

**Strukturelle und dynamische  
Untersuchungen der C1-Domäne des Ras-  
Effektors Nore1 mit Hilfe der NMR-  
Spektroskopie**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Physik  
der Universität Dortmund

Elena Guiberman

Dezember 2003

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 NMR-Spektroskopie .....	5
1.1.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie .....	5
1.1.2 NMR in Proteinuntersuchungen .....	6
1.1.3 Beschreibung der NMR-Experimente für die Zuordnung der Signale und Strukturaufklärung eines Proteins.....	7
1.1.3.1 Übertragung der Magnetisierung zwischen Spins in NMR- Experimenten .....	7
1.1.3.2 Zuordnungsmethode und Strukturaufklärung .....	8
1.1.3.3 Dichte-Operator-Formalismus .....	9
1.1.3.4 Anwendung des Produkt-Operator-Formalismus auf ein NOESY- HSQC- und ein TOCSY-HSQC-Experiment.....	11
1.1.3.5 Beschreibung weiterer für Zuordnung und Strukturaufklärung verwendeter Pulsfolgen.....	17
1.1.4 Relaxation .....	21
1.2 Biologische Einleitung.....	23
1.2.1 Nore1 als potentieller Ras-Effektor .....	23
1.2.2 C1-Domäne .....	24
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	24
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.1 NMR-Spektroskopie .....	26
2.1.1 Proteine .....	26
2.1.2 Probenvorbereitung.....	27
2.1.3 Allgemeine Messbedingungen.....	27
2.1.4 Aufnahmeparameter.....	27
2.1.5 Prozessierung der NMR-Spektren .....	28
2.2 Auswertung der NMR-Spektren .....	29
2.2.1 Zuordnung von Signalen.....	29
2.2.2 Bestimmung der Relaxationsraten von Rückgratstickstoffatomen.....	29
2.2.3 <sup>15</sup> N-HSQC-Titration von Nore1 <sub>95-358</sub> mit Ras.....	29
2.3 Bestimmung der Struktur der C1-Domäne von Nore1 .....	30

2.3.1 Distanzen und Winkel.....	30
2.3.1.1 Abstände .....	30
2.3.1.1.1 Zinkbindungstasche .....	30
2.3.1.2 Wasserstoffbrücken.....	31
2.3.1.3 Dihedrale $\theta$ -Winkel.....	31
2.3.1.4 Dihedrale $\psi$ -Winkel .....	32
2.3.2 Sekundärstrukturbestimmung .....	32
2.3.3 Strukturrechnung mit CNS (Crystallography & NMR System) .....	33
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1 Die NMR-Struktur der C1-Domäne von Nore1.....	34
3.1.1 Zuordnung.....	34
3.1.1.1 Zuordnung mit Hilfe homonuklearer 2D-Spektren.....	34
3.1.1.1.1 Identifizierung der Spinsysteme .....	34
3.1.1.1.2 Sequentielle Zuordnung der Spinsysteme mit Hilfe von 2D-Spektren .....	35
3.1.1.2 Zuordnung mit heteronuklearen Spektren .....	36
3.1.1.2.1 Dreifach-Resonanz-Experimente.....	37
3.1.1.2.2 $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC .....	38
3.1.1.2.3 HCCH-COSY .....	39
3.1.1.3 Darstellung der Zuordnung.....	39
3.1.1.3.1 HSQC.....	39
3.1.1.3.2 Darstellung der chemischen Verschiebungen in Form einer Tabelle.....	42
3.1.2 Analyse der Sekundärstruktur.....	44
3.1.2.1 Analyse der Sekundärstruktur mit Hilfe skalarer Kopplungen und chemischer Verschiebungen .....	44
3.1.2.1.1 Kopplungskonstanten.....	44
3.1.2.1.2 Chemische Verschiebungen.....	47
3.1.2.1.3 Auswertung der J-Kopplungen und der chemischen Verschiebungen zur Bestimmung der Sekundärstruktur .....	47
3.1.2.2 Analyse der Sekundärstruktur mit NOEs.....	49

3.1.2.2.1 $\beta$ -Faltblätter .....	49
3.1.2.2.2 $\alpha$ -Helix .....	50
3.1.2.3 Identifizierung nicht strukturierter Regionen mit $^1\text{H}\{-^{15}\text{N}\}$ -NOE-Spektren und Relaxationszeiten .....	51
3.1.3 3D-Struktur von Nore1 .....	54
3.1.3.1 Berechnung .....	54
3.1.3.2 Qualität der Struktur .....	58
3.1.3.3 Tertiärstruktur der C1-Domäne von Nore1 .....	61
3.3 Untersuchung der Rolle der C1-Domäne von Nore1 bei der Bindung von Ras. ....	62
3.3.1 Titration von C1-RBD mit RAS .....	62
3.3.1.1 $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren .....	62
3.3.1.2 $^{15}\text{N}$ -Relaxationsmessungen .....	66
3.3.1.3 Ermittlung der Dissoziationskonstanten .....	67
3.3.2 Bindungsoberfläche von C1-Domäne zu RBD .....	70
3.3.2.1 Ermittlung der Bindungsoberfläche .....	70
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>71</b>
4.1. Einige Anmerkungen zur Datenauswertung .....	71
4.1.1 Anzahl der Resonanzen in HSQC-Spektren .....	71
4.1.2 Wasserstoffbrücken .....	72
4.1.3 $\alpha$ -Helix .....	73
4.2 Strukturrechnung .....	73
4.2.1 Rechnung mit vierfach koordiniertem Zink .....	73
4.2.2 Energiefunktion in CNS .....	74
4.3 Vergleich mit anderen C1-Domänen .....	75
4.4 Titration .....	77
4.4.1 Diskussion der Dissoziationskonstanten .....	77
4.5 Diskussion der Bindungsoberfläche .....	80
4.5.1 Vergleich der Bindungsoberfläche von C1 an RBD von Nore1 mit der Bindungsoberfläche von Ras an RBD von Byr2 .....	80
4.5.2 Vergleich mit der membranbindenden Oberfläche der C1 von PKC $\gamma$ und C1 von Raf1 .....	82

4.6 Vorgeschlagener Mechanismus für die Rolle der C1-Domäne in der Signalübertragung .....	85
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>87</b>
<b>Referenzen</b> .....	<b>88</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>94</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>96</b>
A1 Programm zur automatischen NOE-Suche in C++ .....	96
A2 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ Abstände zur Berechnung der Struktur .....	100

# 1 Einleitung

## 1.1 NMR-Spektroskopie

### 1.1.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die magnetische Kernspinresonanz (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) wurde 1938 zum ersten Mal in einem Atomstrahl beobachtet. [1]. 1945 fanden Purcell, Torrey und Pound NMR-Signale in kondensierter Materie (Wachs) [2]. Gleichzeitig wurden NMR-Signale von Bloch, Hansen und Packard im Wasser beobachtet [3]. Dies waren die Anfänge der heute weit verwendeten NMR-Spektroskopie.

Mit Hilfe dieser Methode werden heutzutage verschiedene Materialien untersucht wie z. B. kleine Moleküle, Festkörper oder biologische Makromoleküle. NMR wird sowohl in Wissenschaft und Industrie als auch in der Medizin verwendet.

Der nukleare Magnetismus basiert darauf, dass viele Kerne einen quantisierten Drehimpuls, Spin  $\vec{I}$ , und ein damit verbundenes magnetisches Moment  $\vec{m} = \hbar g \vec{I}$  haben. Dabei sind  $g$  das gyromagnetische Verhältnis, das für jeden Kern spezifisch ist, und  $\hbar$  das Plancksche Wirkungsquantum dividiert durch  $2\pi$ . Das magnetische Moment eines Kerns koppelt an das äußere Magnetfeld  $\vec{B}$ . Dabei bekommen Kerne mit entgegengesetzten Spins verschiedene Energien  $E = -\vec{m} \cdot \vec{B}$  (Bild 1-1). Für den Spin  $\frac{1}{2}$  ist der Energieunterschied  $\Delta E = \hbar g B$ , wobei  $B$  der Betrag von  $\vec{B}$  ist. Übergänge zwischen den zwei Zuständen werden bei Einstrahlung des magnetischen Wechselfeldes mit der Resonanzfrequenz  $gB$  angeregt. Die Resonanzfrequenz hängt über  $g$  von der Art des Kerns, aber auch von dessen Umgebung ab, weil diese das äußere Feld abschirmen kann. Dadurch haben gleiche Kerne in verschiedenen Umgebungen verschiedene Resonanzfrequenzen. Dieser Effekt heißt chemische Verschiebung [4]. Dank ihm ist es möglich, mit Hilfe der NMR verschiedene Materialien einschließlich Proteine zu untersuchen.

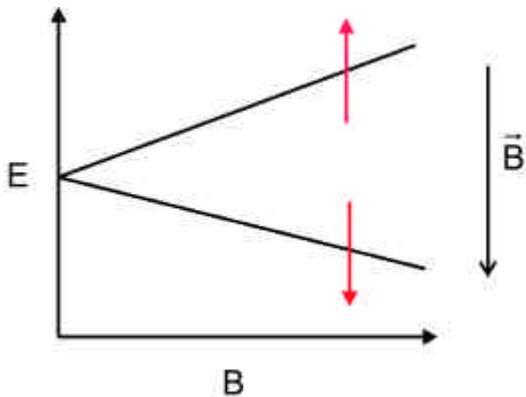


Abbildung 1-1: Die Aufspaltung der Energie  $E$  im äußeren Magnetfeld  $\vec{B}$ . Rot sind zwei entgegengesetzte Spins dargestellt.

### 1.1.2 NMR in Proteinuntersuchungen

In letzter Zeit ist die Proteinstrukturaufklärung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie sehr verbreitert. Um die 4000 gelöste NMR-Strukturen sind in der PDB Datenbank hinterlegt. Die NMR-Technik entwickelt sich sehr schnell. Heutzutage können Strukturen von Proteinen bis zu 150 kD mit Hilfe dieser Methode aufgeklärt werden. Viele Proteine sind zwar größer als 150 kD, aber sie bestehen aus kleineren Domänen. Domänen sind Teile eines Proteins, die selbständig ihre drei-dimensionale Struktur einnehmen. Während der Evolution wurden oft existierende Domänen neu kombiniert, was zur Entstehung neuer Proteine führte. Die Struktur einer Domäne im Protein gleicht der in einer freien Domäne. Dieser Befund erlaubt strukturelle und funktionelle Untersuchungen an einzelnen Domänen, die oft mit Hilfe der NMR durchführbar sind. Das verbreitet deutlich das Anwendungsgebiet der NMR-Spektroskopie.

Aus den NMR-Spektren kann man sowohl strukturelle, als auch dynamische Informationen erhalten. Messungen von Relaxationzeiten ermöglichen es, die Beweglichkeit von Rückgrad und Seitenketten eines Proteins einzuschätzen. Die NMR hat sich als eine leistungsfähige Methode bei der Untersuchung der Protein-Protein- und Protein-Ligand-Bindung erwiesen. In der Tat ändert sich bei der Bindung eines Ligands die Umgebung der beteiligten Spins. Wenn die Signale der einzelnen Atomgruppen zugeordnet sind, kann man sehen, welche Aminosäuren an der Bindung beteiligt sind.

## 1.1.3 Beschreibung der NMR-Experimente für die Zuordnung der Signale und Strukturaufklärung eines Proteins

### 1.1.3.1 Übertragung der Magnetisierung zwischen Spins in NMR-Experimenten

Um Signale aus NMR-Spektren den einzelnen Atomen von Aminosäuren der Peptidkette zuzuordnen und damit eine Proteinstrukturaufklärung durchzuführen, werden mehrere NMR-Experimente gemacht. Dabei werden Übergänge bei einigen Spins angeregt und auf andere Spins übertragen. Die Übertragungswege sind spezifisch für jede Pulsfolge. Es gibt zwei Wechselwirkungen, die in der NMR-Spektroskopie für Magnetisierungstransfer verwendet werden. Das sind skalare Spin-Spin-Kopplung und auf dipolaren Kopplungen zwischen Kernen basierender Kern-Overhauser-Effekt (NOE) [5]. Wenn ein Spin angeregt wird, kann er seine Energie an einen anderen Spin abgeben, mit dem er dipolar gekoppelt ist. Dieser Effekt wird in NOESY-Experimenten benutzt. Direkte oder dipolare Kopplungen entstehen durch Wechselwirkung von zwei magnetischen Dipolen in einem Magnetfeld miteinander. Der säkulare, mit dem Zeemann-Operator vertauschbare, Teil dieser Wechselwirkung in Operatorform der Quantenmechanik wird durch:

$$H_{jk}^{dd} = -\frac{\mathbf{m}_0}{4r_{jk}^3} \mathbf{g}_j \mathbf{g}_k \hbar (3 \cos^2 \Theta_{jk} - 1) (I_{jz} I_{kz} - \frac{1}{4} (I_{j+} I_{k-} + I_{k+} I_{j-}))$$

wobei  $\Theta_{jk}$  der Winkel zwischen dem Vektor, der beide Spins verbindet, und der Richtung des äußeren Magnetfelds ist,  $r_{jk}$  der Abstand zwischen Spins und  $\mathbf{m}_0$  eine Permeabilitätskonstante sind. Dabei sind  $I_+$  und  $I_-$  durch  $I_+ = I_x + iI_y$  und  $I_- = I_x - iI_y$  gegeben.  $I_x$ ,  $I_y$  und  $I_z$  sind die Projektionen des Spin-Operators auf die entsprechenden Achsen. Die Übertragung der Energie findet nur zwischen räumlich benachbarten Atomen statt, weil die Wahrscheinlichkeit dafür mit  $(1/r_{jk})^6$  abfällt.

Skalare oder indirekte Kopplungen werden durch gepaarte Bindungselektronen vermittelt. Diese Kopplungen wirken auch über mehrere Bindungen hinweg, werden aber immer schwächer mit der wachsenden Anzahl der Bindungen. Der säkulare Teil von skalaren oder J-Kopplungen wird durch  $H_{jk}^J = J I_{jz} I_{kz}$  gegeben, wobei  $J$  eine

Kopplungskonstante ist. Alle in der Arbeit verwendeten Pulsfolgen mit Ausnahme vom  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Experiment benutzen diese Art von Kopplungen zum Magnetisierungstransfer.

### 1.1.3.2 Zuordnungsmethode und Strukturaufklärung

Bei der Zuordnung der einzelnen Resonanzen aus den 3D-Spektren zu Atomen wurden folgende dreidimensionale Experimente verwendet:  $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC, HNCACB, HCCONH, CCONH und HCCH-COSY. Die Zuordnungsmethode ist in [6] beschrieben. Für größere Proteine wird eine größere Anzahl von Spektren benutzt.

Im TOCSY-HSQC können Stickstoffprotonen mit ihren zugehörigen Spin-Systemen, aliphatischen H-Atomen der jeweiligen Aminosäure, verbunden werden. HNCACB, HCCONH, CCONH sind Dreifach-Resonanz-Experimente, die einen Kohärenztransfer zwischen  $\text{H}_\text{N}$ -Atomen einer Aminosäure und den entsprechenden Atomen der vorherigen Aminosäure hervorrufen. Für HNCACB sind es  $\text{C}_\alpha$  und  $\text{C}_\beta$ , für HCCONH aliphatische Protonen und für CCONH aliphatische Kohlenstoffatome der vorherigen Aminosäure. In Bild 1-2 ist ein Peptid mit den zugehörigen skalaren Kopplungen schematisch dargestellt. Zum Beispiel sind ein Carbonyl-Kohlenstoffatom (CO) eines Aminosäurerestes, ein Stickstoff (N) und ein  $\text{H}_\text{N}$ -Atom des nächsten Aminosäurerestes der Proteinsequenz innerhalb des quadratischen Rahmens zu sehen. Im Laufe eines HNCO-Experimentes wird die Magnetisierung am  $\text{H}_\text{N}$  erzeugt, durch den Stickstoff an das Carbonyl-Kohlenstoffatom transportiert und dann wieder zurück an das  $\text{H}_\text{N}$  zum Detektieren übertragen.

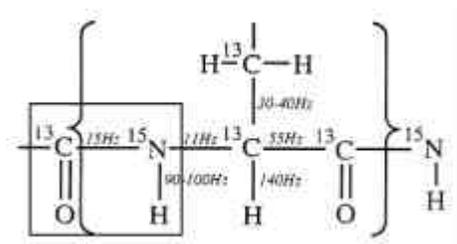


Abbildung 1-2: Ein Ausschnitt aus einer Aminosäurenkette. In den Klammern ist ein Aminosäurerest eingeschlossen. Kopplungskonstanten sind aufgetragen.

Mit Hilfe von TOCSY-HSQC und Dreifach-Resonanz-Experimenten kann man die vollständige Peptid-Kette zuordnen. Einige Aminosäuren lassen sich eindeutig durch ihre  $C_{\alpha}$ - und  $C_{\beta}$ -Resonanzen identifizieren (z. B. Alanin  $C_{\alpha}=52.5$ ,  $C_{\beta}=19.1$  und Glycin  $C_{\alpha}=45.1$ ). Die chemischen Verschiebungen von  $C_{\alpha}$ -Atomen liegen im Bereich zwischen 50 und 63 ppm bei allen Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin. Die charakteristischen chemischen Verschiebungen von Alkoholen ermöglichen es, Serin und Threonin von allen anderen Aminosäuren zu unterscheiden, weil ihre  $C_{\beta}$ -Frequenzen stark zu den höheren Frequenzen verschoben sind und damit im Spektrum unter  $C_{\alpha}$  ( $C_{\beta}=63.8$  für Serin und  $69.8$  für Threonin) liegen. Die anderen Aminosäuren werden aus dem Vergleich von Spinmustern mit der Proteinsequenz zugeordnet.

Wenn die Zuordnung der Atome abgeschlossen ist, können NOEs aus  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-,  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC- und  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC-Spektren extrahiert werden. Mit Hilfe des HNHA-Spektrums werden skalare Kopplungskonstanten gemessen und in dihedrale Winkel umgerechnet (Kapitel 2.3.1.3 und 3.1.2.1.1). Aus den NOEs werden Abstände (Kapitel 2.3.1.1) ermittelt. Mit diesen Abständen und mit den dihedralen Winkeln werden eine Moleküldynamik-Simulation und eine anschließende Minimierung der Energiefunktion (Kapitel 2.3.3 und 3.1.3.1) durchgeführt. Diese Energien ergeben sich als Abweichungen der gerechneten Werte von den idealen Geometrien und den experimentellen Daten.

### 1.1.3.3 Dichte-Operator-Formalismus

Um die Pulsfolgen für NMR-Experimente zu beschreiben, muss ein passender Formalismus eingeführt werden. Während der Schrödinger-Formalismus der Quantenmechanik keine direkte Beschreibung eines Ensembles identischer Spin-Systeme erlaubt [7], ist der Dichte-Operator-Formalismus gut dafür geeignet. Ein Dichte-Operator wird für reine Zustände folgendermaßen definiert:  $\mathbf{s} = |\mathbf{y}\rangle\langle\mathbf{y}|$ , wobei  $\mathbf{y}$  eine Wellenfunktion ist und eine „bracket“ Schreibweise in Dirac Notation verwendet wird. Eine wichtige Eigenschaft dieses Operators besteht darin, dass der Dichte-Operator des Ensembles durch die Summe einzelner Dichte-Operatoren gegeben wird. Er beschreibt

einen gemittelten Spin und ist gut für die Berechnung der zeitlichen Entwicklung der Mittelwerte verwendbar.

Die zeitliche Entwicklung des Dichte-Operators lässt sich als Lösung der Liouville-von-Neumann-Gleichung ausdrücken

$$\mathbf{s}(t) = \exp(-iHt)\mathbf{s}(0)\exp(iHt) \quad (1-1),$$

wobei  $H$  der Hamilton-Operator des Spinsystems ist. Der Hamilton-Operator kann bei freier Präzession für ein Zwei-Spin-System in der Form

$$H(\text{präz}) = -\Omega_I I_z - \Omega_S S_z + J I_z S_z \quad (1-2)$$

und während des Pulses (z. B. x-Pulses) in der Form

$$H(\text{puls}) = -\omega_I I_x - \omega_S S_x \quad (1-3)$$

beschrieben werden, wobei  $\omega_I = \gamma_I B_I$  und  $\omega_S = \gamma_S B_S$  die Stärken der RF-Felder  $\vec{B}_I$  und  $\vec{B}_S$ ,  $\Omega_I$  und  $\Omega_S$  die Präzessionsfrequenzen in den rotierenden Koordinatensystemen und  $J$  die Kopplungskonstante zwischen den Spins I und S sind.

Für zwei zyklisch kommutierende Operatoren A und B ( $[A, [A, B]] = B$ ) gilt die folgende Gleichung:

$$\exp(-i\Theta A) B \exp(i\Theta A) = B \cos \Theta + i[A, B] \sin \Theta \quad (1-4).$$

Das ist die Master-Gleichung des Produkt-Operator-Formalismus [8], die eine zeitliche Entwicklung des Dichte-Operators (Gl. 1-1) während einer Pulsfolge (Pulse und Zeiten für freie Präzession) wiedergibt. Der Produkt-Operator Formalismus wird im Folgenden benutzt, da er für die Beschreibung der Pulsfolgen sehr gut geeignet ist und in der Literatur am Häufigsten verwendet wird.

### 1.1.3.4 Anwendung des Produkt-Operator-Formalismus auf ein NOESY-HSQC- und ein TOCSY-HSQC-Experiment

#### NOESY-HSQC

Das  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum liefert NOEs zwischen  $\text{H}_\text{N}$ -Protonen und den aliphatischen Protonen. Die Anwesenheit und die Stärke des NOEs ist ein Maß für den räumlichen Abstand zwischen zwei Atomen. Das Experiment [9] besteht aus einer NOESY- und einer HSQC-Pulssequenz. Der NOESY-Teil des Experimentes erzeugt NOEs und die HSQC-Pulsfolge dient als  $^{15}\text{N}$ -Filter um alle NOEs zu einem  $\text{H}_\text{N}$ -Atom auszuwählen. Das hilft Überlappungen im NOESY-Spektrum aufzulösen.

Zuerst wird eine NOESY-Pulsfolge verwendet:

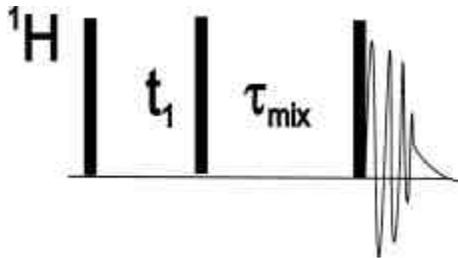


Abbildung: 1-3: NOESY-Pulsfolge. Durch Rechtecke sind  $90^\circ$  Pulse dargestellt.  $90^\circ$  Pulse drehen eine Magnetisierung um  $90^\circ$  um eine entsprechende Achse.

Ein  $90^\circ$  x-Puls erzeugt die transversale Magnetisierung. Nach diesem Puls nimmt der Spin-Dichte-Operator  $\mathbf{S}$  die folgende Form an:

$$\mathbf{S}(0) \sim (I_y + S_y)$$

Während  $t_1$  präzedieren die Spins und werden dadurch mit den Larmor-Frequenzen markiert. Das Zweig-Diagramm der Master-Gleichung sieht folgendermaßen aus:

$$I_y \xrightarrow{S_z(\Omega_I t_1)} \begin{cases} I_y \\ I_x \end{cases} \qquad S_y \xrightarrow{S_z(\Omega_S t_1)} \begin{cases} S_y \\ S_x \end{cases}$$

Die Frequenzmarkierung wird auf die z-Komponente durch den zweiten  $90^\circ$  x-Puls übertragen. Danach ist die Spin-Dichte durch

$$\mathbf{s}(x) \sim [-I_z \cos(\Omega_I t_1) + I_x \sin(\Omega_I t_1)] + [-S_z \cos(\Omega_S t_1) + S_x \sin(\Omega_S t_1)]$$

gegeben. Wenn der zweite  $90^\circ$  Puls in der  $-x$ -Richtung gegeben wird, erhält man

$$\mathbf{s}(-x) \sim [I_z \cos(\Omega_I t_1) + I_x \sin(\Omega_I t_1)] + [S_z \cos(\Omega_S t_1) + S_x \sin(\Omega_S t_1)].$$

Die x-Komponente wird weder von  $90_x$  noch von  $90_{-x}$  Pulsen beeinflusst, wobei die y-Komponente in die  $-z$ -Richtung im Falle des  $90_x$  und in die z-Richtung im Falle des  $90_{-x}$  übertragen wird. Wenn zwei Experimente mit x und  $-x$  Phasen des zweiten Pulses nacheinander durchgeführt und ihre Ergebnisse voneinander subtrahiert werden, heben sich die Signale von  $I_x$  und  $S_x$  gegenseitig auf. Daher reicht es aus, am Anfang der Mischzeit nur die z-Terme zu betrachten. Die z-Magnetisierung weicht zu diesem Zeitpunkt von dem Gleichgewichtswert ab, zu dem die Magnetisierung während der Mischzeit ( $t_m$ ) zurückrelaxiert. Nach der Kurz-Zeit-Näherung (Mischzeit ist viel kleiner als die longitudinale Relaxationszeit  $t_m \ll T_1$ ) der Solomon-Gleichungen [10] wird die Magnetisierung am Ende der Mischzeit  $t_m$  durch die folgende Formel gegeben,

$$\langle I_z(t_m) \rangle \sim -\cos(\Omega_I t_1)(1 - R_{II} t_m) + R_{IS} t_m \cos(\Omega_S t_1) + (R_{II} + R_{IS}) t_m \quad (1-5)$$

wobei  $R_{II}$  eine Autorelaxationsrate und  $R_{IS}$  eine Kreuzrelaxationsrate sind. Der erste aus  $-I_z$  generierter Term ist mit der Frequenz  $\Omega_I$  markiert und wird während der Mischzeit nicht auf einen anderen Spin übertragen. Der zweite Term, der von  $-S_z$  stammt, wurde während  $t_1$  mit  $\Omega_S$  markiert und wird während der Mischzeit durch Kreuz-Relaxation in  $I_z$  umgewandelt. Das ist der Kern Overhauser Effekt. Der dritte Term wurde durch die

longitudinale Relaxation neu gebildet und hat keine frequenz-markierte Vorgeschichte. Dieser Term wird durch die Phasen-Zyklen aufgehoben.

An dieser Stelle erfolgt eine Umbenennung von I zu  $H^a$  und von S zu  $H^b$ , weil die beiden Spins Protonen-Spins darstellen. Damit sieht der Magnetisierungsweg während der NOESY-Pulsfolge folgendermaßen aus:

$$H_z^a \xrightarrow{90^H} H_y^a \xrightarrow{t_1} H_y^a(\Omega_a t_1) \xrightarrow{90^H} H_z^a \xrightarrow{NOE} H_z^b \xrightarrow{90^H} H_y^b$$

Ein Beispiel eines NOESY-Spektrums ist in Bild 1-4 zu sehen.

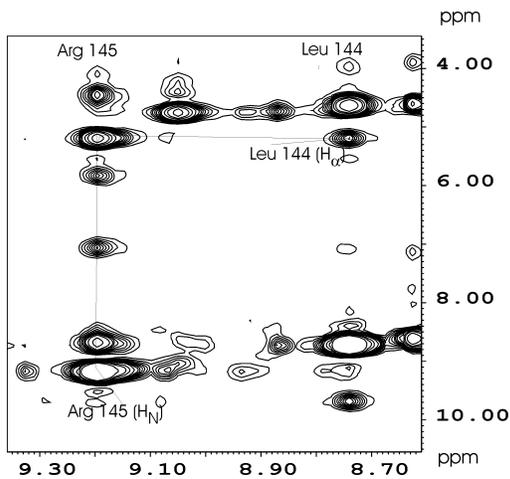


Abbildung 1-4:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Ebene aus einem Noesy-HSQC-Spektrum des Proteins Nore1 ( $^{15}\text{N}=120.388$ ).

Während  $t_1$  wird bei der NOESY-HSQC-Pulsfolge die  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung durch einen  $180^\circ$  Puls gegeben.

Nach der NOESY-Pulsfolge wird eine HSQC -Pulsfolge [8] angewendet (Bild 1-5). Der Magnetisierungsweg während der HSQC-Pulsfolge sieht folgendermaßen aus:

$$H_y^b \xrightarrow{H_z N_z (J2t)} H_x^b N_z \xrightarrow{H_y (90) N_x (90)} H_z^b N_y \xrightarrow{N_z (\Omega_N t_2)} H_z^b N_y (\Omega_N t_2) \xrightarrow{H_x (90) N_x (90)} -H_y^b N_z$$

$$\xrightarrow{H_z N_z (J2t)} -H_x^b \xrightarrow{H_z (\Omega_b t_3)} -H_x (\Omega_a t_1, \Omega_N t_2, \Omega_b t_3)$$

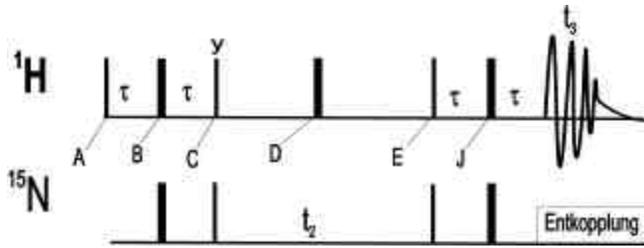


Abbildung 1-5: HSQC-Pulsfolge. Durch schmale bzw. breite Rechtecke sind  $90^\circ$  bzw.  $180^\circ$  Pulse dargestellt.

Zwischen den Punkten A und C (Abbildung 1-5) für die Zeit  $2\tau$  wird die skalare Kopplung aktiv. Dieser Teil der Pulsfolge ist eine INEPT-Sequenz [11]. In der Mitte dieser Periode werden  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -  $180^\circ$  Pulse verwendet um die Wirkung der Larmor-Präzession zu kompensieren (B). Der Spin-Dichte-Operator im Punkt C, der weiter zum detektierten Signal führt, wird folgendermaßen gegeben:

$$\mathbf{s}_b(H_z N_z (J2t)) \sim H_x^b N_z \sin(J2t) \quad (1-6)$$

Dann werden gleichzeitig zwei  $90^\circ$  Pulse gegeben:

$$\mathbf{s}_b(H_y(90)N_x(90)) \sim H_z^b N_y \sin(J2t) \quad (1-7)$$

Später präzedieren  $^{15}\text{N}$ -Spins mit den Frequenzen  $\Omega_N$ , währenddessen werden die  $^1\text{H}$ -Spins durch einen  $180^\circ$  Puls (D) entkoppelt. Im Punkt E sieht der Spin-Dichte-Operator folgendermaßen aus:

$$\mathbf{s}_b(N_z(\Omega_N t_2)) \sim H_z^b N_y \cos(\Omega_N t_2) \quad (1-8)$$

Durch die anschließenden  $90^\circ$  Pulse wird die Kohärenz  $-H_y^b N_z$  gebildet:

$$\mathbf{s}_b(H_x(90)N_x(90)) \sim -H_y^b N_z \cos(\Omega_N t_2) \quad (1-9)$$

Danach wird die Magnetisierung durch die skalare Kopplung auf den  $H^b$ -Spin übertragen, der zu präzedieren beginnt. Dieses Signal wird letztendlich detektiert, wobei die anderen Magnetisierungstransportwege durch Phasen-Zyklen aufgehoben werden. Die einfachsten Phasen-Zyklen für HSQC-Experimente sind in [9] beschrieben. Ein Beispiel eines HSQC-Spektrums mit der Zuordnung der C1-Domäne von Nore1 ist im Kapitel 3.1.1.3.1 zu sehen.

### TOCSY-HSQC

Das Experiment besteht ähnlich wie das NOESY-HSQC aus zwei Teilen: einem TOCSY (total correlation spectroscopy) und einem HSQC. Der HSQC-Teil wurde bereits beschrieben, deswegen wird jetzt nur der TOCSY-Teil [12] betrachtet. Die Pulsfolge für ein TOCSY-Experiment ist in Bild 1-6 zu sehen.

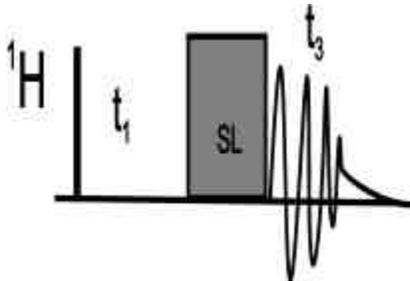


Abbildung 1-6: TOCSY-Pulsfolge. Durch ein schmales Rechteck ist ein  $90^\circ$  Puls dargestellt. SL ist ein Spin-Lock-Puls.

Ein Spin-Lock-Puls ist eine Serie von  $180^\circ$  nicht selektiven Pulsen, die die Larmor-Präzession ausschalten und dem System erlauben, sich nur unter dem Einfluss der J-Kopplung zu entwickeln. Nicht selektive Pulse regen die wechselwirkenden Kerne gleichzeitig an. Da ein Spin-Lock-Puls Millisekunden dauert, werden die meisten J-gekoppelten Protonen erreicht (im Protein entspricht dies den aliphatischen Protonen einer Aminosäure). Für ein homonukleares Spin-System IS (Protonen) in einem starken Radio-Frequenz-Feld (RF-Feld) sieht der Hamilton-Operator folgendermaßen aus:

$$H = -\Omega_I I_z - \Omega_S S_z + J(I_x S_x + I_y S_y + I_z S_z) - w_1(I_x + S_x) \quad (1-10)$$

Der letzte Term stellt ein Spin-Lock-Feld dar. Nach dem ersten  $90^\circ$  Puls und der Präzessions-Zeit  $t_1$  entstehen aus  $I_z$  vier Kohärenzen:  $I_x$ ,  $I_y$ ,  $I_x S_z$  und  $I_y S_z$  (Gl. 1-4).  $I_y$  und  $I_x S_z$  verschwinden wegen der Inhomogenität des RF-Feldes. Somit bleiben nur  $I_x$  und  $I_y S_z$  [8] zu betrachten. Wenn das RF-Feld stark genug ist, können die zwei ersten Terme des Hamilton-Operators (Gl. 1-10) vernachlässigt werden.  $I_z S_z$  und  $I_y S_y$  kommutieren weder mit  $I_x$  noch mit  $S_x$ , aber die Summe  $I_y S_y + I_z S_z$  kommutiert mit der Summe  $I_x + S_x$ .

a)

Kohärenz	Faktor	Signalposition	Aufspaltung	Linienform
$\frac{1}{2} I_x$	$1 + \cos 2\pi J \tau$	diagonal	In Phase	Absorption
$I_y S_z$	$\sin 2\pi J \tau$	diagonal	Antiphase	Dispersion
$-I_z S_y$	$\sin 2\pi J \tau$	Kreuz-Signal	Antiphase	Dispersion
$\frac{1}{2} S_x$	$1 - \cos 2\pi J \tau$	Kreuz-Signal	In-Phase	Absorption

b)

Kohärenz	Faktor	Signalposition	Aufspaltung	Linienform
$-\frac{1}{2} I_x$	$\sin 2\pi J \tau$	diagonal	In Phase	Absorption
$I_y S_z$	$\cos 2\pi J \tau$	diagonal	Antiphase	Dispersion
$-I_z S_y$	$\cos 2\pi J \tau$	Kreuz-Signal	Antiphase	Dispersion
$\frac{1}{2} S_x$	$\sin 2\pi J \tau$	Kreuz-Signal	In-Phase	Absorption

Tabelle 1-1: Auflistung der Kohärenzen, die aus a)  $I_x$  und b)  $I_y S_z$  entstehen.

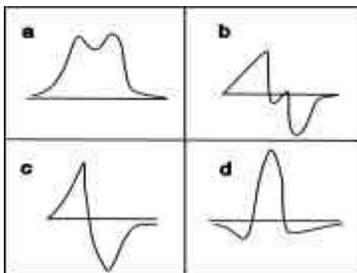


Abbildung 1-7: Duplett mit den verschiedenen Kombinationen von Linien-Formen und Aufspaltungen: a) Absorption/In-Phase, b) Dispersion/In-Phase, c) Absorption/Antiphase und d) Dispersion/Antiphase.

