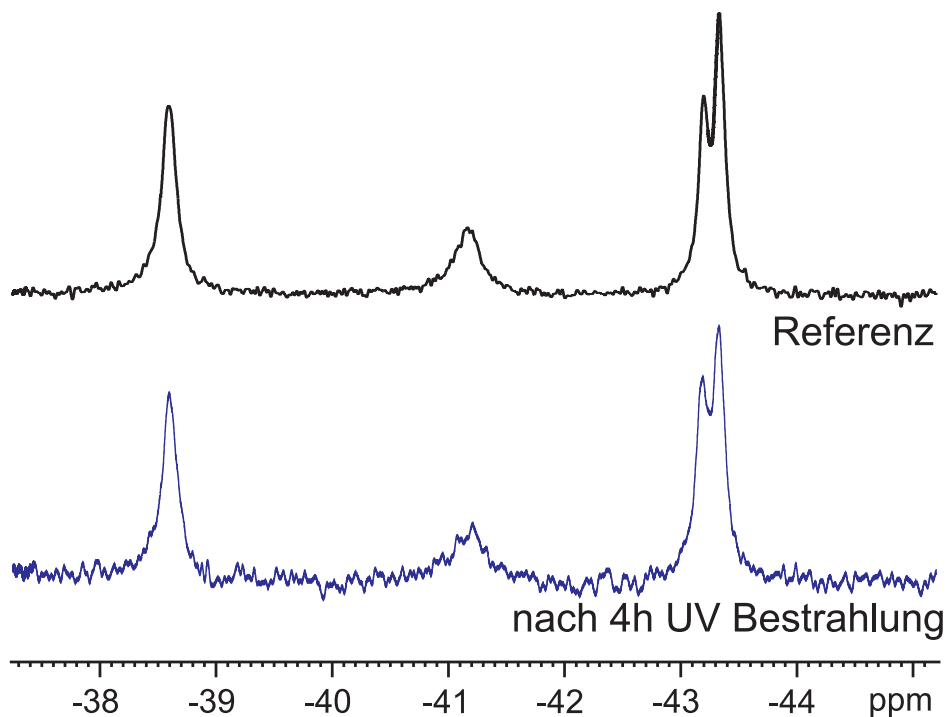


Abbildung B.1: Einfluss von Licht auf  $^{19}\text{F}$  Spektren von 6FW ECFP

Die  $^{19}\text{F}$  Spektren von 6FW ECFP zeigen keinerlei Veränderung der Zustandspopulationen nach der Bestrahlung mit intensiven UV-Licht. Es tritt keine Photokonversion auf. Die Proteinkonzentration verringert sich durch langsames Ausfallen von Proteinen aus der Lösung.

## B.2 Konzentrationsabhängigkeit der $^{19}\text{F}$ Spektren von 6FW ECFP

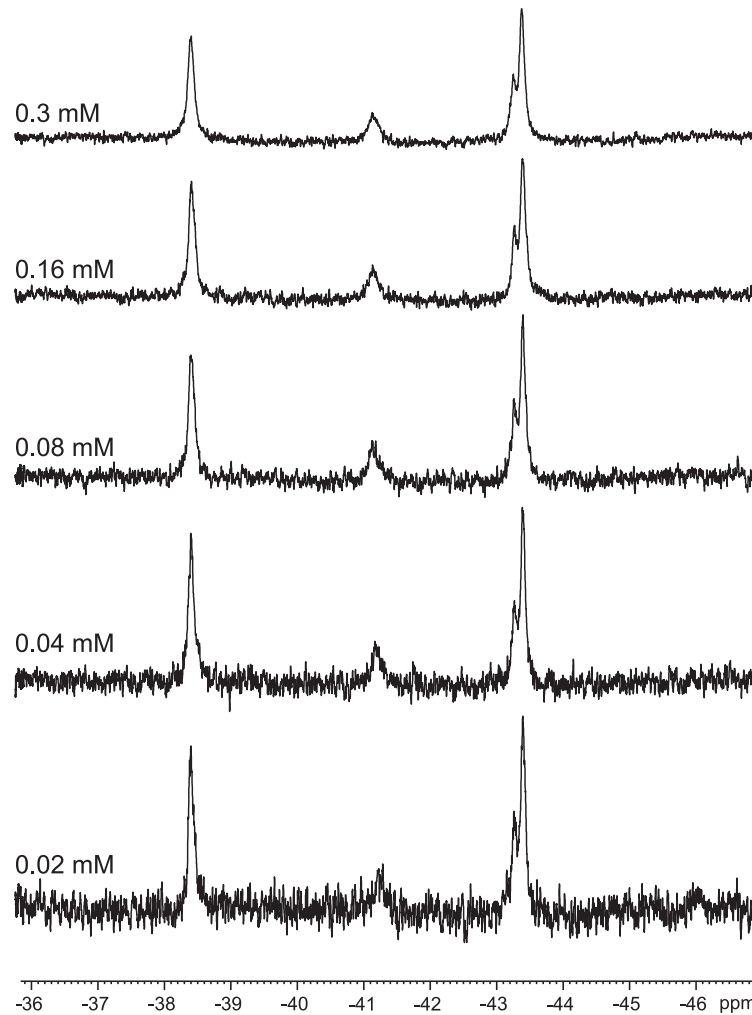


Abbildung B.2: Konzentrationsabhängigkeit der  $^{19}\text{F}$  Spektren von 6FW ECFP

Die  $^{19}\text{F}$  Spektren von 6FW ECFP zeigen keinerlei Veränderung der Zustandspopulationen mit der Gesamtproteinkonzentration. Dies beweist, dass die zwei Zustände von W57 und W66 nicht durch ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren hervorgerufen werden.

# Anhang C

## Ergänzende Informationen zu den Diffusionsmessungen

### C.1 Herleitung des b-Wertes bei sinusförmigen Gradienten

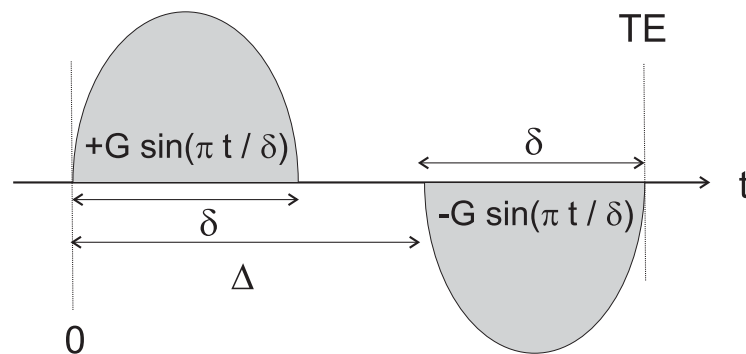


Abbildung C.1: Effektive Gradienten in einem Diffusionsexperiment

Ein Diffusionsexperiment entspricht einem Spinecho-Experiment mit starken, gleichgerichteten Magnetfeldgradienten  $G$  der Dauer  $\delta$  vor und nach einem  $180^\circ$ -Puls. Dieser, hier nicht dargestellte,  $180^\circ$ -Puls ist die Ursache dafür, dass der zweite Gradienten für die Berechnung der Diffusionsabschwächung effektiv negativ gerechnet werden muss [126]. Das Signal wird zur Echozeit  $TE$  aufgezeichnet.

Der b-Wert der Diffusionsabschwächung ist durch

$$b = \int_0^{TE} k^2(t) dt \quad (\text{C.1})$$

gegeben, wobei der Vektor  $k$  im Ortsfrequenzraum [217] durch

$$k(t) := \gamma \int_0^t G(t') dt' \quad (\text{C.2})$$

definiert ist [126]. Durch stückweise Integration der Gradientenstärke  $G$  über die Zeit erhält man:

$0 \dots \delta$ :

$$\begin{aligned} k(t) &= \gamma G \int_0^t \sin \frac{\pi t'}{\delta} dt' \\ &= \gamma G \left[ -\frac{\delta}{\pi} \cos \frac{\pi t'}{\delta} \right]_0^t \\ &= \gamma G \frac{\delta}{\pi} \left[ 1 - \cos \frac{\pi t}{\delta} \right] \end{aligned}$$

$\delta \dots \Delta$ :

$$\begin{aligned} k(t) &= \gamma G \frac{\delta}{\pi} \left[ 1 - \cos \frac{\pi \delta}{\delta} \right] \\ &= 2\gamma G \frac{\delta}{\pi} \end{aligned}$$

$\Delta \dots \Delta + \delta$ :

$$\begin{aligned} k(t) &= 2\gamma G \frac{\delta}{\pi} - \gamma G \int_{\Delta}^t \sin \frac{\pi(t' - \Delta)}{\delta} dt' \\ &= 2\gamma G \frac{\delta}{\pi} - \gamma G \left[ -\frac{\delta}{\pi} \cos \frac{\pi(t' - \delta)}{\delta} \right]_{\Delta}^t \\ &= \gamma G \frac{\delta}{\pi} \left[ 1 + \cos \frac{\pi(t - \Delta)}{\delta} \right] \end{aligned}$$

