

Technische Universität München
Fakultät für Chemie

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

NMR-spektroskopische Untersuchungen von Actin- bindenden Proteinen aus *Dictyostelium discoideum*

Chrystelle Catherine Mavoungou

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. Steffen J. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. h. c. Robert Huber
2. Priv.-Doz. Dr. Gerd Gemmecker

Die Dissertation wurde am 28.03.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 03.06.2003 angenommen.

Danksagung

Die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Abhandlung wurden in der Zeit von Juli 2000 bis einschließlich Dezember 2002, in der Arbeitsgruppe "Biologische NMR-Spektroskopie,, der Abteilung "Strukturforschung,, (Dir. Prof. Dr. Huber) am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Herrn Dr. Tad Holak, durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank geht zuerst an Herrn Prof. Dr. Huber, der mir die Gelegenheit gab in seiner Abteilung eine Promotion durchzuführen und vor allem die verantwortungsvolle Aufgabe übernahm, mein Doktorvater zu werden.

Ich danke ganz herzlich Herrn Dr. Tad Holak wegen seines Vertrauens und die Bereitstellung der Materialien, Geräte und des nötigen wissenschaftlichen Freiraums, ohne die, die Durchführung dieser Arbeit bis zum Ende nicht möglich wäre. Seine wertvollen Ratschläge haben zum Erfolg dieser Promotion beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. Schleicher (physiologisches Institut der LMU in München) bedanken, dessen Kooperation sehr hilfreich für die Durchführung dieser Promotion war.

Herrn Prof. Dr. Gerisch und Frau Dr. Müller-Taubenberger danke ich für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen und Materialien für die zellbiologischen und biochemischen Versuche im Laufe dieser Promotion. Die Mitwirkung und der Einsatz von Frau Dr. Müller-Taubenberger hat zur Erweiterung meines Wissens über den Umgang mit Dictyostelium discoideum im Labor beigetragen. Die guten Ratschläge zur Gestaltung der schriftlichen Fassung der Doktorarbeit waren ebenfalls vom besonderen Interesse. Dafür bin ich sehr dankbar.

Frau Rüller möchte ich auch ganz herzlich bedanken wegen ihrer seelischen Unterstützung, ihrer guten Ratschläge und ihrem Einsatz bei den sehr wichtigen Verwaltungsangelegenheiten, an die jeder Doktorand angewiesen ist.

Mein ganz besonderer Dank gilt für die Arbeitsgruppe Gerisch: Frau Helen de los Santos-Jackowski, Frau Angelika Konzok, Frau Marlis Fürbringer, Frau Ursula Mintert, Frau Evelyn Simmeth, Frau Jana Köhler, Frau Emmanuel Burghardt und Herr Dr. Ralph Neujahr, die mich bedingungslos aufgenommen haben und für eine stets gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Frau Ursula Minterts Reinigungsprotokoll hat zu meinem Erfolg im Labor beigetragen. Helen de los Santos-Jackowski, Angelika Konzok, Jana Köhler, Evelyn Simmeth möchte ich außerdem noch bedanken für ihre Bereitschaft mich in die zellbiologischen Arbeitsmethoden mit Dictyostelium discoideum einzuweißen. Ihre Tipps waren sehr hilfreich.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schleicher möchte ich auch danke schön sagen, insbesondere an Herrn Lars Israel, aufgrund seines Arbeitseinsatzes und seines Vertrauens hinsichtlich meiner Person.

An unserer Abteilung für "Strukturforschung,, möchte ich auch einen ganz besonderen Dank aussprechen: an Herrn Dr. Hans Brandstetter, wegen seiner Arbeit und Kooperation, Herrn Dr. Uwe Jakob für das Erlernen von Graphikanwendungen sowie seine konstruktiven Kritiken, Herrn Michael Koch für seine Hilfe und seine Freundschaft, Herrn Otto Kyrieleis für das Erlernen von anderen Graphikanwen-

dungen. Dabei vergesse ich natürlich nicht mich bei Herrn Martin Augustin, Herrn Dr. Tim Klause, Herrn Dr. Jens Kaiser, Dr. Pablo Fuentes-Prior, Frau Daniela Jozic, Frau Kerstin Wendt, Herrn Rasso Willkomm, Frau Iris Fritze, Herrn Snezan Marinkovic und Herrn Werner Dersch, wegen ihrer Unterstützung, zu bedanken.

Besonders berührt war ich durch die Bekanntschaft von ganz besonderen Menschen im Laufe meiner Promotionszeit, die mir ihre dauerhafte Freundschaft angeboten haben und immer für mich da waren: Frau Dr. Conny Ciosto, Frau Dorota Kziazek, Frau Irena Bonin, Frau Dr. Francesca Benvenuti, Frau Dr. Marta Garrido-Franco, Frau Dr. Sofia Gadeiro Macieira, Frau Dr. Ruth Pfaender, Frau Mireia Comellas, Frau Dr. Berta Martins, Frau Dr. Eva Estebanez-Perpina, Frau Agata Smialowska, Herr Dr. Markus Siefert, Herr Yuri Cheburkin, Herr Dr. Paolo Perani, Herr Dr. Michael Brüggert, Herr Dr. Till Rehm, Herr Benedikt Burninger, Herr Fabio Stanchi, Frau Federica, Frau Cornelia Stoll und schließlich die unvergesslichen Herr Dr. Raphael und Frau Dr. Iulia Georgescu.

Bei allen Kollegen meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich auch bedanken: Herr Loyola D'Silva, Frau Joma Kanikadu Joy, Frau Madhumita Ghosh, Frau Isabel Winkelmann, Frau Madhumita Ghosh, Herr Marcin Krajewski, Herr Sudipta Majumdar, Herr Narashimha Rao Nalabothula, Herr Grzegorz Popowicz, Herr Grzegorz Dubin, Frau Magda Wisniewska, Herr Mahavir Singh, Herr Dr. Mariusz Kamionka, Herr Sreejesh Shanker, Herr Igor Siwanowicz, Herr André Schönichen, Herr Pawel Smialowski, Marta Figures Centena.

Meinen Freunden Frau Anja Belling, Herrn Walter Gmelin, Herrn Dr. Christian Benda, Frau Dorota Kziazek, Frau Irena Bonin, Frau Dr. Francesca Benvenuti, Frau Dr. Marta Murgia, Frau Dr. Conny Ciosto, Frau Andrea Liptay-Wagner, Frau Tina Wallen, danke ich für ihre moralische Unterstützung in besonders schweren Zeiten.

Meine Familie und alle Freunde, Familie Holmes, Familie Solansky, Familie Krause, Familie Bauer, Frau Lilly Neumann, und insbesondere meinem Freund Alan Solansky möchte ich ganz herzlich danken. Ihr habt mir die Kraft gegeben im Laufe dieser Zeit sehr viel durchzustehen und dabei die wichtigsten Werte des Lebens vermittelt.

Publikationsliste

Teile dieser vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

Rehm, T., **Mavoungou, Ch.**, Israel, L., Schleicher, M. & Holak, T. A. (2002). Letter to the Editor: Sequence-specific (^1H , ^{15}N , ^{13}C) resonance assignment of the N-terminal domain of the cyclase-associated protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum*. *J. of Biomol. NMR*, **23**, 337-338.

Mavoungou, Ch., Rehm, T., Israel L., Ksiazek, D., Popowicz, G., Schleicher, M. & Holak, T. (2003). Solution Structure of the adenylyl cyclase-associated protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum*, *in Vorbereitung*.

<i>i. Zusammenfassung</i>	8
<i>ii. Summary</i>	10
<i>iii. Abkürzungen und Symbole</i>	11
1. Einleitung	18
2. Biologischer Hintergrund	21
2.1. Einleitung	21
2.2. Das Actin-Cytoskelett	21
2.3. Regulation der Zelldynamik	22
2.3.1. Das Adenylyl-Cyclase-assoziierte Protein (CAP)	25
2.3.2. Das DAip1, ein mit F-Actin wechselwirkendes Protein aus <i>D. discoideum</i>	28
3. Theorie des Rechenverfahrens zur Strukturberechnung von Proteinen	32
3.1. Einleitung	32
3.2. Berechnung der dreidimensionalen Proteinstruktur in der Lösung aus kernresonanzspektroskopischen Messdaten	35
3.2.1. Berechnung durch Distanzgeometrie	37
3.2.2. Berechnung durch Molekulardynamik	39
4. Grundlagen der magnetischen Kernresonanzspektroskopie	42
4.1. Das 1D-NMR Spektrum	42
4.1.1. Die Zeeman-Aufspaltung	42
4.1.2. Das Verhalten der Kernspins im statischem Magnetfeld	43
4.1.3. Das Spinensembel	46
4.1.4. Eindimensionale NMR-Spektroskopie	46
<i>Spektrale Parameter</i>	47
4.2. 2D- und 3D-NMR-Spektren	50
4.2.1. Die Spektrenaufnahme	50
4.2.2. 2D-NMR-Experimente	51
4.2.3. Das 2D-NOESY-Experiment	51
4.2.4. Das 2D-TOCSY-Experiment	52
4.2.5. Das HSQC-Experiment	53
4.2.6. 3D-NMR-Experimente	54
4.2.7. Das HCCH-TOCSY-Experiment	54

4.2.8. 3D Tripel-Resonanz NMR-Experimente _____	54
4.2.9. Von der Sekundärstrukturidentifizierung zur dreidimensionalen Struktur _____	56
4.3. NMR-spektroskopische Methoden _____	61
4.3.1. Vorbereitung der Proteinprobenlösungen _____	61
5. Andere Methoden zur Charakterisierung von Proteinen _____	62
5.1. Die Erzeugung von Proteineinkristallen _____	62
5.1.1. Prinzipien des Kristallwachstums _____	62
5.2. Kristallisationstechniken _____	64
5.2.1. Die Batch-Kristallisation _____	64
5.2.2. Kristallzüchtung durch Lösungsdiffusion _____	64
5.2.3. Kristallzüchtung durch Dampfdiffusion: die „Hanging-Drop“- und die „Sitting-Drop“-Verfahren _____	65
5.2.4. Kristallisation durch Mikrodialyse _____	66
5.2.5. Proteineinkristalle _____	66
5.2.6. Molekulargewichtsbestimmung mit MALDI-MS (Matrix unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie) _____	67
6. Verwendete Materialien und angewandte Methoden _____	69
6.1. Chemikalien _____	69
6.1.1. Medien und Puffer _____	69
6.1.2. Andere Chemikalien _____	73
6.2. Biologische Materialien _____	74
6.2.1. Organismen _____	74
6.2.2. DNAs, Enzyme und Proteine _____	75
6.3. Verbrauchsmaterialien _____	77
6.3.1. Säulenmaterial _____	77
6.3.2. Sonstiges _____	77
6.4. Geräte _____	77
6.5. Softwareanwendungen für die Proteinstrukturberechnung und makromolekulare Strukturanalyse _____	78
6.6. Angewandte zellbiologische und Biochemische Methoden _____	79
6.6.1. Zellbiologische Methoden _____	79
6.6.2. Biochemische Methoden _____	81

7. <i>Strukturaufklärung der aminoterminalen Domäne des <i>D. discoideum</i> CAP-Proteins (CAP-N)</i>	85
7.1. Vorbereitung der Proteinprobenlösungen	85
7.2. Die NMR-Experimente	86
7.3. Sequenzspezifische Zuordnung der NMR-Resonanzen im CAP	87
7.4. Bestimmung der Sekundärstruktur von CAP	98
7.5. Bestimmung der Tertiärstruktur von CAP	101
7.6. Beschreibung der dreidimensionalen Struktur der aminoterminalen Domäne von CAP	106
7.7. <i>D. discoideum</i> CAP als mögliches Substrat von Proteinkinasen	107
7.8. Modell der Struktur des gesamten CAP-Moleküls	108
7.9. Diskussion	111
8. <i>Expression und Reinigung des DAip1 aus einem genver-änderten <i>D. discoideum</i> Stamm (4-1)</i>	113
8.1. Gewinnung des DAip1 aus 4-1	113
8.2. Reinigung von DAip1 durch Ionenaustauschchromatographie	114
8.3. Gelfiltration der DAip1-Proteinprobenlösung	115
8.4. Bestimmung der Konzentration mit Hilfe des Bradford-Tests.	117
8.5. Kristallzüchtung	117
8.6. Massenspektrometrie	118
8.7. Diskussion	121
A) Anhang	122
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	133
<i>Tabellenverzeichnis</i>	135
<i>Literaturverzeichnis</i>	136

i. Zusammenfassung

Das Cyclase-assoziierte-Protein (CAP) und seine Homologen sind G-Actin-sequestrierende Proteine. Sie sind durch eine Prolin-reiche zentrale Domäne charakterisiert. Im CAP-Protein des *Dictyostelium discoideum* weist diese Region 20% Proline auf und ist wie bei allen anderen Homologen durch ein SH3-Proteinbindungsmotiv gekennzeichnet. Während die C-terminale Domäne maßgeblich an der Bindung von Actin beteiligt ist, zeigt die N-terminale Domäne eine Bindungsaffinität zur Adenylyl-Cyclase.

Die strukturelle Charakterisierung des *D. discoideum* CAP-Proteins erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mittels magnetischer Kernresonanzspektroskopie. Dabei lag der Schwerpunkt in der Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der stabilen N-terminalen Teildomäne des CAP-Proteins. Erforderlich hierfür war die Zuordnung von Resonanzsignalen in den NMR-Spektren von Isotopen-angereicherten CAP-Proben in H₂O und D₂O. Diese NMR-Spektren lieferten Intensitäten von Kern-Overhauser-Effekten und Werte von skalarer Spin-Spin-Kopplung, welche den Zugang zu konformationellen Einschränkungen gewährten. Das Sammeln diesen konformationellen Einschränkungen erlaubte es, für den N-terminalen Sequenzabschnitt S51-T176 (CAP-N), die Sekundärstruktur zu bestimmen und schließlich mit Hilfe von Distanzgeometrie- und molekulardynamischen Algorithmen die Tertiärstruktur zu definieren. Die ermittelte Struktur stellt ein Bündel von sechs α -Helices dar, die antiparallel zueinander gerichtet sind. Darüber hinaus wurde ein Modell des gesamten CAP-Proteins vorgeschlagen. Dieses Modell diente als erste Annäherung zur Aufklärung der strukturellen Bindungseigenschaften zwischen dem CAP-Protein und die Adenylyl-Cyclase.

Des Weiteren wurde das *D. discoideum* Actin-bindende Protein 1 (DAip1) auch hier untersucht. Das DAip1 gehört zur Familie der „WD-repeat-Proteine“. Es ist ein F-Actin-bindendes Protein, das gemeinsam mit Cofilin den Turnover von Actin reguliert. Das DAip1 wurde in den Zellen von *D. discoideum* überexprimiert und aus dem Zell-Lysat gereinigt. Die native Reinigung aus dem Zell-Lysat erfolgte mittels Ionen-tauschchromatographie und Gelfiltration, wonach das reine Protein für die Kristallzüchtung erhältlich war. Die Charakterisierung des DAip1 erfolgte weitgehend mittels MALDI-MS-spektrometrische Analyse durch Anwendung der Protease-katalytische Spaltung. Schließlich wurden geeignete Kristallisationsbedingungen bei

4°C definiert mit 20% w/v Polyethylene Glykol Monomethyl Ether 2000 als Fällungsreagenz. Weitere Kristalle konnten bei 20°C mit 30% v/v iso-Propanol erzeugt werden. Die Erzeugung von DAip1-Einkristallen liefert den Ausgangspunkt zur Charakterisierung von DAip1 mittels Röntgenstrukturanalyse. Damit ergibt sich die Möglichkeit strukturelle Informationen sowohl über die Bindungsaffinität zu Cofilin als auch über die Interaktionen mit Actin zu gewinnen.

ii. Summary

The *Dictyostelium discoideum* cyclase associated protein (CAP) and its homologues of the higher and lower eukaryotic organisms are G-actin sequestering proteins. All CAP proteins have a proline rich central domain. In the *D. discoideum* CAP protein, this linker domain carries 20% of prolines and has been discussed as a potential SH3 binding region. The actin binding activity of CAPs has been localized to the C-terminal domain, while the N-terminal domain seems to interact with adenylyl cyclase.

Our structural characterization of *D. discoideum* CAP was carried out using NMR spectroscopical methods, with the final aim to determine the three-dimensional structure of the amino-terminal core domain of CAP. This required NMR resonance assignments using NMR spectra of isotope labelled CAP samples in H₂O and D₂O. The assignment of the NMR spectra provided NOE intensities and scalar coupling constants that allowed the extraction of conformational restraints. These restraints were used to determine the secondary structure of the amino-terminal segment encompassing the residues from positions 51-176 (CAP-N), and subsequently to define the three-dimensional structure of CAP-N with the distance geometry and molecular dynamic calculations. The CAP-N structure consists of a bundle of six anti-parallel α -helices. A model of the full length of CAP was also proposed as a first approach to describe the binding properties between CAP and adenylyl cyclase.

A second actin binding protein studied here was the *D. discoideum* actin binding protein 1 (DAip1), which belongs to the family of the „WD-repeat proteins“. It is an F-actin binding protein that interacts with cofilin in the cell cortex and regulates the actin turnover. DAip1 has been overexpressed in the cells of *D. discoideum* and was purified using ion exchange chromatography methods. An analytical gel filtration was used to obtain pure DAip1 samples that could be used for crystallization. Further investigation of DAip1, including mass spectroscopy, involved the catalytical cleavage of the protein with proteases. Conditions for crystallization of DAip1 at 4°C were determined (20% w/v polyethylene glycol monoethyl ether 2000 as a precipitant). Other DAip1 crystals were produced at 20°C using 30% v/v isopropanol as a precipitant. The crystallization of DAip1 is the starting point of characterization of DAip1 using the X-ray crystallography method and should provide structural information about the binding activity of DAip1 to cofilin and actin.

iii. Abkürzungen und Symbole

1D, 2D, 3D, 4D	ein-, zwei-, drei-, vierdimensional
Å	Ångström
A ₅₉₅	Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm
Abb.	Abbildung (en)
ACN	Acetonitril
ADF	Actin depolymerisierender Faktor
AgNO ₃	Silbernitrat
Ala (A)	Alanin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Amp ^r	Ampicillinresistenz
APS	Am monium- per oxo- dis ulfat
Arg (R)	Arginin
Asp (D)	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Asn (N)	Asparagin
AX ₂	Axenisch und auf Bakterien wachsender Abkömmling von NC4
B, B₁	Magnetisches Feld
B₀	Statisches magnetisches Feld
BSA	B ovine S erum A lbumine (Rinderserumalbumin)
β-C ₂ H ₅ SH	β-Mercaptoethanol
¹³ C	Isotop 13 des Kohlenstoffatoms
C ^α	Alpha-Kohlenstoffatom
C ^β	Beta-Kohlenstoffatom
C ^γ	Gama-Kohlenstoffatom
°C	Grad Celcius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>

C-terminal	Carboxyterminal
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAP	C yclase A ssociated P rotein (Adenylyl-Cyclase assoziiertes Protein)
CoCl ₂	Cobaltchlorid
CO	Kohlenmonoxid
COSY	C orrelation S pectroscopy (Korrelationspektroskopie)
CSI	C hemical S hift I ndex (Chemischer Verschiebungsindex)
CuCl ₂	Kupferchlorid
c	Komplex (complex)
Da	Dalton
DAip1	D ictyostelium A ctin interacting p rotein 1 (<i>Dictyostelium</i> wechselwirkendes Protein 1)
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
DG	D istance G eometry (Distanz-Geometrie)
DHP	2,5 Dihydroxy-benzoesäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	D ithiothreitol
δ	Chemische Verschiebung
E, ΔE	Energie, Energiedifferenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2 aminoethyl)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
F ₁ , F ₂	Frequenzachse (en)
F-Actin	Filamentöses Actin
FID	F ree I nduction D ecay (Freier Induktionszerfall)
G-Actin	Globuläres Actin

Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutamat
Gly (G)	Glycin
x g	Relative Zentrifugalkraft
g/l	Gramm pro Liter
gal	Galaktose
γ	Gamma
^1H	Proton
$^{\text{N}}\text{H}$	Amidproton
$^{\alpha}\text{H}, ^{\beta}\text{H}, ^{\gamma}\text{H}, ^{\delta}\text{H}, ^{\epsilon}\text{H}$	Alpha-, Beta-, Gama-, Delta-, Epsilon-Proton
HCl	Salzsäure
H_3BO_3	Borsäure
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His (H)	Histidin
His-tag	Aus 6 Histidinen bestehendes Fusionspeptid
HSQC	H eteronuclear S ingle Q uantum C oherence
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Inc.	Incorporation
Ile (I)	Isoleucin
INEPT	insensitive nuclei enhanced by polarisation transfer
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
J	Kopplungskonstante
$^1\text{J}, ^2\text{J}, ^3\text{J}$	einfach-, vicinale-, geminale Kopplung
K	Kelvin
K^+	Kalium-Ion
$\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Kaliumphosphat-hexahydrat
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat

KZ	Koordinationszahl
Kan ^r	Kanamycinresistenz
Kb	Kilobasen paar
kDa	Kilodalton
kV	kilo Volt
kcal/mol	Kilokalorie pro Mol
L	Liter
Lys (K)	Lysin
<i>lac</i> ⁻	Lactose repressor
λ	Wellenlänge
M	Magnetisierung
M_y, M_{xy}	Magnetisierung in der y – und xy – Achse.
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
MHz	Megahertz (10 ⁶ Hz)
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
Met (M)	Methionin
Min	Minuten
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MnCl ₂	Manganchlorid
mbar	Millibar
μ l	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)
m/z	Masse pro Ladung
mM	Millimolar
ms	Millisekunden (10 ⁻³ s)
ml	Milliliter (10 ⁻³ l)
ml/min	Milliliter pro Minuten

mg/ml	Milligramm pro milliliter (10^{-3} g/ml)
μ M	Mikromolar (10^{-6} M)
μ g	Mikrogramm (10^{-6} g)
N	Stickstoffatom
15 N	Isotop 15 des Stickstoffs
N-terminal	Aminoterminal
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat-dihydrat
Na ₂ MoO ₄	Natriummolybdat
Nd-YAG	Neodym-Yttrium-Aluminium-Galium
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-nitrilo-tri-acetic acid
NMR	N uclear M agnetic R esonance
NOE	N uclear O verhauser E nhancement
NOESY	N uclear O verhauser E nhancement S pectroscopy
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
σ	Abschirmungskonstante
Phe (F)	Phenylalanin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinase
Pro (P)	Prolin
pDEXRH ⁺	Plasmid-Vektor ...
ppm	Teile pro Million (parts per million)
ps	picosekunde
ϕ	Phi-Winkel

ψ	Psi-Winkel
\vec{R}	Abstandsvektor
RNAse	Ribonuklease
r	real
rMD	restrained M olecular D ynamic
rmsd	root m ean s quare d eviation
rpm	Rotations per minutes
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
S/N	S ignal to N oise
SDS	S odium d odecyl s ulfate
SDS-PAGE	SDS - P olyacrylamid- g electrophoresis
SH3	Src gene homology region 3
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ser (S)	Serin
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Src	<i>Sarcoma</i> virus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr (T)	Threonin
TOCSY	Totale Korrelationspektroskopie (total correlation spectroscopy)
TOF	T ime o f F light
TPPI	time proportional phase incrementation
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)-aminoethan
Trp (W)	Tryptophan
Tyr (Y)	Thyrosin
τ_m	Mischzeit

t	Zeit
UpM	Umdrehungen pro Minuten
UV	Ultraviolett
$V(\vec{R})$	Potentielle Energiefunktion
V_0	Anfangsvolumen bei $t = 0$
Val (V)	Valin
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
ω	Rotationsfrequenz
YAG	Ytrium-Argent-Gallium
Zn-EDTA	Zink-Ethylendiamin-tetraessigsäure
Zn (Ac) ₂	Zinkdiacetat
Zellen/ml	Zelle pro Milliliter

1. Einleitung

Die Proteine haben an grundlegenden Vorgängen des Lebens teil und erfüllen eine Vielzahl von Funktionen. Diese Funktionen werden meist durch Ausbildung von hoch spezifischen und funktionellen Komplexen unterstützt. Die räumliche Lokalisierung diesen gebildeten Proteinkomplexen und Zellorganellen ist im Cytoskelett gesteuert, welches eine Art „Kommunikationszentrum“ für die Zellen darstellt. Da die räumliche Organisation der Zellen durch Polymerisationsprozesse bewerkstelligt wird, finden sich im Cytoskelett polymere Einheiten aus cytoskeletalen Proteinen. Diese polymeren Einheiten sind filamentösen Proteinmolekülen, die für die Form und Beweglichkeit der Zellen verantwortlich sind. Es werden im Cytoskelett drei Arten filamentösen Proteinen unterschieden: F-Actin, die Mikrotubuli und die Intermediärfilamente. Zweck der Bildung dieser Filamente ist es, „Schienen“ für den Proteintransport von einem Ort zu einem anderen zu schaffen. Dadurch wird ermöglicht, Proteinkomplexe in verschiedenen Regionen der Zellen mit den Organellen zu verbinden. Eine weitere überragende Bedeutung dieser filamentösen Proteine kommt außerdem noch darin zum Ausdruck, dass sie eine zentrale Rolle in der Signaltransduktionsmaschinerie innerhalb der Zellen spielen. In einem multizellulären Organismus wird beispielsweise damit sichergestellt, dass eine Zelle sich erst dann teilt, wenn ihre vorgeschalteten Nachbarn sie dazu anregen.

Der Wissenschaft ist es seit einigen Zeiten gelungen, einen besseren Einblick in diese wichtigen Abläufe des Cytoskeletts zu gewinnen. Dies geschah u. a. durch die genauere Untersuchung und Charakterisierung von Proteinen, welche daran als hochspezifische und hochwirksame Moleküle beteiligt sind. Diese Charakterisierung erfolgt heutzutage durch physikalische Methoden, die es erlauben, eine verlässliche Aussage über Faltung und sogar Funktion der jeweiligen Proteine zu machen. Zu den physikalischen Methoden zur Proteinstrukturaufklärung zählt neben der Beugung von Röntgenstrahlen an Proteineinkristallen (Glusker & Trueblood, 1985) die magnetische Kernresonanzspektroskopie (Abragam, 1961; Ernst *et al.*, 1987), die immer mehr an Bedeutung gewonnen hat.

Die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spectroscopy) lässt sich in drei Spektroskopiearten unterteilen: die hochauflösende Kernresonanzspektroskopie in Flüssigkeiten, die Kernresonanzspektroskopie für Festkörper und die Kernspintomographie (MRI: „**M**agnetic **R**esonance **I**maging“). In allen diesen Spektroskopiearten

spielen das Kernspinresonanzsignal und die chemische Verschiebung¹ für die Auswertung der Kernresonanzdaten eine entscheidende Rolle. Bei der Anwendung der kernresonanzspektroskopischen Methoden in Flüssigkeiten und in Festkörper werden das Kernspinresonanzsignal (Bloch, 1945; Purcell, 1945) und die chemische Verschiebung genutzt, um Daten über die Struktur von Molekülen zu liefern. In der Kernspintomographie wird dahingegen das Kernspinresonanzsignal in Bilder übersetzt. Sie ist in der Medizin eine spektroskopische Methode der Bilderanalyse (z.B. Gewebebilder). Wichtig für die moderne Kernresonanzspektroskopie waren die Einführung der Fourier-Transformations-Spektroskopie (Ernst & Anderson, 1966) und die Entwicklung von supraleitenden und leistungsstarken Hochfeldmagneten (heute bis zu 900 MHz). Die kernresonanzspektroskopischen Methoden sind in der Biochemie zu einem sehr wichtigen Werkzeug geworden, da sie ein sehr wirksames Mittel zur Untersuchung von komplexen biologischen Molekülen darstellen. Die Ursache dafür liegt in der raschen Weiterentwicklung dieser Methoden von der eindimensionalen zur mehrdimensionalen Spektroskopie (2D-, 3D-, 4D-NMR). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dynamische Vorgänge in Proteinen im Bereich von 10^{-12} - 10^4 Sekunden mit Hilfe von Relaxationsstudien zu untersuchen. Gewährleistet wird auch die Identifizierung von schwach bindenden Liganden. Diese Bindungsstudien sind in den meisten Fällen der Ausgangspunkt für das Design von Medikamenten. Die Untersuchung von Proteinen mittels der Kernresonanzspektroskopie unterscheidet sich also von der schon länger etablierten Röntgenstrukturanalyse dadurch, dass nicht nur ein statisches Bild der dreidimensionalen Struktur geliefert wird, sondern auch ein zusätzlicher Einblick in die dynamischen Vorgänge im Protein gewonnen wird.

Die Untersuchungs- und die Charakterisierungsmethoden von Proteinen mittels der Kernresonanzspektroskopie werden in dieser Abhandlung auf die Bestimmung der dreidimensionalen Strukturdomäne eines Actin-bindenden Proteins angewandt: das Adenylyl-Cyclase-assoziierte Protein (CAP) des *D. discoideum* Cytoskeletts. Homologe von CAP wurden in *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces pombe* gefunden sowie in anderen Eukaryonten, wie beispielsweise Ratte und dem Mensch. Zweck der Strukturbestimmung von CAP war es, einen Einblick in die chemischen und die physikalischen Eigenschaften sowie in die Funktion dieses Proteins zu

¹ Die chemische Verschiebung wird in Metallen (Knight, 1949) und Flüssigkeiten (Arnold *et al.*, 1951) durch die Änderung der Kernspinresonanzfrequenz definiert.

gewinnen. In diesem Zusammenhang wurden sowohl zweidimensionale homonukleare Experimente in H_2O und D_2O , zweidimensionale heteronukleare Experimente in H_2O sowie dreidimensionale heteronukleare Doppel- und Tripel-Resonanz-Experimente in H_2O durchgeführt und schließlich ein hetero-NOE aufgenommen. Die Auswertung dieser Kernresonanzspektren diente der sequenziellen Resonanzzuordnung und lieferte dabei die Intensitäten von Kern-Overhauser-Effekten und die Werte skalarer Spin-Spin-Kopplung. All das konnte dazu genutzt werden, um eine qualitativ hochwertige Proteinstruktur und Informationen über die Dynamik zu erhalten. Ein Modell des gesamten CAP-Proteins wurde schließlich erstellt.

Des Weiteren wurde in dieser Abhandlung ein Protein-Homolog der „WD-repeat“-Familie untersucht, welches sowohl mit F-Actin als auch mit Cofilin interagiert: Das *D. discoideum* Actin interacting Protein 1 (DAip1). Die Charakterisierung dieses Actin bindenden Proteins erfolgte durch native Reinigung aus den Zellen eines DAip1-Überexprimierers (Müller-Taubenberger *et al.*, 1999), Massenspektrometrie und durch anschließende Kristallisationsversuche.

Der Hauptgrund des Interesses für diese Actin-bindenden Proteine liegt darin, dass ihre wichtigsten Funktionen im Laufe der Evolution von Eukaryonten, von *D. discoideum* zu den höheren Organismen konserviert wurden. Dazu gehört die Regulation der motilen Prozesse der Zelle wie das Zellwachstum, die Lokomotion, die Zelldifferenzierung und die Zellmorphologie. Die Identifizierung bzw. Charakterisierung solcher Proteine des *D. discoideum* könnte daher ein wichtiger wissenschaftlicher Beitrag zum tieferen Verständnis der dynamischen Prozesse des Cytoskeletts von Eukaryonten liefern.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Dissertation, in den Kapiteln 2 bis 4, werden die theoretischen Hintergründe behandelt. Dieser Abschnitt umfasst die biologischen Aspekte und eine kurze Einführung in die Theorie der NMR-Strukturberechnung unter Verwendung von Kernresonanz-Daten. Bei der Erörterung der biologischen Aspekte werden die Lokalisationen und die wichtigsten Eigenschaften sowohl der CAP-Proteine als auch des DAip1-Proteins dargelegt. Vorgestellt werden im zweiten Abschnitt, in den Kapiteln 5 bis 6, die verschiedenen angewandten physikalischen und proteinanalytischen Methoden. Der dritte Abschnitt stellt den experimentellen Teil der Dissertation dar. Hier werden die durchgeführten Experimente und deren Auswertungen aufgeführt, die schließlich diskutiert werden.

2. Biologischer Hintergrund

2.1. Einleitung

Viele eukaryontische Zellen besitzen die Fähigkeit, ihre Gestalt beliebig zu verändern und vor allem koordinierte und zielgerichtete Bewegungen auszuführen. Diese besonderen Fähigkeiten sind auf ein komplexes Netzwerk aus filamentösen Proteinen zurückzuführen, welche sich durch das gesamte Cytoplasma erstrecken: das Cytoskelett. Dem Cytoskelett wird eine entscheidende Rolle in der Evolution von Eukaryonten zugeschrieben (Amos & Amos, 1991; Bershadsky *et al.*, 1988; Bray, 1992; Kreis & Vale, 1993). Zusammen mit anderen filamentösen Proteinen, zu denen die Mikrotubuli und die Intermediärfilamente zählen, stellen die Actinfilamente den zentralen Bestandteilen des Cytoskeletts dar.

2.2. Das Actin-Cytoskelett

Actin ist ein entscheidender Bestandteil des kontraktile Apparats in den Muskelzellen. Es ist das am häufigsten vorkommende Protein in fast allen eukaryontischen Zellen mit einem Gehalt von bis zu 20%² und existiert als reines Monomer (G-Actin) in Lösungen mit geringer Ionenstärke. Das globuläre G-Actin polymerisiert zu filamentösem Actin (F-Actin), das wiederum durch assoziierte Proteine stabilisiert wird. Die Polymerisation des G-Actins zu F-Actin geschieht spontan in Gegenwart von ATP-Molekülen durch Erhöhung der Salzkonzentrationen (Mg^{2+} , K^+) in der Lösung (Straub, 1942). In Abbildung 2.1 wird die Struktur von F-Actin veranschaulicht, dargestellt im Elektronenmikroskop. Im Elektronenmikroskop sichtbar, besteht F-Actin aus zwei Protofilamenten, die sich eng umeinander winden und somit eine rechtsdrehende Doppelhelix mit einem Durchmesser von 7-9 nm bilden. In dieser Anordnung ist jede einzelne, gleich orientierte, G-Actin-Untereinheit von vier weiteren Untereinheiten umgeben (Holmes *et al.*, 1990). Die Actinfilamente sind vor allem im Zellkortex unterhalb der Zellmembran lokalisiert, wo sie in „Actin-Bündeln“ quervernetzt sind.

² In den Muskelzellen von Wirbeltieren stellt Actin 20% der Zellmasse dar.

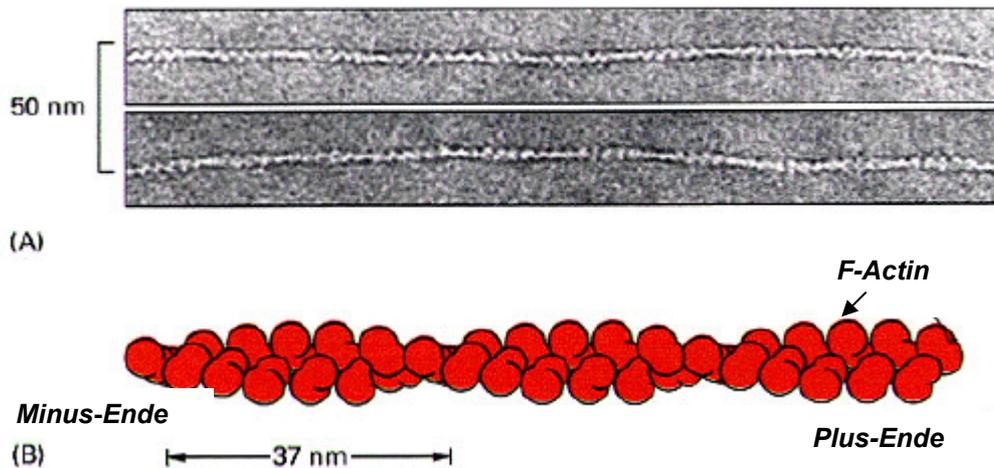


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung von Actinfilamenten (Bray, 1992).

F-Actin besteht aus zwei gewundenen Helices, die nach der Polymerisation von G-Actin entstehen. Die Actinfilamente sind sehr flexible Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 5-9 nm, welche sich in linearen Bündeln, zweidimensionalen Netzwerken sowie dreidimensionalen Gelen organisieren. Actinfilamente werden überall in der Zelle lokalisiert. Besonders angereicht sind sie dennoch im Zellkortex unter der Plasmamembran.

2.3. Regulation der Zelldynamik

Das Actin-Cytoskelett ist also ein sehr dynamisches Netzwerk, in dem Actin-Bündel rasch wachsen oder verkürzt werden. So findet eine stetige Umstrukturierung in der Zelle statt. Actin-assoziierte Protein katalysieren die Bildung von hochorganisierten Strukturen wie Stressfasern³, Filopodien⁴, Lamellipodien⁵ oder Crowns⁶ etc. (Abbildung 2.2). Diese permanente Umstrukturierung des Actin-Netzwerkes führt zur Aufrechterhaltung und Entwicklung der Zellform, steuert die Signaltransduktion, die Zellbewegung, die Chemotaxis, den gerichteten intrazellulären Transport von Proteinen und Organellen und ist maßgeblich für die Cytokinese, die Exo- und Endocytose sowie diverse Zellfunktionen verantwortlich.

³ Stressfasern werden durch längs angeordnete Bündel aus Actinfilamente gekennzeichnet.

⁴ Fingerförmige Zellfortsätze.

⁵ Lamellipodien sind dünne, blattähnliche Fortsätze.

⁶ Kronenförmige Ausstülpungen an der Zelloberfläche, die z.B. der Phagozytose vorangehen.

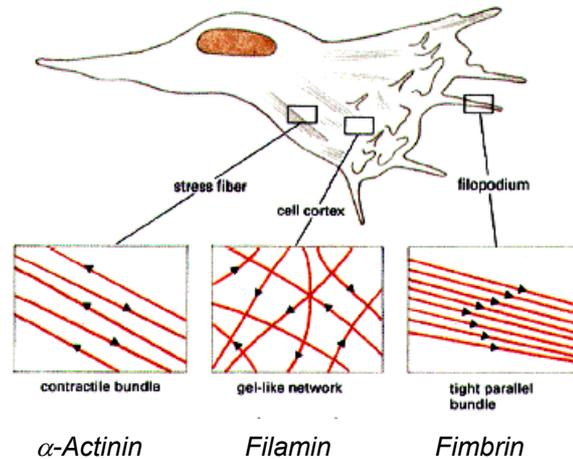


Abbildung 2.2 Ordnungsprinzipien von Actinfilamenten (Bray, 1992).

Schematisch dargestellt ist hier eine sich fortbewegende Zelle (kriechende Zelle), in der drei verschiedenen Typen von Actin-Bündeln lokalisiert und in Quadraten hervorgehoben sind. Im Zellkortex finden sich die Actinfilamente in Parallel- und kontraktile Bündeln sowie gelartige Geflechte. Die Parallelbündel sind in Abstand zwischen 10-20 nm angeordnet und sind mit der gleichen Polarität orientiert. Die kontraktile Bündel sind in einem Abstand von 30-60 nm angeordnet und sind mit entgegengesetzter Polarität orientiert. Die gelartigen Geflechte sind eine lockere und offene Anordnung der Filamente mit rechtwinkligen Verbindungen.

Die Actinfilamente sind durch assoziierte Proteine stabilisiert: Das Fimbrin, das alpha-actinin und das Filamin. Das Fimbrin weist eine parallele Bündelung auf und ist am Leitsaum der Zellen lokalisiert, besonders in den Filopodien und Mikrospikes. Das α -Actinin ist in kontraktile Bündeln angeordnet und findet sich in den Streßfasern. Es wirkt an der lockeren Verknüpfung der Actinfilamente mit und trägt dazu bei, die Enden der Streßfasern in den Fokalkontakten zu verankern. Das Filamin ist ein Homodimer und verbindet zwei Actinfilamente, die sich überkreuze und ist in vielen Tierzellen vorhanden. Es ist in gelartigem Geflecht angeordnet. Das bedeutet, dass hier ein sehr lockeres, viskoses Geflecht gebildet wird.

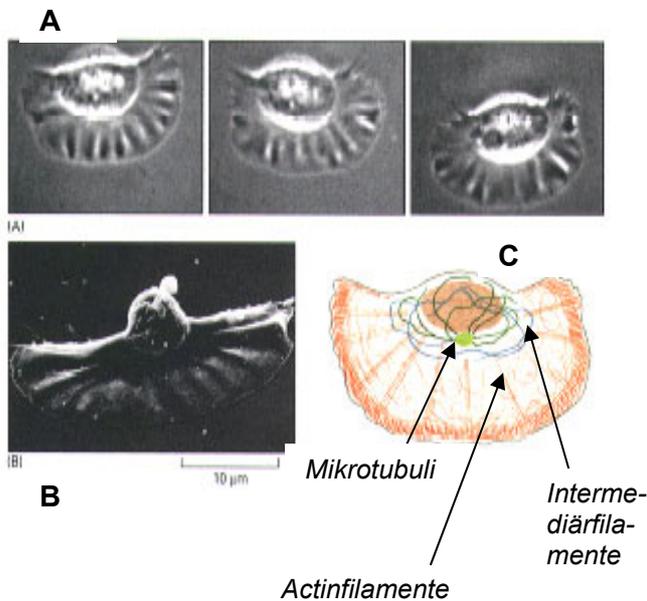


Abbildung 2.3 Beweglichkeit der Zellen mit Hilfe von Lamellipodien.

A. Keratocyt im Lichtmikroskop. Die Aufnahme erfolgte in Intervallen von 15 Sekunden. Die Beweglichkeit der Zellen beträgt hier $15\mu\text{m/s}$.

B. Keratocyt im Elektronenmikroskop. Sichtbar sind hier die Fortsätze einer beweglichen Zelle. Der Zellkörper enthält den Kern, der oberhalb seiner flachen Kante zu sehen ist.

C. Verteilung der cytoskelettalen Filamente im Keratocyt. Die Actinfilamente (rot) füllen die gesamte Frontregion der Zelle auf. Sie sind für die Bewegung der Zelle verantwortlich (Bray, 1992).

Als Modellorganismus für die Aufklärung von biochemischen und dynamischen Prozessen im Cytoskelett dient der einzellige Schleimpilz (Amöbe), der *D. discoideum*. Im *D. discoideum* unterliegen die Actinfilamente dem „Tretmühlmechanismus“: Am Plus-Ende werden Monomere angefügt, während sich am Minus-Ende Monomere ablösen, wobei sich die Gesamtlänge des Filamentes nicht ändert. Die Actinfilamente zeigen also keine dynamische Instabilität. Das gesamte Zellprotein des *D. discoideum* enthält ca. 8 % Actin. Das entspricht einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ (Podolski & Steck, 1990). Angesichts der ionischen Bedingungen im Cytosol und der kritischen Konzentration von Actin, die $0,1\mu\text{M}$ für das Plus - bzw. $0,8\mu\text{M}$ für das Minus-Ende beträgt, sollte Actin zu über 99 % in jeder Zelle polymerisiert sein. Entgegen diesem Ergebnis, ergab sich aus Untersuchungen an *D. discoideum*-Zellen, dass in unstimulierten Zellen etwa die Hälfte des Actins in seiner monomeren Form vorliegt (Eichinger *et al.*, 1999). Dass die Konzentration des monomeren Actins in der Zelle relativ hoch liegt (über c_{krit}), liegt an speziellen Proteinen, die an G-Actin binden und dessen Anlagerung an das Filament verhindern. Diese Proteine beein-

flussen die Polymerisation und Depolymerisation des G-Actins zu F-Actin und regulieren damit das dynamische Gleichgewicht zwischen monomeres und polymeres Actin. Die benötigte Energie für diesen Mechanismus wird aus der ATP-Hydrolyse gewonnen. Die Hydrolyse dient dazu, die Bindungen im Polymer abzuschwächen und die Depolymerisation zu fördern (ATP/ADP Austausch ist sehr langsam). Das bekannteste G-Actin-bindende Protein ist Thymosin (5 kDa), das wahrscheinlich den Polymerisationsvorgang sterisch verhindert oder den ATP/ADP-Austausch verhindert. Weitere Proteine dieser Art sind Profilin und die CAP-Proteine (Adenylyl Cyclase **A**ssociated **P**roteins), die eine Funktion bei der Steuerung der Polymerisation als Reaktion auf äußere Reize haben. Diese äußeren Reize sind meistens mit der Plasmamembran assoziiert. Die Actin-bindende Funktion der CAP-Proteine wurde im Laufe der Evolution von den niederen zu den höheren Eukaryonten konserviert (Yu *et al.*, 1994).

