

J–Kopplungs-gestützte Diederwinkelanalyse im Fettsäurebindungsprotein

Diplomarbeit

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Johann Wolfgang Goethe–Universität
Frankfurt am Main

von

Thorsten Brandau

aus Hanau

Frankfurt am Main
1996

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans im Zeitraum von Oktober 1995 bis März 1996 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung und für die Bereitstellung der hervorragenden experimentellen Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit, sowie für Diskussion und Anregung.

Herrn Dr. Jürgen Schmidt gilt mein besonderer Dank, da er stets bemüht war, konkrete Hilfestellung zu leisten und die Arbeit voranzubringen. Die vielen anregenden Diskussionen und seine Hilfsbereitschaft wirkten in fachlicher, sachlicher und motivierender Weise über diese Diplomarbeit hinaus, Anregung und Freude zu diesen Problemkreisen der Biophysikalischen Chemie zu erhalten.

Herrn Dipl.-Phys. Michael Marek danke ich für stete Hilfsbereitschaft, konstruktive Vorschläge und anregende Diskussion bei der Durchführung der Molekulardynamiksimulationen, sowie seinem steten Bemühen, das Computernetzwerk optimal instandzuhalten.

Herrn Dr. H. Hanssum und Herrn Dipl.-Chem. Frank Löhr danke ich für ihre Unterstützung bei den NMR-spektroskopischen Messungen.

Allen nicht namentlich genannten Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Ein persönlicher Dank gilt meinen Eltern: Ohne ihre ständige ideelle und materielle Unterstützung hätte ich mein Studium kaum in diesem kurzen Zeitraum absolvieren können.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Das Fettsäurebindungsprotein (FABP)	1
1.2	Struktur des FABP	5
2	Methoden	9
2.1	3J -Kopplungen als Strukturparameter	9
2.2	Bestimmung von 3J -Kopplungskonstanten	11
2.3	Pulssequenz und Spektren	12
2.4	3J -Kopplungskonstanten in MD-Simulationen	13
3	Experimenteller Teil	17
3.1	NMR-Spektroskopie	17
3.2	Auswertung der Spektren	18
3.3	Molekulardynamiksimulation	19
4	Ergebnisse	22
4.1	J -modulierte [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-COSY-Spektren	22
4.2	$^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten	23
4.3	Diederwinkelanalyse	25
5	Diskussion und Ausblick	37
6	Zusammenfassung	39
7	Literatur	40
A	Chemische Verschiebungen	45
B	Programme	51
B.1	Pulsprogramm und Aquisitionsparameter	51
B.2	prepare.m	53
B.3	volumes.m	54
B.4	table.m	55
B.5	kopplung.m	56
B.6	ellipse.m	57
B.7	fct_hnha.m	58
B.8	zoom2d.m	59
B.9	cont2d.m	60

Abkürzungen

Die Vorschläge der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur für die Ein- und Dreibuchstabenabkürzungen der Aminosäuren wurden befolgt.

CoA	<i>Coenzym A</i>
COSY	„ <i>Correlated Spectroscopy</i> “
E.COSY	„ <i>Exclusive Correlated Spectroscopy</i> “
FID	„ <i>Free Induction Decay</i> “
GARP	„ <i>Globally Optimized Alternating Phase Rectangular Pulse</i> “
J	Kopplungskonstante
MD	„ <i>Molekulardynamik</i> “
NMR	„ <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> “
NOE	„ <i>Nuclear Overhauser Enhancement Effect</i> “
NOESY	„ <i>Nuclear Overhauser Enhancement and Chemical Exchange Spectroscopy</i> “
RMSD	„ <i>Root Mean Square Deviation</i> “
TPPI	„ <i>Time Proportional Phase Incrementation</i> “
1D-	eindimensional
2D-	zweidimensional

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Das Fettsäurebindungsprotein (FABP)

Vor ungefähr zwanzig Jahren wurde das Fettsäurebindungsprotein (FABP) als cytosolisches Protein mit einer hohen Bindungsaffinität für langkettige Fettsäuren entdeckt [1]. Funktional verwandte Spezies wurden mit zahlreichen Verfahren mittlerweile aus dem Herz, der Leber und den Nervenzellen vieler Säugetiere [2, 3], sowie aus Humanmuskeln [4, 5], fötaler Lunge [6] und Placenta [7], aus dem Rinderhirn [8], aus dem Verdauungstrakt der Ratte [9], aus Human- [10], Mäuse- [11] und Schweine-Adipozyten [12], aus Rattenmilchdrüsen [13] und aus Rattennieren [14] isoliert. Isoformen des FABP wurden auch in fettsäuremetabolisierenden Geweben von Hühnern [15, 16], Schellfisch [17], im Darm von Schmetterlingslarven [18] und in Flugmuskeln von Heuschrecken [19] gefunden. In dieser Arbeit werden Untersuchungen an rekombinantem H-FABP_c, dem zellulären Protein aus dem Muskelgewebe des Rinderherzens, durchgeführt. H-FABP_c kommt im Muskelgewebe in zwei Isoformen vor, die sich nur durch den Austausch einer Aminosäure (Asp⁹⁸ gegen Asn⁹⁸) und ihrem pI (4.9 bzw. 5.1) unterscheiden. Die verwendete rekombinante Form entspricht der pI=5.1 Isoform, besitzt jedoch am aminoterminalen Ende noch einen zusätzlichen Methioninrest.

Die physiologische Funktion des Fettsäurebindungsproteins ist trotz des häufigen Vorkommens erst teilweise bekannt. Alle bisher beschriebenen FABP-Isoformen binden bevorzugt Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 bis 20 Kohlenstoffatomen. Die Komplexbildung ist mit einer Dissoziationskonstante von $K_d \approx 10^{-6} - 10^{-7}$ M [20] stark begünstigt. Die Ligandenspezifität hängt dabei vom FABP-Typ ab. In der Regel besitzt das FABP nur eine Bindung-

stelle für die Fettsäure [2]. Lediglich für das Leber-FABP wurde eine Bindungsstöchiometrie von 2 Fettsäuremolekülen pro FABP-Molekül gefunden [21, 22].

Metabolite wie Fettsäuren und ihre CoA- und Carnitinerester beeinflussen direkt und indirekt viele zelluläre Prozesse und Funktionen durch ihre Wechselwirkungen mit Membranen, Enzymen, Transportern und Rezeptoren. Fettsäuren und ihre Derivate spielen ebenso bei der Kontrolle der Zellproliferation und im Metabolismus, wie auch in der Transmembransignalübertragung und in der Pathologie — beispielsweise bei myocardialen Verletzungen — eine Rolle. Die Regulation der Konzentration von Fettsäuren und ihren Estern ist daher wichtig für alle Zellen [2].

Es wird angenommen, daß spezifische Fettsäurebindungsproteine (FABP) als intrazelluläre Fettsäurespeicher dienen und damit die Zelle vor den detergenten Einflüssen hoher Konzentrationen freier Fettsäuren schützen [20]. Darüberhinaus wurde nachgewiesen, daß das FABP eine Rolle bei der Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle spielt [23] und beim intrazellulären Transport der Fettsäuren zu den Mitochondrien, in denen der Fettsäuremetabolismus stattfindet [4, 5, 24]. Zusätzlich hat die Regulation der Fettsäurekonzentration innerhalb der Zelle einen Einfluß auf die Modulation der Enzymaktivitäten durch bestimmte Fettsäuren oder deren CoA-Ester [25]. Auch wurde dem FABP ein Einfluß auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung zugeschrieben [20].

Das Fettsäurebindungsprotein wird — zusammen mit Acyl-CoA-Bindungsprotein (ACBP), unspezifischem Lipidtransferprotein (nsL-TP), Phosphatidylcholintransferprotein (PC-TP), Phosphatidylinositoltransferprotein (PI-TP), zellulärem Retinolbindungsprotein (CRBP) und zellulärem Retinosäure-

bindungsprotein (CRABP) — in die übergeordnete Klasse cytosolischer Proteine eingeordnet, deren Charakteristikum ihr relativ niedriges Molekulargewicht und die hohe Affinität für amphiphile Liganden ist. Die Klassenmitglieder besitzen jedoch deutlich verschiedene biochemische Eigenschaften (z.B. isoelektrische Punkte) und treten in sehr unterschiedlichen Konzentrationen auf, wobei der FABP-Gehalt dabei wesentlich höher ist, als der anderer lipidbindenden Proteine (Tabelle 1).

Protein	Ligand(en)	M_r [kDa]	pI	zelluläre Konzentration [nmol/g]
FABP	Fettsäuren	14,2	6,4	200,0
ACBP	Acyl-CoA	10,0	5,9	28,0
nsL-TP(=SCP ₂)	PL, Cholesterol	12,5	8,6	6,3
PC-TP	PC	28,0	8,4	1,1
PI-TP	PI, PC	36,0	4,9	^a
CRBP	Retinol	15,7	^a	1,2
CRABP	Retinoesäure	15,5	^a	0,013

^a unbekannt

Tabelle 1: Lipidbindende Proteine in der Rattenleber, ACBP: Acyl-CoA-Binding Protein; nsL-TP: non-specific Lipid-Transfer Protein; SCP₂: Sterol Carrier Protein 2; TP: Transport Protein; PC: Phosphatidylcholine; PI: Phosphatidylinosin; PL: Phospholipid; CRBP: Cellular Retinol Binding Protein; CRABP: Cellular Retinoic Acid Binding Protein.

Weiterhin unterscheidet sich FABP von den übrigen Vertretern der Klasse durch eine große Heterogenität an Typen und Isoformen. Es wurden bisher mindestens sechs strukturell unterschiedliche FABP-Typen charakterisiert (Tabelle 2), wobei die Namen der FABP-Typen aus den Geweben aus denen sie ursprünglich isoliert wurden, abgeleitet sind.

Das Molekulargewicht aller bisher untersuchten Fettsäurebindungsproteine liegt zwischen zwischen 13 und 16 kDa mit 127 bis 133 Aminosäureresten in

FABP Typ	Gewebe
Leber Typ	Leber, Darm, Magen
Darm Typ	Darm
Herz Typ	Herz, Nieren, Skelettmuskel, Aorta, Lunge, Milchdrüsen, Placenta, Gehirn, Hoden, Magen
Nieren Typ	Nieren, Blase
Adipozyten Typ	Adipozyten
Myelin Typ	Nerven

Tabelle 2: Gewebsspezifisches Vorkommen der verschiedenen FABP Typen (aus [20])

der jeweiligen Sequenz. Alle FABP-Typen besitzen eine Acetylgruppe an ihrer aminoterminalen Aminosäure. Beim Vergleich der Sequenz verschiedener FABPs aus einem Organismus zeigt sich ein hohes Maß an Ähnlichkeit für die aminoterminalen Domäne (Aminosäurereste 1–25), sowie für eine Domäne in der Mitte der Sequenz (Aminosäurereste 60–90). Die Ähnlichkeit für den carboxyterminalen Teil des Proteins ist jedoch gering. Innerhalb der FABP-Gruppe findet man eine Übereinstimmung von 20–97%. Dabei besteht eine hohe Sequenzidentität (>80%) beim Vergleich der gleichen gewebsspezifischen Form, wie Herz-, Myelin- oder Leber-FABP, in unterschiedlichen Gastorganismen. Dagegen ist die Sequenzidentität beim Vergleich verschiedener gewebsspezifischer Formen innerhalb des gleichen Gastorganismus vergleichsweise niedrig. Leber- und Darm-FABP sind nur zu 20–35% sequenzidentisch. Herz-, Adipozyten- und Myelin-FABP haben bereits 60–80% identische Aminosäuren. Ähnlichkeiten (22–47%) findet man auch zwischen den Sequenzen der zellulären Retinol- und Retinoesäurebindungsproteine und den Sequenzen der Fettsäurebindungsproteine [20].

1.2 Struktur des FABP

Um den Mechanismus der Ligandenbindung besser zu verstehen, wurden Strukturuntersuchungen durchgeführt. Neben verschiedenen Fluoreszenzstudien [26], chemischen Modifizierungsexperimenten [27] und NMR-spektroskopischen Untersuchungen [22, 28] führte vor allem die Kristallstrukturanalyse von einigen Vertretern der Klasse cytoplasmischer Bindungsproteine zu einer Aufklärung der jeweiligen Tertiärstruktur [29, 30, 31, 32, 33]. Es konnte gezeigt werden, daß die Konformation der erhaltenen Kristallstrukturen alle das gleiche, in Abbildung 1 und 2 — am Beispiel der Röntgenstruktur des H-FABP_c aus Rinderherz — schematisch dargestellte [30] Sekundär- und Tertiärstrukturmuster aufweisen.

Diese Proteinmoleküle weisen als gemeinsames Strukturmerkmal eine „ β -Faß“-Struktur auf. Dieses „ β -Faß“ besteht aus zehn antiparallelen β -Faltblattsträngen (A bis J), die aus je fünf Strängen zwei nahezu orthogonale β -Faltblätter bilden. Die zwei Faltblätter sind einseitig durch zwei kurze parallele α -Helices (α I und α II) und eine kurze Schleife miteinander verbunden. Zwischen den β -Faltblattsträngen D und E wurde eine Lücke im β -Faltblattemuster beobachtet, da der Abstand der beiden Stränge das für ein antiparalleles β -Faltblatt übliche Wasserstoffbrückennetzwerk nicht zuläßt.

Dieses, in cytoplasmischen Bindungsproteinen weitverbreitete Tertiärstrukturelement deutet an, daß das Gesamtstrukturmotiv eng mit der Eigenschaft der Ligandenbindung verknüpft ist. Tatsächlich ergab die Kristallstrukturanalyse der *holo*-Form des intestinalen I-FABP_c, daß die Fettsäure leicht gekrümmt im Inneren der „ β -Faß“-Struktur des I-FABP_c eingelagert wird. Dabei werden auf Grund der räumlichen Anordnung Wechselwirkungen der Fettsäurecarboxylgruppe mit der Guanidiniumgruppe einer Argininseiten-

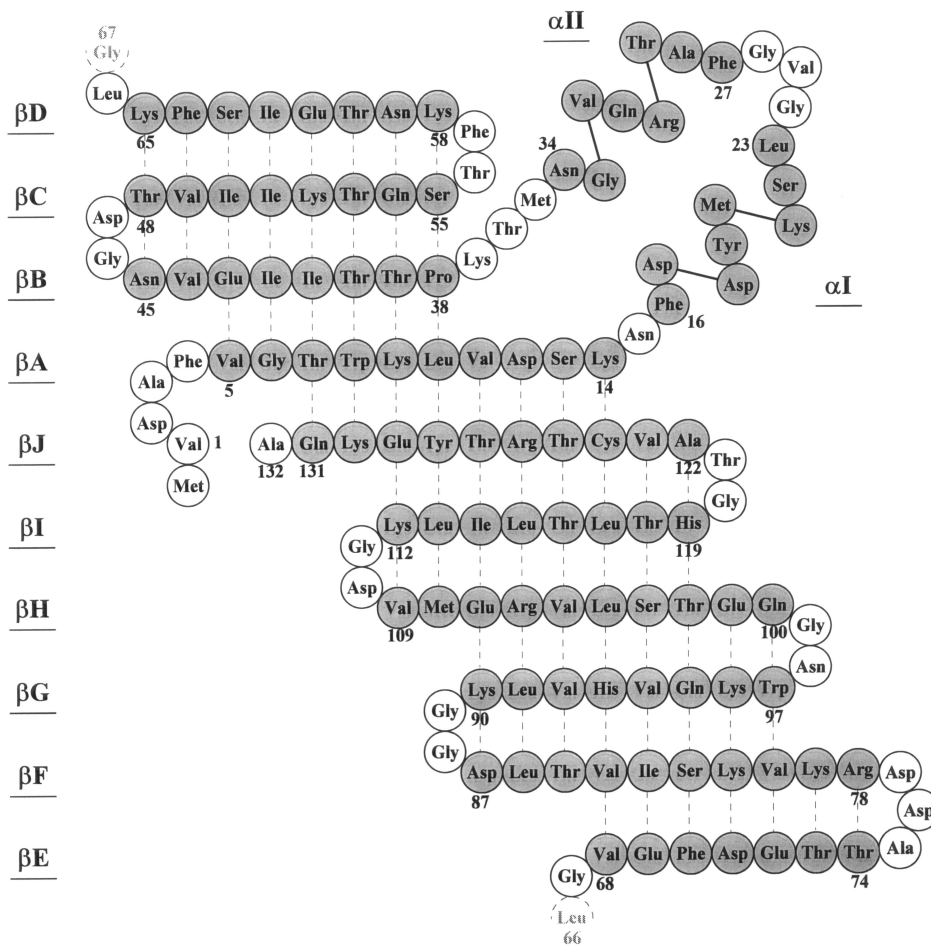


Abbildung 1: Sekundärstruktur aus der Röntgenkristallstruktur der pl=5.1 Isoform des FABP aus Rinderherz.

kette über Wasserstoffbrückenbindungen beschrieben [35].

Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen [36] sind nahezu alle Protonen- und Rückgratkohlenstoffresonanzen bestimmt worden. Mit Hilfe von NOE-Experimenten und Distanzgeometrierechnungen wurde die Tertiärstruktur



Abbildung 2: Tertiärstruktur der $pI=5.1$ Isoform des FABP aus Rinderherz [34].

tur ermittelt. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigten Signaltheterogenitäten. Dies deutet darauf hin, daß die Konformation des FABPs — wie bei den meisten Proteinen — nicht starr, sondern dynamisch ist. In der Röntgenstrukturanalyse wird in der Regel ein charakteristisches mittleres Kristallstrukturmodell erhalten. In manchen Fällen liegt in Lösung sogar eine andere Struktur als im Kristall vor. Außerdem kann unter Umständen die Aktivität eines Proteins erst durch die in Lösung mögliche Dynamik zustandekommen. So stehen beim FABP in Lösung mehrere Konformationen im Gleichgewicht zueinander [37, 38]. Diese Dynamik ist wahrscheinlich für die Ligandenbindung wichtig, da sie das Eindringen des Gastmoleküls zur Bindungsstelle innerhalb des „ β -Fasses“ vermutlich erst ermöglicht [33].

Die Untersuchung der Dynamik eines Proteinmodells gelingt mit *Molekulardynamiksimulationen*. Dabei werden mit Hilfe von komplexen Kraftfeldern die klassischen Bewegungsgleichungen für die Atome angenähert. Es ergibt sich aus der Simulation ein Ensemble von Strukturen. Die über alle Substrukturen gemittelte Struktur sollte in ihren Eigenschaften wie 3J -Kopplungskonstante, Diederwinkel usw. möglichst gut mit den Meßwerten übereinstimmen. Je geringer die Abweichung des berechneten Mittelwertes von den experimentellen Daten ist, um so signifikanter ist die Simulation. Der Vergleich der einzelnen Substrukturen untereinander zeigt durch die Größe der Abweichungen dynamische Bereiche innerhalb der gemittelten Struktur. In der vorliegenden Arbeit sollen $^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten an einer rekombinanten ^{15}N -markierten H-FABP_c-Probe in Lösung gemessen werden. Heteronukleare 2-dimensionale NMR-Experimente sowie eine quantitative Datenanalyse sollen zu hochgenauen $^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten führen, die verwendet werden, um das Strukturmodell zu verfeinern.

2 Methoden

2.1 3J -Kopplungen als Strukturparameter

Eine der derzeit genauesten Methoden, $^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten zu bestimmen, besteht darin, eine Folge von J -modulierten COSY-Experimenten durchzuführen, deren Wartezeit T sich mit jedem Experiment verlängert. Damit erhält man eine Abhängigkeit der Signalintensität von der Kopplungskonstanten. Die skalare Spin-Spin-Kopplung J zwischen dem Kern A und dem Kern X wird durch die Bindungselektronen vermittelt und bewirkt eine Aufspaltung des Signals von A, die aus der unterschiedlichen Orientierung des Kernspins des Kopplungspartners X im Magnetfeld resultieren. Spin- $\frac{1}{2}$ -Kerne sind bezüglich des äußeren B_0 -Feldes in zwei Zustände, α und β , polarisiert, das heißt bei 50% der in der Probe vorhandenen Moleküle liegt der X-Kern im $|\alpha\rangle$ -Kernspinzustand vor, bei den anderen 50% im $|\beta\rangle$ -Spinzustand.