Mit  $a := \left( \gamma G \frac{\delta}{\pi} \right)^2$  erhält man

$$k^2(t) = \begin{cases} a \left[ 1 - 2 \cos \frac{\pi t}{\delta} + \cos^2 \frac{\pi t}{\delta} \right] & : 0 < t < \delta \\ 4a & : \delta < t < \Delta \\ a \left[ 1 + 2 \cos \frac{\pi(t - \Delta)}{\delta} + \cos^2 \frac{\pi(t - \Delta)}{\delta} \right] & : \Delta < t < \Delta + \delta \end{cases}$$

Die stückweise Integration  $b = \int k^2(t)dt$

$$\begin{aligned}
 \int_0^\delta a dt &= a\delta \\
 -a \int_0^\delta 2 \cos \frac{\pi t}{\delta} dt &= 0 \\
 a \int_0^\delta \cos^2 \frac{\pi t}{\delta} dt &= \frac{1}{2}a\delta \\
 \int_\delta^\Delta 4a dt &= 4a(\Delta - \delta) \\
 \int_\Delta^{\Delta+\delta} a dt &= a\delta \\
 -a \int_\Delta^{\Delta+\delta} 2 \cos \frac{\pi(t-\Delta)}{\delta} dt &= 0 \\
 a \int_\Delta^{\Delta+\delta} \cos^2 \frac{\pi(t-\Delta)}{\delta} dt &= \frac{1}{2}a\delta
 \end{aligned}$$

ergibt schliesslich den b-Wert

$$\begin{aligned}
 b &= a\delta + \frac{1}{2}a\delta + 4a(\Delta - \delta) + a\delta + \frac{1}{2}a\delta \\
 &= 3a\delta + 4a\Delta - 4a\delta = a(4\Delta - \delta) \\
 &= \gamma^2 G^2 \frac{\pi^2}{\delta^2} (4\Delta - \delta)
 \end{aligned} \tag{C.3}$$

## C.2 Eichung der Gradientenstärke

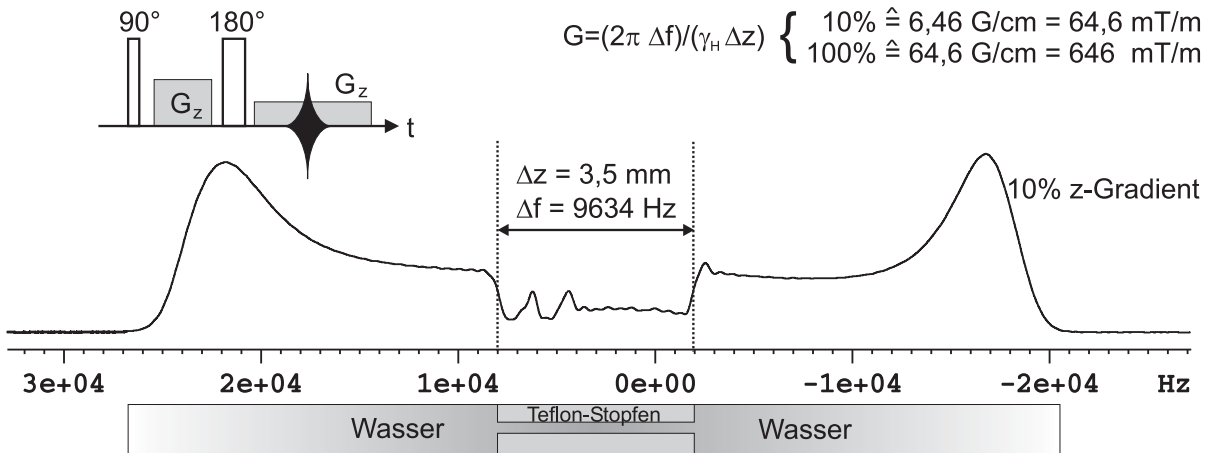


Abbildung C.2: Kalibrierung der Gradientenstärke für Diffusionsmessungen

Die Gradientenstärke wird mittels einer 1D-Spinecho-Bildgebungssequenz (Einschub links oben) an einer Wasserprobe, in die ein Teflonstopfen bekannter Länge eingebracht ist, geeicht. Aus der Frequenzdispersion kann die Stärke des angelegten Auslesegradienten berechnet werden.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Detektions- und Anwendungsmöglichkeiten der NMR . . . . .	3
2.1	Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus im Magnetfeld . . . . .	6
2.2	Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Spins . . . . .	7
2.3	Anisotropie der chemischen Verschiebung . . . . .	8
2.4	Kreuzkorrelation zwischen DD- und CSA-Relaxation . . . . .	9
2.5	Schneller und langsamer Austausch . . . . .	11
3.1	Schema eines 2D Relaxationsexperiments . . . . .	15
3.2	Relaxationsmodul zur Messungen der DD-CSA Kreuzkorrelationsrate . . . . .	18
3.3	NMR-Messmethoden und Zeitskalen der Bewegung in Proteinen . . . . .	23
4.1	Der TROSY-Effekt bei 600 MHz am Beispiel von Alanin 37 in GFPuv: . . . . .	27
4.2	Selektion der TROSY-Komponente durch ein doppeltes $S^3CT$ -Element . . . . .	28
4.3	Pulssequenz eines 2D-TROSY und 3D-TROSY-HNCA Experiments . . . . .	31
4.4	Sensitivität von HSQC, PFG-SE HSQC und PFG-SE TROSY . . . . .	32
4.5	TROSY Sensitivität und DD-CSA Kreuzkorrelation . . . . .	33
4.6	Wasserunterdrückung und Gradientenstärke . . . . .	35
4.7	Wasserunterdrückung und Gradientenwinkel - 1D Spektren . . . . .	35
4.8	Wasserunterdrückung und Gradientenwinkel - 2D-Spektren . . . . .	36
4.9	Artefaktunterdrückung durch Gradienten im "magischen Winkel" . . . . .	36
5.1	Struktur von GFP (A) und Energieniveaus des Chromophors (B): . . . . .	41
5.2	2D-TROSY Spektrum von GFPuv mit Signalzuordnung . . . . .	49
5.3	Sequentielle Zuordnung mit Tripelresonanz-Spektren (HNCA) . . . . .	50
5.4	2D-NOESY Spektrum der $\{FTIVY\}$ - $^1H$ - $^{14}N$ , $\{X\}$ - $^2H$ - $^{15}N$ Probe . . . . .	50
5.5	Relaxationsraten von GFPuv . . . . .	52

5.6	Spektrale Dichte in GFPuv . . . . .	53
5.7	Diffusionsmessung an GFPuv . . . . .	55
5.8	HSQC des selektiv <sup>15</sup> N-Histidin markierten GFPuv . . . . .	57
5.9	UV-Spektren von GFPuv und GFPuv H148G . . . . .	57
5.10	Ausschnitte der HSQC-Spektren von GFPuv und GFPuv H148G . . . . .	58
5.11	Resonanzen in GFPuv H148G, die in zwei Zuständen existieren . . . . .	58
5.12	Protonenentkopplung in <sup>19</sup> F-Spektren . . . . .	61
5.13	<sup>19</sup> F-Spektren von OFF, 6FW und MFY markiertem GFPuv . . . . .	63
5.14	<sup>19</sup> F-Spektren von MFY markiertem GFP, CFP und YFP . . . . .	63
5.15	Identifizierung der flexiblen Aminosäuren . . . . .	64
5.16	Fluoreszenz und UV-Spektren von GFP und CFP . . . . .	65
5.17	J-Kopplung in Fluorotryptophanen . . . . .	65
5.18	Signalzuordnung in 4-, 5- und 6FW CFP . . . . .	67
5.19	Modell der spektralen Dichte für <sup>19</sup> F bei 470 MHz . . . . .	69
5.20	Simulation der <sup>19</sup> F Relaxation bei 470 MHz . . . . .	70
5.21	Temperaturabhängige Messungen an 6FW ECFP . . . . .	71
5.22	Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten für W66 . . . . .	71
5.23	Entfaltung und pH-Titration von 6FW CFP . . . . .	74
5.24	Faltungsschema und strukturelle Dynamik von GFP . . . . .	76
5.25	Dimerkontakte in GFPuv . . . . .	77
5.26	Mögliche Chromophor-Rotamere in CFP . . . . .	82
5.27	Modell für die Chromophorumgebung in CFP . . . . .	83
6.1	Funktionsweise der cAMP-abhängigen Proteinkinase . . . . .	89
6.2	Struktur der katalytischen Untereinheit von PKA . . . . .	91
6.3	<sup>31</sup> P NMR Spektren von PKA 2P, 3P und 4P bei pH 8,5 . . . . .	96
6.4	<sup>31</sup> P NMR Spektrum von PKA 4P bei pH 6,9 . . . . .	96
6.5	Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase . . . . .	100
6.6	Bindung von AMP-PNP mit PKA . . . . .	100
6.7	Phosphorylierungsstellen in PKA und AMP-PNP Bindungstasche . . . . .	105
A.1	pH Titration an GFPuv . . . . .	129
A.2	HD-Austausch Experiment an GFPuv . . . . .	130
B.1	Einfluss von Licht auf <sup>19</sup> F Spektren von 6FW ECFP . . . . .	131
B.2	Konzentrationsabhängigkeit der <sup>19</sup> F Spektren von 6FW ECFP . . . . .	132
C.1	Effektive Gradienten in einem Diffusionsexperiment . . . . .	133
C.2	Kalibrierung der Gradientenstärke für Diffusionsmessungen . . . . .	136