2.3.1. Das Adenylyl-Cyclase-assoziierte Protein (CAP)

Alle CAP-Protein-Homologen sind G-Actin-bindende Proteine. Sie sequestrieren G-Actin und stabilisieren dabei seinen Pool. So wird eine kritische Konzentration des Actins von 0,2 μmol (ca. 8 $\mu\text{g/ml}$) in der Plasmamembran beibehalten. Das bedeutet, die Konzentration an freien Monomeren, bei der der Anteil an freien G-Actin im Polymer nicht weiter zunimmt wird bei 0,2 μmol (ca. 8 $\mu\text{g/ml}$) beibehalten. CAP-Proteine werden in fast alle eukaryontischen Organismen gefunden: in *S. cerevisiae* (Field *et al.*, 1990) und *S. pombe* als CAP/Srv2p (Kawamukai *et al.*, 1992), in *H. sapiens* als CAPI und dessen Isoform CAPII (Matwiw *et al.*, 1992) sowie in *C. albicans* (Bahn & Sundstrom, 2001). Zu den bekanntesten Homologen gehört das Protein ASP56 der Wirbeltiere (Gieselmann & Mann, 1992). CAP-Proteine sind durch zwei verschiedene Domänen gekennzeichnet, die maßgeblich an der Bindung von Actin und Adenylyl-Cyclase beteiligt sind. Sie werden zusätzlich in Oligomerisierungsreaktionen einbezogen. Beide Domänen sind durch eine prolinreiche Region verbunden, die ein SH3-Proteinbindungsmotiv aufweist (Freemann *et al.*, 1995; Matwiw *et al.*, 1992; Vojtek & Cooper, 1993; Zelicof *et al.*, 1993; Gottwald *et al.*, 1996; Benlali *et al.*, 2000).

Das CAP-Protein wurde das erste Mal aus *S. cerevisiae* als Bestandteil eines Komplexes mit der Adenylyl-Cyclase (Field *et al.*, 1990) isoliert, dessen Rolle darin

besteht, Signaltransduktionskaskaden mit Änderungen im Cytoskelett zu verbinden (Hubberstey *et al.*, 2002). Die Frage über die entscheidende Rolle der Effektoren, die sowohl in die extra- als auch intrazelluläre Signaltransduktion miteinbezogen sind, ist nur ungenügend aufgeklärt. Die bisherige Charakterisierung dieser Proteinklasse ergab dennoch ihre Beteiligung in die Zellteilung, das Zellwachstum und die Zelllokomotion. Während die CAP-Homologen aus anderen Organismen als trifunktionelle Proteine bekannt sind, entsprechend dem Aufbau der zwei Domäne (Gottwald *et al.*, 1996) werden für das *D. discoideum* CAP-Protein nur zwei verschiedene Funktionen nachgewiesen: Die Fähigkeit der Bindung an G-Actin, die auf der carboxyterminalen Proteindomäne (L255-I464) beschränkt ist und die Signalübertragung in Gegenwart von Adenylyl-Cyclase nach einer Aktivierung durch Ras, als Reaktion auf äußere Reize (Gerst *et al.*, 1991). Letztere Funktion ist auf die aminoternale Domäne (M1-W215) zurückzuführen. Die Region, N216-G254, zwischen der carboxy - und aminoternale Domänen im *D. discoideum* CAP-Protein enthält im Gegensatz zu den anderen CAP-Homologen deutlich weniger Proline (Gerst *et al.*, 1992; Gottwald *et al.*, 1996). Ihre Sequenzabfolge zwischen A228 und V238 ähnelt dennoch dem SH3-Motiv – XPXXPPPYXPX –, das in alle andere Homologen vorhanden ist⁷. Das CAP-Homolog aus *D. discoideum* ist ein Actin-bindendes Protein und als solches an der Reorganisation der Actinfilamente in den vorderen und hinteren Bereiche der Plasmamembran beteiligt (Gottwald *et al.*, 1996). Es ist 50 kDa groß und wird von einem einzelnen Gen kodiert (Noegel *et al.*, 1999). Bezüglich seiner Aminosäuresequenz weist es 39% Übereinstimmungen und 61% Ähnlichkeiten mit den Homologen aus Mensch und Hefe auf, die durch eine polyprolinreiche Region zwischen der carboxy - und aminoternale Domänen gekennzeichnet sind. Im *D. discoideum* CAP-Protein ist in dieser Region dahingegen nur 20% der Proline konserviert. Darüber hinaus wurde bei einem Sequenzvergleich der aminoternalen Domänen der CAP-Proteine aus 14 verschiedenen Spezies (Hubberstey *et al.*, 2002) ein hoch konservierter Abschnitt genannt das RLE-Motiv (Abbildung 2.5). Im RLEXAXXRLE⁸-Motiv ist nach den Ergebnissen von Fenger *et al.* (1994) eine mögliche Bindungsstelle für die Adenylyl-Cyclase vorhanden. Dieses Motiv in der Lage ist eine amphipathische Helix⁹ zu bilden, die für Protein-Protein-Interaktionen entscheidend ist (Cohen & Parry, 1986).

⁷ Im *D. discoideum* CAP-Protein ist innerhalb der Sequenz APASSAPAAPV die Position der Prolinen 2, 7 und 10 konserviert. Sie sind essentiell für die Bindung an SH3.

⁸ Der Buchstabe X steht für eine x-beliebige Aminosäure, die im Laufe der Evolution nicht konserviert wurde.

⁹ Helix-Anfang und -Ende besitzen entgegengesetzte Eigenschaften.

Im *D. discoideum* CAP-Protein wird dieses Motiv jedoch durch ein RLDXAXXRLE-Motiv ersetzt, wodurch die Bildung einer amphipatischen Helix eher unwahrscheinlich wird. Trotz der sich durchaus resultierenden großen Menge an Daten bezüglich der Charakterisierung der CAP-Proteine, herrschen bei den Fragen nach Bindung und Aktivierung der Adenylyl-Cyclase immer noch Unklarheiten. Eine direkte Wechselwirkung konnte bis heute erst für die CAP-Homologen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* nachgewiesen werden (Gerst *et al.*, 1991; Kawamukai *et al.*, 1992). In *C. albicans* konnte dazu noch ein regulatorischer Einfluss gezeigt. Sowohl „*In vitro*“ als auch „*In vivo*“ Untersuchungen zur Adenylyl-Cyclase Aktivierung in der *S. cerevisiae* hatten gezeigt, dass für die Aktivierung von Cyr1p durch aktiviertes Ras2p die ersten 168 Aminosäurereste von CAP benötigt werden (Gerst *et al.*, 1991; Shima *et al.*, 1997). Neueren Untersuchungen von Swiston *et al.*, (1995) beschränkten diesen notwendigen Bindungsstellen jedoch auf die ersten 36 Aminosäuren.

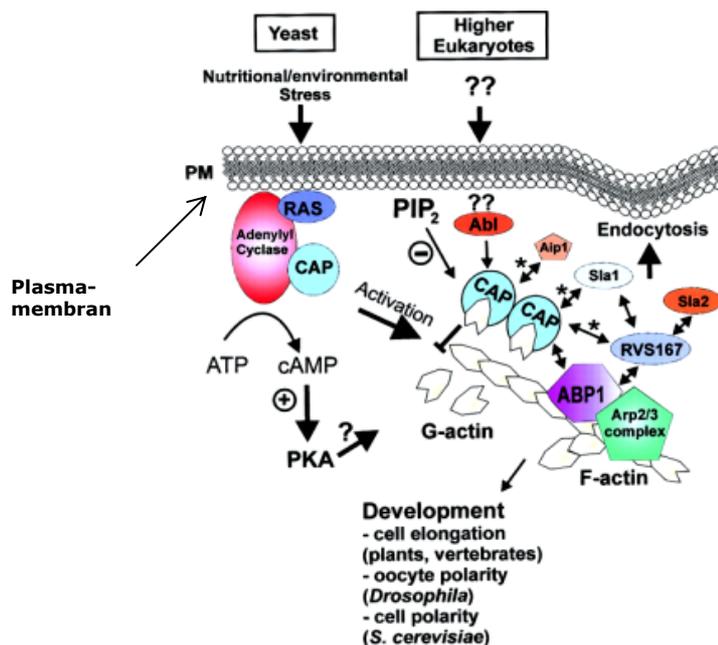


Abbildung 2.4 Modell zu den möglichen Funktionen der CAP-Proteine (Hubberstey & Mottilio, 2001). Dieses Modell basiert auf durchgeführte Studien an den CAP-Proteinen aus der Hefe.

Vorgeschaltete Signale wie äußere Reize können den Signalübertragungsweg durch Ras induzieren und dabei die Adenylyl-Cyclase stimulieren. Bei der Signalübertragung durch die Adenylyl-Cyclase, die durch die Aktivierung von Ras2^{Val19} hervorgerufen wird, sollen die CAP-Proteine essentiell sein. Das CAP-Protein soll außerdem die Bildung von filamentösen Actin (F-Actin) hemmen durch Sequestrierung des globulären Actin (G-Actin) und damit zugleich das G-Actin zur Verfügung stellen, um die Bildung von F-Actin zu fördern. Man spricht von der Erhöhung des Actin-turnovers.

REGION	A	B	C	D
Consensus (>80%)	<u>RLEAVGRLE</u>	<u>EKNRGSKFFNHL</u>	<u>FYTNRVLKE</u>	<u>LKHVSDDMKTHKNPAL</u>
HumanCAP	10-RLEAVGRLE-19	120-EKNRGS-KLFNHL-131	163-FYTNRVLKE-171	271-LKHVSDDMKTHKNPAL-286
MouseCAP	10-RLEAVGRLE-19	119-EKNRGS-KFFNHL-130	162-FYTNRVLKE-170	270-LKHVSDDMKTHKNPAL-285
RatCAP	10-RLEAVGRLE-19	119-EKNRGS-KFFNHL-130	162-FYTNRVLKE-170	270-LKHVSDDMKTHKNPAL-285
XenopusCAP	10-RLEAVSKLE-19	114-EKNRGS-KLFNHL-125	147-FYTNRVLKE-165	269-LKHVSDDMKTHKNPAL-284
DrosophilaCAP	42-RLETLVDRLE-51	176-EKRRSS-PFFNHL-187	219-FYTNRVLKE-227	321-LKKVTDGDMQTHKNPSEL-336
C.elegansCAP	8-RLENVANRTE-17	114-EKNRKS-EFYNHI-125	158-FYLNRIIME-166	258-LKKVTPPEMQTHKNPVL-273
S.cerevisiaeCAP	19-RLEEATARLE-28	156-ESNRQSK-YFAYI-167	198-FWTNRILKE-206	324-LKKVDKSKQTHKNPEL-339
S.pombeCAP	20-RLEAATSRLE-29	184-DEHRTAPE-FNQL-195	227-FYANRVVKE-235	351-LRKVDKSEMTHKNPSEL-366
CandidaCAP	21-RLEAATSRLE-29	169-DSNRKSP-FFNHL-180	211-FWSDRVLKE-219	335-LKKVDKSEMTHKNPEL-350
LentinulaCAP	15-RLEAATSRLE-24	156-EANRKRDRWFTHL-167	199-YYGNRVLKE-207	313-LRKVDKSEMTHKNPSEL-328
DictyosteliumCAP	12-RLDQATTRLLE-21	128-DSNRSS-KFFNHL-139	171-FYTNRIILKE-179	272-LKKVTNDMKS-KNFTD-286
ChlorohydraCAP	7-RLEAVTRLE-16	114-EKNRSS-KQFNHL-125	157-FYTNKLLKE-165	273-LKKVTDMMKTHKNPEL-288
ArabidopsisCAP	8-RLEAAVTRLE-17	126-EGKR-S-DFFNHL-136	174-FYNNKVLVE-182	278-LRKVTDMMKT-KNRAD-292
CottonCAP	8-RLEAAVARLE-17	118-EGRR-S-DFFNHL-128	166-FYNNKVLVE-174	274-LKKVTADMKT-KNRTD-288
REGION	E	F	G	
Consensus (>80%)	<u>IKGKINSI</u>	<u>PTISINKTDGCHAYLSKNSLDCEIVSAKSSEM</u>	<u>EFVPEQ</u>	
HumanCAP	356-C--IKGKINSI--C-375	406-PTISINKTDGCHAYLSKNSLDCEIVSAKSSEM-438	450-EFPVPEQ-456	
MouseCAP	355-C--IKGKINSI--C-374	405-PTISINKTDGCHAYLSKNSLDCEIVSAKSSEM-437	449-EFPVPEQ-455	
RatCAP	355-C--IKGKINSI--C-374	405-PTISINKTDGCHAYLSKNSLDCEIVSAKSSEM-437	449-EFPVPEQ-455	
XenopusCAP	356-C--VKGKINSI--C-375	406-PTISINKTDGCHVYLSQDSLACEIVSATSSSEM-438	451-EFPVPEQ-457	
DrosophilaCAP	402-C--VKGKVNNI--C-421	452-PTVSIQKTDGCMYLSKDSLSGVEIVNSKSEM-484	496-ELALPEQ-502	
C.elegansCAP	337-C--IKGKANAI--C-356	387-PTVSIQKTDGCHIYLSRDALNAQIVASKSEM-419	398-EMALPEQ-404	
S.cerevisiaeCAP	406-C--IKGKVNAI--T-425	456-PQISIDKSDGNGIYLSKESINTEIYTSCTAIN-488	501-EFPIPEQ-507	
S.pombeCAP	432-C--IKGKLNIV--C-451	482-PMIVIDQCDGGSYLSKSSLSSEVVTSTSLN-514	525-ERAVPEQ-531	
CandidaCAP	424-C--LKGKANAV--T-443	474-PMLSIDKSDGTYIYLSQESIDNDSQVFTSSTTA-506	520-ELAVPEQ-526	
LentinulaCAP	396-C--IKGKLNIV--C-415	446-PMIQIDSCDTGMIVLSQASLHAEITAKCSSIN-478	493-EQALPEM-499	
DictyosteliumCAP	344-C--IKGKVNAI--C-363	394-PSIAIDKTSGCQIYLSKDSLETEIVSSKSEM-426	440-ELALPEQ-446	
ChlorohydraCAP	360-C--INGKVNSI--C-379	410-PTISIEKTDGAQVFINPKLESQIVTAKSEM-442	454-EYPLPEQ-459	
ArabidopsisCAP	354-C--IQGKVNNI--C-373	404-PTVSVNDTTCQQLYLNKDSLETAITAKSEM-436	450-EHALPEQ-456	
CottonCAP	350-C--IQGKVNNI--C-369	400-PTISVDNTSGCQLYLSKDSLEGTSTSAKSEM-432	445-EHSLPEQ-449	

Abbildung 2.5 Das RLE/RLE-Motiv (Hubberstey et al., 2001).

Ersichtlich hier sind hoch konservierte Regionen in den verschiedenen CAP-Homologen, zu dem das RLE/RLE-Motiv gehört (19-21 und 26-28 in der Hefe). Ein Primärstrukturvergleich wurde nach der „Clustal W“-Methode durchgeführt. Die besonders hoch konservierten Regionen in der Primärsequenz werden wie folgt definiert: 50% in einem Sequenzabschnitt von mehr als 6 Aminosäuren sind in 80% der CAP-Homologen zu finden. Diese konservierten Regionen der CAP-Homologen sind in dunklen Farbe gekennzeichnet. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte zeigen eine Konservierung der Regionen von 100 %. Mit X werden solche Aminosäuren dargestellt, die im Laufe der Evolution nicht konserviert wurden.

2.3.2. Das DAip1, ein mit F-Actin wechselwirkendes Protein aus *D. discoideum*

Wie in den meisten Eukaryonten finden sich im *D. discoideum* Cytoskelett Myosin II, Actin und Actin-bindende Proteine wie beispielsweise α -Actinin, ABP120, Fimbrin, Cortexillin und Coronin (Fechthamer & Taylor, 1984; de Hostos et al., 1991; Faix et al., 1996; Prasser et al., 1997). Das Actin-bindende Protein 1 (Aip1) wurde das erste Mal als neues F-Actin-bindende Protein in der *S. cerevisiae* identifiziert (Amberg et

al., 1995). Aip1 wird in zahlreichen eukaryontischen Organismen wie *S. pombe*, *P. polycephalum* (Matsumoto *et al.*, 1998), *D. discoideum* (Konzok *et al.*, 1999; Aizawa *et al.*, 1999), *C. elegans* (Ono, 2001), *X. laevis* (Okada *et al.*, 1999), *A. thaliana* und *H. sapiens* lokalisiert (Adler *et al.*, 1999). Es ist im Laufe der Evolution von niederen zu höheren Eukaryonten konserviert. Das *D. discoideum* Aip1 (DAip1) wurde erst unter dem Name von „WD-repeat“ Protein² in der „GenBank“ unter der Nummer U36936 registriert, entsprechend seiner Klassifizierung als „WD-repeat“ Protein (Neer *et al.*, 1994). Es ist 64 kDa groß und zeigt 33% Übereinstimmung mit Aip1p aus *S. cerevisiae*. DAip1 enthält im Sequenzabschnitt 56-594 neun „WD-repeat“ motive. Alle Protein-Homologen der „WD-repeat“-Familie haben als solche eine sehr hohe Tendenz β -Propeller-Strukturen zu bilden und werden meistens in makromolekularen Komplexe einbezogen. Der carboxyterminale Sequenzabschnitt 215-222 des DAip1 weist ein Nucleotidbindungsmotiv auf. Die Ergebnisse von Konzok *et al.* (1999) belegten, dass diese Domäne Bindungsaffinitäten zu vorgeschalteten Regulatoren bzw. Effektoren zeigt. Das bedeutet, die carboxyterminale Domäne ist für die Protein-Protein-Interaktionen im DAip1 verantwortlich.

DAip1 ist in Actin-Myosin Komplexen angereichert (Konzok *et al.*, 1999). Es wird vor allem auch in Bereichen des Zellkortex' mit den dynamischen Abschnitte zusammen lokalisiert, die mit filamentösen Actin versehen sind: die Phagocytotische „cups“, die „crowns“, das „leading edge“ (Lamellipodien bzw. Filopodien) und die Polen von sich teilenden Zellen. Aip1 sind im Allgemeinen Cofilin-abhängige F-Actin-bindende Proteine. Sie wirken in multizellulären Organismen mit manchen Isoformen des ADF/Cofilins zusammen, die nicht besonders ausgeprägt spaltende bzw. depolymerisierende Eigenschaften aufweisen¹⁰. Blanchoin *et al.* (2002) fanden durch ihren Studien über das *Xenopus* Aip1 (XAip1) heraus, dass Aip1 die Spaltung von Actinfilamenten durch Cofilin unterstützt und blockiert sowohl die Verlängerung als auch die Depolymerisation des Minus-Ende des Filamentes, die so genannten „barbed Ends“, auch langsam wachsendes Ende genannt. Hierbei bindet Aip1 an den Cofilin-Actinfilamenten, wodurch es die Erwärmung und die Verlängerung der Filamente verhindert. So spielt Aip1 eine entscheidende Rolle bei der Steuerung von Prozessen, die den „Actin-turnover“ verursachen (Carlier *et al.*, 1997; Lappalainen & Drubin, 1997; Thierot, 1997). Während es über spezifische Funktionen von Aip1-Homologen

¹⁰ Die Proteine der ADF/Cofilin Familie beschleunigen den Actinfilamenten-Umsatz (Actin „turnover“) durch Trennung und/oder Unterstützung der Dissoziation der Subeinheiten der Filamenteenden.

bereits zahlreichen Erkenntnisse gewonnen werden konnten, besteht über ihrer jeweiligen Strukturen noch keine eindeutigen Angaben.

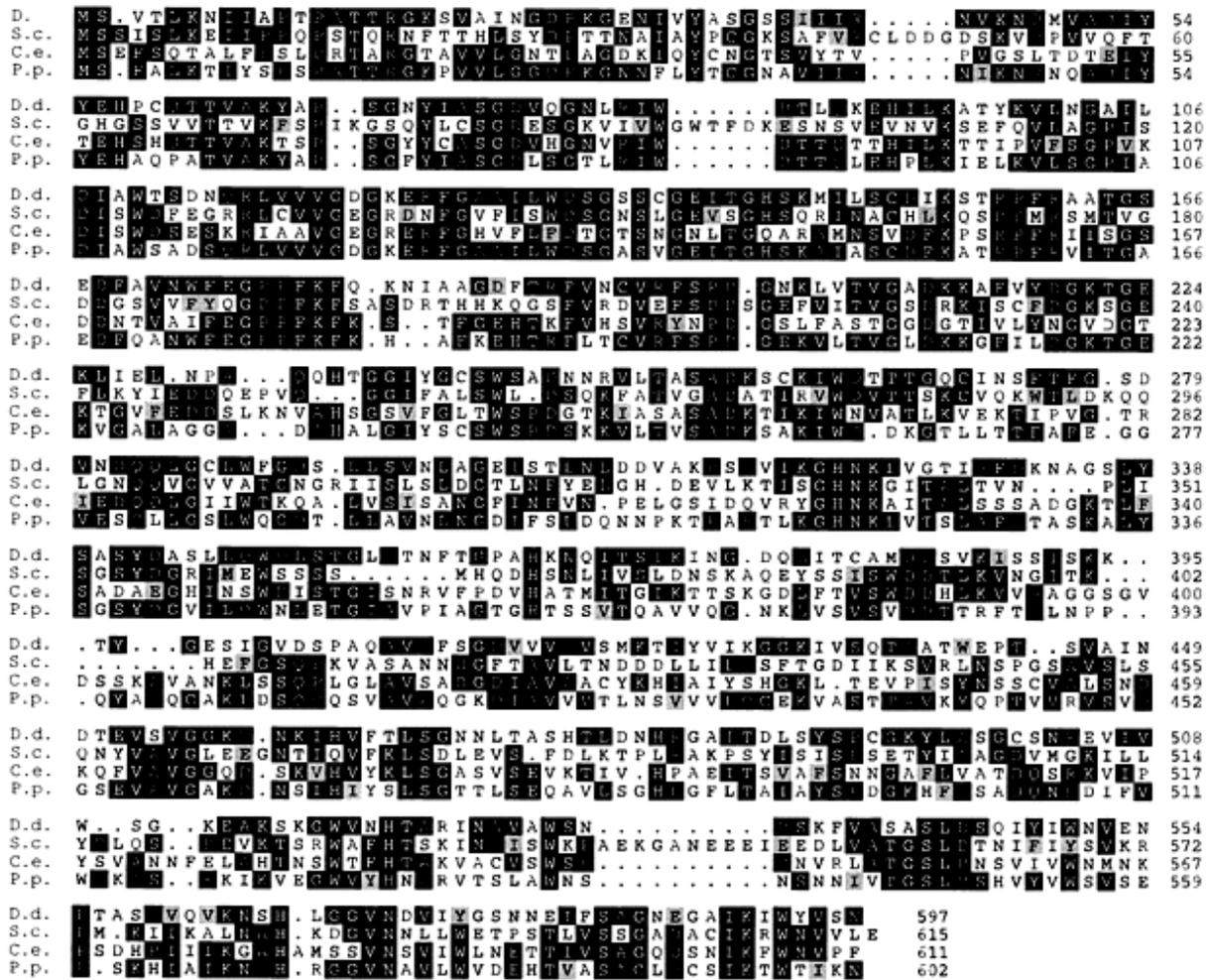


Abbildung 2.6 Primärsequenzhomologie zwischen dem *D. discoideum* Aip1 (GenBank-Nr. U36936) und Aip1 aus anderen eukaryontischen Organismen (Anordnung nach der „Clustal W“-Methode).

Untereinander angeordnet und nach Identität bzw. Ähnlichkeiten sortiert sind in diesem Zusammenhang das Aip1p der *S. cerevisiae* (GenBank-Nr. S54451 und U35666) sowie die Aip1-Proteinen aus *P. polycephalum* (Matsumo et al., 1998) und *C. elegans* (GenBank-Nr. U42835). Identitäten zwischen den Proteinenregionen werden hier durch die Markierung der Aminosäurereste in Boxen dargestellt (Konzok et al., 1999). Aus dieser Primärstrukturhomologie geht hervor, dass die Primärsequenz des Aip1, von der N- bis zu der C-terminalen Domäne, in alle Eukaryonten stark konserviert wurde.

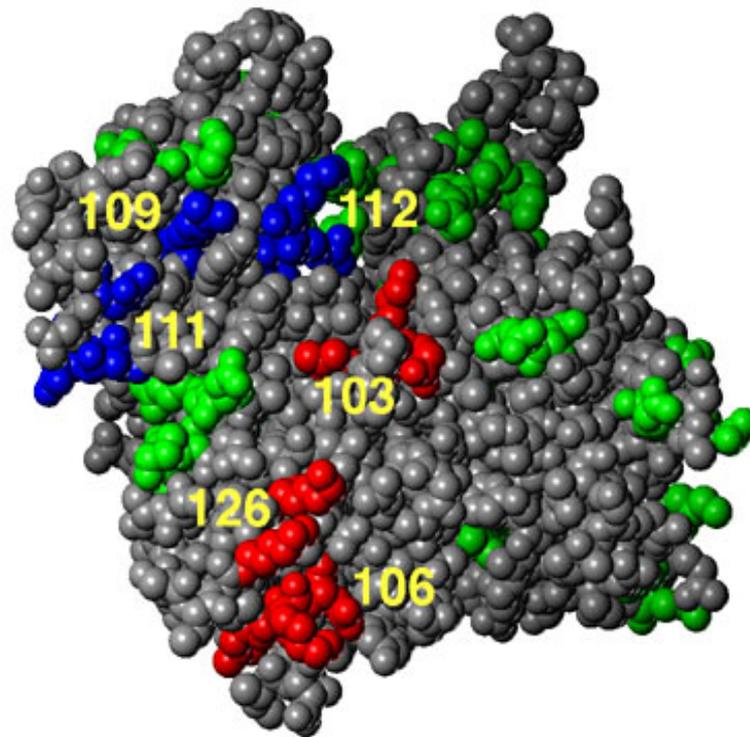


Abbildung 2.7: Aip1p-Fingerprintregionen in Actin (Abb. aus Rodal et al., 1999).

Darstellung einer monomeren Einheit von Actin, wo einige Aminosäurereste mutiert sind. In rot werden Reste dargestellt, deren Mutation die Spaltung der Actin-Cofilin- und der Actin-Aip1p-Bindung hervorruft. In blau sind die Reste dargestellt, deren Mutation ausschließlich zur Spaltung der Actin-Bindung führt. Grün schließlich kennzeichnen Reste, deren Mutation keinen besonderen Einfluss auf Actinwechselwirkungen haben. Die Allelnummern der Mutationen sind in gelber Schrift markiert.

3. Theorie des Rechenverfahrens zur Strukturberechnung von Proteinen

3.1. Einleitung

Die überragende Bedeutung der Proteine in der modernen Wissenschaft und Medizin kommt daher, dass die genetische Information, die im Erbgut bewahrt wird, in erster Linie aus den Bauplänen der Proteine besteht. Die Proteine bestehen aus natürlich vorkommenden Aminosäuren¹¹, welche der Reihe, nach durch Peptidbindungen miteinander verknüpft werden, um eine lineare Kette zu bilden: die „Primärstruktur“ der Proteine. Die Primärstruktur der Proteine bestimmt die Faltung der Kette im dreidimensionalen Raum und damit deren Funktion. Letztere lässt auf die Sekundärstruktur, regelmäßige, sich wiederholende Faltungselemente und die Tertiärstruktur (3D-Faltung der Kette) zurückführen. Es existiert demnach in der Natur ein direkter Weg von der genetischen Information zur Funktion der Proteine, von der Herstellung einer linearen Polypeptidkette bis zur dreidimensionalen Struktur (Güntert, 1993).

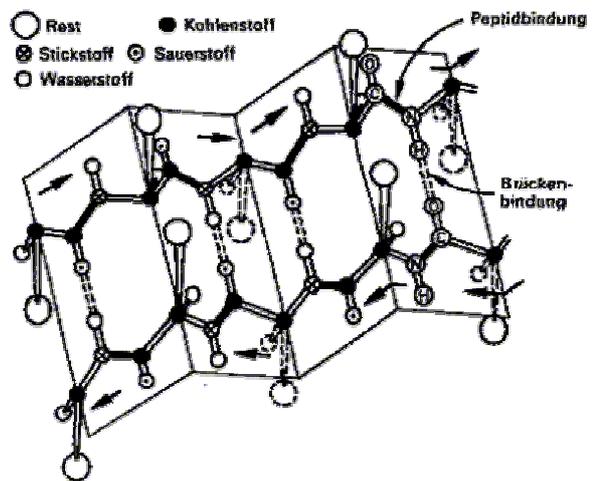
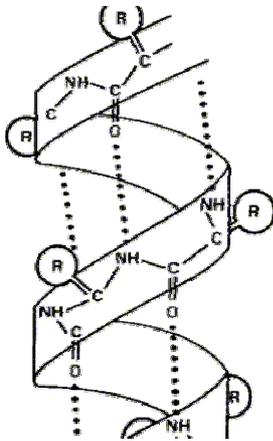
¹¹ Aus nur 20 verschiedenen Aminosäuren lassen sich alle Proteine mit Hilfe einer einzigen Verknüpfung, der Peptidbindung, aufbauen.

Primärstruktur

1 MALAAARRVL LQAGSRLGRR GAVDGARRFS NKRVLVEKEG EAGIAVMKFK
 51 NPPVNSLSLE FLTEFVISLE KLENDKSIRG VILTSEKPGI FSAGLDLMM
 101 YGRNPAHYAE YWKAVQELWL RLYLSNLTLL SAINGASPAG GCLMALTCDY
 151 RIMADNSKYT IGLNESLLGI VAPFWLKDNY VNTIGHRAAE RALQLGTLFP
 201 PAEALKVGLV DEVVPEDQVH SKARSVMKW FTIPDHSRQL TKSMMRKATA
 251 DNLIKQREAD IQNFTSFISR DSIQKSLHVV LEKLEKQKGG

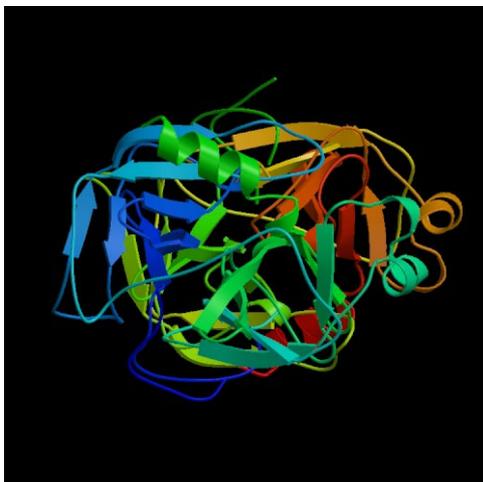
Sekundärstruktur

α -Helix- Spiralförmig mit 3,6 Aminosäuren pro Windungen



β -Faltblatt- Zickzackform, lang gestreckt.

Tertiärstruktur



α -Chymotrypsin („Pdb Protein Data Bank“ identifizierungskode: 1AFQ)

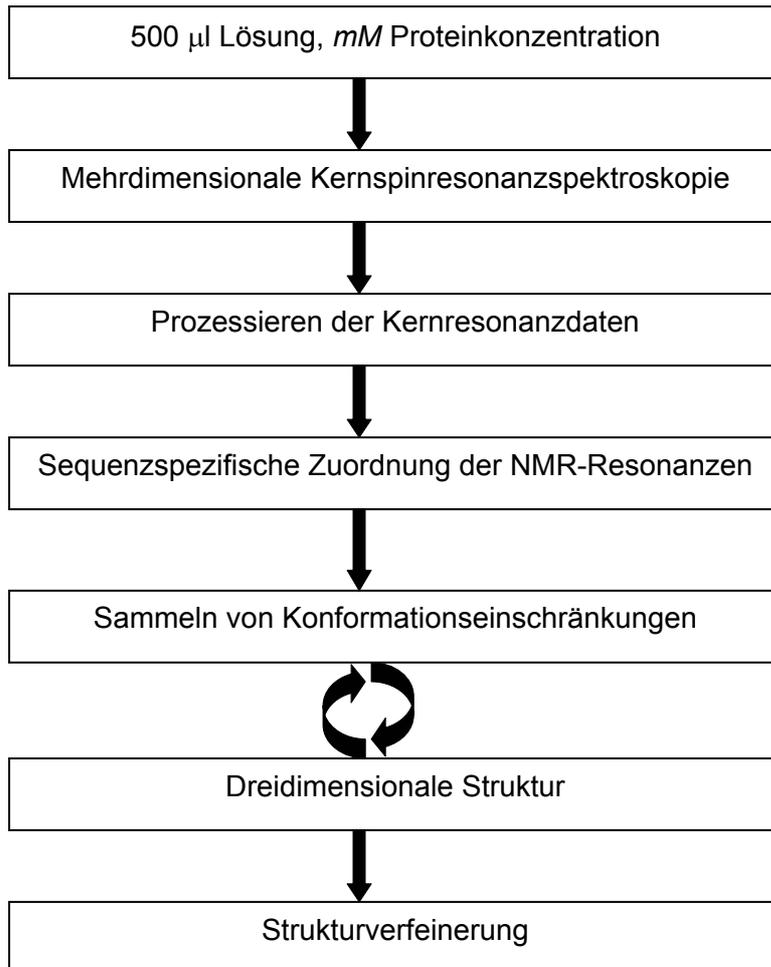
Abbildung 3.1

Die Primärstruktur eines Proteins wird durch die Abfolge der einzelnen Aminosäuren in der Peptidkette definiert. Aminosäuresequenzen werden von N- zum C-terminalen Ende geschrieben. Die sekundärstruktur ist durch die räumliche Anordnung der Peptidkette aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen des Polypeptidrückgrats der Peptidbindungen (Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen), ohne Berücksichtigung der Seitenketten. Die Tertiärstruktur ist die dreidimensionale Anordnung seiner Sekundärelemente. Sie erlaubt es, die Funktion von Proteinen zu verstehen (Abb. von Alberts et al., 2002).

Die Kenntnisse über den Zusammenhang zwischen Bauplan und Faltung eines Proteins lassen sich heutzutage durch die Anwendung von physikalischen Methoden zur Proteinstrukturaufklärung gewinnen.

Die Strukturaufklärung von großen Proteinen in Lösung mittels magnetischer Kernresonanzspektroskopie, erlaubt es, Proteine annähernd in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen. Die magnetische Kernresonanzspektroskopie setzt die Wechselwirkung von magnetischen Momenten in Atomkernen als empfindliche Sensoren für ihre lokale Umgebung voraus. Über diese Sensoren erhält man Informationen über interatomare Abstände in den zu untersuchenden Proteinen. Ursache dafür ist die Existenz einer großen Anzahl von Kernen mit Spin $\frac{1}{2}$ wie ^1H -Protonen in Proteinen. Diese Kerne erlauben es, spezifische und interpretierbare Informationen über diese Proteine zu gewinnen. Hauptquelle für diese Informationen sind sowohl die magnetischen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen räumlich benachbarten Kernspins (Solomon, 1955) als auch skalare J-Kopplungen zwischen den Kernspins, die durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind (Karplus, 1963).

Mit Hilfe der magnetischen Kernresonanzspektroskopie lassen sich also genügend Parameter messen, um die dreidimensionale Struktur eines Proteins aufzuklären. Die Struktur eines Proteins lässt sich (dennoch erst nach Berechnung der Faltung) aus den gemessenen Kernresonanzdaten ableiten. Der Ablauf der Strukturbestimmung eines Proteins beinhaltet deshalb die Präparation des Proteins, die Durchführung der Kernresonanzexperimente, das Prozessieren der Rohdaten, die den Zugang zu mehrdimensionalen Spektren erlauben, die Zuordnung der Resonanzsignale, das Sammeln der konformationellen Einschränkungen und schließlich die Berechnung und Verfeinerung der dreidimensionalen Struktur durch Energieminimierung unter Berücksichtigung bekannter geometrischer Daten (Abbildung 3.2).

**Abbildung 3.2**

Ablauf der Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins in Lösung mittels der magnetischen Kernresonanzspektroskopie (Wüthrich et al., 1993)

In diesem Kapitel wird die Theorie der Rechenmethodik erläutert, die zur Ermittlung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins in Lösung mittels der NMR-Spektroskopie herangezogen wird. Auf ausführliche Beschreibungen wird verzichtet und hierfür auf die Literatur verwiesen (Roberts, 1995).

3.2. Berechnung der dreidimensionalen Proteinstruktur in der Lösung aus kernresonanzspektroskopischen Messdaten

Das Sammeln von konformationellen Einschränkungen und die Strukturberechnung an sich stellen einen iterativen Prozess dar. Die Kenntnis über die vorläufige dreidimensionale Struktur die Bestimmung führt zu weiteren Einschränkungen, über die wiederum genauere dreidimensionale Strukturen ermittelt werden können. Strukturberechnungen werden deshalb in der Regel sehr oft wiederholt, um ein Bündel aus

qualitativ hochwertigen Konformeren zu erhalten. Auf dieser Weise werden die Verletzungen von Einschränkungen, Wasserstoffbrücken und Abweichungen der Atomposition relativ zur mittleren Molekülgeometrie minimiert. Wichtig ist dabei der Umgang mit der hohen Anzahl an Freiheitsgraden dieser Makromoleküle, gekennzeichnet durch die Anzahl der drehbaren Diederwinkel (s. Struktur von Proteinen), wenn Bindungslänge und -winkel konstant gehalten werden. Diese Notwendigkeit kommt daher, dass oft statische Strukturen von Proteinen geliefert werden können. Aufgrund der überaus großen entstehenden Datenmengen jedoch, die durch die Messung von NMR-Resonanzen entstehen, müssen aufwendige Berechnungen durchgeführt werden. Dies geschieht in der Regel mit leistungsfähigen Rechnern durch Verwendung von Softwareanwendungen, welche auf mathematischen und physikalischen Näherungsverfahren beruhen¹². Als Näherungsverfahren für Strukturberechnungen haben sich in der NMR-Spektroskopie zwei Verfahren als effizient bewiesen: Die Berechnung durch Distanzgeometrie (**DG**) und die Methode der eingeschränkten molekularen Dynamik (rMD: **r**estrained **M**olecular **D**ynamics). Das Prinzip beider Verfahren beruht auf der Optimierung einer Zielfunktion. Die Zielfunktion stellt die potentielle Energie von Startkonformationen in einem kartesischen Koordinatensystem dar. Sie wird mit zufälligen Diederwinkelwerten und Abständen minimiert, um ein globales Minimum an Energie für alle Konformere zu erreichen (Abbildung 3.3).

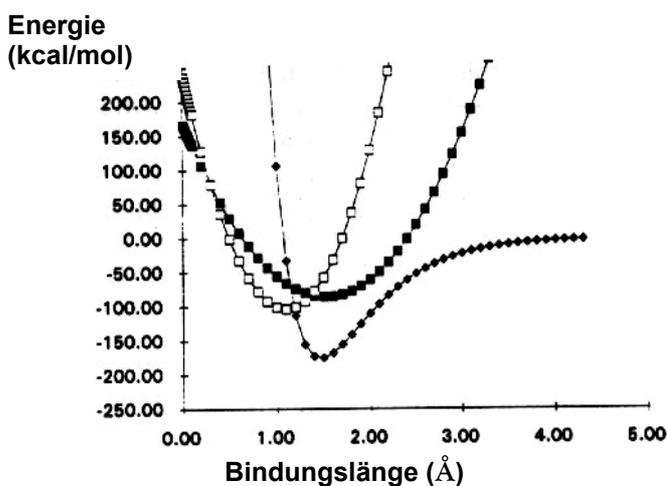


Abbildung 3.3

Schematische Darstellung der potentiellen Energiefunktionen der Schwingung. Die dargestellten Kurven reflektieren die Änderung der potentiellen Energie bei der Kernbewegung. Die gefüllten Quadrate ■ stellen die C-C-Abstoßungsenergie dar, während die weißen Quadrate □ und die gefüllten Hexagonen ◆ jeweils die C-H- und C=C-Abstoßungsenergien kennzeichnen.

¹² Quantenmechanische Berechnungen, molekulare mechanische Feldstärke etc.

Dieses Energieminimum entspricht gemäß der Boltzmann-Verteilung¹³ dem Energieniveau, das durch die meisten Konformere besetzt ist. Dies sollte am Ende einer Strukturberechnung zu einem Bündel konvergierter „guter“ Konformeren führen. Die potentielle Energie eines Moleküls ist dabei gegeben durch:

$$V(\vec{R}) = \sum E_{\text{Schwingung}} + \sum E_{\text{Bindung}} + \sum E_{\text{Torsion}} + \sum E_{\text{Van der Waals}} + \sum E_{\text{elektrostatisch}} \quad (1)$$

wobei \vec{R} , die Molekülkoordinaten im kartesischen Koordinatensystem darstellt.

Sehr oft werden beide Verfahren in einer Strukturberechnung verknüpft, so dass die Faltung der vorläufigen Strukturkonformeren, welche mit Hilfe der DG-Methode berechnet werden, durch eine Moleküldynamikrechnung weitgehend verfeinert wird. Der Zweck dieser Verknüpfung ist es, lokale Konformationsverletzungen aus irrelevanten Datensätzen zu überprüfen und zu beheben. Im Grunde dient hier eine vorläufige Optimierung der Molekülgeometrie durch erste Energieminimierungsverfahren der Vorbereitung einer molekulardynamischen Simulation. Diese Optimierung der Molekulargeometrie wird im Bezug auf eine Zielfunktion durchgeführt. Diese Zielfunktion ist ein Maß für den Unterschied zwischen den Abständen bzw. Torsionswinkeln aus der berechneten Struktur und den experimentellen Abständen bzw. Torsionswinkeln. Diese Art der Strukturberechnung ist unter dem Begriff von „Simulated Annealing“ bekannt.

3.2.1. Berechnung durch Distanzgeometrie

Die Anwendung des Distanzgeometrie-Algorithmus zur Berechnung von Strukturkonformationen erfordert experimentell gewonnene Werte von interatomaren Abständen und Standardwerten für Bindungslängen und -winkeln, welche konstant gehalten werden. Wie bereits erläutert werden, je nach Art der Distanzgeometrietechnik die Diederwinkel (DISMAN) oder die Abstände als variablen unabhängigen Größen behandelt. In Betracht gezogen werden hierfür also Funktionen, welche sowohl Informationen über obere und untere Distanzschranken, U und L¹⁴, als auch Terme für abstoßende Bindungspotentiale, R, beinhalten. Diese variablen Funktionen ergeben zusammen eine Funktion T, die im Laufe der Strukturberechnung nach

¹³ Vgl. Kapitel 4.

¹⁴ „upper bound“ und „lower bound“.

Durchführung einer Reihe von Minimierungsschritten ein globales Minimum erreichen sollte. Zweck dieser Minimierung ist es, gute Konformere zu erhalten, die mit den experimentellen Datensätzen im Einklang stehen. Die Funktion T ist bei der Distanzgeometrieberechnung wie folgt definiert:

$$\begin{aligned}
 T_{k,l} = & \frac{1}{4} \sum_{(\alpha,\beta)} \rho_k(\alpha, \beta) \theta(d_{\alpha\beta} - u_{\alpha\beta}) (d_{\alpha\beta}^2 - u_{\alpha\beta}^2)^2 / u_{\alpha\beta}^2 \\
 & + \frac{1}{4} \sum_{(\alpha,\beta)} \sigma_k(\alpha, \beta) \theta(l_{\alpha\beta} - d_{\alpha\beta}) (l_{\alpha\beta}^2 - d_{\alpha\beta}^2)^2 / l_{\alpha\beta}^2 + \\
 & \frac{w}{4} \sum_{(\alpha,\beta)} \tau_l(\alpha, \beta) \theta(s_{\alpha} + s_{\beta} - d_{\alpha\beta}) \left\{ (s_{\alpha} + s_{\beta})^2 - d_{\alpha\beta}^2 \right\}^2,
 \end{aligned} \tag{2}$$

Dabei ist $d_{\alpha\beta}$ der Abstand zwischen zwei Atomen α und β ; Für die Stufenfunktion θ gilt:

$\theta(x) = 0$ für $x \geq 0$ und $\theta(x) = 1$ für $x < 0$;

$\rho_k(\alpha, \beta) = 1$, wenn $(\alpha, \beta) \in U_k$, sonst $\rho_k(\alpha, \beta) = 0$ mit $k = 0, 1, 2, \dots$

$\sigma_k(\alpha, \beta) = 1$, wenn $(\alpha, \beta) \in L_k$, sonst $\sigma_k(\alpha, \beta) = 0$ mit $k = 0, 1, 2, \dots$

$\tau_k(\alpha, \beta) = 1$, wenn $(\alpha, \beta) \in R_k$, sonst $\tau_k(\alpha, \beta) = 0$. mit $k = 0, 1, 2, \dots$

w ist ein Parameter, der den relativen Einfluss des dritten Terms, R, auf den ersten und L den zweiten Term U beschreibt. Der dritte Term ist im Sinne des Lennard-Jones-Potentials ein Modell für die Abstoßung und wird eingeführt, um ungünstige sterische Überlappungen zwischen Atomradien aufzuheben.

