

NMR-spektroskopische und strukturelle Untersuchungen an kleinen Proteinen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Chemie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Peter Gröschke
aus
Berlin

Frankfurt am Main
2001

(DF 1)

Vom Fachbereich Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. J. W. Engels
erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Griesinger
zweiter Gutachter	Prof. Dr. S. J. Glaser

Datum der Disputation: 6. August 2001

Meinen Eltern. Allen drei.

Danke!

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Prof. Dr. Christian Griesinger in der Zeit von September 1992 bis Februar 1997 durchgeführt.

Prof. Dr. Christian Griesinger gilt mein Dank für die Überlassung des Themas, das Interesse am Fortgang der Arbeit und die Bereitstellung einer guten Arbeitsumgebung. Dr. Ole Sørensen, ehemals Novo Nordisk, inzwischen bei *Carlsberg Institutes* in Kopenhagen, danke ich für die Bereitstellung der zweiten Domäne des TFPI und die freundliche Unterstützung.

Dr. Michael Nilges am EMBL in Heidelberg, Alexander Diener und Bettina Elshorst danke ich für die Zusammenarbeit bei der Strukturbestimmung der zweiten Domäne des TFPI. Für fruchtbare Diskussionen sei in diesem Zusammenhang auch Marcus Maurer gedankt, der seine mit Rhodniin gewonnenen Erfahrungen mit mir teilte.

Prof. Dr. Steffen Glaser, Prof. Dr. Harald Schwalbe und Dr. Thomas Prasch verdanke ich im Rahmen des Projektes, das schlußendlich zu SIAM-TACSY führte, viele Einblicke in moderne Multipulssequenzen.

Mit Dr. Kai Meyer-Rogge aus der Arbeitsgruppe Dr. Kröger an der Universität Gießen verbindet mich nicht nur die Zusammenarbeit im Zusammenhang mit der Spektroskopie und Strukturbestimmung des DNA-bindenden Proteins C1, sondern auch eine in den Jahren gewachsene Freundschaft.

Für die gute, anregende und fruchtbare Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und Freundschaft danke ich – alphabetisch – Mirko Hennig, Marcus Maurer, Jens Quant, Bernd Reif, Jürgen Schleucher, Harald Schwalbe und Michael Sattler.

Allen hier nicht aufgeführten Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für alles, was über das übliche „gute Arbeitsklima“ hinausging: die freundschaftliche und faire Atmosphäre im Umgang miteinander.

Dank gebührt auch Dr. Wolfgang Bermel und Dr. Rainer Kerssebaum (BRUKER, Karlsruhe), die nicht nur Meßzeiten an ihren Geräten zur Verfügung stellten, sondern auch an Wochenenden und in tiefen Nächten zu *remote support* in den Anfangstagen des 800 MHz-Spektrometers bereit waren.

Peter Schmidt, Thomas Geppert und vor allem Jochen Junker waren immer ansprechbar, wenn ich etwas mit den Rechnern machen wollte, was nur Superuser dürfen.

Für die Unterstützung auch und gerade bei den medizinischen Fragen danke ich Dres. med. Bettina & Waldemar Jendritza, Mannheim.

Axel Gubitz und mich verbindet eine Reihe außerordentlich interessanter Diskussionen im Zusammenhang mit den rechnerischen Methoden, von „*ab initio*“ bis „*απειρον*“.

Frau Dipl.-Des. Heike Ullmann, Herrn Dipl.-Des. Sebastian Schollmeyer und der Werbeagentur Gingco, Braunschweig, danke ich für die Hilfe bei der Gestaltung dieser Arbeit.

1	Einleitung und Ziele.....	1
1.1	Ziele der Arbeit	3
1.2	Aufbau der Arbeit	3
2	Die zweite Domäne des TFPI.....	5
2.1	Inhibitoren von Proteasen	5
2.1.1	Kunitz-Inhibitoren	6
2.1.2	Der Mechanismus der Inhibition	8
2.1.3	Vorkommen der Kunitz-Inhibitoren	12
2.2	Blutgerinnung	14
2.2.1	Blutstillung	14
2.2.2	Die Blutgerinnung	15
2.2.2.1	Historische Betrachtungen	16
2.2.2.2	Struktur und Aufbau der beteiligten Proteine	18
2.2.3	Der exogene Weg der Gerinnung	19
2.2.3.1	Faktor VII(a)	20
2.2.3.2	Gewebefaktor	20
2.2.3.3	Der weitere Verlauf	21
2.2.4	Das intravaskuläre System der Gerinnung	21
2.2.5	Faktor X	22
2.2.5.1	Aufbau von Faktor X und Xa	23
2.2.5.2	Aufgaben des Faktors Xa	24
2.2.5.3	Struktur des Faktors Xa	25
2.3	Tissue Factor Pathway Inhibitor	29
2.3.1	Isolierung und Aufklärung	30
2.3.2	Eigenschaften von TFPI	32
2.3.2.1	Inhibierung von Faktor Xa – die zweite Domäne	32
2.3.2.2	Inhibition von F VIIa/Gewebefaktor und F Xa	35
2.3.2.3	Die dritte Kunitzdomäne des TFPI	37
2.3.3	Die Effekte auf die Gerinnungskaskade	38
2.3.4	TFPI im menschlichen Körper	39
3	NMR-Experimente zur Zuordnung	43
3.1	Grundbausteine der Experimente	45
3.1.1	Correlation Spectroscopy	45
3.1.2	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	47
3.1.3	Total Correlation Spectroscopy	50
3.1.3.1	Clean-TOCSY	54
3.1.3.2	FLOPSY	54
3.1.4	Sequenzen zur Wasserunterdrückung	55
3.1.4.1	Vorsättigung	56
3.1.4.2	Binominale Sequenzen	56
3.1.4.3	JR-Echo	59

3.1.4.4 WATERGATE	60
3.2 Bestimmung von Spinsystemen	61
3.3 Sequentielle Zuordnung über NOEs	63
3.4 Zuordnung der Spinsysteme in TFPI-2	63
4 Die Experimente zur Bestimmung von Kopplungskonstanten.....	71
4.1 Die Bestimmung skalarer Kopplungen	71
4.1.1 Die Lorenz-Fit-Methode.	74
4.1.2 Die Methode nach Kim und Prestegard	75
4.2 TACSYS Experimente zur Bestimmung von Kopplungskonstanten	77
4.2.1 Tailored Correlation Spectroscopy	78
4.2.2 Das TACSYS für die Ermittlung der Kopplungskonstanten	81
4.2.3 Experimente und Auswertung	82
4.3 SIAM-TACSYS	84
4.3.1 Theoretische Grundlagen des SIAM-TACSYS	86
4.3.2 Experimentelle Daten	89
4.3.3 Beispielspektren	90
4.3.4 Die Bestimmung mittels TACSYS	92
4.4 Alternative Experimente: das HNHA	94
5 Gewinnung strukturelevanter NMR-Daten	97
5.1 Bestimmung der Abstände aus NOEs	97
5.2 Sekundärstrukturelemente	100
6 Strukturrechnungen	103
6.1 Simulated Annealing	104
6.2 Distance Geometry	108
6.2.1 Der Ansatz	108
6.2.2 Distanzgeometrie in der Anwendung	109
6.2.3 IRMA	111
6.3 Die Strukturrechnungen	113
6.3.1 Ablauf der Strukturrechnung	113
6.3.1.1 Distanz-NOEs und Intervalle	113
6.3.1.2 Pseudoatomkorrektur	114
6.3.1.3 Wasserstoffbrückenbindungen	114
6.4 Die Strukturen und die Bewertung	115
6.4.1 Elemente der Struktur des TFPI-2	122
6.4.2 Die Güte der erhaltenen Strukturen – Procheck-NMR	123
6.4.3 Vergleich mit der publizierten Struktur	125
6.4.3.1 Die NMR-Struktur	125
6.4.3.2 Die Komplexe von TFPI-2 mit Trypsin und Faktor Xa	126
6.4.4 Vergleich mit anderen Kunitz-Inhibitoren	130
7 Zusammenfassung.....	135
8 Experimentelles.....	139

8.1 Die Probe der zweiten Domäne des TFPI	139
8.1.1 Gentechnische Expression	139
8.1.2 NMR-Proben	140
8.2 NMR Spektren	142
8.2.1 Aufnahme: Geräte und Programme	142
8.2.2 Programme zur Auswertung	142
8.2.3 Programme für die Strukturrechnungen	143
8.2.4 Meßbedingungen	143
8.2.5 Prozessierung	144
8.2.6 Bedingungen der TACSY-Spektren	144
8.2.7 Die Ergebnisse der TACSY-Spektrenreihe	145
8.2.7.1 Graphen der gefitteten Funktionen	146
8.2.7.2 Zweidimensionale Darstellung der Minimumsbestimmung	147
9 Literatur.....	151
A Puls-, C- und PERL-Programme	165
A.1 Verwendete Pulsprogramme	166
A.1.1 FLOPSY	166
A.1.2 DQF-sCOSY (TPPI)	167
A.1.3 DQF-COSY (NS=64)	168
A.1.4 TACSY-Pulsprogramm	169
A.1.5 SIAM-TACSY (auf AMX)	170
A.1.6 TOCSY: Mit DIPSI-Sequenz	172
A.1.7 NOESY mit Watergate (DMX-Version)	174
A.1.8 Jump-Return NOESY	175
A.1.9 TOCSY mit DIPSI Sequenz und Watergate	176
A.1.10 NOESY mit Watergate (AMX)	178
A.1.11 NOESY mit Presat und RSH	179
A.1.12 NOESY mit Jump-Return	180
A.1.13 COSY mit Gradienten	182
A.1.14 NOESY mit 11-Sequenz	183
A.2 PERL-Programme	183
A.2.1 Tacsyintegrale.perl	183
A.2.2 tacsymerge	184
A.3 C-Programme	185
A.3.1 Kopplungsextraktion (brute_force)	185
A.3.2 Kim+Prestegaard.c	187
B Kopplungskonstanten mit TACSY – Die Graphen	189
B.1 Auswertungen mit Kaleidagraph	189
B.2 Auswertung mit Felix	189
C Die Xplor-Dateien	217
C.1 Distanz NOEs	217

C.1.1 Interresiduale NOEs	217
C.1.2 Intraresiduale NOEs	222
C.2 Zusätzlich eingeführte Restraints	228
C.2.1 Dihedrale Winkelbeschränkungen	228
C.2.2 Wasserstoffbrücken	229
C.2.3 Disulfidbrücken	229
C.3 Xplor-Protokolle	230
C.3.1 Die Inputdatei sa_lal.inp	230
C.3.2 read_aldata.xplor	232
C.3.3 sa_l_randomchain.xplor	232
C.3.4 setup_swapnew.xplor	233
C.3.5 sa_l_initial_values.xplor	234
C.3.6 sa_l_reduced.xplor	234
C.3.7 sa_l_hightemp.xplor	235
C.3.8 sa_l_cool1.xplor	235
C.3.9 sa_l_cool2.xplor	236
C.3.10 swap15v.xplor	237
D Publikationen	239
E Akademische Lehrer und Lebenslauf	245

Verwendete Abkürzungen

Für die verschiedenen Aminosäuren wurden sowohl Einbuchstabenabkürzungen als auch Dreibuchstabenabkürzungen verwendet (IUPAC-UIB-Kommision für biochemische Nomenklatur (IUPAC 1972)).

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

Tabelle 1: Namen, Dreibuchstaben- und Einbuchstabenabkürzungen der Aminosäuren

α -DTX	α -Dendrotoxin (Schlangengift der grünen Mamba)
APPI	Kunitz-Domäne des Alzheimer β -Amyloid Precursor Proteins
AS	Aminosäure
BPTI	Bovine (oder Basic) Pancreatic Trypsin Inhibitor
COSY	Correlation Spectroscopy
DG	Distance Geometry
DIPSI	Decoupling In the Presence of Scalar Interactions
DQF	Doppelquanten-gefiltert
EGF	Epidermal Growth Factor
(F)FT	(Fast) Fourier Transformation
G_z	Gradient entlang der der z-Achse (B_0 -Feld)
HN, H α ,...	Amidproton einer Peptidbindung, Proton am α -C einer AS, ...
HMQC	Heteronuclear Multi Quantum Coherence
HMWK	High Molecular Weight Kallikrein
HNCA	3D-Experiment zur Korrelation von HN, N und C α einer AS

Verwendete Abkürzungen

HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
I_{2x}	Spin-Operator für den Protonenspin 2, entlang der x-Achse
INEPT	Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer
$^aJ(AB)$	Kopplung über a Bindungen zwischen den Spins der Kerne A und B
MLEV	Multipulssequenz zur Entkopplung, entwickelt von M. Levitt
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY	NOE Spectroscopy
Ω_{HN}	Chemische Verschiebung (von HN)
ppm	Parts per million
ROE	Rotating Frame Overhauser Effect (Bothner-By, Stephens et al. 1984)
RSH	Vorzeichenunterscheidung (States, Haberkorn et al. 1982)
rTAP	recombinant Tick Anticoagulant Protein
S_{1x}	Spinoperator für Heterospin 1, entlang der x-Achse
SA	Simulated Annealing
SIAM	Simultaneous acquisition of In-phase- and Anti-phase Multiplets
ShPI	<i>Stichodactyla helianthus</i> Proteinase Inhibitor (Antuch, Berndt et al. 1993)
T_1	Longitudinale Relaxation
T_2	Transversale Relaxation
τ_m	Mischzeit
TACSY	Tailored Correlation Spectroscopy
TF	Tissue Factor, Gewebefaktor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TPPI	Time Proportional Phase Increment (Marion und Wüthrich 1983)

1 Einleitung und Ziele

Die strukturelle Kenntnis biologisch interessanter Moleküle ist ein Imperativ, um die Eigenschaften und Funktionen der Vorgänge zu erklären, die einen lebenden Organismus zu dem machen, was er ist: lebendig.

Zum gegenwärtigen Augenblick sind die komplexen Zusammenhänge des Lebens nicht vollständig verstanden, doch stellt die Korrelation von Funktion und Struktur eines biologisch relevanten Moleküls, sei es ein Protein, sei es ein Zucker, sei es ein Genom, eine Grundlage für eben dieses Verständnis dar.

Vom medizinischen Standpunkt aus macht das Wissen um die Struktur eines Zielobjekts, sei es Rezeptor, sei es Enzym, die Entwicklung maßgeschneiderter Medikamente möglich; die Idee des *Rational Drug Design* – im Gegensatz zum *Screening* – beruht auf der Korrelation von Struktur und Funktion. Die Hoffnung beruht darauf, daß maßgeschneiderte Moleküle hochspezifisch an der pharmakologisch interessanten Stelle angreifen – ohne auch andere potentielle Ziele anzuvisieren.

Die Annahme, nur aufgrund der Kenntnis der Primärstruktur, der Sequenz eines Proteins, könne man dessen räumlichen Aufbau vorhersagen, ist im Moment noch unrealistisch. Kurze Sequenzen könnten zwar bis auf einen Fehler von 4 bis 5% vorhergesagt werden (MacBride 1997) und das *Homology Modelling* wird immer besser; aber die *genauen* Strukturen großer und damit interessanter Proteine müssen mit physikalischen Methoden aufgeklärt werden.

Auch ist es sinnvoll, bereits bekannte Arzneimittel und Toxine strukturell aufzuklä-

ren, birgt doch hier eine bessere Kenntnis die Möglichkeit der Verbesserung und der Erweiterung des Verständnisses, beispielsweise von Meta- oder Katabolismen. Die Strukturbestimmung durch Ausnutzung der magnetischen Eigenschaften der Atomkerne hat sich durch die enormen Fortschritte sowohl in der Hardware als auch in der Software, den Pulsprogrammen, innerhalb der letzten drei Jahrzehnte zu einer Methode entwickelt, die neben der Strukturbestimmung mit Hilfe der Röntgenbeugung steht. Beide Methoden ergänzen sich: Hier die Struktur mit sehr hoher lokaler Auflösung, dort ein riesiger Komplex strukturell geklärt; hier ein Blick auf die Dynamik einzelner Bereiche eines Moleküls, dort ein Blick auf das Ganze. Die Entdeckung der kernmagnetischen Resonanz durch Purcell und Bloch (Bloch, Hansen et al. 1946; Purcell, Torrey et al. 1946) stellt den Startpunkt dieser Methode dar. Die rasante Entwicklung und auch das Begreifen des Potentials dieser Technik führte dazu, daß beiden Wissenschaftlern bereits 1952 für Ihre Arbeiten der Nobelpreis verliehen wurde.

1966 entwickelten Ernst und Anderson (Ernst und Anderson 1966) die Grundlagen der Fourier-Spektroskopie und brachten die Analytik mit Hilfe von NMR durch den enormen Empfindlichkeitsgewinn gegenüber der *continuos wave*-Methode einen großen Schritt vorwärts, wurde es doch nun möglich, routinemäßig auch andere Kerne als Protonen zu messen.

10 Jahre später berichteten Aue et al. (Aue, Bartholdi et al. 1976) von dem ersten gelungenen zweidimensionalen Experiment, dessen theoretische Grundlagen bereits fünf Jahre vorher von J. Jeener auf einer Sommerakademie in Jugoslawien (Jeener 1971) entwickelt wurden.

Wieder 10 Jahre später, 1986, faßte Kurt Wüthrich seine Erfahrungen und Ergebnisse bei der Bestimmung der Strukturen von Proteinen und Nukleinsäuren in einem Buch (Wüthrich 1986) zusammen, das seitdem neben dem Werk von Abragam (Abragam 1961) und Ernst, Bodenhausen und Wokaun (Ernst, Bodenhausen et al. 1991) zu den am häufigsten zitierten Publikationen in diesem Bereich zählt.

Heute stehen dem NMR-Spektroskopiker eine fast unübersehbare Anzahl von Pulssequenzen – und damit Antworten auf spezifische Fragen an das Molekül – zur Verfügung.

Der Nobelpreis für Prof. Dr. Richard R. Ernst im Jahre 1991 für seine Arbeiten auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie stellt weniger einen Schlußpunkt, als vielmehr die Würdigung (Ernst 1992) des bisher Erreichten – und damit einen Ansporn für weitere Entwicklungen – dar.

1.1 Ziele der Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist die strukturelle Aufklärung der zweiten Kunitz-Domäne des *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie.

Von der Primärstruktur und von den Sekundärstrukturelementen her ähnliche Moleküle sind bereits strukturell aufgeklärt worden, das wahrscheinlich mit NMR bestuntersuchtete Protein, der *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI) ist vom selben Typ wie TFPI-2. Beide, BPTI und TFPI-2, besitzen 58 Aminosäuren, eine hohe Homologie in der Primärstruktur und gleiche Disulfid-Verbrückungen.

Die Zuordnung der ^1H -Resonanzen ist über etablierte Standardmethoden (Wüthrich 1986) möglich gewesen; die Gewinnung der für die Güte der berechneten Struktur wichtigen skalaren Kopplungskonstanten $^3J(\text{NH-H}\alpha)$ gestaltete sich schwierig und gelang erst durch die Entwicklung und den Einsatz neuer NMR-Experimente, was schließlich zum Experiment SIAM-TACSY (Prasch, Gröschke et al. 1998) führte.

Für die Bestimmung der Struktur wurden Rechenmethoden wie *Simulated Annealing* und *Distance Geometry* verwendet. Die erhaltene Struktur wird in dieser Arbeit diskutiert und mit anderen, ähnlichen Strukturen verglichen.

1.2 Aufbau der Arbeit

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird auf die zweite Kunitz-Domäne des TFPI eingegangen und dessen biologische Bedeutung beschrieben. Zunächst wird auf die Inhibitor-Familie der Kunitz-Inhibitoren eingegangen, deren Vertreter sowohl in Tieren als auch in Pflanzen anzutreffen sind. Es wird erläutert, weshalb das untersuchte Molekül von großem medizinischen Interesse ist und wieso der untersuchte Teil, mithin nur ein Drittel des gesamten Moleküls, eine herausragende Stellung einnimmt. In diesem Rahmen wird auf das physiologische Umfeld, die Blutgerinnung, und die Eigenschaften des TFPI eingegangen. Näher beleuchtet wird in diesem Zusammenhang der direkte Bindungspartner der zweiten Domäne des TFPI, Faktor Xa.

Auf die gängigen Methoden zur Strukturbestimmung von Proteinen mittels homonuklearer Kernresonanzspektroskopie wird im dritten Kapitel eingegangen. Der Schwerpunkt liegt in der Beschreibung der angewandten Experimente.

Im folgenden vierten Kapitel wird die Gewinnung strukturell relevanter Parameter aus den aufgenommenen Spektren beschrieben. Zentral sind hier die NOE-Experimente.

Die Experimente zur präzisen Bestimmung von homonuklearen Kopplungskonstanten, die für Proteine oft aufgrund von Überlappungen, geringen Signalintensitäten und großen Linienbreiten oft nicht oder nur unzureichend möglich sind, sind Thema des fünften Kapitels dieser Arbeit. Ausgehend von den in dieser Arbeitsgruppe entwickelten TACSY-Pulssequenzen (Glaser 1993; Quant, Prasch et al. 1995; Prasch, Gröschke et al. 1998) wurde eine Methode entwickelt, die die Probleme anderer Bestimmungsmethoden umgeht und einfach und in einem hohen Maße automatisierbar die gesuchten Kopplungskonstanten aus den Spektren in exzellenter Qualität extrahiert. Diese Entwicklungen waren Anstoß zu der Entwicklung der inzwischen unter dem Namen SIAM-TACSY (Prasch, Gröschke et al. 1998) publizierten Methode zur Bestimmung von homonuklearen Kopplungskonstanten.

Es folgt im sechsten Kapitel das methodische Gerüst zur Strukturbestimmung mit Hilfe der Methoden *Simulated Annealing* (Brünger 1992) und *Distance Geometry* (Blumenthal 1970; Wagner, Braun et al. 1987; Kuntz, Thomason et al. 1989). Hier wird die aus NMR-Daten berechnete Struktur der zweiten Domäne des TFPI vorgestellt und verglichen mit ähnlichen Strukturen.

Nach der Zusammenfassung in Kapitel 7 schließt sich ein Kapitel mit dem experimentellen Daten der Experimente an.

Im Anhang sind die Pulsprogramme und die bei der Auswertung benutzten C- und PERL-Programme zu finden, die Graphen der TACSY-Experimente, die in den vorangegangenen Kapiteln besprochen wurden und die bei den Strukturrechnungen verwendeten Input- und Protokoll-Dateien.

2 Die zweite Domäne des TFPI

Es wird zunächst auf den Molekültyp und dessen Wirkmechanismus eingegangen, dann auf die Blutgerinnung und schließlich werden die Eigenschaften des *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) und seiner zweiten Inhibitor-Domäne genau beleuchtet.

2.1 Inhibitoren von Proteasen

Proteaseinhibitoren sind wichtige Werkzeuge, um die proteolytische Aktivität der Proteasen zu regulieren. Diese Regulation kann eine Blockierung im Notfall sein oder auch im Rahmen des normalen Abbaus durch die Protease nach Beendigung einer Aufgabe eines Proteins erfolgen. Endogene, also körpereigene Inhibitoren scheinen immer Proteine zu sein; Mikroorganismen ist es möglich, auch Inhibitoren zu produzieren, die keine Proteine sind (Bode und Huber 1992).

Alle Inhibitoren von Proteasen verhindern den Zugang für Substrate durch Einlagerung in das aktive Zentrum des Enzyms, entweder als Substrat- oder Produkt-Analogon. Im Fall des Verhaltens als Substrat stabilisieren sich die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Protease gegenseitig, so daß eine Dissoziation nicht mehr stattfindet. Ist die Anlagerung produktähnlich, so sind die Wechselwirkungen stark genug, um eine schnelle Dissoziation zu verhindern.

Die Mehrheit der bislang bekannten proteinischen Inhibitoren blockieren Serinproteasen. Diese Inhibitoren lassen sich in mindestens 16 verschiedene Untergruppen

einteilen, ausgehend von den Ähnlichkeiten in Sequenz, topologischer Übereinstimmung und Mechanismus der Blockierung. Neben den hier im Detail besprochenen Kunitz-Inhibitoren sind die Moleküle vom Typ Bowman-Birk, die *Serpins* und die Inhibitoren vom Kazal-Typ besser bekannt und untersucht (Laskowski und Kato 1980).

2.1.1 Kunitz-Inhibitoren

Die Inhibitoren vom Kunitz-Typ sind die bislang am besten untersuchte Gruppe von inhibierenden Proteinen.

Wie die meisten inhibitorisch wirkenden Proteine, so haben auch die Kunitz-Inhibitoren eine exponierte Schleife in ihrer Struktur, die an das aktive Zentrum der Protease binden kann. Daneben haben sie mit den Inhibitoren aller anderen Familien zusätzlich einige Gemeinsamkeiten:

- kompakte Struktur,
- hydrophober *Core* (hydrophobe Seitenketten weisen in das Innere des Inhibitors),
- sehr hohe Stabilität gegenüber Entfaltung.

Bei dem Prototyp aller Kunitz-Inhibitoren, dem *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI), liegt die Schmelztemperatur bei etwa 95°C und auch in 6 M Guanidin bleibt die Tertiärstruktur im Grunde unverändert (Moses und Hinz 1983).