Sie führen zu unterschiedlichen lokalen Magnetfeldern am Ort von Kern A und daher zu zwei Linien im Spektrum, die um den Wert der Kopplungskonstanten $J_{A,X}$ separiert sind. Dadurch liefert sie mit der Konnektivität der Kerne wichtige Informationen über die Konstitution der Moleküle. Die Größe einer Kopplungskonstante ist aber auch von der räumlichen Anordnung der Kerne abhängig [39, 40].

3J -Kopplungskonstanten Können mit den Diederwinkeln über die Karplusbeziehung

$$J(\theta) = A \cdot \cos^2(\theta) + B \cdot \cos(\theta) + C \quad (1)$$

korreliert werden. So korreliert die $^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplung in Aminosäuren mit dem Rückgrattorsionswinkel ϕ und wurde schon frühzeitig als Konforma-

tionsparameter eingesetzt [41]. In Abbildung 3 sind beispielhaft einige Karpluskurven für die Parametrisierungen von ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{H}^{\alpha}}$ ($A=9.4$; $B=-1.1$; $C=0.4$), ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{C}'_i}$ ($A=5.7$; $B=-2.7$; $C=0.1$), ${}^3J_{\text{C}'_{i-1},\text{H}^{\alpha}}$ ($A=9.0$; $B=-4.4$; $C=-0.8$) und ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{C}^{\beta}}$ ($A=4.7$; $B=-1.5$; $C=-0.2$) dargestellt.

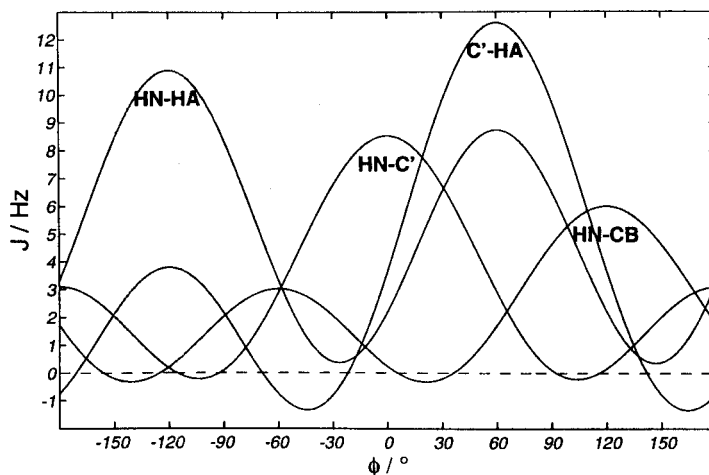


Abbildung 3: Karpluskurven für verschiedene Parametrisierungen der Diederwinkelabhängigkeiten der 3J -Kopplungskonstanten ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{H}^{\alpha}}$ ($A=9.4$; $B=-1.1$; $C=0.4$), ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{C}'_i}$ ($A=5.7$; $B=-2.7$; $C=0.1$), ${}^3J_{\text{C}'_{i-1},\text{H}^{\alpha}}$ ($A=9.0$; $B=-4.4$; $C=-0.8$) und ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}},\text{C}^{\beta}}$ ($A=4.7$; $B=-1.5$; $C=-0.2$)

In jüngster Zeit tragen gentechnologische Verfahren zur Isotopenanreicherung dazu bei, die früher nicht zugänglichen heteronuklearen Kopplungskonstanten auch bei großen Molekülen zu messen [42, 43, 44]. Darüber hinaus wurden die gemessenen 3J -Kopplungskonstanten in Strukturberechnungen eingesetzt [45, 46, 47, 48]. Die bisherigen Datensätze, die nur aus NOE-Parametern bestanden, können somit durch 3J -Kopplungskonstanten erweitert werden, so daß man nicht nur die Zuverlässigkeit der NMR-spektroskopisch ermittelten Strukturen erhöhen kann, sondern auch Informationen über Teilflexibilität und interne Moleküldynamik erhält [49, 50].

2.2 Bestimmung von 3J -Kopplungskonstanten

In einem schwach gekoppelten Spinsystem, das heißt, daß die Kopplungskonstante J klein im Vergleich zur Differenz der chemischen Verschiebung $\Delta\nu$ ist, kann man im einfachsten Fall aus den eindimensionalen Spektren die Kopplung direkt ablesen, sofern die Multiplettlinien gut separiert sind. Sind in einem eindimensionalen Spektrum die Signale überlagert, so kann eine Trennung oft durch Aufnahme eines zweidimensionalen Spektrums erfolgen. Dabei besitzen die Kreuzsignale in ihrer Feinstruktur die gleiche Multiplizität wie die entsprechenden eindimensionalen Signale.

Oft sind Kopplungskonstanten in der gleichen Größenordnung wie die natürlichen Signalbreiten. Dies hängt vor allem vom Molekulargewicht der Substanz ab. Kleine Moleküle, die sich in Lösung schnell umorientieren, liefern relativ schmale Signale (1 Hz oder weniger), große Moleküle weisen in der Regel breitere Signale auf. Bei mittelgroßen Proteinen sind dies zum Beispiel 20–30 Hz. Wenn nun die Signalbreiten nicht mehr vernachlässigbar klein gegenüber den Kopplungskonstanten sind, dann sind die einzelnen Multiplettlinien nicht mehr aufgelöst und der Signalabstand (der Abstand der Signalmaxima) entspricht nicht mehr der Kopplungskonstanten.

Die zur Bestimmung von 3J -Kopplungskonstanten weitverbreitete *E.COSY*-Methode [51, 52, 53] bietet den Vorteil, unabhängig von der Größe der Kopplungskonstante stets mit gleichbleibender Genauigkeit zu arbeiten, erfordert aber zwingend ein 3-Spinsystem. Die 3J -Kopplungskonstanten lassen sich allerdings auch aus den Signalintensitäten über die Quantifizierung des Magnetisierungstransfers ableiten [54]. Damit diese Quantifizierung überhaupt durchführbar ist, muß eine Pulssequenz gewählt werden, bei der die Signalintensität eine möglichst starke Abhängigkeit von der Kopplungskonstante

aufweist. Der Vorteil dieser Methode ist, daß eine große Kopplungskonstante sehr exakt aus der leicht bestimmbaren Signalintensität ermittelt werden kann. Kleine Kopplungskonstanten unter 2 Hz sind mit dieser Methode nur sehr ungenau bestimmbar.

2.3 Pulssequenz und Spektren

In dem hier verwendeten J -modulierten [^{15}N , ^1H]-COSY Experiment mit der in Abbildung 4 gezeigten Pulssequenz [56] wird die Kopplungskonstante aus der zeitlichen Evolution der Protonen-Kohärenz erhalten. Dabei wird die Kopplungskonstante aus den N- H^α -Kreuzsignalintensitäten mit Hilfe einer nichtlinearen Anpassung an die Transferfunktion berechnet.

In diesem J -modulierten [^{15}N , ^1H]-COSY-Experiment entwickelt sich eine Modulation auf Grund der $J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^\alpha)$ -Kopplungskonstanten in der Zeit ($4\text{T}+2\Delta$). Heteronukleare Zweispinkohärenz ($^1\text{H}-^{15}\text{N}$) existiert zwischen den Zeitpunkten a und b der Pulssequenz, die das 4T -Intervall eingrenzen. Am Punkt c wird die in-phase H^{N} -Magnetisierung entlang der z-Achse durch einen 90_{x}° -Protonenpuls gespeichert. Nach dem Gradientenpuls G wird die in-phase H^{N} -Magnetisierung durch ein Standardmodul, ein „jump-and-return“ $90_{\phi_2} - \tau - 90_{-\phi_2}$ Pulspaar, detektiert.

Es ergibt sich für die Transferfunktion [56]:

$$I_y(t) = I_y(0) \exp\left(\frac{t}{T_{2,MQ}} - \frac{t}{2T_{1,\alpha}}\right) \left(\cos(\pi J^r t) + \frac{\sin(\pi J^r t)}{2\pi J^r T_{1,\alpha}}\right) \quad (2)$$

mit

$$J^r = \sqrt{J_{HH}^2 - \left(\frac{1}{2\pi T_{1,\alpha}}\right)^2},$$

wobei $T_{2,MQ}$ die apparente transversale Relaxationsrate der ($^1\text{H}-^{15}\text{N}$)-Zweispin Kohärenz ist, und $T_{1,\alpha}$ die longitudinale Relaxationsrate des H^α -Protons.

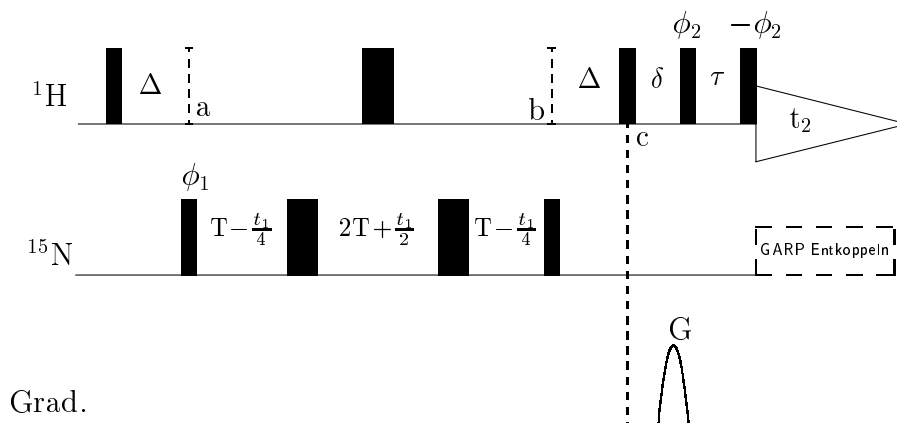


Abbildung 4: Pulssequenz des J -modulierten- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -COSY. Die schmalen Pulse haben Flipwinkel von 90° , die breiten 180° , und wenn nicht anders angegeben, ist die Phase x . Der Phasenzklus ist: $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 2x, 2y, 2(-x), 2(-y)$, $\phi_{\text{ref}} = x, -x, y, -y, -x, x, -y, y$. Quadraturdetektion nach TPPI wurde auf die ϕ_1 -Phase im Programm angewendet [57]. Die Zeitdauern waren $\Delta = 5\text{ms}$, $\delta = 2,503\text{ms}$, $\tau = 12\mu\text{s}$. Die Länge des Gradientenpulses war $G = 2\text{ms}$. Die Entkopplung erfolgte mit der GARP-Sequenz [58].

2.4 3J -Kopplungskonstanten in MD-Simulationen

Um Aussagen über die Dynamik eines Moleküls zu erhalten, werden *Molekulardynamiksimulationen* durchgeführt. Da die Dynamik der kovalenten Bindungsstruktur von Proteinen ohne quantenmechanische Effekte hinreichend beschrieben werden kann, genügt eine rein klassische Beschreibung mittels der Newton'schen [59] oder der Langevin'schen Mechanik [60]. Dabei werden die Atome auf ihre Massenschwerpunkte reduziert und bekommen entsprechend der Simulationstemperatur eine Maxwell-Boltzmann-Geschwindigkeitsverteilung zugewiesen. Durch iteratives Lösen der Newton'schen Bewegungsgleichung für N Atome der Masse m

$$m_i \frac{d^2}{dt^2} \vec{x}_i(t) = \frac{\partial}{\partial x_i} V(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N) \quad (3)$$

erhält man eine zeitliche Abfolge von Koordinatensätzen (*Trajektorie*), die die Dynamik des Systems beschreibt.

In dem hier verwendeten Programmpaket GROMOS ist ein Algorithmus nach dem „leap-frog“-Schema [61] implementiert. Dieser wurde vom *Taylor-Predictor*-Algorithmus nach Verlet [62] abgeleitet. Die Geschwindigkeit jedes einzelnen Atoms des neuen Koordinatensatzes X kann so in jedem Zeitschritt Δt durch die über das Kraftfeld auf jedes Atom wirkende Kraft ermittelt werden.

Mit sogenannten „Stochastischen Dynamik-Simulationen“ [63, 64] können Lösungsmittelleffekte explizit in die Betrachtung einbezogen werden. Dabei gilt anstelle der Newton’schen Bewegungsgleichung die Langevin’sche Bewegungsgleichung:

$$\frac{d}{dt}v_i(t) = \frac{1}{m_i} \cdot \frac{\partial}{\partial x_i}V(x_i) + \frac{1}{m_i} \cdot R_i(t) - \gamma_i \cdot v_i(t) \quad (4)$$

Diese erweitert die Newton’sche Bewegungsgleichung um eine stochastisch wirkende Kraft im zweiten Term und eine Reibungskraft mit dem Reibungskoeffizienten γ_i . Der stochastische Term simuliert die Stöße zwischen dem Protein und der Lösungsumgebung und der Reibungsterm den Energieverlust durch die Solvensmoleküle. Da die Reibungsenergie von der Lösungsmittelzugänglichkeit jedes einzelnen Atoms abhängt, gilt der Zusammenhang:

$$\gamma_i = \omega_i \cdot \gamma \quad (5)$$

ω_i ist die lösungsmittelzugängliche Fläche eines jeden Atoms und γ der Reibungskoeffizient, der sich über das Stoke’sche Reibungsgesetz

$$\gamma = \frac{6 \cdot \pi \cdot \eta_s \cdot r_s}{m_s} \quad (6)$$

bestimmen läßt. Dabei ist m_s die Masse, r_s der Stoke'sche Radius und η_s die dynamische Viskosität des Lösungsmittels. Die Fläche ω_i wird dabei durch eine Wichtungsfunktion bestimmt, die den Wert 1 annimmt, wenn sich kein anderes Proteinatom innerhalb des Stoke'schen Radius befindet und gegen Null konvergiert, wenn die Zahl der Nachbaratome sechs erreicht.

Führt man nun Randbedingungen (*Restraints*), das sind zusätzliche Potentialterme auf Basis experimenteller Daten, in das Kraftfeld ein, so kann man damit den Konformationsraum einschränken und somit das Auffinden einer wahrscheinlichen Molekülstruktur erheblich beschleunigen oder sogar erst ermöglichen. Seit längerem werden dazu NMR-Parameter, wie NOE-Abstände oder 3J -Kopplungskonstanten, verwendet.

Mit den NOE-Werten werden üblicherweise Startstrukturen modelliert. Diese werden dann einer Energieminimierungsrechnung unterworfen. Die energieminierte Struktur wird dann als Startstruktur in einer Molekulardynamiksimulation verwendet. Die gemessenen 3J -Kopplungskonstanten werden als Randbedingungen in die Rechnung eingebunden, indem ein Strafterm (*Penaltyfunction*)

$$V_j = \frac{k_j}{2} (J_{j,calc} - J_{j,exp})^2 \quad (7)$$

formuliert wird, der die Verletzung jeder einzelnen berechneten 3J -Kopplungskonstanten $J_{j,calc}$ von der zugehörigen experimentell erhaltenen $J_{j,exp}$ angibt. k_j ist die Kraftkonstante, die aus der betreffenden Konformation mittels Karplusbeziehung (siehe Gleichung (1)) berechnet wurde. Wenn die Bedingungen an den Strafterm (7) zu streng festgelegt werden, so führt dies in der Regel zu gespannten (physikalisch sinnlosen) Molekülstrukturen.

Da in NMR-Experimente immer zeitlich gemittelte J -Kopplungskonstanten bestimmt werden, verwendet man in der Simulation besser zeitabhängige,

statt der statischen Randbedingungen. Diese zwingen das Molekül nicht zu jeder Zeit, sondern nur im zeitlichen Mittel, die experimentellen NMR-Parameter einzuhalten [65, 66, 67, 68].

Das zeitabhängige Strafpotential folgt aus Gleichung (7):

$$V_j = \frac{k_j}{2} (\overline{J_{j,calc}} - J_{j,exp}) \quad (8)$$

Jetzt ist die aus einer einzelnen Konformation berechnete Kopplungskonstante $J_{j,calc}$ durch den zeitlichen Mittelwert \overline{J} ersetzt:

$$\overline{J(\theta(t))} = \frac{1}{t} \int_0^t J(\theta(t')) dt' \quad (9)$$

Damit der Einfluß einer unmittelbar auftretenden Konformationsänderung auf den Mittelwert bei steigender Simulationszeit nicht überbewertet wird, wird die zeitabhängige Randbedingung mit einer exponentiell abfallende Erinnerungsfunktion mit charakteristischer Erinnerungszeit τ berücksichtigt:

$$\overline{J(\theta(t))} = \frac{1}{\tau(1 - e^{-\frac{t}{\tau}})} \int_0^t e^{-\frac{t-t'}{\tau}} J(\theta(t-t')) dt' \quad (10)$$

Aus praktischen Gründen wird \overline{J} als Karplusbeziehung ausgedrückt:

$$\overline{J(\theta(t))} = A \cdot \overline{\cos^2(\theta(t))} + B \cdot \overline{\cos(\theta(t))} + C \quad (11)$$

Ein solches Verfahren konnte für die Distanzbeschränkungen, die sich aus der Messung von NOE-Kreuzrelaxationsraten ergeben, bereits erfolgreich durchgeführt werden [65, 66, 67]. Ein erster Versuch mit homonuklearen 3J -Kopplungskonstanten zeigte die Nützlichkeit dieser Technik für die Diederwinkelanalyse [68].

3 Experimenteller Teil

3.1 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen wurden an einem BRUKER DMX600 Spektrometer, ausgerüstet mit einer Aspect Auswertestation durchgeführt. Die Prozessierung erfolgte auf einer Silicon Graphics Indy Workstation mit Hilfe des Programmes XWinNMR 1.0. Das verwendete Pulssequenzmikroprogramm ist zusammen mit den Aquisitionsparametern im Anhang beschrieben. Die Messungen wurden mit einem Tripelresonanzprobenkopf mit z-Gradientensystem durchgeführt. Als Probe wurde eine rekombinante ^{15}N -markierte Rinderherz-FABP-Probe verwendet.

Die Spektren wurden phasensensitiv nach dem TPPI-Verfahren aufgenommen [57]. Bereits während der Aufnahme der Experimente wurde eine Phasen- und Basislinienkorrektur [69] berücksichtigt, indem jeweils in einem 1D-Spektrum (1. t_1 -Inkrement) die Phase nullter Ordnung korrigiert und dieser Korrekturwert von dem Wert der Empfängerphase im Mikroprogramm substrahiert wurde. Die spektrale Weite betrug für die F_2 -Dimension (^1H) 8333,33 Hz und für die F_1 -Dimension (^{15}N) 2500 Hz. Es wurden 192 Durchgänge mit jeweils 2048 Inkrementen für die F_2 -Dimension mit jeweils 160 Inkrementen für die F_1 -Dimension aufgenommen. In verschiedenen Experimenten wurde $2T+2\Delta$ von 43,3 ms bis 183,3 ms in 10 ms-Schritten variiert. In der F_1 -Dimension wurde der Datensatz mit Nullen auf 512 Datenpunkte aufgefüllt. Die Prozessierung erfolgte mit einer Phasenkorrektur ($49,7^\circ/-89,4^\circ$) und mit einer verschobenen Sinusfilterfunktion (um $\frac{2\pi}{5}$) in der F_1 -Dimension, beziehungsweise mit einer verschobenen Sinusquadratfilterfunktion ($\frac{\pi}{4}$) in der F_2 -Dimension.

3.2 Auswertung der Spektren

Zur Bestimmung der Signalpositionen wurden die chemischen Verschiebungen aus [38] verwendet. Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 6 (Anhang) dargestellt. Die Berechnung der Signalintensität erfolgte mit Hilfe der in Matlab programmierten Prozedur „`volumes.m`“ (siehe Anhang).