# Tabellenverzeichnis

5.1	$^{19}\text{F}$ Relaxation von ECFP . . . . .	69
5.2	Zustandspopulation und Austauschraten W66 in 6FW CFP . . . . .	73
6.1	$^{31}\text{P}$ Relaxation in PKA . . . . .	98
6.2	Veröffentlichte Röntgenstrukturen von PKA . . . . .	102
A.1	Verwendete Spektren von GFPuv . . . . .	113
A.2	Zuordnungstabelle für GFPuv . . . . .	116
A.3	$^{15}\text{N}$ Relaxationsraten für GFPuv . . . . .	123



# Literaturverzeichnis

- [1] HOULT, D.I. und N.S. GINSBERG: *The quantum origins of the free induction decay signal and spin noise*. J. Magn. Reson., 148:182–199, 2001.
- [2] TJANDRA, N. und A. BAX: *Direct measurement of distances and angles in biomolecules by nmr in a dilute liquid crystalline medium*. Science, 278:1111–1114, 1997.
- [3] PERVUSHIN, K., R. RIEK, G. WIDER und K. WÜTHRICH: *Attenuated  $T_2$  relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12366–12371, 1997.
- [4] DIERCKS, T., M. COLES und H. KESSLER: *Applications of NMR in drug discovery*. Curr. Opin. Chem. Biol., 5:285–291, 2001.
- [5] SHUKER, S.B., P.J. HAJDUK, R.P. MEADOWS und S.W. FESIK: *Discovering high-affinity ligands for proteins - SAR by NMR*. Science, 274:1531–1534, 1996.
- [6] SPYRACOPOULOS, L. und B.D. SYKES: *Thermodynamic insights into proteins from NMR spin relaxation studies*. Curr. Opin. Struct. Biol., 11:555–559, 2001.
- [7] KAY, L.E.: *Protein dynamics from NMR*. Nature Struct. Biol., NMR supplement:513–517, 1998.
- [8] DENISOV, V.P., J. PETERS, H.D. HÖRLEIN und B. HALLE: *Using buried water molecules to explore the energy landscape of proteins*. Nature Struct. Biol., 3:505–509, 1996.
- [9] PALMER III, A.G., P.E. WRIGHT und M. RANCE: *Measurement of relaxation time constants for methyl groups by proton-detected heteronuclear NMR spectroscopy*. Chem. Phys. Lett., 185, 1991.

- [10] MULDER, F.A.A., A. MITTERMAIER, B. HON, F.W. DAHLQUIST und L.E. KAY: *Studying excited states of proteins by NMR spectroscopy*. Nature Struct. Biol., 8:932–935, 2001.
- [11] HULL, W.E. und B.D. SYKES: *Fluorotyrosine alkaline phosphatase. <sup>19</sup>F nuclear magnetic resonance relaxation times and molecular motion of the individual fluorotyrosines*. Biochemistry, 13:3431–3437, 1974.
- [12] GORENSTEIN, D.G. (Herausgeber): *Phosphorus-31 NMR - Principles and Applications*. Academic Press, Orlando, 1984.
- [13] CLARKE, J., A.M. HOUNSLOW, M. BYCROFT und A.R. FERSHT: *Local breathing and global unfolding in hydrogen exchange of barnase and its relationship to protein folding pathways*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:9837–9841, 1993.
- [14] MULDER, F.A.A., B. HON, A. MITTERMAIER, F.W. DAHLQUIST und L.E. KAY: *Slow internal dynamics in proteins: application of NMR relaxation dispersion spectroscopy to methyl groups in a cavity mutant of T4 lysozym*. J. Am. Chem. Soc., 124:1443–1451, 2002.
- [15] CAVANAGH, J., W.J. FAIRBROTHER, A.G. PALMER III und SKELTON N.J.: *Protein NMR spectroscopy: Principles and Practice*. Academic Press, 1996.
- [16] NEUHAUS, D. und M.P. WILLIAMSON: *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. Wiley-VCH, New York, 2. Auflage, 2000.
- [17] FUSHMAN, D. und D. COWBURN: *Model-independent analysis of <sup>15</sup>N chemical shift anisotropy from NMR relaxation data. Ubiquitin as a test example*. J. Am. Chem. Soc., 120:7109–7110, 1998.
- [18] PALMER III, A.G., C.D. KROENKE und J.P. LORIA: *Methods in Enzymology*, Band 339, Part B, Kapitel Nuclear Magnetic Resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. Academic Press, San Diego, 2001.
- [19] BLOCH, F., W.W. HANSEN und M. PACKARD: *Nuclear Induction*. Phys.Rev., 69:117, 1946.
- [20] MCCONNELL, H.M.: *Reaction rates by nuclear magnetic resonance*. J. Chem. Phys., 28:430, 1958.
- [21] SANDSTRÖM, J.: *Dynamic NMR Spectroscopy*. Academic Press, London, 1982.

- [22] EVANS, J.: *Biomolecular NMR spectroscopy*. Oxford Univ. Press, 1995.
- [23] MORRIS, G.A. und R. FREEMAN: *Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer*. J. Am. Chem. Soc., 101:760–762, 1979.
- [24] VAN DE VEN, F.J.M.: *Multidimensional NMR in Liquids: Basic principles and experimental methods*. Wiley-VCH, New York, 1995.
- [25] MORI, S., C. ABEYGUNAWARDANA, M.O. JOHNSON und P.C. VAN ZIJL: *Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation*. J Magn Reson B., 108:94–98, 1995.
- [26] ZHU, G., Y. XIA, L.K. NICHOLSON und K.H. SZE: *Protein dynamics measurements by TROSY-based NMR experiments*. J. Magn. Reson., 143:423–426, 2000.
- [27] SKELTON, N.J., A.G. PALMER III, M. AKKE, J. KÖRDEL, M. RANCE und W.J. CHAZIN: *Practical aspects of two-dimensional proton-detected  $^{15}\text{N}$  spin relaxation measurements*. J. Magn. Res., B 102:253–264, 1993.
- [28] CARR, H.Y. und E.M. PURCELL: *Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments*. Phys. Rev., 94:630–638, 1954.
- [29] MEIBOOM, S. und D. GILL: *Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times*. Rev. Sci. Instrum., 29:688–691, 1958.
- [30] LUZ, Z. und S. MEIBOOM: *Nuclear magnetic resonance study of the protolysis of trimethylammonium ion in aqueous solution - order of the reaction with respect to solvent*. J. Chem. Phys., 39:366–371, 1963.
- [31] ZWECKSTETTER, M. und T.A. HOLAK: *An adiabatic multiple spin-echo pulse sequence: Removal of systematic errors due to pulse imperfections and off-resonance effects*. J. Magn. Res., 133:134–147, 1998.
- [32] TJANDRA, N., A. SZABO und A. BAX: *Protein backbone dynamics and  $^{15}\text{N}$  chemical shift anisotropy from quantitative measurement of relaxation interference effects*. J. Am. Chem. Soc., 118:6986–6991, 1996.