Die Konformation der exponierten Schleife innerhalb des gegen Denaturierung geschützten Gerüsts des Inhibitors ist gestreckt (*extended conformation*) und alle Reste um die entscheidende Schnittstelle herum weisen aus dem Protein heraus. Von den Resten¹ P3 bis P3' weisen die Inhibitoren eine charakteristische Konformation auf, die der eines antiparallelen β -Faltblatts entspricht. Dabei liegen die Winkel für ϕ zwischen -120° und -140° und für ψ zwischen 140° und 170° für P3, zwischen -100° bis -60° und 140° - 180° für P2 und P1'. Die Winkel ϕ und ψ für P1 ähneln denjenigen einer 3_{10} -Helix (-120° bis -95° und 10° - 50°) und bei P2' und P3' gleichen die Winkel denen eines parallelen β -Faltblatts (ϕ : -140° bis -100°, ψ : 70° bis 120°) (Bode and Huber 1992). Diese kanonischen Strukturen werden sowohl in Röntgenstrukturen als auch in NMR-Untersuchungen gefunden; im Kom-

¹ P1, P2, P3 ... und P1', P2' ... sind die Aminosäuren im Substrat (hier also Inhibitor), die zum N- bzw. C-Terminus des Substrats liegen. Die Schnittstelle liegt zwischen P1 und P1'. Die entsprechenden Reste in der Protease sind mit S1, ... und S1' ... gekennzeichnet (Schechter und Berger 1967).

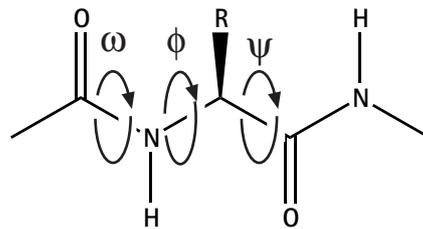


Abbildung 1: Darstellung der Dihedralwinkel ω , ϕ und ψ im peptidischen Backbone. Nach (Croasmun und Carlson 1994).

plex mit ihren Proteasen zeigen die Inhibitoren ebenfalls diese Strukturmerkmale. Die exponierte Schleife ist durch zusätzliche Strukturmerkmale in Nachbarschaft zur Schnittstelle stabilisiert. Bei den Inhibitoren vom Kunitz-Typ ist P2 ein Cystein (Cys-14 im TFPI), das eine Disulfidbrücke zum Gerüst des Proteins (Cys-38) aufbaut. Auch können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Schleife und dem Gerüst die Stabilität erhöhen.

Ein Kunitz-Inhibitor hat drei Sulfidbrücken, von denen eine den *N*-Terminus mit dem *C*-Terminus verbindet (Cys-5 - Cys-55 im BPTI und in der zweiten Domäne des TFPI), eine, die das Ende des β -Faltblatts mit der exponierten Schleife verbindet (Cys-14 - Cys-38) und eine, die das Faltblatt mit dem restlichen Molekül zusammenhält (Cys-30 - Cys-51):

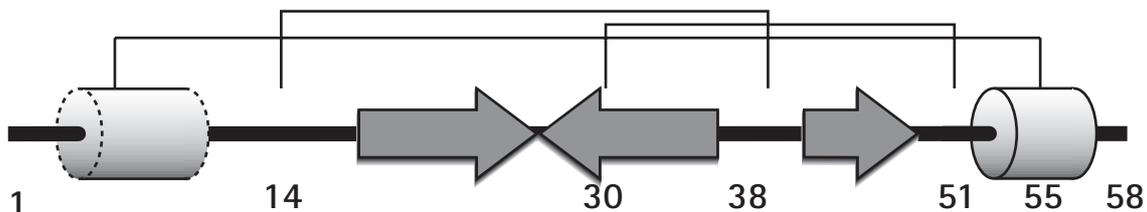


Abbildung 2: Sekundärstrukturschema von Kunitz-Inhibitoren. α -helicale Bereiche sind als Zylinder, β -Faltblätter als breite Pfeile dargestellt. Dünne Linien: Sulfidbrücken. Gestrichelt: Nicht in allen Molekülen helicaler Bereich. Die Numerierung richtet sich nach dem BPTI bzw. der zweiten Domäne des TFPI. Nach (Laskowski and Kato 1980).

Die Entfernungen zwischen den einzelnen Cystein-Resten ist entscheidend: *Recombinant Tick Anticoagulant Protein* (rTAP) (Antuch, Güntert et al. 1994), der von Zecken verwendet wird, um die Gerinnung des aufgesaugten Blutes zu verhindern, hat – bei ähnlicher Länge und ähnlichen Sekundärstrukturelementen wie bei BPTI – einige Deletionen zwischen den Resten Cys-14 und Cys-38 (abgebildet auf die Sequenz von BPTI). Dies führt dazu, daß die Konformation des Bereiches, der

bei BPTI die exponierte Schleife darstellt (Reste 11 bis 17, Abbildung 3), nicht in der Lage ist, das identifizierte Zielenzym, Faktor Xa, an dessen aktiven Zentrum zu binden. Wie genau dieser Inhibitor funktioniert, wird noch untersucht.

Alle anderen Inhibitoren des Kunitz-Typs haben zwischen den entsprechenden Cystein-Resten 14 und 38 (Numerierung nach BPTI) dieselbe Anzahl von Aminosäuren. Zusätzlich ist bei allen Kunitz-Inhibitoren ein Glycinrest direkt vor dem vierten Cystein zu finden (Antuch, Güntert et al. 1994).

Sequenz	1								2								3								4								5																									
	12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678																																																									
TFPI-2	K	P	D	F	C	F	L	E	E	D	P	G	I	C	R	G	Y	I	T	R	F	Y	N	N	Q	T	K	Q	C	E	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	M	N	N	F	E	T	L	E	E	C	K	N	I	C	E	D	G	
ShPI	S	I	C	S	E	P	K	K	V	G	R	C	K	G	Y	F	P	R	F	Y	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	Q	C	R	A	I	C	R	A			
BPTI	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	K	A	R	I	I	R	Y	F	Y	N	A	K	A	G	L	C	Q	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D	C	M	R	T	C	G	G	A
Toxin K	A	A	K	Y	C	K	L	P	L	R	I	G	P	C	K	R	K	I	P	S	F	Y	Y	K	W	K	A	K	Q	C	L	P	F	D	Y	S	G	C	G	N	A	N	R	F	K	T	I	E	E	C	R	R	T	C	V	G		
a-DTX	*Z	P	R	R	K	L	C	I	L	H	R	N	P	G	R	C	Y	D	K	I	P	A	F	Y	N	Q	K	K	Q	C	E	R	F	D	W	S	G	C	G	N	S	N	R	F	K	T	I	E	E	C	R	R	T	C	I	G		
APPI	V	R	E	V	C	S	E	Q	A	E	T	G	P	C	R	A	M	I	S	R	W	Y	F	D	V	T	E	G	K	C	A	P	F	F	Y	G	G	C	G	N	R	N	N	F	D	T	E	E	Y	C	M	A	V	C	G	S	A	



Abbildung 3: Sequenzvergleich verschiedener Inhibitoren vom Kunitz-Typ. Toxin K: Dendrotoxin Homolog K (*Z: 5-Oxoprolin). Sequenzen außer TFPI-2 aus (Antuch, Berndt et al. 1993).

Die Proteine vom Kunitz-Typ sind nur zu einem Teil Inhibitoren von Proteasen, die Schlangengifte (Dendrotoxine der Mamba) blockieren Kalium-Kanäle, die Inhibitor-Domäne aus dem Alzheimer Amyloid Protein (APPI (Kitaguchi, Takahashi et al. 1988)) hat keine inhibitorische Aufgabe.

2.1.2 Der Mechanismus der Inhibition

Fast alle Inhibitoren – und somit auch die Inhibitoren vom Kunitz-Typ – gehen nach folgender Reaktionsgleichung eine Bindung mit der entsprechenden Protease ein:



Dabei wird der stabile Komplex EI schnell geformt und die Dissoziation zu dem Enzym und einem Inhibitor, dessen peptidische Bindung zwischen P1 und P1' gebrochen wurde, erfolgt sehr langsam.

In den Komplexen mit den Proteasen nehmen die Inhibitoren eine Position ein, die derjenigen eines normalen Substrates entspricht. Bei Serinproteasen wie Trypsin bildet die Schleife des Inhibitors mit der zu schneidenden Bindung und die Umgebung des Serins, das zusammen mit Asparagin und Histidin die katalytischen Triade des Enzyms bildet, ein anti-paralleles β -Faltblatt über Wasserstoffbrückenbindungen bei P1, P3 und P2' (Fersht 1985; Stryer 1988; Bode and Huber 1992; Alberts, Bray et al. 1994). Das reaktive Zentrum (im Gegensatz zum *aktiven* Zentrum eines Enzyms) des Inhibitors liegt dann nahe bei den katalytisch wirksamen Resten der Protease, wobei die Carbonylgruppe des Restes P1 in Kontakt ($\sim 2.7 \text{ \AA}$) mit dem γ -Sauerstoff des Serins steht. Diese Carbonylgruppe zeigt in das Oxyanion-Loch, wo sie mit den Amidprotonen von Gly-193 und Ser-195 zwei Wasserstoffbrücken aufbaut. Der Amidstickstoff des P1-Restes zeigt in Richtung γ -Sauerstoff von Ser-195.

Im Komplex bleibt die peptidische Bindung zwischen den Resten P1 und P1' bestehen, lediglich eine leichte Deformation (*out-of-plane*) des Carbonylsauerstoffs ist in den Komplexen des BPTI mit Trypsin zu beobachten. Bei der Inhibierung kommt also der Mechanismus bereits vor Bildung des ersten tetraedrischen Übergangszustand (Stryer 1988; Daggett, Schröder et al. 1991) zum Stehen (Abbildung 4).

Ein Großteil der Reste um das reaktive Zentrum (*reactive site*) des Inhibitors gehen Wechselwirkungen – meist hydrophobe – mit der Umgebung des aktiven Zentrums der Protease ein. In Serinproteasen wie Trypsin und Chymotrypsin ist die wichtigste Wechselwirkung die des P1-Restes mit der Spezifitätstasche, der der aktiven Stelle des Enzyms benachbarten Einbuchtung, in der die Reste, die neben der zu schneidenden Bindung des Substrats angeordnet sind, zu liegen kommen. Diese Interaktion ist die hauptsächliche Ursache für die Aufnahme des Inhibitors in die katalytisch aktive Region. Sind die Reste an P1 zum Beispiel Lysin oder Arginin, so blockieren diese Inhibitoren Trypsin und Serinproteasen mit ähnlicher Spezifitätstasche (Stryer 1988; Alberts, Bray et al. 1994); der selektive Austausch eines P1-Restes kann bei gleichzeitiger Beibehaltung aller anderen Aminosäuren zu einer Änderung der Selektivität führen (Grzesiak, Helland et al. 2000).

Für die passende Umgebung für das „perfekte Substrat“ sind die Reste P2, P1' und P2' verantwortlich, die nicht mit den „tiefen“ Taschen des katalytischen Zentrums zusammenpassen müssen. Die anderen Reste der Schleife des Inhibitors, die in Kontakt mit der Protease kommen, bilden Wasserstoffbrücken aus, haben aber keinen strukturellen Einfluß auf die Umgebung des aktiven Zentrums (Bode and Huber

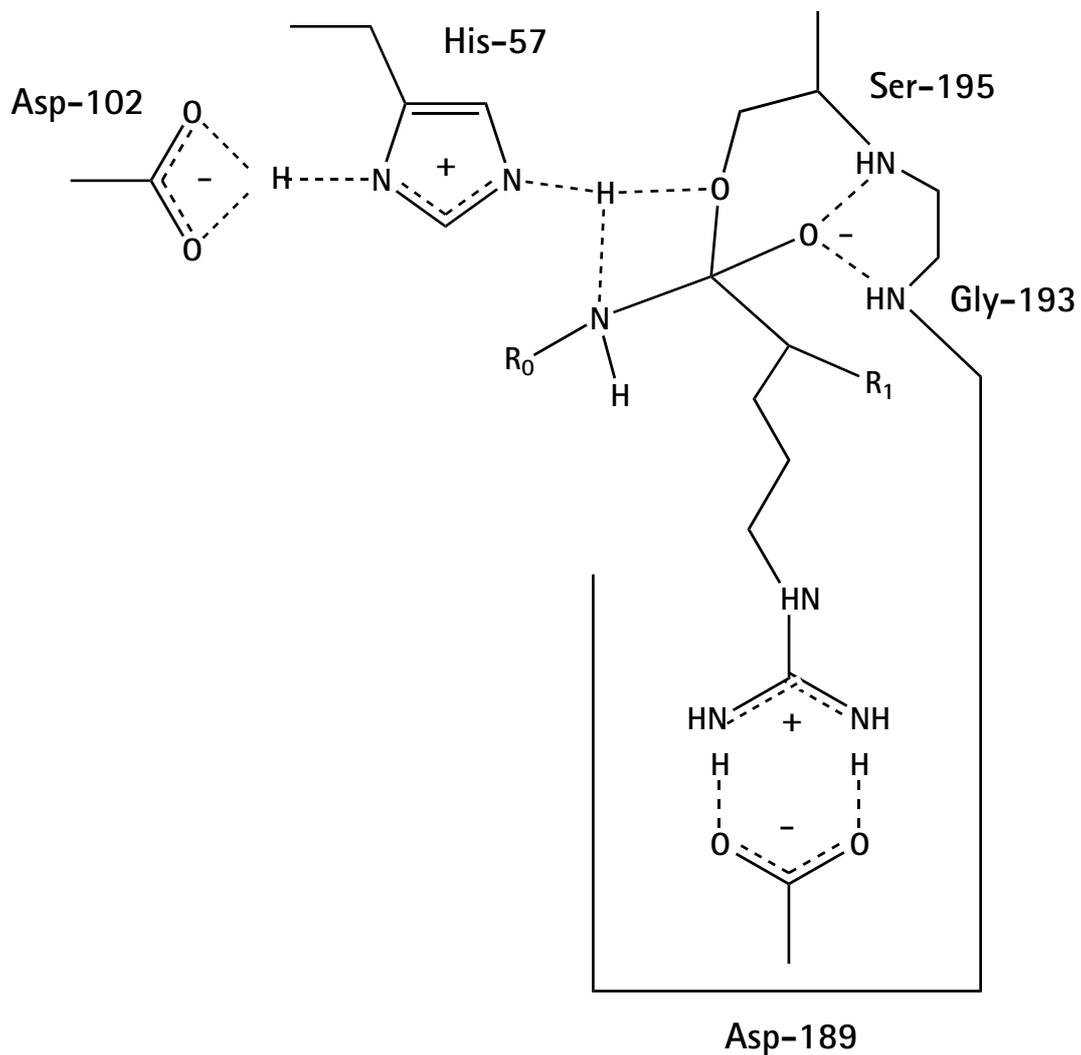


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Arg-15-Restes des Inhibitors in der Spezifitätstasche (Asp-189) von Trypsin. Nach (Corey und Craik 1992).

P3-P3'	Inhibitor	Enzym
PCKARI	BPTI	Trypsin
RCKGYF	ShPI	Trypsin
ICRGYI	TFPI-2	Trypsin
SCFGFV	Indian cobra	Chymotrypsin

P1

Abbildung 5: P3-P3'-Sequenzen verschiedener Kunitz-Inhibitoren. Indian Cobra: Schlangengift (Shafqat, Zaidi et al. 1990).

1992).

Neben diesen primären Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor gibt es

noch eine Reihe zusätzlicher Kontakte über ein bis zu vier Aminosäuren langes Segment. Diese Kontakte sind in den meisten Fällen nicht spezifisch und offenbar (Bode and Huber 1992) nicht vonnöten für die Stärke der Anbindung. Bei Proteasen mit sehr engen Öffnungen im Bereich des aktiven Zentrums, wie sie bei den Proteasen des Gerinnungssystems vorliegen, können diese sekundären Bindungsbereiche zu sterischen Behinderungen führen und so die Anbindung eines Inhibitors an eine Serinprotease, die von den Parametern in und um das aktive Zentrum passen würde, verhindern (Bode, Mayr et al. 1989) und so die Spezifität des Enzyms deutlich erhöhen.

Im Bereich der Anbindung des Inhibitors an das Enzym liegen die Proteinstränge genauso eng beieinander wie Aminosäuren im Innern von Proteinen oder in Aminosäurekristallen (Janin und Chothia 1990). Die Kontaktflächen sind grundsätzlich komplementär, die Ausbildung des *EI*-Komplexes (Gleichung 1) wird von nur sehr geringen Konformationsänderungen ($\sim 0,35$ nm Änderung der Standardabweichung (Bode, Papamokos et al. 1987; McPhalen und James 1988)) begleitet. Die Schleife des Inhibitors wird dabei „eingefroren“.

Eine Ausnahme bildet wahrscheinlich BPTI (Wlodawer, Deisenhofer et al. 1987), bei dem die Schleife bei der Einlagerung in die *active site* des Trypsins strukturell verändert wird; etwas ähnliches berichten Burgering et al. über die zweite Domäne des TFPI (Burgering, Orbons et al. 1997).

Das gute Ineinanderverschließen von Inhibitor und Protease erklärt lediglich zu einem Teil die Stärke der Bindung. Eine Stabilisierung kann aus dem Gerüst des Inhibitors abgeleitet werden: Der Unterschied zwischen einem bindenden vollständigen Inhibitor und der Schleifenregion allein beträgt bei Ovomuroid-Inhibitor 33 kJ/Mol (Abbildung 6).

Die Summe dieser stabilisierenden Wechselwirkungen scheint die Deformation des aktiven Zentrums der Protease zu behindern. Diese Deformation ist aber notwendig, um die Spaltung der peptidischen Bindung zu vervollständigen (James, Sielecki et al. 1980). Dadurch wird die katalytische Spaltung drastisch verlangsamt, was aber insgesamt eher ein Seiteneffekt ist und nicht den Hauptteil der inhibitorischen Wirkung des Inhibitors ausmacht.

Der stabile Komplex liegt in einer energetischen Senke, die nur eine langsame Dissoziation zu den Produkten erlaubt. Die Höhe der energetischen Barriere kann variieren, sie ist keine allein über die Struktur des Inhibitors zu erklärende Größe, sondern auch von der Struktur der Protease und natürlich der Struktur des Inhibitor/Protease-Komplexes (Nolte und Neumann 1978) abhängig.

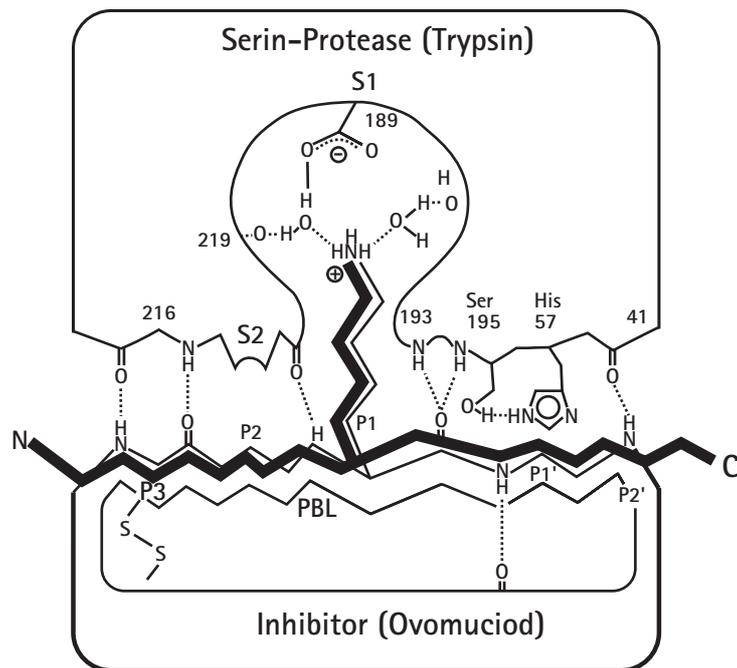


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Inhibierung durch eine Substrat-ähnliche Anbindung eines Inhibitors (Ovomuciod) an eine Serinprotease (Trypsin). Die dicke Linie stellt ein beliebiges Substrat dar. PBL: Primary Binding Loop (nach (Bode and Huber 1992)).

Die Hydrolyse der Bindung P1-P1' besitzt eine K_{hyd} von ungefähr 1 (Bode and Huber 1992) bei physiologischem pH. Damit handelt es sich weder eindeutig um eine Produkt- noch eine Substratinhibition. Das, was einen Inhibitor zu einem Inhibitor macht, ist die starke Bindung der *active site*, die geringen sterischen Änderungen bei der Einlagerung des Inhibitors und des „Einfrierens“ (Bode and Huber 1992) der Region. Dieses Einfrieren behindert die notwendige Konformationsänderung bei dem Ablösen des Produktes aus der *active site* des Enzyms.

2.1.3 Vorkommen der Kunitz-Inhibitoren

So wie die Serinproteasen, kommen Kunitz-Inhibitoren sowohl in Pflanzen als auch in Tieren – in allen Gattungen, also auch in Mollusken und z. B. der Seeschildkröte – vor (Laskowski and Kato 1980). Dabei treten die Moleküle nicht zwangsläufig als Inhibitoren in Erscheinung.

Interessanterweise ist die genaue physiologische Funktion des bekanntesten Vertreters der Kunitz-Inhibitoren, BPTI, nicht bekannt. Ein homologer Inhibitor im Darmtrakt von Rindern und Schafen, glycosiliert an Asn-25, hat BPTI möglicherweise die Aufgabe, Antikörper gegen den Verdauung durch Trypsin zu schützen (Las-

kowski and Kato 1980).

Bei Schlangen sind eine Vielzahl von Inhibitoren im Gift zu finden. Allein im Gift der schwarzen Mamba sind drei Kunitz-Inhibitoren, die Toxine I, E und K. Weder Toxin I noch Toxin K inhibieren Trypsin. β -Bungarotrypsin besteht aus zwei Strängen, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind; der erste Strang ist homolog zu Phospholipase A, der andere Strang ist homolog zu Kunitz-Inhibitoren.

Im Menschen sind keine isolierten Inhibitoren dieses Typs bekannt. Sie treten in Form von Multidomänenproteinen auf oder sind Teil eines größeren Proteins. Es wird angenommen, daß die Domänen als unabhängige Einheiten wirken können. Zu den im menschlichen Organismus gefundenen Kunitz-Inhibitor-domänen gehören die zwei des inter- α -Trypsin-Inhibitor und natürlich die drei Domänen des TFPI; je eine Domäne, die aber nicht als Inhibitor arbeitet, findet sich im Alzheimer Amyloid β -Protein Vorläufer (APP)² (Kitaguchi, Takahashi et al. 1988; Tanzi, McClatchey et al. 1988; Li, Berndt et al. 1994) und im Kollagen Typ VI.

Aus dem dargelegten geht hervor, daß das Gen für Inhibitoren vom Kunitz-Typ nicht nur sehr alt (das Gen des „Urahns“ der Kunitz-Inhibitoren trat vor etwa 500 mio. Jahren auf (Ikeo, Takahashi et al. 1992)), sondern auch sehr weit verbreitet ist. Es muß bereits bei der Entstehung erster multizellulärer Lebewesen vorhanden gewesen sein (Laskowski and Kato 1980).

Publiziert sind inzwischen über 74 Primärsequenzen, die sich in Untertypen einteilen lassen (Pritchard und Dufton 1999):

- Inter- α -Trypsin Inhibitor, Domäne 1
- Inter- α -Trypsin Inhibitor, Domäne 2
- Calcium-Kanal Blocker der Seeanemone
- nichttoxische Kunitz-Proteine der Seeanemone
- TFPI-1, TFPI-2 und TFPI-3
- nicht neurotoxische Schlangengifte
- neurotoxische Schlangengifte
- Domäne im *Alzheimer's Amyloid Protein Precursor*
- β -Bungarotoxin, Kette B
- BPTI

². Die Kunitzdomäne des APP, das APPI (Amyloid Precursor Protein Inhibitor)

Blutgerinnung

Die Evolution, so die Autoren, sei bei der Diversifikation in zwei Schritten vorgegangen: In einem ersten Schritt kam es irgendwann zu einer Entwicklung von Proteinen mit einer bestimmten *Target*-Familie an Proteinen, also z. B. Serin-Proteasen oder Ionen-Kanälen.

In einem zweiten Schritt kam zu einer Diversifikation der Proteine vom Kunitz-Typ in Richtung auf spezielle *Targets* innerhalb der Klassen.

Pritchard et al. (Pritchard and Dufton 1999) unterscheiden daher zwischen strukturellen und funktionalen Anteilen der Entwicklung.

2.2 Blutgerinnung

Das Blut (Keidel 1985; Mutschler und Vaupel 1989; Silbernagel und Despopoulos 1991) ist das Transportmittel, das auf den Wegen des Kreislaufs Stoffe transportiert. Es sind dies:

- Nahrungsstoffe und deren Abbauprodukte,
- Wirkstoffe wie Vitamine, Hormone und Enzyme,
- Signalstoffe, also Hormone,
- Abwehrstoffe (z. B. Antikörper) und
- Gase (Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid).

Auch für die Versorgung des Körpers mit Wärme ist das Blut „Transportmittel“.