Die Peaks wurden in ein Rechteck eingeschlossen und darin wurde eine Ellipse eingepaßt, um der Signalform gerecht zu werden. Die resultierende Schablone wurde auf alle Spektren angewandt, um die einzelnen Intensitäten zu bestimmen. Die gemittelte Basislinienintensität in der Umgebung jedes einzelnen Signals wurde von der berechneten Intensität zur Intensitätskorrektur abgezogen. In den Abbildungen 5 und 6 sind die zeitabhängigen Signale für Asn^{59} beziehungsweise Ala^3 dargestellt.

Die Signalintensitäten der $^{15}\text{N}, ^1\text{H}^{\text{N}}$ -Korrelationssignale dienten als Stützpunkte zur Parameteranpassung an die Gleichung (2). Eine Korrektur mit der Spin-Gitter-Relaxationskonstanten, wie sie in Gleichung (2) vorgesehen ist, wurde für zwei charakteristische Grenzwerte, 100 ms und ∞ durchgeführt.

Die 3J -Kopplungskonstanten wurden durch nichtlineares Anpassen an die Gleichung (2) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt. In Abbildung 7 und 8 sind die Anpassungskurven für Asn^{59} beziehungsweise Ala^3 dargestellt.

Im Programm „`table.m`“ (Anhang) wurden für alle Intensitäten die Kurvenverläufe angepaßt. Die Fehlerberechnung wurde nur für $T_1 = 100$ ms durchgeführt. Die Standardabweichung wurde als statistischer Parameter in Tabelle 3 aufgenommen. Für jeden Datenpunkt wurde einheitlich ein mittlerer Rauschwert von 0,0424 angenommen, wie er vorher aus dem Rauschen eines

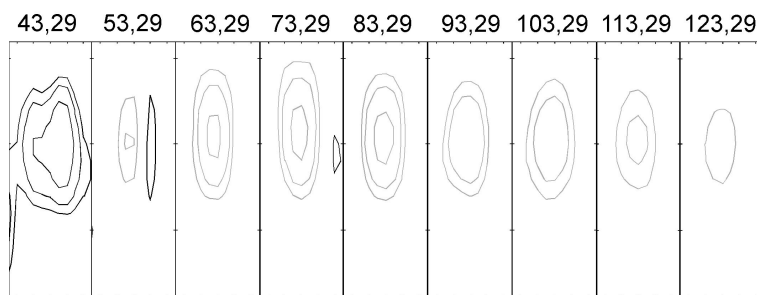


Abbildung 5: Verlauf der Intensität des $^{15}\text{N}'$, $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Korrelationssignals von Asn^{59} in Abhängigkeit von der Wartezeit. Die Zahlenwerte sind die Wartezeiten in ms. Schwarze Linien sind positive, graue negative Signalintensitäten.

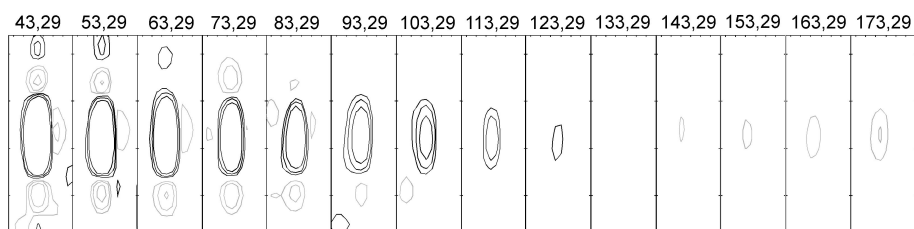


Abbildung 6: Verlauf der Intensität des $^{15}\text{N}'$, $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Korrelationssignals von Ala^3 in Abhängigkeit von der Wartezeit. Die Zahlenwerte sind die Wartezeiten in ms. Schwarze Linien sind positive, graue negative Signalintensitäten.

signalfreien Bereiches (Spalten 1-200) im Summenspektrum der 14 einzelnen Spektren bestimmt wurde.

3.3 Molekulardynamiksimulation

Die ermittelten J -Kopplungskonstanten wurden in eine *Stochastische Dynamiksimulation* eingebracht. Es wurden zwei Simulationen — einmal mit 97 (Lauf I) und einmal mit 67 (Lauf II) gemessenen J -Kopplungskonstanten mit einem zusätzlichen $^3J(\text{N}, \text{H}^\beta)$ -Datensatz [70] — durchgeführt.

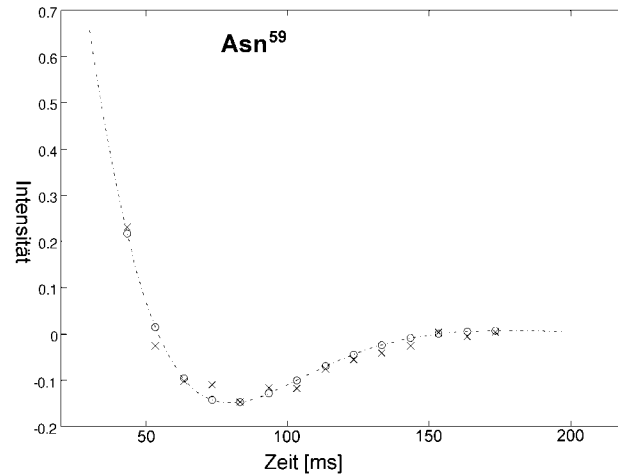


Abbildung 7: Anpassung der experimentellen Signalvolumina an Gleichung (2) für den Verlauf der Signalintensitäten aus Abbildung 5. \circ entspricht den berechneten und \times den gemessenen Intensitäten. Die 3J -Kopplungskonstante für die abgebildete Aminosäure ergibt sich für $T_{1,\alpha}=100$ ms zu 10,1 Hz.

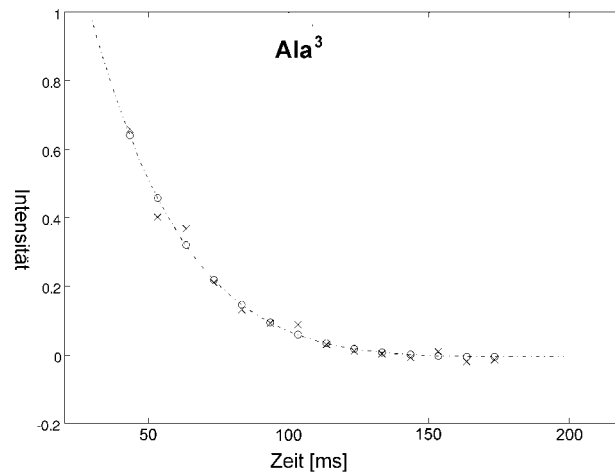


Abbildung 8: Anpassung der experimentellen Signalvolumina an Gleichung (2) für den Verlauf der Signalintensitäten aus Abbildung 6. \circ entspricht den berechneten und \times den gemessenen Intensitäten. Die 3J -Kopplungskonstante für die abgebildete Aminosäure ergibt sich für $T_{1,\alpha}=100$ ms zu 4,22 Hz.

Die Simulationen wurden als zeitgemittelte Simulationen angesetzt. Dazu wurde das Programmpaket GROMOS eingesetzt. Für die Berechnung von zeitlich gemittelten skalaren Kopplungen wurden zeitabhängige Restraints mit einer Erinnerungszeit von $\tau = 15$ ps verwendet. Die Kraftkonstante wurde mit dem Wert $3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ s}^{-2}$ angenommen. Die Integrationsschrittweite Δt betrug 2 fs unter Verwendung des SHAKE-Algorithmus. Die Neuberechnung aller nichtbindenden Wechselwirkungen erfolgte alle 10 Schritte mit einem „cut-off“ Radius von 0,9 nm. Das relative Gewicht der solvenszugänglichen Fläche ω_i wurde alle 500 Integrationsschritte neu berechnet. Die in der Simulation verwendeten Parameter für γ beziehen sich auf H_2O . Es ergibt sich ein Solvens-Reibungskoeffizient von $\gamma = 91 \text{ ps}^{-1}$.

Als Karplusparameter für die Umrechnung der berechneten Kopplungen in die Diederwinkel wurden $A = 9.4$, $B = -1.1$ und $C = 0.4$ verwendet [41].

Für ein mittelgroßes Protein wie FABP benötigt eine 200 ps lange Molekulardynamiksimulation unter Lösungsmittelausschluß etwa 5 Tage Rechenzeit mit einer Silicon Graphics Indy Workstation.

4 Ergebnisse

4.1 *J*-modulierte [^{15}N , ^1H]-COSY-Spektren

In Abbildung 9 ist das *J*-modulierte [^{15}N , ^1H]-COSY-Spektrum mit der kürzesten Wartezeit (43,25 ms) abgebildet. An Hand dieses Spektrums wurden die einzelnen Peaks bestimmt. Die selektierten Bereiche wurden als Maske in allen gemessenen Spektren verwendet.

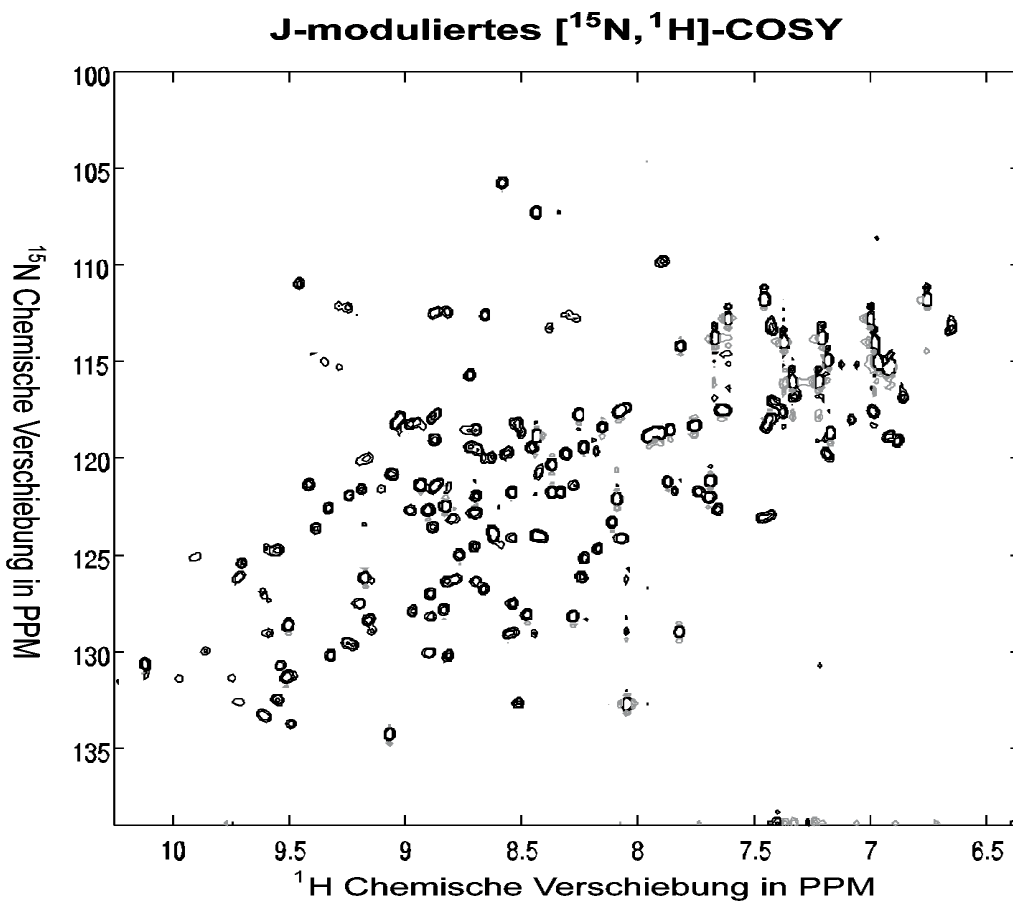


Abbildung 9: *J*-moduliertes [^{15}N , ^1H]-COSY-Spektrum, Wartezeit 43,25 ms. Schwarze Linien bedeuten positive Intensität, graue negative.

4.2 ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten

In Tabelle 3 sind für die zwei angenommenen longitudinalen Relaxationszeiten von $T_{1,\alpha}=100$ ms und ∞ jeweils die ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten, die apparente transversale Relaxationszeit $T_{2,\text{MQ}}^*$ und die Standardabweichung für die Kopplungskonstante bei $T_{1,\alpha}=100$ ms aufgeführt.

Für 120 von 133 Aminosäuren (Met⁰-Ala¹³²) könnten die 3J -Kopplungskonstanten bestimmt werden. Pro³⁸ enthält kein α -Proton und für Glycinreste konnte keine Winkelaussage getroffen werden. 97 3J -Kopplungskonstanten wurden ermittelt. Die restlichen Signale waren auf Grund starker Überlagerungen nicht eindeutig auszuwerten.

Im Anhang sind in Tabelle 6 die Werte der chemischen Verschiebung aus [38] aufgeführt.

Tabelle 3: Berechnete ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten für $T_{1,\alpha}=100$ ms und ∞ , berechnete $T_{2,\text{MQ}}^*$ und Standardabweichung bei $T_{1,\alpha}=100$ ms

$T_{1,\alpha} =$	$T_{2,\text{MQ}}^*$	${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$	${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$	$T_{1,\alpha} =$	$T_{2,\text{MQ}}^*$	${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$	${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$
	100 ms	100 ms	∞		100 ms	100 ms	∞
	[ms]	[Hz]	[Hz]		[ms]	[Hz]	[Hz]
Val ¹	33.5	7.82±0.19	6.93	Lys ⁶⁵	55.9	10.30±0.08	9.48
Asp ²	77.3	4.69±0.51	3.83	Leu ⁶⁶	346.0	4.26±0.35	0.00
Ala ³	50.1	4.22±0.39	3.46	Val ⁶⁸	104.5	11.10±0.39	10.40
Phe ⁴	92.1	8.18±0.18	7.33	Glu ⁶⁹	60.2	3.77±0.19	3.05
Val ⁵	76.8	4.18±0.27	3.39	Phe ⁷⁰	58.2	9.33±0.23	8.48
Thr ⁷	74.2	9.42±0.11	8.58	Asp ⁷¹	68.6	8.20±0.13	7.35
Trp ⁸	44.1	9.33±0.31	8.46	Glu ⁷²	53.1	9.06±0.15	8.20
Lys ⁹	55.5	9.25±0.08	8.40	Thr ⁷³	72.0	10.30±0.15	9.49
Leu ¹⁰	61.0	3.91±0.32	3.15	Thr ⁷⁴	73.9	6.70±0.25	5.81
Val ¹¹	42.3	10.80±0.15	9.93	Ala ⁷⁵	46.7	2.53±0.62	0.05
Asp ¹²	63.6	7.31±0.09	6.43	Asp ⁷⁶	52.4	9.24±0.18	8.38
Ser ¹³	64.9	7.89±0.10	7.02	Lys ⁷⁹	73.8	9.75±0.12	8.91
Lys ¹⁴	52.9	9.89±0.13	9.04	Val ⁸⁰	28.9	9.03±0.22	8.13
Asn ¹⁵	52.6	7.56±0.24	6.68	Lys ⁸¹	30.1	14.10±0.97	13.30
Phe ¹⁶	87.4	4.26±0.27	3.45	Ser ⁸²	35.8	6.84±0.19	5.94

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>							
$T_{1,\alpha} =$	$T_{2,MQ}^*$	${}^3J_{H^N H^\alpha}$	${}^3J_{H^N H^\alpha}$	$T_{1,\alpha} =$	$T_{2,MQ}^*$	${}^3J_{H^N H^\alpha}$	${}^3J_{H^N H^\alpha}$
	100 ms	100 ms	∞		100 ms	100 ms	∞
	[ms]	[Hz]	[Hz]		[ms]	[Hz]	[Hz]
Asp ¹⁷	53.7	3.87±0.33	3.16	Ile ⁸³	51.2	7.92±0.16	7.04
Asp ¹⁸	117.0	4.32±0.25	3.49	Thr ⁸⁵	50.8	9.23±0.06	8.36
Met ²⁰	93.9	5.56±0.16	4.68	Asp ⁸⁷	83.2	9.89±0.09	9.06
Lys ²¹	59.2	3.90±0.27	3.16	Lys ⁹⁰	69.3	9.25±0.10	8.41
Leu ²³	55.5	6.96±0.35	6.07	Leu ⁹¹	62.3	8.68±0.23	7.82
Val ²⁵	71.3	5.77±0.20	4.88	His ⁹³	39.4	8.82±0.23	7.94
Phe ²⁷	106.4	3.79±0.22	3.02	Gln ⁹⁵	36.2	10.00±0.20	9.15
Ala ²⁸	140.8	4.10±0.14	3.30	Lys ⁹⁶	44.7	9.95±0.12	9.08
Thr ²⁹	77.2	7.20±0.12	6.33	Trp ⁹⁷	64.8	6.45±0.18	5.56
Arg ³⁰	52.6	4.25±0.27	3.52	Asn ⁹⁸	70.6	6.19±0.39	5.30
Gln ³¹	65.5	3.39±0.36	2.76	Gln ¹⁰⁰	94.7	9.78±0.14	8.97
Val ³²	101.0	7.16±0.25	6.29	Glu ¹⁰¹	74.2	8.85±0.09	8.00
Asn ³⁴	73.8	5.69±0.15	4.81	Thr ¹⁰²	39.9	7.07±0.12	6.17
Thr ³⁶	73.8	6.82±0.53	5.94	Ser ¹⁰³	51.7	9.98±0.09	9.13
Thr ⁴⁰	54.2	9.47±0.33	8.62	Arg ¹⁰⁶	32.6	9.91±0.09	9.02
Ile ⁴¹	37.6	10.00±0.30	9.15	Glu ¹⁰⁷	50.4	8.93±0.14	8.06
Ile ⁴²	8.25	11.80±0.42	10.90	Met ¹⁰⁸	69.0	8.87±0.13	8.02
Val ⁴⁴	79.0	9.18±0.14	8.34	Val ¹⁰⁹	64.2	9.85±0.09	9.01
Asn ⁴⁵	89.8	9.75±0.10	8.93	Asp ¹¹⁰	88.1	6.78±0.19	5.90
Asp ⁴⁷	85.0	9.64±0.14	8.82	Lys ¹¹²	80.0	9.53±0.16	8.70
Thr ⁴⁸	115.0	10.10±0.17	9.34	Leu ¹¹³	56.0	9.00±0.14	8.14
Val ⁴⁹	46.0	9.60±0.11	8.73	Leu ¹¹⁵	42.3	9.25±0.10	8.37
Ile ⁵⁰	53.5	8.93±0.27	8.06	Thr ¹¹⁸	52.4	10.20±0.06	9.34
Ile ⁵¹	49.3	9.65±0.12	8.79	His ¹¹⁹	54.5	7.33±0.16	6.44
Lys ⁵²	48.0	9.79±0.12	8.93	Thr ¹²¹	59.2	9.62±0.11	8.77
Thr ⁵³	52.2	9.73±0.21	8.87	Ala ¹²²	70.4	8.41±0.33	7.55
Gln ⁵⁴	49.8	9.87±0.26	9.00	Val ¹²³	67.2	10.10±0.07	9.25
Ser ⁵⁵	70.6	6.15±0.17	5.26	Cys ¹²⁴	45.9	10.10±0.10	9.21
Thr ⁵⁶	41.3	4.59±0.97	3.80	Thr ¹²⁵	60.1	9.64±0.19	8.80
Phe ⁵⁷	57.2	8.70±0.19	7.85	Arg ¹²⁶	34.5	9.34±0.30	8.45
Lys ⁵⁸	58.7	6.49±0.20	5.61	Thr ¹²⁷	52.4	10.00±0.18	9.15
Asn ⁵⁹	48.1	10.10±0.26	9.26	Tyr ¹²⁸	42.9	9.84±0.21	8.96
Thr ⁶⁰	56.3	9.60±0.28	8.74	Glu ¹²⁹	52.1	10.00±0.14	9.25
Ile ⁶²	54.4	9.68±0.19	8.82	Gln ¹³¹	75.7	8.63±0.16	7.78
Phe ⁶⁴	66.7	8.64±0.11	7.79				

4.3 Diederwinkelanalyse

Aus den Molekulardynamiksimulationen wurden die Trajektorien der Kopplungskonstanten und die Diederwinkel extrahiert. In Tabelle 4 (Lauf I mit 97 J -Kopplungskonstanten) und Tabelle 5 (Lauf II mit 67 J -Kopplungskonstanten und zusätzlichem $^{15}\text{N},\text{H}^\beta$ -Datensatz) sind die zeitlich gemittelten Rückgrattorsionswinkel und $^3J_{\text{H}^\text{N},\text{H}^\alpha}$ -Kopplungskonstanten sowie die jeweilige Standardabweichung für die zwei Molekulardynamiksimulationen dargestellt. In den Abbildungen 10 und 11 sind die Trajektorien für Arg¹⁰⁶ und Arg³⁰ dargestellt.

