

Bestimmung der Lösungsstruktur von Rinder-Adrenodoxin durch Auswertung hochaufgelöster NMR-Spektren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Roland Weiß
aus Beuthen in Oberschlesien

Frankfurt am Main, 2001
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Rüterjans
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation: 22. April 2002

Ute und Arne

Danksagung

Meinem akademischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. Heinz Rüterjans, möchte ich für seine umfangreiche Unterstützung und die mir gewährte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas, das stete Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, sowie die Schaffung hervorragender Arbeitsbedingungen herzlich danken. Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1997 bis Oktober 2000 unter seiner Anleitung am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.

Herrn Dr. Helmut Hanssum und Herrn Dipl.-Ing. Rolf Esche danke ich für die Betreuung der NMR-Spektrometer und die vielen anregenden Diskussionen über die NMR-Spektroskopie.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. Frank Löhr. Er hat mit seinen herausragenden Kenntnissen der NMR-Spektroskopie entscheidenden Anteil an den hochwertigen Spektren, die den vorliegenden Analysen zugrunde liegen.

Frau Dr. Judith Hartleib danke ich für Ihre sehr geduldige Einführung in die Proteinpräparation.

Herrn Dipl.-Chem. Dirk Beilke danke ich für seine fortwährende Hilfe bei der Zuordnung.

Herrn Dr. Primoz Pristovzek danke ich für die Einarbeitung in sein Zuordnungsprogramm nmr2s.

Herrn Dipl.-Biochem. Christian Ludwig danke ich für die stete Hilfe bei Problemen mit Matlab.

Der Betrieb und die Verwaltung des UNIX- und des PC-Computer-Netzwerkes lagen bei Herrn Dipl.-Chem. Ulrich Schiborr und Herrn Dipl.-Ing. Bernd Weyrauch sowie Herrn Dr. Matthias Haun und Herrn Dipl.-Chem. Thorsten Brandau in den besten und stets hilfsbereiten Händen.

Allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die ausgezeichnete familiäre Atmosphäre bei der Arbeit und im Kaffeeraum.

Den größten Dank und nur an dieser Stelle zuletzt schulde ich meiner Frau und meinem Sohn für Ihre vielseitige und ausdauernde Unterstützung und Ihr Verständnis während meiner gesamten Doktorandenzeit.

Abkürzungen

Adx	Rinder-Adrenodoxin
COSY	correlation spectroscopy
ct	constant time
DIPSI	decoupling in the presence of scalar interactions
E. coli	Escherichia coli
FID	free induction decay
FT	Fouriertransformation
GARP	globally optimized, alternating-phase rectangular pulses
h	Stunde
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
INEPT	insensitive nuclei enhanced by polarization transfer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
M	mol/l
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser enhancement
NOESY	nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
OD	optische Dichte
ppm	parts per million
rf	radio frequency
sl	spin lock
TM	Trade Mark
TOCSY	total correlated spectroscopy
TPPI	time proportional phase incrementation
Watergate	water suppression by gradient tailored excitation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Katalytische Funktion und Struktur des Rinderadrenodoxins	2
2	Theorie	9
2.1	Mehrdimensionale Puls-FT NMR-Spektroskopie	9
3	Material und Methoden	13
3.1	Transformation von E. coli BL21	13
3.2	Wachstum von E. coli BL21 und Expression von bAdx in N15-Medium	14
3.3	Ernte und Aufschluß der Bakterienzellen	14
3.4	Reinigung des $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -angereicherten Adrenodoxins	15
3.5	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von bAdx	16
3.5.1	Erste Ammoniumsulfatfällung	17
3.5.2	Zweite Ammoniumsulfatfällung	17
3.6	Hydrophobe Interaktionschromatographie von bAdx mit Phenyl-Sepharose	17
3.7	Ionenaustauschchromatographie von bAdx mit Q - Sepharose-FF .	19
4	NMR-technische Methoden	21
4.1	Experimente zur sequentiellen Zuordnung	21
4.1.1	Das 3D HNHB-Experiment	21
4.1.2	Das 3D HNCA-Experiment	22
4.1.3	Das 3D HN(CO)CA-Experiment	24
4.1.4	Das 3D H(N)CA,CO-Experiment	25
4.1.5	Watergate-Schema	26
4.1.6	Das 3D HCACO-Experiment	26
4.1.7	Das 3D HNCACB-Experiment	27
4.1.8	Das 3D HNCO-Experiment	28
4.1.9	Das 3D (HCA)CO(CA)NH-Experiment	29
4.1.10	Das 3D HBHA(CO)NH	32

4.2	Experimente zur Seitenkettenuordnung	32
4.2.1	Das 3D TOCSY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment	32
4.2.2	Das 3D (H)CC(CO)NH-TOCSY Experiment	33
4.2.3	Das 3D HCCH-TOCSY-Experiment	35
4.3	Experimente zur Strukturbestimmung	36
4.3.1	Das 3D NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment	36
4.3.2	Das 3D NOESY-(^{13}C , ^1H)-HSQC-Experiment	37
4.3.3	Das NOESY-(^{13}C , ^1H)-HSQC-Experiment zur Detektion der aromatischen Aminosäurereste	38
4.4	Experiment zur Bestimmung von Amid-Protonen T_1 -Zeiten	39
4.4.1	Das ct-(^{15}N , $^1\text{H}^N$)-HSQC-Experiment	39
4.4.2	Extraktion der Amid-Protonen- T_1 -Zeiten	40
4.5	Spektrenreferenzierung und Prozessierung der Spektren	41
4.5.1	Spektrenreferenzierung	41
4.5.2	Prozessierung der Spektren	41
4.6	Bestimmung der Lösungsstruktur von Proteinen	42
4.6.1	Distanzgeometrie-Rechnungen mit DYANA	42
4.6.2	Ergänzung der DYANA-Bausteinbibliothek um den künst- lichen Aminosäurerest CYSC	44
4.6.3	Verwenden der REDAC-Strategie	45
5	Ergebnisse und Diskussion	46
5.1	Zuordnung der Resonanzen des oxidierten Rinder Adrenodoxins	46
5.2	Zuordnung der Resonanzen des reduzierten Rinder-Adrenodoxins	48
5.3	Zuordnung der ^1H - und ^{15}N - Resonanzen	48
5.4	Zuordnung der ^{13}C - Resonanzen	50
5.4.1	Korrelation der Resonanzen des Proteinrückgrates	51
5.4.2	Beschreibung der ^{13}C -Experimente	52
5.5	Zuordnungsstrategie	59
5.6	Ermittlung von Sekundärstrukturelementen	59
5.6.1	Identifizierung relevanter NOE's	61
5.6.2	Der Chemical Shift Index (CSI)	62

5.7	Bestimmung von Abstandsbeschränkungen mittels Amid-Protonen- T ₁ -Zeiten	64
5.8	Die Struktur von Adrenodoxin	70
5.8.1	Zusammenstellung der geometrischen Randbedingungen . .	70
5.8.2	Die künstliche Aminosäure CYSC in der DYANA-Rechnung	71
5.8.3	Durchführung der Strukturberechnung	75
5.8.4	Vergleich der Strukturensamples der oxidierten und der re- duzierten Form	76
5.8.5	Die Strukturen von Rinder-Adrenodoxin	81
6	Zusammenfassung	95
A	Anhang	98
A.1	Oxidiertes Adrenodoxin	98
A.1.1	Chi-1 Frequenzverteilung	98
A.1.2	Chi-2 Frequenzverteilung	101
A.1.3	Individuelle Ramachandran-Diagramme	103
A.2	Reduziertes Adrenodoxin	109
A.2.1	Chi-1 Frequenzverteilung	109
A.2.2	Chi-2 Frequenzverteilung	112
A.2.3	Individuelle Ramachandran-Diagramme	114
A.3	Zuordnungstabelle für den oxidierten Zustand	120
A.4	Zuordnungstabelle für den reduzierten Zustand	126
A.5	Graphen für die T ₁ -Relaxationsraten des red. Adrenodoxins . . .	132
B	Literatur	143

1 Einleitung

Eines der Hauptziele in der Proteinforschung ist die Aufklärung der Struktur, um ihre Wirkungsweise zu verstehen. Die Aminosäureanalyse nach vollständiger Hydrolyse aller Peptidbindungen des Proteins liefert die für ein Protein verwendeten Bausteine. Die Bestimmung der Primärstruktur eines Proteins, also der Reihenfolge, in der diese Aminosäuren verknüpft sind, ist durch sequentiellen Abbau und anschließende Identifikation der N-terminalen Aminosäuren (Edmann-Abbau) schon seit Jahren Routine.

Trotz aller Bemühungen ist es bislang nicht gelungen, auf theoretischem Weg aus der Primärstruktur auf die dreidimensionale Tertiärstruktur eines Proteins zu schließen. Es haben sich aber zwei grundsätzlich verschiedene experimentelle Verfahren zur Aufklärung der Proteinstruktur etabliert: die Beugung von Röntgenstrahlen am Protein-Einkristall [1] und die NMR-Spektroskopie [2].

Die NMR-Spektroskopie ist eine sehr unempfindliche Methode, so daß Proteinkonzentrationen von mindestens 1 mM erforderlich sind, d. h. die untersuchten Proteine müssen in großer Menge zugänglich sein. Die Entwicklung molekularer Klonierungstechniken [3] bietet eine Methode zur Herstellung großer Proteinmengen und erlaubt zudem die spezifische Veränderung von Proteinen durch ortsspezifische Mutagenese sowie die Anreicherung der NMR-aktiven Isotope ^{15}N und ^{13}C .

Die Anreicherung mit diesen Isotopen liefert die Möglichkeit, auch Informationen über die Kohlenstoff- und Stickstoffresonanzen aus den NMR-Experimenten zu erhalten, wodurch das molekulare und dynamische Bild der Proteinstruktur verfeinert werden kann.

Bei der Strukturuntersuchung elektronentransportierender Proteine hofft man, aus NMR-Daten den bis heute ungeklärten Mechanismus des Elektronentransports zu ermitteln. Da viele elektronentransportierende Proteine Metalloproteine sind, ist die Untersuchung solcher Proteine mittels NMR aufgrund des Paramagnetismus der Übergangsmetallatome schwierig. Paramagnetische Atome führen durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ungepaarter Elektronen mit den Kernspins in ihrer Umgebung zu einer Verkürzung der longitudinalen Relaxationszeit und

damit zu einer extremen Linienverbreiterung der Resonanzen von Kernspins in der Umgebung des paramagnetischen Ions.

1.1 Katalytische Funktion und Struktur des Rinderadrenodoxins

Adreno-Ferredoxin (Adrenodoxin/Adx) ist ein kleines [2Fe-2S]-Protein aus der Ferredoxinfamilie und Bestandteil der mitochondrialen Elektronentransportkette für die Steroidhormonhydroxylierung. Diese Elektronentransportkette enthält neben Adx das Flavoenzym NADPH-Adrenodoxin-Reduktase und das Cytochrom P-450_{ssc} bzw. das Cytochrom P-450_{11 β} .

Adx kommt in den Mitochondrien Steroidhormon synthetisierender Organe, wie der Nebennierenrinde [4], der Plazenta [5], und den Gonaden [6] sowie in geringen Mengen in der Leber [7, 8, 9], der Niere [10, 11, 12] und dem Gehirn [13] vor.

Adx wird als Vorläuferprotein (MG \sim 19 kD) an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert [14, 15, 16] und anschließend in die Mitochondrien aufgenommen. Das für die Aufnahme in die Mitochondrien erforderliche N-terminale Leitpeptid (58 Aminosäuren) wird nach dem Transport in der mitochondrialen Matrix durch eine Metalloprotease abgespalten, wobei das reife Adx entsteht [17, 18].

Sowohl die Synthese des Adrenodoxins als auch die Synthese der Adrenodoxin-Reduktase und der Cytochrome P-450_{ssc} bzw. P450_{11 β} wird in der Nebennierenrinde in koordinierter Weise durch Adrenocorticotropin und in den Granulazellen der Ovarien durch Gonadotropine stimuliert [19, 20, 21, 22, 23, 24]. Die durch ACTH bzw. Gonadotropine ausgelöste Stimulation der Proteinsynthese wird dabei durch cAMP vermittelt [25].

Die Primärstruktur des Rinderadrenodoxins (bAdx) wurde zuerst durch Aminosäuresequenzierung [26] aufgeklärt und später durch cDNA-Sequenzierung [27] vervollständigt. Während die Aminosäuresequenzierung des bAdx zunächst auf ein aus 114 Aminosäuren bestehendes Protein hinwies, konnte erst durch Sequenzierung der cDNA ein vollständiges Bild der Primärstruktur erhalten werden. So konnte die Existenz des basischen N-terminalen Leitpeptids aus 58 Aminosäu-

Ala: 7	Cys: 5	His: 3	Met: 5	Thr: 10
Arg: 5	Gln: 3	Ile: 10	Phe: 4	Tyr: 1
Asn: 6	Glu: 10	Leu: 12	Pro: 1	Val: 7
Asp: 13	Gly: 9	Lys: 6	Ser: 10	

Tabelle 1: Anzahl der jeweiligen Aminosäure-Reste des Adx

ren, das für die Aufnahme des Adrenodoxins in die Mitochondrien erforderlich ist, nachgewiesen werden. Ferner konnte eine C-terminale Erweiterung von 14 Aminosäuren identifiziert werden.

Die Anwesenheit der C-terminalen Extension in mitochondrialem Adx konnte durch Immunoblots steroidaler Gewebe mittels Antikörper gegen dieses Peptid nachgewiesen werden [28].

Die Analyse des C-Terminus nach Aufreinigung von bAdx aus frischer Rinderiere ergab, daß die C-terminale Erweiterung im reifen Adx enthalten ist [29], bei längerer Inkubation des Rohlysats jedoch entfernt wird, was auf einen proteolytischen Abbau des Proteins hinweist. Dafür spricht auch, daß bei der Isolation von Adx aus Rinderiere die Existenz multipler Adx-Formen, die in ihrer Aminosäurezahl von 114 [26], 121, 124 125 [30] bzw. 127 [29] variieren, nachgewiesen wurde. Zudem gelang es [31], bei der Aufreinigung des Adrenodoxins in Gegenwart von Proteaseinhibitoren, ein Protein aus 128 Aminosäuren zu isolieren.

Die Primärstruktur des nativen Rinderadrenodoxins besteht demnach aus 128 Aminosäuren (Abb.1). Für das reife, aus 128 Aminosäuren bestehende Protein, ist die Aminosäurezusammensetzung in Tabelle 1 aufgeführt.

Anhand der Aminosäurezusammensetzung ist zu erkennen, daß bAdx ein extrem saures Protein ist ($pI \sim 4$), das insgesamt 23 saure und 11 basische Aminosäuren enthält.

Die mitochondriale Elektronentransportkette zur Hydroxylierung von Steroidhormonen dient der Aktivierung des für die Hydroxylierung erforderlichen molekularen Sauerstoffs. In dieser Elektronentransportkette werden die Elektronen

```

1
GTTCCCGACAGTGCT ATG GCC GCA CGC CTC CTG CGC GTC GCC TCC GCC GCC CTC GGC GAC ACG GCC GGC CCG TGG CGG CTT CTC
Met Ala Ala Arg Leu Leu Arg Val Ala Ser Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Gly Arg Trp Arg Leu Leu
-50 -40
90
GTG CGA CCG CCG GCG GGA GCC GGC GGC CTC CGT GGG AGC CGA GGA CCG GGC CTG GGC GGC GGC GCA GTG GCG ACG CCG ACG
Val Arg Pro Arg Ala Gly Ala Gly Gly Leu Arg Gly Ser Arg Gly Pro Gly Leu Gly Gly Ala Val Ala Thr Arg Thr
-30 -20 -10
180
CTG AGC GTA TCG GGG CGA GCG CAG AGC AGC TCA GAA GAT AAA ATA ACA GTC CAC TTT ATA AAC CGT GAT GGT GAA ACA TTA
Leu Ser Val Ser Gly Arg Ala Gln Ser Ser Ser Glu Asp Lys Ile Thr Val His Phe Ile Asn Arg Asp Gly Glu Thr Leu
-1 1 10
270
ACA ACC AAA GGA AAA ATT GGT GAC TCT CTG CTA GAT GTT GTG GTT CAA AAT AAT CTA GAT ATT GAT GGT TTT GGT GCA TGT
Thr Thr Lys Gly Lys Ile Gly Asp Ser Leu Leu Asp Val Val Val Gln Asn Asn Leu Asp Ile Asp Gly Phe Gly Ala Cys
20 30 40
360
GAG GGA ACC TTG GCT TGT TCT ACC TGT CAC CTC ATC TTT GAA CAG CAC ATA TTT GAG AAA TTG GAA GCA ATC ACT GAT GAG
Glu Gly Thr Leu Ala Cys Ser Thr Cys His Leu Ile Phe Glu Gln His Ile Phe Glu Lys Leu Glu Ala Ile Thr Asp Glu
50 60 70
450
GAG AAT GAC ATG CTT GAT CTG GCA TAT GGA CTA ACA GAT AGA TCG CGG TTG GGC TGC CAG ATC TGT TTG ACA AAG GCT ATG
Glu Asn Met Leu Asp Leu Ala Tyr Gly Leu Thr Asp Arg Ser Arg Leu Gly Cys Gln Ile Cys Leu Thr Lys Ala Met
80 90 100
540
GAC AAT ATG ACT GTT CGA GTA CCT GAT GCC GTG TCT GAT GCC AGA GAG TCC ATT GAT ATG GGC ATG AAC TCC TCA AAG ATA
Asp Asn Met Thr Val Arg Val Pro Asp Ala Val Ser Asp Ala Arg Glu Ser Ile Asp Met Gly Met Asn Ser Ser Lys Ile
110 120
653
GAA TAA ATAGGAATATTTTCACAACATTTTACCCTATTTTATAATTATTATTTCTTAATGTAATAAATGAGAcacatggatgaatggaaaaaaaaaa
Glu End

```

Abbildung 1: Aminosäure- und cDNA -Sequenz des bAdx. Das vermeintliche poly(A)-Signal auf der cDNA ist unterstrichen, die aminoternale Spaltungsstelle ist durch den Buchstaben Ä gekennzeichnet.

zunächst vom NADPH über die NADPH-Adrenodoxin-Reduktase auf Adx übertragen. Von Adrenodoxin werden die beiden Elektronen dann in zwei Schritten auf das membranständige Cytochrom P-450_{sc} bzw. Cytochrom P-450_{11β} übertragen [32]. Die beiden Cytochrome katalysieren in einer Monooxygenasereaktion die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon unter Aufnahme von 6 Elektronen und 3 Molekülen Sauerstoff [33, 34] bzw. die 11β- und 18-Hydroxilierung von Steroidhormonen [35], wozu zwei Elektronen und ein Molekül Sauerstoff erforderlich sind.

Für den Prozeß des Elektronentransfers wurden drei mögliche Modelle postuliert:

1. die Übertragung der Elektronen über einen ternären Komplex aus Adrenodoxin-Reduktase, Adrenodoxin und Cytochrom P-450 [36],
2. das Auftreten von 2 Molekülen Adx in der Elektronentransportkette [37],
3. das sog. Shuttle-Modell [38, 39], nach dem Adx als mobiler Elektronencarrier zwischen Adrenodoxin-Reduktase und Cytochrom dient.

Thermodynamische und kinetische Daten scheinen das Shuttle-Modell zu bestätigen. So konnte durch kinetische Studien [40] nachgewiesen werden, daß oxidiertes Adrenodoxin bei niedrigen Ionenstärken einen 1:1-Komplex mit der Adrenodoxin-Reduktase bildet, während das reduzierte Protein in einem 1:1-Komplex mit Cyt P-450 vorliegt.

Die Tatsache, daß hohe Ionenstärken sowohl die Wechselwirkung des Adx mit der Adrenodoxin-Reduktase als auch mit Cyt P-450 inhibieren [38, 39], weist darauf hin, daß die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen elektrostatischer Natur sind und daß die Bindungsstellen des Adx für die Adrenodoxin-Reduktase bzw. Cyt P-450 überlappen. Weitere Hinweise auf die elektrostatische Natur der Bindung erhielt man durch chemische Modifikation [41] und ortsspezifische Mutagenese [42, 43, 44, 45, 46]. Danach sind an der Wechselwirkung negativ geladene Aspartat- und Glutamat-Seitenketten des Adx und positiv geladene Reste auf der Oberfläche der Adrenodoxin-Reduktase bzw. Cyt P-450 beteiligt.

Die ortsspezifische Mutagenese einzelner acider Reste in der Bindungsdomäne des Adx [47] weist des weiteren darauf hin, daß die Bindungsstellen für die Reduktase und Cyt P-450 zwar überlappen, aber nicht identisch sind. Vor allem Asp76 und Asp79 scheinen essentiell für die Bindung beider Proteine zu sein, während andere acide Reste in dieser Domäne einen geringen Einfluß auf die Bindung haben. Für ein differentielles Bindungsverhalten von Adrenodoxin-Reduktase und Cyt P-450 spricht auch, daß die Bindung des Cyt P-450 von Tyr82 des Adrenodoxins abhängig ist, während Tyr82 keinen Einfluß auf die Bindung der Reduktase hat [48]. Außerdem unterscheidet sich die Bindungsaffinität C-terminaler Deletionsmutanten des Adx für die Reduktase und Cyt P-450_{ssc} bzw. Cyt P-450_{11β} [49]. Daraus kann auch auf eine Beteiligung des C-Terminus an der Regulation der Bindung der Partnerproteine geschlossen werden. Unter Berücksichtigung der bisher bekannten thermodynamischen, kinetischen und NMR-spektroskopischen Daten ergibt sich für den Elektronentransfer von NADPH über Adrenodoxin-Reduktase und Adrenodoxin auf Cyt P-450 folgendes Modell:

1. Oxidiertes Adx bildet einen festen 1:1-Komplex mit der Reduktase, wobei bei der Bindung das Redoxpotential des Adx um mehr als 80mV verschoben wird,

um die Reduktion des Adx zu ermöglichen.

2. Die Reduktion des Adrenodoxins führt zu einer Konformationsänderung des [2Fe-2S]-Clusters, die über His56 auf die acide Bindungsdomäne des Adx übertragen wird [50] und zur Dissoziation des Adrenodoxin- Adx-Reduktase-Komplexes führt.

3. Das reduzierte Adx bindet nun an Cyt P-450, und zwar bevorzugt an die oxidierte Form, die bereits Substrat gebunden hat [51]. Bei der Komplexbildung verschiebt sich das Redoxpotential des Adx um +20 mV, das des Cyt P-450 um 30 mV [52]. Außerdem induziert die Komplexbildung im Cytochrom eine Konformationsänderung, die vermutlich essentiell für eine effiziente Hydroxylierung des Substrats ist [43].

4. Bei der Übertragung des Elektrons von Adrenodoxin auf Cyt P-450 geht das Häm-Eisen vom "low spin" in den "high spin"-Zustand über [53], in dem dann die Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff erfolgt.

5. Das oxidierte Adx dissoziiert schließlich von Cyt P-450 ab und geht den stabileren Komplex mit der Adx-Reduktase ein.

Die sequentielle Protein-Protein-Wechselwirkung scheint dabei über die Redoxpotentiale der drei Enzyme [52] sowie über die bei der Elektronenübertragung auftretende Konformationsänderung reguliert zu werden. Auch oxidiertes Adx könnte bei der Regulation eine Rolle spielen, da es mit reduziertem Adx um die Bindung an Cyt P-450 konkurriert [54].

Im Folgenden soll auf die Struktur des [2Fe-2S]-Clusters und auf die durch den [2Fe-2S]-Cluster bedingten Eigenschaften des Adrenodoxin eingegangen werden. Das pH-abhängige Redoxpotential des Adx beträgt 300 mV und wird durch Thr54 moduliert, das vermutlich eine Wasserstoffbrücke zu einem Schwefelatom des Eisen-Schwefel-Clusters bildet [55]. Im reduzierten Zustand zeigt Adx ein für [2Fe-2s]-Proteine charakteristisches EPR-Spektrum [56, 57, 58]. Magnetische Suszeptibilitätsmessungen weisen darauf hin, daß nur eines der beiden Eisentome in reduziertem Adx zu den charakteristischen Signal ($g = 1,94$) beiträgt [59].

EPR- [60] und Mößbauer-Spektren [61] sprechen dafür, daß die Spins der Eisenatome in [2Fe-2S]-Proteinen antiferromagnetisch gekoppelt sind, was im oxidierten Zustand bei tiefen Temperaturen zu einem Nettospin von 0 führt, d.h. die Proteine sind diamagnetisch. Im reduzierten Zustand ergibt die Kopplung dagegen einen Nettospin von $\frac{1}{2}$.

Die Struktur des [2Fe-2S]-Clusters aus Vertebraten-Ferredoxinen ist bisher nur in der Röntgenstruktur eines verkürzten Rinder-Adrenodoxin (6 - 108) im oxidierten Zustand aufgeklärt [62]. Vergleiche mit ORD- und CD-Spektren von Vertebraten- und Pflanzen-Ferredoxinen weisen weiter darauf hin, daß die Clusterstrukturen dieser Proteine eine ähnliche Struktur aufweisen [6], daß jedoch konformationelle Unterschiede des Eisen-Schwefel-Clusters zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand bestehen.

Aus Resonanz-Raman-Spektren von Pflanzen-Ferredoxinen und Adx konnte auf die Existenz eines ausgedehnten Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen freien bzw. proteingebundenen Schwefelatomen des [2Fe-2S]-Clusters und Amidprotonen des Proteinrückgrats geschlossen werden [63]. Die Existenz eines solchen Wasserstoffbrückennetzwerkes konnte durch Röntgenstrukturuntersuchungen an Pflanzen-Ferredoxinen bestätigt werden [64, 65].

Während das Wasserstoffbrückennetzwerk in Pflanzen- und Vertebraten-Ferredoxinen ähnlich zu sein scheint, weisen Unterschiede in den Kontaktverschiebungen von ^1H -Resonanzen in Pflanzen- und Vertebraten-Ferredoxinen bei NMR-Messungen darauf hin, daß die Elektronendelokalisation in reduzierten [2Fe-2S]-Clustern von Pflanzen- bzw. Vertebraten-Ferredoxin unterschiedlich ist [47].

Die Identität der an der Koordination des Eisens beteiligten Cysteinreste des Adx konnte erstmals durch chemische Mutation der Cysteine [66] sowie durch EPR-Analyse von Mutanten, in denen einzelne Cysteinreste durch Serin ersetzt waren [67], und schließlich in der Röntgenstruktur (Abb.2) des verkürzten Adrenodoxins (6 - 108) [62] nachgewiesen werden.

NMR-Messungen an oxidiertem und reduziertem Adx ergaben, daß sich bei der Reduktion des Adx die Konformation der aciden Bindungsdomäne ändert [68]. Nach einem von Miura postulierten Modell sollen die Konformationsänderungen

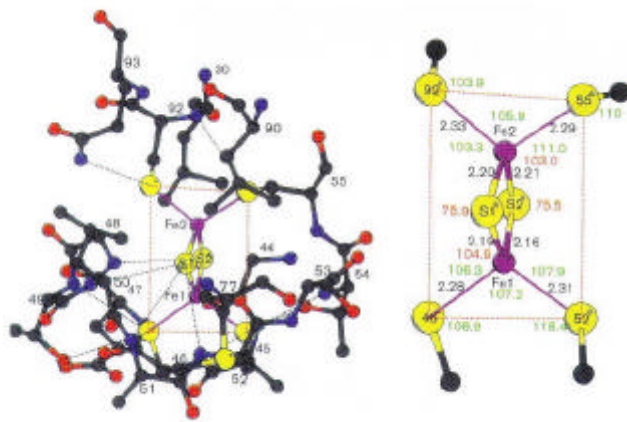


Abbildung 2: Koordination der 4 eisengebundenen Cysteine und deren Umgebung im Protein (Ausschnitt aus der Röntgenstruktur; Uhlmann et al., 1998)

des [2Fe-2S]-Clusters bei der Reduktion über His56 auf die acide Bindungsdomäne übertragen werden. Für dieses Modell spricht zum einen, daß durch NMR- und Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden konnte, daß sich His56 in der Nähe von Tyr82 und damit in der Nähe der aciden Bindungsdomäne befindet, zum anderen, daß eine chemische Modifizierung des His56 die Bindung des Adrenodoxins an Cyt P-450 hemmt [69]. Außerdem sprechen NOE-Daten dafür, daß His56 eine Wasserstoffbrücke mit dem in der aciden Bindungsdomäne gelegenen Ser88 eingeht [50], über die die Konformationsänderungen übertragen werden könnten.

Die vorliegende Arbeit ist folgendermaßen aufgeteilt: Zunächst sollen Prinzipien der NMR-Spektroskopie erläutert werden, die zum Verständnis der angewandten Techniken von Bedeutung sind. Im methodischen Teil werden die Präparation, Pulssequenzen und die wichtigsten Komponenten der eingesetzten NMR-Spektrometer beschrieben. Es schließen sich grundsätzliche Bemerkungen zum "set-up" der Experimente und ihrer Anwendung an. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird hier darauf verzichtet, explizite Parameter der einzelnen Experimente aufzuzählen. Diese werden statt dessen, sofern sie im jeweiligen Zusammenhang relevant sind, im Anhang angegeben. Im Kapitel "Ergebnisse und

Diskussion“ soll die Vorgehensweise bei der Resonanzzuordnung, die Extraktion von NOE-Information sowie die Bestimmung von Kopplungskonstanten beschrieben werden.

2 Theorie

2.1 Mehrdimensionale Puls-FT NMR-Spektroskopie

Bedingt durch ihre Ladung besitzen Atomkerne mit einem Eigendrehimpuls ein magnetisches Dipolmoment μ :

$$\mu = \sqrt{I(I+1)}\gamma\hbar \quad (1)$$

Die Kernspinquantenzahl I kann die Werte $I = 0, 1/2, 1, 3/2, \dots$ usw. annehmen; das magnetogyrische Verhältnis γ ist eine für das jeweilige Isotop charakteristische Konstante. In einem äußeren, statischen Magnetfeld B_0 gibt es $2I + 1$ mögliche Orientierungen des magnetischen Dipolmomentes relativ zur Feldrichtung z . Die bei Untersuchungen an Biomakromolekülen wichtigsten Kerne ^1H , ^{31}P , ^{13}C und ^{15}N haben einen Kernspin von $I = \frac{1}{2}$. Für die beiden Anordnungen der Spins im Magnetfeld ergeben sich in diesem Fall die folgenden Energiewerte (Kern-Zeeman-Niveaus):

$$E_\alpha = -\frac{1}{2}\gamma B_0\hbar \quad (2)$$

$$E_\beta = \frac{1}{2}\gamma B_0\hbar \quad (3)$$

Mit $\Delta E = h\nu$ folgt daraus die Resonanzbedingung der NMR-Spektroskopie:

$$\omega_n = |\gamma| B_0 (1 - \sigma_n) \quad (4)$$

In der klassischen Betrachtungsweise ist ω die Frequenz, mit der die magnetischen Momente der Kerne um die Richtung des Magnetfeldes präzedieren (Larmorfrequenz). Der Abschirmungsterm σ_n wird von der elektronischen Umgebung

des Kernes n bestimmt, so daß im allgemeinen chemisch nicht-äquivalente Kerne unterschiedliche Resonanzfrequenzen besitzen. Das von der Magnetfeldstärke unabhängige Maß der Beeinflussung der Resonanzfrequenzen einer Kernsorte ist die in ppm angegebene chemische Verschiebung δ :

$$\delta_n = \frac{\omega_n - \omega_{ref}}{\omega_{ref}} \cdot 10^6 \quad (5)$$

In vielen Fällen lassen sich bestimmte Molekülgruppen durch die typischen Resonanzfrequenzen ihrer Kerne identifizieren. Für Proteine ist dies allerdings aufgrund der großen Anzahl sich wiederholender Einheiten unmöglich. Ist jedoch die Resonanzzuordnung bereits erfolgt, so läßt die chemische Verschiebung oftmals Aussagen über elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Torsionswinkel der Proteinhauptkette, die Nähe von Aromaten (Ringstromeffekte) und in speziellen Fällen über paramagnetische Effekte durch ungepaarte Elektronen zu.

Da die Besetzung der Kern-Zeeman-Niveaus der Boltzmann-Verteilung folgt, gibt es einen Überschuß an Kernen mit der energieärmeren α -Spineinstellung, aus dem eine makroskopische Magnetisierung M_0 parallel zum B_0 -Feld resultiert, man spricht von longitudinaler oder z -Magnetisierung. Übergänge zwischen den Spinzuständen und damit eine Änderung der Populationsdifferenzen können durch Radiofrequenzpulse der Frequenz ω_0 induziert werden. Ein sogenannter 180° -Puls entspricht der Energie, die notwendig ist, um die Magnetisierung zu invertieren, während ein 90° -Puls, ausgehend von z -Magnetisierung, Komponenten der makroskopischen Magnetisierung mit senkrechter Orientierung zum Magnetfeld erzeugt (transversale oder x,y -Magnetisierung). Die Anregungsbandbreite der Radiofrequenzpulse hängt von deren Leistung und des zeitlichen Verlaufs von Amplitude und Phase ab.

Durch die Kopplung der magnetischen Momente mit anderen Freiheitsgraden des umgebenden Mediums kann ein Ensemble von Spins nach der Einstrahlung von Energie wieder in das thermodynamische Gleichgewicht zurückkehren. Dieser Prozeß nimmt einen exponentiellen Verlauf mit zwei verschiedenen Zeitkonstanten T_1 und T_2 für longitudinale Nicht-Gleichgewichtsmagnetisierung (M_z) bzw.

transversale Magnetisierungs-komponenten ($M_{x,y}$) (Bloch, 1946):

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (6)$$

$$\frac{dM_{x,y}}{dt} = -\frac{M_{x,y}}{T_2} \quad (7)$$

Transversale Komponenten führen eine Rotation um die B_0 -Achse mit einer Resonanzfrequenz der jeweiligen Kerne aus. In einer in der transversalen Ebene angebrachten Spule wird dabei eine Spannung induziert. Das aufgezeichnete Signal $s(t)$ wird als freier Induktionsabfall ("free induction decay", FID) bezeichnet. Eine Fourier-Transformation (FT) generiert daraus das Spektrum $S(\omega)$, das die Resonanzfrequenzen der angeregten Kerne zeigt [70, 71].

Während eines Radiofrequenzpulses wird dem B_0 -Feld ein senkrecht dazu liegendes Feld $B_1 \cdot \cos(\omega t)$ überlagert. Die Beschreibung der Bewegung von Magnetisierungs-komponenten unter dem Einfluß dieser beiden Felder sowie von chemischer Verschiebung und Spin-Spin-Kopplungen wird durch die Einführung eines mit der Frequenz ω_0 um die Magnetfeldrichtung rotierenden Koordinatensystems vereinfacht. Experimentell wird analog dazu vor der Digitalisierung des FID die Trägerfrequenz des Radiofrequenzsenders von den Frequenzen der empfangenen Signale subtrahiert.

Jedes Fourier-Transform NMR-Experiment besteht aus einer Präparationsphase, in der sich longitudinale Magnetisierung aufbaut, die dann unter dem Einfluß von Pulsen in transversale Magnetisierung, also einen Nicht-Gleichgewichtszustand, überführt wird, und einer Detektionsphase, in der die Präzessionsfrequenzen der angeregten Kerne im rotierenden Koordinatensystem aufgezeichnet werden. Ein eindimensionales Experiment enthält im einfachsten Fall einen Puls und liefert Informationen über die Werte der chemischen Verschiebung der Kerne, weitere Informationen kann man gegebenenfalls durch die Linienbreite und die Feinstruktur der Signale sowie über transversale Relaxationszeiten T_2 und Spin-Spin-Kopplungen erhalten. Das gleiche Resultat kann im Prinzip, wenn auch in einer deutlich längeren Aufnahmezeit, mit der älteren Methode der kontinuierlichen Einstrahlung von Radiowellen ("continuous wave", CW) erhalten werden.

Hier findet sozusagen die Anregung, die Evolution des beobachteten Systems und die Detektion simultan statt, wodurch die experimentellen Freiheitsgrade stark eingeschränkt sind. Die Separation dieser drei Elemente in der Puls-FT Spektroskopie hat eine Reihe von Vorteilen: Es gibt eine Vielzahl möglicher Anregungsschemen, es können zusätzliche Zeitvariablen eingeführt werden und die von der Detektion unabhängige Evolution erlaubt das Erfassen nicht direkt detektierbarer Phänomene, wie z.B. der Multiquantenkohärenzen.

In mehrdimensionalen Experimenten wird ein Signal durch die Koordinaten entlang mehrerer Frequenzachsen charakterisiert. Der entscheidende Vorteil gegenüber 1D Spektren ist das Aufdecken von Wechselwirkungen der Spins anhand sogenannter Kreuzsignale, die unterschiedliche Frequenzen in den einzelnen Dimensionen, nämlich die Resonanzfrequenzen der beteiligten Kerne, besitzen. Darüber hinaus können bestimmte Parameter wie chemische Verschiebungen, skalare Kopplungen und Linienbreiten einzeln detektiert werden.

Ein zweidimensionales NMR-Experiment wurde erstmals von Jeener 1971 [72] vorgeschlagen und von Ernst und Mitarbeitern wiederaufgegriffen und experimentell verwirklicht [73, 74, 75]. Das zugrunde liegende Prinzip läßt sich auf drei [76, 77, 78, 79, 80] oder vier [81, 82] Dimensionen ausdehnen. Spektrale Frequenzachsen werden erzeugt durch die Einführung von (im allgemeinen) systematisch inkrementierten Wartezeiten, während derer transversale Magnetisierung präzedieren kann. Auf einer dieser sogenannten Evolutionszeiten folgt eine Mischperiode, in der unter dem Einfluß eines oder mehrerer Pulse ein Austausch von Spinsystem-Zuständen und damit eine Übertragung von Magnetisierung stattfindet. Das allgemeine Schema für ein n-dimensionales Experiment ist demnach [83, 84]:

$$\textit{Präparation} - [\textit{Evolution}(t_1) - \textit{Mischung}(i)]_{n-1} - \textit{Detektion}(t_n)$$

mit $i=1, \dots, n-1$. Das t_n detektierte Signal verändert sich mit der Dauer jeder der Evolutionszeiten t_1 bis t_{n-1} , da die Spinsysteme sich zu Beginn der Mischungsperioden in immer anderen Zuständen befinden. Mit der Aufnahme einer Datenmatrix $s(t_1, \dots, t_n)$, also einer Serie von FID's für unabhängig von einan-

der zunehmenden Werten der Evolutionszeiten, erreicht man eine indirekte Frequenzmarkierung der beteiligten Kerne. Diese Frequenzen können nach einer n-dimensionalen Fourier-Transformation entlang den Koordinaten des Spektrums $S(F_1, \dots, F_n)$ abgelesen werden.

Neben der Dispersion der Signale steigt mit zunehmender Dimensionalität zwangsläufig auch der Informationsgehalt von NMR-Spektren. Da homonukleare Protonen-Spektren nie ganz aufgelöst werden können, hilft man sich in diesem Fall mit den Isotopen ^{13}C und ^{15}N weiter, welche eine bessere Dispersion der dann heteronuklearen NMR-Spektren gewährleisten.

3 Material und Methoden

3.1 Transformation von E. coli BL21

Ein 100 μl Aliquot der kompetenten E. coli BL21 Zellen wurde für 5 min. auf Eis aufgetaut, anschließend mit 1 μl einer Plasmidlösung [$50\mu\text{g}/\mu\text{l}$] versetzt und weitere 30 min. auf Eis inkubiert.

Um die Penetration der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen zu ermöglichen, wurde der Transformationsansatz für 45 s in einem auf 42°C vorgeheizten Wasserbad (Memmert) inkubiert und dann für weitere 2 min. auf Eis gelagert.

Der Transformationsansatz wurde schließlich in 400 μl S.O.C.-Medium, das in einem sterilen Polypropylenröhrchen (Falcon 2059, 17x100 mm) vorgelegt wurde, überführt und zur Expression der Antibiotika-Resistenz für 1h bei 37°C und 180 rpm im Inkubationsschüttler geschüttelt.

Um die transformierten E. coli-Zellen von den nichttransformierten Zellen zu trennen, benutzt man die auf dem Plasmid pkkAdx codierte Information für die Ampicillin-Resistenz. Das halbsynthetische Penicillinderivat Ampicillin wird durch die von den transformierten Bakterien gebildete β -Lactamase durch Hydrolyse des β -Lactamringes inaktiviert.

Zur Selektion transformierter Bakterien wurden deshalb 150 μl des Transformationsansatzes mittels eines Drigalski-Spatels auf einer mit 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Ampicillin versetzten und auf 37°C vortemperierten LB-Agarplatte ausgestrichen.

Zum Abtrocknen wurde die Platte ca. 15 min. offen unter der Sterilbank stehengelassen und anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.2 Wachstum von E. coli BL21 und Expression von bAdx in N15-Medium

Nach der Transformation von E. coli BL21 Zellen mit dem Plasmid pkkAdx wurden je 150 μ l des Transformationsansatzes auf insgesamt 2 LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um möglichst hohe Expressionsraten zu erzielen, wurden die frisch transformierten Zellen dann direkt zur Kultivierung in N15-Medium verwendet. Dazu wurde ein 2 Liter Erlenmeyerkolben mit 66 ml N15-Medium beschickt, die frisch transformierten E. coli Zellen dann mit je 4 ml des Mediums von den LB-Platten abgespült und die Kultur bei einer anfänglichen OD₆₀₀ von ca. 0,1 angeimpft.

Nach dem Animpfen wurde die Kultur bei 37°C und 180 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert und das Wachstum der Bakterien durch diskontinuierliche Messung OD₆₀₀ am Spektralphotometer (U-1100 Spektralphotometer, Hitachi) verfolgt.

Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,8-1,0, nachdem der Kultur zuvor nochmals 200 μ l Ampicillin-Lösung (250mg/ml) zugesetzt worden war.

Nach der Induktion wurden die Zellen für weitere 12 h bei 37°C und 180 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert und anschließend geerntet.

3.3 Ernte und Aufschluß der Bakterienzellen

Zur Ernte der Zellen wurde der Inhalt der Kultur in zwei Zentrifugenbecher (500 ml) gefüllt und für 10 min. bei 4°C und 3000g zentrifugiert (Rotor GS-3, Sorvall RC28S, DuPont). Nach dem Abdekantieren des Überstandes wurden die Zentrifugenbecher erneut gefüllt und unter den gleichen Bedingungen nochmals abzentrifugiert.

Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die bakteriellen Pellets in insge-

samt 40 ml 50 mM Tris/HCl-Puffer, und mit einem pH-Wert von 9, resuspendiert. Zur Freisetzung des bAdx wurden die Zellen dann im Eisbad 10 mal für jeweils 15s im Abstand von einer Minute bei einer Leistung von 200W mit dem Ultraschallhorn (Ultraschallgerät Lab Sonic U) beschallt.

Um den Abbau der freigesetzten Proteine durch Proteasen zu verhindern, wurden der Suspension nach der Ultraschallbehandlung 0,1 mg/ml eines Protease-Inhibitors (CompleteTM, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, Boehringer) zugesetzt. Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurde die Suspension anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 30 min bei 4°C und 30000g zentrifugiert (Rotor SS-34, Sorvall RC28S). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abdekantiert und das Pellet verworfen.

Um einen Abbau des bAdx zu verhindern, wurde das so erhaltene Rohlysat sofort weiter aufgereinigt.

3.4 Reinigung des ¹³C¹⁵N-angereicherten Adrenodoxins

Zur Reinigung des Adrenodoxins wurde das Rohlysat zunächst einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Im Anschluß daran wurde das Proteingemisch durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC = Hydrophobic Interaction Chromatography) weiter gereinigt, bei der eine Trennung aufgrund der unterschiedlichen Hydrophobizität der verschiedenen Proteine erfolgt. Abschließend wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt, die zur Trennung von Proteinen aufgrund von Ladungsunterschieden führt.

Sowohl die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung als auch die HIC wurden bei einem pH-Wert von 9 durchgeführt, da bei diesem alkalischen pH-Wert das Adrenodoxin wenigstens partiell vor dem proteolytischen Abbau des C-Terminus geschützt werden kann [29]. Zur Vermeidung des proteolytischen Abbaus von Adrenodoxin wurde außerdem in jedem Reinigungsschritt der Protease-Inhibitor CompleteTM (CompleteTM, Proteasen-Inhibitor Cocktail, Boehringer) zugesetzt, da bei Zusatz von Proteaseinhibitoren das native Protein mit vollständigem C-Terminus isolierbar sein sollte [31].

Die gereinigte Probe wurde dann unter Ausschluß von Sauerstoff unter Ar-

gon gelagert, da bei Untersuchungen an dem zu bAdx homologen Putidaredoxin festgestellt wurde, daß bei Ausschluß von Sauerstoff aus der Proteinprobe das Auftreten der C-terminalen Deletion zumindest verlangsamt werden kann [85].

Alle Säulenchromatographien wurden an einer Pharmacia-FPLC-Anlage durchgeführt.

3.5 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von bAdx

Grundsätzlich können Proteine durch Änderung der Lösungsmitelegenschaften, wie z.B. pH-Wert, Ionenstärke oder Temperatur, gefällt werden [86].

Die Struktur eines Proteins in einer wässrigen Lösung hängt von den in der Lösung enthaltenen Ionen und anderen Molekülen ab. Hält man die Zusammensetzung des Lösungsmittels konstant, so nimmt das Proteinmolekül im Gleichgewicht eine stabile Konformation ein, die durch die Summe aller Wechselwirkungen bestimmt wird.

Störungen der Protein-Lösungsmittel-Interaktionen können zu Strukturveränderungen führen, so führt z.B. die Erhöhung der Ionenstärke in einem Medium durch Zusatz großer Salzmengen zu einer Fällung vieler Proteine. Dieser sog. "Aussalz-Effekt" beruht auf der Neutralisation der Oberflächenladungen des Proteins durch die hinzugefügten Ionen und auf der Verringerung der effektiven Konzentration des Wassers bei der Salzzugabe.

Die zur Fällung eines bestimmten Proteins erforderliche Salzkonzentration hängt von der Anzahl und der Verteilung geladener und nichtionischer, hydrophiler Gruppen auf der Proteinoberfläche sowie von der Anzahl und der Verteilung der exponierten hydrophoben Gruppen ab, deren Einfluß auf die Löslichkeit des Proteins bei der Neutralisation polarer Gruppen bedeutend wird.

Am häufigsten wird Ammoniumsulfat zur Präzipitation verwendet, da es in einer gesättigten Lösung in so hoher Molarität vorliegt, daß die meisten Proteine gefällt werden können. Außerdem hat Ammoniumsulfat nur eine geringe Lösungswärme, konzentrierte Ammoniumsulfatlösungen hemmen bakterielles Wachstum und Ammoniumsulfat in Lösung schützt die meisten Proteine vor Denaturierung.

Nach dem Zellaufschluß wurde das Rohlysat zunächst durch eine fraktionier- te Ammoniumsulfatfällung aufgereinigt. Dazu wurde durch Zusatz von festem Ammoniumsulfat zu der Lösung im ersten Schritt eine Fällung bis zu 30%iger Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durchgeführt und durch anschließende Erhöhung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration auf 50% eine 2. Fällung erzielt.

3.5.1 Erste Ammoniumsulfatfällung

Zu dem beim Zellaufschluß erhaltenem Lysat wurde unter Rühren bei 4°C lang- sam festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Endkonzentration von 30% (w/v) zugegeben. Nach Zusatz des gesamten Ammoniumsulfats wurde die Lösung zur vollständigen Präzipitation der Proteine für weiter 30 min. bei 4°C gerührt, anschließend in 50ml Zentrifugenbecher überführt und das Präzipitat bei 4°C/30000g für 30 min. abzentrifugiert (Rotor SS-34, Sorvall RC28S).

Der klare, rotgefärbte Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, das Volumen des Überstandes bestimmt und das Pellet verworfen.

3.5.2 Zweite Ammoniumsulfatfällung

Dem Überstand aus der ersten Ammoniumsulfatfällung wurde unter Rühren bei 4°C erneut langsam festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Sättigung vo 50% (w/v) Am- moniumsulfat zugesetzt. Zur Gleichgewichtseinstellung wurde nach Zugabe des gesamten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ die Lösung wiederum für weitere 30 min. bei 4°C gerührt und anschließend die gefällten Proteine für 30 min. bei 4°C/30000g (SS-34, Sor- vall RC28S) abzentrifugiert.

Der klare, rotgefärbte Überstand wurde vorsichtig abgenommen, sterilfiltriert (FP 030/2 Einmal-Filterhalter, Porengröße 0,45 μm steril, Schleicher & Schüll), für 5 min. im Exsikkator entgast und anschließend sofort einer hydrophoben Interaktionschromatographie unterzogen.

3.6 Hydrophobe Interaktionschromatographie von bAdx mit Phenyl-Sepharose

Die Bezeichnung "hydrophobe Wechselwirkungen" beschreibt nicht die Anziehung zwischen hydrophoben Gruppen im eigentlichen Sinn, vielmehr werden hydrophobe Wechselwirkungen unpolaren Gruppen vom umgebenden polaren Lösungsmittel "aufgezwungen" (Näheres zu hydrophoben Wechselwirkungen s. [87, 88]). Die Aggregation unpolarer Moleküle in wässriger Lösung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen ist energetisch vorteilhaft, da durch Umstrukturierung der Wassermoleküle bei dieser Aggregation die Entropie des Gesamtsystems zunimmt.

Da die Struktur des Wassers für hydrophobe Wechselwirkungen bestimmend ist, werden bei Änderung der Lösungsmittelstruktur durch Zusatz von Salzen oder organischen Lösungsmitteln auch die hydrophoben Wechselwirkungen verändert.

In der Regel führt eine ansteigende Ionenstärke zur Zunahme der hydrophoben Wechselwirkungen. Chaotrope Salze, die die Struktur des Wassers zerstören, führen meist zu einer Verminderung der hydrophoben Wechselwirkungen, während nicht-chaotrope Salze, wie z.B. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, diese Wechselwirkungen in der Regel verstärken.

Die Fähigkeit eines Proteins, im nativen Zustand hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen, ist abhängig von der Zahl hydrophober Gruppen an der Oberfläche des Proteins, die dem Lösungsmittel direkt ausgesetzt sind. Die Differenzen in der Hydrophobizität verschiedener Proteine bilden die Grundlage für die Separation von Proteinen durch hydrophobe Interaktionschromatographie [89].

In der HIC verwendet man als Säulenmaterial hydrophile Matrices, an die unpolare, kurzkettige Gruppen, z.B. Phenyl- oder Octyl-Gruppen, gebunden sind.

Die Auftrennung auf HIC-Matrices erfolgt mittels wässriger Salzlösungen, wobei die Proben in einem Puffer mit hoher Salzkonzentration auf die Säule geladen werden und in der Regel durch einen absteigenden Salzgradienten von der Säule eluiert werden. Die Bindung von Proteinen an hydrophobe Matrices wird von der Hydrophobizität des Liganden, der Ionenstärke des Puffers (antichaotrope Salze, die zur Proteinfällung führen, fördern auch die Bindung von Proteinen an hydro-

phobe Liganden) und der Temperatur (bei Abnahme der Temperatur nehmen die hydrophoben Wechselwirkungen ab) bestimmt.