Blut besitzt eine Reihe von Eigenfunktionen, so die Blutgerinnung, die Pufferung und es übernimmt – teilweise – Abwehrfunktionen.

Der rote Blutfarbstoff, an den O₂ bindet, macht mit weitem Abstand den größten Anteil aus – nach Wasser. Die zweitgrößte Fraktion stellen mit 3,5% die Eiweiße im nichtzellulären Anteil des Blutes, dem Plasma, dar. Sie haben vielfältige Funktionen, neben dem Wassertransport sind dies die Proteine der Abwehr- und Gerinnungsfunktion. Alle anderen Substanzen – organische wie anorganische – machen nur noch 2% des Blutes aus.

2.2.1 Blutstillung

Im wesentlichen beteiligen sich am lebenswichtigen Vorgang der Blutstillung

- die Blutgefäße,
- die Blutplättchen und
- die eigentliche Blutgerinnung.

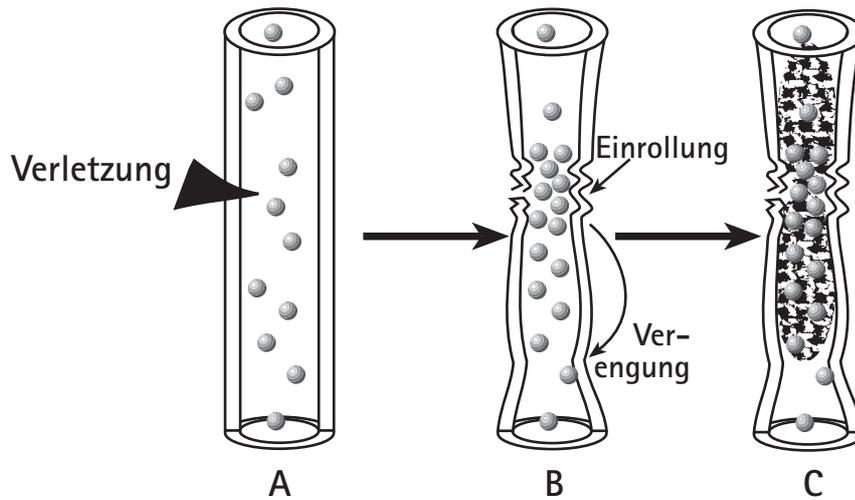


Abbildung 7: Vorgänge bei einer Verletzung eines Gefäßes. Graue Kugeln: Thrombozyten, Muster: Fibrinnetz. Nach (Silbernagel and Despopoulos 1991).

Der Verschluss einer Punctionsstelle eines größeren Gefäßes erfolgt über die Wandspannung der Gefäße, ähnlich wie in einem „schlauchlosen Autoreifen“ (Keidel 1985). Blutplättchen (Thrombozyten) heften sich sofort nach einer Verletzung (A in Abbildung 7) an die Bindegewebsfasern der Wundränder und verschließen die Wunde. Gleichzeitig werden Substanzen abgegeben, die zur Verengung des Gefäßes und zu einer Einrollung der Gefäßwände (B) führen. Dieser erste Thrombozytenpfropf (weißer Thrombus) dichtet ein Leck zwar innerhalb weniger Minuten ab, ist allerdings nicht stabil genug, um die Wunde dauerhaft zu verschließen. Die notwendige Festigkeit erhält der Wundpfropf erst durch die bei der eigentlichen Blutgerinnung entstehenden Fibrinfäden, von denen der Pfropf netzartig durchspannt wird (C). Diesen Vorgängen schließt sich die Nachgerinnung an, bei der die Fibrinfäden kontrahieren und so die Wundränder zueinander geführt werden, damit sie verheilen können.

2.2.2 Die Blutgerinnung

Die Blutgerinnung besteht aus einer Kette enzymatischer Reaktionen, in deren Verlauf Proenzyme, also Vorläufer proteolytisch aktiver Proteine, in ihre aktiven Formen überführt werden, die dann ihrerseits wieder Proenzyme aktivieren. Die kaskadenartig ablaufenden Reaktionen führen schließlich zur Bildung des Enzyms Thrombin, das in der Folge Fibrinogen, ein lösliches Plasmaprotein, in Fibrinmonomere umwandelt. Diese Fibrinmonomere polymerisieren spontan zu einem Fasernetz, dem Fibrin.

2.2.2.1 Historische Betrachtungen

Bei den ersten systematischen Untersuchungen zur Blutgerinnung zeigt es sich, daß die Gerinnung frischen Blutes deutlich beschleunigt wird, wenn man es mit zerstörtem Gewebe zusammen bringt. Daher muß es im Gewebe eine Substanz geben, die zunächst als Gewebsthromboplastin bezeichnet wird; heute ist der Name Gewebsfaktor (von engl.: *Tissue Factor*, TF) geläufig. Dieser Gewebsfaktor ist nicht im Blut selbst vorhanden, er muß von außen in das Blut kommen, um die Gerinnung zu starten. Dieser Verlauf der Bildung eines Fibrinpfropfs wird als exogener oder extravaskulärer Weg (engl.: *extrinsic pathway*: äußerlich, von außen) der Gerinnung bezeichnet.

In weiteren Experimenten zeigt es sich, daß Blut bereits dann gerinnt, wenn man es in einen Glasbehälter gibt, wenn es mit einer Oberfläche in Kontakt kommt, die nicht der Innenseite eines Blutgefäßes entspricht. Folglich müssen alle Komponenten, die dabei zur Auslösung der Gerinnung führen, bereits im Blut vorhanden sein; dieser Reaktionsweg wird seither als endogen (engl.: *intrinsic pathway*: innerlich, von innen) bezeichnet.

Heute wird der anglo-amerikanische Sprachgebrauch oft übernommen, man spricht dann von dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg der Gerinnung.

Aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten der beiden Gerinnungswege wird in den ersten Publikationen zunächst angenommen, daß der exogene Weg der entscheidende sei. Diese Meinung wird mit dem fortschreitenden Wissen um Hämophilie (Bluterkrankheit) geändert, da im Blut hämophiler Personen keine offensichtlichen Defekte der exogenen Gerinnungskaskade feststellbar sind. Also wird die endogene Koagulation als wichtigerer Weg zum Gerinnsel angesehen, als die Kaskadentheorie publiziert wird; die exogene Gerinnung sei nurmehr zweitrangig.

1964 wird die Kaskadentheorie von zwei Gruppen – eine englische, die in *Nature* (MacFarlane 1964) und eine amerikanische, die in *Science* (Davie und Ratnoff 1964) publiziert – veröffentlicht, die die endogene Gerinnungskaskade – im Prinzip und von der Reihenfolge der Aktivierungen – richtig wiedergibt. Der exogene Weg der Gerinnung kommt in diesen Publikationen – passend zur herrschenden Meinung – nur am Rande vor, MacFarlane (MacFarlane 1964) schreibt lediglich: „*Factor X can also be activated by tissue factor in the presence of factor VII.*“

MacFarlane versucht auch die Frage nach der großen Anzahl an Schritten der intrinsischen Gerinnungskaskade zu beantworten: Die Effizienz der Gerinnung hängt entscheidend von der augenblicklichen Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin ab, die wiederum auf der „explosiven“ (MacFarlane 1964) Aktivierung von Thrombin

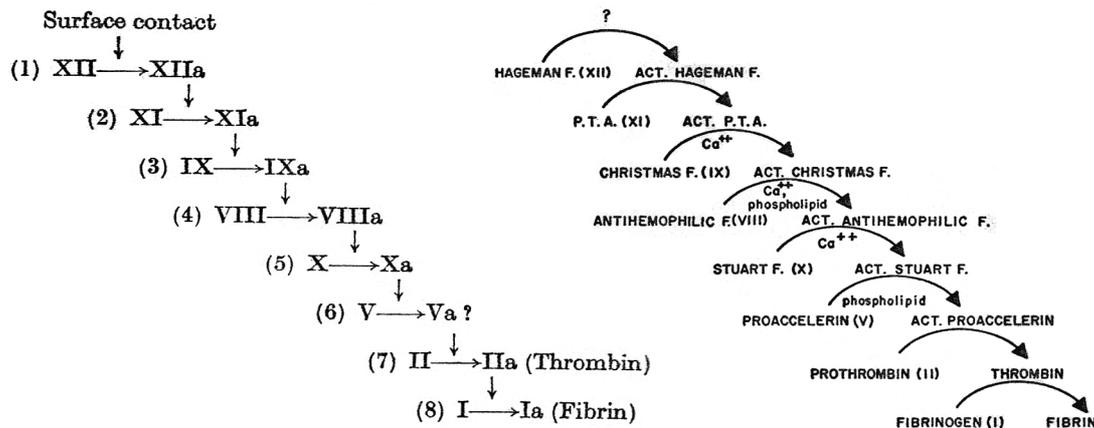


Abbildung 8: Die endogene Gerinnungskaskade. Links aus (MacFarlane 1964), rechts aus (Davie and Ratnoff 1964).

beruht; eine langsamere Erzeugung von Thrombin sei ineffektiv. Würde in der intrinsischen Kaskade jedes Enzymmolekül zehn Proenzyme der nächsten Stufe aktivieren, so resultierte dies – so die Veröffentlichung von 1964 – in einem Faktor von 10^6 von der ersten Stufe der Aktivierung bis zur Stufe des Thrombins.

Ende der siebziger Jahre kommt es dann wieder zu einem Meinungswechsel, da bei einigen Patienten beobachtet wurde, daß einige der Faktoren der Gerinnungskaskade, die im endogenen Weg die Gerinnung durch den Kontakt zu unphysiologischen Oberflächen (Kontaktfaktoren) auslösen, fehlen und diese Patienten dennoch nicht an Hämophilie leiden. Zu diesen Beobachtungen kommt noch das Ergebnis einer Untersuchung von Østerud & Rapaport (Østerud und Rapaport 1977), die zeigt, daß der Komplex aus Faktor VIIa und Gewebefaktor nicht nur Faktor X in Faktor Xa umwandelt, sondern auch Faktor IX aus dem endogenen Weg aktiviert, somit also die Möglichkeit der Umgehung des endogenen Weges besteht und daß das Vorhandensein der Kontaktfaktoren (Faktor XII, Faktor XI, Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen) nicht zwingende Voraussetzung für die Produktion des aktivierten Faktors XI ist.

Nach dem heutigen Stand der Dinge wird davon ausgegangen, daß der Vorgang der Gerinnung nicht mehr in zwei diskrete Wege zu unterteilen ist, daß die gegenseitige Beeinflussung und Aktivierung der Faktoren diese Trennung in entscheidenden Bereichen aufhebt. Die modernen Betrachtungen über die Gerinnungskaskaden verzichten daher auf eine Wertung, wonach einer der Wege wichtiger sei als der andere.

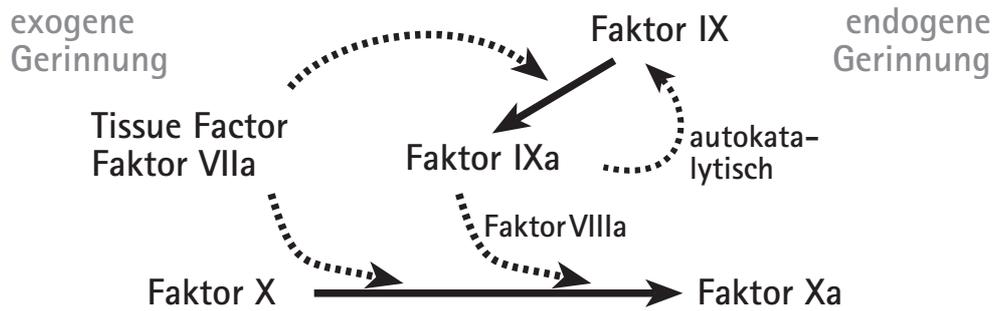


Abbildung 9: Schematische Darstellung der doppelten Rolle des Komplexes Gewebefaktor/Faktor VIIa; gestrichelte Linie: „wirkt aktivierend auf“.

2.2.2.2 Struktur und Aufbau der beteiligten Proteine

Die Proteine der Gerinnung bauen sich aus einem Pool von Proteinmodulen auf, die in unterschiedlicher Reihenfolge zusammengesetzt sind (Patthy 1993). So besitzen Faktor VII, IX, und X neben ihren katalytischen Domänen eine Vitamin-K-abhängige Calziumbindungsstelle und eine Region, die einem Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) ähnelt; Prothrombin baut sich ebenfalls aus einer Vitamin-K-abhängigen Calziumbindungsstelle und einer *Kringle*-Domäne auf, die der katalytischen Domäne vorgeschaltet sind. Diese Beobachtungen geben Anlaß

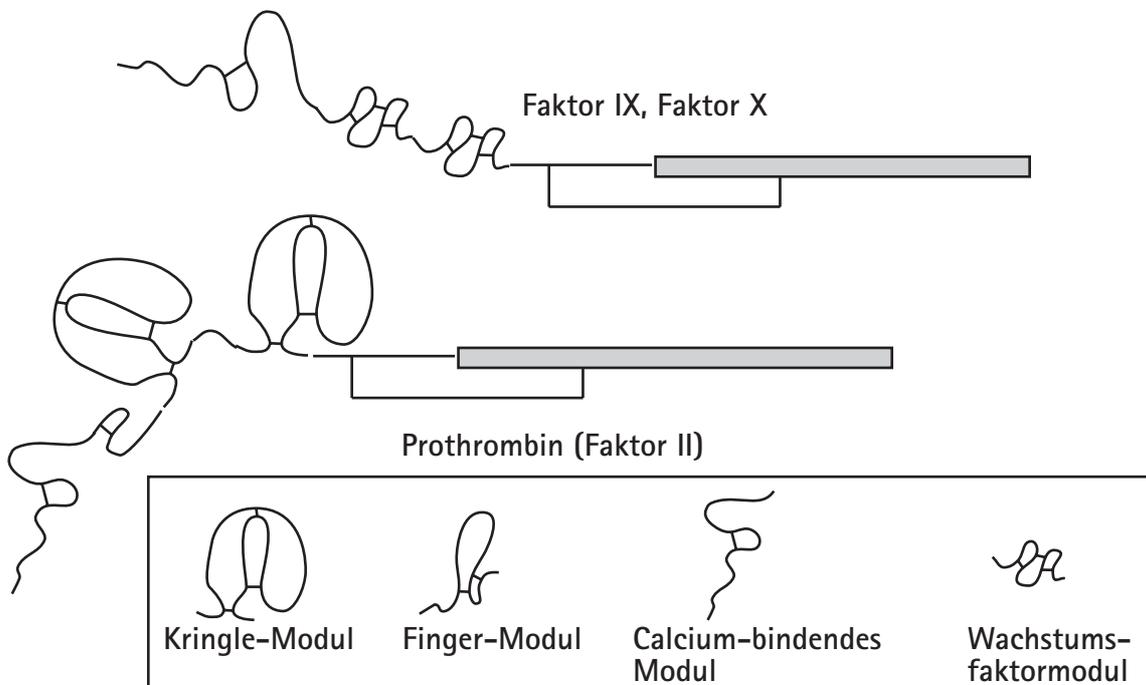


Abbildung 10: Modularer Aufbau einiger Gerinnungsfaktoren. Nach (Patthy 1993).

zu der Hypothese, daß die nicht proteolytisch wirksamen Teile der genannten Proteasen der Blutgerinnung im Laufe der Evolution zwischen das *N*-terminale Signalpeptid des Zymogens und deren katalytisch aktiver Region eingeschoben wurden. Der Schluß liegt nahe, daß die gemeinsamen Ahnen der Regulationsproteine nicht nur der Blutgerinnung, sondern auch des Komplementsystems und der Fibrinolyse, einfache, dem Trypsin ähnliche Proteasen (Patthy 1993) waren. Die eingeschobenen Domänen dienen der Wechselwirkung mit makroskopischen Strukturen, Cofaktoren, Substraten und Inhibitoren, die die Aktivität und die Aktivierung der Zymogene regulieren.

2.2.3 Der exogene Weg der Gerinnung

Die Reaktionen, die über den exogenen Weg der Gerinnung zur Bildung eines Fibrinpfropfs führen, verlaufen innerhalb von Sekunden. Innerhalb des exogenen Systems wird Faktor VII durch seinen spezifischen Aktivator, den Gewebefaktor aus den verletzten Zellen, der nun im Kontakt mit dem Blut steht, in seine aktive Form (Faktor VII(a)) überführt; Faktor VII(a) verbindet sich dann unter Mitwirkung von Calcium mit Phospholipiden der verletzten Gewebszellen. Dieser Komplex stellt den Aktivator des exogenen Systems dar (Broze Jr. 1995).

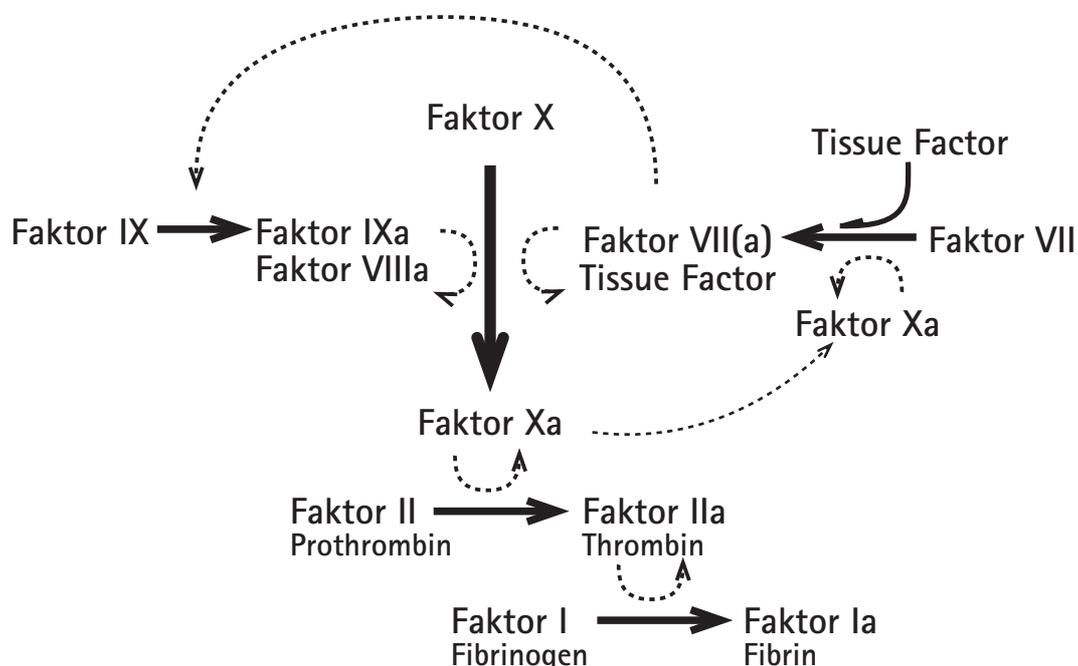


Abbildung 11: Extravaskulärer Weg der Gerinnung. Zu beachten ist die Aktivierung des Faktors IX, der – eigentlich – dem intravaskulären Weg der Gerinnung zugeordnet wird. Nach (Broze Jr. 1992; Broze Jr. 1995).

2.2.3.1 Faktor VII(a)

Der Faktor VII (Broze Jr. und Majerus 1982; Silbernagel and Despopoulos 1991) im menschlichen Plasma ist ein einkettiges Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 48.000 Einheiten, von denen etwa 40.000 auf das Protein und der Rest auf die Kohlenhydrate entfallen. Die Konzentration im Blut liegt bei etwa 10 nM. Hauptsächlich wird es in der Leber produziert, zur vollen Funktionalität gelangt es durch die Carboxylierung von 10 Glutaminsäuren in der Nähe des *N*-Terminus. Faktor VII ist ein Zymogen, ein Vorläufer der Serinprotease Faktor VIIa.

In seine aktive Form, Faktor VIIa, wird dieses Proenzym durch Faktor Xa³, Thrombin oder Faktor IXa in Gegenwart von Phospholipiden und Calcium und – ohne weitere Cofaktoren – durch Faktor XIIa (Broze Jr. and Majerus 1982) gebracht. Dabei wird das einsträngige Molekül in ein zweisträngiges Protein zwischen Arg-152 und Ile-153 gespalten. Die beiden Stränge sind über eine Disulfidbrücke verknüpft und weisen Molekulargewichte von etwa 20.000 beziehungsweise 28.000 Einheiten auf. Die enzymatische Aktivität von Faktor VIIa, die Aktivierung der Zymogene Faktor X und Faktor IX, wird um ein vieltausendfaches ($\sim 10^5$ -fach (Østerud and Rapaport 1977)) durch die Präsenz des spezifischen Cofaktors, des Gewebefaktors, erhöht. Der Unterschied in der Aktivität ist so groß, daß Faktor VIIa frei im Blut fließen kann, ohne daß dies einen Risikofaktor für Thrombose darstellen würde (Broze Jr. and Majerus 1982).

Sowohl Faktor VII als auch Faktor VIIa binden mit ähnlichen Affinitäten an Gewebefaktor in der Anwesenheit von Calciumionen. Im Komplex mit dem Gewebefaktor wird Faktor VII im Gegensatz zu freiem Faktor VII durch kleinste Konzentrationen (*trace concentrations*) (Broze Jr. and Majerus 1982) von Faktor Xa in Faktor VIIa umgewandelt.

Der Gerinnungsfaktor VII aktiviert in Gegenwart von Gewebefaktor und Calcium Faktor X zu Faktor Xa. Wie Østerud und Rapaport (Østerud and Rapaport 1977) zeigen konnten, aktiviert das Reaktionsprodukt aus Faktor VII(a) und Gewebefaktor außerdem Faktor IX zu Faktor IXa, ein Vorgang, der eigentlich dem intrinsischen Weg der Gerinnung zugeordnet ist.

2.2.3.2 Gewebefaktor

Der Gewebefaktor (engl.: *Tissue Factor*, TF) (Jesty und Silverberg 1979; Edgington, Ruf et al. 1991; Camerer, Kolstø et al. 1996; McVey 1999), auch Thromboplasmin

³ Die Aktivierung von Faktor X erfolgt durch den *Komplex* von TF und Faktor VII bzw. VIIa. Faktor Xa aktiviert dann Faktor VII zu VIIa.

oder Gewebsthrombokinase genannt und in der Nomenklatur der Gerinnungsfaktoren Faktor III, hat beim Menschen ein Molgewicht von etwa 45.000 Dalton. Es handelt sich um ein einkettiges, membranständiges Protein. Synthetisiert wird es in Zellen, die normalerweise keinerlei Kontakt zum Plasma haben, beispielsweise Bindegewebszellen (Fibroblasten) und glatten Muskelzellen.

Um die Blutgerinnung *in vivo* am Ort der Wunde auszulösen, muß Gewebsfaktor mit dem im Plasma vorhandenen Faktor VII bzw. Faktor VIIa zusammenkommen (Silbernagel and Despopoulos 1991). Es wirkt dann im wesentlichen als Cofaktor der Protease Faktor VIIa. Die Endothelzellen, die die Wände der Adern auskleiden, produzieren normalerweise keinen Gewebsfaktor, allerdings können sie durch z. B. Stimuli wie etwa das lösliche Protein C5a aus dem Komplementsystem, durch Immunkomplexe oder den *Tumor Necrosis Factor* dazu angeregt werden (Broze Jr. 1995). Diese von außen angeregte Synthese könnte der Grund für einige pathologische Erscheinungen im Zusammenhang mit einer gestörten Gerinnung mit thrombotischen Erscheinungen sein (Bauer und Rosenberg 1987).

2.2.3.3 Der weitere Verlauf

Der Komplex aktiviert durch Proteolyse sowohl Faktor X als auch Faktor IX, wobei Faktor X das bevorzugte Substrat zu sein scheint. Um Faktor IX zu aktivieren, muß eine Proteolyse an zwei Stellen erfolgen. Lawson und Mann konnten (Lawson und Mann 1991) zeigen, daß die Aktivierung des – eigentlich dem intrinsischen Gerinnungsweg zugeordneten – Faktor IX durch den katalytisch aktiven Komplex aus Gewebsfaktor und Faktor VIIa gelingt.

Bemerkenswert ist die lange Lebensdauer des aktivierten Faktors VII (Faktor VIIa), sie ist beinahe so lang wie die des nichtaktivierten Faktors. Die Inhibierung der Serinprotease durch Antithrombin III, ein in der Leber synthetisiertes, etwa 64 kDa schweres körpereigenes Protein, das die Gerinnung hemmt (Forth 1987), erfolgt sehr langsam. Daraus folgt, daß die Regulation der durch den Gewebsfaktor ausgelösten Gerinnung nicht durch den Abbau von Faktor VIIa gelingt. Wahrscheinlich ist TFPI, das den katalytisch aktiven Komplex der Protease mit Gewebsfaktor inhibiert, das Schlüsselmolekül der Kontrolle des extravaskulären Weges der Blutgerinnung.

2.2.4 Das intravaskuläre System der Gerinnung

Der intravaskuläre Weg (Keidel 1985; Silbernagel and Despopoulos 1991; Broze Jr. 1995) der Gerinnung (*intrinsic pathway*) kommt – wie erwähnt – ohne äußere Substanzen aus.