- [33] FUSHMAN, D., N. TJANDRA und D. COWBURN: *Direct measurement of  $^{15}\text{N}$  chemical shift anisotropy in solution*. J. Am. Chem. Soc., 120:10947–10952, 1998.
- [34] TJANDRA, N. und A. BAX: *Solution NMR measurements of amide proton chemical shift anisotropy in  $^{15}\text{N}$ -enriched proteins. Correlation with hydrogen bond length*. J. Am. Chem. Soc., 119:8076–8082, 1997.
- [35] DEMPSEY, C.E.: *Hydrogen exchange in peptides and proteins using NMR spectroscopy*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 39:135–170, 2001.
- [36] MONTELIONE, G.T. und G. WAGNER: *2D chemical exchange NMR spectroscopy by proton-detected heteronuclear correlation*. J. Am. Chem. Soc., 111:3096, 1989.
- [37] FARROW, N., O. ZHANG, J.D. FORMAN-KAY und L.E. KAY: *A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of  $^{15}\text{N}$  longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium*. J. Biomol. NMR, 4:727, 1994.
- [38] SZYPERSKI, T., P. LUGINBÜHL, G. OTTING, P. GÜNTERT und K. WÜTHRICH: *Protein dynamics studied by rotating frame  $^{15}\text{N}$  spin relaxation times*. J. Biomol. NMR, 3:151, 1993.
- [39] LORIA, J.P., M. RANCE und A.G. PALMER III: *A relaxation-compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence for characterizing chemical exchange by NMR spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc., 121:2331–2332, 1999.
- [40] RENNER, C. und T.A. HOLAK: *Separation of anisotropy and exchange broadening using  $^{15}\text{N}$  CSA- $^{15}\text{N}^1\text{H}$  dipole-dipole relaxation cross-correlation experiments*. J. Magn. Reson., 145:192–200, 2000.
- [41] PERVUSHIN, K.: *The use of TROSY for detection and suppression of conformational exchange NMR line broadening in biological macromolecules*. J. Biomol. NMR, 20:275–285, 2001.
- [42] PERVUSHIN, K., V. GALLIUS und C. RITTER: *Improved TROSY-HNCA experiment with suppression of conformational exchange induced relaxation*. J. Biomol. NMR, 21:161–166, 2001.
- [43] LIPARI, G. und A. SZABO: *Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity*. J. Am. Chem. Soc., 104:4546–4559, 1982.

- [44] LIPARI, G. und A. SZABO: *Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results.* J. Am. Chem. Soc., 104:4559–4570, 1982.
- [45] DOSSET, P., J.-C. HUS, M. BLACKLEDGE und D. MARION: *Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data.* J. Biomol. NMR, 16:23–28, 2000.
- [46] DAYIE, K.T., G. WAGNER und J.-F. LEFEVRE: *Dynamics and the Problem of Recognition in Biological Macromolecules*, Kapitel Heteronuclear relaxation and the experimental determination of the spectral density function. Plenum Press, New York, 1996.
- [47] FARROW, N.A., O. ZHANG, A. SZABO, D.A. TORCHIA und L.E. KAY: *Spectral density function mapping using  $^{15}\text{N}$  relaxation data exclusively.* J. Biomol. NMR, 6:153–162, 1995.
- [48] PENG, J und G. WAGNER: *Frequency spectrum of NH bonds in eglin c from spectral density mapping at multiple fields.* Biochemistry, 34:16733–16752, 1995.
- [49] PFÄNDER, R.: *Kernspinresonanzspektroskopie an Proteinen in Lösung: Strukturbestimmung, Relaxationsstudien und dipolare Kopplungen.* Doktorarbeit, Fakultät für Chemie, TU München, 2000.
- [50] TJANDRA, N., P. WINGFIELD, S. STAHL und A. BAX: *Anisotropy rotational diffusion of perdeuterated HIV protease from  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation measurements at two magnetic fields.* J. Biomol. NMR, 8:273–284, 1996.
- [51] EISENMESSER, E.Z., D.A. BOSCO, M. AKKE und D. KERN: *Enzyme dynamics during catalysis.* Science, 295:1520–1523, 2002.
- [52] KLEIN-SEETHARAMAN, J., M. OIKAWA, S.B. GRIMSHAW, J. WIRMER, E. DURCHARDT, T. UEDA, T. IMOTO, L. SMITH, C.M. DOBSON und H. SCHWALBE: *Long-range interactions within a nonnative protein.* Science, 295:1719–1722, 2002.
- [53] WIDER, G. und K. WÜTHRICH: *NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution.* Curr. Opin. Struct. Biol., 9:594–601, 1999.

- [54] SALZMANN, M., K. PERVUSHIN, G. WIDER, H. SENN und K. WÜTHRICH: *TROSY in triple-resonance experiments: New perspectives for sequential NMR assignment of large proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:13585–13590, 1998.
- [55] RIEK, R., G. WIDER, K. PERVUSHIN und K. WÜTHRICH: *Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:4918–4923, 1999.
- [56] ELETSKY, A., A. KIENHÖFER und K. PERVUSHIN: *TROSY NMR with partially deuterated proteins*. J. Biomol. NMR, 20:177–180, 2001.
- [57] MEISSNER, A., T. SCHULTE-HERBRÜGGEN, J. BRIAND und O.W. SÖRENSEN: *Double spin-state-selective coherence transfer. Application for two-dimensional selection of multiplet components with long transverse relaxation times*. Mol. Phys., 95(6):1137–1142, 1998.
- [58] LORIA, J.P., M. RANCE und A.G. PALMER III: *Transverse-relaxation-optimized (TROSY) gradient-enhanced triple-resonance NMR spectroscopy*. J. Magn. Reson., 141:180–184, 1999.
- [59] WEIGELT, J.: *Single scan, sensitivity and gradient-enhanced TROSY for multidimensional NMR experiments*. J. Am. Chem. Soc., 120:10778–10779, 1998.
- [60] MATTIELLO, D.L., A.S. WARREN, L. MUELLER und B.T. FARMER II: *Minimizing the water resonance in biological NMR: characterization and suppression of intermolecular dipolar interactions by multiple-axis gradients*. J. Am. Chem. Soc., 118:3253–3261, 1996.
- [61] MEISSNER, A. und O.W. SÖRENSEN: *The role of coherence transfer efficiency in design of TROSY-type multidimensional NMR experiments*. J. Magn. Reson., 139:439–442, 1999.
- [62] MINOT, E.D., P.T. CALLAGHAN und N. KAPLAN: *Multiple echoes, multiple quantum coherence, and the dipolar field: demonstrating the significance of higher order terms in the equilibrium density matrix*. J. Magn. Reson., 140:200–205, 1999.
- [63] LIN, Y.-Y., N. LISITZA, S. AHN und W.S. WARREN: *Resurrection of crushed magnetization and chaotic dynamics in solution NMR spectroscopy*. Science, 290:118–121, 2000.



- [64] WARREN, W.S., W. RICHTER, A.H. ANDREOTTI und B.T. FARMER II: *Generation of impossible cross-peaks between bulk water and biomolecules in solution NMR*. *Science*, 262:2005–2009, 1993.
- [65] GÜNTERT, P., N. SCHAEFER, G. OTTING und K. WÜTHRICH: *POMA: a complete Mathematica implementation of the NMR product-operator formalism*. *J. Magn. Reson. Series A*, 101:103–105, 1993.
- [66] MCCOY, M.A. und L. MUELLER: *Selective shaped pulse decoupling in NMR: homonuclear [<sup>13</sup>C]Carbonyl decoupling*. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:2108–2112, 1992.
- [67] CAVANAGH, J., A.G. PALMER III, P.E. WRIGHT und M. RANCE: *Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear relay spectroscopy*. *J. Magn. Reson.*, 91:429–436, 1991.
- [68] KAY, L.E., M. IKURA, R. TSCHUDIN und A. BAX: *Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins*. *J. Magn. Reson.*, 89:496–514, 1990.
- [69] CZISCH, M. und R. BOELENS: *Sensitivity enhancement in the TROSY experiment*. *J. Magn. Reson.*, 134:158–160, 1998.
- [70] FUSHMAN, D. und COWBURN D.: *The effect of noncollinearity of <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H dipolar and <sup>15</sup>N CSA tensors and rotational anisotropy on <sup>15</sup>N relaxation, CSA/dipolar cross correlation and TROSY*. *J. Biomol. NMR*, 13:139–147, 1999.
- [71] HARVEY, E.N. *Biol. Bull. (Woods Hole, MA)*, 41:280–287, 1921.
- [72] SHIMOMURA, O. und F.H. JOHNSON: *Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin*. *Methods Enzymol.*, 57:271–291, 1978.
- [73] INOUE, S., M. NOGUCHI, Y. SAKAKI, T. TAKAGI, S. IWANAGA, T. MIYATA und F.I. TSUJI: *Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3154–3158, 1985.
- [74] CHARBONNEAU, H., K.A. WALSH, R.O. MCCANN, F.G. PRENDERGAST, M.J. CORMIER und T.C. VANAMAN: *Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein aequorin*. *Biochemistry*, 24:6762–6771, 1985.