Die Elution der auf der Säule gebundenen Proteine erfolgt meistens durch eine Verringerung der Konzentration des antichaotropen Salzes unter nicht denaturierenden Bedingungen. Nur bei sehr fest gebundenen Proteinen werden zur Elution auch Detergentien oder unpolare Lösungsmittel eingesetzt, was oft zur Denaturierung der gebundenen Proteine führt.

Die nach der 2. Ammoniumsulfatfällung erhaltene, sterilfiltrierte und entgaste Proteinlösung wurde direkt auf die Phenylsepharose-Säule (Phenyl-Sepharose High Performance, Pharmacia, Column System XK 16/20, Pharmacia, Säulenvol. 30ml) aufgetragen. Zur Elution unspezifisch gebundener Proteine wurde die Säule mit 3 Volumen des Puffers mit hoher Ionenstärke (50mM Tris/HCl, pH9 + 2,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) beladen.

Die Elution gebundener Proteine von der Säule erfolgte dann mittels eines linearen Ammoniumsulfatgradienten von 2,2M - 0,4M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Elution wurde durch Messung der Absorption bei $\lambda = 278$ nm verfolgt.

Von den, an der roten Farbe zu erkennenden, Adrenodoxin enthaltenden Fraktionen wurde ein Absorptionsspektrum (Cary 3E, Varian) im Wellenlängenbereich von $\lambda = 250 - 700$ nm aufgenommen sowie das Verhältnis der Absorptionen A_{414}/A_{278} , der sog. Q-Wert, bestimmt.

bAdx enthaltende Fraktionen wurden vereinigt, über einen Amicon YM10 Konzentrator auf 20mM Tris/HCl, pH7.7 umgepuffert und eingeeengt. Die Proteinlösung wurde dann mit 1mM des Protease-Inhibitors CompleteTM (Boehringer) versetzt, mehrmals entgast, mit Argon mehrmals gespült und anschließend über Nacht bei 4°C unter Argon gelagert.

3.7 Ionenaustauschchromatographie von bAdx mit Q - Sepharose-FF

Die Ionenaustauschchromatographie (IEC = Ion Exchange Chromatographie) unterscheidet sich von anderen Chromatographiemethoden insofern, als die stationäre Phase ionisierbare, funktionelle Gruppen trägt [90]. Zur Erreichung elektri-

scher Neutralität werden diese fixierten Ladungen durch bewegliche Gegenionen ausgeglichen. Die IEC wird nach den mobilen Gegenionen benannt, d.h. in einem Anionenaustauscher sind die fixierten Ladungen positiv, in einem Kationenaustauscher negativ.

Die IEC beruht zum einen auf der Bindung des Proteins an die fixierten Ladungen durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen an der Proteinoberfläche und den fixierten Ladungen, wobei die mobilen Gegenionen durch das Protein verdrängt werden müssen. Zum anderen beruht sie auf der Elution des Proteins von den fixierten Ladungen durch ein mobiles Gegenion dessen Affinität zu den fixierten Ladungen größer als die des Proteins ist.

Die Fähigkeit eines Gegenions, ein gebundenes Protein von den fixierten Ladungen zu verdrängen, ist eine Funktion der Affinitätsdifferenz zwischen den fixierten und mobilen Ladungen von Protein bzw. Salz. Die Affinitäten werden unter anderem durch die Nettoladung des Proteins sowie durch die Konzentration des zur Verdrängung verwendeten Salzes bestimmt (Näheres s. [91, 92, 93]).

Für die Separation des Adrenodoxins wurde der Anionenaustauscher Q-Sepharose-FF (Q-Sepharose High Performance, Pharmacia, Säulenvol. 25 ml) verwendet, da Adrenodoxin aufgrund des hohen Gehalts an den sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat (pI von bAdx \sim 4) bei pH 7.5 eine negative Nettoladung trägt.

Zur Beladung mit den mobilen Gegenionen wurde die Säule vor dem Auftragen der Probe zunächst mit dem dreifachen Säulenvolumen Puffer B (20 mM Tris/HCl pH7.5/ 0.5 M KCl) gespült und anschließend mit Puffer A (20 mM Tris/HCl pH 7.5) äquilibriert. Die Probe wurde sterilfiltriert, entgast und dann auf die Säule aufgetragen.

Anschließend wurde die Säule zur Elution unspezifisch gebundener Proteine mit 3 Volumen Puffer A nachgespült. Die Elution des bAdx erfolgte hierauf mittels eines linearen Gradienten von 0 - 0.5 M KCl. Die Elution wurde über Messung der Absorption bei $\lambda = 278$ nm verfolgt.

Von den rotgefärbten, bAdx enthaltenden Fraktionen wurde dann ein Absorptionsspektrum im Bereich $\lambda = 250 - 700$ nm aufgenommen (Cary 3, Varian) und

der Q-Wert bestimmt.

Fraktionen mit einem über 0.9 liegenden Q-Wert wurden vereinigt, über einen Amicon YM10 Konzentrator auf 50 mM Natriumphosphat pH 7.5/200 mM NaCl umgepuffert und auf eine Konzentration von 2 mM bAdx gebracht.

Zur Lagerung wurde die gereinigte Probe im NMR-Röhrchen mehrfach entgast mit Argon überschichtet und das Probenröhrchen abgeschmolzen.

4 NMR-technische Methoden

Im folgenden wird hier ein Übersicht der durchgeführten Experimente, sowohl zur Proteinrückgratzuordnung als auch zur Seitenkettenuordnung, sowie den Experimenten, die zur Strukturrechnung verwendet wurden gegeben. Außerdem wurden noch ein Experiment zur ${}^3J_{HNH\alpha}$ Bestimmung am oxidierten Adrenodoxin aufgenommen, sowie ein weiteres Experiment zur Bestimmung der Amidprotonen- T_1 -Zeiten am reduzierten Adrenodoxin. Die Konzentration der Proteinproben wurde sowohl für ${}^{15}\text{N}$ -angereicherte, als auch für $({}^{15}\text{N}, {}^{13}\text{C})$ -angereicherte Proben bei allen Experimenten auf 2 - 3 mM eingestellt. Die Pulsprogramme und alle weiteren wichtigen Parameter sind im Anhang verzeichnet.

4.1 Experimente zur sequentiellen Zuordnung

Alle hier aufgeführten Experimente zur sequentiellen Zuordnung an Rinder-Adrenodoxin wurden an einem DMX500 MHz Spektrometer der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH (Rheinstetten) bei Temperaturen zwischen 27°C und 30°C durchgeführt. Das Gerät arbeitet mit einem Supercon-Magneten (Oxford Instruments, Oxford, England), dessen magnetischen Induktion 11,74 T beträgt.

4.1.1 Das 3D HNHB-Experiment

Zur Identifizierung der H^β -Protonen sowie der Amidprotonen des Proteinrückgrats wurde an einer 2 - 3 mM ${}^{15}\text{N}$ -angereicherten Proteinprobe ein 3D HNHB-Experiment [94] (Abb.3) aufgenommen. Dabei wird die Magnetisierung vom

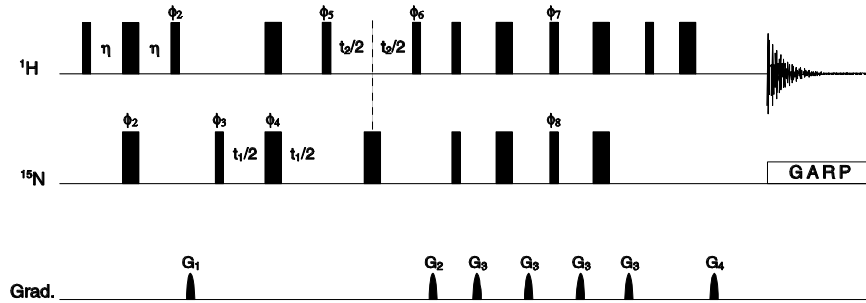


Abbildung 3: Pulssequenz des 3D HNHB Experimentes. Alle nicht gekennzeichnete Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, y$; $\phi_5 = x, -x$; $\phi_6 = x, -x$; $\phi_7 = y$; $\phi_8 = y$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $\eta = 20 \mu s$; $\frac{t_1}{2} = 4 \mu s$; $\frac{t_2}{2} = 13 \mu s$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}, 10 \text{ Gcm}^{-1}$, $G_2 = 1 \text{ ms}, -39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}, 39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}, 8 \text{ Gcm}^{-1}$.

Amid-Proton auf den Amid-Stickstoff-Kern via INEPT-Transfer [95] übertragen. Während t_1 entwickelt sich nur heteronukleare Kopplung zwischen den Amid-Protonen und den ^{15}N -Kernen. Der folgende 90° Puls verschiebt die Magnetisierung auf die aliphatischen Protonen. In der Zeit t_2 entsteht nur chemische Verschiebung der $^1\text{H}^\beta$ -Protonen. Anschließend wird die Magnetisierung wieder über die ^{15}N -Kerne auf die Amid-Protonen zurück transferiert, welche dann in der Aquisitionszeit t_3 detektiert werden. Zu beachten ist, daß sich auch die chemische Verschiebung von Seitenkettenamiden ($^1\text{H}^\beta, ^{15}\text{N}$) mit entwickelt. Wasserunterdrückung wird erreicht durch den Gradienten-Puls G_1 . Zur phasensensitiven Aufnahme wurde der Gradienten-Puls G_4 invertiert.

4.1.2 Das 3D HNCA-Experiment

Ein weiteres unerlässliches Experiment zur Zuordnung der Proteinerückgratresonanzen ist das 3D HNCA Experiment.[96, 97] (Abb.4). Es wurde an einer 2 - 3 mM einer ^{15}N - ^{13}C -angereicherten Proteinprobe durchgeführt. Das HNCA Experiment gestattet die Detektion der intraresiduellen Kerne $^1\text{H}^N, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}^\alpha$ und des

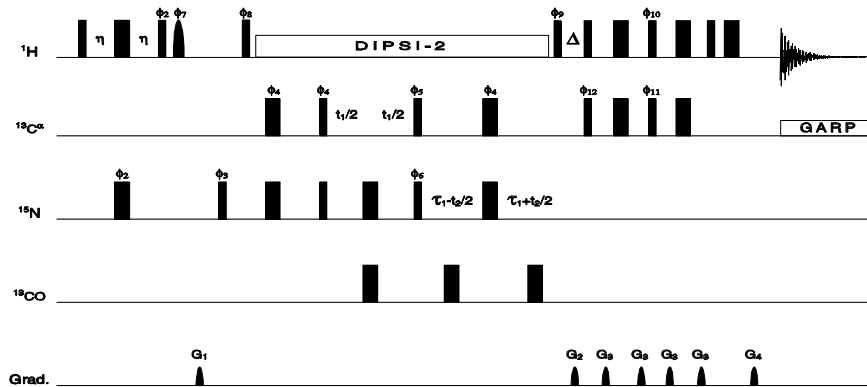


Abbildung 4: Pulssequenz für das 3D HNCA Experiment. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_5 = x, -x$; $\phi_6 = x, -x$; $\phi_7 = -x$; $\phi_8 = y$; $\phi_9 = y$; $\phi_{10} = y$; $\phi_{11} = y, -y$; $\phi_{12} = x, -x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $\eta = 2,3$ ms; $\frac{t_1}{2} = 46,1$ μ s; $\frac{t_2}{2} = 657$ μ s; $\tau_1 = 6,12$ ms; $\Delta = 3,9$ ms. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1$ ms, 10 Gcm $^{-1}$, $G_2 = 1$ ms, $-39,85$ Gcm $^{-1}$; $G_3 = 0,5$ ms, $39,85$ Gcm $^{-1}$; $G_4 = 0,5$ ms, 8 Gcm $^{-1}$.

interresidualen $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerns der vorangegangenen Aminosäure. Als Hilfe bei der Zuordnung dient der Sachverhalt, daß die interresiduale $^{13}\text{C}^\alpha$ Resonanz eine geringere Intensität aufweist als die intraresiduale $^{13}\text{C}^\alpha$ Resonanz. Zuerst wird über einen INEPT-Transfer [95] Magnetisierung von den Amid-Protonen ($^1\text{H}^N$) auf die ^{15}N -Kerne übertragen. Es entwickelt sich nur heteronukleare $^1\text{J}^{HN}$ -Kopplung zwischen den Amid-Protonen und den ^{15}N -Kernen. Das folgende 90° Pulspar transferiert die Magnetisierung auf die $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne. Während t_1 entwickelt sich nur chemische Verschiebung der $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne.

Mit dem nun folgenden 90° Pulspar wird die Magnetisierung wieder auf die ^{15}N -Kerne zurücktransferiert. Während t_2 entwickelt sich chemische Verschiebung der ^{15}N -Kerne. Das Delay τ_1 wurde so gesetzt, daß die $^1\text{J}^{C\alpha N}$ - und die $^2\text{J}^{C\alpha N}$ -Kopplung ein Maximum erfährt.

Der anschließende 90° Protonen-Puls transferiert die Magnetisierung wieder auf die Amid-Protonen, welche anschließend in t_3 detektiert werden. Während des Delays D entwickelt sich $^1\text{J}^{NH}$ -Kopplung. In den Evolutionszeiten t_1 und t_2

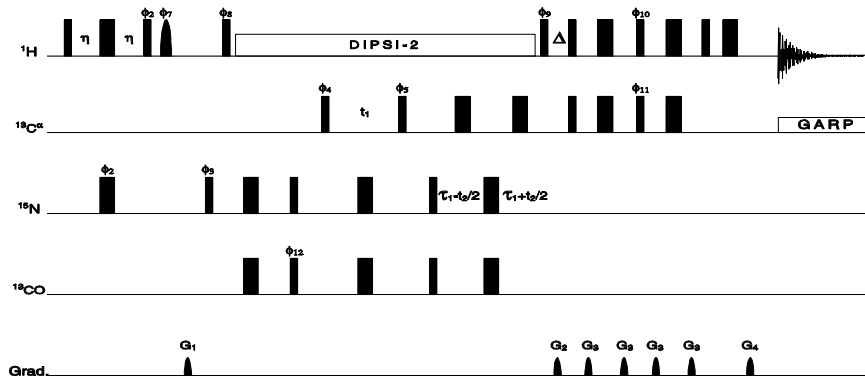


Abbildung 5: Pulssequenz des 3D HN(CO)CA Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_5 = x$; $\phi_6 = x$; $\phi_7 = -x$; $\phi_8 = y$; $\phi_9 = y$; $\phi_{10} = y$; $\phi_{11} = y, -y$; $\phi_{12} = x, -x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $\eta = 2,3$ ms; $\frac{t_1}{2} = 46,1$ μ s; $\frac{t_2}{2} = 4$ μ s; $\tau_1 = 6,5$ ms; $\Delta = 3,9$ ms. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1$ ms, 10 Gcm $^{-1}$, $G_2 = 1$ ms, $-39,85$ Gcm $^{-1}$; $G_3 = 0,5$ ms, $39,85$ Gcm $^{-1}$; $G_4 = 0,5$ ms, 8 Gcm $^{-1}$.

wurden die Protonen mittels DIPS1-2-Entkopplungssequenz [98] entkoppelt. Um die störende Wasserresonanz zu unterdrücken wurden ein selektiver Protonen-Puls (mit Phase ϕ_7) und ein Gradienten-Puls G_1 eingefügt. Weiterhin wurde zur phasensensitiven Aufnahme der Gradienten-Puls G_4 invertiert.

4.1.3 Das 3D HN(CO)CA-Experiment

Das 3D HN(CO)CA Experiment [99] (Abb. 5) verläuft analog dem 3D HNCA Experiment. Zu beachten ist lediglich, daß sich während der Evolutionszeit t_1 ausschließlich chemische Verschiebung der interresidualen $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne der vorangegangenen Aminosäure und $^2\text{J}^{\text{C}^\alpha\text{N}}$ -Kopplung entwickelt. Die störende Protonenmagnetisierung wurden auch hier während der Evolutionszeiten t_1 und t_2 mittels DIPS1-2 [98] entkoppelt. Die Resonanz der Wasserprotonen wurde über ein Puls-Gradienten-Paar (selektiver Puls mit Phase ϕ_7 und Gradienten-Puls G_1), wie im 3D HNCA Experiment [100], eliminiert. Phasensensitive Aufnahme wurde hier

über ein Echo-Antiecho-Schema erreicht, indem der Gradienten-Puls G_4 invertiert wurde.

4.1.4 Das 3D H(N)CA,CO-Experiment

Aufgrund der geringen Lebensdauer von oxidiertem Rinderadrenodoxin und um die Resultate aus den zwei vorher gehenden Experimenten zu stützen, wurde zusätzlich ein 3D H(N)CA,CO Experiment (Abb.6) aufgenommen. Dieses Experiment erlaubt die Detektion der $^1\text{H}^N$ -, $^{13}\text{C}^\alpha$ -, ^{13}CO - der intraresidualen Aminosäure und des $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kernes der vorhergehenden Aminosäure. Es folgt weitestgehend dem Magnetisierungstransfer-Schema des 3D HNCA Experimentes [100]. Allerdings wird hier auf die Entwicklung chemischer Verschiebung der ^{15}N -Kerne verzichtet. In der Evolutionszeit t_2 entwickelt sich die chemische Verschiebung der intraresiduellen ^{13}CO -Kerne. Der Unterschied in der Pulssequenz zum 3D HNCA Experiment besteht in dem WATERGATE-Wasserunterdrückungs-Schema [101, 102] am Ende in F1.

4.1.5 Watergate-Schema

Die WATERGATE-Pulssequenz [101, 102] (Abb. 7) ist eine Gradientenecho-Sequenz, die aus zwei Teilen besteht. Im ersten Teil regt ein nicht-selektiver 90° Puls alle Resonanzen gemeinsam an, unabhängig von ihrer chemischen Verschiebung. Im zweiten Teil wird das symmetrische Echo-Segment durch zwei kurze Feldgradientenpulse mit der selben Amplitude und dem gleichen Vorzeichen und einem nicht-selektiven 180° Puls gestaltet. Alle Kohärenzen werden durch den ersten Feldgradientenpuls dephasiert und durch den zweiten Feldgradientenpuls wieder rephasiert, vorausgesetzt, sie erfahren eine 180° Rotation durch den selektiven RF-Puls. Gestaltet man die symmetrischen, selektiven Pulse so, daß die Rotation der Wasserresonanz eliminiert wird, während der Rest des Spektrums um 180° gedreht wird, so ist die Wasserprotonenresonanz weitgehend unterdrückt, wenn die Aquisition beginnt.

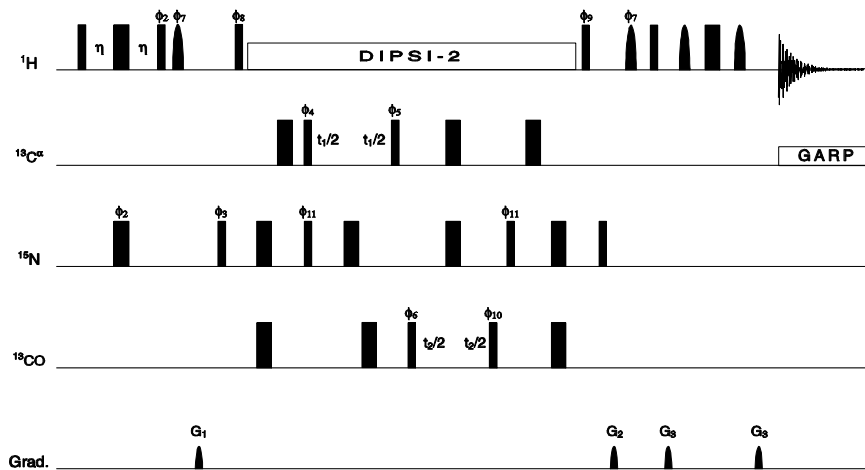


Abbildung 6: Pulssequenz des 3D H(N)CA,CO Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_5 = x$; $\phi_6 = x, -x$; $\phi_7 = -x$; $\phi_8 = y$; $\phi_9 = y$; $\phi_{10} = x$; $\phi_{11} = y, -y$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $\eta = 2,3 \text{ ms}$; $\frac{t_1}{2} = 46,1 \text{ } \mu\text{s}$; $\frac{t_2}{2} = 54,3 \text{ } \mu\text{s}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}, 10 \text{ Gcm}^{-1}$, $G_2 = 1 \text{ ms}, -39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 800 \text{ } \mu\text{s}, 39,85 \text{ Gcm}^{-1}$.

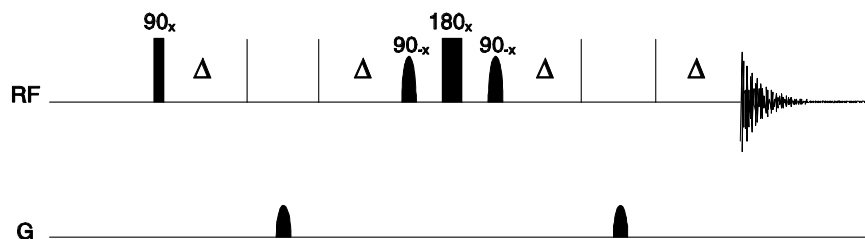


Abbildung 7: WATERGATE-Pulssequenz zur gradientengestützten Wasserunterdrückung. Die Radiofrequenz- und die Feldgradientenpulse sind auf separaten Linien gezeigt. Zusätzlich zu einem nicht selektiven Spin-Echo-Pulspaar, werden zwei selektive 90° Pulse mit der entgegengesetzten Phase und zwei Feldgradienten symmetrisch zum nicht-selektiven 180° Puls eingesetzt.

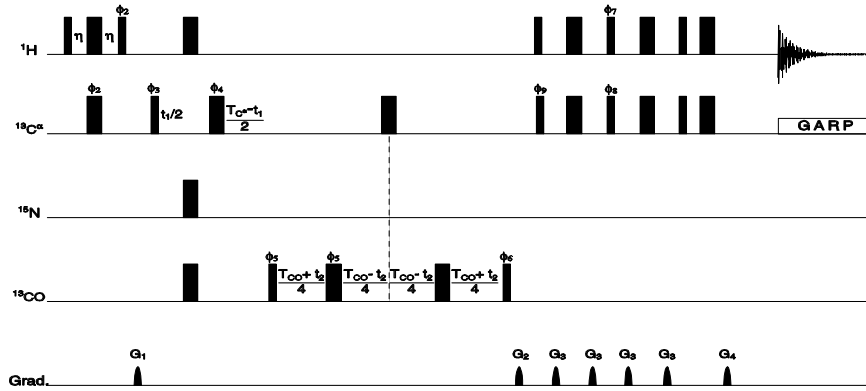


Abbildung 8: Pulssequenz des 3D HCACO Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, y$; $\phi_5 = x, -x$; $\phi_6 = x$; $\phi_7 = y$; $\phi_8 = y, -y$; $\phi_9 = x, -x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $\eta = 1,7 \text{ ms}$; $T_{C^\alpha} = 9,4 \text{ ms}$; $T_{CO} = 10 \text{ ms}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}, 10 \text{ Gcm}^{-1}$, $G_2 = 1 \text{ ms}, -39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}, 39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}, 8 \text{ Gcm}^{-1}$.

4.1.6 Das 3D HCACO-Experiment

Im 3D HCACO Experiment [96] (Abb. 8) entwickelt sich während des Delays η nur heteronukleare $^1J^{C^\alpha H^\alpha}$ -Kopplung. Der folgende Gradienten-Puls G_1 dephasiert sämtliche transversale Protonen-Magnetisierung. Über den anschließenden 90° Puls mit Phase ϕ_3 wird die Magnetisierung auf die $^{13}C^\alpha$ -Kerne transferiert. In der Evolutionszeit t_1 entwickelt sich chemische Verschiebung der $^{13}C^\alpha$ -Kerne und $^1J^{C^\alpha CO}$ -Kopplung. Über den 90° Puls mit Phase ϕ_5 gelangt die Magnetisierung auf die ^{13}CO -Kerne. Während t_2 entwickelt sich dann chemische Verschiebung der ^{13}CO -Kerne und $^1J^{C^\alpha CO}$ -Kopplung. Anschließend wird die Magnetisierung wieder über die $^{13}C^\alpha$ -Kerne auf die $^1H^\alpha$ -Protonen übertragen und diese detektiert. Dieses Experiment hat den Nachteil, daß eine große Anzahl von $^1H^\alpha$ -Protonen mit der Wasserunterdrückung verloren gehen, da diese in dem selben Frequenzbereich liegen wie die Wasser-Protonen. Phasensensitive Aufnahme wurde hier über ein Echo-Antiecho-Schema erreicht, indem der Gradienten-Puls G_4 invertiert wurde.

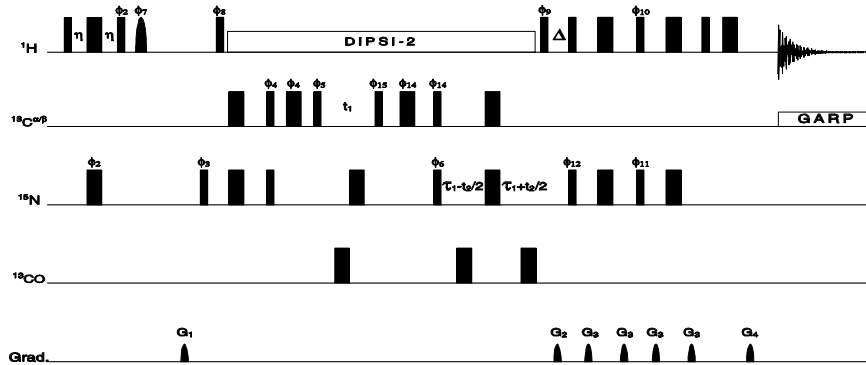


Abbildung 9: Pulssequenz des 3D HNCACB Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_5 = y, -y$; $\phi_6 = x$; $\phi_7 = -x$; $\phi_8 = y$; $\phi_9 = y$; $\phi_{10} = y$; $\phi_{11} = y, -y$; $\phi_{12} = x, -x$; $\phi_{14} = x$; $\phi_{15} = y$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $\eta = 2,3 \text{ ms}$; $t_1 = 62,2 \text{ } \mu\text{s}$; $\frac{t_2}{2} = 657 \text{ } \mu\text{s}$; $\tau_1 = 6,12 \text{ ms}$; $\Delta = 3,9 \text{ ms}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}, 10 \text{ Gcm}^{-1}$, $G_2 = 1 \text{ ms}, -39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}, 39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}, 8 \text{ Gcm}^{-1}$.

4.1.7 Das 3D HNCACB-Experiment

Im 3D HNCACB Experiment [103] (Abb.9) wird die Magnetisierung mit dem INEPT-Transfer [95] von den Amid-Protonen auf die ^{15}N -Kerne übertragen. Während der Evolutionszeit t_1 entwickelt sich chemische Verschiebung der $^{13}\text{C}^{\alpha}$ -, $^{13}\text{C}^{\beta}$ -Kerne. In t_2 entwickelt sich dann chemische Verschiebung der ^{15}N -Kerne. Das Delay τ_1 wurde so gesetzt, daß die $^1\text{J}^{\text{C}^{\alpha}\text{N}}$ - und die $^2\text{J}^{\text{C}^{\beta}\text{N}}$ -Kopplung ein Maximum erfährt. Der nun folgende 90° Puls transferiert die Magnetisierung wieder zurück auf die Amid-Protonen, welche dann in t_3 detektiert werden. In den Evolutionszeiten t_1 und t_2 wurden die Protonen mit der DIPSI-2-Entkopplungssequenz [98] entkoppelt. Um die störende Wasserresonanz zu unterdrücken wurden ein selektiver Protonen-Puls (mit Phase ϕ_7) und ein Gradienten-Puls G_1 eingefügt. Weiterhin wurde zur phasensensitiven Aufnahme der Gradienten-Puls G_4 invertiert.

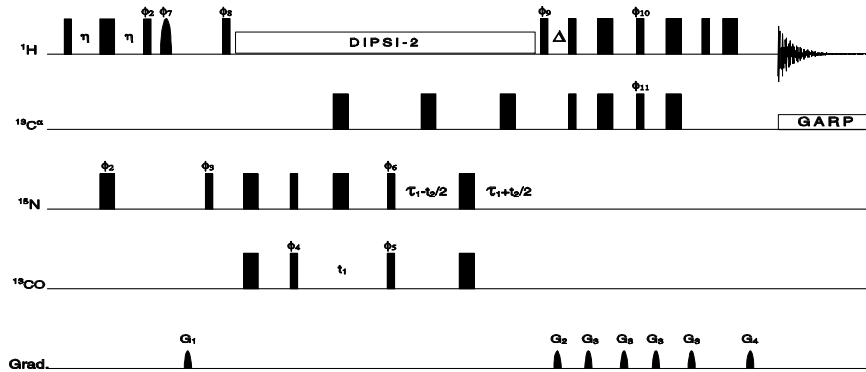


Abbildung 10: Pulssequenz des 3D HNCO Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_5 = x$; $\phi_6 = x$; $\phi_7 = -x$; $\phi_8 = y$; $\phi_9 = y$; $\phi_{10} = y$; $\phi_{11} = y, -y$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $\eta = 2,3$ ms; $t_1 = 108,6$ μ s; $\frac{t_2}{2} = 4$ μ s; $\tau_1 = 6,5$ ms; $\Delta = 3,9$ ms. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1$ ms, 10 Gcm $^{-1}$, $G_2 = 1$ ms, $-39,85$ Gcm $^{-1}$; $G_3 = 0,5$ ms, $39,85$ Gcm $^{-1}$; $G_4 = 0,5$ ms, 8 Gcm $^{-1}$.

4.1.8 Das 3D HNCO-Experiment

Die Grundlage des 3D HNCO Experiment [96] (Abb.10) ist das analoge 3D ^{15}N - ^{13}CO -Korrelations-Experiment [104, 105, 106]. Über einen INEPT-Schritt [95] wird die Magnetisierung von den $^1\text{H}^N$ -Protonen auf die direkt koppelnden ^{15}N -Kerne transferiert. Während der Wartezeit t_1 entwickelt sich chemische Verschiebung der Carbonyl-Kerne, während die ^{15}N - und die $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne über 180° Pulse entkoppelt werden. Die Protonen werden sowohl in der Wartezeit t_1 , als auch in der Wartezeit t_2 mit einer DIPS1-2 Sequenz [98] entkoppelt. In t_2 entwickelt sich dann chemische Verschiebung der ^{15}N -Kerne. τ_1 wurde so gewählt, daß die $^2J^{NCO}$ -Kopplung ein Maximum durchläuft. Anschließend wird die Magnetisierung von den Amidn mit einem 90° Puls wieder zurück transferiert und dann detektiert. Zur Unterdrückung der störenden Wasserresonanz, wurden ein selektiver Protonen-Puls (mit ϕ_7) und ein Gradienten-Puls G_1 eingefügt. Weiterhin wurde zur phasensensitiven Aufnahme der Gradienten-Puls G_4 invertiert.

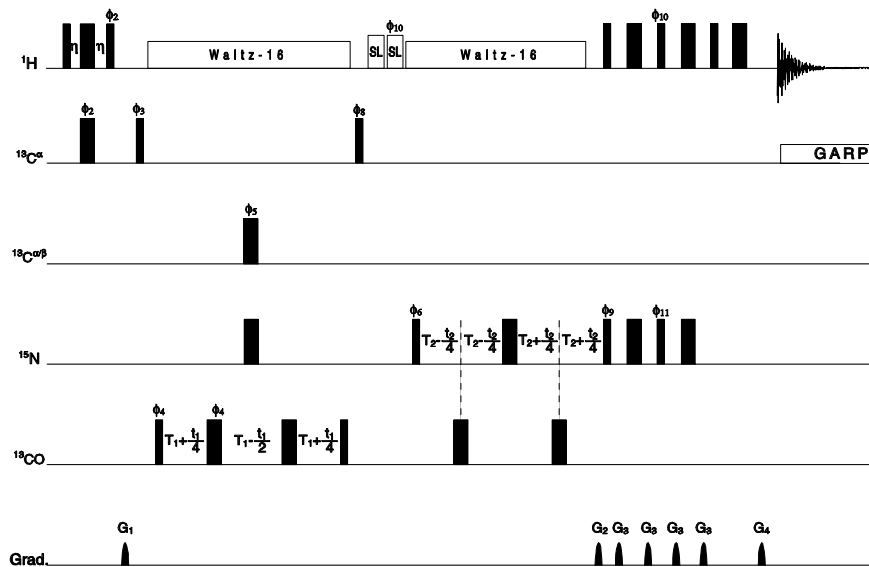


Abbildung 11: Pulssequenz des 3D (HCA)CO(CA)NH Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_5 = x, y, -x, -y$; $\phi_6 = x$; $\phi_7 = x$; $\phi_8 = x$; $\phi_9 = x, -x$; $\phi_{10} = y$; $\phi_{11} = y, -y$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $\eta = 1,7 \text{ ms}$; $T_1 + \frac{t_1}{4} = 2,5 \text{ ms}$; $T_1 - \frac{t_1}{2} = 4,9 \text{ ms}$; $T_2 = 6,12 \text{ ms}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}, 10 \text{ Gcm}^{-1}$, $G_2 = 1 \text{ ms}, -39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}, 39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}, 8 \text{ Gcm}^{-1}$.

4.1.9 Das 3D (HCA)CO(CA)NH-Experiment

Das 3D (HCA)CO(CA)NH Experiment [107] (Abb.11) korreliert die Kohlenstoffresonanzen der Carbonyle mit den ^{15}N - und $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kernen der selben und der sequenziell folgenden Aminosäuren.

Der initiale Magnetisierungstransfer wird mittels INEPT [95] auf die $^{13}\text{C}^{\alpha}$ -Kerne transferiert. Der dritte 90° Puls transferiert die Magnetisierung auf die ^{13}CO -Kerne. Während der nun folgenden "constant-time"-Evolutionsperiode t_1 entwickelt sich chemische Verschiebung der ^{13}CO -Kerne. Die Kerne $^{13}\text{C}^{\alpha/\beta}$ und ^{15}N wurden mittels eines 180° Pulses entkoppelt. Die Protonen wurden sowohl während der Evolutionszeit t_1 , als auch während der Evolutionszeit t_2 mit einem WALTZ-16 Schema [108] und einem RF-Feld von 4,0 kHz entkoppelt. Die an

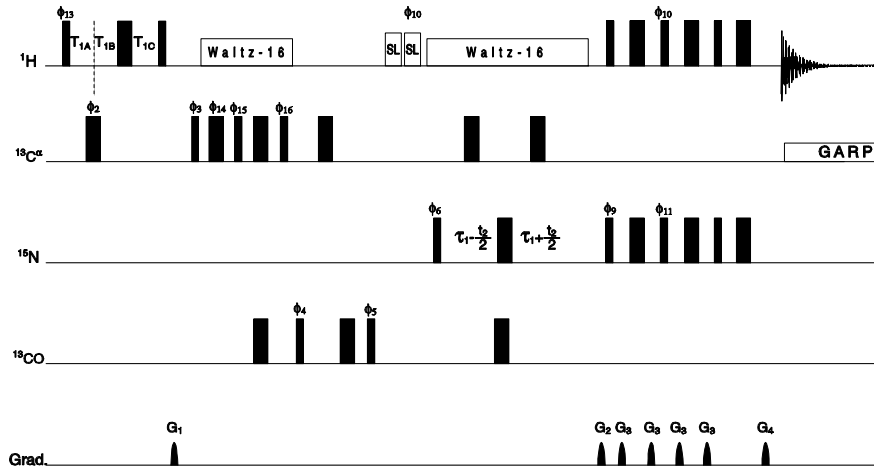


Abbildung 12: Pulssequenz des 3D HBHA(CO)NH Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_5 = x$; $\phi_6 = x$; $\phi_9 = x, -x$; $\phi_{10} = y$; $\phi_{11} = y, -y$; $\phi_{13} = y, -y$; $\phi_{14} = x, y, -x, -y$; $\phi_{15} = x, -x$; $\phi_{16} = x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $T_{1A} = \frac{\Delta + t_1}{2} = 1,72 \text{ ms}$; $T_{1B} = \frac{(1-a) \cdot t_1}{2} = 4 \text{ } \mu\text{s}$; $T_{1C} = \frac{\Delta - a \cdot t_1}{2} = 1,75 \text{ ms}$; $\tau_1 = 6,5 \text{ ms}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}$, 10 Gcm^{-1} , $G_2 = 1 \text{ ms}$, $-39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}$, $39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}$, 8 Gcm^{-1} .

diese Wartezeit sich anschließende Wasserunterdrückung wird erfüllt von einem Paar orthogonaler "spin-lock purge" Pulse (sl) mit einer Dauer von 1,5 ms und 0,5 ms. In der Zeit t_2 entwickelt sich dann chemische Verschiebung der ^{15}N -Kerne. Anschließend wird über ein "reverse"-INEPT-Schritt [95], welcher observable Magnetisierung erzeugt, die Magnetisierung wieder auf die Amid-Protonen übertragen und dort detektiert. Weiterhin wurde zur phasensensitiven Aufnahme der Gradienten-Puls G_4 invertiert.

4.1.10 Das 3D HBHA(CO)NH

Das 3D HBHA(CO)NH Experiment [109] (Abb.12) erlaubt die Korrelation der $^1\text{H}^\alpha$ -, $^1\text{H}^\beta$ -Protonen der vorangehenden Aminosäure mit den intraresiduellen Amid-Protonen und den intraresiduellen ^{15}N -Kernen. Dieser Sachverhalt hat den Vor-

teil, daß man die F3 Dimension der Amid-Protonen in der Regel von 6 ppm an skaliert und somit das Spektrum ohne die störenden Protonen-Resonanzen des Lösungsmittels beobachten kann. Den ersten Schritt stellt eine "semi-constant-time"-Periode dar, die die Entwicklung chemischer Verschiebung der aliphatischen Protonen erlaubt ($^1\text{H}^\alpha, ^1\text{H}^\beta$). Während der Wartezeit t_2 entwickelt sich chemische Verschiebung der ^{15}N -Kerne. Anschließend wird über einen "reverse"-INEPT-Schritt [95], welcher observable Magnetisierung erzeugt, die Magnetisierung auf die Amid-Protonen übertragen und dort detektiert. Zur phasensensitiven Aufnahme wurde der Gradienten-Puls G_4 invertiert. Die Protonen wurden mit einem WALTZ-16 Schema [108] und einem RF-Feld von 4,0 kHz entkoppelt. Wasserunterdrückung wird erfüllt von einem Paar orthogonaler "spin-lock purge" Pulse (sl) mit einer Dauer von 1,5 ms und 0,5 ms.

4.2 Experimente zur Seitenkettenuordnung

Die Experimente zur Seitenkettenuordnung wurden an einem DMX600 Avance Bruker Spektrometer der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH (Rheinstetten) bei Temperaturen von 27°C und 30°C durchgeführt. Das Gerät arbeitet mit einem Supercon-Magneten (Oxford Instruments, Oxford, England), dessen magnetische Induktion 14,09 T beträgt.

4.2.1 Das 3D TOCSY-($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-HSQC-Experiment

Zur Charakterisierung homonuklearer Protonenspinsysteme wurde an einer 2 - 3 mM ^{15}N -angereicherten Proteinprobe ein 3D TOCSY-($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-HSQC-Spektrum [110, 111, 112, 113, 114] (Abb. 13) aufgenommen.

In der Evolutionszeit t_1 entwickelt sich chemische Verschiebung der Protonen. Der sich anschließende Gradienten-Puls G_1 dephasiert die transversale Protonenmagnetisierung. Während der Wartezeit t_2 entwickelt sich dann chemische Verschiebung der Amid-Protonen. Das Delay T_G dient als Wartezeit für den Gradienten-Puls G_2 . Anschließend wird über einen "reverse"-INEPT-Schritt [95] mit "sensitivity enhancement", welcher observable Magnetisierung erzeugt, die

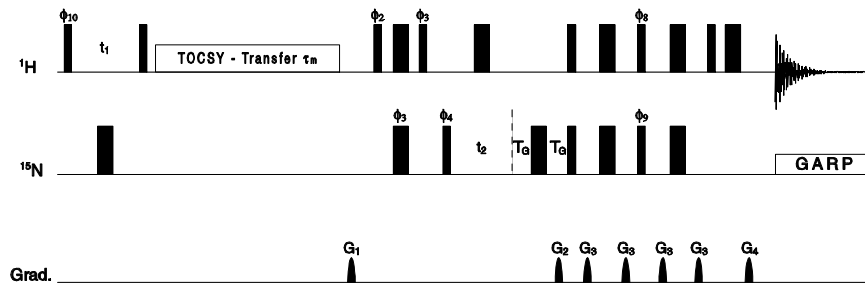


Abbildung 13: Pulssequenz des 3D TOCSY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = x$; $\phi_3 = y, -y$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_8 = y$; $\phi_9 = y$; $\phi_{10} = x, -x$; $\phi_{12} = x$; $\phi_{13} = y$; $\phi_{14} = -y$; $\phi_{15} = -x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $t_1 = 6,4 \mu\text{s}$; $t_2 = 8 \mu\text{s}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}$, 10 Gcm^{-1} , $G_2 = 1 \text{ ms}$, $-39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}$, $39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}$, 8 Gcm^{-1} .

Magnetisierung auf die Amid-Protonen übertragen und dort detektiert. Weiterhin wurde zur phasensensitiven Aufnahme der Gradienten-Puls G_4 invertiert.

4.2.2 Das 3D (H)CC(CO)NH-TOCSY Experiment

Zur Zuordnung der Kohlenstoffe der Seitenketten wird das 3D (H)CC(O)NH-TOCSY-Experiment [115, 116, 117, 118, 119] (Abb.14) angewendet. Dieses Experiment detektiert die ^{13}C -Kerne der voran gegangenen Aminosäure, d.h. es werden die ^{15}N - und $^1\text{H}^N$ -Kerne der Aminosäure N mit den ^{13}C -Kernen der Aminosäure N -1 über die Peptid-Bindung hinweg korreliert.

Über einen INEPT-Schritt [95] wird die Magnetisierung auf die aliphatischen Kohlenstoffe übertragen. Während der Evolutionszeit t_1 entwickelt sich dann chemische Verschiebung der aliphatischen Kohlenstoffe, sowie Kopplung zwischen den ^{13}C -Kernen und den Protonen. Der anschließende TOCSY-Transfer über die ^{13}C -Kerne gestattet einen Magnetisierungstransfer über die gesamte aliphatische Kohlenstoffkette. In t_2 entwickelt sich dann chemische Verschiebung der ^{15}N -Kerne und Kopplung zwischen ^{15}N -Kernen und Kohlenstoff-Kernen. Über einen "reverse"-INEPT-Schritt [95] mit "sensitivity enhancement" wird die Magneti-

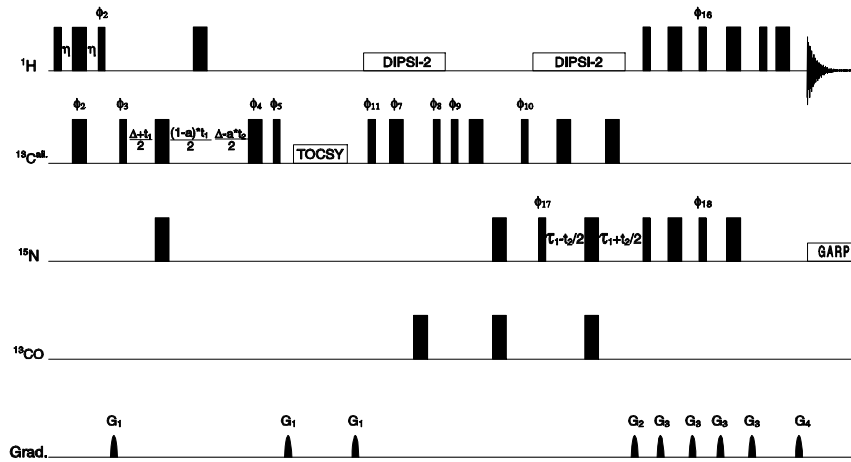


Abbildung 14: Pulssequenz des 3D (H)CCC(O)NH Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x$; $\phi_4 = x, y$; $\phi_5 = y$; $\phi_6 = y$; $\phi_7 = x, y, -x, -y$; $\phi_8 = x$; $\phi_9 = x, -x$; $\phi_{10} = x$; $\phi_{16} = y$; $\phi_{17} = x$; $\phi_{18} = y$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$; $\phi_{11} = (16)0$; $\phi_{12} = (16)2$; $\phi_{13} = (16)3$; $\phi_{14} = (16)14$; $\phi_{15} = (16)1$; $\phi_{21} = (16)8$; $\phi_{22} = (16)10$; $\phi_{23} = (16)11$; $\phi_{24} = (16)6$; $\phi_{25} = (16)9$; Die Länge der angeführten Delays betrug: $\frac{\Delta+t_1}{2} = 4 \mu s$; $\frac{(1-a) \cdot t_1}{2} = 782,8 \mu s$; $\frac{\Delta-a \cdot t_1}{2} = 4 \mu s$; $a = t_{1max}$; $\tau = 7 ms$; $\Delta = 3,9 ms$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 ms, 10 Gcm^{-1}$, $G_2 = 1 ms, -39,85 Gcm^{-1}$; $G_3 = 0,5 ms, 39,85 Gcm^{-1}$; $G_4 = 0,5 ms, 8 Gcm^{-1}$.

sierung auf die Amid-Protonen übertragen und in detektierbare Magnetisierung überführt. Zur phasensensitiven Aufnahme wurde der Gradienten-Puls G_4 invertiert. Die Gradienten-Pulse G_1 dienen der Dephasierung von transversaler Magnetisierung, die an dieser Stelle noch vorhanden ist.

4.2.3 Das 3D HCCH-TOCSY-Experiment

Zur vollständigen Korrelation der ^{13}C -Kerne mit den ihnen zugehörigen Protonen wird ein 3D HCCH-TOCSY [120] (Abb.15) Experiment aufgenommen. In diesem Spektrum werden in F2-Richtung auf der Diagonalen die aliphatischen Kohlenstoff-Resonanzen abgebildet, während in F3-Richtung die Protonenresonanzen der Aminosäuren aufgetragen sind.

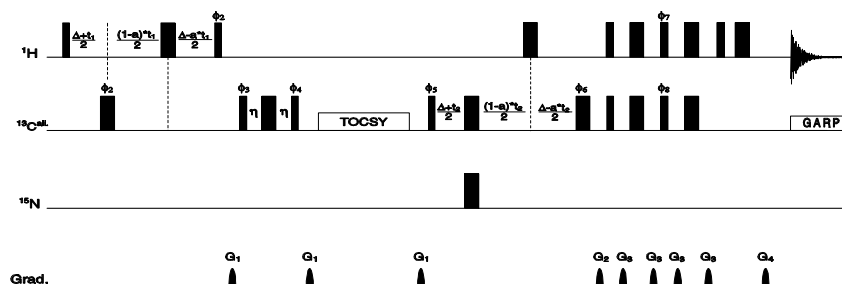


Abbildung 15: Pulssequenz des 3D HCCH-TOCSY Experiments. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = y$; $\phi_5 = y, -y$; $\phi_6 = x, -x$; $\phi_7 = y$; $\phi_8 = y$; $\phi_9 = x, -x$; $\phi_{10} = x, .x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$; $\phi_{11} = (16)0$; $\phi_{12} = (16)2$; $\phi_{13} = (16)3$; $\phi_{14} = (16)14$; $\phi_{15} = (16)1$; $\phi_{21} = (16)8$; $\phi_{22} = (16)10$; $\phi_{23} = (16)11$; $\phi_{24} = (16)6$; $\phi_{25} = (16)9$; Die Länge der angeführten Delays betrug: $\frac{\Delta+t_1}{2} = 4 \mu s$; $\frac{(1-a)\cdot t_1}{2} = 4 \mu s$; $\frac{\Delta-a\cdot t_1}{2} = 1,755 ms$; $\eta = 1 ms$; $a = t_{1\max}$; $\frac{\Delta+t_2}{2} = 4 \mu s$; $\frac{(1-a)\cdot t_2}{2} = 22 ms$; $\frac{\Delta-a\cdot t_1}{2} = 100 \mu s$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 ms, 10 Gcm^{-1}$, $G_2 = 1 ms, -39,85 Gcm^{-1}$; $G_3 = 0,5 ms, 39,85 Gcm^{-1}$; $G_4 = 0,5 ms, 8 Gcm^{-1}$.

In der Evolutionszeit t_1 ("semi constant-time" [121, 122, 123]) entwickelt sich chemische Verschiebung der aliphatischen Protonen, $^3J_{HH}$ -Kopplung und $^1J_{HC}$ -Kopplung. Anschließend wird über den folgenden 90° -Puls die Magnetisierung auf die aliphatischen ^{13}C -Kerne übertragen. Über den sich anschließenden TOCSY-Transfer werden die aliphatischen Kohlenstoff-Kerne miteinander magnetisch verknüpft. In der Evolutionszeit t_2 entwickelt sich chemische Verschiebung der ^{13}C -Kerne sowie heteronukleare Kopplung zwischen den ^{13}C - und 1H -Kernen. Über einen "reverse"-INEPT-Schritt [95] mit "sensitivity enhancement" wird die Magnetisierung auf die Amid-Protonen übertragen und in detektierbare Magnetisierung überführt. Zur phasensensitiven Aufnahme wurde der Gradienten-Puls G_4 invertiert. Die Gradienten-Pulse G_1 dienen der Dephasierung von transversaler Magnetisierung, die an dieser Stelle noch vorhanden ist.

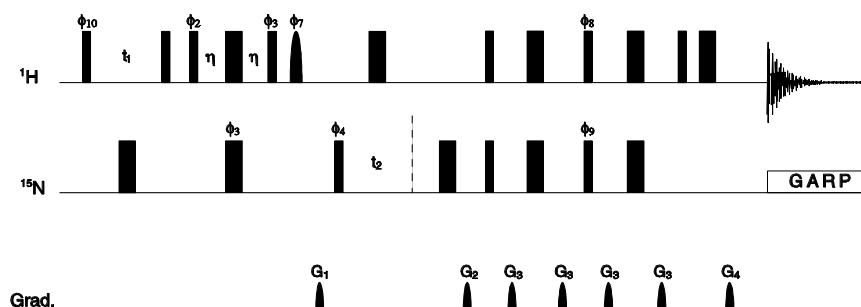


Abbildung 16: Pulssequenz des 3D NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = x$; $\phi_3 = y, -y$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_8 = y$; $\phi_9 = y$; $\phi_{10} = x, -x$; $\phi_{12} = x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $t_1 = 6,4 \mu\text{s}$; $t_2 = 8 \mu\text{s}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}, 10 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_2 = 1 \text{ ms}, -39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}, 39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}, 8 \text{ Gcm}^{-1}$.

4.3 Experimente zur Strukturbestimmung

4.3.1 Das 3D NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment

Zur Identifizierung der räumlichen Konnektivitäten zwischen den Protonen unterschiedlicher Aminosäuren und ihren Amid-Kernen wurde ein 3D NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment [110, 111, 112, 113, 114] (Abb.16) durchgeführt. Innerhalb dessen "sieht man" nicht nur die Signale der intraresidualen Protonen einer Aminosäure, sondern auch die Konnektivitäten durch den Raum zu räumlich benachbarten Aminosäuren. Allerdings nimmt die Intensität der Signalamplitude mit dem Faktor $\frac{1}{r^6}$ ab.