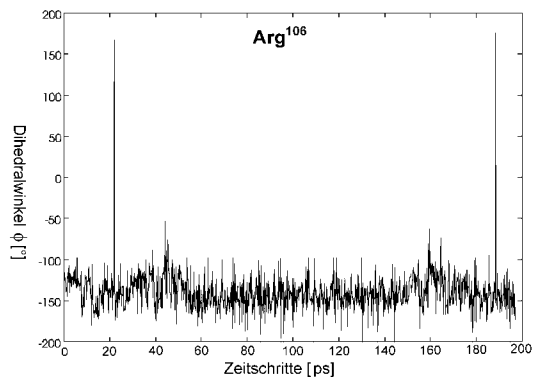


Abbildung 10: Trajektorie für Arg¹⁰⁶ aus dem β H-Strukturelement. Die Konformationswinkel ϕ und ψ liegen mit -98.7 und 103.6° im β -Faltblattbereich. Die Standardabweichung beträgt 10.8 (ϕ -Winkel) beziehungsweise 11.0° (ψ -Winkel) und deutet auf eine unflexible Region hin.

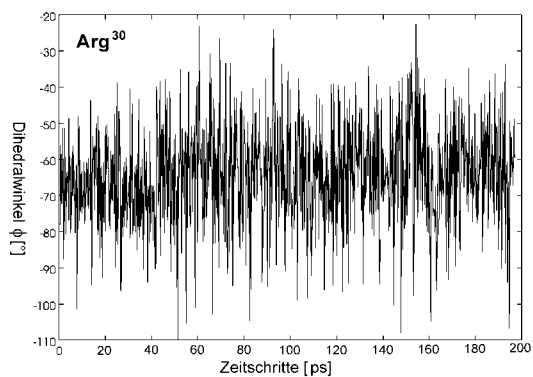


Abbildung 11: Trajektorie für Arg³⁰ aus der α II-Region nahe zum β A-Bereich. Die Konformationswinkel ϕ und ψ liegen mit -65.2 und -61.2° im α -Helixbereich. Die Standardabweichung beträgt 15.7 (ϕ -Winkel) beziehungsweise 27.7° (ψ -Winkel) und deutet auf eine flexible Region hin (siehe Text).

Tabelle 4: Gemittelte ϕ - und ψ -Winkel, Fehler der ψ -Winkel mit Standardabweichungen, gemittelte ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten und Fehler der gemittelten Kopplungskonstanten. Aminosäuren, bei denen die Abweichung der berechneten mittleren 3J -Kopplungskonstante von der experimentell bestimmten 1 Hz überschreitet, sind mit • und solche, bei denen sie 2 Hz überschreitet, mit •• gekennzeichnet.

	Lauf I		
	$\overline{\phi\text{-Winkel}}$ [°]	$\overline{\psi\text{-Winkel}}$ [°]	$\overline{{}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}}$ [Hz]
Asp ²	-79.0 ± 100.6	+26.0 ± 123.1	5.13 ± 2.30
Ala ³	-49.0 ± 56.5	+135.2 ± 62.8	4.49 ± 2.39
Phe ⁴	-139.6 ± 45.8	+89.9 ± 49.8	7.82 ± 2.04
Val ⁵	-70.0 ± 51.3	+141.2 ± 54.4	4.72 ± 2.12
Gly ⁶	+55.6 ± 79.5	-142.1 ± 98.2	
Thr ⁷	-96.6 ± 12.4	+37.6 ± 74.0	9.00 ± 1.41
Trp ⁸	-102.4 ± 15.9	+97.5 ± 16.1	9.41 ± 1.59
Lys ⁹	-99.7 ± 15.7	+116.7 ± 14.0	9.17 ± 1.72
Leu ¹⁰	-63.3 ± 11.4	+130.8 ± 9.7	3.97 ± 1.75
Val ¹¹	-108.6 ± 10.6	+129.5 ± 10.7	10.21 ± 0.86
Asp ¹²	-136.5 ± 61.7	-42.5 ± 23.7	7.68 ± 2.29
Ser ¹³	-106.7 ± 31.0	+125.5 ± 27.0	8.28 ± 2.25
Lys ¹⁴	-108.3 ± 20.1	+105.3 ± 25.9	9.50 ± 1.79
Asn ¹⁵	+62.7 ± 15.7	+133.4 ± 15.2	8.08 ± 0.84
Phe ¹⁶	-41.3 ± 37.4	+9.0 ± 35.1	3.91 ± 2.05
Asp ¹⁷	-60.0 ± 13.3	-60.8 ± 16.6	3.54 ± 1.85
Asp ¹⁸	-66.6 ± 43.1	-27.9 ± 27.5	4.44 ± 2.03
Tyr ¹⁹	-68.5 ± 15.3	-45.0 ± 12.7	
Met ²⁰	-70.0 ± 12.1	-43.3 ± 11.4	5.05 ± 1.95
Lys ²¹	-61.9 ± 12.4	-32.3 ± 17.8	3.77 ± 1.80
Ser ²²	-78.9 ± 17.6	-38.7 ± 15.5	
Leu ²³	-86.4 ± 22.4	-13.0 ± 27.1	7.02 ± 2.36
Gly ²⁴	+59.2 ± 45.2	+22.4 ± 45.6	
Val ²⁵	-77.3 ± 40.7	-77.6 ± 39.0	5.74 ± 2.88
Gly ²⁶	-62.3 ± 34.7	-18.7 ± 38.0	
Phe ²⁷	-52.9 ± 76.7	-14.8 ± 57.2	4.00 ± 2.43
Ala ²⁸	-31.5 ± 63.6	-33.9 ± 75.2	4.18 ± 2.65
Thr ²⁹	-86.2 ± 20.5	-53.1 ± 26.5	7.26 ± 2.65
Arg ³⁰	-65.2 ± 15.7	-61.2 ± 27.7	4.30 ± 2.25
Gln ³¹	-60.9 ± 12.3	-36.5 ± 18.9	3.61 ± 1.84
Val ³²	-80.1 ± 13.1	-39.4 ± 14.9	6.66 ± 2.06
Gly ³³	+23.8 ± 27.1	-29.1 ± 19.9	
Asn ³⁴	+23.8 ± 60.2	+17.3 ± 45.7	5.84 ± 2.89

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>					
	Lauf I				
	$\overline{\phi}$ -Winkel [$^{\circ}$]		$\overline{\psi}$ -Winkel [$^{\circ}$]		$\overline{{}^3J_{H^N H^\alpha}}$ [Hz]
Met ³⁵	-99.5 ± 26.0		-12.0 ± 98.1		
Thr ³⁶	-101.4 ± 43.4		+1.6 ± 47.0		7.22 ± 2.47
Lys ³⁷	-124.0 ± 15.9		+104.4 ± 29.3		
Pro ³⁸	-58.5 ± 15.1		+93.6 ± 16.3		
Thr ³⁹	-124.1 ± 20.6		-64.2 ± 21.2		
Thr ⁴⁰	-128.0 ± 18.8		+139.6 ± 25.5		9.75 ± 1.19
Ile ⁴¹	-101.5 ± 12.5		+110.0 ± 14.4		9.54 ± 1.33
Ile ⁴²	-105.2 ± 12.9		+105.5 ± 11.5		11.80 ± 0.42
Glu ⁴³	-87.6 ± 14.2		+76.8 ± 13.0		
Val ⁴⁴	-97.1 ± 12.2		+103.9 ± 12.3		9.09 ± 1.47
Asn ⁴⁵	-100.2 ± 13.1		+103.3 ± 13.2		9.36 ± 1.39
Gly ⁴⁶	+72.7 ± 12.1		+79.6 ± 14.9		
Asp ⁴⁷	-109.5 ± 21.2		-96.5 ± 15.2		9.46 ± 1.79
Thr ⁴⁸	-103.9 ± 15.5		-11.2 ± 21.2		9.59 ± 1.62
Val ⁴⁹	-113.6 ± 19.4		+122.7 ± 25.0		9.82 ± 1.61
Ile ⁵⁰	-97.0 ± 14.6		+125.0 ± 13.7		8.95 ± 1.72
Ile ⁵¹	-100.9 ± 12.8		+109.1 ± 12.5		9.45 ± 1.37
Lys ⁵²	-104.2 ± 14.5		+112.2 ± 13.5		9.64 ± 1.32
Thr ⁵³	-98.4 ± 12.5		+101.5 ± 12.6		9.21 ± 1.43
Gln ⁵⁴	-103.7 ± 11.8		+92.0 ± 11.7		9.78 ± 1.16
Ser ⁵⁵	-86.3 ± 68.0		+96.7 ± 26.9		6.63 ± 2.52
Thr ⁵⁶	-65.9 ± 15.2		+118.4 ± 105.2		4.46 ± 2.23
Phe ⁵⁷	-103.6 ± 41.8		-26.0 ± 32.5		8.76 ± 2.28
Lys ⁵⁸	-11.6 ± 118.3		+48.5 ± 75.8		6.90 ± 2.21
Asn ⁵⁹	-111.0 ± 17.3		+114.7 ± 18.2		9.87 ± 1.37
Thr ⁶⁰	-113.0 ± 21.7		+106.0 ± 24.8		9.55 ± 1.68
Glu ⁶¹	-116.2 ± 20.4		+123.0 ± 23.4		
Ile ⁶²	-137.1 ± 15.1		+111.4 ± 20.6		9.49 ± 1.45
Ser ⁶³	-107.4 ± 19.1		+125.5 ± 80.4		
Phe ⁶⁴	-137.8 ± 28.1		+139.0 ± 27.7		8.88 ± 1.87
Lys ⁶⁵	-109.8 ± 13.6		+145.5 ± 46.6		10.10 ± 1.08
Leu ⁶⁶	-65.4 ± 12.3		+126.5 ± 13.0		4.31 ± 1.92
Gly ⁶⁷	+108.9 ± 68.5		+120.3 ± 20.0		
Val ⁶⁸	-113.1 ± 12.8		-44.3 ± 24.1		10.30 ± 0.96
Glu ⁶⁹	-64.4 ± 16.9		+113.3 ± 105.0		4.20 ± 2.42
Phe ⁷⁰	-119.1 ± 23.7		+113.1 ± 25.0		9.43 ± 1.70
Asp ⁷¹	-89.2 ± 15.3		+139.2 ± 28.7		7.92 ± 2.03
Glu ⁷²	-105.6 ± 20.3		+104.0 ± 16.0		9.32 ± 1.91
Thr ⁷³	-107.6 ± 14.3		+142.5 ± 36.7		9.93 ± 1.25
Thr ⁷⁴	-92.1 ± 55.3		+89.3 ± 30.2		7.37 ± 2.88

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>					
	Lauf I				
	$\overline{\phi}$ -Winkel [$^{\circ}$]		$\overline{\psi}$ -Winkel [$^{\circ}$]		$\overline{{}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}}$ [Hz]
Ala ⁷⁵	-43.5 ± 21.8		+134.5 ± 19.3		2.24 ± 1.58
Asp ⁷⁶	-91.2 ± 18.5		-37.0 ± 23.3		8.34 ± 2.12
Asp ⁷⁷	-133.9 ± 29.8		+3.1 ± 27.7		
Arg ⁷⁸	+65.5 ± 14.6		-25.6 ± 28.8		
Lys ⁷⁹	-129.0 ± 20.3		-67.4 ± 23.0		9.56 ± 1.43
Val ⁸⁰	-137.6 ± 24.0		+111.2 ± 23.6		9.23 ± 1.67
Lys ⁸¹	-96.7 ± 12.4		+144.5 ± 12.2		9.04 ± 1.49 ••
Ser ⁸²	-88.5 ± 23.6		+92.3 ± 21.5		7.31 ± 2.66
Ile ⁸³	-90.3 ± 16.5		+112.7 ± 18.4		7.97 ± 2.02
Val ⁸⁴	-95.1 ± 17.3		+96.2 ± 18.5		
Thr ⁸⁵	-97.1 ± 17.3		+121.2 ± 20.8		8.84 ± 2.13
Leu ⁸⁶	-76.1 ± 13.4		+94.5 ± 105.4		
Asp ⁸⁷	-119.3 ± 21.3		+83.3 ± 17.8		9.67 ± 1.36
Gly ⁸⁸	-14.1 ± 59.1		+110.9 ± 28.2		
Gly ⁸⁹	-59.8 ± 64.9		+18.3 ± 131.7		
Lys ⁹⁰	-91.6 ± 12.8		-72.9 ± 21.7		8.38 ± 1.74
Leu ⁹¹	-137.4 ± 27.6		-14.5 ± 152.8		9.01 ± 1.84
Val ⁹²	-111.6 ± 13.7		+124.5 ± 13.4		
His ⁹³	-95.8 ± 14.5		+98.3 ± 13.5		8.79 ± 1.71
Val ⁹⁴	-89.6 ± 15.3		+93.5 ± 15.0		
Gln ⁹⁵	-110.4 ± 15.8		+110.2 ± 14.0		9.96 ± 1.20
Lys ⁹⁶	-113.5 ± 18.8		+120.5 ± 14.5		9.82 ± 1.28
Trp ⁹⁷	-124.6 ± 77.3		+121.9 ± 23.2		6.91 ± 2.26
Asn ⁹⁸	-68.9 ± 31.1		+9.2 ± 134.6		6.11 ± 2.09
Gly ⁹⁹	-104.2 ± 47.2		+76.1 ± 26.5		
Gln ¹⁰⁰	-104.2 ± 18.8		-49.6 ± 36.4		9.32 ± 1.79
Glu ¹⁰¹	-101.6 ± 21.7		+134.1 ± 24.7		8.88 ± 2.11
Thr ¹⁰²	-85.5 ± 18.9		+93.4 ± 17.9		7.15 ± 2.21
Ser ¹⁰³	-100.6 ± 11.8		+107.4 ± 21.8		9.47 ± 1.22
Leu ¹⁰⁴	-86.2 ± 12.8		+106.9 ± 12.2		
Val ¹⁰⁵	-98.7 ± 12.0		+90.2 ± 11.1		
Arg ¹⁰⁶	-98.7 ± 10.8		+103.6 ± 11.0		9.33 ± 1.27
Glu ¹⁰⁷	-95.6 ± 14.7		+96.7 ± 11.3		8.75 ± 1.66
Met ¹⁰⁸	-94.3 ± 15.8		+102.3 ± 16.4		8.56 ± 1.96
Val ¹⁰⁹	-109.3 ± 14.9		+104.3 ± 15.1		9.97 ± 1.14
Asp ¹¹⁰	+ 51.9 ± 20.2		+83.7 ± 16.3		7.64 ± 1.51
Gly ¹¹¹	-92.1 ± 23.2		-93.4 ± 16.1		
Lys ¹¹²	-124.4 ± 23.9		-84.9 ± 25.8		9.78 ± 1.49
Leu ¹¹³	-105.2 ± 18.2		+125.5 ± 15.8		9.45 ± 1.64
Ile ¹¹⁴	-99.9 ± 12.9		+118.4 ± 13.0		

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>					
	Lauf I				
	$\overline{\phi}$ -Winkel		$\overline{\psi}$ -Winkel		$\overline{{}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}}$
	[$^{\circ}$]		[$^{\circ}$]		[Hz]
Leu ¹¹⁵	-96.1 ± 11.7		+104.8 ± 11.5		8.99 ± 1.44
Thr ¹¹⁶	-96.2 ± 13.1		+100.2 ± 11.5		
Leu ¹¹⁷	-88.4 ± 14.4		+106.0 ± 14.9		
Thr ¹¹⁸	-111.2 ± 13.2		+100.7 ± 11.2		10.19 ± 0.97
His ¹¹⁹	-134.7 ± 75.6		+120.9 ± 18.6		7.35 ± 2.36
Gly ¹²⁰	-23.7 ± 66.2		+108.9 ± 95.2		
Thr ¹²¹	-124.3 ± 36.1		-1.5 ± 81.1		8.95 ± 1.87
Ala ¹²²	-97.8 ± 26.4		-76.8 ± 78.5		8.16 ± 2.21
Val ¹²³	-108.5 ± 20.5		+114.9 ± 49.0		9.48 ± 1.76
Cys ¹²⁴	-114.8 ± 18.9		+139.3 ± 17.8		9.85 ± 1.28
Thr ¹²⁵	-116.1 ± 18.5		+122.1 ± 19.1		9.92 ± 1.24
Arg ¹²⁶	-110.4 ± 20.9		+94.5 ± 23.3		9.51 ± 1.70
Thr ¹²⁷	-107.4 ± 13.2		+131.3 ± 14.6		9.98 ± 1.10
Tyr ¹²⁸	-130.5 ± 12.8		+137.0 ± 11.1		10.11 ± 0.88
Glu ¹²⁹	-117.0 ± 14.0		+146.4 ± 18.3		10.32 ± 0.90
Lys ¹³⁰	-75.8 ± 13.6		+141.8 ± 17.9		
Gln ¹³¹	-99.5 ± 16.3		+133.9 ± 13.3		9.09 ± 1.65
Ala ¹³²	-117.8 ± 11.2		-62.8 ± 17.0		

Tabelle 5: Gemittelte ϕ - und ψ -Winkel, Fehler der ψ -Winkel mit Standardabweichungen, gemittelte ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten und Fehler der gemittelten Kopplungskonstanten. Aminosäuren, bei denen die Abweichung der berechneten mittleren 3J -Kopplungskonstante von der experimentell bestimmten 1 Hz überschreitet, sind mit • und solche, bei denen sie 2 Hz überschreitet, mit •• gekennzeichnet.