- [75] INOUE, S. und F.I. TSUJI: *Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein*. FEBS Lett., 351:211–214, 1994.
- [76] TSIEN, R.Y.: *The green fluorescent protein*. Annu. Rev. Biochem., 67:509–544, 1998.
- [77] GELEY, J.S., E. KRAMER, C. GIEFFERS, J. GANNON, J.-M. PETERS und T. HUNT: *Anaphase-promoting Complex/Cyclosome dependent Proteolysis of Human Cyclin A Starts at the Beginning of Mitosis and Is Not Subject to the Spindle Assembly Checkpoint*. J. Cell Biol., 153:137–147, 2001.
- [78] CHAN, A., K. CHONG, C. MARTINOVICH, C. SIMERLY und SCHATTEN G.: *Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes*. Science, 291:309–312, 2001.
- [79] CHATTORAJ, M., B.A. KING, G.U. BUBLITZ und S.G. BOXER: *Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8362–8367, 1996.
- [80] LOSSAU, H., A. KUMMER, R. HEINNECKE, F. PÖLLINGER-DAMMER, C. KOMPA, G. BIESER, T. JONSSON, C. SILVIA, M. YANG, D. YOUVAN und M.E. MICHEL-BEYERLE: *Time-resolved spectroscopy of wild-type and mutant green fluorescent proteins reveals excited state deprotonation consistent with fluorophore-protein interactions*. Chem.Phys., 213:1–16, 1996.
- [81] PRENDERGAST, F.: *Biophysics of the green fluorescent protein*. Methods in Cell Biology, 58:1–18, 1999.
- [82] FÖRSTER, T.: *Elektrolytische Dissoziation angeregter Moleküle*. Z. Elektrochem., 54:42–46, 1950.
- [83] CREEMERS, T.M.H., A.J. LOCK, V. SUBRAMANIAM, T.M. JOVIN und S. VÖLKER: *Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning*. Nature Struct. Biol., 6:557–560, 1999.
- [84] VAN THOR, J.J., A.J. PIERIK, I. NUGTEREN-ROODZANT, A. XIE und K.J. HELLINGWERF: *Characterization of the photoconversion of green fluorescent protein with FTIR spectroscopy*. Biochemistry, 37:16915–16921, 1998.

- [85] VAN THOR, J.J., T. GENSCHE, K.J. HELLINGWERF und L.N. JOHNSON: *Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate* 222. *Nature Struct. Biol.*, 9:37–41, 2002.
- [86] DICKSON, R.M., A.B. CUBITT, R.Y. TSIEN und W.E. MOERNER: *On/off blinking and switching of single molecules of green fluorescent protein*. *Nature*, 388:355–358, 1997.
- [87] PETERMAN, E.J.G., S. BRASSELET und W.E. MOERNER: *The fluorescence dynamics of single molecules of green fluorescent protein*. *J. Phys. Chem. A*, 103:10553–10560, 1999.
- [88] CREEMERS, T., A. LOCK, V. SUBRAMANIAM, T. JOVIN und VÖLKER S.: *Photophysics and optical switching in green fluorescent protein mutants*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:2974–2978, 2000.
- [89] GARCIA-PARAJO, M., G. SEGERS-NOLTEN, J. VEERMAN, J. GREVE und N. VON HULST: *Real-time light-driven dynamics of the fluorescence emission in single green fluorescent protein molecules*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:7237–7242, 2000.
- [90] WEBER, W., V. HELMS, J.A. MCCAMMON und P.W. LANGHOFF: *Shedding light on the dark and weakly fluorescent states of green fluorescent proteins*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6177–6182, 1999.
- [91] YANG, F., L.G. MOSS und G.N. PHILLIPS JR.: *Molecular structure of green fluorescent protein*. *Nature Biotech.*, 14:1246–1251, 1996.
- [92] ORMÖE, M., A. CUBITT, K. KALLIO, L. GROSS, R.Y. TSIEN und REMINGTON J.: *Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein*. *Science*, 273:1392–1395, 1996.
- [93] REID, B.G. und G.C. FLYNN: *Chromophore formation in green fluorescent protein*. *Biochemistry*, 36:6786–6791, 1997.
- [94] WACHTER, R., M. ELSLIGER, K. KALLIO, G. HANSON und REMINGTON J.: *Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein*. *Structure*, 6:1267–1277, 1998.

- [95] ELSLIGER, M., R. WACHTER, G. HANSON und REMINGTON J.: *Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH*. *Biochemistry*, 38:5296–5301, 1999.
- [96] BATTISTUTTA, R., A. NEGRO und G. ZANOTTI: *Crystal structure and refolding properties of the mutant F99S/M153T/V163A of the green fluorescent protein*. *Proteins: Struct.*, 41:429–437, 2000.
- [97] GROSS, L.A., G.S. BAIRD, R.C. HOFFMAN, K.K. BALDRIDGE und R.Y. TSIEN: *The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:11990–11995, 2000.
- [98] YARBROUGH, D., R. WACHTER, R. KALLIO, M. MATZ und J. REMINGTON: *Redefined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein, at 2.0 Å resolution*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:462–467, 2001.
- [99] LUKYANOV, K., A.F. FRADKOV, N.G. GURSKAYA, M.V. MATZ, Y.A. LABAS, A.P. SAVITSKY, M.L. MARKELOV, A.G. ZARAIKY, X. ZHAO, Y. FANG, W. TAN und LUKYANOV S.: *Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog*. *J.Biol.Chem.*, 275:25879–25882, 2000.
- [100] MARTYNOV, V., A. SAVITSKY, N. MARTYNOVA, P. SAVITSKY, K. LUKYANOV und LUKYANOV S.: *Alternative cyclization in GFP-like proteins family*. *J.Biol.Chem.*, 276:21012–21016, 2001.
- [101] HOPF, M., W. GÖHRING, A. RIES, R. TIMPL und HOHENESTER E.: *Crystal structure and mutational analysis of a perlecan-binding fragment of nidogen-1*. *Nature Struct.Biol.*, 8:634–640, 2001.
- [102] STRIKER, G., V. SUBRAMANIAM, C.A.M. SEIDEL und A. J. VOLKMER: *Photochromicity and fluorescence lifetimes of green fluorescent protein*. *J. Phys. Chem. B*, 103:8612–8617, 1999.
- [103] WARD, W.W.: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications*, Seiten 235–242. Academic Press, New York, 1981.

- [104] WARD, W.W., H.J. PRENTICE, A.F. ROTH, C.W. CODY und S.C. REEVES: *Spectral perturbations of the Aequorea green-fluorescent protein*. Photochem. Photobiol., 35:803–808, 1982.
- [105] KUMMER, A.D., C. KOMPA, H. LOSSAU, F. PÖLLINGER-DAMMER, M.E. MICHEL-BEYERLE, C. SILVA, E. BYLINA, W. COLEMAN, M. YANG und D. YOUVAN: *Dramatic reduction in fluorescence quantum yield in mutants of green fluorescent protein due to fast internal conversion*. Chem.Phys., 237:183–193, 1998.
- [106] NIWA, H., S. INOUE, T. HIRANO, T. MATSUNO, S. KOJIMA, M. KUBOTA, M. OHASHI und F.I. TSUJI: *Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:13617–13622, 1996.
- [107] KUMMER, A.D., J. WIEHLER, H. REHABER, C. KOMPA, B. STEIPE und MICHEL-BEYERLE M.E.: *Effects of threonine 203 replacements on excited-state dynamics and fluorescence properties of the green fluorescent protein*. J. Phys. Chem. B., 104:4791–4798, 2000.
- [108] A., WARREN und M. ZIMMER: *Computational analysis of Thr203 isomerization in green fluorescent protein*. J. Mol. Graph. Mod., 19:297–303, 2001.
- [109] BELL, A.F., X. HE, R.M. WACHTER und P.J. TONGE: *Probing the ground state structure of the green fluorescent protein chromophore using Raman spectroscopy*. Biochemistry, 39:4423–4431, 2000.
- [110] VOITYUK, A.A., M.E. MICHEL-BAYERLE und N. RÖSCH: *Structure and rotation barriers for ground and excited states of the isolated chromophore of the green fluorescent protein*. Chem. Phys. Lett., 296:269–276, 1998.
- [111] DANIELSON, M.A. und J.J. FALKE: *Use of  $^{19}\text{F}$  NMR to probe protein structure and conformational changes*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 25:163–195, 1996.
- [112] DOMINGUEZ, M.A., K.C. THORNTON, M.G. MELENDEZ und C.M. DUPUREUR: *Differential effects of isomeric incorporation of Fluorophenylalanines into Pvull Endonuclease*. Prot. Struct. Funct. Gen., 45:55–61, 2001.
- [113] XIAO, G., J.F. PARSONS, K. TESH, R.N. ARMSTRONG und G.L. GILLILAND: *Conformational changes in the crystal structure of rat glutathione transferase M1-1 with global substitution of 3-fluorotyrosine for tyrosine*. J. Mol. Biol., 281:323–339, 1998.