In vivo aktiviert sich als erstes das Proenzym Faktor XII (Hagemann-Faktor) dadurch, daß es an nach einer Verletzung vorliegende Oberflächen und Partikel anhaftet, wie etwa der Grenzschicht zwischen Gefäßwand und Bindegewebe (Basalmembran), Zellfragmente oder Kollagen. Weitere aktivierende Enzyme sind Kallikrein, Thrombin, Plasmin und auch Trypsin. Der aktivierte Faktor XII (Faktor XIIa) wirkt dann auf drei Systeme:

- das Gerinnungssystem über die Aktivierung des Faktors IX,
- das fibrinolytische System, indem Plasmin aktiviert wird, das neben Fibrinogen auch die Faktoren V und VIII inaktiviert (Pschyrembel 1986),
- und das Kinin-System, das regulierend auf die Weite und Durchlässigkeit von Gefäßen wirkt (Pschyrembel 1986).

Der aktive Faktor IX, Faktor IXa, aktiviert seinerseits den von Vitamin K abhängigen Faktor XI zu Faktor XIa. Diese Reaktion ist von der Gegenwart von Calciumionen abhängig.

Faktor XIa aktiviert dann Faktor X zu Faktor Xa, hier also laufen die beiden Wege der Gerinnung zusammen.

Die Aktivierung von Faktor X über Faktor IXa wird erheblich beschleunigt, wenn sogenannte Acceleratorglobuline anwesend ist, die keine eigene enzymatische Aktivität haben. Faktor VIII, ein solcher „Beschleuniger“, bildet zusammen mit Faktor IXa einen Komplex auf einer Phospholipidmatrix, der dann effektiv Faktor X aktivieren kann.

2.2.5 Faktor X

Faktor X, ein Glycoprotein, kann auf zwei Wegen zu seiner katalytisch aktiven Form überführt werden, zum einen ausgehend vom intravaskulären Weg der Gerinnung durch Faktor IXa (Abbildung 12) und zum anderen im Rahmen des exogenen Weges der Gerinnung durch den Komplex aus Gewebefaktor und Faktor VIIa (Abbildung 11). Als Aktivator des Prothrombins in dessen aktive Form, Thrombin, kommt Faktor Xa eine Schlüsselposition innerhalb der Gerinnungskaskade zu. So beruht die gefährliche Hämophilie vom Typ C auf einem Mangel an Faktor X. Hämophilie Typ B (*Christmas Disease*) liegt vor, wenn ein Mangel an Faktor IX besteht, Typ A bei Faktor VIII-Mangel (Pschyrembel 1986).

Diesen Schlüssel der Gerinnung zu kontrollieren, sei es über den Katabolismus oder über Proteinaseinhibitoren, ist von großen medizinischen Interesse.

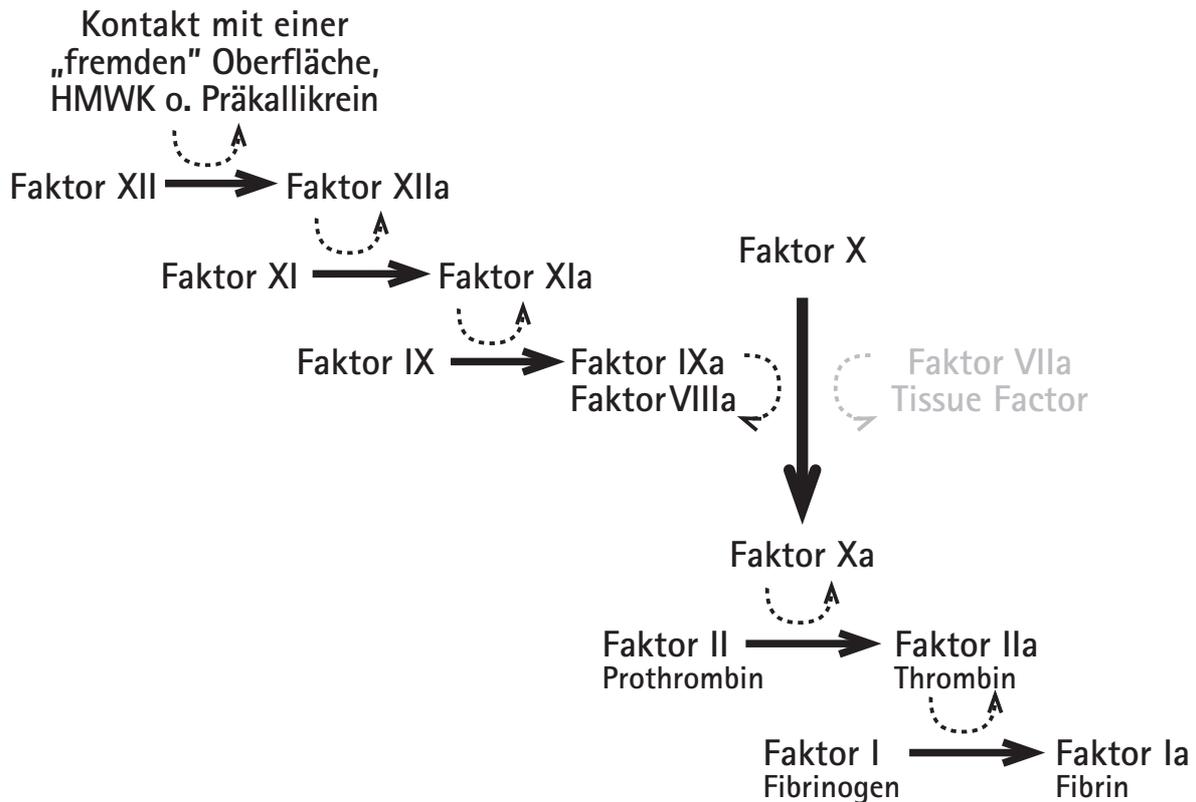


Abbildung 12: Intravaskulärer Weg der Gerinnung. Nach (Broze Jr. 1992; Broze Jr. 1995).

Über den Abbau der aktiven Protease ist nur wenig bekannt; dagegen sind einige Inhibitoren bekannt, die effektiv die Aktivität von Faktor Xa unterbinden. Neben TFPI sind dies:

- α_1 -Antitrypsin (Colman, Scott et al. 1982)
- α_2 -Macroglobulin (Jackson und Nemerson 1980)
- und Antithrombin III (Kurachi, Fujikawa et al. 1976)

2.2.5.1 Aufbau von Faktor X und Xa

Faktor X ist ein von Vitamin K abhängiges Glycoprotein mit einer Molmasse von etwa 59 kDa. Das Zymogen wird in der Leber synthetisiert und in das Blut gegeben. Vor der Sekretion in das Blut wird das Protein modifiziert, so werden 11 Glutaminsäuren γ -carboxyliert, Asp-63 wird β -hydroxyliert und zwei Seitenketten werden *N*-glycolysiert.

Faktor X (Padmanabhan, Padmanabhan et al. 1993; Brandstetter, Kühne et al. 1996) besteht nach Spaltungen an Arg-139 und Arg-142 aus zwei Ketten, einer

leichteren (*light chain*) mit 139 Aminosäuren und einer schweren Kette (*heavy chain*) aus 303 Aminosäuren, die beide über eine einzelne Disulfidbrücke verbunden sind. Die *N*-terminale Region der *light chain* enthält die oben genannten 11 γ -carboxyl-Glutaminsäuren, diese Region weist zudem eine hohe Homologie zu den *N*-terminalen Bereichen anderer Vitamin K-abhängigen Proteine aus der Blutgerinnungskaskade auf.

Die modifizierten Glutaminsäuren sind für die Bindung an Phospholipide und an Calcium verantwortlich.

Auf diese Bereiche folgen zwei Regionen homolog zu epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF, *epidermal growth factor*), ähnlich wie bei Faktor VII und Faktor IX. Es ist möglich, daß die zweite EGF-Region die Bindung von Faktor X an Faktor VIIIa/Faktor Va vermittelt, möglicherweise in Zusammenarbeit mit der ersten EGF-Region (Brandstetter, Kühne et al. 1996).

Die schwere Kette von Faktor X enthält die (inaktive) katalytische Triade aus His-236, Asp-279 und Ser-376 (diesen Aminosäuren entspricht in der Chymotrypsin-Nomenklatur His-57, Asp-102 und Ser-195). Insgesamt weist diese Kette Homologien zu anderen Serinproteasen auf, insbesondere zu Faktor IX, Protein C und Prothrombin.

Während der Gerinnung wird aus dem inaktiven Zymogen durch katalytische Proteolyse durch Faktor VIIa/Gewebefaktor (exogener Pfad der Blutgerinnung) oder durch den Komplex aus Faktor IXa/Faktor VIIIa (endogener Pfad der Gerinnung) der aktive Faktor X (Faktor Xa). Gespalten wird die Peptidbindung zwischen Arg-52 und Ile-53. Das nun *N*-terminale Isoleucin faltet sich, wie bei Trypsin, Thrombin und Chymotrypsin in das Innere des Proteins und formt dort eine ionische Bindung (*ion pair*) mit der Asparaginsäure neben dem Serin der katalytischen Triade.

2.2.5.2 Aufgaben des Faktors Xa

In Gegenwart von Calciumionen assoziiert Faktor Xa mit seinem (nicht enzymtisch wirksamen) Cofaktor, Faktor Va, an Phospholipiden. Dieser Komplex formt eine Prothrombinase, die Faktor II (Prothrombin) über eine begrenzte Proteolyse in Thrombin (Faktor IIa) umwandelt. Dabei werden zwei interne Peptidbindungen (Arg-271/Thr-272 und Arg-320/Ile-321) geschnitten, die das Gewicht des Prothrombins von 71.600 auf die 39.000 Dalton des Thrombins reduzieren.

Die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa und die anschließende Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin verläuft mit k_{cat}/K_m von 7 bzw. $2 \cdot 10^9$ für die beiden proteolytischen Spaltungen.

Faktor Xa wirkt auch auf weitere an der Blutgerinnung beteiligte Proteine, so ak-

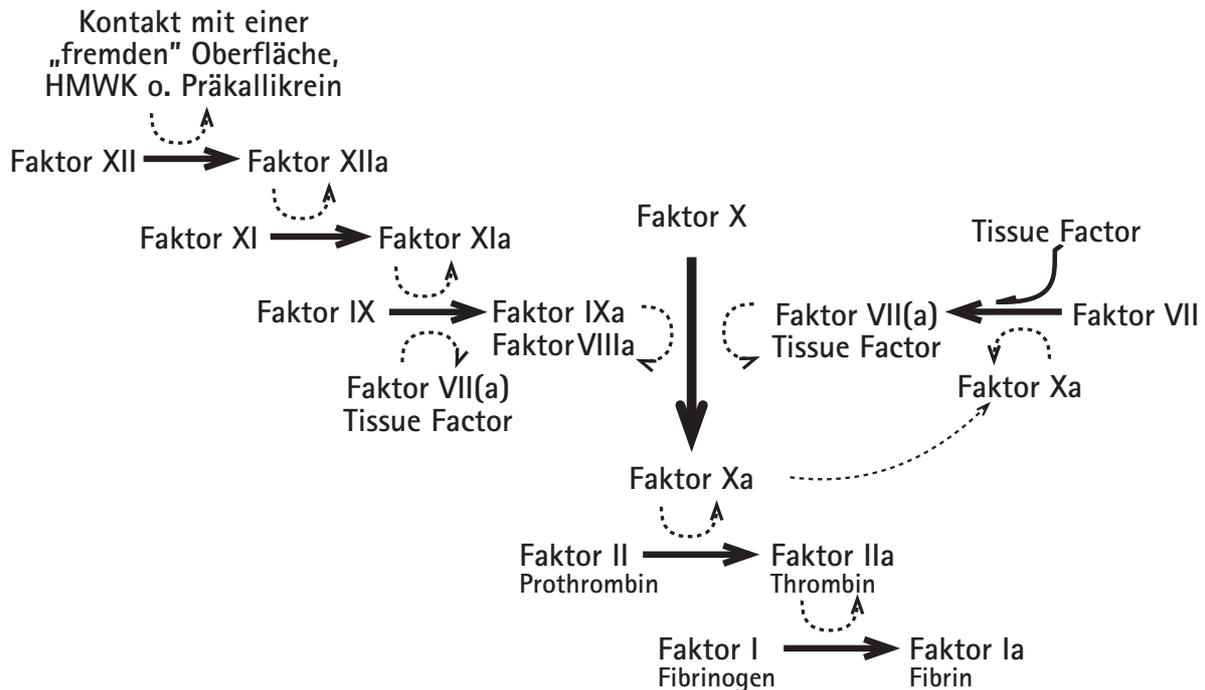


Abbildung 13: Gesamtdarstellung des Gerinnungssystems.

tiviert die Protease die Faktoren V und VII, mittelbar ist er an der Umwandlung von Faktor IX zu Faktor IXa beteiligt.

Faktor IX wird im endogenen Weg der Gerinnung durch Faktor XIa aktiviert; allerdings wird ein erheblicher Anteil des Faktor IXa durch die proteolytische Aktivität des Komplexes Gewebefaktor/Faktor VIIa generiert.

Faktor Xa ist in der Lage, Faktor IX in Faktor IX α , eine nur an einer statt an zwei Stellen proteolytisch gespaltenen Variante des Faktors IXa, (Lawson and Mann 1991) umzuwandeln.

Die Bildung von Faktor IXa wird durch eine zweite Spaltung einer peptidischen Bindung durch den Komplex Gewebefaktor/Faktor VIIa erreicht. Lawson und Mann beobachteten, daß der zweite Schritt der Aktivierung durch den Komplex Gewebefaktor/Faktor VIIa deutlich schneller verläuft als die Aktivierung von Faktor IX zu IXa, was die Autoren vermuten ließ, daß Faktor X und Faktor Xa eine wichtige Rolle bei der Generierung von Faktor IXa haben.

2.2.5.3 Struktur des Faktors Xa

Bereits in den 80iger Jahren wurde versucht, die Struktur des Moleküls zu modellieren. Ausgehend von Sequenzhomologien bekannter Serinproteasen und deren Strukturen mit Faktor Xa wurde ein Modell erstellt. Diese Studien legten nahe, daß

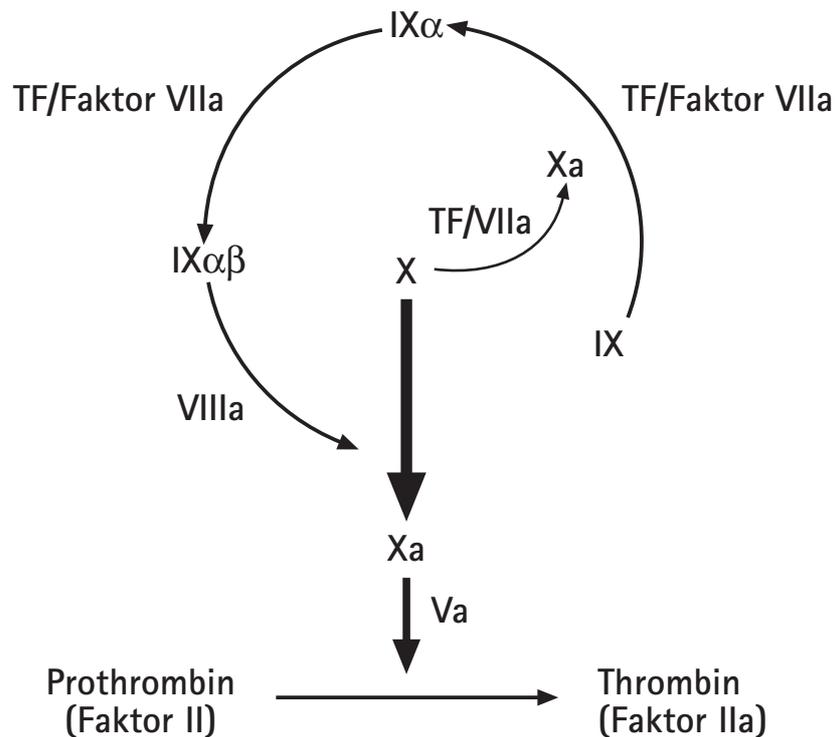


Abbildung 14: Aktivierung von Faktor IX zu Faktor IX α durch den exogenen Weg der Gerinnung; TF: Gewebefaktor, römische Zahlen: Gerinnungsfaktoren. Nach (Lawson and Mann 1991).

die katalytisch wirksamen Regionen der Proteasen und von Faktor Xa eine ähnliche Anordnung aufweisen.

Hydrodynamische Studien (Lim, Bloomfield et al. 1977) ergaben, daß sich Faktor Xa wie ein langgestrecktes Molekül mit einer Länge von etwa 100 Å verhält. Der Abstand der Phospholipid-Membran, an die Faktor Xa gebunden ist zu der katalytisch wirksamen Bindungsstelle liegt bei 61 Å oder 69 Å, abhängig von der Ab- oder Anwesenheit des Cofaktors Faktor Va (Husten, Esmon et al. 1987). Nach diesen Beobachtungen sind die Domänen des Moleküls linear angeordnet, sie stehen innerhalb des Prothrombinkomplexes fast senkrecht zu der Phospholipidmembran in den Raum. Diese Aktivierung des Prothrombin durch den Komplex ist von Calcium abhängig, ohne Calcium bindet Prothrombin um einen Faktor 279.000 schlechter. Erst der Komplex an der Phospholipidmembran erreicht die höchsten *Turnover*-Raten, die Membran erhöht in einem hohen Maße die Affinität des Prothrombins.

1993 wurde von einer Gruppe, der unter anderem auch Bode und Huber angehörten, die Struktur eines um die Aminosäuren 1-45 gekürzten Faktor Xa publiziert



Abbildung 15: Primärstruktur des des(1-45) Faktor Xa. Aus (Padmanabhan, Padmanabhan et al. 1993).

(Padmanabhan, Padmanabhan et al. 1993), 1996 erfolgte die Veröffentlichung der gesamten Struktur durch Brandstetter et al. (Brandstetter, Kühne et al. 1996)

Der *N*-Terminus der *Light Chain* wird von einer Gla-Domäne aufgebaut (Gla: γ -Carboxy-Glu), die von Aminosäure 1 bis 45 oder 50 reicht. Danach folgen zwei EGF-ähnliche Domänen. Die erste EGF-Domäne ist relativ frei beweglich (Brandstetter, Kühne et al. 1996), die zweite greift wahrscheinlich regulierend auf die Komplexbildung mit VIIIa/Va ein. Eine EGF-Domäne besteht aus einem *major* und einem *minor* β -Faltblatt, die über 3 Disulfidbindungen miteinander verknüpft sind; es endet in einem *hairpin*, einer engen Schleife.

Die *heavy chain* des Faktor Xa mit der katalytisch wirksamen Triade ähnelt strukturell α -Thrombin, die Abweichung (RMSD) der überlagerten Strukturen (C α -Überlagerung) liegt bei 1.1 Å (Padmanabhan, Padmanabhan et al. 1993).

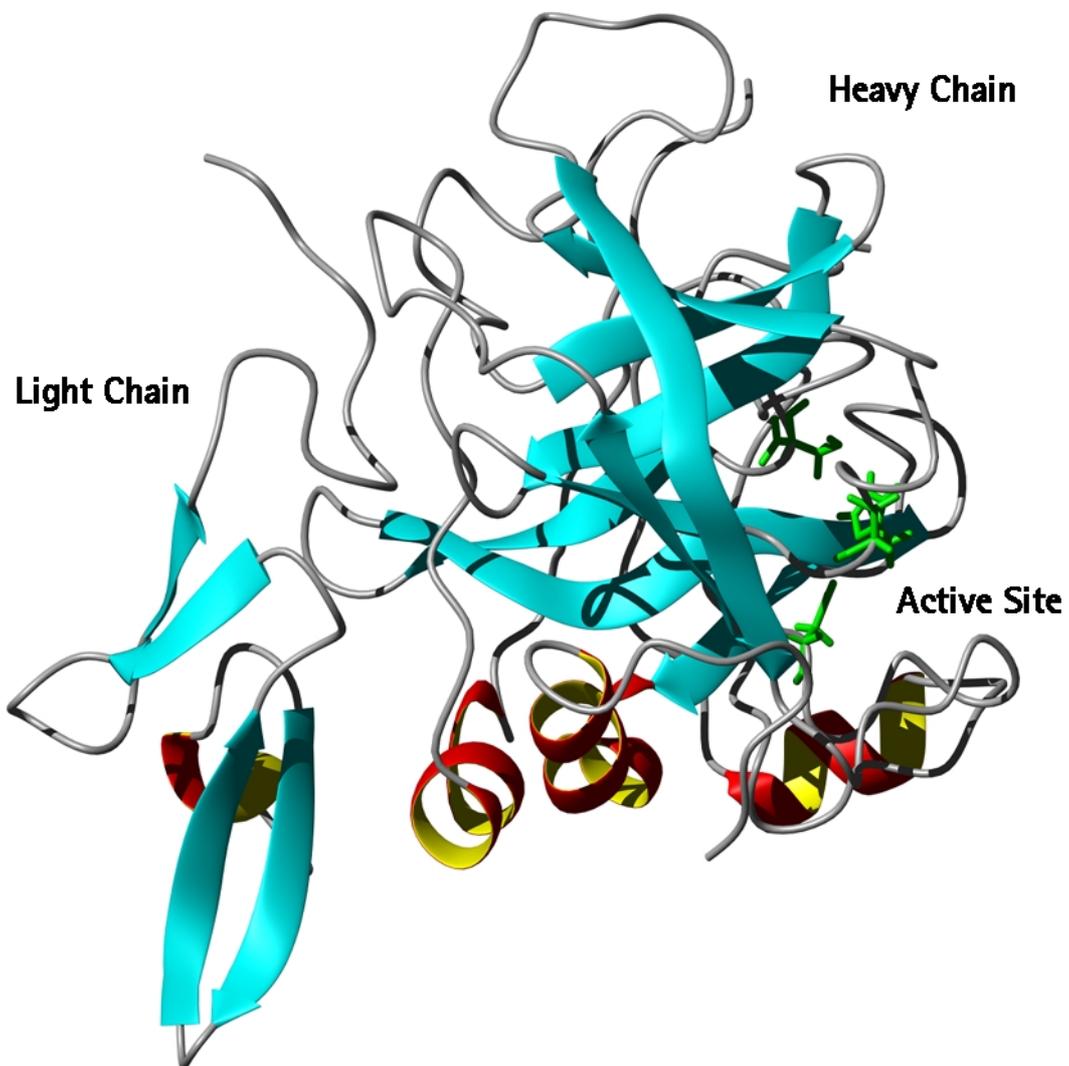


Abbildung 16: Struktur des Faktor Xa mit Sekundärstrukturelementen. Die katalytische Triade ist hervorgehoben. Nach (Padmanabhan, Padmanabhan et al. 1993).

2.3 Tissue Factor Pathway Inhibitor

Bereits 1922 erkannten Loeb et al. (Loeb, Fleischer et al. 1922; Loeb, Fleischer et al. 1922), daß Gewebsextrakte, die natürlich Gewebefaktor enthielten, nach der Inkubation mit Serum keine Gerinnung mehr auslösten. Thomas (Thomas 1947) und Schneider (Schneider 1947) konnten 25 Jahre später voneinander unabhängig diese Beobachtung *in vivo* reproduzieren, in dem sie zeigen konnten, daß Gewebefaktor nicht mehr die Gerinnung in Tieren auslöste, wenn der Gewebefaktor vorher mit Serum inkubiert worden war.

Thomas bemerkte zusätzlich die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Gegenwart von Calciumionen. Der postulierte Inhibitor im Serum band offenbar an Gewebefaktor; dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Chelatbildnern, die das Calcium binden, zunichte gemacht.

1957 publizierte Hjort (Hjort 1957) eine Studie, in der er unter anderem zeigen konnte, daß „Proconvertin“ (Faktor VII) in Kombination mit dem Gewebefaktor in Gegenwart von Calcium-Ionen einen Komplex mit gerinnungsfördernder Aktivität formte, den Hjort als „Convertin“ bezeichnete. In derselben Publikation wies er darauf hin, daß der von Schneider (Schneider 1947) und Thomas (Thomas 1947) beobachtete Inhibitor den Convertin-Komplex inhibierte und nicht das Proconvertin allein oder den Gewebefaktor. Hjort benannte den Inhibitor „Anticonvertin“.

Bereits zu Beginn der siebziger Jahre stießen Marciniak und Tsukamura (Marciniak und Tsukamura 1972) bei Untersuchungen zu Faktor Xa auf einen Inhibitor in einer Fraktion des Serums mit Makroglobulinen (MW > 106) und konnten im folgenden nachweisen, daß der Inhibitor mit *low density lipoproteins* (LDL) assoziiert ist. Rückblickend, so vermuten Broze et al. in ihrem Übersichtsartikel (Broze Jr., Girard et al. 1991), muß zumindest ein Teil der beobachteten Inhibierung von Faktor Xa durch den heute als *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) bezeichneten Inhibitor hervorgerufen worden sein.

1981 bemerkte Carson (Carson 1981), daß der Komplex aus Faktor VIIa/Gewebefaktor durch Lipoproteine aus dem Plasma inaktiviert wurde, in HDL (*high density lipoproteins*) konnte er die inhibierende Aktivität auf den Proteinanteil zurückführen.