Diese Abstandsinformationen können in Form von oberen und unteren Distanzschranken-Matrizen zusammengefasst werden. Diese Distanzschranken-Matrizen sind der Ausgangspunkt der Strukturberechnung durch Distanzgeometrie. Sie werden innerhalb der oberen und unteren Distanzschranken nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Entsprechend der getroffenen Auswahl wird einen Satz von Strukturberechnungen durchgeführt. Dieser Satz von Strukturberechnungen führt schließlich zu einem Satz von Strukturen. Die Abweichung der Atompositionen (r.m.s.d) innerhalb des berechneten Strukturensambels ist ein Maß für die Qualität, in der die Distanzschranken-Matrizen die erstellten dreidimensionalen Strukturen definieren.

Eine Optimierung der Zielfunktion (2) durch Minimierungsschritte nach der Distanzgeometrieberechnung findet wie folgt statt: Die Funktion $T_{k,l}$ wird zuerst für kleine Werte von k und l minimiert, welche Schritt für Schritt erhöht werden. Hierbei dient die erste Konformation entsprechend dem ersten Minimierungsschritt als Startkonformation bei der Berechnung, welche wiederum als erste korrekte lokale Konforma-

tion bewertet wird. Diese Startkonformation wird dann benutzt, um zusätzliche Abstandsinformationen zu generieren, da ein vollständiger Datensatz an Distanzschranken durch experimentelle Verfahren in der Praxis nicht gewonnen werden kann. Beim Generieren von neuen Abständen erfolgt eine leichte Störung der momentanen lokalen Konformation bis zum Erreichen einer endgültigen guten Konformation, passend zum niedrigsten Energieniveau, ohne jedoch die globale Faltung zu verändern. Daraus folgt, dass Konformationen, welche dem untersten Energieniveau ∞ entsprechen, hier aber nicht erreicht werden können. Startkonformationen und Endkonformationen besitzen folglich eine mittlere quadratische Abweichung, genannt r.m.s.d., entsprechend der Größe des Proteins, dessen Struktur ermittelt werden soll. Der r.m.s.d. zweier Konformationen lässt sich durch

$$r.m.s.d. = \left[\frac{1}{N} \sum_{\alpha=1}^N (r_{\alpha} - \tilde{r}_{\alpha})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

definieren, wobei r_{α} die Atomkoordinaten der ersten Konformation im kartesischen Koordinatensystem beschreibt, während \tilde{r}_{α} die rotierenden Koordinaten der anderen Konformation kennzeichnet, die rotiert werden, damit beide Strukturen die beste Übereinstimmung im Raum aufweisen (Braun & Gö, 1985).

Größter Nachteil dieser Strukturberechnung durch Annäherung der Molekülgeometrie und ihrer anschließenden Optimierung ist die Ermittlung von Molekülen, welche tausende von einzigartigen Konformationen sekundenweise annehmen können, ohne jedoch an alle konformationsbedingten Energiebarrieren zu gelangen. Ursache dafür ist, dass die Energiebarrieren zwischen den meist besetzten Konformationsniveaus zu groß sind. Behoben, wird dieses Problem durch die Anwendung von molekulardynamischen Algorithmen, bei denen Temperatureffekte auf Atombindungen simuliert werden können. Nur dadurch ist es möglich, diese Energiebarrieren zu passieren. Das Passieren mehrerer Energiebarrieren erlaubt es, die günstigste Konformationsenergie zu erreichen und damit die Ermittlung von besonders energiearmen Konformeren.

3.2.2. Berechnung durch Molekulardynamik

Anders als im DG-Verfahren beruht die Annäherung mittels des molekulardynamischen Algorithmuses auf Kernladungen und Energieniveaus von Molekülorbitalen

(semi-empirische Berechnungen). Hier werden die Atome wie Teilchen behandelt, die sich in einem Kraftfeld bewegen, um dadurch ihr Verhalten zu beschreiben und folglich die Struktur von Molekülen aufzuklären. Dies geschieht durch Berücksichtigung der Energie des Kraftfeldes, die sich im Sinne des Newton'schen Gesetzes wie ein anharmonischer Oszillator verändern soll. Bei der Berechnung wird zur Gesamtenergiefunktion (Zielfunktion) der Term der potentiellen Energie addiert, der die interatomaren Distanzschranken kennzeichnet. Gemäß dem Newtonschen Gesetz wird die kinetische Energie der Teilchen K wie folgt definiert:

$$K = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \quad (4)$$

m_i ist hier die Masse eines Teilchens i und v_i seine Geschwindigkeit.

In einer molekulardynamischen Simulation werden die Newtonsche Bewegungsgleichungen durch diskrete numerische Integration über eine große Anzahl von infinitesimal kleinen Zeitabständen gelöst¹⁵ (Brünger, 1986). Die Größe der ersten Änderung der molekularen Geometrie aus einer Störung des Systems bestimmt hier dann das Niveau der kinetischen Energie, welches einer bestimmten Temperatur T entspricht und sich wie folgt beschreiben lässt:

$$\frac{3}{2} NkT = \left\langle \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \right\rangle \quad (5)$$

N ist dabei die Avogadro'sche Zahl und k die Boltzmann Konstante. Die Zeitentwicklung kann auch durch die Geschwindigkeit der Atome ausgedrückt werden, während die Temperatur durch Skalieren der Geschwindigkeiten konstant gehalten wird. Dies entspricht der Verknüpfung des Systems mit einem „Wärmebad“, wodurch große Temperaturfluktuationen vermieden werden. Darüber hinaus führt eine Simulation in kleineren Zeitabständen (Picosekunden) zur Integration von höheren Bewegungsfrequenzen im System. Diese hohen Frequenzen werden in der Regel durch Vibrationen von Atombindungen hervorgerufen. Diese Art der Simulation nach molekulardynamischer Berechnung erlaubt es außerdem die Änderung der Energie und die Abweichungen der Atompositionen relativ zu einer gemittelten Konformation zu

¹⁵ Dies entspricht eine Änderung der Zeit gemäß $\int_{dt}^{\Delta t}$

verfolgen. In der Praxis wird eine Strukturberechnung durch molekulardynamische Simulation durch drei wichtige Zeit- und Temperaturperioden charakterisiert: das Erhitzen, die Simulation und das Kühlen des gesamten Systems. Die Simulationsperiode wird im Regelfall weiterhin in einen Äquilibrationsschritt und in eine Datensammlung unterteilt. Dieses Äquilibrieren des Systems erlaubt es im Allgemeinen Artefakte aus hohen Temperaturen zu korrigieren (Glasel & Deutscher, 1995).

4. Grundlagen der magnetischen Kernresonanzspektroskopie

Die Anwendung der magnetischen Kernresonanzspektroskopischen Methoden auf biologische Makromoleküle wie Proteine basiert heutzutage auf den Arbeiten von Wüthrich *et al.* (1986). In diesem Kapitel werden die Grundlagen dieser modernen Kernresonanzspektroskopie erläutert, die als Hauptinstrument zur Strukturaufklärung der aminoterminalen Domäne des *D. discoideum* CAP-Proteins (CAP-N) dienen.

4.1. Das 1D-NMR Spektrum

Das Phänomen der Zeeman-Aufspaltung liegt der magnetischen Kernresonanzspektroskopie zu Grunde. Es liefert einen wichtigen experimentellen Beweis über die Quantelung des Kernspins I eines Atoms und dessen Verhalten in einem äußeren homogenen Magnetfeld \mathbf{B}_0 .

4.1.1. Die Zeeman-Aufspaltung

Durch die Wechselwirkung des kernmagnetischen Momentes $\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{p}$ mit dem äußeren Feld spalten die Energieniveaus eines Atomkerns auf. Diese Energieniveaus werden Kern-Zeeman-Niveaus genannt. Dabei ist das gyromagnetische Verhältnis γ eine kernspezifische Konstante und \mathbf{p} der Eigendrehimpuls des betroffenen Kernes. Für die magnetische Kernresonanzspektroskopie an Proteinen spielen Kerne mit Spin-Quantenzahl $I=1/2$ eine wesentliche Rolle. Für solche Kerne sind zwei verschiedene energetische Zustände erlaubt: ein energieärmerer Zustand, α , parallel zu \mathbf{B}_0 (in Richtung des Feldes) und ein energiereicherer Zustand, β , antiparallel zu \mathbf{B}_0 (dem Feld entgegengerichtet). Hier findet jeweils eine Präzession des magnetischen Momentes $\boldsymbol{\mu}$ mit der Larmor-Frequenz $\nu_0 = |\gamma| \mathbf{B}_0 / 2\pi$ um \mathbf{B}_0 bzw. um $-\mathbf{B}_0$ statt.

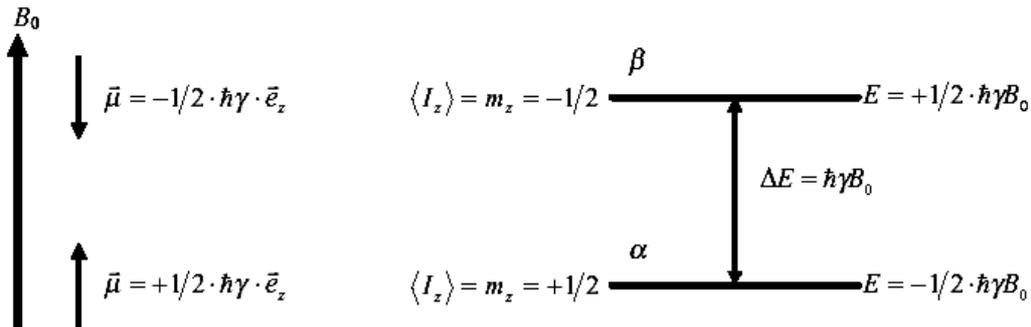


Abbildung 4.1 Orientierung eines Teilchens mit Spins $I = 1/2$ im Magnetfeld. α stellt den energetisch armen Zustand und β den energetisch reichen Zustand. m_z ist die magnetische Quantenzahl und I_z die Drehspinquantenzahl der Teilchen.

In diesen zwei erlaubten Energieniveaus erfolgt eine Verteilung der Kerne gemäß dem Boltzmann-Gesetz:

$$N\beta = N\alpha \exp(-\Delta E / kT) \quad (6)$$

ΔE ist der Energieunterschied zwischen den zwei verschiedenen Zuständen α und β , kT die Boltzmann-Temperatur und $N\beta$ bzw. $N\alpha$ die Anzahl der Kerne in den energetischen Zuständen, α und β . Ein geringer Besetzungsunterschied $\Delta N = N\beta - N\alpha$ entsteht dadurch, dass eine stärkere Besetzung des energieärmeren Zustandes stattfindet. Dies führt zu einer Netto Magnetisierung \mathbf{M} , die für das Entstehen des NMR-Signals bei der Durchführung von Pulsexperimenten verantwortlich ist.

4.1.2. Das Verhalten der Kernspins im statischem Magnetfeld

Beim Puls-Fourier-Transformations-NMR-Experiment wird die zu messenden Probe in ein statisches Magnetfeld \mathbf{B}_0 gebracht. Unter dem Einfluss von \mathbf{B}_0 werden die Kernspins polarisiert, so dass eine makroskopische Magnetisierung \mathbf{M}_0 in Richtung des statischen Magnetfeldes \mathbf{B}_0 resultiert.

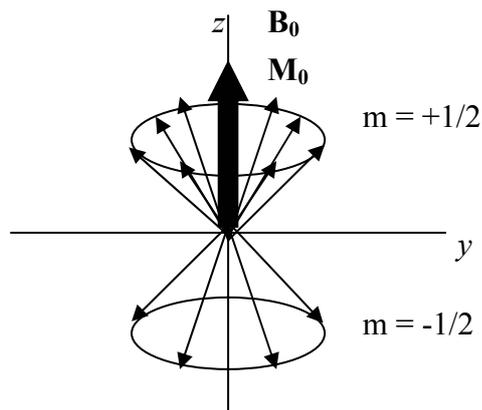


Abbildung 4.2 Verteilung von Kernspins auf einem Doppelpräzessionskegel mit der Larmorfrequenz ν_L . M_0 ist die resultierende makroskopische Magnetisierung.

Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, präzedieren die Kerne mit Kernspin $I = 1/2$ auf einem Doppelpräzessionskegel um die Feldrichtung z . Die Anwendung eines Radiofrequenzfeldes B_1 entlang der x -Achse des Koordinatensystems stört das thermische Gleichgewicht des Ensembles gleichartiger Spins, in dem eine Besetzungsinversion zwischen den zwei Energieniveaus hervorgerufen wird. Ein Radiofrequenzfeld einer geeigneten Länge, das einen 90° -Puls erzeugt, bewirkt, dass M_0 in die x, y -Ebene gedreht wird (M_x, M_y), die senkrecht zu B_0 steht (s. Abbildung 4.3).

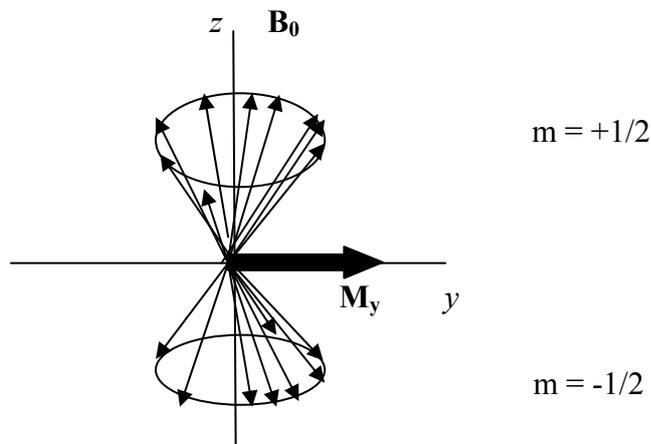


Abbildung 4.3: Richtung der resultierenden makroskopischen Magnetisierung nach einem 90° -Puls. Dieser 90° -Puls ruft eine gleiche Besetzung der beiden Energieniveaus hervor. Dabei beruht die makroskopische Magnetisierung auf eine Phasenkohärenz der präzedierenden Spins.

Die Ursache hierfür liegt in der Tatsache, dass bei Einstrahlung eines hochfrequenten Wechselfeldes \mathbf{B}_1 mit der Larmorfrequenz ν_L senkrecht zu \mathbf{B}_0 eine Resonanzabsorption durch die Kerne erfolgt. Dadurch wird die Gleichgewichtsverteilung der magnetischen Kernmomente auf dem Präzessionskegel gestört, mit der Folge, dass eine transversale Magnetisierung in der x,y -Ebene erzeugt wird. Diese transversale Magnetisierung in der x,y -Ebene präzediert unter dem Einfluss des statischen Magnetfeldes \mathbf{B}_0 mit der Larmorfrequenz. Die transversale

Magnetisierung induziert einen elektrischen Strom in der Detektionsspule des Spektrometers, der die Observable in der NMR-Spektroskopie darstellt. Da das untersuchte System dazu tendiert, in das thermodynamische Gleichgewicht zurückzukehren, bei der die Magnetisierung parallel zu \mathbf{B}_0 orientiert ist, nimmt die transversale Magnetisierung mit der Zeit ab. Dabei wächst \mathbf{M}_z wieder auf \mathbf{M}_0 an und \mathbf{M}_x und \mathbf{M}_y gehen gegen Null. Bloch (Bloch, 1946) hat diese Vorgänge mit zwei verschiedenen Relaxationszeiten T_1 und T_2 beschrieben. Die longitudinale Relaxationszeit T_1 , auch als Spin-Gitter-Relaxationszeit bezeichnet, beschreibt dabei die Rate, mit der die Magnetisierung M in das thermodynamische Gleichgewicht zurückkehrt. T_1 korreliert mit der gesamten Rotationsbewegung des Moleküls in Lösung und kann weiterhin durch die intramolekulare Mobilität flexibler Strukturen beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu beinhaltet die transversale Relaxationszeit oder Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 die Rate des Abfalls effektiver Magnetisierung, die in der x,y -Ebene nach einem 90° -Puls beobachtet wird. Sie resultiert aus dem Verlust an Phasenkohärenz der einzelnen Kernspins untereinander, die in der x,y -Ebene präzedieren und zu der makroskopischen Magnetisierung beitragen. Die so genannten Relaxationsprozesse gehorchen einer Funktion 1. Ordnung:

$$\boxed{\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1}} \quad (7)$$

$$\boxed{\frac{dM_x}{dt} = \frac{M_x}{T_2} \quad \text{und} \quad \frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2}} \quad (8)$$

Die Gleichungen (7) und (8) sind die Bloch-Gleichungen, die im klassischen Bild das Verhalten der makroskopischen Magnetisierung beschreiben.

4.1.3. Das Spinensembel

Das NMR Experiment kann anhand der Theorie des isochronen Spins (gleiche Spins) verstanden werden. Zu diesem Zweck wird anstelle des statischen Koordinatensystems ein rotierendes Koordinatensystem in Betracht gezogen (Hornak *et al.*, 1997).

Die Netto-Magnetisierung \mathbf{M} von Kernen mit gleichen gyromagnetischen Konstanten γ setzt sich in einer Proben aus den magnetischen Momente μ von magnetisch äquivalenten Kerngruppen, genannt Spinensembel oder Spinpacket (z.B. frei rotierende Methylgruppen). In jeder dieser Gruppen haben die Spins eine charakteristische Larmor-Frequenz. Nach einem 90° Puls präzedieren die Spins dieser Kerngruppen um die z-Achse mit ihrer jeweiligen Frequenzen. Diese Präzessionsbewegung hängt von der Abschirmung σ (s. Anhang), dem Maß für die magnetische Umgebung jedes Spins (Nachbargruppeneffekt), ab. Da ein Spinpacket als den gemittelten Spin-Vektor einer Gruppe von magnetisch äquivalenten Kernen definiert wird, wird die gemittelte Larmor-Frequenz eine kernabschirmungsabhängige Funktion: $\omega_0 (1-\sigma)$. Für einen Beobachter in dem rotierenden Koordinatensystem, wird das Spinpacket mit der winkelabhängigen Frequenz

$$\omega = \omega_0 (1-\sigma) - \omega' \quad (9)$$

präzedieren.

4.1.4. Eindimensionale NMR-Spektroskopie

Das Eindimensionale Experiment besteht aus zwei Phasen: die Präparation und die Detektion (Abbildung 4.4).

Bei der Präparation wird das Spinsystem in einen definierten Zustand gebracht, dessen „Antwort“ während der Detektionszeit registriert wird.

Die Präparation des Spinsystems besteht aus einem kurzen, starken Anregungspuls aus der x-Richtung, auf die Gleichgewichtsmagnetisierung \mathbf{M}_0 (Magnetisierung in z-Richtung). Bei geeigneter Wahl der Pulsdauer wird die Magnetisierung von ihrer ursprünglichen Orientierung entlang der z-Achse vollständig zur y-Achse hingeklappt. Nach diesem 90° Puls präzedieren die verschiedenen Kernspins mit ihrer Larmorfrequenz um die z-Achse. Sie induzieren dabei eine Spannung in einer Empfängersp-

le, die registriert und abgespeichert wird. Durch die Relaxationszeit T_2 nimmt diese Spannung stark ab. Aus diesem Grund werden die gesammelten Daten als FID (*Free Induction Decay*) bezeichnet. Die erhaltenen Daten werden zunächst in einer Zeitdomäne registriert und in Frequenzdomäne durch Fourier-Transformation übersetzt.

Spektrale Parameter

Das NMR-Spektrum eines Proteins ist durch eine Signaldispersion von ca. 10 ppm (s. unten) gekennzeichnet. Diese Signaldispersion wird dadurch erklärt, dass das von außen angelegte statische Magnetfeld B_0 einen Ringstrom der Elektronen am Ort des Kerns erzeugt. Nach der Lenzschen Regel wird ein Magnetfeld B_{ind} induziert, das dem B_0 -Feld entgegengesetzt orientiert ist. Das lokale Feld am Kernort ist dementsprechend gegenüber dem angelegten statischen Feld wie folgt abgeschwächt

$$B_{lok} = B_0 - B_{ind} \quad (10)$$

Die Gleichung (10) beschreibt hiermit die Abschirmung eines Kernes durch seine elektronische Umgebung. Die Abschirmung ist die Grundlage der chemischen Verschiebung (Spektralparameter). Ausgehend von (11) lässt sich eine Abschirmungskonstante σ definieren, da das induzierte Feld B_{ind} vom angelegten B_0 abhängig ist.

$$B_{ind} = \sigma \cdot B_0 \quad (11)$$

Die Abschirmungskonstante σ ist ein Maß für die Nachbargruppeneffekte, zu denen

1. die magnetische Anisotropie von Nachbargruppen (σ_N),
2. der Ringstromeffekt bei Aromaten (σ_R)
3. der elektrische Effekt (σ_e)
4. und die Intermolekulare Wechselwirkungen (σ_i) wie beispielsweise Wasserstoffbrücken und Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel zählen.

In der NMR-Spektroskopie spielen vor allem (σ_N) und (σ_R) eine wichtige Rolle.

Aus den Gleichungen (8) und (9) erhält man folgende Gleichung, die das lokale Feld am betrachteten Kernort beschreibt.

$$B_{lok} = B_0 \cdot (1 - \sigma) \quad (12)$$

Die Abschirmung σ hängt in großem Maße von den elektronegativen, induktiven und mesomeren Eigenschaften der Nachbaratome oder Atomgruppen eines Kerns ab, die die Elektronendichte am Kernort beeinflussen. Da Resonanzfrequenz und magnetische Flussdichte entsprechend der Resonanzbedingung miteinander verknüpft sind, verwendet man in der NMR-Spektroskopie einen relativen Maßstab $\Delta\nu$, der den Frequenzdifferenzen zwischen den Resonanzsignalen der Substanz und einer Referenzsubstanz entspricht. Daher lässt sich die chemische Verschiebung wie folgt definieren:

$$\delta = \frac{\Delta\nu}{\nu} \times 10^6 \quad (13)$$

δ ist eine dimensionslose, von der Messfrequenz bzw. Magnetfeldstärke unabhängige, für den betrachteten Kern in seiner Umgebung charakteristische Größe. Da $\Delta\nu$ im Vergleich zu ν sehr klein ist, wurde der Faktor 10^6 eingeführt. In der Regel δ wird in *ppm* (parts per million) angegeben (Hesse, Meier & Zeeh, 1995).

Wegen des oben genannten Nachbargruppeneffektes lässt sich für die Dispersion folgende Einteilung der Signale im eindimensionalen ^1H -NMR-Spektrum vornehmen. Im Bereich von etwa 0,0 bis 3,5 ppm befinden sich die Resonanzfrequenzen gewöhnlicher aliphatischer Protonen, im Bereich von ungefähr 3,5 bis 6,0 ppm die Frequenzen der C_α -Protonen von Aminosäuren, aber auch die der δ -Protonen der Proline ebenso wie der β -Protonen von Serin und Threonin. Resonanzfrequenzen von ^1H -Protonen bzw. H_2O finden sich im Frequenzbereich 6,0 bzw. 4,5 ppm (Wüthrich, 1986).

Während einzelne Aminosäuren in Lösung oder denaturierte Proteine nur eine geringe Dispersion aufweisen, gilt dies nicht für native Proteine. Da diese im Raum durch eine dreidimensionale Faltung charakterisiert sind, weisen die meisten NMR-Signale eine unterschiedliche chemische Verschiebung auf.

Zu der chemischen Verschiebung zählt noch als weiterer spektraler Parameter die skalare Spin-Spin-Kopplung. Sie umfasst:

1. Die indirekte Spin-Spin-Kopplung. Gemeint ist hier die Kopplung eines Kernes mit zwei bis mehreren Nachbarkernen über mehrere Bindungen. Sie enthält ferner die geminalen Kopplungen (2J) und die vicinalen Kopplungen (3J).
2. Die Kopplung mit einem direkten Nachbarkern (1J).
3. Die Kopplung mit nicht äquivalenten Nachbarkernen

Andere Spektralparameter wie Intensitäten und die Linienbreite der Resonanzsignale liefern ebenfalls wertvolle Informationen bei der Strukturaufklärung (Abbildung 5.1).

Die Linienbreite $\Delta\nu_{1/2}$ ist mit der transversalen Relaxationszeit T_2 wie folgt verknüpft.

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{2}{\pi T_2^*} \quad \text{mit} \quad \frac{1}{T_2^*} = \frac{\gamma\Delta B_0}{2} + \frac{1}{T_2} \quad (14)$$

Diese Resonanzlinie lässt sich durch eine Lorentz-Funktion beschreiben. Sowohl paramagnetische Verunreinigungen als auch Austauschprozesse (dynamische Prozesse) beeinflussen die Linienbreite. Zum einen führen paramagnetische Verunreinigungen zu stark verbreiterten Linien, indem die Relaxationszeiten verkürzt werden, zum anderen bewirken langsamere bzw. schnellere Austauschprozesse scharfe bzw. verbreiterte Signale. Die Linienbreite wird zur Bestimmung der Molekülgröße und des Aggregationszustandes eines Proteins herangezogen, da T_2 von der Größe des Moleküls abhängig ist. Hierin zeigt sich auch ein bedeutendes Problem in der NMR-Spektroskopie von Proteinen, da unter den erforderlichen Konzentrationen einige Proteine stark zur Aggregation neigen. Die daraus resultierende große Linienbreite der Signale aggregierter Proteine verschlechtert die bei Proteinen ohnehin kritische spektrale Auflösung erheblich. Sowohl Signalintensitäten, Linienbreite, skalare Kopplung als auch chemische Verschiebungen sind somit die wichtigsten Hilfsmittel bei der Strukturaufklärung von Proteinen.

Die Interpretation eines 1D-Spektrums ist für komplexe Moleküle aufgrund der Überlagerung der verschiedenen Signale gänzlich unmöglich. Diese Überlagerungen können jedoch durch die Einführung weiterer spektraler Dimensionen aufgelöst werden.

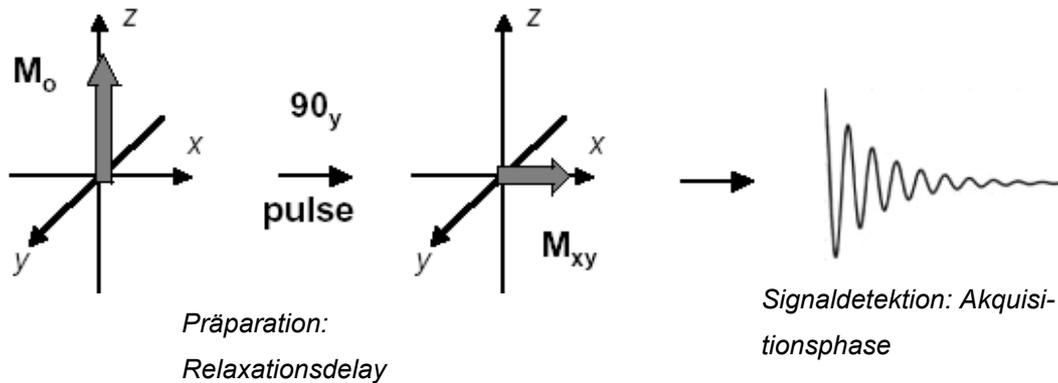


Abbildung 4.4 Schematische Darstellung eines 1D-NMR-Experiments.

Das 1D-NMR-Experiment wird durch eine Spins-Präparationsphase und eine Signaldetektionsphase gekennzeichnet bei der das FID (free induction decay) aufgenommen wird. Das FID entspricht eine zeit- und frequenzabhängige Funktion: $M(t) = \cos(\omega t) \exp(-t/T)$ und wird in der Zeitdomäne gemessen. Nach einer Fouriertransformation dieser Funktion erhält man das NMR-Signal in der Frequenzdomäne.

4.2. 2D- und 3D-NMR-Spektren

Die Einführung von mehrdimensionalen NMR Experimenten erlaubt es, eine genauere Interpretation der Protonen-, Stickstoff- und Kohlenstoffresonanzen von fast jeder Aminosäure eines Proteins im Spektrum durchzuführen. Aufgrund besser aufgelöster Resonanzsignale wird die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen in Lösung und die Suche nach möglichen Proteinbindungspartnern in diesem Fall ermöglicht. Für die Charakterisierung von Proteinen der Massen 50 bis 200 kDa werden üblicherweise 2D- und 3D-NMR-Experimente verwendet. Eine vierte Dimension ist nicht immer der Regelfall, dennoch vorteilhaft bei der Aufklärung von größeren Proteindomänen.

4.2.1. Die Spektrenaufnahme

Die Spektrenaufnahme beginnt mit der Stabilisierung des Magnetfeldes durch Locken durch Verwendung vom Deuterium-Locksignal (s. Abschnitt 4.7.1). Danach erfolgt eine Optimierung der Magnetspule durch Anpassung an eine geeignete

Resonanzfrequenz und den „richtigen“ Widerstand (probe tuning). Der Magnetspuleno-optimierung folgt die Erhöhung der Magnetfeldhomogenität in Bezug auf die gemessene Probe (engl: shimming) und schließlich die Pulskalibrierung und die Datenakquisition. Nachdem die Spektren aufgenommen worden sind, wird in der Regel eine „Datenprozessierung“ angewandt, die das gemessene Signal in den Frequenzraum transformiert. Dabei werden verschiedene Optimierungsmethoden, wie z.B. Basislinienkorrektur, angewandt. Für eine genauere Beschreibung dieser Prozesse wird auf die Literatur verwiesen (Roberts, 1995).

4.2.2. 2D-NMR-Experimente

Die Pulse werden im Allgemeinen bei den 2D-Experimenten so ausgewählt, dass detektierte Signale als t_1 -abhängige Amplituden- oder Phasenfunktionen moduliert werden, da für jeden Wert von t_1 ein FID aufgenommen wird. Infolgedessen können die Frequenzen der Signale in t_1 durch ihre Beziehung zu den Signalen in t_2 indirekt gemessen werden. Sobald ein vollständiger Datensatz vorhanden ist, wird er in Bezug auf t_1 und t_2 Fourier transformiert. Das dabei entstandene zweidimensionale Spektrum kann dann als Funktion von zwei Frequenzvariablen F_1 und F_2 dargestellt werden.

Folgende Typen von 2D-Experimenten haben sich als wesentlich für die Strukturaufklärung von Proteinen herauskristallisiert: das NOESY- das TOCSY- und das HSQC-Experiment. Diese Experimente unterscheiden sich durch den Typ von Signal in t_1 und die Informationsübertragung von t_1 zu t_2 und dienen im Falle von NOESY- und TOCSY-Experimenten, zum einem der Zuordnung von sequenziellen Beziehungen zwischen Aminosäureresten in einem Protein und zum anderen zur Identifizierung von Signalen aus interresidualen Wechselwirkungen, ausgehend von der Primärstruktur. Das HSQC-Experiment dagegen wird ausschließlich zur Identifizierung von Protonen, die direkt an den Heterokernen ^{15}N und ^{13}C gekoppelt sind, genutzt.

4.2.3. Das 2D-NOESY-Experiment

Das NOESY-Experiment („Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy“) basiert auf die dipolare Wechselwirkung der Kernspins. Man spricht vom Kern-Overhauser-

Effekt. Bei diesem Vorgang relaxieren zwei Spins wie folgt: einen Spin I relaxiert über einen anderen Spin S und umgekehrt und verstärkt oder schwächt dadurch dessen Magnetisierung (Kreuzrelaxation). Dieser Kern-Overhauser-Effekt wirkt durch den Raum und ist in erster Näherung proportional zu $1/r^6$ (r entspricht dem Abstand zwischen zwei Kernen). Die Kreuzrelaxation zweier Protonen ist daher von dem räumlichen Abstand dieser Protonen abhängig. Ein Magnetisierungsübertrag zwischen zwei Kernen wird in der Regel nur dann beobachtet, wenn diese weniger als etwa 5 Å voneinander entfernt sind. Das NOESY-Experiment erlaubt es, Informationen über den Abstand zwischen zwei Protonen zu gewinnen, welcher zur Strukturberechnung herangezogen werden kann. Die Korrelation von Protonen aufgrund ihrer räumlichen Beziehung stellt die wichtigste Strukturinformation in der NMR-Spektroskopie dar.

4.2.4. Das 2D-TOCSY-Experiment

Im TOCSY-Experiment (**T**otal **C**orrelation **S**pectroscopy) wird die Magnetisierung durch den Transfer über skalare J-Kopplung entlang des Spinsystems einer Aminosäure verteilt. Dieser erfolgt durch Einstrahlen eines starken Spin-Lock-Pulses nach Erzeugung von transversaler Magnetisierung während der Evolutionsphase. Der Spin-Lock-Puls unterdrückt die Larmor-Präzession, d.h. die Magnetisierung entwickelt sich nur unter dem Einfluss der J-Kopplung und eliminiert dabei den Effekt der Abschirmung von benachbarten Kernen. Somit kann die Magnetisierung zwischen den Protonen innerhalb einer Aminosäure bis zu vier Bindungen übertragen werden. Dieser Effekt, der durch die TOCSY-Pulsabfolge hervorgerufen wird, wird „isotrope Mischung“ genannt. Da eine isotrope Mischung durch eine Abwesenheit von einem Phasenverlust gekennzeichnet ist, so dass die Magnetisierungen des Spins im Spinpacket sich nicht gegenseitig auslöschen können, ist das TOCSY-Experiment bezüglich der Signalübertragung durch ^1H - ^1H -Kopplungen hoch empfindlich („data-sensitiv“), im Gegensatz zum COSY-Experiment (Roberts, 1995). Einziger Nachteil dabei ist der daraus resultierende Signalverlust, bedingt durch eine Relaxation im Laufe der Mischsequenz.

Sowohl die 2D-NOESY- als auch die 2D-TOCSY-Experimente werden bei größeren Proteinen in H_2O aufgenommen und später nach einem Lösungsmittelaustausch auch in D_2O . Zweck dieses Austauschs ist es, Signalüberlagerungen durch Proto-

nenresonanzen aus einer Wechselwirkung mit H₂O (Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen) zu unterdrücken. Die austauschenden Gruppen, wie beispielsweise die Amidprotonen, sind dadurch im 2D-NOESY in D₂O nicht sichtbar. Einer der wesentlichen Vorteile ist außerdem hier die Abnahme der Signalintensitäten von verbreiteten Signalen, die als Folge der Proteindynamik zu einer massiven Überlagerung beiträgt.

4.2.5. Das HSQC-Experiment

Das HSQC-Experiment („**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence“) entsteht aus dem Übertrag von Magnetisierung auf einen Heterokern und wieder zurück. In der NMR an Biomolekülen werden heteronukleare Korrelations-Experimente in der Regel dazu benutzt, Protonen zu identifizieren, die an andere X-Kerne direkt gekoppelt sind. X steht für die Isotope, ¹³C und ¹⁵N. Im Fall eines ¹⁵N-HSQC-Experimentes zum Beispiel wird die Magnetisierung von einem ¹H^N-Proton auf den skalar gekoppelten ¹⁵N^H-Stickstoffkern übertragen. Die Folge ist dabei eine Korrelation zwischen einem Stickstoffkern und seinem Amid-Proton. Diesem Vorgang, der INEPT (**I**nsensitive **N**uclei **E**nhanced by **P**olarization **T**ransfer) genannt wird, folgt eine Evolutionszeit, in der die Spins entsprechend der lokalen chemischen Umgebung präzedieren. Schließlich erfolgt ein Rück-INEPT-Schritt. Die Magnetisierung kann dann über das ¹H^N-Proton detektiert werden. Einer der größten Vorteile dieses Experimentes ist, dass Signale der ¹H^N- oder Kohlenstoffprotonen, die im 2D-NOESY-Experiment überlagert sind, hier besser identifizierbar sind. Das HSQC-Experiment stellt die Basis für die Charakterisierung von großen Proteinen (> 100 Aminosäuren) mittels der NMR-Spektroskopie dar. Während ein ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum sowohl der Charakterisierung der Protonen des Rückgrades als auch der Identifizierung der Amid-Seitenketten von einigen Aminosäuren dient, erlaubt das ¹H-¹³C-HSQC als Ergänzung dazu, die Kohlenstoff-Protonen im Protein zu identifizieren und vor allem das Spinsystem von Prolinresten leichter zu erfassen. Ein weiterer Vorteil des HSQC-Experiments liegt in der Möglichkeit einer Erweiterung in weitere spektrale Dimensionen.

4.2.6. 3D-NMR-Experimente

Der Übergang in einer dritten Dimension erlaubt es, die Signalüberlagerungen weiter zu reduzieren. Ein dreidimensionales Spektrum kann somit aus einem zweidimensionalen Experiment folgendermaßen konstruiert werden:

Nach der ersten Mischperiode wird eine weitere Evolutionszeit, gefolgt von einer zweiten Mischperiode, anstelle einer anschließender Akquisition eingefügt. Am Ende steht wiederum die direkte Datenakquisition. Die verschiedenen Zeiten t_1 und t_2 werden einzeln inkrementiert. Bei den 3D-NMR-Experimenten erfolgt eine Signalverteilung in einem Quader anstelle einer Ebenen wie es in den 2D-Experimenten der Fall ist. Kombiniert werden in der Regel die Pulssequenz eines 2D- ^1H -NOESY-Experimenten mit der Pulssequenz von einem ^{15}N -HSQC- oder einem ^{13}C -HSQC-Experiment, so dass 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC- oder 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC-Spektren entstehen. Die 2D-NOESY Mischzeiten werden hier von den HSQC-Pulssequenzen gefolgt. Erst am Ende der HSQC-Pulssequenz beginnt die Datenakquisition.

4.2.7. Das HCCH-TOCSY-Experiment

Das 3D-HCCH-TOCSY-Experiment wird als Alternative zum ^{13}C -TOCSY-HSQC für größere Proteine (> 50 kDa) bevorzugt. Hier findet ein schneller Magnetisierungs-transfer über die direkte ^{13}C - ^{13}C zwischen den kovalent gebundenen Kernen im gesamten aliphatischen Bereich des Proteins statt. Dadurch erfolgt der Transfer der Magnetisierung von einem Proton der Kohlenstoffseitenkette (oder einem C^α -Proton) via dem direkt gebundenen Kohlenstoff zum nächst benachbarten Kohlenstoffkern, um schließlich zu dem am nächsten gelegenen Proton zu gelangen usw. Im HCCH-TOCSY sind deshalb alle Resonanzsignale der Kohlenstoffseitenketten sichtbar.

4.2.8. 3D Tripel-Resonanz NMR-Experimente

Zwar lässt sich das Problem der Signalüberlagerung in kleinen Proteinen durch Einbeziehen eines zweiten Kerns (Doppel-Resonanz) verringern, auf den die Magnetisierung übertragen werden kann, bei größeren Proteine (> 150 Aminosäuren) sind diese Schwierigkeiten nur eingeschränkt zu beheben. Durch Einführung eines dritten aktiven Kerns werden Signalüberlagerungen in den Spektren von größeren Proteinen

deutlich geringer, da nur bestimmte Tripel von Kernen z.B. $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N}$) Signale liefern. Dies kommt daher, dass in diesen Spektren eine viel geringere Anzahl an Signalen pro Ebene in dem 3D-Quader vorhanden ist. Die Anwendung von Tripel-Resonanz-Experimenten bleibt aus diesem Grund die Methode der Wahl für die Strukturaufklärung solcher Proteine. Die Durchführung von solchen Experimenten erfordert jedoch die Verwendung von doppelmarkierten Proteinproben (^{13}C , ^{15}N).

Bei Tripel-Resonanz-Experimenten findet ein Magnetisierungstransfer zwischen den Kernen über die ^1J oder ^2J -Kopplung statt, z.B. über direkte kovalente $\text{C}^\alpha\text{-C}^\beta$, $^{\text{N}}\text{H-C}^\alpha$, $\text{C}^\alpha\text{-}^{\text{N}}\text{H}$ Bindungen. Infolgedessen erfolgt der Transfer zwischen den Kernen besonders schnell und effizient. Signalverluste (s. oben) sind außerdem wesentlich geringer als bei den homonuklearen NMR-Experimenten.

Eine Klassifizierung und folglich die Anwendung solcher Experimente erfolgt nach der Art der Korrelation zwischen den verschiedenen Kernen. Unter Berücksichtigung der Beziehungen zwischen Kernen untereinander, basiert die Charakterisierung des Proteinrückgrades von besonders großen Proteinen neben den 2D- ^{13}C - und ^{15}N -HSQC-Experimenten auf Tripelresonanz-Experimente:

4.2.8.1. Korrelation zwischen Amidprotonen und Alphakohlenstoffe: HNCA

Von einem Amidproton ($^{\text{N}}\text{H}$) ausgehend erfolgt der Magnetisierungstransfer zu dem direkt gekoppelten Stickstoffatom ($^{\text{N}}\text{H}$), später zu einem der benachbarten C^α -Kerne, i oder $i-1$, und zurück. Die Resonanz der Stickstoffatome ist im Spektrum in der ersten Dimension aufgetragen, die zweite zeigt die Resonanz der C^α -Atome und die dritte schließlich weist auf die der Amidprotonen hin. Jeder dieser Schritte erfordert einen Transfer über starke ^1J -Kopplungen zwischen den Kernen, wobei die $^2\text{J}_{\text{NC}^\alpha}$ Kopplung unwesentlich stärker ist als die $^1\text{J}_{\text{NH}^\alpha}$ Kopplung. Beide betragen jeweils 7 Hz und 11 Hz.

4.2.8.2. Korrelation zwischen Alpha- und Beta-Kohlenstoffen mit Amidprotonen: CBCA(CO)NH

Das CBCA(CO)NH-Experiment verbindet die Resonanzen von C^α und C^β -Kohlenstoffatomen eines Aminosäurerestes i mit dem Amidproton des Nachfolgers

$i+1$. Das daraus erhaltene Spektrum wird als Ergänzung zusammen mit dem HNCA-Spektrum verwendet, um eine effiziente Identifizierung der Aminosäurereste des Proteinrückgrads zu erzielen. Sowohl hier als auch bei einem HNCA Spektrum können die Resonanzen von Kohlenstoffen identifiziert werden.

4.2.8.3. Korrelation zwischen Amidprotonen und Carbonylen (CO): HNCO

Hier werden Resonanzen von Amidprotonen mit denen der Stickstoffe (^1H) eines Aminosäurerestes i und denen des Carbonylrestes des vorheriges Restes $i-1$ verbunden. Dadurch wird versucht, die Carbonylkohlenstoffe aller Aminosäuren in der Sequenz zu identifizieren.