- [114] HULL, W.E. und B.D. SYKES: *Dipolar nuclear spin relaxation of  $^{19}\text{F}$  in multispin systems. Application to  $^{19}\text{F}$  labeled proteins.* J. Chem. Phys., 63:867–880, 1975.
- [115] HULL, W.E. und B.D. SYKES: *Fluorotyrosine alkaline phosphatase: internal mobility of individual tyrosines and the role of chemical shift anisotropy as a  $^{19}\text{F}$  nuclear spin relaxation mechanism in proteins.* J. Mol. Biol., 98:121–153, 1975.
- [116] RONG, D., C.-L.S. LIN, D'AVIGNON D.A., A.J. LOVEY, M. ROSENBERGER und E. LI:  *$^{19}\text{F}$  NMR studies of retinol transfer between cellular retinol binding proteins and phospholipid vesicles.* FEBS Lett., 402:116–120, 1997.
- [117] DOBSON, C.M. und P.J. HORE: *Kinetic studies of protein folding using NMR spectroscopy.* Nature Struct. Biol., NMR supplement:504–507, Juli 1998.
- [118] BANN, J.G., J. PINKNER, S.J. HULTGREN und C. FRIEDEN: *Real-time and equilibrium  $^{19}\text{F}$ -NMR studies reveal the role of domain-domain interactions in the folding of the chaperone PapD.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:709–714, 2002.
- [119] KLEIN-SEETHARAMAN, J., E.V. GETMANOVA, M.C. LOEWEN, P.J. REEVES und H.G. KHORANA: *NMR spectroscopy in studies of light-induced structural changes in mammalian rhodopsin: applicability of solution  $^{19}\text{F}$  NMR.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:13744–13749, 1999.
- [120] CRAMERI, A., E.A. WHITEHORN, E. TATE und W.P. STEMMER: *Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling.* Nat. Biotechnol., 14:315–319, 1996.
- [121] GEORGESCU, J.P.: *NMR-Untersuchungen und Strukturbestimmungen von Biomolekülen: Linkerpolypeptid  $L_C^{7,8}$ , Interleukin-16, grün fluoreszierendes Protein (GFPuv).* Doktorarbeit, Technische Universität München, Fakultät für Chemie, 2000.
- [122] FORD, C.F., I. SUOMINEN und C.E. GLATZ: *Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins.* Prot. Express. & Purif., 1991.
- [123] KELLY, M.J., C. KRIEGER, L.J. BALL, Y. YU, G. RICHTER, P. SCHMIEDER, A. BACHER und H. OSCHKINAT: *Application of amino acid type-specific  $^1\text{H}$ - and  $^{14}\text{N}$ -labeling in a  $^2\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ -labeled background to a 47 kDa homodimer: potential for NMR structure determination of large proteins.* J. Biomol. NMR., 1999.

- [124] GODDARD, T.D. und D.G. KNELLER: *SPARKY 3*. University of California, San Francisco, 2001.
- [125] FUSHMAN, D., R. WEISEMANN, H. THÜRING und H. RÜTERJANS: *Backbone dynamics of ribonuclease T1 and its complex with 2'GMP studied by two dimensional heteronuclear NMR spectroscopy*. J. Biomol. NMR, 4:61–78, 1994.
- [126] SEIFERT, M.H.J.: *Auf dem Weg zur Gewebecharakterisierung: Parametersensitive NMR-Bildgebung*. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Experimentelle Physik V, Universität Würzburg, 1999.
- [127] DINGLEY, A.J., J.P. MACKAY, B.E. CHAPMAN, M.B. MORRIS, P.W. KUCHEL, B.D. HAMBLY und G.F. KING: *Measuring protein self-association using pulsed-field-gradient NMR spectroscopy: application to myosin light chain 2*. J. Biomol. NMR, 6:321–328, 1995.
- [128] ILYINA, E., V. ROONGTA, H. PAN, C. WOODWARD und K.H. MAYO: *A pulsed-field gradient study of bovine pancreatic trypsin inhibitor self-association*. Biochemistry, 36:3383–3388, 1997.
- [129] PIOTTO, M., V. SAUDEK und V. SKLENAR: *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions*. J. Biomol. NMR, 1992.
- [130] CANTOR, C. und P.R. SCHIMMEL: *Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
- [131] FARROW, N.A., R. MUHANDIRAM, A.U. SINGER, S.M. PASCAL, C.M. KAY, G. GISH, S.E. SHOELSON, T. PAWSON, J.D. FORMAN-KAY und L.E. KAY: *Backbone dynamics of a free and a phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by <sup>15</sup>N NMR Relaxation*. Biochemistry, 33:5984–6003, 1994.
- [132] CHOU, K.-C.: *Low-frequency motions in protein molecules -  $\beta$ -sheet and  $\beta$ -barrel*. Biophys. J., 48:289–297, 1985.
- [133] MINKS, C., R. HUBER, L. MORODER und N. BUDISA: *Atomic mutations at the single tryptophan residue of human recombinant annexin V: effects on structure, stability, and activity*. Biochemistry, 38:10649–10659, 1999.

- [134] MINKS, C., S. ALEFELDER, L. MORODER, R. HUBER und N. BUDISA: *Towards new protein engineering: In vivo building and folding of protein shuttles for drug delivery and targeting by the selective pressure incorporation (SPI) method*. Tetrahedron, 56:9431–9442, 2000.
- [135] LUCK, L.A., J.E. VANCE, T.M. O'CONNELL und R.E. LONDON: *<sup>19</sup>F NMR relaxation studies on 5-fluorotryptophan- and tetradeutero-5-fluorotryptophan-labeled E. coli glucose/galactose receptor*. J. Bio. NMR, 7:261–272, 1996.
- [136] FRAUENFELDER, H., S.G. SLIGAR und P.G. WOLYNES: *The energy landscape and motions of proteins*. Science, 254:1598–1603, 1991.
- [137] WÜTHRICH, K.: *NMR of proteins and nucleic acids*. John Wiley & Sons, New York, 1986.
- [138] LAU, E.Y. und J.T. GERIG: *Origins of fluorine NMR chemical shifts in fluorine-containing proteins*. J. Am. Chem. Soc., 122:4408–4417, 2000.
- [139] KNEEN, M., J. FARINAS, Y.X. LI und A.S. VERKMAN: *Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator*. Biophys. J., 74:1591–1599, 1998.
- [140] PALM, G.J., A. ZDANOV, G.A. GAITANARIS, R. STAUBER, G.N. PAVLAKIS und A. WLODAWER: *The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein*. Nature Struct. Biol., 4:361–365, 1997.
- [141] LAKOWICZ, J.R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic, 1999.
- [142] ROPSON, I.J. und C. FRIEDEN: *Dynamic NMR spectral analysis and protein folding: Identification of a highly populated folding intermediate of rat intestinal fatty acid-binding protein by <sup>19</sup>F NMR*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7222–7226, 1992.
- [143] KWON, K., Y.L. JIANG, F. SONG und J.T. STIVERS: *<sup>19</sup>F NMR Studies of vaccinia type IB topoisomerase*. J. Biol. Chem., 277:353–358, 2002.
- [144] CHO, B.P. und L. ZHOU: *Probing the conformational heterogeneity of the acetylaminofluorene-modified 2'-deoxyguanosine and DNA by <sup>19</sup>F NMR spectroscopy*. Biochemistry, 38:7572–7583, 1999.
- [145] DUNITZ, J.D.: *Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions*. Chem. Biol., 2:709–712, 1995.



- [146] LEE, A.L. und A.J. WAND: *Microscopic origins of entropy, heat capacity and the glass transition in proteins*. Nature, 411:501–504, 2001.
- [147] WAND, A.J.: *Dynamic activation of protein function: a view emerging from NMR spectroscopy*. Nature Struct. Biol., 8:926–931, 2001.
- [148] EVENÄS, J., S. FORSEN, A. MELMENDAL und M. AKKE: *Backbone dynamics and energetics of a Calmodulin domain mutant exchanging between closed and open conformations*. J. Mol. Biol., 289:603–617, 1999.
- [149] BUDISA, N., J. BAE, M. RUBINI, E. WEYHER, W. WENGER, K.M. AZIM, L. MORODER und R. HUBER: *Chromophore redesign by bioincorporation of non-canonical amino acids into proteins: 4-amino-tryptophan converts cyan into gold fluorescent protein by large red shift in fluorescence*. Manuskript in Vorbereitung.
- [150] SKALICKY, J.J., J.L. MILLS, S. SHARMA und T. SZYPERSKI: *Aromatic ring flipping in supercooled water: implications for NMR-based structural biology of proteins*. J. Am. Chem. Soc., 123:388–397, 2001.
- [151] CHEN, M.C., C.R. LAMBERT, J.D. URGITIS und M. ZIMMER: *Photoisomerization of green fluorescent protein and the dimensions of the chromophore cavity*. Chem. Phys., 270:157–164, 2001.
- [152] PLETNEVA, E.V., A.T. LAEDERACH, D.B. FULTON und N.M. KOSTIC: *The role of cation- $\pi$  interactions in biomolecular association. Design of peptides favoring interactions between cationic and aromatic amino acid side chains*. J. Am. Chem. Soc., 123:6232–6245, 2001.
- [153] BLUME-JENSEN, P. und T. HUNTER: *Receptor and cytoplasmic oncogenic kinases*. Nature, 411:355, 2001.
- [154] JOHNSON, D.A., P. AKAMINE, E. RADZIO-ANDZELM, E. A. MADHUSUDAN und S.S. TAYLOR: *Dynamics of cAMP dependent kinase*. Chem. Rev., 101:2243–227, 2001.
- [155] ENGH, R.A. und D. BOSSEMEYER: *Structural aspects of protein kinase control - role of conformational flexibility*. Pharmacol. Ther., in press.
- [156] M., ZACCOLO und T. POZZAN: *Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes*. Science, 295:1711–1715, 2002.