Damit kann die zeitliche Entwicklung des Dichte-Operators als drei unabhängige Drehungen um die  $I_x+S_x$ -,  $I_xS_x$ - und  $I_yS_y+I_zS_z$ -Achsen behandelt werden. Die durch diese Drehungen aus  $I_x$  bzw.  $I_yS_z$  entstandenen Kohärenzen und die entsprechenden Signale sind in der Tabelle 1-1.a bzw. 1-1.b aufgeführt. Durch die Anwendung von Phasen-Zyklen bleibt eine Superposition aus In-Phase-Absorptions- und Antiphase-Dispersions-Linien erhalten (Bild 1-7). Das gibt einem TOCSY-Spektrum eine absorptionsähnliche Erscheinung.

### **1.1.3.5 Beschreibung weiterer für Zuordnung und Strukturaufklärung verwendeter Pulsfolgen**

#### **HNCACB**

Das HNCACB-Spektrum [13] korreliert die  $H_N$ - und N-Resonanzen mit den  $C_\alpha$ - und  $C_\beta$ -Frequenzen der eigenen und der vorhergehenden Aminosäure. Dieses Experiment verbindet sechs Frequenzen in einem 3D-Datensatz miteinander. Zu jeder H- und N-Koordinate im Spektrum sollten vier C-Koordinaten zu finden sein (zwei  $C_\alpha$  und zwei  $C_\beta$ ). Dabei entsprechen die intensiveren Signale der eigenen und die schwächeren der vorhergehenden Aminosäure (Bild 1-8). Die Magnetisierung wird durch eine INEPT-Pulsfolge von dem  $H_N$ -Kern zu dem direkt gebundene N-Kern übertragen. Während der Zeit  $2d_1$  (Bild 1-9) wird die Magnetisierung zu  $C_\alpha(i)$  und  $C_\alpha(i-1)$ , und während der ersten  $2d_2$  Zeit von diesen zu  $C_\beta(i)$  bzw.  $C_\beta(i-1)$  transportiert. Während der Zeit  $t_1$  präzedieren  $C_\alpha$  und  $C_\beta$ , wobei H, N und CO entkoppelt bleiben. Dann wird die Magnetisierung zurück zu  $C_\alpha$  gebracht, während des Hin- und Rückweges bekommt die Amplitude der  $C_\beta$ -markierten Kohärenz ein anderes Vorzeichen als die Amplitude der  $C_\alpha$ -markierten Kohärenz.

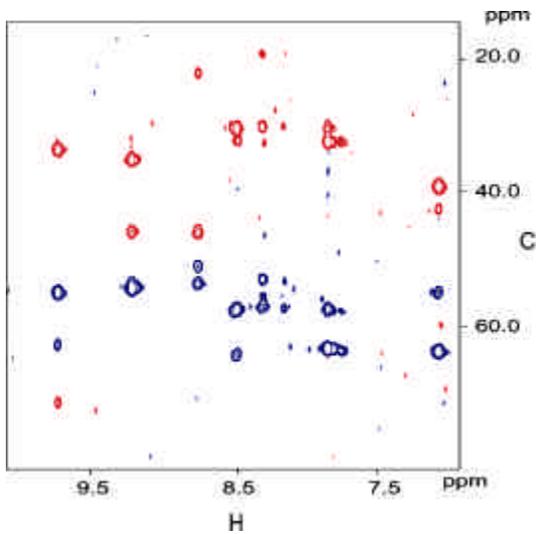


Abbildung 1-8: Eine ( $H_N$ -C)-Ebene aus dem HNCACB-Spektrum des Nore1. Blau dargestellt sind  $C_\alpha$  und rot  $C_\beta$ . Die schwächeren Signale kommen von  $C_\alpha(i-1)$  und  $C_\beta(i-1)$ , die stärkeren stammen von  $C_\alpha(i)$  und  $C_\beta(i)$ .

Deshalb haben die Signale im aufgenommenen Spektrum ein unterschiedliches Vorzeichen (Bild 1-8). Dann wird die Magnetisierung nach N, und danach nach  $H_N$  übertragen, wo sie auch detektiert wird.

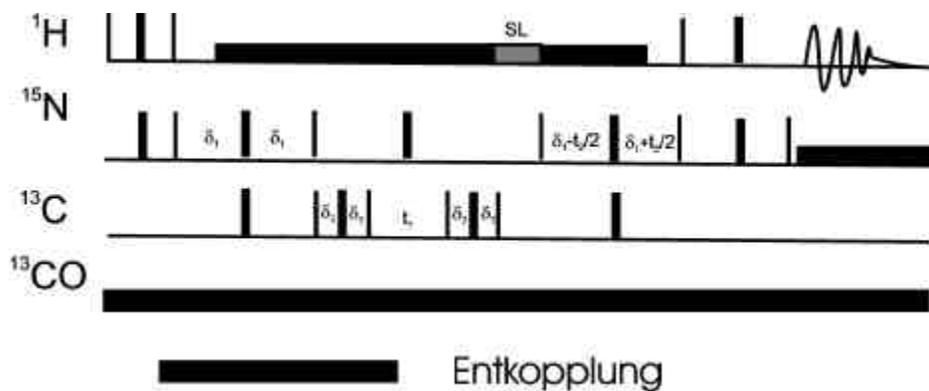


Abbildung 1-9: HNCACB –Pulsfolge. SL ist ein Spin-Lock-Puls, der das Wassersignal unterdrückt. Durch schmale bzw. breitere Rechtecke sind  $90^\circ$  bzw.  $180^\circ$  Pulse dargestellt.

## CCONH

Das CCONH-Experiment (Bild 1-10, [14]) korreliert aliphatische Kohlenstoffatome einer Aminosäure mit dem Stickstoff der nächsten Aminosäure. Zuerst wird die Magnetisierung durch eine INEPT-Sequenz von aliphatischen Protonen zu den direkt gebundenen Kohlenstoffatomen transportiert, die dann frei präzedieren. Die  $^1\text{H}$ -Entkopplung wird durch einen  $180^\circ$  Puls in der Mitte der  $t_1$  Zeit gewährleistet. Ein Spin-Lock-Puls, wie bei TOCSY-Experimenten, verknüpft über J-Kopplungen die angeregten C-Spins mit den  $\text{C}_\alpha(i)$ -Kernen. Bis dahin bleibt  $^{13}\text{CO}$  entkoppelt. Danach wird die Magnetisierung durch den  $\text{CO}(i)$ -Kern zu den  $\text{N}(i+1)$ -Spin übertragen. Nach der freien Präzession der Stickstoffspins, wird die Magnetisierung durch einen INEPT-Schritt zu  $\text{H}_\text{N}(i+1)$  übertragen.

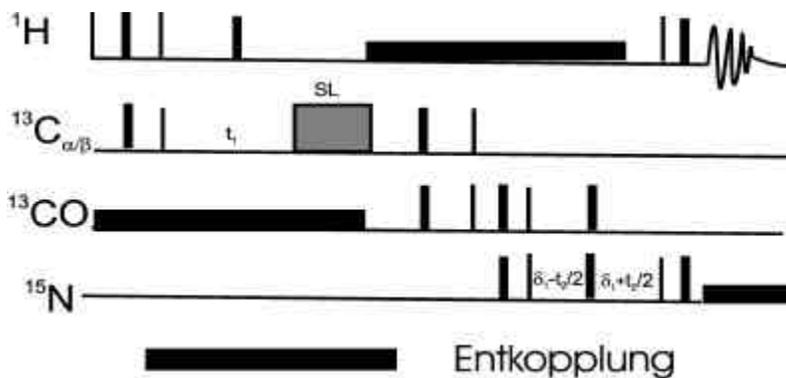


Abbildung 1-10: CCONH –Pulsfolge. SL ist ein Spin-Lock-Puls. Durch schmale bzw. breitere Rechtecke sind  $90^\circ$  bzw.  $180^\circ$  Pulse dargestellt.

## HCCONH

Dieses Experiment (Bild 1-11) benutzt einen ähnlichen Magnetisierungstransportweg wie das CCONH. Der Unterschied besteht darin, dass statt der chemischen Verschiebungen von Kohlenstoffatomen die chemischen Verschiebungen von Protonen gemessen werden. Dabei wird die  $^{13}\text{C}$ -Evolutionszeit durch die  $^1\text{H}$ -Evolutionszeit ersetzt. HCCONH verknüpft aliphatische Protonen mit den  $\text{H}_\text{N}$  und  $\text{N}$  der nachfolgenden Aminosäuren.

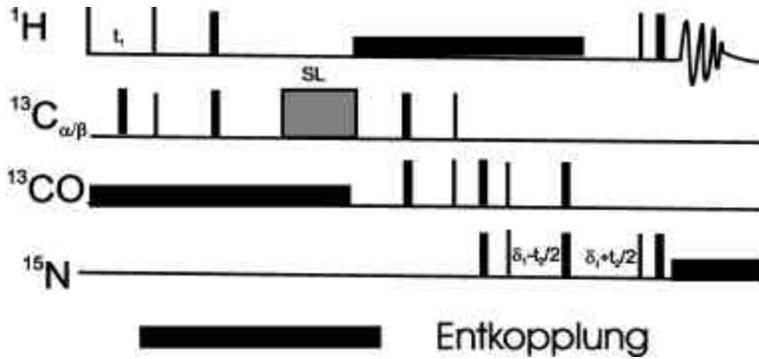


Abbildung 1-11: HCCONH –Pulsfolge [14]. SL ist ein Spin-Lock-Puls. Durch dünnere bzw. dickere Rechtecke sind  $90^\circ$  bzw.  $180^\circ$  Pulse dargestellt.

### HNHA

Das HNHA-Experiment [9] ist für die Messung der Kopplungskonstanten  $J(H_N-H_\alpha)$  geeignet, und bezieht sich auf die quantitative Analyse der relativen Intensität der Diagonal- und Kreuz-Signale im Spektrum. In diesem Experiment sind  $H_N$ -, N- und  $H_\alpha$ -Resonanzen miteinander korreliert.

Im ersten Teil der Pulsfolge (Abbildung 1-12) kommt es zu einem Polarisationstransfer, der eine Kohärenz  $H_N^x N^y$  herstellt (Zwischen Punkten a und b). Zwischen b und c entwickelt sich diese Kohärenz unter dem Einfluss der  $H_N H_\alpha$ -Kopplung und der  $\Omega_N$ -Präzession. Bei den nächsten Schritten wird die Kohärenz  $H_N^x N^y$  mit der  $H_N$ -Frequenz und  $H_N^y H_\alpha^z N^y$  mit der  $H_\alpha$ -Frequenz markiert. Am Punkt d hat der Dichteoperator die Form:

$$\mathbf{s}_d = A(H_N^x N^y \cos(\Omega_{H_N} t_2)) + B(H_N^y H_\alpha^z N^y \cos(\Omega_{H_\alpha} t_2)) \quad (1-11)$$

wobei A und B Koeffizienten sind. Danach wird die Magnetisierung nach  $H_N$  übertragen, wo sie auch gemessen wird. Dadurch entstehen die Diagonal- bzw. Kreuz-Signale, deren relative Intensität sich wie folgt ausdrücken lässt:

$$I_{\text{cross}}/I_{\text{diagona}} = -\tan^2(2\pi J(H_N-H_\alpha)\delta_1) \quad (1-12)$$

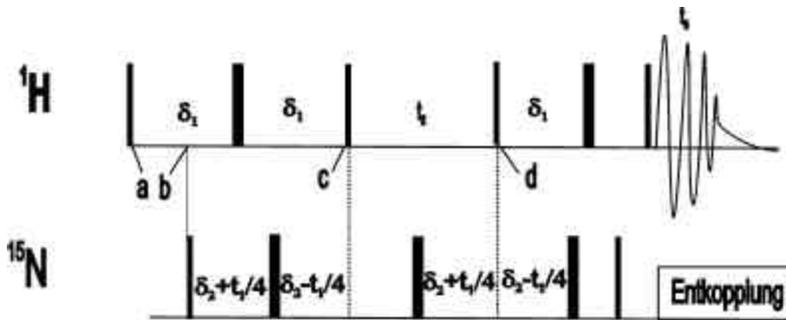


Abbildung 1-12: HNHA-Pulsfolge. Durch schmale bzw. breitere Rechtecke sind 90° bzw. 180° Pulse dargestellt.

### 1.1.4 Relaxation

Wenn sich die Magnetisierung durch die RF-Pulse nicht mehr in der Gleichgewichtsposition  $\vec{M} \parallel \vec{B}$  befindet, kommen Mechanismen ins Spiel, die das System zurück zum Gleichgewichtszustand treiben. Dieses Phänomen wird als Relaxation bezeichnet. In Proteinen sind dipolare Kopplungen der wichtigste Relaxationsmechanismus. In Abwesenheit des RF-Feldes nähern sich die longitudinale  $M_z$  und die transversale  $M_{xy}$  Magnetisierung exponentiell dem Gleichgewicht. Die zeitliche Entwicklung der Magnetisierungen in diesem Fall wird folgendermaßen gegeben:

$$M_z(t) = M_0 + (M_z(0) - M_0) \exp(-t/T_1) \quad (1-13)$$

und

$$M_{x,y} = M_{xy}(0) \cos(\Omega t - \phi_{x,y}) \exp(-t/T_2). \quad (1-14)$$

Dabei sind  $M_0$  die Gleichgewichtsmagnetisierung,  $M_z(0)$  und  $M_{xy}(0)$  die Anfangswerte,  $\Omega$ -die Präzessionsfrequenz,  $T_1$  und  $T_2$  die longitudinale und transversale Relaxationszeiten.  $\phi_x$  und  $\phi_y$  sind die Phasen, die sich um  $\pi/2$  unterscheiden. Die Relaxationszeiten geben eine Möglichkeit, die Beweglichkeit des ganzen Proteins und der einzelnen Aminosäuren abzuschätzen (Kapitel 3.1.2.3 und 3.3.1.2). Um Relaxationszeiten für Stickstoffkerne zu bestimmen, werden HSQC-Pulsfolgen mit variablen Relaxationswartezeiten  $T$  benutzt [15]. In Bild 1-13 ist die Pulsfolge für die  $T_1$ -Messung dargestellt. In der HSQC-Pulsfolge wird nach der freien Präzessionszeit  $t_1$  ein 90° Puls gegeben, der die

Magnetisierung in z-Richtung dreht. Dann wird eine variable Zeit T gewartet und der nächste 90° Puls gegeben, um die Magnetisierung zurück in die xy-Ebene zu bringen. Die Stärke des Signals hängt dann von der Zeit T ab.

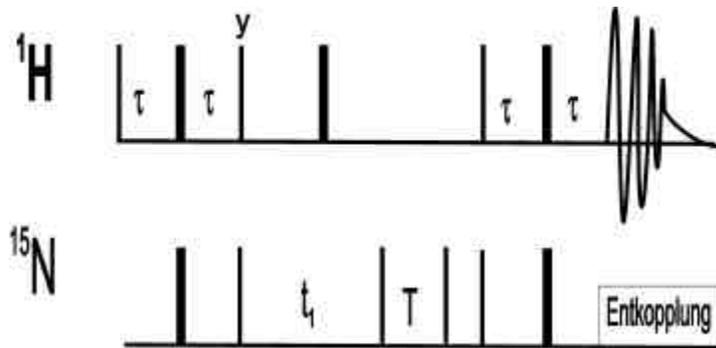


Abbildung 1-13: T<sub>1</sub>-HSQC-Pulsfolge [15]. Durch schmale bzw. breitere Rechtecke sind 90° bzw. 180° Pulse dargestellt.

In Bild 1-14 ist eine Pulsfolge zur T<sub>2</sub>-Messung zu sehen. Die T-Wartezeit wurde vor der Präzessionszeit t<sub>1</sub> eingebaut. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Magnetisierung schon in der transversalen Ebene. Aus mehreren T<sub>1</sub>-HSQC bzw. T<sub>2</sub>-HSQC-Spektren ist es möglich, T<sub>1</sub>- bzw. T<sub>2</sub>-Werte zu extrahieren (Kapitel 2-2-2).

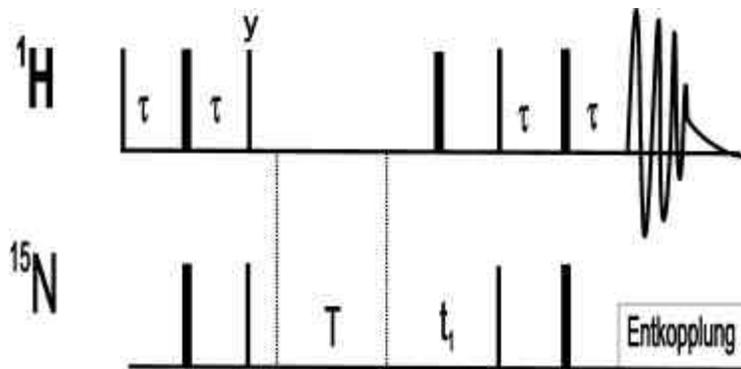


Abbildung 1-14: T<sub>2</sub>-HSQC-Pulsfolge [15]. Durch schmale bzw. breitere Rechtecke sind 90° bzw. 180° Pulse dargestellt.

## 1.2 Biologische Einleitung

In Rahmen dieser Arbeit wurde die C1-Domäne von Nore1 mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht.

### 1.2.1 Nore1 als potentieller Ras-Effektor

Das kleine GTP- (Guanosin-Triphosphat) bindende Protein Ras spielt eine entscheidende Rolle bei der Weitergabe von Wachstums- und Differenzierungssignalen durch Zelloberflächenrezeptoren. Mit Hilfe von Ras werden Signale von Zelloberflächenrezeptoren auf verschiedenen Wegen in Säugetierzellen weitergeleitet. Vavvas et al. [16] haben 1998 einen neuen potentiellen Ras-Effektor Nore1 (Novel Ras Effector) identifiziert. Für Nore1 wurde eine Wechselwirkung mit Ras *in vitro* nachgewiesen. Nore1 bindet an Ras *in situ* in COS-7 (unsterbliche Affennierenzellen) und KB-Zellen (menschliche Halskarzinomazellen), nachdem der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors aktiviert wurde. 2002 wurde ein neuer Signaltransduktionsweg gefunden, der von Ras über Nore1 zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt [17]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Nore1 ein Tumor-Unterdrücker ist, denn das Einbringen von Nore1 in Tumorzellen verlangsamt deren Wachstum [18]. Bei normaler Regulation ist das Protein in ausreichenden Mengen in der Zelle vorhanden, um eine krebsartige Veränderung zu verhindern. Das menschliche NORE1 Protein ist aber in einigen Krebszelllinien [19], und das Maus-Protein in Lungenkrebszellen unterreguliert [18]. Dadurch kann es zur Tumorbildung kommen. Die Herabregulierung ist auf eine Methylierung der entsprechenden Promotorregion in der DNA zurückzuführen, die das Ablesen des Gens steuert. Ein Promoter ist eine DNA-Sequenz, an der die Proteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren, binden können. Dabei aktivieren sie die Herstellung eines Proteins, dessen kodierendes Gen hinter dem Promotor liegt. Wenn der Promotor methyliert ist, ist die Bindung der Transkriptionsfaktoren gestört und das Genprodukt ist unterreguliert. Die Methylierung eines Promotors ist einer der Hauptmechanismen zum Inaktivieren der Tumor-Unterdrücker in Krebszellen.

Nore1 besteht aus vier Domänen (Bild 1-15): Prolinreiche Region (P) (1-90), C1-Domäne (118-166), Ras bindende Domäne (RBD) (266-359) und Coiled-Coil-Domäne (CC) (376-411).

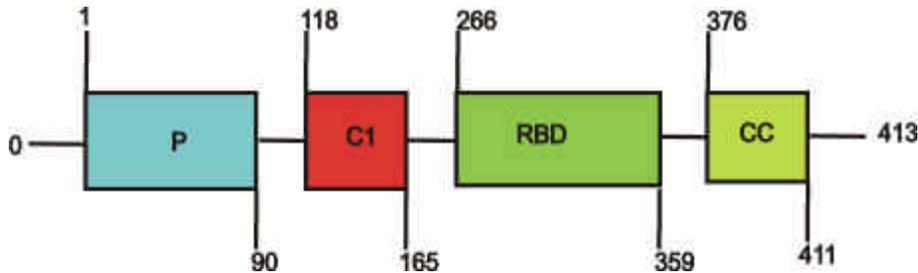


Abbildung 1-15: Domänenstruktur von Nore1.

Die Rolle der Prolinreichen Domäne ist noch nicht klar. Die Coiled-Coil-Domäne bindet MST1, ein Protein, dessen Aktivierung zur Apoptose führt [20]. Die RBD ist für ihre Bindung an Ras bekannt. Die Bindung der RBD von Nore1 an Ras wurde *in vitro* von S. Wohlgemuth nachgewiesen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der Strukturaufklärung und Funktion der C1-Domäne von Nore1.

## 1.2.2 C1-Domäne

Eine C1-Domäne (Protein Kinase C Homologie „1“) [21] ist ein kompaktes zink-haltiges membranbindendes Motiv, das in der Literatur als Cysteinreiche Domäne bezeichnet wird. Diese Domäne wurde bei mehr als 200 verschiedenen Proteinen in einer oder in zwei Kopien gefunden. Alle bekannten C1-Domänen bestehen aus zwei  $\beta$ -Faltblättern und einer kurzen  $\alpha$ -Helix am C-Terminus. Zwei Zinkatome sind ein integraler Bestandteil der Proteinstruktur. Die beiden Zinkatome sind je an drei Cysteinreste und an einen Histidinrest gebunden.

## 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ras spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung und ist in 30% aller Krebsarten mutiert. Nore1, ein neuentdeckter Ras-Effektor, erhält Signale von Ras und liefert sie an andere Proteine weiter, die dann die Apoptose einleiten. Diese Funktion des Proto-

Onkoproteins Ras widerspricht seinen bekannten Funktionen und ist bis jetzt noch nicht gut verstanden. Deshalb sind die Untersuchungen an Nore1 von besonderem Interesse.

Die Reinigung von Nore1 in seiner gesamten Länge war nicht möglich [22]. Deswegen wurden Strukturuntersuchungen an einzelnen Domänen vorgenommen. Diese Vorgehensweise wurde in Kapitel 1.1.2 rechtfertigt. Das Ziel dieser Arbeit ist die Struktur der C1-Domäne von Nore1 zu bestimmen. Das Konstrukt besteht aus 72 Aminosäuren und ist damit für NMR-Untersuchungen gut geeignet. Außerdem wird die Rolle der C1-Domäne bei der Bindung von Nore1 an Ras untersucht. Die Rolle der C1 bei der Ras-Bindung ist nicht gut verstanden, nicht einmal bei einem viel untersuchten Protein wie Raf1. Es gibt widersprüchliche Arbeiten, die entweder C1-Bindung an Ras bestätigen [23] oder widerlegen [24].

Mit NMR können solche Fragen geklärt werden, indem die HSQC-Spektren ohne Ras und mit Ras verglichen werden. Bei der Bindung ändert sich die chemische Umgebung der beteiligten Aminosäuren und deren Signale sollten sich verschieben.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 NMR-Spektroskopie

#### 2.1.1 Proteine

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine (Nore<sub>195-166</sub>, <sup>15</sup>N-Nore<sub>195-166</sub>, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-Nore<sub>195-166</sub>, <sup>15</sup>N-Nore<sub>195-358</sub>) wurden in der Gruppe von Dr. Christian Herrmann von Sabine Wohlgemuth hergestellt. Nore<sub>195-166</sub> ist die C1-Domäne von Nore1 und Nore<sub>195-358</sub> entspricht einem Protein, das aus einer C1 und einer RBD-Domäne besteht. Für die Expression wurden die Vektoren pGEX4T1 Nore<sub>195-166</sub> und pGEX4T1 Nore<sub>195-358</sub> (zyklische DNA mit kodierender Sequenz für Nore1) in *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3) transformiert. Die Expression erfolgte bei 37°C über 6 Stunden. Die Reinigung der GST-gebundenen Nore1 erfolgte nach Aufschluss der Zellen in einem ZnCl<sub>2</sub> haltigen Puffer (50 mM Tris/HCl, 500mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100µM ZnCl<sub>2</sub>, 5mM DTT) und einer anschließenden Ultrazentrifugation an einer GSH-Säule. Dabei bindete der GST-Anteil von Nore1 an die GSH-haltige Säule. Nach der Elution der gebundenen Proteine durch Erhöhung der GSH-Konzentration im Puffer, wurden die GST-Nore1 enthaltenden Fraktionen der Wirkung der Protease Trombin ausgesetzt, die GST von Nore1 abschnitt. Die beiden Proteine wurden durch Gelfiltrierung voneinander getrennt. Danach wurden die Nore1-Proben gegen einen leicht sauren Puffer (Kapitel 2.1.2) dialysiert, damit der pH-Wert unter 7 blieb, und der Protonenaustausch, der die NMR-Linien verbreitert, verlangsamt wurde. Abschließend wurden die Proteine durch Zentrifugation in VivaSpin6-Röhrchen (MWCO 5000) auf 22 mg/ml für Nore<sub>195-166</sub>, auf 28 mg/ml für <sup>15</sup>N-Nore<sub>195-166</sub> und <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-Nore<sub>195-166</sub>, auf 25.8 mg/ml für <sup>15</sup>N-Nore<sub>195-358</sub> konzentriert. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe des Bradford-Tests bestimmt. Dafür wurde die Coomassie-Färbung verwendet, wobei die Menge des gebundenen Coomassie-Farbstoffes proportional zu der Proteinkonzentration war. Der Farbstoff absorbiert bei 595 nm. Durch Messung der Absorption und den Vergleich mit den Standardwerten wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

## 2.1.2 Probenvorbereitung

Die Proteine wurden in 450  $\mu\text{l}$  Puffer (20mM Kalium-Phosphatpuffer pH 6.9, 0.5 mM  $\text{NaN}_3$ , 4mM DTE) und 50  $\mu\text{l}$  99.9 %  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. Die Lösung wurde in NMR-Röhrchen überführt (Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland).

## 2.1.3 Allgemeine Messbedingungen

NMR-Messungen wurden mit einem Inova 600 Spektrometer (Varian, Darmstadt) bei einer Protonen-Resonanzfrequenz von 599.8 MHz aufgenommen. Zur Eichung der chemischen Verschiebung von Protonen diente das Natriumsalz der Trimethylsilyl-Propionsäure (TSP), dessen gemessene Frequenz 599.8326347 auf 0 ppm geeicht wurde. Die Eichung der  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Dimensionen erfolgte gemäß IUPAC Konvention [25]. Alle Spektren wurden bei 300 K aufgenommen.

## 2.1.4 Aufnahmeparameter

Für die Pulsprogramme wurde die Standardbibliothek der installierten Varian Datenbank benutzt. Die Aufnahme erfolgte mit Quadraturdetektion unter Verwendung der States- (States-Haberkorn-Ruben) [26] und TPPI [27] Techniken [28]. Das Wassersignal wurde für die meisten Experimente durch Pulsfeldgradienten wie in [29] beschrieben unterdrückt. Im HCONH- und in den zwei-dimensionalen homonuklearen Experimenten erfolgte die Unterdrückung durch eine Vorsättigung, und bei der Aufnahme des HNHA-Spektrums durch die Anwendung der WATERGATE-Pulsfolge [30]. Die Mischzeit betrug 150 ms für  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-, 100 ms für  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC- und 90 ms für  $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC-Pulssequenzen. Um Relaxationszeiten zu messen, wurden jeweils sieben  $T_1$ - und sechs  $T_2$ -Spektren [31] mit den variierenden Wartezeiten T (Kapitel 1.1.4) aufgenommen. Für die  $T_1$ -Experimente wurden die Wartezeiten 10ms, 30ms, 90ms, 150ms, 250ms, 530ms, 800ms, und für die  $T_2$ -Experimente 10ms, 50ms, 70ms, 90ms, 110ms, 150 ms benutzt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Spektren, die Referenzen und die Anzahl der aufgenommenen und prozessierten Datenpunkte sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Experimente	Referenz	F3(A)	F2(A)	F1(A)	F3(P)	F2(P)	F1(P)
DQF-COSY	[32]	-	2432	1000	-	1024	1024
TOCSY	[33]	-	4096	1024	-	2048	1024
NOESY	[34]	-	2432	1024	-	2048	512
<sup>15</sup> N-HSQC	[35]	-	2048	512	-	2048	512
HNHA	[36]	2048	172	100	2048	256	128
<sup>15</sup> N-NOESY-HSQC	[37][35]	2048	160	96	1024	512	256
<sup>15</sup> N-TOCSY-HSQC	[37][35]	2048	160	96	1024	256	256
<sup>13</sup> C-NOESY-HSQC (Aliphatische Reste)	[37] [35]	2048	188	128	2048	256	128
<sup>13</sup> C-NOESY-HSQC (Aromatische Reste)	[37] [35]	2048	160	104	2048	256	128
HCCH-COSY	[38]	2048	310	140	1024	128	128
HNCACB	[13]	2048	140	96	1024	256	128
HCCONH	[14]	2048	160	96	2048	256	128
CCONH	[14]	2048	160	86	1024	256	128
T <sub>1</sub> HSQC	[31]	-	2048	512	-	4096	2048
T <sub>2</sub> HSQC	[31]	-	2048	512	-	4096	2048
<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N NOE	[31]	-	2048	512	-	1024	512

Tabelle 2-1: Aufgenommene NMR-Spektren. F1(A), F2(A) und F3(A) entsprechen der Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte und F1(P), F2(P), F3(P) der der prozessierten Datenpunkte.

## 2.1.5 Prozessierung der NMR-Spektren

Die Prozessierung aller Spektren erfolgte mit dem Programmpaket XWIN-NMR (Bruker, Karlsruhe). In den meisten Fällen wurde eine künstliche Verlängerung der Datensequenzen (*Zero filling*) durchgeführt. Die erhaltenen freien Induktionszerfälle (FIDs) wurden in allen Dimensionen mit einer Kosinus-Quadratfunktion multipliziert und fouriertransformiert. Anschließend wurden die Phasen aller Spektren korrigiert um eine Absorptionsform der Signale zu erreichen. Für die Basislinienkorrektur wurde ein Polynom fünfter Ordnung verwendet.

## 2.2 Auswertung der NMR-Spektren

### 2.2.1 Zuordnung von Signalen

Die Zuordnung wurde mit dem Programm AURELIA (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt. Zwei-dimensionale Spektren wurden in NDEE (Spinup Inc., Dortmund) überlagert.

### 2.2.2 Bestimmung der Relaxationsraten von Rückgratstickstoffatomen

Die Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  wurden aus der Abhängigkeit der Intensitäten  $I$  von einer variierenden Wartezeit  $T$  (Kapitel 1.1.4) ermittelt. Der Intensitätsabfall kann mit Hilfe einer exponentiellen Funktion (2-1) beschrieben werden.

$$I = I_0 \exp(-RT) \quad (2-1),$$

wobei  $R$  eine Relaxationsrate (entweder  $R_1=1/T_1$  oder  $R_2=1/T_2$ ) und  $I_0$  eine Intensität in dem Spektrum mit kleinster Wartezeit  $T$  ist. Die Listen der Signale aus den  $T_1$ - und  $T_2$ -HSQC-Spektren wurden mit einem von Herrn K.H. Müller (MPI, Dortmund) geschriebenen Fortran 77 Programm erstellt.

### 2.2.3 $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von Nore1<sub>95-358</sub> mit Ras

Die auf 12.9 mg/ml verdünnte C1-RBD-Probe (Nore1<sub>95-358</sub>) wurde mit Ras titriert. Das verwendete Ras<sub>1-166</sub> hat Guanylylimidodiphosphate (GppNHp), ein nicht hydrolysierbares Analogon des GTPs, gebunden. 100  $\mu\text{l}$  von 67.5 mg/ml konzentrierter Ras-Probe wurde in sechs Schritten zu Nore1<sub>95-358</sub> zugegeben. Die molaren Verhältnisse von Ras zu Nore1 waren dabei jeweils 10%, 20%, 30%, 50%, 75%, 100%. In allen Proben wurde die in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Puffer verwendet. Nach jeder Zugabe von Ras wurde ein  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum unter den in 2.1.3 genannten Bedingungen aufgenommen. Die aufgenommenen Spektren wurden mit dem Programm NDEE überlagert. Dabei wurden die Änderungen in den Signalpositionen analysiert.

## 2.3 Bestimmung der Struktur der C1-Domäne von Nore1

### 2.3.1 Distanzen und Winkel

Zur Strukturaufklärung wurden Distanzen zwischen Protonen (2.3.1.1) und dihedrale  $\psi$ -Winkel (2.2.1.4) mit Hilfe von NOESY-Spektren und dihedrale  $\theta$ -Winkel (2.3.1.3) mit Hilfe von HNHA-Spektrum gemessen.

#### 2.3.1.1 Abstände

Der abstandabhängige Kern Overhauser Effekt (Kapitel 1.1.3.1) erzeugt die Signale, die in einem NOESY-Spektrum auftreten. Die Signale geben daher Information über Abstände zwischen zwei Atomen. Die NOE-Intensitäten wurden in drei Klassen eingeteilt: starke NOEs (1.8 Å - 2.9 Å), wenn die Intensität eines Signals größer als die Hälfte der Intensität des intensivsten Signals des gegebenen Spektrums (maximale Intensität) war, mittlere NOEs (1.8 Å - 4.2 Å), wenn die Intensität eines Signals 20 - 50% der maximalen Intensität betrug, und schwache NOEs (1.8 Å - 5.5 Å), wenn die Intensität kleiner als 20% der maximalen Intensität war. Die NOEs wurden aus dem  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC- und aus den  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC-Spektren entnommen.

##### 2.3.1.1.1 Zinkbindungstasche

An allen bekannten C1-Domänen binden zwei Zink-Atome. Jedes Zink-Atom wird durch drei Cysteine und ein Histidin koordiniert (Kapitel 1.2.2). Für die Rechnung wurden die Zink-Atome jeweils formal an ein Cystein gebunden (Parameter sind aus [39] entnommen). Abstände zwischen Zink und den anderen Zink-bindenden Atomen [40] sind durch zusätzliche „künstliche“ NOEs gegeben (Bild 2-1).

!ZNA

assign (resname ZNA) (resid 132 and name SG) 2.3 0.2 0.2

assign (resname ZNA) (resid 135 and name SG) 2.3 0.2 0.2

assign (resname ZNA) (resid 154 and name ND1) 2.0 0.2 0.2

!ZNB

assign (resname ZNB) (resid 146 and name SG) 2.3 0.2 0.2

assign (resname ZNB) (resid 149 and name SG) 2.3 0.2 0.2

assign (resname ZNB) (resid 118 and name ND1) 2.0 0.2 0.2

Abbildung 2-1: Auszug aus dem NOE-File im CNS-Code geschrieben. ZNA und ZNB sind die Zinkatome. SG- sind die  $\gamma$  Schwefelatome von Cysteinen. ND1-sind die  $\delta$  Stickstoffe von Histidinen. Rechts stehen die Abstände zwischen den Atomen in Å mit erlaubten oberen und unteren Abweichungen.

### 2.3.1.2 Wasserstoffbrücken

Durch Aufnahme der HSQC-Spektren in D<sub>2</sub>O können die langsam austauschenden Stickstoffprotonen ermittelt werden. Als langsam austauschende Stickstoffprotonen wurden solche definiert, die im ersten Spektrum, d.h. nach 1-2 Stunden nach Zugabe von D<sub>2</sub>O noch zu sehen waren. Sie wurden als Wasserstoffbrücken in die Strukturrechnung einbezogen. Für jede Wasserstoffbrücke wurden zwei NOEs gesetzt. Der Abstand  $d_{\text{HN-O}}=1.7 \text{ \AA} -2.3 \text{ \AA}$  wurde zwischen Wasserstoff und Sauerstoff und der Abstand  $d_{\text{N-O}}=2.4 \text{ \AA} -3.3 \text{ \AA}$  wurde zwischen Stickstoff und Sauerstoff gesetzt. [41]. Vier Wasserstoffbrücken wurden aufgrund der Homologie zu der Kristallstruktur [42] gesetzt. Es handelt sich um die Brücken zwischen der Amidgruppe von Arg 158 und den Sauerstoffen von His 154 und Ser 155, zwischen der Amidgruppe von Leu 160 und dem Sauerstoff von Arg 157 und zwischen der Amidgruppe von Ile 161 und dem Sauerstoff von Arg 158.