4.2.9. Von der Sekundärstrukturidentifizierung zur dreidimensionalen Struktur

Die Charakterisierung von Proteinen mittels der magnetischen Kernresonanzspektroskopie wird heutzutage immer mehr durch die Anpassung modernen Techniken an größere Proteine (>100 Aminosäuren) geprägt. Die Strukturaufklärung einer Proteindomäne lässt sich in vier verschiedene Prozesse einteilen:

4.2.9.1. Spektrenauswertung: Strategie der sequenzspezifischen Zuordnung

Die Strategie der sequenzspezifischen Zuordnung erfolgt hier gemäß der Sequenzspezifischen Zuordnung bei großen Proteine (> 100 Aminosäuren) durch Verwendung von Spektren der uniform ^{15}N einfachmarkierten bzw. ^{15}N , ^{13}C doppelmarkierten sowie ^{15}N selektiv markierten Proteinproben. Hiermit können sequenzielle Beziehungen zwischen den Aminosäuren leichter identifiziert werden als in Spektren von nicht markierten Proben. Eine sequenzspezifische Zuordnung beginnt mit der Lokalisation einzelner Aminosäuren innerhalb der Primärsequenz. Dies geschieht durch Überlagerung der ^{15}N -HSQC Spektren der selektiv markierten Proben mit denen der ^{15}N -HSQC uniform markierten Proben. Zweck dieser Überlagerung ist es, jeder Aminosäuretyp anhand seiner chemischen Verschiebung bzw. seiner Frequenz im Spektrum zu identifizieren. Die erhaltenen Werte können in die 3D ^{15}N -NOESY-HSQC und HNCA-Spektren übertragen werden, wo die eigentliche Suche nach

direkten Nachbarschaftsbeziehungen $i - (i + 1)$ bzw. $i - (i - 1)$ stattfindet. Gewonnen werden derartige Beziehungen durch die Untersuchung von Korrelationssignalen (Kreuzsignalen) in den überlagerten HNCA- und CBCA(CO)NH-Spektren. Die Korrelationssignale der $^N\text{H}-^N\text{H}$ -Region des 3D-NOESY-HSQC-Spektrums sind dabei eine sehr hilfreiche Ergänzung, um die genauere Positionierung der Aminosäuren in der Primärsequenz hervorzuheben. Der erfolgreichen Identifizierung von sequenziellen Kreuzsignalen, bei der Peptidketten nach und nach ergänzt werden, folgt die Identifizierung von intraresidualen Signalen. Hinweise über intraresidualen Beziehungen werden in der Regel durch Überlagerung der 2D-NOESY, 2D-TOCSY in H_2O und 2D-NOESY in D_2O Spektren gegeben. Hier werden Signale der H^α und H^β Protonen und manchmal auch Amidseitenkettenprotonen abgelesen und können dann in das 2D- ^{13}C -HSQC-Spektrum übertragen werden. Hier sind nur die Signale der Kohlenstoffprotonen des aliphatischen Bereichs detektierbar. Die Auswertung des ^{13}C -HSQC-Spektrums erfordert die vorherige Extrahierung von Frequenzen aus den HNCA- und CBCA(CO)NH-Spektren, aus denen Signale von C^α und C^β -Kohlenstoffen der einzelnen Aminosäuren schon identifiziert wurden. Diese werden in der Regel auch in den 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC übertragen. Zwar sind solche Spektren für die Identifizierung der Kohlenstoffseitenketten von Proteinen ausreichend, weit bessere Ergebnisse werden bei großen Proteinen jedoch durch die Verwendung des HCCH-TOCSY erzielt. Kreuzsignale der Amidseitenketten und folglich ihre Identifizierung sind dagegen ausschließlich im 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC erhältlich. Eine wichtige Ausnahme stellt die Aminosäure Prolin dar. Diese unterbricht die Kette der sequenziellen Konnektivitäten und ruft daher Schwierigkeiten bei der Strukturaufklärung hervor. Der Grund hierfür liegt in der Absenz des Amidprotons, so dass im 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum auch kein entsprechendes Signal erscheint. Anders ist es, wenn der Prolinrest in der energetisch begünstigten trans-Konformation vorliegt. In diesem Fall lassen sich die sequenziellen Signale des $^N\text{H}_{i-1}-\text{H}^\delta_i$ -Kontaktes auf die H^α -Frequenz der Aminosäure $i-1$ im 3D ^{15}N -NOESY-HSQC extrahieren.

4.2.9.2. Übersetzung der Kreuzsignale in Distanzschranken: Sammeln von konformationellen Einschränkungen und Bestimmung der Sekundärstruktur

Wie bereits erläutert, finden sich in den NMR-Spektren Kreuzsignale für Protonen, die einen geringeren Abstand als 5 Å voneinander aufweisen¹⁶. Protonen benachbarter Aminosäuren weisen aufgrund der Molekülgeometrie nahezu immer sequenzspezifische interresiduale Abstände auf, die weniger als 5 Å betragen, genannt Distanzschranken. Diese konformationellen Distanzeinschränkungen sind in der Tabelle 4.11 zusammengefasst. Sie werden dazu benutzt, um eine Klassifizierung der Sekundärstrukturelemente durchzuführen. Andererseits können die Volumen der Resonanzsignale in den NMR-Spektren in Distanzschranken (NOE-Abstände) übersetzt werden durch die Beziehung,

$$r_i = r_{\text{ref}} (I_i / I_{\text{ref}})^{-1/6} \quad (15)$$

Dabei ist I_i das Volumenintegral des beobachteten Signals bei einem Abstand r_i , der der Abstand der Aminosäure i zu einer bestimmten Aminosäure im Raum darstellt; r_{ref} ist ein Referenzabstand, dessen Wert aus der Literatur erhältlich ist und I_{ref} schließlich das dazu korrespondierende Peakvolumenintegral im Spektrum.

Eine Klassifizierung der Sekundärstrukturelemente erfolgt aufgrund dessen durch eine genauere Untersuchung der Kreuzkorrelationen in den verschiedenen Regionen der NOESY-Spektren. Hierfür werden Spektren ausgewählt, die unterschiedliche Mischzeiten aufweisen ($\tau_m = 40$ ms und $\tau_m > 100$ ms). Dabei weisen besonders starke $^N\text{H}_i - ^N\text{H}_{i+1}$ - und schwächere $^\alpha\text{H}_i - ^N\text{H}_{i+1}$ -Wechselwirkungen in den $^N\text{H}-^N\text{H}$ - und $^\alpha\text{H}-^N\text{H}$ -Regionen des Spektrums mit $\tau_m = 40$ ms auf eine Helix hin. Die Anwesenheit schwacher $^\alpha\text{H}_i - ^N\text{H}_{i+2}$ - und $^\alpha\text{H}_i - ^N\text{H}_{i+3}$ -Wechselwirkungen zusätzlich und manchmal auch die der $^\alpha\text{H}_i - ^N\text{H}_{i+4}$ -Kontakte in der $^\alpha\text{H}-^N\text{H}$ -Region des Spektrums mit $\tau_m > 100$ ms (hier: $\tau_m = 120$ ms) dient als endgültiger Beweis zur Zuordnung der beteiligten Aminosäurereste in einer Helix. Berücksichtigt werden unter anderem isolierte $^N\text{H}_i - ^N\text{H}_{i+2}$ - und $^\alpha\text{H}_i - ^N\text{H}_{i+1}$ -Konnektivitäten für die Identifizierung von β -Schleifen (Turns). Die Anzahl der Aminosäuren, die sich bei den $^N\text{H}_i - ^N\text{H}_{i+1}$ -Wechselwirkungen betei-

¹⁶ Dies gilt nur für nicht deuterierten Proben.

gen, wird zudem in Betracht gezogen. Bei einer Beteiligung von mindestens drei und mehr Aminosäuren handelt es sich um eine Helix, während man bei zwei Resten (höchstens drei) von einem β -Schleife spricht. Unterschieden wird außerdem noch, ob eine α -Helix oder möglicherweise eine 3^{10} -Helix vorhanden ist. Entscheidend für diese Unterscheidung ist die Anwesenheit von $^{\alpha}\text{H}_i - ^{\text{N}}\text{H}_{i+4}$ -Konnektivitäten in der gesamten Peptidkette.

Tabelle 4.1: Konformationelle Einschränkungen, wichtig für die Bestimmung der Sekundärstruktur eines Proteins: Kurze sequenzielle ^1H - ^1H -Distanzschranken, ^1H - ^1H -Distanzschranken aus mittleren Reichweite, vicinale Kopplungen und Austauschrate von Amidprotonen.

Parameter	α -Helix	3_{10} -Helix	β -Antiparallel	β -Parallel
$d_{\alpha\text{N}}(i, i)$	2.6	2.6	2.8	2.8
$d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$	3.5	3.4	2.2	2.2
$d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$	4.4	3.8		
$d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$	3.4	3.3		
$d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$	4.2	(> 4.5)		
$d_{\text{NN}}(i, i+1)$	2.8	2.6	4.3	4.2
$d_{\text{NN}}(i, i+2)$	4.2	4.1		
$d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$	2.5-4.1	2.9-4.4	3.2-4.5	3.7-4.7
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$	2.5-4.4	3.1-5.1		
$d_{\alpha\alpha}(i, j)$			2.3	4.8
$d_{\alpha\text{N}}(i, j)$			3.2	3.0
$d_{\text{NN}}(i, j)$			3.3	4.0
$3J_{\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\alpha}}$	(< 4)	(< 4)	(> 9)	(> 9)
NH-Austausch	langsam	langsam	langsam	langsam

4.2.9.3. Strukturberechnung: Bestimmung der Tertiärstruktur

Die für die Strukturberechnung benötigten Einschränkungen werden durch Integration der Kreuzsignalvolumina aus den 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC- und ^{13}C -NOESY-HSQC-Spektren erzeugt (s. Kapitel 6). Nach einer internen Kalibrierung können die Abstände innerhalb Distanzschranken in sequenziellen, mittleren und Abständen großer Reichweite eingeteilt werden. Diese Kalibrierung erfolgt meistens unter Berücksichtigung bekannter Werte der verschiedenen Strukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt und β -Schleifen). Dies gilt sowohl für sequenzielle als auch für intraresidualen NOEs. Der Literatur zufolge befinden sich die Distanzschranken bei den jeweiligen Proteinkonformationen in den oberen Grenzbereichen: 4,2; 5,2 und 6,0 Å. Die 2D- ^1H NOESY-Spektren in H_2O und D_2O werden herangezogen, um ausschließlich Einschränkungen von Amidseitenketten, aber auch Amidprotonen, zu extrahieren. Auch hier werden die Distanzschranken wie folgt in obere und untere Grenzbereiche gruppiert: 1,8-2,8 Å, 2,8-3,5 Å und 3,5-5,5 Å. Hinzugefügt werden außerdem noch Korrekturen (Pseudo-atom-Korrekturen), wenn aromatischen Ringprotonen, Methyl- und Methylenprotonen in den Distanzschranken beteiligt sind (Wüthrich, 1986).

Da die Winkel ϕ und ψ des Proteinerückgrates zwischen den Aminosäuren für den Aufbau von Tertiärstrukturen eine wichtige Rolle spielen, ist die Verwendung von Winkeleinschränkungen bei der Strukturberechnung von Proteinen von großer Bedeutung. Diese Winkel sind torsionsabhängig und lassen sich nur indirekt aus der Charakterisierung von $^3J_{\text{HN}}$ -Kopplung-Konstanten in den Spektren ableiten. Eine Extraktion aus einem 3D-HNHA-Experiment wird deshalb durchgeführt, da hier $^3J_{\text{HN}\alpha}$ -Kopplungen direkt abgelesen werden können. Zusätzlich dazu besteht die Möglichkeit der Winkelvorhersage (Cornilescu *et al.*, 1999). So kann die Anzahl der erhaltenen Torsionswinkeleinschränkungen aus dem HNHA-Spektrum zu ergänzt werden. Bei dieser Torsionswinkelvorhersage werden die starke Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen der Atome des Proteinerückgrates zu der lokalen Konformation und die Übereinstimmung mit sekundären chemischen Verschiebungen von Proteinen vorausgesetzt. Dies führt dazu, dass die sekundären chemischen Verschiebungen eines gegebenen Aminosäurerestes und die Informationen, die durch die Primärsequenz gegeben werden, genutzt werden, um eine Aussage über den Winkel der zentralen Aminosäure innerhalb einer Dreiergruppe zu treffen. Ähnlichkeiten zwischen Werten von bekannten Proteinen in einer Datenbank zu dem zu untersu-

chendem Protein werden gemessen und dazu eine neue Datenbank erstellt. Dies erlaubt es die best möglichen Winkel für eine gegebene Dreiergruppe in der Proteinsequenz zu generieren. Diese Messungen basieren auf einem am häufigsten vorkommenden Wert bei Verschiebungen zwischen dem zu untersuchenden Protein und Einträgen aus der Datenbank. Solche häufig vorkommenden Werte von ϕ and ψ werden dann für die Vorhersage verwendet.

4.3. NMR-spektroskopische Methoden

4.3.1. Vorbereitung der Proteinprobenlösungen

Die Intensität des NMR-Signals ist proportional zur Materialmenge innerhalb des empfindlichen Volumens des Spektrometers. Empfohlen werden aus diesem Grund Volumenmengen von ca. 400-500 μl in einem NMR-Probenröhrchen von 5 mm Durchmesser bei einer Probenkonzentration von 0.5-2 mM und im Idealfall bis zu 5 mM für die Aufnahme von mehrdimensionalen NMR-Spektren für strukturelle Studien (Roberts, 1995). Die Isotopenanreicherung der Proteinproben, bei der durch Austausch der Kerne ^{12}C und ^{14}N mit ^{13}C und ^{15}N , Kerne mit Spins $I = \frac{1}{2}$ zusätzlich zu ^1H eingeführt werden, spielt außerdem eine Schlüsselrolle bei der Strukturaufklärung eines Proteins. Besonders große Proteine werden dadurch für NMR-spektroskopische Untersuchungen besser zugänglich. In der Regel wird die Proteinlösung mit 5% D_2O versetzt, um sich auf das Deuterium Lock-Signal einzulocken und zu shimmen. Das Shimmen und Locken erlaubt es, das Feld zu stabilisieren, da sich Feldinhomogenitäten bei der Messung von Spektren in der Regel negativ auswirken.

5. Andere Methoden zur Charakterisierung von Proteinen

5.1. Die Erzeugung von Proteineinkristallen

5.1.1. Prinzipien des Kristallwachstums

Die Kristallisation von biologischen Makromolekülen ist die Grundvoraussetzung für ihre Strukturaufklärung mittels der Röntgenstrukturanalyse. Trotz ihrer praktischen Bedeutung ist sie noch immer unzureichend verstanden. Der Begriff der Proteinkristallisation schließt einen Vorgang ein, in dem die Proteine langsam und gleichmäßig aus ihrer Mutterlauge ausfallen. Dabei spielen Verunreinigungen und Kristallkeimbildung sowie von anderen noch unerforschten Faktoren eine wesentliche Rolle. Das Kristallwachstum erfordert bei Proteinen außerdem noch eine gleichmäßige Verteilung der Oberflächeneigenschaften¹⁷, welche für alle beteiligten Moleküle möglichst identisch sein sollte. Zum Beispiel führt eine identische Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche für alle Moleküle des sich bildenden Kristalls demnach zur Bildung einer besseren Packung der Proteinmoleküle in Kristallen, d.h. zu der Bildung einer dichtesten Kugelpackung im Laufe des Kristallisationsvorgangs. Hierbei spielen sowohl die Temperatur als auch der pH-Wert der Lösung eine entscheidende Rolle.

Die Erzeugung von dicht gepackten Proteineinkristallen wird in der Regel in vier wichtige Prozesse aufgeteilt, zu denen:

- Die Erzeugung von besonders homogenen und reinen Proteinlösungen (> 95%),
- die Auswahl eines geeigneten Kristallisationspuffers,
- die Überführung der Mutterlauge in einen Zustand der Übersättigung und die darauf folgende Kristallkeimbildung,
- und schließlich das Kristallwachstum zählen.

In den Abbildungen 5.1 und 5.2 sind das Phasendiagramm eines Proteins und eine Zusammenfassung des Kristallwachstumvorganges schematisch dargestellt. Auf detaillierte Erklärungen der Prozesse, die das Kristallwachstum umfassen, wird hier jedoch verzichtet und deshalb auf die Lehrbücher der Kristallographie verwiesen (Drenth, 1999).

¹⁷ Z.B. eine gleichmäßige Verteilung der Ladung an der Proteinoberfläche.

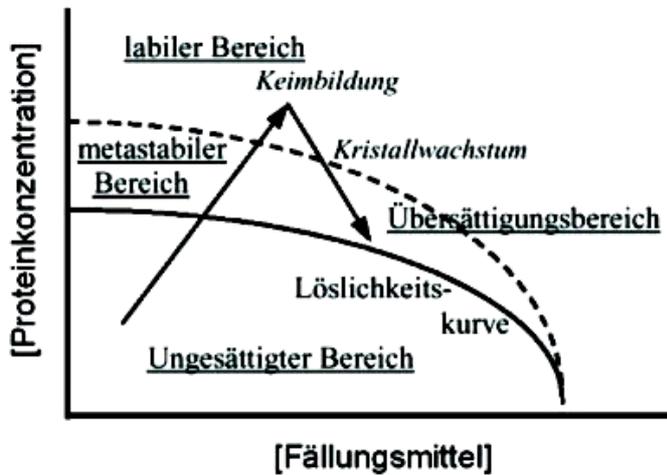


Abbildung 5.1 Phasendiagramm von Proteinen.

Dieses Phasendiagramm zeigt den Konzentration-Zeit-Verlauf des Kristallisationsvorganges bei Proteinen. Bei Übersättigung erfolgt die Keimbildung. Erfolgt eine langsame Bildung von Kristallen, so orientieren sich die Proteinmoleküle in eine geordnete dichteste Kugelpackung.

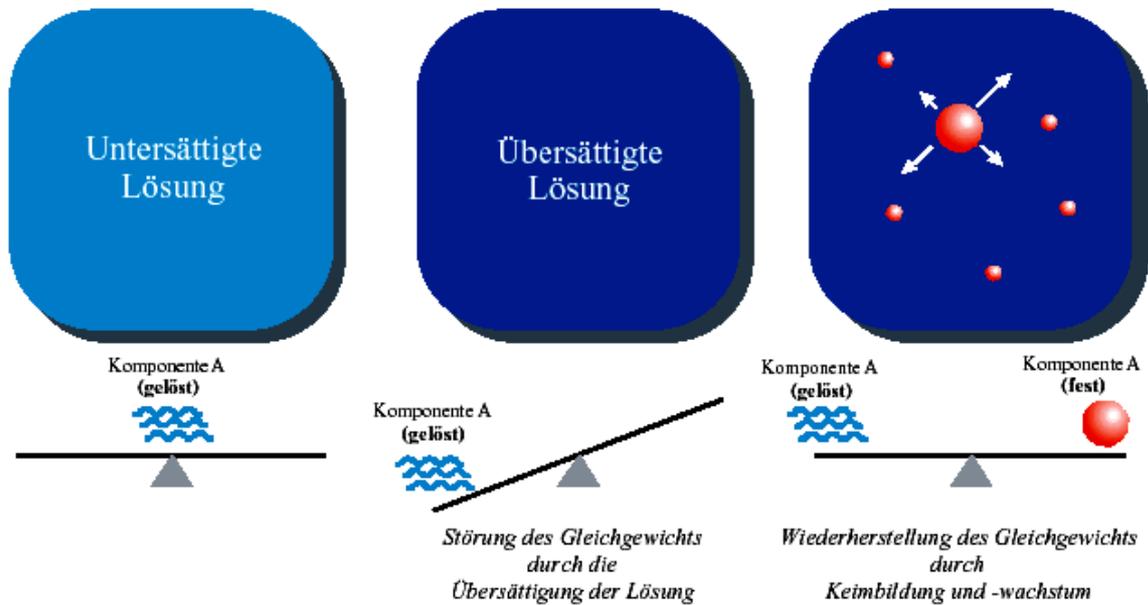


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Kristallisationsvorganges von Proteinen aus ihrer Mutterlauge.

5.2. Kristallisationstechniken

Vier Techniken haben sich zur Züchtung von Proteineinkristallen in der Biokristallographie als besonders vorteilhaft erwiesen:

5.2.1. Die Batch-Kristallisation

Während der Kristallisation von Proteinen mittels des Batch-Verfahrens werden Proteinlösungen in einen Zustand der höchsten Übersättigung überführt, indem zu der Lösung ein Reagenz¹⁸ als Fällungsmittel rasch hinzugefügt wird. Demzufolge kann das langsame Wachstum von Proteineinkristallen aus der Mutterlauge induziert werden (Chayen et al., 1990, 1992). Im Labor wird bevorzugt die „Microbatch“-Methode verwendet. Dabei werden 1-2 μ l Tropfen der Proteinlösung und des Fällungsmittels zusammenpipettiert und mit Öl überschichtet (Paraffin-, manchmal auch Silikonöl), welches abdichtet und folglich das Lösungsgemisch vor der Evaporation schützt (Chayen, 1997, 1998).

5.2.2. Kristallzüchtung durch Lösungsdiffusion

Bei der Lösungsdiffusion werden Protein- und Fällungsmittel-Lösungen mit einer Spritze in eine „small-bore“ Kapillare gefüllt (s. Abbildung 6.3). Dabei entstehen zwei verschiedene Schichten. Die Lösung mit einer höheren Dichte setzt im unteren Bereich der Kapillare ab und bildet die unterste Schicht und diejenige mit der niedrigen Dichte dagegen die oberste Schicht. Bei der Auswahl einer Äquimolaren Mischung von beiden Lösungen sollte die Konzentration der Reagenzlösung am Anfang doppel so groß wie ihrer Endkonzentration sein. Beide Lösungen diffundieren dann langsam ineinander als Folge der Bildung einer starken Oberflächenspannung. Ein Übersättigungsbereich entsteht in der Proteinlösung in der Kapillare so, dass oberhalb die Übersättigung am niedrigsten und unterhalb an der Grenzoberfläche zur Reagenzlösung am höchsten wird (García-Ruiz & Moreno, 1994).

¹⁸ Vgl. Tabelle 4.10

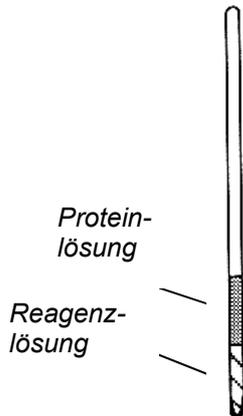


Abbildung 5.3: Kristallzüchtung durch Lösungsdiffusion.

Dargestellt ist hier eine Kapillare, in der eine Proteinlösung und eine Fällungsreagenzlösung zwei verschiedene Schichten bilden. Die Lage der Lösungen in der Kapillare ist von der Dichte der Lösungen abhängig: im unteren Bereich der Kapillare befindet sich die Lösung mit der höchsten Dichte. Die zwei Lösungen sollen in der Kapillare ineinander diffundieren (Abbildung aus Drenth, 1999).

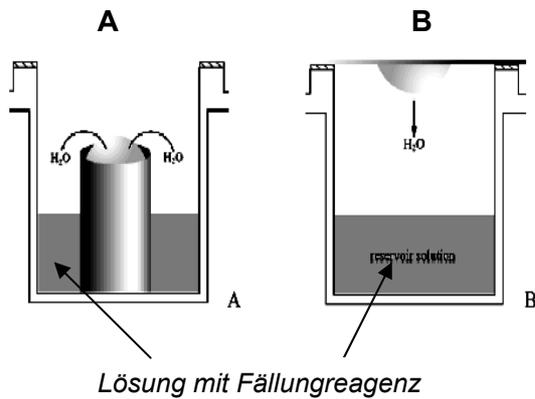
5.2.3. Kristallzüchtung durch Dampfdiffusion: die „Hanging-Drop“- und die „Sitting-Drop“-Verfahren

1.) Das „Hanging-Drop“-Verfahren

Bei dem „Hanging-Drop“-Verfahren werden 3-10 μl Proteinlösung zusammen mit einer äquimolaren Menge Reagenzlösung mit Fällungsmittel in einem mit Silikon bedeckten Deckglas präpariert. Der Tropfen aus Protein- und Reagenzlösung wird dann oberhalb der Ablage eines Reservoirs invertiert. Dieses Reservoir wird in der Regel teilweise mit der Reagenzlösung aufgefüllt (Abbildung 4.3). Die Beschichtung des Glases mit Silikon vermeidet die Verteilung des hängenden Tropfens auf der Glasoberfläche. Mit der Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Reservoirinhalt und dem Mutterlaugetropfen ein. Dieses Gleichgewicht ist die Folge der Diffusion des Dampfes von dem Tropfen in dem Reservoirinhalt und umgekehrt.

2.) Das „Sitting-Drop“-Verfahren

Im Unterschied zu dem „Hanging-Drop“-Verfahren wird bei dem „Sitting-Drop“-Verfahren die Protein-Reagenz-Fällungsmittel Lösungsmischung auf einer Plattform gesetzt (Abbildung 6.3).

**Abbildung 5.4** Dampfdiffusionstechnik**A. Sitting-Drop Verfahren.**

Hier wird das Protein mit der Reagenzlösung zusammen auf einer Plattform pipettiert.

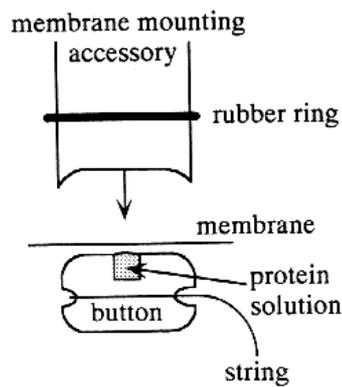
B. Hanging Drop Verfahren.

Der Tropfen aus Protein und Reagenzlösung wird oberhalb der Ablage eines Reservoirs gefüllt.

In beiden Fällen diffundiert Dampf von dem Tropfen in den Reservoirinhalt und umgekehrt (Graphik aus McPherson, 1999).

5.2.4. Kristallisation durch Mikrodialyse

Es gibt mehrere Dialysentechniken, um Proteineinkristalle zu erzeugen. Bei allen diesen Techniken wird die Proteinlösung in die Reagenzlösung dialysiert. Ein Beispiel für die Kristallisation durch Mikrodialyse stellt das Zepperzauer-Verfahren, das in der Abbildung 6.5 schematisch dargestellt ist.

**Abbildung 5.5:** Kristallzüchtung durch Mikrodialyse.

Die Kristallbildung findet hier unterhalb der Membran, im unterstem Bereich statt (Abbildung aus Drenth, 1999).

5.2.5. Proteineinkristalle

Ein Kristall ist ein homogenes anisotropes Gebilde, das eine regelmäßige periodische Anordnung seiner Bausteine aufweist. Man unterscheidet bei Proteineinkristallen aufgrund starker Einschränkungen in der Zähligkeit der Symmetrieachse sieben Kristallsysteme: triklin, monoklin, orthorombisch, tetragonal, trigonal, hexagonal und kubisch. In

der Tabelle 6.1 sind diese sieben Kristallsysteme mit den Dimensionen ihrer jeweiligen Elementarzellen aufgelistet. Auf ausführliche Erklärungen wird jedoch verzichtet auf die Literatur verwiesen (Drenth, 1999).

Tabelle 5.1. Kristallsysteme bei Proteinen

Kristallsysteme	Elementarzelle	Punktgruppen ¹⁹
Triklin	$\alpha \neq \beta \neq \gamma$ $a \neq b \neq c$	1
Monoklin	$\alpha = \gamma = 90^\circ$ (mit b als einzige Achse; Für Protein ist es die 2-Schraubenachse ²⁰) oder: $\alpha = \beta = 90^\circ$ (mit c als einzige Achse; Für Protein ist es die 2-Schraubenachse)	2
Orthorhombisch	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	222
Tetragonal	$a = b; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	4
Trigonal	$a = b; \alpha = \beta = 90; \gamma = 120$ (hexagonale Achsen) oder: $a = b = c; \alpha = \beta = \gamma$ (rhombohedrische Achsen)	3
Hexagonal	$a = b; \alpha = \beta = 90; \gamma = 120$	6
Kubisch	$a = b = c; \alpha = \beta = \gamma = 90$	23

5.2.6. Molekulargewichtsbestimmung mit MALDI-MS (Matrix unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie)

Die MALDI-Massenspektrometrie (engl.: **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**isorption **I**onisation) ist eine Methode, bei der große Moleküle (wie Proteine) ausgehend von ihrem Molekulargewicht nachgewiesen werden. Das Prinzip der MALDI beruht auf der Übertragung eines zu analysierenden Moleküls in einer festen kristallinen Matrix. Diese Matrix besteht aus kleinen organischen Molekülen (Tabelle 6.2), die nach Einstrahlen von Laserphotonen (Nd-YAG-Laser) eine hohe Absorption zeigen. Außerdem müssen die Analytmoleküle in das Kristallgitter der Matrix eingebaut werden, wodurch die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Analytmolekülen aufgehoben werden. Die Einkopplung der für die Ionen notwendigen Energie erfolgt bei UV-Bestrahlung über

¹⁹ Vgl. Drenth, 1999.

²⁰ Schraubenachsen sind Kopplungen von Rotationen mit Translation entlang der Rotationsachse C_n , d.h. nach einer Drehung um einen Winkel $360/n$ erfolgt eine Translation τ entlang der Achse.

elektronische Anregung der π -Elektronensysteme der aromatischen Matrixmoleküle. Danach bewirken die photoionisierten radikalischen Matrixmoleküle eine hohe Ausbeute an elektrischen geladenen Proteinmolekülen (einfach bzw. zweifach, eventuell dreifache Protonierung). Diese geladenen Moleküle fliegen vom Matrixträger auf eine Kathode, wobei die Flugzeit gemessen wird. Bei der MALDI-MS Methode werden Flugzeitmassenspektrometer verwendet (engl. TOF: „time of flight“), bei der die Massenbestimmung im Hochvakuum über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit erfolgt (s. Anhang). Aus einer Eichung des Gerätes mit Proteinen bekannter Masse kann schließlich das Molekulargewicht des unbekanntes Proteins bestimmt werden.

Tabelle 5.2:

Beispiel von Matrixsubstanzen, die im Allgemeinen bei der MALDI-MS verwendet werden.

Matrix	Wellenlänge	Geeignet für
2,5 Dihydroxybenzoesäure (DHP)	266 nm	Proteine, Peptide
Nicotinsäure	266 nm, 337 nm, 355 nm	Proteine, Peptide
3,5 Dimethoxy-4-hydroxizimtsäure (Sinapinsäure)	266 nm, 337 nm, 355 nm	Proteine

6. Verwendete Materialien und angewandte Methoden

6.1. Chemikalien

6.1.1. Medien und Puffer

6.1.1.1. Medien und Pufferlösungen für die *E. coli* Kulturen

1.) LB Medium bei pH 7,4 (Sambrook et al., 1989)

Tryptone	10,0 g/l
Hefe-Extrakt	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l

2.) Minimal Medium (Muchmore et al., 1989)

Stammlösungen:

Thiamin	1,0 %
Ampicillin (steril filtriert)	50 mg
MgSO ₄	1,0 M
Zn-EDTA-Lösung:	
EDTA	5,0 mg/ml
Zn(Ac) ₂	8,4 mg/ml

Lösung von Spurenelementen:

H ₃ BO ₃	2,5 g/l
CoCl ₂ ·H ₂ O	2,0 g/l
CuCl ₂ ·H ₂ O	1,13 g/l
MnCl ₂ ·H ₂ O	9,8 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	2,0 g/l

Sterile Endlösung bei 1 Liter Medium (pH 7,0):

NaCl	0,5 g
Lösung der Spurenelemente	1,3 ml
Zitronensäure-Monohydrat	1,0 g
Eisencitrat	36 mg (in 120 µl konz. HCl)
KH ₂ PO ₄	4,0 g
KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	7,8 g
Zn-EDTA-Lösung	1,0 ml
NH ₄ Cl und oder ¹⁵ NH ₄ Cl	1,0 g

Glucose (steril)	5,0 g/l
Thiamin (steril filtriert)	560 µl
Antibiotika (100 mg/ ml)	1:1000
MgSO ₄ (steril filtriert)	2,0 ml

3.) *Definiertes Medium (Senn et al., 1987)*

K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O	10,0 g
Glucose (250 g/l)	20,0 ml/l
Zitronensäure	1,0 g
Natriumacetat	2,0 g
NH ₄ Cl	1,0 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	500 mg
Guanosin, Cytosin, Uracil	je 125 mg
Nikotinsäure, Thiamin, Thymin	je 50,0 mg
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	10,0 mg
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	5,0 mg
Biotin	0,1 mg

Aminosäuren:

Serin	1,6 g
Alanin, Glutaminsäure, Glutamin	
Arginin, Glycin	je 400 mg
Asparaginsäure, Methionin	je 250 mg
Asparagin, Histidin, Isoleucin, Lysin, Prolin, Threonin, Tyrosin, Valin, Leucin	je 100 mg
Cystein, Cystin, Tryptophan, Phenylalanin	je 50,0 mg
Ampicillin (steril filtriert)	50,0 mg/ ml

ad 1 l mit kaltem H₂O (bid., autokl.),
pH mit 10 M KOH auf 7,4 einstellen,
steril filtrieren,

4.) *Phosphat-Puffer-Lösung (60mM bei pH 7,3)*

KH ₂ PO ₄	69,61 ml
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	30,39 ml
β-C ₂ H ₅ SH	30,39 ml

5.) 10 × Kinasierungspuffer (pH 7,4)

Tris	200 mM
MgCl ₂	100 mM
β-Glycerolphosphat	100 mM
DTT	10,0 mM

6.1.1.2. Medien und Pufferlösungen für die *D. discoideum* Kulturen1.) AX2-Medium, pH 6,7 (Watts und Ashworth, 1970)

Peptone-Oxid	14,3 g/l
Hefe-Extrakt (oxidiert)	7,15 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,61 g/l
KH ₂ PO ₄	0,49 g/l
Maltose	18,0 g/l

2.) SM-Agarplatten ad 1 l H₂O (pH 6,5)

Agar	9,0 g
Pepton	10,0 g
Glucose	50,0 mM
Hefe-Extrakt	1,0 g
MgSO ₄	4,0 mM
KH ₂ PO ₄	16,0 mM
K ₂ HPO ₄	5,7 mM

3.) Phosphat-Puffer nach Soerensen, pH 7 (Malchow et al., 1972)

KH ₂ PO ₄	14,6 mM
Na ₂ HPO ₄	2,0 mM

4.) Phosphat-Agarplatten ad 1 l mit Soerensen-Puffer (pH 7)

Bacto-Agar	10,0 g
------------	--------

5.) Homogenisations-Puffer (pH 7)

PIPES	1,50 g/l
DTT	0,46 g/l

EGTA	1,9 g/l
EDTA	0,6 g/l
Benzamidin	0,78 g/l
Complete Proteaseinhibitor Cocktail (Roche)	1 Tabl. /20 ml

6.) **Tris-Puffer (pH 8)**

Tris-ammonium-hydrochlorid	2,42 g/l
DTT	0,15 g/l
NaCl	3,50 g/l

7.) **HEPES-G-Puffer (pH 7,5)**

HEPES	1,19 g/l
CaCl ₂ H ₂ O	0,29 g/l
MgCl ₂	0,20 g/l
DTT	0,03 g/l
ATP	1,10 g/l
Benzamidin	0,16 g/l

8.) **End-Puffer (pH 8)**

Tris-ammonium-hydrochlorid	2,42 g/l
DTT	0,015 g/l
MgCl ₂	0,40 g/l
KCl	4,47 g/l

9.) **Kristallisationspuffer (pH 8)**

Tris-ammonium-hydrochlorid	2,42 g/l
DTT	0,015 g/l
MgCl ₂	0,40 g/l
KCl	4,47 g/l
NaCl	24,0 g/l

6.1.2. Andere Chemikalien**6.1.2.1. Antibiotika**

Blasticidin (Calbiochem)	7,5 µg/ml
G 418 (AG Scientific Inc.)	10,0 µg/ml
Penicillin/ Streptomycin (1%)	9 ml
Ampicillin (Sigma)	50 mg/l

6.1.2.2. Isotopenangereicherte Chemikalien

99,99 %ige Deuteriumoxid ($^2\text{H}_2\text{O}$)-Lösung	Campro Scientific, Berlin.
99,9% ^{15}N -Ammoniumchlorid ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$)-Lösung	Campro Scientific, Berlin.
99,99% deuteriertes Tris-Lösung	Campro Scientific, Berlin.

6.1.2.3. Reagenzien

40 % Acrylamid	National Diagnostics
2,1 % Bisacrylamid)	National Diagnostics
L-Alanin	Merck, Darmstadt
Äpfelsäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Arginin	Merck, Darmstadt
L-Asparagin	Merck, Darmstadt
L-Asparaginsäure	Merck, Darmstadt
Bernsteinsäure	Merck, Darmstadt
Biotin	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat Merck	Darmstadt
Complete EDTA-free	Roche Diagnostics
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
L-Cystein	Merck, Darmstadt
L-Cystin	Merck, Darmstadt
Cytosin	Merck, Darmstadt
Trypton	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
DNA-Ladepuffer (6x)	Peqlab, Erlangen
Eisen-(III)-chlorid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze

Tabelle 6.1 Reagenzien zur Züchtung von DAip1-Einkristallen (Hampton Research)

	SALZ	PUFFER	FÄLLUNGSREAGENZ
Crystal Screens I	0,2 M Ammonium Acetate	0,1 M Tris/HCl pH 8,5	30% v/v iso-Propanol
Crystal Screen II	0,01 M Nickel (II) Chloride hexahydrate	0,1 M Tris pH 8,5	20% w/v Polyethylen-Glycol Monomethyl Ether 2000

6.2. Biologische Materialien

6.2.1. Organismen

Tabelle 6.2 Bakterienstämme (Israel, 2003)

Stamm	Genotyp bzw. Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21	$F^- dcm ompT hsdS(r_B^- m_B^-) gal$	Studier & Moffat, 1986
<i>E. coli</i> M15	$nal^s str^s rif^s lac^- ara^- gal^- mtl^- F^- recA^+ uvr^+$	Qiagen, Hilden

Tabelle 6.3 *D. discoideum* Stämme (Konzok et al., 1999)

Stamm	Genotyp bzw. Phänotyp	Referenz
AX2-214	Wildtyp	Raper, 1935; Watts & Ashworth, 1970
4-1	DAip1 Überexprimierer	Konzok et al., 1999

6.2.2. DNAs, Enzyme und Proteine

Tabelle 6.4 *E. coli* Expressionsvektoren

DNAs	Relevante Merkmale	Referenz
pT7-7	Amp ^r , Expressionsvektor mit T7-Promotor; 2743 kb	Tabor, 1990
pUC 19	Amp ^r , Plasmid-DNA; 2686 kb	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

Tabelle 6.5 *D. discoideum* Expressionsvektoren (Konzok *et al.*, 1999)

DNA	Relevante Merkmale	Referenz
pDEXRH	G418 ^r , Expressionsvektor mit Actin15-Promotor	Faix <i>et al.</i> , 1992

Tabelle 6.6 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzymen	Merkmale	Referenz
<i>Nde I</i>	R ⁺ , 37°C, 95% E.a. ²¹	Amersham, Gibco-BRL New England Biolabs
<i>BamH I</i>	BamHI+, 37°C, 95 % E.a.	
<i>Hind III</i>	R ⁺ , 37°C, 95 % E.a.	Amersham, Gibco-BRL New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	EcoRI+, 37°C, 95 % E.a.	

Andere Enzyme

Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie, München
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP)	Boehringer, Mannheim
RNase	Sigma-Aldrich Chemie, München
Proteinkinase A	Sigma-Aldrich Chemie, München

²¹ Enzymaktivität im Puffer R⁺ (s. unten).

Tabelle 6.7 Proteinmarker für die SDS-Gelelektrophorese (Fermentas)

Proteinstandard	Ursprung	Molekulargewicht (kDa)
beta-galactosidase	<i>E. coli</i>	116,0
Bovine Serum albumin	Rinderplasma	66,2
Ovalbumin	Hühnereiweiß	45,0
Lactate dehydrogenase	Schweinemuskel	35,0
RE Bsp98I	<i>E. coli</i>	25,0
beta-lactoglobulin	Rindermilch	18,4
Lysozym	Hühnereiweiß	14,4

Tabelle 6.8 Proteinmarker für die Gelfiltrationsanalyse

Proteinstandard	Molekulargewicht(kDa)
Ferritin	450,0
Katalase	240,0
Aldolase	158,0
BSA	68,0
Ovalbumin	45,0
Chymotrypsinogen A	25,0
Cytochrom c	12,5
ATP	0,65

Tabelle 6.9 CAP-Konstrukte

Domäne	Sequenzabschnitt	Molekulargewicht (Da)	PI	Proteinklasse	Ursprung
N-terminal	M1-T226 mit His-tag	25,000	7,1	Pfam-Familie	<i>D. discoideum</i>
N-terminal	S51-T226	20,000			

Tabelle 6.10 DAipI-Konstrukt

Domäne	Sequenzabschnitt	Molekulargewicht (Da)	PI	Proteinklasse	Ursprung
N- und C-terminal	M1-N551	64,612	7,13	“WD-repeat“-Familie	<i>D. discoideum</i>

6.3. Verbrauchsmaterialien

6.3.1. Säulenmaterial

Bio-Gel HAT, 500 ml (hydratisiert)

DEAE, DE52 (freie Base)

Mono S HR 75, 10/10

Bio-Rad Laboratories, California, USA.

Whatman International Ltd., Kent, England.

Amersham Pharmacia, Freiburg.

6.3.2. Sonstiges

Centriprep YM10, YM 30

Dialysemembranen Spectra/Por[®] MW 8000, 34000

Macrosep[™], 10, 30

NMR-Röhrchen 5,0 mm

NMR-Röhrchen 5,0 mm

Parafilm

Pipettenspitzen 2,5 µl, 10,0 µl, 200 µl, 500 µl, 1000 µl

Pipetten 1,0 ml, 1,5 ml, 5,0 ml, 10,0 ml, 25,0 ml

Reaktionsgefäße 0,4 ml, 1,5 ml und 2 ml

Säulen

Sterile Filter, Millex 0.22 µm, 0.45 µm

Spritzen, 1 ml, 2 ml, 10 ml, 60 ml

Ultrafiltrationsmembranen YM10 YM30

Zentrifugationsröhrchen

Douncer

Amicon, Witten.

Roth, Kleinfeld bei Hannover.

Pall Filtron Corporations, Massachusetts, USA.

Wilmad, Buena, N.J., USA.

Shigemi, Tokyo, Japan.

American National, Canada.

Gilson, Villiers-le-Bel, France.

Wheaton Science, New Jersey, USA.

Eppendorf, Leipzig.

Bio-Rad Laboratories, California, USA.

Amersham Pharmacia, Freiburg.

Millipore, Molsheim.

Braun, Melsungen.

Amicon, Witten.

Beckmann, Heidelberg.

Wheaton Science, New Jersey, USA.

6.4. Geräte

Äkta Explorer 20

Peristaltische Pumpe P1

Fraktionssammler

Aufnahmegerät

UV-Detektor

Amersham Pharmacia, Freiburg.

Elektrophorese- und Proteintransferkammern	MPI für Biochemie, Martinsried.
Feinwaage	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz.
Magnetrührer	Bachhofer, Reutlingen.
NMR-Spektrometer: AMX 500 (500 MHz)	Brucker, Rheinstetten.
NMR-Spektrometer: DRX 600 (600 MHz)	Brucker, Rheinstetten.
NMR-Spektrometer: DRX 750 (750 MHz)	Brucker, Rheinstetten.
Spektralphotometer UV/ VIS Lambda 5	Perkin-Elmer, Überlingen.
Ultrazentrifuge	Kontron Instruments,
Waage	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz.
Zentrifuge Avanti J-30 I	Beckmann, Heidelberg.
Zentrifuge 3K15	Sigma,
Zentrifuge Mikrofuge R	Beckmann, Heidelberg.
Zentrifuge 5414	Eppendorf, Leipzig.
Cell disrupter; French Press	BioTechnology Resource Center, University of Minnesota, USA.
Neubauer Zellkammer	Nunc, Wiesbaden.
Mikroskop	Olympus, New York, USA.
Schüttler	Infors, Bottmingen, CH
Rotoren	Kontron, Ergolding

6.5. Softwareanwendungen für die Proteinstrukturberechnung und makromolekulare Strukturanalyse

XWINNMR 2.5	Brucker, Rheinstetten.
Sparky 3	Goddard <i>et al.</i> , 2000.
X-PLOR 3.851	Brünger, 1992.
CNS_solve 1.1	Brünger, 1995.
MOLMOL	Koradi <i>et al.</i> , 1995.
Swiss-PdbViewer 3.7	Guex & Peitsch, 1997.
Suppose	Smith, 2002.
Molscript	Bacon, D. J., 1988.
Rasmol 2.7	Bernstein, 1998-2001.
3D-Dock 2.0	Moont <i>et al.</i> , 2001.
TALOS	Cornilescu <i>et al.</i> , 2002.