Während der Evolutionszeit t_1 entwickelt sich chemische Verschiebung sämtlicher aliphatischer Protonen. Der selektive Protonen-Puls und der Gradient G_1 sorgen für die Dephasierung der übrig gebliebenen transversalen Magnetisierung. Über den sich anschließenden INEPT-Transfer [95] wird die Magnetisierung auf die ^{15}N -Kerne übertragen. Zu beachten ist, daß darin auch der Transfer auf die Seitenketten-Amide enthalten ist. In der Wartezeit t_2 entwickelt sich chemische Verschiebung der ^{15}N -Kerne, inklusive der Seitenketten-Amide. Anschließend

wird über einen "reverse"-INEPT-Schritt [95] mit "sensitivity enhancement", welcher observable Magnetisierung erzeugt, die Magnetisierung auf die Amid-Protonen übertragen und dort detektiert. Weiterhin wurde zur phasensensitiven Aufnahme der Gradienten-Puls G_4 invertiert.

4.3.2 Das 3D NOESY-(^{13}C , ^1H)-HSQC-Experiment

Zur Identifizierung der räumlichen Konnektivitäten zwischen den Protonen unterschiedlicher Aminosäuren und ihren Kohlenstoff-Kernen wurde ein 3D NOESY-(^{13}C , ^1H)-HSQC-Experiment [110, 111, 112, 113, 114] (Abb.17) durchgeführt. Innerhalb dessen sieht man nicht nur die Signale der intraresidualen Protonen einer Aminosäure, sondern auch die Konnektivitäten durch den Raum zu räumlich benachbarten Aminosäuren. Allerdings nimmt die Intensität der Signalamplitude auch hier mit dem Faktor $\frac{1}{r^6}$ ab. In der Wartezeit t_1 entwickelt sich nur chemische Verschiebung der aliphatischen Protonen der Seitenketten, während die heteronuklearen Kerne mittels 180° Pulsen entkoppelt werden. Die Gradienten-Pulse G_1 sorgen für die Dephasierung der restlichen transversalen Magnetisierung. Über den folgenden 90° Puls wird die Magnetisierung auf die ^{13}C -Kerne übertragen. In der Wartezeit t_2 entwickelt sich chemische Verschiebung der ^{13}C -Kerne. Anschließend wird über einen "reverse"-INEPT-Schritt [95] mit "sensitivity enhancement", welcher observable Magnetisierung erzeugt, die Magnetisierung auf die Protonen übertragen und dort detektiert. Zur phasensensitiven Aufnahme wurde der Gradienten-Puls G_4 invertiert.

4.3.3 Das NOESY-(^{13}C , ^1H)-HSQC-Experiment zur Detektion der aromatischen Aminosäurereste

Bei diesem Experiment [110, 111, 112, 113, 114] (Abb.18) werden die ^{13}C -Kerne von aromatischen Ringsystemen mit deren Protonen und mit den intramolekularen H^β -Protonen korreliert. Dieses Experiment ist nötig, da in den herkömmlichen Seitenketten-Experimenten aufgrund des $^3J_{HH}$ -Magnetisierungstransfers die aromatischen Ringsysteme nicht detektiert werden können.

Die ersten zwei 90° -Pulse erzeugen transversale Magnetisierung, die gleich

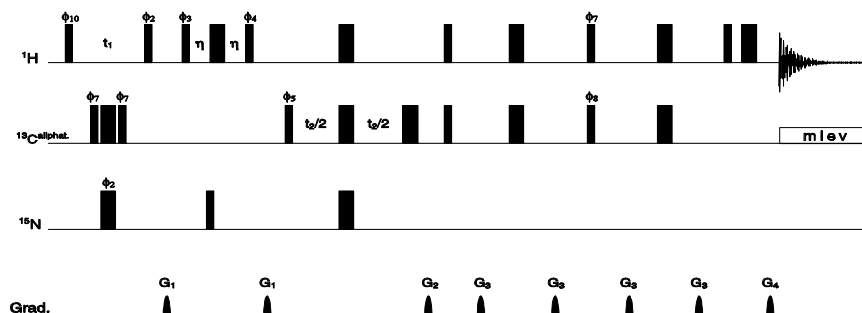


Abbildung 17: Pulssequenz des 3D NOESY-(^{13}C , ^1H)-HSQC Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = x$; $\phi_3 = x$; $\phi_4 = y, -y$; $\phi_5 = x, -x$; $\phi_6 = x, -x$; $\phi_7 = y$; $\phi_8 = y$; $\phi_9 = y$; $\phi_{10} = x, -x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $t_1 = 6,0 \mu\text{s}$; $\eta = 1,7 \text{ ms}$; $\frac{t_2}{2} = 4 \mu\text{s}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}$, 10 Gcm^{-1} , $G_2 = 1 \text{ ms}$, $-39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}$, $39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}$, 8 Gcm^{-1} .

wieder durch den folgenden Gradienten-Puls G_1 eliminiert wird. Dieser Vorgang dient der Inaktivierung der ^{15}N - und ^{13}C -Kerne während t_1 . Während der Evolutionszeit t_1 entwickelt sich nur chemische Verschiebung der Protonen. Über den sich anschließenden INEPT-Transfer [95] wird die Magnetisierung auf die ^{13}C -Kerne der aromatischen Ringsysteme transferiert. In der Evolutionszeit t_2 entwickelt sich chemische Verschiebung der Kohlenstoffresonanzen. Anschließend wird über einen "reverse"-INEPT-Schritt [95] mit "sensitivity enhancement", welcher observable Magnetisierung erzeugt, die Magnetisierung auf die Protonen übertragen und dort detektiert. Zur phasensensitiven Aufnahme wurde der Gradienten-Puls G_4 invertiert.

4.4 Experiment zur Bestimmung von Amid-Protonen T_1 -Zeiten

4.4.1 Das ct-(^{15}N , $^1\text{H}^N$)-HSQC-Experiment

Der initialisierende selektive Protonen-Puls (Abb.19) dient der Wasserunterdrückung. In der folgenden Relaxationswartezeit T_W werden die Signalintensitäten mit

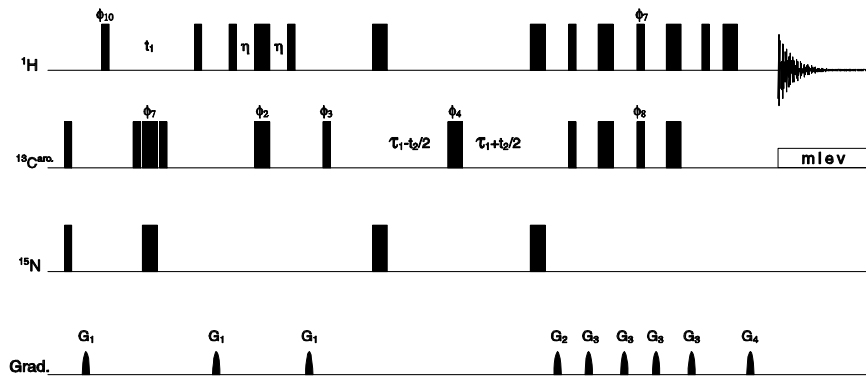


Abbildung 18: Pulssequenz des 3D NOESY- $(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HSQC Experimentes zur Detektion der aromatischen Systeme. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x -Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x$; $\phi_4 = x, -x, y, -y$; $\phi_7 = y$; $\phi_8 = y, -y$; $\phi_9 = x, -x$; $\phi_8 = y$; $\phi_{10} = x, -x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $t_1 = 8,6 \mu\text{s}$; $\eta = 1,4 \text{ ms}$; $\tau = 6,5 \text{ ms}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}, 10 \text{ Gcm}^{-1}$, $G_2 = 1 \text{ ms}, -39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}, 39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}, 8 \text{ Gcm}^{-1}$.

dem Faktor $I_0 \bullet e^{-\frac{T}{T_1}}$ moduliert. Während des Delays η entwickelt sich ausschließlich heteronukleare Kopplung. Über diesen INEPT-Transfer [95] wird die Magnetisierung auf die Amide des Proteinrückgrates transferiert. In der Evolutionszeit t_1 entwickelt sich chemische Verschiebung der Amide des Proteinrückgrates und heteronukleare Kopplung. Anschließend wird über einen "reverse"-INEPT-Schritt [95] mit "sensitivity enhancement", welcher observable Magnetisierung erzeugt, die Magnetisierung auf die Protonen übertragen und dort detektiert. Zur phasensensitiven Aufnahme wurde der Gradienten-Puls G_4 invertiert. Der Gradienten-Puls G_1 dient der Dephasierung von transversaler Magnetisierung.

4.4.2 Extraktion der Amid-Protonen- T_1 -Zeiten

Die Auswertung der Spektren zur Ermittlung der Relaxationsraten wurde mit der "Matlab Software RMX" von Jürgen M. Schmidt durchgeführt. Die Abstände aus den Amid-Protonen- T_1 -Zeiten wurden mit der Methode von Bertini et. al. bestimmt [124]. Zu beachten ist bei dieser Methode, daß der diamagne-

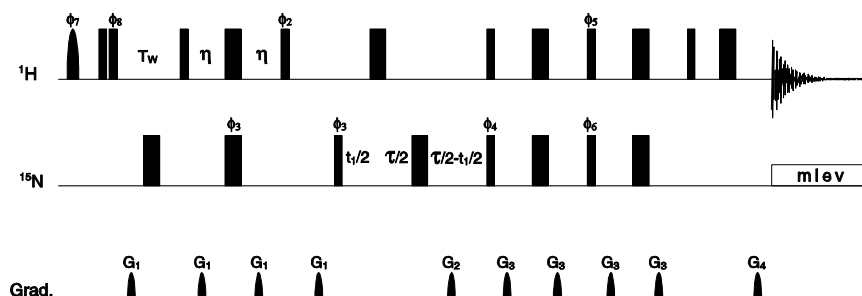


Abbildung 19: Pulssequenz des 2D ct -($^{15}\text{N}, ^1\text{H}^N$)-HSQC Experiments. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x -Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen: $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = x, -x$; $\phi_5 = y$; $\phi_6 = y, -y$; $\phi_7 = y$; $\phi_8 = x, -x$; $\phi_{ref} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Länge der angeführten Delays betrug: $\eta = 1,02 \text{ ms}$; $\tau = 1,4894 \text{ ms}$. Die Gradientenpulse hatten eine Länge von: $G_1 = 1 \text{ ms}, 10 \text{ Gcm}^{-1}$, $G_2 = 1 \text{ ms}, -39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_3 = 0,5 \text{ ms}, 39,85 \text{ Gcm}^{-1}$; $G_4 = 0,5 \text{ ms}, 8 \text{ Gcm}^{-1}$.

tische Anteil eliminiert wird. Für die Abstandsberechnung wird somit nur der paramagnetische Anteil des Elektronenspins berücksichtigt.

4.5 Spektrenreferenzierung und Prozessierung der Spektren

4.5.1 Spektrenreferenzierung

Als Referenzsubstanz für die Kalibrierung der NMR-Spektren dienen grundsätzlich externe Standards. Werte der chemische Verschiebung der Protonenresonanzen beziehen sich auf 0 ppm für 3-(Trimethylsilyl)-(2,2,3,3- d_4)-propionsäure (TSP) in 50% $\text{H}_2\text{O}/50\% \text{D}_2\text{O}$. Für ^{15}N wurde die Resonanz von 2,9 M $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ in 1N HCL bei 20°C auf 24,93 ppm relativ zu flüssigem Ammoniak gesetzt [125]. Die Werte der ^{13}C -chemischen Verschiebung sind bezogen auf 1,7 ppm für die Methylresonanz von TSP relativ zu Tetramethylsilan (TMS) [126].

Zur Bestimmung der sekundären chemischen Verschiebung von ^{13}C wurden die Werte so umgerechnet, daß die Skala ihren Ursprung bei der Methylresonanz von 2,2-Dimethyl-2-sila-pentasulfonsäure (DSS) hat. Die Differenz betrug -1,76

ppm.

4.5.2 Prozessierung der Spektren

Für alle NMR-Spektren umfaßte die Datenmanipulation eine Multiplikation des FID's bzw. Interferogramme mit Wichtungsfunktionen (Apodisierung), die Erweiterung auf zumindest die nächste Potenz von 2 durch Ergänzen von Nullen ("zero-filling"), reale oder komplexe Fourier-Transformation sowie anschließende Phasenkorrektur. Eine Basislinienkorrektur in der Aquisitionsdomäne durch Subtraktion eines Polynoms 4. oder 5. Ordnung wurde angeschlossen, wenn Ausläufer einer intensiven H₂O-Resonanz zu Störungen führten. Alternativ wurde vor der FT eine durch Konvolution der FID's mit einer Sinus-Glockenfunktion hervorgegangene, nur die niederfrequenten Anteile enthaltende Komponente subtrahiert [127], sofern die ¹H-Trägerfrequenz mit der Resonanzfrequenz des Lösungsmittels "zusammenfiel" und keine weiteren, in der Nähe liegenden Signale detektiert werden sollten. Als Wichtungsfunktion in Dimensionen, in welchen die gewünschten Signale eine Antiphase-Struktur besitzen, wurde eine Sinus-Glockenkurve angewendet. In allen anderen Fällen erfolgte die Apodisierung durch Multiplikation mit quadrierten, um $\frac{\pi}{8}$ bis $\frac{\pi}{2}$ verschobenen Sinus-Glockenfunktionen.

In "constant-time"-Dimensionen von zwei- und dreidimensionalen, sowie "semi constant-time"-Dimensionen in dreidimensionalen Experimenten wurden die Zeitdomänen-Daten durch "linear prediction" erweitert.

Alle Daten wurden mit dem UXNMR-Programm (Bruker) prozessiert.

4.6 Bestimmung der Lösungsstruktur von Proteinen

Nach der Interpretation der NMR-Daten müssen die gewonnenen strukturelevanten Parameter wie interatomare Abstands- und Diederwinkelbeschränkungen mit den holonomen Restriktionen im Molekül wie Bindungslängen oder Bindungswinkel unter Berücksichtigung sterischer Limitierungen kombiniert werden.

4.6.1 Distanzgeometrie-Rechnungen mit DYANA

Zur Lösung dieses komplexen Problems werden am häufigsten Distanzgeometrie-Verfahren unter der Verwendung des Algorithmus der variablen Zielfunktion [128] oder restriktive Molekulardynamik-Simulationen herangezogen. Sehr häufig werden Strukturen von Proteinen auf der Basis interatomarer Abstands- und Diederwinkelbeschränkungen mit Hilfe des Programms DYANA [129] berechnet. Das Programm arbeitet im Torsionswinkelraum, so daß Standardgeometrien der Aminosäurereste wie Bindungslängen und -winkel (gemäß ECEPP/2 Kraftfeld [130] während der Strukturberechnung erhalten bleiben. Mit der Definition der Aminosäuresequenz wird für die ω -Torsionswinkel eine cis- oder trans-Konformation festgelegt. Nach der Festlegung zweier Startpunkte am N-Terminus kann die Tertiärstruktur des Proteins lediglich mit einem Satz von Torsionswinkeleinstellungen beschrieben werden. Durch Änderung der frei drehbaren Torsionswinkel innerhalb erlaubter Intervalle werden zunächst intraresiduale Abstandsbeschränkungen erfüllt. Anschließend werden Schritt für Schritt auch immer weiterreichende Abstandsbeschränkungen berücksichtigt. Eine Fehlerfunktion enthält alle Verletzungen der vorgegebenen Abstand- und Diederwinkelbeschränkungen sowie der zumindest erforderlichen van-der-Waals-Abstände in einer Konformation und ist somit ein Maß dafür, inwieweit diese Konformation zur Beschreibung der experimentellen Daten dienen kann. Ziel der Strukturrechnung ist daher die Minimierung dieser Fehlerfunktion, der sogenannten "variablen Zielfunktion" T durch Variation der Torsionswinkel:

$$T = \sum_{c=o,u,v} \sum_{i \in I_c} \omega_c \left(\frac{\Theta_c(a_i^2 - c_i^2)}{2c_i} \right) + \sum_{j=1}^{n_d} \omega_d \left(1 - \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta_j}{\Gamma_j} \right)^2 \right) \Delta_j^2 \quad (8)$$

Der rechte Summenrand beschreibt die Verletzung der Abstandsgrenzen für obere, untere und van-der-Waals-Abstandsgrenzen. Der tatsächliche Abstand zwischen einem Atompaar i ist a_i , die zulässige Abstandsgrenze ist c_i . I_c ist die Gesamtmenge aller Abstandsgrenzen. Zur Unterscheidung von unteren und oberen Abstandsgrenzen dient die Funktion $\Theta_c(x)$:

$$\Theta_c(x) = \left\{ \begin{array}{ll} \max(0, x) & \text{für } c = o \\ \min(0, x) & \text{für } c = u, v \end{array} \right\} \quad (9)$$

Der zweite Summand in Gleichung 8 faßt die Verletzungen der zulässigen Diederwinkelintervalle zusammen. Dabei ist Δ_j die vorzeichenbehaftete Größe der Verletzung eines der n_d Diederwinkelintervalle, die mit dem Faktor ω_d gewichtet wird und Γ_j die Halbwertsbreite des verbotenen Diederwinkelintervalls:

$$\Gamma_j = \pi - \frac{\phi_i^{\max} - \phi_i^{\min}}{2} \quad (10)$$

Um die Gefahr zu verringern, während des Minimierungsprozesses der Zielfunktion T in ein lokales Minimum zu geraten, besteht die Menge I_c aller berücksichtigten Abstandsgrenzen bei der Minimierung einer zufälligen Startkonformation nur aus intraresidualen Beschränkungen. Ausgehend von der erhaltenen Konformation werden bei der zweiten Minimierung zusätzlich Beschränkungen zwischen Atomen benachbarter Reste berücksichtigt. In der folgenden Minimierung enthält I_c zusätzlich alle Beschränkungen zwischen Atomen innerhalb von Restetriplets. Da der für die Berechnung der Zielfunktion benötigte Datensatz schrittweise vergrößert wird und erst mit der letzten Minimierung alle experimentellen Randbedingungen berücksichtigt werden, bezeichnet man die Zielfunktion als variabel.

4.6.2 Ergänzung der DYANA-Bausteinbibliothek um den künstlichen Aminosäurerest CYSC

Um den Eisen-Schwefel-Cluster in der DYANA-Rechnung berücksichtigen zu können, muß eine hypothetische Aminosäure definiert werden, die in ihrer Seitenkette den Eisen-Schwefel-Cluster enthält. Dafür wurde willkürlich Cystein 46 ausgewählt. Der Bausteinbibliothekseintrag für die "Aminosäure" CYSC lautet:

Residue	CYSC	5	18	3	17							
1 Omega	-1	2	10.0000	2	1	3	4	0				
2 Phi	0	0	0.0000	1	3	5	13	0				
3 Chi1	1	3	1.3500	3	5	7	11	12				
4 Chi2	1	3	0.7500	5	7	11	12	12				
5 Psi	0	0	0.0000	3	5	16	18	0				
1 C	C_BYL	2	8.2024	-18.2680	-10.1730	4.3260	2	3	0	0	0	0
2 O	O_BYL	2	-7.0004	-19.2640	-10.0950	5.0900	1	0	0	0	0	0
3 N	N_AMI	2	-6.4912	-17.6360	-9.0760	3.9370	1	4	5	0	0	0
4 HN	H_AMI	0	3.2103	-16.7851	-9.1849	3.3669	3	0	0	0	0	0
5 CA	C_ALI	3	1.1597	-18.0690	-7.7280	4.2650	3	6	7	13	0	0
6 HA	H_ALI	0	0.3677	-18.5060	-7.6426	5.2599	5	0	0	0	0	0
7 CB	C_ALI	3	-1.9092	-16.8990	-6.7610	4.3840	5	8	9	11	0	0
8 HB1	H_ALI	0	1.0041	-16.0901	-7.2901	4.8878	7	0	0	0	0	10
9 HB2	H_ALI	0	1.0041	-17.2418	-5.9063	4.9672	7	0	0	0	0	10
10 QB	PSEUD	0	0.0000	-16.5000	-6.6000	4.9200	0	0	0	0	0	0
11 SG	S_RED	3	0.2687	-16.1940	-6.0870	2.8640	7	12	0	0	0	0
12 FE1	S_RED	1	0.0000	-15.4600	-7.5560	1.4200	11	14	15	0	0	0
13 FE2	S_RED	1	0.0000	-14.8000	-7.3290	-1.2030	14	15	0	0	0	0
14 S1	S_RED	1	0.0000	-13.7120	-6.2480	0.3410	12	13	0	0	0	0
15 S2	S_RED	1	0.0000	-16.4030	-8.3650	-0.1730	12	13	0	0	0	0
16 C	C_BYL	2	8.2024	-19.1230	-7.1860	3.3200	5	17	18	0	0	0
17 O	O_BYL	2	-7.0004	-19.5000	-6.0040	3.4000	16	0	0	0	0	0
18 N	N_AMI	2	-6.4912	-19.6120	-8.0090	2.3970	16	0	0	0	0	0

Die Definition des CYSC-Restes als Baustein für die DYANA-Bibliothek erfolgte nach der Vorschrift von [129].

Die Kopfzeile enthält nach den Worten RESIDUE CYSC die Gesamtzahl der veränderbaren Diederwinkel und der folgenden Atomdeklaration, sowie die Nummern des ersten und letzten Atoms der Liste, die noch zum CYSC-Rest gehören.

Die Definition der Diederwinkel in den folgenden 5 Zeilen erfolgt durch eine laufende Nummer, ihren Namen sowie den Nummern der vier Atome, die

den Winkel aufspannen und der Nummer des letzten Atoms, dessen Koordinaten durch eine Änderung des Diederwinkels beeinflußt werden. Für Rückgrat-Atome ist diese Zahl 0. Durch eine Drehung dürfen keine Atome bewegt werden, deren Nummern kleiner als die Nummern des dritten Atoms des entsprechenden Diederwinkels sind.

Die Atomnummern entsprechen den laufenden Nummern aus der ersten Spalte der Atomdeklaration. Die weiteren Einträge enthalten den Atomnamen, den Atomtyp, die x-, y- und z-Koordinaten in Angström relativ zur Amidfunktion des Proteinrückgrates, vier Atomnummern zur Beschreibung der kovalenten Verknüpfungen und die Atomnummern des zweiten diastereotopen Substituenten eines prochiralen Zentrums.

NMR-Pseudoatome wurden definiert für die $^1\text{H}^\beta$ -Atome des Cystein 46 - Restes. Mit 18 Atomen enthält dieser Rest mehr Atome als in der Cystein-Standard-Version, die in DYANA vorgesehen ist.

4.6.3 Verwenden der REDAC-Strategie

Da die bei einer Minimierung der Zielfunktion erhaltene Konformation von der Startstruktur abhängt, wurde in einem zyklischen Verfahren das Ergebnis einer Minimierung als Startkonformation für eine weitere Minimierung benutzt. Nach einigen Durchläufen verringern sich die zuletzt erhaltenen Zielfunktionen der Konformationen eines Ensembles kaum noch. Innerhalb eines Ensembles können sich die Konformationen in ihrer Güte, ausgedrückt durch den Wert der Zielfunktion, um mehrere Größenordnungen unterscheiden. *Lokale* Übereinstimmungen von Konformationen mit Zielfunktionen kleiner einem willkürlichen Schwellenwert können durch einen Vergleich der Diederwinkel identifiziert werden. Die erhaltenen Verteilungsintervalle der Diederwinkel kann man als *redundanten* Informationsgehalt der experimentellen Randbedingungen ansehen, da sie von zufälligen Startwerten ausgehend in den Strukturen eingestellt wurden, die diese Randbedingungen am besten erfüllten.

Zur Beschleunigung der Konvergenz der Zielfunktion der übrigen Konformationen gegen kleine Werte wird diese eigentlich redundante Information in Form

von zusätzlichen Diederwinkelbeschränkungen im folgenden Minimierungszyklus allen Konformationen zur Verfügung gestellt. Im letzten Minimierungszyklus der Zielfunktionen werden die zusätzlichen Diederwinkelbeschränkungen wieder entfernt. Diese REDAC-Strategie [131] liefert ähnliche Strukturensamble wie die Minimierung eines sehr großen Satzes zufälliger Startstrukturen bei deutlich geringerer Rechenzeit.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Zuordnung der Resonanzen des oxidierten Rinder Adrenodoxins

Mit einem Molekulargewicht von 14 kDa und 128 Aminosäureresten befindet sich das Adrenodoxin aus Rind bereits oberhalb der allgemein bei 10 - 12 kDa angesetzten Molekülgröße, für die eine Zuordnung der ^1H -Resonanzen nur mit homonuklearen NMR-Experimenten erzielt werden kann, so daß die Zuordnung von Anfang an auf heteronuklear korrelierte Experimente gestützt wurde.

Weiterhin konnte anhand des Eisen-Schwefel-Clusters mit Schwierigkeiten bei der Zuordnung gerechnet werden. Im oxidierten Zustand sollte der Eisen-Schwefel-Cluster einen diamagnetische Charakter haben. Studien [85] belegten aber, daß es über "anti-ferromagnetische Kopplung" zu einem partiellen paramagnetischen Charakter kommt, der zu immensen Linienverbreiterungen und zu drastisch verkürzten Relaxationszeiten bei Kernen in der Nähe (~ 6 Angström) des Clusters führt.

Ein weiterer Faktor, der zu Problemen bei der Zuordnung führte, war die sehr kurze Lebensdauer des Proteins (Abb.20, Abb.21). In eindimensionalen Spektren lassen sich Veränderungen am Protein sehr gut erkennen. Diese erkennt man daran, daß sich Intensitäten einzelner Linien ändern. Aber auch das Auftreten von "scharfen" und intensiven Signalen, die vorher nicht beobachtet werden konnten, sind ein sicheres Zeichen für eine Denaturierung des Proteins. Adrenodoxin war nach ca. 3 Tagen für eine Messung nicht mehr zu verwenden. Die Schwierigkeiten,

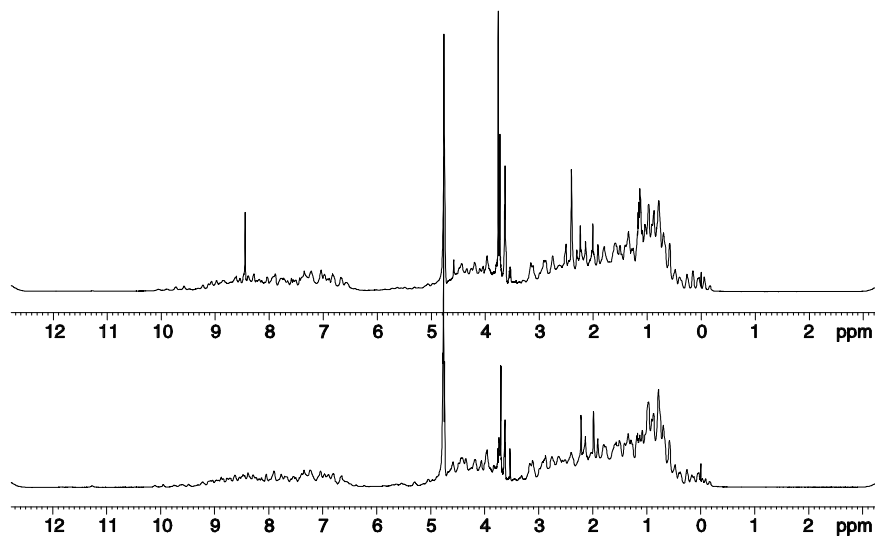


Abbildung 20: Aufnahme eines eindimensionalen Spektrums einer "frischen" Proteinprobe (unten) und nach einer Meßzeit von zweieinhalb Tagen (oben). Das obere 1D-Spektrum zeigt bereits sehr stark denaturiertes Adrenodoxin.

die während der Zuordnung auftreten, sind in Abbildung 21 illustriert. Die Konsequenz ist, daß die Proben für jedes dreidimensionale Experiment, unabhängig von seiner Funktion, nicht länger als 3 Tage zur Aquisition der Daten verwendet werden konnte.

Für die Zuordnung der ^1H -Resonanzen des Proteinrückgrats wurde daher die Dispersion des Amidbereichs durch die ^{15}N -chemische Verschiebung benötigt. Die Ermittlung einer gut definierten Lösungsstruktur erfordert unter anderem aber auch die Detektion einer großen Anzahl von NOE-Effekten zwischen aliphatischen Protonen. Im vorliegenden Fall ist dazu eine Separation von NOESY-Kreuzsignalen durch ^{13}C -chemische Verschiebung der beteiligten Gruppen unumgänglich. Zu diesem Zweck muß zunächst die Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen durchgeführt werden. Die für "100%" $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -angereicherte Proteine entwickelten Tripelresonanz-Experimente ermöglichen es, ^{13}C -Resonanzen zusammen mit ^1H - und ^{15}N -Resonanzen in einer konzertierten Weise zuzuordnen [82, 132, 133]. Dabei werden häufig innerhalb eines Experiments alle drei Kerne miteinander

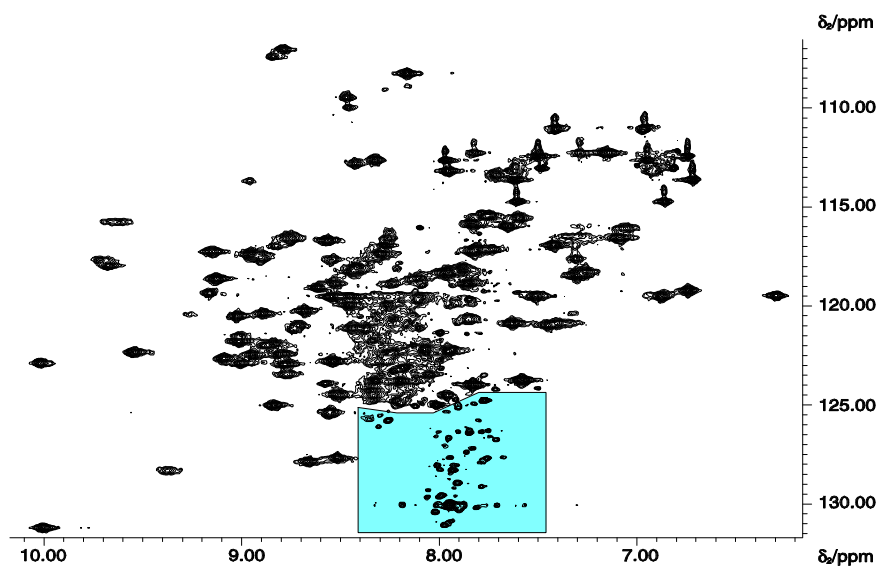


Abbildung 21: Zweidimensionaler Ausschnitt aus einem NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Spektrum. Mit der blauen Box sind diejenigen Peaks markiert, die erst bei Denaturierung des Adrenodoxin auftreten.

physikalisch verknüpft. Allerdings führt der meistens verwendete Standardsatz an Experimenten nur im Idealfall zu einer eindeutigen Zuordnung, so daß es im Fall von Adrenodoxin notwendig war, weitere Experimente aufzunehmen, die ein gewisses Maß an redundanten Informationen enthalten. Für die Überprüfung der Zuordnung wurden diese Experimente aber unbedingt benötigt. Die Kerne in der Nähe des Eisen-Schwefel-Clusters weisen unvollständige Spinsysteme auf, da durch den Eisen-Schwefel-Cluster enorme Linienverbreiterungen und drastisch verkürzten Relaxationszeiten zu beobachten sind. Diese Einflüsse führen zu einem "Verschwinden" von Resonanzen in den aufgenommenen Spektren.

Die Tabellen mit den Werten der chemischen Verschiebung, für den oxidierten sowie den reduzierten Zustand, der zugeordneten ^1H -, ^{15}N -, ^{13}C - Resonanzen sind im Anhang aufgeführt.

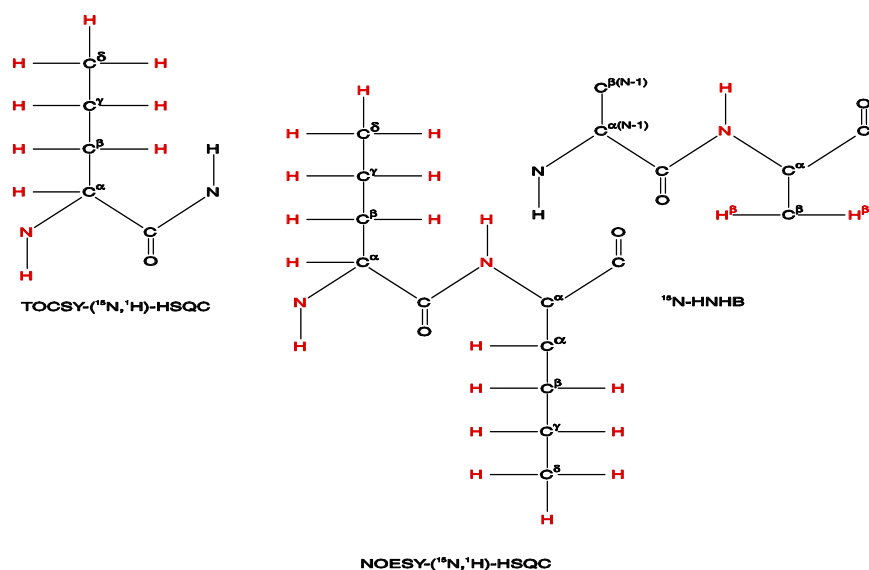


Abbildung 22: Detektierbare Kerne der dreidimensionalen Experimente TOCSY-($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-HSQC, ^{15}N -HNHB und NOESY-($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-HSQC. Die Detektierten Kerne sind in der Farbe Rot dargestellt.

5.2 Zuordnung der Resonanzen des reduzierten Rinder-Adrenodoxins

Im Fall des reduzierten Zustandes von Rinder-Adrenodoxin wurden die gleichen Experimente aufgenommen. Auch hier wurde die Aufnahme von Spektren sowohl durch die begrenzte Lebensdauer (2 - 3 Tage), als auch durch oben genannte Einflüsse begrenzt.

5.3 Zuordnung der ^1H - und ^{15}N - Resonanzen

Dreidimensionale NMR Techniken sind wertvolle Werkzeuge, um eine bessere Dispersion der Resonanzen eines Proteins zu erhalten. Durch die Verknüpfung zu einem weiteren NMR aktiven Kern erhöht sich der Informationsgehalt, aber auch die Komplexität der Spektren.

Sehr wichtig war in diesem Zusammenhang der Informationsgehalt des TOCSY-($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$)-HSQC-Experiments [110, 111, 112, 113, 114], welches in einigen Fällen

Korrelationen aller aliphatischen Protonen zur $^1\text{H}^N$ - Resonanz des jeweiligen Spinsystems aufwiesen. Die eindeutige Zuordnung der $^1\text{H}^\beta$ - Protonen konnte mit Hilfe des 3D HNHB-Experiments [94] getroffen werden. Die sequentielle Zuordnung von Protonenresonanzen mit Hilfe einer Kombination von ^{15}N - aufgelöster TOCSY - und NOESY - Spektren basiert im Grunde auf der erweiterten "Wüthrich-Methode" [134, 135, 136]. Hier werden zunächst Gruppen skalar gekoppelter ^1H - Spins identifiziert und diese dann durch interresiduale NOE-Effekte entsprechend der Aminosäuresequenz aneinandergereiht. Man greift hier ausschließlich auf Korrelationen zurück, an welchen Amidprotonen beteiligt sind. Durch die Dispersion der ^{15}N - chemischen Verschiebung in der dritten Dimension ist es nämlich möglich, Signalüberlagerungen der Amidprotonen weitgehend aufzulösen. Der Zusammenhang zwischen den drei Spektren ist in den schematischen Abbildungen 22 und 23 zu sehen.

Bereits die ersten drei der oben beschriebenen Experimente zeigten, daß zusätzliche Informationen und somit weitere Experimente nötig waren. Die Mehrzahl der Seitenkettenresonanzen waren weder im TOCSY -, noch im NOESY - Spektrum vollständig zu erkennen, was auf den Einfluß des Eisen-Schwefel-Clusters zurückzuführen ist.

5.4 Zuordnung der ^{13}C - Resonanzen

Im Gegensatz zu den ^{15}N - Resonanzen des Proteinrückgrates, die sich praktisch automatisch aus ^{15}N - aufgelösten $^1\text{H}, ^1\text{H}$ - Korrelationsspektren ergeben, werden für die ^{13}C - Resonanzzuordnung eigens zu diesem Zweck entwickelte Standardexperimente verwendet. Hierbei steht die gegenüber Protonenkorrelationen erhöhte Transfereffizienz durch Ausnutzung großer Kopplungen im Vordergrund. Die so erhaltene Information kann anschließend zur Gewinnung struktureller Daten eingesetzt werden.

5.4.1 Korrelation der Resonanzen des Proteinrückgrates

Im ursprünglichen Ansatz zur Zuordnung von ^1H , ^{13}C und ^{15}N - Resonanzen der Proteinhauptkette über ^1J und ^2J skalare Wechselwirkungen [133] werden die vier

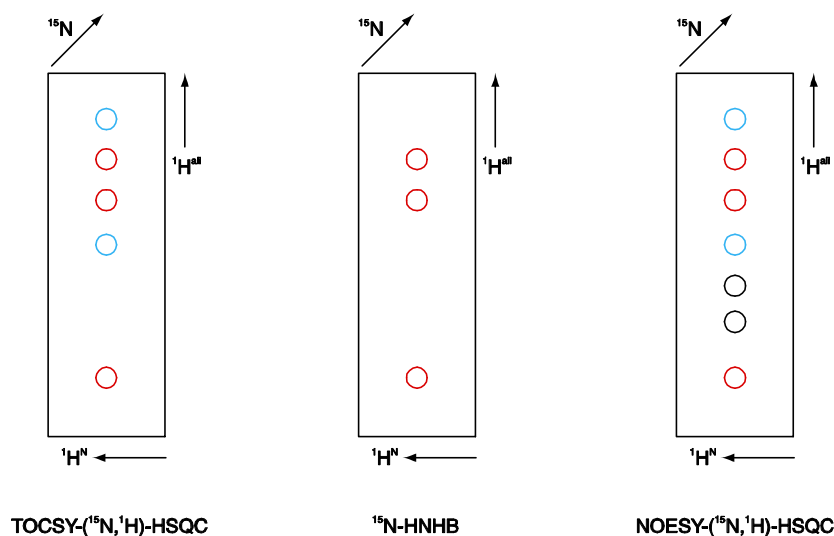


Abbildung 23: Schema der Konnektivitäten zwischen den drei Experimenten zur Zuordnung der Resonanzen der Protonen und der Amid-Kerne und anschließendem "Sequential Walk" per NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC. Informationsgleichheit ist in dieser Abbildung farblich codiert.

Tripelresonanzexperimente HNC0, HNCA, HCACO und HCA(CO)N eingesetzt. Das Auffinden sequentiell benachbarter Aminosäurereste beruht daher letztendlich immer auf gemeinsamen Korrelationen zu einer $^{13}\text{C}^\alpha$ - Resonanz und ist deshalb anfällig für die Signalüberlagerungen im spektralen Bereich dieser Spins, auch wenn diese im Prinzip durch Kombination der drei anderen Experimente in weitere Frequenzkoordinaten aufgelöst werden können.

Im folgenden soll ein alternativer Weg zur Resonanzzuordnung der Hauptkette $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - angereicherten Adrenodoxins gezeigt werden, bei dem sowohl Paare von $^{13}\text{C}^\alpha$ - als auch von ^{13}CO - Resonanzen für eine sequentielle Verknüpfung benutzt werden. Zusätzlich wird selektiv in Kombination auf Informationen von $^{13}\text{C}^\alpha$ - und $^{13}\text{C}^\beta$ - Resonanzen, sowie zur zusätzlichen Charakterisierung der Aminosäuren auf $^1\text{H}^\alpha$ - und $^1\text{H}^\beta$ - Resonanzen zurückgegriffen. Für die Anwendung zur Signalmzuordnung war die Kenntnis der $^1\text{H}^N$ -, $^1\text{H}^\alpha$ - und ^{15}N - Resonanzfrequenzen aus den ^{15}N , ^1H - Korrelationsexperimenten zwar keine Voraussetzung, erlaubte aber eine Überprüfung der Ergebnisse.

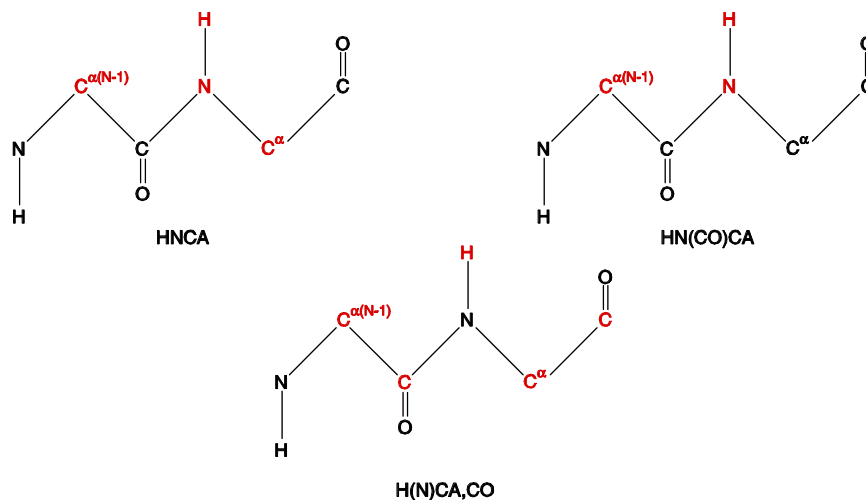


Abbildung 24: Zusammenhang der drei Experimente HNCA, HN(CO)CA und H(N)CA,CO anhand eines Ausschnitts des Proteinrückgrates.

Bei Adrenodoxin war es notwendig, redundante Information der chemischen Verschiebungen zu erlangen, da in den einzelnen Experimenten die Resonanzen und Spinsysteme aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften und den daraus resultierenden Schwierigkeiten sehr oft nicht vollständig sichtbar waren.

5.4.2 Beschreibung der ^{13}C -Experimente

Der erste Satz von Experimenten diente dazu, die spektroskopischen Eigenschaften von Adrenodoxin bei den doppelt markierten Proben zu beobachten. Wie bereits bei den ^{15}N korrelierten Experimenten beobachtet, kam es auch bei der doppelt markierten Probe zu den oben beschriebenen Problemen.

HNCA, HN(CO)CA, H(N)CA,CO Als erste Experimente wurden das HNCA, HN(CO)CA und H(N)CA,CO aufgenommen. Das HNCA Experiment korreliert die Amid-Protonen mit den intra- und interresidualen $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kernen sowie den intraresidualen Amididen. Das HN(CO)CA Experiment korreliert dagegen über die Peptid-Bindung die intraresidualen Amid-Protonen und die intraresidualen Amide mit den interresidualen $^{13}\text{C}^\alpha$ der vorangegangenen Aminosäure. Um ein

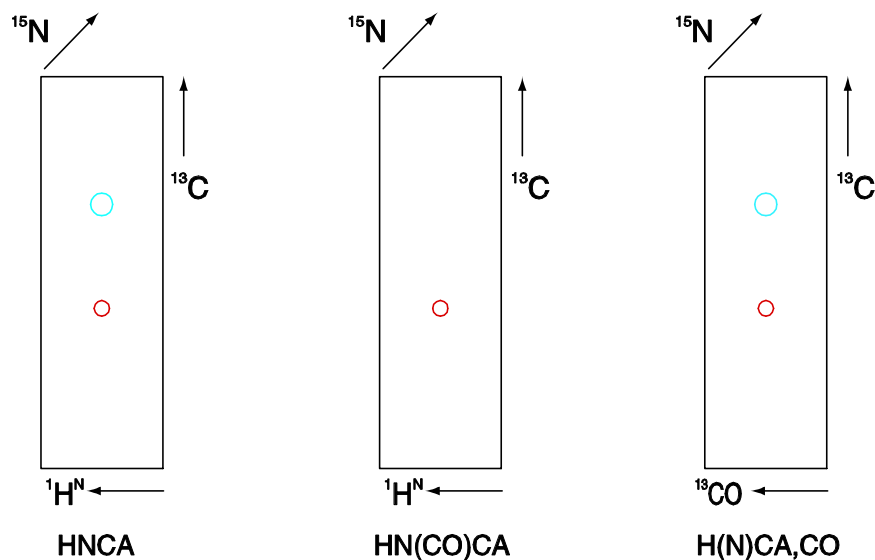


Abbildung 25: Schematischer Zusammenhang zwischen den Experimenten HNCA, HN(CO)CA und H(N)CA,CO. Peaks (Kreise), die die gleiche Information liefern sind farblich codiert.

gewisses Maß an Redundanz zu erlangen, wird zusätzlich noch das H(N)CA,CO Experiment aufgenommen, bei welchem die intraresidualen Amid-Protonen mit den intra- und interresidualen $^{13}\text{C}^{\alpha}$ -Kernen korrelieren und anstelle der Korrelation zum eigenen Amid, eine Korrelation zur eigenen Carbonyl-Gruppe herstellt. Abbildung 24 und Abbildung 25 verdeutlichen diesen Sachverhalt noch einmal anschaulich.

HCACO, HNCO, (HCA)CO(CA)NH, HBHA(CO)NH Zur weiteren Zuordnung des Proteinrückgrates wurden das HCACO-, HNCO-, (HCA)CO(CA)NH- und HBHA(VCO)NH-Experiment aufgenommen. Das HNCO liefert die interresiduale Carbonyl-Information im Gegensatz zum H(N)CA,CO. Das HCACO korreliert das $^1\text{H}^{\alpha}$ Proton mit dem intraresidualen $^{13}\text{C}^{\alpha}$ - und $^{13}\text{C}^{\beta}$ -Kern. Allerdings verhindern bei diesem Experiment die Resonanzen des Wasser die Zuordnung der $^1\text{H}^{\alpha}$ -Protonen. Bei 4,74 ppm erzeugen die Protonen des Wassers einen ziemlich breiten Intensitätsstreifen, der die $^1\text{H}^{\alpha}$ -Resonanzen ganz oder teilweise überdeckt.

Zur Ergänzung des HCACO Experiments wurde anschließend ein HBHA(CO)NH Experiment aufgenommen. Dieses Experiment gestattet die Beobachtung der interresidualen $^1\text{H}^\alpha$ - und $^1\text{H}^\beta$ -Protonen. Der Unterschied ist, daß man hier von der Wasserresonanz "weggeht" und die Korrelation zum Proteinrückgrat-Amid anhand seiner chemischen Verschiebung nutzt. Dessen spektraler Bereich erstreckt sich von 6 - 11 ppm und ist somit deutlich tieffeldverschoben im Bezug auf die Wasserresonanz. Somit können die aliphatischen Protonen nahezu "ungestört" beobachtet werden.

Weitere Ergänzungen sind das (HCA)CO(CA)NH und das HNCO. Beide liefern hier sowohl die nötige Redundanz als auch zusätzliche Informationen zur Zuordnung. Beide Experimente sind unterschiedlich empfindlich und gestatten nicht immer die Beobachtung der Resonanzen der Spinsysteme. Durch sehr kurze T_1 -Relaxationszeiten und enorme Linienverbreiterung wird die Untersuchung von Resonanzen, die nahe dem Eisen-Schwefel-Cluster angeordnet sind, erheblich beeinträchtigt. Abbildung 26 und Abbildung 27 erklären anschaulich den Zusammenhang der vier Experimente.

(H)CC(CO)NH-TOCSY, HNCACB, HCCH-TOCSY Das letzte Experiment zur Proteinrückgrat-Zuordnung ist das HNCACB. Es verknüpft das Amid-Proton und sein Amid sowohl mit den intraresidualen $^{13}\text{C}^\alpha$ - und $^{13}\text{C}^\beta$ -Kernen, als auch mit den interresidualen $^{13}\text{C}^\alpha$ - und $^{13}\text{C}^\beta$ -Kernen der vorangehenden Aminosäure. Das HNCACB bildet den Übergang zur Seitenketten-Zuordnung, da mit den $^{13}\text{C}^\beta$ -Kernen ein weiterer Baustein der Seitenkette einer Aminosäure detektiert wird. Die $^{13}\text{C}^\beta$ -Kerne der Aminosäuren haben sehr charakteristische chemische Verschiebungen, die für Identifizierung der Aminosäurereste sehr wichtig sind. In den vorangegangenen Experimenten wurden bisher nur die Schweratome des Proteinrückgrats detektiert.

Das (H)CC(CO)NH-TOCSY ist ein *Seitenketten*-TOCSY, welches die ^{13}C -Kerne der Seitenkette der vorangehenden Aminosäure mit dem Amid-Proton und dem ^{15}N -Kern der folgenden Aminosäure korreliert. Allerdings werden bei diesem Experiment nur die Signale der aliphatischen ^{13}C -Kerne und nicht die Signale der

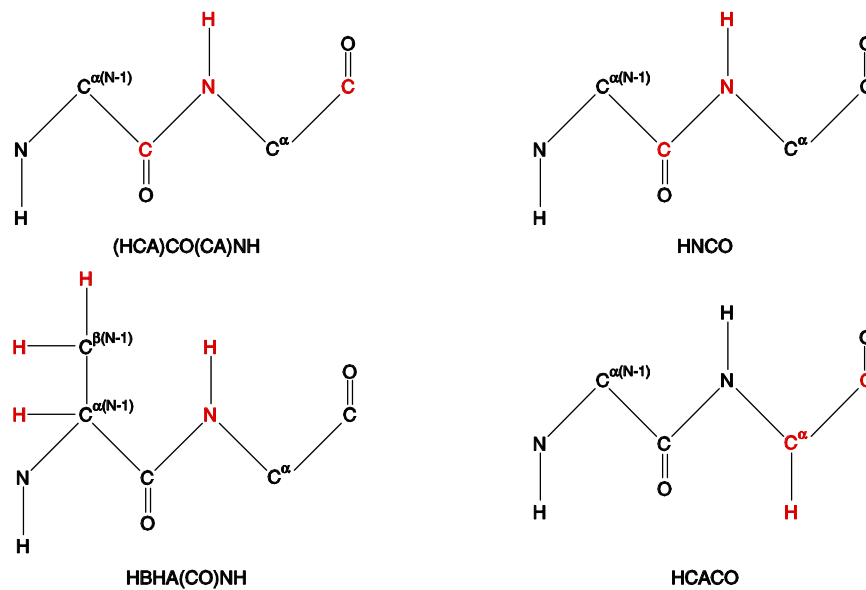


Abbildung 26: Zusammenhang der drei Experimente (HCA)CO(CA)NH, HNCO, HBHA(CO)NH und HCACO anhand eines Ausschnitts des Proteinrückgrates.

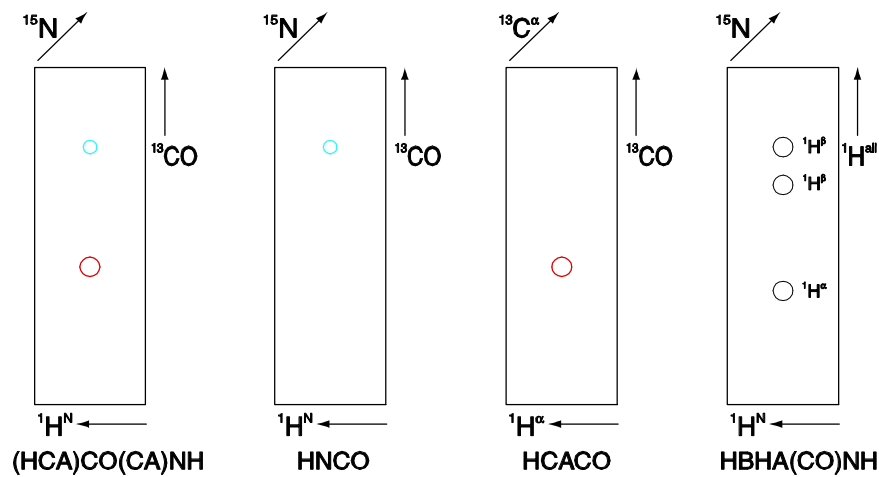


Abbildung 27: Schematischer Zusammenhang zwischen den Experimenten (HCA)CO(CA)NH, HNCO, HCACO und HBHA(CO)NH. Peaks (Kreise), die die gleiche Information liefern sind farblich codiert. Das HBHA(CO)NH steht hier zwar nicht im direkten Zusammenhang zur Zuordnung mit den anderen drei Experimenten, steht hier aber als Ergänzung zum HCACO Experiment.