	Lauf II		
	$\overline{\phi\text{-Winkel}}$ [°]	$\overline{\psi\text{-Winkel}}$ [°]	$\overline{{}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}}$ [Hz]
Asp ²	+29.3 ± 56.0	-33.3 ± 152.0	
Ala ³	-47.0 ± 157.2	+95.7 ± 20.6	4.54 ± 2.93
Phe ⁴	-108.5 ± 34.1	-93.1 ± 55.3	8.19 ± 2.19
Val ⁵	-69.5 ± 31.7	+18.3 ± 155.6	4.80 ± 2.71
Gly ⁶	+84.9 ± 20.5	-30.1 ± 51.0	
Thr ⁷	-101.7 ± 14.7	+53.8 ± 55.2	
Trp ⁸	-105.4 ± 17.9	+101.4 ± 16.7	9.49 ± 1.63
Lys ⁹	-103.5 ± 16.1	+123.5 ± 15.0	9.48 ± 1.59
Leu ¹⁰	-64.4 ± 11.2	+131.2 ± 10.4	4.14 ± 1.82
Val ¹¹	-110.1 ± 11.1	+125.6 ± 10.4	10.27 ± 0.86
Asp ¹²	-139.1 ± 30.8	-41.8 ± 16.2	
Ser ¹³	-109.8 ± 21.0	+124.7 ± 17.3	
Lys ¹⁴	-107.4 ± 18.3	+107.3 ± 24.7	9.60 ± 1.59
Asn ¹⁵	+38.6 ± 59.3	+117.9 ± 78.7	7.73 ± 0.99
Phe ¹⁶	-24.5 ± 48.4	+7.3 ± 64.1	4.46 ± 2.17
Asp ¹⁷	-53.4 ± 23.6	-56.5 ± 18.9	3.40 ± 1.54
Asp ¹⁸	-66.4 ± 46.7	-37.5 ± 33.9	4.30 ± 1.98
Tyr ¹⁹	-63.4 ± 14.6	-49.0 ± 13.3	
Met ²⁰	-61.3 ± 10.5	-52.1 ± 9.9	
Lys ²¹	-61.2 ± 11.3	-35.8 ± 11.1	3.64 ± 1.49
Ser ²²	-69.1 ± 11.2	-52.1 ± 10.4	
Leu ²³	-80.1 ± 16.2	-16.7 ± 16.9	6.55 ± 2.34
Gly ²⁴	+85.1 ± 20.2	-20.5 ± 21.6	
Val ²⁵	-53.7 ± 12.9	-78.2 ± 17.5	
Gly ²⁶	-52.1 ± 15.6	-42.0 ± 13.9	
Phe ²⁷	-53.2 ± 19.5	-44.8 ± 23.2	
Ala ²⁸	-66.3 ± 15.9	-55.4 ± 13.0	4.46 ± 2.49
Thr ²⁹	-98.4 ± 42.0	-43.0 ± 26.8	7.38 ± 2.22
Arg ³⁰	-31.1 ± 90.5	-17.7 ± 75.8	4.59 ± 2.06
Gln ³¹	-50.5 ± 32.3	-51.4 ± 30.5	3.60 ± 1.83
Val ³²	-85.8 ± 27.6	-44.2 ± 34.7	7.08 ± 2.03
Gly ³³	+22.0 ± 88.6	+45.0 ± 73.9	
Asn ³⁴	-61.2 ± 38.0	-31.6 ± 33.6	

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>					
	$\overline{\phi}$ -Winkel		Lauf II		$\overline{{}^3J_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}}$ [Hz]
	[$^{\circ}$]		$\overline{\psi}$ -Winkel [$^{\circ}$]		
Met ³⁵	+30.8 ±	51.2	-40.4 ±	17.5	
Thr ³⁶	-98.8 ±	46.3	-55.7 ±	18.2	6.99 ± 2.44
Lys ³⁷	-114.2 ±	16.1	+103.3 ±	24.8	
Pro ³⁸	-64.3 ±	15.9	+91.5 ±	18.9	
Thr ³⁹	-114.7 ±	24.1	-61.8 ±	22.0	
Thr ⁴⁰	-133.0 ±	18.7	+133.1 ±	23.8	9.47 ± 1.41
Ile ⁴¹	-98.7 ±	12.1	+119.1 ±	15.6	9.27 ± 1.28
Ile ⁴²	-115.5 ±	8.7	+109.7 ±	10.0	
Glu ⁴³	-70.7 ±	20.4	+87.4 ±	13.8	
Val ⁴⁴	-94.9 ±	14.9	+105.2 ±	14.8	
Asn ⁴⁵	-112.5 ±	20.3	+54.2 ±	37.8	9.68 ± 1.52
Gly ⁴⁶	+55.7 ±	16.5	+127.3 ±	39.5	
Asp ⁴⁷	-115.6 ±	22.7	-117.5 ±	21.9	9.90 ± 1.58
Thr ⁴⁸	-111.5 ±	18.9	+10.2 ±	22.8	9.76 ± 1.53
Val ⁴⁹	-126.2 ±	20.3	+124.7 ±	26.4	9.69 ± 1.37
Ile ⁵⁰	-95.7 ±	14.1	+118.5 ±	14.5	8.81 ± 1.67
Ile ⁵¹	-99.6 ±	11.3	+116.3 ±	13.3	9.40 ± 1.26
Lys ⁵²	-109.3 ±	14.6	+101.5 ±	12.5	9.98 ± 1.26
Thr ⁵³	-99.9 ±	13.8	+107.4 ±	14.6	9.29 ± 1.54
Gln ⁵⁴	-103.0 ±	13.4	+116.0 ±	21.2	9.62 ± 1.37
Ser ⁵⁵	-120.6 ±	21.2	+97.2 ±	21.2	
Thr ⁵⁶	-66.4 ±	13.7	+115.1 ±	104.5	4.52 ± 1.89
Phe ⁵⁷	-82.6 ±	111.0	-6.8 ±	48.7	
Lys ⁵⁸	-91.3 ±	47.3	-73.9 ±	28.7	6.87 ± 2.58
Asn ⁵⁹	-107.8 ±	17.4	+112.3 ±	24.0	9.68 ± 1.37
Thr ⁶⁰	-87.0 ±	29.1	+96.9 ±	35.6	
Glu ⁶¹	-121.2 ±	15.6	+113.4 ±	16.9	
Ile ⁶²	-137.6 ±	16.4	+107.1 ±	21.2	
Ser ⁶³	-103.3 ±	14.6	+122.6 ±	13.6	
Phe ⁶⁴	-143.8 ±	30.8	+118.3 ±	15.0	
Lys ⁶⁵	-104.2 ±	18.1	+100.4 ±	125.2	
Leu ⁶⁶	-68.6 ±	12.9	+132.5 ±	17.2	4.84 ± 2.24
Gly ⁶⁷	-31.7 ±	137.4	+108.5 ±	34.1	
Val ⁶⁸	-119.3 ±	25.2	-85.7 ±	20.7	
Glu ⁶⁹	-67.3 ±	24.6	-88.2 ±	121.0	4.28 ± 2.28
Phe ⁷⁰	-124.3 ±	20.5	+111.2 ±	17.2	9.72 ± 1.92
Asp ⁷¹	-88.9 ±	16.8	+142.0 ±	40.6	
Glu ⁷²	-108.4 ±	20.2	+107.7 ±	16.4	9.51 ± 1.86
Thr ⁷³	-106.5 ±	13.9	+141.6 ±	36.0	9.87 ± 1.28
Thr ⁷⁴	-126.3 ±	19.9	+102.0 ±	20.0	.

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>					
	Lauf II				
	$\overline{\phi}$ -Winkel		$\overline{\psi}$ -Winkel		$\overline{{}^3\text{J}_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}}}$
	[$^{\circ}$]		[$^{\circ}$]		[Hz]
Ala ⁷⁵	-47.5 ± 24.1		+124.6 ± 18.8		2.90 ± 1.63
Asp ⁷⁶	-100.1 ± 33.2		0.0 ± 43.3		8.35 ± 2.21
Asp ⁷⁷	-131.7 ± 31.4		-36.2 ± 26.6		
Arg ⁷⁸	-21.0 ± 39.7		+57.5 ± 40.4		
Lys ⁷⁹	-115.8 ± 22.7		-91.4 ± 26.1		9.73 ± 1.36
Val ⁸⁰	-124.0 ± 17.1		+105.7 ± 18.1		
Lys ⁸¹	-89.0 ± 14.0		+141.5 ± 15.5		
Ser ⁸²	-111.2 ± 50.4		+107.8 ± 34.1		7.54 ± 2.52
Ile ⁸³	-84.4 ± 12.7		+129.7 ± 12.1		
Val ⁸⁴	-107.1 ± 19.0		+94.7 ± 14.9		
Thr ⁸⁵	-102.5 ± 27.7		+91.9 ± 16.4		
Leu ⁸⁶	+12.6 ± 44.8		+122.3 ± 28.6		
Asp ⁸⁷	+21.9 ± 67.5		-47.7 ± 68.4		8.68 ± 1.44 •
Gly ⁸⁸	-59.4 ± 24.3		+110.1 ± 26.1		
Gly ⁸⁹	+22.0 ± 69.8		+43.4 ± 108.5		
Lys ⁹⁰	-58.3 ± 13.8		-84.4 ± 12.7		
Leu ⁹¹	-132.2 ± 21.5		+52.9 ± 155.9		9.31 ± 1.68
Val ⁹²	-112.5 ± 14.8		+134.7 ± 14.6		
His ⁹³	-112.7 ± 27.8		+108.2 ± 24.5		9.14 ± 1.68
Val ⁹⁴	-83.2 ± 12.8		+74.5 ± 11.5		
Gln ⁹⁵	-100.2 ± 11.9		+107.3 ± 11.6		9.44 ± 1.24
Lys ⁹⁶	-110.1 ± 17.2		+109.5 ± 15.0		9.83 ± 1.15
Trp ⁹⁷	-120.1 ± 104.7		+108.9 ± 17.9		6.47 ± 2.30
Asn ⁹⁸	-78.0 ± 23.9		-72.1 ± 18.7		6.14 ± 2.11
Gly ⁹⁹	-20.4 ± 46.2		+126.3 ± 61.2		
Gln ¹⁰⁰	-81.1 ± 14.9		-51.5 ± 18.6		
Glu ¹⁰¹	-71.7 ± 22.8		+95.7 ± 27.6		
Thr ¹⁰²	-85.3 ± 17.0		+104.2 ± 16.3		
Ser ¹⁰³	-78.7 ± 11.8		+96.3 ± 12.7		
Leu ¹⁰⁴	-86.5 ± 13.5		+93.4 ± 13.2		
Val ¹⁰⁵	-100.8 ± 14.8		+93.7 ± 15.2		
Arg ¹⁰⁶	-99.8 ± 11.9		+114.7 ± 13.3		9.39 ± 1.26
Glu ¹⁰⁷	-94.6 ± 14.1		+101.5 ± 13.6		8.69 ± 1.64
Met ¹⁰⁸	-96.3 ± 17.2		+105.6 ± 17.4		8.70 ± 1.85
Val ¹⁰⁹	-114.4 ± 17.7		+110.1 ± 15.5		9.95 ± 1.18
Asp ¹¹⁰	+48.8 ± 21.4		+85.8 ± 19.1		7.50 ± 1.65
Gly ¹¹¹	-85.9 ± 27.0		-92.1 ± 16.3		
Lys ¹¹²	-124.4 ± 24.0		-4.3 ± 29.1		9.77 ± 1.58
Leu ¹¹³	-105.6 ± 18.4		+125.5 ± 16.7		9.45 ± 1.66
Ile ¹¹⁴	-97.0 ± 13.3		+113.5 ± 12.4		

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>			
	Lauf II		
	$\overline{\phi}$ -Winkel	$\overline{\psi}$ -Winkel	$\overline{{}^3J_{H^N H^\alpha}}$
	[$^\circ$]	[$^\circ$]	[Hz]
Leu ¹¹⁵	-93.8 ± 11.2	+103.9 ± 12.5	8.72 ± 1.44
Thr ¹¹⁶	-97.2 ± 15.6	+95.8 ± 13.5	
Leu ¹¹⁷	-84.2 ± 15.2	+105.3 ± 16.0	
Thr ¹¹⁸	-112.4 ± 12.7	+102.3 ± 11.7	
His ¹¹⁹	-126.6 ± 87.7	+109.8 ± 64.9	6.95 ± 2.30
Gly ¹²⁰	-72.6 ± 13.9	+66.4 ± 154.2	
Thr ¹²¹	-78.6 ± 146.7	+75.9 ± 20.8	
Ala ¹²²	-91.3 ± 20.2	-101.0 ± 122.0	7.81 ± 1.88
Val ¹²³	-97.6 ± 14.0	+123.6 ± 37.1	9.07 ± 1.56 •
Cys ¹²⁴	-104.6 ± 14.3	+143.8 ± 32.3	9.70 ± 1.31
Thr ¹²⁵	-117.3 ± 20.7	+126.8 ± 21.7	9.75 ± 1.40
Arg ¹²⁶	-103.6 ± 17.1	+109.2 ± 18.2	9.41 ± 1.50
Thr ¹²⁷	-106.8 ± 17.4	+116.8 ± 17.8	
Tyr ¹²⁸	-120.3 ± 16.0	+121.1 ± 14.2	10.18 ± 0.89
Glu ¹²⁹	-112.4 ± 14.6	+142.4 ± 11.8	10.15 ± 1.02
Lys ¹³⁰	-76.3 ± 14.2	+138.7 ± 10.8	
Gln ¹³¹	-96.8 ± 15.7	+135.6 ± 12.9	8.84 ± 1.83
Ala ¹³²	-140.5 ± 71.9	-59.4 ± 13.9	

Die Diederwinkel, die dem Lauf I entnommen wurden, zeigen, daß der Beginn der Kette (Aminosäuren 1–6) mit Standardabweichungen zwischen 45 und 101° für den ϕ -Winkel und zwischen 49 und 124° für den ψ -Winkel ausgesprochen flexibel ist. Auch Thr⁷ weist mit 74° Standardabweichung für den ψ -Winkel noch eine sehr hohe Flexibilität auf. Die folgenden Aminosäuren Trp⁸ bis Val¹¹ sind eindeutig einer β -Faltblattstruktur zuzuordnen (β A) und besitzen nur geringe Standardabweichungen für die ϕ - und ψ -Winkel. Die Konformation von Asp¹² entspricht bereits der einer α -Helix, obwohl sowohl die vorangehenden, als auch die nachfolgenden Aminosäuren Winkelkonformationen, die einem β -Faltblatt entsprechen, einnehmen. Dies könnte die hohe Flexibilität von Asp¹² (61,7° für den ϕ -Winkel und 23,7° ψ -Winkel) und Ser¹³ beziehungsweise Lys¹⁴ (31/27° beziehungsweise 20/26°) erklären.

Der Strukturbruch erfolgt bei den Aminosäuren 15 und 16. Diese beiden Aminosäuren (Asn¹⁵ und Phe¹⁶) sind keinem Sekundärstrukturelement eindeutig zuzuordnen. Mit ihrer Flexibilität bilden sie den Übergang zu der folgenden α -Helixstruktur (α I) der Aminosäuren 17–23. Innerhalb der Helix weisen die Standardabweichungen mit ungefähr 15° auf keine große Flexibilität hin, nur an den Rändern (Asp¹⁸ und Leu²³) ist die Flexibilität größer ($43/28^\circ$ beziehungsweise $22/27^\circ$). Gly²⁴ bildet mit einem Bruch in der α -Helixkonformation die Überleitung zum zweiten α -Helixbereich (α II) im FABP. Dieser α -Helixbereich läßt sich in einen hochflexiblen Bereich (Aminosäuren 25–28) mit Standardabweichungen um 50° sowohl für die ϕ - also auch für die ψ -Winkel und einen weniger flexiblen Bereich (Aminosäuren 29–32, Standardabweichungen um 20° für ϕ - und ψ -Winkel) aufteilen. Die α II-Helix wird durch einen deutlichen Konformationsbruch mit hochflexiblen Aminosäuren (Aminosäuren 33–36, Standardabweichungen zwischen 27 und 60° beziehungsweise zwischen 20 und 99° für die ϕ - beziehungsweise ψ -Winkel) beendet. Dieser Region folgt mit den Aminosäuren 37–46 ein wenig flexibler (Standardabweichungen um 13°) β -Faltblattbereich (β B), der durch Thr³⁹ unterbrochen wird, welches mit Pro³⁸ zusammen einen Knick in dem β -Faltblatt hervorruft. Die Aminosäuren 47–48 bilden wieder ein Verbindungsstück zum nachfolgenden β -Faltblatt (β C), das wiederum von einer beweglichen Region (Aminosäuren 55–58) abgeschlossen wird. Das von den Aminosäuren 59–66 gebildete β -Faltblatt β D besitzt im Vergleich zu den vorangegangenen β -Faltblattregionen β A-C eine im Durchschnitt um ungefähr 5° erhöhte Flexibilität. Außerdem sind in diesem Falblatt zwei sehr flexible Stellen identifizierbar. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren Ser⁶³ und Lys⁶⁵ mit Standardabweichungen von 19 beziehungsweise 80° und 14

beziehungsweise 47° für die ϕ - beziehungsweise ψ -Winkel. Auch die durch ein flexibles Teilstück (Aminosäure 67–68) verbundene β -Faltblattstruktur β E (Aminosäuren 69–74) weist eine erhöhte Beweglichkeit auf (zwischen 20 und 30° für ϕ - und ψ -Winkel). Dies könnte ein partielles „Aufweichen“ der β -Faltblattstruktur andeuten, womit das Eindringen der Fettsäure in das Protein erleichtert würde. Die restlichen β -Faltblätter β F–J (Aminosäuren 80–85, 92–96, 101–109, 113–118 und 123–131) sind wieder weniger flexibel und durch konformell sehr variable Bereiche verbunden.

Die Molekulardynamiksimulation mit zusätzlichem $^{15}\text{N}, \text{H}^\beta$ -Datensatz-Satz (Lauf II) ergibt ein Bild, das dem von Lauf I sehr ähnlich ist. Bei den meisten Aminosäuren liegt die Standardabweichung der Winkel etwas unter der von Lauf I. Auffällig ist aber die sehr stark erhöhte Beweglichkeit der Ränder der α -Helices α I und II zu den β -Faltblättern β A und β B hin. Diese Beweglichkeit der α -Helixstrukturen könnte einen „Deckel“-Effekt hervorrufen, der das Eindringen der Fettsäure durch eine Drehung der α -Helixbereiche in das Protein ermöglicht. Andere Untersuchungen [33] ließen auf ein 7.3 \AA großes Loch in der Proteinstruktur schließen. Es ist somit anzunehmen, daß das Eindringen der Fettsäure an dieser Stelle erfolgt.

Dabei ist anzumerken, daß die auffällig hohe Beweglichkeit im β D und β E-Bereich zwar vorhanden ist, aber nur noch die Aminosäure Lys⁶⁵ eine dem Lauf I vergleichbare Flexibilität zeigt. Die restlichen Diederwinkel ähneln denen des Laufes I, wobei allerdings die Verbindungsbereiche zwischen den Sekundärstrukturelementen zum Teil erheblich andere Werte ergeben (zum Beispiel bei Leu⁸⁶ bis Gly⁸⁷). Diese sind wahrscheinlich auf den zusätzlichen $^{15}\text{N}, \text{H}^\beta$ -Datensatz zurückzuführen.

5 Diskussion und Ausblick

Bei bekannter Zuordnung der Protonenresonanzen läßt sich aus einer Folge von J -modulierten [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-COSY-Spektren mit unterschiedlicher Wartezeit der Verlauf der Signalintensitäten mit 3J -Kopplungskonstanten korrelieren. Die bekannte Transferfunktion (2) dient zur nichtlinearen Anpassung der gesuchten Kopplungskonstante an die Signalintensitäten. Da für die meisten Signale bereits nach zehn der insgesamt vierzehn aufgenommenen Spektren keine Intensität mehr messbar war, kann eine solche Auswertung auch mit weniger als der hier verwendeten Anzahl von Spektren durchgeführt werden. Die Bestimmung der Kopplungskonstanten ist davon abhängig, wie genau der Nulldurchgang des Intensitätsverlaufes festgestellt werden kann.

Beim Vergleich der $^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten für $T_{1,\alpha} = 100$ ms und ∞ ergibt sich, daß die $^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten für $T_{1,\alpha} = \infty$ zu einem Minimum führen. Die nur für die Kopplungskonstanten für $T_{1,\alpha} = 100$ ms durchgeführte Fehleranalyse zeigt Fehler zwischen 0.97 und 0.09 Hz. Es zeigt sich, daß die hier verwendete Methode in der Lage ist, die 3J -Kopplungskonstanten sehr genau zu bestimmen.

Für 97 der 120 bestimmbaren $^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungen konnten hier die $^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten bestimmt werden. Dadurch war es möglich, die aus NOE-Abstandsinformationen erhaltenen Strukturen weiter zu verfeinern und an Hand von Molekuldynamikrechnungen Aussagen über die Dynamik des Moleküls zu gewinnen.