Morrison und Jesty fanden 1984 (Morrison und Jesty 1984), daß die Aktivierung von Faktor IX und Faktor X nicht vollständig verlief, wenn vorher etwas Gewebefaktor zugegeben wurde und daß diese offensichtliche Inhibierung des Komplexes aus Gewebefaktor und Faktor VIIa direkt mit der Gegenwart von Faktor X oder einer kurzen Behandlung (*brief treatment*) des Plasmas mit Faktor Xa zusammen-

hing.

1985 berichteten Sanders et al. (Sanders, Bajaj et al. 1985) in einer Arbeit mit dem Titel „*Inhibition of tissue factor/factor VIIa activity in plasma requires factor X and an additional plasma component*“ von einem Protein, dem sie damals den Namen EPI gaben, *extrinsic pathway inhibitor*.

Noch 1987 existierten zwei Hypothesen: Faktor Xa ist der spezifische Cofaktor, den LACI (*Lipoprotein Associated Coagulation Inhibitor*) (Broze Jr. und Miletich 1987), wie TFPI zu der Zeit auch genannt wurde, benötigt; nur ob die Serinprotease Faktor Xa TFPI durch Proteolyse aktiviert, oder ob ein Komplex aus TFPI, Faktor Xa, Gewebefaktor und Faktor VIIa vorliegt, war zu diesem Zeitpunkt nicht klar.

2.3.1 Isolierung und Aufklärung

Die ersten Schritte zur Bestimmung des bis dahin im Verborgenen gebliebenen Inhibitors scheiterten an der geringen Konzentration des Inhibitors im Blut. Dazu kamen noch Probleme, den Inhibitor von den sehr großen Lipoproteinen abzutrennen. Als entdeckt wurde, daß die Leberzelllinie HepG2 der Lage ist, TFPI zu produzieren (Broze Jr. and Miletich 1987), und daß diese Zellen unter Serumfreien Bedingungen wachsen konnten, war eine Möglichkeit zur Gewinnung von Mengen an TFPI vorhanden, die zur Charakterisierung ausreichen.

Das aus HepG2-Zellen aufgereinigte TFPI hat eine Molmasse von etwa 39.000 Dalton und besitzt alle Eigenschaften des im Plasma beobachteten Inhibitors: Die von Calciumionen und der Anwesenheit von Faktor Xa abhängigen Inhibition des Komplexes aus Gewebefaktor und Faktor VIIa.

Die cDNA wurde nach und nach aufgeklärt und die gewonnenen Informationen über den Aufbau des Gens korrespondieren mit den funktionalen Abschnitten (van der Logt, Reitsma et al. 1991):

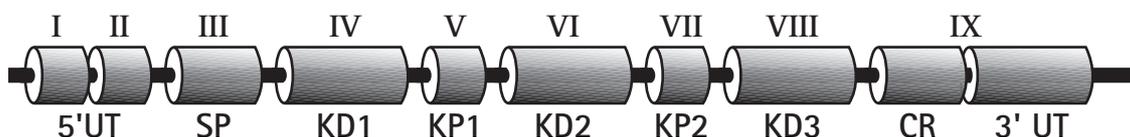


Abbildung 17: Die Organisation des Gens, das TFPI kodiert. Römische Zahlen: Nummer des Exons; UT: Untranslated; SP: Signalpeptid; KD: Kunitzdomäne; KP: Linkerpeptid; CR: C-terminale Region. Nach (van der Logt, Reitsma et al. 1991).

Die Primärstruktur zeigt ein Protein, das nach einer Signalsequenz aus 24 oder 28

Aminosäuren (auf Exon III in Abbildung 17) aus 276 Resten besteht. Auf dieser Sequenz befinden sich drei mögliche Glycosilierungspositionen (gekennzeichnet durch Pfeile in Abbildung 18). Auf einen ausgesprochen sauren N-Terminus folgen drei Kunitzdomänen und schließlich ein basischer C-Terminus.

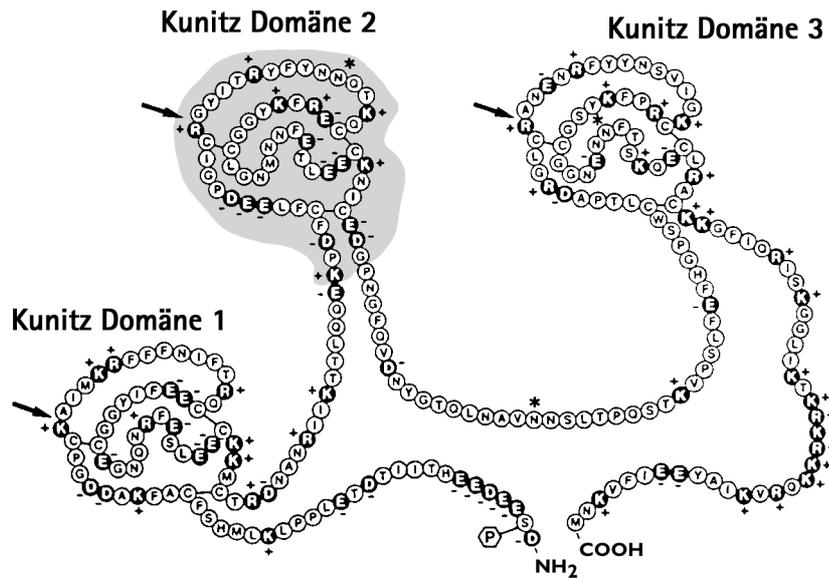


Abbildung 18: Primärstruktur von TFPI. Pfeile: Mögliche Glykolisierung. Grau unterlegt: Die zweite Domäne des Inhibitors. Nach (Girard, Warren et al. 1989).

Daß hier drei Inhibitor-domänen desselben Typs vorliegen, ist bei der beobachteten Spezifität für zwei verschiedene Serinproteasen nicht weiter erstaunlich, auch erklären diese Strukturen die kinetischen Eigenschaften (Seite 35) der Inhibierung von Faktor Xa und des Komplexes Gewebefaktor/Faktor VIIa.

Posttranslationale Modifikationen sind die N-Glycolisierung einer oder mehrerer möglicher Positionen und eine wahrscheinliche Phosphorylierung von Ser-2. Allerdings ist letztere Modifikation nicht vollständig, und sie wird nicht in allen Expressionssystemen, die Verwendung fanden, angetroffen.

Northern Blotting (Alwine, Kemp et al. 1977) ergab, daß mehrere Zellarten zwei mRNAs produzieren, die TFPI kodieren, eine mit $1,4 \cdot 10^3$ und eine mit $4,0 \cdot 10^3$ Basenpaaren; hervorgerufen wird dies wahrscheinlich durch unterschiedliche Terminierungs- und Polyadenylierungssignale.

2.3.2 Eigenschaften von TFPI

Der *Tissue Factor Pathway Inhibitor* besteht – wie dargelegt – aus drei Kunitz-Domänen, die über kurze Sequenzen zusammenhängen. Wie bei anderen Multidomänenproteinen kann auch beim TFPI eine Zuweisung der funktionellen Eigenschaften zu einzelnen Domänen durchgeführt werden. Die Domänen, die jede für sich einem Inhibitor vom Kunitz-Typ gleichen (Domänen 1 und 2) oder Abkömmlinge sind (Domäne 3), funktionieren nicht in einer Synergie miteinander, die Wirkungen addieren sich. Daher können die Eigenschaften separiert werden.

Der Prozeß der Komplexbildung aus Faktor Xa, Faktor VII(a), Gewebefaktor und TFPI läuft – nach heutigem Stand der Kenntnisse (Baugh, Broze Jr. et al. 1998) – zweistufig ab: Zunächst wird ein Komplex aus Faktor Xa und TFPI gebildet, der dann in einem zweiten Schritt mit dem Komplex aus Faktor VII(a) und Gewebefaktor komplexiert.

Der alternative Weg, der zunächst vorgeschlagen wurde, lief über den Komplex aus Faktor VIIa/Gewebefaktor, der Faktor X zu Xa aktiviert. Dieser ternäre Komplex hätte dann in einem Schritt von TFPI inhibiert werden können.

Beide Varianten erklären, wieso stets proteolytisch aktiver Faktor Xa vonnöten ist – durch Mutation an dem aktiven Zentrum inaktiver Faktor Xa bindet nicht an TFPI (Broze Jr., Warren et al. 1988) – und wieso die Inhibierung von Gewebefaktor/Faktor VIIa nur in Gegenwart von Faktor Xa beobachtet wird.

Das Fehlen der Calcium-bindenden Region im Faktor Xa führte zwar dazu, daß TFPI an Faktor Xa band und ihn blockierte, die Ausbildung eines quaternären Komplexes fand nicht statt (Broze Jr., Warren et al. 1988; Warn-Cramer, Rao et al. 1988).

Ausgehend von der Erkenntnis, daß die Modifikation (Wenzel und Tschesche 1981; Tschesche, Beckmann et al. 1987) des P1-Restes eines Inhibitor die Spezifität deutlich änderte, versuchten Girard et al. 1989 (Girard, Warren et al. 1989) durch *site specific mutation* die Aufgaben und Eigenschaften der einzelnen Kunitzdomänen genauer zu klären. Neben den genannten Ergebnissen fanden sie, daß sowohl bei einer Mutation der ersten Domäne als auch bei der Mutation der zweiten Domäne die Inhibierung von Gewebefaktor/Faktor VIIa durch Komplexbildung nicht mehr möglich war. Das unbedingte Vorhandensein einer inhibitorisch aktiven zweiten Domäne bewies, daß die Bildung eines Komplexes aus Faktor Xa mit TFPI eine Voraussetzung für die Inhibition von Gewebefaktor/Faktor VIIa ist.

2.3.2.1 Inhibierung von Faktor Xa – die zweite Domäne

Interessant vom medizinischen Standpunkt aus ist die zweite Domäne des Proteins.

Kallikrein) in ihrer Aktivität gehemmt (Broze Jr., Girard et al. 1991).

Die abgeleiteten kinetischen Konstanten für menschlichen Faktor Xa sind bei Verwendung der Gleichung 2 in Tabelle 1 dargelegt:



mit E: Enzym, I: Inhibitor, EI: stabiler Komplex und I*: geschnittener Inhibitor.

Enzym	$K_{i(initial)}$ [nM]	k_{diss}^* [min ⁻¹]	k_{ass}^* [min ⁻¹]	$K_{i(final)}$ [nM]
Faktor Xa	28	3.3	0.08	0.66
Trypsin	17	2.0	0.03	0.25

Tabelle 1: Liste der kinetischen Parameter. Aus (Broze Jr., Girard et al. 1991).

Heparin erhöht die inhibitorische Wirkung von TFPI auf Faktor Xa um einen Faktor von 40, in dem es den K_i -Wert des Startkomplexes ($K_{i(initial)}$) herabsetzt und die Konstante k_{ass}^* , die die Rückreaktion vom partiell geschnittenen Zustand in den einfach komplexierten Zustand beschreibt, herabsetzt.

Heparin zeigte in den Versuchen keinerlei Auswirkungen auf die Inhibierung von Trypsin durch TFPI, was die Vermutung widerlegte, wonach Heparin eine konformationelle Änderung des TFPI auslösen würde (Broze Jr., Girard et al. 1991).

Durch selektive Modifikationen an den P1-Stellen der drei Kunitzdomänen konnte die zweite Domäne des TFPI als Inhibitor des Faktors Xa identifiziert werden (Warn-Cramer, Rao et al. 1988).

Wie kann TFPI aber *in vivo* Faktor Xa blockieren, wo doch die mittlere Konzentration im Blut mit etwa 2,5 nM um einen Faktor 10 geringer ist als notwendig für den initialen Komplex ($K_{i(initial)} = 28$ nM)?

Novotny et al. (Novotny, Brown et al. 1986; Novotny, Brown et al. 1991) weisen darauf hin, daß die lokale Konzentration sich bei Gabe von Heparin *in vivo* deutlich erhöht wird. Die Autoren gehen davon aus, daß das im Plasma vorliegende TFPI nur einen Teil des verfügbaren TFPIs darstellt und das Endothel, also die Gefäßwand, leicht lösbares TFPI enthält.

Hansen et al. (Hansen, Huseby et al. 1994; Hansen, Huseby et al. 1997) weisen darauf hin, daß etwa 70-85% des TFPI an Lipoproteine (*Low Density Lipoproteins*,

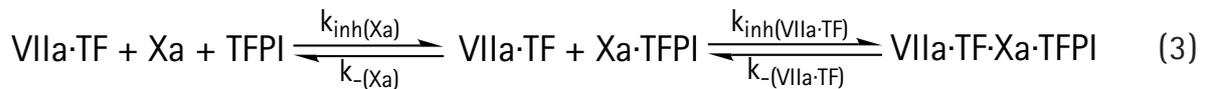
LDL) gebunden vorliegt und damit nicht gerinnungshemmend wirksam ist. Im Gegensatz zu den geringen Konzentrationen, in denen TFPI im Mittel im Blut vorliegt, sind die Konzentrationen der anderen Faktor Xa-Inhibitoren alle deutlich höher; sie liegen für Antithrombin III bei 4.6 μM , für α_1 Proteinase-Inhibitor bei 45 μM und für α_2 -Macroglobulin bei 3.4 μM . Diese Inhibitoren binden irreversibel an Faktor Xa (Colman, Marder et al. 1987). Erwartet würde ein Austausch von Inhibitoren, von TFPI hin zu den irreversibel bindenden. Daß dies nicht beobachtet wird, läßt den Schluß zu, daß die Bindung an Faktor Xa durch TFPI innerhalb des Gesamtkomplexes aus Faktor Xa/Faktor VIIa/Gewebefaktor/TFPI deutlich stärker ist als die Bindung des TFPI an Faktor Xa allein. Alternativ könnte der Komplex aus Gewebefaktor und Faktor VIIa eine „schützende Umgebung“ für Faktor Xa darstellen, wie Jesty (Jesty and Silverberg 1979) zeigte: In Gegenwart von Faktor VIIa/Gewebefaktor wurde Xa nicht von Antithrombin III inaktiviert; fehlte Faktor VIIa, so konnte keine Aktivität durch Faktor Xa mehr beobachtet werden. Versuche mit der isolierten zweiten Domäne des TFPI zeigten, daß deren Wirksamkeit um etwa einen Faktor 4 niedriger liegt als im Komplex (Petersen, Bjørn et al. 1996).

2.3.2.2 Inhibition von F VIIa/Gewebefaktor und F Xa

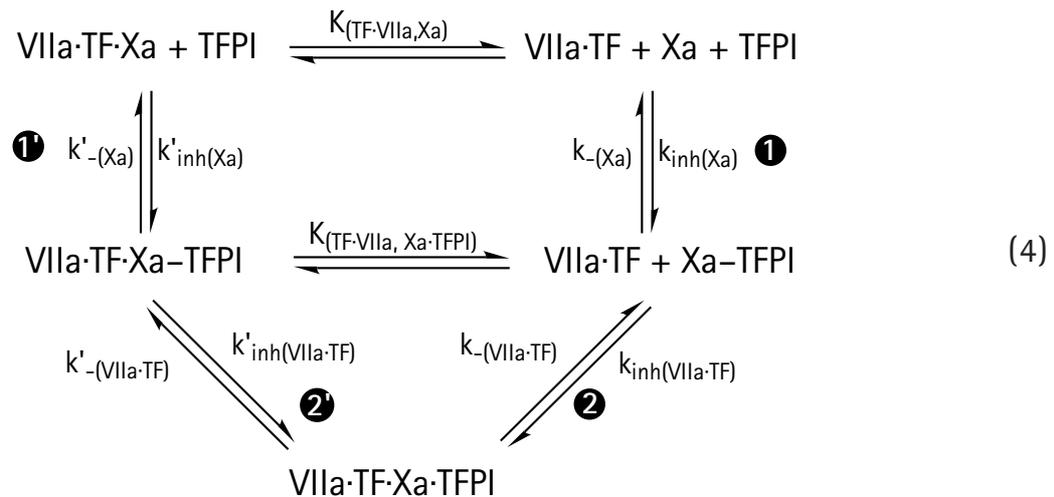
Durch Mutationsstudien an TFPI konnte die Bindungsstelle für den Komplex aus Gewebefaktor und Faktor VIIa gefunden werden; es ist die erste Kunitzdomäne, die an den Komplex bindet (Girard, Warren et al. 1989). Sie inhibiert die *active site* der Serinprotease Faktor VIIa.

Die N-terminale Region des Faktors Xa und die erste Kunitzdomäne des TFPI werden benötigt, um den Gewebefaktor/Faktor VIIa-Komplex durch den vorher gebildeten Komplex aus Faktor Xa und TFPI zu blockieren. Die Frage stellte sich, ob beide Bereiche ausreichend sind, um Faktor VIIa/Gewebefaktor zu inaktivieren. Girard et al. synthetisierten ein Protein, das aus dem Bereich des Faktors Xa, der Calcium bindet, einer Wachstumsfaktordomäne (Leytus, Foster et al. 1986) und der ersten Kunitzdomäne des TFPI besteht. Dieses Molekül inhibierte effektiv und ohne die Gegenwart von Faktor Xa den Komplex aus Gewebefaktor und Faktor VIIa und zeigte damit, daß die Calcium-bindende kurze Kette (*light chain*) des Faktors Xa unbedingt notwendig ist, um den Gewebefaktor/Faktor VIIa Komplex zu inhibieren.

Die Kinetik der Bildung des quartären Komplexes ist dabei noch nicht vollständig geklärt: Der einfache Fall, wonach die Gesamtkomplexbildung nach:



verläuft, konnte nicht allen Beobachtungen gerecht werden. Ausführliche Untersuchungen (Baugh, Broze Jr. et al. 1998) zeigten, daß die Gleichung 3 erweitert werden muß, so daß für die Gesamtkinetik Gleichung 4 gültig ist.



Dabei sind die Schritte 1 und 2 (schwarze Kreise in Gleichung 4) bereits in Gleichung 3 abgehandelt. Neu ist der Schritt 1', in dem der Inhibitor TFPI auf Faktor Xa einwirkt, *während* er durch Katalyse des Komplexes Gewebsfaktor/Faktor VIIa (VIIa·TF in Gleichung 4) aus Faktor X entsteht. Die Inhibierung wird dann in einem unimolekularen Schritt erreicht: Aus der Assoziation wird ein Komplex. Die Autoren (Baugh, Broze Jr. et al. 1998) weisen darauf hin, daß die Konstanten für die Schritte 1 und 1' – so das Modell die Vorgänge adäquat beschreibt – gleich sein können. Die Kinetik des unimolekularen Schritts 2' ist nicht vergleichbar mit dem bimolekularen Schritt 2.

Noch unklar ist ebenfalls, welcher Schritt innerhalb der Reaktionen geschwindigkeitsbestimmend ist: Die Untersuchungen von Jesty et al. (Jesty, Wun et al. 1994) deuteten darauf hin, daß die Bildung des quaternären Komplexes aus den zwei Komplexen Gewebsfaktor/Faktor VIIa und Faktor Xa/TFPI geschwindigkeitsbestimmend ist, die Untersuchungen von Baugh et al. (Baugh, Broze Jr. et al. 1998) deuten dagegen darauf hin, daß der erste Schritt, die Bildung des Komplexes Faktor Xa/TFPI, den Gesamtverlauf bestimmt.

2.3.2.3 Die dritte Kunitzdomäne des TFPI

Die Aufgabe der dritten Domäne des Inhibitors ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt. In einem Vergleich der inhibitorischen Eigenschaften der drei Domänen des TFPI versuchten Petersen et al. (Petersen, Bjørn et al. 1996) die dritte Domäne zu analysieren. Sie kamen, ausgehend von einem Modell der Domäne mit Trypsin, zu dem Schluß, daß Ser-36 der Domäne zusammen mit der Disulfidbrücke zwischen Cys-14 und Cys-38 die Einlagerung in die active site des Trypsins verhindert. Rest 36 ist in BPTI und den beiden anderen Domänen Glycin, eine S36-Mutante von BPTI zeigte deutlich geringere inhibitorische Wirkung (Berndt, Beunink et al. 1993), die Autoren nehmen an, daß die Seryl-Gruppe ein Wassermolekül verdrängt, das die Orientierung der Disulfidbindung zwischen Cys-14 und Cys-38 stabilisiert. Ein mögliche Aufgabe dieser Domäne fand eine japanische Gruppe (Enjyoji, Miyata et al. 1995): Ein Teil der dritten Domäne (Gly-212 – Phe-243) sei in der Lage, Heparin zu binden.

Daß TFPI an Heparin bindet, ist lange bekannt; es wurde angenommen, daß der C-Terminus des Proteins, in dem viele basische Aminosäuren zu finden sind, die Bindungsstelle sei. Allerdings besteht die Affinität zu Heparin auch dann, wenn TFPI des C-Terminus' beraubt wird (Wesselschmidt, Likert et al. 1993).

Die Autoren untersuchten zunächst die Domänen, dazu schnitten sie TFPI zum einem zwischen der ersten und zweiten und zum anderen zwischen der zweiten und dritten Domäne. Nachdem sie festgestellt hatte, daß die Fähigkeit, Heparin zu binden, nur dann bestand, wenn die dritte Domäne in den untersuchten Bruchstücken war, synthetisierten sie Bruchstücke der dritten Domäne.

Die Affinität des Glycans überprüften Enjyoji et al. (Enjyoji, Miyata et al. 1995) mit Hilfe eines Fluorescein-Labels. Die Fluoreszenz vor und nach der Zugabe von TFPI (oder dessen Bruchstücken) wurden dann in der Heparinlösung gemessen.

Um ihre Ergebnisse mit dem Bruchstück Gly-212 – Phe-243, in dem eine Disulfidbrücke liegt, zu überprüfen, modifizierten die Autoren rechnerisch eine BPTI-Struktur und tauschten die Aminosäuren, so daß eine tentative Struktur der dritten Domäne des TFPI zur Verfügung stand. Es konnte an dieser – der realen Struktur wenigstens ähnlichen – Struktur gezeigt werden, daß die dritte Domäne eine basische Oberflächenstruktur zeigt, die als Bindungsstelle für Heparin dienen könnte. Diese Stelle liegt innerhalb der Region Gly-212 – Phe-243, die im Fluoreszenz-Assay die höchste Affinität zeigte.

Es gibt einen weiteren Hinweis, daß die dritte Domäne des TFPI an Heparin bindet: Saito et al. (Kojima, Katsumi et al. 1996) berichten von Ryudocan, einem Glycos-

aminoglycan mit einem Kernprotein (*core protein*) mit einer Masse von etwa 30 kDa. Dieses Glycan zeigt, wie das verwandte Heparin auch, eine hohe Affinität zu TFPI, nicht aber zu anderen Inhibitoren wie etwa Antithrombin III.

2.3.3 Die Effekte auf die Gerinnungskaskade

Gewebefaktor wird am Wundort aus den Zellen unterhalb des Endothels ausgeschüttet und kommt in Kontakt mit Blut, wo der Faktor VII(a) an ihn bindet. Dieser Komplex beginnt nun mit der Aktivierung von Faktor X und Faktor IX (Abbildung 11, Seite 19).

Mit dem Umwandeln des Zymogens Faktor X zu einer Serinprotease wird TFPI aktiv, indem es – nun an Faktor Xa gebunden – die weitere Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa durch Faktor VIIa/Gewebefaktor und die Aktivierung von Faktor IX zu Faktor IXa aus dem intrinsischen Weg der Gerinnung unterbindet. In diesem Fall könnte zusätzlicher Faktor Xa nur über Faktor IXa mit Faktor VIII als Cofaktor generiert werden. Dabei wird Faktor IXa entweder durch die Aktivierung durch Gewebefaktor/Faktor VIIa oder durch die Aktivierung über den endogenen Weg der Gerinnung, also durch Aktivierung durch Faktor XIa, gebildet.

Dieser Rückkopplungsmechanismus erklärt die Tatsache, daß das Plasma hämophiler Personen sich bei Zugabe *großer* Mengen Gewebefaktor wie das Plasma gesunder Personen verhält, bei Zugabe *geringer* Mengen Gewebefaktor allerdings deutliche Unterschiede in der Gerinnung zu Tage treten.

Mit diesen Ergebnissen kann – zum Teil – erklärt werden, weshalb Personen, die unter Hämophilie leiden, keine funktionierende Gerinnsel aufbauen können: Durch die Blockierung des Gewebefaktor/Faktor VIIa-Komplexes wird die Produktion von Faktor Xa unterbunden, die Produktion über den endogenen Weg der Gerinnung versagt, wenn – Hämophilie Typ A – ein Mangel an Faktor VIII oder – Hämophilie Typ B – ein Mangel an Faktor IX besteht.