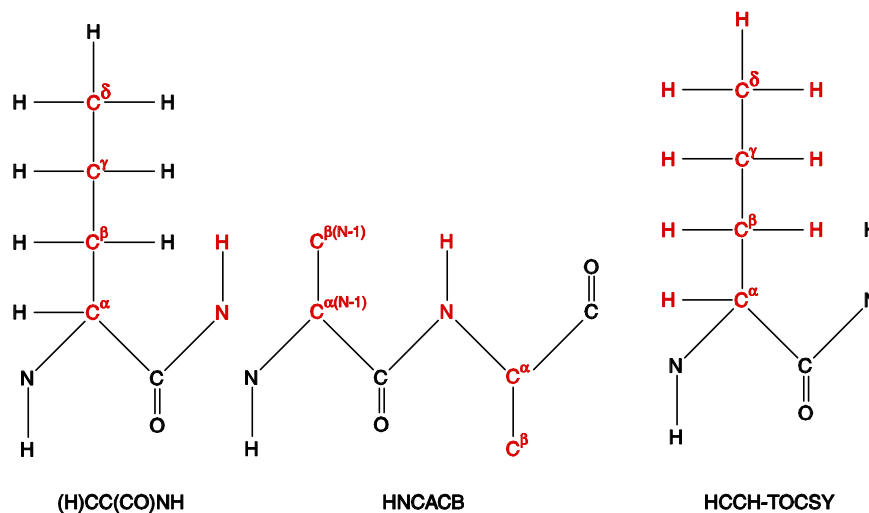


Abbildung 28: Zusammenhang der drei Experimente (H)CC(CO)NH-TOCSY, HNCACB und HCCH-TOCSY anhand eines Ausschnitts des Proteinrückgrates.

aromatischen ^{13}C -Kerne detektiert. Ist die Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen der einzelnen Aminosäuren bekannt, so werde diese mit den chemischen Verschiebungen aus dem HCCH-TOCSY Experiment verglichen. Dieses Experiment korreliert die aliphatischen und aromatischen ^{13}C -Kerne einer Aminosäure mit den zugehörigen ^1H -Seitenketten-Protonen. Mit Hilfe dieses Experiments ist es in günstigen Fällen möglich, die gesamte Zuordnung des Proteins zu verifizieren und sie zu ergänzen. Abbildung 28 und Abbildung 29 verdeutlichen diesen Zusammenhang noch einmal bildlich.

NOESY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC, NOESY- $(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HSQC Nach vollendeter Proteinrückgrat- und Seitenketten-Zuordnung werden die erhaltenen Informationen, in Form von chemischen Verschiebungen für die einzelnen Atome, in die beiden NOESY-Spektren zur Auswertung übertragen. In diesen beiden Experimenten ist nicht nur die intraresiduale Information der Aminosäurereste zu erhalten, sondern es werden auch Korrelationen durch den Raum detektiert.

Das NOESY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC korreliert die aliphatischen Protonen des Proteins mit den Amid-Kernen und Amid-Protonen des Proteinrückgrates. Zu be-

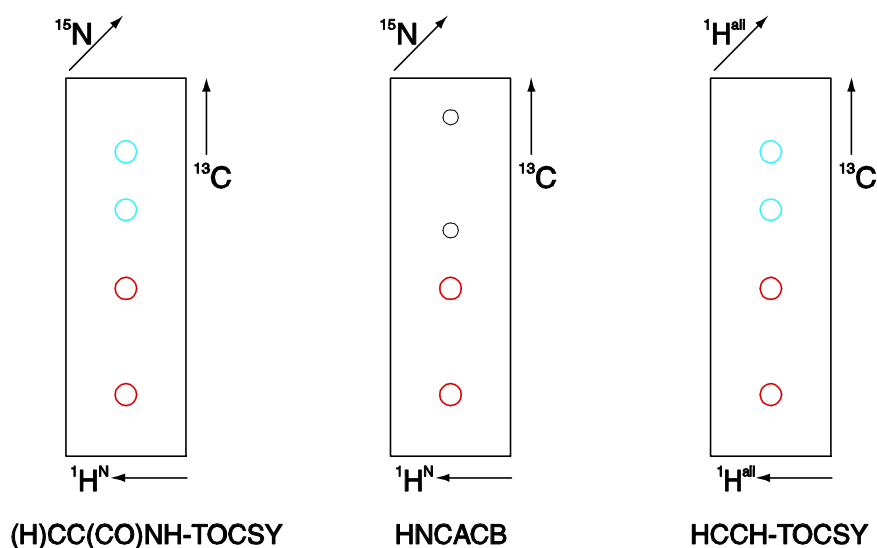


Abbildung 29: Schematischer Zusammenhang zwischen den Experimenten (H)CC(CO)NH-TOCSY, HNCACB und HCCH-TOCSY. Signale (Kreise), die die gleiche Information liefern sind farblich codiert.

achten ist allerdings, daß auch Korrelationen der aliphatischen Protonen zu den Seitenkettenamiden detektiert werden. Beim NOESY- $(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HSQC werden die Signale der Protonen des Proteins mit denen der ^{13}C -Kerne der Seitenketten korreliert. Insgesamt findet man die gleiche Information für die Protonen in beiden NOESY-Spektren (zu sehen in Abb.30 und Abb.31). Der Unterschied besteht in der Wahl des Heterokerns, der eine unterschiedliche Dispersion der Signale erzeugt. Die Abstandsinformation wird aus den Volumina der Kreuzsignale zwischen den einzelnen Kernen gewonnen.

5.5 Zuordnungsstrategie

Die sequentielle Zuordnung der Resonanzen des Proteins mit den im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Experimenten erfolgt in drei aufeinander folgenden Phasen vom N- zum C-Terminus. Zunächst werden in den ersten Experimenten die $^1\text{H}^N(i)$, $^{15}\text{N}(i)$, $^{13}\text{C}^\alpha(i)$, $^{13}\text{C}^\alpha(i-1)$ und $^{13}\text{C}'(i)$ zugeordnet. Wobei die $^{13}\text{C}'(i)$ -Kerne die Verknüpfung zur nächsten Zuordnungsphase darstellen. In der zweiten

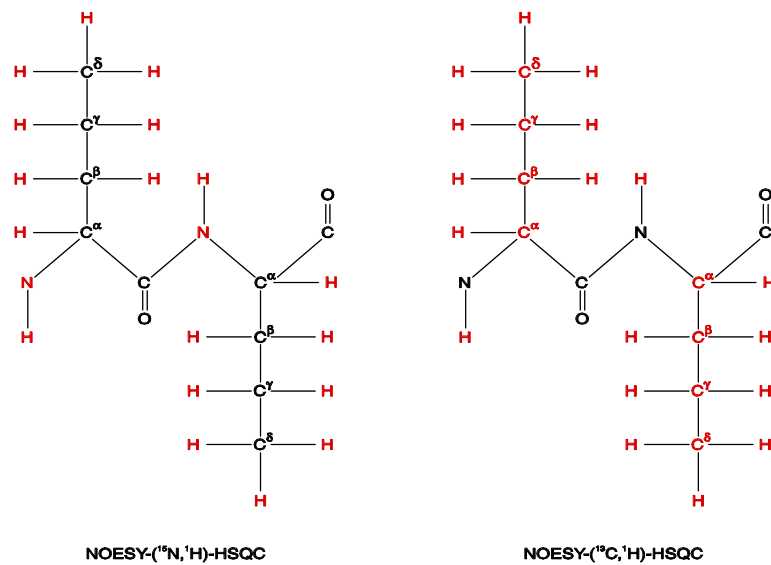


Abbildung 30: Zusammenhang der zwei Experimente NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC und NOESY-(^{13}C , ^1H)-HSQC anhand eines Ausschnitts des Proteinrückgrates mit Seitenketten.

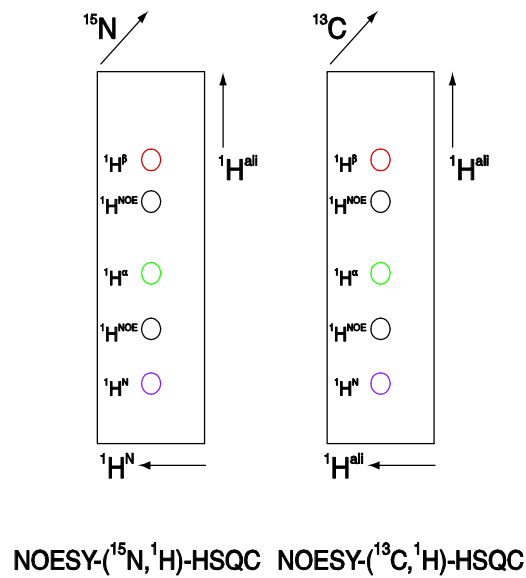


Abbildung 31: Schematischer Zusammenhang zwischen den Experimenten NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC und NOESY-(^{13}C , ^1H)-HSQC. Signale (Kreise), die die gleiche Information liefern sind farblich codiert.

Phase werden die $^1\text{H}^\alpha(i)$ -, $^1\text{H}^\alpha(i-1)$, $^1\text{H}^\beta(i-1)$, $^{13}\text{C}'(i)$ -, $^{13}\text{C}'(i-1)$ -Resonanzen zusätzlich zu den bereits identifizierten $^1\text{H}^N(i)$ -, $^{15}\text{N}(i)$ - und $^{13}\text{C}'$ -Resonanzen identifiziert. Die dritte Zuordnungsphase liefert letztendlich die $^{13}\text{C}^{ali}(i-1)$ -, $^{13}\text{C}^\beta(i)$ - und $^1\text{H}^{ali}(i)$ -Resonanzen. Diese Informationen werden anschließend in die beiden NOESY-HSQC's übertragen und dort verifiziert.. Abbildung 32 zeigt drei Ausschnitte aus drei Spektren, die bei der Zuordnung verwendet wurden.

5.6 Ermittlung von Sekundärstrukturelementen

Bei einer Resonanzzuordnung über ^1H , ^1H -Korrelationen in ^{15}N -aufgelösten Spektren bekommt man neben der sequentiellen Verknüpfung über NOE-Kontakte auch Informationen über die Konformation. In helicalen Segmenten treten zum Beispiel dipolare Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten, die in der Sequenz zwei, drei oder vier Positionen auseinanderliegen (*"medium-range"* NOE's) auf, die fast zwangsläufig bei der Zuordnung von ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen ebenfalls identifiziert werden.

Eine direkt aus der Zuordnung von ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen hervorgehende Information über die Sekundärstruktur sind die sekundären chemischen Verschiebungen, d.h. die Differenz zwischen den gefundenen und den in *"random coil"*-Peptiden auftretenden Resonanzfrequenzen.

Bei Protonen des Proteinrückgrats besteht eine auffällige Abhängigkeit der sekundären $^1\text{H}^\alpha$ -chemischen Verschiebung von der Sekundärstruktur. Es treten Korrelationen mit den ϕ - und ψ -Torsionswinkeln auf [137, 138], die allerdings nicht ohne weiteres plausibel zu erklären sind. Während in helicalen Regionen eine Hochfeldverschiebung relativ zu den *"random coil"* Resonanzfrequenzen zu beobachten ist, zeigen β -Faltblattregionen eine Tieffeldverschiebung [139, 140, 141], welche in manchen Fällen durch Ringstromeffekte verdeckt sein können [142]. Weniger geeignet sind dagegen sekundäre chemische Verschiebungen von Amidprotonen, da diese in erster Linie vom Donor-Akzeptor Abstand in Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt werden [143, 144], obwohl die magnetische Anisotropie von CO-Gruppen zu einer Hochfeldverschiebung nur in Helices führt [145].

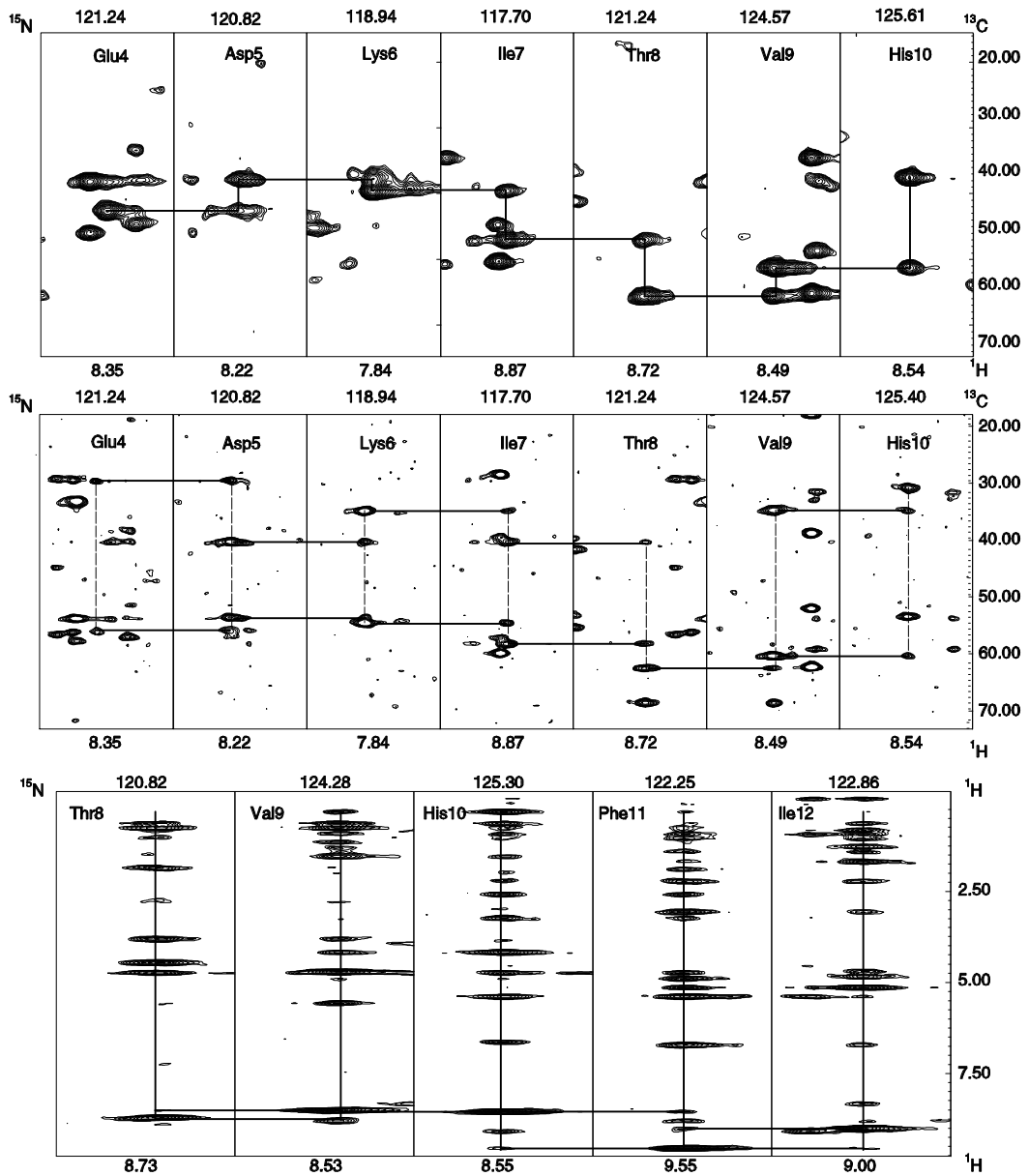


Abbildung 32: Ausschnitt aus der Zuordnung anhand der drei verwendeten Spektren 3D HNCA (oben), 3D HNCACB (mitte) und 3D NOESY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC (unten). Interresiduale Konnektivitäten sind mit horizontalen Linien angedeutet.

5.6.1 Identifizierung relevanter NOE's

Zur sequentiellen Verknüpfung zweier ^1H -Spinsysteme in Proteinen können NOE's zwischen einem Amid-Proton und den $^1\text{H}^\alpha$ - und $^1\text{H}^\beta$ Spins herangezogen werden, da die entsprechenden Abstände $d_{NN}(i,i+1)$, $d_{\alpha N}(i,i+1)$ und $d_{\beta N}(i,i+1)$ immer unterhalb von 4,5 Angström liegen, also grundsätzlich zu Kreuzsignalen in NOESY-Spektren Anlaß geben. Hierbei hängt $d_{\alpha N}(i,i+1)$ vom Torsionswinkel ψ , $d_{NN}(i,i+1)$ von ϕ und ψ und $d_{\beta N}(i,i+1)$ von ψ und χ der Aminosäure i ab [146, 147], so daß eine qualitative Auswertung der NOE-Intensitäten Aussagen über die Konformation des Proteinrückgrates erlaubt. Die NOE's zu den β -Protonen sind am wenigsten hilfreich, da die $d_{\beta N}(i,i+1)$ - Werte für die Helices und die β -Faltblattstränge sowie die entsprechenden ψ - Torsionswinkel nicht sehr weit auseinander liegen und die Bereiche durch die Abhängigkeit von der Seitenkettenkonformation und der Multiplizität am C_β überlappen [148]. Sehr nützlich sind dagegen kurze $d(i,i+j)$ - Abstände ($j=2,3,4$), die nur in Helices und bestimmten Schleifen auftreten und kurze $d(i,k)$ - Abstände, wobei i und k zu verschiedenen Strängen eines Faltblattes gehören, die zu "long-range" NOE's führen.

Insgesamt ergibt sich folgendes Bild [149]: Charakteristisch für eine gestreckte Konformation, wie sie in parallelen und antiparallelen β -Faltblättern vorkommt, sind sehr intensive $d_{\alpha N}(i,i+1)$ und schwache $d_{NN}(i,i+1)$ - NOE's. Die Orientierung läßt sich über "long range" NOE's bestimmen. Helicale Strukturen führen zu relativ intensiven $d_{NN}(i,i+1)$ - und etwas schwächeren $d_{\alpha N}(i,i+1)$ - NOE's. Sowohl in α -Helices als auch in 3_{10} -Helices sind die $d_{\alpha N}(i,i+3)$ - Abstände mit 3,4 Angström bzw. 3,3 Angström etwa gleich den entsprechenden sequentiellen $(i,i+1)$ - Verknüpfungen. Unterschiede gibt es bei den $d_{\alpha N}(i,i+2)$ - und $d_{\alpha N}(i,i+4)$ - Verknüpfungen, wobei die ersteren vorwiegend bei 3_{10} -Helices und die letzteren bei α -Helices auftreten. Wichtig bei der Identifizierung von Helices sind die $d_{NN}(i,i+2)$ - und die $d_{\alpha N}(i,i+3)$ - Konnektivitäten, die mit Abständen von etwa 4 Angström bzw. 2,5 - 4,4 Angström ebenfalls in NOESY-Spektren detektierbar sind.

Für Adrenodoxin konnte der größte Teil der sekundärstrukturelevanten NOE's,

an welchen Amid-Protonen beteiligt sind, aus dem 3D NOESY- $(^{15}\text{N},^1\text{H})$ -HSQC - und dem NOESY- $(^{13}\text{C},^1\text{H})$ -HSQC - Spektrum entnommen werden. Abbildung 33 faßt die für das oxidierte und reduzierte Adrenodoxin identifizierten sequentiellen und "medium range" - NOE's zusammen.

5.6.2 Der Chemical Shift Index (CSI)

Chemische Verschiebungen sind empfindliche Indikatoren der lokalen chemischen Umgebung eines Kernes. Anhand der chemischen Verschiebung einzelner Kerne ist es möglich, eine ungefähre Voraussage über die Sekundärstrukturelemente des Proteins zu machen. Mit dem Ziel einer besseren Übersichtlichkeit solcher Daten wurde zunächst für $^1\text{H}^\alpha$ [150] und später auch für $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$ und ^{13}CO [151] der sogenannte "chemical shift index" eingeführt. Hierbei werden die $\Delta\delta$ - Werte in die Stufen 0, ± 1 digitalisiert, je nachdem, ob die chemischen Verschiebungen innerhalb bestimmter Grenzen mit den "random coil"-Werten übereinstimmen oder darüber bzw. darunter liegen. In den entsprechend vereinfachten Balkengraphiken (Abb. 34 und Abb. 35) können anhand einer Folge von +1 oder -1 Einträgen die Sekundärstrukturelemente lokalisiert werden. Bedingung dafür ist allerdings, daß drei aufeinander folgende gleiche Einträge vorhanden sind. Ist in einer Folge von fünf aufeinander folgenden gleichen Einträgen der mittlere nicht vorhanden, zum Beispiel durch fehlende Zuordnung, so wird an dieser Stelle kein Sekundärstrukturelement angezeigt. Insofern ist der CSI bei Proteinen, die nicht vollständig zugeordnet werden konnten, an den entsprechenden Stellen mit Vorsicht zu interpretieren. Die Übereinstimmung aus den beiden Abbildungen 34 und 35 ist im Kapitel (Struktur v. Adx) dargestellt und wird dort diskutiert. Zu beachten bei den Abbildungen ist, daß für die Balkengraphiken des $^{13}\text{C}^\alpha$ - und $^{13}\text{C}^\beta$ -Kerns +1 den Helixbereich und -1 für Faltblatt-Elemente ergibt. Bei den beiden Balkengraphiken der Kerne $^{13}\text{C}^\beta$ und $^1\text{H}^\alpha$ bezeichnen +1 die Faltblatt- und -1 die Helix-Elemente.

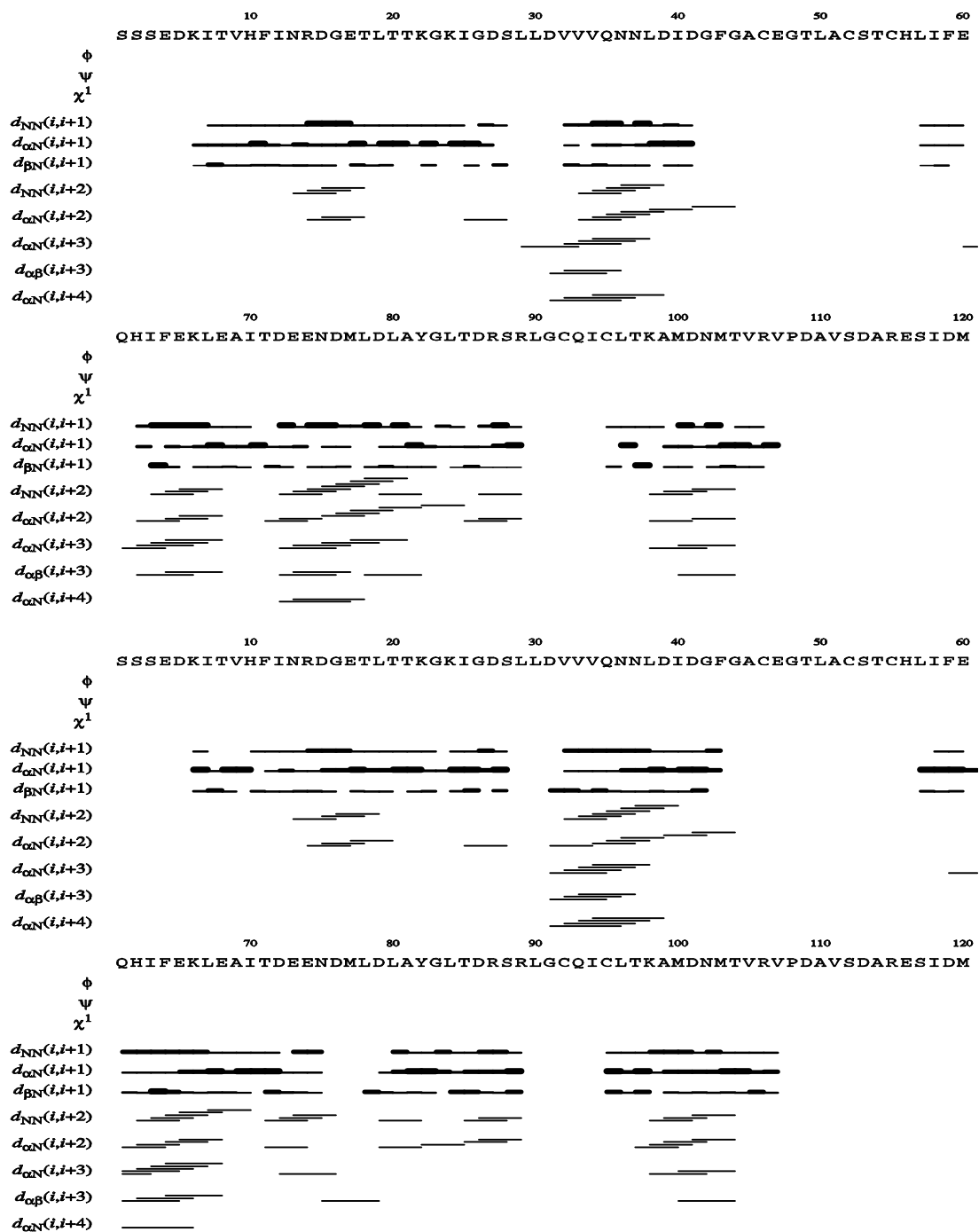


Abbildung 33: Sequentielle und "medium range" NOE-Information über die Sekundärstruktur des oxidierten Adrenodoxin (oben) und des reduzierten Adrenodoxin (unten). Für die sequentiellen NOE's wird die Intensität durch die Dicke der Balken wiedergegeben.

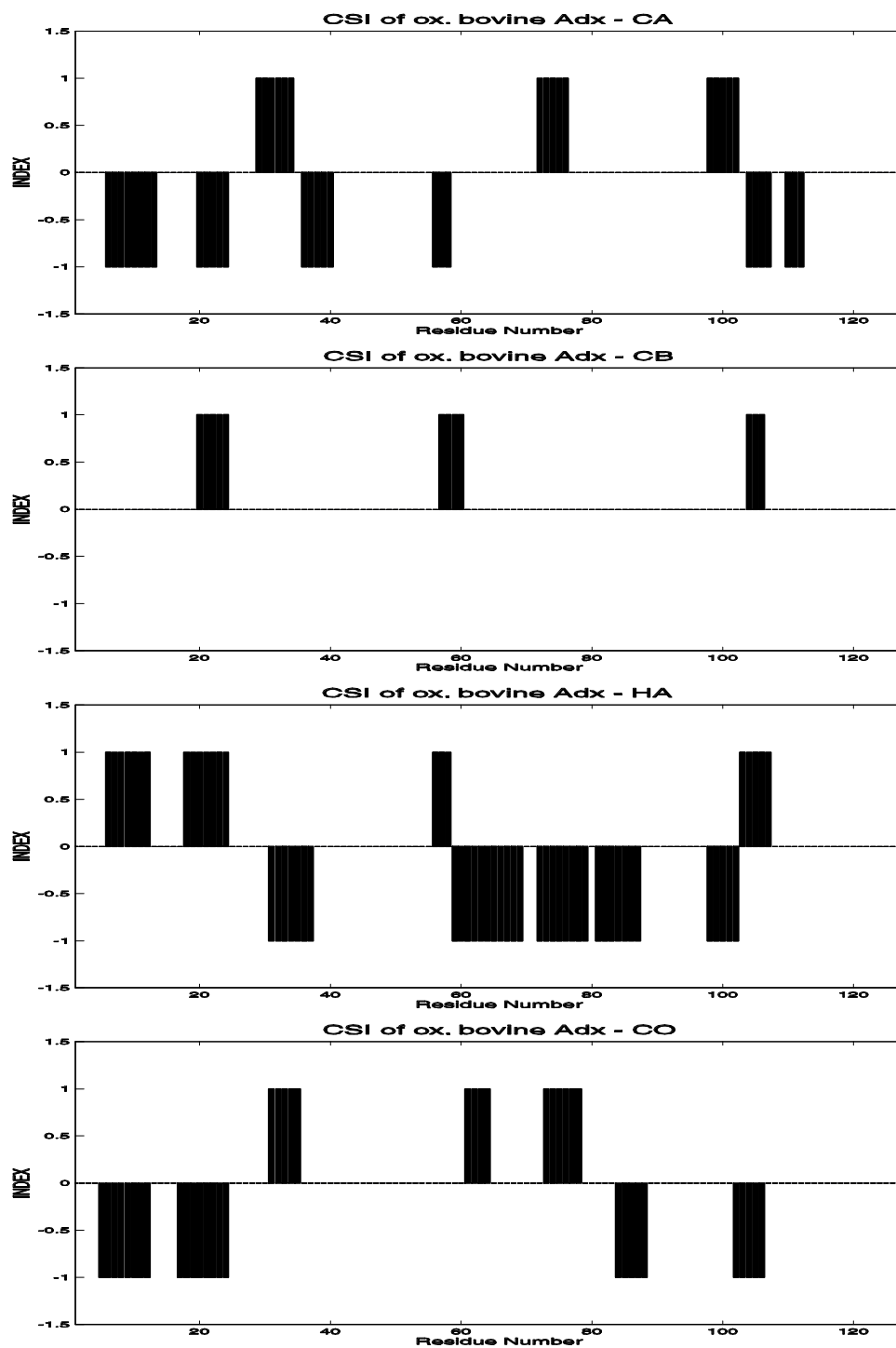


Abbildung 34: Chemical Shift Index für die Kerne $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, $^1\text{H}^\alpha$ und ^{13}CO von oxidiertem Adrenodoxin.

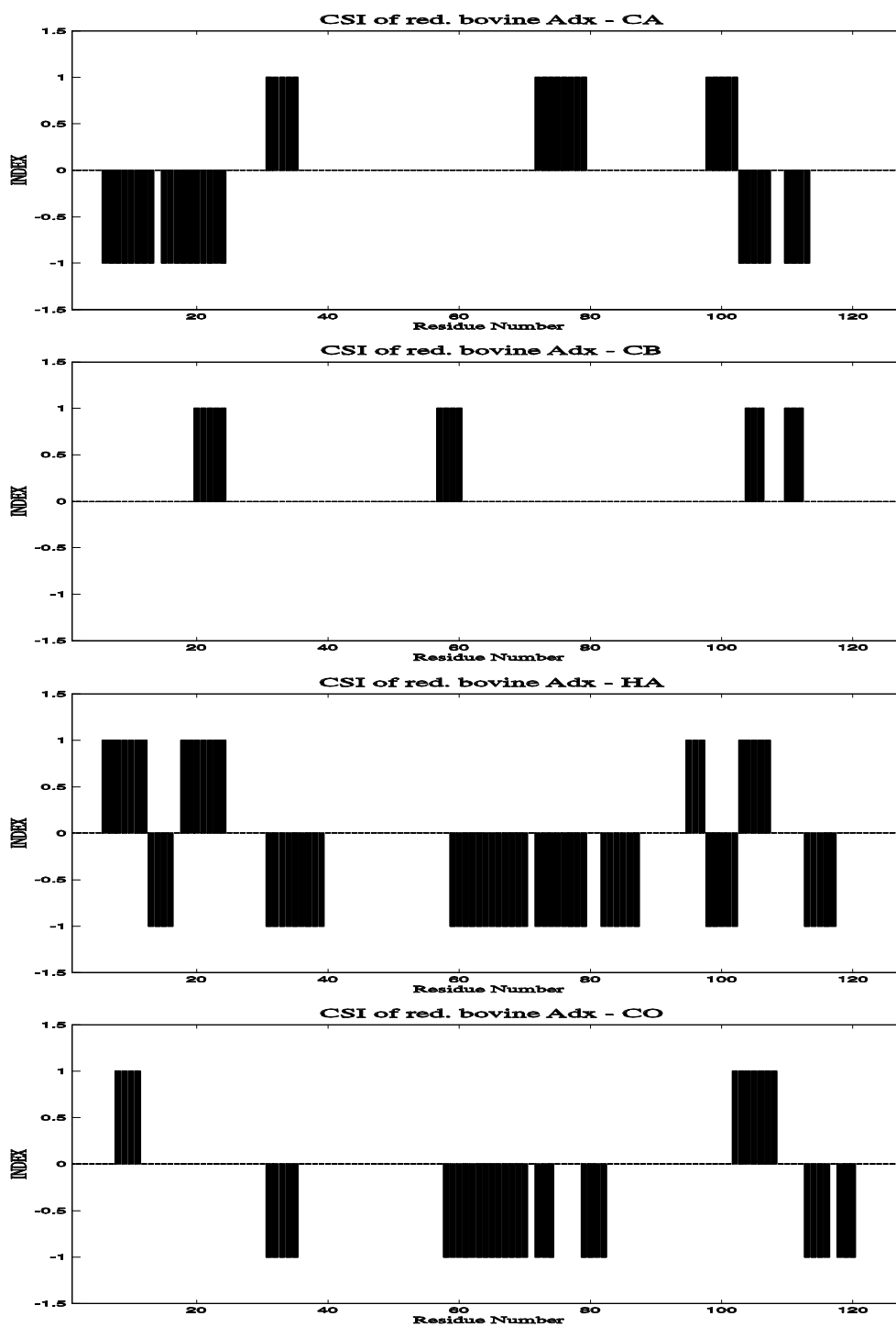


Abbildung 35: Chemical Shift Index für die Kerne $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, $^1\text{H}^\alpha$ und ^{13}CO von reduziertem Adrenodoxin.

5.7 Bestimmung von Abstandsbeschränkungen mittels Amid-Protonen- T_1 -Zeiten

Bei Proteinen ohne paramagnetisches Zentrum gibt es in der Regel nur die "üblichen" Schwierigkeiten bei der Zuordnung und Strukturrechnung. Probleme treten bei der Zuordnung häufig im α -helicalen Bereich auf, in dem die Dispersion der Signale oftmals nicht sehr gut ist. Im Fall von Adrenodoxin fehlt aber aufgrund des paramagnetischen Zentrums, sowohl im oxidierten wie auch reduzierten Zustand, eine gewisse Anzahl von Signalen einiger Aminosäuren. Alle Aminosäuren, die in einen Abstand von bis zu circa 5 Angström um den Eisen-Schwefel-Cluster angeordnet sind, können aufgrund starke Linienverbreiterung nicht detektiert werden. Dieser Sachverhalt macht sich besonders in der Strukturrechnung bemerkbar, da die Anzahl der NOE-Abstandsparameter drastisch reduziert wird.

Zur weiteren Strukturverfeinerung wurde deswegen ein ct -($^{15}\text{N}, ^1\text{H}^N$)-HSQC aufgenommen (siehe Kapitel 4.4.1). Allerdings war dies nur für den reduzierten Zustand von Adrenodoxin möglich, da die Lebensdauer des oxidierten Zustandes dieses Experiment verhinderte.

Grundlage der angewandten Technik [124] ist der Abstand der Amid-Protonen des Proteinerückgrates zu den ihnen am nächsten liegenden Eisen-Kern. Die Amid-Protonen, die in der Nähe des Eisen-Schwefel-Clusters liegen, relaxieren wesentlich schneller, als diejenigen, die sich in größerem Abstand aufhalten. Näherungsweise befinden sich Amid-Protonen mit einer T_1 -Relaxationszeit kleiner als 100 ms in einem Abstand vom Eisen-Schwefel-Cluster, der kleiner als circa 5 Angström ist. In Abbildung 36 ist die Anpassungskurve für Ala⁸¹ dargestellt. Die Auswertung wurde mit Hilfe der "Matlab Software RMX" von Jürgen M. Schmidt durchgeführt.

Insgesamt konnten für 95 Aminosäuren experimentelle Daten gesammelt werden. 33 Aminosäuren konnten nicht detektiert werden. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren S1, S2, S3, S124, S125, K126, L127, E128. Diese Aminosäuren konnten nicht detektiert werden. Die Aminosäuren L29, L30, V31, G44, A45, C46, E47, G48, T49, L50, A51, C52, S53, T54, C55, H56, L57, D76, M77, L78, L90, G91, C92, Q93, I94 unterliegen dem direkten Einfluß des Eisen-

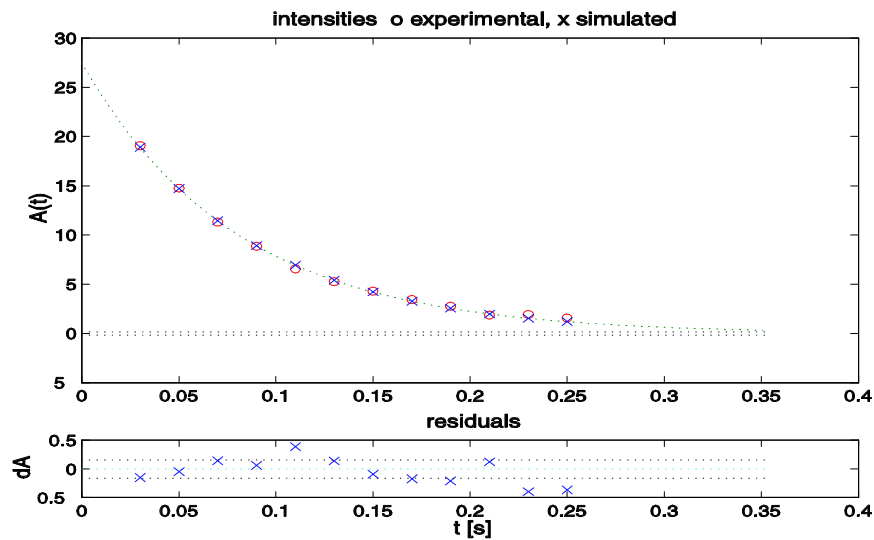


Abbildung 36: Anpassung der experimentellen Signalvolumina [119]. o entspricht den berechneten und x den gemessenen Intensitäten. Die T_1 -Relaxationszeit für Ala81 betrug 71,6 ms.

Schwefel-Clusters und sind somit wegen ihrer extrem kurzen T_1 -Relaxationszeit auch nicht detektierbar. Pro108 kann aufgrund seiner Topologie kein Signal liefern. Es zeigt sich ganz deutlich, daß die Amid-Protonen, die in der Nähe des Eisen-Schwefel-Cluster liegen, aber trotzdem gerade noch so detektierbar sind, alle eine T_1 -Relaxationszeit aufweisen, die kleiner als 100 ms ist.

Die ermittelten T_1 -Relaxationszeiten für die detektierbaren Signale der Aminosäurereste sind in Tabelle 2 zusammengefaßt:

Die sehr kleinen T_1 -Relaxationszeiten der Aminosäurereste S3, E4 und M122 resultieren aus der Endständigkeit dieser Aminosäurereste. Die graphische Auswertung ist in Abbildung 37 dargestellt.

In Tabelle 3 sind die erhaltenen Abstände (in Å) aus den verwendeten T_1 -Relaxationszeiten der entsprechenden Aminosäurereste mit den Abständen aus der Röntgenkristallstruktur verglichen. Wie Tabelle 3 sehr anschaulich, zeigt bewegen sich die Abweichungen zwischen den Werten aus der Röntgenkristallstruktur und den NMR-Daten zwischen 1 - 10 Prozent.

AS	T ₁	Δ	AS	T ₁	Δ	AS	T ₁	Δ	AS	T ₁	Δ
3	20,6	2,9	28	63	3,9	70	300,3	6,9	103	643,8	25,3
4	42,8	5,7	32	43,4	14,7	71	105,4	5,1	104	472,9	40,9
5	214	35,6	33	71	4,2	72	204	20,9	105	429,1	6,4
6	610,6	46,6	34	59,1	6,0	73	140	3,3	106	264	23,9
7	739,8	48,7	35	219,3	5,3	74	51,6	2,4	107	308,9	28,5
8	732,2	68,6	36	372,3	3,5	75	98,5	3,6	109	197,6	16
9	568,9	45,6	37	420,1	12,9	79	112,9	6,1	110	314,6	3
10	316,9	28,2	38	341,5	7,3	80	54,6	11,6	111	237,9	8,1
11	555,5	14,5	39	423,4	3,6	81	71,6	2	112	62,5	3
12	478	24	40	264,2	11,3	82	57,1	4,9	113	613,1	34,2
12	759,5	84,2	41	237,1	2,5	83	339,5	8,8	114	492,4	23,8
14	488,7	9,1	42	118,6	9,5	84	295,3	12,5	115	120,3	5,6
15	815,7	16,6	43	66,5	1,8	85	200,4	7,2	116	543,7	6,2
16	1130,2	31,9	58	131,2	13,6	86	279,4	45,4	117	274,6	11,2
17	1050,4	41,9	59	256,3	20,5	87	350,2	6	118	332	16,1
18	810,1	27,6	60	348,8	28,3	88	217,3	5,1	119	289,9	20,8
19	719,8	33,7	61	220,8	79,7	89	46,9	2,4	120	139,5	9,5
20	656,2	62,9	62	201,1	74,8	95	89,4	3,9	121	123,9	7,4
21	529,8	31,1	63	586,3	27,1	96	197,6	16	122	35,7	10,5
22	290,9	4,4	64	552,5	28,7	97	426,5	45,8	123	422	9,6
23	610,9	9	65	339,4	42,5	98	474,9	57,7			
24	453,6	27,2	66	638	30,1	99	252,4	62,9			
25	756,7	45,8	67	434	16,4	100	700,2	34,3			
26	415,9	9,2	68	324	3,7	101	949,1	61,2			
27	204,8	18,9	69	493,2	23,8	102	902,5	62,7			

Tabelle 2: Darstellung der gemessenen longitudinalen Amid-Protonen-Relaxationszeiten der entsprechenden Aminosäurereste. AS steht hier für Aminosäure-Nummer in der Sequenz, T₁ bedeutet T₁-Relaxationszeit in Millisekunden. Δ ist der Fehler in Millisekunden

$^1\text{H}_\text{N}$ - T_1 -Zeiten (reduziertes Adrenodoxin)

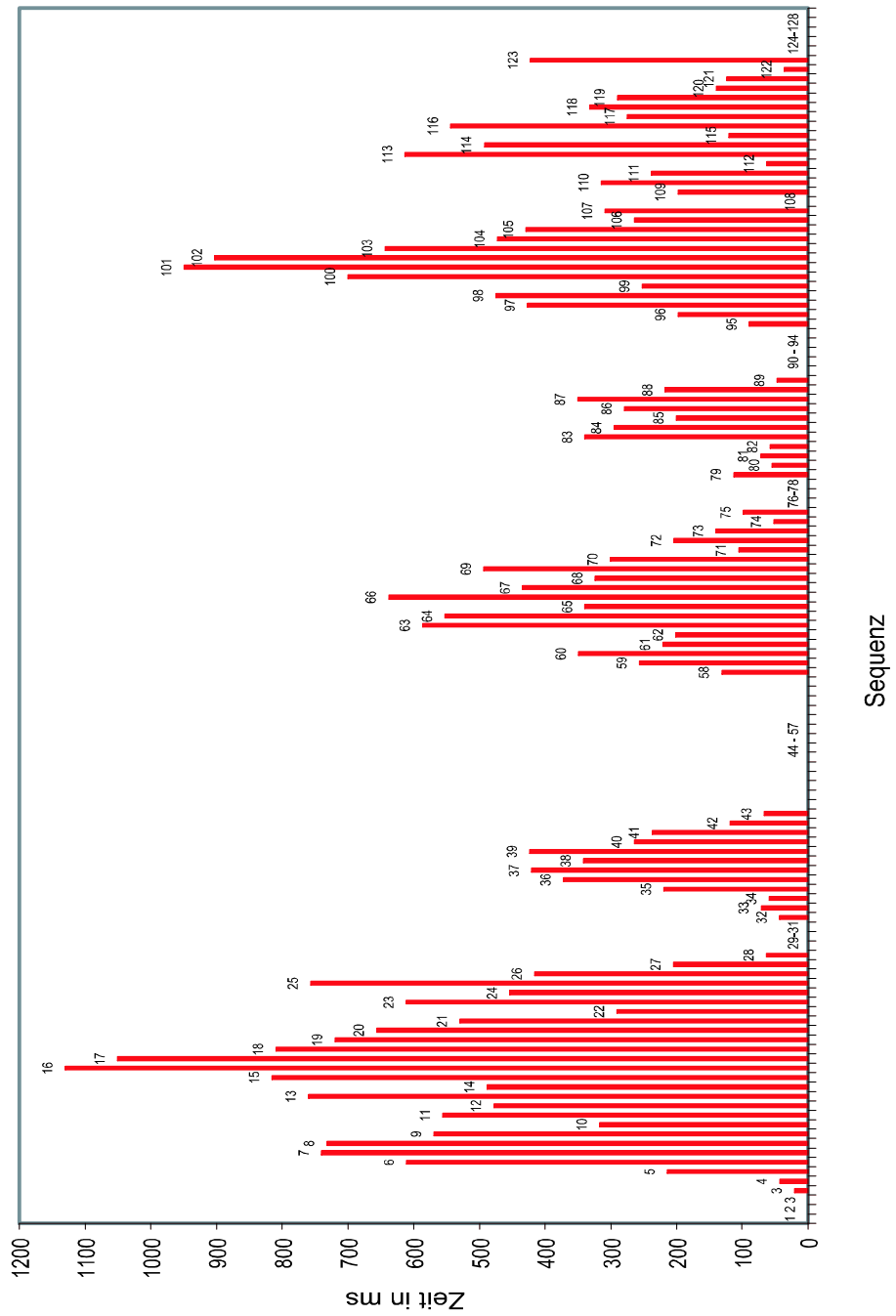


Abbildung 37: Balkendiagramm der T_1 -Relaxationszeiten in Abhängigkeit zur Aminosäuresequenz. Die Zahlen über den roten Balken stellen die Nummerierung der entsprechenden Aminosäuren dar.

Proton ($^1\text{H}^N$)	Adx	X-ray	Δ [%]	Proton ($^1\text{H}^N$)	Adx	X-ray	Δ [%]
S28	10,4	11,0	5,8	E74	10,0	9,9	1
V32	9,7	10,7	10,3	N75	11,6	11,8	1,7
V33	10,7	10,3	3,7	D79	12,0	11,4	5
V34	10,3	10,4	1	L80	10,1	10,7	5,9
G42	12,2	12,4	1,6	A81	10,7	10,8	0,9
F43	10,5	10,2	2,9	Y82	10,2	11,3	10,8
I58	12,6	12,3	2,4	R89	9,8	10,0	2
T71	11,8	11,6	1,7	C95	11,3	11,5	1,8
E73	12,9	12,4	3,9	L96	15,4	15,8	2,6

Tabelle 3: Gegenüberstellung der experimentell gefundenen Abstände (in Å) aus NMR-Daten und den Abständen aus der Röntgenkristallstruktur. Δ [stellt die Abweichung in Prozent dar. Als Grundwert wurde immer der Wert aus den NMR-Daten angesetzt. X-ray bezeichnet die Abstände aus der Röntgenkristallstruktur.

5.8 Die Struktur von Adrenodoxin

5.8.1 Zusammenstellung der geometrischen Randbedingungen

Im Abschnitt 4.6 wurde die Transformation der experimentellen Daten (NOE-Intensitäten) in geometrische Randbedingungen für eine Strukturberechnung (Abstandsbeschränkungen) beschrieben.

In einem Protein ohne paramagnetische Eigenschaften kann man ungefähr 3000 obere Abstandsbeschränkungen erwarten. Sowohl beim oxidierten, wie auch beim reduzierten Zustand von Adrenodoxin konnten lediglich insgesamt rund 1800 obere Abstandsbeschränkungen gewonnen werden. Diese Anzahl beinhaltet bereits auch Abstandbeschränkungen zu Pseudoatomen, die mit Hilfe von Dreiecksgleichungen auf nicht zugeordnete diastereotope Gruppen gewonnen wurden [129]. In Abbildung 38 für den oxidierten Zustand und in Abbildung 39 für den reduzierten wird die Quantität der Abstandsbeschränkungen graphisch dargestellt. Die Farbkodierung unterscheidet intraresiduale und sequentielle Abstandsbeschränkungen, NOE im Nahbereich auf der Polypeptidkette und weitreichende

NOE. Bei den Aminosäureresten, die durch den Eisen-Schwefel-Cluster beeinflusst werden, findet man nur weitreichende Abstandsbeschränkungen. Diese resultieren aus den T_1 -Relaxationszeiten der Amidprotonen dieser Reste, die in einem separaten Experiment detektiert wurden. (siehe Kapitel 4.4).

Für die Aminosäurereste 110 bis 128 konnte keine NOE-Information gewonnen werden. Dieser Befund ist auf die freie Drehbarkeit des C-Terminus zurückzuführen. Experimente zur Gewinnung von vicinalen Kopplungskonstanten konnten nicht angewendet werden, da die Lebensdauer des Proteins Experimente dieser Kategorie nicht zuließ. Die oberen Abstandsbeschränkungen wurden somit *nur* durch Standard-Diederwinkelbeschränkungen in den Strukturberechnungen mit dem Programm DYANA ergänzt.

Bindungslängen- und -winkel sind entsprechend dem ECEPP/2-Kraftfeld [130] vorgegeben und bleiben während der Strukturberechnung ebenso unverändert wie die Atomkonnectivitäten. Für alle aciden und basischen Seitenketten wurde ein geladener Zustand angenommen.

5.8.2 Die künstliche Aminosäure CYSC in der DYANA-Rechnung

Das Programm DYANA beschreibt die Proteinstruktur durch die Diederwinkel einer vorgegebenen Aminosäuresequenz. Die Transformation in einen Satz Atomkoordinaten erfolgt mit Hilfe einer Bausteinbibliothek (dyana.lib). Die Einstellungen der Diederwinkel sind somit die einzigen verbleibenden Freiheitsgrade einer Aminosäurekette, so daß bei der Minimierung der Zielfunktion (siehe Kapitel 4.6) nur ein einzelner Peptidstrang berücksichtigt werden kann. Abstandsinformationen zu kovalent gebundenen Cofaktoren wie im Falle des Adrenodoxins zum Eisen-Schwefel-Cluster sind nicht ohne weiteres in die Berechnung mit einzubeziehen. Ohne zusätzliche Definition des Eisen-Schwefel-Clusters in der Bausteinbibliothek kann es nämlich nicht zu einer Diederwinkelberechnung kommen, da die Konnectivitäten im Eisen-Schwefel-Cluster dem Programm DYANA unbekannt sind. Zusätzlich fehlt natürlich auch die Definition der Bindungslängen zwischen den Atomen des Eisen-Schwefel-Clusters.