FABP weist in bestimmten Strukturbereichen eine hohe Dynamik auf. Neben den Verbindungsstücken zwischen den β -Faltblättern sind es besonders die den β -Faltblättern zugewandten Ränder der α -Helixbereiche, die große Beweglichkeit zeigen. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Öffnung

der gesamten α -Helix-Region sein. Gestützt wird diese Vermutung durch die große Beweglichkeit der Verbindung von α II-Helix zum β B-Faltblatt. An dieser Stelle wird eine Öffnung mit 7.3 Å Durchmesser in der Proteinstruktur vermutet [33], die das Eindringen der Fettsäure ermöglicht. Eine weitere Stelle hoher Flexibilität innerhalb der Proteinstruktur sind die β D- und β E-Faltblätter. Ihre Beweglichkeit deutet eventuell auf ein partielles Aufweichen der Faltblattstruktur hin. Somit sind zwei potentielle Stellen erhöhter Beweglichkeit feststellbar, die das Eindringen der Fettsäure in die „ β -Faß“-Struktur und somit die Funktionalität des Proteins möglich machen könnten.

Da auf Grund von Überlagerungen eine Reihe von Signalen in dieser Arbeit nicht eindeutig zugeordnet werden konnten und somit auch die Kopplungen nicht bestimmt werden konnten, wäre eine Aufnahme mit einem höher auflösenden Spektrometer hilfreich (800 MHz). Auch sollte zur genaueren Bestimmung der Kopplungen unter 5 Hz die E.COSY-Methode eingesetzt werden.

Für eine weitere Strukturverfeinerung wäre die Bestimmung von weiteren heteronuklearen 3J -Kopplungskonstanten nötig. Mit diesen Kopplungen könnten auch neben dem in dieser Arbeit untersuchten Torsionswinkel ϕ weitere Bindungswinkel (ψ , χ_1) bestimmt werden.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Geometrieuntersuchung am FABP-Molekülmodell durchgeführt. Um 3J -Kopplungsinformation für die Diederwinkelanalyse zu bestimmen, wurden J -modulierte [${}^{15}\text{N}$, ${}^1\text{H}$]-COSY-Experimente durchgeführt. Mit Hilfe numerischer Anpassungsroutinen wurden die Signalintensitäten quantitativ ausgewertet, um sehr genaue ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten zu erhalten. Diese Kopplungskonstanten wurden in Kraftfeldrechnungen als experimentelle Randbedingungen für die ϕ -Diederwinkel des Proteinrückgrates berücksichtigt. Dadurch ist eine Aussage über die Winkelverteilung und über die zeitlich gemittelten Kopplungseffekte im Proteinmodell möglich. Die aus der Molekulardynamiksimulation bestimmten ${}^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstanten wurden mit den experimentellen verglichen. Die Analyse ergab, daß die den β -Faltblättern zugewandten Ränder der α -Helixbereiche sowie zwei der zehn β -Faltblattbereiche sehr flexible Teilabschnitte aufweisen. Diese Arbeit konnte somit die Überlegungen stützen, die vor allem den flexiblen Teilabschnitt zwischen der αII -Helix und dem βB -Faltblattbereich für die Funktion des Proteins verantwortlich machen.

Literatur

- [1] R.K. Ockner, J.A. Manning, R.B. Poppenhausen, and W.K.L. Ho. *Science*, **177** 56–8, 1972.
- [2] N.M. Bass. *Internat. Rev. Cytol.*, **111** 143–84, 1988.
- [3] R.J.A. Paulussen and J.H. Veerkamp. Plenum Publishing Corp., New York, 1990.
- [4] R.A. Peeters, M.A. In't Groen, and J.H. Veerkamp. *Arch. Biochem. Biophys.*, **274** 556–63, 1989.
- [5] R.A. Peeters and J.H. Veerkamp. *Mol. Cell. Biochem.*, **88** 45–9, 1989.
- [6] G. Sa and T. Das. *Mol. Cell. Biochem.*, **274** 556–63, 1989.
- [7] T. Das, G. Sa, and M. Mukherjea. *Lipids*, **23** 528–33, 1988.
- [8] F. Schoentgen, G. Pgnéde, L.M. Bonanno, and P. Jollés. *Eur. J. Biochem.*, **185** 35–40, 1989.
- [9] T. Kanda, S. Iseki, M. Hitomi, H. Kumura, S. Odani, H. Kondo, Y. Matsubara, T. Muto, and T. Ono. *Eur. J. Biochem.*, **185** 27–33, 1989.
- [10] C.A. Baxa, R.S. Sha, M.K. Buelt, A.J. Smith, V. Matarese, L.L. Chinander, K.L. Boundy, and D.A. Bernlohr. *Biochemistry*, **28** 8683–90, 1989.
- [11] V. Matarese and D.A. Bernlohr. *J. Biol. Chem.*, **263** 14544–51, 1988.
- [12] M.K. Armstrong, D.A. Bernlohr, J. Storch, and S.D. Clarke. *Biochem. J.*, **267** 373–8, 1990.
- [13] P.D. Jones, A. Carne, N.M. Bass, and M.R. Gringor. *Biochem. J.*, **251** 919–25, 1988.
- [14] K.T. Lam, S. Borkan, K.P. Claffey, J.H. Schwartz, A.V. Chobanian, and P. Brecher. *J. Biol. Chem.*, **263** 15762–8, 1988.
- [15] G. Scapin, P. Spandon, L. Pengo, M. Mammi, G. Zanotti, and H.L. Monaco. *FEBS Lett.*, **240** 196–200, 1988.

- [16] J.E. Sewell, C.R. Young, S.K. Davis, and P.S. Hargis. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B** 623–9, 1989.
- [17] J.M. Stewart and W.R. Driedzic. *Can. J. Zool.*, **66** 2671–5, 1988.
- [18] A.F. Smith, K. Tsuchida, E. Hanneman, T.C. Suzuki, and M.A. Wells. *J. Biol. Chem.*, **267** 380–4, 1992.
- [19] N.H. Haunerland and J.M. Chisholm. *Biochim. Biophys. Acta*, **1047** 233–8, 1990.
- [20] J.H. Veerkamp, R.A. Peeters, and R.G.H.J. Maatman. *Biochim. Biophys. Acta*, **1081** 1–24, 1991.
- [21] J.B. Lowe, J.C. Sacchettini, M. Laposata, J.J. McQuillan, and J.I. Gordon. *J. Biol. Chem.*, **262** 5931–7, 1987.
- [22] H. Schulenberg-Schell, P. Schäfer, H.J.K. Keuper, B. Stanislanski, E. Hoffmann, H. Rüterjans, and F. Spener. *Eur. J. Biochem.*, **170** 565–74, 1988.
- [23] R.A. Wesiger, S.M. Pond, and L. Bass. *Am. J. Physiol.*, **257** G904–16, 1989.
- [24] J.M. Stewart, W.R. Driedzic, and J.A.M. Berkelaar. *Biochem. J.*, **275** 569–73, 1991.
- [25] F. Spener, T. Börchers, and M. Mukherjea. *FEBS Lett.*, **244** 1–5, 1989.
- [26] J. Storch, N.M. Bass, and A.M. Kleinfeld. *J. Biol. Chem.*, **264** 8708–13, 1989.
- [27] R.A. Peeters, M.A.P.M. In't Groen, M.P. de Moel, H.T.B. van Moerkerk, and J.H. Veerkamp. *Int. J. Biochem.*, **21** 407–418, 1989.
- [28] D.P. Cistola, M.T. Walsh, R.P. Corey, J.A. Hamilton, and P. Brecher. *Biochem.*, **27** 711–7, 1988.
- [29] T.A. Jones, T. Bergfors, J. Sedzik, and T. Unge. *EMBO J.*, **7** 1597–1604, 1988.
- [30] J.C. Sacchettini, J.I. Gordon, and L.J. Banaszak. *J. Biol. Chem.*, **263** 5815–9, 1988.

- [31] G. Scapin, P. Spandon, M. Mammi, G. Zanotti, and H.L. Monaco. *Mol. Cell. Biochem.*, **98** 95–9, 1990.
- [32] A. Müller-Fahrnow, U. Egner, T.A. Jones, H. Rüdell, F. Spener, and W. Saenger. *Eur. J. Biochem.*, **199** 271–6, 1991.
- [33] G. Scapin, J.I. Gordon, and J.C. Sacchettini. *J. Biol. Chem.*, **267** 4253–69, 1992.
- [34] P.J. Kraulis. *J. Appl. Crystallogr.*, **24** 946–50, 1991.
- [35] J.C. Sacchettini, D. Gopaul, J.I. Gordon, and L.J. Banaszak. *J. Mol. Biol.*, **208** 327–39, 1989.
- [36] D.P. Lassen. *Bestimmung der Tertiärstruktur von Rinderherz FABP mit multidimensionaler NMR-Spektroskopie und Kraftfeldrechnungen*. Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 1994.
- [37] C. Lücke, D. Lassen, H.-J. Kreienkamp, F. Spener, and H. Rüterjans. *Eur. J. Biochem.*, **210** 900–10, 1992.
- [38] D. Lassen, C. Lücke, M. Kveder, A. Mesgarzadeh, J.M. Schmidt, B. Specht, A. Lezius, F. Spener, and H. Rüterjans. *Eur. J. Biochem.*, **230** 266–80, 1995.
- [39] M. Karplus. *J. Chem. Phys.*, **30** 11–3, 1959.
- [40] M. Karplus. *J. Am. Chem. Soc.*, **85** 2870–1, 1963.
- [41] V.F. Bystrov. *Prog. NMR Spectr.*, **10** 41–81, 1976.
- [42] S. Seip, J. Balbach, and H. Kessler. *Angew. Chem.*, **104** 1656–8, 1992.
- [43] T. Szyperski, P. Güntert, G. Otting, and K. Wüthrich. *J. Magn. Reson.*, **99** 552–60, 1992.
- [44] G.W. Vuister and A. Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **115** 7772–7, 1993.
- [45] Y. Kim and J.H. Prestegard. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **8** 377–82, 1990.
- [46] D.F. Mierke and H. Kessler. *Biopolymers*, **32** 1277–82, 1992.

- [47] M. Eberstadt, D.F. Mierke, M. Köck, and H. Kessler. *Helv. Chim. Acta*, **75** 2583–92, 1992.
- [48] D.F. Mierke, S. Grdadolnik, Golic, and H. Kessler. *J. Am. Chem. Soc.*, **114** 8283–4, 1992.
- [49] D.F. Mierke and H. Kessler. *Biopolymers*, **33** 1003–17, 1993.
- [50] D.F. Mierke, M. Kurz, and H. Kessler. *J. Am. Chem. Soc.*, **116** 1042–9, 1994.
- [51] C. Griesinger, O.W. Sørensen, and R.R. Ernst. *J. Am. Chem. Soc.*, **107** 6394–6, 1985.
- [52] C. Griesinger, O.W. Sørensen, and R.R. Ernst. *J. Chem. Phys.*, **85**(12) 6837–52, 1986.
- [53] C. Griesinger, O.W. Sørensen, and R.R. Ernst. *J. Magn. Reson.*, **75** 474–92, 1986.
- [54] G.W. Vuister, S. Grzesiek, F. Delaglio, A.C. Wang, R. Tschudin, G. Zhu, and A. Bax. *Meth. Enzym.*, **239** 79–105, 1994.
- [55] C. Biamonti, C.B. Rios, B.A. Lyons, and G.T. Montelione. *Adv. Biophys. Chem.*, **4** 51–120, 1994.
- [56] H. Kuboniwa, S. Grzesiek, F. Delaylio, and A. Bax. *J. Biomol. NMR*, **4** 871–8, 1994.
- [57] D. Marion and K. Wüthrich. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113** 967–74, 1983.
- [58] A.J. Shaka, P.B. Barker, and R. Freeman. *J. Magn. Reson.*, **64** 547–52, 1985.
- [59] W.F. van Gunsteren. *Angew. Chem.*, **102** 1020, 1990.
- [60] S. Chandrasekar. *Rev. Mod. Phys.*, **15** 1, 1943.
- [61] W.F. van Gunsteren and H.J.C. Berendsen. *Mol. Simulation*, **1** 173–85, 1988.
- [62] Verlet. *Phys. Rev.*, **159** 98, 1967.

- [63] C.A.G. Haasnoot, F.A.A.M. deLeeuw, and C. Altona. *Tetrahedron*, **36** 2783, 1989.
- [64] S. Yung-yu, W. Lu, and W.F. van Gunsteren. *Mol. Simulation*, **1** 369–88, 1988.
- [65] A.E. Torda, R.M. Scheek, and W.F. van Gunsteren. *Chem. Phys. Lett.*, **157** 289–94, 1989.
- [66] A.E. Torda, R.M. Scheek, and W.F. van Gunsteren. *J. Mol. Biol.*, **214** 223–35, 1990.
- [67] A.E. Torda, R.M. Brunne, T. Huber, H. Kessler, and W.F. van Gunsteren. *J. Biomol. NMR*, **3** 55–66, 1993.
- [68] T. Huber. Moleküldynamik-Rechnungen unter Verwendung von zeitabhängigen Randbedingungen skalarer Kopplungen. Diplomarbeit, TU München, 1993.
- [69] A. Bax and D. Marion. *J. Magn. Reson.*, **78** 186–91, 1988.
- [70] T. Kohl. NMR-spektroskopische Untersuchungen und Molekular-Dynamik-Rechnungen am Fettsäurebindungsprotein aus Rinderherz. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 1995.

A Chemische Verschiebungen

Tabelle 6: ^1H -chemische Verschiebungen von rekombinantem Rinderherz-FABP bei 310 K (pH=6.0) in H_2O aus [38]. Die rekombinanten Form entspricht der natürlichen pl=5.1 Isoform, weist jedoch am aminoterminalen Ende noch eine zusätzliche Aminosäure (Met) auf.

	^{15}N	H^{N}	H^{α}	H^{β_x}	H^{β_y}	weitere H
Met ⁰	129.3	–	4.71	2.24	2.09	–
Val ¹	121.2	8.72	4.27	2.27	–	H^{γ^1} 1.01; H^{γ^2} 0.97
Asp ²	118.6	8.44	4.22	2.60	2.67	–
Ala ³	122.0	8.08	4.09	1.18	–	–
Phe ⁴	113.6	7.80	4.46	2.87	3.20	H^{δ^1} 7.12; H^{δ^2} 7.07; H^{ϵ^1} 6.92; H^{ϵ^2} 6.90; H^{ζ} 7.52
Val ⁵	118.3	7.13	3.76	2.22	–	H^{γ^1} 1.16; H^{γ^2} 1.16
Gly ⁶	115.2	8.73	H^{α^2} 4.13 H^{α^3} 3.87			
Thr ⁷	118.1	8.15	4.79	3.86	–	H^{γ^2} 1.09
Trp ⁸	129.4	9.66	5.31	3.36	3.08	H^{δ^1} 7.00; H^{ϵ^1} 9.55; H^{ϵ^3} 7.20; H^{ζ^2} 7.32; H^{ζ^3} 7.15; H^{η^2} 6.87
Lys ⁹	125.6	9.77	5.41	1.82	1.98	H^{γ^2} 1.53; H^{γ^3} 1.47; H^{δ^2} 1.73; H^{δ^3} 1.69; H^{ϵ^2} 2.96; H^{ϵ^3} 2.96
Leu ¹⁰	129.3	7.80	3.48	1.14	1.45	H^{γ} 1.25; H^{δ^1} 0.81; H^{δ^2} 0.40
Val ¹¹	121.5	9.14	4.60	2.25	–	H^{γ^1} 0.98; H^{γ^2} 0.82
Asp ¹²	121.0	7.67	4.87	2.45	2.74	–
Ser ¹³	117.4	8.25	4.98	3.46	3.71	–
Lys ¹⁴	130.4	8.93	4.89	1.95	1.92	H^{γ^2} 1.54; H^{γ^3} 1.46; H^{δ^2} 1.79; H^{δ^3} 1.71; H^{ϵ^2} 3.08; H^{ϵ^3} 3.08
Asn ¹⁵	121.3	9.47	4.82	3.53	3.34	$\text{H}^{\delta^2_1}$ 7.64; $\text{H}^{\delta^2_2}$ 7.16
Phe ¹⁶	122.6	8.94	5.04	3.08	3.16	H^{δ^1} 7.48; H^{δ^2} 7.48; H^{ϵ^1} 7.44; H^{ϵ^2} 7.44; H^{ζ} 7.07
Asp ¹⁷	121.3	8.96	4.32	2.61	2.92	–
Asp ¹⁸	118.2	7.74	4.30	2.66	2.81	–

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>						
	^{15}N	H^{N}	H^{α}	H^{β_x}	H^{β_y}	weitere H
Tyr ¹⁹	121.9	7.67	4.00	2.95	3.25	H^{δ^1} 6.94; H^{δ^2} 6.74; H^{ϵ^1} 6.40; H^{ϵ^2} 6.47
Met ²⁰	119.7	8.48	3.36	1.71	2.15	H^{γ^2} 1.45; H^{γ^3} 1.32
Lys ²¹	121.6	8.91	3.86	1.87	1.75	H^{γ^2} 1.51; H^{γ^3} 1.29; H^{δ^2} 1.65; H^{δ^3} 1.65; H^{ϵ^2} 2.95; H^{ϵ^3} 2.95
Ser ²²	118.4	7.93	4.23	4.07	4.07	–
Leu ²³	120.2	7.14	3.93	1.57	1.24	H^{γ} 0.99; H^{δ^1} 0.27; H^{δ^2} 0.12
Gly ²⁴	109.1	7.88	H^{α^2} 3.73 H^{α^3} 4.18			
Val ²⁵	122.7	7.41	3.72	1.41	–	H^{γ^1} 0.81; H^{γ^2} 0.98
Gly ²⁶	117.5	8.90	H^{α^2} 4.11 H^{α^3} 4.03			
Phe ²⁷	122.8	8.72	3.87	3.04	3.30	H^{δ^1} 7.21; H^{δ^2} 7.21; H^{ϵ^1} 7.06; H^{ϵ^2} 7.06; H^{ζ} 7.32
Ala ²⁸	122.4	8.85	3.97	1.48	–	–
Thr ²⁹	117.0	7.60	3.76	3.93	–	H^{γ^2} 0.92
Arg ³⁰	124.0	8.43	3.86	1.71	1.71	H^{γ^2} 1.30; H^{γ^3} 1.30; H^{δ^2} 3.20; H^{δ^3} 2.78; H^{ϵ} 7.64
Gln ³¹	118.5	7.88	3.85	1.96	1.90	H^{γ^2} 2.04; H^{γ} 2.04; $\text{H}^{\epsilon^{21}}$ 6.90; $\text{H}^{\epsilon^{22}}$ 6.85
Val ³²	118.5	6.86	3.68	1.76	–	H^{γ^1} 0.87; H^{γ^2} 0.56
Gly ³³	111.9	8.90	H^{α^2} 3.72 H^{α^3} 3.57			
Asn ³⁴	119.6	8.58	4.87	2.68	2.84	$\text{H}^{\delta^{21}}$ 7.28; $\text{H}^{\delta^{22}}$ 6.81
Met ³⁵	117.6	7.40	4.72	2.20	2.20	H^{γ^2} 2.70; H^{γ^3} 2.70
Thr ³⁶	116.7	7.37	4.34	4.14	–	H^{γ^2} 1.34
Lys ³⁷	–	–	4.94	–	–	–
Pro ³⁸	137.2	–	4.90	3.65	3.80	H^{γ^2} 2.22; H^{γ^3} 2.22; H^{δ^2} 2.01; H^{δ^3} 1.58
Thr ³⁹	118.2	8.76	5.49	4.10	–	H^{γ^2} 1.27
Thr ⁴⁰	125.2	9.98	5.62	3.48	–	H^{γ^2} 0.96
Ile ⁴¹	131.8	9.81	5.20	1.69	–	$\text{H}^{\gamma^{1_2}}$ 1.53; $\text{H}^{\gamma^{1_3}}$ 1.32; H^{γ^2} 0.91; H^{δ^1} 0.87
Ile ⁴²	129.1	9.18	5.25	2.35	–	$\text{H}^{\gamma^{1_2}}$ 1.72; $\text{H}^{\gamma^{1_3}}$ 1.72; H^{γ^2} 0.64; H^{δ^1} 0.99