Die Ergebnisse von Schwartz et al. (Ho, Toomey et al. 1996) deuten auf eine weitere mögliche Aufgabe von TFPI innerhalb der Gerinnung hin: Den Abbau des Faktors Xa. Bei der Beobachtung von ¹²⁵I-markiertem Faktor Xa in Blutkrebszellen und embryonischen Fibroblasten (Stammzellen des Bindegewebes) wurde entdeckt, daß die Aufnahme und der folgende Abbau der Protease abhängig von der Anwesenheit von TFPI ist, das an Zellwände gebunden ist. Im Gegenzug wurde auch der Abbau von ¹²⁵I-markiertem TFPI durch die Anwesenheit von Faktor Xa merklich beschleunigt. Kinetische Messungen legen dabei nahe, daß der Abbau des Faktors Xa im Komplex mit TFPI erfolgt, dem TFPI also auch den Katabolismus des

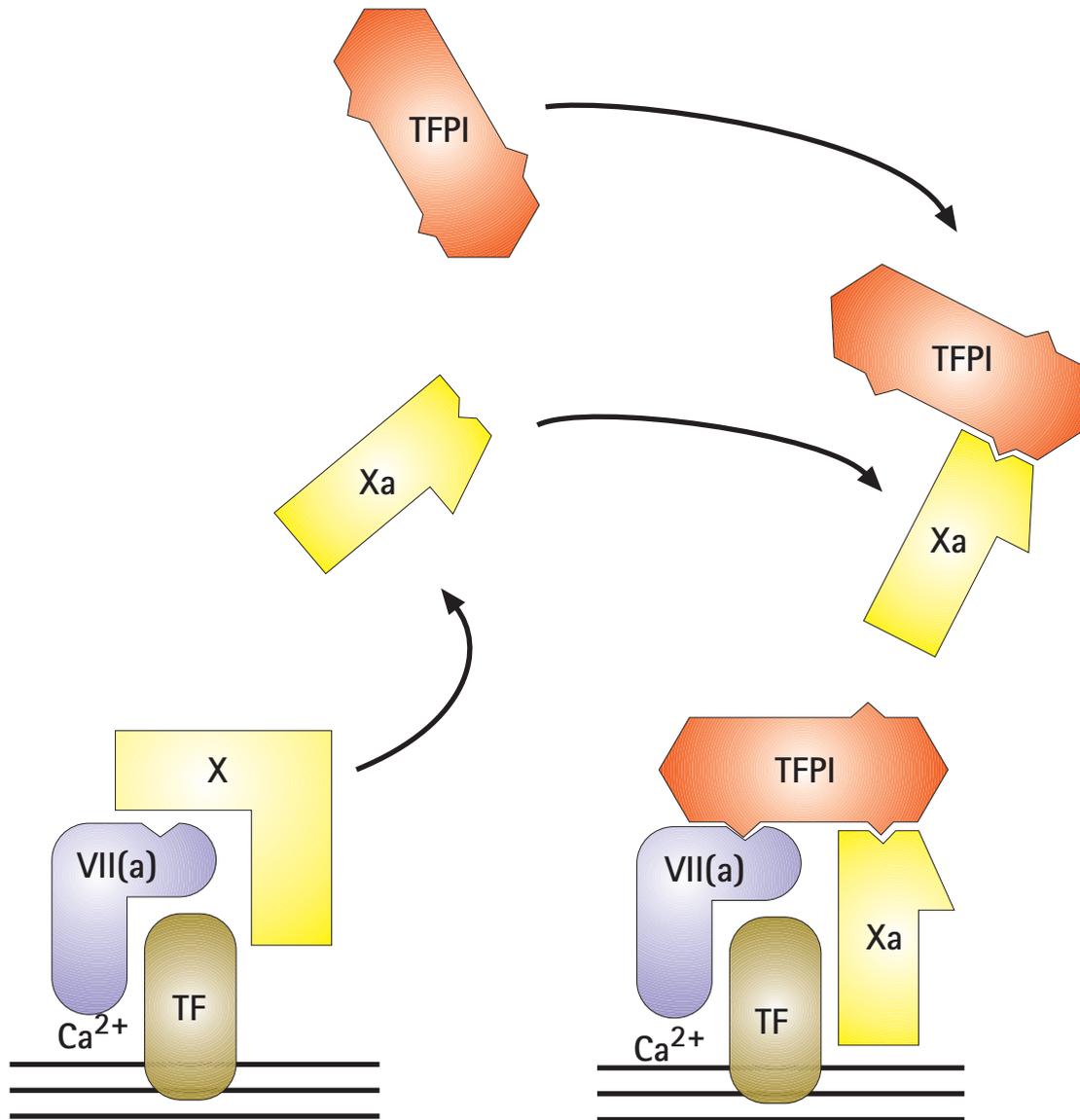


Abbildung 20: Mechanismus von TFPI. Nach der Aktivierung von Faktor X inhibiert TFPI direkt Faktor Xa. Der Komplex aus TFPI und Faktor Xa inhibiert dann den TF/VIIa-Komplex. Nach (Broze Jr., Girard et al. 1991).

Faktors Xa deutlich unterstützt.

2.3.4 TFPI im menschlichen Körper

TFPI konnte bislang aus Leberzellen und aus Zellen des Endothels isoliert werden (Broze Jr. und Miletich 1987), bei Patienten mit akuten Leberkrankheiten wurden sowohl sehr niedrige als auch sehr hohe TFPI-Konzentrationen gefunden, was darauf hindeutet, daß es außerhalb der Leber noch weitere Orte der Synthese geben muß.

Wahrscheinlich sind die Zellen des Endothels die bedeutendsten Quellen für TFPI, wobei diese Zellen nicht durch Stimulanzen zu einer erhöhten Produktion von TFPI angeregt werden konnten, während gleichzeitig die ebenfalls im Endothel produzierten Plasminogen-Aktivator und der von-Willebrand-Faktor verstärkt ausgeschüttet wurden (Sandset, Abildgaard et al. 1988).

Blutplättchen können nach Stimulierung durch Thrombin auch TFPI ausschütten; in ihnen befinden sich etwa 8% des gesamten im Blute befindlichen TFPIs. Allerdings wird am Wundort, wo sich die Blutplättchen ansammeln, eine deutlich höhere Konzentration erreicht. Das wird durch Untersuchungen bestätigt, die zeigen, daß das bei einer oberflächlichen Verletzung abgenommene Blut eine deutliche höhere Konzentration an TFPI aufweist (Novotny, Girard et al. 1988).

Sandset et al. (Sandset, Abildgaard et al. 1988) fanden, daß sich die Menge an TFPI bei Zugabe von Heparin (7500 units) in etwa verdoppelte. Andere Studien zeigten, daß die Zugabe *in vivo* zu deutlichen Konzentrationserhöhungen führte, gleichzeitig konnte dieser Effekt *in vitro* nicht nachgewiesen werden, was bedeutet, daß Heparin die Ausschüttung von TFPI in das Blut aus intra- oder extrazellulären Speichern anregt.

Diese Konzentrationsschwankungen und die Anzahl an verschiedenen Quellen für TFPI machen die Feststellung einer „normalen“ Konzentration im Blut ausgesprochen schwierig. Die Konzentration im Plasma gesunder Menschen scheint relativ stabil zu sein, sowohl über den Tag verteilt als auch über mehrere Monate. Die Standardabweichungen allerdings liegen bei $\pm 20-27\%$ (Broze Jr., Girard et al. 1991), wobei die Mittelwerte nur leicht mit dem Alter und dem Geschlecht variieren. Eine Studie kommt auf einen Wert von 60-180 ng/ml bei einem Mittelwert um 113 ng/ml (Novotny, Brown et al. 1986). Die TFPI-Werte fallen leicht nach Operationen, was Anlaß zu der Vermutung gibt, daß TFPI nicht reaktiv ausgeschüttet wird (Broze Jr., Girard et al. 1991).

Ein Mangel an TFPI könnte bei der ihm zugewiesenen Bedeutung zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Bildung von Thromben führen, allerdings ist bislang noch keine Koagulopathie beobachtet worden, bei der ein solcher Mangel Ursache gewesen wäre.

Resultate von Hollister et al. (Hollister, Kiesel et al. 1996) beweisen, daß TFPI auch in einigen Regionen des Hirn exprimiert wird und daß die Konzentration von TFPI in Hirnen, die von Alzheimer befallen sind, höher liegt. TFPI liegt in den Hirnen von Alzheimer-Patienten zusammen mit Plaques vor. Es gibt noch keinen Hinweis auf die physiologische Rolle des TFPI in diesem Zusammenhang.

Bei der Entfernung von TFPI aus dem Plasma muß zwischen dem Abbau und der Beseitigung unterschieden werden. TFPI wird in der Leber abgebaut. Die Halbwertszeit von freiem TFPI beträgt in Kaninchen etwa 2 min. und unter einer Minute in Ratten (Warshawsky, Bu et al. 1995). Ein *lipoprotein receptor-related protein* (LPR) steuert den Abbau, also die Spaltung von TFPI in Leberzellen, zusammen mit einem LPR-Inhibitor, der eine Größe von etwa 39 kDa hat (Narita, Bu et al. 1995). Dieser Vorgang ist langsam, so daß LPR-gebundenes TFPI auch wieder ins Plasma abgegeben werden kann.

Ein zweiter Mechanismus, vorgeschlagen von Sandset et al. (Sandset, Abildgaard et al. 1988), hängt mit *heparine sulfate proteoglycans* (HSPG) zusammen. Diese HSPGs binden TFPI an das Endothel und geben es schnell (< 1 min.) wieder an das Plasma ab (Narita, Bu et al. 1995).

3 NMR-Experimente zur Zuordnung

Die Kernresonanzspektroskopie ist heute neben der Röntgenstrukturanalyse die leistungsfähigste Methode, wenn es um die Bestimmung von Konstitution und Konformation von Proteinen und Oligonukleotiden geht. Für die Beobachtung dynamischer Prozesse und der Bestimmung der Struktur unter physiologischen Bedingungen gibt es keine vergleichbare Methode.

Ein Großteil der grundlegenden Methoden, die heute zur Bestimmung der Strukturen von Biopolymeren mittels NMR Verwendung finden, wurde in den 80er Jahren entwickelt (Ernst and Anderson 1966). Hervorzuheben sind hier die Arbeiten, die im Arbeitskreis von Kurt Wüthrich zu den ersten publizierten Proteinstrukturen führten, die nur auf NMR-Daten beruhen (Dubs, Wagner et al. 1979; Wüthrich und Wagner 1979; Wüthrich, Wagner et al. 1981).

Noch heute bauen die Ansätze zur Zuordnung mit Hilfe homonuklearer NMR-Spektroskopie auf den Experimenten auf, die auch bei der Berechnung der ersten Proteinstrukturen mittels NMR an der ETH Zürich Verwendung fanden: COSY, TOCSY und NOESY. Mit Ihnen können Konnektivitäten, ganze Spinsysteme und schließlich die räumliche Nähe der Kerne zueinander bestimmt werden. Während die beiden erstgenannten Experimente auf skalaren Kopplungen zum Magnetisierungstransfer beruhen, baut das NOESY auf dem Kern-Overhauser-Effekt (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE) auf, der die Dipol-Dipol-Wechselwirkung nutzt.

Am Anfang der Strukturbestimmung steht stets die Zuordnung der Signale zu den korrespondierenden Kernen im Molekül. Dazu werden mehrere Schritte durchge-

führt:

- Auffinden der Spinsysteme und deren Klassifizierung
- Korrelation von Spinsystemen über NOE-Signale oder, bei vorhandener Isotopenmarkierung über 3D- oder 4D-Experimente (Griesinger, Sørensen et al. 1987; Kay, Clore et al. 1990; Clore und Gronenborn 1991; Ernst 1992)
- Kombination dieser Bruchstücke mit den erwarteten Spinsystemen des Moleküls
- Zuordnen der Bruchstücke und Zusammenfügen der Spinsystemsequenzen

Ist die Zuordnung abgeschlossen, können die strukturelevanten Parameter aus den Spektren extrahiert werden. Im homonuklearen Fall, in dem außer Protonen keine NMR-aktiven Kerne in ausreichender Menge vorhanden sind, sind dies die Abstände der Protonen untereinander, die aus den Integralen der NOE- und ROE-Signale berechnet werden können. Die aus den Spektren gewonnenen Daten geben die Abstände bis etwa 6 Å wieder. Die Kreuzrelaxationsrate, die die Intensität des Signals bestimmt, ist – ohne Spindiffusion – mit τ_c/r^{-6} proportional zur Korrelationszeit τ_c und zum Abstand r , der Austausch der Magnetisierung gelingt daher nur über kleine Entfernungen. Auf die Einschränkungen und Probleme dieser Korrelation wird an entsprechender Stelle genauer eingegangen.

Daneben sind über verschiedene Methoden die Kopplungskonstanten zugänglich, die die lokale Orientierungen zugänglich machen. Im Falle der Proteine sind neben anderen die Dihedralwinkel zwischen HN und H α interessant, da sie den Winkel ϕ definieren.

Aus der Matrix der Distanzen und Dihedralwinkel kann nun mit Hilfe verschiedener Methoden eine Struktur berechnet werden. Zur Verwendung bei der Aufklärung der Struktur der zweiten Domäne des TFPI kamen *Distance Geometry* (DG) (Wagner, Braun et al. 1987; Crippen und Havel 1988) und *Simulated Annealing* (SA) (Kirkpatrick, Gelatt et al. 1983).

Neben den „normalen“ Methoden, die Strukturen in ihrer Qualität zu werten, (Anzahl und Größe der verletzten *Restraints*, Standardabweichung der Strukturen untereinander) wurden die Programmpakete AQUA und ProCheck (Laskowski, Rullmann et al. 1996) zur Analyse der mittels NMR-Daten erzeugten Strukturen herangezogen.

3.1 Grundbausteine der Experimente

Die Grundlage für die Vielzahl der Methoden der modernen NMR liegt in der Einfachheit des Hamilton-Operators und – noch wichtiger – der Vielzahl der Modifikationsmöglichkeiten.

Die Entwicklung der Fourier Transformation-NMR (FT-NMR) 1966 war der Auslöser des Fortschritts, die erst durch die Erfindung des *Fast-Fourier-Algorithmus* und der Möglichkeit der Anwendung mit Hilfe von schnellen Computern in FT-NMR-Geräte einfließen konnte. 1983 führten Sørensen et al. (Sørensen, Eich et al. 1983) den Produktoperatorformalismus ein, der es ermöglicht, auf einfache, fast bequeme Art und Weise FT-NMR theoretisch zu beschreiben.

Bereits 1971 formulierte Jeener die Idee des 2D-NMR (Jeener 1971), 1976 berichteten Aue et al. (Aue, Bartholdi et al. 1976) über ein gelungenes COSY-Experiment.

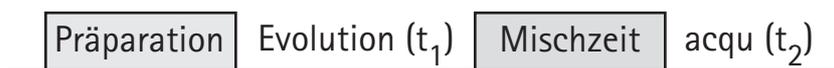


Abbildung 21: Allgemeine Darstellung der Bestandteile eines 2D-Experiments.
acqu: Akquisitionszeit.

An dieser Stelle soll auf die bei den verschiedenen Experimenten unterschiedlichen Vorgänge in der Mischzeit eingegangen werden. Beschrieben werden sollen die Experimente COSY, NOESY und TOCSY; später noch auf das in der Arbeitsgruppe (Glaser 1993; Quant, Prasch et al. 1995) entstandene TACS. Ein kurzer Abschnitt ist den verschiedenen Wassersignal-Unterdrückungsmethoden gewidmet.

3.1.1 Correlation Spectroscopy

In einem COSY-Spektrum kommen Kreuzsignale durch den Kohärenztransfer zwischen benachbarten Kernen zustande (Aue, Bartholdi et al. 1976). In Proteinen sind dies Kerne, die zwei oder maximal drei Bindungen auseinander liegen.

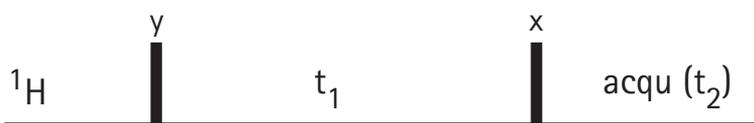


Abbildung 22: ¹H-COSY-Experiment. Die beiden 90°-Pulse werden einem CYCLOPS-Phasenzzyklus unterworfen, was zusammen mit einer Axialpeakunterdrückung zu einem Phasenzzyklus mit acht Schritten führt.

Die Pulssequenz besteht im einfachsten Fall lediglich aus zwei 90°-Pulsen; eine

Mischzeit, wie in dem generellen 2D-Experiment (Abbildung 21) angedeutet, ist durch den Mischpuls ersetzt. (Abbildung 22)

Der erste Puls entspricht der Präparation, es folgt die Evolution in Form der t_1 -Zeit und schließlich der Mischpuls, der den Kohärenztransfer ermöglicht nach (Kessler, Gehrke et al. 1988):

$$I_{1z} \xrightarrow{90^\circ_y} I_{1x} \xrightarrow{t_1} +2I_{1y}I_{2z} \xrightarrow{90^\circ_x} -2I_{1z}I_{2y} \xrightarrow{t_2} -I_{2x} \quad (5)$$

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen COSY-Spektren bedienen sich alle eines Doppelquantenfilters (Abbildung 23) aus zwei 90° -Pulsen, der wichtige Vorteile mit sich bringt: zum einen sind Diagonal- und Kreuzsignale nicht um 90° phasenverschoben wie im normalen COSY, in dem die Transferfunktionen in einem Zweispinsystem für Diagonal- (Gleichung 6) und Kreuzsignal (Gleichung 7) lauten:

$$\sin\Omega_1 t_1 \cos\pi J_{12} t_1 \sin\Omega_1 t_2 \sin\pi J_{12} t_2 \quad (6)$$

$$\sin\Omega_1 t_1 \sin\pi J_{12} t_1 \sin\Omega_2 t_2 \sin\pi J_{12} t_2 \quad (7)$$

Zum anderen führen nur diejenigen Protonen zu einem detektierbaren Signal, die zu anderen Protonen koppeln. Protonen, die „abgekoppelt“ sind, z. B. -S-CH₃, fallen durch den Doppelquantenfilter.

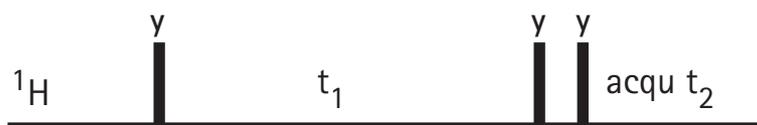


Abbildung 23: ¹H-DQF-COSY-Experiment.

Für einen Doppelquantenfilter muß nun die Phase für die Pulse mit $k \cdot \pi/2$ ($k=0, 1, 2, 3$) und für die Akquisition mit $k \cdot \pi$ ($k=0, 1, 2, 3$) gezykelt werden.

Der in der t_1 -Zeit entwickelte Operator $2I_{1y}I_{2z}$ wird im COSY durch den Mischpuls vollständig in detektierbare Antiphaskohärenz $-2I_{1z}I_{2y}$ überführt, während im DQF-COSY durch den ersten Mischpuls Multiquantenkohärenz $I_{1y}I_{2x}$ erzeugt wird, die der zweite 90° -Puls in detektierbare Antiphaskohärenz umgewandelt (Gleichung 8 beschreibt den Transferweg zu einem Kreuzsignal).

$$I_{1z} \xrightarrow{90^\circ_y} I_{1x} \xrightarrow{t_1} 2I_{1y}I_{2z} \xrightarrow{90^\circ_y} 2I_{1y}I_{2x} \xrightarrow{90^\circ_x} 2I_{1z}I_{2x} \xrightarrow{t_2} I_{2y} \quad (8)$$

Die Transferfunktionen für Kreuz- und Diagonalsignal lauten nun:

$$\sin \Omega_1 t_1 \cos \pi J_{12} t_1 \sin \Omega_1 t_2 \cos \pi J_{12} t_2 \quad (9)$$

$$\cos \Omega_1 t_1 \sin \pi J_{12} t_1 \sin \Omega_1 t_2 \cos \pi J_{12} t_2 \quad (10)$$

was – wie oben erwähnt, zu Spektren führt, deren Kreuz- und Diagonalsignale gleich phasbar sind.

Das DQF-COSY Experiment gehört heute zum Standardrepertoire und hat das traditionelle COSY weitgehend verdrängt.

Mit diesen Experimenten ist es möglich, die Spinsysteme und ihre Konnektivitäten zu finden und zu kategorisieren. In den Spektren sind Kreuzsignale zwischen zwei Kernen zu finden, die über zwei oder drei Bindungen voneinander entfernt sind.

3.1.2 Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

Diese Art der Spektroskopie beruht nicht wie COSY oder TOCSY auf den Transfer von Magnetisierung über die skalaren J -Kopplungen, also über die Bindungsvektoren, sondern auf den Magnetisierungstransfer durch Kreuzrelaxation. Dabei werden in den wechselwirkenden Kernen durch Bewegungsprozesse Spin-Flips ausgelöst, die zu Änderungen der Intensitäten führen, die als *Nuclear Overhauser Effekt* (NOE) bezeichnet werden (Derome 1992).

Neben der dipolaren Wechselwirkung, die die wichtigste Beeinflussung darstellt, kann Relaxation durch paramagnetische Teilchen, chemische Verschiebungsanisotropie und skalare Kopplungen hervorgerufen werden.

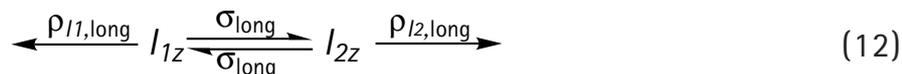
Dipolare Wechselwirkung findet zwischen Spins statt, die als magnetische Dipole beschrieben werden können. Diese Spins „spüren“ durch räumliche Nähe den jeweils anderen Dipol.

Die longitudinale Relaxation, also der Versuch, Magnetisierung gleichmäßig über das Gesamtsystem zu verteilen (Spin-Gitter-Relaxation), ist ein Prozeß, bei dem dipolar gekoppelte Kerne in Abhängigkeit voneinander miteinander wechselwirken. Die Beschreibung eines Zweispinsystems I_1, I_2 gelingt mit den Solomon-Gleichungen (Ernst, Bodenhausen et al. 1991):

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}(I_{1z} - I_{1,0}) &= -\rho_{I_1}(I_{1z} - I_{1,0}) + \sigma_{long}(I_{2z} - I_{2,0}) \\ \frac{d}{dt}(I_{2z} - I_{2,0}) &= -\rho_{I_2}(I_{2z} - I_{2,0}) - \sigma_{long}(I_{1z} - I_{1,0}) \end{aligned} \quad (11)$$

mit denen die Kreuzrelaxation σ zweier Spins I_1 und I_2 gezeigt werden kann. Durch die Kreuzrelaxation wird die Magnetisierung eines Kerns (I_2) auf den anderen (I_1) übertragen, um das System in einen Gleichgewichtszustand $I_{1,0}$, $I_{2,0}$ zu bringen. Gleichzeitig wird neben der Kreuzrelaxation σ_{long} in Gleichung 11 die Eigenrelaxation ρ eines Kerns berücksichtigt.

In dem Zweispin-System ergibt sich – hier als Verdeutlichung – diese „Kinetik“ für die Eigen- und Kreuzrelaxation schematisch als:



Der NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) beschreibt nun den Einfluß auf die Intensität eines Signals durch den Einfluß einer Störung. Die Störung ist in diesem Fall die dipolare Wechselwirkung; der NOE ist dann Ausdruck des gesamten Systems, einen Gleichgewichtszustand wiederzuerlangen.

Der NOE ist definiert als:

$$\eta(I_2) = \frac{(I_1 - I_{1,0})}{I_{1,0}} \quad (13)$$

Dabei beschreibt Gleichung 13 den *Nuclear Overhauser Effect* auf den Kern I_1 durch eine Störung des Kerns I_2 . Die normale Intensität des Signals sei $I_{1,0}$, die durch die Störung verursachte neue Intensität I_1 . Der Effekt kann positiv oder negativ sein, in Abhängigkeit vom Molekulargewicht.

Die Größe der Änderung ist abhängig von der Differenz der Wahrscheinlichkeiten der Übergänge zwischen Doppel- und Nullquantenübergängen und der Geschwindigkeit der Reorientierung des interessierenden Moleküls in der Probe, der Korrelationszeit τ_c .

Es wird dabei angenommen, daß sich diese Bewegung – die möglichen Translationen und Rotationen – mit einem einzigen Parameter annähern lassen. Diese molekulare Gesamtkorrelationszeit τ_c beschreibt die Zeitkonstante für die Reorientierungen des Moleküls. Der Parameter τ_c ist dabei eine Untergrenze der Re-

orientierungsgeschwindigkeit.

Die Korrelationszeit τ_c ist bei der Annahme von isotropen Verhalten von mehreren Parametern abhängig. Die wichtigsten sind Molekülgewicht, Viskosität der Lösung und Temperatur. So wird ein großes Molekül sich langsamer bewegen in Lösung als ein leichtes und eine höhere Korrelationszeit τ_c besitzen. Bei Anisotropie müssen weitere Parameter T_{\parallel} und T_{\perp} für die Reorientierungen berücksichtigt werden.

Die Zeiten liegen zwischen weniger als 0,1 ns für kleine und mehr als 10 ns für große Moleküle.

Bei kleinen Molekülen ist die Korrelationszeit sehr klein und der NOE positiv, gegeben durch das Verhältnis von σ_{long} zu ρ . Die resultierenden Kreuzsignale in einem NOESY (s. u.) sind relativ zum Diagonalsignal negativ. Bei großen Molekülen ist der NOE negativ und entsprechend sind die Vorzeichen von Kreuz- und Diagonalsignalen gleich.