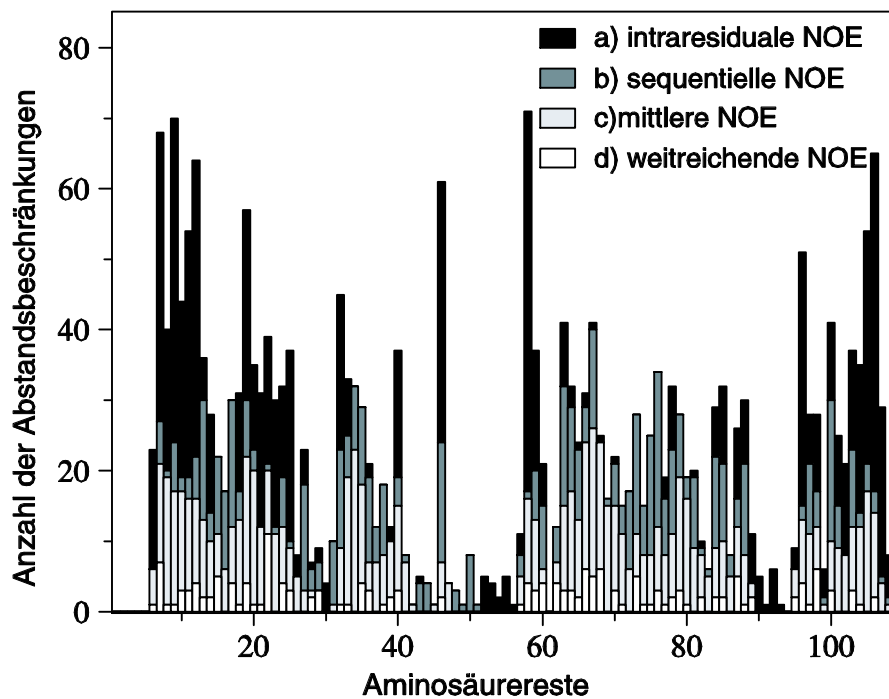
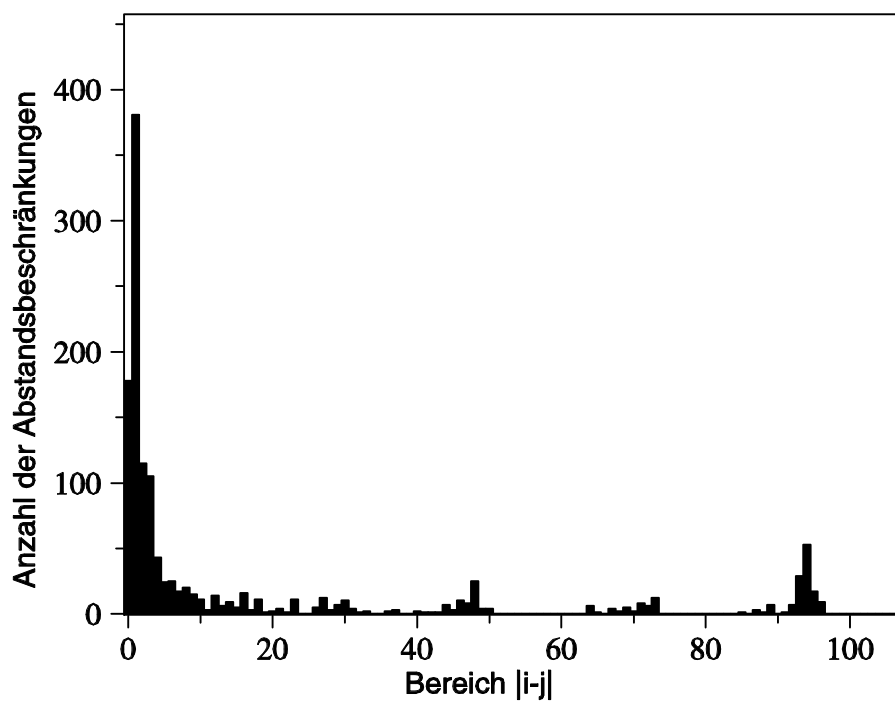


Abbildung 38: Verteilung der Abstandsbeschränkungen für den oxidierten Zustand des Adx mit Berücksichtigung ihrer Länge (oben). Anzahl und Art der Abstandsbeschränkungen des oxidierten Zustands entlang der Aminosäuresequenz (unten).

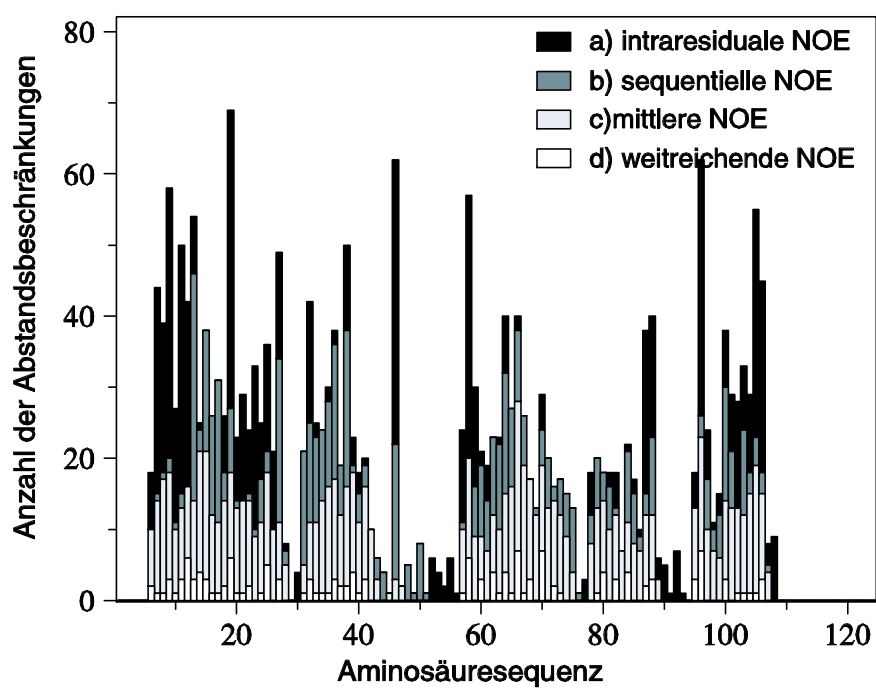
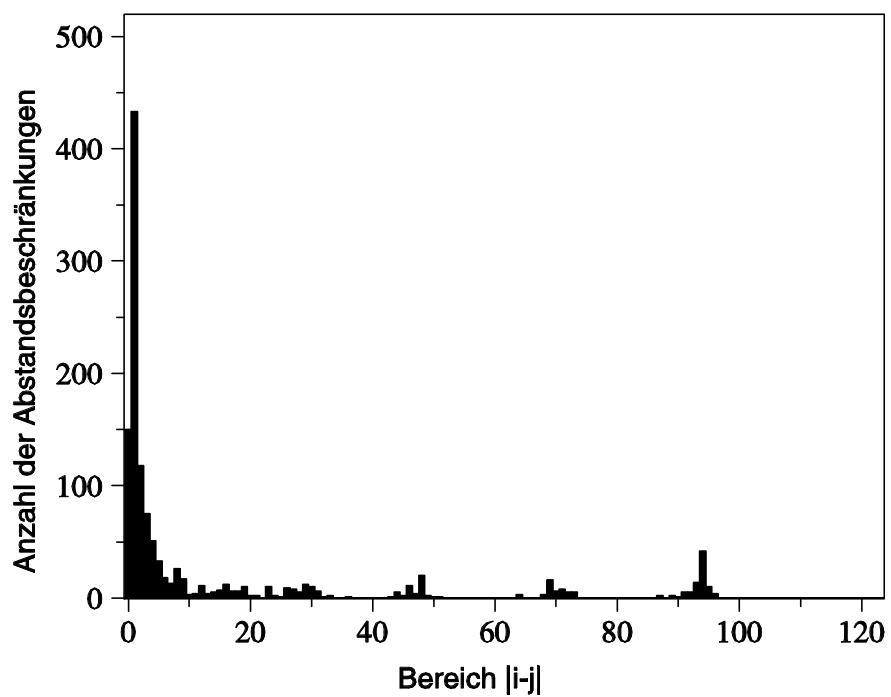


Abbildung 39: Verteilung der Abstandsbeschränkungen für den reduzierten Zustand des Adx mit Berücksichtigung ihrer Länge (oben). Anzahl und Art der Abstandsbeschränkungen des reduzierten Zustands entlang der Aminosäuresequenz (unten).

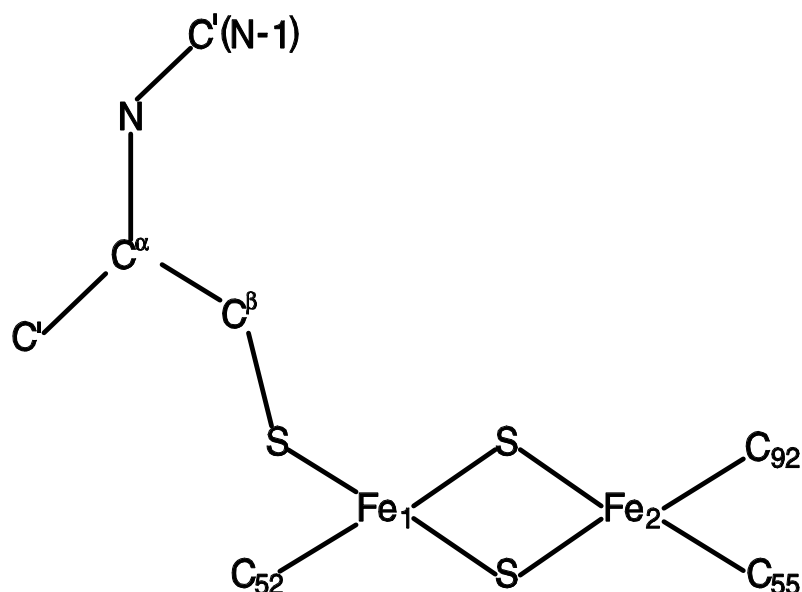


Abbildung 40: Schema der Erweiterung der Aminosäure Cys46 als Eintrag in die Bausteinbibliothek des Distanzgeometrie-Programms DYANA. Zu sehen ist die Topologie zu Cystein 46.

Zur Lösung des Problems muss der Eisen-Schwefel-Cluster direkt an eines der vier an den Cluster bindenden Cysteine (C46, C52, C55, C92) definiert werden. Willkürlich wurde dazu Cystein 46 ausgewählt. Eine solche hypothetische Aminosäure muß so definiert werden, daß die Strukturberechnung nicht beeinflußt wird. Die Abstände der Schwefel- und Eisenatome wurden der Röntgenkristallstruktur [62] entnommen, ebenso die Distanzen zu den angrenzenden Schwefelatomen der anderen drei Cysteine (C52, C55, C92). Die Geometrie des Eisen-Schwefel-Clusters wurde als starr angenommen. Zusätzlich wurde der Eisen-Schwefel-Cluster energieminiert.

5.8.3 Durchführung der Strukturberechnung

Der gesamte Satz der aus NMR-Experimenten gewonnenen Abstandsbeschränkungen enthält häufig teilweise inkonsistente Daten, die häufig auf dynamische Phänomene zurückzuführen sind. Die experimentell bestimmte Meßgröße NOE

entspricht dann einem gewichteten Mittel. Die daraus abgeleiteten Geometrieparameter interatomarer Abstände werden durch diese Mittelung unterschiedlich beeinflusst und lassen sich nicht mehr durch eine einzige Konformationen beschreiben. Das bei der Minimierung erhaltene Resultat ist als optimale Lösung für die vorgegebene Startstruktur zu bezeichnen. Durch willkürliche Einstellung aller variablen Torsionswinkel wurde ein Satz von 50 zufälligen Konformationen erzeugt und als Startensemble für die Strukturberechnung des Adrenodoxins verwendet. Zusätzlich wurde zum Erhalt des Startensembles die Röntgenkristallstruktur von oxidiertem Adrenodoxin [62] zu Hilfe genommen. Prinzipiell bestimmt die Qualität der Randbedingungen die notwendige Größe des Ensembles: Je geringer die Inkonsistenzen durch überbestimmte Daten und je weniger Bereiche des Proteins unbestimmt bleiben, desto kleiner ist das erforderliche Ensemble. Die hier gewählte Anzahl 50 ist rein zufällig und läßt keinen Rückschluß auf die Qualität der experimentellen Daten zu.

Aufgrund der nicht lückenlosen Zuordnung mußten die Berechnungen ohne stereospezifische Zuordnungen oder Diederwinkelbeschränkungen durchgeführt werden. Daraus resultiert eine geringere Anzahl an Abstandsbeschränkungen und eine größere Variabilität im Bezug auf die Diederwinkel. Das Programm zur Strukturrechnung bezieht sich somit bei den Diederwinkeln auf seine Standardeinträge in der Bausteinbibliothek (dyana.lib), welche wesentlich mehr energetisch günstige Drehwinkel zulassen.

Von dem nach der Minimierung erhaltenen Strukturensemble kann man weniger ein "Abbild" der tatsächlichen Struktur erwarten als vielmehr eine Vorstellung des dem Protein zugänglichen Konformationsraumes. Das Strukturensemble wird auch als "digitalisierter Konformationsraum" bezeichnet [152, 153], wenn gewährleistet ist, daß der verwendete Minimierungsalgorithmus den vollständigen Konformationsraum absucht [154].

Im ersten Moment scheint die Verwendung der Kristallstruktur für die Strukturrechnung kontraproduktiv. Diese gibt nämlich nur eine einzige Konformation wieder, während die NMR Struktur versucht, eine gemittelte Struktur zu präsentieren. Aufgrund der Anzahl der nicht zugeordneten Resonanzen der Aminosäu-

AS	red	ox	AS	red	ox	AS	red	ox
Ala	2	2	Gly	3	3	Lys	1	1
Cys	4	4	His	1	1	Met	1	0
Gln	1	1	Ile	2	1	Ser	5	6
Glu	2	2	Leu	4	2	Thr	2	2

Tabelle 4: Anzahl der verschiedenen Aminosäure-Typen (AS), die aufgrund des Eisen-Schwefel-Clusters nicht zugeordnet werden konnten. red entspricht dem reduzierten, ox dem oxidierten Adx.

rereste bietet die Kristallstruktur jedoch eine gute "Starthilfe".

5.8.4 Vergleich der Strukturensamples der oxidierten und der reduzierten Form

Vor dem direkten Vergleich der beiden Strukturensamples soll kurz noch einmal auf die Problematik der Zuordnung eingegangen werden. Sowohl im oxidierten wie im reduzierten Zustand konnten Aminosäure-Reste, die weniger als 6 Angström vom Eisen-Schwefel-Cluster entfernt sind, nicht zugeordnet werden (Tabelle 4). Von den 1339 NMR-aktiven Kernen des Adrenodoxins konnten somit beim reduzierten Adx 19,2%, und beim oxidierten Adx 15,6% nicht zugeordnet werden.

Es fehlen somit in der Strukturrechnung die Zuordnungen zu den Aminosäuren, die von eigentlichem Interesse sind. Aminosäure-Reste, die an den Interaktionen zu den Redoxpartnern beteiligt sind konnten jedoch zugeordnet werden und stehen der Strukturrechnung zur Verfügung. Ebenso verhält es sich mit Aminosäure-Resten, die bei der Modulation des Redoxpotentials essentiell sind.

Zum Vergleich der Reproduzierbarkeit einer Konformation aus den experimentellen Daten sind in Abbildung 41 für das Ensemble des oxidierten und des reduzierten Adx die globalen RMSD-Werte der Rückgratome gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen.

Für eine Identifizierung verschiedener Strukturgruppen innerhalb eines Ensembles wurden die jeweils 20 Strukturen nach zunehmenden Werten für die

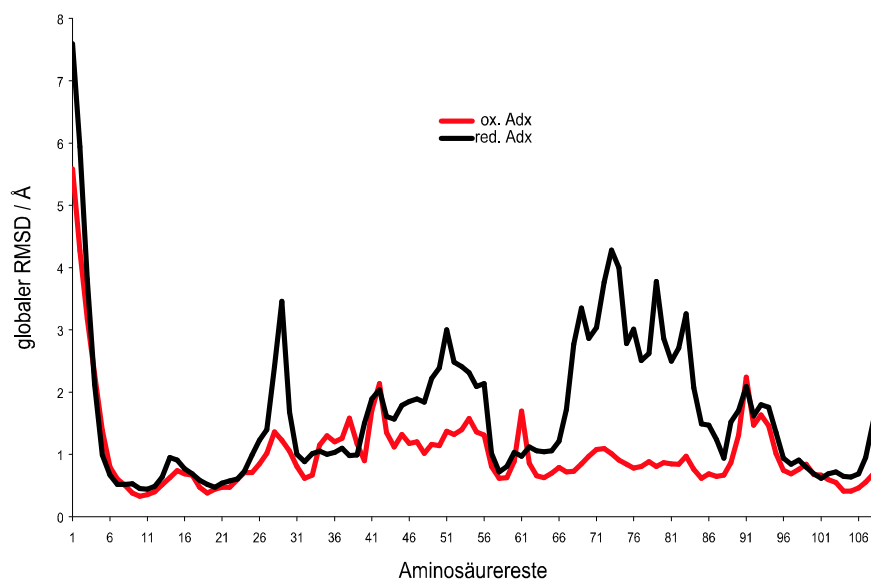


Abbildung 41: Globale Präzision in den zwei berechneten Strukturensamples. Es sind die globalen RMSD-Werte der Rückgratome gegen die Aminosäurereste aufgetragen.

Zielfunktion und damit nach der mittleren Verletzung der geometrischen Randbedingungen geordnet. Eine Möglichkeit für eine Gruppierung der Konformation bietet der Maximalwert der paarweisen RMSD-Werte (RMSD_{max}) einer Struktur zu allen Strukturen mit kleinerer Zielfunktion [155]. Eine sprunghafte Vergrößerung dieses Wertes ist gleichbedeutend mit einer Struktur, die einen neuen Bereich des Konformationsraumes erschließt. In Abbildung 42 ist das Ergebnis einer solchen Ähnlichkeitsanalyse gezeigt, bei der entweder nur Schweratome des Proteinrückgrates (N, C^α , und C') oder alle Schweratome berücksichtigt wurden.

Für Adrenodoxin, sowohl im reduzierten als auch im oxidierten Zustand, finden sich vornehmlich 4 Hauptcluster ähnlicher Struktur mit relativ kleiner Zielfunktion (Abb. 42). Der mittlere Wert der Zielfunktionen beim oxidierten Adrenodoxin beträgt $3,23 \text{ \AA}^2$ und der mittlere Wert der Zielfunktion des reduzierten Adrenodoxin beträgt $4,7 \text{ \AA}^2$.

In Abbildung 43 sind die so bestimmten Strukturgruppen aus den beiden Ensembles für das oxidierte und das reduzierte Adrenodoxin gegenübergestellt. Im oxidierten Adrenodoxin sind die Bereiche rund um den Eisen-Schwefel-Cluster

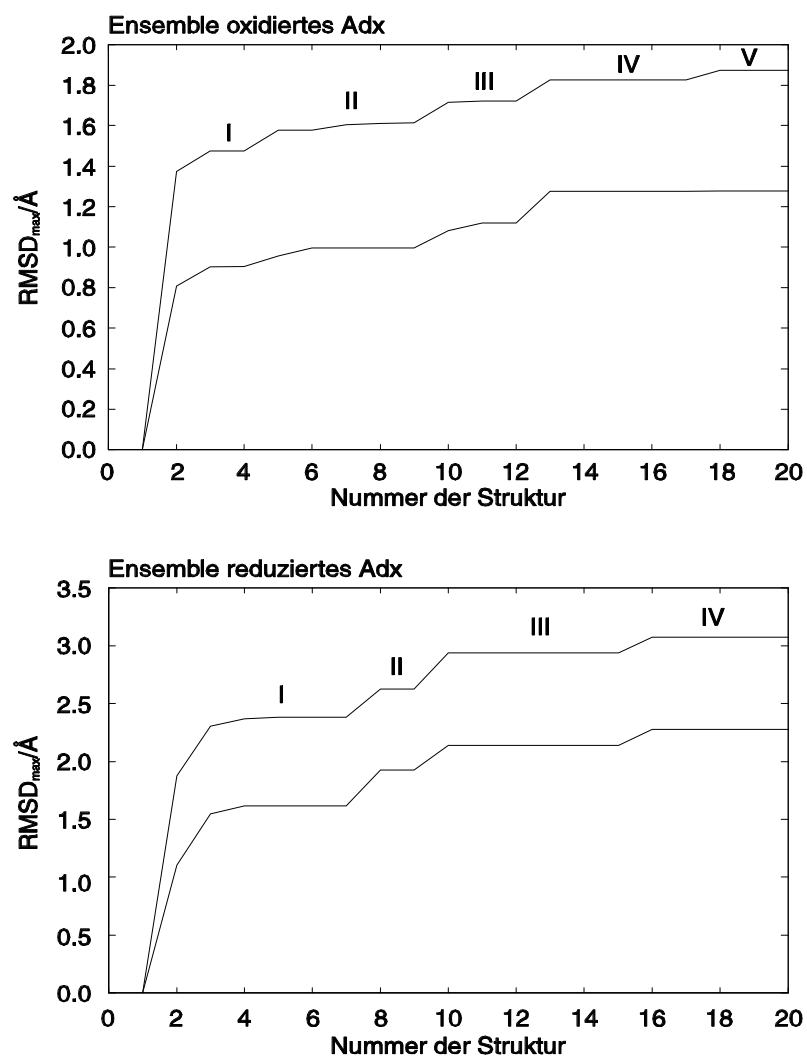


Abbildung 42: Ähnlichkeitsanalyse innerhalb der zwei berechneten Strukturensamples. Entlang der Abszisse sind 20 individuelle Konformationen nach steigenden Werten für die Zielfunktion geordnet. Aufgetragen ist der Höchstwert der paarweisen RMSD-Werte einer Struktur i zu allen Strukturen mit kleinerer Zielfunktion. Die Überlagerung erfolgte entweder für die Rückgratatom N, C $^{\alpha}$, C' (untere Linie) oder für alle Schweratome des Proteins (obere Linie).

RMSD-Werte der Schweratome				
	im Proteinrückgrat		gesamt	
ox. Adx	$0,94 \pm 0,16$	(0,56..1,61)	$1,63 \pm 0,20$	(1,13..2,29)
red. Adx	$1,53 \pm 0,22$	(1,01..2,35)	$2,36 \pm 0,25$	(1,70..3,03)

Tabelle 5: Vergleich charakteristischer mittlerer globaler RMSD-Werte für die 20 ausgewählten Struktur der zwei berechneten Ensembles

etwas schlechter definiert als der Rest der Struktur. Dies liegt aber mehr an der fehlenden Zuordnung als an einer erhöhten Flexibilität, so daß das Protein im oxidierten Zustand relativ unflexibel erscheint. Im reduzierten Adrenodoxin fällt auf, daß der Bereich von Aminosäurerest 69 bis Aminosäurerest 80 eine starke Änderungen in seiner Konformation aufweist. Hier handelt es sich um die Wechselwirkungsdomäne, die im Vergleich zum Gesamtprotein relativ gut definiert ist. Die erhöhte Unschärfe im reduzierten Adrenodoxin spiegelt sich auch in den etwas erhöhten RMSD-Werten in Abb. 43 wieder. In Tabelle 5 sind die mittleren globalen RMSD-Werte für die Schweratome des Proteinrückgrates und der gesamten Aminosäurereste im gesamten Protein sowie in den Sekundärstrukturelementen und den Schlaufenregionen zusammengestellt.

Zum Vergleich der beiden Zustände des Adrenodoxins wurden die Schweratome des Proteinrückgrats übereinandergelegt (Abb.44). Da es im Wechsel vom reduzierten zum oxidierten Adrenodoxin zu Änderungen in den Sekundärstrukturelementen kommt, ist es nicht verwunderlich, daß beide Strukturen nicht exakt übereinander zu legen sind. So verkürzt sich die dritte Helix (72-79), um vier Aminosäurereste (72-75). Dies resultiert aus einer Bewegung der beiden Aminosäurereste D72 und E73. Die Helix "bricht" zwischen Aminosäurerest 79 und 76, da D76 und D79 als Kontaktstellen zu beiden Redoxpartnern dienen. D72 und E73 fungieren nur im oxidierten Adrenodoxin als Kontaktstelle zu Cytochrom P450_{ssc}. Dadurch kommt es zu einem unterschiedlichen Verlauf des Proteinrückgrats im Bereich der Wechselwirkungsdomäne, speziell zwischen den Aminosäureresten K66 und L80.

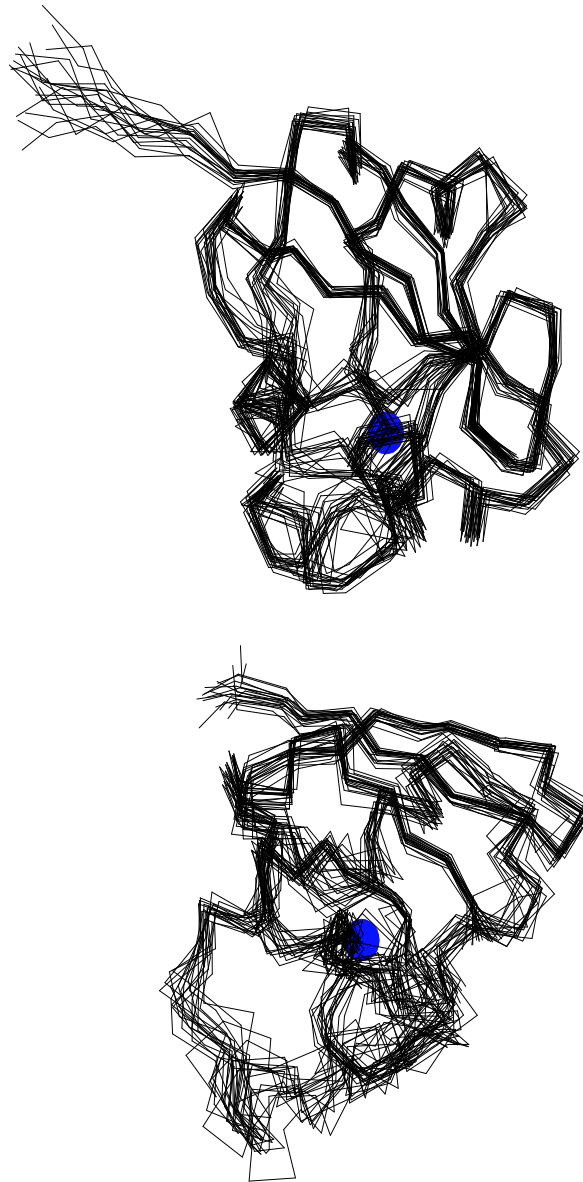


Abbildung 43: Strukturensamble von 20 Strukturen des oxidierten Adrenodoxin (oben) und Strukturensamble von 20 Strukturen des reduzierten Adrenodoxin (unten). Der blaue Kreis symbolisiert die Position des Eisen-Schwefel-Clusters.

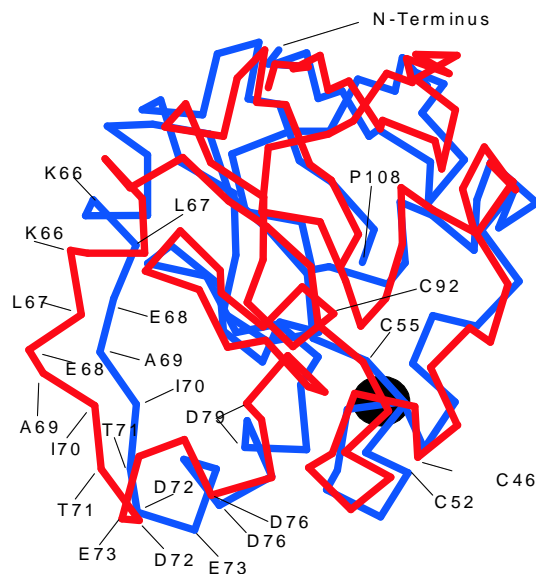


Abbildung 44: Übereinanderlagerung der Proteinrückgrat-Schweratome der Strukturen mit der jeweils besten Zielfunktion des reduzierten (rot) und des oxidierten (blau) Adrenodoxins. Der Eisen-Schwefel-Cluster wird durch einen schwarzen Kreis symbolisiert.

5.8.5 Die Strukturen von Rinder-Adrenodoxin

Die erhaltenen Ensembles repräsentieren die Lösungsstrukturen des Adrenodoxins (Abb.43). Zur Bewertung dieser Strukturen ist in Abbildung 45 das Ramachandran - Diagramm, ermittelt mittels PROCHECK-NMR [156], für das oxidierte und das reduzierte Ensemble gezeigt. In dieser Auftragung sind die (ϕ, ψ) -Diederwinkelkombinationen jeden Restes durch ein Quadrat mit der Konformationsnummer innerhalb des Ensembles markiert. Die (ϕ, ψ) -Diederwinkelkombinationen von Glycinresten sind durch Dreiecke angezeigt. Die farblich kodierten Bereiche markieren verschieden intensiv populierte Bereiche, die in etwa der aus sterischen Überlegungen erwarteten Abstufung der potentiellen Energie entsprechen. Rote Regionen markieren sehr häufig gefundene Konformationen, die daher als "erlaubte" Bereiche bezeichnet werden. In Konformationen mit Rückgrat-Diederwinkelseinstellungen in den gelben Regionen haben ungünstige van-der-Waals Kontakte, so daß diese Bereiche weniger bevorzugt sind. Die entsprechen-

Konformations-Statistik				
	red. Adx		ox. Adx	
Reste in energetisch günstigen Kernbereichen	1076	49,4 %	1231	62,8 %
Reste in zusätzlich erlaubten Kernbereichen	830	38,1 %	597	30,5 %
Reste in generell erlaubten Kernbereichen	183	8,4 %	118	6,0 %
Reste in nicht erlaubten Bereichen	91	4,2 %	14	0,7 %

Tabelle 6: Statistik der resultierenden Konformationsverteilungen im Ramachandran-Diagramm. .

den Statistiken über die Konformationsverteilungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Betrachtet man jetzt die Aminosäurereste der Wechselwirkungsdomäne, so erkennt man im reduzierten Zustand speziell bei den Aminosäureresten D72, E73, D76 und D79 große Veränderungen ihrer (ϕ, ψ) -Winkelkonformationen (siehe Abb.46) gegenüber dem oxidierten Zustand. Wurde zuerst vermutet, die Verkürzung der Helix, bestehend aus den Aminosäureresten 72 - 79, im reduzierten Zustand würde allein aufgrund der fehlenden Information durch die Einwirkung des Eisen-Schwefel-Clusters resultieren, so läßt sich anhand der Änderungen der Winkelkonformationen eine Drehbewegung der genannten Aminosäurereste aufzeigen. Während sich die Aminosäurereste D72 und E73 nur an der Reaktion mit Cytochrom P450_{ssc} beteiligen, sind die Aminosäurereste D76 und D79 an der Reaktion mit beiden Redox-Partnern beteiligt. Die Aminosäurereste D72 und E73 drehen sich aus der Wechselwirkungsebene heraus und drehen somit die Helix-Konformation an dieser Stelle mit, während die Aminosäurereste D76 und D79 nur geringfügig ihre Position in der Wechselwirkungsebene verändern und damit eine energetisch ungünstigere Winkelkonformation einnehmen. Abbildung 46 veranschaulicht diesen Sachverhalt. Mit anderen Worten die Bewegung der Aminosäurereste reguliert offensichtlich die Stärke der Interaktionen zwischen den Redoxpartnern [157]. In Abbildung 47 und in Abbildung 48 sind die Auswirkungen der Winkeländerungen auf die Struktur dargestellt. Man sieht hier sehr gut die Positionsänderung der beiden Aminosäurereste D72 und E73, die sich in der Drehung der Helix widerspiegelt und die beiden anderen Aminosäurereste

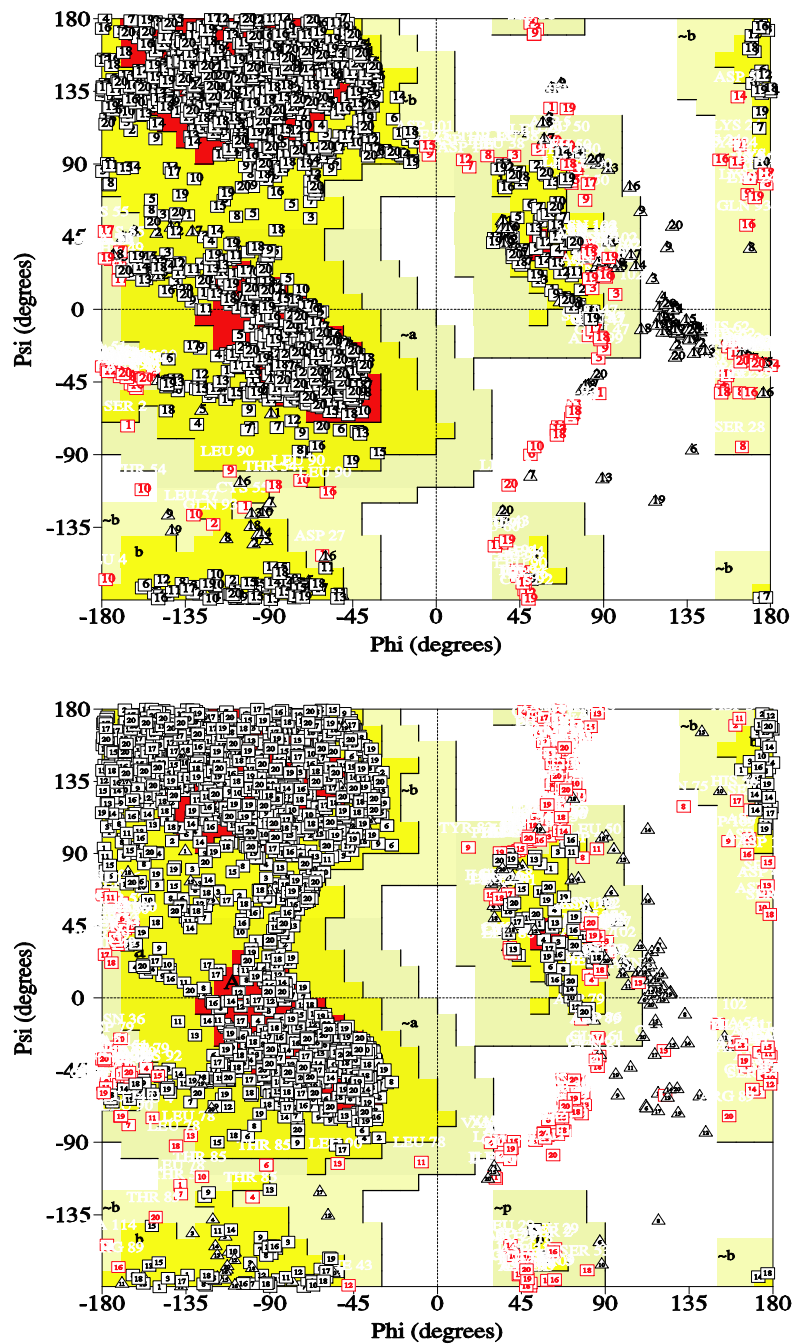


Abbildung 45: Ramachandran-Diagramme der Adx-Ensembles (oben ox. Adx). Jeder Datenpunkt ist mit der Modellnummer von 1 bis 20 markiert. Die farbliche Kodierung markiert bevorzugte und weniger bevorzugte (ϕ , ψ) - Diederwinkelkombinationen. Rot entspricht der bevorzugtesten Region. Glycine werden als schwarze Dreiecke dargestellt.

D76 und D79 in energetisch ungünstigere Bereiche rückt. Bedingt dadurch ändert sich die Konformation der Aminosäurereste 66 - 71.

Die Darstellung der Ramachandran-Diagramme in Abbildung 41 gibt eine sehr gute Übersicht über die globale Qualität der erhaltenen Ensembles. Vor allem die relative Lage und die Streuung der (ϕ, ψ) - Diederwinkelkombinationen einzelner Reste in allen Konformationen der Ensembles ist, wie in Abbildung 46 gezeigt, für eine Nähere Analyse sehr wertvoll.

Im Adrenodoxin findet sich für die Reste, die genügend definiert sind, eine starke Clusterbildung der Datenpunkte. Genügend definiert heißt im Fall von Adrenodoxin, daß die Resonanzen der entsprechenden Aminosäurereste mindestens zu 70% zugeordnet sind. Die helicalen Bereiche sowie die Stränge der β -Faltblätter weisen beim oxidierten Adrenodoxin eine gute Reproduzierbarkeit auf. Etwas stärker aufgelockerte Ansammlungen sind bei den Sekundärstrukturelementen des reduzierten Adrenodoxins zu beobachten. Ein Großteil der Datenpunkte – abgesehen von den Glycinresten und dem Prolinrest – befinden sich innerhalb oder in näherer Umgebung zu den energetisch bevorzugten Bereichen. Auch dieser Befund weist auf Ensembles mit guter Präzision hin und zeigt die Plausibilität der berechneten Strukturen. Bei Aminosäureresten mit größerer Streuung ist fast immer die ungenügende Definition die Ursache für diesen Befund. Die Übersichten der individuellen Ramachandran-Diagramme für das Ensemble des oxidierten und des reduzierten Adrenodoxins sind im Anhang zu finden.

Die Analyse der Seitenkettenkonformationen bezüglich der Einstellungen der χ^1 -Diederwinkel für jeden einzelnen Rest des oxidierten Adrenodoxins werden in den Abbildungen 53 bis 55 dargestellt. Für das reduzierte Adrenodoxin zeigen die Abbildungen 64 bis 66 die entsprechenden Analysen.

Die Analyse der Seitenkettenkonformationen bezüglich der Einstellungen der χ^2 -Diederwinkel für jeden einzelnen Rest des oxidierten Adrenodoxins sind in den Abbildungen 56 und 57 dargestellt sowie für den reduzierten Zustand in den Abbildungen 67 und 68. Die Abbildungen zu den Diederwinkelkonformationen sind im Anhang zu finden.

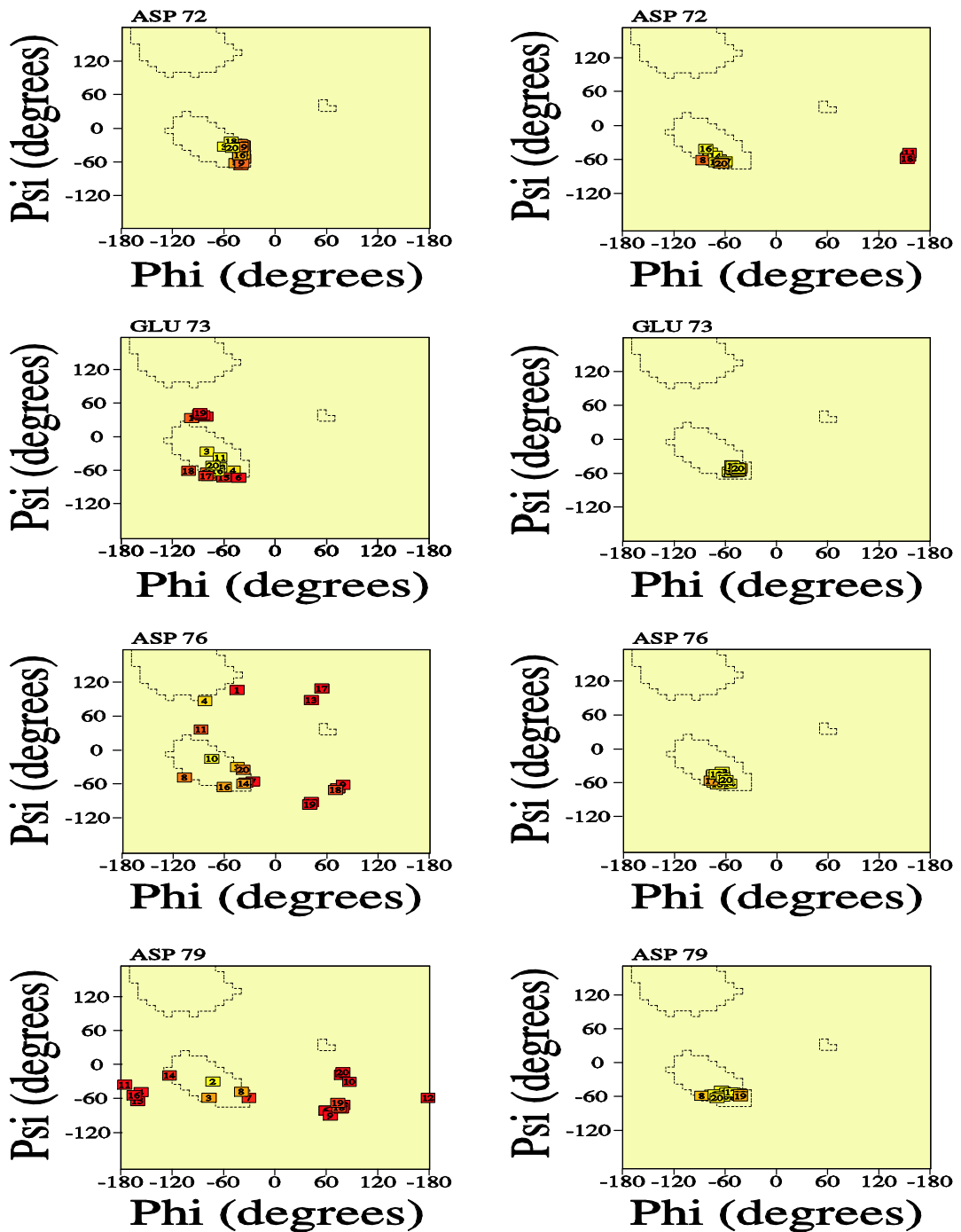


Abbildung 46: Ramachandran-Diagramme für die Aminosäurereste D72, E73, D76 und D79. Die linken vier Diagramme stellen den reduzierten Zustand, die rechten vier den oxidierten Zustand dar.

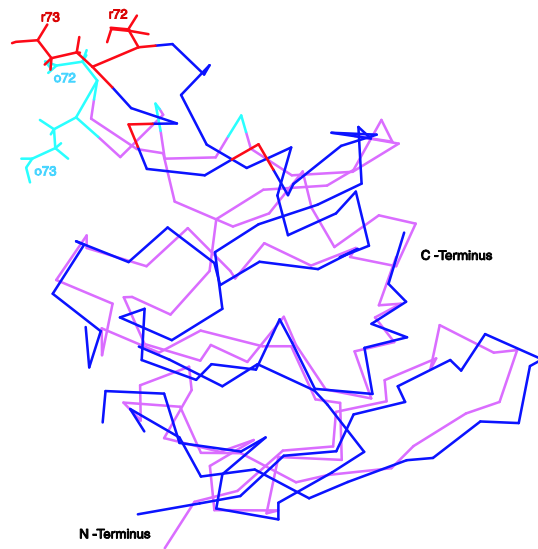


Abbildung 47: Übereinander gelegte Proteinrückgratstrukturen des reduzierten Adrenodoxins (blau) und des oxidierten Adrenodoxins (lila). Die Aminosäuren D72 und E73 sind im reduzierten Zustand rot und im oxidierten Zustand hellblau dargestellt.

Für die Aminosäurereste D72, E73, D76 und D79 (Abb.54) scheint es im oxidierten Zustand nach dem χ^1 -Histogramm eine bevorzugte Konformation zu geben. Während sich im reduzierten Zustand für den Aminosäurerest D72 noch eine Konformation erraten läßt, scheinen die Aminosäurereste E73, D76 und D79 (Abb.65) keine bevorzugte Konformation aufzuweisen.

Beim Vergleich des CSI mit den gefundenen Sekundärstrukturelementen aus der Strukturrechnung, die mit PROCHECK [156] ermittelt wurden, stellt man fest, daß die Vorhersage nicht ganz mit den gefundenen Resultaten übereinstimmt. Es fehlt im CSI das β -Faltblatt zwischen den Aminosäureresten 56-58 und die Helix zwischen den Aminosäureresten 61-64. Das β -Faltblatt der Aminosäurereste 88-89 ist gleichfalls im CSI nicht vorhanden. Dieser Befund ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß der CSI mindestens drei Aminosäurereste in Folge benötigt, um ein Sekundärstrukturelement zu definieren. Können jetzt aber wie im vorliegenden Fall nicht alle Aminosäurereste zugeordnet werden, so ergeben sich Lücken, die der CSI nicht schließen kann. Dadurch können nicht alle Se-

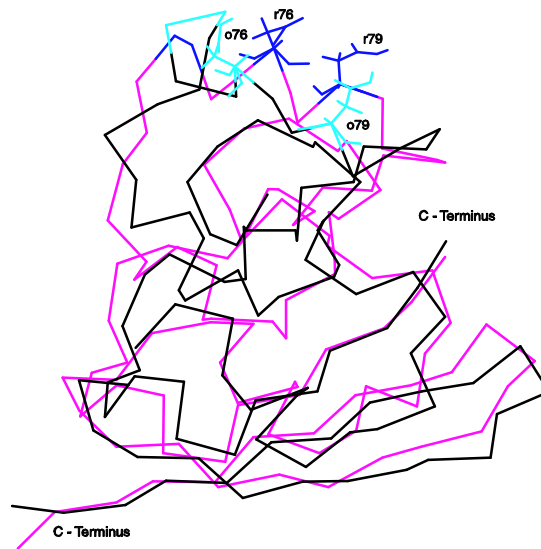


Abbildung 48: Übereinander gelegte Proteinrückgratstrukturen des reduzierten Adrenodoxins (blau) und des oxidierten Adrenodoxins (schwarz). Die Aminosäuren D76 und E79 sind im reduzierten Zustand blau und im oxidierten Zustand hellblau dargestellt.

kundärstrukturelemente vorhergesagt werden. Sehr anschaulich läßt sich dieser Sachverhalt an Abbildung 49 zeigen. Die gelben Pfeile spiegeln die Ergebnisse aus der Strukturrechnung mittels PROCHECK wieder. Während die schwarzen Balken die Ergebnisse der "Chemical Shift Index"-Rechnung zeigen. Man sieht deutlich, daß die gerechnete Struktur die erwarteten Sekundärstrukturelemente [62] aufweist. Trotz der diskutierten Widrigkeiten gibt der CSI einen relativ guten Überblick.

Die Ergebnisse aus den gewonnenen NMR-Daten mit den vorhandenen aus der Röntgenkristallstruktur sowie den NMR-Daten aus den Untersuchungen am Humanen Adrenodoxin, welches 70 % strukturhomolog zu Rinder Adrenodoxin ist, werden in Tabelle 7 dargestellt. Zu erkennen ist, daß die Lage der Sekundärstrukturelemente des humanen Adrenodoxins denen des Rinder Adrenodoxins ähneln und umgekehrt. Bei beiden Proteinen ist die dritte Helix im reduzierten Zustand verkürzt. Und bei beiden Proteinen fehlt die Helix der Aminosäurereiste 91-93, die in der Röntgenkristallstruktur vorhanden ist. Dies ist allerdings

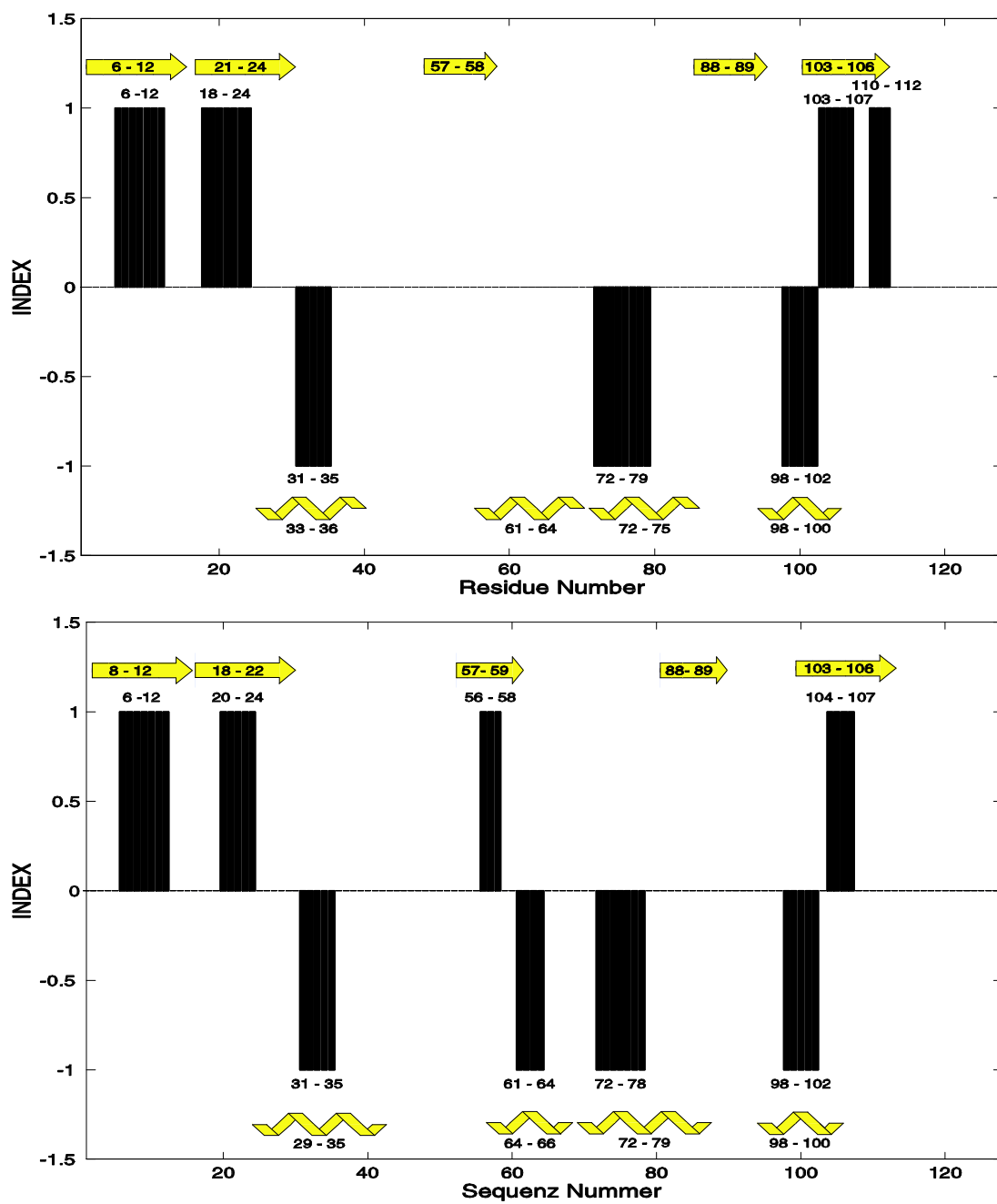


Abbildung 49: Chemical Shift Index (CSI) von reduzierten Adrenodoxin (oben) und oxidierten Adrenodoxin (unten). Die gelben Pfeile bezeichnen die Strukturelemente, die mittels PROCHECK-NMR aus den Daten der Strukturrechnung erhalten wurden.

	Rind		x-ray	Human	
	ox	red	ox	ox	red
β-Faltblatt	8-12	6-12	7-12	6-13	6-13
	18-22	21-24	18-23	17-24	17-24
	57-59	57-58	56-59	57-60	57-60
	88-89	88-89	88-90	88-89	88-89
	103-106	103-106	103-106	103-106	103-106
					110-112
Helix	29-35	33-36	29-35	31-37	34-37
	64-66	61-64	61-64	61-67	61-67
	72-79	72-75	72-78	72-79	72-76
			91-93		
	98-100	98-100	98-100	98-102	98-102

Tabelle 7: Vergleich der Sekundärstrukturelemente des Rinder Adrenodoxins, des humanen Adrenodoxins und den Daten der Röntgenkristallstruktur des Adx (ox.)

darauf zurückzuführen, daß diese Aminosäuren dem Relaxationsphänomen des Eisen-Schwefel-Cluster unterliegen und somit NMR-technisch nicht zu erfassen sind. Die Helix von Aminosäure D72 - D76 ist, wie oben bereits diskutiert, aufgrund ihrer geänderten Konformation verkürzt. Allerdings ist zu beachten, daß die Aminosäurereste M77 und L78 im reduzierten Zustand nicht zugeordnet werden können. Auch bei der ersten Helix im humanen Adrenodoxin und im Rinder Adrenodoxin tritt im reduzierten Zustand eine Verkürzung auf, da sich auch hier die Einwirkung des Eisen-Schwefel-Cluster bemerkbar macht.