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>						
	^{15}N	H^{N}	H^{α}	H^{β_x}	H^{β_y}	weitere H
Glu ⁴³	129.8	9.26	4.82	1.94	1.89	H^{γ^2} 2.14; H^{γ^3} 2.08
Val ⁴⁴	120.1	8.38	4.68	1.85	–	H^{γ^1} 0.80; H^{γ^2} 0.78
Asn ⁴⁵	127.2	8.92	4.89	2.52	2.66	$\text{H}^{\delta^2_1}$ 7.33; $\text{H}^{\delta^2_2}$ 6.92
Gly ⁴⁶	117.8	9.07	H^{α^2} 3.61 H^{α^3} 4.02			
Asp ⁴⁷	128.3	8.48	4.59	2.73	2.87	–
Thr ⁴⁸	118.4	7.94	4.45	4.08	–	H^{γ^2} 0.91
Val ⁴⁹	130.5	8.84	4.18	0.61	–	H^{γ^1} 0.53; H^{γ^2} 0.63
Ile ⁵⁰	127.0	8.68	4.79	1.52	–	$\text{H}^{\gamma^1_2}$ 1.24; $\text{H}^{\gamma^1_3}$ 0.92; H^{γ^2} 0.77; H^{δ^1} 0.69
Ile ⁵¹	124.6	8.71	4.96	1.79	–	$\text{H}^{\gamma^1_2}$ 1.00; $\text{H}^{\gamma^1_3}$ 1.00; H^{γ^2} 0.63; H^{δ^1} 0.80
Lys ⁵²	133.0	9.78	5.21	2.00	1.88	H^{γ^2} 1.39; H^{γ^3} 1.37; H^{δ^2} 1.64; H^{δ^3} 1.51; H^{ϵ^2} 2.75; H^{ϵ^3} 2.75
Thr ⁵³	122.7	9.02	5.10	4.22	–	H^{γ^2} 1.11
Gln ⁵⁴	127.4	9.66	5.40	2.05	2.05	H^{γ^2} 2.30; H^{γ} 2.22; H^{ϵ^1} 7.41; $\text{H}^{\epsilon^2_2}$ 6.69
Ser ⁵⁵	118.0	8.53	5.02	4.21	3.98	–
Thr ⁵⁶	112.0	8.29	4.13	4.33	–	H^{γ^2} 1.31
Phe ⁵⁷	121.6	7.71	4.69	3.15	2.78	H^{δ^1} 7.20; H^{δ^2} 7.20; H^{ϵ^1} 7.34; H^{ϵ^2} 7.34; H^{ζ} 7.44
Lys ⁵⁸	117.6	7.03	4.33	1.54	1.47	H^{γ^2} 1.23; H^{γ^3} 1.04; H^{δ^2} 1.67; H^{δ^3} 1.67; H^{ϵ^2} 2.83; H^{ϵ^3} 2.83
Asn ⁵⁹	124.2	8.54	5.88	2.76	3.02	$\text{H}^{\delta^2_1}$ 7.38; $\text{H}^{\delta^2_2}$ 6.59
Thr ⁶⁰	114.5	9.39	4.89	4.44	–	H^{γ^2} 1.10
Glu ⁶¹	123.9	8.64	5.17	1.97	1.97	H^{γ^2} 2.05; H^{γ^3} 2.05
Ile ⁶²	120.6	8.43	4.88	1.90	–	$\text{H}^{\gamma^1_2}$ 1.71; $\text{H}^{\gamma^1_3}$ 1.57; H^{γ^2} 1.25; H^{δ^1} 0.83
Ser ⁶³	117.2	8.08	5.42	3.48	3.56	–
Phe ⁶⁴	121.6	8.38	4.64	2.71	2.74	H^{δ^1} 6.27; H^{δ^2} 6.27; H^{ϵ^1} 6.71; H^{ϵ^2} 6.71; H^{ζ} 6.74
Lys ⁶⁵	119.4	8.71	4.94	1.88	1.88	H^{γ^2} 1.53; H^{γ^3} 1.45; H^{δ^2} 1.62; H^{δ^3} 1.62; H^{ϵ^2} 2.92; H^{ϵ^3} 2.92

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>						
	^{15}N	H^{N}	H^{α}	H^{β_x}	H^{β_y}	weitere H
Leu ⁶⁶	126.5	9.21	4.47	1.87	1.87	H^{γ} 1.59; H^{δ^1} 0.99; H^{δ^2} 0.81
Gly ⁶⁷	110.2	9.50	H^{α^2} 4.26 H^{α^3} 3.47			
Val ⁶⁸	122.5	7.63	4.42	2.25	–	H^{γ^1} 1.14; H^{γ^2} 0.93
Glu ⁶⁹	134.7	9.09	5.10	2.05	2.05	H^{γ^2} 2.23; H^{γ^3} 2.23
Phe ⁷⁰	123.5	9.43	5.23	3.32	3.29	H^{δ^1} 7.48; H^{δ^2} 7.48; H^{ϵ^1} 6.93; H^{ϵ^2} 6.93; H^{ζ} 6.26
Asp ⁷¹	121.7	8.55	5.16	2.67	2.77	–
Glu ⁷²	127.7	8.55	4.78	1.83	1.78	H^{γ^2} 2.34; H^{γ^3} 1.62
Thr ⁷³	126.3	8.73	5.39	4.07	–	H^{γ^2} 1.21
Thr ⁷⁴	120.6	9.09	4.57	4.38	–	H^{γ^2} 0.84
Ala ⁷⁵	124.8	9.62	3.97	1.48	–	–
Asp ⁷⁶	111.5	9.29	4.55	2.82	2.20	–
Asp ⁷⁷	117.1	8.06	4.08	2.93	2.69	–
Arg ⁷⁸	118.0	7.42	4.10	1.42	0.40	H^{γ^2} 1.06; H^{γ^3} 0.89; H^{δ^2} 2.66; H^{δ^3} 0.57; H^{ϵ} 9.51
Lys ⁷⁹	124.7	8.17	4.94	1.81	1.78	H^{γ^2} 1.46; H^{γ^3} 1.46; H^{δ^2} 1.69; H^{δ^3} 1.69; H^{ϵ^2} 3.00; H^{ϵ^3} 3.00
Val ⁸⁰	117.8	8.98	5.15	2.09	–	H^{γ^1} 0.23; H^{γ^2} 0.62
Lys ⁸¹	123.1	8.82	4.97	1.89	1.89	H^{γ^2} 1.53; H^{γ^3} 1.45; H^{δ^2} 1.71; H^{δ^3} 1.71; H^{ϵ^2} 2.96; H^{ϵ^3} 2.96
Ser ⁸²	126.3	9.21	5.76	2.99	1.98	–
Ile ⁸³	119.5	8.31	4.22	1.74	–	$\text{H}^{\gamma^{1_2}}$ 0.96; $\text{H}^{\gamma^{1_3}}$ 0.96; H^{γ^2} 0.91; H^{δ^1} 0.83
Val ⁸⁴	131.6	9.53	5.41	1.27	–	H^{γ^1} 0.51; H^{γ^2} -0.37
Thr ⁸⁵	118.8	8.90	4.68	4.23	–	H^{γ^2} 1.17
Leu ⁸⁶	123.9	8.62	5.32	1.32	1.86	H^{γ} 1.53; H^{δ^1} 0.91; H^{δ^2} 0.81
Asp ⁸⁷	128.1	9.00	4.95	2.48	2.70	–
Gly ⁸⁸	117.8	9.01	H^{α^2} 3.82 H^{α^3} 3.94			
Gly ⁸⁹	111.9	8.67	H^{α^2} 4.04 H^{α^3} 3.95			

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>						
	^{15}N	H^{N}	H^{α}	H^{β_x}	H^{β_y}	weitere H
Lys ⁹⁰	121.0	7.86	5.00	1.95	1.50	H^{γ^2} 1.26; H^{γ^3} 1.26; H^{δ^2} 1.57; H^{δ^3} 1.57; H^{ϵ^2} 2.96; H^{ϵ^3} 2.96
Leu ⁹¹	126.5	8.84	4.82	1.27	0.73	H^{γ} 1.02; H^{δ^1} 0.50; H^{δ^2} 0.45
Val ⁹²	133.8	9.65	4.11	2.28	–	H^{γ^1} 0.84; H^{γ^2} 0.96
His ⁹³	133.2	8.54	5.53	2.70	4.00	H^{ϵ^1} 7.95; H^{δ^2} 6.53
Val ⁹⁴	128.7	9.21	4.78	1.95	–	H^{γ^1} 0.94; H^{γ^2} 0.91
Gln ⁹⁵	126.4	8.72	5.10	2.20	2.20	H^{γ^2} 2.45; H^{γ} 2.45; $\text{H}^{\epsilon^2_1}$ 7.32; $\text{H}^{\epsilon^2_2}$ 7.00
Lys ⁹⁶	121.6	9.23	5.58	1.94	1.82	H^{γ^2} 1.53; H^{γ^3} 1.42; H^{δ^2} 1.68; H^{δ^3} 1.68; H^{ϵ^2} 2.86; H^{ϵ^3} 2.86
Trp ⁹⁷	128.3	8.28	4.93	3.25	3.71	H^{δ^1} 7.16; H^{ϵ^1} 10.20; H^{ϵ^3} 7.16; H^{ζ^2} 7.13; H^{ζ^3} 6.80; H^{η^2} 6.24
Asn ⁹⁸	122.5	9.37	4.40	2.95	2.47	$\text{H}^{\delta^2_1}$ 7.58; $\text{H}^{\delta^2_2}$ 6.95
Gly ⁹⁹	106.4	8.44	H^{α^2} 3.98 H^{α^3} 3.62			
Gln ¹⁰⁰	121.6	8.33	4.42	0.54	1.29	H^{γ^2} 1.52; H^{γ} 1.82; $\text{H}^{\epsilon^2_1}$ 7.13; $\text{H}^{\epsilon^2_2}$ 6.91
Glu ¹⁰¹	119.0	8.23	5.85	1.95	1.95	H^{γ^2} 2.11; H^{γ^3} 2.11
Thr ¹⁰²	117.6	9.05	5.47	4.40	–	H^{γ^2} 1.34
Ser ¹⁰³	121.3	8.28	5.72	3.86	3.78	–
Leu ¹⁰⁴	126.3	9.78	4.96	1.88	1.33	H^{γ} 1.47; H^{δ^1} 0.73; H^{δ^2} 0.32
Val ¹⁰⁵	128.6	9.20	4.93	2.02	–	H^{γ^1} 0.93; H^{γ^2} 1.06
Arg ¹⁰⁶	128.4	8.91	5.62	1.28	1.34	H^{γ^2} 1.86; H^{γ^3} 1.09; H^{δ^2} 2.67; H^{δ^3} 2.53; H^{ϵ} 7.60
Glu ¹⁰⁷	123.5	8.91	4.88	1.91	1.91	H^{γ^2} 2.20; H^{γ^3} 2.16
Met ¹⁰⁸	125.0	8.80	5.42	1.83	1.74	H^{γ^2} 2.06; H^{γ^3} 2.06
Val ¹⁰⁹	127.7	9.23	4.20	1.93	–	H^{γ^1} 0.89; H^{γ^2} 0.82
Asp ¹¹⁰	130.4	9.36	4.34	3.04	2.62	–
Gly ¹¹¹	104.8	8.60	H^{α^2} 4.29 H^{α^3} 3.67			

Fortsetzung nächste Seite

<i>Fortsetzung von vorheriger Seite</i>						
	^{15}N	H^{N}	H^{α}	H^{β_x}	H^{β_y}	weitere H
Lys ¹¹²	123.2	8.11	4.93	1.97	1.89	H^{γ^2} 1.73; H^{γ^3} 1.58; H^{δ^2} 1.63; H^{δ^3} 1.63; H^{ϵ^2} 3.07; H^{ϵ^3} 3.07
Leu ¹¹³	126.2	8.24	4.67	1.01	1.01	H^{γ} 1.00; H^{δ^1} 0.10; H^{δ^2} -0.09
Ile ¹¹⁴	129.8	9.30	4.84	2.13	–	$\text{H}^{\gamma^{1_2}}$ 1.56; $\text{H}^{\gamma^{1_3}}$ 1.37; H^{γ^2} 0.79; H^{δ^1} 0.82
Leu ¹¹⁵	134.2	9.55	5.43	2.05	2.05	H^{γ} 1.27; H^{δ^1} 0.81; H^{δ^2} 0.64
Thr ¹¹⁶	126.3	9.78	5.29	3.89	–	H^{γ^2} 1.05
Leu ¹¹⁷	133.6	9.66	5.34	0.80	0.33	H^{γ} 1.23; H^{δ^1} 0.72; H^{δ^2} 0.64
Thr ¹¹⁸	118.0	8.72	5.59	4.13	–	H^{γ^2} 1.25
His ¹¹⁹	132.6	9.61	5.18	3.34	3.14	H^{ϵ^1} 8.17; H^{δ^2} 7.79
Gly ¹²⁰	120.3	9.21	H^{α^2} 3.88 H^{α^3} 3.57			
Thr ¹²¹	119.0	8.72	4.27	4.56	–	H^{γ^2} 1.23
Ala ¹²²	129.1	8.55	4.63	1.57	–	–
Val ¹²³	125.3	8.23	5.10	1.95	–	H^{γ^1} 0.81; H^{γ^2} 0.93
Cys ¹²⁴	131.0	9.58	5.35	3.27	2.25	–
Thr ¹²⁵	124.0	8.06	5.23	3.85	–	H^{γ^2} 1.15
Arg ¹²⁶	131.6	10.04	4.86	1.87	1.84	H^{γ^2} 1.72; H^{γ^3} 1.47; H^{δ^2} 2.67; H^{δ^3} 2.53; H^{ϵ} 7.57
Thr ¹²⁷	121.8	8.71	4.86	3.85	–	H^{γ^2} 1.13
Tyr ¹²⁸	130.3	9.93	5.35	3.37	3.12	H^{δ^1} 6.87; H^{δ^2} 6.87; H^{ϵ^1} 6.59; H^{ϵ^2} 6.59
Glu ¹²⁹	121.8	9.28	5.41	2.11	2.01	H^{γ^2} 2.37; H^{γ^3} 2.37
Lys ¹³⁰	131.5	9.56	3.71	1.49	1.49	H^{γ^2} 0.92; H^{γ^3} 0.22; H^{δ^2} 1.34; H^{δ^3} 1.25; H^{ϵ^2} 2.71; H^{ϵ^3} 2.71
Gln ¹³¹	128.1	8.86	4.36	2.02	1.75	H^{γ^2} 2.30; H^{γ^3} 2.30; $\text{H}^{\epsilon^{2_1}}$ 7.29; $\text{H}^{\epsilon^{2_2}}$ 7.18
Ala ¹³²	133.1	8.03	4.08	1.32	–	–

B Programme

B.1 Pulsprogramm und Aquisitionsparameter

Das Pulsprogramm wurde auf einem Bruker DMX600 Spektrometer realisiert. Die Pulslängen wurden zu 11,5 μs für einen 90° und 23 μs für einen 180° ^1H -Puls bestimmt, für den 90° bzw. 180° X-Puls ergaben sich entsprechend 29,2 bzw. 58,4 μs . Für die Delays d0, d1 und d2 wurden 8,05 ms, 1 s und 5 ms eingesetzt. Das d0-Delay wurde mit jedem Spektrum um 2,5 ms inkrementiert. So ergaben sich Wartezeiten von 43,2918 bis 183,2918 ms in 10 ms-Schritten.

Pulsprogramm:

```

;-----
; file: js.Hmqc
; author: js-mar-92
; js-oct-95 ported to DMX
;
; aim: 1H-detected 2D-heteronuclear single-quantum coherence (HSQC)
; with J-modulation mixing step for 3J(HN,HA) determination
;
; feat: heteronuclear one-bond shift correlation (F1=X, F2=H)
; TPPI in t1 dimension
; heteronucleus CPD-decoupling during acquisition
; pseudo-3D for variable mixing time
;
; ref: Kuboniwa et al. (1994) J. Biomol. NMR 4, 871-878.
;-----
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
d21 = 10m ; slow-switching delay
p2 = p1*2 ; 180-deg H pulse
p4 = p3*2 ; 180-deg X pulse
d20 = d0-p1*2-p3*0.64
d14 = dw*2
ze ; zero memory, reset all pointers
2 d21*4 do:f2 ; NS loop
1 3u p13:f2 ; set decoupler to high power
d1
( p1 ph1):f1 ; H-excitation
d2 ; evolution of 1J(HX) coupling
(p3 ph3):f2 ; create heteronuclear DQC/ZQC
d20
(p4 ph3):f2
d0 ; t1/2 evolution of chemical shifts
( p1 ph10):f1 ; exchange DQC/ZQC for removal of h-shifts
(3u p2 ph1):f1 ; exchange DQC/ZQC for removal of h-shifts
(3u p1 ph10):f1 ; exchange DQC/ZQC for removal of h-shifts
d0 ; t1/2 evolution of chemical shifts
(p4 ph5):f2
d20
(p3 ph5):f2 ; restore H-nucleus SQC
d2 UNBLKGRAD p14:f2 ; evolution of 1J(HX) coupling
; water-flip-back module
( p1 ph20):f1
d13
p16:ngrad:c34
d16
( p1 ph21):f1
d14
( p1 ph22):f1
50u BLKGRAD
go=2 ph0 cpd:f2 ; accumulate NS scans, CPD decoupling
d21 do:f2 wr #0 if #0 zd ; write to ser-file, zero data memory
d21 id0 ; increment d0
d21 dd20 ; decrement d0
d21 ip3 ; increment first pulse phases

```



```
    lo to 1 times tdi ; t1-increment loop
exit
; H-excitation
ph1= 0
; X-filter
ph3= 0
ph4= 0
ph5= 0 2
; receiver
ph0= 0 2 1 3 2 0 3 1
; H-refocusing
ph10= 0
ph11= 1
ph12= 2
ph13= 3
; water-flip-back module
ph20= 2
ph21= 0 0 1 1 2 2 3 3
ph22= 2 2 3 3 0 0 1 1
```

B.2 prepare.m

Im Programm `prepare.m` werden die Spektren in Matlab geladen und auf eine angemessene Größe beschnitten, bei der sie alle Informationen behalten, aber die leeren Spektrenbereiche wegfallen. Der globale Rauschwert wurde einmal explizit bestimmt und fest in das Program eingetragen. Kommentare sind in Matlab-Programmen mit `%` gekennzeichnet.

```
% prepare.m
% (Spektrensumme), (Rauschwert), (Uebersichtsplot)
% TB-dec-95 revised
% NOISE and LEVEL are fixed in program 'volumes' so no
% calculation is needed (save MEM)
% overview due to time not done anymore
% notes: Used once before processing volumes
% includes 'loadspect'
% temporary solution
global NOE1 NOE2 NOE3 NOE4
global NOE5 NOE6 NOE7 NOE8
global NOE9 NOE10 NOE11 NOE12
global NOE13 NOE14
% set noise to fixed level. found in testing
global NOISE, NOISE=0.0424;
% set displaylevel to three times noiselevel
global LEVEL, LEVEL=NOISE*3;
% for getting the right sizes, first spectrum has to be loaded
load NOE31, NOE1=NOE31; clear NOE31
% number of spectras
ntime=14
% loop over all spectras
for k=1:ntime
% load all but first spectras, 'cause first loaded at beginning
if k>1
eval(['load NOE' int2str(30+k) ', NOE' int2str(k) '=NOE'
int2str(30+k) '; clear NOE' int2str(30+k) ';'])
end
% summ over spectras
% eval(['NOES=NOES+(NOE' int2str(k) ');'])
% reduce spectras to reasonable size
eval(['NOE' int2str(k) '=NOE' int2str(k) '(:,201:800);'])
end
% reduce intensity of sumspectra
% NOES=NOES/sqrt(ntime);
% without cross peaks
% Region=NOES(:,1:200);
% OFFSET=mean(mean(Region))
% global NOISE, NOISE=rms(Region-OFFSET)
% minimum plot level
% global LEVEL, LEVEL=3*NOISE;
disp('Prepare finished')
```