6.6. Angewandte zellbiologische und biochemische Methoden

In diesem Kapitel werden die Methoden beschrieben, die für die Durchführung aller Laborarbeiten benötigt wurden. Sie erfolgten größtenteils sowohl nach etablierten und protokollierten Arbeiten von M-Taubenberger & Mintert²² als auch durch Verwendung von Anleitungen aus den Laborbüchern von Sambrook *et al.* (1989).

6.6.1. Zellbiologische Methoden

6.6.1.1. Sporengewinnung und Konservierung von *D. discoideum* Zellen

Axenisch gewachsene, zweimal mit kaltem sterilem Soerensen-Phosphatpuffer gewaschene *D. discoideum*-Zellen werden in einer Dichte von $2,4 \times 10^7$ Zellen/ml in Phosphatpuffer resuspendiert und je 5,0 ml dieser Suspension auf Phosphatagarplatten pipettiert. Sobald die Zellsuspension in die Platten eingedrungen ist, wird der überstehende Phosphatpuffer vorsichtig abgegossen. Diese Platten werden ca. 30 Min unter sterilen Bedingungen abgetrocknet und schließlich zwei bis drei Tage bei 23 °C inkubiert, wodurch die Sporenbildung induziert wird. Diese Sporen enthalten Fruchtkörper, die mit Phosphatpuffer abgespült werden (5,0 ml pro Platte). Die Sporensuspension wird auf 10^7 Sporen/ml eingestellt, in 1,0 ml Aliquots im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

6.6.1.2. Anzucht von *D. discoideum* Zellen in Flüssigmedium

Die *D. discoideum* Zellen können aus Vorkulturen, Sporen oder SM-Platten in einem flüssigen Nährmedium angeimpft werden. Sie werden in der Regel bei 150 UpM und 21°C im AX2-Medium geschüttelt und je nach Mutationsart mit 7,5 µg/ml BlastocidinS und/oder 10 µg/ml G418 versetzt. Die Kulturen werden von *Klebsiella aerogenes* durch Zusatz von 1% Penicillin und Streptomycin befreit. Unter diesen Bedingungen beträgt die Generationszeit in 300 ml Schüttelkulturen zwischen 8 und 9 Stunden für AX2-Zellen und bis zu 10 Stunden für 4-1-Zellen. Anhaftenden Zellen auf Petrischalen bzw. Erlenmeyerkolben können weitgehend behandelt werden, in dem das flüssige Nährmedium zweimal die Woche geändert wird und bei 4°C und 110 UpM weiterhin geschüttelt werden. Dadurch entwickeln sich die meisten Sporen zu vegetativen Zellen. Während es für alle zellbiologi-

²² Ergebnisse nicht publiziert.

schen Untersuchungen die Zellen bis zu einer Dichte von maximal 5×10^6 Zellen/ml angezogen werden, hat sich die Dichte von 8×10^6 für proteinchemische Untersuchungen als sehr gut herauskristallisiert.

6.6.1.3. Entwicklung der vegetativen Zellen in Suspensionskultur

Die in Flüssigmedium gewachsene *D. discoideum*-Zellen werden, im Falle einer proteinchemischen Untersuchung, nach Erreichen von einer Zelldichte von 8×10^6 Zellen/ml bei 1500 UpM und 4°C 20 Min zentrifugiert, geerntet und zweimal mit kaltem sterilem Soeren-sen Phosphatpuffer gewaschen. Daraufhin werden die so behandelten Zellen auf einer Zelldichte von 10^7 Zellen/ml in Phosphatpuffer aufgenommen, bei 21°C und 150 UpM %, 5 Stunden geschüttelt.

6.6.1.4. Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wird in der Regel mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Gezählt wird unter einem Lichtmikroskop in einem genau definiertem Zählfeld. Unter Berücksichtigung der Anzahl der lebendigen Zellen²³ in den vier Eckquadraten des Zählfeldes wird die Zellkonzentration der Probe ermittelt. Sie ist durch das Verhältnis

$$X \times 10^4 \text{ Zellen/ml} \quad (11)$$

gegeben, wobei X der Anzahl der Zellen in einem Eckquadrat aus 16 kleiner Quadrate entspricht und 10^4 der Kammerfaktor ist.

²³ Die Zelldichte in einer Kultur wird durch die Anzahl der Zellen pro Volumeneinheit gegeben. Da der Anteil der lebendigen Zellen an der Gesamtzelldichte das Wachstumsverhalten der Zellen widerspiegelt, ist es durch die Bestimmung der Zelldichte möglich, das zeitabhängige Wachstumsverhalten der Zelle in einer Kultur zu verfolgen.

6.6.2. Biochemische Methoden

6.6.2.1. Isotopenmarkierung

Die Isotopenmarkierung mit ^{13}C und ^{15}N erfolgt in der Regel nach den üblichen Techniken von Muchmore et al. (1989) und Riesenberg et al. (1990) für die uniforme Markierung von Proteinproben, bzw. nach Senn et al. (1987) für ihre selektive Markierung. Die Probenlösungen werden wie folgt vorbereitet: Ein Klon der *E. coli* Zellen wird zur uniformen Isotopenanreicherung über 36 Stunden an ein Minimalmedium adaptiert, in dem 100 mg/l bis 800 mg/l der isotopenmarkierten Aminosäuren gelöst sind. Dabei wird eine 50 ml Übernachtskultur mit frischem Minimalmedium zu einem Endvolumen von 50 ml, 1:100 verdünnt. Nach weiteren 12 Stunden Inkubation werden 100 ml frisches Minimalmedium mit der Übernachtskultur angeimpft. Nach Überführen in 3-4 l frisches Medium wird bei 37°C und 200 rpm bei einer OD600 von 0,7-0,9 mit 1 mM IPTG induziert. Inkubiert wird dann bis zu einer OD600 von 1,5-2,0. Für die selektive Markierung wird aminosäurespezifisch verfahren. Das Minimalmedium wird hierfür mit einer der gewünschten Aminosäuren angereichert. Eine Hälfte der zu markierenden Aminosäuren wird außerdem erst bei der Induktion mit IPTG zu der Zellkultur hinzugefügt.

6.6.2.2. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) erlaubt es, Proteine in einem vernetzten Polyacrylamidgel in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol aufgrund ihrer Größe und ihres Molekulargewichts aufzutrennen. Dabei wird das β -Mercaptoethanol als reduzierendes Reagenz verwendet. Zusammen mit dem SDS und dem β -Mercaptoethanol werden die zu untersuchenden Proteine mindestens 10 Min bei 75°C bis 100°C erhitzt. Dieser Vorgang führt sowohl zum Aufbrechen der Disulfidbrücken als auch zur Bildung von negativ geladenen Mizellen zwischen Proteinen und SDS, die beim Anlegen eines elektrischen Feldes zur positiven Elektrode wandern.

Die Gele bestehen aus einem Trenngel (15 x 11 x 0,1 cm) mit konstanter n-%iger Polyacrylamid-Konzentration (je nach Größe der zu untersuchenden Proteinefragmente) und einem 3-%igen Sammelgel.

Trenngel (n %)

Acrylamid	n % (w/v)
Methylenbisacrylamid	(n/37) % (w/v)
APS	0,05 % (w/v)
TEMED	0,04 % (v/v)
EDTA	10,0 mM
Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS	375 mM

Sammelgel (3%)

Acrylamid	3,0 % (w/v)
EDTA	10,0 mM
APS	0,03 % (w/v)
TEMED	0,05 % (v/v)
Tris/HCl, pH 6,8; 1,0 % SDS	0,5 M

Die Proteinlösungen und die Proteinpellets werden mit ½ Volumen bzw. 200 µl 3 x SDS-Probenpuffer verستetzt und 15 Min bei 100°C gekocht. Zur Elektrophorese werden jeweils 15 µl vorgefärbter Proteingrößenmarker als Referenz und die Proteinproben aufgetragen und bei 150 V für ca. 3 Stunden in 1 x Laufpuffer getrennt. Sie durchwandern das Gel abhängig von ihrer Größe. Die Gele werden mit Coomassie-Balu gefärbt.

3 x SDS-Probenpuffer

Tris/HCl (pH 6,8)	200 mM
Glycerin	12,0 %
SDS	6,7 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	6,0 % (v/v)
Bromphenolblau	ca. 10,0 mg/l

10 x Elektrophoreselaufpuffer

Tris-Base	250 mM
Glycin	1,9 M
SDS	1,0 % (w/v)

6.6.2.3. Coomassie Blau-Färbung von Proteinen

Am Ende der Elektrophorese werden die SDS-Gele für 15-30 Min mit Coomassie-Blau-Lösung angefärbt und anschließend in Entfärbelösung geschüttelt. Sie erscheinen in verschiedenen Zonen des Gels, wo ihre jeweiligen Molekulargewichte unter Berücksichtigung der Markerbanden ermittelt werden können.

SDS-PAGE-Gelfärbelösung (filtriert)

Coomassie Brilliant Blau R 250	0,1 %
Methanol	50,0 %
Essigsäure	7,0 %
Essigsäure	12,0 %

Entfärberlösung (filtriert)

Ethanol	5,0 %
Essigsäure	10 %

6.6.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen kann biochemisch durch Anwendung des Bradford-Tests (1976) ermittelt werden. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine durch eine Farbstoff-Einlagerung kolorimetrisch nachgewiesen. Der Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird mit Hilfe eines Reagenz durchgeführt, welches den Farbstoff Coomassie-Brillantblau G250 enthält. Dieses Bradford-Reagenz wird in der Regel mit H₂O verdünnt verwendet und erfährt in Gegenwart von Proteinen einen Farbwechsel von rotbraun nach Blau. Die Proteinmenge wird mit Hilfe eines Spektrophotometers durch Messung der Transmission bei einer Wellenlänge $\lambda = 595 \text{ nm}$ ermittelt. Demzufolge wird für die Messung das Spektrophotometer bei $A_{595} = 0$ kalibriert. Eine Ermittlung der Konzentration wird dann durch einen Vergleich der Absorption der unbekannt Proteinkonzentrationen mit einem Protein-Standard möglich. In der Regel wird eine Eichkurve erstellt, bei der die Absorption der bekannten Proteine (z.B. Albumin) gegen entsprechende Konzentrationen aufgetragen ist.

6.6.2.5. Trennung aufgrund molekularer Größe**1.) Dialyse**

Bei einer Dialyse werden Proteine von kleineren Molekülen über eine semipermeable Membran getrennt. Zu diesem Zweck werden Proteinlösungen in einen Cellophan-schlauch mit einer bestimmten Porengröße gefüllt und diese in 100-faches Volumen von geeigneten Puffer-Lösungen eingetaucht. Die Auswahl der Porengröße des Schlauches richtet sich nach dem Molekulargewicht Proteins. Der „cut-off“, d.h. die Abschnittgröße des verwendeten Schlauches beträgt deshalb bei allen Dialysevorgängen die Hälfte des Molekulargewichts desjenigen Proteins, welches die Pore nicht durchlaufen soll. Dadurch können selektiv Wasser- und Salzmoleküle sowie kleinere Proteine durch die Poren des Cellophan-schlauches diffundieren.

2.) Gelfiltration

Die Gelfiltration kann sowohl zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen als auch zur Trennung von Proteinmischungen verwendet werden. Hierfür werden Säulen aus unlöslichen, aber stark hydratisierten Kohlenhydratpolymeren in Form poröser Perlen verwendet. Während kleinere Moleküle in die Poren der Polymeren eindringen können, bewegen sich die größeren Moleküle dazwischen. Somit wird die Fließgeschwindigkeit größerer Moleküle durch die Säule größer und die der kleinen geringer. Die zu untersuchenden Proteine können nach Vergleich ihrer jeweiligen Molekulargewichte mit dem eines Proteinstandards mit bekannter Größe identifiziert werden.

6.6.2.6. Trennung auf Basis der Molekülladung: Ionenaustauschchromatographie

Ionenaustauschersäulen bestehen aus unlöslichen Ionenaustauscherharzen, die entweder polyanionische oder polykationische Gruppen tragen. Diese Gruppen werden durch ionische Interaktionen an Proteine gebunden, können aber auch vom Austauscher durch Verwendung bestimmter Salzen gelöst werden. Bei der Ionenaustauschchromatographie wird die pH-abhängige Bindungsfestigkeit einzelner Proteine genutzt, um Proteinmischungen voneinander zu trennen. Berücksichtigt wird hierfür unter anderem die Anzahl der Gruppen, die zur Verfügung stehen, um dadurch die Qualität der einzelnen Bindungen zu optimieren. Das vollständige Eluieren der Proteine von der Säule erfolgt in der Regel mit Salz-Gradienten, bevorzugt linear von 10 mM bis 500 mM bei einem geeigneten pH-Wert. Dabei können schwach gebundene von den anderen, fester gebundenen Proteinen, getrennt werden. Proteinfraktionen werden dann entsprechend des Reinheitsgrades gesammelt und gegen einen Endpuffer der entsprechenden Salzkonzentrationen dialysiert und für weitere Zwecke konzentriert und gelagert.

7. Strukturaufklärung der amino-terminalen Domäne des *D. discoideum* CAP-Proteins (CAP-N)

7.1. Vorbereitung der Proteinprobenlösungen

Die Proteinprobenlösungen der amino-terminalen Konstrukte von CAP wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schleicher an der medizinischen Fakultät der LMU München vorbereitet.

Die Plasmid-DNAs, CAP'Px und CAP151-678, wurden für die Kodierung der amino-terminalen CAP-Konstrukte, M1-T226 mit His-tag und S51-T226, verwendet. Beide DNAs wurden in dem Expressionsvektor pT7-7 mit den Enzymschnittstellen *NdeI* und *BamHI* kloniert und anschließend für die Expression beider Proteinfragmente in dem *E. coli* –Bakterienstamm BL21 transformiert. Eine Proteinexpression fand nach einer Induktion mit 0.5 mM IPTG jeweils bei 30°C und 37°C bei einer OD₆₀₀ (Optische Zelldichte bei $\lambda = 600$ nm) von 0.6-0.8 statt. Gereinigt wurde erst nach Abzentrifugieren des Zelllysats bei $100000 \times g$, durch Verwendung einer Anionenaustauschersäule vom Typ DE52, einer Kationenaustauschersäule vom Typ P11 (Phosphocellulose) der Firma Whatman, einer Hydroxyapaptitsäule von Bio-Rad und schließlich einer Ni-NTA von Qiagen als Affinitätssäule für den His-tag am M1-T226 Konstrukt. Alle Reinigungsschritte erfolgten nach bereits etablierten Reinigungsprotokollen. Die daraus gewonnenen Proteinproben konnten dann mit Hilfe einer Amicon Membran mit Porengröße 10, gemäß des Molekulargewichtes beider Proteinkonstrukte einkonzentriert werden.

Folgende Proben dienten der Durchführung der NMR-Experimente: ¹⁵N einfach markierte und ¹⁵N-¹³C doppelmarkierte Proteinlösungen, ¹⁵N-Ala, ¹⁵N-Phe, ¹⁵N-Gly, ¹⁵N-Ile, ¹⁵N-Lys, ¹⁵N-Leu, ¹⁵N-Val, und ¹⁵N-Gly/¹⁵N-Ser spezifisch markiert sowie einfach protonierte Lösungen bei Konzentrationen von 0.8 bis 1.2 mM im Phosphatpuffer bei pH 6.8 - 7.3. Alle Proben wurden für die Aufnahme der Experimente mit 10% D₂O versetzt.

7.2. Die NMR-Experimente

Die ^1H -NMR Spektren der amino-terminalen Konstrukte von CAP, **1-226** mit His-tag und **51-226**²⁴, wurden bei einer Temperatur von 300 K sowohl am Bruker DRX 600 und am DMX 750 Spektrometers gemessen. Das Konstrukt **1-226** mit His-tag war im Vergleich zum **51-226**-Konstrukt instabil und wies sehr stark verbreitete Signale sowie eine hohe Signalüberlagerung auf, selbst bei mehrdimensionalen Spektren. So eignete sich das Konstrukt **51-226** besser für die sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen im CAP-Protein, während das Konstrukt **1-226** der Untersuchung der Dynamik von CAP diene.

Alle 2D-NOESY-Experimente, die der Zuordnung der Resonanzen im CAP Protein dienten bei den Mischzeiten $\tau_m = 120$ ms, 40 ms und 20 ms aufgenommen und die TOCSY Experimente dagegen bei den Mischzeit $\tau_m = 30$ ms und $\tau_m = 50$ ms. Da in den TOCSY-Spektren Kopplungen über längere Bindungen als auch über kürzere Bindungen erfasst werden können, bestand die Möglichkeit, jede Aminosäure eindeutig zu identifizieren aufgrund sichtbaren typischen Signalmustern: Die Spinsysteme. Die Spektren mit kürzeren Mischzeiten dienten dazu, die Kreuzsignale aus den Kreuzrelaxationen zweier Protonen (engl: Spindiffusion) zu unterscheiden. Sowohl die 2D-NOESY- als auch die 2D-TOCSY-Experimenten wurden in H_2O aufgenommen und später nach einem Lösungsmittelaustausch auch in D_2O . Für den Lösungsmittelaustausch wurde eine D_2O -Lösung mit 99.99% Reinheitsgrad verwendet. Zusätzlich zu den 2D- ^1H -NOESY-Experimente wurden sowohl ^{15}N -HSQC und ^{13}C -HSQC- als auch 3D- ^{15}N - NOESY-HSQC- und 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC-Experimente durchgeführt. Die Mischzeiten $\tau_m = 120$ ms und 40 ms für das 3D- ^{15}N - NOESY-HSQC und $\tau_m = 50$ ms für das 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC haben sich für den Erhalt von qualitativ hohen Spektren beim CAP-Protein als besonders gut bewährt. Als 3D-TOCSY-Anwendung, zur Zuordnung von Spinsystemen im CAP-Protein, wurde vorzugsweise ein HCCH-TOCSY-Spektrum verwendet. Des Weiteren dienten die folgenden heteronuklearen Tripel-Resonanz-Experimente für die Zuordnung der Signale des Protein-Rückgrates von CAP: die HNCA, CBCA(CO)NH, HNCO für die Identifizierung von Stickstoff- und Kohlenstoffkorrelationen.

²⁴ Bei der Nummerierung der Primärsequenz des kleinen Konstruktes entspricht S1, S51 (Vgl. unten).

7.3. Sequenzspezifische Zuordnung der NMR-Resonanzen im CAP

Einer der entscheidenden Prozesse bei der Strukturaufklärung von Proteinen in Lösung ist die Zuordnung von detektierten Korrelationssignalen in mehrdimensionalen NMR Spektren. Die Zuordnung der Korrelationssignalen im CAP-Protein erfolgte mit dem Programm Sparky (Goddard et al., 2000). Ziel dieser Zuordnung war es, alle Resonanzen von Protonen, Kohlenstoff- und Stickstoffkernen der Aminosäurenreste von CAP zu identifizieren, um Randbedingungen für eine anschließende Strukturberechnung zu erhalten. Dabei wurde eine Strategie angewandt, welche im Grunde vom Molekulargewicht des zu untersuchenden CAP-Konstruktes (**S51-T226**) sehr stark abhängt. Das aminoterminal CAP-Konstrukt **S51-T226** beträgt 20 kDa bei 176 Aminosäurenresten. Die sequenzspezifische Zuordnung der NMR-Resonanzen im CAP-Protein begann also, gemäß der Strukturaufklärung für große Proteine (> 100 AS), in erster Linie mit der Identifizierung von jedem Aminosäuretyp im 2D-HSQC-Spektrum einer ^{15}N uniform markierten Probe. Dies erfolgt, wie bereits erläutert, durch Überlagerung der Spektren von selektiv markierten Proben auf das ^{15}N -HSQC-Spektrum der uniform markierten Probe als Referenzspektrum. Die Resonanzen der Amidprotonen werden somit im ^{15}N -HSQC-Spektrum Schritt für Schritt nach dem Aminosäuretyp zugeordnet, bevor eine Berücksichtigung entsprechend ihrer sequenziellen Beziehung in der folgenden Primärstruktur erfolgt.

```

1  SVKEFQNLVD QHITPFVALS KKLAPEVGNQ VEQLVKAIDA EKALINTASQ
51  SKKPSQETLL ELIKPLNNFA AEVGKIRDSN RSSKFFNNLS AISESIGFLS
101 WVVVEPTPGP HVAEMRGSÆ FYTNRILKEF KGVNQDQVDW VSNYVNFLKD
151 LEKYIKQYHT TGLTWNPKGG DAKSAT

```

Am leichtesten gelingt es in der Reihenfolge, ^{15}N -Gly-, ^{15}N -Gly/Ser-, ^{15}N -Ala-, ^{15}N -Val, ^{15}N -Ile, ^{15}N -Leu, ^{15}N -Lys und schließlich ^{15}N -Phe (Abbildungen 5.1 und 5.2).

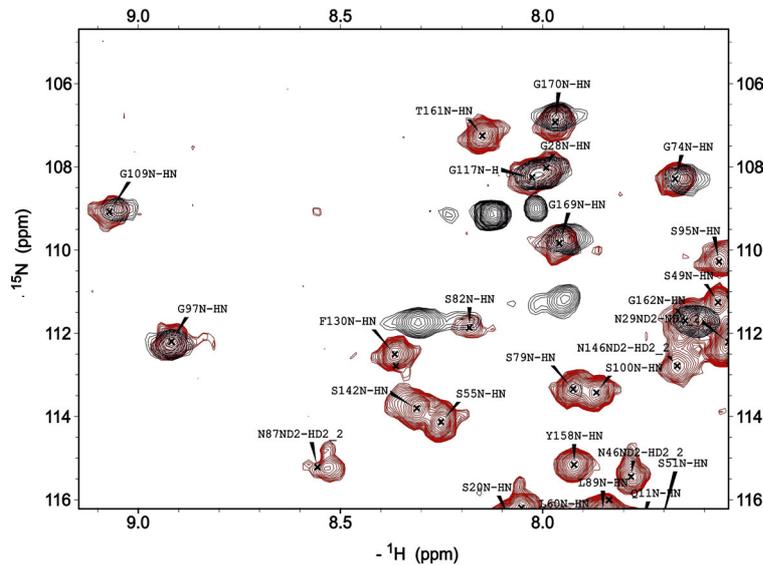


Abbildung 7.1

Identifizierung von Glycinen im 2D ^{15}N -HSQC-Spektrum von CAP.

Gezeigt wird hier eine Überlagerung zwischen dem 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum einer ^{15}N -Glycin-markierten Probe des CAP-Konstrukts 1-226 (dunkel) und dem ^{15}N -HSQC-Spektrum einer ^{15}N -uniform markierten Probe des CAP-Konstruktes 51-226 (rot). Hiermit lassen sich die Protonen- und Stickstoffverschiebungen der Glycinen im CAP zuordnen.

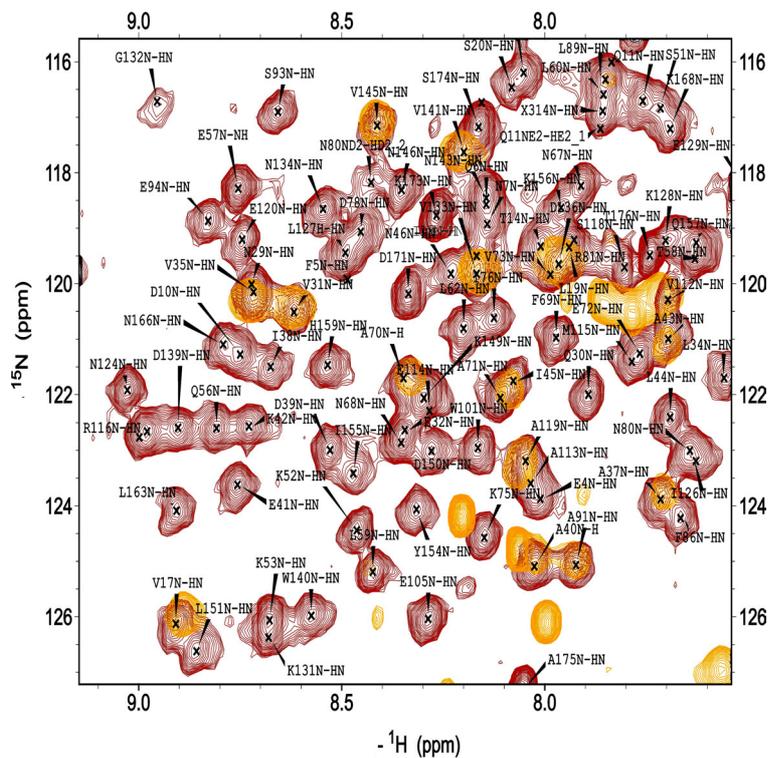


Abbildung 7.2

Identifizierung von Valinen im 2D ^{15}N -HSQC-Spektrum von CAP.

Überlagert wird hier das 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum einer ^{15}N -Valin-markierten Probe des CAP-Konstruktes 1-226 (gold) auf das ^{15}N -HSQC-Spektrum einer ^{15}N -uniform markierten Probe des CAP-Konstruktes 51-226 (rot), um die Protonen- und Stickstoffverschiebungen der Valinen zuordnen zu können. Die Zuordnung nach dem Aminosäuretyp mit Hilfe der Spektren von selektiv-markierten Proben ist grundlegend für die Signalzuordnung der Spektren von größeren Proteinen.

Die Protonen- und Stickstoffverschiebungen der Aminosäurereste wurden aus den ^{15}N -HSQC-Spektren in die 3D-Spektren übertragen, um die sequenzspezifische Zuordnung in den 3D-HSQC-Spektren zu ermöglichen. Die Zuordnung der interresidualen Korrelationen fand später sowohl im 3D- ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektrum als auch in den 3D-HNCA und CBCA(CO)NH Spektren statt. Verwendet wurden dabei so genannten Strips, die Abschnitte in den Spektrenebenen darstellen. Diese Strips sind Streifen, auf denen die Resonanzen aus Kreuzkorrelationen von Protonen abgebildet sind. Sie erlaubten es, die Verschiebungen der $^{\text{N}}\text{H}$ -Protonen, der C^{α} -, C^{β} - und N-Kerne besser zu veranschaulichen. Durch das Nebeneinanderlegen der Strips war es möglich, Nachbarschaftskorrelationen zwischen den Protonen herauszufinden. Im Laufe dieser Zuordnung konnten schließlich Signalgruppenpaare zu Ketten zusammengefügt werden, wobei auf bestimmten Kombinationen in der Primärsequenz geachtet wurde. Eine Schematisierung dieses Prozesses ist in den Abbildungen 5.3 und 5.4 zu finden.

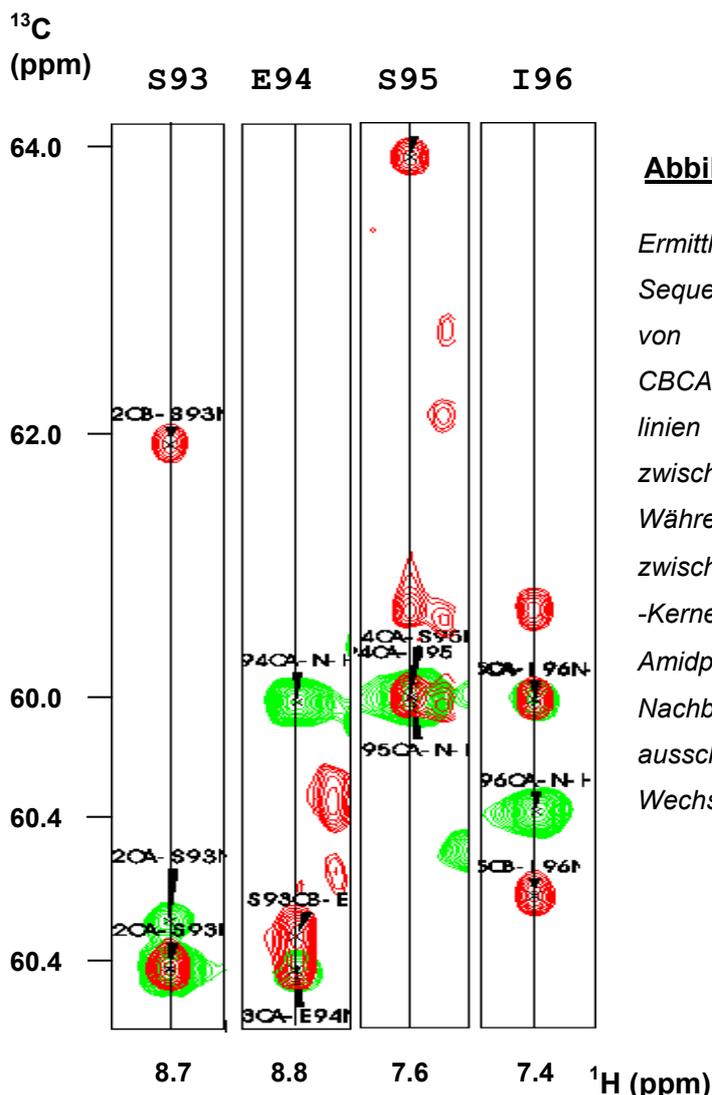


Abbildung 7.3

Ermittlung der Nachbarschaftskorrelationen im Sequenzabschnitt S93 bis S95 der Primärstruktur von CAP aus den HNCA (grün) und CBCA(CO)NH (pink) Spektren. Die Verbindungslinien spiegeln die Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den Atomen im Proteinerückgrat wieder. Während im HNCA-Spektrum Korrelationen zwischen dem intraresidualen Amidproton und C^{α} -Kernen einer Aminosäure und die dieses Amidprotons mit dem C^{α} -Kern seines direkten Nachbarn ersichtlich sind, sind im CBCA(CO)NH ausschließlich Korrelationen aus interresidualen Wechselwirkungen zu finden.

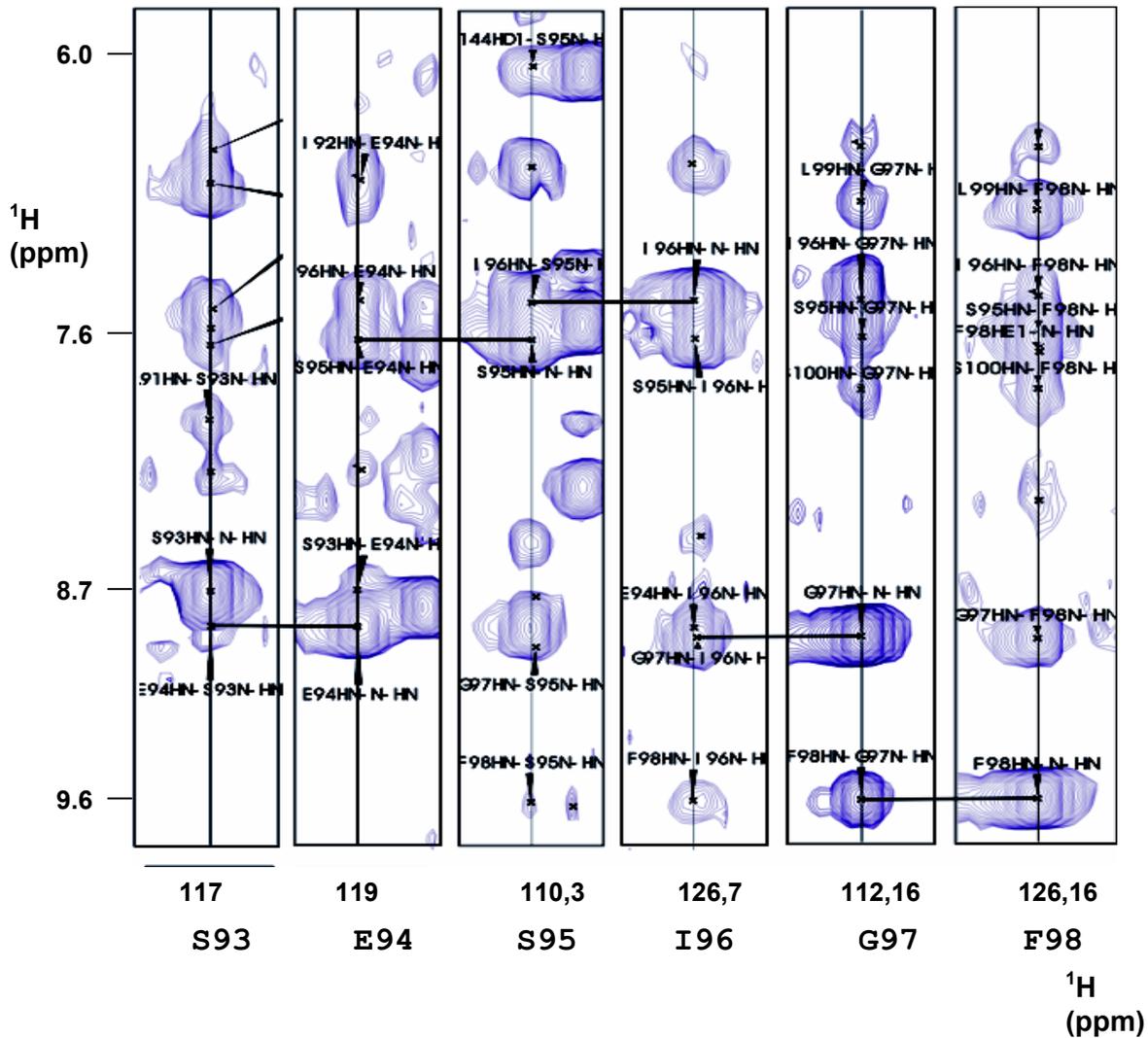


Abbildung 7.4: Ermittlung der Nachbarschaftskorrelationen im Sequenzabschnitt S93 bis F98 der Primärstruktur von CAP aus der $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^1\text{H}^{\text{N}}$ -Region des $3\text{D-}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrums.

Ersichtlich sind hier die Resonanzen der Aminosäurenreste S93, E94, S95, I96, G97 und F98 in Form von Streifen, die Abschnitte aus dem $3\text{D-}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum darstellen. Die Verbindungslinie zwischen den Streifen reflektiert hier Nachbarschaftsbeziehungen zwischen zwei Aminosäuren. Eine Korrelation zwischen zwei benachbarten Resten wird durch ein Kreuzsignal auf ihren jeweiligen Streifen gekennzeichnet. Diese Kreuzsignale haben in der Regel die gleiche Form und Größe und weisen die Verschiebung der betroffenen Nachbarn auf.

Die Sicherheit der sequenziellen Zuordnung stieg mit der wachsenden Anzahl der Kreuzkorrelationen von Protonen, da die Wahrscheinlichkeit zufälliger Frequenzentartung²⁵ mit der Länge der Kette weiter sank. Für manche Kreuzsignale war eine solche Zuordnung jedoch sehr ungenau oder manchmal sogar unmöglich. Dies war bei den

²⁵ Widersprüchliche Frequenzen.

Aminosäuren Ser 1 bis Lys 3 der Fall, die aufgrund ihrer Stellung in der Primärsequenz vermutlich flexible Reste kennzeichnen. Am Ende konnten die Resonanzen des Proteinerückgrates bis zu 90 % identifiziert werden.

Unmittelbar nach der sequenziellen Zuordnung der Resonanzen im CAP erfolgte die Auswertung der 2D-TOCSY-, 3D-HCCH-TOCSY-Spektren sowie des ^{13}C -NOESY-HSQC, die Informationen über die Spinsysteme der Aminosäuren beinhalten. Eine Zuordnung der Aminosäurenspinsysteme diente dazu, die Resonanzen der Kohlenstoffseitenketten und der Amidseitenketten zu identifizieren. Dabei konnten intraresiduale Kreuzkorrelationen von den interresidualen unterschieden werden (Abbildung 5.5).

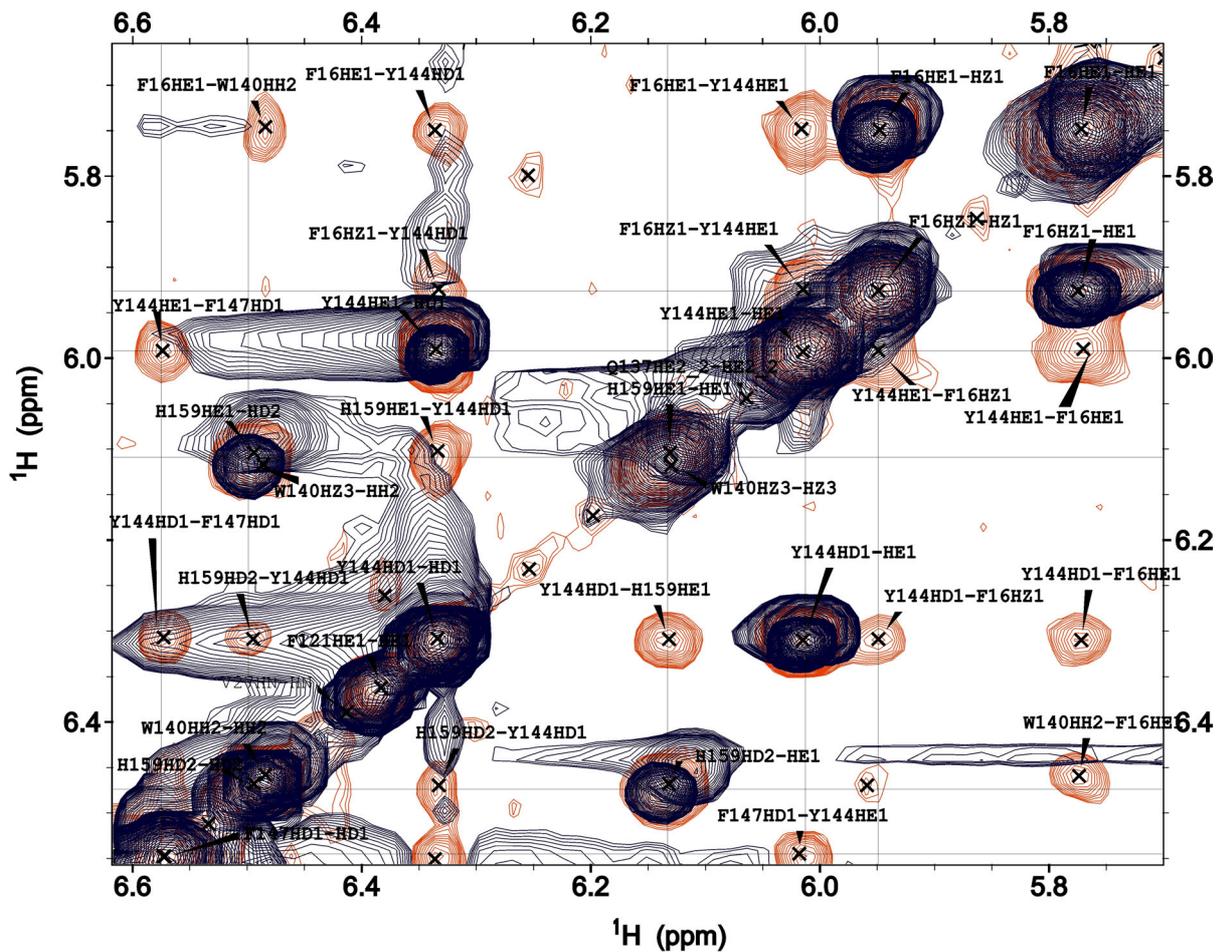


Abbildung 7.5 Abschnitt eines $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}\text{-NOESY}$ -Spektrums (rot) in D_2O^{26} und $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}\text{-TOCSY}$ -Spektrum (dunkel) in H_2O^{27} von CAP, aufeinander gelegt.

Veranschaulicht sind hier Resonanzsignale der Protonen von aromatischen Seitenketten. Eine Unterscheidung zwischen interresidualen und intraresidualen Kreuzsignalen ist in der Regel möglich, wenn sich Signale derselben Art sowohl im NOESY- als auch im TOCSY-Spektrum finden. Ziel dieser Spektrenüberlagerung ist es deshalb, deckungsgleiche Korrelationssignale von den isolierten Signalen auseinander zuhalten und zuzuordnen. Als interresiduale Signale oder NOE-Signale werden nur solche Kreuzsignale identifiziert, die beim Aufeinanderlegen der Spektren isoliert sind. Die mit den TOCSY- gedeckten NOESY-Signale sind dann als intraresidualen anzusehen, da sich in den TOCSY-Spektren ausschließlich Signale aus intraresidualen Kreuzkorrelationen identifizieren lassen.

²⁶ Gemeint ist hier, dass das D_2O bei der Spektrenaufnahme als Lösungsmittel dient. Dies wird durch einen Lösungsmittelaustausch zwischen D_2O und Wasser erreicht, um Protonen, welche zu Signalüberlagerung beitragen zu unterdrücken (s. unten).

²⁷ H_2O stellt das Lösungsmittel bei der Spektrenaufnahme dar.

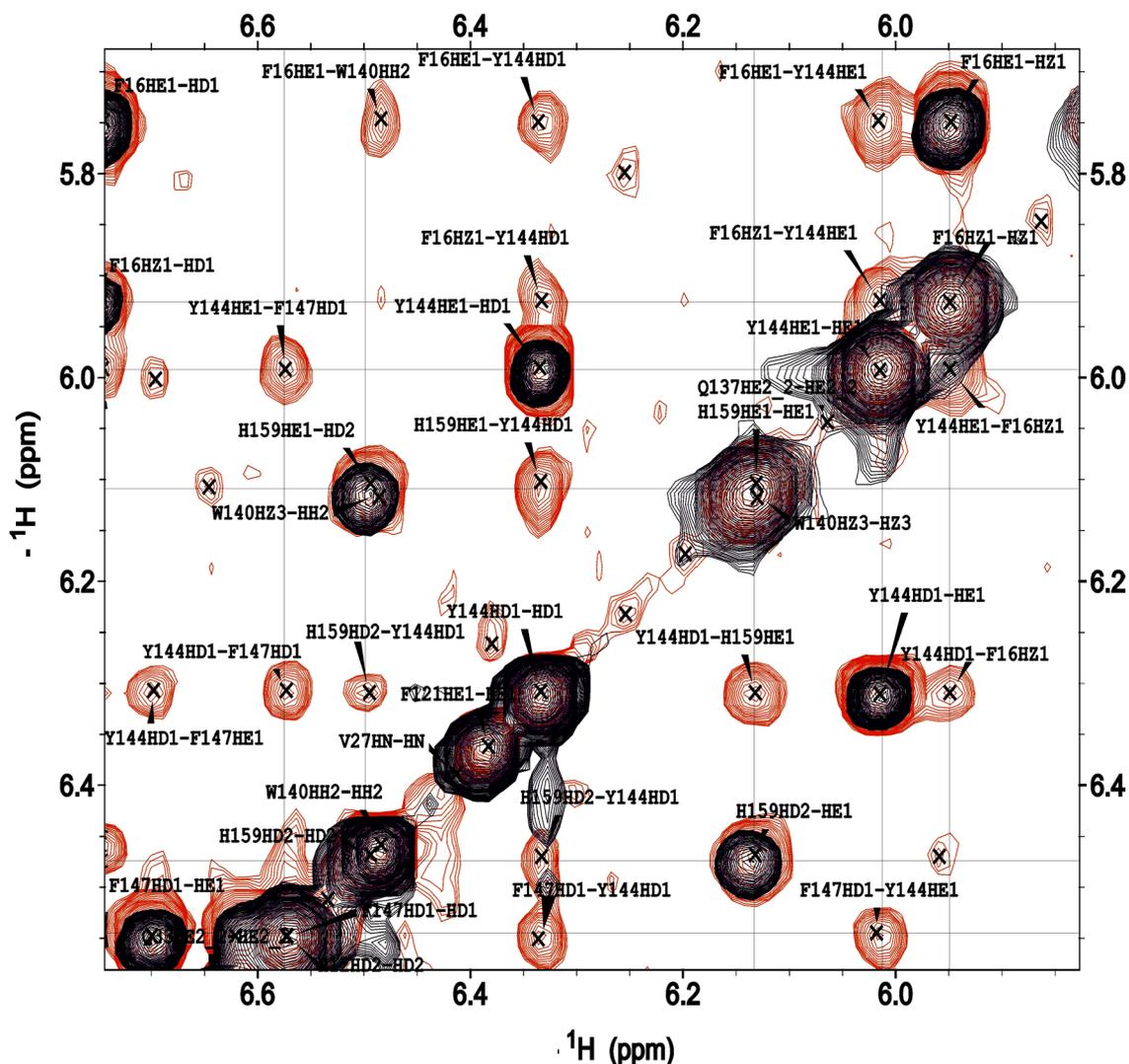


Abbildung 7.6 Abschnitt eines $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}\text{-NOESY}$ -Spektrums in D_2O (rot) und $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}\text{-TOCSY}$ -Spektrum in D_2O (dunkel), aufeinander gelegt. Region der aromatischen Seitenketten.