Zusätzlich wurden die Änderungen in den chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}^N$ -, ^{15}N -, $^{13}\text{C}^\alpha$ -, $^1\text{H}^\alpha$ -, $^{13}\text{C}^\beta$ -, und $^{13}\text{C}'$ -Kerne beider Zustände miteinander verglichen. Dazu wurden die chemischen Verschiebungen der erwähnten Kerne des oxidierten Adrenodoxins von denen des reduzierten Adrenodoxins subtrahiert. Daraus resultieren Differenz-Diagramme (Abb.50u.51), die eine gewisse Aussage über mögliche Konformationsänderungen zulassen. Allerdings wurden nur die Differenzen aufgetragen, zu denen eine Zuordnung sowohl im reduzierten als auch

im oxidierten Adrenodoxin gelang.

Auffällig sind die großen Differenzen am C-Terminus, vornehmlich ab Aminosäurerest P108. Bemerkenswert ist auch die Änderung der chemischen Verschiebungen im Bereich der Wechselwirkungsdomäne von Aminosäurerest A69 bis L80. Speziell die Differenz-Diagramme der $^{13}\text{C}^\beta$ - und $^{13}\text{C}'$ -Kerne weisen hohe Veränderungen in den chemischen Verschiebungen auf. Dies deutet auf eine starke Bewegung der Seitenketten der entsprechenden Aminosäurereste hin.

Abschließend zeigt Abbildung 52 den oxidierten und reduzierten Zustand des Adrenodoxins nebeneinander. Zum besseren Vergleich wurde das Modell aus der Röntgenkristallstruktur-Analyse hinzugefügt [62]. Auffällig ist die geringere Packungsdichte des reduzierten Adrenodoxins (in Abbildung 52 rechts zu sehen). Das C-terminale Ende des oxidierten Zustands wurde in Abbildung 52 mit Absicht nicht dargestellt, da der C-Terminus frei beweglich ist und sich somit gerade in den Raum vom Protein weg orientiert. Die Struktur wurde nach dem Aminosäurerest P108 "abgeschnitten". Die Kristallstruktur und die NMR Struktur des oxidierten Zustands von Adrenodoxin sind sich relativ ähnlich. Wie erwartet gibt es strukturelle Unterschiede zum reduzierten Zustand der NMR Struktur.

Zu beachten ist der "Knick" am C-terminalen Ende des reduzierten Rinder-Adrenodoxins. Während der C-Terminus im oxidierten Rinder-Adrenodoxin gerade vom Protein-Körper wegzeigt, hat er im reduzierten Zustand einen Knick. Interessanterweise sitzt an dieser Stelle der Aminosäurerest S112, der im Histogramm der Amid-Protonen- T_1 -Zeiten einen Wert von 62,5 ms aufweist, was auf einen direkten Einfluß durch den Eisen-Schwefel-Cluster vermuten lassen könnte. Gegen einen direkten Einfluß des Eisen-Schwefel-Clusters spricht die relativ große Entfernung von ca. 22Å, die sich zwischen dem Eisen-Schwefel-Cluster und dem Aminosäurerest S112 aufspannt.

Zur Bewertung der Qualität der Strukturen wurden verschiedene Kriterien herangezogen, von denen keines ohne weiteres ein Maßstab für die Richtigkeit der Strukturen sein kann. Das gängigste Kriterium zur Bewertung der Qualität einer Struktur (genauer: der "Präzision" (precision)) ist die Wurzel der mittleren

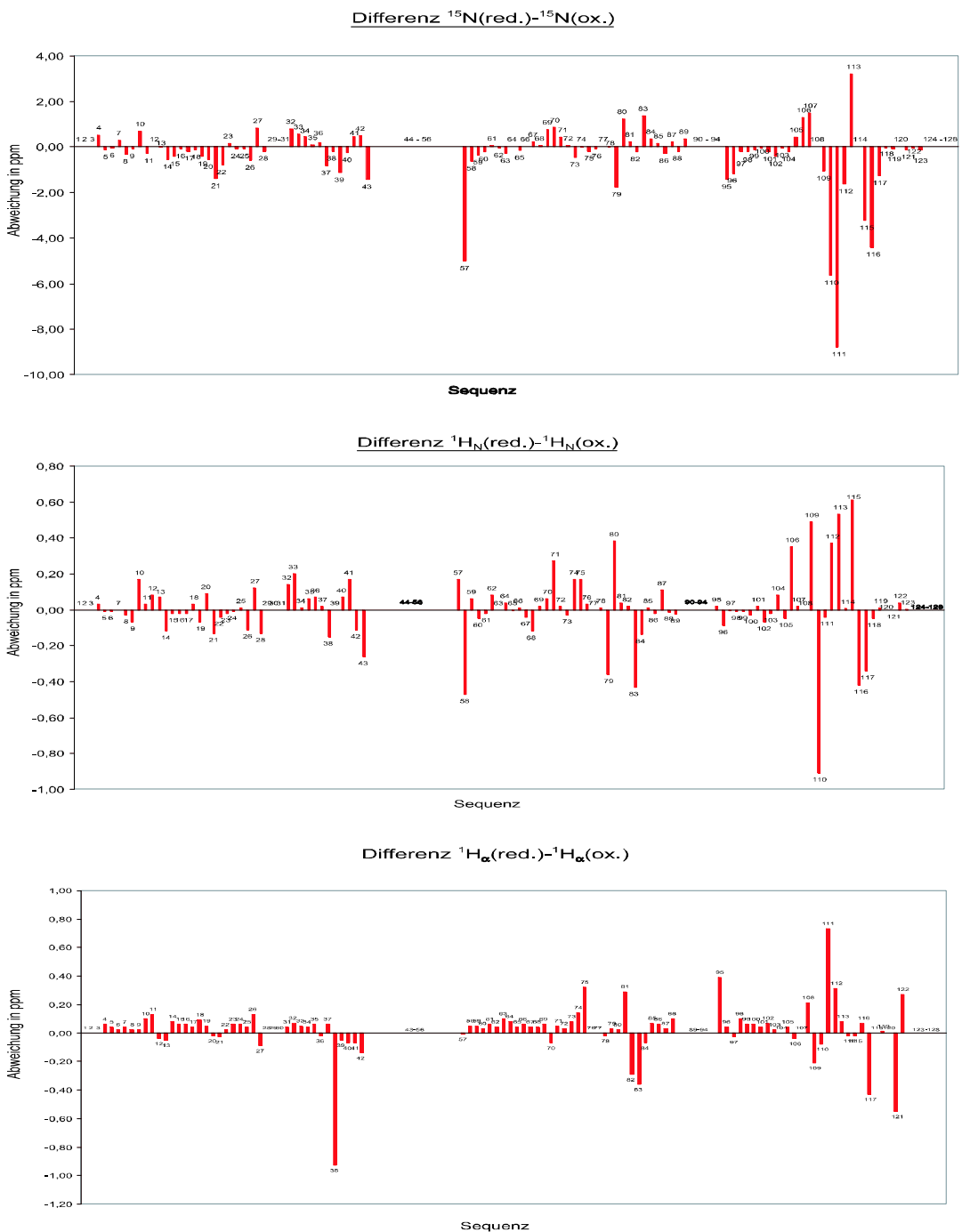


Abbildung 50: Differenz-Diagramme der chem. Verschiebung der Kerne $^1\text{H}^N$, ^{15}N und $^1\text{H}_\alpha$. Kerne, zu denen kein Paar der chemischen Verschiebungen vorlag wurden nicht aufgetragen. Die Differenz resultiert aus der Subtraktion der Werte des oxidierten vom reduzierten Zustand.

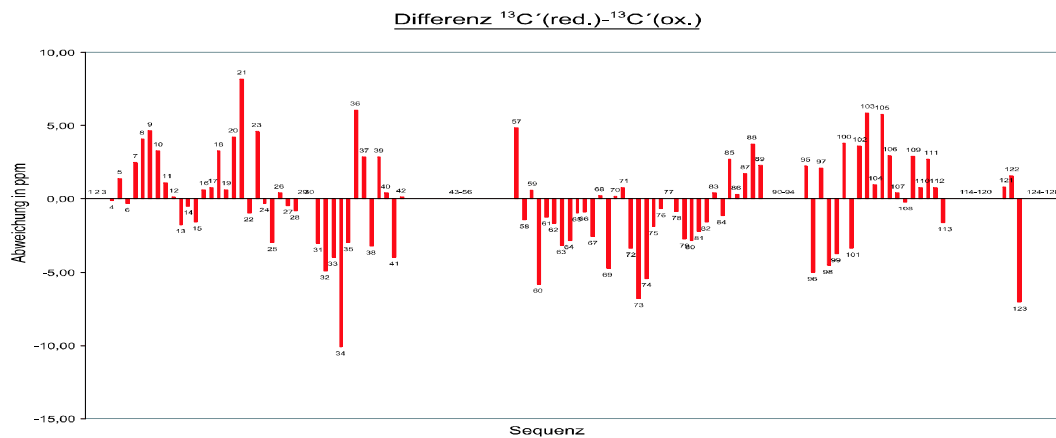
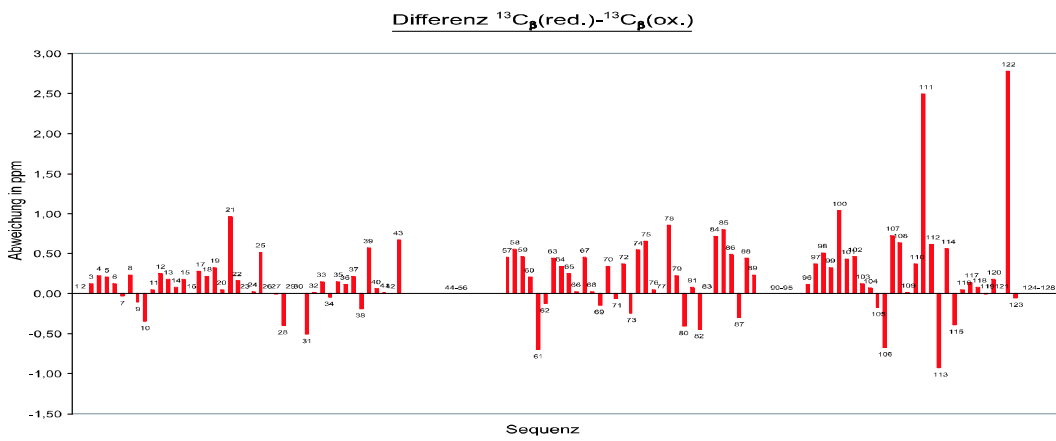
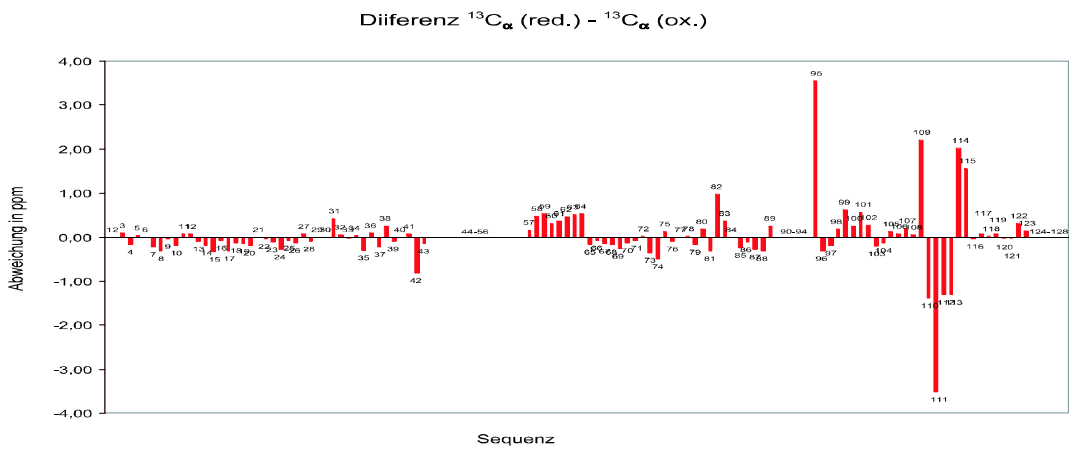


Abbildung 51: Differenz-Diagramme der chem. Verschiebung der Kerne $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$ und $^{13}\text{C}'$. Kerne, zu denen kein Paar der chemischen Verschiebungen vorlag wurden nicht aufgetragen. Die Differenz resultiert aus der Subtraktion der Werte des oxidierten vom reduzierten Zustand.

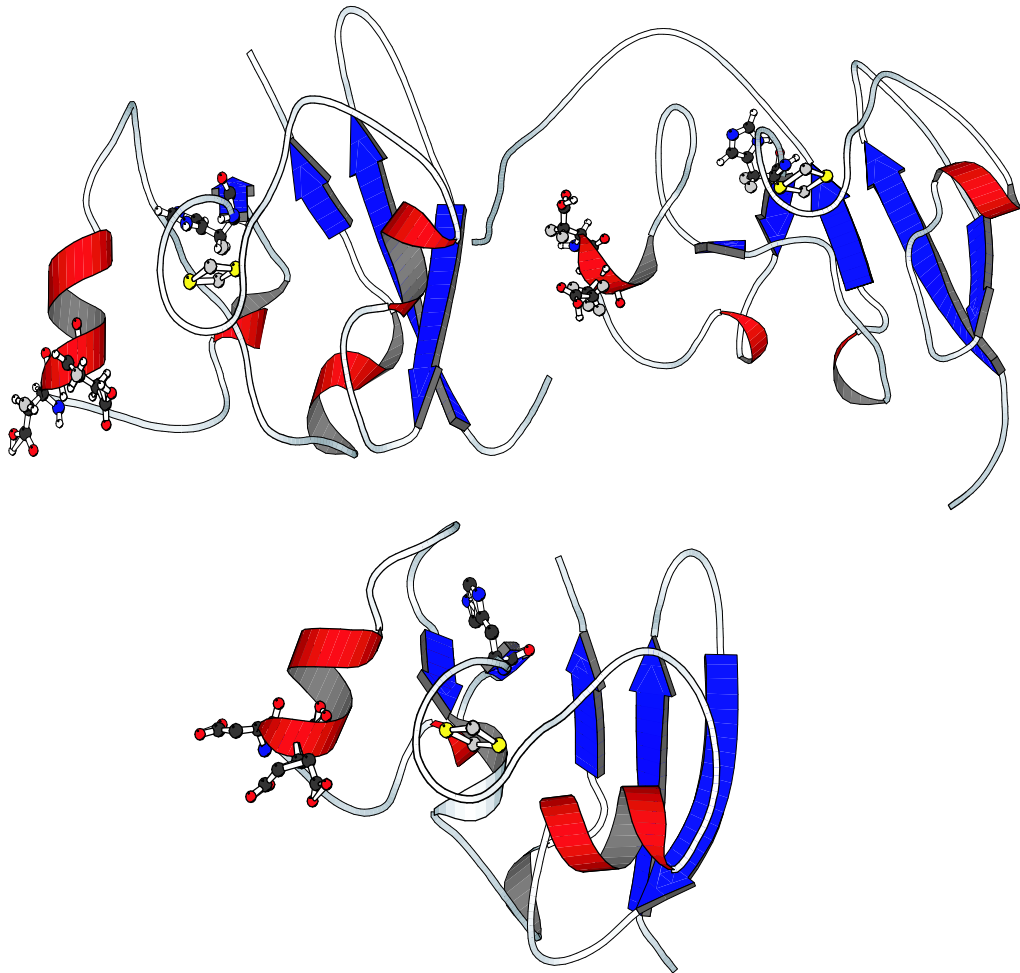


Abbildung 52: Strukturmodelle des oxidierten Adrenodoxins (oben links), des reduzierten Adrenodoxins (oben rechts) und der Kristallstruktur (unten). Dargestellt sind die Seiten-
gruppen der Aminosäurereste E72 und D73 der Wechselwirkungsdomäne und des H56, das der Steuerung des Redoxpotentials dient.

quadratischen Abweichung der Atomkoordinaten der einzelnen Strukturen des Ensemble von der mittleren Struktur. Dieser mittlere globale RMSD-Wert der Rückgratátome zur Mittelstruktur beträgt für das oxidierte Adrenodoxin 0,94 A und für das reduzierte Adrenodoxin 1,53 A.

Physikalisch macht es keinen Sinn, für ein NMR-Strukturensemble eine "Auflösung" anzugeben. Um aber eine Basis zu schaffen, auf der Kristallstrukturen und mit Hilfe der NMR aufgeklärte Strukturen miteinander verglichen werden können, haben Laskowski et al. [158] aus 160 mit der Röntgenkristallographie aufgeklärten Proteinstrukturen mehrere strukturelle Kriterien mit der Auflösung der Struktur korreliert. Die gewählten Kriterien sind beispielsweise "der Prozentsatz der Aminosäurereste mit (ϕ, ψ) -Diederwinkelkombinationen in den energetisch besonders bevorzugten Bereichen eines Ramachandran-Diagrammes" oder "die Verteilung der χ_1 -Diederwinkeleinstellungen". Die hier bestimmten Strukturen entsprechen in ihrer Güte einer Kristallstruktur mit der Auflösung von 2.0 Å für den reduzierten und den oxidierten Zustand von Rinder-Adrenodoxin und sind somit zufriedenstellend aufgelöst.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Strukturen von Rinder-Adrenodoxin im oxidierten und im reduzierten Zustand. Die rekombinante Form dieses Elektronentransportproteins aus 128 Aminosäuren und dem [2Fe-2S]-Eisen-Schwefel-Cluster mit einer Molmasse von 14,4 kDa wurde in *E. coli* exprimiert. Die hergestellten Proben wurden entweder mit ^{15}N - oder $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ -angereichert, was den Einsatz einer breiten Palette heteronuklearer NMR-Experimente ermöglichte.

Nach der Zuordnung individueller Werte der chemischen Verschiebung für die NMR-aktiven Kerne konnten durch ^{15}N - und ^{13}C -editierte dreidimensionale NOESY-Experimente 1800 strukturelevante Interprotonenabstände qualitativ bestimmt werden. Insgesamt konnten 70 Prozent der Resonanzen der NMR-aktiven Kerne der jeweiligen Proteinzustände zugeordnet werden. Bedingt durch den paramagnetischen Einfluß des Eisen-Schwefel-Clusters waren durch enorme Linienbreiten und sehr schnelle T_1 -Relaxationszeiten 30 Prozent der zu erwartenden Signale des Proteins nicht detektierbar. Zusätzlich konnten durch die Anwendung eines ct- $(^{15}\text{N},^1\text{H})$ -HSQC Experiments weitere 18 Abstandsparameter von Amidprotonen im Einflußbereich des Eisen-Schwefel-Cluster, die aber gerade noch detektiert werden konnten, zu dem jeweiligen näheren Eisenkern gewonnen werden.

Für die Strukturrechnung mußte der Eisen-Schwefel-Cluster künstlich mit der Aminosäure C46 verbunden werden, da das Programm DYANA keine Eisen-Atome erkennt. Anschließend wurde dieser "künstliche" Aminosäurerest neu benannt (CYSC). Diese neue Aminosäure wurde dann nach Energieminimierung in die DYANA - Bausteinbibliothek eingebracht. Es zeigte sich, daß der Eisen-Schwefel-Cluster die Struktur wie eine "Klammer" zusammenhält. Ohne die Einbindung des Eisen-Schwefel-Cluster kommt es nach der Strukturrechnung zu keiner Struktur, sondern zu einem ungeordneten "Knäuel".

Bei der Interpretation der Strukturensamples wurde deutlich, daß Rinder-Adrenodoxin ein relativ rigides Protein ist. Scheinbar hohe flexible Bereiche im

Protein mußten korreliert werden mit den Bereichen des Proteins, die aufgrund von fehlenden Zuordnungen nicht gut genug definiert werden konnten. Es ist somit nicht definitiv zu bestimmen, woher diese Abweichung in den Strukturen herrührt. Allerdings wurde bei der Betrachtung von Aminosäureresten in der Wechselwirkungsdomäne deutlich, daß an den Positionen der Aminosäurereste D72, E73, D76 und D79 es zu Bewegungen beim Übergang aus dem oxidierten in den reduzierten Zustand kommen muß, da speziell die Aminosäurereste D72 und E73 ihre Position dramatisch verändern. Entsprechende Änderungen der Werte der χ^1 -Diederwinklereinstellungen wurden beobachtet und lokale Ramachandran-Diagramme ergeben sich aus den Rechnungen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß im reduzierten Zustand S112 mit einer T_1 -Relaxationszeit von 62,5 ms im Einflußbereich des Eisen-Schwefel-Cluster liegen könnte. Ein Hinweis darauf ist auch die Änderung der Geometrie des C-Terminus, da im oxidierten Zustand dieser gerade vom Proteinkörper wegweist, während im reduzierten Zustand das C-terminale Ende sich in Richtung Proteinkörper biegt. Bisher wurde angenommen, daß dem C-Terminus keine funktionelle Rolle zukommt.

Die Struktur des Adrenodoxins wurde nach der Distanzgeometrierechnung unter Berücksichtigung aller experimenteller Daten erhalten. Rinder-Adrenodoxin ist klassifiziert als ein $(\alpha+\beta)$ -Protein welches 22% β -Faltblatt, 17% α -Helix und 6% 3_{10} Helix besitzt. Für den oxidierten und den reduzierten Zustand konnten jeweils 5 β -Faltblätter und 4 Helices identifiziert werden. Beim oxidierten Zustand erstrecken sich die 5 β -Faltblätter auf die Aminosäurereste 8-12, 18-22, 57-59, 88-89 und 103-106, während beim reduzierten Adrenodoxin sie sich auf die Aminosäurereste 6-12, 21-24, 57-58, 88-89 und 103-106 erstrecken. Die 4 identifizierten Helices erstrecken sich im oxidierten Zustand auf die Reste 29-35, 64-66, 72-79 und 98-100. Die 4 Helices für den reduzierten Zustand werden durch die Reste 33-36, 61-64, 72-75 und 98-100 charakterisiert. Der Eisen-Schwefel-Cluster ist kovalent an die vier Cystein-Reste 46, 52, 55 und 92 gebunden.

Mit einem mittleren globalen RMSD-Wert der Rückgratátome zur Mittel-

struktur für das oxidierte Adrenodoxin von 0,94 Å und für das reduzierte Adrenodoxin von 1,53 Å sind die Anforderungen an relativ gut aufgelöste Strukturen erfüllt.

Die hier bestimmten Strukturen entsprechen in ihrer Güte einer Kristallstruktur mit der Auflösung von 2.0 Å (Programm PROCHECK) für den reduzierten und den oxidierten Zustand von Rinder-Adrenodoxin und sind somit zufriedenstellend aufgelöst.

A Anhang

A.1 Oxidiertes Adrenodoxin

A.1.1 Chi-1 Frequenzverteilung

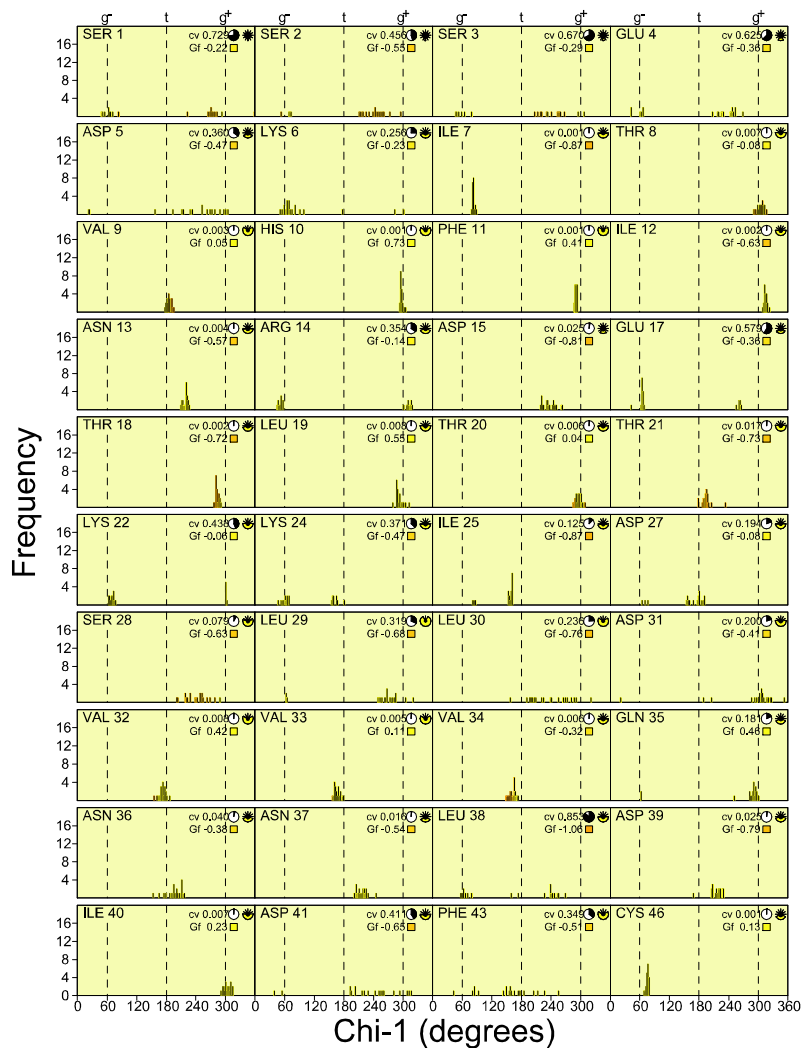


Abbildung 53: Verteilung der χ^1 -Diederwinklereinstellungen für die Reste S1 bis C46 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

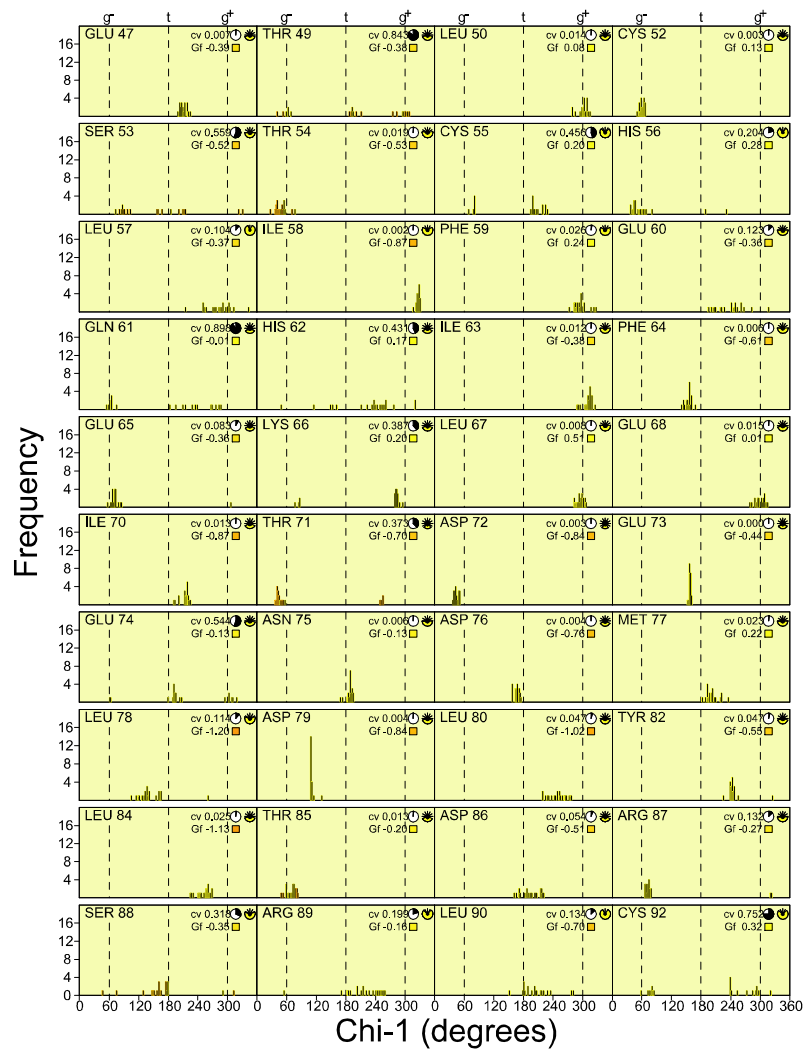


Abbildung 54: Verteilung der χ^1 -Diederwinkelseinstellungen für die Reste E47 bis C92 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

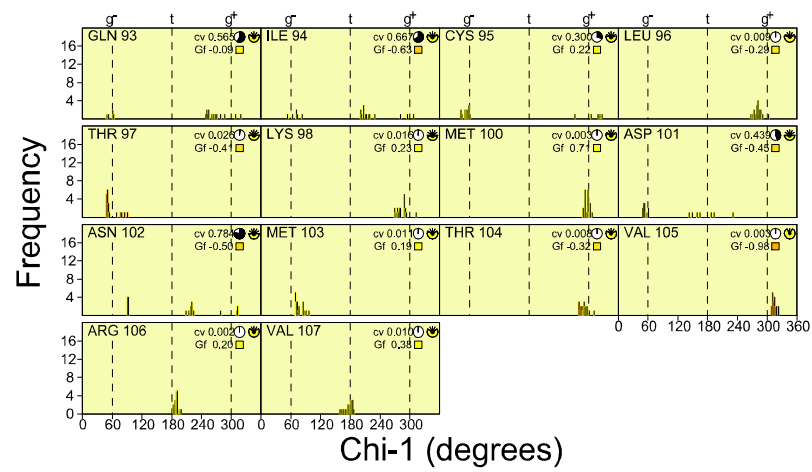


Abbildung 55: Verteilung der χ^1 -Diederwinkeleinstellungen für die Reste Q93 bis V107 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

A.1.2 Chi-2 Frequenzverteilung

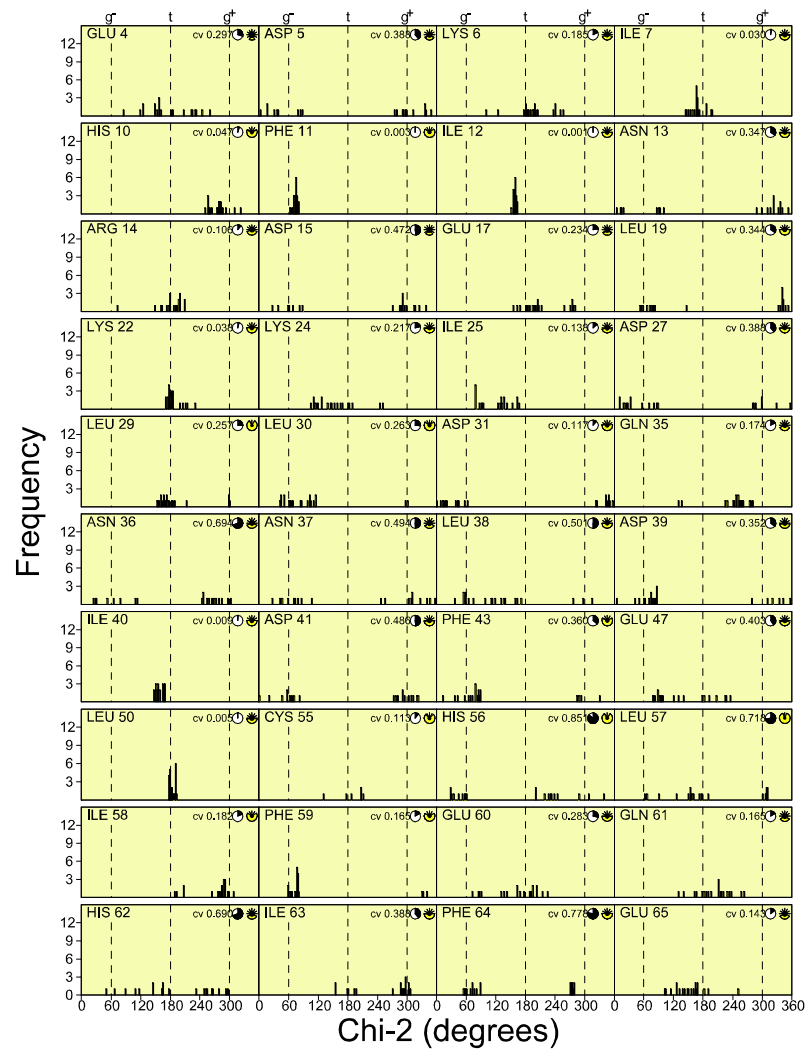


Abbildung 56: Verteilung der χ^2 -Diederwinklereinstellungen für die Reste E4 bis E65 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

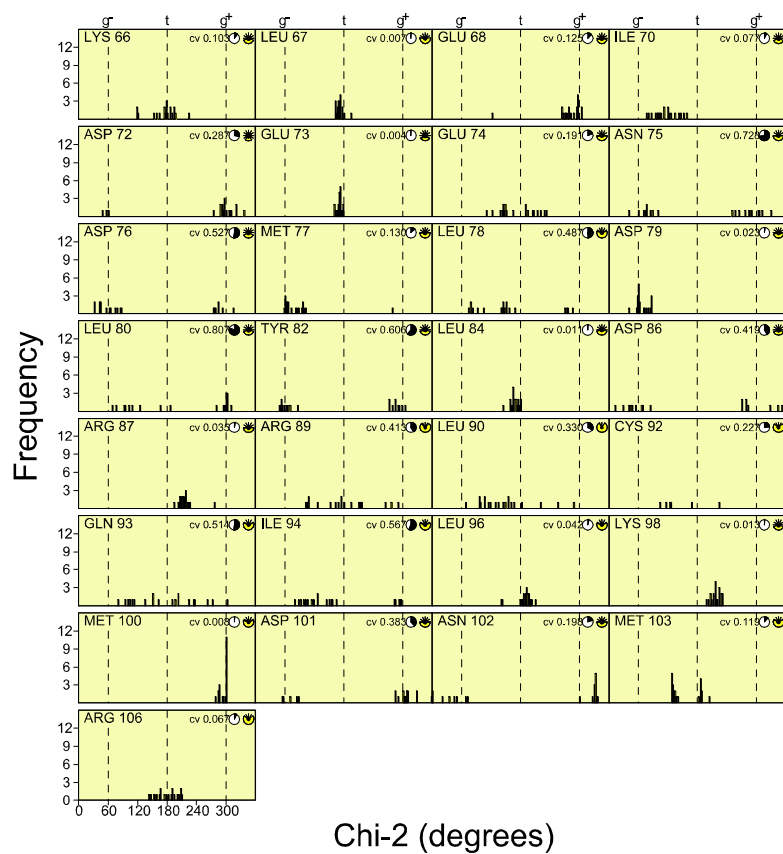


Abbildung 57: Verteilung der χ^2 -Diederwinkeleinstellungen für die Reste K66 bis R106 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

A.1.3 Individuelle Ramachandran-Diagramme

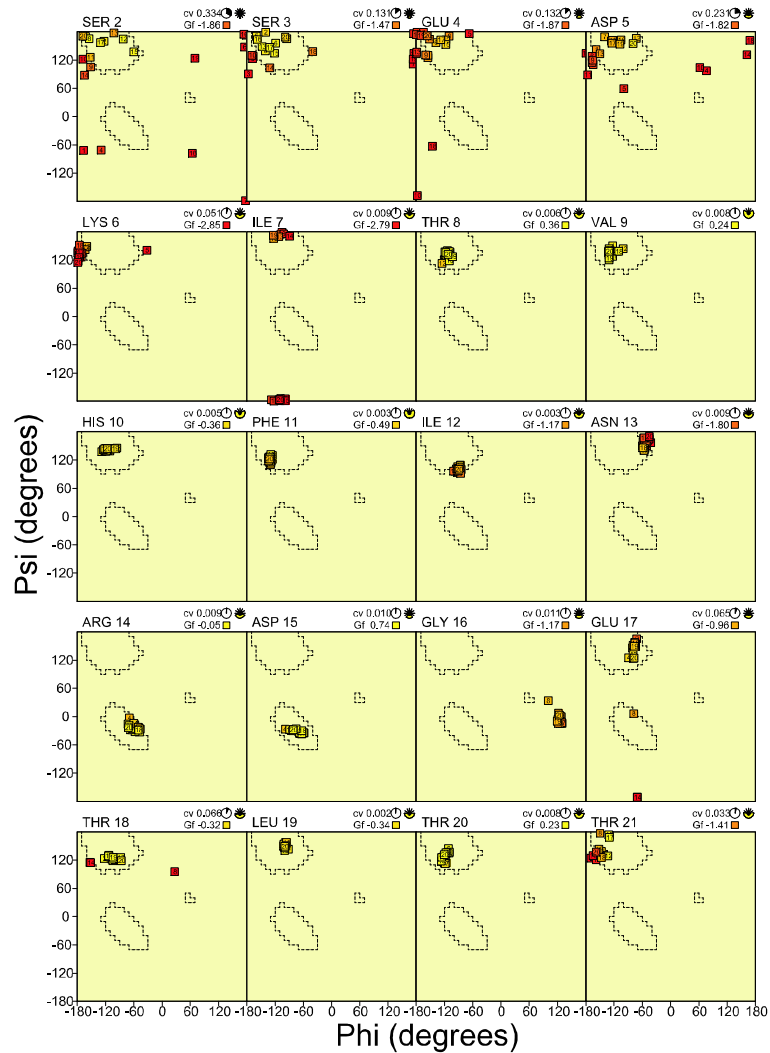


Abbildung 58: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste S2 bis T21 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

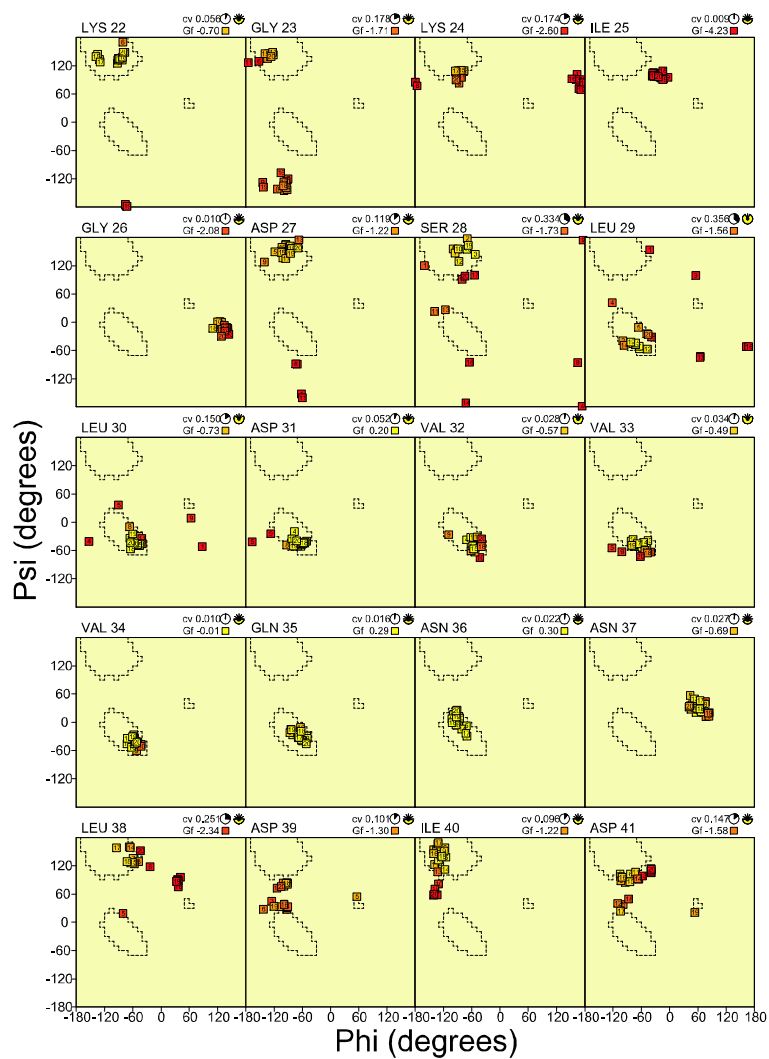


Abbildung 59: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste K22 bis D41 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

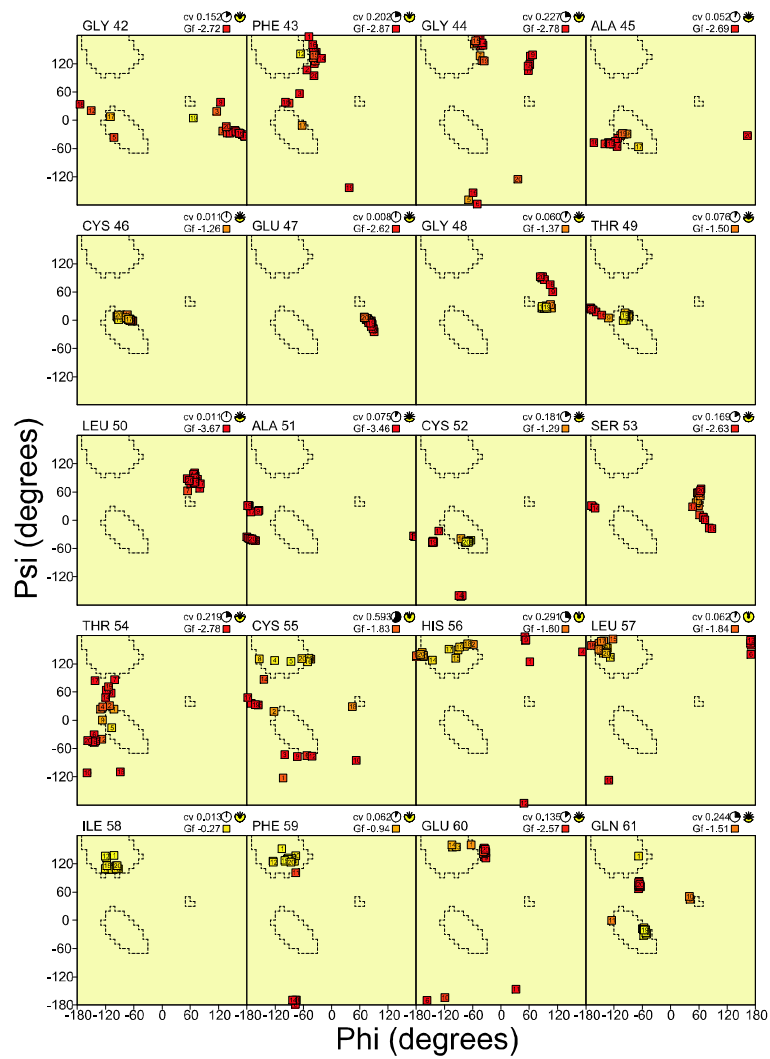


Abbildung 60: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste G42 bis Q61 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

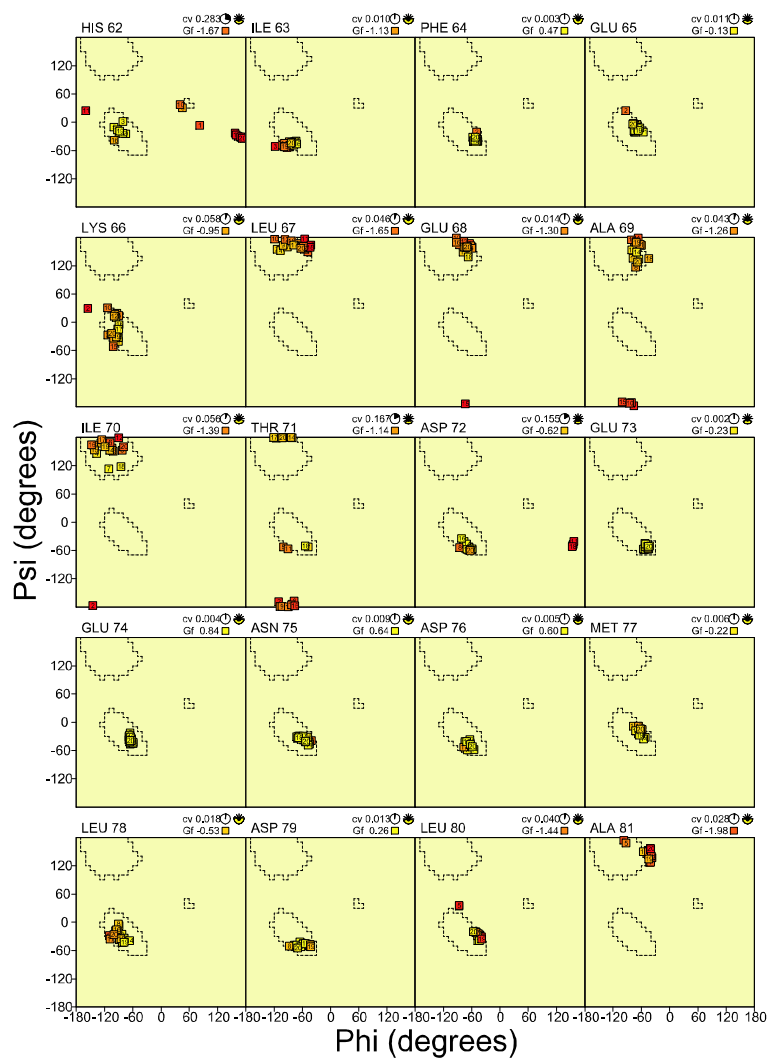


Abbildung 61: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste H62 bis A81 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

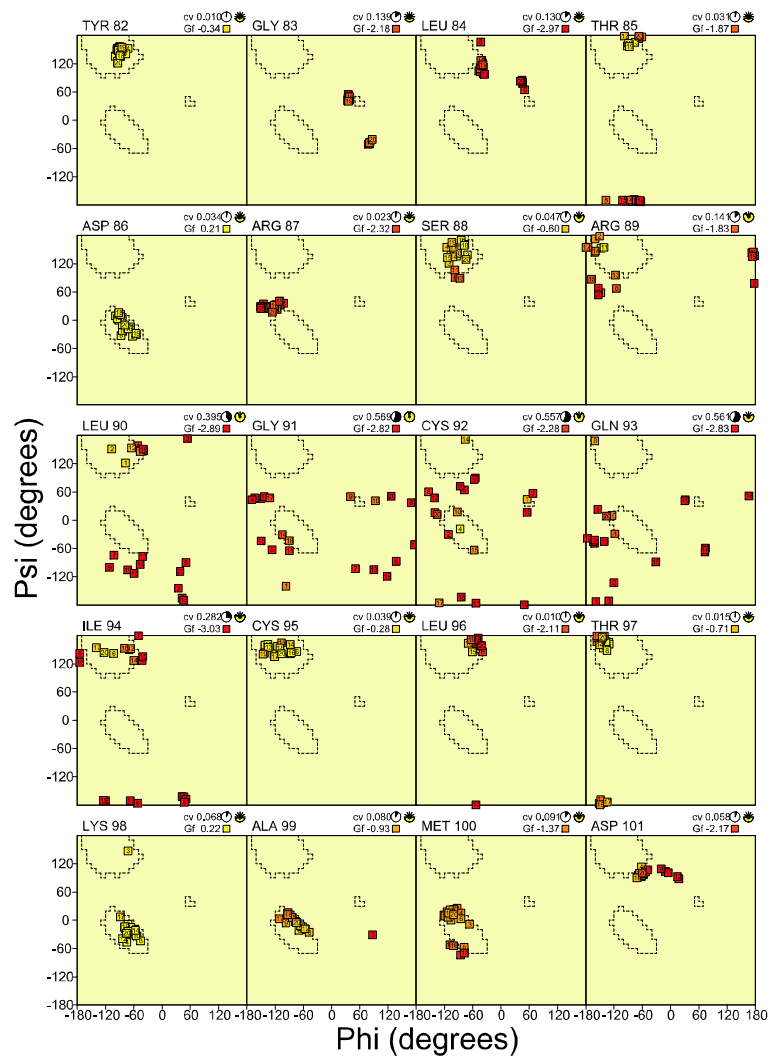


Abbildung 62: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste Y82 bis D101 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

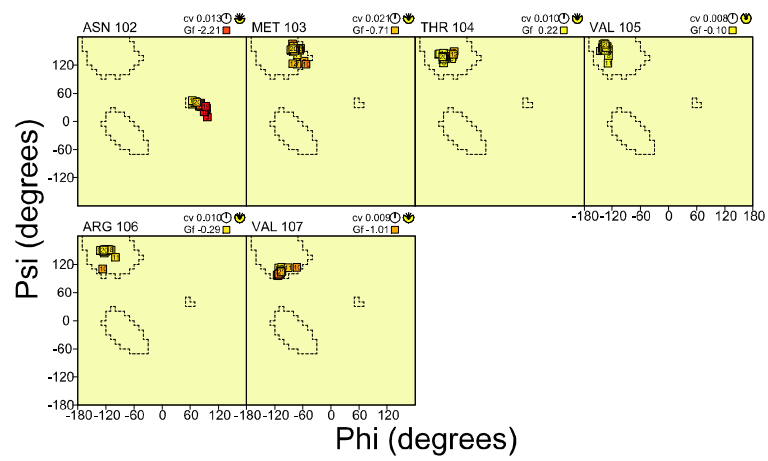


Abbildung 63: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste N102 bis V107 im Konformationsensemble des oxidierten Adrenodoxins.