Um den Austausch von Amidprotonen gegen Deuteronen zu messen, wurde die untersuchte Probe eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Vakuum eingedampft (Lyophilisation). Anschließend wurde das Protein in 500  $\mu\text{l}$  100% D<sub>2</sub>O wieder aufgelöst.

### 2.3.1.3 Dihedrale $\varphi$ -Winkel

Die dihedralen Winkel  $\theta$  der Peptidkette sind aus den Kopplungskonstanten  $J(\text{H}_\text{N}-\text{H}_\alpha)$  nach der Gleichung 2-2 [43] berechnet

$$J(H_N-H_\alpha)=6.4 \cos^2 \theta - 1.4 \cos \theta + 1.9 \quad (2-2).$$

Die Kopplungskonstanten wurden aus den Intensitätsverhältnissen zwischen Kreuz- und Diagonal-Signalen im HNHA-Spektrum ermittelt (Gl. 1-12). Die Signalliste mit den Intensitäten wurde vom Programm Aurelia ausgegeben. Für die Messung an der C1-Domäne von Nore1 wurde  $\delta_1=0.025$  s gewählt (Kapitel 1.1.3.5).

### 2.3.1.4 Dihedrale $\psi$ -Winkel

Die  $\psi$ -Winkel wurden im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC gemessen [44]. Sie hängen von der Verhältnisse der Intensitäten  $I(H_N(i)H_a(i))/I(H_N(i)H_a(i-1))$  ab, wobei  $I(H_N(i)H_a(i))$  und  $I(H_N(i)H_a(i-1))$  die Intensitäten von Kreuzsignalen zwischen  $H_N$  und dem eigenen  $H_a$  bzw. zwischen  $H_N$  und dem  $H_a$  der vorherigen Aminosäure sind. Wenn dieser Wert größer als zwei war, wurden die Winkel  $\psi = -65^\circ \pm 5^\circ$  für alle Aminosäuren außer Ile, Thr und Ala gesetzt. Für die zuletzt genannten Aminosäuren wurden in diesem Fall  $\psi = -65^\circ \pm 15^\circ$  angegeben. Wenn das Verhältnis kleiner als eins war, wurde für die Winkel ein Wert zwischen  $100^\circ$  und  $170^\circ$  angenommen.

### 2.3.2 Sekundärstrukturbestimmung

Die Sekundärstruktur eines Proteins wurde unter anderem durch die Untersuchung der Abweichungen chemischer Verschiebungen von den zugehörigen Werten in ungeordneten Peptiden (*random coil*) [45], [46] bestimmt. *Random coil* Werte sind in [47] für  $H_\alpha$  und in [48] für C-Atome zu finden. Die Verschiebungen zu höheren oder tieferen Werten gegenüber *random coil* sind charakteristisch für  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helizes. Die chemischen Verschiebungen von  $H_\alpha$  [45] und  $C_\beta$  [49] wurden bei  $\beta$ -Faltblättern zu höheren Werten und bei  $\alpha$ -Helizes zu tieferen Werten verschoben. Für  $C_\alpha$ -Atome sind die chemischen Verschiebungen für Sekundärstrukturelemente in die Gegenrichtung verschoben. Jeder einzelne Verschiebungswert kann durch lokale Einflüsse von diesem Verhalten abweichen. Deswegen wurden mehrere unabhängige

Parameter wie  $H_{\alpha^-}$ ,  $C_{\alpha^-}$ ,  $C_{\beta^-}$ -chemische Verschiebungen und J-Kopplungskonstanten analysiert.

### **2.3.3 Strukturrechnung mit CNS (Crystallography & NMR System)**

Für die Strukturrechnung wurden Molekulodynamik-Simulationen mit Hilfe eines *simulated annealing* Algorithmus und nachfolgender Energieminimierung mit dem Programm CNS [50] durchgeführt. Nachdem die Faltung des Proteins grob definiert war, wurde ein mit der Hilfe von Dr. S. Harjes geschriebenes Programm zur automatischen NOE-Suche benutzt ( Kapitel 3.1.3.1 und A1). Mit Hilfe dieses Programms wurden aus den mit CNS berechneten Strukturen die Abstände zwischen Protonen in NOEs umgewandelt, wie es in 2.3.1.1 beschrieben wurde. Waren diese NOEs in den experimentellen Signallisten zu finden, wurden sie zusätzlich in die NOE-Liste eingetragen. Mit der neuen Liste wurde die nächste Rechnung durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Die NMR-Struktur der C1-Domäne von Nore1

#### 3.1.1 Zuordnung

Zur Aufklärung der Proteinstruktur mit Hilfe der NMR-Methode ist es notwendig möglichst vielen Atomen aus der Peptidkette ein NMR-Signal zuzuordnen. Die Zuordnung wurde mit zweidimensionalen Experimenten begonnen und mit dreidimensionalen Experimenten fortgesetzt.

##### 3.1.1.1 Zuordnung mit Hilfe homonuklearer 2D-Spektren

###### 3.1.1.1.1 Identifizierung der Spinsysteme

Für den ersten Schritt der Zuordnung wurden die zweidimensionalen homonuklearen Spektren COSY, TOCSY und NOESY benutzt. Ein COSY-Spektrum koppelt alle Protonen in einer Aminosäure miteinander, die nicht mehr als drei kovalente Bindungen voneinander entfernt sind. Im TOCSY-Spektrum sind zusätzlich auch weiter entfernte Protonen an ein Proton gekoppelt, wenn die einzelnen dazwischen befindlichen Protonen untereinander jeweils nicht weiter als drei Bindungen voneinander entfernt sind. Diese aliphatischen Protonen einer Aminosäure bilden ein Spinsystem. In NOESY-Spektren sind Abstände zwischen räumlich benachbarten Protonen enthalten. Das Auftreten eines Signals im NOESY-Spektrum bedeutet, dass zwei Atome nicht mehr als 5-6 Å voneinander entfernt sind. Zuerst wurden folgende Spin-Systeme aus zweidimensionalen Spektren einer unmarkierten Probe identifiziert: Phe102, Arg 109, Val 110, Leu 111, Ala 112, Glu 113, Glu 122, Leu 123, Trp 131, Leu 144, Arg 145, Cys 146, Ala 147, Asn 148, Lys 150, Phe 151, Thr 152, Cys 153, His 154. Einige Spinsysteme konnten direkt über typische chemische Verschiebungen und ein charakteristisches Verknüpfungsmuster der Signale identifiziert werden. In Bild 3-1 ist das Spinsystem von Ala 112 (HN-CH( $\alpha$ )-CH<sub>3</sub>( $\beta$ )) als Beispiel zu sehen. Die chemische Verschiebung von H $\beta$  ist charakteristisch

für Alanin (*Random Coil* Wert ist 1.39). Durch ein COSY-Signal ist das  $H_N$ -Atom mit dem  $H_\alpha$ , und das  $H_\alpha$ -Atom mit dem  $H_\beta$  verbunden, während das  $H_N$  zusätzlich durch ein TOCSY-Signal mit dem  $H_\beta$  korreliert ist. Das ergibt zusammen ein für Alanin typisches Spinsystemmuster.

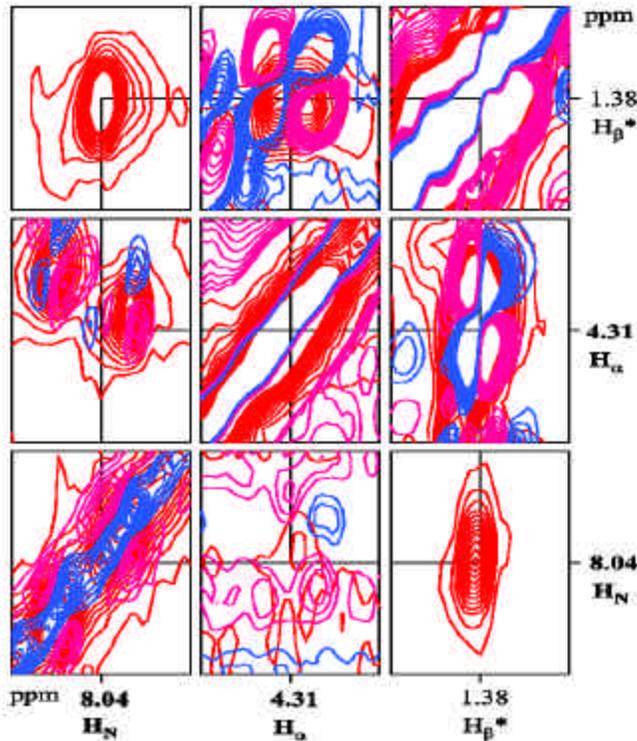


Abbildung 3-1: Spinsystem von Ala 112. Das Bild wurde mit dem Programm NDEE (Spinup Inc., Dortmund) erstellt. Rot sind TOCSY-, rosa und blau sind COSY-Signale dargestellt. \* bedeutet, dass drei Protonen der  $\beta$   $CH_3$  Gruppe bei Alanin voneinander nicht unterscheidbar sind.

### 3.1.1.1.2 Sequentielle Zuordnung der Spinsysteme mit Hilfe von 2D-Spektren

Nachdem einige Spinsysteme gefunden und identifiziert worden waren, sollte die sequenzielle Anordnung der Spinsysteme vorgenommen werden. Hierzu bedient man sich des sogenannten „Chaintracing“ Verfahrens.  $H_\alpha$ -Atome sind aufgrund der Bindungslängen nicht weiter als 5 Å von  $H_N$ -Atomen der nachfolgenden Aminosäure entfernt. Das bedeutet, dass zwischen diesen Atomen NOESY-Signale zu finden sind.

Diese Signale haben als Koordinaten die chemischen Verschiebungen des  $H_N$ -Atoms einer Aminosäure und des  $H_\alpha$ -Atoms der vorhergehenden. Zusätzlich ist jedes  $H_N$ -Atom durch ein COSY- und ein NOESY-Signal mit dem eigenen  $H_\alpha$  verbunden. Die sequentielle Zuordnung für die Aminosäuren von Lys 150 bis His 154 ist in Bild 3-2 zu sehen.

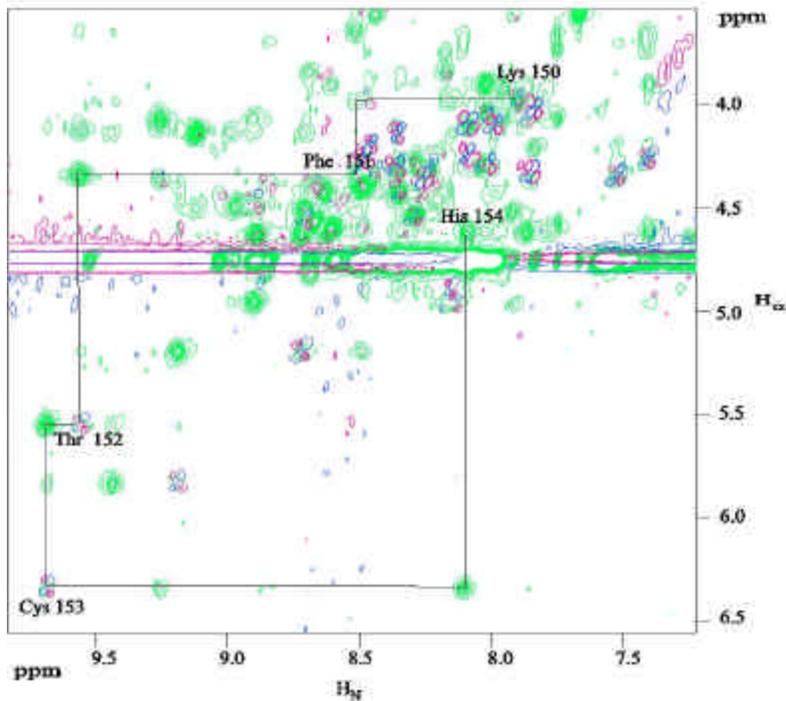


Abbildung 3-2: Sequentielle Zuordnung der Aminosäuren Lys 150 - His 154. Das Bild wurde mit NDEE erstellt. Grün sind NOESY-, rosa und blau COSY-Signale dargestellt. An der x-Achse sind chemische Verschiebungen  $H_N$  und an der y-Achse  $H_\alpha$  aufgetragen. Die vertikalen Linien verbinden COSY-Signale ( $H_N(i)$ ,  $H_\alpha(i)$ ) mit NOESY-Signalen ( $H_N(i)$ ,  $H_\alpha(i-1)$ ), die horizontalen Linien NOESY-Signale ( $H_N(i+1)$ ,  $H_\alpha(i)$ ) mit COSY-Signalen ( $H_N(i)$ ,  $H_\alpha(i)$ ).

### 3.1.1.2 Zuordnung mit heteronuklearen Spektren

Nur ein Teil des Proteins wurde mit zweidimensionalen Experimenten zugeordnet. Für die weitere Zuordnung wurden heteronukleare Spektren mit  $^{15}N$ - und  $^{15}N$ ,  $^{13}C$ -markierter C1-Domäne aufgenommen.

### 3.1.1.2.1 Dreifach-Resonanz-Experimente

Ausgehend von den bereits identifizierten Aminosäuren wurde eine sequentielle Zuordnung mit Hilfe von Dreifach-Resonanz-Experimenten durchgeführt. Das HNCACB-Spektrum verbindet ein Stickstoffproton sowohl mit den eigenen  $C_{\alpha}$ - und  $C_{\beta}$ -, als auch mit den  $C_{\alpha}$ - und  $C_{\beta}$ -Atomen der vorhergehenden Aminosäure (Kap. 1.1.3.5). Bild 3-3 zeigt eine sequenzielle Zuordnung von Aminosäuren zwischen Cys 132 und Gln 138. Negative Signale von  $C_{\beta}$ -Atomen sind in roter Farbe und positive Signale von  $C_{\alpha}$ -Atomen in blauer Farbe dargestellt. Signale, die der eigenen Aminosäure zugeordnet sind, sind in der Regel intensiver als die Signale, die zu der vorhergehenden Aminosäure führen. In Bild 3-3 ist zu sehen, dass Cys 132, Asp 133, Leu 134, Cys 135, Glu 138 vier Signale zeigen, die den  $C_{\alpha}(i)$ -,  $C_{\alpha}(i-1)$ -,  $C_{\beta}(i)$ - und  $C_{\beta}(i-1)$ -Atomen entsprechen. Gly 136 und Arg 137 haben ein Signal weniger, da Glycine keine  $\beta$ -Kohlenstoffe haben. Dadurch hat auch die nachfolgende Aminosäure nur drei Signale. Auf dieser Weise kann man entlang der ganzen Peptidkette „laufen“ und die chemischen Verschiebungen den entsprechenden  $C_{\alpha}$  und  $C_{\beta}$ -Atomen zuordnen.

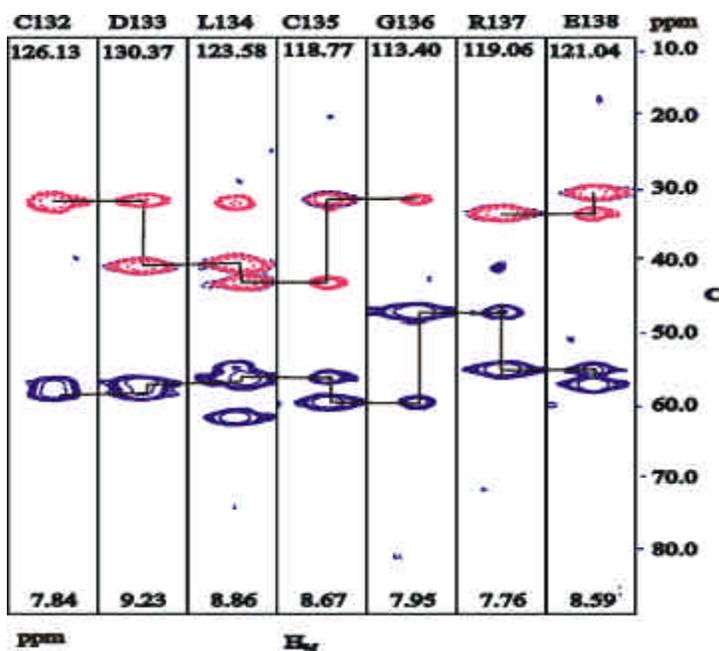


Abbildung 3-3: Die sequentielle Zuordnung der Aminosäuren Cys 132 bis Gln 138. Dargestellt sind die Ausschnitte aus  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Ebenen mit den verschiedenen  $^{15}\text{N}$ -Koordinaten, dessen ppm Werte oben aufgezeichnet sind.

Mit Hilfe eines CCONH-Experiments (Kap. 1.1.3.5) war es möglich, mehrere aliphatische Kohlenstoffatome der Seitenketten zuzuordnen. Dieses Experiment korreliert die Stickstoffproton- und Stickstoff-Verschiebung einer Aminosäure mit den Verschiebungen der Kohlenstoffatome der vorherigen Aminosäure. Die chemischen Verschiebungen der aliphatischen Protonen der vorhergehenden Aminosäure wurden durch das HCCONH-Spektrum (Kap. 1.1.3.5) bestimmt.

### 3.1.1.2.2 $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC

Das TOCSY-HSQC-Experiment besteht aus aufeinanderfolgenden TOCSY- und HSQC-Pulssequenzen (Kap. 1.1.3.4). Dieses Spektrum dient wie die zweidimensionalen TOCSY- und COSY-Experimente der Identifizierung von Spinsystemen. Durch den HSQC-Teil der Sequenz werden im Unterschied zu einem TOCSY-Experiment nur die an  $^{15}\text{N}$  direkt gebundenen Protonen detektiert. Das Spektrum enthält eine zusätzliche  $^{15}\text{N}$ -Dimension. Protonensignale (Spinsysteme), die im 2D-Experiment überlagern, können so oftmals durch Dispersion in der dritten Dimension getrennt werden.

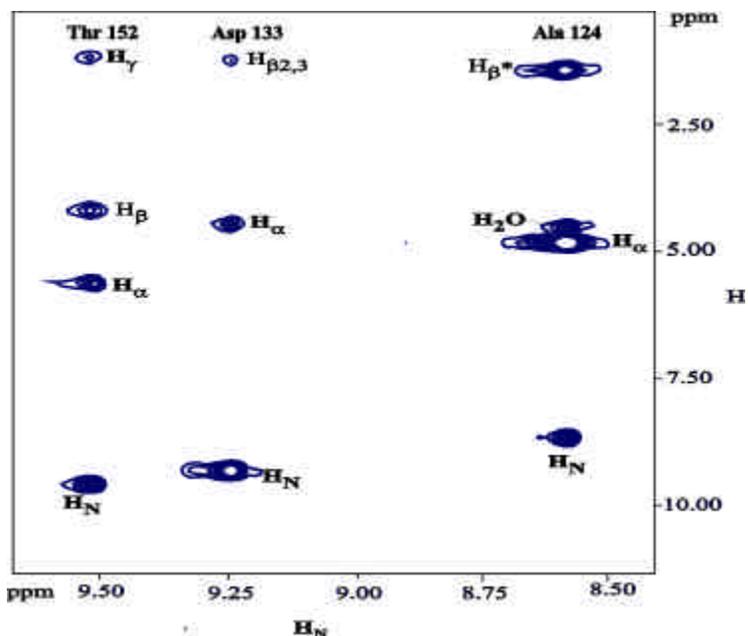


Abbildung 3-4: Ein Ausschnitt aus der TOCSY-Ebene ( $\delta(^{15}\text{N})=130,1$  ppm) der  $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC. \* bedeutet, dass die drei Protonen der  $\beta$ - $\text{CH}_3$ -Gruppe bei Alanin nicht voneinander unterscheidbar sind.

In Bild 3-4 ist eine Ebene aus dem  $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC Spektrum mit den Spinsystemen von Ala 124, Asp 133 und Thr 152 zu sehen.  $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC und HCCONH liefern zusammen eine Möglichkeit die Zuordnung zu verifizieren. Das  $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC-Spektrum zeigt ein zu jedem Stickstoffproton zugehöriges Spinsystem und das HCCONH-Spektrum das Spinsystem der vorherigen Aminosäure. Zum Beispiel waren für die ( $H_N$ , N) Koordinaten von Asp 133 (9.258, 130.273) in  $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC die Signale bei 1.2 und 1.9 ppm zu sehen. Dieselben Werte wurden bei den chemischen Verschiebungen ( $H_N$ , N) von Leu 134 (8.862, 123.487) im HCCONH-Spektrum gefunden.

### **3.1.1.2.3 HCCH-COSY**

Die noch nicht zugeordneten Kohlenstoffatome und Protonen wurden mit Hilfe des HCCH-COSY zugeordnet. Hier werden Protonen korreliert, die an benachbarten Kohlenstoffatomen gebunden sind. Das HCCH-COSY ist nützlich bei Aminosäuren mit längeren Seitenketten, wenn nicht klar ist, zu welchem Atom dieser Aminosäure ein Signal gehört. Das ist ein typisches Problem für die  $H_{\beta}$ -,  $H_{\gamma}$ -Atome von Leucin und die  $H_{\gamma}$ -,  $H_{\delta}$ -Protonen von Lysin, wo die chemischen Verschiebungen eng beieinander liegen. Das  $H_{\beta}$  kann durch die Kopplung mit dem bereits identifizierten  $H_{\alpha}$ -Atom zugeordnet werden. Z. B. wurden  $H_{\beta}$  und  $H_{\gamma}$  von Leu 134 auf diese Weise zugeordnet.

### **3.1.1.3 Darstellung der Zuordnung**

Mit dem oben beschriebenen Verfahren wurden die chemischen Verschiebungen aller Stickstoffatome und Stickstoffprotonen mit Ausnahme der Resonanzen von Gly 127 und Ser 155 gefunden.

#### **3.1.1.3.1 HSQC**

Das  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum korreliert Stickstoffatome mit den direkt gebundenen Wasserstoffatomen (Kap.1.1.3.4). Damit liefert dieses Spektrum eine Möglichkeit, die Zuordnung von Stickstoff und Stickstoffprotonen darzustellen. In Bild 3-5 ist ein HSQC-Spektrum der C1-Domäne von Nore1 zu sehen. Insgesamt beinhaltet dieses Spektrum 87 Signale. Zehn von ihnen wurden als Stickstoffprotonen der Seitenketten von Glutaminen

(Gln 104, Gln 106, Gln 142 und Gln 162) und Asparagin (Asp 148) identifiziert. Die restlichen 77 Signalen gehören zu Stickstoffprotonen des Proteinrückgrats. Das Protein hat aber nur 72 Aminosäuren, von denen zwei (Gly 127 und Ser 155) im Spektrum nicht zu sehen waren. Die vier in der C1-Domäne enthaltenen Proline haben keine Stickstoffprotonen.

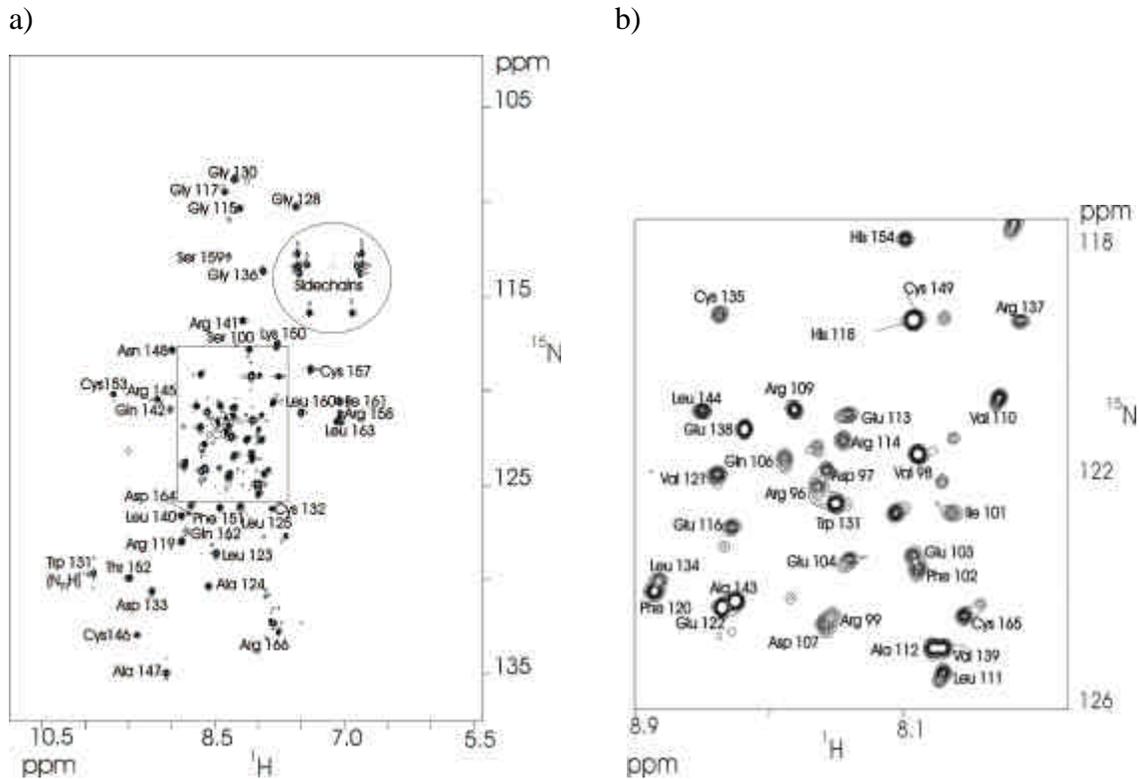


Abbildung 3-5: a)  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von Nore1 mit den zugeordneten Stickstoffprotonen und Stickstoffatomen der Aminosäuren; b) Ausschnitt aus diesem Spektrum.

Eine ähnliche Möglichkeit zur Darstellung aliphatischer und aromatischer Kohlenstoffprotonen und Kohlenstoffe liefern  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren. Diese Spektren korrelieren Kohlenstoffatome mit direkt gebundenen Protonen. Für die Strukturrechnung sind die NOEs zwischen  $\text{CH}_3$ -Gruppen der hydrophoben Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin und Alanin sehr wichtig, da sie zusammen mit den hydrophoben aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan die Faltung eines Proteins bestimmen. Sie bilden den hydrophoben inneren Kern des Proteins.

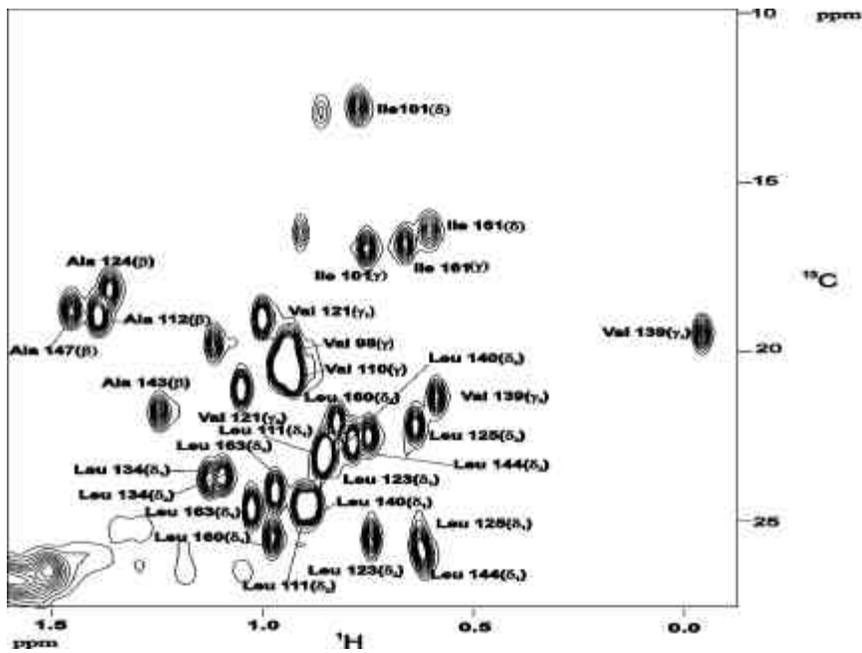


Abbildung 3-6: Ein Ausschnitt aus dem <sup>13</sup>C-HSQC-Spektrum von Nore1 mit den zugeordneten CH<sub>3</sub>-Gruppen.

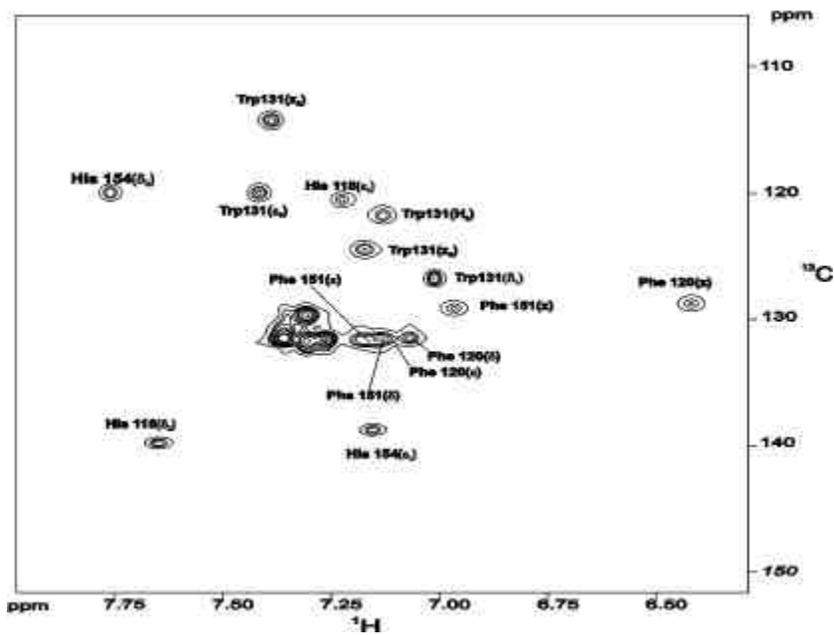


Abbildung 3-7: <sup>13</sup>C-HSQC-Spektrum der aromatischen Region der C1-Domäne von Nore1.

Die Zuordnung von CH<sub>3</sub>-Gruppen und aromatischen Aminosäuren ist in den Bildern 3-6 bzw. 3-7 zu sehen.

### 3.1.1.3.2 Darstellung der chemischen Verschiebungen in Form einer Tabelle

AS	H <sub>N</sub>	H <sub>α</sub>	H <sub>β</sub>	andere	N <sub>H</sub>	C <sub>α</sub>	C <sub>β</sub>
Pro95		4.4	2.29, 1.95	1.91(γ), 3.99(δ)		63.02	31.738
Arg96	8.386	4.32		1.74(γ), 3.21(δ)	121.79		
Asp 97	8.361	4.158	2.689		121.79	53.933	40.806
Val 98	8.083	4.13	2.166	0.949(γ)	121.366	62.371	31.656
Arg 99	8.327	4.356	1.73	1.63(γ), 3.18(δ)	124.453	55.96	30.448
Ser 100	8.238		3.867		117.384	58.037	63.764
Ile 101	7.981	4.096	1.771	1.101, 0.745	122.356	61.473	38.206
Phe 102	8.081	4.73	3.16, 2.95	7.254 (δ), 7.34 (z), 7.247(ε)	123.346	57.368	39.363
Glu 103	8.097	4.27	1.9,1.6	2.3	123.204	56.097	30.238
Gln 104	8.299	4.523	1.95, 2.09	2.43	123.204	53.375	28.574
Pro 105		4.485	2.3	1.9, 3.742		62.936	31.665
Gln 106	8.48	4.3	1,9, 2.0	2.36(γ)	121.508	55.421	29.787
Asp 107	8.33	4.828	2.58, 2.78		124.453	55.144	38.817
Pro 108		4.43	2.32	2.04(γ), 3.9(δ)		63.495	31.9
Arg 109	8.453	4.2	1.794, 1.84	3.214(δ), 1.649(γ)	120.518	56.806	29.973
Val 110	7.832	4.036	2.175	0.948(γ), 0.92	120.235	62.66	32.028
Leu 111	8.004	4.294	1.677	1.595(γ), 0.889	125.183	55.031	42.031
Ala 112	8.036	4.317	1.43		124.759	52.106	18.918
Glu 113	8.286	4.344	2.016	2.303	120.659	56.077	29.698
Arg114	8.303	4.408	1.9	1.72(γ), 3.2(δ)	121.084	55.808	30.805
Gly 115	8.194	3.91			110.315	45.182	
Glu 116	8.677	4.402	1.912	2.271(γ)	122.639	56.12	31.118
Gly117	8.377	4.06, 3.74			109.184	44.869	
His 118	8.061	4.955	2.8, 2.55	7.662(δ), 7.154(ε)	119.08	55.808	31.431
Arg 119	8.904	4.657	1.83	1.53, 1.63(γ), 3.23(δ)	127.728	54.245	31.431
Fhe 120	8.893	4.484	2.852	6.386(z), 7.06(δ), 7.098(ε)	123.77	61.111	39.857
Val 121	8.702	4.566	2.276	1.069(γ), 0.986(γ)	121.649	59.481	35.064
Glu 122	8.667	4.432	1.969	2.247(γ)	124.052	57.832	29.756
Leu123	8.488	4.593	1.53	0.817(δ), 1.27(γ)	128.293	53.199	44.147
Ala 124	8.526	4.462	1.367		130.131	51.442	18.344
Leu 125	8.223	4.364	1.583	1.494(γ), 0.695(δ)	125.89	54.212	40.344
Arg 126	8.293				122.144		
Gly 127		4.036				45.518	
Gly128	7.589	4.28, 3.99			110.066	43.88	

Pro 129		4.57	2.26, 2.05			62.677	32.86
Gly 130	8.303	4.41, 3.187			108.634	43.307	
Trp 131	8.338	4.749	2.893	9.9( $\epsilon_1$ ), 7.4 ( $\epsilon_3$ ), 7.3 ( $z_2$ ), 7.2 ( $z_3$ ), 7( $\delta_1$ )	122.215	56.409	31.743
Cys 132	7.867	4.075	2.02, 3.4		126.032	57.903	31.118
Asp 133	9.258	4.42	1.206, 1.9		130.273	56.409	40.267
Leu 134	8.862	4.875	2.33, 2.0	1.71( $\gamma$ ), 1.09( $\delta$ )	123.487	55.495	42.682
Cys 135	8.68	4.863	3.32, 3.08		118.68	58.933	31.118
Gly 136	7.93	4.017			113.45	46.432	
Arg 137	7.798	4.635	2.05, 1.98	3.26( $\delta$ ), 1.75( $\gamma$ )	119.116	54.558	32.993
Glu 138	8.609	3.92	1.65, 1.92	2.29( $\gamma$ )	120.964	56.433	30.18
Val 139	8.013	4.063	1.12	0.05( $\gamma$ ), 0.58( $\gamma$ )/	124.759	60.183	32.64
Leu 140	8.899	4.524		0.87, 0.77( $\delta$ ), 1.51( $\gamma$ )	126.456	54.558	43.309
Arg 141	8.206	4.296	2	1.547( $\gamma$ ), 3.26( $\delta$ )	116.136	57.371	30.493
Gln 142	9.027	4.418	2.076	2.307( $\gamma$ )	120.801	55.808	28.93
Ala 143	8.632	4.647	1.235		123.911	50.482	21.871
Leu 144	8.716	5.26	1.85, 1.185	1.514( $\gamma$ ), 0.675( $\delta$ ), 0.743	120.518	52.981	45.405
Arg 145	9.189	5.829	1.67, 1.73	1.412( $\gamma$ ), 3.06, 2.99( $\delta$ )	120.135	53.778	34.556
Cys 146	9.44	4.172	3.116, 1.98		132.676	58.51	29.03
Ala 147	9.119	4.203	1.502		134.633	53.927	18.87
Asn 148	8.983	4.759	2.811		117.691	54.458	39.678
Cys 149	8.152	5.044	3.1, .5		119.104	58.969	32.368
Lys 150	7.762	4.06	2.3,2	1.3, 1.27( $\gamma$ ), 1.63, 1.55( $\delta$ ), 2.95( $\epsilon$ )	117.384	58.364	29.071
Phe 151	8.516	4.34	2.764, 3.69	7.161( $\epsilon$ ), 6.951( $z$ ), 7.092 ( $\delta$ )	125.89	60.164	40.036
Thr 152	9.529	5.569	4.22	H $\gamma$ =1.13	129.698	62.128	70.801
Cys 153	9.686	6.376	2.837, 3.22		120.072	54.273	33.163
His 154	8.101	4.591	3.72, 3.66	7.751( $\delta$ ), 7.209( $\epsilon$ )	117.549	58.869	30.678
Ser 155			3.954			61.741	62.363
Glu 156	9.887	4.233	2.06	2.43	119.622	58.93	28.302
Cys 157	7.396	4.307	3.28, 2.95		118.774	61.118	30.49
Arg 158	7.054	3,74	1.475, 1.64	1.15, 0.98( $\gamma$ ), 2.64, 2.88( $\delta$ )	121.036	59.326	29.543
Ser 159	8.355	4.783	4.172, 3.94		112.743	59.692	62.388
Leu 160	7.503	4.403	1.58	1.87( $\gamma$ ), 0.96( $\delta$ )	120.916	54.179	41.821
Ile 161	7.088	3.721	1.714	0.68 ( $\gamma$ Ch3)	120.38	62.944	38.522
Gln 162	8.826	4.485	1.89	2.433 ( $\gamma$ )	127.281	55.031	29.985
Leu 163	7.086	4.479	1.58	1.8( $\gamma$ ), 1.017( $\delta$ )	121.319	54.486	43.611
Asp 164	8.779	4.513	2.558		125.843	53.617	41.116
Cys 165	7.925		2.4, 1.09		124.146	60.805	28.302
Arg 166	7.85	4.202	1.81	3.86, 3.16, 1.55	131.969	57.075	31.553

Tabelle 3-1: Zuordnung der Aminosäure der C1-Domäne von Nore1. Werte sind in ppm angegeben.