In den NOESY- bzw. TOCSY-Spektren in D_2O finden sich nur Signale von Protonen, die zum Austausch mit H_2O als Lösungsmittel²⁸ nicht fähig sind und somit zur Lösung des Signalüberlappungsproblems bei großen Proteinen großteils beitragen. Der Hauptvorteil von derartigen Spektren liegt in der Identifizierung von Signalen, welche durch die Wasserlinie²⁹ bei Spektren in H_2O stark unterdrückt werden, da sie nahezu die gleichen Resonanzfrequenzen bei 4.5 bis 4.7 ppm wie H_2O aufweisen. Die NOESY- und TOCSY-Spektren in D_2O werden im Allgemeinen bei der sequenzspezifischen Signalzuordnung von Proteinen herangezogen, um Signale der Seitenketten von besonders polaren Aminosäuren wie Histidine und Argininen zu identifizieren.

²⁸ Säure-Base-Gleichgewicht mit aziden Protonen oder Wasserstoffbrückenbindungen.

²⁹ Vgl. Anhang über 1D-Spektrum von CAP in H_2O .

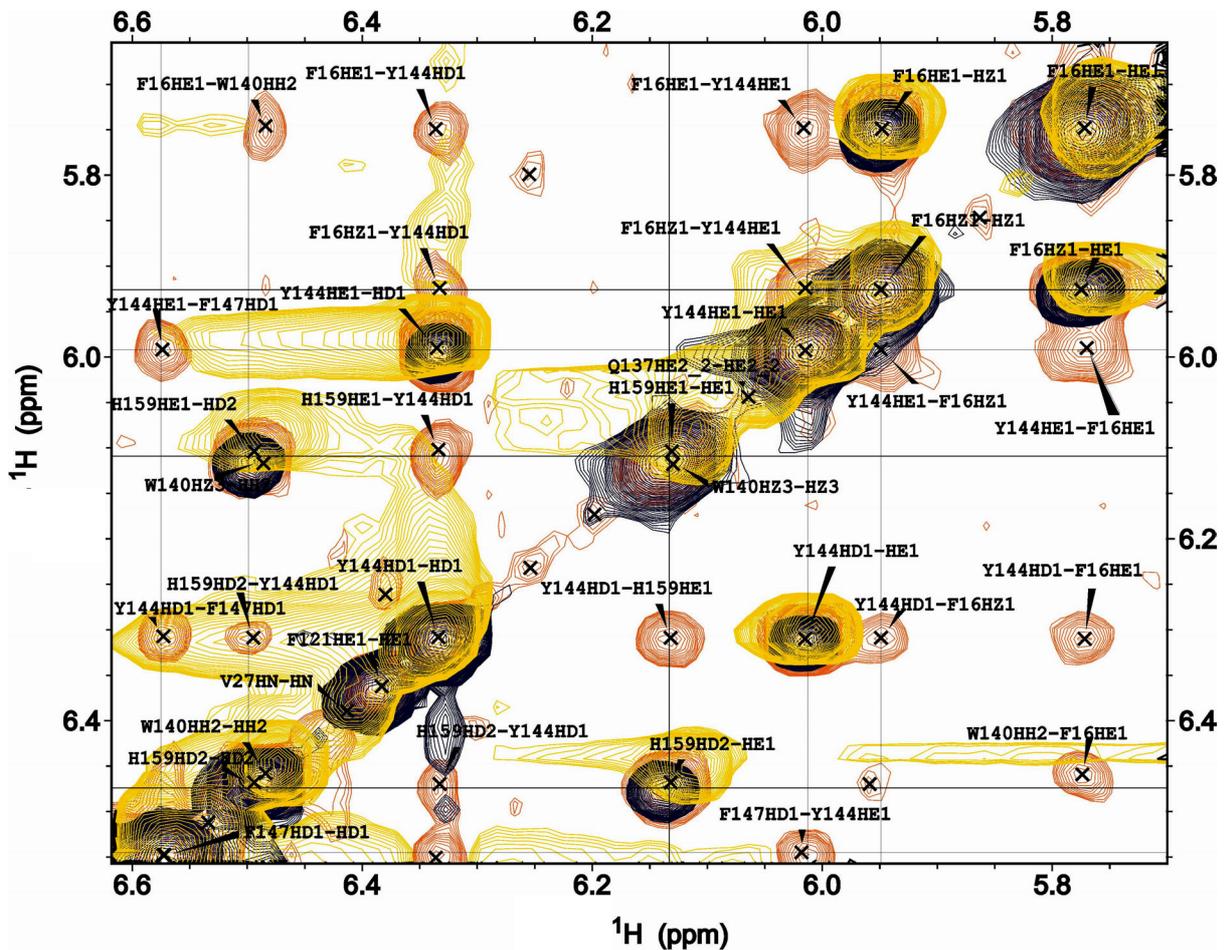


Abbildung 7.7 Überlagerung eines 2D- ^1H - ^1H -NOESY-Spektrums in D_2O (rot) mit den 2D- ^1H - ^1H -TOCSY-Spektren in D_2O (dunkel) und in H_2O (gold). Region der aromatischen Seitenketten. Wie bereits erläutert, tragen die Spektren in D_2O zur Verringerung der Signalüberlappung bei. Aufgrund einer erheblichen Signalüberlagerung lassen die Signale im Bereich zwischen 6.2 und 6.6 ppm im TOCSY-Spektrum in H_2O kaum identifizieren. Erst beim Überlagern der Spektren in H_2O und D_2O ist eine Identifizierung möglich.

Die Kreuzsignale aus Kern-Overhauser-Effekten geben die Stärke der Konnektivität zwischen Aminosäureresten durch den Raum wieder. In der Tabelle A.1, in Anhang A, sind die ^1H , ^{15}N , ^{13}C , Verschiebungen aufgelistet, welche im CAP die intraresidualen Korrelationen reflektieren. Diese Tabelle wurde in der „BioMagResBank“ Datenbank unter der Nummer 5393 hinterlegt. In der Abbildung 5.8 und 5.9 sind die ^{15}N -HSQC- und ^{13}C -HSQC Spektren mit den $^1\text{H}^{\text{N}}$ - und $^1\text{H}^{\alpha}$ -, $^1\text{H}^{\beta}$ -, $^1\text{H}^{\gamma}$ -, $^1\text{H}^{\delta}$ -Resonanzen aller Aminosäuren entsprechend der Nummerierung in der Primärsequenz dargestellt.

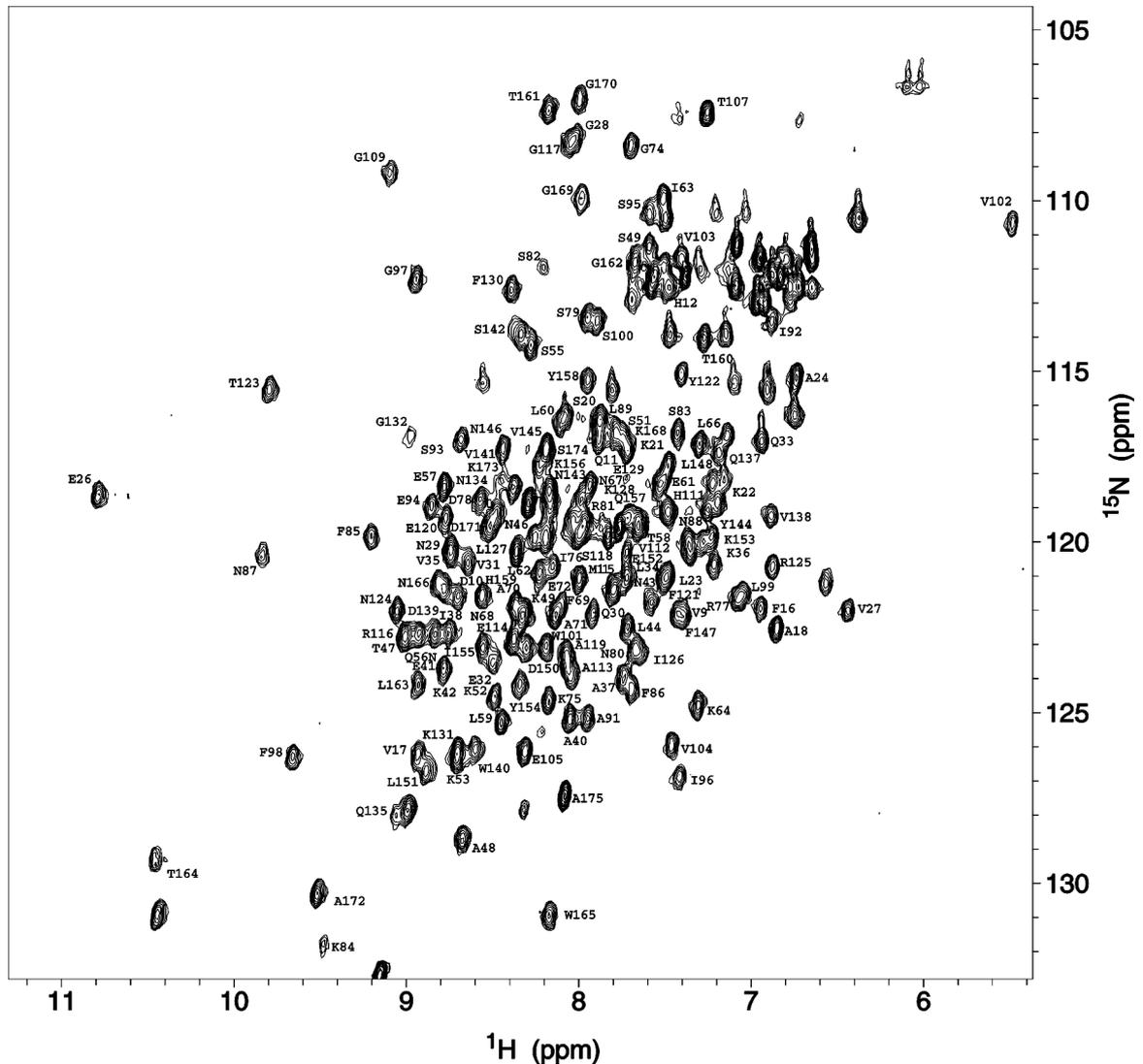


Abbildung 7.8 $2D$ - ^{15}N -HSQC-Spektrum von CAP.

Zu finden sind hier Resonanzfrequenzen der Amidprotonen des Proteinrückgrates und die der Amid-Seitenketten. Eine Signaluordnung erfolgte bis zu 95% durch die Identifizierung von Amidprotonenresonanzen der Aminosäuren von CAP. Nicht charakterisierbar waren jedoch die Protonen, deren zugehörige Aminosäuren sich in den flexiblen Bereichen des Proteins befanden wie beispielsweise die am Anfang der N-terminalen Regionen.

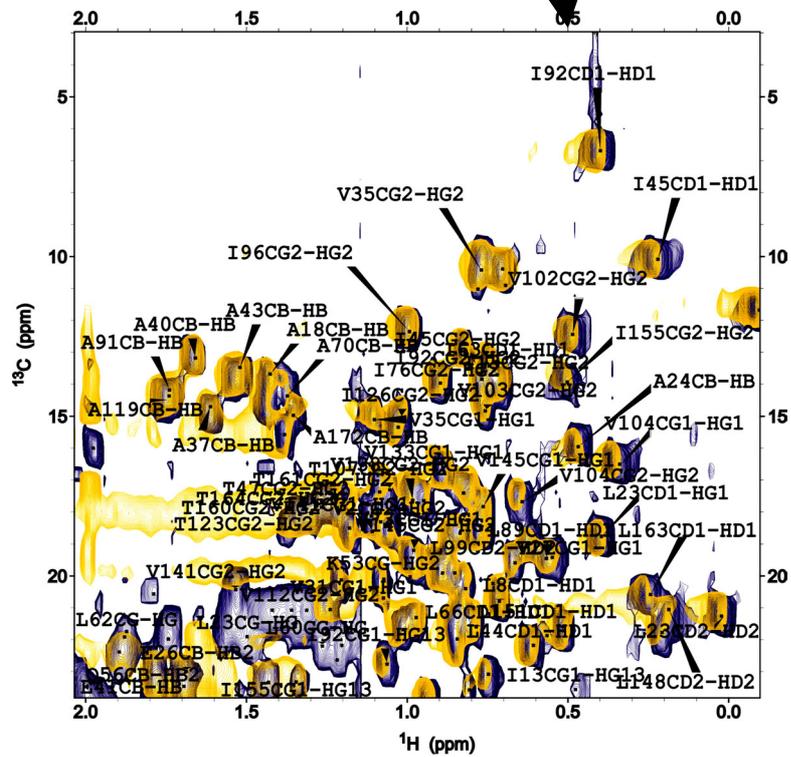
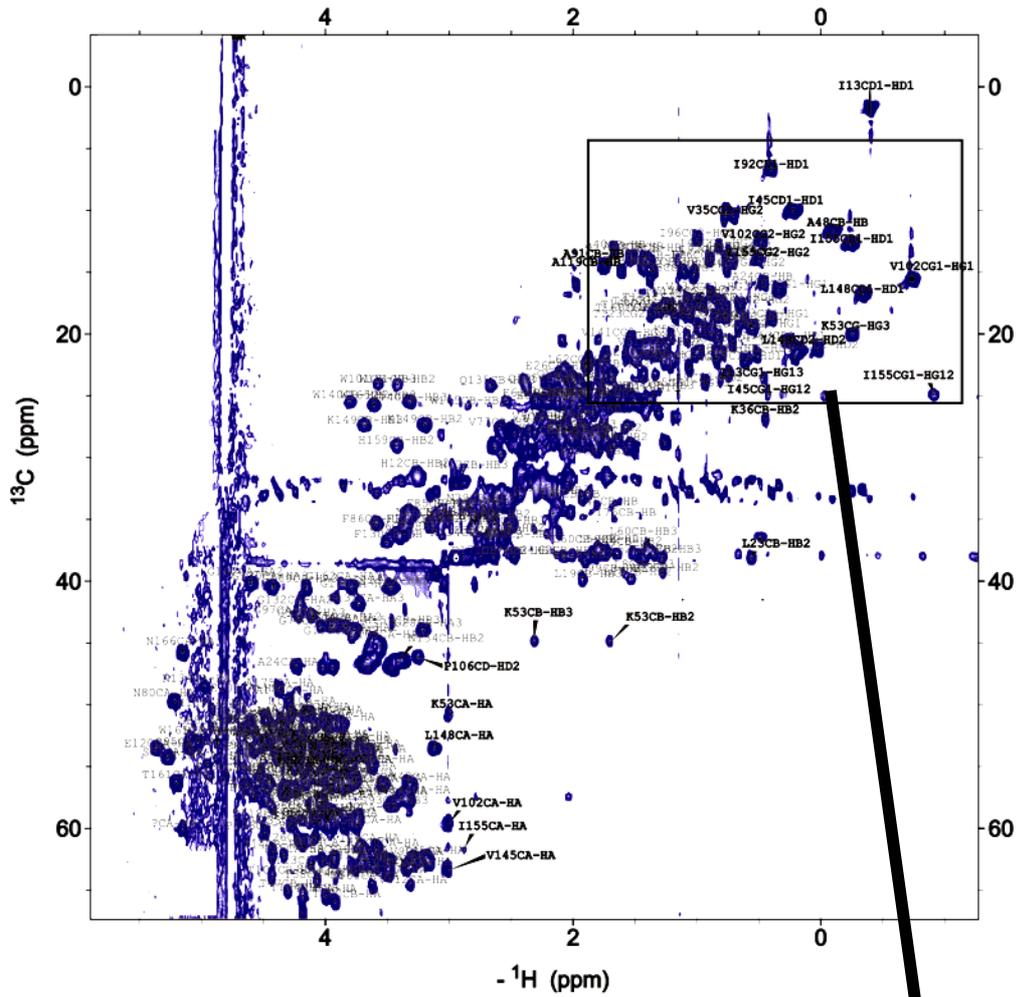


Abbildung 7.9: 2D- ^{13}C -HSQC-Spektrum von CAP (dunkelblau). Ausschnittvergrößerung der ^1H -Region des 2D- ^{13}C -HSQC-Spektrum und 2D-Projektion der ^{13}C - ^1H -Ebenen eines 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC (gold) aufeinander gelegt.

Im 2D- ^{13}C -HSQC-Spektrum können Protonen der Kohlenstoffseitenkette identifiziert werden, welche sich in der ^1H -aliphatischen Region eines NOESY- bzw. TOCSY-Spektrums im Bereich zwischen -2 und +5 ppm befinden. Das 3D- ^{13}C -NOESY-HSQC wird in der Regel herangezogen, um derartige Seitenketten-Protonen leichter zuzuordnen. Im Gegensatz zum 2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum trägt die größere Anzahl an vorhandenen Kohlenstoffen im Protein im Vergleich zu den Amidprotonen zu erheblichen Signalüberlappungen in den $^{\alpha}\text{H}$ - und $^{\beta}\text{H}$ -Regionen bei. Eine vollständige Signalzuordnung der Protonenresonanzen war daher im ^{13}C -HSQC-Spektrum vom CAP bei Weitem nicht so erfolgreich wie im ^{15}N -HSQC-Spektrum³⁰. Besonders hilfreich ist hier auch die Verwendung von Verschiebungen der Kohlenstoffresonanzen aus den Tripelresonanz-Spektren, um die zugehörigen $^{\alpha}\text{C}$ - und $^{\beta}\text{C}$ der Aminosäuren gemäß ihrer Abfolge in der Primärsequenz zu identifizieren und zuzuordnen.

³⁰ Vgl. Liste der Protonenresonanzen im Anhang A.

7.4. Bestimmung der Sekundärstruktur von CAP

Der zweite Schritt dieser Strukturaufklärung wird ausschließlich durch die Identifizierung von Sekundärstrukturelementen charakterisiert. Aus den 2D-NOESY-Spektren in H₂O und D₂O, 2D-TOCSY in H₂O, 3D-¹⁵N-NOESY-HSQC und 3D-¹³C-NOESY-HSQC-Spektren konnten pro Aminosäurerest bis zu fünf Distanzschranken extrahiert werden. Diese Distanzschranken spiegeln die Werte von interatomaren Abständen im CAP wider, die sich für die Bestimmung zunächst der Sekundärstruktur als besonders relevant erwiesen haben. In Abbildung 5.10 ist eine graphische Darstellung dieser Distanzschranken zu finden. Im CAP-Protein konnten teilweise bei einigen Resten weder sequenzielle noch Distanzschranken mittlerer Reichweite extrahiert werden; Grund hierfür war eine erhebliche Signalüberlagerung in den NOESY-Spektren, die die Identifizierung jeder Art von Korrelationen zwischen den Aminosäuren erschwerte. Im Gegensatz dazu sind bei allen Aminosäureresten Distanzschranken aus Wechselwirkungen großer Reichweite vorhanden und in der Graphischen Darstellung aufgetragen. Eine Ausnahme stellten jedoch manche Proline und die Aminosäuren Ser 1 und Val 2 dar, für die keine erkennbaren Kreuzsignale vorhanden waren. Es existieren für sie in dieser graphischen Darstellung keine Distanzschranken.

Anhand der Art von sequenziellen Beziehungen und Wechselwirkungen mittlerer Reichweite der Aminosäuren untereinander wurde eine graphische Darstellung über die Konformation der Sekundärstruktur erstellt (Abb. 7.11). Aus diesem Sekundärstrukturgraphische Darstellung geht hervor, dass das CAP Protein überwiegend α -helikal ist, das bedeutet, dass sie eine „all- α -Konformation“ besitzt. Hinweise auf andere Arten von Sekundärstrukturelementen wie die von β -Faltblätter sind hier nicht ersichtlich.

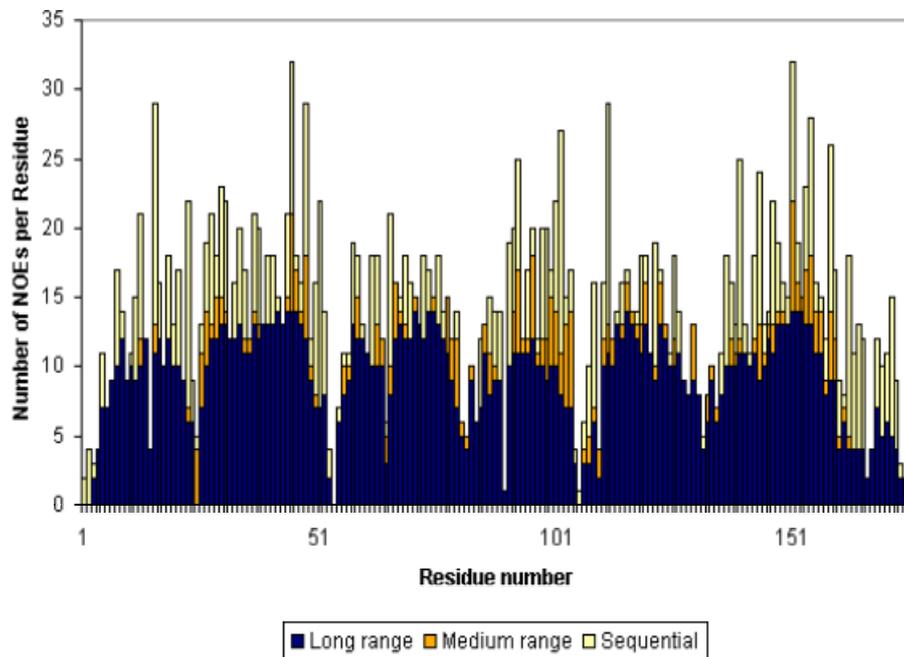


Abbildung 7.10 Graphische Darstellung der Anzahl von Abständen pro Aminosäurerest im CAP-Protein. Die Anzahl der Abstände pro Aminosäurerest ist gegen die Aminosäurenummer entsprechend der Primärsequenzabfolge von CAP-N aufgetragen. Diese Darstellung veranschaulicht die Wechselwirkungen aus dem Kern-Overhauser-Effekt zwischen den Aminosäuren, die von sequenzieller Natur, mittlerer Reichweite (engl.: „medium range NOE“) sowie großer Reichweite (engl.: „long range NOE“) sind. Anders als die Wechselwirkungen aus großer Reichweite, ergeben die Aminosäurewechselwirkungen aus sequenzieller Natur und mittlerer Reichweite diejenigen Abstände innerhalb der Distanzschranken (konformationelle Einschränkungen), die zur Analyse der Sekundärstruktur herangezogen werden. Während diese konformationelle Einschränkungen aus sequenzieller Natur und mittlerer Reichweite Informationen über das Proteinrückgrad liefern, sind die Abstände großer Reichweite innerhalb der Distanzschranken auf die globale Faltung eines Proteins zurückzuführen.

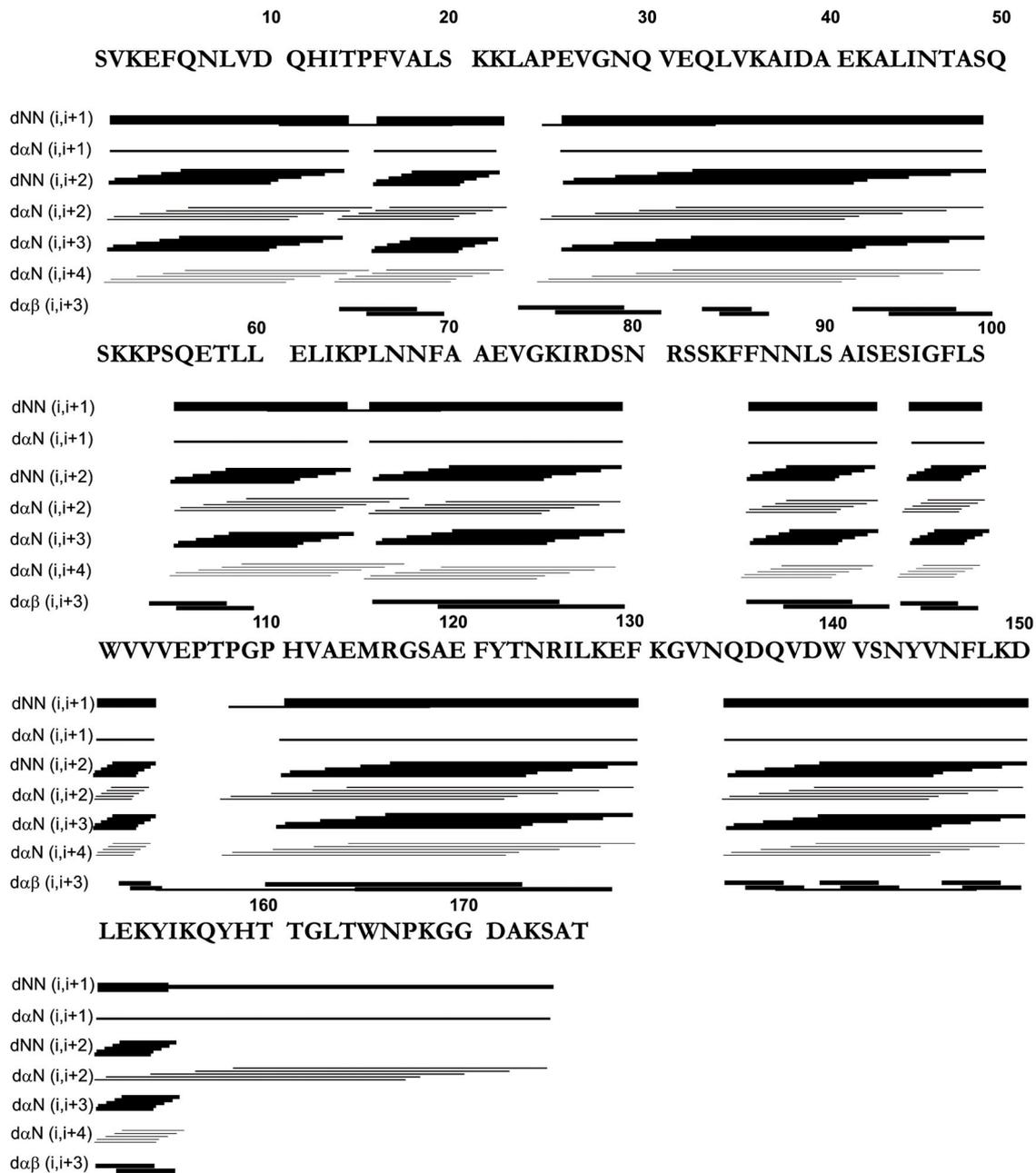


Abbildung 7.11 Graphische Darstellung der sequenziellen Konnektivitäten ($|i-j| < 5$), welche $^1H^N$, $^1H^\alpha$ und $^1H^\beta$ -Protonen einbeziehen.

Die Stärke der Linien reflektiert die Intensität der Kreuzsignale, die in den Spektren beobachtet wurden. Die Intensität der Kreuzsignale entsprechen den $^1H^\alpha(i) - ^1H^N(i+1)$ - und $^1H^\alpha(i) - ^1H^N(i+3)$ -Wechselwirkungen zwischen Aminosäurenresten. Diese waren bis auf sehr wenigen Ausnahmen in allen Spektren von CAP ähnlich. Die Anwesenheit sowohl von Kreuzsignalen aus den $^1H(i)^N - ^1H^N(i+1)$ - und $^1H^\alpha(i) - ^1H^N(i+3, 4)$ - sowie Wechselwirkungen aus $^1H^\alpha(i) - ^1H^\beta(i+3)$ deutet auf eine α -Helix hin. Demzufolge sind die Aminosäuren ausgehend von Val 2-Lys 22, Glu 26-Ser 49, Gln 56-Ser 79, Phe 86-Ser 93, Ser 95- Val 103, Pro 108- Phe 130 und von Gln 135-Ile 155 jeweils in α -helikalen Regionen zuzuordnen.

7.5. Bestimmung der Tertiärstruktur von CAP

Am wichtigsten beim Erstellen der dreidimensionalen hochaufgelösten NMR-Struktur für CAP waren Kriterien wie Abstands-, Torsionswinkel- und Diederwinkelverletzungen, anhand deren die Qualität der resultierenden Strukturen beurteilt werden konnten. Mehrere Strukturrechnungen wurden durchgeführt, um zunächst die konsistenten Datensätze von den irrelevanten zu unterscheiden. Datensätze wurden irrelevant, sobald sie erhebliche Einschränkungverletzungen hervorriefen und dadurch die gesamte Konformationsenergie des Systems erhöhten. Diese Datensätze sind die gesammelten konformationellen Einschränkungen: die Distanz- und die Diederwinkeleinschränkungen, die zwar die Art der dreidimensionalen Anordnung der Atome im Raum limitieren, jedoch zu falschen Konformationen führen könnten. Darüber hinaus bezogen sich, alle Distanzeinschränkungen, die diastereotope oder Ringprotonen betreffen, auf Pseudoatome (Wüthrich, 1983), da keine stereospezifische Zuordnung für solche Protonen durchgeführt werden konnte. Zusätzlich wurden für die H-Bindungen ideale Werte aus der Literatur verwendet, ohne dass dafür genauere Distanzmessungen notwendig wären.

Die Bestimmung einer tertiären Struktur für CAP erfolgte nach Anwendung einer Distanzgeometrieberechnung mit einschließender molekulardynamischer Berechnung, bei der die experimentell erhaltenen Kernresonanzdatensätze aus den Spektrenauswertungen verwertet wurden. Von den ca. 2000 extrahierten Distanzschranken wurden 500 experimentelle Werte als nicht relevant für das Erstellen einer endgültigen Struktur bewertet und herausgefiltert. So wurden nur diejenigen Einschränkungen verwertet, die zu niedrigeren Bindungsenergien und konformationellen Energiewerten führten. Insgesamt waren also 1500 Distanzschranken und 358 Diederwinkeleinschränkungen für CAP erhältlich. Sie wurden mit Hilfe den Programmen Xplor-3.851 (Brünger, 1992) und CNS-solve 1.1 (Nilges et al, 1990) für die molekulardynamische Berechnung verwendet. Diese Strukturberechnung nach Brünger und Nilges stellt eine Annäherung an das gesamte Energieminimum eines makromolekularen Systems dar (s. Kapitel 3). Ein vorläufiges Bündel von 30 Konformeren konnte daraus erzeugt werden. Weitgehend verfeinert wurde schrittweise, gemäß der Energieminimierungen aus den Powell Energie-Algorithmen (Powell, 1977) jede der resultierenden Konformeren. Nur dadurch war es möglich, besonders energetisch armen Konformeren zu erhalten. Eine enge Auswahl konnte folglich für alle Konformeren getroffen werden, welche auf niedrigen Gesamtenergiekriterien basierte. Dies führte schließlich zu einem Satz an best möglichen Strukturen für CAP. Von den ursprünglich 30 verfeinerten Konformeren erfüllten insgesamt 18 alle Bedingungen für hoch qualitative Proteinstrukturen, welche

gungen für hoch qualitative Proteinstrukturen, welche anschließend miteinander verglichen wurden. In der Abbildung 5.12 ist dieses Bündel von 18 Konformeren dargestellt. Ein Vergleich erfolgt, in dem die Rückgratatompositionen N, C α ; C \prime aller Konformeren des Bündels überlagert werden und Werte für die mittleren Abweichungen der Atompositionen innerhalb des Strukturbündels berechnet werden, relativ zu einer gemittelten Struktur³¹ als Referenzstruktur (rmsd-Wert³²: „root mean square differences“). Die Überlagerung und Analyse der Konformeren erfolgten mit den Software-Anwendungen MOLMOL (Koradi et al., 1996), Suppose (Jarrod, 1999) und Swiss-PdbViewer (Gale Rhodes, 1998). Die mittleren Abweichungen der Atompositionen zur mittleren Struktur bewiesen, dass die Konformeren keine gerichtete Tendenz zeigen, sich von der Referenzstruktur abzuweichen (s. Abb. 5.13). Dies gilt insbesondere für die Regionen im Bereich des Rückgrats und in den α -Helices, während in den strukturlosen Regionen (engl.: Loops) große Abweichungen auftreten. Diese großen Unterschiede sind jedoch aufgrund der hohen Flexibilität von Aminosäureresten in diesen Regionen für diesen Vergleich nicht von Bedeutung, da die gesamte räumliche Molekülgeometrie dadurch unverändert bleibt. Kleine Werte von mittleren Atomverschiebungen, wie sie im CAP-Protein-Bündel zu sehen sind, spiegeln die Präzision der berechneten Konformeren und folglich die Genauigkeit der experimentellen Kernresonanzdatensätze wider. Alle 18 Strukturen erfüllten außerdem noch die experimentellen Normwerte für ideale Strukturen, mit nur sehr geringen Abweichungen von der idealen kovalenten Proteinstrukturgeometrie (Tabelle 7.1).

³¹ Die mittlere Struktur entsteht im Allgemeinen durch Mittelung der Atomkoordinaten

³² Vgl. Kapitel 3

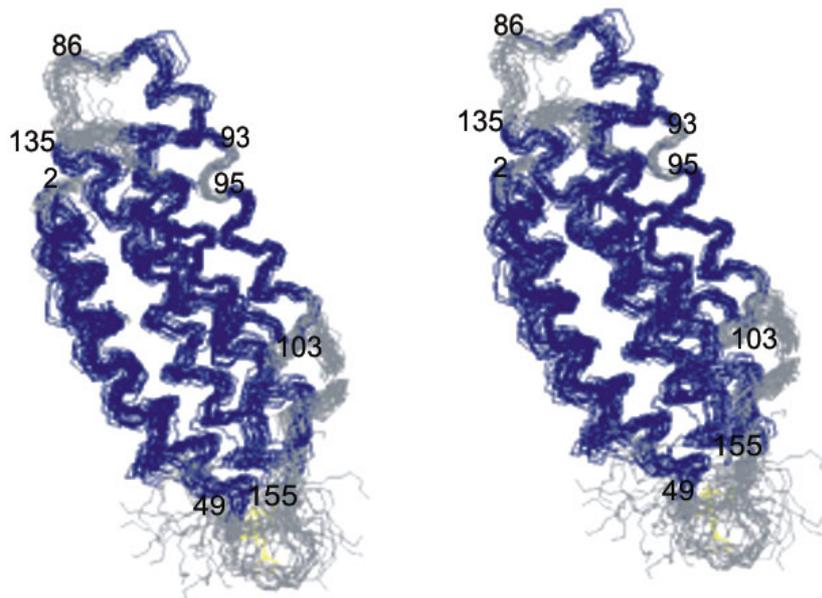


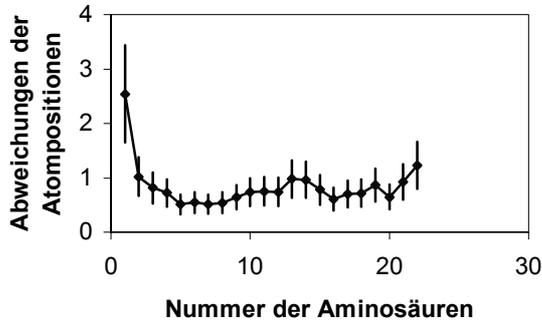
Abbildung 7.12 Stereodarstellung des Strukturbündels von CAP.

Das Strukturbündel von CAP besteht aus 18 Konformeren, die hier überlagert sind. Durch diese Überlagerung können die Positionen der Atome der Konformeren im Bündel (N, C α , C', und O) entlang des Polypeptidrückgrates, verglichen werden. Die Bestimmung der Konformation des Proteinrückgrates erfolgte mittels der konservativen Pseudoatomkorrekturen nach Wüthrich et al., (1983). Die Atome N, C α and C' der Aminosäuren aus den helikalen Regionen (in blau): Val 2-Lys 22, Glu 26-Ser 49, Gln 56-Ser 79, Phe 86-Ser 93, Ser 95- Val 103, Pro 108- Phe 130 und schließlich Gln 135-Ile 155 weisen insgesamt kleine Atomverschiebungen auf, so dass die Geometrie des CAP-Moleküls innerhalb der Konformeren kaum verändert wird.

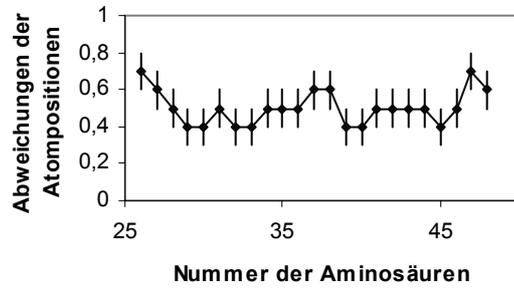
Abbildung 7.13 Graphische Darstellung der mittleren Atomverschiebungen in den helikalen Regionen im Strukturbündel <SA> von CAP, relativ zu einer gemittelten Struktur, <SA>m.

Berücksichtigt werden hier die N, C α und C' Atome des Proteinrückgrates aller 18 Konformere. Diese Darstellung reflektiert, wie stark die Geometrie des Proteinrückgrates der einzelnen Strukturen im Bündel von den mittleren Atomkoordinaten m abweicht. Besonders große Unterschiede entstehen bei den Aminosäuren, die in den unstrukturierten Regionen liegen, da diese eine höhere Flexibilität aufweisen im Vergleich zu denjenigen Aminosäuren, die in den α -Helices involviert sind.

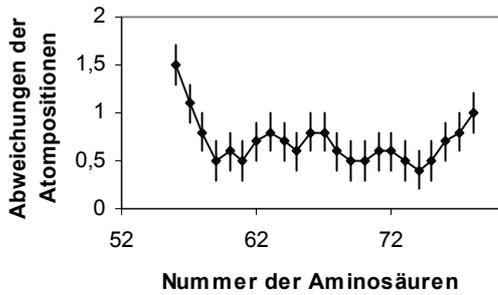
A) <SA> versus <SA>m: Proteintrückgrat



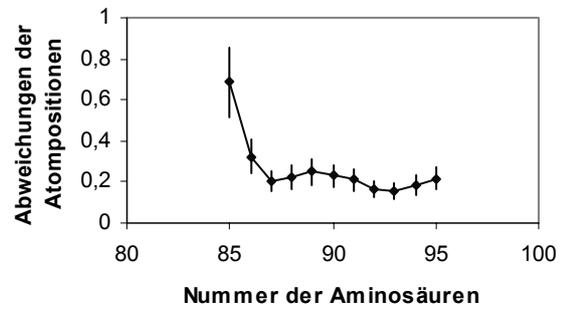
B) <SA> versus <SA>m: Proteintrückgrat



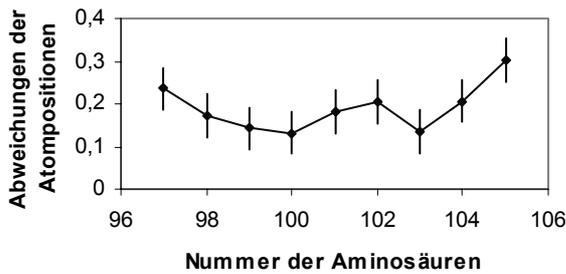
C) <SA> versus <SA>m: Proteintrückgrat



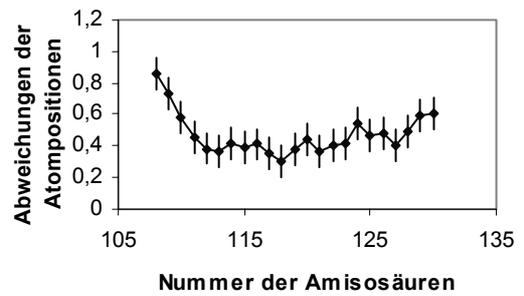
D) <SA> versus <SA>m: Proteintrückgrat



E) <SA> versus <SA>m: Proteintrückgrat



F) <SA> versus <SA>m: Proteintrückgrat



G) <SA> versus <SA>m: Proteintrückgrat

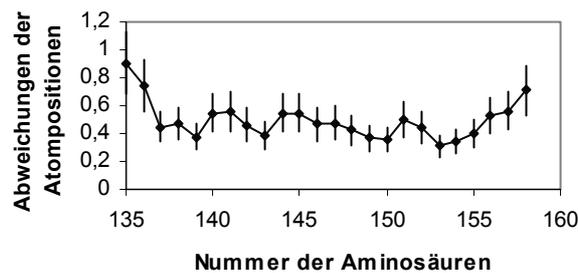


Tabelle 7.1:

Parameter, die die Ergebnisse der Strukturberechnung von CAP in Lösung charakterisieren (pH 7, 300K)

Parameter	Strukturbündel
Abweichung von berechneten Werten für ideale kovalente Proteinstrukturgeometrie	
<i>Bindungslänge (Å)</i>	0.0046 ± 0.000
<i>Winkel (°)</i>	0.6191 ± 0.031
<i>Improper (°)</i>	0.5332 ± 0.021
Energiewerte (kcal.mol⁻¹)	
<i>E_{NOE}</i>	234.56 ± 19.440
<i>E_{imp}</i>	38.73 ± 1.201
<i>E_{Bindung}</i>	10.65 ± 0.518
Abweichungen von den erlaubten Verletzungen der Einschränkungen	
<i>Verletzungen der Distanzschranken > 0.2 Å</i>	21.9 ± 4.150
<i>Verletzungen der Distanzschranken > 0.5 Å</i>	0.21 ± 0.043
Abweichungen von den ermittelten Proton-Proton-Korrelationen (Å)	
<i>Interatomare Wechselwirkung –insgesamt–</i>	0.000 ± 0.000
<i>Interatomare Wechselwirkung –sequenzielle Natur–</i>	0.000 ± 0.000
<i>Interatomare Wechselwirkung –mittlere Reichweite–</i>	0.000 ± 0.000
<i>Interatomare Wechselwirkung –größere Reichweite–</i>	2.120 ± 0.020
<i>Interatomare Wechselwirkung –^NH(i+4) – O(i) (25) –</i>	0.000 ± 0.000

Das Strukturbündel von CAP besteht aus 18 Konformeren. Die mittleren Atomverschiebungen wurden mit Hilfe der Softwareanwendung „Suppose“ berechnet. Insgesamt wurden 1500 Distanzschranken und 358 Diederwinkelschränkungen verwendet.

7.6. Beschreibung der dreidimensionalen Struktur der aminoterminalen Domäne von CAP

Die dreidimensionale Struktur der N-terminalen Domäne des CAP-Homologs aus *D. discoideum* stellt ein Bündel von sechs Helices dar, die antiparallel zueinander gerichtet sind (Abbildung 5.14). Während die helikalen Regionen durch die Aminosäuren in den Bereichen zwischen Val2-Ser49, 56-79, 86-93, 95-103, 108-130 und 135-155 gekennzeichnet sind, sind die restlichen Aminosäuren Bestandteile einer strukturlosen oder ausgedehnten Konformationen. Andererseits erinnert diese Art der Ausrichtung von Helices an Membranproteine des Typs IV, bei denen die Länge jeder Helix aus 20 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Die Ansicht des Proteins von oben gibt den Anschein, dass die Helices zusammen eine Art gestreckter Zylinder bilden (Abbildung 5.15).

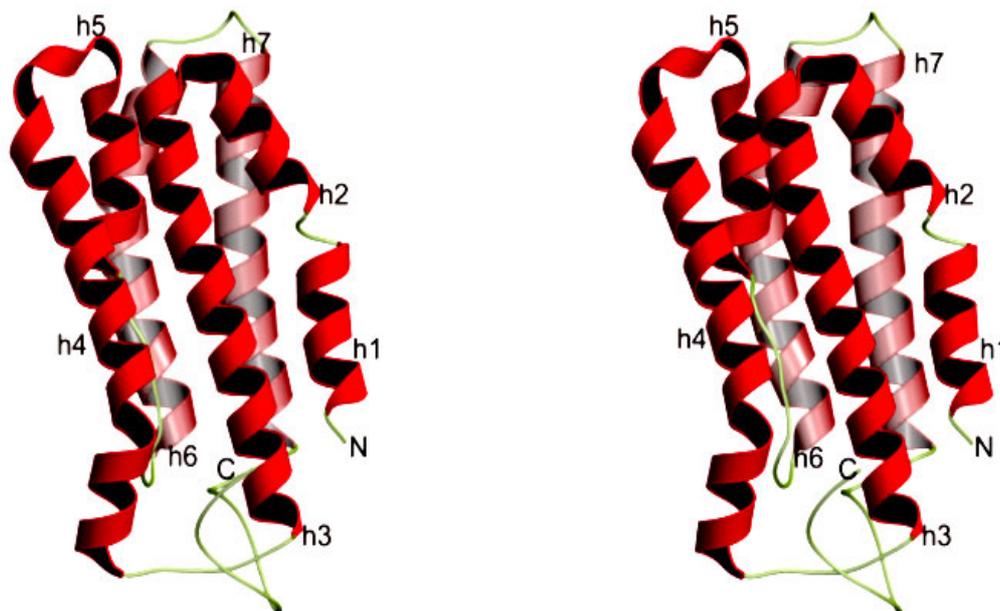


Abbildung 7.14 Stereodarstellung der dreidimensionalen Struktur der amino-terminalen Domäne von CAP (Seitenansicht).