A.2 Reduziertes Adrenodoxin

A.2.1 Chi-1 Frequenzverteilung

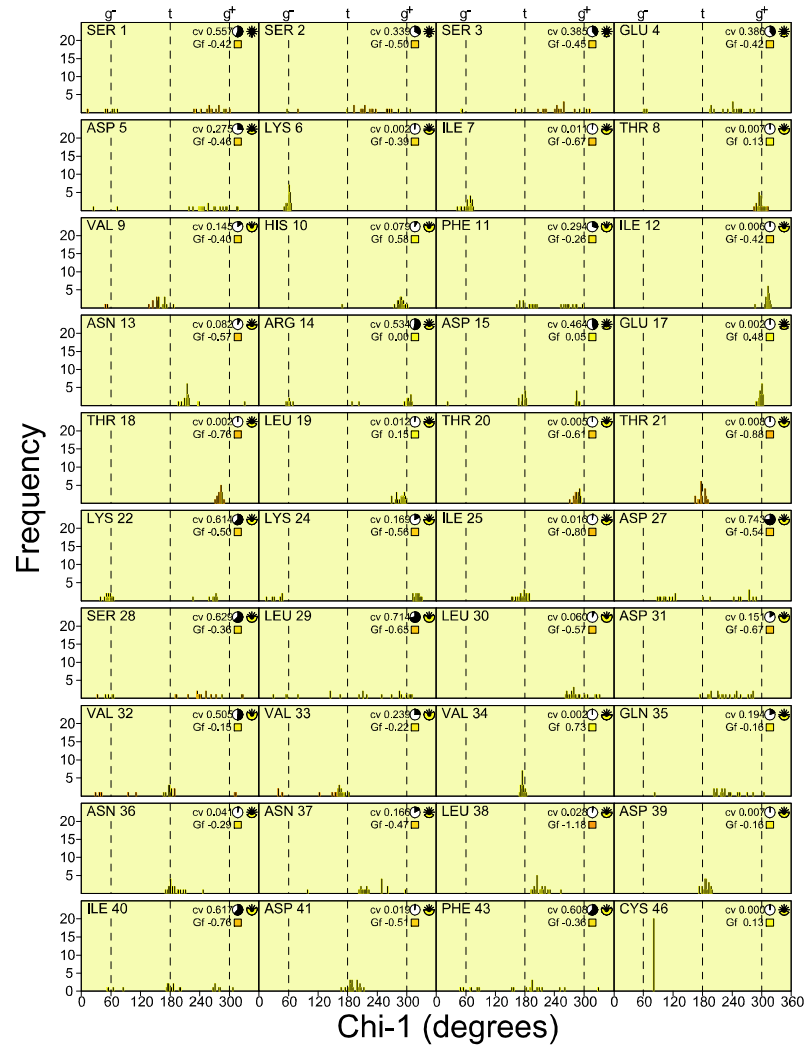


Abbildung 64: Verteilung der χ^1 -Diederwinklereinstellungen für die Reste S1 bis C46 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

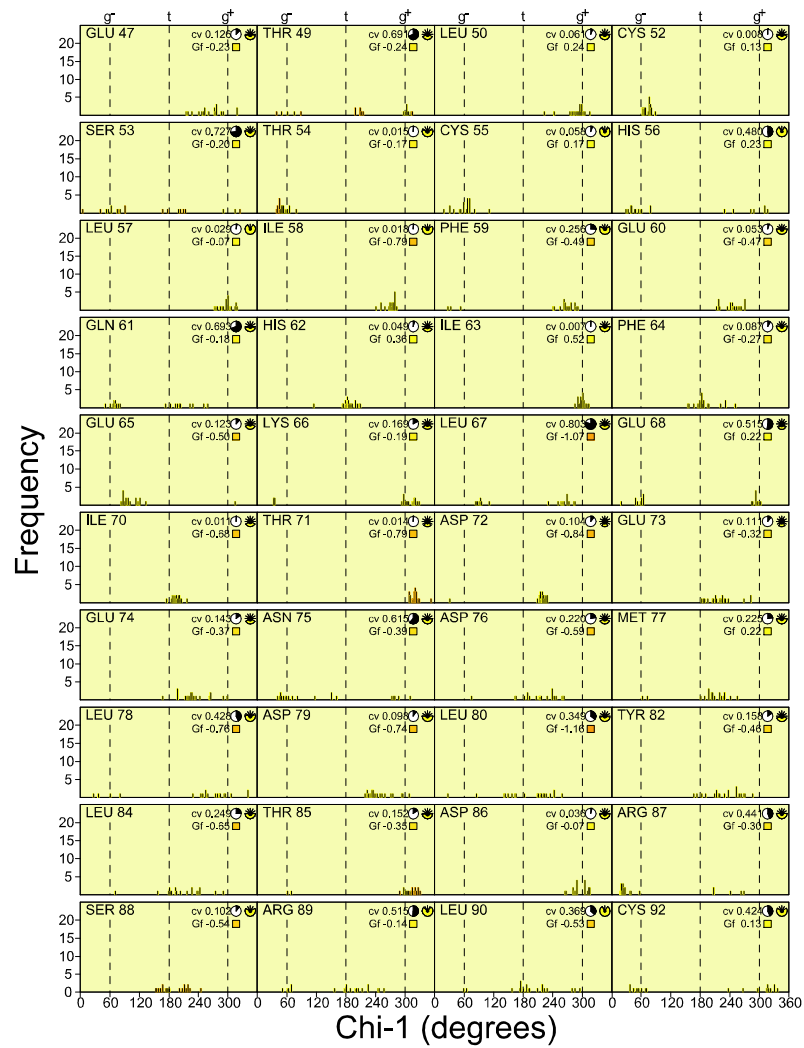


Abbildung 65: Verteilung der χ^1 -Diederwinkelseinstellungen für die Reste E47 bis C92 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

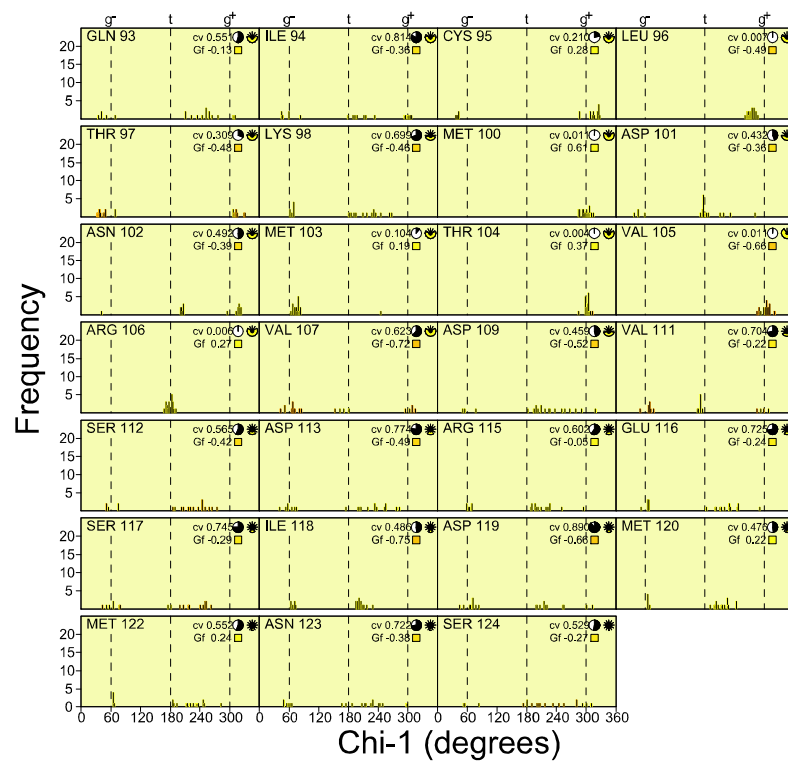


Abbildung 66: Verteilung der χ^1 -Diederwinkeleinstellungen für die Reste Q93 bis S124 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

A.2.2 Chi-2 Frequenzverteilung

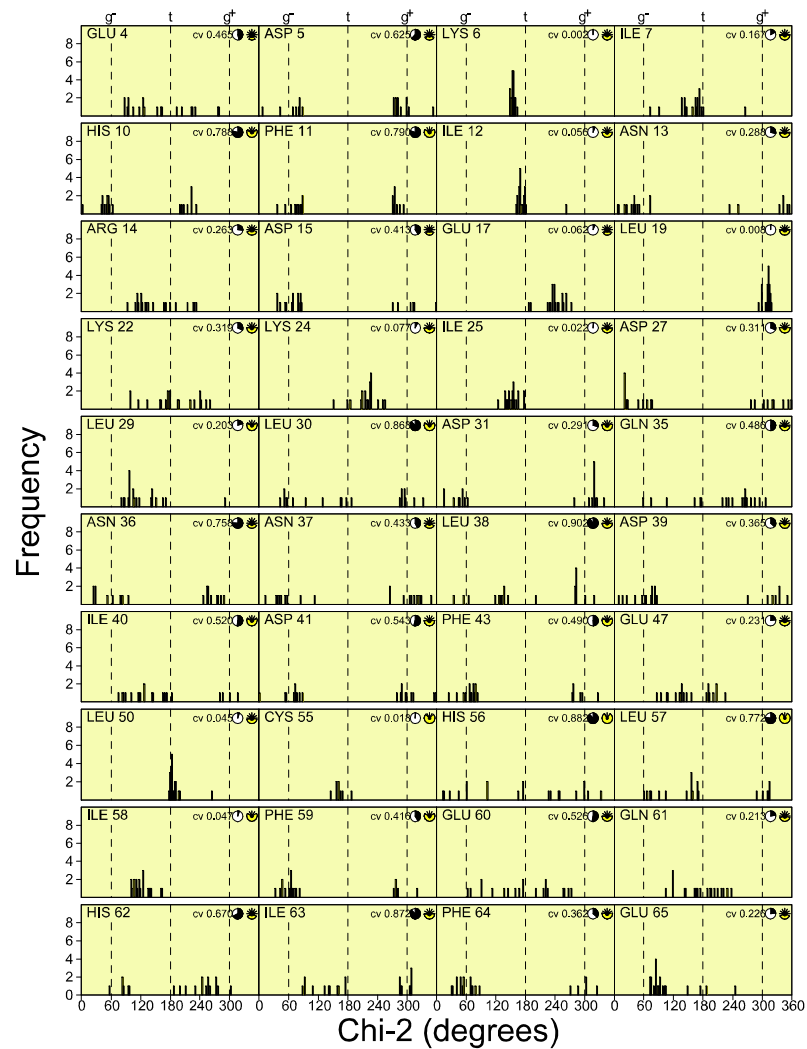


Abbildung 67: Verteilung der χ^2 -Diederwinklereinstellungen für die Reste E4 bis E65 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

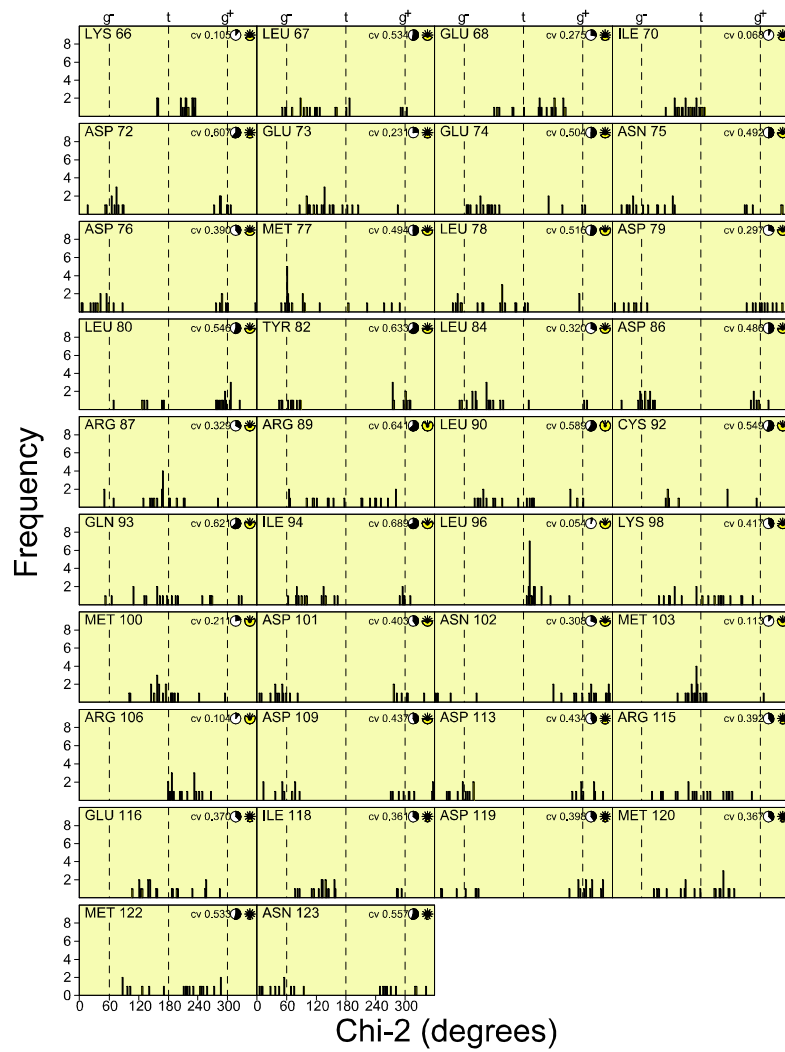


Abbildung 68: Verteilung der χ^2 -Diederwinklereinstellungen für die Reste K66 bis N123 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

A.2.3 Individuelle Ramachandran-Diagramme

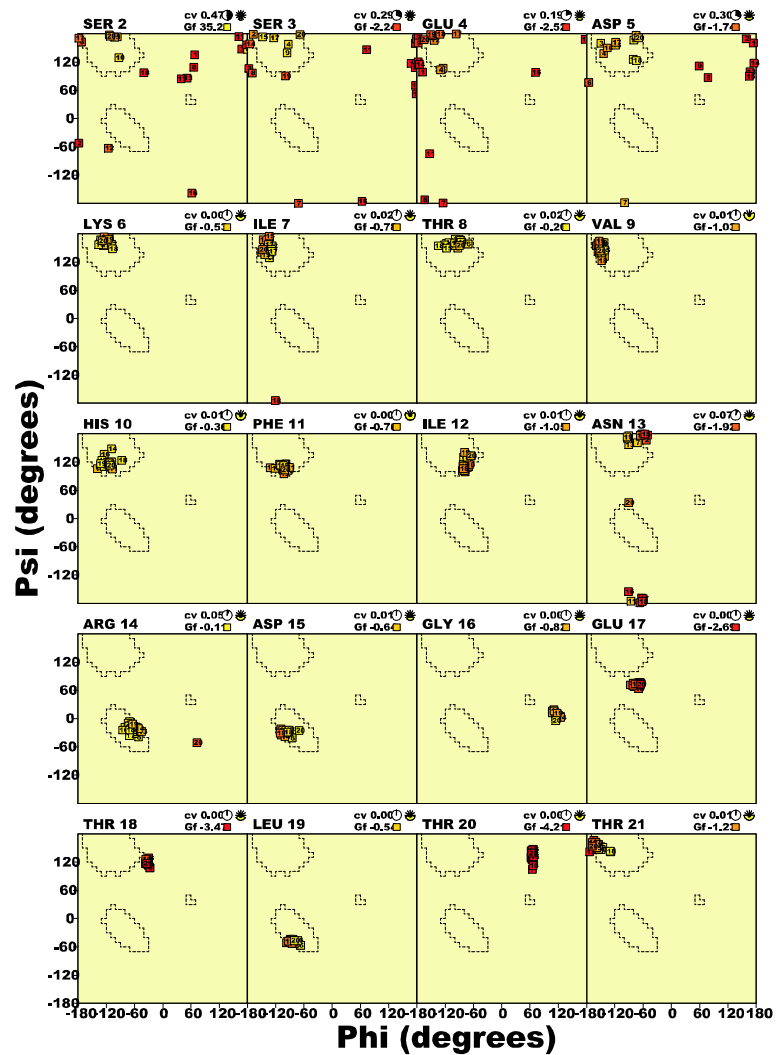


Abbildung 69: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste S2 bis T21 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

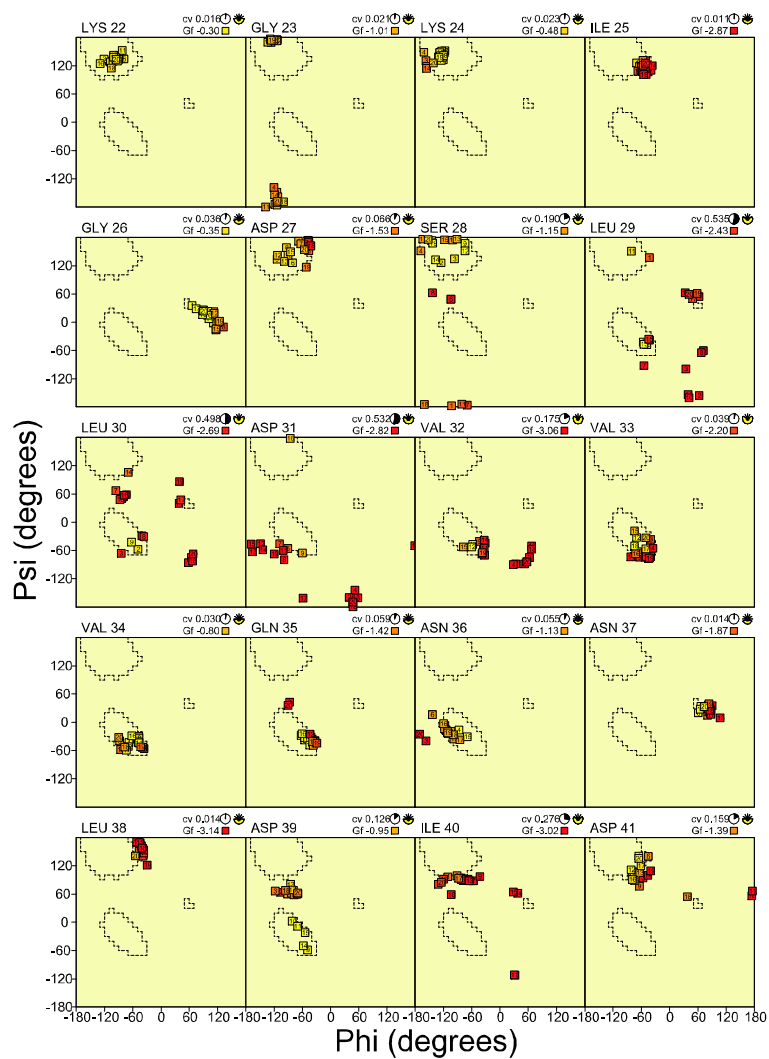


Abbildung 70: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste K22 bis D41 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

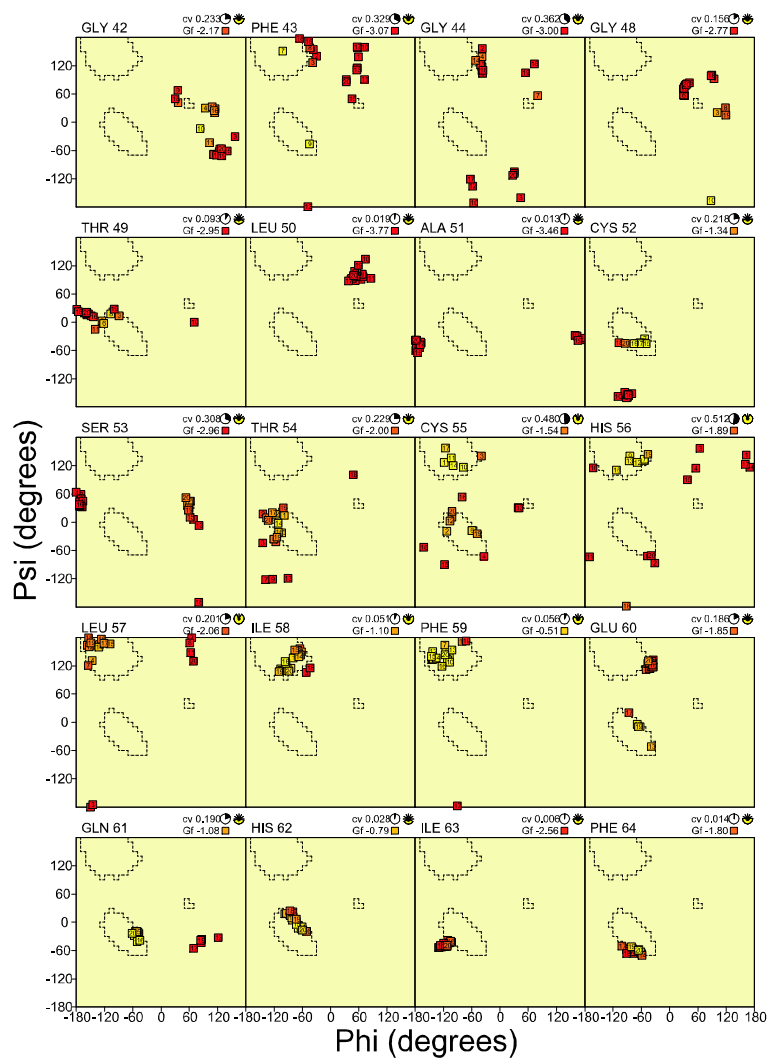


Abbildung 71: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste G42 bis F64 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

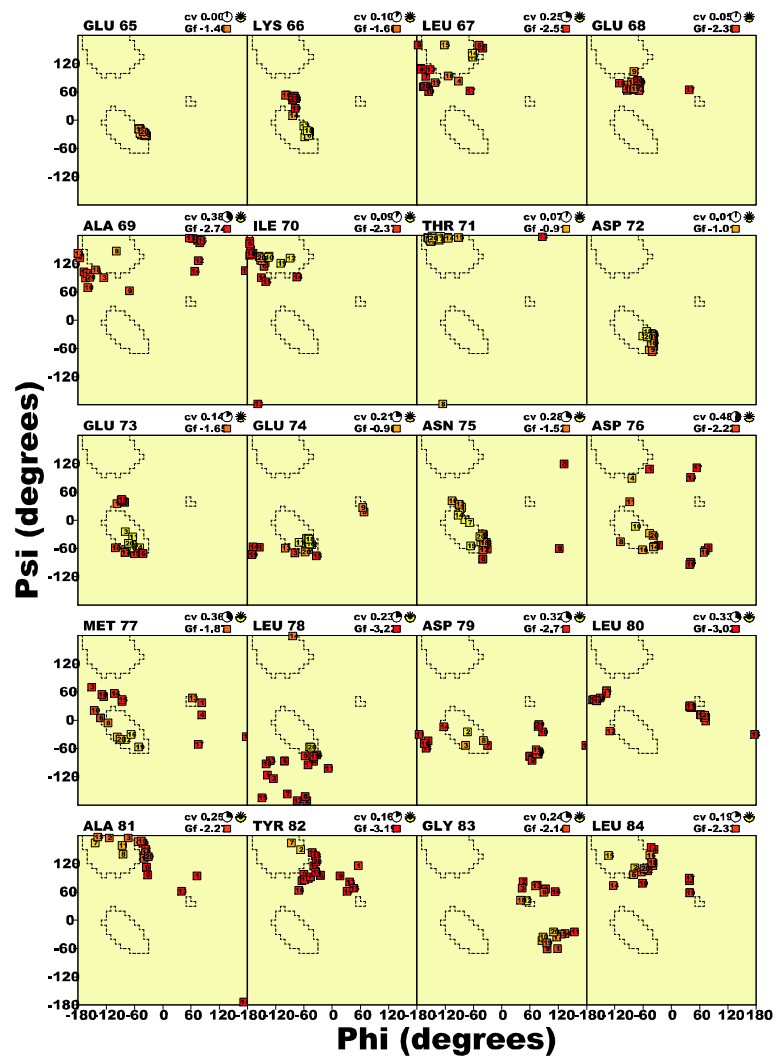


Abbildung 72: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste E65 bis L84 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

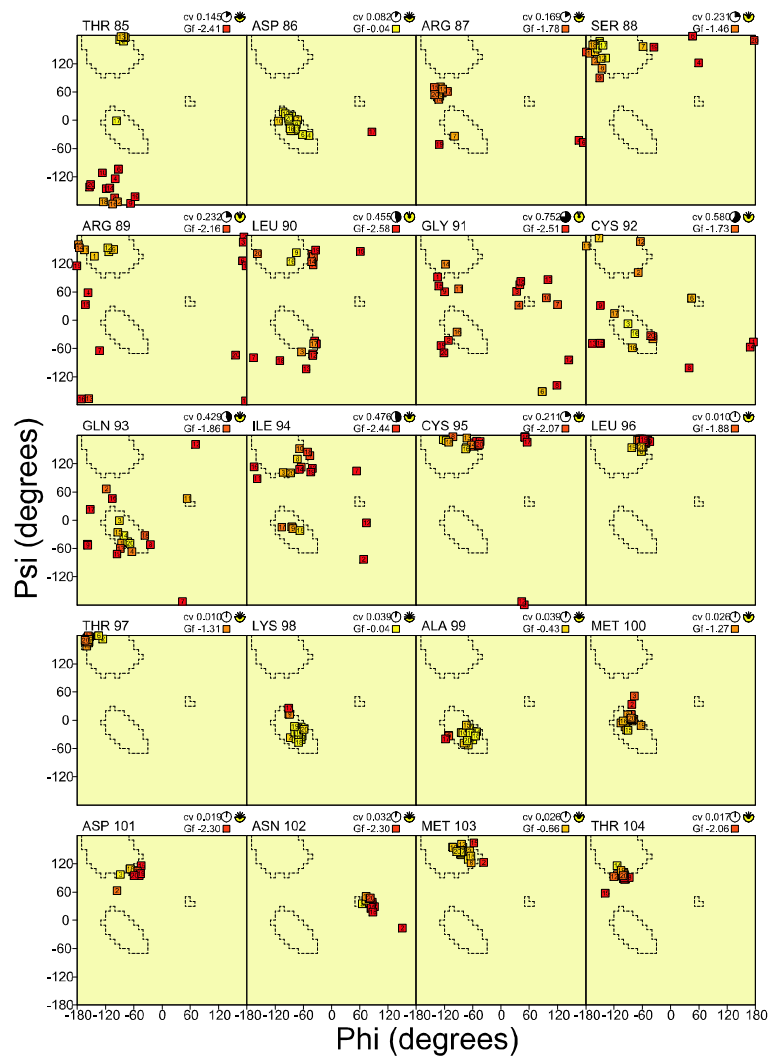


Abbildung 73: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste T85 bis T104 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

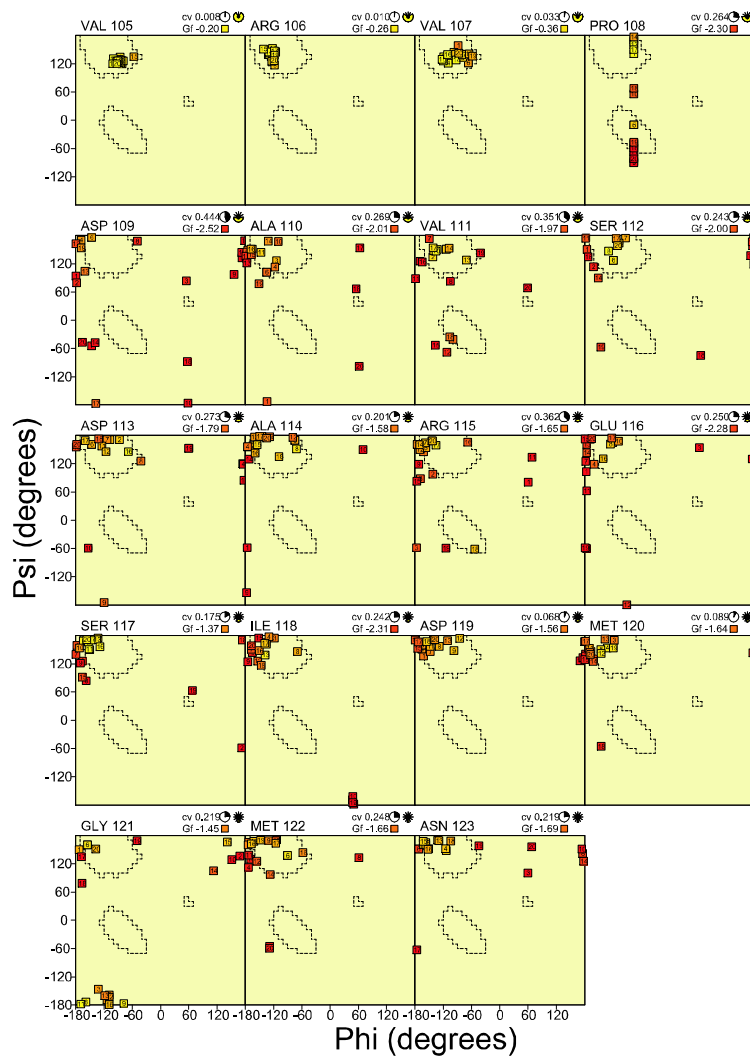


Abbildung 74: Individuelle Ramachandran-Diagramme für die Reste V105 bis N123 im Konformationsensemble des reduzierten Adrenodoxins.

A.3 Zuordnungstabelle des oxidierten Zustands

In den folgenden Tabellen sind die gefundenen Werte der chemischen Verschiebungen für den oxidierten Zustand des Rinder-Adrenodoxins aufgeführt. Die bei manchen Aminosäureresten alleine stehenden chemischen Verschiebung der Kohlenstoffkerne wurden mit Hilfe von indirekten Experimenten gefunden, das heißt diese wurden über die Peptidbindung detektiert ohne das die Protonen oder Amide der Aminosäure bekannt sind. Als Beispiexperiment kann hier das (H)CC(O)NH-TOCSY angeführt werden.

Bei den gefundenen Werten der chemischen Verschiebungen für die "Seitenkettenamide" wurden die Werte für die Seitenkettenamidkerne an die Stelle der entsprechenden Kohlenstoffkerne gesetzt. Somit wird bei dem Aminosäurerest Asparagin der $^{13}\text{C}^\delta$ -Kern in den $^{15}\text{N}^\delta$ -Kern überführt, das heißt an dieser Stelle in der Tabelle steht die chemische Verschiebung des Seitenkettenamides in der Spalte für die $^{13}\text{C}^\delta$ -Kerne. Bei dem Aminosäurerest Glutamin wurde ebenso verfahren ($^{13}\text{C}^\delta \rightarrow ^{15}\text{N}^\delta$).

AS	¹⁵ N	C'	¹ H ^N	¹³ C ^α	¹ H ^α	¹³ C ^β	¹ H ^β	¹³ C ^γ	¹ H ^γ	¹³ C ^δ	¹ H ^δ	¹³ C ^ε	¹ H ^ε
S1													
S2													
S3				58,05		62,81							
E4	121,20	175,95	8,39	56,25	4,24	29,35	2,01/1,86	35,91	2,37/2,22				
D5	120,73	175,15	8,25	53,76	4,54	40,11	3,03/2,59						
K6	118,92	175,95	7,88	54,72	4,89	34,71	1,59	24,81	1,45/1,17	28,78	1,66	41,72	2,8
I7	117,69	174,58	8,92	58,36	4,43	40,11	1,85	25,08/17,68	1,04/0,73/0,61	13,46	0,64		
T8	121,32	173,78	8,76	62,58	4,73	68,42	3,83	21,12	0,78				
V9	124,54	173,21	8,53	60,47	4,16	34,71	1,52	21,65/22,6	0,67/0,35				
H10	125,48	174,34	8,57	53,76	5,4	30,82	3,24/2,59						
F11	122,32	175,27	9,56	55,1	5,08	40,95	3,01/2,21						
I12	122,9	175,84	9,02	59,9	4,66	36,93	1,67	26,14/16,36	1,28/1,06/0,89	12,14	0,66		
N13	125,07	176,75	8,85	50,69	4,69	39,07	3,35/2,97			112,04	7,83/7,73		
R14	118,92	176,07	8,55	58,56	4,01	29,03	1,78	28,2	1,57	43,57	3,28		
D15	116,04	176,04	7,67	52,99	4,54	39,9	2,82/2,67						
G16	108,31	175,81	8,17	44,74	4,16/3,43								
E17	122,32	175,38	7,97	55,49	4,26	29,52	1,94	35,64	2,27				
T18	119,09	174,13	8,63	62,39	4,89	68,21	3,97	21,12	1,06				
L19	131,28	175,38	10,02	52,8	4,76	42,05	1,90/1,43	25,34	1,7	22,7	0,83		
T20	122,96	173,9	8,8	63,35	4,89	69,51	3,78	22,17	1,17				
T21	122,49	171,61	8,82	59,52	4,71	69,51	3,74	19,53	0,9				
K22	118,33	176,18	7,97	53,38	5,54	35,12	1,67/1,44	24,02		28,78		41,72	2,76
G23	107,14	170,73	8,81	43,4	4,58/3,2								
K24	121,91	175,95	8,85	54,53	4,62	32,98	1,59	24,02	1,38	28,51		41,57	2,95
I25	122,49	177,35	8,3	62,78	3,28	36,14	1,7	28,25/16,63	1,52/0,9	11,87	0,71		
G26	117,04	173,94	8,84	44,55	4,49/3,56								
D27	122,32	176,18	8,09	53,95	4,84	40,55	2,9/2,82						
S28	118,04	176,41	9,68	56,64	5,77	65,62	4,21/3,99						
L29	118,68	179,04	8,16	57,4	4,21	40,36	2,33/1,47	25,87	1,8	23,76	1,04/0,85		
L30	116,75	176,42	7,26	57,79	4,49	42,09	2,23/1,32	27,12	1,85	22,44	0,78/0,66		

AS	¹⁵ N	C'	¹ H ^N	¹³ C ^α	¹ H ^α	¹³ C ^β	¹ H ^β	¹³ C ^γ	¹ H ^γ	¹³ C ^δ	¹ H ^δ	¹³ C ^ε	¹ H ^ε
D31	120,73	178,01	7,87	57,4	4,31	39,45	2,76/2,49						
V32	117,16	178,13	7,75	65,85	3,58	31,39	2,28	23,49/22,7	0,85/1,18				
V33	120,97	177,78	7,42	66,61	3,04	31,25	2,11	22,97/20,32	0,56/0,18				
V34	118,33	180,87	8,46	65,65	3,7	31,9	2,13	21,65/20,59	0,9/1,09				
Q35	118,68	177,33	9,14	57,98	4,01	27,36	2,01	34,06	2,46/2,57			110,82	7,42/6,97
N36	112,29	172,87	7,17	52,8	4,77	38,6	2,7/2,51			113,05	7,63/6,95		
N37	117,16	174,47	7,83	53,57	4,31	36,44	2,93/2,59			112,24	7,51/6,74		
L38	115,52	177,67	7,78	54,91	4,9	41,19	1,29	26,14		21,91/25,08			
D39	122,84	174,47	8,55	52,99	4,46	38,6	2,74/2,43						
I40	123,78	175,61	7,59	59,52	4,12	37,74	1,29	25,34/18,48	0,9/0,63	12,66	0,01		
D41	127,77	177,9	8,53	56,25	4,35	40,76	2,64						
G42	113,7	173,78	8,99	45,7	4,01/3,73								
F43	12091	178,01	7,64	58,75	4,06	40,33	3,01/2,01		6,79/6,65				
G44													
A45													
C46													
E47													
G48													
T49													
L50													
A51													
C52													
S53													
T54													
C55													
H56													
L57	128,35	173,56	9,39	53,18	4,82	48,54	1,66	27,98	0,9	25,51/23,49			
I58	119,5	176,75	8,46	60,86	4,46	39,46	1,4	27,46/17,15	0,99/1,23/0,86	13,98	0,61		
F59	127,88	175,5	8,66	57,79	4,51	42,06	3,15/3,12		7,7/7,52/7,07				
E60	119,39	178,78	9,18	56,25	4,34	31,04	2,05/1,88	37,49	2,23				

AS	¹⁵ N	C'	¹ H ^N	¹³ C ^α	¹ H ^α	¹³ C ^β	¹ H ^β	¹³ C ^γ	¹ H ^γ	¹³ C ^δ	¹ H ^δ	¹³ C ^ε	¹ H ^ε
Q61	125,3	176,39	9,58	59,71	3,74	28,44	2,22/2,12	31,95	2,47/2,33			112,44	7,97/6,95
H62	112,82	176,64	8,42	58,36	4,43	28,86	3,19/3,09						
I63	119,56	177,44	6,3	59,32	3,81	35,57	2,16	25,34/17,15	1,38/1,06/0,97	8,44			
F64	120,26	177,21	8,7	61,05	3,51	39,68	3,09/2,86						
E65	113,23	176,3	7,97	57,4	4,01	29,09	2,05	35,38	2,5				
K66	116,92	176,3	7,43	54,34	4,35	32,52	1,98/1,67	24,29	1,6/1,37	28,25	1,66	41,72	3,03
L67	119,27	177,1	6,76	53,95	4,01	40,55	1,21	24,55	1,71	24,99/21,38	0,42/0,01		
E68	121,96	175,73	9,05	56,25	3,89	29,09	1,96/1,84	36,17	2,34/2,26				
A69	123,9	178,13	8,21	52,23	3,89	18,06	1,25						
I70	124,43	175,84	8,37	62,39	3,91	38,6	28,51/15,83	1,29/0,86	14,25				
T71	118,27	175,5	7,91	60,28	4,46	71,45	4,62	21,12	1,18				
D72	122,49	177,55	8,96	57,21	4,24	39,25	2,74/2,7						
E73	117,39	179,04	8,95	60,09	3,97	28,44	1,94	36,97	2,47/2,28				
E74	119,5	177,67	7,52	58,75	3,89	28,23	2,01	35,64	2,96				
N75	119,56	176,87	8,56	56,64	4,3	38,38	2,93/2,63			113,46	7,63/6,72		
D76	117,33	178,35	8,32	56,64	4,23	39,8	2,67/2,51						
M77	116,1	179,61	7,06	55,1	4,5	33,2		32,49		19,63			
L78	123,55	178,13	8,79	57,21	3,78	40,92	1,75	26,14	1,61	24,55/22,97	0,52/0,76		
D79	115,87	177,21	7,85	56,25	4,38	40,55	2,67/2,44						
L80	116,63	177,1	7,1	53,38	4,33	41,41	1,76/1,63	26,14	1,38	25,08/21,91	0,85/0,47		
A81	124,02	176,66	7,85	51,84	4,16	18,75	1,21						
Y82	122,43	176,56	8,25	57,4	4,43	38,47	2,97/2,82						
G83	112,65	174,56	8,34	45,89	4,05/3,58								
L84	118,51	176,41	7,32	56,31	3,81	42,06	1,52	25,87	1,52	24,02/23,49	0,8		
T85	116,69	174,47	8,77	59,52	4,3	73,1	4,85	21,38	1,18				
D86	117,74	175,61	8,56	54,14	4,39	38,91	2,67/2,63						
R87	119,57	175	8,07	54,3	2,87	29,64	2,05/1,95	27,19	1,18/0,8	42,78	3,04/3,14		
S88	119,56	174,01	6,88	60,28	5,38	64,32	3,85/3,78						
R89	117,28	175,5	9,17	52,23	4,84	33,63	2,02/1,68						
L90													

AS	¹⁵ N	C'	¹ H ^N	¹³ C ^α	¹ H ^α	¹³ C ^β	¹ H ^β	¹³ C ^γ	¹ H ^γ	¹³ C ^δ	¹ H ^δ	¹³ C ^ε	¹ H ^ε
G91													
C92													
Q93													
I94													
C95	124,54	174,65	7,97	52,99	4,61	40,14	1,98/1,06						
L96	121,55	178,3	9,03	55,49	4,62	41,57	1,98/1,06	26,4	1,77	24,29/24,29	0,72/0,66		
T97	113,47	174,81	7,72	58,56	4,65	71,02	4,54	21,12	1,16				
K98	120,56	178,13	9,04	58,88	3,81	31,25	1,88	24,55	1,47/1,37	28,51	1,64	41,46	2,95
A99	119,91	177,67	7,86	53,18	4,12	17,89	1,33						
M100	115,58	173,9	7,62	56,06	4,01	31,47	2,44/1,99	33,53					
D101	118,27	177,55	7,27	56,25	4,39	40,34	2,66/2,47						
N102	122,96	174,01	10,04	55,29	3,81	37,3	3,16/2,97						
M103	118,1	172,87	8,43	56,06	4,62	30,82	2,17	32,48	2,95			20,4	2,01
T104	116,69	175,5	8,57	61,24	5,35	69,72	3,66	21,12	0,98				
V105	122,73	172,98	9,11	57,79	4,5	33,63	1,25	19,0/22,7	0,04/0,0				
R106	121,14	174,47	8,44	53,95	4,81	32,98	1,63/1,45	27,48	1,29	43,04	2,99		
V107	124,6	177,56	8,35	59,32	4,45	31,59	2,23		0,9/1,18				
P108		175,69		62,2	4,24	31,68	1,98/1,9	26,14		50,7	3,65		
D109	120,03	175,15	8,47	54,34	4,39	40,76	2,74/2,67						
A110	122,28	176,75	8,16	51,07	4,3	19,37	1,17						
V111	118,11	174,81	7,85	61,43	3,85	32,11	1,82	19,8/20,06	0,78				
S112	118,68	178,24	8,12	57,4	4,14	63,24	3,83/3,79						
D113	123,19	175,73	8,2	53,51	4,18	40,55	2,97/2,81						
A114	124,84		8,23	52,0	4,26	18,5	1,34						
R115	119,97		8,28	55,67	4,26	29,96	1,8/1,64	26,4		42,78			
E116	121,85		8,37	55,89	4,26	29,52	2,03/1,92	35,64	2,23				
S117	116,69		8,28	57,62	4,8	63,02	3,79						
I118	122,28		8,05	60,64	4,18	38,17	1,88	26,66/16,89	0,9	12,66			
D119	123,84		8,35	53,73	4,61	40,55	2,74/2,58						
M120													

	^{15}N	C'	$^1\text{H}^{\text{N}}$	$^{13}\text{C}^{\alpha}$	$^1\text{H}^{\alpha}$	$^{13}\text{C}^{\beta}$	$^1\text{H}^{\beta}$	$^{13}\text{C}^{\gamma}$	$^1\text{H}^{\gamma}$	$^{13}\text{C}^{\delta}$	$^1\text{H}^{\delta}$	$^{13}\text{C}^{\epsilon}$	$^1\text{H}^{\epsilon}$
AS													
G121	109,36	173,95	8,49	45,13	4,5								
M122	119,62	175,05	8,11	54,85	4,24	29,31	2,01/1,86	31,42	2,18				
N123	125,07	179,27	8,03	54,34		39,9							
S124													
S125													
K126													
I127													
E128													

A.4 Zuordnungstabelle des reduzierten Zustands

In den folgenden Tabellen sind die gefundenen Werte der chemischen Verschiebungen für den reduzierten Zustand des Rinder-Adrenodoxins aufgeführt. Die bei manchen Aminosäureresten alleine stehenden chemischen Verschiebung der Kohlenstoffkerne wurden mit Hilfe von indirekten Experimenten gefunden, das heißt diese wurden über die Peptidbindung detektiert ohne das die Protonen oder Amide der Aminosäure bekannt sind. Als Beispielexperiment kann hier das (H)CC(O)NH-TOCSY angeführt werden.

Bei den gefundenen Werten der chemischen Verschiebungen für die "Seitenkettenamide" wurden die Werte für die Seitenkettenamidkerne an die Stelle der entsprechenden Kohlenstoffkerne gesetzt. Somit wird bei dem Aminosäurerest Asparagin der $^{13}\text{C}^\delta$ -Kern in den $^{15}\text{N}^\delta$ -Kern überführt, das heißt an dieser Stelle in der Tabelle steht die chemische Verschiebung des Seitenkettenamides in der Spalte für die $^{13}\text{C}^\delta$ -Kerne. Bei dem Aminosäurerest Glutamin wurde ebenso verfahren ($^{13}\text{C}^\delta \rightarrow ^{15}\text{N}^\delta$).

AS	¹⁵ N	C'	¹ H ^N	¹³ C ^α	¹ H ^α	¹³ C ^β	¹ H ^β	¹³ C ^γ	¹ H ^γ	¹³ C ^δ	¹ H ^δ	¹³ C ^ε	¹ H ^ε
S1													
S2													
S3	117,65	177,68	8,32	58,13	4,45	62,93	3,88						
E4	121,71	175,84	56,08	4,30	29,57	2,08/1,91	36,26						
D5	120,60	176,54	53,79	4,58	40,31	2,67							
K6	118,87	175,66	7,87	54,71	4,91	34,83	1,66	25,23		28,99		42,02	
I7	117,96	177,07	8,92	58,13	4,47	40,08	1,87	25,23/17,69		13,45			
T8	121,00	177,86	8,73	62,25	4,75	68,65	3,84	21,72					
V9	124,45	177,86	8,46	60,42	4,18	34,6	1,62	21,47/22,72					
H10	126,18	177,60	8,74	53,56	5,50	30,48	3,34/2,69						
F11	122,02	176,73	9,59	55,16	5,21	41,00	3,00/2,29						
I12	122,93	175,93	9,10	59,96	4,62	36,88	1,72	26,48/16,71		12,70			
N13	125,06	174,96	8,92	50,59	4,64	38,25	3,34/2,96						
R14	118,36	175,58	8,43	58,36	4,09	29,11	1,91/1,74	28,24		43,78			
D15	115,63	175,05	7,65	52,65	4,60	40,08	2,86/2,71						
G16	108,22	176,45	8,15	44,65	4,22/3,49								
E17	122,12	176,13	7,95	55,16	4,30	29,80	1,99	36,01					
T18	118,97	177,42	8,66	62,25	4,98	68,42	3,99	21,47					
L19	130,85	176,02	9,95	52,65	4,81	42,37	1,87/1,47	25,48		22,97			
T20	122,42	178,12	8,89	63,16	4,87	69,56	3,91	22,47					
T21	121,10	179,79	8,69	59,51	4,68	70,47	3,84	20,72					
K22	117,55	175,23	7,93	53,34	5,56	35,28	1,72/1,51	24,48		28,99		42,02	
G23	107,30	175,31	8,79	43,28	4,60/3,30								
K24	121,81	175,66	8,84	54,25	4,68	33,00	1,66	24,23		28,99		41,52	
I25	122,42	174,35	8,31	62,70	3,32	36,65	1,74	28,49/16,69		12,45			
G26	116,44	174,35	8,73	44,42	4,45/3,86								
D27	123,13	175,75	8,21	54,02	4,75	40,54	2,96/2,86						
S28	117,86	175,58	9,55	56,53		65,22							
L29													
L30													

AS	¹⁵ N	C'	¹ H ^N	¹³ C ^α	¹ H ^α	¹³ C ^β	¹ H ^β	¹³ C ^γ	¹ H ^γ	¹³ C ^δ	¹ H ^δ	¹³ C ^ε	¹ H ^ε
D31		174,96		57,81	4,35	38,94	3,30/2,58						
V32	117,96	173,21	7,89	65,90	3,65	31,40	2,39	22,72/23,73					
V33	121,51	173,82	7,62	66,59	3,09	31,40	2,29	20,72/23,22					
V34	118,77	170,75	8,47	65,68	3,74	31,86	2,16	20,72/22,22					
Q35	118,77	174,35	9,20	57,68	4,07	27,51	2,10	34,25					
N36	112,48	178,91	7,24	52,88	4,75	38,71	2,77/2,54						
N37	116,34	177,33	7,85	53,34	4,37	36,65	2,98/2,65						
L38	115,32	174,44	7,63	55,16	3,97	41,00	1,34/0,92	26,48		21,97/24,98			
D39	121,71	177,33	8,55	52,88	4,41	39,17	2,79/2,43						
I40	123,54	176,02	7,66	59,51	4,05	37,80	1,34	25,48/18,71		12,95			
D41	128,21	173,91	8,70	56,31	4,28	40,77	2,60/2,48						
G42	114,20	173,91	8,88	44,88	3,91/3,55								
F43	119,48		7,38	58,59		41,00							
G44													
A45													
C46													
E47													
G48													
T49													
L50													
A51													
C52													
S53													
T54													
C55													
H56													
L57	123,35	178,39	9,56	53,34	4,81	48,99	1,68/1,01	36,26		28,49/23,98			
I58	118,87	175,31	7,99	61,32	4,51	40,01	1,53	27,74/17,46		14,20			
F59	127,52	176,10	8,72	58,31	4,56	42,52	3,19						
E60	119,18	172,94	9,13	56,56	4,37	31,24	2,33/1,91	37,76					

AS	¹⁵ N	C'	¹ H ^N	¹³ C ^α	¹ H ^α	¹³ C ^β	¹ H ^β	¹³ C ^γ	¹ H ^γ	¹³ C ^δ	¹ H ^δ	¹³ C ^ε	¹ H ^ε
Q61	125,35	175,14	9,56	60,07	3,80	27,74	2,16	32,25					
H62	112,78	174,96	8,50	58,81	4,47	28,74	3,23/3,11						
I63	119,28	174,26	6,30	59,82	3,91	36,01	2,20	25,73/17,46		8,94			
F64	120,29	174,53	8,74	61,57	3,59	40,02	3,15/2,94						
E65	113,09	175,31	7,96	57,22	4,05	29,34	2,12	36,01					
K66	116,94	175,40	7,44	54,25	4,41	32,54	2,01/1,72	24,73		28,74		42,02	
L67	119,48	174,52	6,72	53,79	4,05	41,00	1,26	25,23		21,97			
E68	122,02	175,93	8,93	56,08	3,93	29,11	1,95	36,26					
A69	124,66	173,38	8,23	51,96	3,95	17,92	1,30						
I70	125,27	176,02	8,43	62,25	3,84	38,94	1,49	29,24/15,71		14,95			
T71	118,67	176,28	8,18	60,19	4,51	71,39	4,72	21,47					
D72	122,53	174,17	8,98	57,22	4,27	39,62	2,77/2,52						
E73	116,94	172,24	8,92	59,73	4,05	28,20	1,95	37,01					
E74	119,48	172,24	7,69	58,24	4,03	28,77	2,01	36,26					
N75	119,37	174,96	8,73	56,76	4,62	39,03	2,75						
D76	117,25	177,68	8,35	56,53		39,85							
M77													
L78	123,54	177,24	8,80	57,22	3,76	41,77	1,78/1,66	26,48		24,73/24,23			
D79	114,10	174,44	7,49	56,08	4,41	40,77	2,69/2,52						
L80	117,86	174,26	7,48	53,56	4,35	41,00	2,04/1,64	25,48		22,22			
A81	124,25	174,44	7,89	51,51	4,45	18,83	1,24						
Y82	122,22	174,96	8,27	58,36	4,14	38,03	2,81/2,69						
G83	114,00	174,96	7,91	46,25	3,46								
L84	118,87	175,23	7,18	56,31	3,74	42,77	1,51/1,43	25,98		23,73/24,48			
T85	116,84	177,16	8,78	59,28	4,37	73,90	4,93	21,72					
D86	117,45	175,93	8,54	54,02	4,45	39,40	2,71						
R87	119,79	176,72	8,18	54,02	2,90	29,34	2,10/1,22	27,48		43,02			
S88	119,38	177,77	6,87	59,96	5,48	64,76	4,09/3,88						
R89	117,64	177,77	9,14	52,48		33,86							
L90													

AS	¹⁵ N	C'	¹ H ^N	¹³ C ^α	¹ H ^α	¹³ C ^β	¹ H ^β	¹³ C ^γ	¹ H ^γ	¹³ C ^δ	¹ H ^δ	¹³ C ^ε	¹ H ^ε
G91													
C92													
Q93													
I94													
C95	123,13	176,89	7,99	56,53	5,00	28,66	2,69/2,37						
L96	120,39	173,29	8,94	55,16	4,66	41,68	2,01/1,09	26,48		24,48/21,72			
T97	113,29	176,89	7,71	58,36	4,62	71,39	4,55	21,47					
K98	120,39	173,56	9,03	59,06	3,91	31,75	1,87	24,98		28,74		42,02	
A99	119,79	173,91	7,85	53,80	4,18	18,21	1,38						
M100	115,52	177,68	7,59	56,31	4,07	32,50	2,50/2,04	33,50				18,27	
D101	118,06	174,17	7,29	56,81	4,43	40,77	2,77						
N102	122,53	177,60	9,97	55,56	3,88	37,76	3,23/3,04						
M103	118,06	178,74	8,41	55,85	4,64	30,94	2,22	32,75					
T104	116,48	176,45	8,65	61,11	5,35	69,79	3,76	21,47					
V105	123,13	178,74	9,06	57,91	4,54	33,46	1,36	19,72/22,97					
R106	122,42	177,42	8,79	54,02	4,77	32,31	1,68/1,49	27,99		43,27			
V107	126,08	177,95	8,37	59,51		32,31							
P108		175,49		62,25	4,45	32,31	2,41/2,14	26,98		52,05			
D109	118,97	178,03	8,96	56,53	4,18	40,77	2,75/2,67						
A110	116,64	177,51	7,25	49,68	4,22	19,74	0,48						
V111	109,33	177,51	7,81	57,91	4,58	34,60	1,68	18,21/21,22					
S112	117,05	179,00	8,49	56,08	4,45	63,85	3,74/3,55						
D113	126,38	174,08	8,73	52,19	4,26	39,62	1,91						
A114	124,85	172,77	8,24	54,02	4,24	19,06	1,64						
R115	116,74	173,73	8,89	57,22	4,24	29,57	2,08	26,23		44,28			
E116	117,45	175,58	7,95	55,85	4,33	29,57	2,18/2,04	36,26					
S117	115,42	177,24	7,94	57,68	4,37	63,16	4,49/3,91						
I118	122,22	176,01	8,00	60,65	4,18	38,25	1,89	26,98/17,21		12,95			
D119	123,74	175,40	8,36	53,79	4,62	40,54	2,75/2,62						
M120	121,81	174,79	8,38	55,16	4,47	31,86	2,16/2,01	30,74				21,97	

AS	^{15}N	C'	$^1\text{H}^{\text{N}}$	$^{13}\text{C}^{\alpha}$	$^1\text{H}^{\alpha}$	$^{13}\text{C}^{\beta}$	$^1\text{H}^{\beta}$	$^{13}\text{C}^{\gamma}$	$^1\text{H}^{\gamma}$	$^{13}\text{C}^{\delta}$	$^1\text{H}^{\delta}$	$^{13}\text{C}^{\epsilon}$	$^1\text{H}^{\epsilon}$
G121	109,23	174,79	8,49	45,11	3,95								
M122	119,58	176,63	8,15	55,16	4,51	32,08	2,12/1,97	31,75				24,38	
N123	124,96	172,24	8,03	54,48		39,85							
S124													
S125													
K126													
I127													
E128													

A.5 Graphen für die T_1 -Relaxationsraten des red. Adrenodoxins

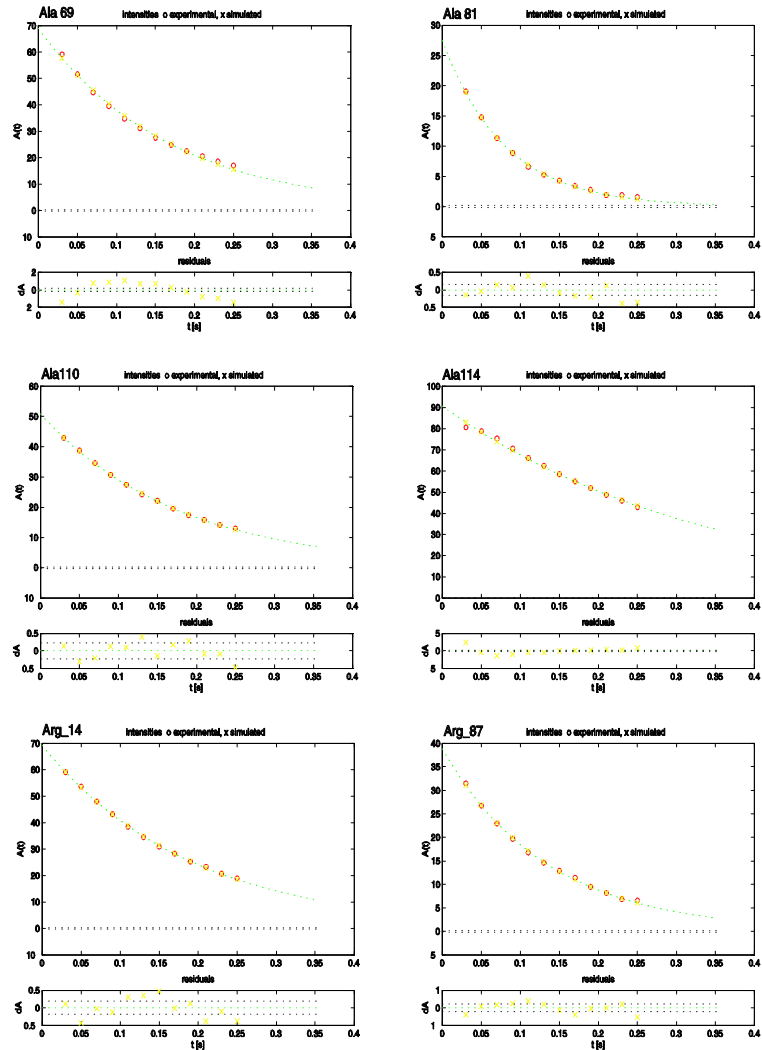


Abbildung 75: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren A69, A81, A110, A114, R14 und R87.