In Tabelle 3-1 ist die komplette Zuordnung aller identifizierten Protonen, C<sub>α</sub>- und C<sub>β</sub>-Kohlenstoff- und Stickstoffatome zu sehen.

### 3.1.2 Analyse der Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur der C1-Domäne wurde über drei unabhängige Parameter bestimmt. Zuerst wurden die Abweichungen der chemischen Verschiebungen von Durchschnittswerten in ungeordneten Peptiden untersucht. Dann wurden H<sub>α</sub>-H<sub>N</sub>-Kopplungskonstanten betrachtet. Als nächstes wurden NOEs analysiert, die für die Elemente der Sekundärstruktur spezifisch sind.

#### 3.1.2.1 Analyse der Sekundärstruktur mit Hilfe skalarer Kopplungen und chemischer Verschiebungen

##### 3.1.2.1.1 Kopplungskonstanten

Die skalaren Kopplungskonstanten zwischen H<sub>α</sub> und H<sub>N</sub> Atomen wurden aus den Quotienten der Intensitäten von H<sub>α</sub>-H<sub>N</sub> und H<sub>N</sub>-H<sub>N</sub> Signalen im HNHA-Spektrum berechnet, wie in Kapitel 2.3.1.3 beschrieben ist. Die Kopplungskonstanten sind in guter Näherung nur von den entsprechenden dihedralen Winkeln abhängig. Das wurde in der Arbeiten von Karplus [51] zum ersten mal gezeigt. Die Karplus-Gleichung  $J(H_N-H_\alpha) = A \cos^2 \theta - B \cos \theta + C$  verbindet die Kopplungskonstanten zwischen H<sub>N</sub> und H<sub>α</sub> Atomen  $J(H_N-H_\alpha)$  mit den dihedralen Winkeln  $\theta$  der Polypeptidkette. Die Konstanten in dieser Gleichung wurden in mehreren Arbeiten phänomenologisch getestet und hier aus [43] übernommen.

Als nächstes wird auf die Definition dihedraler Winkeln eingegangen. Wenn sowohl die Vektorprodukte der Vektoren  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  als auch der  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  nicht Null sind, sind die dihedralen Winkel für die Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$ , die gegen den Uhrzeigersinn rund um  $\vec{b}$  gemessene Winkel  $\alpha$  (Abbildung 3-8) zwischen  $\vec{a} \times \vec{b}$  und  $\vec{b} \times \vec{c}$ .  $\times$  bezeichnet hier ein Vektorprodukt zwischen zwei Vektoren.  $\vec{a} \times \vec{b}$  und  $\vec{b} \times \vec{c}$  liegen in einer zu  $\vec{b}$  senkrechten Ebene.

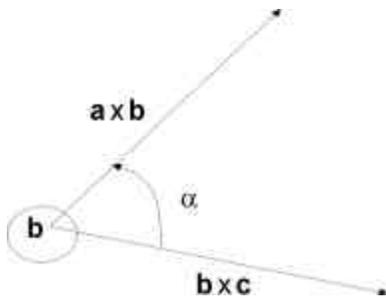


Abbildung 3-8: Definition des dihedralen Winkels.

Der dihedrale Winkel  $\theta$  ist durch die Vektoren  $(H_N, N)$ ,  $(N, C_\alpha)$  und  $(C_\alpha, H_\alpha)$  und der Winkel  $\psi$  durch die Vektoren  $(N, C_\alpha)$ ,  $(C_\alpha, CO)$  und  $(CO, N)$  definiert. Die dihedralen Winkel  $\theta$  und  $\psi$  des Proteinerückgrats sind in Bild 3-9 dargestellt. Dihedrale Winkel liegen theoretisch zwischen  $-180^\circ$  und  $+180^\circ$ . Werden aber die Volumina und Van der Waals Radien der Atome mitberücksichtigt, sind die meisten Zustände der Proteinkette (Paare von  $\theta$  und  $\psi$ ) nicht mehr möglich, weil die Atome sich räumlich behindern. Die Karplus-Gleichung hat vier Lösungen. Die Winkel zwischen  $-60^\circ$  und  $-180^\circ$  wurden ausgewählt, weil sie den Konformationen ohne räumliche Behinderungen entsprechen [52].

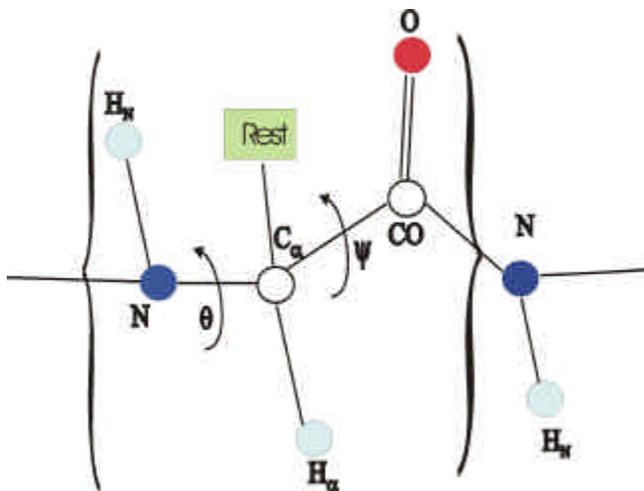


Abbildung 3-9: Ein Ausschnitt aus der Peptidkette mit den gezeigten dihedralen Winkeln  $\theta$  und  $\psi$ . Die Klammern begrenzen eine Aminosäure der Peptidkette.

In Tabelle 3-2 sind die gemessenen Kopplungskonstanten und die mit der Hilfe der Karplus-Gleichung daraus berechneten dihedralen Winkel  $\theta$  aufgelistet.

AS	J(H <sub>N</sub> -H <sub>α</sub> )	$\theta$
Val 98	6.26	-136.17
Ile 101	5.90	-133.54
Gln 104	5.93	-133.82
Gln 106	5.87	-133.29
Asp 107	4.94	-126.39
Arg 109	5.60	-131.33
Val 110	6.45	-137.60
Leu 111	5.61	-131.40
Glu 113	5.94	-133.84
Gly 115	5.42	-129.99
Glu 116	6.49	-137.86
Gly117	4.82	-125.54
Arg 119	8.10	-150.86
Val 121	8.68	-156.40
Glu 122	3.66	-116.37
Leu123	7.77	-147.98
Ala 124	5.57	-131.12
Leu 125	6.56	-138.40
Gly128	4.60	-123.91
Gly 130	6.70	-139.50
Trp131	7.90	-149.05
Cys 132	5.41	-129.94
Asp 133	4.62	-124.00
Cys 135	7.07	-142.33

AS	J(H <sub>N</sub> -H <sub>α</sub> )	$\theta$
Gly 136	5.20	-128.37
Arg 137	7.56	-146.19
Glu 138	2.67	-107.04
Leu 140	7.21	-143.45
Arg 141	5.93	-133.76
Gln 142	6.20	-135.71
Ala 143	6.46	-137.64
Leu 144	7.95	-149.56
Arg 145	7.27	-143.90
Cys 146	4.52	-123.26
Ala 147	3.20	-112.24
Asn 148	8.06	-150.49
Cys 149	6.76	-139.93
Lys 150	5.98	-134.08
Fhe 151	2.31	-102.88
Thr 152	8.30	-152.64
Cys 153	6.74	-139.79
His 154	4.40	-122.34
Cys 157	7.49	-145.67
Leu 160	7.21	-143.42
Gln 162	7.30	-144.16
Asp 164	5.22	-128.53
Arg 166	6.66	-139.21

Tabelle 3-2: H<sub>N</sub>-H<sub>α</sub>-Kopplungskonstanten J und dihedrale Winkel  $\theta$  aus der C1-Domäne von Nore1

Hohe Werte der Kopplungskonstanten entsprechen Aminosäuren in  $\beta$ -Faltblättern (im idealen Fall  $\varphi=-180^\circ$ ,  $J=9.7$ ), schwache Kopplungen Aminosäuren in  $\alpha$ -Helizes (im idealen Fall  $\varphi=-120^\circ$ ,  $J=4.2$ ). Die Kopplungskonstanten wurden nicht für alle Aminosäuren ermittelt, weil einige Resonanzen nicht im HNHA-Spektrum zu finden waren. Andere Signale haben sich überlagert, was die Intensitätsanalyse unmöglich machte.

### **3.1.2.1.2 Chemische Verschiebungen**

Die Differenzen zwischen den experimentellen chemischen Verschiebungen von  $H_\alpha$ -,  $C_\alpha$ - und  $C_\beta$ -Atomen und den Werten für ungefaltete Peptide (*random coil* Werten) geben Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Die Verschiebungen von  $H_\alpha$  und  $C_\beta$  zu höheren Werten relativ zu *random coil* Werten sind charakteristisch für Falblätter, Verschiebungen zu kleineren Werten dagegen für Helizes. Das umgekehrte Bild wird für  $C_\alpha$  beobachtet.

### **3.1.2.1.3 Auswertung der J-Kopplungen und der chemischen Verschiebungen zur Bestimmung der Sekundärstruktur**

In Bild 3-10 sind die J-Kopplungen und die Abweichungen der chemischen Verschiebungen von den *random coil* Werten zu sehen. Sowohl die chemischen Verschiebungen von  $H_\alpha$  und  $C_\beta$  als auch J-Kopplungen der Aminosäuren Val 121 bis Leu 123 und Phe 151 bis Cys 153 sind charakteristisch für  $\beta$ -Faltblätter. Diese Regionen bilden das erste und das fünfte (letzte) Falblatt von C1. Das zweite wurde durch J-Kopplungen und durch  $C_\alpha$ - und  $C_\beta$ -Verschiebungen von Gly 130 bis Cys 132 identifiziert. Die  $H_\alpha$ -Verschiebungen deuten auf ein  $\beta$ -Falblatt zwischen Arg 137 und Val 139 hin. Das Falblatt Ala 143 bis Arg 145 ist durch alle vier Parameter bestimmt. Die chemischen Verschiebungen von  $H_\alpha$ ,  $C_\alpha$  und  $C_\beta$  für die Region zwischen Glu 156 und Leu160 sind typisch für eine  $\alpha$ -Helix.

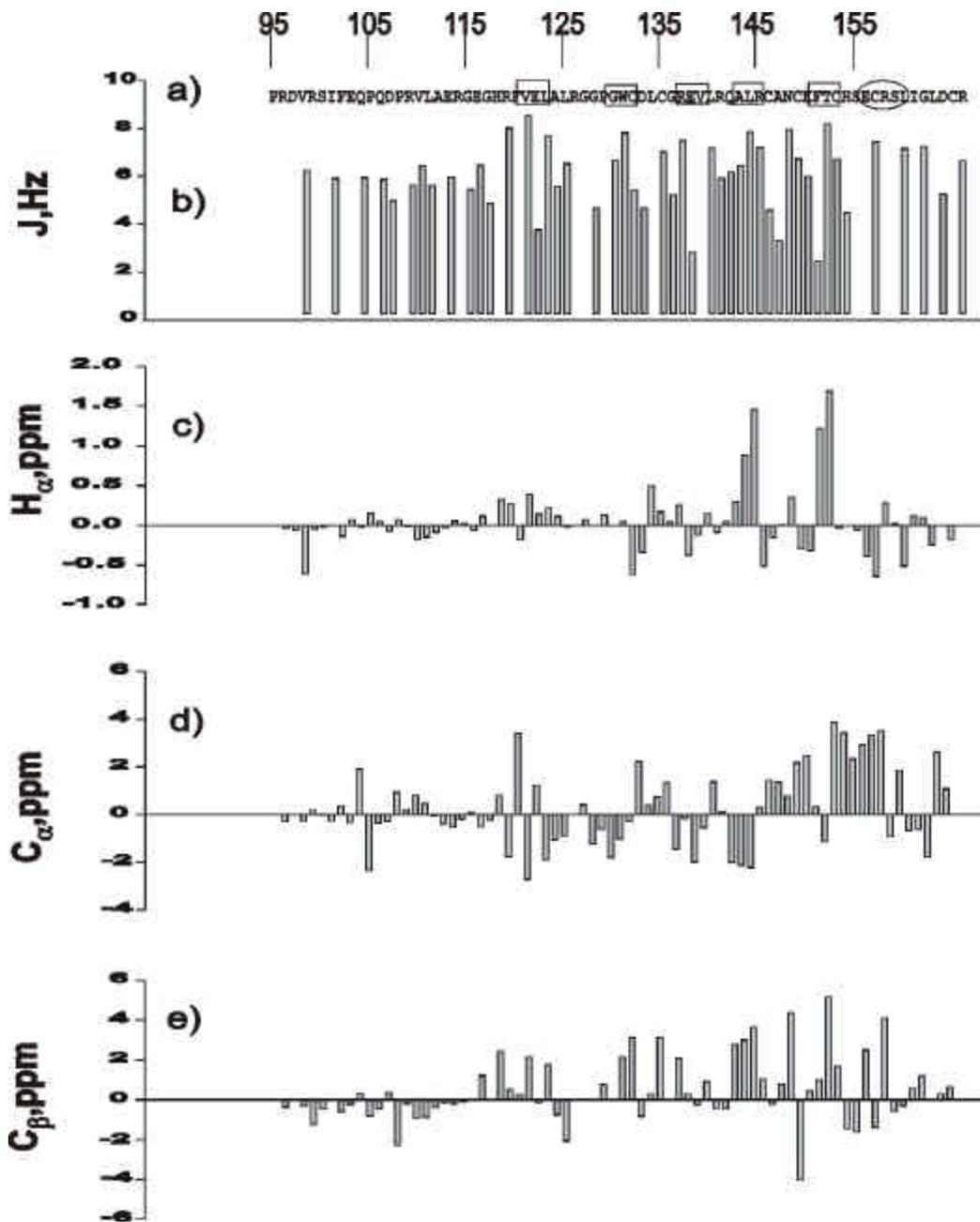


Abbildung 3-10: Graphische Darstellung der Parameter, die die Sekundärstruktur der C1-Domäne von Nore1 abbilden. In a) ist die Primärsequenz der C1-Domäne aufgetragen. Die Aminosäuren in  $\beta$ -Faltblättern sind mit Rechtecken und die in der  $\alpha$ -Helix ist mit einem Oval umrahmt. In b) sind die skalaren  $H_N$ - $H_{\alpha}$  Kopplungskonstanten  $J$  zu sehen, in c), d) und e) die Abweichungen chemischer Verschiebungen der  $H_{\alpha}$ -Protonen,  $C_{\alpha}$  und  $C_{\beta}$ -Atome von *random coil* Werten für die C1-Domäne von Nore1.

### 3.1.2.2 Analyse der Sekundärstruktur mit NOEs

#### 3.1.2.2.1 $\beta$ -Faltblätter

Zwischen den Rückgratprotonen der Aminosäuren in  $\beta$ -Faltblättern wurden die in Abbildung 3-11 gezeigten NOEs gefunden. Starke NOEs zwischen dem  $H_N$  einer Aminosäure und dem  $H_\alpha$  der vorherigen Aminosäuren, und zwischen  $H_N$  und  $H_\alpha$  von benachbarten Strängen bilden ein für Faltblätter typisches NOE Muster.

Wie in Kapitel 2.3.1.2 beschrieben ist, lassen sich durch Messungen in  $D_2O$  die Wasserstoffsbrücken identifizieren. Die Probe wurde dafür lyophilisiert und dann in  $D_2O$  wiederaufgelöst.

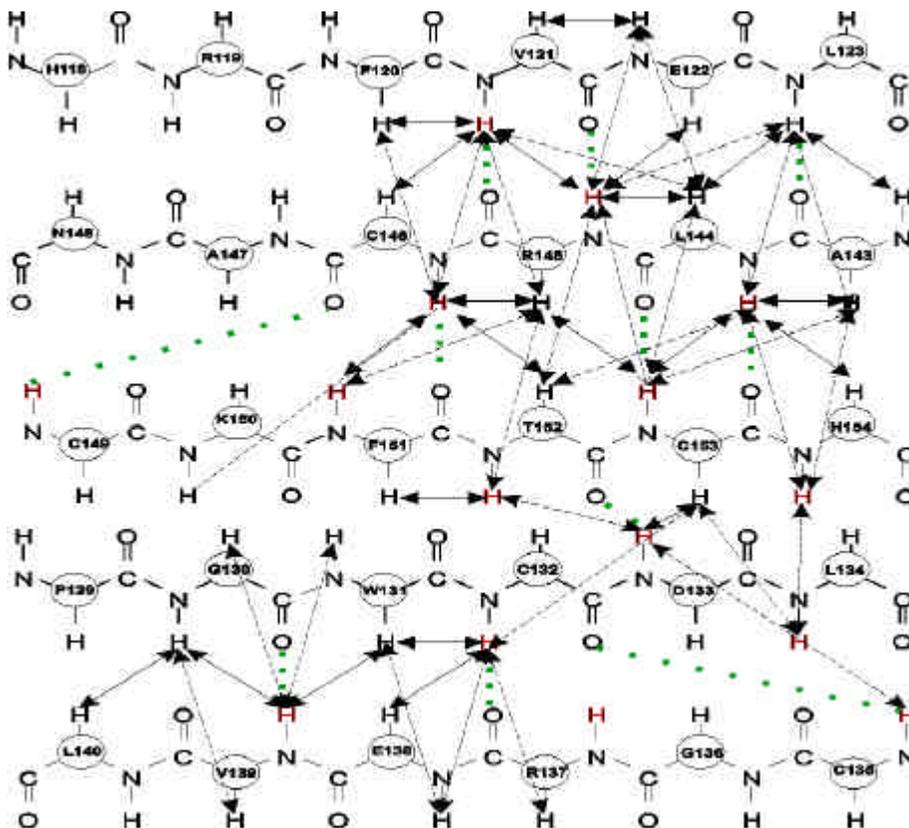


Abbildung 3-11: Darstellung der  $\beta$ -Faltblätter von Nore1. Starke und mittlere NOEs sind durch durchgezogene Pfeile gekennzeichnet, schwache durch unterbrochene. Rot sind die Protonen gefärbt, die in  $D_2O$  nach zwei Stunden noch sichtbar waren. Die Wasserstoffbrücken sind grün dargestellt.

Die Stickstoffprotonen von Arg 119, Val 121, Cys 132, Asp 133, Leu 134, Cys 135, Arg 137, Val 139, Leu 144, Arg 145, Cys 146, Cys 149, Phe 151, Thr 152, Cys 153, His 154, Cys 157 sind im ersten HSQC-Spektrum zwei Stunden nach Zugabe von D<sub>2</sub>O bei einem pH Wert von 6.9 noch sichtbar. Der Austausch dieser Protonen ist durch Wasserstoffbrücken verlangsamt. Die in Bild 3-11 rot gezeichneten Protonen befinden sich in Wasserstoffbrücken. Das Stickstoffproton von Leu 123 war im in D<sub>2</sub>O aufgenommenen Spektrum nicht sichtbar. Es findet sich aber in allen gerechneten Strukturen innerhalb einer Distanz von 2.2 Å zum Sauerstoffatom der Aminosäure Ala 143. Aufgrund dieses Abstands und des Abstands zwischen dem N von Leu 123 und dem O von Ala 143 (3.3 Å) wurde zwischen den zugehörigen Aminosäuren eine Wasserstoffbrücke angenommen. Für die langsam ausgetauschten Protonen von Arg 119, Leu 134, Arg 137, Phe 151 und His 154 wurden keine Wasserstoffbrücken bildenden Partner gefunden. Das Stickstoffproton von Cys 157 liegt in der helikalen Region und bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoff von His 154.

### 3.1.2.2.2 $\alpha$ -Helix

Typische NOEs für  $\alpha$ -Helizes sind in [52] aufgelistet. Dies sind NOEs zwischen dem Stickstoffproton einer Aminosäure zum  $\alpha$ -Proton einer drei oder vier Plätze davorstehenden Aminosäuren. Weiterhin sind NOEs zwischen zwei Stickstoffprotonen, die durch eine Aminosäure sequenziell getrennt sind, typisch für Helizes. In Tabelle 3-3 ist die Anwesenheit dieser NOEs in der  $\alpha$ -Helix der C1-Domäne von Nore1 gezeigt. Keine  $\alpha$ N(i, i+4) NOEs wurden für diese Helix gefunden. Ser 155 wurde nicht zugeordnet und Gln 156 war sehr schwach zu sehen. Für diese Aminosäuren wurden auch keine NOEs gefunden.

	His 154	Cys 157	Arg 158	Ser 159
$\alpha$ N(i, i+3)	+	+	+	
NN(i, i+2)				+

Tabelle 3-3: Die für  $\alpha$ -Helizes typischen NOEs des C-Terminus der C1-Domäne. In Klammern stehen die Nummern der beteiligten Aminosäuren.

### 3.1.2.3 Identifizierung nicht strukturierter Regionen mit $^1\text{H}\{-^{15}\text{N}\}$ -NOE-Spektren und Relaxationszeiten

$^1\text{H}\{-^{15}\text{N}\}$  NOE Spektren liefern Informationen über die Beweglichkeit eines HN-Vektors einer Aminosäure im Pikosekundenbereich. Die vollständig ungefalteten Teile eines Proteins, die sich frei bewegen können, erzeugen negative Signale. Je unbeweglicher das Rückgrat einer Aminosäure ist, desto positiver ist das Signal in diesem Spektrum.

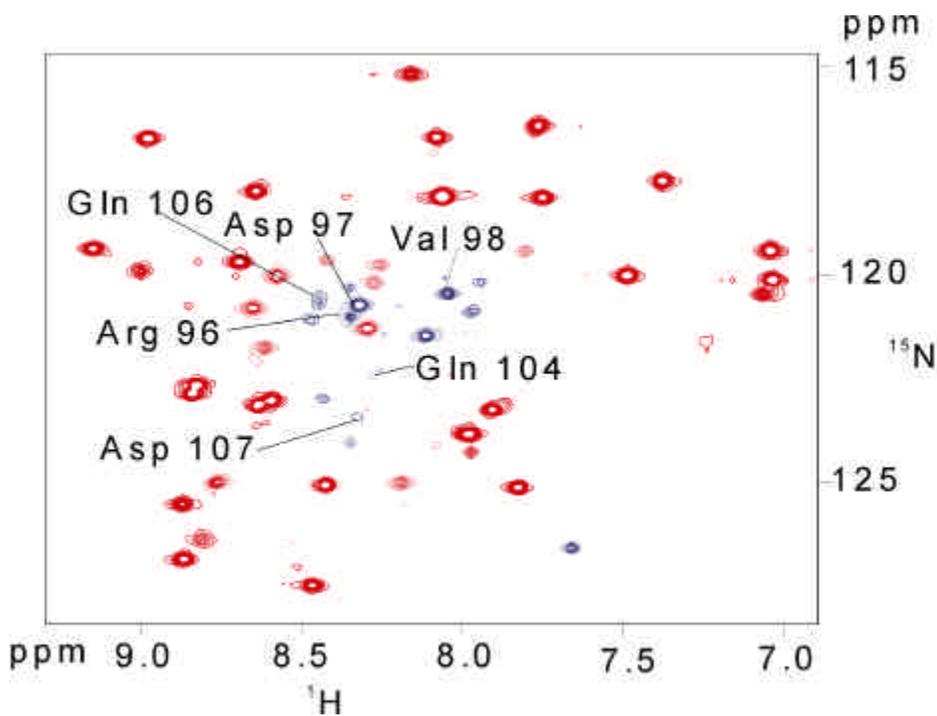


Abbildung 3-12: Ausschnitt aus einem  $^1\text{H}\{-^{15}\text{N}\}$ -NOE-Spektrum von Nore1. Blaue Resonanzen stellen negative Signale und rote positive dar. Nur die Minima, an deren Stelle im Kontrollspektrum (ein Spektrum ohne Vorsättigung) ein Signal vorhanden ist, sind markiert.

Negative Signale wurden bei Arg 96, Asp 97, Val 98, Gln 104, Gln 106 und Asp 107 gemessen (Bild 3-12). Die Signale von Arg 99, Ser 100, Ile 101, Phe 102, Glu 103 waren wegen zu kleiner Intensität nicht zu sehen. Diese im N-Terminus liegenden Aminosäuren sind frei beweglich und deshalb nicht strukturiert. Sie wurden in die Berechnung der Struktur nicht miteinbezogen.

Die longitudinalen Relaxationszeiten  $T_1$  und die transversalen Relaxationszeiten  $T_2$  sind von den Bewegungen auf der Zeitskala von  $10^{-8}$ - $10^{-12}$  s abhängig. Darüber hinaus hängt  $T_2$  auch noch von Bewegungen im Millisekunden- bis Mikrosekundenbereich ab. [53]. Der  $R_2/R_1$  Quotient ist ein Maß für die Korrelationszeit der Aminosäure [15], wobei  $R_2=1/T_2$  zu  $R_1=1/T_1$  sind. Die Korrelationszeit ist die Zeit, die eine Aminosäure oder ein Molekül braucht um sich um ein Radian zu drehen. Der Zusammenhang zwischen  $R_2/R_1$  und Korrelationszeit wird im Folgenden für die Relaxation durch dipolare Kopplungen betrachtet. Unter der Bedingung, dass die Korrelationsfunktion durch eine einzige Exponential-Funktion beschrieben werden kann, kann die longitudinale Relaxationsrate für die dipolare Relaxation folgendermaßen ausgedrückt werden [54]:

$$R_1 = 0.1t_c (2pR)^2 \left[ \frac{1}{1 + (\omega_H - \omega_N)^2 t_c^2} + \frac{3}{1 + \omega_N^2 t_c^2} + \frac{6}{1 + (\omega_H + \omega_N)^2 t_c^2} \right],$$

wobei  $R = (\mu_0/4\pi) g_H g_N (h/2\pi) r_{HN}^{-3}$  die Konstante dipolarer Wechselwirkung,  $t_c$  eine Korrelationszeit der Aminosäure,  $\omega_H$  und  $\omega_N$  Larmor-Frequenzen von Protonen bzw. von Stickstoffatomen und  $r_{HN}$  der Abstand zwischen H und N sind. Für ein Spektrometer mit 600 MHz wird  $\omega_H = 2\pi \cdot 600$  rad\*MHz und  $\omega_N = 2\pi \cdot 60$  rad\*MHz. Die transversale Relaxationsrate hat die Form:

$$R_2 = 0.05t_c (2pR)^2 \left[ 4 + \frac{1}{1 + (\omega_H - \omega_N)^2 t_c^2} + \frac{3}{1 + \omega_N^2 t_c^2} + \frac{6}{1 + (\omega_H + \omega_N)^2 t_c^2} + \frac{6}{1 + \omega_H^2 t_c^2} \right]$$

Eine mit Sigma-Plot erstellte Abhängigkeit  $R_2/R_1$  von der Korrelationszeit ist in Bild 3-12 zu sehen. Diese Abhängigkeit ist parabolisch für  $t_c > 10^{-14}$  s (Bild 3-13, links). Die Korrelationszeiten von Proteinen liegen in Nanosekundenbereich. Deswegen ist diese Situation für Proteine gegeben. Für  $\omega_N t_c > 1$  wird dieses parabolische Verhalten hier gezeigt. Die Terme in den Gleichungen für  $R_1$  und  $R_2$ , die andere Frequenzen als  $\omega_N$  beinhalten, können vernachlässigt werden, weil deren Nenner um zwei Größenordnungen größer ist. Somit kann  $R_2/R_1$  folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$\frac{R_2}{R_1} = \frac{4 + \frac{3}{1 + \omega_N^2 \tau_c^2}}{3} = 1 + \frac{4}{3} (1 + \omega_N^2 \tau_c^2)$$

Diese Gleichung ist quadratisch. Wenn  $\omega_N \tau_c \ll 1$  ist, ist das Verhältnis  $R_2/R_1$  nicht mehr von  $\tau_c$  abhängig. (Bild 3-13, rechts). Das trifft für kleine Moleküle zu.

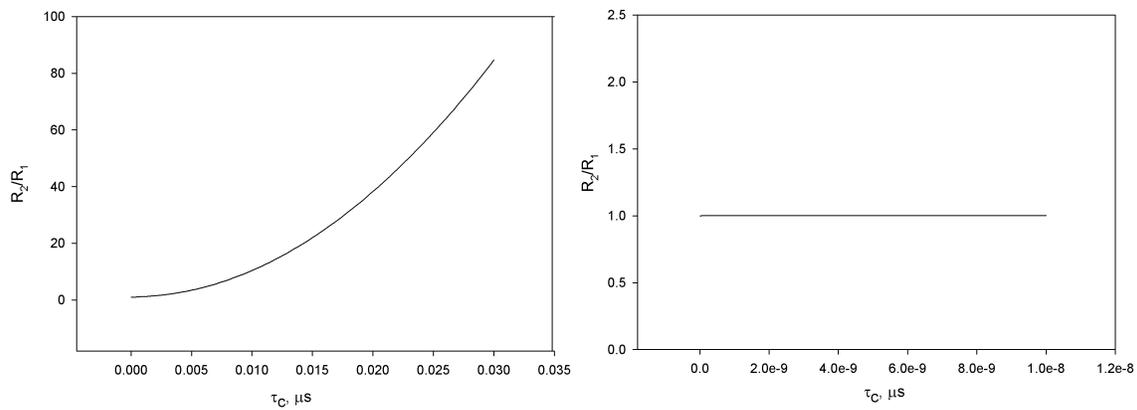


Abbildung 3-13:  $R_2/R_1$ -Quotienten in Abhängigkeit von Korrelationszeiten links für große und rechts für kleine Korrelationszeiten  $\tau_c$ . Die Gleichung wurde mit Sigma-Plot gezeichnet.

In Bild 3-14 sind die Quotienten  $R_2/R_1$  für die Aminosäuren der C1-Domäne gezeigt.

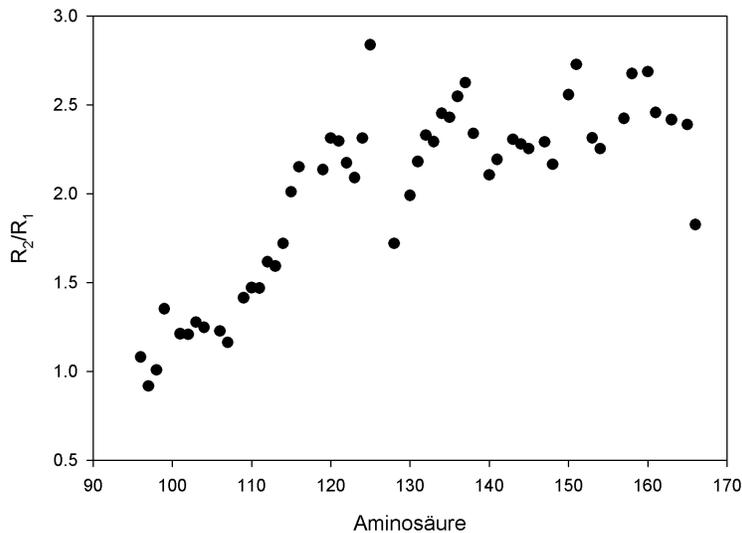


Abbildung 3-14:  $R_2/R_1$ -Quotienten gegen Aminosäurenummer

Die Werte für die Aminosäuren im strukturierten Teil liegen zwischen 2.0 und 2.8. Aus dem Mittelwert für den strukturierten Teil des Proteins (118-123, 130-165) ist die Korrelationszeit  $\tau_c$  für das ganze Molekül zu ermitteln. Die großen Abweichungen vom Mittelwert zu den kleineren Werten im N-Terminus, bei Gly 128 und bei der letzten Aminosäure Arg 166 bedeuten eine zusätzliche Beweglichkeit in diesen Regionen (kleinere Korrelationszeiten). Die kleinsten, um Eins liegenden  $R_2/R_1$  Werte, sind bei den ersten drei Aminosäuren zu beobachten. Wenn die flexiblen Regionen ausgenommen werden, liegt der mittlere Wert für das Protein bei 2.36.

### 3.1.3 3D-Struktur von Nore1

#### 3.1.3.1 Berechnung

Die aus den NMR-Daten ermittelten NOEs, dihedralen Winkel und Wasserstoffbrücken wurden in CNS eingegeben (Kapitel 2.3). Insgesamt wurden für die C1-Domäne von Nore1 475 NOEs, 48 dihedrale Winkel und 17 Wasserstoffbrücken gefunden. Davon waren 147 NOEs zwischen Atomen von Aminosäuren, die durch mehr als fünf Reste voneinander getrennt sind. 65 NOEs wurden zwischen Aminosäuren gefunden, die durch

2 - 5 Reste getrennt sind. Außerdem wurden 164 sequentielle NOEs verwendet. Die restlichen NOEs waren intraresidual. Im Durchschnitt wurden für die Strukturberechnung acht NOEs pro Aminosäure benutzt. Sieben davon waren zwischen Atomen von verschiedenen Aminosäuren. Schwach definierte Bereiche sind im N-Terminus und in einer beweglichen Region (Ala 124 - Pro 129). Bereiche hoher Präzision sind die rigiden Elemente der Sekundärstruktur. Die meisten NOEs (bis zu 47 interresiduale) wurden für die langkettigen aliphatischen und aromatischen Aminosäuren wie z. B. Val 139, Leu 144 und His 154 gefunden, die im Proteininneren liegen. Die Anzahl der interresidualen NOEs, die für die Aminosäuren aus C1-Domäne von Nore1 gefunden sind, ist in Bild 3-15 dargestellt.