Die Struktur besteht aus 6 Helices, die sich zwischen den Aminosäuren Val 2 -Ser 49, Gln 56-Ser 79, Phe 86-Ser 93, Ser 95- Val 103, Pro 108- Phe 130 und Gln 135-Ile 155 erstrecken. Diese Helices sind antiparallel zueinander gerichtet und weisen jeweils einen leichten Knick auf. Die Art der Ausrichtung erinnert sehr stark an ein Membranprotein des Typs IV. Die erste Helix Val 2 -Ser 49 ist im CAP-Molekül durch ein Pro 25 unterbrochen.

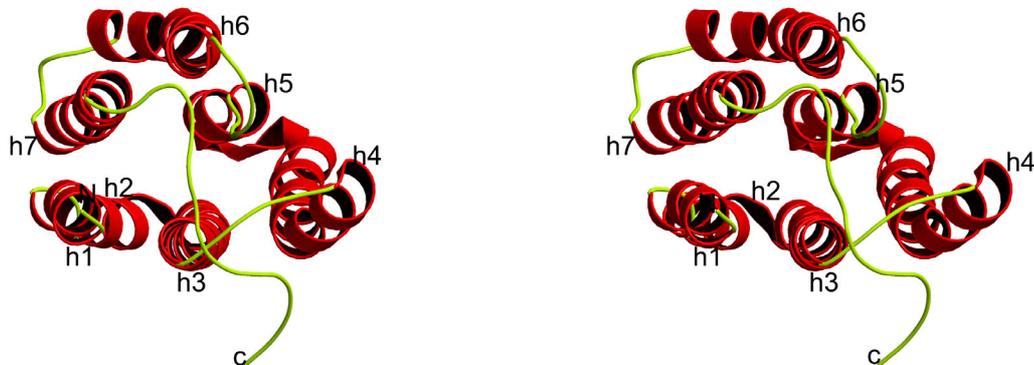


Abbildung 7.15 Stereodarstellung der dreidimensionalen Struktur der amino-terminalen Domäne von CAP (Ansicht von oben).

Ersichtlich sind hier Helices, die zusammen eine Art Zylinder bilden.

7.7. *D. discoideum* CAP als mögliches Substrat von Proteinkinasen

Da die biologische Funktion von Proteinen im Allgemeinen auf ihre Konformation oder dreidimensionale molekulare Gestalt zurückzuführen ist, wurde nach der Strukturbestimmung der amino-terminalen Domäne des *D. discoideum*s CAP-Proteins versucht, seine möglichen Funktionen zu definieren.

Laut Ergebnisse der Literatur spielt das *D. discoideum* CAP-Protein eine regulatorische Rolle in der dynamischen Reorganisation des Actin-Cytoskeletts durch eine Signalübertragungskaskade über eine externe Stimulierung (Vojtek *et al.*, 1991; Amberg *et al.*, 1995). Es soll außerdem noch in der Lage sein, Actin *in vitro* zu binden und dabei mit dem PIP₂-Molekül zusammenwirken (Gottwald *et al.*, 1996). Um zu verstehen inwiefern, die aminoterminal Domäne des *D. discoideum* CAP-Proteins als Actin-bindendes Protein das Actin-Netzwerk in der Zelle beeinflusst, wurde es in einem Experiment als Substrat für die Proteinkinase A³³ (zyklische AMP-abhängige Proteinkinase) eingesetzt. Dadurch sollten wichtige Informationen über seine Rolle in den Signaltransdukti-

³³ Die Proteinkinase A setzt sich aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten zusammen, die bei Phosphorylierungsmechanismen während der Signalübertragungsvorgänge eine entscheidende Rolle spielen (Traugh *et al.*, 1974).

onskaskaden, die den raschen Umbau des Cytoskeletts zu kontrollieren scheinen, gewonnen werden.

Eine Phosphorylierungsreaktion wurde deshalb *in vivo* durchgeführt, um einen Phosphat-Transfer von einem ATP (Adenosyltriphosphat) zu dem CAP-Protein zu erreichen. Bei diesem Versuch wurde das CAP als Substrat für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A aus Rinderherz verwendet. Ein Phosphat-Transfer konnte währenddessen jedoch nicht beobachtet werden. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass das untersuchte Fragment der amino-terminalen Domäne von CAP (S51-T226) nicht phosphoryliert wird, also nicht als Substrat für die Proteinkinase A im Actin-Cytoskelett in Frage kommen kann.

7.8. Modell der Struktur des gesamten CAP-Moleküls

Ein Modell der Struktur des CAP-Moleküls wurde mit Hilfe der Softwareanwendung 3D-Dock erstellt und als vermutete monomere Einheit der Quartärstruktur von CAP vorgeschlagen (Abbildung 7.16). Berechnet wurden dabei die Oberflächenpotentialen in den Kontaktflächen zwischen der amino-terminalen und der carboxyterminalen Domäne. Als Ausgangspunkte für die Berechnung des CAP-Proteins wurden die konformationelle Einschränkungen aus der NMR-Strukturberechnung und die Koordinaten der C-terminalen Domäne aus der Proteindatenbank (Nr. 1K4Z) berücksichtigt. Das Modell zeigt welche Aminosäurereste an der Kontaktfläche zwischen den zwei CAP-Domänen liegen.

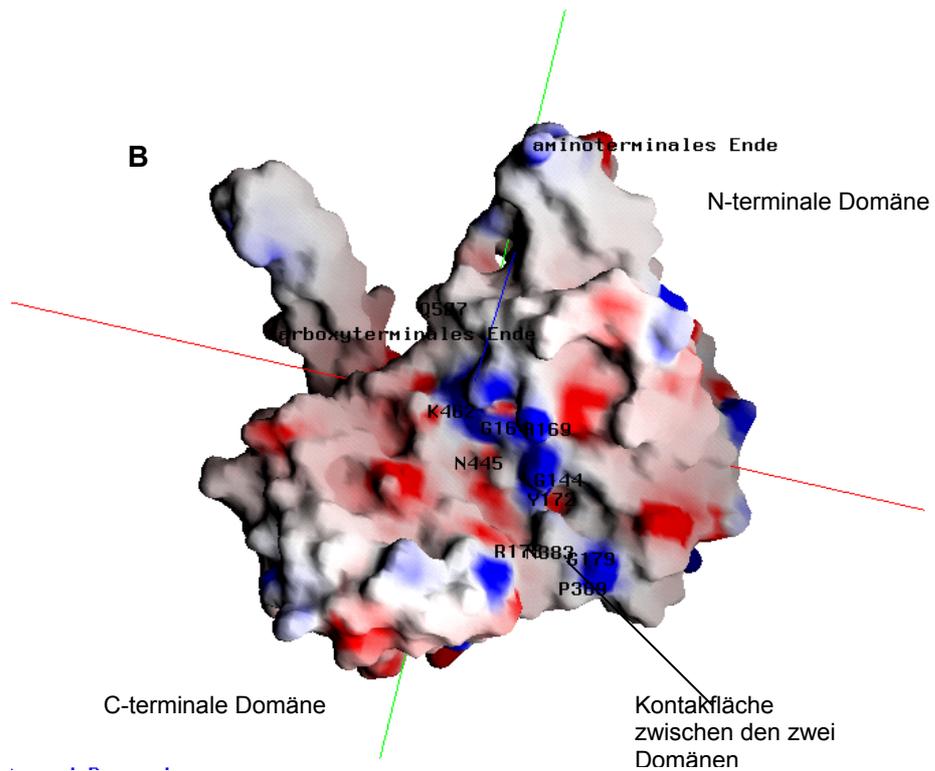
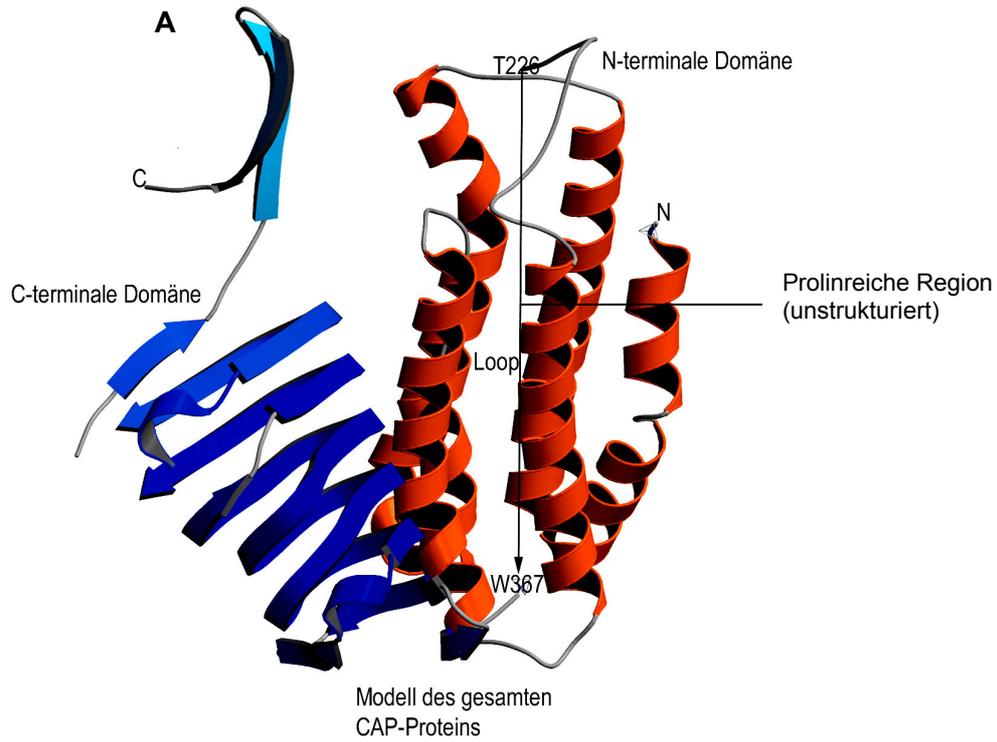


Abbildung 7.16 Modell einer monomeren Einheit der Quartärstruktur von CAP.

A. Das CAP-Protein besteht aus zwei verschiedenen Domänen, die durch eine prolinreiche Region verbunden ist. Während die N-terminale Domäne von CAP durch eine All- α -Konformation gekennzeichnet ist (rechts), besteht die C-terminale Domäne aus überwiegend β -Faltblätter (links). Das 6-Helix-Bündel der N-terminalen Domäne ist antiparallel zu der C-terminalen Domäne gerichtet, deren β -Faltblätter in einem β -Barril angeordnet sind. Die Gesamtenergie des Modells betrug -59 kcal/ mol nach einer Verfeinerung der berechneten Struktur. Die Wahrscheinlichkeit der Oberflächenkomplementarität (Scscore) betrug 79.

B. Darstellung der Oberfläche von CAP.

Zu sehen sind hier die positiv geladenen Ionen auf der Proteinoberfläche. Die positiv geladenen Ionen sind rot gekennzeichnet, die negativ geladenen blau und die ungeladenen Atomen weiss. Die positiv geladenen Ionen sind im CAP-Protein, nach außen, zum Lösungsmittel gerichtet während die negativ geladenen Ionen nach innen gerichtet sind. In der Mitte, zwischen den zwei Molekülen sind die Aminosäurereste zu sehen, die die Kontaktfläche zwischen den zwei Domänen bilden.

7.9. Diskussion

Den NMR-Untersuchungen zufolge wird die aminoternale Domäne des *D. discoideum* CAP-Proteins durch eine temperaturempfindliche Teildomäne gekennzeichnet, die aus 50 Aminosäureresten besteht. Diese Teildomäne besteht aus Met 1 bis einschließlich Ser 50 und ist unstrukturiert. Um dennoch die Zuordnung der Resonanzen der aminoterminalen Domäne von CAP in den NMR-Spektren durchführen zu können, bestand die Notwendigkeit die ersten 50 Aminosäuren vom Rest des Proteins abzutrennen. Dadurch wurde ein Großteil der Signalüberlagerung verringert und die Zuordnung der Resonanzen in den NMR-Spektren effizienter als vor der Abtrennung. So war eine Zuordnung der Resonanzen für fast alle Aminosäure im CAP-Protein möglich, jedoch nicht für manche Proline und die Aminosäuren Ser 51, Val 52 und Lys 53. Schließlich konnte es, ausgehend von der Teildomäne S51-T226, einen Satz von Konformeren für die aminoternale Domäne von CAP zu erstellen. Die besondere Qualität des Datensatzes wurde dadurch bestätigt, dass alle Konformeren keine großen Tendenzen zeigten, von der mittleren Molekülgeometrie abzuweichen. Das 6-Helix-Bündel von CAP erklärt seine Tendenz Oligomeren zu bilden (Abbildung 7.17).

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von CAP ist für das Verständnis seine Funktionen im Cytoskelett von großer Bedeutung und dient als erste Annäherung zur strukturellen Aufklärung der Bindungseigenschaften von CAP und der Adenylyl-Cyclase. Aufgrund der sehr hohen Instabilität des Konstruktes M1-T226 waren die NMR-Untersuchungen von CAP stets mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Über die Art der Bindung an der Adenylyl-Cyclase herrscht daher weiterhin Unklarheit. Die Frage, ob die Bindung an Adenylyl-cyclase bei allen CAP-Homologen konserviert ist oder aber eine Folge der Evolution von den Prokaryonten zu den Eukaryonten ist, bleibt darüber hinaus offen. Die Bindung an Actin und damit die Teilnahme der CAP-Proteine an der Regulation des G-Actin-F-Actin-Gleichgewichtes wurde bereits in früheren Studien überprüft (Gottwald *et al*, 1999). Die hier gewonnenen Erkenntnisse über das *D. discoideum* CAP-Protein ergänzen diese Studien und zeigen, dass eine Actin-bindende Stelle ausschließlich in der carboxy-terminalen Domäne zu finden ist.

Bis jetzt konnte in keinen diesen zahlreichen Studien über die CAP-Proteine bewiesen werden, dass wie bei der carboxy-terminalen Domäne, die Funktion der zentralen Polyprolin-reiche Domäne konserviert sind.

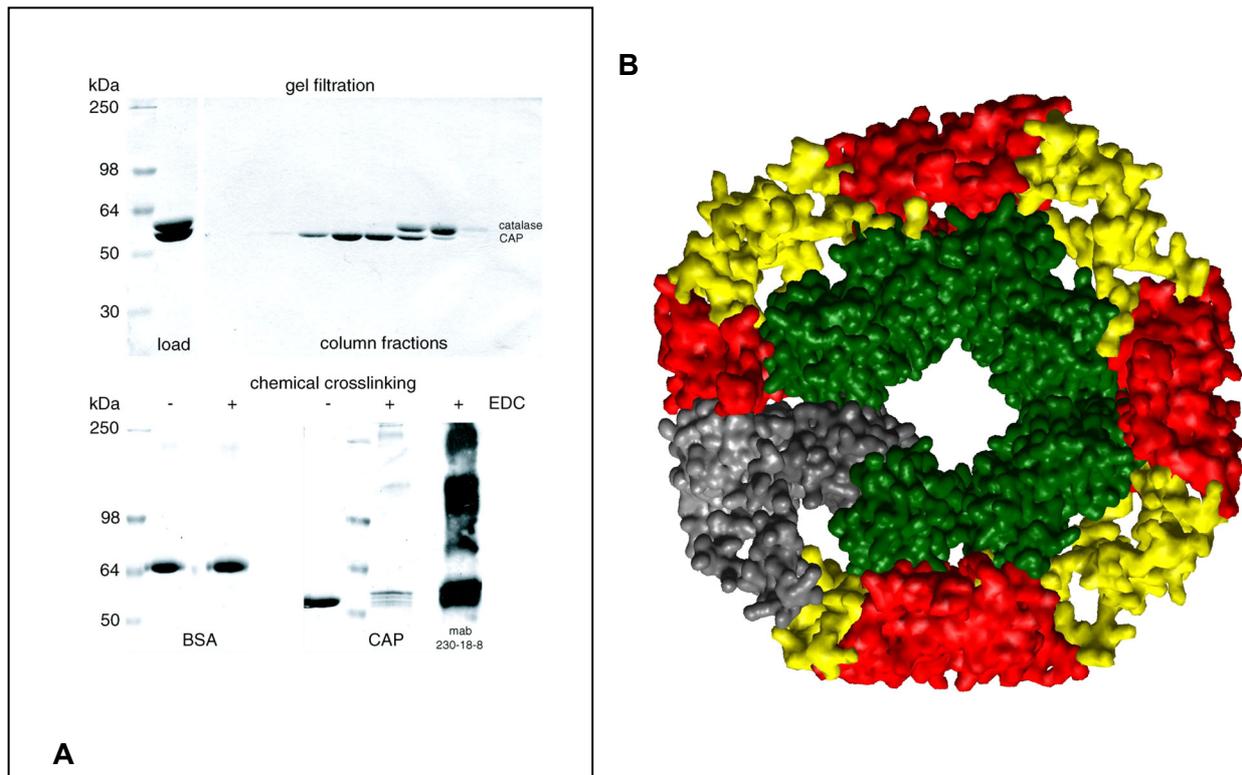


Abbildung 7.17 Das CAP-Oktamer.

A. SDS-PAGE der amino- und carboxyterminalen Domäne von CAP. Auf dem Gel sind sowohl monomere als auch heteromere Einheiten der Quartärstruktur von CAP zu sehen. Die monomere Einheit wird auf dem Gel durch eine Doppelbande bei 60 kDa charakterisiert, während die heteromere Einheiten bei ca. 150 und 250 kDa zu sehen sind. Es handelt sich bei der Doppelbande bei 250 kDa um ein Oktamer des CAP-Moleküls, welches durch chemischen „Cross-linking“ bewiesen wird.

B. Modells des CAP-Oktamers. Dieses Modell wurde mit der Softwareanwendung PdbSwissviewer erstellt. Hier sind die amino-terminalen Domänen (grün) in der Mitte der Struktur durch die carboxy-terminalen Domänen (rot) abgeschirmt und bilden eine Art Pore. Beide Domäne sind durch prolinreiche Region (gelb) verbunden. Grau ist eine monomere Einheit von CAP gekennzeichnet. Das CAP-Protein für die Bindung an Ionen oder an polare Substrate verantwortlich sein.

8. Expression und Reinigung des DAip1 aus einem genveränderten *D. discoideum* Stamm (4-1)

Für die Expression und Reinigung des DAip1 wurde der DAip1-überexprimierende *D. discoideum*-Stamm, der 4-1-Stamm, verwendet. Die Zellen des 4-1-Stammes exprimierten ca. 25-mal mehr DAip1 als der Wildtyp AX2 (M-Taubenberger³⁴). Zweck dieser Überexpression und der anschließenden Reinigung war es, Protein-Einkristalle zu erzeugen, um später die Struktur von DAip1 mittels Röntgenstrukturanalyse zu bestimmen.

Die Reinigung von DAip1 wird in drei Schritte unterteilt, zu denen in zunächst das kontrollierte Zellwachstum von vegetativen bis zu entwickelten Zellen in Schüttelkulturen gehört. Im zweiten Schritt erfolgt die Reinigung des DAip1-Proteins aus dem Zellhomogenat durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration, um das DAip1 in reiner Form zu erhalten. Schließlich zielt erfolgt das Einkonzentrieren der reinen DAip1-Lösung auf 2-3 mg/ml bis zu 10 mg/ml.

8.1. Gewinnung des DAip1 aus 4-1

Mit Sporen des Stammes 4-1 wurde das AX2-Medium beimpft. Sobald sich die Sporen zu vegetativen Zellen entwickelt und vermehrt hatten, wurden die Lösungen aus den Petrischalen in 30 ml Erlenmeyer-Kolben überführt, wo sie weiter kultiviert wurden. Das Zellwachstum wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer unter einem Lichtmikroskop kontrolliert und die Anzahl der Zellen pro ml ermittelt. Beim Erreichen der stationären Phase ($5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) wurde die Kultur zum Beimpfen in 2 Liter Erlenmeyer-Kolben verwendet. Geerntet wurden die Zellen bei einer Dichte von 10^7 Zellen/ml durch Zentrifugation bei 1500 rpm. Die geernteten 4-1-Zellen wurden dann gemäß dem Reinigungsprotokoll von DAip1-Protein in kaltem Soerensen-Puffer aufgenommen und zweimal gewaschen. Zu diesem Zweck wurde eine Zentrifuge mit Swing-out-Rotor verwendet, wodurch große Verluste am besten minimiert werden konnten. Die Zelldichte wurde dann auf 10^7 Zellen/ml eingestellt, die Zellen dann im Phosphat-Puffer aufgenommen und zum Entwickeln gebracht. Die entwickelten Zellen wurden bei 1500 rpm geerntet und ihre Masse bestimmt. Bei der Einwaage betrug die gesamte Zellmasse 31,19 g. Als besonders vorteilhaft kristallisierte sich die Zell-Lyse bei 15000 psi in einer „French Press“ sowie in dem „Celldisrupter“ heraus.

³⁴ Ergebnisse nicht publiziert.

8.2. Reinigung von DAip1 durch Ionenaustauschchromatographie

Die native Reinigung von DAip1 erfolgte in drei Stufen mittels Ionenaustauschchromatographie³⁵. Die erste Trennung zur Aufreinigung von DAip1-Protein erfolgte mittels einer DEAE-Säulenchromatographie bei einem Säulendurchfluss von 5 ml/min und einem pH-Wert von 7,5 in 5 mM Hepes-G-Puffer. Ziel dieses Reinigungsverfahrens war es durch ionische Bindung an den Kationenaustauschergruppen der DEAE-Säule, die positiv geladenen Proteine im 100.000 x g-Überstand von den anderen negativ sowie neutral geladenen Proteinen zu trennen. Der Grund für die Wahl des pH-Wertes war der pI (³⁶) des DAip1-Proteins von 7.13. Damit sollte erreicht werden, dass aufgrund einer neutralen Gesamtladung das DAip1-Protein ohne Salzgradienten die DEAE-Säule passieren müsste. Daraufhin bestand die Möglichkeit der Aufteilung des Säulendurchflusses in drei verschiedene Sammelfraktionen entsprechend der Anzahl von detektierten Peaks im Säulenchromatogramm und folglich des DAip1-Reinheitsgrads. Diese Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese weitergehend untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung erlaubte es, die darauf folgende Trennung durch eine Hydroxyapatit-Säule in drei verschiedenen Stufen gemäß dem jeweiligen Reinheitsgrad der Proteinlösungen aufzuteilen. Eine weitere Trennung wurde mit Hilfe einer Hydroxyapatitsäule durchgeführt, wodurch die gesammelten Fraktionen, Pool 1 bis Pool 3, der DEAE-Säulenchromatographie jeweils gereinigt wurden. Damit sollte das DAip1-Protein in reiner Form gewonnen werden. Diese Reinigung erfolgte bei einer Durchflussrate von 0,2 ml/min und einem Säulenvolumen von 60,0 ml bei einem pH-Wert von 8 in 20 mM Tris-Puffer. Ein linearer Salzgradient von 10,0 mM bis 500 mM $K_3PO_4 \cdot 7H_2O$ erlaubte es, die gebundenen Proteine nacheinander von der Säule zu eluieren. Das Ergebnis dieses Reinigungsschrittes ist in Abbildung 6.1 zu finden. Eine weitere Bande bei etwa 30 kDa wurde in jeder der einzelnen Fraktionslösungen als Verunreinigung identifiziert.

³⁵ Das Protokoll über die Ionenaustauscherchromatographie des DAip1 wurde bereits von Mintert & M-Taubenberger (Ergebnisse nicht publiziert) ausgearbeitet.

³⁶ Isoelektrischer Punkt.

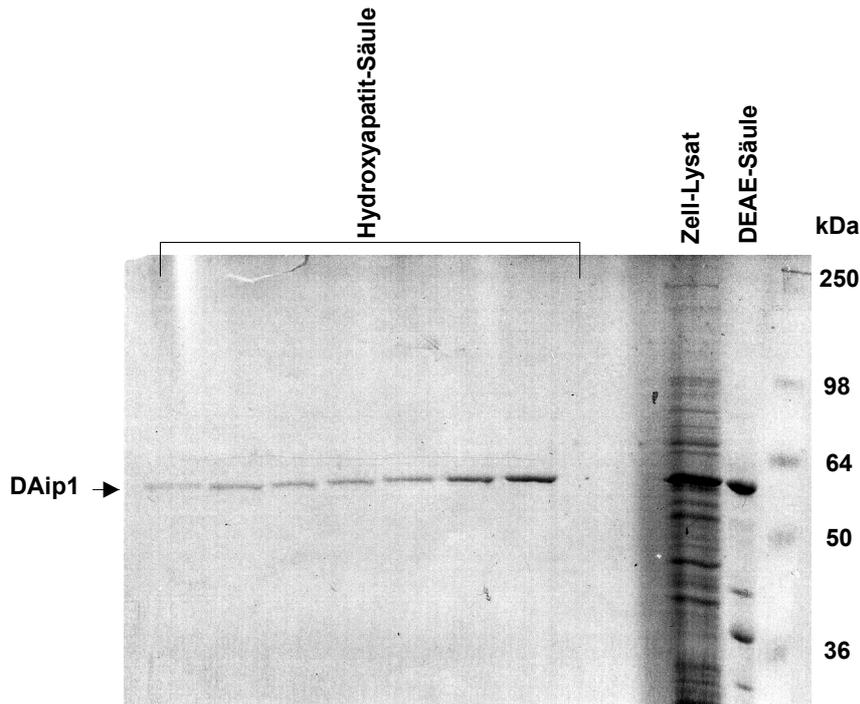


Abbildung 8.1 SDS-PAGE der Proteinfraktionen der Hydroxyapatitsäule.

DAip1-Fraktion der Hydroxyapatitsäule werden mit einer Probe aus einer ersten Reinigung mittels DEAE-Säule verglichen. Die DEAE-Fraktion ist mit anderen Proteinen aus dem *D. discoideum* Cytoskelett sehr stark angereicht. Dagegen zeigen die Hydroxyapatitsäule-Fraktionen nur Banden bei 60 kDa, da sie wesentlich mehr DAip1 enthalten und wenig Verunreinigungen.

8.3. Gelfiltration der DAip1-Proteinprobenlösung

Eine Gelfiltrationsanalyse wurde angewandt, um die restlichen Verunreinigungsspuren von Begleitproteinen des Cytoskeletts vom DAip1-Protein abzutrennen. Die Fraktionen der jeweiligen Hydroxyapatit-Säulen des Pools 1 bis 3 wurden nach und nach über die Cellophanmembranen eines Centriprep 50 einkonzentriert und mit Hilfe einer Gelfiltration in einem 20 mM Tris-Puffer, versetzt mit 100 mM NaCl, untersucht. Die besten Ergebnisse wurden, bei einem gesamten Säulenvolumen von 23,56 ml, durch Verwendung eines Anfangsvolumen V_0 von 7,77 ml und einem Säulendurchfluss von 1,5 ml/min, erzielt. Die Benutzung eines Proteinmarkers als Referenz während des Gelfiltrationsprozesses erlaubte es, die Molekulargewichte der Proteine, die die Säule passierten, zu identifizieren (Abbildung 6.5). Nach der Gelfiltration konnte schließlich reines DAip1 erhalten werden.

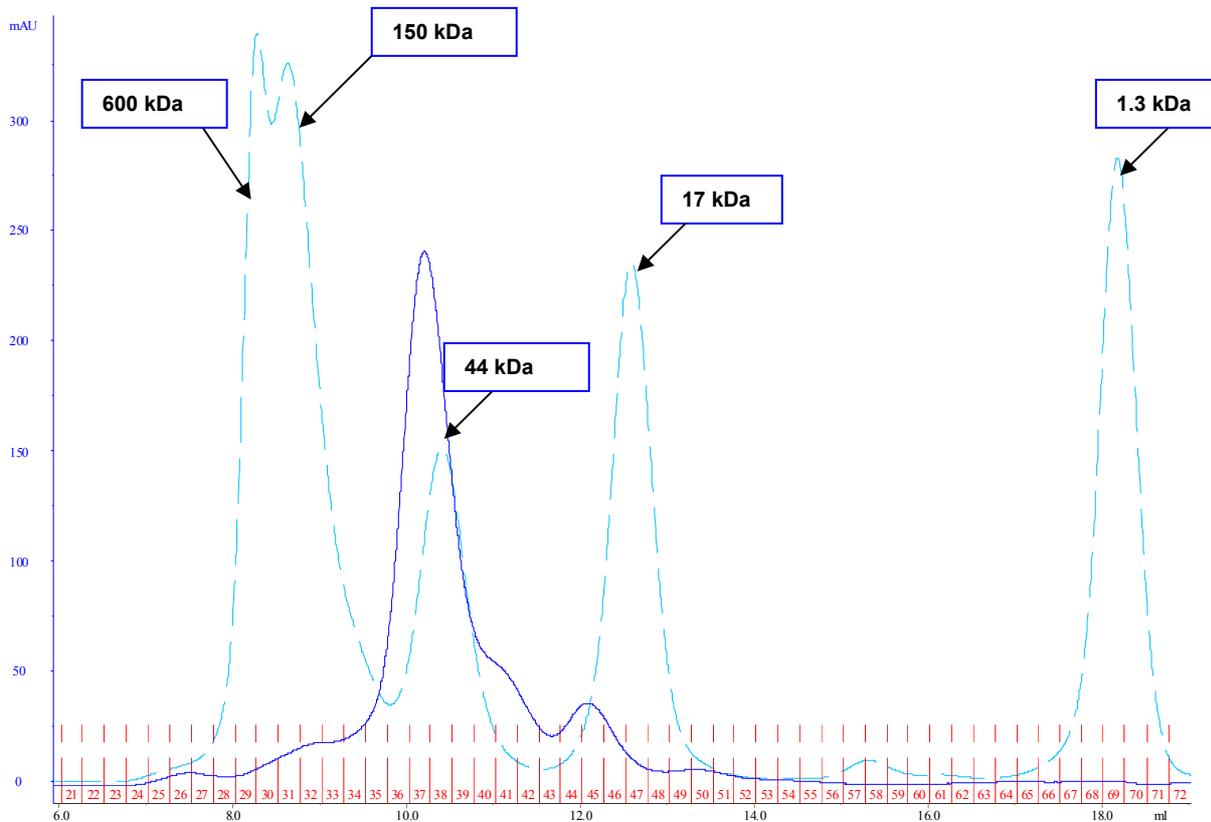


Abbildung 8.2 Gelfiltration von DAip1.

Bei einem Säulenvolumen und –durchfluss von 23 ml und 0.5 ml/min wurden 150 μ l einer konzentrierten DAip1-Lösung gegen einen Proteinmarker auf eine Mono-S-Säule aufgetragen. Das Molekulargewicht der Proteine, die die Säule passieren, wurde dann ermittelt.

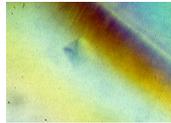
Auf dem hier abgebildeten Chromatogramm sind die Signale der in der Lösung vorhandenen Proteine gegen die Retentionsvolumen aufgetragen. Während das Chromatogramm des Proteinmarkers mit unterbrochenen Linien dargestellt ist, zeigen die Signale des Chromatogramms mit durchgezogenen Linien die Absorptionssignale der Proteine, die sich in der DAip1-Lösung befinden. Die einzelnen Fraktionen werden hier durch rote Striche unten gekennzeichnet.

8.4. Bestimmung der Konzentration mit Hilfe des Bradford-Tests.

Die erhaltene reine DAip1-Probenlösung wurde nach der Gelfiltration mit Hilfe von Amicon und Centiprep-Konzentratoren ankonzentriert. Der „Cut-off“ der Membranen betrug dabei 50.000 Da und teilweise 30.000 Da. Da die Verwendung von Proteinkonzentratoren mit dem „Cut-off“ 50.000 Da meistens zu erheblichen Proteinverlusten führte, wurden hauptsächlich Membranen mit „Cut-off“ 30.000 Da benutzt. Die Bestimmung der Endkonzentration der DAip1-Lösung erfolgte durch Messung der Absorption der Proteine in der Lösung bei $\lambda = 595$ nm nach Bradford. Es wurde von 0.8 mg/l bis zu 3 mg/l einkonzentriert. Ein weiterer Versuch das DAip1-Protein bis zu 5 mg/l zu konzentrieren, scheiterte an der Bildung eines Niederschlags.

8.5. Kristallzüchtung

Zur Erzeugung von DAip1-Einkristalle wurde ein standardisiertes Set von Reagenzmischungen der Firma Hampton benutzt, um mögliche Kristallisationsbedingungen für das DAip1-Protein zu bestimmen. Die Kristallzüchtung erfolgte in einem Kristallisationspuffer aus 20mM Tris und 150mM NaCl durch Anwendung des „Sitting Drop“-Verfahrens. Dabei wurden Kristallisationsplatten verwendet, die mit 24 Reservoirs versehen sind, mit je 500 μ l Lösung von Reagenzmischungen aus „Crystal Screen I“ und „Crystal Screen II“ gefüllt. Die Tröpfchen oberhalb der Reservoirs bestanden aus je 2 μ l einer 3 mg/ml DAip1-Lösung und 1 μ l der jeweiligen Reagenzlösungen. Die mit „Crystal-Clear“ versiegelten Platten wurden anschließend in einem Kristallisationsraum bei 20°C und 4°C gelagert. Nach ca. sechs Wochen wuchsen einige Proteineinkristalle aus einer der Platten mit „Crystal Screen I“, welche jedoch aufgrund ihrer Größe für eine weitere Behandlung durch Röntgenstrukturanalyse ungeeignet waren (Abbildung 6.6). Das zum Kristallwachstum erforderliche Reagenz bestand aus: 0.2 M Ammoniumacetat als Salz, 0.1 M Tris-Hydrochlorid bei pH 8.5 als Puffer und 30% v/v Isopropanol für die katalytische Bildung von kristallinartigen Proteinniederschlägen. Darüber hinaus konnten aus Versuchen mit Reagenzien des „Crystal Screen II“ weitere DAip1-Einkristalle erzeugt werden, die in der Abbildung 6.7 zu finden sind.

Abbildung 8.3 DAip1-Einkristall.

Bereits bei einer Konzentration von 3 mg/ml und Tris-Hydroxychlorid als Fällungsreagenz ist es möglich DAip1-Kristalle bei 20°C zu erhalten. Unter diesen Bedingungen fallen die DAip1-Kristalle aus der Lösung in Form von Plättchen aus, erreichen jedoch nicht die erforderliche Größe, um mittels der Röntgenstrukturanalyse untersucht zu werden. Besonders schwer zu erkennen, ist auch hier welchem Kristallsystem der Kristall zugeordnet wird.

**Abbildung 8.4** Änderung des Kristallhabitus durch Änderung der Kristallisationsbedingungen.

Bei ca. 3-4 mg/ml und Polyethylen-Glycol-monomethylether kristallisiert DAip1 bei 4°C mit Änderung des Kristallhabitus (Plättchenförmig zu vermutlich hexagonal).

8.6. Massenspektrometrie

Eine massenspektrometrische Untersuchung wurde mittels der MALDI-TOF-Methode zur Identifizierung von DAip1 angewandt. Die Massenspektrometrie erfolgte im Wege der Charakterisierung für modifizierte Proteine³⁷ durch Protease-katalysierte Proteinspaltung. Hierfür dienten die Proteinbanden von DAip1 der SDS-PAGE. DAip1 wurde zuerst mit Trypsin verdaut, die dabei erzeugten Fragmente in einem Reflektor-TOF gemessen und anschließend mit der MALDI-MS-Methode nachgewiesen. Für die Messung wurden gemäß den Standard-Methoden gleiche Volumina von Proben und der MS-Matrix³⁸-Lösung vermischt, so dass ein Verhältnis von Matrix zu Probe von etwa 10⁴:1

³⁷ Feste Modifizierung durch Carbamidomethyl und variabel Modifizierung durch Oxidation.

³⁸ Vgl. Kapitel 6.

entstand. Die Abbildung 6.8 zeigt die $[M + H]^+$ -Ionengruppen der tryptischen DAip1-Fragmente, deren monoisotopischen Signale analysiert werden konnten.

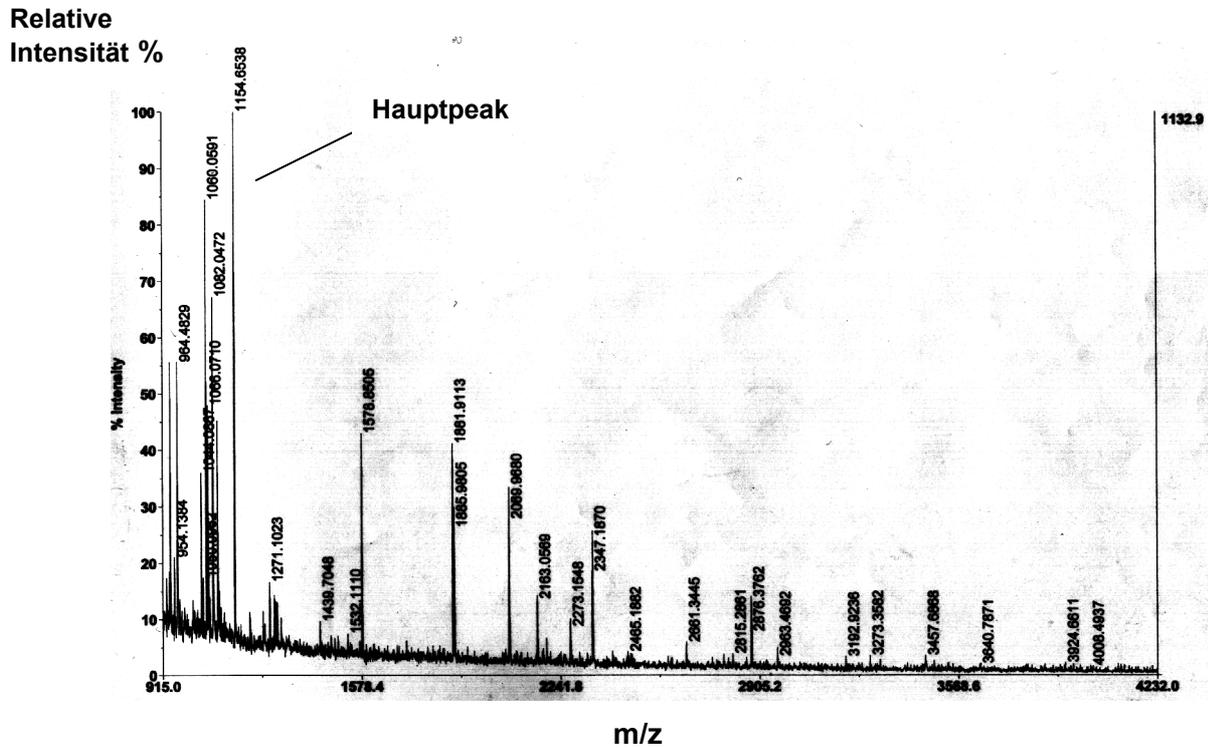


Abbildung 8.5 Massenspektrum von DAip1.

Aufgetragen ist hier die relative Signalintensität der monoisotopischen Signale von Proteinfragmenten gegen m/z . Jedes Signal wird einer geeigneten Sequenz aus der Datenbank „Mascot“ zugeordnet. Das monoisotopische Hauptsignal von DAip1 beträgt 1154,6.

Tabelle 8.1 Gefundene Fragmentmassen bei der MALDI-Analyse von DAip1 nach dem tryptischen Verdau und teilweise Identifizierung der Signale als DAip1-Peptidfragmente.

m/z (MALDI)	m/z, monoisotopisch (experimentell)	m/z, monoisotopisch (berechnet)	Peptidsequenz
963,70	962,69	962,54	LVGTIAFDK
964,63	963,62	963,48	NIAAGDFTR
1071,78	1070,77	1070,61	LVVVGDKER
1154,83	1153,82	1153,65	NIIAPTPATTR
1579,09	1578,08	1577,84	GENIVYASGSSIIR
1882,19	1881,18	1880,90	YAPSGNYIASGVQGNLR
1886,25	1885,25	1884,97	VLNGAILDIAWTSDNQR
2070,28	2069,27	2068,95	AATGSEDFAVNWFEGPPFK

- *Identifizierung der Peptidfragmente in der Aminosäuresequenz von DAip1*

```

1 MSVTLKNIIA PTPATTRGKS VAINGDPKGE NIVYASGSSI IIRNVKNPMV
51 ADIYYEHPCQ TTVAKYAPSG NYIASGDVQG NLRIDWTLQK EHILKATYKV
101 LNGAILDIAW TSDNQRL VVV GDGKERFGAA ILWDSGSSCG EITGHKSMIL
151 SCDIKSTRPF RAATGSEDFV VNWFEQPPFK FQKNIAAGDF TRFVNCVRFV
201 PDGNKLVTVG ADKKAFFVYDG KTGEKLIELN PAQQHTGGIY GCSWSADNNR
251 VLTASADKSC KIWDTTTGQC INSFTFGSDV NDQQLGCLWF GDSLLSVNLA
301 GEISTLNLDD VAKPSRVIK HNKLVGTIAF DKNAGSLYSA SYDASLLQWD
351 LSTGLATNFT GPAHKNQITS IKINGDQLIT CAMDDSVKIS SISKKTYGES
401 IGVDSPAQAV AFSGDVVVAV SMKTIYVIK GKIVSQTAAAT WEPTSVAIND
451 TEVSVGGKDN KIHVFTLSGN NLTASHTLDN HRGAIITDLSY SPCGKYLASG
501 CSNREVIWVS GKEAKSKGWV NHTARINAVA WSNDSKFFVAS ASLDSQIYIW
551 NVENPTASPV QVKNSHLGGV NDVIYGSNNE IFSAGNEGAI KIWYVSN

```

8.7. Diskussion

Da die Erzeugung von Proteineinkristallen zur Röntgenstrukturanalyse hohe Proteinkonzentrationen sowie sehr reine Proteinlösungen erfordert, war u. a. die Gewinnung von DAip1 in großer Ausbeute von besonderer Bedeutung. Die Überexpression des DAip1-Proteins erfolgte daher in den Zellen eines genveränderten *D. discoideum*-Stamm: der 4-1-Stamm. Die native Reinigung der DAip1-Probenlösungen fand mittels Anionenaustauscher- und Kationenaustauscher-Chromatographie statt mit anschließender Gelfiltration, wodurch reines DAip1 erhältlich war. Die Durchflussraten von 0.2 ml/min bei einem Säulenvolumen von 70 ml für die DEAE-Säulenchromatographie und einem Säulenvolumen von ca. 60ml für die Hydroxyapatit-Säule haben sich als sehr effizient jedoch nicht ausreichend für die Trennung des DAip1 von anderen Proteinen in der Lösung erwiesen. Die SDS-Gele der Fraktionen, die mit DAip1 angereichert waren, zeigten nach dem zweiten Reinigungsschritt noch immer einiges an Verunreinigungen. Ein dritter Reinigungsversuch erfolgte deshalb, bei dem eine Gelfiltration angewandt wurde.

Die Reinigung des DAip1-Proteins stellt als solche ein Beispiel der Charakterisierung eines Actin-wechselwirkenden Proteins des *D. discoideum* Cytoskeletts mit Hilfe von klassischen biochemischen Methoden dar. Schwierig war es jedoch, sehr stark konzentrierte DAip1-Lösungen zu erhalten. Bei Konzentrationen oberhalb 3 mg/l, erfährt das DAip1 einen so genannten „Salting-in-Effekt“ und fällt aus der Lösung aus. Dieser „Salting-in-Effekt“ ist die Folge der Existenz von ungenügenden Lösungsmittel-Ionen in der Lösung, so dass die entgegengesetzten Ladungen der Proteinoberflächen durch andere Proteinmoleküle kompensiert werden (Coulomb-Anziehungskraft). Der „Salting-Effekt“ ist auf die Anwesenheit einer großen Anzahl von konkurrierenden Ionen der Proteinoberfläche mit den vorhandenen Ionen in der Lösung zurückzuführen. Mit Hilfe des „Sitting Drop“-Verfahrens und durch Verwendung von „Crystal screens I“ und „Crystal screens II“ war es möglich, DAip1-Einkristalle schon bei niedrigen Konzentrationen zu erzeugen. Diese waren dennoch zu klein und daher ungeeignet für eine Untersuchung durch Röntgenstrukturanalyse. Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des DAip1 mittels Röntgenstrukturanalyse würde in näherer Zukunft einen sehr wichtigen Beitrag zur Aufklärung seiner strukturellen Änderungen bei der Bildung eines Komplexes mit ADF/Cofilin und damit zur Aufklärung seiner spezifischen Bindungen liefern.