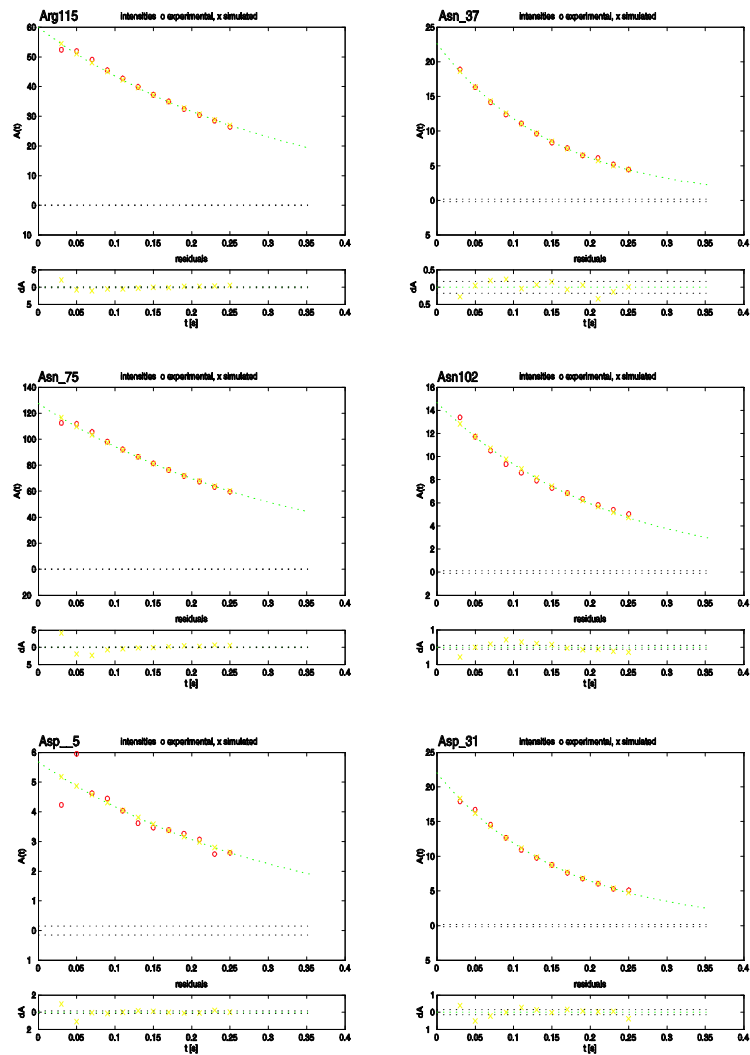


Abbildung 76: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren R115, N37, N75, N102, D5 und D31.

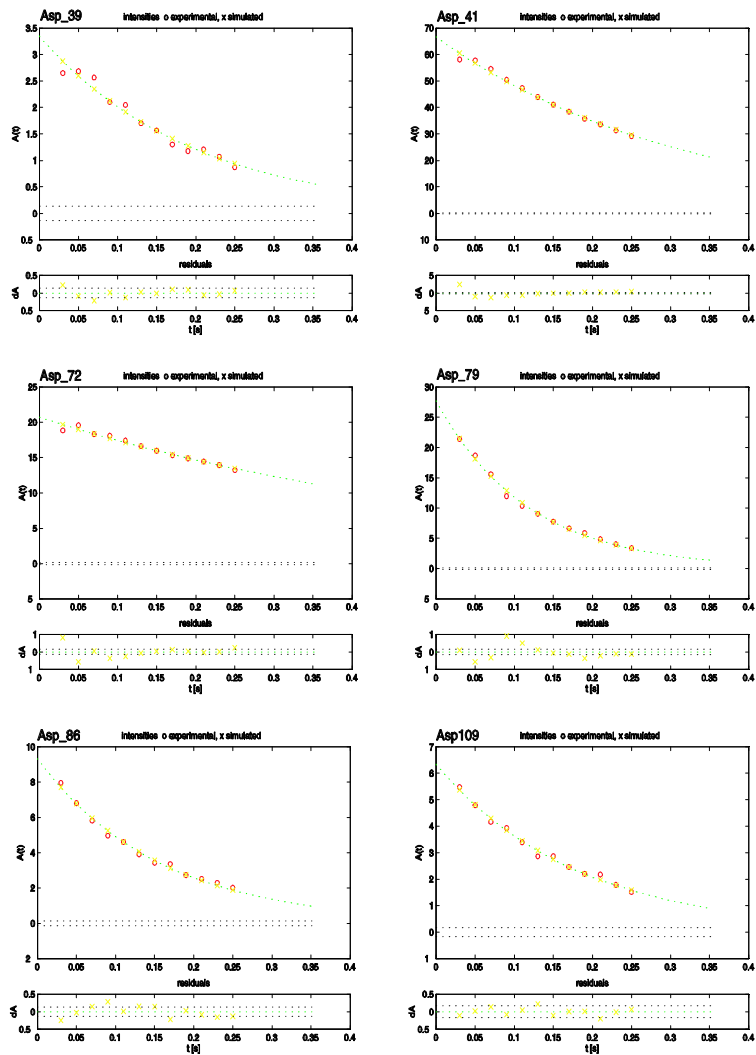


Abbildung 77: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren D39, D41, D72, D79, D86 und D109.

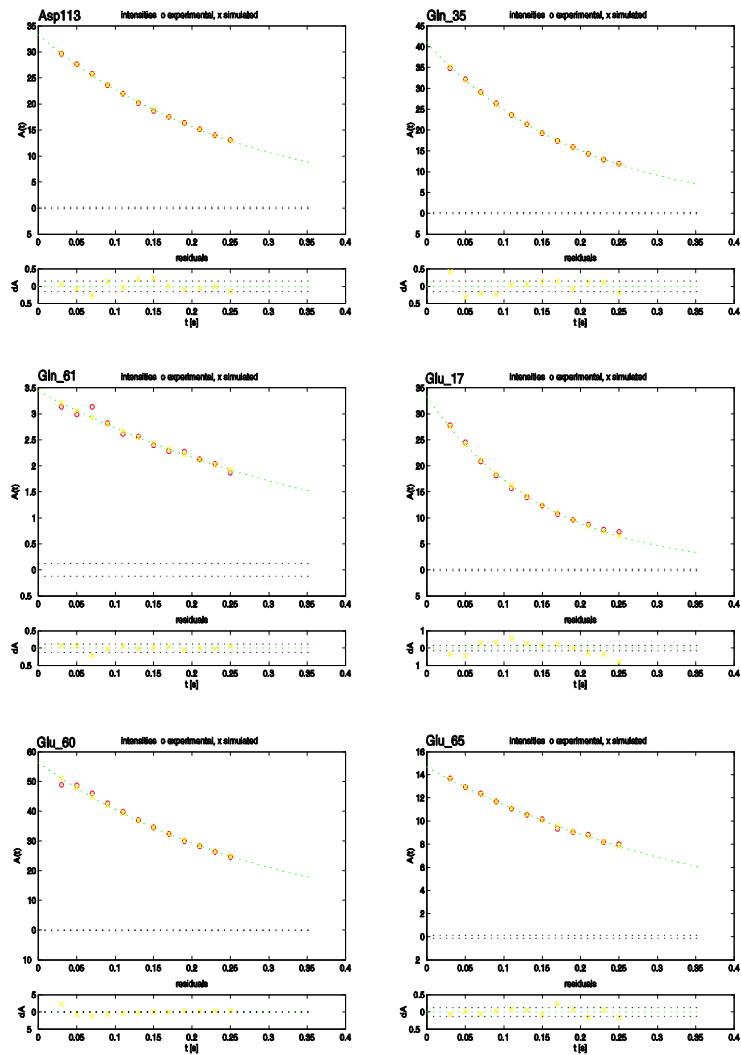


Abbildung 78: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren D113, Q35, Q61, E17, E60 und E65.

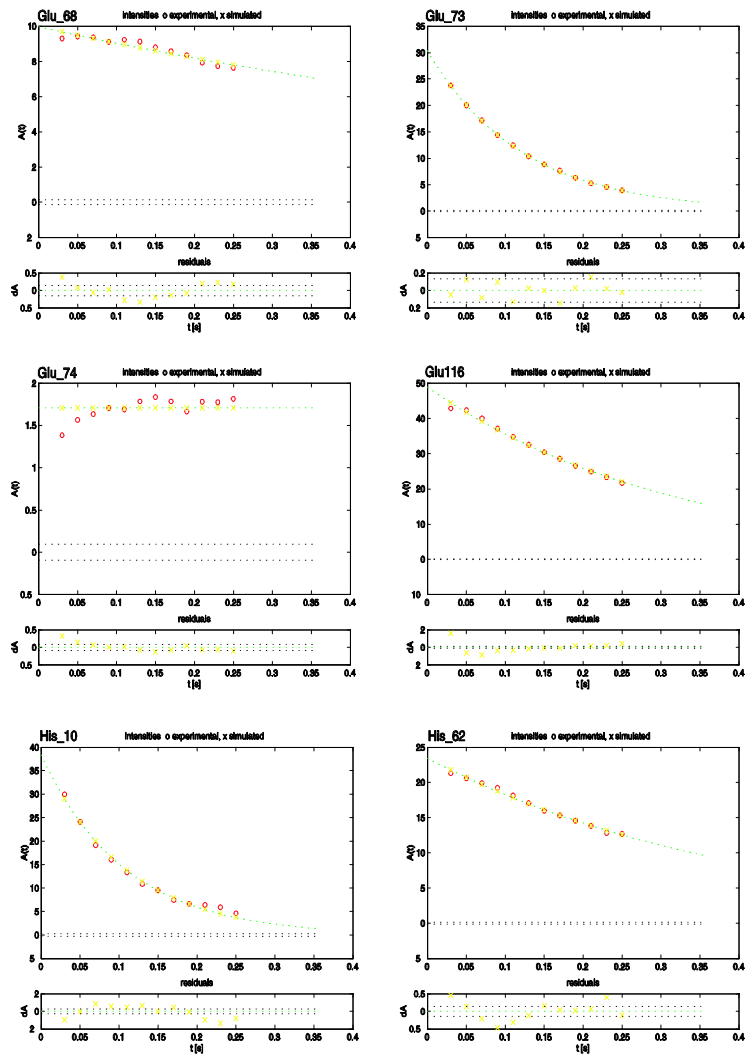


Abbildung 79: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren E68, E73, E74, E116, H10 und H62.

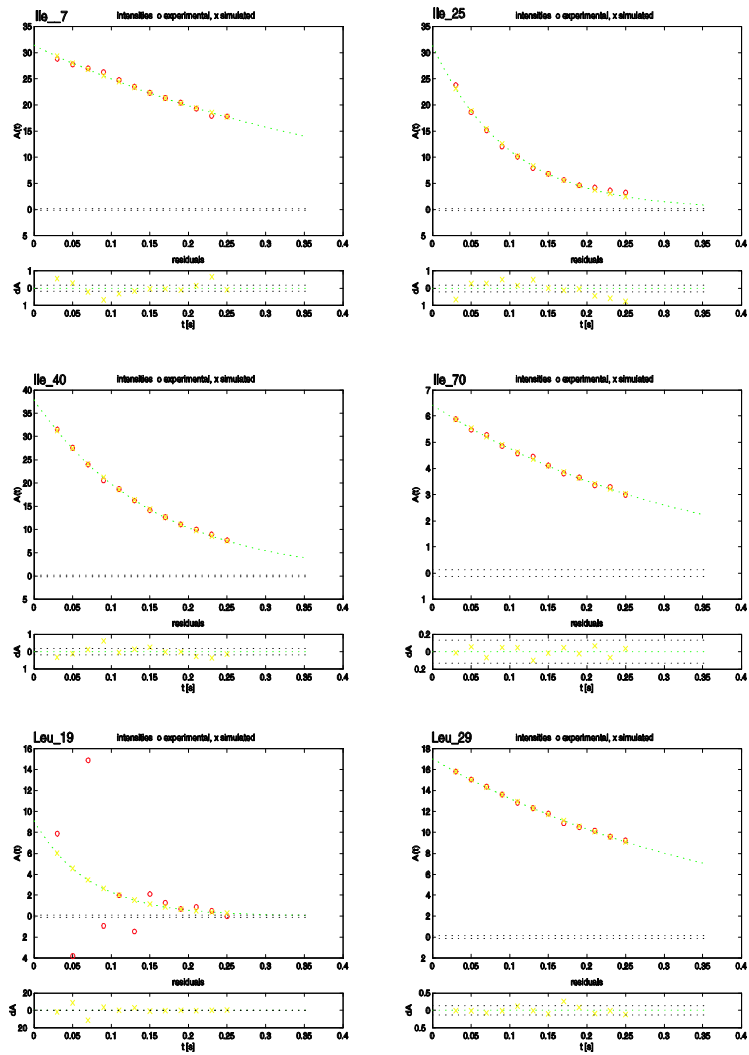


Abbildung 80: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren I7, I25, I40, I70, L19 und L29.

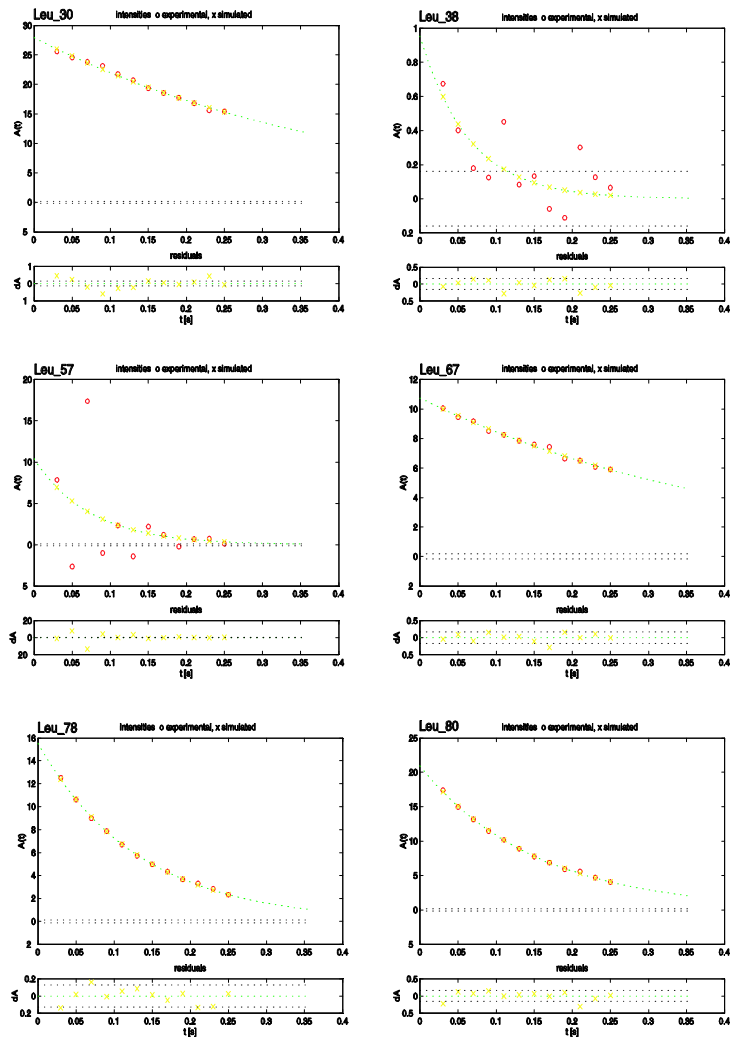


Abbildung 81: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren L30, L38, L57, L67, L78 und L80.

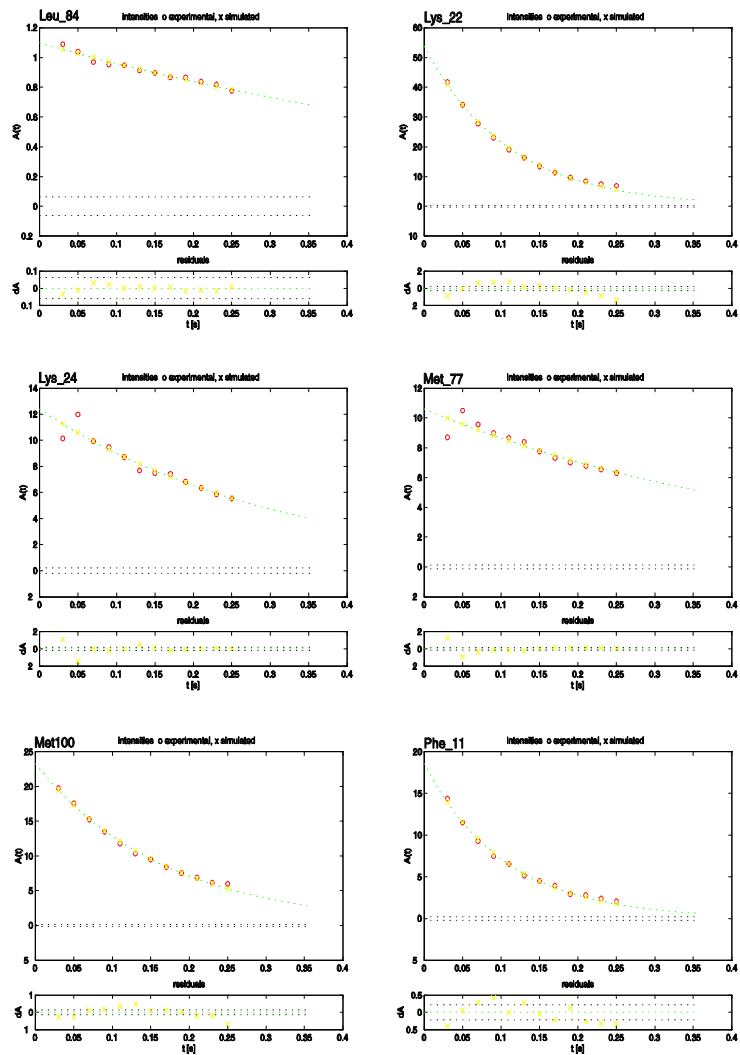


Abbildung 82: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren L84, K22, K24, M77, M100 und F11.

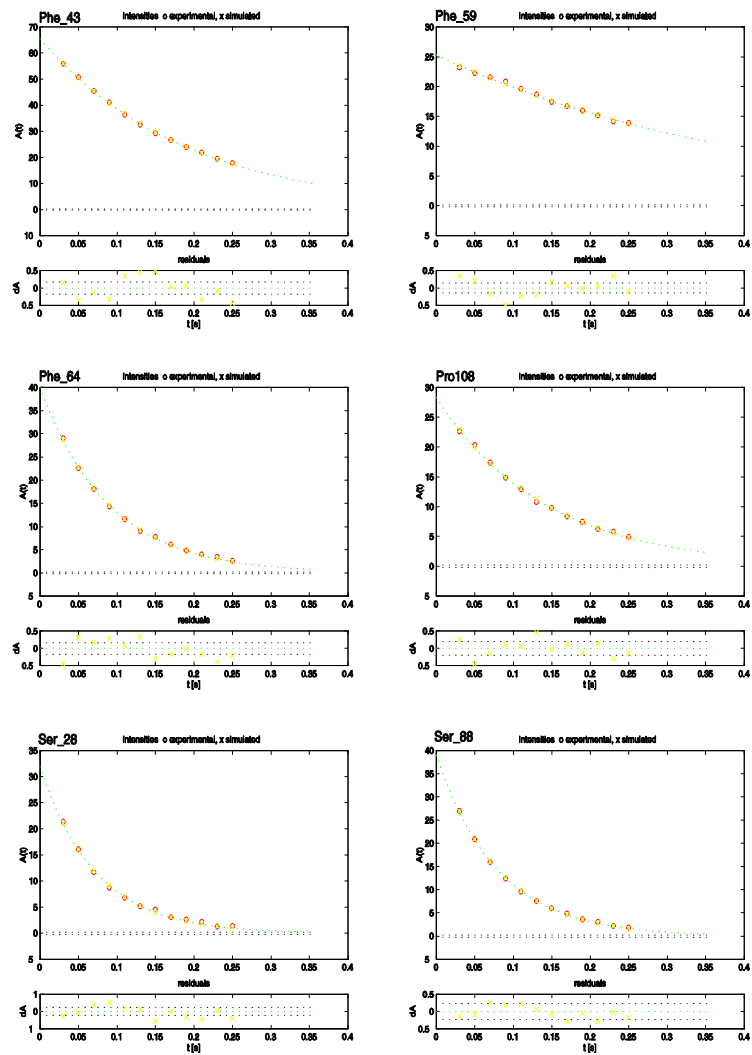


Abbildung 83: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren F43, F59, F64, P108, S28 und S88.

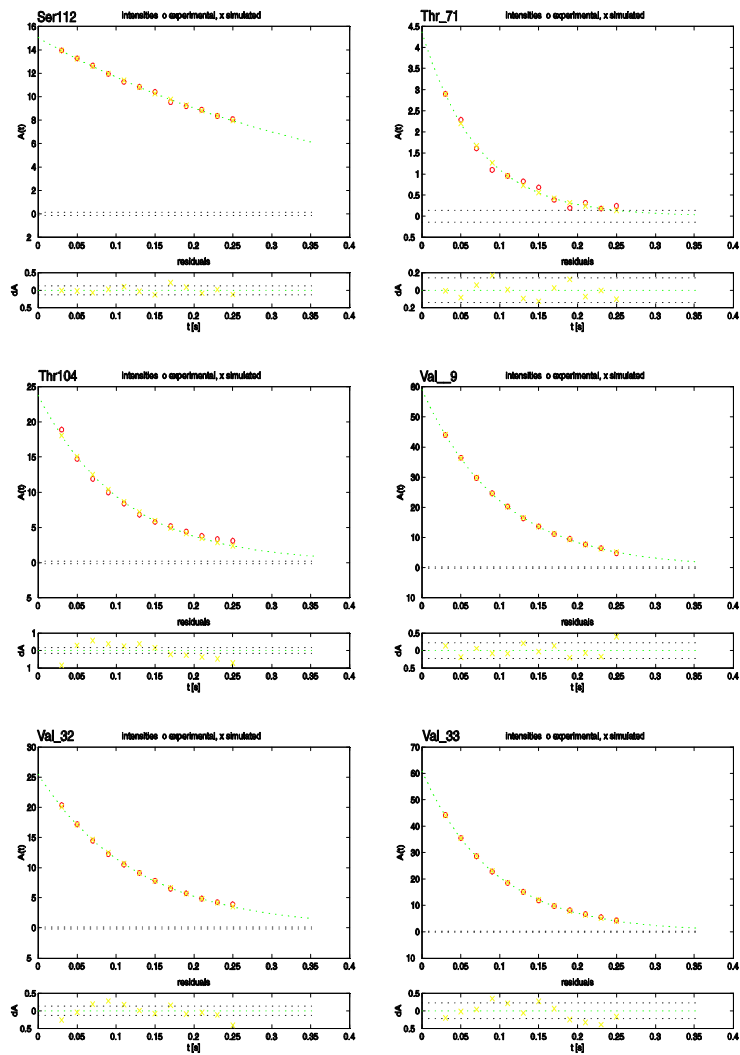


Abbildung 84: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren S112, T71, T104, V9, V32 und V33.

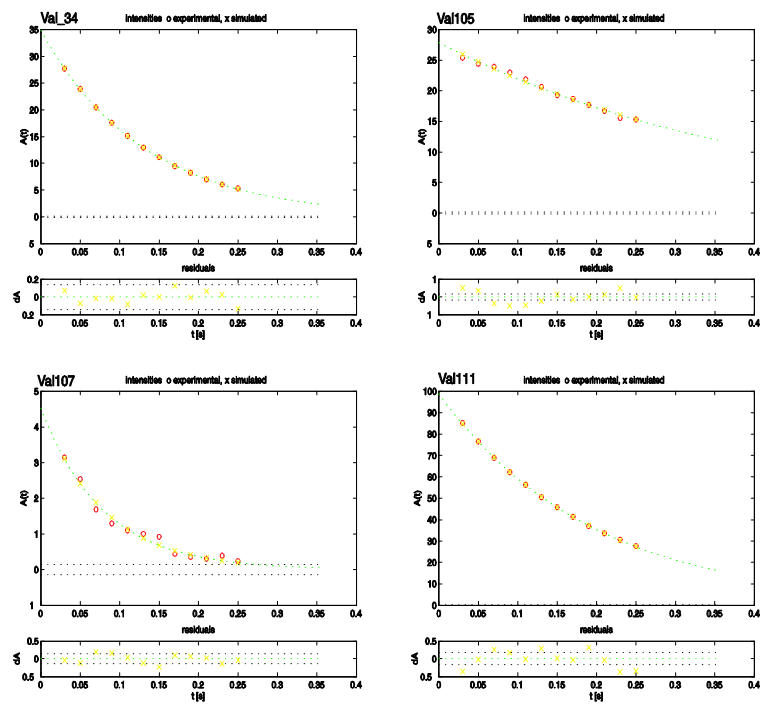


Abbildung 85: Graphische Auswertung der T_1 -Relaxationsraten des reduzierten Adrenodoxins für die Aminosäuren V34, V105, V107 und V111.

B Literatur

Literatur

- [1] **Glusker, J.P. und Trueblood, K.**, Crystal Structure Analysis (Oxford University Press, New York, 1985)
- [2] **Ernst, R., Bodenhausen, G. und Wokaun, A.**, Principles of NMR in One and Two Dimensions (Oxford University Press, London, 1987)
- [3] **Johnson, I.**, *Science*, **219**, (1983), 632–637
- [4] **Suzuki, K. und Kimura, T.**, *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **19**, (1965), 340–345
- [5] **Coghlan, V., Cupp, J. und Vickery, L.**, *Arch. Biochem. Biophys.*, **264**, (1988), 376–382
- [6] **Kimura, T.**, *Struct. Bonding*, **5**, (1968), 1–40
- [7] **Oftebro, H., Saarem, K., Bjorkhem, I. und Pedersen, J.**, *J.- Lipid. Res.*, **22**, (1981), 1254–1264
- [8] **Atsuta, Y. und Okuda, K.**, *JBC*, **253**, (1978), 4653–4658
- [9] **Waki, N., Hiwatashi, A. und Ichikawa, Y.**, *FEBS Lett.*, **195**, (1986), 87–91
- [10] **Pederson, J., Ghazarian, J., Orme-Johnson, N. und DeLuca, H.**, *JBC*, **251**, (1976), 3933–3941
- [11] **Kulkowski, J. und Ghazarian, J.**, *Biochem. J.*, **177**, (1979), 673–678
- [12] **Yvon, P. und DeLuca, H.**, *Biochemistry*, **19**, (1980), 2165–2171
- [13] **Oftebro, H., Stormer, F. und Pederson, J.**, *JBC*, **254**, (1979), 4331–4334

- [14] **Nabi, N.** und **Omura, T.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, (1980), 680–686
- [15] **Kramer, R.**, **DuBois, R.**, **Simpson, E.**, **Anderson, C.**, **Kashiwaga, K.**, **Lambeth, J.**, **Jefcoate, C.** und **Waterman, M.**, *Arch. Biochem. Biophys.*, **215**, (1982), 478–485
- [16] **Nabi, N.**, **Ishikawa, T.**, **Ohashi, M.** und **Omura, T.**, *J. Biochem. (Tokio)*, **94**, (1983), 1505–1515
- [17] **Matocha, M.** und **Waterman, M.**, *JBC*, **259**, (1984), 8672–8678
- [18] **Sagara, Y.**, **Ho, A.** und **Omura, T.**, *J. Biochem.*, **96**, (1984), 1743–1752
- [19] **Waterman, M.**, *Xenobiotica*, **12**, (1982), 773–786
- [20] **Kowal, J.**, **Simpson, E.** und **Estabrook, R.**, *JBC*, **245**, (1970), 2438
- [21] **John, M.**, **John, M.**, **Ashley, P.**, **MacDonald, R.**, **Simpson, E.** und **Waterman, M.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, (1984), 5628–5632
- [22] **John, M.**, **John, M.**, **Boggaram, V.**, **Simpson, E.** und **Waterman, M.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, (1986), 4715–4719
- [23] **Picado-Leonard, J.**, **Voutilainen, R.**, **Kao, L.-C.**, **Chung, B.-C.**, **Strauss, F.** und **Miller, W.**, *JBC*, **263**, (1988), 3240–3244
- [24] **Voutilainen, R.**, **Picado-Leonard, J.**, **Diblasio, A.** und **Miller, W.**, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **66**, (1988), 383–388
- [25] **Kramer, R.**, **Rainey, W.**, **Funkenstein, B.**, **Dee, A.**, **Simpson, E.** und **Waterman, M.**, *JBC*, **259**, (1984), 707–713
- [26] **Tanaka, M.**, **Haniu, M.** und **Yasunobu, K.**, *JBC*, **248**, (1973), 1141–1157
- [27] **Okamura, T.**, **John, M.**, **Zuber, M.**, **Simpson, E.** und **Waterman, M.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, (1985), 5705–5709

- [28] **Bhasker, C., Okamura, T., Simpson, E. und Waterman, M.**, *Eur. J. Biochem.*, **164**, (1987), 21–25
- [29] **Sakihama, N., Hiwatashi, A., Miyatake, A., Shin, M. und Ichikawa, Y.**, *Arch. Biochem. Biophys.*, **264**, (1988), 23–29
- [30] **Hiwatashi, A., Sakihama, N., Shin, M. und Ichikawa, Y.**, *FEBS Lett.*, **209**, (1986), 311–315
- [31] **Cupp, J. und Vickery, L.**, *JBC*, **264**, (1989), 1602–1607
- [32] **Omura, T., Sato, R., Cooper, D. und Rosenthal, O. Estabrook, R.**, *Fed. Proc.*, **24**, (1965), 1181
- [33] **Ichii, S., Omata, S. und Koboyashi, S.**, *Biochim. Biophys. Acta*, **139**, (1967), 308
- [34] **Simpson, E. und Boyd, G.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, (1967), 523
- [35] **Nakamura, Y., Otsuka, H. und Tamaoki, B.**, *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, (1966), 34
- [36] **Kido, T. und Kimura, T.**, *JBC*, **254**, (1979), 11806–11815
- [37] **Hara, T. und Takeshima, M.**, *Cytochrome P450 8th Int. Conf.*, 417–420
- [38] **Lambeth, J. und Kamin, H.**, *JBC*, **254**, (1979), 2766–2774
- [39] **Lambeth, J. und Kriengsiri, S.**, *JBC*, **260**, (1985), 8810–8816
- [40] **Lambeth, J., Geren, L. und Millett, F.**, *JBC*, **259**, (1984), 10025
- [41] **Geren, L., O'Brien, P., Stonehuerner, J. und Millett, F.**, *JBC*, **259**, (1984), 2155–2160
- [42] **Tuls, J., Geren, L. und Millett, F.**, *JBC*, **264**, (1989), 16421–16425

- [43] **Tsubaki, M., Iwamoto, Y., Hiwatashi, A. und Ichikawa, Y.,** *Biochemistry*, **28**, (1989), 6899–6907
- [44] **Hamamoto, I., Kurokochi, K., Tanaka, S. und Ichikawa, Y.,** *Biochim. Biophys. Acta*, **953**, (1988), 207–213
- [45] **Adamovich, T., Pikuleva, I., Cashchin, V. und Usanov, A.,** *Biochim. Biophys. Acta*, **996**, (1989), 247–253
- [46] **Wada, A. und Waterman, M.,** *JBC*, **267**, (1992), 22877–22882
- [47] **Coghlan, V. und Vickery, L.,** *JBC*, **266**, (1991), 18606–18612
- [48] **Beckert, V., Dettmer, R. und Bernhardt, R.,** *JBC*, **269**, (1994), 2568–2573
- [49] **Uhlmann, H., Kraft, K. und Bernhardt, R.,** *JBC*, **266**, (1994), 22557–22564
- [50] **Miura, S. und Ichikawa, Y.,** *JBC*, **266**, (1990), 6252–6258
- [51] **Lambeth, J., Seybert, D. und Kamin, H.,** *JBC*, **255**, (1980), 138–143
- [52] **Lambeth, J. und Pember, S.,** *JBC*, **258**, (1983), 5596–5602
- [53] **Tuls, J., Geren, L., Lambeth, J. und Millett, F.,** *JBC*, **262**, (1987), 10020–10025
- [54] **Hanugoklu, I. und Jefcoate, C.,** *JBC*, **255**, (1980), 3057–3061
- [55] **Uhlmann, H. und Bernhardt, R.,** *JBC*, **270**, (1995), 1–8
- [56] **Der Vartanian, D., Orme-Johnson, W., Hansen, R. und Beinert, H.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, (1967), 569
- [57] **Shetna, Y., Wilson, O., Hansen, R. und Beinert, H.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **52**, (1964), 1263
- [58] **Palmer, G.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, (1967), 315

- [59] **Kimura, T., Tasaki, A. und Watari, H.**, *JBC*, **245**, (1970), 4450
- [60] **Gibson, J., Hall, D., Thornley, J. und Whatley, F.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, (1966), 987
- [61] **Lammack, R., Rao, K., Hall, D. und Johnson, C.**, *Biochem. J.*, **125**, (1971), 849–856
- [62] **Müller, A., Müller, J., Muller, Y., Uhlmann, H., Bernhardt, R. und Heinemann, U.**, *Structure*, **6**, (1998), 269–280
- [63] **Mino, Y., Loehr, T., Wada, K., Matsubara, H. und Sanders-Loehr, J.**, *Biochemistry*, **26**, (1987), 8059–8065
- [64] **Tsukihara, T., Fukuyama, K., Mizushima, M., Harioka, T., Kusunoki, M., Katsube, Y., Hase, Y. und Matsubara, H.**, *J. Mol. Biol.*, **216**, (1990), 399–410
- [65] **Rypniewsky, W., Breiter, D., Benning, M., Weisenberg, G., Oh, B.-H., Markley, J., Rayment, I. und Holden, H.**, *Biochemistry*, **30**, (1991), 4126–4131
- [66] **Cupp, J. und Vickery, L.**, *JBC*, **263**, (1988), 17418–17421
- [67] **Uhlmann, H., Beckert, V., Schwartz, D. und Bernhardt, R.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, (1992), 1131–1138
- [68] **Miura, S. und Ichikawa, Y.**, *JBC*, **266**, (1991b), 6252–6258
- [69] **Miura, S. und Ichikawa, Y.**, *JBC*, **266**, (1991c), 19212–19216
- [70] **Ernst, R.**, *Adv. Magn. Reson.*, **2**, (1966), 1–135
- [71] **Ernst, R. und Anderson, W.**, *Rev. Sci. Instr.*, **37**, (1966), 93–102
- [72] **Jeener, J.**, *Ampere International Summer School, Basko Polje, Jugoslawien, unveröffentlicht*

- [73] Ernst, R., *Chimia*, **29**, (1975), 179–183
- [74] Müller, L., Kumar, A. und Ernst, R., *J. Chem. Phys.*, **63**, (1975), 5490–5491
- [75] Aue, W., Bartholdi, E. und Ernst, R., *J. Chem. Phys.*, **64**, (1976a), 2229–2246
- [76] Plant, H., Mareci, T., Cockman, M. und Brey, W., *27th Experimental NMR Conference Baltimore, Maryland, USA*
- [77] Vuister, G. und Boelens, R., *J. Magn. Reson.*, **73**, (1987), 328–333
- [78] Griesinger, C., Sørensen, O. und Ernst, R., *J. Magn. Reson.*, **72**, (1987a), 574–579
- [79] Griesinger, C., Sørensen, O. und Ernst, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, (1987b), 7227–7228
- [80] Griesinger, C., Sørensen, O. und Ernst, R., *J. Magn. Reson.*, **84**, (1989), 14–63
- [81] Kay, L., Clore, G., Bax, A. und Gronenborn, A., *Science*, **249**, (1990), 411–414
- [82] Clore, G., Kay, L., Bax, A. und Gronenborn, A., *Biochemistry*, **30**, (1991), 12–18
- [83] Aue, W., Karhan, J. und Ernst, R., *J. Chem. Phys.*, **64**, (1976b), 4226–4227
- [84] Nagayama, K., Wüthrich, K., Bachmann, P. und Ernst, R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, (1977), 99–105
- [85] Pochapsky, T. und Ye, X., *Biochemistry*, **30**, (1991), 3850–3856
- [86] England, S. und Seifert, S., *Methods Enzymol.*, **182**, (1990), 285–300

- [87] **Ben-Aim, A.**, *Plenum Press, NY*
- [88] **Tanford, C.**, *The Hydrophobic Effect*", *Wiley, NY*
- [89] **Kennedy, R.**, "Hydrophobic Chromatography", *Methods Enzymol.*, **182**
- [90] **Rossomando, E.**, "Ion-Exchange Chromatography", *Methods Enzymol.*, **182**, (1990), 309–317
- [91] **Samsonov, G.**, *105 Consultants Bureau, NY*, 99
- [92] **Poole, C. und Schuette, S.**, *Contemporary Practice of Chromatography*", *Elsevier, Amsterdam*, 304–312
- [93] **Schoenmakers, P.**, "Optimization of Chromatography Selectivity", *Elsevier, Amsterdam*
- [94] **Archer, S., Ikura, M., Torchia, D. und A., B.**, *J. of Magnetic Resonance*, **95**, (1991), 636 – 641
- [95] **Morris, G. und Freeman, R.**, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, (1979), 760
- [96] **Kay, L., Ikura, M., Tschudin, R. und Bax, A.**, *J. of Magn. Reson.*, **89**, (1990), 496 – 514
- [97] **Farmer II, B., Venters, R., Spicer, L., Wittekind, M. und Müller, L.**, *J. of Biomol. NMR*, **2**, (1992), 195
- [98] **Cavanagh, J. und Rance, M.**, *J. of Magn. Reson.*, **88**, (1990), 72
- [99] **Bax, A. und Ikura, M.**, *J. of Biomol. NMR*, **1**, (1991), 99
- [100] **Wishart, D., Sykes, B. und Richards, F.**, *Biochemistry*, **31**, (1992), 1647 – 1651
- [101] **Sklenar, V., Saudeck, V. und Piotto, M.**, *J. of Biomol. NMR*, **2**, (1992), 661 – 665
- [102] **Bax, A.**, *J. of Biomol. NMR*, **4**, (1994), 871 – 878

- [103] Wittekind, M. und Müller, L., *J. of Magn. Reson. Ser. B*, **101**, (1993), 201
- [104] Westler, W., Stockman, B. und Markley, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, (1988), 6256
- [105] Mooberry, E., Oh, B. und Markley, J., *J. of Magn. Reson.*, **85**, (1989), 147
- [106] Niemczura, W., Helm, G., Chesnick, A., Moore, R. und Bornemann, J., *J. of Magn. Reson.*, **81**, (1989), 635
- [107] Löhr, F. und Rüterjans, H., *J. of Biomol. NMR*, **6**, (1995), 189 – 197
- [108] Shaka, A., Keeler, J., Frenkiel, T. und Freeman, R., *J. of Magn. Reson.*, **52**, (1983), 335 – 338
- [109] Grzesiek, S. und Bax, A., *J. of Biomol. NMR*, **3**, (1993), 185 – 204
- [110] Wittekind, M., Gorch, M., Friedrichs, M., Dreyfuss, G. und Müller, L., *Biochemistry*, **31**, (1992), 6254
- [111] Marion, D., Driscoll, P., Kay, L., Wingfield, P., Bax, A., Gronenborn, A. und Clore, G., *Biochemistry*, **28**, (1989), 6150
- [112] Zuiderweg, E., McIntosh, L., Dahlquist, F. und Fesik, S., *J. of Magn. Reson.*, **86**, (1990), 210
- [113] Constantine, K., Goldfarb, V., Wittekind, M., Anthony, J., Ng, S. und Müller, L., *Biochemistry*, **31**, (1992), 5033
- [114] Fairbrother, W., Palmer III, A., Rance, M., Seizer, J., Saier, H. und Wright, P., *Biochemistry*, **31**, (1992), 4413
- [115] Clowes, R., Boucher, W., Hardman, C., Domaille, P. und Laue, E., *J. of Biomol. NMR*, **3**, (1993), 349 – 354

- [116] **Grzesiek, S., Anglister, J. und Bax, A.**, *J. of Magn. Reson.*, **B 101**, (1993), 114 – 119
- [117] **Logan, T., Olejniczak, E., Xu, R. und Fesik, S.**, *J. of Biomol. NMR*, **3**, (1993), 225 – 231
- [118] **Lyons, B. und Montelione, G.**, *J. of Magn. Res.*, **B 101**, (1993), 206 – 209
- [119] **Richardson, J., Clowes, R., Boucher, W., Domaille, P., Hardman, C., Keeler, J. und Laue, E.**, *J. of Magn. Reson.*, **B 101**, (1993), 223 – 227
- [120] **Bax, A., Clore, G. und Gronenborn, A.**, *J. of Magn. Reson.*, **88**, (1990), 425
- [121] **Logan, T., Olejniczak, E., Xu, R. und Fesik, S.**, *FEBS Lett.*, **314**, (1992), 413 – 418
- [122] **Logan, T., Olejniczak, E., Xu, R. und Fesik, S.**, *J. of Biomol. NMR*, **3**, (1993), 225 – 231
- [123] **Grzesiek, S. und Bax, A.**, *J. of Biomol. NMR*, **3**, (1993), 185 – 204
- [124] **Bertini, I., Donaire, A., Luchinat, C. und Rosato, A.**, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **29**, (1997), 348 – 358
- [125] **Levy, G. und Lichter, R.**, *John Wiley and Sons (New York)*, **Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy**
- [126] **Kalinowski, H.-O. und Berger, S. und Braun, S.**, *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, **13C-NMR-Spektroskopie**
- [127] **Marion, D., Ikura, M. und Bax, A.**, *J. of Magn. Reson.*, **84**, (1989), 425 – 430
- [128] **Braun, W. und Go, N.**, *J. of Mol. Biol.*, **186**, (1985), 611 – 626

- [129] **Güntert, P., Braun, W. und Wüthrich, K.**, *J. of Mol. Biol.*, **217**, (1991), 517 – 530
- [130] **Momany, F., McGuire, R., Burgess, A. und Scheraga, H.**, *J. of Phys. Chem.*, **79**, (1975), 2361 – 2381
- [131] **Güntert, P. und Wüthrich, K.**, *J. of Biomol. NMR*, **217**, (1991), 447 – 456
- [132] **Ikura, M., Spera, S., Barbato, G., Kay, L., Krinks, M. und Bax, A.**, *Biochemistry*, **30**, (1991), 9216 – 9228
- [133] **Ikura, M., Kay, L. und Bax, A.**, *Biochemistry*, **29**, (1990), 4659 – 4667
- [134] **Wüthrich, K., Wider, G., Wagner, G. und Braun, W.**, *J. of Mol. Biol.*, **155**, (1982), 311 – 319
- [135] **Wüthrich, K.**, *Biopolymers*, **22**, (1983), 131 – 138
- [136] **Wüthrich, K.**, NMR of Proteins und Nucleic Acids, *Wiley, New York*
- [137] **Dalgarno, D., Levine, B. und Williams, R.**, *Biosci. Rep.*, **3**, (1983), 443 – 452
- [138] **Wishart, D., Sykes, B. und Richards, F.**, *J. of Mol. Biol.*, **222**, (1991), 311 – 333
- [139] **Szilágyi, L. und Jardetzky, O.**, *J. of Magn. Reson.*, **83**, (1989), 441 – 449
- [140] **Pastore, A. und Saudek, V.**, *J. of Magn. Reson.*, **90**, (1990), 165 – 176
- [141] **Williamson, M.**, *Biopolymers*, **29**, (1990), 1423 – 1431
- [142] **Hoffmann, E. und Rüterjans, H.**, *Eur. J. Biochem.*, **177**, (1988), 539 – 560
- [143] **Pardi, A., Wagner, G. und Wüthrich, K.**, *Eur. J. Biochem.*, **137**, (1983), 445 – 454

- [144] **Wagner, G.**, *J. of Magn. Reson.*, **55**, (1983), 151 – 156
- [145] **Asakura, T., Taoka, K., Demura, M. und Williamson, M.**, *J. of Biomol. NMR*, **6**, (1995), 227 – 236
- [146] **Billeter, M., Braun, W. und Wüthrich, K.**, *J. of Mol. Biol.*, **155**, (1982), 321 – 346
- [147] **Leach, S., Némethy, G. und Scheraga, H.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, (1977), 207 – 215
- [148] **Arseniev, A., Schultze, P., Wörgötter, E., Braun, W., Wagner, G., Vasák, M., Kägi, J. und Wüthrich, K.**, *J. of Mol. Biol.*, **201**, (1988), 637 – 657
- [149] **Wüthrich, K., Billeter, M. und Braun, W.**, *J. of Mol. Biol.*, **180**, (1984), 715 – 740
- [150] **Wishart, D., Sykes, B. und Richards, F.**, *Biochemistry*, **31**, (1992), 1647 – 1651
- [151] **Wishart, D. und Sykes, B.**, *J. of Biomol. NMR*, **4**, (1994), 171 – 180
- [152] **De Lano, W. und Brünger, A.**, *Proteins*, **20**, (1994), 105
- [153] **Bonvin, A. und Brünger, A.**, *J. of Mol. Biol.*, **250**, (1995), 80
- [154] **Berndt, K., Güntert, P. und Wüthrich, K.**, *Proteins*, **24**, (1996), 304 – 313
- [155] **Pfeiffer, S.**, Struktur, Dynamik und Hydratation der Ribonuklease T1., *Dissertation, Frankfurt/Main*
- [156] **Laskowski, R., Rullmann, J., Mac Arthur, M., Kaptein, R. und Thornton, J.**, *J. of Biomol. NMR*, **8**, (1996), 477 – 486
- [157] **Pikuleva, I., Tesh, K., Waterman, M. und Kim, Y.**, *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **373**, (2000), 44 – 55

- [158] **Laskowski, R., MacArthur, M., Moss, D. und Thornton, J.**, *J. of Appl. Crystallogr.*, **26**, (1993), 283 – 291

Lebenslauf

Zur Person

Roland Weiß
geb. am 18.10.1970
in Beuthen / Oberschlesien
deutsch, verheiratet, 1 Kind

Hochschulbildung

10/1990 - 03/1996 Chemistudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/M.
04/1996 Diplom-Chemiker Hauptprüfung
04/1996 - 10/1996 Diplom-Arbeit im Institut für Biophysikalische Chemie bei Prof. H. Rüterjans
seit 01/1997 Promotion am Institut für Biophysikalische Chemie der Universität Frankfurt bei Prof. Rüterjans:
"Bestimmung der Lösungsstruktur von Rinder-Adrenodoxin durch Auswertung hochaufgelöster NMR Spektren"

Berufstätigkeit

01/1997 - 12/2000 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Frankfurt (Betreuung von Studenten durch Seminare und in Praktika)

Schulbildung

08/1977 - 04/1990 Grundschule, Gesamtschule und Oberstufe in Frankfurt, Nidderau und Bruchköbel

Meine akademischen Lehrer waren:

H. Bartl, H. Bock, B. Brutschy, F.J. Comes, J.W. Engels, E. Egert, C. Griesinger, K. Hensen, B.O. Kohlbesen, G. Kohlmaier, W. Martinsen, J. Mulzer, G. Quinkert, D. Rehm, E.A. Reinsch, H. Rüterjans, W. Sterzel, M. Trömel