- [157] LODISH, H., D. BALTIMORE, A. BERK, S.L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA und J. DARNELL: *Molekulare Zellbiologie*. de Gruyter, New York, 2 Auflage, 1996.
- [158] MORGAN, D.O. und H.L. DE BONDT: *Protein kinase regulation: insights from crystal structure analysis*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:239–246, 1994.
- [159] TAYLOR, S.S., E. RADZIO-ANDZELM, MADHUSUDAN, X. CHENG, L. TEN EYCK und N. NARAYANA: *Catalytic Subunit of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase: Structure and Dynamics of the Active Site Cleft*. *Pharmacol. Ther.*, 1999.
- [160] YONEMOTO, W., M.L. MCGLONE, B. GRANT und S.S. TAYLOR: *Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli*. *Protein Engineering*, 10:915–925, 1997.
- [161] YONEMOTO, W., M.L. MCGLONE, B. GRANT und S.S. TAYLOR: *Identification of phosphorylation sites in the recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase*. *J. Biol. Chem.*, 268:18626–18632, 1993.
- [162] TONER-WEBB, J., S.M. VAN PATTEN, D.A. WALSH und S.S. TAYLOR: *Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase*. *J. Biol. Chem.*, 267:25174–25180, 1992.
- [163] JEDRZEJEWSKI, P.T., A. GIROD, A. THOLEY, N. KÖNIG, S. THULLNER, V. KINZEL und D. BOSSEMEYER: *A conserved deamidation site at Asn 2 in the catalytic subunit of mammalian cAMP-dependent protein kinase detected by capillary LC-MS and tandem mass spectrometry*. *Protein Science*, 7:457–469, 1998.
- [164] HERBERG, F.W., B. ZIMMERMANN, M. MCGLONE und S.S. TAYLOR: *Importance of the  $\alpha$ -Helix of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase for stability and for orienting subdomains at the cleft interface*. *Protein Sci.*, 6:569–579, 1997.
- [165] MASHHOON, N., G. CARMEL, J. W. PFLUGRATH und J. KURET: *Structure of the Unliganded Camp-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit from Saccharomyces Cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 387:11, 2001.
- [166] GIROD, A., V. KINZEL und D. BOSSEMEYER: *In vivo activation of recombinant cAPK catalytic subunit active site mutants by coexpression of the wild-type enzyme - evidence for intermolecular cotranslational phosphorylation*. *FEBS Lett.*, 391:121–125, 1996.

- [167] VOGEL, H.J.: *Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance of phosphoproteins*. In: *Methods Enzymol.*, Band 177 Part B, Seiten 263–282. Academic Press, Inc., San Diego, 1989.
- [168] TAKAHASHI, K., M. SHIMIDZU, H. SHINDO, T. KAWAMOTO, M. NISHI, U. MATSUMOTO und S. TANIGUCHI: *Tyrosine-specific dephosphorylation with alkaline phosphatase and epidermal growth factor receptor kinase as evidenced by  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy*. *J. Biochem.*, 101:1107–1114, 1987.
- [169] HIRAI, H., K. YOSHIOKA und K. YAMADA: *A simple method using  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy for the study of protein phosphorylation*. *Brain Research Protocols*, 5:182–189, 2000.
- [170] HULL, W.E., S.E. HALFORD, H. GUTFREUND und B.D. SYKES:  *$^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance study of alkaline phosphatase: the role of inorganic phosphate in limiting the enzyme turnover rate at alkaline pH*. *Biochemistry*, 15:1547–1561, 1976.
- [171] BRAUER, M. und B.D. SYKES: *Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the adenosine 5'-triphosphate-calcium-G-actin complex*. *Biochemistry*, 20:2060–2064, 1981.
- [172] BRAUER, M. und B.D. SYKES: *Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of adenosine 5'-triphosphate bound to a nitrated derivative of G-actin*. *Biochemistry*, 20:6767–6775, 1981.
- [173] EVRARD, A., M. ZEGHOUF, M. FONTECAVE, C. ROBY und J. COVES:  *$^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance study of the flavoprotein component of the Escherichia coli sulfite reductase*. *Eur. J. Biochem.*, 261:430–437, 1999.
- [174] SWIDEREK, K., K. JAQUET, H.E. MEYER, C. SCHÄCHTELE, F. HOFMANN und M.G. HEILMEYER JR: *Sites phosphorylated in bovine cardiac troponin T and I - characterization by  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy and phosphorylation by protein kinases*. *Eur. J. Biochem.*, 1990.
- [175] KEANE, N.E., P.G. QUIRK, Y. GAO, V.B. PATCHELL, PERRY S.V. und B.A. LEVINE: *The ordered phosphorylation of cardiac troponin I by cAMP-dependent protein kinase - structural consequences and functional implications*. *Eur. J. Biochem.*, 248:329–337, 1997.
- [176] KILIMANN, M.W., K.D. SCHNACKERZ und L.M. HEILMEYER JR.: *Nonactivated phosphorylase kinase is a phosphoprotein: differentiation of two classes of endogenous phosphoseri-*

- ne residues by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy and phosphatase sensitivity.* Biochemistry, 23:112–117, 1984.
- [177] HAHMANN, M., T. MAURER, M. LORENZ, W. HENGSTENBERG, S. GLASER und H.R. KALBITZER: *Structural studies of histidine-containing phosphocarrier protein from Enterococcus faecalis.* Eur. J. Biochem., 252:51–58, 1998.
- [178] MACHEROUX, P., C. SANNER, H. BUTTNER, V. KIEWEG, H. RUTERJANS und S. GHISLA: *Medium-chain acyl CoA dehydrogenase: evidence for phosphorylation.* Biol. Chem., 378:1381–1385, 1997.
- [179] ECKERT, B.S. und P.L. YEAGLE: *Site-specificity of ethanol-induced dephosphorylation of rat hepatocyte keratins 8 and 18: A  $^{31}\text{P}$  NMR study.* Cell Motility & the Cytoskeleton, 33:30–37, 1996.
- [180] WILLIAMS, S.P., B.D. SYKES und W.A. BRIDGER: *Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of the active site phosphohistidine and regulatory phosphoserine residues of rat liver ATP-citrate lyase.* Biochemistry, 24:5527–5531, 1985.
- [181] SHINDO, H.: *NMR relaxation processes of  $^{31}\text{P}$  in Macromolecules.* Biopolymers, 19:509–522, 1980.
- [182] WITHERS, S.G., N.B. MADSEN und B.D. SYKES:  *$^{31}\text{P}$  relaxation studies of the activation of the coenzyme phosphate of glycogen phosphorylase.* Biophys. J., 48:1019–1026, 1985.
- [183] UN, S. und M.P. KLEIN: *Study of the  $^{31}\text{P}$  NMR chemical shift tensors and their correlation to molecular structure.* J. Am. Chem. Soc., 111:5119–5124, 1989.
- [184] PRADE, L., R.A. ENGH, A. GIROD, V. KINZEL, R. HUBER und D. BOSSEMEYER: *Staurosporine-induced conformational changes of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit explain inhibitory potential.* Structure, 5:1627–1637, 1997.
- [185] GANGAL, M., S. COX, J. LEW, T. CLIFFORD, S.M. GARROD, M. ASCHBAHER, S.S. TAYLOR und D. JOHNSON: *Backbone flexibility of five sites on the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in the open and closed conformations.* Biochemistry, 37:13728–13735, 1998.