Der Nulldurchgang der beschreibenden Funktion ist bei „mittelgroßen“ Molekülen gegeben, deren Molgewicht bei etwa 1000 Da und deren Korrelationszeit bei etwa 1-2 ns liegt. Der Nulldurchgang ist gegeben durch:

$$\omega_0 \tau_c \approx \sqrt{\frac{5}{4}} \quad (14)$$

In einem NOESY (*NOE Spectroscopy*) (Abbildung 24) wird durch den zweiten 90°-Puls der in der t_1 -Zeit magnetisch gelabelte Spin longitudinal ausgerichtet. Nun kann durch Kreuzrelaxation während τ_m die Magnetisierung auf andere, räumlich nahe Kerne transferiert werden. Mit dem dritten Puls wird die longitudinale Magnetisierung transversal ausgerichtet.



Abbildung 24: Schematische Darstellung der NOESY Pulssequenz.

Der Magnetisierungstransfer erfolgt nach:

$$I_{1z} \xrightarrow{90^\circ_y} \pm I_{1x} \xrightarrow{90^\circ_y} \pm I_{1z} \xrightarrow{\sigma \tau_m} \pm I_{2z} \xrightarrow{90^\circ_y} \pm I_{2x} \quad (15)$$

Berücksichtigt man Gleichung 11 und Gleichung 12, die Darstellung der Relaxation

als „chemische Gleichung“, so ergibt sich unter Berücksichtigung der Phasenänderung schlußendlich (Griesinger 1991) zu Beginn der Mischzeit:

$$\begin{pmatrix} I_{2z} \\ I_{1z} \end{pmatrix} \bullet = \begin{pmatrix} -\rho_{I_2, \text{long}} & \sigma_{\text{long}} \\ -\sigma_{\text{long}} & -\rho_{I_1, \text{long}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_{2,0} \\ I_{1,0} \end{pmatrix} \quad (16)$$

Für Diagonalpeaks ergibt sich daraus unter Nutzung der *initial rate approximation*:

$$\dot{I}_{1z} = -\rho_{I_1} I_{1,0} \Rightarrow I_{1z} = I_{1,0} (1 - \rho_{I_1} \tau_m) \quad (17)$$

und für Kreuzsignale:

$$\dot{I}_{2z} = -\sigma I_{1,0} \Rightarrow I_{2z} = -I_{1,0} \cdot \sigma \cdot \tau_m \quad (18)$$

Die NOESY-Spektren ermöglichen die sequentielle Zuordnung der einzelnen Spinsysteme über Bindungen hinweg, die für skalare Kopplungen unüberwindbar sind. Die Kreuzsignale und deren Intensität beruhen allein auf der räumlichen Nähe der Kerne. Diese Informationen sind es dann auch, die in den Strukturrechnungen als relevante Parameter Berücksichtigung finden.

3.1.3 Total Correlation Spectroscopy

Ein Manko des COSY-Experiments ist, daß die Magnetisierung von einem Kern auf den nächsten übertragen wird, ein weiterer Transfer aber nicht stattfindet. Ein „Wandern“ durch ein Spinsystem ist nur indirekt möglich, durch das Verfolgen der Korrelation A mit B, dann B mit C, dann C mit D, usw.

Die chemischen Verschiebungen stellen effektive Hürden dar, die ein Wandern der Magnetisierung durch ein Spinsystem unterbinden. Gewünscht ist also:

$$I_{1x} \longrightarrow I_{2x} \longrightarrow I_{3x} \longrightarrow \dots \quad (19)$$

mit den Kernen 1, 2, 3, ... innerhalb eines Spinsystems.

Die Evolution des Dichteoperators wird durch die Liouville-von Neumann-Gleichung beschrieben:

$$\frac{d}{dt} \sigma(t) = -i[H_0 + H_{RF}(t), \sigma(t)] - \hat{\Gamma}\{\sigma(t) - \sigma_0\} \quad (20)$$

Sie besteht aus dem Hamilton-Operator für die freie Evolution (H_0), dem Hamilton-Operator der Pulssequenz (H_{RF}) und dem Relaxations-Superoperator (Glaser und Quant 1996). Vernachlässigt man – für die kurze Einstrahldauer – die Relaxation, so bietet sich die Möglichkeit, die Wirkung einer Multipuls-Sequenz über den effektiven Hamilton-Operator, H_{eff} , zu beschreiben.

Der gewünschte Hamilton-Operator für die Mischzeit (Index m) kann dann bis zu der einfachen Form reduziert werden:

$$\bar{H}_{(m)} = H_J = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 2\pi J_{ij} I_i I_j \quad (21)$$

mit

$$2\pi J_{ij} I_i I_j = 2\pi J_{ij} (I_{ix} I_{jx} + I_{iy} I_{jy} + I_{iz} I_{jz}) \quad (22)$$

Im „normalen“ Hamilton-Operator sind die einzelnen Spins voneinander unabhängig (*single spin modes*), da die Kopplung als schwach gegenüber den chemischen Verschiebungsdifferenzen ($|\Delta\nu_{ij}| \gg |J_{ij}|$) angenommen wird und für die Aminosäuren der Backbone-Resonanzen auch gilt. Im Falle, daß die Entwicklung von chemischer Verschiebung unterdrückt wird, muß die Evolution während der Mischzeit als kollektiver Vorgang angesehen werden, von Braunschweiler und Ernst (Braunschweiler und Ernst 1983) als *collective spin modes* bezeichnet.

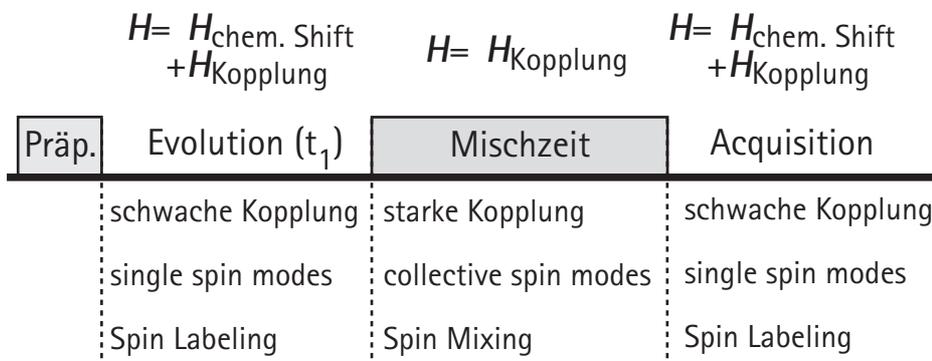


Abbildung 25: Schematische Darstellung eines 2D-Experimentes mit isotroper Mischsequenz. Nach (Braunschweiler and Ernst 1983).

Die Pulssequenzen, mit denen der gewünschte Effekt erreicht werden kann, basieren auf Refokussierung der chemischen Verschiebungen bei gleichzeitiger Evolution der Kopplung. Anhand von 180° -Pulsen kann man sich das Prinzip verständlich machen: Ein π -Puls kann in einem Zweispinsystem die chemische Verschiebung refokussieren, wenn er gleichzeitig auf beide Spins wirkt, bei denen die Evolution der J -Kopplung gleichzeitig invertiert wird.

Eine Reihe von aufeinander folgenden nicht-selektiven 180° -Pulsen, die Abstände klein im Vergleich zu der größten chemischen Verschiebung, erreicht nun durch die stete Refokussierung der chemischen Verschiebung – bei gleichzeitiger Transparenz für die skalare Kopplung – den erwünschten Effekt: Die Evolution findet über die J -Kopplung statt.

Ausgangspunkt ist die Liouville-von Neumann-Gleichung ohne Einbeziehung der Relaxation

$$\dot{\sigma} = -i[\mathbf{H}(t), \sigma] \quad (23)$$

mit dem zeitabhängigen Hamiltonoperator und dem Dichteoperator.

In einem System mit zwei Spin- $1/2$ -Teilchen auf die der anzuwendende Hamilton-Operator

$$\bar{H}^{(m)} = 2\pi J_{12} I_{1z} I_{2z} \quad (24)$$

lautet, der in der Mischzeit wirkt, stimmen die *collective spin modes* mit den Summen und Differenzen der Produktoperatoren überein:

$$\begin{aligned} \Sigma_{\alpha} &= \frac{1}{2} \{ I_{1\alpha} + I_{2\alpha} \} \\ \Delta_{\alpha} &= \frac{1}{2} \{ I_{1\alpha} - I_{2\alpha} \} \\ \Sigma_{\alpha\beta} &= \{ I_{1\alpha} I_{2\beta} + I_{1\beta} I_{2\alpha} \} \\ \Delta_{\alpha\beta} &= \{ I_{1\alpha} I_{2\beta} - I_{1\beta} I_{2\alpha} \} \end{aligned} \quad (25)$$

mit den Kommutatoren:

$$\begin{aligned}
 \left[\overline{H}^{(m)}, \Sigma_{\alpha} \right] &= 0 \\
 \left[\overline{H}^{(m)}, \Sigma_{\alpha\beta} \right] &= 0 \\
 \left[\overline{H}^{(m)}, \Delta_{\alpha} \right] &= i\Delta_{\beta\gamma} \\
 \left[\overline{H}^{(m)}, \Delta_{\beta\gamma} \right] &= -i\Delta_{\alpha}
 \end{aligned}
 \tag{26}$$

mit α, β, γ als zyklische Vertauschung von x, y und z.
Die Evolution ergibt sich in der Mischzeit zu:

$$\begin{aligned}
 \Delta_{\alpha} &= \Delta_{\alpha} \cos(2\pi J_{12}\tau_m) + \Delta_{\beta\gamma} \sin(2\pi J_{12}\tau_m) \\
 \Delta_{\beta\gamma} &= \Delta_{\beta\gamma} \cos(2\pi J_{12}\tau_m) - \Delta_{\alpha} \sin(2\pi J_{12}\tau_m)
 \end{aligned}
 \tag{27}$$

Die Summenterme aus Gleichung 25 bleiben invariant.
Die Evolution eines Kerns 1 und dessen Magnetisierungstransfer auf den Kern 2 ergeben sich bei isotropen Mischen (Glaser and Quant 1996) zu:

$$\begin{aligned}
 I_{1z} &\xrightarrow{\pi J_{12}\tau_m(2I_{1x}/2x)} I_{1z} \cos(\pi J_{12}\tau_m) \\
 &\quad - 2I_{1y}/2x \sin(\pi J_{12}\tau_m) \\
 &\xrightarrow{\pi J_{12}\tau_m(2I_{1y}/2y)} I_{1z} \cos(\pi J_{12}\tau_m) \cos(\pi J_{12}\tau_m) \\
 &\quad + 2I_{1x}/2y \cos(\pi J_{12}\tau_m) \sin(\pi J_{12}\tau_m) \\
 &\quad - 2I_{1y}/2x \sin(\pi J_{12}\tau_m) \cos(\pi J_{12}\tau_m) \\
 &\quad + I_{2z} \sin(\pi J_{12}\tau_m) \sin(\pi J_{12}\tau_m)
 \end{aligned}
 \tag{28}$$

Ersichtlich ist, daß der Transfer nur über die J-Kopplung erfolgt.
Da das Anwenden einfacher 180°-Pulse nicht ausreichend ist, um von theoretischen Erwägungen zu guten Spektren zu gelangen, werden an dieser Stelle die beiden verwendeten TOCSY-Pulssequenzen Clean-TOCSY und FLOPSY vorgestellt. Diese Sequenzen verhindern oder verringern die durch Kreuzrelaxation im Spinlockfeld erzeugten ROE-Signale (*rotating frame Overhauser effect*), die als negative Signale in den Spektren auftreten können.

3.1.3.1 Clean-TOCSY

Der erste Ansatz für ein TOCSY, in dem die durch den ROE auftretenden Artefakte unterdrückt werden sollten, beruhte auf Delays zwischen den einzelnen Pulsen eines 90° - 180° - 90° -Elements (Griesinger, Otting et al. 1988). Ausgenutzt wurde in diesem Experiment die Unterdrückung der Kreuzrelaxation durch das gegenseitige Auslöschen der longitudinalen und transversalen Relaxation; ein Nachteil dabei ist die bei gleicher Bandbreite deutlich erhöhte Einstrahlleistung.

In einem zweiten Ansatz (Kersebaum, Markert et al. 1992), unter Beibehaltung des Namens Clean-TOCSY, wurde die Leistung während eines *composite* 90° -Pulses variiert; der optimale 90° -Puls ähnelt im Profil einer Cosinus-Funktion. Aufgeteilt in 8 Teilpulse, die diese Funktion nachbilden, resultiert ein composite 90° -Puls, der analog MLEV-17 (Schleucher, Quant et al. ; Bax und Davis 1985) expandiert wurde:

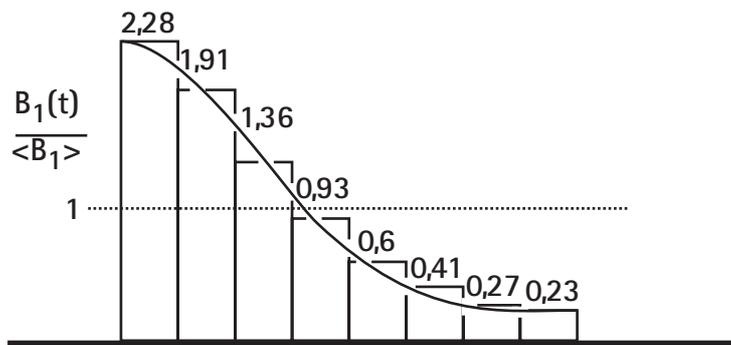


Abbildung 26: Pulssequenz für einen composite 90° -Puls in einem Clean-TOCSY (Kersebaum, Markert et al. 1992). Durchgezogene Linie: Nachgebildete optimale Pulsform; Angegeben sind die relativen Stärken bezogen auf einen composite 90° -Puls (90° - 180° - 90°) in einem konventionellen MLEV.

Die mit Clean-TOCSY aufgenommenen Spektren wiesen gegenüber denen mit der MLEV-17-Sequenz deutlich geringere Störungen durch ROE-Effekte – resultierend in einer geringeren Anzahl an negativen Signalen relativ zur Diagonalen – auf.

3.1.3.2 FLOPSY

Die in der Arbeitsgruppe um A. J. Shaka entwickelten Sequenzen (Kadkhodaie, Rivas et al. 1991) mit dem Akronym FLOPSY (*flip-flop spectroscopy*) ist auf Polarisationstransfer optimiert, was konkret für ein Experiment bedeutet, daß bei geringerer Leistungseinstrahlung während der Mischzeit ein breiterer Frequenzbereich dem Mischungs-Hamilton-Operator unterliegt.

Die Spin-Inversion von I_z nach $-I_z$ gelingt nur genau und vollständig bei einem 180° -Puls *on-resonance*; *off-resonance* ist eine komplette Inversion nicht möglich.

Die Autoren betrachten nun die Nullquantenkomponente $I_{1z}-I_{2z}$, also die Differenz der Magnetisierungen. Wirkt auf diese Nullquantenkomponente ein ZQ180°-Puls¹, so wird die Differenz der Magnetisierungen invertiert, nicht aber die Gesamtmagnetisierung entlang z, die bleibt gleich.

In Konsequenz streben die Autoren an, statt des in Gleichung 24 aufgeführten Hamilton-Operators, der ja direkt aus dem Gesamt-Hamiltonian entwickelt wurde, einen Hamilton-Operator zu generieren, bei dem die longitudinale Komponente der skalaren Kopplung mit den longitudinalen Spin-Operatoren kommutiert und somit keinen weiteren Einfluß auf den Polarisationstransfer nimmt.

Die eigentliche Entwicklung der Sequenzen geschah numerisch, da die Methode des *Average Hamiltonian* bei einem variierenden Hamilton-Operator nicht anwendbar gewesen wäre. Es resultierte das Pulsschema R in Abbildung 27, das in der Expansion $\overline{RRRR RRRR}$ im Pulsprogramm implementiert wurde.

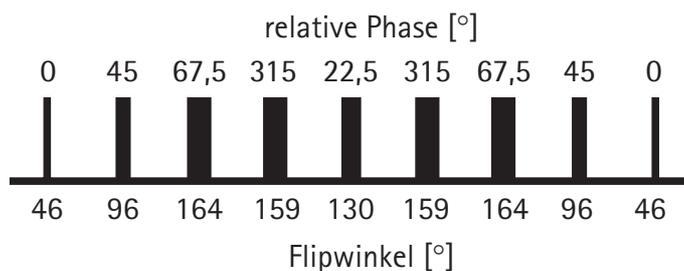


Abbildung 27: Schematische Darstellung der FLOPSY-Sequenz (Kadkhodaie, Rivas et al. 1991). Die Pulse sind direkt aneinandergereiht, es sind zwischen ihnen keine Delays.

3.1.4 Sequenzen zur Wasserunterdrückung

Die meisten NMR-spektroskopischen Untersuchungen an Biomakromolekülen finden in wässrigen Lösungen statt. Die Konzentration des Wassers liegt bei etwa 55 M, wohingegen die Konzentrationen der gelösten Moleküle im Bereich von wenige mM liegen. Die Intensitätsauflösung, die Dynamik des Experimentes würde um einen Faktor 10^4 bis 10^5 eingeschränkt, müßte das Signal des Wassers vollständig mit aufgenommen werden. Neben dem Problem der Dynamik steht das Problem der Linienbreite; das Wassersignal überdeckt weite Bereiche der Region, in der z. B. in Proteinen die H α -Resonanzen zu erwarten sind.

H₂O bewirkt zudem *Radiation damping*, der Effekt der Re-Induzierung eines Ma-

¹ ZQ180° entspricht einem Puls, der auf die Nullquantenkomponente wie ein normaler 180°-Puls wirkt.

gnetfeldes in der Spule des Probenkopfes durch die Magnetisierung in der Probe. Nach der Lenz'schen Regel wird in der Spule eine Spannung induziert, die der Spannung, die durch das H_2O -Signal induziert wird, entgegengesetzt ist. Dadurch relaxiert das Wasser schneller und die Breite des beobachteten Signals vergrößert sich. Der Dämpfungseffekt steigt mit dem Magnetfeld und der Güte Q des Probenkopfes.

Die einfachste Methode zur Unterdrückung des Wassersignals ist der Austausch von H_2O zu D_2O , was aber dazu führt, daß die außerordentlich wichtigen Resonanzen der mit Wasser austauschenden Protonen im Spektrum fehlen. Gerade in Proteinen ist die Zuordnung und Berücksichtigung der Resonanzen der Amidprotonen des Proteinrückrates für die Generierung einer Struktur unerlässlich.

Um die Intensität des Lösungsmittelsignals zu reduzieren, werden innerhalb der Experimente folgende Methoden verwandt, auf die näher eingegangen werden soll:

- Vorsättigung (Presaturation)
- Jump-Return (Binominalsequenzen)
- WATERGATE (Gradientensequenzen)

3.1.4.1 Vorsättigung

Die einfachste und dabei sehr effektive Methode der *Presaturation* besteht in der Einstrahlung eines schwachen RF-Feldes B_{presat} an der Wasserfrequenz während der Relaxationsperiode. Durch das Feld kommt es zu einer Equilibrierung der Boltzmann-Verteilung in den Energieniveaus. Die Länge kann variieren, in den meisten Pulsprogrammen wird eine Länge von 1 bis 5 mal die T_1 -Relaxationszeit empfohlen; in der Praxis hat sich eine Zeit von 1 bis 3 Sekunden Einstrahlung bei Biomakromolekülen bewährt.

Ein Problem dieser Methode ist jedoch die Mitsättigung nahe der Wasserresonanz gelegenen Protonen, namentlich der $\text{H}\alpha$ -Protonen in Proteinen. Diese sind oftmals nur schwer zu beobachten, da die Signalintensität schwach ist. Gleichzeitig werden die Signale der Protonen deutlich geschwächt, die mit Wasser austauschen. Dieser Effekt ist Temperatur-, Puffer- und pH-abhängig und in den TFPI-Proben bei einem pH von etwa 3-4 klein.

3.1.4.2 Binominale Sequenzen

Während bei der Vorsättigung die Solvens-Signale dadurch unterdrückt werden, daß lange mit der entsprechenden Frequenz eingestrahlt wird, bewirken binomina-

le Sequenzen, daß das Anregungsprofil über das Spektrum an der Stelle der Lösungsmittelsignale gleich Null ist. Dabei kann das Anregungsprofil auf Null absinken (z. B. bei der Sequenz $1-\bar{3}-3-\bar{1}$) oder einen Nulldurchgang (z. B. bei der Sequenz $1-\bar{1}$) besitzen.

Binominalpulse beruhen auf einer Sequenz harter Pulse, die durch gleichbleibende Delays τ getrennt sind. Die Flipwinkel der Pulse entsprechen den Binominalkoeffizienten des dazu gehörigen Binoms (Gleichung 29) mit der Ordnung p .

$$\beta_i \text{ mit } \beta_i = \binom{p}{i} \frac{\pi/2}{2^p} \quad (29)$$

Die resultierenden Binominalsequenzen besitzen ein symmetrisches Anregungsprofil mit einem Abstand der Maxima von $1/\tau$ und Minima bei ungeraden Vielfachen von $1/2\tau$. Der Delay ergibt sich aus den Beziehungen

$$v_{\max} = v_o \pm \frac{n}{\tau} \quad \text{mit } n = 0, 1, 2, 3, \dots \quad (30)$$

und

$$v_{\text{null}} = v_o \pm \left(\frac{2n+1}{2\tau} \right) \quad (31)$$

mit v_o als Transmitteroffset, v_{\max} als die Frequenz maximaler Anregung und v_{null} als Resonanzfrequenz des Wassers. Die Sequenzen sind *on-resonance* auf der Frequenz des Lösungsmittels am robustesten, also am wenigsten anfällig gegen *off-resonance* Effekte; dabei ist folglich v_o gleich der v_{null} .

Das Anregungsprofil dieser Sequenzen gehorcht in guter Näherung im allgemeinen Fall $\cos^p(\pi\Delta\nu\tau)$; unter der Bedingung $v_o = v_{\text{null}}$ gilt in Näherung für das Anregungsprofil $\sin^p(\Delta\nu\tau/2)$:

Mit dem Grad des Binoms steigen die Breiten der unterdrückten Bereiche und die Empfindlichkeit gegenüber Imperfektionen, zudem steigt die Phasendispersion $\Delta\phi = p\pi$.

Die einfachste binominale Sequenz, bestehend aus zwei um 180° phasenverschobene 90° -Pulse ($1-\bar{1}$), die durch einen Delay τ getrennt sind, ist unter dem Namen

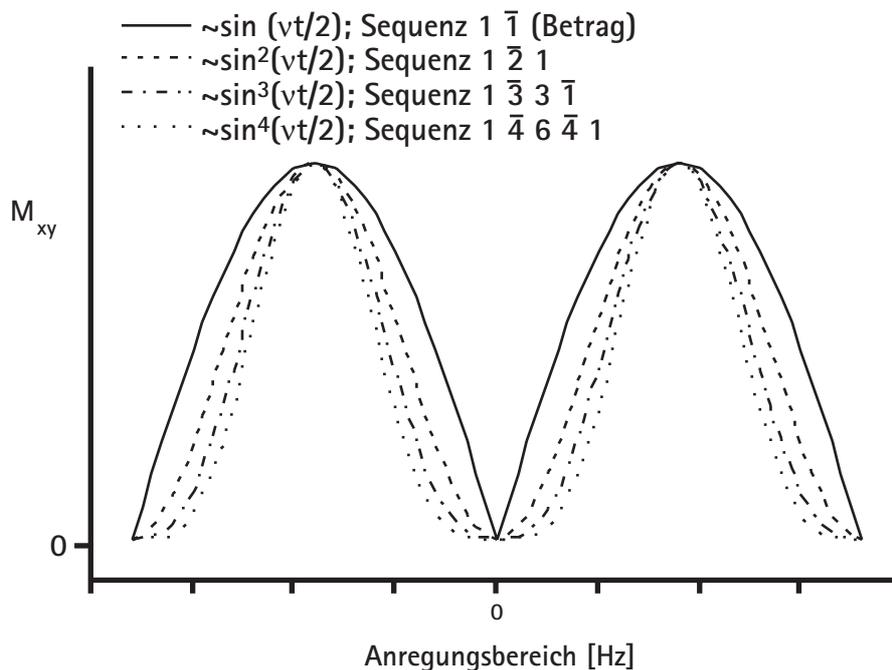


Abbildung 28: Darstellung des transversalen Anregungsprofils binomischer Pulsfolgen. Die Zahlen bei den Sequenzen geben die Anzahl der 90°-Pulse an; ein Strich („Bar“) über der Zahl bedeutet, daß diese Pulsfolge relativ um 180° phasengeschoben ist. Nach (Hore 1989).

Jump-Return von Plateau und Guéron (Guéron und Plateau 1982) eingeführt worden. Dabei entwickeln sich nach

$$I_z \xrightarrow{\Omega\pi I_y} I_z \cos(\Omega\tau) + I_x \sin(\Omega\tau) \quad (32)$$

in τ die gewünschten Frequenzen maximal und werden von dem zweiten 90°-Puls in Abhängigkeit von $\nu_{\text{null}} - \nu_{\text{max}}$ berührt; das sich *on-resonance* befindliche Wasser entwickelt in der Zeit τ keine chemische Verschiebung.

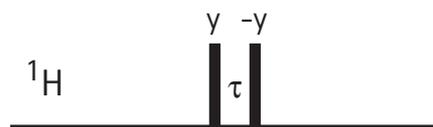


Abbildung 29: Die Jump-Return-Sequenz. Nach (Guéron and Plateau 1982).