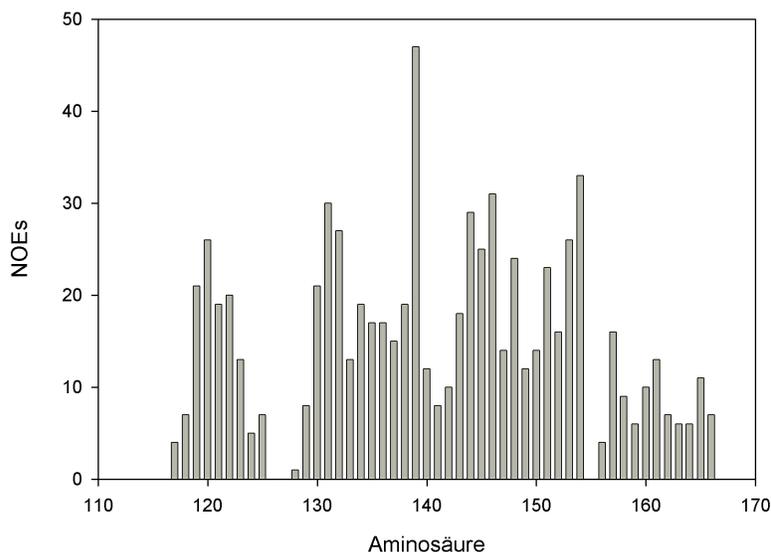


Abbildung 3-15: Anzahl der interresidualen NOEs für Aminosäuren aus der C1-Domäne von Nore1.

Bei den letzten Schritten der Strukturbestimmung wurde das selbstgeschriebene Programm zur automatischen NOE-Suche verwendet. Das Programm benutzt vorläufige Strukturen und rechnet daraus Abstände zwischen je zwei Protonen. Dann werden aus diesen Abständen starke, schwache oder mittlere NOEs ermittelt, wie es in 2.3.1.1 beschrieben ist. Die Liste der chemischen Verschiebungen wurde im Programm angegeben. Die gerechneten NOEs wurden in den Signallisten von NOESY-HSQC-Spektren gesucht. Waren diese NOEs dort zu finden, wurden sie in eine neue NOEs-Liste eingetragen. Die gerechneten NOE-Listen der drei energetisch besten Strukturen wurden

miteinander verglichen und gemeinsame NOEs wurden für die nächste Rechnung verwendet. Mit diesem Verfahren wurden 53 von 475 NOEs gefunden.

Zwölf Wasserstoffbrücken wurden aufgrund der langsam austauschenden Stickstoffprotonen identifiziert. Die Annahme einer Wasserstoffbrücke zwischen Leu 123 und Ala 143 wurde in 3.1.2.2.1 begründet. Vier Wasserstoffbrücken im Bereich der  $\alpha$ -Helix wurden in den letzten Rechnungen aus der Struktur der verwandten C1-Domäne aus PKC $\delta$  (PDB Nummer 1PTQ) übernommen. Durch die Einführung dieser Brücken wurde eine bessere Definition der  $\alpha$ -Helix erreicht. Dabei wurde kein NOE verletzt.

In allen bekannten C1-Domänen sind die Zink-Ionen tetraedrisch koordiniert. Mit Hilfe von CNS wurde die Moleküldynamik-Simulation im Torsionswinkelraum durchgeführt [55]. In der genannten Arbeit wurde gezeigt, dass dieser Algorithmus eine höhere Konvergenzrate und eine höhere Rechnungseffektivität für die Strukturberechnung als die Dynamik im kartesischen Raum aufweist. Leider kommt das Programm mit einer vernetzten Aminosäuren-Kette, die durch eine Verknüpfung des Zinks mit allen vier koordinierenden Atomen entsteht, nicht zurecht. Deswegen wurden die Zinkatome durch kovalente Verknüpfung nur mit Cys 157 bzw. mit Cys 165 verbunden. Sowohl die Bindungsparameter für diese Bindungen als auch die Abstände zwischen Zink und den restlichen koordinierenden Atomen wurden aus [39] bzw. [40] übernommen. Diese Parameter sind typisch für tetraedrische Zink-Koordinierung durch Cysteine und Histidine. Eine weitere Zink-Topologiemöglichkeit (eine kovalente Bindung von jedem Zinkatom zu vier koordinierenden Atomen) wird am Ende der Arbeit diskutiert.

Für die Strukturrechnung wurde ein „*simulated annealing*“ benutzt. „*Simulated annealing*“ bezeichnet einen Prozess der langsamen Kühlung, anfangend von einem hochenergetischen, ungeordneten Zustand. Da die Kühlung langsam vorangeht, befindet sich das System die ganze Zeit näherungsweise im thermodynamischen Gleichgewicht. Zuerst wurden jedem Atom der ungefalteten Peptidkette mit der Sequenz der C1-Domäne hohe Geschwindigkeiten gemäß einer Maxwell Verteilung zugeordnet. 15 ps lang wurde eine Moleküldynamik im Torsionswinkelraum bei 50000 K durchgeführt. Danach wurde eine langsame Abkühlung innerhalb von 15 ps vorgenommen. Der Moleküldynamikzeitschritt war 0.015 ps. Nach jedem fünften Zeitschritt wurde das Protein um 250° gekühlt. Als letztes wurde die Energiefunktion  $E = E_{chem} + E_{nmr}$  nach

dem Konjugierten-Gradienten Verfahren [56] in 2000 Schritten minimiert.  $E_{chem}$  beinhaltet *a priori* Kenntnisse und beschreibt sowohl die Abweichungen von der idealen Geometrie, das heißt von den idealen Bindungslängen und Winkeln, als auch die Van der Waals Energien.

$E_{nmr}$  beschreibt experimentelle Daten und besteht aus einem Term der NOEs und einem Term der dihedrale Winkel beinhaltet:

$$E_{nmr} = E_{dihedral} + E_{NOE}$$

$E_{NOE}$  beschreibt die Abweichungen von den experimentell ermittelten Abständen

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

Dabei sind  $r_{ij}$  und  $r_{ij}^0$  der aktuelle bzw. aus den experimentellen NOE-Daten resultierende Abstand zwischen den Protonen  $i$  und  $j$ .  $K_{NOE}$  ist eine Konstante, die eine Gewichtung des NOE Terms gegenüber den anderen Termen der Gleichung vorgibt. Um die Abhängigkeit der berechneten Strukturen von den Anfangsbedingungen zu vermeiden, wurden 50 Strukturen mit unterschiedlichen Anfangswerten berechnet.

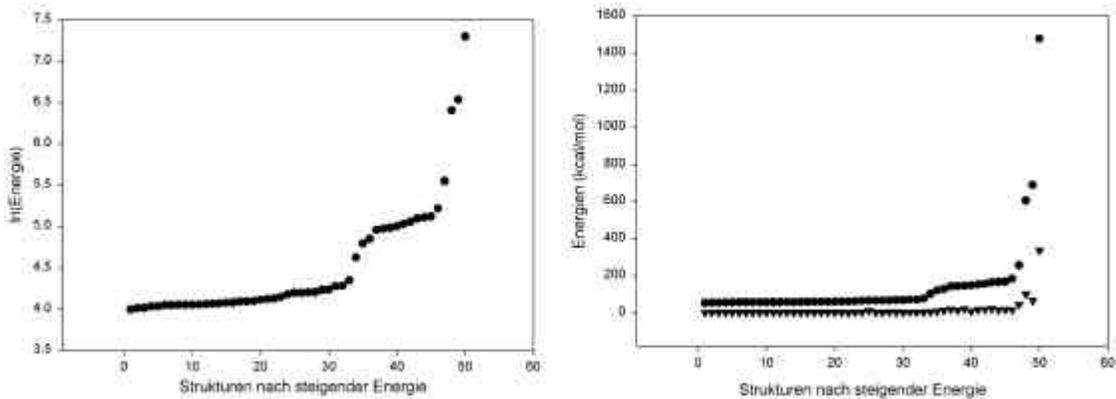


Abbildung 3-16: Das Energieprofil von 50 gerechneten Strukturen. Links in einer logarithmischen Darstellung und rechts in einer linearen. Im rechten Teil sind die gesamten Energien als Kreise und die Energien von NOE-Verletzungen als Dreiecken dargestellt. Die Strukturen sind nach wachsenden Energien sortiert.

In Bild 3-16 sind die Gesamtenergien und die Energien der NOE Verletzungen für die gerechneten Strukturen gezeigt. Die ersten zwanzig Strukturen besitzen ungefähr gleiche Energien. Deswegen wurden sie zu einem Ensemble ausgewählt, das die Struktur der C1-Domäne von Nore1 repräsentiert.

### 3.1.3.2 Qualität der Struktur

Die Qualität einer Gruppe von ausgewählten Strukturen wird durch die Energien der Strukturen, durch Abweichungen der gerechneten Strukturen voneinander und durch den Ramachandranplot abgeschätzt. Die Energien und die Abweichungen in den unbeweglichen Regionen sollen möglichst klein sein. Der größte Teil der Aminosäuren soll dihedrale Winkeln haben, die in den vollständig erlaubten Regionen des Ramachandranplots liegen. Der Ramachandranplot für das Ensemble von 20 ausgewählten Strukturen der C1-Domäne von Nore1 ist in Bild 3-17 zu sehen. 59.9% der Aminosäuren sind in den vollständig erlaubten Regionen (rot) und 0.8% in den verbotenen Regionen zu finden (weiß). Die Daten zur Qualitätseinschätzung sind in Tabelle 3-3 gezeigt. Als wichtigstes Qualitätskriterium dienen die Abstandsquadrate gleicher Atome zweier Strukturen. Die Wurzel des mittleren Abstandsquadrats (RMSD) der Atome des Proteinerückrats von je zwei Strukturen beträgt 0.32 Å. Dabei wurden die im Abschnitt 3.1.2.3 als beweglich eingestuften Aminosäuren des N-Terminus (107-118), des Loops zwischen Ala 124 und Pro 129, und die letzte Aminosäure Arg 166 nicht mitberücksichtigt. Wenn alle Atome außer Wasserstoff mitgerechnet wurden, wurde ein Wert von 0.97 Å ermittelt. Die Überlagerung der 20 ausgewählten Strukturen ist in Bild 3-18 zu sehen. Bereiche schwacher Überlagerung passen zusammen mit den in 3.1.2.3 ermittelten beweglichen Regionen. Größere Abweichungen im C-Terminus sind darauf zurückzuführen, dass die Aminosäuren Gln 162 und Asp 164 nur sehr schwache Signale liefern. Für diese konnten nur wenige NOEs gefunden werden.

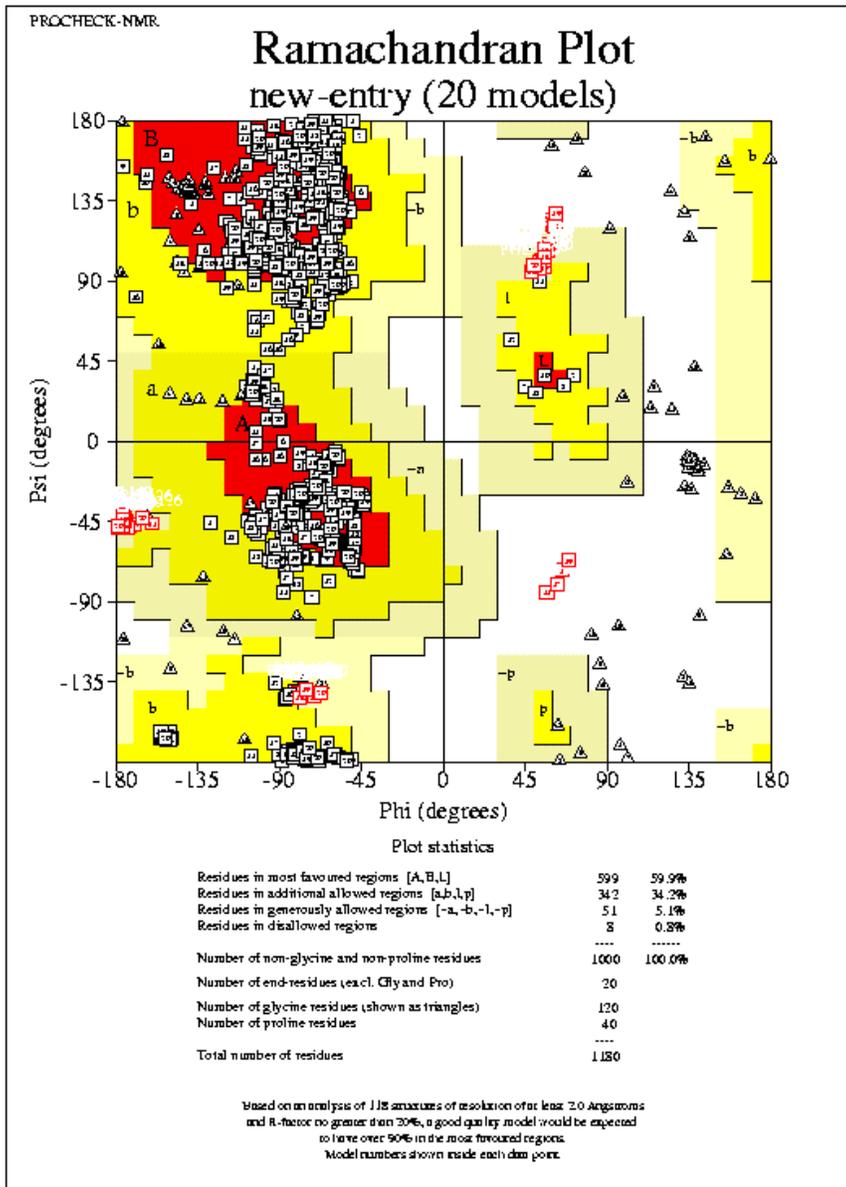


Abbildung 3-17: Ramachandranplot für das Ensemble von 20 ausgewählten Strukturen der C1-Domäne von Nore1. Das Bild wurde mit dem Programm *Auto Dep Input Tool* (ADIT) erstellt. Dihedrale Phi-Winkeln sind aus den Theta-Winkeln folgendermaßen zu berechnen:  $\phi = \theta + 60^\circ$ .

---

Anzahl der Einschränkungen	
NOEs	
Insgesamt	475
davon weitreichende NOEs (Mindestens fünf Aminosäuren zwischen den beteiligten Aminosäuren)	147
medium NOEs (2-4 Aminosäuren zwischen den beteiligten Aminosäuren )	65
Sequentielle NOEs	164
Dihedrale Winkel	48
Wasserstoffbrücken	17
RMSD Abweichungen von experimentellen Werten	
Abstände (NOEs)(Å)	0.0076 ± 0.0013
Dihedrale Winkel (°)	0.23 ± 0.09
RMSD Abweichungen von idealer Geometrie	
Bindungslänge (Å)	0.0014 ± 0.0001
Bindungswinkel (°)	0.39 ± 0.01
"Improper" Winkel(°)	0.20±0.02
Energien (kcal mol <sup>-1</sup> )	
Gesamtenergie	62.62±6.72
van der Waals	17.71±2.73
Verletzung der idealen Bindungslängen	1.72±0.34
Verletzung der idealen Winkel	37.75± 2.57
Verletzung der idealen "improvers"	3.01± 0.67
Verletzung der NOEs	2.26± 0.03
Verletzung der dihedralen Winkel	0.17±0.17
Ramachandranplot (%)	
Vollständig erlaubte Regionen	59.9
Zusätzlich erlaubte Regionen	34.2
Standartabweichungen von der gemittelten Struktur (A)	
Rückgrat (118-123, 130-165)	0.32
Alle schweren Atome (118-123, 130-165)	0.97

---

Tabelle 3-3: Qualitätsanalyse für das Ensemble von zwanzig ausgewählten Strukturen.

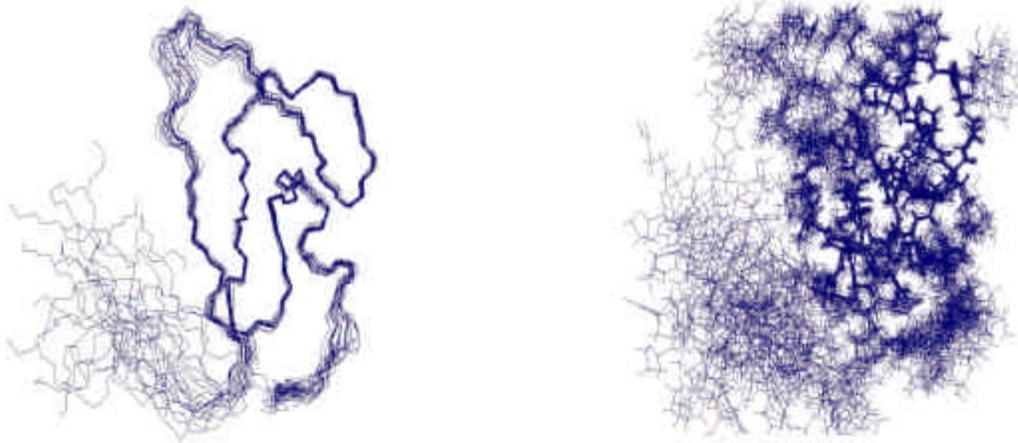


Abbildung 3-18: Überlagerung von 20 zu einem Ensemble ausgewählten Strukturen der C1-Domäne von Nore1 nur für das Proteinrückgrat (links) und für die gesamte Domäne (rechts).

### 3.1.3.3 Tertiärstruktur der C1-Domäne von Nore1

Die Tertiärstruktur der C1-Domäne von Nore1 besteht aus zwei  $\beta$  Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix, deren Position in Bild 3-19 zu sehen ist. Der hydrophobe Kern des Proteins wird aus den Seitenketten der Aminosäuren His 118, Phe 120, Cys 132, Val 139, Ala 143, Leu 144, Cys 146, Cys 149, Cys 153 und Ile 161 gebildet. Die  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$   $\text{CH}_2$ -Gruppen von Lys 150,  $\epsilon_2$  und  $\delta_2$  CH-Gruppen von Phe 151 und  $\text{CH}_3$ -Gruppe von Thr 152 liefern einen zusätzlichen Beitrag zum Kern.

Ein Zinkatom wird durch die  $\text{S}_\gamma$  Atome von Cys 132, Cys 135, Cys 157 und das  $\text{N}_{\delta 1}$  Atom von His 154 fixiert. Cys 132 und Cys 135 liegen in einem Turn zwischen dem zweiten und dem dritten Faltblatt und Cys 157 gehört zur  $\alpha$ -Helix. His 154 liegt zwischen dem letzten Faltblatt und der Helix. Das andere Zinkatom wird durch  $\text{N}_{\delta 1}$  von His 118 und  $\text{S}_\gamma$  von Cys 146, Cys 149 und Cys 165 koordiniert. His 118 liegt im N-Terminus der C1-Domäne. Cys 146 und Cys 149 liegen zwischen dem vierten und fünften Faltblatt. Hingegen befindet sich Cys 165 im C-Terminus des Proteins.

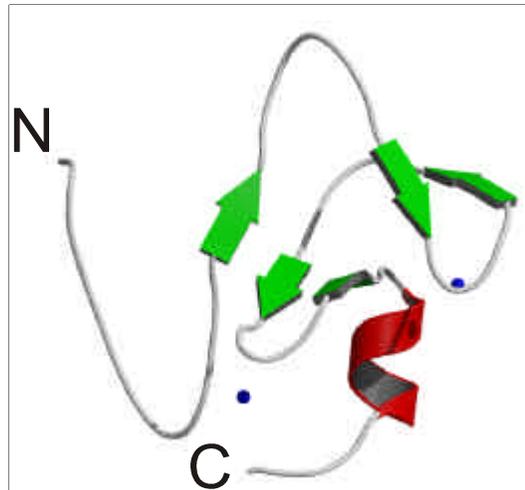


Abbildung 3-19: Molscriptdarstellung [57] der Tertiärstruktur der C1-Domäne von Nore1. Die  $\beta$ -Faltblätter sind grün und die  $\alpha$ -Helix rot gezeichnet. Die Zinkatome sind als blaue Kugeln dargestellt.

### 3.3 Untersuchung der Rolle der C1-Domäne von Nore1 bei der Bindung von Ras

Nore1 bindet mit Hilfe der Ras Bindenden Domäne die kleine GTPase Ras im GTP gebundenen Zustand. Um die Rolle der C1-Domäne bei dieser Bindung zu untersuchen wurde von Sabine Wolgemuth ein  $^{15}\text{N}$  markiertes C1-RBD-Konstrukt exprimiert.

#### 3.3.1 Titration von C1-RBD mit RAS

Es wurde ein  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von C1-RBD gemessen. Ras wurde in sechs Schritten bis zu einem Verhältnis von 1:1 zu C1-RBD titriert. Nach jeder Zugabe wurde ein HSQC-Spektrum gemessen. Für C1-RBD ohne Ras und bei dem vollständig titrierten Protein (molares Verhältniss von Ras zu C1-RBD 1:1) wurden  $T_1$ - und  $T_2$ - $^{15}\text{N}$ -Relaxationszeiten gemessen.

##### 3.3.1.1 $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren

Das  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von C1-RBD zeigt einige Unterschiede im Vergleich zu der freien C1-Domäne (Bild 3-20). Die Signale, die den N und  $\text{H}_\text{N}$  Atomen des Rückgrats der Aminosäuren Trp 131, Cys 132, Asp 133 und Thr 152 und der  $\epsilon$ -Resonanz von Trp 131

entsprechen, sind im  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von C1-RBD nicht mehr zu finden. Die Signale von Val 121, Glu 122, Gly 128, Gly 130, Leu 134, Gly 136, Arg 137, Glu 138, Lys 150, Phe 151, His 154 und von der  $\delta\text{NH}_2$ -Gruppe von Asn 148 haben sich verschoben. Diese Verschiebungen für Protonen und Stickstoffresonanzen sind in Tabelle 3-4 aufgelistet.

AA	$\Delta\delta\text{H}$ , ppm	$\Delta\delta\text{N}$ ,ppm
Val 121	0.000	-0.280
Glu 122	0.015	-0.035
Gly 128	0.029	0.076
Gly 130	-0.060	-0.043
Leu 134	0.087	0.796
Gly 136	-0.062	-0.544
Arg 137	-0.157	-1.016
Glu 138	0.102	0.1870
Lys 150	-0.142	-0.9560
Phe 151	0.195	-0.0450
His 154	-0.043	-0.1510

Tabelle 3-4: Die Änderungen der chemischen Verschiebungen in C1-RBD relativ zu der freien C1-Domäne. Trp 131, Cys 132, Asp 133 und Thr 152 sind in der Tabelle nicht aufgelistet, weil sie nur ein Signal liefern. Die Änderungen  $\Delta\delta\text{H}$  und  $\Delta\delta\text{N}$  wurden aus den überlagerten  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von freien C1 und C1-RBD gerechnet, indem die chemischen Verschiebungen in freier C1 von den chemischen Verschiebungen in C1-RBD abgezogen wurden.

Bei Zugabe von Ras wurden die Spektren von C1-RBD dem Spektrum der freien C1 immer ähnlicher. Bei gleicher molaren Konzentrationen von Ras und C1-RBD glichen die chemischen Verschiebungen des C1-Anteils denen der freien Domäne. Dabei verschieben sich die Signale von Val 121, Glu 122, Gly 128, Leu 134 und His 154 kontinuierlich. In jedem Spektrum ist für diese Aminosäuren nur ein Mittelwert von Zuständen mit Ras und ohne Ras zu sehen. Die Signale von Gly 130, Gly 136, Arg 137, Glu 138, Lys 150 und Phe 151 sind auch bei C1-RBD relativ zu denen der freien C1 verschoben. Bei einem molaren Verhältnis von Ras zu C1-RBD im Bereich von 0.2-0.4

tauchten die Signale der freien C1-Domäne auf und wurden mit der Zugabe von Ras immer stärker. Das gleiche Bild ist auch für Rückgrat-Resonanzen von Trp 131, Cys 132, Asp 133 und Thr 152 und die  $\epsilon$ -Resonanz von Trp 131 zu beobachten. Die entsprechenden Signale sind bei C1-RBD nicht zu sehen. Val 121, Glu 122, Gly 128, Leu 134 und His 154 sind in einen schnellen, alle anderen genannten Aminosäuren in einen langsamen Austausch [58] bei Zugabe von Ras verwickelt.

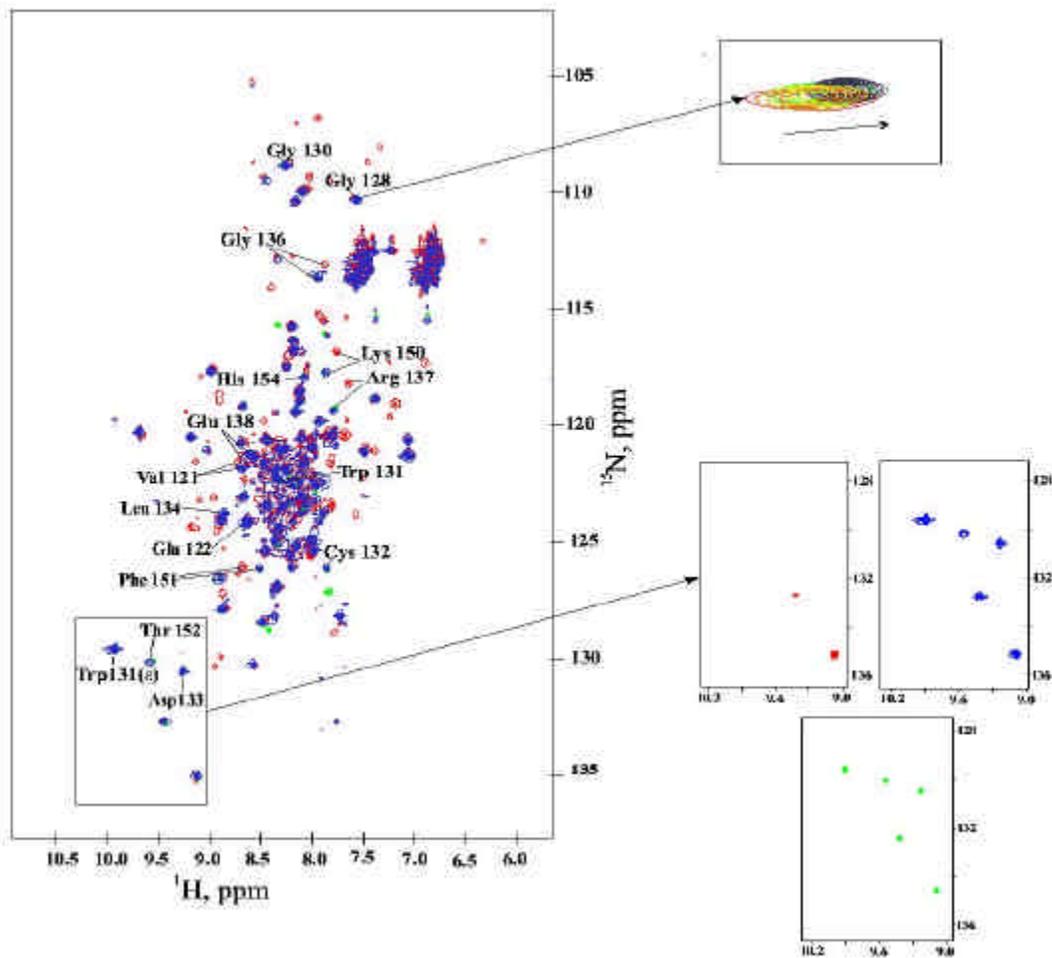


Abbildung 3-20: Bindung von Ras an die C1-RBD.  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von C1 sind grün, von C1-RBD rot und von C1-RBD mit Ras (1:1) blau gezeichnet. Die Beispiele für einen schnellen Austausch (oben) und einen langsamen Austausch (unten) sind gezeigt.

Langsamer Austausch bedeutet, dass die Austauschrate klein im Vergleich zur Differenz der chemischen Verschiebungen von zwei Zuständen ist. Wenn die Austauschrate groß in

Vergleich zu dieser Differenz ist, spricht man von einem schnellen Austausch. Beispiele für einen langsamen und einen schnellen Austausch sind in Bild 3-20 zu sehen. Die Änderungen der Signale während der Titration sind in Tabelle 3-5 aufgelistet.

a)

AA	$\Delta\delta H$	$\Delta\delta N$
Val 121	-0.017	0.214
Glu 122	-0.044	0.062
Gly 128	-0.019	-0.068
Gly 130	0.036	0.016
Leu 134	-0.078	-0.731
Gly 136	-0.181	0.03
Arg 137	0.144	1.042
Glu 138	-0.073	-0.106
Lys 150	0.114	0.761
Phe 151	-0.185	0.019
His 154	0.018	0.158

b)

AA	20%		30%		50%		75%		100%	
	$\delta H$	$\delta N$								
Gly 128	-0.004	-0.022	-0.016	-0.039	-0.019	-0.068	-0.019	-0.068	-0.019	-0.068

c)

% Ras	Gly 130, C1	Gly 136, C1	Gly 150, C1	Phe 151, C1-RBD	Phe 151, C1
10	0.225			1	
20	0.441	0.309	0.278	0.780	0.378
30	0.535	0.312	0.398	0.656	0.417
50	0.853	0.835	0.871	0.508	
75	0.953	1.015	0.923	0.419	1.002
100	1	1	1	0.306	1

Tabelle 3-5: Ras-Titration. a) Darstellung der Änderungen der chemischen Verschiebungen in C1-RBD bei einem molaren Verhältnis von Ras zu C1-RBD von 1:1 relativ zu den chemischen Verschiebungen bei

einem molaren Verhältnis von Ras:C1-RBD von 0.1:1. b) Änderungen der chemischen Verschiebungen von Gly 128 bei der Zugabe von Ras relativ zu den chemischen Verschiebungen bei einem molaren Verhältnis von Ras:C1-RBD von 0.1:1. Die Signale von Val 121, Glu 122, Glu 138 und His 154 überlagern sich teilweise mit den anderen Signalen und es war nicht möglich die genaue Position dieser Signale während der Titration zu verfolgen. c) Die Intensitätsänderungen von Signalen bei der Zugabe von Ras. Es sind nur Aminosäuren aufgelistet, von denen Signale in mehr als vier Titration-HSQC-Spektren vorhanden sind. Die Intensitäten sind auf die Werte im letzten Spektrum normiert.

### 3.3.1.2 $^{15}\text{N}$ -Relaxationsmessungen

Der Mittelwert von  $R_2/R_1$  über den strukturierten Teil des Proteins bildet die Korrelationszeit für das ganze Molekül ab. Je größer dieses Verhältnis ist, desto größer ist die Korrelationszeit. Wenn zwei Teile eines Moleküls nur durch ein frei bewegliches Peptid verbunden sind, verhalten sie sich fast wie zwei getrennte Moleküle mit eigenen Relaxationszeiten. Wenn aber diese Teile aneinander binden, können sie als ein Molekül betrachtet werden. Dadurch steigt der  $R_2/R_1$  Quotient. Diese Relationen für die freie C1-Domäne, C1-RBD und C1-RBD mit Ras (1:1) sind in Bild 3-21 zu sehen.

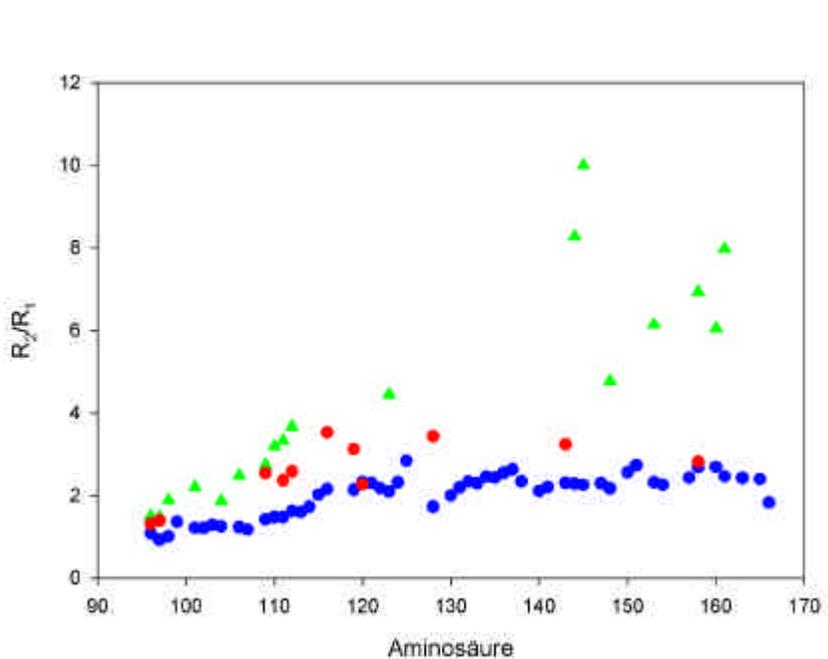
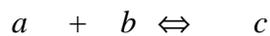
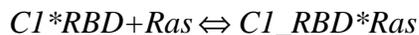


Abbildung 3-21: Die  $R_2/R_1$  Quotienten für C1 (blau), C1-RBD grün und C1-RBD mit Ras in molaren Verhältniss 1:1.

Aus dem Bild 3-21 ist ersichtlich, dass der Mittelwert von  $R_2/R_1$  für den strukturierten Teil des freien C1-Domäne (118-123, 130-165) bei 2.4 liegt. Bei C1-RBD steigt dieser Wert auf 6.8. Diese Steigerung lässt sich durch die Wechselwirkung zwischen zwei Domänen erklären. Nach der Zugabe von Ras fällt der  $R_2/R_1$  des strukturierten Teils zu den fast gleichen Werten (Mittelwert 2.85) wie bei der freien C1-Domäne ab. An Beispiel von Arg 158 ist es gut zu sehen. Für die freie C1-Domäne liegt der Quotient bei 2.7, für C1-RBD bei 6.9. Am Ende der Titration (1:1), ist der Quotient auf 2.8 gesunken.

### 3.3.1.3 Ermittlung der Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstanten  $k_d$  für die Bindung von Ras an C1-RBD wurden für die Aminosäuren ermittelt, die an einem langsamen Austausch beteiligt waren. Diese Signale aus dem HSQC-Spektrum der freien C1-Domäne sind im Spektrum von C1-RBD abwesend oder verschoben, tauchen aber bei der Ras-Titration wieder auf. Die Dissoziationskonstante ist durch die folgende kinetische Gleichung definiert:



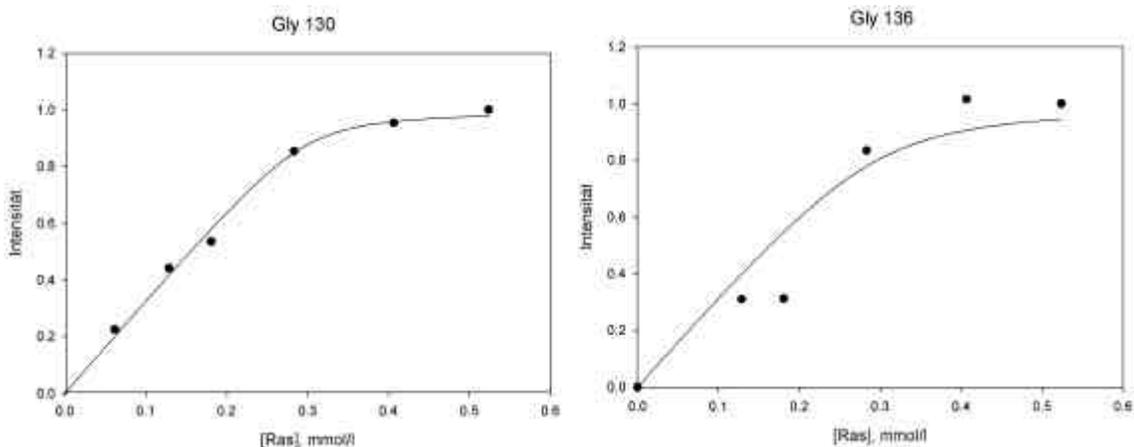
$$k_d = \frac{[a][b]}{[c]} \tag{3-1}$$

C1\*RBD bezeichnet den Zustand von C1-RBD, in dem beide Domäne miteinander wechselwirken. C1\_RBD\*Ras bezeichnet den binären Komplex aus C1-RBD und Ras, in dem die C1 und RBD-Domänen nur über einen Linker, nicht aber über ein gemeinsames Interface wechselwirken. [a,] [b] und [c] sind die molaren Konzentrationen von C1\*RBD, Ras und C1\_RBD\*Ras. Diese Reaktion entspricht der Bindung von Ras an RBD und der Dissoziation der C1 von RBD. Wenn die Relationen  $[a_{tot}] = [a] + [c]$ ,  $[b_{tot}] = [b] + [c]$  und  $a = a_{tot}(1 - I/I_{end})$  in die Gleichung 3-1 eingesetzt werden und diese Gleichung nach I aufgelöst wird, erhält man Gleichung 3-2.  $[a_{tot}]$  und  $[b_{tot}]$  sind dabei die gesamten Konzentrationen von freien und gebundenen C1-RBD und Ras. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Intensität eines Signals linear von der Konzentration abhängt. Die

Intensität wurde in Abhängigkeit von der Ras-Konzentration untersucht und mit der Gleichung 3-2 gefittet:

$$I = \frac{I_{end}}{2[a_{tot}]} \left( [b_{tot}] + [a_{tot}] + k_d - \sqrt{([b_{tot}] + [a_{tot}] + k_d)^2 - 4[a_{tot}][b_{tot}]} \right) \quad 3-2.$$

Dabei sind I eine Intensität eines Signals in einem HSQC-Spektrum und  $I_{end}$  die Intensität am Ende der Titration. Die gefitteten Kurven und experimentelle Punkte sind in Bild 3-22 dargestellt. Alle Intensitäten wurden auf den Mittelwert der unveränderten Signale (erste drei Aminosäuren) skaliert. Bei der Titration wurden die Signale in den HSQC-Spektren und die Relaxationszeiten des N-Terminus nicht verändert. Deswegen wurde in jedem Spektrum ein Mittelwert der Intensitäten von Arg 96, Asp 97 und Val 98 berechnet. Diese Werte wurden miteinander verglichen und ein Skalierungsfaktor wurde für jedes Spektrum ermittelt. Die Analyse war möglich für die Rückgrat-Stickstoffprotonen und die Rückgrat-Stickstoffatome von Gly130, Gly136, Lys150 und Phe151 und für  $N_{\epsilon 1}$  von Trp131.