B.3 volumes.m

Mit diesem Programm werden die Peaks bestimmt, und deren Position auf einem Datenträger gespeichert. Anschließend wird die Signalintensität der Spektren ausgewertet und eine erste Anpassung durchgeführt.

```
function Par_final=volumes()
% volumes.m
%-----
%   JMS-dec-95 Matlab4
%   TB-dec-95 minor changes in comments
% aim: J-coupling evaluation from J-modulated HMQC spectra
% according to Kuboniwa & Bax (1995) JBNMR 4, 871-878.
% call: volumes
% Par_final=volumes
% pars: (none) interactive prolog
% note: critical spectrum data is granted via 'global NOE1 NOE2 NOE3 ...'
% note: see also preparation routines 'loadspec' and 'prepare'
% note2: 'loadspec' changed by TB and faded into uselessness. 'prepare' holds
%       load-routines and optimization for lesser memoryrequirements.
%-----
global NOE1 NOE2 NOE3 NOE4           % temporary solution
global NOE5 NOE6 NOE7 NOE8           % temporary solution
global NOE9 NOE10 NOE11 NOE12        % temporary solution
global NOE13 NOE14 NOE15 NOE16       % temporary solution
global NOISE,NOISE=0.0424;           % set noise to fixed level. found in testing
global LEVEL, LEVEL=NOISE*3;         % set displaylevel to three times noiselevel
[NROW,NCOL]=size(NOE1);
ZROW=64;                             % define size of zoom-region
ZCOL=64;
figure(1),[NOE_zoomed,NOE_mapped,row_strip,col_strip]=zoom2d(NOE1,ZROW,ZCOL);
ZROW=16;
ZCOL=16;
[SROW,SCOL] = strip2d(NOE_zoomed); % variable region
SROW=row_strip(SROW);
SCOL=col_strip(SCOL);
NULL=zeros(length(SROW),length(SCOL));
[select,border]=ellipse(NULL);
ntime=14
for k=1:ntime,
eval(['PEAK=NOE' int2str(k) '(SROW,SCOL);'])
V_rawdata(k)=mean(mean(PEAK));
V_elliptic(k)=mean(PEAK(select));
V_corrected(k)=mean(PEAK(select))-mean(PEAK(border));
end
V=[V_rawdata;V_elliptic;V_corrected] % display values
T_min=0.0432918; % in [sec]
T_dif=0.010; % in [sec]
T=T_dif*(0:ntime-1)+T_min; T=T(:);
figure(2).plot(T,V_rawdata,T,V_elliptic,T,V_corrected,T,zeros(size(V,1)),'g:');
axis([0 T(ntime) -inf inf])
figure(3), clear ax xl yl ti
for k=1:ntime
eval(['PEAK=NOE' int2str(k) '(SROW,SCOL);'])
subplot(2,ntime/2,k), [ax(k),xl(k),yl(k),ti(k)]=cont2d(PEAK,NOISE*sqrt(2));
set(ti(k),'string',sprintf('%2f ms',1000*T(k)))
end
set([xl,yl],'string','')
PEAKID=input('Enter peak identifier for save to disk : ','s');
savecmd=['save ' PEAKID '.mat NROW NCOL SROW SCOL V T']
eval(savecmd)
% Do a first trial fit
disp('Fitting the curve, please wait ...')
Par_start=[1 .035 5];
T1a=.1; % guessed value !
Par_final=fmins('fct_hnha',Par_start,[],[],T1a,T,V(:,3));
[chi2,sim] = fct_hnha(Par_final,T1a,T,V(:,3));
t=(30:200)*1e-3; % in [sec]
[chi2,Sim] = fct_hnha(Par_final,T1a,t);
figure(2).plot(T,V(:,3),'yx',T,sim,'ro',t,Sim,'r-',t,zeros(size(t)),'g:');
%axis([.03 .2 -inf inf])
J_test=Par_final(3)
title(['J=' num2str(J_test) ' Hz, x - experimental, o - simulated, ' PEAKID ])
%-----
return
```

B.4 table.m

```

% table.m
%-----
% tb-dec-95
% Aim: give formatted OUTPUT on previously achieved reagonfiles of peaks (ASCII)
% Note: this funktion shows the current directory and asks for a filename.
%       the filename has to contain the region, the volume and the time for the
%       spectra. Only usable with 'prepare' and 'volumes' in the same directory.
%       Output will be the calculated J-couplings for T1=100msec and T1=infinity
% Format:  T2-time J(100msec) J(infinity)
% Uses: fct_hnha
%-----
%global Sim sim Par_final Par Par_start T1a t chi2 PEAKID J_multi
global OUTPUT LoadCom FILENAME A
k=1
fid=fopen('dir.lst')
while 1
    [A]=fscanf(fid,'%s',1);
    if ( A(1:10) == '-----.zzz' )
        k=k-1
        break
    else
        FILENAME(k,1:10)=A(1:10);
        k=k+1
    end
end
fclose(fid)
% loop forever
while 1
% break?
    if ( k == 0 )
        LoadCom = ['load ' FILENAME(k,1:10)]
% get Peak
        eval([ LoadCom ]);
% information for the user
        disp('Fitting the curve, please wait ...')
% start parameters:
% 1) cross peak volume at tau2=0
% 2) apparent relaxation time
% 3) coupling constant 3J(HN,Ha)
        Par_start = [max(V(:,3)) .035 5];
% value with little correction
        T1a=.1;
% fit parameters
        Par_final=fmins('fct_hnha',Par_start,[],[],T1a,T,V(:,3))
        [chi2,sim] = fct_hnha(Par_final,T1a,T,V(:,3));
        [chi2,Sim] = fct_hnha(Par_final,T1a,t);
% figure(2),plot(T,V(:,3),'yx','T,sim','ro','t,Sim','r-','t,zeros(size(t))','g:') % Plot fitcurves
% save value for further use
        OUTPUT(k,1:2)=Par_final(2:3) ;
% minimum T1-Value
        T1a=inf;
% fit parameters
        Par_final=fmins('fct_hnha',Par_start,[],[],T1a,T,V(:,3))
        [chi2,sim] = fct_hnha(Par_final,T1a,T,V(:,3));
        [chi2,Sim] = fct_hnha(Par_final,T1a,t);
% save value for further use
        OUTPUT(k,3)=Par_final(3);
% error calculation
        global FILE, FILE=1
        global EIGEN, EIGEN=0
% T1a was fixed to .1 for calculation of Errors!
        T1a=.1;
        Par_final=fmins('fct_hnha',Par_start,[],[],T1a,T,V(:,3))
        [chi2,sim] = fct_hnha(Par_final,T1a,T,V(:,3));
        [chi2,Sim] = fct_hnha(Par_final,T1a,t);
        [dY,Cov,chi2,Q_ANOVA,Q_GAMMA]=errcalcf('fct_hnha',Par_final,V(:,3),NOISE,0.1,T,V(:,3));
        OUTPUT(k,4:6)=dY(:)'; % Standardabweichung
        OUTPUT(k,7)=Q_ANOVA ; % Regressionskoeffizient der Varianzanalyse
        OUTPUT(k,8)=Q_GAMMA ; % Regessionskoeffizient der unvollst. Gammafunktion
        k=k-1 % increase counter for getting next row
    else
        break
    end
end
end
save output.asc -ascii OUTPUT % Save the resulting matrix

```

B.5 kopplung.m

Die in der Molekulardynamiksimulation gefundenen Kopplungen werden hiermit gemittelt und der mittlere Fehler bestimmt.

```
% kopplung.m
-----
% tb-jan-96
% Aim: Find the errors for MD-Outputcouplings and experimental couplings
% Note: This Funktion needs the couplings to be preloaded as 'Kopplung'
% Format: (J_0 - J(n) ) ^ 2 [ntimes] ... ( J_0 - Sum(J(n))/n ) ^ 2
% Uses: (none)
%-----
% Number of Peaks
NoCoup=71
% Get Rowvector (works always!)
experimental=experimental(:)';
% calculate Matrix of errors
Fehler = ( ones(1000,1) * experimental - Kopplung(:,2:NoCoup+1) ) .^ 2 ;
% calculate mean coupling
MittelKopplung = mean(Kopplung(:,2:NoCoup+1)) ;
% Meanerror over Couplings(t)
MittelFehler = ( experimental - MittelKopplung ) .^ 2 ;
```

B.6 ellipse.m

```

function [select,border]=ellipse(mx);
%-----
% JMS-mar-94 Matlab4 compliant
% aim: Find points within ellipse defined by selected region
% call: [select,border]=ellipse(mx);
% pars: mx input matrix (required)
% select points that obey ellipse inequality
% border points on ellipse contour
% uses: global none
% function
%-----
if ( nargin<1),
    error('*** ellipse - No input matrix given, aborted ***')
end
%-----
[rows,cols]=size(mx);
row=(1:rows)';
col=(1:cols) ;
a=cols/2; % ellipse x-diameter
b=rows/2; % ellipse y-diameter
A=((col-a-0.5)/a); % scaled to unit length
B=((row-b-0.5)/b); % scaled to unit length
A2=A.^2;
B2=B.^2;
dA=mean(abs(diff(A))); % scaled pitch per pixel
dB=mean(abs(diff(B))); % scaled pitch per pixel
dAdB=sqrt(dA^2+dB^2); % 2D pitch per pixel
A2B2 = ones(size(B2))*A2 + B2*ones(size(A2)); % some kind of potential function
radius=sqrt(A2B2); % distance from center of ellipse
border=find( (1-dAdB<=radius) & (radius<=1+dAdB)); % points on ellipse contour
select=find(radius<=1); % points that obey ellipse inequality
%-----
return

```

B.7 fct_hnha.m

```

function [chi2,Sim] = fct_hnha(Par,tau1,tau2,Ref,Std);
%-----
% ykn-oct-93
% JMS-jun-95 revised
% JMS-dec-95 revised (Bax's function, adapted from Billeter's function)
% tb -dec-95 kuboniwa-funktion
% Aim: Determination of J(HN,Ha) by a
% non-linear least-squares fit of A, J(HN,Ha) and T2'
% to the experimental dependence of auto peak volumes
% in J-modulated HSQC's on delay time tau2.
% Call: chi2 = fct_hnha(Par,tau1,tau2,Ref,Std);
% [chi2,Sim] = fct_hnha(Par,tau1,tau2,Ref,Std);
% Pars: chi2 chi-square error between Vol and vol
% Sim vector of calculated intensities
% Ref vector of experimental intensities and
% Std their respective standard deviations
% tau1 first delay in experiment
% tau2 vector of mixing times in experiment
% Note: A set of cross peak volumes Ref, the corresponding delay
% times tau2 and the delay tau1 is required.
% 'Sim' returns the fitted peak intensities.
% The algorithm varies the apparent relaxation time T2,
% the cross peak volume at tau2=0 A and the J(HN,Ha) J
% during optimization.
% The Par-vector must contain an apparent relaxation time T2,
% an estimate of the cross peak volume at tau2=0 A and an
% estimate of 3J(HN,Ha).
% Uses: global (none)
% refs: Billeter et al., J.Biomol.NMR 2, 257 (1992).
% Kuboniwa & Bax (1995) JBNMR 4, 871-878.
%-----
if nargin<5
Std= ones(size(tau2));
end
if nargin<4 % only function evaluation
Ref=zeros(size(tau2));
end
if (size(Ref)~=size(tau2))
error('*** fct_hnha - Ref and tau2 vectors do not match ***')
end
if (size(Ref)~=size(Std))
error('*** fct_hnha - Ref and Std vectors do not match ***')
end
Sim=zeros(size(Ref));
%-----
A=Par(1); % cross peak volume at tau2=0
T=Par(2); % apparent relaxation time
J=Par(3); % coupling constant 3J(HN,Ha)
%-----
% Calculate cross peak volumes as a function of tau2
%-----
BAX=1; % see refs. above !
if (~BAX)
cos_pJt1=cos(pi*J*tau1); % scalar
cos_pJt2=cos(pi*J*tau2); % vector
sin_pJt1=sin(pi*J*tau1); % scalar
sin_pJt2=sin(pi*J*tau2); % vector
exp_t2T2=exp(-tau2/T); % vector
Sim(:) = A.*( cos_pJt1*cos_pJt2 - 0.5*sin_pJt1*sin_pJt2 ).*exp_t2T2;
else
% tau1 used apparent T1 relaxation time for H-alpha
T1=tau1;
Jr=sqrt( J^2 - 1/(2*pi*J*tau1)^2 );
Sim(:) = A .* exp(-tau2/T - tau2/T1) .* (cos(pi*Jr*tau2) + sin(pi*Jr*tau2)/(2*pi*Jr*T1));
end
%-----
% Compare with experimental data and impose constraints on the parameters
%-----
if nargin<4 % only function evaluation
chi2 = Sim;
else
chi2 = sum(((Sim - Ref)./Std).^2);
cons = Par.*(Par<=0); % restrict to positive values
chi2 = chi2 + prod(size(Ref))* cons(:)'*cons(:);
end
%-----
return

```

B.8 zoom2d.m

```

function [MX_zoomed,MX_mapped,row_strip,col_strip]=zoom2d(MX,NROW,NCOL);
%-----
% JMS-feb-92
% JMS-oct-93 ported to Matlab4
% JMS-sep-95 revised (2D mapping vector)
% JMS-nov-95 revised (1D mapping vector)
% aim: Interactively zoom part of a matrix (and plot again)
% call: MX_zoomed=zoom2d(MX,NROW,NCOL);
% [MX_zoomed,MX_mapped,row_strip,col_strip]=zoom2d(MX,NROW,NCOL);
% pars: MX full matrix (required)
% MX_zoomed zoomed region
% MX_mapped mapping (sparse) vector
% NCOL col-strip size (optional)
% NROW row-strip size (optional)
% note: If only MX is provided, two corners must be picked.
% If MX and NCOL are provided, a vertical strip is selected.
% If in addition NROW is provided, picking the center of
% the region of interest is sufficient.
% If you define "global LIMITS OFFSET CENTER", you can retrieve
% the coordinates of the zoom region and its center.
% uses: global LEVEL (optionally: LIMITS CENTER OFFSET rows cols)
% function cont2d(), strip2d()
%-----
global LEVEL LIMITS CENTER OFFSET rows cols
%-----
if (nargin<1),
    error('*** zoom2d - No input matrix given, aborted ***')
else
    [rows,cols]=size(MX);
end
if (nargin<3), NCOL=[]; end % dummy argument
if (nargin<2), NROW=[]; end % dummy argument
%-----
cont2d(MX,LEVEL,(1:cols),(1:rows)) % ensure correct axis labels
[row_strip,col_strip,MX_mapped] = strip2d(MX,NROW,NCOL); % select region of interest
MX_zoomed=MX(row_strip,col_strip); % do the selection
[rows,cols]=size(MX_zoomed); % update global rows cols
size_of_region=size(MX_zoomed)
LIMITS=[row_strip(1) row_strip(length(row_strip)) ...
        col_strip(1) col_strip(length(col_strip))]
OFFSET=[LIMITS(1) LIMITS(3)]-1
CENTER= OFFSET+1 + size_of_region/2
if (LEVEL)
    cont2d(MX_zoomed,LEVEL)
else
    cont2d(MX_zoomed)
end
%-----
return

```


B.9 cont2d.m

```

function [ax,xl,y1,tl]=cont2d(MX,Level,axis,yaxis,pcol,ncol,xtext,ytext,ttext);
%-----
% JMS-jan-92 created
% JMS-oct-93 ported to Matlab4
% JMS-may-94 compression included
% JMS-dec-94 revised level facility
% JMS-jun-95 returns graphics object handles
% JMS-nov-95 revised
% aim: 2D-plot of a matrix MX with positive and negative contours.
% call:
% [ax,xl,y1,tl]=cont2d(MX,Level,axis,yaxis,pcol,ncol,xtext,ytext,ttext)
% pars: MX input matrix (required)
% Level positive/negative level vector (optional)
% xaxis x-axis vector (optional)
% yaxis y-axis vector (optional)
% pcol positive color item (optional)
% ncol negative color item (optional)
% xtext x-axis text string (optional)
% ytext y-axis text string (optional)
% ttext title text string (optional)
% uses: global (optionally LEVEL MAX rows cols)
% functions contour(), xlabel(), ylabel(), title()
% note: If the Level argument is omitted, plev and nlev will automatically
% be adjusted to 10, 20, and 40% of the maximum peak height in MX.
% You might want to define "global MAX" to retrieve the maximum.
% If the Level argument is scalar, it is taken as the minimum level.
% The actual plot levels will also be delivered into "global LEVEL".
% Any previously existing global LEVEL vector will be overridden.
%-----
global MAX LEVEL
% display not more points than
LIMX=512;
LIMY=512;
%-----
if nargin<1,
    error('*** cont2d - No input matrix provided ***')
end
[rows,cols]=size(MX); % get matrix dimension
xdiv=ceil(cols/LIMX); xsel=(1:xdiv:cols);
ydiv=ceil(rows/LIMY); ysel=(1:ydiv:rows);
if (xdiv>1 | ydiv>1)
    disp(['*** cont2d - compressed matrix display (XDIV,YDIV)=(...'
        int2str(xdiv) ',' int2str(ydiv) ') ***'])
end
if nargin<9,% default blank title
    ttext='';
else
    if (isempty(ttext)), ttext=''; end
end
if nargin<7,% default axis labeling
    xtext='col #';
    ytext='row #';
else
    if (isempty(xtext)), xtext='col #'; end
    if (isempty(ytext)), ytext='row #'; end
end
zcol='b-'; % default "0" contour coloring
if nargin<5,% default +/- contour coloring
    pcol='r-';
    ncol='g-';
else
    if (isempty(pcol)), pcol='r-'; end
    if (isempty(ncol)), ncol='g-'; end
end
if nargin<3,% default axis scaling
    xaxis=xsel;
    yaxis=ysel;
else
    xaxis=xaxis(xsel);
    yaxis=yaxis(ysel);
end
% contour level processing
if (nargin==1) % find default contour level
% MAX=max(abs(real(MX(:))))); % to be retrieved as global
MAX=max(max(abs(MX)));
Level=MAX/10;
else
    if (isempty(Level))
MAX=max(max(abs(MX)));

```

```

Level=MAX/10;
    else
clear MAX
    end
end
if (length(Level)==1) % predefined contour levels
plev= [4 2 1]*abs(Level);
nlev=-plev;
zlev= [];
    else
plev=Level(Level>0);
nlev=Level(Level<0);
zlev=Level(Level==0);
    end
LEVEL=[plev zlev nlev]; % to be retrieved as global
%-----
% contour plot of real part of matrix
%-----
% if the level argument in "contour" is scalar, it is taken as the
% number of contours to be drawn instead of the level! Therefore:
    if (length(plev)==1) plev=[plev plev]; end
    if (length(nlev)==1) nlev=[nlev nlev]; end
    if (length(zlev)==1) zlev=[zlev zlev]; end
% The argument sequence has changed in CONTOUR, but old structure still works.
figure(gcf), cla
if ~isempty(plev), contour(xaxis,yaxis,real(MX(ysel,xsel)),plev,pcol), end, hold on
if ~isempty(nlev), contour(xaxis,yaxis,real(MX(ysel,xsel)),nlev,ncol), end, hold on
if ~isempty(zlev), contour(xaxis,yaxis,real(MX(ysel,xsel)),zlev,zcol), end, hold off
xlabel(xtext), ylabel(ytext), title(ttext)
% quick hack to reverse the stupid descending PPM scales
if (mean(diff(xaxis))<0), set(gca,'XDir','reverse'), end
if (mean(diff(yaxis))<0), set(gca,'YDir','reverse'), end
if nargin
ax=gca; xl=get(ax,'Xlabel'); yl=get(ax,'Ylabel'); ti=get(ax,'Title');
end
%-----
return

```

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main,