- [186] KWON, Y.G., J. SRINIVASAN, M. MENELOW, S. PLUSKEY und D.S. LAWRENCE: *Stereochemistry specifies the regiochemistry of phosphorylation in two cAMP-dependent protein kinase substrates*. J. Biol. Chem., 268:16725–16729, 1993.
- [187] QAMAR, R., M.Y. YOON und P.F. COOK: *Kinetic mechanism of the adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase catalytic subunit in the direction of magnesium adenosine 5'-diphosphate phosphorylation*. Biochemistry, 31:9986–9992, 1992.
- [188] PROROK, M., D.K. SUKUMARAN und D.S. LAWRENCE: *The cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle is a homoserine kinase*. J. Biol. Chem., 264:17727–17733, 1989.
- [189] ENGH, R.A., A. GIROD, V. KINZEL, R. HUBER und D. BOSSEMEYER: *Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity*. J. Biol. Chem., 271:26157–26164, 1996.
- [190] YEUNG, A.C., P.R. GLAHN und D.D. MILLER: *Dephosphorylation of sodium caseinate, enzymatically hydrolyzed casein and casein phosphopeptides by intestinal alkaline phosphatase: implications for iron availability*. J. Nutr. Biochem., 12:292–299, 2001.
- [191] HAUSER, H., C. RADLOFF, R.R. ERNST, S. SUNDELL und I. PASCHER: *The  $^{31}\text{P}$  chemical shielding tensor in phospholipids*. J. Am. Chem. Soc., 110:1054–1058, 1988.
- [192] ANGLISTER, J., GRZESIEK. S., H. REN, C.B. KLEE und A. BAX: *Isotope-edited multidimensional NMR of calcineurin B in the presence of the non-deuterated detergent CHAPS*. J. Biomol. NMR., 3:121–126, 1993.
- [193] SHOJI, S., K. TITANI, J.G. DEMAILLE und E.H. FISCHER: *Sequence of two phosphorylated sites in the catalytic subunit of bovine cardiac muscle adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase*. J. Biol. Chem, 254:6211–6214, 1979.
- [194] KNIGHTON, D. R., J. ZHENG, L. F. TEN EYCK, A. ASHFORD, N.-H. XUONG, S. S. TAYLOR und J. M. SOWADSKI: *Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase*. Science, 253:407–414, 1991.

- [195] NARAYANA, N., S. COX, N.-H. XUONG, L. F. TEN EYCK und S.S. TAYLOR: *A binary complex of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase and adenosine further defines conformational flexibility*. *Structure*, 5:921–935, 1997.
- [196] NARAYANA, N., T. C. DILLER, K. KOIDE, M. E. BUNNAGE, K. C. NICOLAOU, L. L. BRUNTON, N.-H. XUONG, L. F. TEN EYCK und S.S. TAYLOR: *Crystal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase*. *Biochemistry*, 38:2367–2376, 1999.
- [197] KNIGHTON, D. R., S. M. BELL, J. ZHENG, L. F. TEN EYCK, N.-H. XUONG, S. S. TAYLOR und J. M. SOWADSKI: *2.0 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with a peptide inhibitor and detergent*. *Acta Crystallogr.*, D49:357–361, 1993.
- [198] ZHENG, J., D. R. KNIGHTON, N.-H. XUONG, S. S. TAYLOR, J. M. SOWADSKI und L. F. TEN EYCK: *Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations*. *Protein Sci.*, 2:1559–1573, 1993.
- [199] KARLSSON, R., J. ZHENG, N.-H. XUONG, S. S. TAYLOR und J. M. SOWADSKI: *The crystal structure of the mammalian catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase and an inhibitor peptide displays an open conformation*. *Acta Crystallogr.*, D49:381–388, 1993.
- [200] ZHENG, J., D. R. KNIGHTON, L. F. TEN EYCK, R. KARLSSON, N.-H. XUONG, S. S. TAYLOR und J. M. SOWADSKI: *Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor*. *Biochemistry*, 32:2154–2161, 1993.
- [201] MADHUSUDAN TRAFNY, E. A., N.-H. XUONG, J. A. ADAMS, L. F. TEN EYCK, S. S. TAYLOR und J. M. SOWADSKI: *cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer*. *Protein Sci.*, 3:176–187, 1994.
- [202] NARAYANA, N., S. COX, S. SHALTIEL, S. S. TAYLOR und N.-H. XUONG: *Crystal structure of a polyhistidine-tagged recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with the peptide inhibitor PKI(5-24) and adenosine*. *Biochemistry*, 36:4438–4448, 1997.

- [203] BOSSEMEYER, D., R. A. ENGH, V. KINZEL, H. PONSTINGL und R. HUBER: *Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn<sup>2+</sup> adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24)*. EMBO J., 12:849–859, 1993.
- [204] ENGH, R.A. und D. BOSSEMEYER: *The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation -targets for therapeutic intervention*. Advan. Enzyme Regul., 41:121–149, 2001.
- [205] HUBBARD, S.R.: *Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog*. EMBO J., 16:5572–5581, 1997.
- [206] KINZEL, V., N. KÖNIG, R. PIPKORN, D. BOSSEMEYER und W.D. LEHMANN: *The amino terminus of PKA catalytic subunit - A site for introduction of posttranslational heterogeneities by deamidation: D-Asp2 and D-isoAsp2 containing isozymes*. Protein Science, 9:2269–2277, 2000.
- [207] WALKER, F., J. DEBLAQUIERE und A.W. BURGESS: *Translocation of pp60c-src from the plasma membrane to the cytosol after stimulation by platelet-derived growth factor*. J. Biol. Chem., 268:19552–19558, 1993.
- [208] PEPPERKOK, R., A. HOTZ-WAGENBLATT, N. KÖNIG, A. GIROD, D. BOSSEMEYER und V. KINZEL: *Intracellular distribution of mammalian protein kinase A catalytic subunit altered by conserved Asn2 deamidation*. J. Cell. Biol., 48:715–726, 2000.
- [209] MCLAUGHLIN, S. und A. ADEREM: *The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions*. Trends Biochem. Sci., 20:272–27, 1995.
- [210] GANGAL, M., T. CLIFFORD, J. DEICH, X. CHENG, S.S. TAYLOR und D.A. JOHNSON: *Mobilization of the A-kinase N-myristate through an isoform specific intermolecular switch*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 96:12394–12399, 1999.
- [211] SKÅLHEGG, B.S., O. WITCZAK, N. REINTON, T. EIDE, S. EIKVAR, P. COLLAS, K. TASKÉN, T. JAHNSEN und S. ØRSTAVIK: *Specific effects of cAMP are mediated by multiple isozymes of cyclic AMP-dependent protein kinase and A-kinase anchoring proteins*. J. Mol. Biol. Biotech., 1:49–63, 1999.

- [212] THOLEY, A., R. PIPKORN, D. BOSSEMEYER, V. KINZEL und J. REED: *Influence of myristoylation, phosphorylation, and deamidation on the structural behavior of the N-terminus of the catalytic subunit of CAMP-dependent protein kinase*. *Biochemistry*, 40:225–231, 2001.
- [213] CHIU, Y. S. und M. TAO: *Autophosphorylation of rabbit skeletal muscle cyclic AMP-dependent protein kinase I catalytic subunit*. *J. Biol. Chem.*, 253:7145–7148, 1978.
- [214] DIERCKS, T., M. COLES und H. KESSLER: *An efficient strategy for assignment of cross-peaks in 3D heteronuclear NOESY experiments*. *J. Biomol. NMR*, 15:177–180, 1999.
- [215] FERNANDEZ, C., C. HILTY, S. BONJOUR, K. ADEISHVILI, K. PERVUSHIN und K. WÜTHRICH: *Solution NMR studies of the integral membrane proteins OmpX and OmpA from Escherichia Coli*. *FEBS Lett.*, 504:173–178, 2001.
- [216] DIGIAMMARINO, E.L., I. FILIPPOV, J.D. WEBER, B. BOTHNER und R.W. KRIWACKI: *Solution Structure of the p53 Regulatory Domain of the p19(Arf) Tumor Suppressor Protein*. *Biochemistry*, 40:2379–2386, 2001.
- [217] SODICKSON, A. und CORY D.G.: *A generalized k-space formalism for treating the spatial aspects of a variety of NMR experiments*. *Prog. NMR Spectros.*, 33:77–108, 1998.



# Danksagung

Ich danke ganz besonders:

dem SFB 533 fürs Geld,

Prof. Dr. Kessler und Prof. Dr. Michel-Beyerle für die Betreuung der Doktorarbeit,

Prof. Dr. Huber für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu arbeiten,

Tad Holak für die Möglichkeit zu einem selbständigen Arbeiten in seiner Gruppe,

Rick Engh für die sehr interessante Zusammenarbeit,

Nediljko Budisa für die  $^{19}\text{F}$  GFP Proben und die sehr gute Zusammenarbeit,

Christine Breitenlechner für die PKA Proben und die sehr gute Zusammenarbeit,

Dorota Ksiazek für die GFP-Proben und die stetige Hilfe bei Laborarbeiten,

M. Kamran Azim für die Zusammenarbeit bei der CFP Modellierung,

Till Rehm für die gute Zusammenarbeit am Spektrometer,

Pawel Smialowski für die selektiv  $^{15}\text{N}$ -His GFP Probe,

allen anderen Mitgliedern der NMR-Gruppe für das gute Klima,

meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung in allen Lebenslagen,

und vorallem Ruth Pfänder für Geduld, Liebe und Lesen der Doktorarbeit.