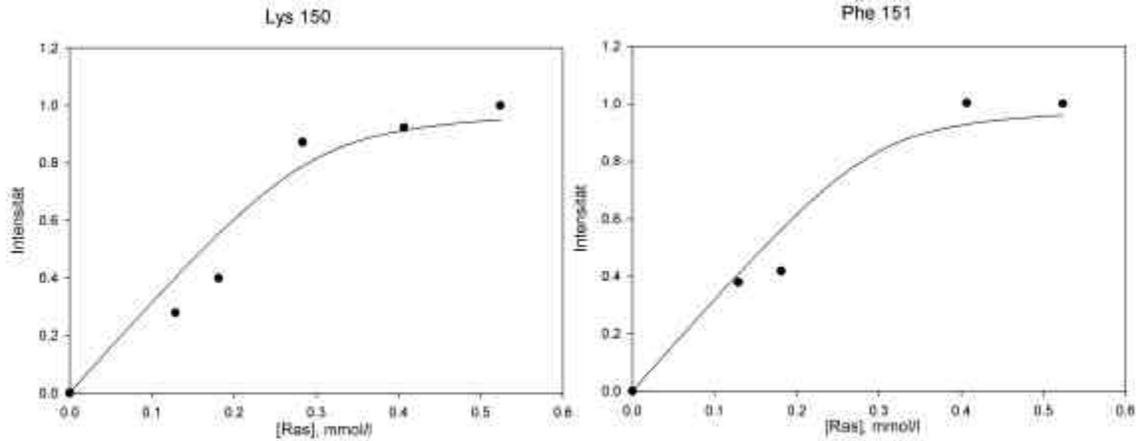


Abbildung 3-22: Abhängigkeit der Signalintensitäten in HSQC-Spektren von der Ras-Konzentration für Gly 130, Gly 136, Lys 150, Phe 151. Die durchgezogene Linie stellt die an die Daten gefittete Gleichung 3-2 dar. Die Intensität wird auf den Mittelwert der Intensitäten von Arg 96, Asp 97 und Val 98 skaliert und auf  $I_{\text{end}}$  normiert.

Die ermittelten Dissoziationskonstanten liegen im Bereich von 5-13  $\mu\text{mol/l}$ . Die Werte für die vier Aminosäuren sind in Tabelle 3-5 aufgelistet:

Aminosäure	$k_d, \mu\text{mol/l}$
Gly 130	$5 \pm 2$
Gly 136	$12 \pm 12$
Lys 150	$13 \pm 10$
Phe 151	$10 \pm 10$

Tabelle 3-5: Die nach Gleichung 3-2 ermittelten Bindungskonstanten.

Die Seitenkettensignale von Trp 131 ließen sich nicht mit der Gleichung 3-1 fitten. Für die Rückgrat-Stickstoffprotonen und Rückgrat-Stickstoffatome von Trp 131, Cys 132, Asp 133 und Thr 152 waren nicht genug Punkte vorhanden. Diese Signale waren nur anwesend, wenn mehr als 30% Ras zugegeben wurde.

## 3.3.2 Bindungsfläche von C1-Domäne zu RBD

### 3.3.2.1 Ermittlung der Bindungsfläche

Die mutmaßliche Bindungsfläche besteht aus Aminosäuren, deren Signale sich während der Titration verändert haben. Sie wurden in Kapitel 3.3.1 besprochen. Die Bindungsfläche ist in Bild 3-19 zu sehen. Die Aminosäuren Gly 130, Trp 131, Cys 132, Asp 133, Leu 134, Gly 136, Arg 137, Glu 138, Lys 150, Phe 151 und Thr 152 liegen räumlich benachbart und bilden eine gemeinsame Oberfläche. Val 121, Glu 122 und Gly 128 sind räumlich von den anderen durch die Bindung von Ras beeinflussten Aminosäuren entfernt. Während der Titration sind diese drei Aminosäuren in einen schnellen Austauschprozess verwickelt und deswegen in Bild 3-19 grün markiert.

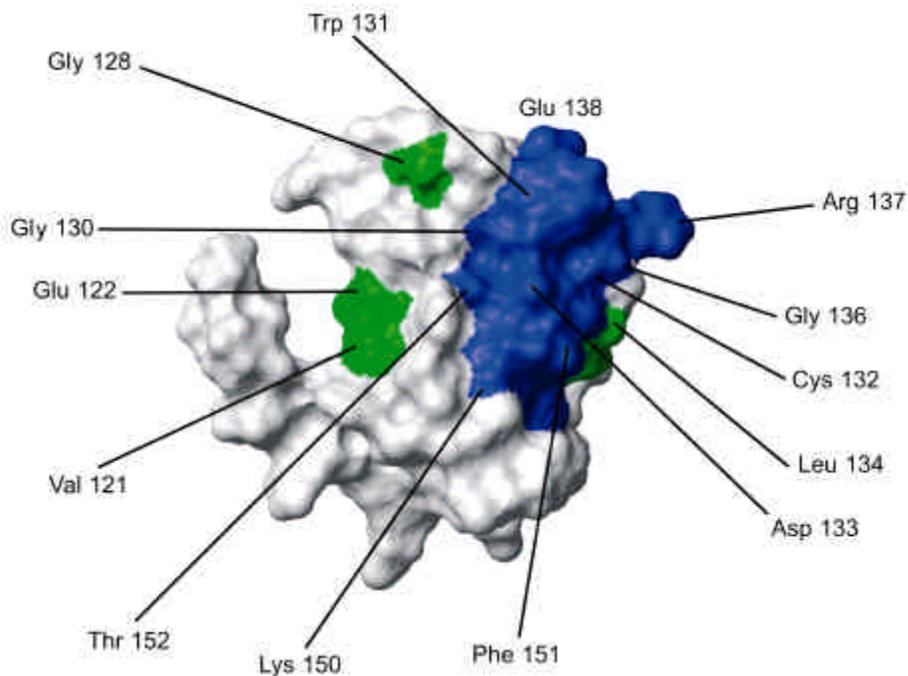


Abbildung 3-23: Vermutliche Bindungsfläche von C1 zu RBD. Blau sind Aminosäuren, die sich in einem langsamen Austausch und grün, solche, die sich in einem schnellen Austausch bei der NMR-Titration befinden. His 154 ist in dieser Orientierung nicht zu sehen. Das Bild wurde mit dem Programm Molmol [59] erstellt.

## 4 Diskussion

### 4.1. Einige Anmerkungen zur Datenauswertung

Einige Probleme der Datenauswertung möchte ich hier besprechen. Das erste Problem stellt die Anzahl der Signale in  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren dar. Das zweite hat mit der Identifizierung von Wasserstoffbrücken zu tun. Das dritte Problem sind die fehlenden wichtigen NOEs im helikalen Bereich.

#### 4.1.1 Anzahl der Resonanzen in HSQC-Spektren

Im  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum (Kapitel 3.1.1.3.1, Bild 3-5) sind aus 77 vorhandenen Signalen 66 zugeordnet. Sechs von den nicht zugeordneten Signalen liegen im *random coil* Bereich und deuten auf einen ungefalteten Zustand hin. Fünf sind aber weit von diesem Bereich verschoben und bedeuten wahrscheinlich eine zweite gefaltete Konformation des Proteins. Diese Signale ließen sich durch Dreifach-Resonanz-Experimente weder untereinander noch mit der restlichen Peptidkette verbinden, weil sie nur in wenigen 3D-Spektren zu sehen sind. Eine naheliegende Erklärung für diese Signale wäre ein Zustand, in dem entweder ein oder zwei Zink-Atome verloren gegangen sind. Für einige zinkbindenden Proteine wurde mit Hilfe von 1D-NMR und Circular-Dichroismus gezeigt, dass sie in Abwesenheit des Zinks ungefaltet sind und bei Zugabe vom Zink eine gefaltete Konformation annehmen [60], [61]. Aus diesem Grund wurde bei unserem Experiment vom reversiblen Zink-Verlust ausgegangen. Um die oben genannte Hypothese zu überprüfen, wurde Zink in großem Überschuss zu der Probe gegeben. Danach wurde ein HSQC-Spektrum gemessen. Die nicht zugeordneten Signale änderten sich dabei nicht. Aus diesem Experiment folgt, dass die zweite Konformation nicht durch fehlende Zinkatome erklärt werden kann oder dass der Verlust von Zink in diesem Fall nicht umkehrbar ist. In der Literatur ist aber bisher ein irreversibler Verlust von Zink nicht beschrieben. Um diese Erklärung vollständig auszuschließen, kann ein weiteres Experiment gemacht werden. Zinkatome könnten durch EDTA (Ethyldiamintetraacetat) in kleiner Konzentration der C1-Domäne entzogen werden [60]. Dann sollten die nicht zugeordneten Signale intensiver werden, wenn sie auf die

Zink-Abwesenheit zurückzuführen sind. Bei diesem Experiment müsste man wegen der strukturstabilisierenden Rolle des Zinks darauf achten, dass das Protein gefaltet bleibt.

Die Erklärung für die nicht zugeordneten Signale durch Verunreinigungen ist eher unwahrscheinlich, weil die Reinigungsmethode (Kapitel 2.1.1) den Verunreinigungsgehalt kleiner als 10% hält.

#### **4.1.2 Wasserstoffbrücken**

Für die langsam austauschenden Protonen von Arg 119, Leu 134, Arg 137, Phe 151 und His 154 wurden keine Wasserstoffbrücken bildenden Partner gefunden. In der Kristallstruktur der verwandten C1-Domäne der PKC $\delta$  bilden die entsprechenden Atome ebenfalls keine Wasserstoffbrücken. Die H<sub>N</sub> und N Atome dieser Aminosäuren sind in beiden Proteinen für Wasser nicht zugänglich. Das könnte den langsamen Austausch erklären. In anderen Zink-bindenden Domänen (RING-, LIM-Domäne) sind auch Amidgruppen im Inneren des Proteins vorhanden, die keine Wasserstoffbrücken binden. Solche Gruppen sind in allen genannten Proteinen in der Nähe der Zinkbindungstasche zu finden. Z. B. in einer RING-Domäne mit dem PDB-Nummer 1BOR sind zwei für Wasser nicht zugängige Amidgruppen ohne Wasserstoffbrücken zu sehen. In einer anderen RING-Domäne (1CHC) und in einer LIM-Domäne (1A7I) ist je eine solche Gruppe zu finden. Ladungen, die keine Wasserstoffbrücken bilden, sind innerhalb des Proteins ungünstig (s. z. B. [62]). Die Energie einer Amidgruppe im Inneren eines Proteins, gerechnet wie in [62], ist aber nur um 0.4 kcal/mol größer als auf der Oberfläche. Die Bindung von Zink liefert einen Energiegewinn von 16 kcal/mol [63]. In der C1-Domäne von Nore1 sind fünf Amidgruppen ohne Wasserstoffbrücken im Inneren des Proteins und zwei Zink-Atome vorhanden. Die Erhöhung der Energie durch Amidgruppen (2 kcal/mol) ist damit viel kleiner als die freie Energie der Zink-Bindung (32 kcal/mol). Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass die fehlenden Wasserstoffbrücken auf die Ungenauigkeit der Rechnung im Vakuum zurückzuführen sind und nichts mit der Zink-Bindung zu tun haben.

### 4.1.3 $\alpha$ -Helix

In 3.1.2.2.2 wurden die helikalen NOEs betrachtet. Dabei fehlten die wichtigen  $\alpha\text{N}(i, i+4)$  NOEs. Das könnte auf die kleine Länge der Helix (sechs Aminosäuren) oder auf eine NOE-Zuordnungsprobleme zurückzuführen sein. In der Tat liegen Arg 158, Ile 161 und Leu 163 in  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum eng zusammen und ihre Signale können in  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC nicht voneinander unterschieden werden.

## 4.2 Strukturrechnung

### 4.2.1 Rechnung mit vierfach koordiniertem Zink

In bisher bekannten C1-Domänen wird Zink tetraedrisch koordiniert (z. B. [40] und [42]). Auch für alle untersuchten Domänen mit einer N-Zn-3S-Bindungstasche, wo Zink eine strukturstabilisierende Rolle spielt [64], wurde nur eine tetraedrische Koordination des Zinkatoms berichtet. Wie in Kapitel 3.1.3.1 erläutert wurde, wurden Zinkbindungstaschen in CNS so modelliert, dass jedes der beiden Zinkatome formal nur an je ein Cystein kovalent gebunden war. So wurde das Ensemble der Strukturen (PDB-Nummer 1RFH, Abbildung 3-18) gerechnet. Dieses Modell war auf folgende Eigenschaft von CNS zurückzuführen: Eine formale Bindung über drei Cysteine und ein Histidin würde eine Quervernetzung der Peptidkette bedeuten. Die Torsionswinkel-moleküldynamik-Simulation war für eine vernetzte Peptidkette nicht möglich, wenn die Rechnung vom ungefalteten Zustand startete. Die Rechnung wurde jedes Mal mit der Fehlermeldung über nicht ausreichende Freiheitsdimensionen abgebrochen. Die Art der Zinkbindung ist aber gleich für jedes zinkbindende Atom. Es war möglich mit einer tetraedrischen (vierfachen) Koordination des Zinkes zu rechnen, wenn man von einer bereits gefalteten Struktur ausging. Als gefaltete Anfangsform wurde die aus dem Ensemble (Kapitel 3.1.3.2) gemittelte Struktur mit minimierter Energie (1RFH) herangezogen. Die Rechnung ergab eine kleine Verbesserung der RMSD Werte der Gruppe der Strukturen gegenüber 1RFH. Der RMSD Wert des Rückgrats ist von 0.32 auf 0.29 und für alle schweren Atome von 0.97 auf 0.85 innerhalb des strukturierten Teils des Proteins

gesunken. In Bild 4-1 sind die Strukturen mit unterschiedlichen Zinkbindungstaschen verglichen. Links ist eine Struktur mit der vierfachen tetraedrischen Zinkkoordination abgebildet, die ausgehend von 1RFH gerechnet wurde. Rechts ist eine Struktur (1RFH) zu sehen, wo die Zinkatome an je ein Cystein gebundenen sind. Die Zinkbindungstaschen der linken Struktur sind tetraedrisch. Bei der rechten Struktur weichen die Zinkbindungstaschen wesentlich von Tetraedern ab. Für die untere Bindungstasche ist  $45^\circ$  die größte Abweichung vom tetraedrischen Winkel ( $109^\circ$ ). Für die obere Zinkbindungstasche ist die maximale Abweichung  $30^\circ$ .

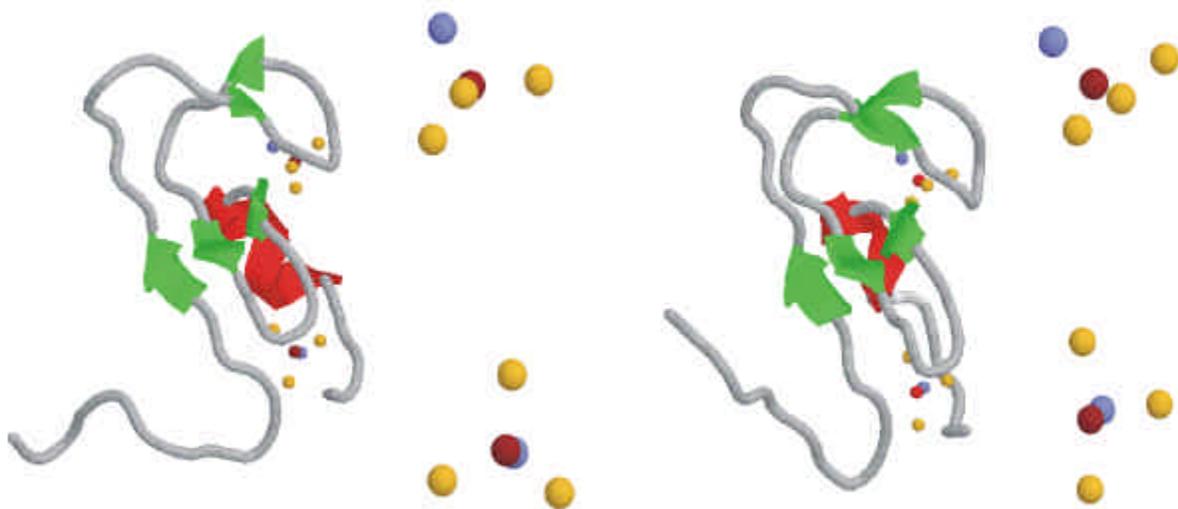


Abbildung 4-1: Vergleich der Zinkbindungstasche einer Struktur mit der vierfachen Zink-Koordination, die von 1RFH ausgehend gerechnet wurde, mit der energieminierten gemittelten Struktur (1RFH) von Bild 3-18. Die Zinkbindungstaschen sind rechts der jeweiligen Struktur vergrößert dargestellt.

## 4.2.2 Energiefunktion in CNS

CNS benutzt eine auf empirischer Geometrie, van der Waals-Kräften und experimentellen Daten basierende Energiefunktion (Kapitel 3.1.3.1). Eine wichtige treibende Kraft der Proteinfaltung ist die Bildung eines hydrophoben Kerns und die Verdrängung des Wassers an die Oberfläche des Proteins. Wegen des Rechenaufwands wird aber die Wechselwirkung mit Wasser bei den meisten

Strukturrechnungen vernachlässigt (z. B. [55]). Für die Strukturrechnung der C1-Domäne von Nore1 wurde auch die elektrostatische Wechselwirkung mit Wassermolekülen in der Energiefunktion nicht mitberücksichtigt. Dadurch unterscheidet CNS nicht zwischen hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren. In den gerechneten Strukturen liegen einige hydrophobe Aminosäuren z. B.  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Gruppen von Val 121 und  $\beta$ -CH<sub>3</sub>-Gruppen von Ala124 am Außenrand des Proteins. Eine solche Positionierung könnte eine funktionelle Rolle haben, andererseits könnte es aber auch ein Rechnungsfehler sein.

Es gibt Programme, die Strukturen in Wasser rechnen und damit Wasser direkt berücksichtigen (z. B. [65]). Es gibt auch Möglichkeiten das Wasser indirekt in die Rechnung einzubeziehen. Eine einfache Version wäre, jeder Atom-Gruppe eine Gewichtung zuzuordnen. Entsprechend dieser Gewichtung sollte die Atom-Gruppe energetisch „belohnt“ oder „bestraft“ werden je nach dem ob sie innen oder außen ist. Diese Energie könnte man versuchsweise der Energiefunktion von CNS hinzufügen.

### 4.3 Vergleich mit anderen C1-Domänen

In Bild 4-2 ist ein Sequenzvergleich von einigen C1-Domänen zu sehen.

PKC $\alpha$	102	<b>HKFKI</b> IHTYGS	- <b>PTFCDH</b> CGS	-LLY <b>GLI</b> HQ <b>Q</b>	MK <b>CDTCD</b> MNV	<b>HKQC</b> VINVPS	<b>LC</b>	151
PKC $\gamma$	102	<b>HKFRL</b> LHSYSS	- <b>PTFCDH</b> CGS	-LLY <b>GLV</b> HQ <b>Q</b>	MK <b>CSCCE</b> MNV	<b>HRRCV</b> RSVPS	<b>LC</b>	151
PKC $\delta$	231	<b>HRFKV</b> YNYMS	- <b>PTFCDH</b> CGT	-LL <b>WGL</b> VK <b>Q</b>	LK <b>CE</b> DCGMNV	<b>HHKCR</b> EKVAN	<b>LC</b>	280
Raf1	139	<b>HNFAR</b> KTFLK	- <b>LAFCDI</b> CQK	FLL----- <b>NG</b>	<b>FR</b> <b>CQT</b> <b>CGY</b> KF	<b>HEHC</b> STKVPT	<b>MC</b>	184
Nore1	118	<b>HRFV</b> ELALRG	<b>GP</b> <b>GW</b> <b>CDL</b> CGR	EVL---- <b>RQA</b>	<b>LR</b> <b>CAN</b> <b>CK</b> FTC	<b>HSE</b> CRSLIGL	<b>DC</b>	165

Abbildung 4-2: Sequenzvergleich zwischen C1-Domänen. Die in C1-Domänen hoch konservierten Cystein- und Histidinreste, die Zinkatome koordinieren, sind rot markiert. Die Nomenklatur der C1-Domäne von Nore1 wird verwendet. Fett sind Pro 129, Gly\*, Gln 142 und die Aminosäuren an gleichen Stellen der atypischen C1-Domänen dargestellt. Kursiv sind die im Text erwähnten Aminosäuren an den Stellen 125, 131, 139, Tyr\*/Trp\* und Leu\* markiert. \* bedeutet, dass die entsprechenden Aminosäuren in Nore1 nicht vorhanden sind. – bedeutet eine freie Stelle.

C1-Domänen können in zwei Klassen eingeteilt werden. Typische C1-Domänen z. B. die von Protein Kinase C binden Diacylglycerol (DAG). Atypische C1-Domänen (z. B. die von Raf) binden DAG nicht. Zwischen typischen und atypischen C1-Domänen wurden Unterschiede sowohl in Primär- [66] als auch in der Tertiärstruktur [40] gefunden. Hier wird die Nomenklatur der C1-Domäne von Nore1 benutzt. Pro 129, Gln 142 und ein

Glycin (Glycin\*), das zwischen Leu 140 und Arg 141 in typischen C1-Domänen vorkommt, bilden bei diesen Domänen eine DAG-Bindungsstelle. Sie sind bei typischen Domänen hochkonserviert. Zwei von diesen drei Aminosäuren sind in der C1-Domäne von Nore1 zu finden. Die Position vom Glycin\* ist im Nore1 nicht besetzt. Ein Glycin an dieser Stelle ist aber sehr wichtig [42], weil diese Aminosäure wegen ihrer kleiner Größe dihedrale Winkel  $(\theta, \psi) = (60^\circ, 170^\circ)$  haben kann, die für die anderen Aminosäuren sterisch verboten sind. Dieser Winkel ist notwendig, um die Bindung vom DAG an C1 zu ermöglichen. Das wurde in [42] für Phorbolster gezeigt und konnte auf DAG übertragen werden, weil Proteine die gleichen Bindungsstellen für DAG und Phorbolster haben [67], [68]. Das nächste Merkmal von typischen C1-Domänen ist die Hydrophobizität der Aminosäuren an der Positionen 125, 131, 139, und zwei Aminosäuren, die in typischen C1-Domänen zwischen Leu 140 und Arg 141 liegen (Tyr\*/Trp\* und Leu\*). Die ersten drei der genannten Reste sind auch bei der C1-Domäne von Nore1 hydrophob, aber wie bei Raf fehlen die Aminosäuren Tyr\*/Trp\* und Leu\*. Wegen der fehlenden Aminosäuren ist der Loop zwischen dem dritten und dem vierten  $\beta$ -Faltblatt kleiner als bei den typischen C1 Domänen (z. B. PKC $\delta$  und PKC $\gamma$ ). In Bild 4-3 sind die C1-Domänen von PKC $\delta$ , Raf1 und Nore1 dargestellt, wobei der genannte Loop blau markiert ist. Die Länge dieses Loops ist ein struktureller Unterschied zwischen typischen und atypischen C1-Domänen.

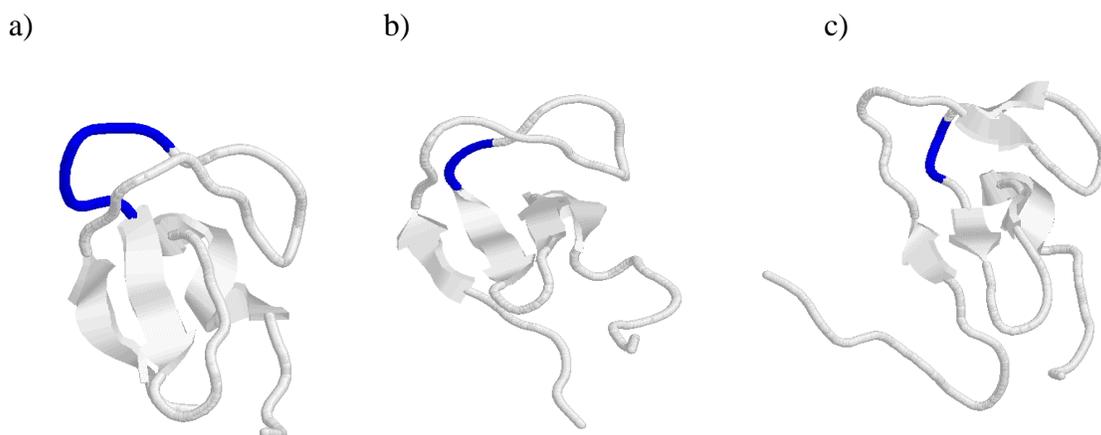


Abbildung 4-3: C1-Domäne von a) PKC $\delta$  (1PTQ), b) Raf1 (1FAR) und c) Nore1 (1RFH). Blau markiert sind die Loops zwischen dem dritten und dem vierten Faltblatt.

Nach den oben genannten Eigenschaften kann die C1-Domäne von Nore1 als atypisch klassifiziert werden. Die atypischen C1-Domänen sind an Protein- oder/und Lipidbindung beteiligt.

## 4.4 Titration

Nore1 ist bekannt als ein Bindungspartner von Ras. Um die Rolle der C1-Domäne bei der Bindung von Ras zu verstehen, wurde eine Ras-Titration eines C1-RBD-Konstruktes mit Hilfe von HSQC-Spektren verfolgt. Dabei wurden Signale von Aminosäuren in einem schnellen und langsamen Austausch relativ zu NMR-Zeitskala (Kapitel 3.3.1.1) beobachtet. Die Spektren von C1-RBD unterscheiden sich von den Spektren der freien C1-Domäne durch Verschiebungen und Fehlen einiger Signalen. Mit Zugabe von Ras wurden aber diesen Spektren immer ähnlicher. Sättigt man die C1-RBD mit Ras, sind keine Unterschiede in chemischen Verschiebungen der Signale im Vergleich mit der freien C1-Domäne mehr zu sehen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass durch die Bindung von Ras an die RBD die Wechselwirkungen zwischen C1 und RBD verloren gehen. Dabei sollte C1 nur durch einen flexiblen Linker an RBD gebunden bleiben. Die Messungen von Relaxationszeiten bestätigten diese Vermutung (Kap. 3.3.1.2).

### 4.4.1 Diskussion der Dissoziationskonstanten

Die in 3.3.1.3 ermittelten Dissoziationskonstanten der Bindung von Ras zu C1-RBD betragen 5-13  $\mu\text{mol/l}$  und können nur als sehr grobe Einschätzung betrachtet werden, da im Bereich der Sättigung (Bild 3-22) nur sehr wenige Messdaten vorhanden sind. Alternativ wurde die Dissoziationskonstante für die Bindung von Ras an C1-RBD von S. Wohlgemuth kalorimetrisch bestimmt. Mit der viel genaueren isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) wurde ein Wert von 400  $\text{nmol/l}$  ermittelt. Die blaue Kurve in Bild 4-4 stellt die Gleichung 3-2 für die mit Hilfe der ITC gemessenen Dissoziationskonstanten dar. Wie aus dem Bild 4-4 ersichtlich ist, passt diese Linie zu der NMR-Daten nur etwas schlechter als die schwarze Kurve.

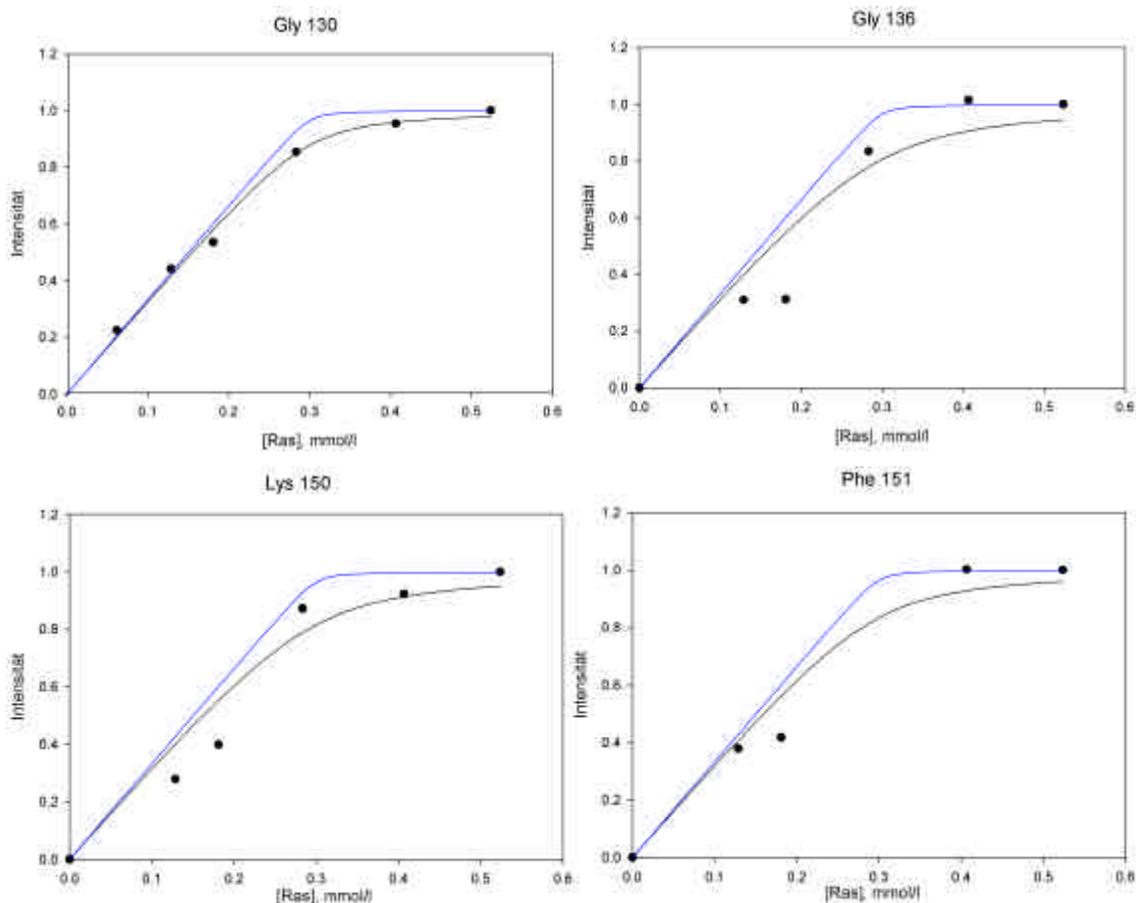
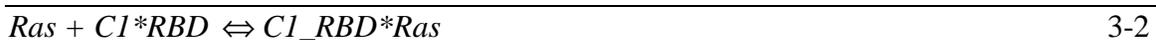


Abbildung 4-4: Abhängigkeit der Signalintensitäten in HSQC-Spektren von der Ras-Konzentration für Gly 130, Gly 136, Lys 150, Phe 151, wie in Bild 3-22. Die schwarze Linie ist eine an die Daten gefittete Gleichung 3-2 aus Bild 3-22. Die blaue Kurve stellt die Gleichung 3-2 mit  $k_d=400\text{nmol/l}$  dar.

Die mit der ITC gemessenen Konstanten stimmen mit den NMR-Ergebnissen überein. Das nach den NMR-Daten entwickelte Modell beschreibt Gleichung 3-2 als eine aus Dissoziation der C1 von RBD (4-1) und Ras-Bindung an RBD (4-2) zusammengesetzte chemische Reaktion:



wobei  $C1^*RBD$  die direkt gebundene und  $C1\_RBD$  die nur durch einen flexiblen Linker verbundene C1 und RBD sind. Die Dissoziationskonstanten für folgende Gleichungen wurden mit ITC von S. Wohlgemuth ermittelt:



Diese Konstanten betragen 50  $\mu\text{mol/l}$  (Gl. 4-3), 200  $\text{nmol/l}$  (Gl. 4-4) und 400  $\text{nmol/l}$  (Gl.4-5). In erster Näherung entspricht die Reaktion 4-4 der Reaktion 4-2. Man kann also annehmen, dass die Dissoziationskonstanten dieser Gleichungen gleich sind:  $k_{4-4}=k_{4-2}$ . Die Reaktion 4-5 entspricht formal der Reaktion 3-2, wenn man den Unterschied in Schreibweise zwischen diesen zwei Gleichungen vernachlässigt. Wir wollen jetzt die Gleichgewichtskonstante für Gleichung (4-1)  $k_{4-1} = k_{4-2}/k_{3-2} = 0.5$  und die gemessenen Dissoziationskonstante für die Reaktion (4-3) miteinander vergleichen. Hierbei entspricht die Gleichung 4-1 der inversen Reaktion von Gleichung 4-3. Um die Dissoziationskonstanten  $k_{4-1}$  und  $k_{4-3}$  miteinander zu vergleichen, werden C1 und RBD auf der rechten Seite der Gleichung (4-1) getrennt behandelt. Dann wird die effektive Konzentration wie in [69] eingeführt, aus den mit ITC gemessenen Dissoziationskonstanten ausgerechnet und die Länge eines flexiblen Linkers wird abgeschätzt. Die effektive molare Konzentration von C1,  $[C1]_{eff}$ , das heißt die Konzentration von C1, die RBD „sieht“, ist nur von der Länge  $R$  des flexiblen Linkers abhängig. In der Kugel mit dem Radius  $R$  um jede RBD befindet sich eine C1-Domäne. Dieser Radius konnte aus folgender Gleichung ausgerechnet werden:

$$[C1]_{eff} = \frac{1}{\frac{4}{3} R^3 N_A \rho},$$

wobei  $N_A$  die Avogadro Zahl ist und  $[C1]_{eff}$  durch die Gleichung (4-6) gegebenen ist.

$$k_{4-1} = [C1\_RBD]/[C1 * RBD] \quad \text{und} \quad k_{4-3} = ([C1]_{eff} [RBD])/[C1 * RBD] \quad (4-6)$$

$$[C1]_{eff} = \frac{k_{4-3}}{k_{4-1}} = \frac{50}{0.5} = 100 \mu\text{mol/l},$$

wobei in unserer Betrachtung  $[C1\_RBD] = [RBD]$  ist. Daraus wird  $R=160 \text{ \AA}$  ermittelt. Der Radius von  $160 \text{ \AA}$  ist ein vernünftiger Wert für einen Linker aus 100 Aminosäuren (Bild 1-15). Damit entsprechen die ITC-Messungen dem Model einer durch Ras-Bindung initiierten Dissoziation von C1 und RBD. Der beste Fit aus den NMR Daten ( $k_d=5 \mu\text{mol/l}$  für Gly 130) weicht nur um einen Faktor 10 von den ITC-Daten ( $k_{3-2}=0.4 \mu\text{mol/l}$ ) ab. Das ist im Rahmen des Experiments (wenige Punkte im Bereich der Sättigung) eine gute Übereinstimmung.