A)Anhang

Tabelle A.1 Liste der intraresidualen Protonenresonanzen der amino-terminalen Domäne von CAP

AS	HN	N	C α	CO	C β	H α	H β	Seitenketten
S1	-	-	-	-	-	-	-	-
V2	-	-	-	-	-	-	-	-
K3		-	59.33	78.35	28.03	-	-	-
E4	8.03	123.84	61.95	176.82	34.72			H γ_1 H γ_2 3.06 H γ_2 H γ_1 2.93
F5	8.48	119.60	58.11	176.18	27.87	3.99	3.43 3.68	H δ_1 H δ_2 6.16 H ϵ_2 H ϵ_1 6.22
Q6	8.16	118.52	59.28	178.32	32.00	-	-	-
N7	8.17	118.85	-	177.53	37.63	4.54	-	-
L8	7.35	120.37	58.00	178.51	42.15	4.08	1.43 1.89	H δ_1 H δ_2 0.51 H δ_2 H δ_1 0.71
V9	7.40	122.06	66.28	178.00	31.32	3.39	2.29	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ ⁴⁰ 0.88 H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 0.72
D10	8.74	121.25	57.30	177.65	40.51	4.34	2.73 2.69	
Q11	7.78	116.68	58.53	176.59	28.96	3.88	1.85 1.47	H ϵ_1 H ϵ_2 7.86 H ϵ_2 H ϵ_1 6.69
H12	7.48	112.45	56.91	176.67	35.03	4.96	3.36 3.00	H ϵ_1 .7. 05 H δ_2 6.55
I13	8.18	119.57	59.93	177.42	33.81	4.10	2.70	H γ_{11} H γ_{12} 1.18 H γ_{12} H γ_{11} 0.58 H $\gamma_{2\#}$ 0.84 H $\delta_{1\#}$ -0.29
T14	8.02	119.26	69.39	-	66.21	4.09	4.52	H $\gamma_{2\#}$ 1.28
P15	-	-	65.48	178.32	30.60	4.51	2.34 1.94	-

⁴⁰ Pseudoatomkorrekturen (s. NMR of Proteins and Nucleic Acids, Wiley, 1986)

AS	^N H	N	C ^α	CO	C ^β	^α H	^β H	Seitenketten
F16	6.97	121.84	60.71	178.82	40.02	4.41	3.48	H δ_1 H δ_2 6.86
							3.30	H ϵ_1 H ϵ_2 5.76
V17	8.90	126.06	67.01	176.91	31.66	3.40	2.22	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.08
								H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 0.97
A18	6.68	122.45	55.36	175.55	17.69	4.09	1.14	-
L19	7.97	119.36	57.69	177.88	43.61	4.05	1.64/2.05	H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 1.08
								H $\delta_{2\#}$ H $\delta_{1\#}$ 1.17
S20	8.08	116.41	63.51	174.42	-	4.11	3.90/3.41	-
K21	7.49	117.66	58.44	177.54	32.31	3.72	1.84	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.37
							1.63	
K22	7.21	118.72	57.95	177.65	32.87	3.98	1.90	
							1.73	
L23	7.36	120.07	57.37	176.25	41.94	3.80	1.59	H γ 0.68
							1.40	H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 0.49
								H $\delta_{2\#}$ H $\delta_{1\#}$ 0.13
A24	6.77	115.06	50.75	-	19.99	4.33	0.58	-
P25	-	-	65.07	178.47	31.77	4.30	2.02	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.52
							2.46	H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 1.74
								H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 3.78
								H $\delta_{2\#}$ H $\delta_{1\#}$ 3.61
E26	10.70	118.56	58.94	177.50	27.07	4.28	1.78	H γ_1 H γ_2 2.89
							2.22	
V27	6.48	121.89	65.35	177.55	30.52	3.67	2.01	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 0.65
								H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 0.95
G28	8.02	108.09	47.81	175.66		3.86	-	-
						3.28		
N29	8.71	120.11	55.68	177.69	38.02	4.50	2.92	H δ_{21} 6.92
							2.84	H δ_{22} 7.65
Q30	7.91	121.96	59.89	178.38	29.38	3.95	2.17	H γ_1 H γ_2 2.45
							2.62	
V31	8.61	120.49	66.57	178.24	31.65	3.78	2.18	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 0.97
								H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 1.19
E32	8.36	122.74	60.27	178.99	29.31	4.49	2.15	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 2.35

AS	HN	N	C α	CO	C β	H α	H β	Seitenketten
Q33	7.15	116.78	57.56	177.39	27.38	4.02	2.26	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 2.48 H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 2.72
L34	7.76	121.64	58.37	177.62	41.75	3.98	1.78	H γ 1.44 H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 0.82 H $\delta_{2\#}$ H $\delta_{1\#}$ 1.19
V35	8.73	120.37	67.42	177.68	31.01	3.43	2.20	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.11 H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 0.80
K36	7.23	120.52	59.64	179.01	30.73	3.84	0.55 1.14	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.54 H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 1.28 H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 1.28 H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 2.66
A37	7.74	123.93	55.24	178.45	18.65	4.11	1.72	-
I38	8.67	121.46	65.92	177.72	37.52	3.75	2.19	H $\gamma_{2\#}$ 1.19 H $\delta_{1\#}$ 0.85
D39	8.53	122.98	57.66	179.03	40.39	4.64	2.69 2.83	-
A40	8.04	125.09	54.79	179.72	17.03	4.35	1.77	-
E41	8.75	123.60	60.55	176.69	28.10	3.93	2.08 2.00	H γ_1 H γ_2 2.78
K42	8.73	122.56	60.39	177.56	31.72	3.40	2.16 1.56	H ϵ_1 H ϵ_2 2.38
A43	7.72	120.92	54.85	179.47	17.48	4.20	1.63	-
L44	7.72	122.38	57.93	177.61	41.37	4.09	1.62 1.85	H γ 1.42 H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 0.72
I45	8.09	121.73	66.05	178.47	38.11	3.29	1.51	H γ_{11} H γ_{12} 0.81 H γ_{12} H γ_{11} 1.81 H $\gamma_{2\#}$ 0.82 H $\delta_{1\#}$ 0.33
N46	8.24	119.76	56.95	178.27	39.03	4.35	2.73 3.18	H δ_{21} 6.89 H δ_{22} 7.79
T47	8.99	122.73	67.40	177.12	69.28	3.83	4.40	H $\gamma_{2\#}$ 1.37
A48	8.65	128.65	55.44	177.40	15.47	4.00	0.007	-

AS	HN	N	C α	CO	C β	H α	H β	Seitenketten
S49	7.59	111.22	60.91	175.65	63.49	4.31	4.14	-
Q50	7.50	119.00	55.07	176.31	32.15		2.11 2.46	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 2.47
S51	7.75	116.87	58.33	172.39	66.61	5.34	4.07 3.91	H γ_1 H γ_2 1.66 H γ_2 H γ_1 1.35
K53	8.65	126.40	54.75	-	48.87	3.05	1.79 2.43	H γ_1 H γ_2 1.11 H γ_2 H γ_1 -0.24
P54	-	-	61.67	-	32.24	4.56	1.97 2.08	-
S55	8.26	114.11	57.50	174.95	64.58	4.28	4.18 4.05	-
Q56	8.80	122.60	59.36	177.52	28.71	3.94	2.17 2.03	-
E57	118.28	118.27	60.32	178.54	28.70	3.97	2.06	-
T58	7.65	119.53	66.16	176.23	67.91	4.03	4.14	H $\gamma_{2\#}$ 1.20
L59	8.43	125.16	58.76	177.61	41.44	3.87	1.86 2.19	H γ 1.47 H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 0.95
L60	7.88	116.84	57.61	179.13	41.10	4.00	1.90 1.51	H γ 1.36 -
E61	7.26	118.94	58.89	179.35	29.42	4.10	1.88 2.22	H γ_1 H γ_2 2.24 H γ_2 H γ_1 2.33
L62	8.21	120.77	57.31	178.49	41.90	4.16	1.54 2.17	H γ 2.00 H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 0.93
I63	7.52	109.83	61.15	175.71	38.27	4.42	2.12	H γ_{11} H γ_{12} 1.58 H γ_{12} H γ_{11} 1.32 H $\gamma_{2\#}$ 0.93
K64	7.32	124.68	61.83	-	-	4.97	2.05 1.90	H γ_1 H γ_2 1.44
P65	-	-	66.63	178.14	30.69	4.12	2.38 1.86	-
L66	7.31	117.00	59.12	178.01	41.60	4.06	1.92	H γ 1.75 H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 0.90
N67	7.93	118.24	55.29	177.00	37.48	4.44	2.81 2.94	H δ_{21} 7.50 H δ_{22} 6.42

AS	HN	N	C α	CO	C β	H α	H β	Seitenketten
N68	8.37	122.74	56.10	177.99	37.50	4.48	2.67	H δ_{21} 6.80
							2.96	H δ_{22} 7.07
F69	7.99	120.96	61.36	177.97	39.11	4.66	2.92	H δ_1 H δ_2 7.12
							3.44	H ϵ_1 H ϵ_2 7.22
A70	8.34	121.74	55.59	179.70	18.38	3.95	1.53	-
A71	8.12	122.02	54.82	179.98	17.69	3.95	1.63	-
E72	7.79	121.28	58.91	178.48	29.01	4.20	2.29	H γ_1 H γ_2 2.01
							2.43	
V73	8.01	119.74	67.27	178.66	31.44	3.68	2.69	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 0.96
								H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 1.19
G74	7.69	108.24	47.47	175.55		3.94	-	-
						4.14		
K75	8.16	124.58	59.70	179.34	32.45	4.16	2.02	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.49
								H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 1.69
								H $\epsilon_{2\#}$ H $\epsilon_{1\#}$ 2.73
I76	8.14	120.58	65.32	178.00	39.09	3.75	1.78	H γ_{11} H γ_{12} 1.17
								H γ_{12} H γ_{11} 2.00
								H $\gamma_{2\#}$ 1.00
								H $\delta_{1\#}$ 0.88
R77	7.10	121.58	60.90	177.70	29.70	4.02	2.13	-
							2.29	
D78	8.45	119.06	57.55	177.71	40.68	4.47	2.84	-
S79	7.94	113.31	59.36	174.44	64.01	4.60	4.07	-
N80	7.67	123.05	53.53	180.23	40.79	5.29	2.63	H δ_{21} 7.23
							3.00	H δ_{22} 8.52
R81	7.97	119.53	59.25	176.92	29.58	3.89	-	-
S82	8.21	111.96	57.76	174.66	63.19	4.48	4.14	-
S83	7.43	116.69	58.36	177.70	64.00	4.38	-	-
K84	9.43	131.64	58.18	176.66	58.18	4.28	1.68	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.42
								H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 0.84
F85	9.16	119.70	56.98	175.82	38.06	4.60	3.16	H δ_1 H δ_2 7.30
							2.41	H ϵ_1 H ϵ_2 7.22

AS	HN	N	C α	CO	C β	H α	H β	Seitenketten
V102	5.55	110.55	63.52	-	30.29	3.07	1.86	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 0.58 H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ -0.64
V103	7.51	111.83	60.53	-	31.92	4.71	2.57	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 0.86 -
V104	7.47	125.83	63.26	175.25	32.55	4.06	1.96	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 0.75 H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 0.46
E105	8.29	126.04	53.21	-	-	4.07	2.43 2.07	-
P106	-	-	64.18	175.70	32.62	4.59	2.10 2.48	-
T107	7.27	107.26	58.66	-	67.86	5.03	4.51	H $\gamma_{2\#}$ 1.16
P108	-	-	65.93	177.51	31.89	-	-	-
G109	9.06	109.06	48.55	-	-	3.69 3.88	-	-
P110	-	-	64.94	174.43	32.12	4.29	1.87 2.41	-
H111	7.50	117.99	60.76	177.05	30.97	4.41	3.29 3.78	H ϵ_1 6.83
V112	7.73	120.18	68.37	177.10	31.07	3.39	2.27	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.35 H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 0.94
A113	8.04	123.63	55.67	180.10	17.82	4.00	1.47	-
E114	8.31	122.18	59.26	179.42	29.01	4.08	2.25 2.40	-
M115	7.81	121.50	56.86	178.46	32.89	4.60	2.40	-
R116	8.97	122.64	59.66	177.86	28.75	3.89	-	-
G117	8.04	108.28	47.41	176.98	-	4.04	-	-
S118	7.83	119.71	62.23	176.98	63.46	4.50	4.30 4.10	-
A119	8.06	123.23	55.56	180.07	18.21	4.68	1.85	-
E120	8.74	119.19	57.53	178.17	29.45	5.45	2.03	H γ_1 H γ_2 2.58 H γ_2 H γ_1 2.23
F121	7.50	120.93	61.79	177.26	39.35	4.13	3.25 2.94	H δ_1 H δ_2 7.12 H ϵ_1 H ϵ_2 6.49

AS	HN	N	C α	CO	C β	H α	H β	Seitenketten
Y122	7.41	114.94	61.97	178.90	39.92	4.19	3.50 2.95	H δ_1 H δ_2 7.06
T123	9.73	115.42	66.92	177.90	66.48	4.21	4.73	H $\gamma_{2\#}$ 1.47
N124	9.01	121.92	56.14	178.46	37.40	4.64	2.71 2.96	H δ_{21} 7.16 H δ_{22} 7.48
R125	6.90	120.64	59.57	178.41	30.30	4.02	1.96 2.14	H γ_1 H γ_2 1.54 H γ_2 H γ_1 1.75
I126	7.64	123.20	65.08	178.20	38.68	4.28	2.24	- - H $\gamma_{2\#}$ 1.09 H $\delta_{1\#}$ 0.82
L127	8.49	119.40	58.12	178.71	41.67	3.78	2.29	H δ_1 H δ_2 0.61 H δ_2 H δ_1 0.81
K128	7.71	119.16	59.17	177.91	32.22	4.01	1.94	H γ_1 H γ_2 1.54 H ϵ_1 H ϵ_2 3.01
E129	7.53	118.21	58.67	177.86	30.33	3.89	1.51 1.77	-
F130	8.37	112.51	59.67	176.99	40.65	4.89	2.85 3.62	H δ_1 H δ_2 7.45 H ϵ_1 H ϵ_2 7.51
K131	8.67	126.08	59.68	177.42	31.41	4.11	2.03	H δ_1 H δ_2 1.76
G132	8.94	116.74	45.74	174.23	-	3.84 4.28	-	-
V133	8.18	119.83	63.64	175.80	35.22	4.38	2.12	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.19 H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 0.99
N134	8.54	118.61	52.46	174.75	40.39	5.07	2.82 2.93	H δ_{21} 7.22 H δ_{22} 7.16
Q135	9.02	127.88	57.33	176.76	28.46	3.39	2.29 2.75	H γ 1.95 H ϵ_{21} H ϵ_{22} 6.94 H ϵ_{21} H ϵ_{21} 6.90
D136	7.98	119.73	57.85	178.32	39.59	4.38	2.43 2.95	-

AS	HN	N	C α	CO	C β	H α	H β	Seitenketten
Q137	7.20	117.28	50.00	177.61	28.69	4.37	1.84	-
							1.67	H ϵ_{21} H ϵ_{22} 6.07
								H ϵ_{21} H ϵ_{21} 6.16
V138	6.10	119.10	66.64	178.26	31.48	3.57	2.30	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.10
								H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 1.16
D139	8.88	122.56	57.32	177.70	40.35	4.49	2.75	-
							2.92	
W140	8.57	125.97	63.99	177.75	29.34	4.09	3.91	H η_{2^*} 6.49
							3.42	H ζ_{3^*} 6.12
								H ϵ_{3^*} 6.97
								H ϵ_1 9.10
V141	8.22	117.70	67.28	177.21	32.07	3.57	2.67	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.19
								H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 1.63
S142	8.31	113.76	61.74	177.55	63.42	4.10	4.00	-
N143	8.16	118.39	56.74	176.36	39.81	4.63	2.73	H δ_{21} 6.77
							3.15	H δ_{22} 7.39
Y144	7.29	119.87	61.61	176.79	38.02	3.41	2.20	H δ_1 H δ_2 5.98
							2.10	H ϵ_1 H ϵ_2 6.31
V145	8.42	117.10	67.45	177.86	31.23	3.08	2.03	H $\gamma_{1\#}$ H $\gamma_{2\#}$ 1.09
								H $\gamma_{2\#}$ H $\gamma_{1\#}$ 0.88
N146	8.36	118.28	55.68	177.29	37.12	4.16	2.85	H δ_{21} 6.76
							2.25	H δ_{22} 7.66
F147	7.43	121.99	61.56	175.80	37.42	3.49	2.78	H δ_1 H δ_2 6.57
							2.89	H ϵ_1 H ϵ_2 6.70
L148	7.24	118.18	57.54	177.3	41.78	3.20	1.76	H γ 0.93
								H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ -0.27
								H $\delta_{2\#}$ H $\delta_{1\#}$ 0.30
K149	8.31	122.05	60.44	178.88	32.44	4.43	-	-
D150	8.29	122.99	56.58	178.84	39.25	4.56	1.99	-
							2.62	
L151	8.85	126.64	57.44	177.60	57.44	3.94	-	H γ 1.52
								H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 0.62
								H $\delta_{2\#}$ H $\delta_{1\#}$ 0.98

AS	HN	N	C α	CO	C β	H α	H β	Seitenketten
E152	7.51	121.18	60.35	177.43	29.44	3.61	1.90 2.11	H γ_1 H γ_2 2.31
K153	7.24	119.69	60.21	177.94	32.47	3.90	1.66 1.99	H γ_1 H γ_2 1.43 H δ_1 H δ_2 1.67
Y154	8.32	124.04	61.27	176.94	61.27	4.42	3.43 3.34	H δ_1 H δ_2 6.78 H ϵ_1 H ϵ_2 7.00
I155	8.48	123.43	65.53	177.56	38.62	2.98	1.56	H γ_{11} H γ_{12} -0.80 H $\gamma_{2\#}$ 0.58 H $\delta_{1\#}$ -0.11
K156	7.98	118.66	60.05	177.96	31.78	1.92	-	H γ_{11} H γ_{12} 1.47 H $\delta_{1\#}$ 1.66
Q157	7.67	119.25	58.16	176.99	28.95	3.97	1.78 1.40	-
Y158	7.94	115.13	60.13	175.64	39.99	4.23	1.72 2.32	H δ_1 H δ_2 6.78 H ϵ_1 H ϵ_2 6.98
H159	8.53	121.46	54.18	176.62	32.94	4.99	3.51 2.57	H ϵ_1 6.10 H δ_2 6.47
T160	7.28	113.90	68.49	176.16	70.11	3.69	4.04	H $\gamma_{2\#}$ 1.44
T161	8.16	107.23	60.12	174.60	68.52	5.28	4.86	H $\gamma_{2\#}$ 1.33
G162	7.67	111.70	43.99	173.47	43.99	4.70 3.95	-	-
L163	8.89	124.06	56.19	176.47	42.35	4.25	1.12 1.90	H γ 0.67 H $\delta_{1\#}$ H $\delta_{2\#}$ 0.35 H $\delta_{2\#}$ H $\delta_{1\#}$ 0.32
T164	10.38	129.32	64.67	174.34	64.67	4.16	4.30	H $\gamma_{2\#}$ 1.40
W165	8.16	130.84	56.78	175.85	29.68	5.13	3.72 2.94	H η_{2^*} 7.18 H δ_{1^*} 7.50 H ϵ_{3^*} 6.89 H ϵ_1 10.36
N166	8.78	121.10	49.65	-	39.40	5.25	2.87 2.71	H δ_{21} 7.18 H δ_{22} 7.02
P167	-	-	64.40	177.48	32.30	5.24	2.36 2.57	H γ_1 H γ_2 2.20 H γ_2 H γ_1 2.01

AS	HN	N	C α	CO	C β	H α	H β	Seitenketten
K168	7.72	117.20	55.18	176.94	31.85	4.56	2.15 1.75	H γ_{11} H γ_{12} 1.46
G169	7.98	109.83	44.40	173.88	-	3.57 4.25	-	-
G170	7.98	106.90	44.31	173.96		4.51 3.89	-	-
D171	8.34	120.20	54.04	177.29	41.90	4.81	2.74 2.57	-
A172	9.46	130.18	53.50	177.35	18.87	4.37	1.47	-
K173	8.27	118.74	56.45	180.38	33.16	4.32	1.79 1.92	H γ_1 H γ_2 0.93 H γ_2 H γ_1 1.16
S174	8.17	117.13	58.34	174.52	63.78	4.47	4.33 3.95	-
A175	8.07	127.34	52.62	176.86	19.39	4.45	1.49	-
T176	7.77	119.50	63.10	-	-	4.20	-	H $\gamma_{2\#}$ 1.21

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	<i>Schematische Darstellung von Actinfilamenten</i>	22
Abbildung 2.2	<i>Ordnungsprinzipien von Actinfilamenten</i>	23
Abbildung 2.3	<i>Beweglichkeit der Zellen mit Hilfe von Lamellipodien</i>	24
Abbildung 2.4	<i>Modell zu den möglichen Funktionen der CAP-Proteine</i>	27
Abbildung 2.5	<i>Das RLE/RLE-Motiv (Hubberstey et al., 2001)</i>	28
Abbildung 2.6	<i>Primärsequenzhomologie zwischen dem <i>D. discoideum</i> Aip1</i>	30
Abbildung 2.7	<i>Aip1p-Fingerprintregionen in Actin</i>	31
Abbildung 3.1		33
Abbildung 3.2		35
Abbildung 3.3		36
Abbildung 4.1	<i>Orientierung eines mit Spins $I = \frac{1}{2}$ Teilchens im Magnetfeld</i>	43
Abbildung 4.2	<i>Verteilung von Kernspins auf einem Doppelpräzessionskegel</i>	44
Abbildung 4.3	<i>Richtung der resultierenden makroskopischen Magnetisierung nach einem 90° Puls</i>	44
Abbildung 4.4	<i>Schematische Darstellung eines 1D-NMR-Experiments</i>	50
Abbildung 5.1	<i>Phasendiagramm von Proteinen</i>	63
Abbildung 5.2	<i>Schematische Darstellung des Kristallisationsvorganges von Proteinen aus der Mutterlauge</i>	63
Abbildung 5.3	<i>Kristallzüchtung durch Lösungsdiffusion</i>	65
Abbildung 5.4	<i>Dampfdiffusionstechnik</i>	66
Abbildung 5.5	<i>Kristallzüchtung durch Mikrodialyse</i>	66
Abbildung 7.1		88
Abbildung 7.2		88
Abbildung 7.3		89
Abbildung 7.4	<i>Ermittlung der Nachbarschaftskorrelationen im Sequenzabschnitt S93 bis F98 der Primärstruktur von CAP aus der $^1\text{H}^N$-$^1\text{H}^N$-Region des 3D-^{15}N-NOESY-HSQC-Spektrums</i>	90

Abbildung 7.5	<i>Abschnitt eines $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$-NOESY-Spektrums (rot) in D_2O und $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$-TOCSY-Spektrum (dunkel) in H_2O von CAP, aufeinandergelegt</i>	92
Abbildung 7.6	<i>Abschnitt eines $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$-NOESY-Spektrums in D_2O (rot) und $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$-TOCSY-Spektrum in D_2O (dunkel), aufeinandergelegt. Region der aromatischen Seitenketten</i>	93
Abbildung 7.7	<i>Überlagerung eines $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$-NOESY-Spektrums in D_2O (rot) mit den $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$-TOCSY-Spektren in D_2O (dunkel) und in H_2O (gold)</i>	94
Abbildung 7.8	<i>$2D\text{-}^{15}\text{N}$-HSQC-Spektrum von CAP</i>	95
Abbildung 7.9	<i>$2D\text{-}^{13}\text{C}$-HSQC-Spektrum von CAP</i>	97
Abbildung 7.10	<i>Graphische Darstellung der Anzahl von Abständen pro Aminosäurerest im CAP-Protein</i>	99
Abbildung 7.11	<i>Graphische Darstellung der sequenziellen Konnektivitäten ($i-j < 5$), welche $^1\text{H}^N$, $^1\text{H}^\alpha$ und $^1\text{H}^\beta$-Protonen einbeziehen</i>	100
Abbildung 7.12	<i>Stereodarstellung des Strukturbündels von CAP</i>	103
Abbildung 7.13	<i>Graphische Darstellung der mittleren Atomverschiebungen in den helikalen Regionen im Strukturbündel $\langle SA \rangle$ von CAP, relativ zu einer gemittelten Struktur, $\langle SA \rangle_m$</i>	103
Abbildung 7.14	<i>Stereodarstellung der dreidimensionalen Struktur der aminoterminalen Domäne von CAP (Seitenansicht)</i>	106
Abbildung 7.15	<i>Stereodarstellung der dreidimensionalen Struktur der aminoterminalen Domäne von CAP (Ansicht von oben)</i>	107
Abbildung 7.16	<i>Modell einer monomeren Einheit der Quartärstruktur von CAP</i>	110
Abbildung 7.17	<i>Das CAP-Oktamer</i>	112
Abbildung 8.1	<i>SDS-PAGE der Proteinfractionen der Hydroxyapatitsäule</i>	115
Abbildung 8.2	<i>Gelfiltration von DAip1</i>	116
Abbildung 8.3	<i>DAip1-Einkristall</i>	118
Abbildung 8.4	<i>Änderung des Kristallhabitus durch Änderung der Kristallisationsbedingungen</i>	118
Abbildung 8.5	<i>Massenspektrum von DAip1</i>	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1	<i>Konformationelle Einschränkungen, wichtig für die Bestimmung der Sekundärstruktur eines Proteins</i>	59
Tabelle 5.1	<i>Kristallsysteme bei Proteinen</i>	67
Tabelle 5.2		68
Tabelle 6.1	<i>Reagenzien zur Züchtung von DAip1-Einkristallen</i>	74
Tabelle 6.2	<i>Bakterienstämme</i>	74
Tabelle 6.3	<i>D. discoideum Stämme</i>	74
Tabelle 6.4	<i>E. coli Expressionsvektoren</i>	75
Tabelle 6.5	<i>D. discoideum Expressionsvektoren</i>	75
Tabelle 6.6	<i>Restriktionsenzyme</i>	75
Tabelle 6.7	<i>Proteinmarker für die SDS-Gelelektrophorese</i>	76
Tabelle 6.8	<i>Proteinmarker für die Gelfiltrationsanalyse</i>	76
Tabelle 6.9	<i>CAP-Konstrukte</i>	76
Tabelle 6.10	<i>DAip1-Konstrukt</i>	76
Tabelle 7.1		105
Tabelle 8.1	<i>Gefundene Fragmentmassen bei der MALDI-Analyse von DAip1 nach dem tryptischen Verdau und teilweise Identifizierung der Signale als DAip1-Peptidfragmente</i>	120
Tabelle A.1	<i>Liste der intraresidualen Protonenresonanzen der aminoterminalen Domäne von CAP</i>	122

Literaturverzeichnis

- Abragam, A. (1961). „*Pr. of Nucl. Magn.*”, Clarendon Press, Oxford.
- Aizawa, H., Sutoh, K., Tsubuki, S., Kawashima, S., Ishii, A. & Yahara, I. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 10923-10932.
- Alberts, B., Bray, B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994). „*Mol. Biol. Cell*”, 3rd edition, New York, Garland Publishing.
- Allen, M. P. & Tildesley, D. J. (1987). „*Comp. Simul. of Liquids*”, Clarendon Press, Oxford.
- Aloy, P., Moont, G., Gabb, H. A., Querol, E., Aviles, F. X. & Sternberg, M. J. E. (1998). *Proteins* **33**, 535-549.
- Amberg, D. C., Basart, E. & Botstein, D. (1985). *Struct. Biol.* **2**, 28-35.
- Amos, L. A. & Amos, W. B. (1991). „*Mol. of the Cytoskel.*” Guilford Press, New York.
- Anfinsen, C. B. (1973). *Science* **181**, 223-230.
- Arnold, J. T., Dharmatti, S. S. & Packard, M. E. (1951). *J. Chem. Phys.* **19**, 507.
- Bacon, D. J. & Anderson, F. (1988). *J. Mol. Graph* **6** (4), 219-220.
- Bahn, Y. & Sundstrom, P. (2001). *J. Bacteriol.* **183**, 3211-3223.
- Bax, A. und Marion, D. (1988). *J. Magn. Reson.* **78**, 186-191.
- Benlali, A., Draskovic, I., Hazalett, D. J., & Treismann, J. E. (2000). *Cell* **101**, 271-281.
- Bennett, H. & Condeelis, J. (1988). *Cell Motil Cytoskel.* **11**, 303-317.
- Bernstein, H. J. & Bernstein, C. F. (2001). 'RASMOL 2.7.1.1'. Bellport, New York.
- Bershadsky, A. D., Vasiliev, J. M. (1988). „*Cytoskel.*”. Plenum Press, New York.

- Bloch, F. (1946). *Phys. Rev.* **70**, 460.
- Bodenhausen, G. & Ruben, D. J. (1980). *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185-189.
- Braun, W. & Gö, N. (1985). *J. Mol. Biol.* **186**, 611-626.
- Bray, D. (1992). „*Cell Mov.*”. Garland Publishing, New York.
- Brown, S. S., Yamamoto, K. & Spudich, J. A. (1982). *J. Cell Biol.* **93**, 205-210.
- Brünger, A. T. (1992). 'X-PLOR': *A system for X-ray Crystallogr. and NMR*, Yale University press, New Haven, C.T.
- Carlier, M-F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G., Hong, Y., Chua, N. & Pantaloni, D. (1997), *J. Cell Biol.* **136**, 1307-1322.
- Cavanagh, J. & Rance, M. (1990). *J. Magn. Reson.* **88**, 72-85.
- Chayen, N. E., Shaw Stewart, P. D., Maeder, D. L. & Blow, D. M. (1990). *J. Appl. Crystallogr.* **23**, 297-302.
- Chayen, N. E., Shaw Stewart, P. D., Maeder, D. L. & Blow, D. M. (1992). *J. Cryst. Growth.* **122**, 176-180.
- Chayen, N. E. (1997). *Struct.* **5**, 1269-1274.
- Chayen, N. E. (1998). *Acta Crystallogr.* **D54**, 43-48.
- Ciesler, C. (1993). Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie.
- Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1991). *Prog. NMR Spectrosc.* **23**, 43-92.
- Cornilescu, F., Delaglio, F. & Bax, A. (1999). *J. Biomol. NMR* **13**, 289-302.
- Croasmun, W. R. und Carlson, R. (1994). „*Two-Dimensional NMR Spectroscopy*” 2nd Edition, New York, VCH.
- Drenth, J. (1999). „*P. Protein X-Ray Crystallogr.*”, Springer-Verlag New York, Inc.

- Dosset, P., Hus, J-C., Blackledge, M., Marion, D. (2001). *J. Biomol. NMR.* **16**, 23-28.
- de Hostos, E. L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. & Gerisch, G. (1991). *EMBO J.* **10**, 4097-4104.
- de Hostos, E., Rehfuss, C. L., Bradtke, B., Waddell, D. R., Albrecht, R., Murphy, J. & Gerisch, G. (1993). *J. Cell Biol.* **120**, 163-173.
- Eichinger, L. Bähler, M., Dietz, M., Eckerskorn, C. & Schleicher, M. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 12952-12959.
- Ernst R. R. (1966). *Adv. Magn. Res.* **2**, 1.
- Ernst R. R. & Anderson WA (1966). *Rev.Sci.Instr.* **37**, 93.
- Ernst, R. R., Bodenhausen, G. & Wokaun, A. (1987). „*The p. of nucl. Magn. Res. in one and two dimensions*”, Clarendon, Oxford.
- Ernst, R. R. (1992). *Angew. Chem.* **104**, 817-836.
- Faix, J., Noegel, A. A. & Gerisch, G. (1992). *J. Cell Sci.* **102**, 203-214.
- Faix, J., Steinmetz, H., Boves, H., Kammerer, R. A., Lottspeich, F., Mintert, U., Murphy, J., Stock, A., Aebi, U. & Gerisch, G. (1996). *Cell* **86**, 631-642.
- Fechheimer, M., & Taylor, D.L. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**, 4514-4520.
- Fechheimer, M. & Furukawa, R. (1993). *J. Cell Biol.* **93**, 1169-1176.
- Fedor-Chaiken, M., Deschenes, R. L. & Broach, J. R. (1990). *Cell* **61**, 329-340.
- Fenger, D. D., Carminati, J. L., Burney-Sigman, D. L., Kashevsky, H., Dines, J. L., Elfring, L. K. & Orr-Weaver, T. L. (2000). *Devel.* **127** (22), 4763-4774.
- Field, J. Nikawa, J. -I., Broek, D., MacDonald, B., Rodges, L., Wilson, I. A., Lerner, R. A. und Wigler, M. (1988). *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2159-2165.

- Field, J., Vojtek, A., Ballester, R., Bolger, G., Colicelli, J., Ferguson, K., Gerst, J., Kataoka, T., Powers, S., Riggs, M., Rodgers, L., Wieland, I., Wheland, B. & Wigler, M. (1990). *Cell* **61**, 319-327.
- Friebolin, H. (1988). „*Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*“ Weinheim, VCH.
- Furukawa, R., (1996). *Biochem.* **35**, 7224-7232.
- Gabb, H. A., Jackson, R. M. & Sternberg, M. J. E. (1997). *J. Mol. Biol.* **272**, 106-120.
- García-Ruiz, J. M. & Moreno, A. (1994). *Acta Crystallogr.* **D50**, 484-490.
- Garner, H. und Kay, L. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (1998). **27**, 357-406.
- Gerst, J. E., Rodgers, L., Riggs, M. & Wigler, M. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4338-4342.
- Gieselmann, R. & Mann, K. (1992). *FEBS Lett.* **298**, 149-153.
- Glasel, A. J. & Deutscher, P. M. (1995). „*Intr. to biophys. Meth. Prot. and Nucl. Acid Res.*“, Academic Press, Inc. San Diego.
- Glusker, J. P. & Trueblood, K. N. (1985). *Cryst. Struct. Anal.*, Oxford University Press, New York.
- Goddard, T. D. & Kneller, D. G. (2000). 'SPARKY 3', University of California, San Francisco.
- Goodloe-Holland, C. M. & Luna, E. J. (1984). *J. Cell Biol.* **99**, 71-78.
- Gottwald, U., Brokamp, R., Karakesisoglou, I., Schleicher, M. & Noegel, A. A. (1996). *Mol. Biol. Cell* **7**, 261- 272.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1999) *T. BS* **24**, 364-367.
- Güntert, P. (1993), Doktorarbeit, ETH, Zürich.

- Haugwitz, M., Noegel, A. A., Rieger, D., Lottspeich, F. & Schleicher, M. (1991). *J. Cell Sci.* **100**, 481-489.
- Haus, U., Trommel, P., Fischer, P. R., Hartmann, H., Lottspeich, F., Noegel, A. A. & Schleicher, M. (1993). *EMBO J.* **12**, 3763-3771.
- Hausser, K. H. & Kalbitzer, H. R. (1989). „*NMR für Med. und Biol.*“ Heidelberg, Springer-Verlag.
- Hesse, M., Meier, H., & Zeeh, B. (1995). „*Spektr. Meth. in der org. Chem.*“, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Hirobe, T. (1994). *J. Cell Sci.* **107**, 1679-1686.
- Holmes, D. S. & Quigley, M. (1981). *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W. (1990). *Nature* **347**, 44-49.
- Hubberstey, A. V., & Mottillio E. P. (2002). *The FASEB j.* **16**, 487-499.
- Israel, L. (2003). Doktorarbeit, Physiologisches Institut der L.M.U. München.
- Jackson, R. M., Gabb, H. A. & Sternberg, M. J. E. (1998). *J. Mol. Biol.* **276**, 265-285.
- Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. (1979). *J. Chem. Phys.* **71**, 4546-4553.
- Kalus, W. (1998). Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martiensried.
- Karplus, M. (1963). *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2870-2871.
- Katchalski-Katzir, E., Shariv, I., Eisenstein, M., Friesem, A. A., Aflalo, C. & Wodak, S. J. (1992). *Proc. Nat. Acad. Sci.* **89**, 2195-2199.
- Kawamukai, M., Gerst, J., Field, J., Riggs, M., Rodgers, L., Wigler, M. & Young, D. (1992). *Mol. Biol. Cell* **3**, 167-180.

Kingsten, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K., *Eds.*, 16.2.1-16.2.11, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.

Knight, W. D. (1949). *Phys. Rev.* **76**, 1259.

Koradi, R., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1996). *J. Mol. Graph.*, **14**, 52-55.

Konzok, A., Weber, I., Simeth, E., Hacker, U., Maniak, M. & Müller-Taubenberger, A. (1999). *J. Cell Biol.* **146**, 453-464.

Kraulis, P. J. (1991). 'MOLSCRIPT' *J. of appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.

Kreis, T. E., Vale, R. D. (1993). „*Guidebook to Cytoskeletal and Motor Proteins*“. Oxford University Press, Oxford, UK.

Ksiazek, D. & Brandstetter, H. (2003). eingereicht.

Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1989). *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

Lappalainen, A. & Dubrin, D. G. (1997). *Nature* **388**, 78-82.

LeMaster, D. M. (1993). *JPNMRS* **26**, 371-419 .

Lim, R., Furukawa, R. & Fechheimer, M. (1999). *Biochem.* **38**, 16323-16332.

Lottspeich, F. & Zorbas, H. (Hrsg.) (1998). „*Bioanal.*“ Heidelberg, Berlin, Spektrum Verlag.

Luna, E. J. & Condeelis, J. S. (1990). *Develop. Gen.* **11**, 328-332.

Maelicke, A. & Müller-Esterl, W. (Hrsg.); Voet, D. & Voet J. G. (1992). „*Biochemie*“ Weinheim, VCH.

Marion, D. & Wüthrich, K. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 967-974.

Mattwiw, H., Yu, G. & Young, D. (1992). *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5033-5040.

McCammon, J. A. & Harvey, S. C. (1987). „*Dyn. of prot. and nucl. acids*“, Cambridge University Press, Cambridge.

- Mc Gough, A., Pope, Br., Chiu, W. & Weeds, A. (1997). *J. Cell Biol.* **138**, 771-781.
- McPherson, A. (1990). *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23.
- Moont, G., Gabb, H. A. & Sternberg, M. J. E. (1999). *Proteins* **35** (3), 364-373.
- Muchmore, D. C., McIntosh, L. P., Russell, C. B., Anderson, D. E. & Dahlquist, T. W. (1989). *Meth. Enzym.* **177**, 44-73.
- Mühlhahn, P. (1998). Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. & Smith, T. F. (1994). *Nature* **371**, 297-300.
- Nilges, M., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1988). *FEBS Lett.* **239**, 129-136.
- Nishida, Y., Shima, F., Sen, H., Tanaka, Y., Yanagihara, C., Yamawaki-Kataoka, Y., Kariya, K. & Kataoka, T. (1998). *J. Biolog. Chem.* **273**, 28019-28024.
- Noegel, A., Rivero, F., Albrecht, R., Janssen, K. P., Köhler, J., Parent, C. A. & Schleicher, M. (1999). *J. of Cell Sci.* **112**, 3195-3203.
- Powell, M. J. D. (1977). *Math. Program.* **12**, 241-254.
- Podolski, J. L. & Steck, T. L. (1990). *J. Biol. Chem.* **265** (3), 1312-1318.
- Prasser, J., Stocker, S., Marriott, G., Heidecker, M., Kellermann, J. & Gerisch, G. (1997). *Mol. Biol. Cell* **8**, 83-95.
- Purcell, E. M., Torrey, H. C. & Pound, R. V. (1946). *Phys. Rev.* **69**, 37-38.
- Purcell, E. M. (1946). *Phys. Rev.* **69**, 681.
- Purcell, E. M., Pound, R. V. & Bloembergen, N. (1946). *Phys. Rev.* **70**, 986-987.
- Purcell, E. M., Pound, R. V. & Bloembergen, N. (1946). *Phys. Rev.* **70**, 988.
- Raper, K. (1935). *J. Agr. Res.* **50**, 135-147.
- Rarey, M. (1996). *GMD-Ber.* **268**, R.Oldenbourg Verlag.

- Rarey, M., Kramer, B. & Lengauer, T. (1997). *J. of Computer-Aided Mol. Design* **11**, 369-384.
- Rarey, M., Kramer, B. & Lengauer, T. (1999). *Bioinformatics* **15**, 243-250.
- Rarey, M., Kramer, B. & Lengauer, T. (1999). *Proteins* **34** (1), 17-28.
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T. & Klebe, G. (1996). *J. of Mol. Biol.* **261** (3), 470-489.
- Rarey, M. & Lengauer, T. (2000). *Persp. in Drug Disc. and Design* **20**, 63-81.
- Rarey, M., Wefing, S., & Lengauer, T. (1996). *J. of Computer-Aided Mol. Design* **10**, 41-54.
- Rehm, T., Mavoungou, Ch., Israel, L., Schleicher, M. & Holak, T. A. (2002) *J. of Biomol. NMR*, **23**, 337-338.
- Rehm, T., Huber, R. & Holak, T. A. (2002). *Structure*.
- Riesenberg, D., Menzel, K., Schulz, V., Schuhmann, K., Veith, G., Zuber, G. & Knorre, W. A. (1990). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 77-82.
- Roberts, G. C. (1995). „*NMR Macromol.*,” IRL Press, Oxford.
- Rodal, A. A., Tetreault, J. W., Lappalainen, P., Drubin, D. G. & Amberg, D. C. (1999). *J. Cell Biol.* **145**, 1251-1260.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). 3rd ed., „*Mol. Clon.: A Labor. Man.*“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, CSH, New York.
- Schima, F., Yamawaki-Kataoka, Y., Yanagihara, C., Tamada, M., Okada, T., Karaya, K. & Kataoka, T. (1987). *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1057-1064.
- Senn, H., Eugster, A., Otting, G., Suter, F. & Wüthrich, K. (1987). *Eur. Biophys. J.* **14**, 301-316.
- Smith, J. (2000). La Jolla, California.

- Solomon, I. (1955). *Phys. Rev.* **99**, 559-565.
- Straub, F. B. (1942). *Stud. Szeged.* **2**, 3-15.
- Straub, F. B. & Feuer, G. (1950). *Biophys. Acta* **4**, 445-470.
- Studier, F. W. & Moffat, B. A. (1986). *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Swiston, J., Hubberstey, A., Yu, G. & Young, D. (1995). *Gene* **165**, 273-277.
- Tabor, S., (1990). „*Curr. Prot. in Mol. Biol.*“ (F.A. Ausubel et al., eds) pp. 16.2.1-16.2.11. Greene publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Thierot, J. A. (1997). *J. Cell Biol.* **136**, 1165-1168.
- Toyoshima, H. & Hunter, T. (1994) *Cell* **78**, 67-74.
- Tompa, P. (2002). *TRENDS in Biochem. Sci.* **27**, 527-533.
- Vojtek, A. & Cooper, J. A. (1993) *J. of Cell Sci.* **105** 777-785
- Wüthrich, K. (1986). „*NMR of Prot. and Nucl. Acids*“, Wiley, New York.
- Wüthrich, K., Billeter, M. & Oschkinat, H. (1989). *FEBS Lett.* **242**, 218-224.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). *Gene* **33**, 103-119.
- Yu, G., Swiston, J. und Young, D. (1994). *J. Cell Sci.* **107**, 1671-1678.
- Zelicof, A., Gatica, J. & Gerst, J. E. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 13448-13453.
- Zhou, G., Yamamoto, T., Ozoe, F., Tanaka, K., Matsuda, H. & Kawamukai, M. (2000). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 149-159.