## 4.5 Diskussion der Bindungsoberfläche

Die vermutliche Bindungsoberfläche von C1 an RBD besteht aus 12 Aminosäuren. Die sich im schnellen Austausch befindenden Val 121, Glu 122 und Gly 128 gehören räumlich (Bild 3-23) nicht zu dieser Oberfläche. Diese Aminosäuren sind eventuell nicht direkt an die RBD gebunden, sind aber durch die Bindung von RBD an C1 beeinflusst.

### 4.5.1 Vergleich der Bindungsoberfläche von C1 an RBD von Nore1 mit der Bindungsoberfläche von Ras an RBD von Byr2

Die NMR-Titration hat gezeigt, dass sich durch die Bindung von Ras an RBD, die C1-Domäne von der RBD-Domäne ablöst. Ras und C1 konkurrieren also um eine Bindungsstelle an der RBD. Entweder stören sie sich sterisch oder sie binden an dieselbe Stelle. Es stellt sich die Frage, ob die Bindungsoberfläche von Ras an die RBD im bekannten Ras-Byr2 Komplex (pdb Nummer 1K8R) der ermittelten Bindungsoberfläche von C1 an die RBD von Nore1 ähnelt. Die an der Bindung an die RBD beteiligten Aminosäuren von Ras sind Asp 33, Glu 37, Asp 38, Ser 39, Tyr 40, Arg 41 und Asp 54 [70]. Bis auf Tyr 40 und Asp 54 sind diese Aminosäuren auch an der Bindung an RBD weiterer Proteine wie z. B. Raf [71], [72] und PI(3)-Kinase [73] beteiligt. In Bild 4-5 sind die Strukturen von C1 (links) und von Ras (rechts) dargestellt. Die oben genannten

Aminosäuren von Ras und die homologen Aminosäuren aus der gemessenen C1-RBD Bindungsoberfläche (das heißt alle Aminosäuren außer Trp 131 und Arg 137) sind farbig dargestellt. Dabei sind gleiche und homologe Aminosäuren mit gleicher Farbe markiert. Die Anordnung von Aminosäuren in beiden Oberflächen hat ein gleiches Muster. Diese Ähnlichkeit lässt auf eine sich überschneidende Bindungsstelle für Ras und C1 an RBD schließen.

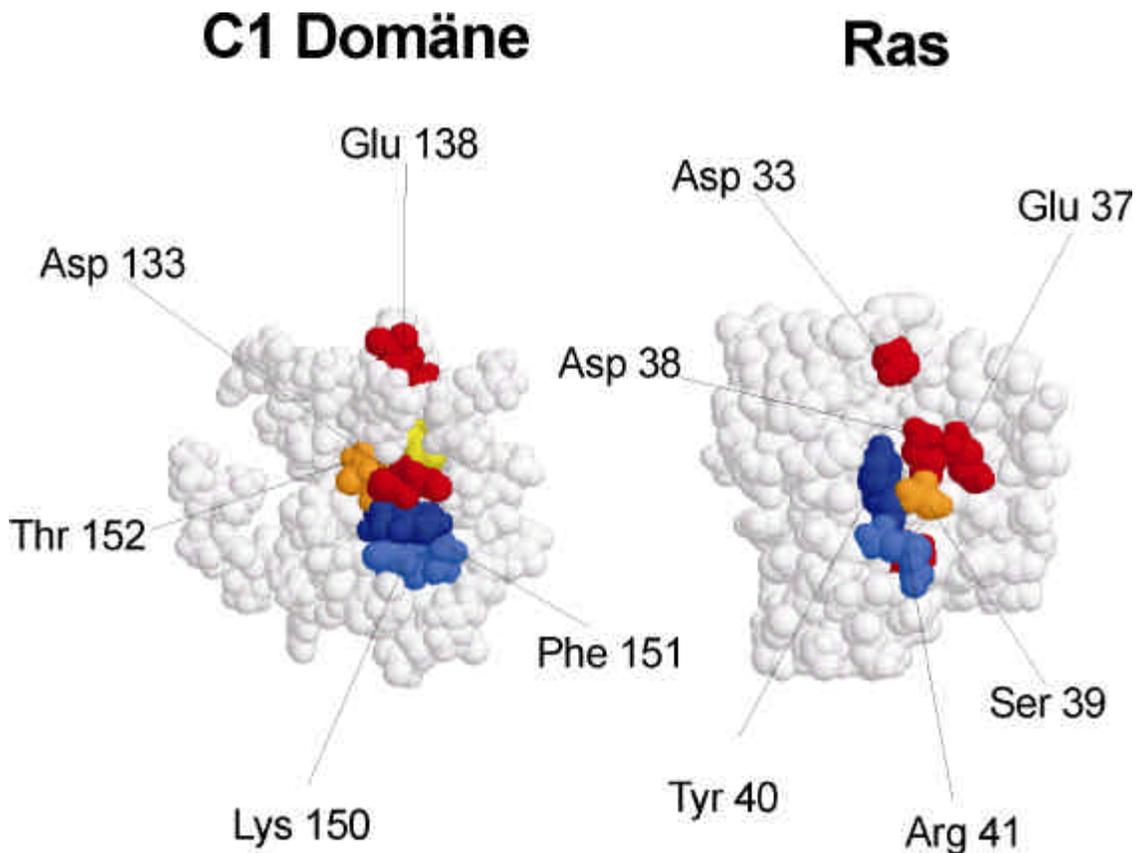


Abbildung 4-5 Vergleich der RBD-Bindungsoberflächen von Ras an Byr2 und C1 an Nore1-RBD. Die Aminosäuren in der C1, die während der NMR-Titration langsamen Austausch zeigen, sind mit Ausnahme von Trp 131 und Arg 137 farbig dargestellt. Die homologen Aminosäuren beider Moleküle wurden beschriftet. Bilder wurden mit dem Programm Rasmol erstellt unter Verwendung der *amino* Farbstile. (homologe Aminosäure in gleicher Farbe).

## 4.5.2 Vergleich mit der membranbindenden Oberfläche der C1 von PKC $\gamma$ und C1 von Raf1

Die Aminosäuren aus der identifizierten mutmaßlichen Bindungsoberfläche der C1 an die RBD entsprechen bei einem strukturbasierten Sequenzvergleich (Bild 4-6) den in einer Membranbindung verwickelten Aminosäuren der PKC $\gamma$  [74]. Die während der Titration in einem langsamen bzw. in einem schnellen Austausch in Bezug auf die NMR-Zeitskala stehenden Aminosäuren wurden blau bzw. grün markiert. Diese Farben entsprechen den Farben in Bild 3-23. Bei PKC $\gamma$  sind Aminosäuren, die in der Membran verankert sind, fett dargestellt [74]. Die markierten Bereiche bei Nore1 und PKC $\gamma$  überlagern deutlich miteinander (Bild 4-6).

```
Raf1: HNFARKTF LKLAFCCDICQKFLL---NGFRCQTCGYKFHEHCSTKVPTMC
Nore1: HRFVELALRGGPGWCDLCGREVL---RQALRCANCKFTCHSECRSLIQLDC
PKC $\gamma$ : HKFRLLHSY SSPTFCDHC GSLLYGLVHQGMKCSCCEMNVHRRCVRSVPSSLC
```

Abbildung 4-6: Der strukturbasierte Sequenzvergleich zwischen den C1-Domänen von Raf1 und PKC $\gamma$  zu Nore1. Die strukturelle Überlagerung wurde mit spdbv [75] erstellt. Bereiche der guten Überlagerung (RMSD Werte für Raf 1.6 Å und für PKC 1.43 Å) sind grau schattiert. In blauen und grünen Farben (wie in Bild 3-23) sind bei Nore1 die durch die Ras Titration beeinflussten Aminosäuren markiert. Bei der C1-Domäne von Raf1 sind die Aminosäuren fett und kursiv gekennzeichnet, deren Alaninmutationen [76] zur Erhöhung der Ras-abhängigen oder basalen Aktivität von Raf1 führen. Bei PKC $\gamma$  sind mit Membranlipiden [74] wechselwirkende Aminosäuren fett dargestellt.

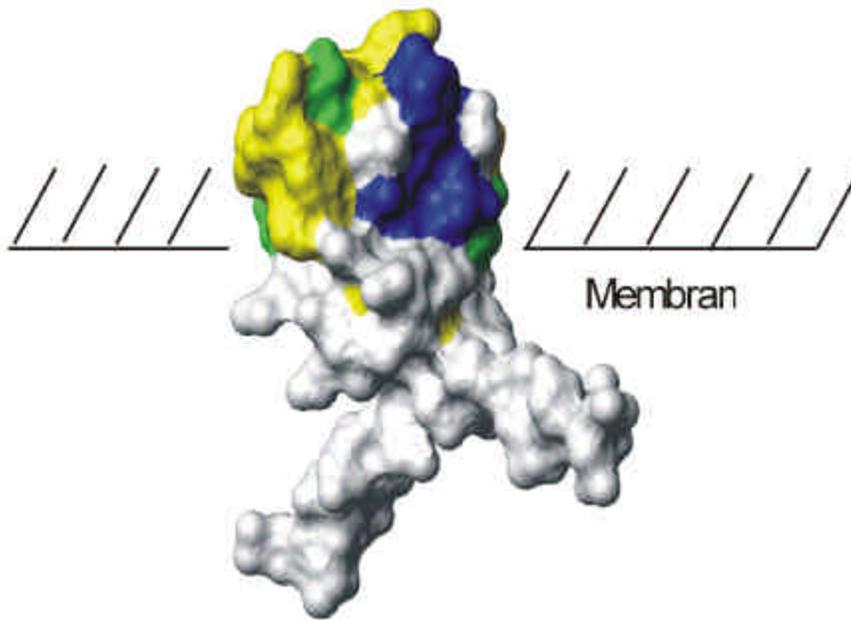


Abbildung 4-7: Struktur der C1-Domäne von PKC $\gamma$ . Gelb markiert sind die Aminosäuren, die an der Membranbindung beteiligt sind. Von diesen Aminosäuren sind zusätzlich diejenigen blau und grün markiert, die der Bindungsoberfläche der C1 von Nore1 an die RBD entsprechen. (Bild 3-23).

Aminosäuren von PKC, die an der Membranbindung beteiligt sind, sind in Bild 4-7 farbig markiert. Blau und grün sind Aminosäuren dargestellt, die der Bindungsoberfläche der C1 von Nore1 an die RBD entsprechen. Die Aminosäuren des oberen Teils (Bild 4-7) der C1-Domäne von PKC $\gamma$  (Bild 4-7, [74]) inserieren in die Membran. Die blau und grün dargestellten Aminosäuren sind in der in die Membran inserierenden Oberfläche beinhaltet. Man könnte erwarten, dass auch die die RBD bindenden Aminosäuren der C1-Domäne von Nore1 einen Teil der membranbindenden (oder inserierenden) Oberfläche bilden. Nach der Bindung von Ras, sind diese Aminosäuren nicht mehr an die RBD gebunden und könnten mit der Membran wechselwirken. Von 15 an der Bindung zur RBD beteiligten Aminosäuren sind sieben hydrophob und zwei positiv geladen. Hydrophobe Aminosäuren der C1-Domäne von Nore1 sind in Bild 4-8 grün dargestellt. Wie man sieht, ist der obere Teil der C1-Domäne größten Teils hydrophob und kann in die Membran eindringen. Positiv geladene Aminosäuren (rot) können mit der negativen Ladung der Membran interagieren. Ob die negativ geladenen Aminosäuren in der Membranbindung eine Rolle spielen könnten, ist nicht klar.

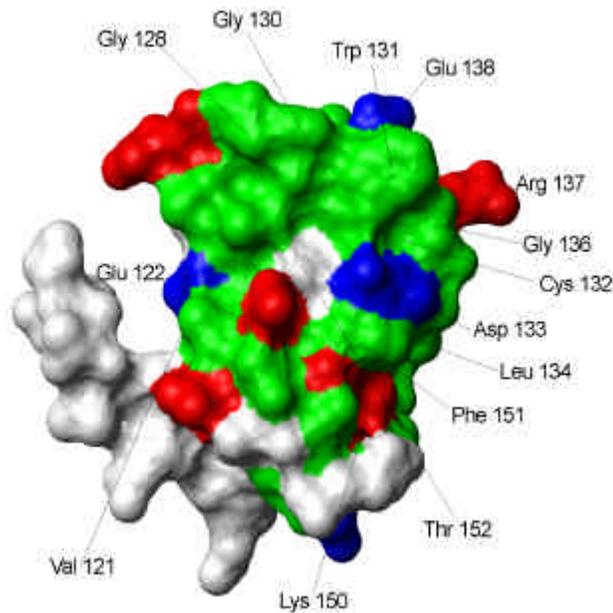


Abbildung 4-8: Molmol Darstellung der Oberfläche der C1-Domäne von Nore1. Grün sind die hydrophoben, rot die positiv geladenen und blau die negativ geladenen Aminosäuren dargestellt. Weiß sind die neutralen Aminosäuren. Der unstrukturierte N-Terminus ist nicht gefärbt. Die an der Bindung an die RBD beteiligten Aminosäuren sind beschriftet.

In Anbetracht neuer zellbiologischen Erkenntnisse wäre die Überprüfung der Hypothese, dass bei der Bindung von Ras an die RBD C1-Domäne von Nore1 an die Membran bindet, sehr interessant. Es wurde nämlich in [17] gezeigt, dass das an Nore1 gebundene Protein MST1, das *Apoptose* (programmierten Zelltod) hervorruft, nur in der Nähe der Membran wirkt. Die Membranlokalisation von Nore1 könnte durch die Kooperation zwischen der Bindung von Ras an der RBD und der C1-Bindung an die Membran erklärt werden. Die Kooperation zwischen C1 und C2 (eine andere Membranbindende Domäne) ist auch für die Membranbindung von PKC verantwortlich [77].

Raf leitet die Signale zur Zellteilung von Ras zu den anderen Proteinen, indem Raf diese Proteine phosphoryliert. Für dieses Ereignis ist die katalytische Domäne verantwortlich. Wenn sie allein exprimiert ist, ist sie aktiv. In [78] wurde gezeigt, dass die C1-Domäne von Raf die Aktivierung des katalytischen Teils von Raf inhibiert. In [76] wurden Aminosäuren aus der C1-Domäne von Raf1 zu Alaninen mutiert. Bei Mutationen mehrerer Aminosäuren erfolgte eine Erhöhung der basalen oder Ras abhängigen Raf-

Kinaseaktivität (s. Bild 4-6). Wenn manche dieser Aminosäuren wie bei Nore1 an die RBD-Domäne von Raf1 binden, könnte diese Bindung nach der Wechselwirkung mit Ras verloren gehen. Einige der in Bild 4-6 markierten Aminosäuren von Raf sind wahrscheinlich an der direkten Wechselwirkung mit der katalytischen Domäne beteiligt. Aus diesem Grund könnten Mutationen dieser Aminosäuren zur Erhöhung der Raf-Aktivität führen. Die anderen in Bild 4-6 markierten Aminosäuren könnten wie bei Nore1 an die RBD binden. Wenn diese Bindung gelöst ist, könnte die C1-Domäne von Raf ihre Position ändern und die katalytische Domäne freisetzen. Das Freisetzen der katalytischen Domäne nach der Bindung von Ras wurde in [78] gezeigt. Wenn die Bindung zwischen C1 und RBD durch eine Mutation geschwächt ist, kann sich die C1-Domäne nach der Bindung von Ras schneller von der RBD und der katalytischen Domäne trennen. Alternativ könnte die schwächer an die RBD gebundene C1 an die Membran binden und die Bindung von Ras an die RBD erleichtern. Das könnte die Erhöhung der Ras unabhängigen und der Ras abhängigen Kinaseaktivität bei den Mutationen in den in Bild 4-6 markierten Aminosäuren erklären. Die Erhöhung der Raf-Kinaseaktivität würde zur Aktivierung der weiteren Proteine der Ras-Raf-Signalkaskade und damit zur erhöhten Zellteilung führen.

## **4.6 Vorgeschlagener Mechanismus für die Rolle der C1-Domäne in der Signalübertragung**

In Bild 4-9 ist ein auf den Ergebnissen dieser Arbeit basierender Mechanismus für die Funktion der C1-Domäne von Nore1 in der *pro-apoptischen* Signalkaskade dargestellt. Nore1 bindet mit seiner RBD an aktives Ras-GTP, wobei die RBD gebundene C1-Domäne frei wird. Die C1 könnte nun wie in Kapitel 4.5.2 diskutiert wurde, an die Membran binden. Danach wird MST aktiviert (oder kann seine weiteren Bindungspartner treffen) und kann *Apoptose* verursachen. Dieses Modell entspricht ähnlichen Aktivierungsmodellen bei PKC [79] und Raf [78]. In der Arbeit wurde gezeigt, dass mit der Bindung von Ras an die RBD, die C1 und RBD-Domänen sich voneinander ablösen. Die nachfolgende Bindung von C1 an der Membran wurde aufgrund des Vergleiches mit der C1 von PKC vorgeschlagen und experimentell noch nicht nachgewiesen. Es ergäbe

also keinen Widerspruch zu den experimentellen Daten, wenn die C1-Domäne schon vor der Bindung von Ras an die RBD membrangebunden wäre. Wenn dann nach Eintreffen eines äußeren Signals Ras seine GTP-gebundene Form annimmt, würde sich die RBD von der C1 ablösen und an Ras binden. Um den Mechanismus zu klären, kann man die Membranbindung von der freien und RBD-gebundenen C1-Domäne messen.

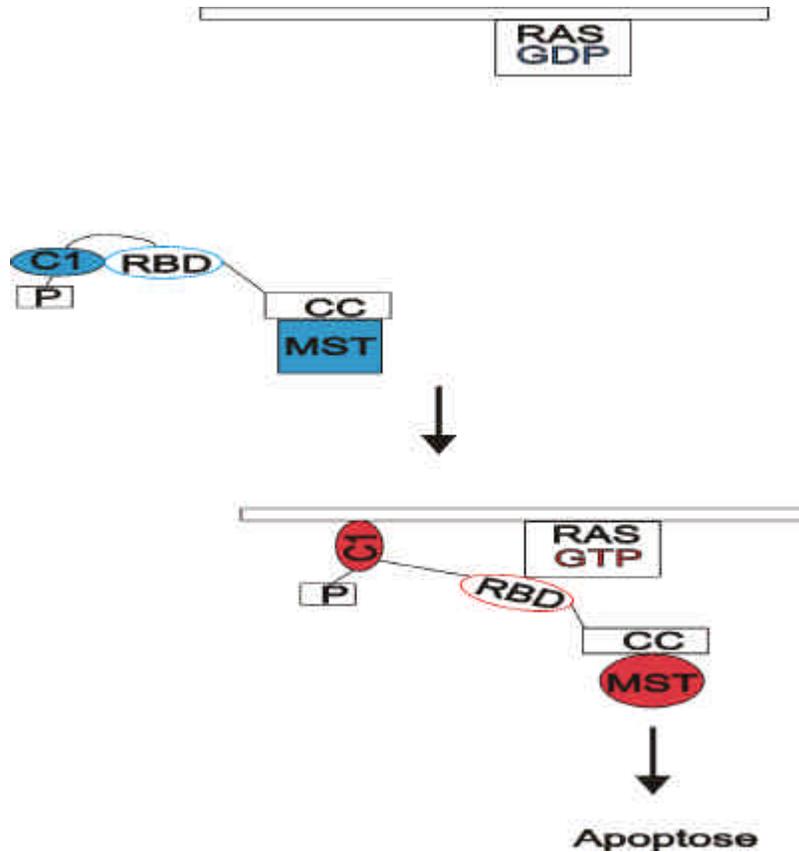


Abbildung 4-9: Mechanismus zur Funktion der C1-Domäne von Nore1 im *pro-apoptischen* Signalweg. Im Quadrat ist ein nicht membranlokalisiertes, und im Oval ein membranlokalisiertes MST-Molekül, die pro-apoptisch wirkt, dargestellt. Farbige Änderungen bei der Signalübertragung sind dargestellt.

## Zusammenfassung

Mit Hilfe der heteronuklearen NMR-Spektroskopie wurde die Struktur der C1-Domäne des vermutlichen Ras Effektors Nore1 gelöst. Die RMSD Werte über das Rückgrat des strukturierten Teils des Proteins (Aminosäuren 118-123, 130-165) beträgt 0.32 Å, und über alle schweren Atomen 0.97 Å. Die Struktur entspricht der Faltung der anderen bekannten C1-Domänen (PKC $\gamma$ , PKC $\delta$ , Raf) und besteht aus zwei  $\beta$ -Faltblätter und einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix. Aufgrund der primären und tertiären Struktur ließ sich die C1-Domäne von Nore1 als eine atypische C1-Domäne klassifizieren. Um die Rolle der C1-Domäne bei der Bindung von Ras zu untersuchen wurden C1 und RBD zusammen exprimiert und mit Ras titriert. Die  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des C1-Anteils in C1-RBD unterschieden sich von den Spektren der freien C1. Verschiebungen oder Abwesenheit der Signalen von Val 121, Glu 122, Gly 128, Gly 130, Trp 131, Cys 132, Asp 133, Leu 134, Gly 136, Arg 137, Glu 138, Lys 150, Phe 151, Thr 152 und His 154 waren festzustellen. Die Abweichungen von den Spektren der freien C1-Domäne verschwanden graduell mit der Zugabe von Ras. Wenn die Ras-C1-RBD-Bindung gesättigt war (1:1) waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Spektren mehr zu sehen. Diese Daten sprechen dafür, dass mit der Bindung von Ras an RBD, die C1-Domäne sich von der RBD ablöst. Dieses Modell wurde mit Relaxationsmessungen bestätigt. Mit Hilfe der Perturbationen chemischer Verschiebungen wurde die mutmaßliche Bindungsfläche von C1 an RBD ermittelt. Sie zeigt gewisse Ähnlichkeiten mit den RBD-bindender Regionen von Ras. Dies deutet auf die konkurrierende Bindung von C1 und Ras an gleiche oder sich überschneidenden Stellen an der RBD von Nore1 hin. Die sequentielle Homologie zwischen dem RBD-bindenden Teil der C1 von Nore1 und dem membranassoziierten Teil der C1-Domäne von PKC $\gamma$  lassen auf eine mögliche Membranbindung der C1-Domäne von Nore1 nach der Bindung von Ras an die RBD schließen. Die Überprüfung dieser Vermutung ist von besonderem Interesse, weil ein Nore1 bindendes Protein MST1, das den programmierten Zelltod (Apoptose) einleitet, nur in der Nähe der Membran aktiv ist.

# Referenzen

- [1] I. Rabi et al. (1938) A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Phys.Rev.* **53**, 318.
- [2] E. Purcell et al. (1946) Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.* **69**, 37.
- [3] F. Bloch et al. (1946) Nuclear induction. *Phys. Rev.* **69**, 127.
- [4] W. Proctor & F. Yu. (1950) The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. *Phys Rev.* **77**, 717.
- [5] A. Overhauser (1953) Polarization of nuclei in materials. *Phys. Rev.* **92**, 411.
- [6] J. Evans (1995) Bimolecular NMR spectroscopy. Oxford University Press.
- [7] D. Suter und R.Böhmer (SS 2003) Magnetische Resonanz. Vorlesungsnotizen.
- [8] F. Van de Ven (1995) Multidimensional NMR in Liquids. VCH, New York.
- [9] J. Cavanagh et al. (1996) Protein NMR spectroscopy. Academic Press, San Diego.
- [10] I. Solomon (1955) Relaxation processes in a system of two spins. *Phys. Rev.* **99**, 559.
- [11] J. Morris et al. (1979) Enhancement of nuclear magnetic resonance signal by polarization transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 760.
- [12] L. Braunschweiler et al. (1983) Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn.Reson.* **53**, 2820.
- [13] M. Wittenkind & L. Mueller (1993) HNCACB, a high-sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the alpha- and beta-carbon resonances in proteins. *J. Magn. Res., Series B* **101**, 201.
- [14] S. Grzesiek (1993) Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  -enriched proteins by isotropic mixing of  $^{13}\text{C}$  magnetization. *J. Magn Reson. B* **101**, 114.
- [15] L. Kai et al. (1989) Backbone dynamics of proteins as studied by  $^{15}\text{N}$  inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, **28**, 8972.
- [16] D. Vavvas et al. (1998) Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J.Biol.Chem.* **273**, 5439.

- [17] A. Khokhlatchev et al. (2002) Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Current Biology* **12**, 253.
- [18] M. Vos et al. (2003) The pro-apoptotic Ras effector Nore1 may serve as a Ras-regulated tumor suppressor in the lung. *J.Biol.Chem.* **278**, 2193.
- [19] L. Hesson et al. (2003) NORE1A, a homologue of RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in human cancers. *Oncogene* **22**, 947.
- [20] S. Ura et al. (2001) MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and independent pathways. *Genes Cells.* **6**, 519.
- [21] J. Hurley et al. (2000) Membran-binding domains. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 50.
- [22] D. Schwarz (2002) Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von Ras-Effektoren. Eigenschaften des kleinen Ras-Effektors Novel Ras Effector 1 (Nore1). Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.
- [23] C. Hu et al. (1995) Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras. *J. Biol. Chem.* **270**, 30274.
- [24] K. Pumiglia et al. (1995) Raf-1 N-terminal sequences necessary for Ras-Raf interaction and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 398.
- [25] J. Markley et al. (1998) Recommendations for the presentations of NMR structures of proteins and nucleic acids. *Pure & Appl. Chem.* **12**, 1.
- [26] D. States et al. (1982) A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J. Magn Reson.* **48**, 286.
- [27] A. Redfield (1975) Quadrature Fourier NMR detection: simple multiplex for dual detection and discussion. *J. Magn. Reson.* **19**, 250.
- [28] D. Marion et al. (1989) Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J. Magn Reson.* **85**, 393.
- [29] L. Kay et al. (1994) Enhanced  $\gamma$ -sensitivity triple-resonance spectroscopy with minimal H<sub>2</sub>O saturation. *J. Magn Reson. A* **109**, 129.
- [30] W. Zhang et al. (1997) Three-dimensional structure of the Hck SH2 domain in solution. *J. Biomol. NMR* **10**, 263.

- [31] N. A. Farrow et al. (1994) Backbone dynamics of a free and a phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation. *Biochemistry* **33**, 5984.
- [32] D. Marion et al. (1983) Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 967.
- [33] C. Griesinger et al. (1989) Clean TOCSY for  $^1\text{H}$  spin system identification in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7870.
- [34] S. Macura et al. (1980) Elucidation of cross relaxation in liquids by two-dimensional NMR spectroscopy. *Mol. Phys.* **41**, 95.
- [35] L. Kay et al. (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10663.
- [36] G. Vuister et al. (1993) Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(HNH.alpha.) coupling constants in  $^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7772.
- [37] O. Zhang et al. (1994) Backbone H-1 and N-15 resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of DRK in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed-field gradient NMR techniques. *J Biomol. NMR* **4**, 845.
- [38] A. Bax et al. (1990) Practical aspects of proton carbon carbon proton 3-dimensional correlation spectroscopy of C-13-labeled proteins. *J. Magn Reson.* **87**, 620.
- [39] H. Chen et al. (2000) Structure of a (Cys3His) zinc ribbon, a ubiquitous motif in archaeal and eucaryal transcription. *Prot. Sci.* **9**, 1743.
- [40] H. Mott et al. (1996) The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: A novel Ras and phospholipid binding site. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 8312.
- [41] P. Kraulis et al. (1989) Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry* **28**, 7241.
- [42] G. Zhang et al. (1995) Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* **81**, 917.

- [43] A. Pardi et al. (1984) Calibration of the angular dependence of the amide proton-C $\alpha$  proton coupling constants,  $3J_{HN\alpha}$ , in a globular protein. Use of  $3J_{HN\alpha}$  for identification of helical secondary structure. *J. Mol. Biol.* **180**, 741.
- [44] I. Bertini et al. (2001) Paramagnetism-based versus classical constraints: an analysis of the solution structure of Ca Ln calbindin D9k. *J. Biomolecular NMR* **21**, 85.
- [45] D. Wishart et al. (1992) The chemical-shift index - a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 1647.
- [46] E. Oldfried (1995) Chemical-shifts and 3-dimensional protein structures. *J. Biomol. NMR* **5**, 217.
- [47] A. Bundi et al. (1979)  $^1\text{H}$ -NMR parameters of the common amino-acid residues measured in aqueous-solutions of the linear tetrapeptides h-gly-gly-x-l-ala-oh. *Biopolymers* **18**, 285.
- [48] D. Wishart et al. (1995)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. Investigation of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR* **5**, 67.
- [49] S. Spera et al. (1991) Correlations of C $\alpha$ / $\beta$  chemical shifts to the protein secondary structure. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5490.
- [50] A. Brünger et al. (1998) Crystallography & NMR System: a new software for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905.
- [51] M. Karplus (1963) Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2870.
- [52] K. Wüthrich (1986) NMR of proteins and nucleic acids. Wiley-Interscience Publication, New York, USA.
- [53] J. Habazettel et al. (1995) A new simplified method for analyzing nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation data of proteins. *J. Magn. Reson. B* **109**, 100.
- [54] R. Harris (1986) Nuclear magnetic resonance spectroscopy, Logman Group, Harlow, England.
- [55] E. Stein (1997) Torsion-angle molecular dynamics as a new efficient tool for NMR structure calculation, *J. Magn. Reson.* **124**, 154.
- [56] M. Powell. (1977) Restart procedures for the conjugate gradient method. *Math. Prog.* **12**, 241.

- [57] P. Kraulis, (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Cryst.* **24**, 946.
- [58] H. McConnell (1958) Reaction rates by nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **28**, 430.
- [59] R. Koradi et al. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graphics* **14**, 51.
- [60] G. Parraga et al. (1988) Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR1. *Science* **241**, 1489.
- [61] A. Frankel et al. (1987) Metal-dependent folding of a single zinc finger from Transcription Factor IIIA. *Proc. Natl. Acad. Science USA* **84**, 4841
- [62] A. Finkelstein (WS 1999-2000) Physik von Proteinen. Vorlesungsnotizen.
- [63] B. Krizek et al. (1993) Ligand variation and metal ion binding specificity in zinc finger peptides. *Inorg. Chem.* **32**, 937.
- [64] I. Alberts et al. (1998) Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Prot. Sci.* **7**, 1700.
- [65] W. Cornell et al. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179.
- [66] J. Hurley et al. (1997) Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Prot. Sci.* **6**, 477.
- [67] N. Sharkey et al. (1984) Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc. Natl. Acad. Science USA* **81**, 607.
- [68] N. Sharkey et al. (1985) Kinetic evidence that 1,2-diolein inhibits phorbol ester binding to protein kinase C via a competitive mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 1051.
- [69] E. Bayer et al. (2003) Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding. *J Biol Chem.* **278**, 26183.
- [70] K. Scheffzek et al. (2001) The Ras-Byr2RBD Complex: Structural Basis for Ras Effector Recognition in Yeast. *Structure* **9**, 1043.
- [71] N. Nassar et al. (1995) The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* **375**, 554.

- [72] N. Nassar et al. (1996) Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 723.
- [73] M. Pacold et al. (2000) Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* **103**, 931.
- [74] R. Xu et al. (1997) NMR structure of Protein Kinase C- $\gamma$  phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. *Biochemistry* **36**, 10709.
- [75] N. Guex et al. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**, 2714.
- [76] M. Daub et al. (1998) The RafC1 cysteine-rich domain contains multiple distinct regulatory epitopes, which control Ras-dependent Raf activation. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 6698.
- [77] M. Medkova et al. (1998) Mutagenesis of the C2 Domain of Protein Kinase C $\alpha$  differential Roles of Ca<sup>2+</sup> ligands and membrane binding residues. *J. Biol. Chem.* **273**, 17544.
- [78] R. Cutler et al. (1998) Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc. Natl. Acad. Science USA* **95**, 9214.
- [79] M. Medkova et al. (1998) Interplay of C1 and C2 Domains of Protein Kinase C $\alpha$  in its membrane binding and activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 19852.

# Abkürzungen

2D	zweidimensional
Å	Angström (0.1nm)
C1	Protein Kinase C Homologie „1“
CNS	Crystallography & NMR System
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
C-Terminus	Carboxylterminus
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTE	1,4 –Dithioerythritol
DQF-COSY	<i>Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GppNHp	Guanylylimidodiphosphate
FID	freie Induktionszerfall
Gl.	Gleichung
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-Triphosphate
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
INEPT	<i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i>
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kD	Kilodalton
MST1	<i>mammalian sterile kinase 1</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernspinresonanz
NOE	Kern Overhauser Effekt
NOESY	Kern Overhauser Effekt ( <i>Enhancement</i> ) Spektroskopie
Nore1	<i>Novel Ras Effector</i>
N-Terminus	Aminoterninus
PI(3)	Phosphoinositidol-3-Kinase gamma
PKC	Protein Kinase C
Raf1	Raf proto-onkogenische Serine/Threonine Proteinkinase
RBD	Ras-bindende Domäne
RF	Radiofrequenzfeld

RMSD	Die Wurzel des mittleren Abstandsquadrats
s.	siehe
States-	States-Haberkorn-Ruben
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TPPI	zeit-proportionale Phasen-Inkrementation
TSP	das Natriumsalz der Trimethylsilyl-Propionsäure
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren in Ein-Drei-Buchstaben Kode:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asp	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

# Anhang

## A1 Programm zur automatischen NOE-Suche in C++

Das Programm erfordert folgende Eingaben:

- Struktur-File (PDB-File) von der Tastatur,
- Text-File mit einer Signalliste aus einem NOESY-HSQC-Spektrum (z. B. vom Programm AURELIA),
- File mit der in CNS-Sprache eingelesenen NOE-Liste.

Ferner soll im Programm die Zuordnung von Atomen zu Frequenzen explizit eingegeben werden. Ausgegeben wird eine Liste in CNS-Sprache mit neuen NOEs. Wenn kein Ausgabe-File definiert ist, erfolgt die Ausgabe auf den Bildschirm.

```
#include <iostream.h>
#include <fstream.h>
#include <math.h>
#include <stdlib.h>
#include <iomanip.h>
#include <strings.h>
#include <string>
#include <cstring>
#include <string.h>

void fehler(const char* p, const char* p2="")
{
    cerr << p << ' ' << p2 << '\n';
    exit(1);
}

void main (int argc, char* argv[])
{
    if (argc != 1) fehler("Please input pdb!");
    /*
    Name aus der Kommandozeile argv[1] einlesen.
    */
    ifstream pdb_file(argv[1]);
    if(!pdb_file)
        fehler("Reaction file error: ",argv[1]);

    const string atom="ATOM";
    const string solltyp="H";
    string inbuf;
    int i=0;
    int maxi=10000, maxi1=10000;
    int anummer[maxi],asnummer[maxi],asnummer1[maxi1], asnummer2[maxi1];
```

```

    string typ,as[maxi],ptyp[maxi],ptyp1[maxi1],ptyp2[maxi1];
    float x[maxi],y[maxi],z[maxi];
double freq1[maxi], freq2[maxi],freq11[maxi], freq22[maxi];
    string inbuf;
    double omega1[maxi1], omega2[maxi1], omega3[maxi1];
int Ins[maxi1],maxIns=0, num[maxi1],count[maxi1],proc=1;
    bool ent[maxi1];
    for(int init=0;init<maxi1;init++) {
        count[init]=0;
        ent[init]=false;
    }
    //
string mull;
    while(pdb_file) { /* Lesen von Information aus dem PDB-File*/
        pdb_file >> inbuf;
        if(inbuf == atom) {
            pdb_file >> anummer[i];
            pdb_file >> typ;
            ptyp[i]=typ;
            string isttyp (typ,0,1);
            pdb_file >> as[i];
            pdb_file >> asnummer[i];
            pdb_file >> x[i];
            pdb_file >> y[i];
            pdb_file >> z[i];
            if(isttyp == solltyp) i++;
        }
    }
    pdb_file.close();
int protons=i+1;
    //

    ifstream text_file,
    text_file.open("peaknoehsw3.txt"); /* Öffnen einer Liste der Signalen aus einem NOESY-HSQC-
Spektrum */
    int l=0;

    while(text_file) {
        char b,buf[100];
        text_file >> mull;
        text_file >> num[l];
        text_file >> omega1[l];
        text_file.ignore(7,');
        text_file >> omega2[l];
        text_file.ignore(7,');
        text_file >> omega3[l];
        text_file.ignore(7,');
        text_file >> Ins[l];
        if (Ins[l]>=maxIns) maxIns=Ins[l];
        text_file >> mull;

        l++; }

    text_file.close();

```

```

int peaks=l+1;
int j,k=0;
/* Berechnung der Distanzen zwischen Protonen in PDB-File */
float dx,dy,dz,dist,abstand[maxi1];
clog << "Berechne Distanzvektoren fuer " << i+1 << " Protonen \n";
for(i=0;i<protons;i++) {
  if (freq2[i]!=0){
    for(j=i+1;j<protons;j++) {
      if (freq2[j]!=0){
        dx=x[i]-x[j];
        dy=y[i]-y[j];
        dz=z[i]-z[j];
        dist=pow(dx*dx+dy*dy+dz*dz,0.5);
        /* Wenn zwei Protonen nicht mehr als 5.5 Å voneinander entfernt sind, wird gecheckt, ob
das entsprechende Signal in der Signal-Liste vorhanden ist */
        if(dist < 5.5) {
          for(int m=0; m<peaks;m++){
            if((ptyp[i]!="HN")&&(ptyp[j]=="HN")) {
              if((fabs(omega1[m]-freq1[j])<=(0.01*proc*freq1[j]))
&& (fabs(omega3[m]-freq2[j])<=(0.01*proc*freq2[j]))
&& (fabs(omega2[m]-freq2[i])<=(0.01*proc*freq2[i]))) {
                count[m]++;
                asnummer1[m]= asnummer[j];
                asnummer2[m]= asnummer[i];
                ptyp1[m]=ptyp[j];
                ptyp2[m]= ptyp[i];
                abstand[m]=dist;
              }
            }
            if(ptyp[i]=="HN"){
              if((fabs(omega1[m]-freq1[i])<=(0.01*proc*freq1[i]))
&& (fabs(omega3[m]-freq2[i])<=(0.01*proc*freq2[i]))
&& (fabs(omega2[m]-freq2[j])<=(0.01*proc*freq2[j]))) {
                count[m]++;
                asnummer1[m]= asnummer[i];
                asnummer2[m]= asnummer[j];
                ptyp1[m]=ptyp[i];
                ptyp2[m]= ptyp[j];
                abstand[m]=dist;
              }
            }
          }
        }
      }
    }
  }
  k++;
}
}
}
}
int n_noes=k+1;
clog << n_noes << " NOE's vorhergesagt\n";
int check=0,check_neu=0;

```

```

char at1[100];
int an1,an2;
for(int t=0;t<peaks;t++){
    if ((count[t]==1) &&(asnummer1[t]!= asnummer2[t])){

        check++;
        NOE_file.open("NOE_20Mai03"); /* NOE-Liste in CNS-Sprache öffnen*/
        while(NOE_file) {
            string text;
            const string assign="assign";
            NOE_file >> text;
            if(text == assign) {
                NOE_file >> text;
                NOE_file >> an1;
                NOE_file >> text;
                NOE_file >> text;
                NOE_file>> at1;
                int size1=strlen (at1);
                string at(at1,0,size1-1);
                NOE_file >> text;
                NOE_file >> an2;
                NOE_file >> text;
                NOE_file >> text;
                NOE_file>> at1;
                int size2=strlen (at1);
                string at2(at1,0,size2-1);
/* Cheken, ob die gefundene NOE schon in der NOE-Liste steht */
                if(((ptyp1[t]==at)&&(asnummer1[t]==an1)&&(ptyp2[t]==at2)&&(asnummer2[t]==an2))

||((ptyp1[t]==at2)&&(asnummer1[t]==an2)&&(ptyp2[t]==at)&&(asnummer2[t]==an1))){
                    ent[t]=true;

                }
            }
        }
        NOE_file.close();
        string text1;
/* Wenn der neue NOE noch nicht in der Liste steht, wird er in eine von drei Klassen eingeteilt und einer
neuen Liste zugeordnet */
        if (!ent[t]){
            check_neu++;
            if((abstand[t]<=3.2) && (Ins[t]>=(maxIns*0.5))) text1="2.5 0.7 0.4";
            else if((abstand[t]<=4.2) && (Ins[t]>=(maxIns*0.25))) text1="3.0 1.2 1.2";
            else text1="4.0 2.2 1.5";
            cout << "assign"<< " " <<"(resid" << " " << asnummer1[t] <<" " <<"and name" << " " <<
ptyp1[t]<< ")"<< " " <<"(resid" << " " << asnummer2[t] << " " <<"and name" << " " << ptyp2[t]<<")<<"<<"
"<<text1<< endl;

        }

    }
}
clog << "Von " << check << " NOEs sind " << check_neu << " neu!\n";
}

```

## A2 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ Abstände zur Berechnung der Struktur

\* bedeutet, dass mehrere Protonen voneinander nicht unterschieden werden konnten

### Interresiduale Abstände

Aminosäurenummer	Atom	Aminosäurenummer	Atom	Abstand, Å
118	H <sub>N</sub>	117	H <sub>α2</sub>	1.8 - 5.5
118	H <sub>N</sub>	117	H <sub>α1</sub>	1.8 - 5.5
118	H <sub>N</sub>	117	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
118	H <sub>δ2</sub>	120	H <sub>ζ</sub>	1.8 - 2.9
119	H <sub>N</sub>	118	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
119	H <sub>N</sub>	148	H <sub>δ22</sub>	1.8 - 5.5
119	H <sub>N</sub>	146	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
119	H <sub>N</sub>	118	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
119	H <sub>N</sub>	118	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
119	H <sub>N</sub>	118	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
119	H <sub>N</sub>	120	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 5.5
119	H <sub>N</sub>	147	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
119	H <sub>N</sub>	148	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
119	H <sub>N</sub>	148	H <sub>δ21</sub>	1.8 - 5.5
119	H <sub>N</sub>	120	H <sub>N</sub>	1.8 - 4.2
120	H <sub>N</sub>	119	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
120	H <sub>α</sub>	146	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
120	H <sub>N</sub>	119	H <sub>γ1</sub>	1.8 - 2.9
120	H <sub>N</sub>	119	H <sub>γ2</sub>	1.8 - 2.9
121	H <sub>N</sub>	145	H <sub>N</sub>	1.8 - 4.2
121	H <sub>N</sub>	146	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
121	H <sub>N</sub>	144	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
121	H <sub>N</sub>	146	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
121	H <sub>N</sub>	146	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
121	H <sub>N</sub>	145	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
121	H <sub>N</sub>	120	H <sub>N</sub>	1.8 - 4.2
121	H <sub>N</sub>	120	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
121	H <sub>N</sub>	120	H <sub>B</sub> *	1.8 - 4.2
121	H <sub>N</sub>	120	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 5.5
121	H <sub>N</sub>	144	H <sub>δ22</sub> *	1.8 - 5.5
121	H <sub>N</sub>	122	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
121	H <sub>N</sub>	122	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
121	H <sub>γ1</sub> *	112	H <sub>B</sub> *	1.8-5.55
122	H <sub>N</sub>	121	H <sub>α</sub>	1.8 - 2.9
122	H <sub>N</sub>	145	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
122	H <sub>N</sub>	123	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
122	H <sub>N</sub>	144	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
122	H <sub>N</sub>	121	H <sub>B</sub>	1.8 - 4.2
122	H <sub>N</sub>	144	H <sub>δ22</sub> *	1.8 - 4.2

122	$H_N$	144	$H_\gamma$	1.8 - 5.5
122	$H_N$	121	$H_{\gamma 1}^*$	1.8 - 4.2
122	$H_\alpha$	144	$H_{\delta 22}^*$	1.8 - 4.2
122	$H_\alpha$	144	$H_\alpha$	1.8 - 4.2
122	$H_\alpha$	144	$H_\gamma$	1.8 - 5.5
122	$H_\alpha$	123	$H_\alpha$	1.8 - 5.5
123	$H_N$	144	$H_\alpha$	1.8 - 4.2
123	$H_N$	144	$H_N$	1.8 - 5.5
123	$H_N$	143	$H_\alpha$	1.8 - 5.5
123	$H_N$	145	$H_N$	1.8 - 5.5
123	$H_N$	143	$H_N$	1.8 - 4.2
123	$H_N$	122	$H_\beta^*$	1.8 - 4.2
123	$H_N$	122	$H_\alpha$	1.8 - 4.2
123	$H_N$	122	$H_\gamma^*$	1.8 - 4.2
123	$H_\alpha$	122	$H_B^*$	1.8 - 5.5
124	$H_N$	123	$H_N$	1.8 - 5.5
124	$H_N$	125	$H_N$	1.8 - 5.5
124	$H_N$	123	$H_{\delta 1}^*$	1.8 - 4.2
124	$H_\alpha$	142	$H_\gamma^*$	1.8 - 5.5
125	$H_N$	124	$H_\alpha$	1.8 - 4.2
125	$H_{\delta 22}^*$	130	$H_{\alpha 1}$	1.8 - 5.5
125	$H_{\delta 22}^*$	130	$H_{\alpha 2}$	1.8 - 5.5
125	$H_{\delta 1}^*$	123	$H_{\delta 1}^*$	1.8 - 5.5
128	$H_N$	129	$H_\delta^*$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	139	$H_N$	1.8 - 5.0
130	$H_N$	140	$H_\alpha$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	129	$H_\alpha$	1.8 - 2.9
130	$H_N$	138	$H_\alpha$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	139	$H_\alpha$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	129	$H_{B2}$	1.8 - 4.5
130	$H_N$	139	$H_B$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	131	$H_B^*$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	139	$H_{\gamma 2}^*$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	139	$H_{\gamma 1}^*$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	129	$H_\gamma^*$	1.8 - 4.5
130	$H_N$	129	$H_\delta^*$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	131	$H_N$	1.8 - 5.5
130	$H_N$	131	$H_\alpha$	1.8 - 5.5
131	$H_N$	139	$H_N$	1.8 - 5.5
131	$H_N$	132	$H_N$	1.8 - 5.5
131	$H_N$	130	$H_{\alpha 1}$	1.8 - 4.2
131	$H_N$	130	$H_{\alpha 2}$	1.8 - 4.2
131	$H_N$	139	$H_{\gamma 2}^*$	1.8 - 5.5
131	$H_N$	139	$H_{\gamma 1}^*$	1.8 - 5.5
131	$H_\alpha$	139	$H_{\gamma 1}^*$	1.8 - 5.5
131	$H_\alpha$	138	$H_{B1}$	1.8 - 5.5

131	$H_{\alpha}$	138	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
131	$H_{\alpha}$	138	$H_{\alpha}$	1.8 - 2.9
131	$H_{\epsilon 1}$	130	$H_{\alpha 2}$	1.8 - 5.5
131	$H_{\delta 1}$	130	$H_{\alpha 2}$	1.8 - 5.5
131	$H_{\epsilon 1}$	129	$H_{B1}$	1.8 - 4.2
131	$H_{\epsilon 1}$	129	$H_{\gamma}^*$	1.8 - 4.2
131	$H_{\epsilon 1}$	138	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
131	$H_N$	132	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
131	$H_{\epsilon 3}$	138	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	137	$H_N$	1.8 - 4.2
132	$H_N$	133	$H_N$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	138	$H_N$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	135	$H_N$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	153	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	139	$H_{\gamma 2}^*$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	139	$H_{\gamma 1}^*$	1.8 - 4.2
132	$H_N$	131	$H_{\alpha}$	1.8 - 4.2
132	$H_N$	137	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	131	$H_{B1}$	1.8 - 4.2
132	$H_N$	131	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	131	$H_{\epsilon 3}$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	154	$H_{\epsilon 1}$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	137	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	136	$H_{\alpha 2}$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	137	$H_N$	1.8 - 5.5
132	$H_N$	135	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
132	$H_{B1}$	154	$H_{\epsilon 1}$	1.8 - 4.5
132	$H_{B2}$	154	$H_{\epsilon 1}$	1.8 - 5.5
133	$H_N$	134	$H_N$	1.8 - 4.2
133	$H_N$	152	$H_N$	1.8 - 5.5
133	$H_N$	154	$H_N$	1.8 - 5.5
133	$H_N$	153	$H_{\alpha}$	1.8 - 4.2
133	$H_N$	132	$H_{\alpha}$	1.8 - 2.9
133	$H_N$	132	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
133	$H_N$	134	$H_{B1}$	1.8 - 5.5
133	$H_N$	139	$H_{\gamma 2}^*$	1.8 - 5.5
133	$H_N$	139	$H_{\gamma 1}^*$	1.8 - 5.5
133	$H_N$	136	$H_N$	1.8 - 5.5
134	$H_N$	132	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.0
134	$H_N$	153	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
134	$H_N$	154	$H_N$	1.8 - 5.5
134	$H_N$	136	$H_N$	1.8 - 5.5
134	$H_N$	153	$H_{B1}$	1.8 - 5.5
134	$H_{\delta 1}^*$	151	$H_{\zeta}$	1.8 - 5.5
134	$H_{\delta 2}^*$	151	$H_{\zeta}$	1.8 - 5.5
135	$H_N$	134	$H_N$	1.8 - 2.9

135	H <sub>N</sub>	133	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
135	H <sub>N</sub>	136	H <sub>N</sub>	1.8 - 2.9
135	H <sub>N</sub>	132	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
135	H <sub>N</sub>	134	H <sub>B1</sub>	1.8 - 2.9
135	H <sub>N</sub>	134	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.2
135	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
135	H <sub>N</sub>	134	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 2.9
135	H <sub>N</sub>	134	H <sub>γ</sub>	1.8 - 2.9
135	H <sub>N</sub>	154	H <sub>ε1</sub>	1.8 - 5.5
135	H <sub>N</sub>	136	H <sub>α2</sub>	1.8 - 5.5
135	H <sub>N</sub>	154	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
136	H <sub>N</sub>	137	H <sub>N</sub>	1.8 - 2.9
136	H <sub>N</sub>	135	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.8
136	H <sub>N</sub>	135	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
136	H <sub>N</sub>	135	H <sub>B2</sub>	1.8 - 2.9
136	H <sub>N</sub>	134	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
136	H <sub>N</sub>	134	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 5.5
136	H <sub>N</sub>	134	H <sub>γ</sub>	1.8 - 5.5
136	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
136	H <sub>N</sub>	137	H <sub>ε</sub>	1.8 - 5.5
136	H <sub>N</sub>	133	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
136	H <sub>N</sub>	154	H <sub>ε1</sub>	1.8 - 5.5
137	H <sub>N</sub>	138	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
137	H <sub>N</sub>	136	H <sub>α</sub> *	1.8 - 4.0
137	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
137	H <sub>N</sub>	131	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
137	H <sub>N</sub>	154	H <sub>ε1</sub>	1.8 - 5.5
138	H <sub>N</sub>	139	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
138	H <sub>N</sub>	131	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
138	H <sub>N</sub>	137	H <sub>α</sub>	1.8 - 2.9
138	H <sub>N</sub>	137	H <sub>B1</sub>	1.8 - 2.9
138	H <sub>N</sub>	137	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 5.5
138	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
138	H <sub>N</sub>	137	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
138	H <sub>N</sub>	154	H <sub>ε1</sub>	1.8 - 5.5
139	H <sub>N</sub>	140	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
139	H <sub>N</sub>	138	H <sub>α</sub>	1.8 - 2.9
139	H <sub>N</sub>	129	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
139	H <sub>N</sub>	130	H <sub>α2</sub>	1.8 - 5.5
139	H <sub>N</sub>	131	H <sub>α</sub>	1.8 - 2.9
139	H <sub>N</sub>	131	H <sub>B</sub> *	1.8 - 5.5
139	H <sub>N</sub>	138	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
139	H <sub>N</sub>	138	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
139	H <sub>N</sub>	140	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
139	H <sub>N</sub>	154	H <sub>ε1</sub>	1.8 - 5.5
139	H <sub>N</sub>	154	H <sub>δ2</sub>	1.8 - 5.5

140	H <sub>N</sub>	141	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
140	H <sub>N</sub>	139	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.0
140	H <sub>N</sub>	139	H <sub>β</sub>	1.8 - 5.5
140	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
140	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ2</sub> *	1.8 - 5.0
140	H <sub>N</sub>	154	H <sub>δ2</sub>	1.8 - 5.5
140	H <sub>N</sub>	141	H <sub>β2</sub>	1.8 - 5.5
141	H <sub>N</sub>	140	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
141	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
141	H <sub>N</sub>	140	H <sub>δ1</sub> *	1.8 - 5.0
142	H <sub>N</sub>	141	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
142	H <sub>N</sub>	143	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
142	H <sub>N</sub>	143	H <sub>β</sub> *	1.8 - 5.5
142	H <sub>N</sub>	141	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
142	H <sub>N</sub>	125	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 5.5
142	H <sub>N</sub>	141	H <sub>γ</sub> *	1.8 - 5.5
143	H <sub>N</sub>	142	H <sub>β</sub> *	1.8 - 4.8
143	H <sub>N</sub>	142	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
143	H <sub>N</sub>	125	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 4.2
143	H <sub>N</sub>	142	H <sub>γ</sub> *	1.8 - 4.8
143	H <sub>N</sub>	144	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
143	H <sub>β</sub> *	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
143	H <sub>β</sub> *	139	H <sub>γ2</sub> *	1.8 - 4.2
143	H <sub>α</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
143	H <sub>α</sub>	139	H <sub>γ2</sub> *	1.8 - 4.2
144	H <sub>N</sub>	153	H <sub>N</sub>	1.8 - 4.2
144	H <sub>N</sub>	154	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
144	H <sub>N</sub>	122	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
144	H <sub>N</sub>	143	H <sub>α</sub>	1.8 - 2.9
144	H <sub>N</sub>	145	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
144	H <sub>N</sub>	152	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
144	H <sub>N</sub>	143	H <sub>β</sub> *	1.8 - 2.9
144	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
144	H <sub>N</sub>	153	H <sub>β1</sub>	1.8 - 5.5
144	H <sub>δ1</sub> *	120	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 5.5
144	H <sub>δ2</sub> *	120	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 5.5
145	H <sub>N</sub>	144	H <sub>α</sub>	1.8 - 2.9
145	H <sub>N</sub>	122	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
145	H <sub>N</sub>	153	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
145	H <sub>N</sub>	152	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.0
145	H <sub>N</sub>	144	H <sub>β2</sub>	1.8 - 5.5
145	H <sub>N</sub>	120	H <sub>β2</sub>	1.8 - 5.5
145	H <sub>N</sub>	120	H <sub>β1</sub>	1.8 - 5.5
145	H <sub>N</sub>	121	H <sub>β</sub>	1.8 - 5.5
145	H <sub>α</sub>	152	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
145	H <sub>N</sub>	144	H <sub>δ2</sub> *	1.8 - 4.2

145	$H_N$	147	$H_N$	1.8 - 5.5
145	$H_N$	120	$H_{\delta 1}$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	147	$H_N$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	149	$H_N$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	145	$H_N$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	153	$H_N$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	151	$H_N$	1.8 - 4.2
146	$H_N$	120	$H_{B1}$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	145	$H_{\alpha}$	1.8 - 2.9
146	$H_N$	152	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	120	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	120	$H_{\epsilon}^*$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	120	$H_{\delta}^*$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	151	$H_{\delta}^*$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	145	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	151	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	144	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
146	$H_N$	150	$H_N$	1.8 - 5.5
146	$H_{B1}$	118	$H_{\delta 2}$	1.8 - 5.5
146	$H_{B2}$	118	$H_{\delta 2}$	1.8 - 5.5
146	$H_{B1}$	118	$H_{B1}$	1.8 - 5.5
147	$H_N$	120	$H_{\alpha}$	1.8 - 4.2
147	$H_N$	146	$H_{\alpha}$	1.8 - 2.9
147	$H_N$	146	$H_{B1}$	1.8 - 5.5
147	$H_N$	146	$H_{B2}$	1.8 - 5.0
147	$H_N$	121	$H_{\gamma 2}^*$	1.8 - 4.2
147	$H_N$	149	$H_N$	1.8 - 5.5
147	$H_N$	145	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
147	$H_N$	148	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
147	$H_N$	148	$H_N$	1.8 - 5.5
148	$H_N$	149	$H_N$	1.8 - 2.9
148	$H_N$	150	$H_N$	1.8 - 5.5
148	$H_N$	118	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
148	$H_N$	147	$H_B^*$	1.8 - 4.2
148	$H_N$	147	$H_{\alpha}$	1.8 - 4.2
148	$H_N$	119	$H_B^*$	1.8 - 5.5
148	$H_N$	146	$H_{B1}$	1.8 - 5.5
148	$H_N$	146	$H_{B2}$	1.8 - 5.5
148	$H_{\delta 22}$	119	$H_B^*$	1.8 - 5.5
148	$H_{\delta 21}$	119	$H_B^*$	1.8 - 5.5
148	$H_{\delta 21}$	119	$H_{\gamma 2}$	1.8 - 5.5
148	$H_{\delta 21}$	119	$H_{\delta}^*$	1.8 - 5.5
148	$H_{\delta 22}$	119	$H_{\delta}^*$	1.8 - 5.5
148	$H_{\delta 22}$	119	$H_{\gamma 2}$	1.8 - 4.2
148	$H_N$	146	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5
149	$H_N$	148	$H_{\alpha}$	1.8 - 5.5

150	H <sub>N</sub>	149	H <sub>N</sub>	1.8 - 2.9
150	H <sub>N</sub>	149	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
150	H <sub>N</sub>	149	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
150	H <sub>N</sub>	149	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
150	H <sub>N</sub>	148	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
150	H <sub>N</sub>	148	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
150	H <sub>N</sub>	148	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
151	H <sub>N</sub>	150	H <sub>N</sub>	1.8 - 4.2
151	H <sub>N</sub>	152	H <sub>N</sub>	1.8 - 4.8
151	H <sub>N</sub>	149	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
151	H <sub>N</sub>	145	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
151	H <sub>N</sub>	150	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
151	H <sub>N</sub>	150	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.0
151	H <sub>N</sub>	150	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.2
151	H <sub>N</sub>	150	H <sub>γ1</sub>	1.8 - 5.0
151	H <sub>N</sub>	146	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
151	H <sub>N</sub>	120	H <sub>ε1</sub>	1.8 - 5.5
152	H <sub>N</sub>	151	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
152	H <sub>N</sub>	151	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
152	H <sub>N</sub>	151	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
152	H <sub>N</sub>	151	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 4.2
152	H <sub>N</sub>	145	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
152	H <sub>γ</sub> *	145	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
152	H <sub>γ</sub> *	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
153	H <sub>N</sub>	154	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
153	H <sub>N</sub>	143	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
153	H <sub>N</sub>	145	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
153	H <sub>N</sub>	152	H <sub>α</sub>	1.8 - 2.9
153	H <sub>N</sub>	144	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
153	H <sub>N</sub>	144	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
153	H <sub>N</sub>	152	H <sub>B</sub>	1.8 - 5.0
153	H <sub>N</sub>	151	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 4.2
153	H <sub>N</sub>	144	H <sub>δ1</sub> *	1.8 - 5.5
153	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
153	H <sub>N</sub>	152	H <sub>γ2</sub> *	1.8 - 4.2
153	H <sub>N</sub>	120	H <sub>ε</sub>	1.8 - 5.5
153	H <sub>N</sub>	132	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
153	H <sub>α</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	153	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.0
154	H <sub>N</sub>	143	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	143	H <sub>B</sub> *	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	157	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	158	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	139	H <sub>B</sub>	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	153	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.0
154	H <sub>N</sub>	153	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.0

154	H <sub>N</sub>	134	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	134	H <sub>γ</sub>	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	132	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
154	H <sub>δ2</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 4.2
154	H <sub>δ2</sub>	139	H <sub>γ2</sub> *	1.8 - 5.5
154	H <sub>ε1</sub>	139	H <sub>γ1</sub> *	1.8 - 5.5
157	H <sub>N</sub>	158	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
157	H <sub>N</sub>	156	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
157	H <sub>N</sub>	156	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.5
157	H <sub>N</sub>	156	H <sub>β</sub> *	1.8 - 4.2
157	H <sub>N</sub>	154	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
157	H <sub>N</sub>	154	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
157	H <sub>N</sub>	156	H <sub>γ</sub> *	1.8 - 4.5
157	H <sub>N</sub>	153	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
157	H <sub>N</sub>	154	H <sub>B1</sub>	.0 2.2 1.5
158	H <sub>N</sub>	159	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
158	H <sub>N</sub>	157	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
158	H <sub>N</sub>	157	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
159	H <sub>N</sub>	160	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
159	H <sub>N</sub>	158	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
159	H <sub>N</sub>	161	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
160	H <sub>N</sub>	161	H <sub>N</sub>	1.8 - 2.9
160	H <sub>N</sub>	158	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.0
160	H <sub>N</sub>	157	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
160	H <sub>N</sub>	159	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
160	H <sub>N</sub>	159	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
160	H <sub>N</sub>	157	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
160	H <sub>N</sub>	158	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
161	H <sub>N</sub>	160	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
161	H <sub>β</sub>	158	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
161	H <sub>N</sub>	162	H <sub>γ</sub> *	1.8 - 5.5
161	H <sub>δ</sub> *	120	H <sub>ζ</sub>	1.8 - 4.2
161	H <sub>γ2</sub> *	120	H <sub>ζ</sub>	1.8 - 5.5
161	H <sub>δ</sub> *	151	H <sub>ε</sub> *	1.8 - 4.2
161	H <sub>γ2</sub> *	151	H <sub>ε</sub> *	1.8 - 5.5
162	H <sub>N</sub>	161	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
162	H <sub>N</sub>	161	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
162	H <sub>N</sub>	161	H <sub>γ2</sub> *	1.8 - 5.5
162	H <sub>N</sub>	160	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
163	H <sub>N</sub>	164	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
163	H <sub>N</sub>	162	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.2
163	H <sub>N</sub>	162	H <sub>γ</sub> *	1.8 - 5.5
163	H <sub>N</sub>	161	H <sub>γ2</sub> *	1.8 - 4.2
164	H <sub>N</sub>	163	H <sub>β</sub> *	1.8 - 4.5
164	H <sub>N</sub>	163	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 5.5

165	H <sub>N</sub>	164	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
165	H <sub>N</sub>	118	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
165	H <sub>N</sub>	118	H <sub>ε1</sub>	1.8 - 5.5
165	H <sub>N</sub>	164	H <sub>α</sub>	1.8 - 2.9
165	H <sub>N</sub>	117	H <sub>α2</sub>	1.8 - 5.5
165	H <sub>A</sub>	118	H <sub>ε1</sub>	1.8 - 4.5
165	H <sub>B2</sub>	118	H <sub>ε1</sub>	1.8 - 5.5
165	H <sub>B2</sub>	118	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
166	H <sub>N</sub>	149	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
166	H <sub>N</sub>	164	H <sub>α</sub>	1.8 - 5.5
166	H <sub>N</sub>	165	H <sub>α</sub>	1.8 - 4.5
166	H <sub>N</sub>	165	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.5
166	H <sub>N</sub>	165	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.5
166	H <sub>N</sub>	149	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.5
166	H <sub>N</sub>	149	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.5

### Intraresiduale Abstände

Aminosäurenummer	Atom	Aminosäurenummer	Atom	Abstand, Å
118	H <sub>N</sub>	118	H <sub>B2</sub>	1.8 - 2.9
118	H <sub>N</sub>	118	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
118	H <sub>B1</sub>	118	H <sub>δ</sub>	1.8 - 4.2
118	H <sub>B2</sub>	118	H <sub>δ</sub>	1.8 - 4.2
119	H <sub>N</sub>	119	H <sub>δ</sub>	1.8 - 5.5
119	H <sub>N</sub>	119	H <sub>B</sub> *	1.8 - 2.9
119	H <sub>N</sub>	119	H <sub>γ</sub>	1.8 - 4.2
119	H <sub>N</sub>	119	H <sub>γ</sub>	1.8 - 2.9
120	H <sub>N</sub>	120	H <sub>B</sub> *	1.8 - 4.2
120	H <sub>N</sub>	120	H <sub>δ</sub>	1.8 - 4.2
121	H <sub>N</sub>	121	H <sub>B</sub>	1.8 - 4.2
121	H <sub>N</sub>	121	H <sub>γ</sub> *	1.8 - 2.9
122	H <sub>N</sub>	122	H <sub>B</sub> *	1.8 - 2.9
123	H <sub>N</sub>	123	H <sub>B</sub> *	1.8 - 4.2
123	H <sub>N</sub>	123	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 4.2
123	H <sub>N</sub>	123	H <sub>γ</sub>	1.8 - 4.2
124	H <sub>N</sub>	124	H <sub>B</sub> *	1.8 - 2.9
125	H <sub>N</sub>	125	H <sub>γ</sub>	1.8 - 4.2
125	H <sub>N</sub>	125	H <sub>δ</sub>	1.8 - 4.2
131	H <sub>N</sub>	131	H <sub>B</sub> *	1.8 - 4.2
131	H <sub>N</sub>	131	H <sub>δ</sub>	1.8 - 5.5
131	H <sub>α</sub>	131	H <sub>ε</sub>	1.8 - 5.5
131	H <sub>ε</sub>	131	H <sub>B</sub> *	1.8 - 5.5

131	H <sub>ε</sub>	131	H <sub>N</sub>	1.8 - 5.5
132	H <sub>N</sub>	132	H <sub>B1</sub>	1.8 - 2.9
132	H <sub>N</sub>	132	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.2
133	H <sub>N</sub>	133	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
134	H <sub>N</sub>	134	H <sub>B1</sub>	1.8 - 2.9
134	H <sub>N</sub>	134	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.2
134	H <sub>N</sub>	134	H <sub>γ</sub>	1.8 - 5.5
134	H <sub>N</sub>	134	H <sub>γ</sub>	1.8 - 4.2
135	H <sub>N</sub>	135	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
135	H <sub>N</sub>	135	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.2
137	H <sub>N</sub>	137	H <sub>ε</sub>	1.8 - 5.5
137	H <sub>N</sub>	137	H <sub>B2</sub>	1.8 - 2.9
137	H <sub>N</sub>	137	H <sub>γ</sub>	1.8 - 2.9
137	H <sub>N</sub>	137	H <sub>δ</sub>	1.8 - 4.2
138	H <sub>N</sub>	138	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
139	H <sub>N</sub>	139	H <sub>B</sub>	1.8 - 4.2
139	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ</sub> *	1.8 - 4.2
139	H <sub>N</sub>	139	H <sub>γ</sub> *	1.8 - 4.0
140	H <sub>N</sub>	140	H <sub>γ</sub>	1.8 - 4.2
140	H <sub>N</sub>	140	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 5.5
141	H <sub>N</sub>	141	H <sub>B</sub> *	1.8 - 5.5
141	H <sub>N</sub>	141	H <sub>γ</sub>	1.8 - 4.2
141	H <sub>N</sub>	141	H <sub>δ</sub>	1.8 - 5.5
142	H <sub>N</sub>	142	H <sub>γ</sub>	1.8 - 5.5
142	H <sub>N</sub>	142	H <sub>B</sub> *	1.8 - 2.9
143	H <sub>N</sub>	143	H <sub>B</sub> *	1.8 - 2.9
144	H <sub>N</sub>	144	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
144	H <sub>N</sub>	144	H <sub>γ</sub>	1.8 - 4.2
144	H <sub>N</sub>	144	H <sub>δ</sub> *	1.8 - 4.2
145	H <sub>N</sub>	145	H <sub>B2</sub>	1.8 - 2.9
145	H <sub>N</sub>	145	H <sub>γ</sub>	1.8 - 5.0
146	H <sub>N</sub>	146	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
146	H <sub>N</sub>	146	H <sub>B2</sub>	1.8 - 2.9
147	H <sub>N</sub>	147	H <sub>B</sub> *	1.8 - 2.9
148	H <sub>N</sub>	148	H <sub>B</sub> *	1.8 - 2.9
148	H <sub>N</sub>	148	H <sub>δ1</sub>	1.8 - 5.5
148	H <sub>N</sub>	148	H <sub>δ2</sub>	1.8 - 5.5
149	H <sub>N</sub>	149	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.5
149	H <sub>N</sub>	149	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
150	H <sub>N</sub>	150	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.8
150	H <sub>N</sub>	150	H <sub>γ</sub>	1.8 - 2.9

150	H <sub>N</sub>	150	H <sub>δ</sub>	1.8 - 4.8
150	H <sub>N</sub>	150	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.2
151	H <sub>N</sub>	151	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
151	H <sub>N</sub>	151	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.2
151	H <sub>N</sub>	151	H <sub>δ</sub>	1.8 - 4.2
151	H <sub>e</sub>	151	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
151	H <sub>e</sub>	151	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
151	H <sub>δ</sub>	151	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
152	H <sub>N</sub>	152	H <sub>B</sub>	1.8 - 2.9
152	H <sub>N</sub>	152	H <sub>γ</sub>	1.8 - 2.9
153	H <sub>N</sub>	153	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
153	H <sub>N</sub>	153	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	154	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.0
154	H <sub>α</sub>	154	H <sub>δ</sub>	1.8 - 4.5
154	H <sub>N</sub>	154	H <sub>δ</sub>	1.8 - 5.5
154	H <sub>N</sub>	154	H <sub>e</sub>	1.8 - 5.5
157	H <sub>N</sub>	157	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
157	H <sub>N</sub>	157	H <sub>B2</sub>	1.8 - 4.0
158	H <sub>N</sub>	158	H <sub>γ</sub>	1.8 - 4.2
158	H <sub>N</sub>	158	H <sub>δ</sub>	1.8 - 5.5
159	H <sub>N</sub>	159	H <sub>B1</sub>	1.8 - 5.5
159	H <sub>N</sub>	159	H <sub>B2</sub>	1.8 - 5.5
160	H <sub>N</sub>	160	H <sub>γ</sub>	1.8 - 4.2
160	H <sub>N</sub>	160	H <sub>δ</sub>	1.8 - 2.9
160	H <sub>N</sub>	160	H <sub>B</sub> *	1.8 - 2.9
161	H <sub>N</sub>	161	H <sub>B</sub>	1.8 - 4.2
161	H <sub>N</sub>	161	H <sub>γ</sub> *	1.8 - 4.2
162	H <sub>N</sub>	162	H <sub>γ</sub>	1.8 - 5.5
162	H <sub>N</sub>	162	H <sub>B</sub> *	1.8 - 5.5
163	H <sub>N</sub>	163	H <sub>δ</sub>	1.8 - 5.0
164	H <sub>N</sub>	164	H <sub>B</sub> *	1.8 - 4.2
165	H <sub>N</sub>	165	H <sub>B1</sub>	1.8 - 4.2
165	H <sub>N</sub>	165	H <sub>B2</sub>	1.8 - 2.9
166	H <sub>N</sub>	166	H <sub>B</sub> *	1.8 - 2.9
166	H <sub>N</sub>	166	H <sub>γ</sub>	1.8 - 2.9