Die Amplitude der detektierten Signale ist proportional zu I_x und hängt vom Delay über den Faktor $\sin(\Omega\tau)$ ab. Dadurch kommt es zu dem Sinus-förmigen Anregungsprofil dieser Pulsfolge und dem daraus resultierenden Erscheinungsbild der Spek-

tren in t_2 mit einer Hälfte, in der alle Signale positiv und der anderen Hälfte, in der alle Signale negativ sind.

Der konstante Delay τ und damit die Anregungsmaxima sind gegeben durch Als gu-

$$\tau = \frac{1}{4(\nu_{\max} - \nu_{\text{null}})} \quad (33)$$

ter Kompromiß für den Delay stellte $90 \mu\text{s}$ heraus, was einem Anregungsmaximum in etwa 2800 Hz Abstand vom Wasser entspricht. Mit dieser Wahl erreicht man bei 600 MHz Feldstärke eine ausreichende Anregung auch der Randbereiche eines Proteinspektrums.

Um die Empfindlichkeit dieser Sequenz gegenüber RF-Phasenfehler und *offset*-Ungenauigkeiten zu kompensieren, kann der erste 90° -Puls verkürzt und der zweite Puls verlängert werden. In dieser *power-adapted* JR-Sequenz (Guéron, Plateau et al. 1992) finden Pulslängen von z. B. $25 \mu\text{s}$ Verwendung, so daß die beiden Pulse fein aufeinander abgestimmt werden können.

Die Evolution der chemischen Verschiebung ($\tau_{\text{chem.Verschiebung}}$) nach dem ersten 90° -Puls kann zur Bestimmung der Phasenverschiebung und damit zur Feineinstellung der Länge des zweiten Pulses bestimmt werden:

$$\tau_{\text{chem.Verschiebung}} = \tau + \frac{4 \cdot \tau_{90}}{\pi} \quad (34)$$

mit τ_{90} als Länge des ersten 90° -Pulses, der bestimmt und als Referenzphase in dem Pulsprogramm berücksichtigt werden.

3.1.4.3 JR-Echo

Sklenár und Bax (Sklenár und Bax 1987) schlugen den Einsatz von Gradienten zur Verbesserung der Unterdrückung des unerwünschten Wassersignals vor. Die bereits erwähnte JR-Sequenz wird von einem binominalen 180° -Puls ergänzt, der mit einem EXORCYCLE ($\phi=0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, 270^\circ$) oder CYCLOPS ($\phi=0^\circ, 270^\circ, 90^\circ, 180^\circ$) gezykelt wird. Die beiden Gradienten rahmen diesen Puls ein und sorgen dafür, daß in jedem Scan die Magnetisierung des Wassers zerstört wird. Um die größtmögliche Unterdrückung zu erhalten, muß der Phasenzyklus allerdings komplett durchlaufen werden.

Diese Sequenz ist robuster als die meisten anderen Sequenzen bezüglich Fehljustierungen. Allerdings ist die Breite des unterdrückten Bereiches durch das Anregungs-

profil von $\sin^3(\omega\tau)$ größer als bei der normalen JR-Sequenz.

3.1.4.4 WATERGATE

Das Akronym steht für *Water Suppression by Gradient Tailored Excitation*. Es geht bei dieser Methode darum, mit Hilfe von Gradienten das Solvens-Signal *anders* anzuregen als die interessanten Resonanzen.

Diese Sequenz kombiniert einen selektiven 180° -Puls, der bezüglich der interessierenden Resonanzen *on-resonance* liegt, mit zwei z-Gradienten.

Die Verwirklichung des 180° -Pulses ist der Schlüsselschritt dieses Experiments. Piotta et al. (Piotta, Saudek et al. 1992) benutzten zwei selektive 90° -Pulse, die einen unselektiven 180° -Puls einschließen:

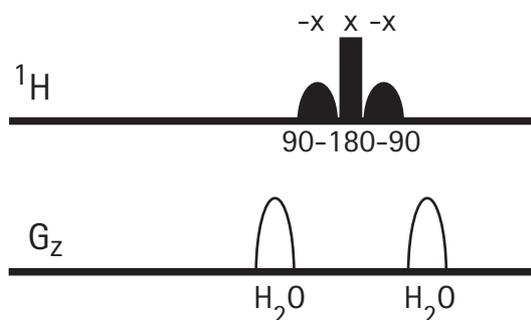


Abbildung 30: Einfachste WATERGATE-Sequenz.

Die transversale Magnetisierung wird durch den ersten Gradienten dephasiert, der selektive Puls zwischen den Gradienten invertiert die Magnetisierungen und die Wassermagnetisierung erfährt einen Puls von insgesamt 360° . Der zweite Gradient mit gleichem Vorzeichen rephasiert lediglich die Magnetisierungen, die zuvor einen 180° -Puls erfahren haben, das Wasser bleibt also dephasiert und tritt so im aufgenommenen Signal nicht auf. Piotta verwendete in dieser ersten Version einfache Rechteckpulse schwacher Leistung für die selektiven Pulse.

Sklenár et al. (Sklenár, Piotta et al. 1993) schlugen vor, optimierte Pulszüge einzubauen. Der berechnete optimale Pulszug für den 180° -Puls lautet – ausgehend von dem Pulszug $3-5-15-\overline{15}-5-3$ (Wang und Pardi 1987) – $3-9-19-\overline{19}-9-3$, ausgeschrieben: $3\alpha-\tau-9\alpha-\tau-19\alpha-\tau-19\alpha-\tau-9\alpha-\tau-3\alpha$ mit $62\alpha=180^\circ$. Die drei letzten Pulse sind gegenüber den ersten drei um 180° phasenverschoben. Dadurch wird das Wassersignal *on-resonance* nicht angeregt:

Wie gefordert, bewirkt diese Sequenz *on-resonance* keine Anregung, das Wasser wird durch die beiden gleichartigen Gradienten dephasiert, alle Resonanzen, die durch die Pulsfolge einen 180° -Puls erfahren haben, werden durch den zweiten

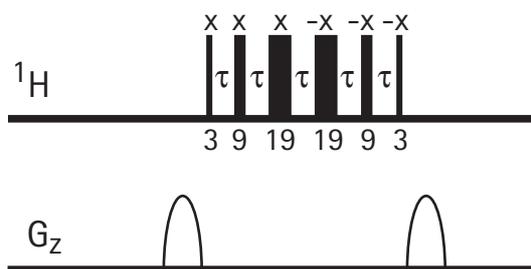


Abbildung 31: Die erweiterte WATERGATE-Sequenz. Die Zahlen geben die Verhältnisse der Pulslängen wieder.

Gradienten rephasiert.

3.2 Bestimmung von Spinsystemen

Die ersten Schritte der Zuordnung erfolgen mit den Spektren, die Korrelationen über die skalare Kopplung treffen. Zu diesen Spektren gehören MQF-COSY Experimente und die TOCSY-Experimente.

Diese Experimente ermöglichen die Identifizierung einzelner Spinsysteme und ermöglichen eine erste Kategorisierung. In Proteinen mit ausschließlich natürlichen Aminosäuren können die Spinsysteme in verschiedene Kategorien eingeteilt werden.

Aminosäuretyp	H β -Shifts	H β -, H γ -Shifts	H β -, H γ -, H δ -Shifts
Glycin	Glycin	Glycin	Glycin
Alanin	Alanin	Alanin	Alanin
Threonin	Threonin	Threonin	Threonin
Valin	Langes System	Valin	Valin
Isoleucin	Langes System	Isoleucin	Isoleucin
Leucin	Langes System	Langes System	Leucin
Arginin	Langes System	Langes System	Arginin
Lysin	Langes System	Langes System	Lysin

Tabelle 2: Kategorisierung der Spinsysteme der einzelnen Aminosäuren; von links nach rechts: steigender Kenntnisgrad der Protonen einer Aminosäure. Nach (Cavanagh, Fairbrother et al. 1996).

Aminosäuretyp	H β -Shifts	H β -, H γ -Shifts	H β -, H γ -, H δ -Shifts
Glutamin	Langes System	5 Spin System	5 Spin System
Glutaminsäure	Langes System	5 Spin System	5 Spin System
Methionin	Langes System	5 Spin System	5 Spin System
Cystein	3 Spin System	3 Spin System	3 Spin System
Asparaginsäure	3 Spin System	3 Spin System	3 Spin System
Asparagin	3 Spin System	3 Spin System	3 Spin System
Phenylalanin	3 Spin System	3 Spin System	3 Spin System
Tyrosin	3 Spin System	3 Spin System	3 Spin System
Tryptophan	3 Spin System	3 Spin System	3 Spin System
Histidin	3 Spin System	3 Spin System	3 Spin System
Serin	Serin	Serin	Serin

Tabelle 2: Kategorisierung der Spinsysteme der einzelnen Aminosäuren; von links nach rechts: steigender Kenntnisgrad der Protonen einer Aminosäure. Nach (Cavanagh, Fairbrother et al. 1996).

Wie ersichtlich, ist selbst eine erste Einteilung über die Spinsysteme bei Zuordnungen hilfreich. So können sofort eindeutige Spinsysteme wie die von Threonin, Serin, Glycin oder Alanin als Startpunkte für eine folgende sequenzspezifische Zuordnung dienen. Je besser man die einzelnen Spinsysteme identifizieren kann, desto leichter sollte die anschließende sequentielle Zuordnung fallen.

Die Kombination von MQF-COSY-Spektren und TOCSY-Spektren hat sich bewährt: Ersteres liefert die Kombination der Protonen, versagt aber im aliphatischen Bereich oft durch Überlagerungen, die es erschweren, die einzelnen Spinsysteme weiter zu verfolgen. Im TOCSY wird theoretisch jedes Spinsystem als Ganzes angezeigt, d. h. von jeder Resonanz eines Spinsystems kann eine Korrelation zu allen anderen Mitgliedern dieses Spinsystems beobachtet werden. Problematisch beim TOCSY sind die möglichen Überlagerungen und andererseits die Mehrdeutigkeiten, die durch die verschiedenen Ausgangsmagnetisierungen und demnach verschiedenen Transfereffizienzen entstehen können.

3.3 Sequentielle Zuordnung über NOEs

Über die sequentiellen dipolaren Wechselwirkungen kann nach der Klassifizierung der Spinsysteme die sequenzspezifische Zuordnung erfolgen. Die theoretisch recht simple Zuordnung wird durch nichtsequentielle NOEs und Probleme der Spinsystemzuordnung erheblich erschwert.

HN–HN, H α –HN und auch HN–H β NOEs sind auch über große Sequenzsprünge möglich, gerade auch bei so kompakten Proteinen wie den Kunitz-Inhibitoren mit ihren drei Disulfidbrücken.

Die Konsistenz der Ergebnisse bei fortschreitender Zuordnung und Einbeziehung erster struktureller Parameter ist die beste Möglichkeit zur Überprüfung der gefundenen Zuordnung.

3.4 Zuordnung der Spinsysteme in TFPI-2

Die Zuordnung erfolgte in den ersten Schritten entsprechend den beschriebenen Methoden.

Leider konnte nur vereinzelt auf eindeutige Spinsysteme als Startpunkte zugegriffen werden, in der Sequenz des TFPI-2 fehlen Serine, Alanine und eindeutig zuordenbare Glycine. Die drei Threonine waren mit Ausnahme von Thr-19 im TOCSY nicht eindeutig zu indentifizieren.

Bester Ansatz war die Ähnlichkeit zu BPTI und darüber konnten ausgehend von z. B. Tyr-23 mit seiner charakteristischen HN-Verschiebung (10.4 ppm im TFPI, 10.55 ppm im BPTI) die ersten Zuordnungen getroffen werden (Gröschke 1992). Auch andere Aminosäuren mit auffälligen Verschiebungen der HN- und H α -Protonen boten einen Ansatz zur Zuordnung. Im direkten Vergleich der Spektren fallen die Kreuzpeaks auf. Zum Vergleich werden hier die Spektren von BPTI aus der Publikation aus der Gruppe um Wüthrich (Wagner und Wüthrich 1982) mit einem DQF-COSY des TFPI-2 gezeigt.

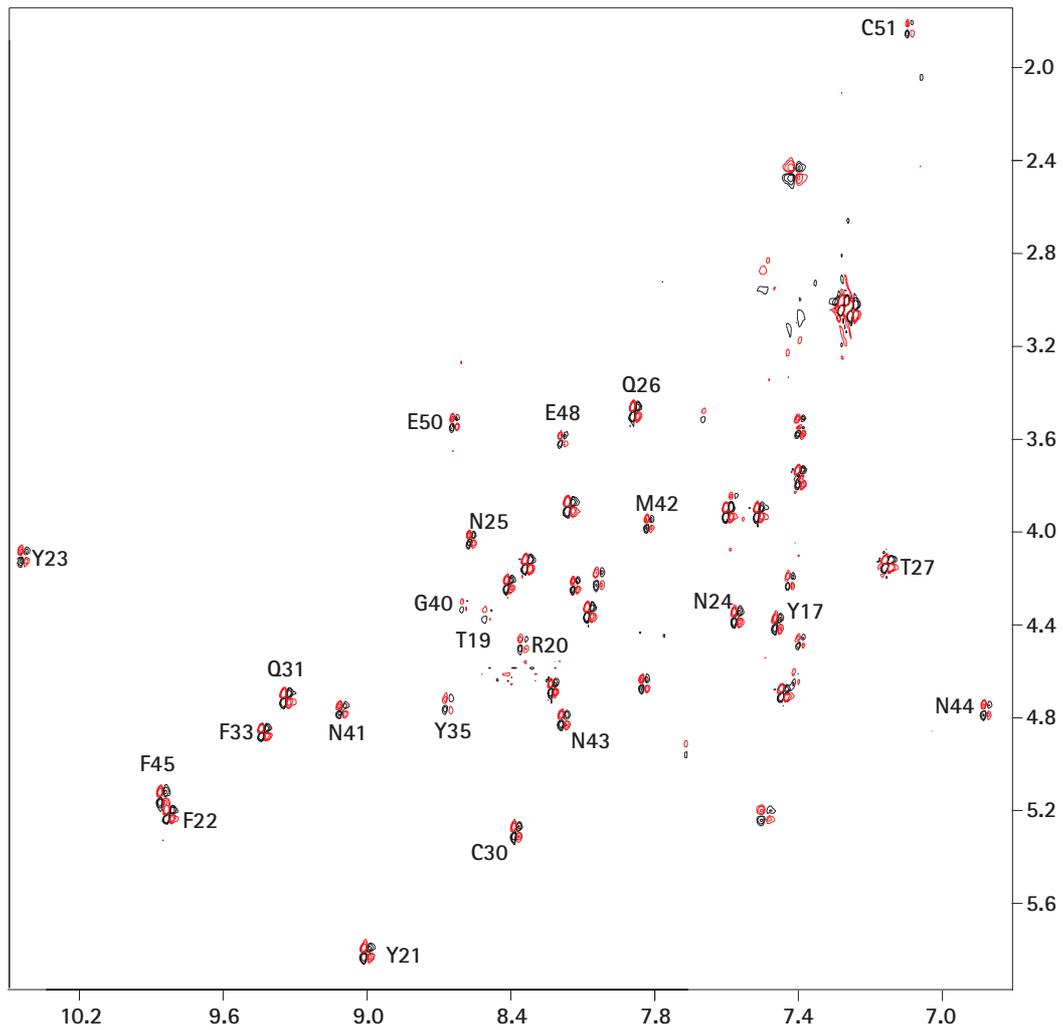


Abbildung 33: Fingerprint-Bereich aus einem DQF-COSY-Spektrum von TFPI-2. Die beschrifteten Signale sind konserviert in BPTI und weisen außergewöhnliche Verschiebungen auf.

Aminosäure	NH	H α	H β 1, H β 2	H γ 1, H γ 2	andere	Spin- system
Lys-1						A ₂ (F ₂ T ₂)MPX
Pro-2		4.220	0.826 1.924	1.809 1.609	3.472 3.644	A ₂ T ₂ MPX
Asp-3	7.218	4.491	3.092			AMX
Phe-4	8.218	4.676	2.899 2.714			AMX
Cys-5	7.404	3.970	2.430 2.146			AMX
Phe-6	7.863	4.664	2.335 1.947			AMX
Leu-7	7.321	4.424	1.935 1.653	1.073 0.974		A ₃ B ₃ MPTX
Glu-8	8.397	4.258	2.051 1.974	2.540 2.540		AM(PT)X
Glu-9	7.611	3.570	0.209 -0.001	1.250 1.361		AM(PT)X
Asp-10	7.390	5.204	2.453 2.676			AMX
Pro-11		4.913	2.862 2.307	2.340 2.221	3.741 4.120	A ₂ T ₂ MPX
Gly-12	8.666	4.232	4.108			AX
Ile-13						A ₃ MPT(B ₃)X
Cys-14	8.060	4.224	3.146 3.146			AMX

Tabelle 3: Getroffene Zuordnung der Spinsysteme aus den Spektren des TFPI-2. Die Verschiebungen entsprechen denen in den zur Strukturbestimmung benutzten NOESY-Spektren. Spinsysteme nach (Wüthrich 1986).

NMR-Experimente zur Zuordnung
Zuordnung der Spinsysteme in TFPI-2

Aminosäure	NH	H α	H β 1, H β 2	H γ 1, H γ 2	andere	Spin- system
Arg-15	8.149	3.948	1.418 1.937		δ 3.113 ϵ 7.070	A ₂ (T ₂)MPX
Gly-16						AX
Tyr-17						AMX
Ile-18	8.970		2.035	1.270 1.418	δ 0.961 δ 0.888	A ₃ MPT(B ₃)X
Thr-19	8.494	4.368	3.980	0.961		A ₃ MX
Arg-20	8.362	4.503	0.788 1.719		δ 3.245	A ₂ (T ₂)MPX
Tyr-21	8.991	5.769	2.689 2.689		δ 6.700 ϵ 6.786	AMX
Phe-22	9.805	5.198	2.803 2.751		δ 7.008 ϵ 7.38, ζ 7.29	AMX
Tyr-23	10.398	4.146	3.393 2.578		δ 7.087 ϵ 6.328	AMX
Asn-24	7.500	4.392	3.230 1.715			AMX
Asn-25	8.575	4.071	2.830 2.858			AMX
Gln-26	8.342	4.170	2.369 2.455	2.196 2.161		AM(PT)X
Thr-27	6.880	4.170	4.226	1.056		A ₃ MX
Lys-28	7.909	3.541	2.122 1.937	1.653 1.237	ϵ 2.998 ζ 7.252	A ₂ (F ₂ T ₂)MPX
Gln-29	7.121	4.620	2.122 2.243	1.961 1.710		AM(PT)X

Tabelle 3: Getroffene Zuordnung der Spinsysteme aus den Spektren des TFPI-2. Die Verschiebungen entsprechen denen in den zur Strukturbestimmung benutzten NOESY-Spektren. Spinsysteme nach (Wüthrich 1986).

Aminosäure	NH	H α	H β 1, H β 2	H γ 1, H γ 2	andere	Spin- system
Cys-30	8.390	5.268	3.245 2.492			AMX
Glu-31	9.322	4.730	2.023 1.616	2.233 2.122		AM(PT)X
Arg-32	8.395	4.660	1.813 1.616	1.159 1.492	δ 3.127 6.783	A ₂ (T ₂)MPX
Phe-33	9.415	4.865	3.134 2.899		δ 7.045 ϵ 7.144	AMX
Lys-34	8.073	4.371	1.620 1.310	1.074 1.244	ϵ 2.552 ζ 7.300	A ₂ (F ₂ T ₂)MPX
Tyr-35	8.666	4.738	2.382 2.256		δ 6.996 ϵ 7.292	AMX
Gly-36	8.597	3.38, 3.183				AX
Gly-37						AX
Cys-38	7.673	4.923				AMX
Leu-39	9.538	3.837	1.838 1.752	1.423	0.925 0.730	A ₃ B ₃ MPTX
Gly-40	8.624	4.397, 3.74				AX
Asn-41	9.097	4.778	3.171 2.949		6.666	AMX
Met-42	7.825	3.997	2.344 2.097	1.381 1.332	1.071	AM(PT)X
Asn-43	8.183	4.799	3.269 2.998		δ 7.773 ϵ 8.094	AMX

Tabelle 3: Getroffene Zuordnung der Spinsysteme aus den Spektren des TFPI-2. Die Verschiebungen entsprechen denen in den zur Strukturbestimmung benutzten NOESY-Spektren. Spinsysteme nach (Wüthrich 1986).

NMR-Experimente zur Zuordnung
Zuordnung der Spinsysteme in TFPI-2

Aminosäure	NH	H α	H β 1, H β 2	H γ 1, H γ 2	andere	Spin-system
Asn-44	6.466	4.765	2.552 2.406			AMX
Phe-45	9.818	5.120	3.331 2.734		δ 7.193, ϵ 7.662 ζ 7.569	AMX
Glu-46	8.742	4.306	2.547 2.250			AM(PT)X
Thr-47	7.293	4.688	4.436	1.134		A ₃ MX
Leu-48						A ₃ B ₃ MPTX
Glu-49	8.190	3.652	1.801 1.961	2.361 2.270		AM(PT)X
Glu-50	7.515	3.911	2.492 2.400	2.245 2.070		AM(PT)X
Cys-51	6.790	1.986	3.065 2.615			AMX
Lys-52	8.637	3.589	1.664 1.168	1.437 1.609	2.851	A ₂ (F ₂ T ₂)MPX
Asn-53	8.144	4.257	2.658 2.768			AMX
Ile-54	7.521	3.960	1.776	1.540 1.588	0.892 1.133	A ₃ MPT(B ₃)X
Cys-55						AMX
Glu-56						AM(PT)X
Asp-57	7.280	4.257	2.368 2.023			AMX
Gly-58						AX

Tabelle 3: Getroffene Zuordnung der Spinsysteme aus den Spektren des TFPI-2. Die Verschiebungen entsprechen denen in den zur Strukturbestimmung benutzten NOESY-Spektren. Spinsysteme nach (Wüthrich 1986).

4 Die Experimente zur Bestimmung von Kopplungskonstanten

4.1 Die Bestimmung skalarer Kopplungen

Die Konformation des *Backbone* eines Protein ist in entscheidender Weise von den Winkeln der Bindungen abhängig. Es sind dies die Winkel ϕ , ψ und ω , die Bindungswinkel um die N-C α -Bindung, die C α -C'-Bindungen und um die C'-N-Bindungen beschreiben.

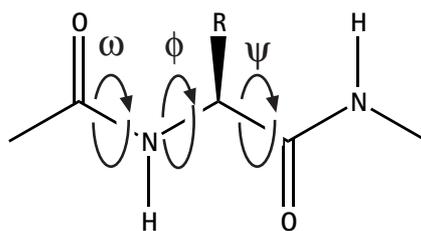


Abbildung 34: Darstellung der Dihedralwinkel ω , ϕ und ψ im peptidischen Backbone. Nach (Croasmun and Carlson 1994)

Dabei ist der Winkel ω meist 0° oder 180° , da eine Peptidbindung in der Regel planar angeordnet ist. Eine – seltene – *cis*-Peptidbindung ($\omega = 0^\circ$) findet man meist bei Xxx-Pro- oder Pro-Pro-Segmenten, dann erkennbar an besonders starken NOE-Wechselwirkungen der H α -Protonen der beteiligten Aminosäuren (Wüthrich 1986).

Der Winkel ϕ ist leichter bestimmbar, weil er über die Kopplungskonstante ${}^3J(\text{HN-H}\alpha)$ meßbar ist. Im Gegensatz dazu ist der *Backbone*-Winkel ψ zwischen $\text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-C}'\text{-O}$ schwerer zugänglich, über kreuzkorrelierte Relaxation etwa, wie auch eine direkte Bestimmung von ω nicht ohne weiteres möglich ist.

Die Winkelabhängigkeit, also der Zusammenhang zwischen Kopplungskonstante und Dihedralwinkel, wurde von Karplus bereits 1959 beschrieben (Karplus 1959). Danach gilt für den *Backbone*-Winkel Φ ($\text{HN-N-C}\alpha\text{-H}\alpha$)

$${}^3J = A \cos^2(\Phi - 60) + B \cos(\Phi - 60) + C \quad (35)$$

Die präzise Parametrisierung der Karpluskonstanten ist notwendig für die Korrelation der Winkel zu den gemessenen Kopplungskonstanten.

Die drei Parameter sind über den Vergleich der gemessenen Kopplungen mit den Winkeln, die in Röntgenstrukturen zu finden sind, mehrfach bestimmt und immer wieder korrigiert worden:

Autoren	A	B	C
(Bystrov 1976)	9,4	-1,1	0,4
(Pardi, Billeter et al. 1984)	6,4	-1,4	1,9
(Ludvigsen und Poulsen 1992)	6,7	-1,3	1,5
(Vuister und Bax 1993)	6,51	-1,76	1,6

Tabelle 4: Liste der Parameter für Gleichung 35.

Die in Tabelle 4 aufgeführten Werte sind 1993 von Vuister und Bax (Vuister and Bax 1993) mit Hilfe des HNHA-Experiments auf ihre Genauigkeit hin überprüft und aufgrund der Standardabweichung der einzelnen Werte von den Kurven optimiert worden. Auch die in der letzten Zeile stehenden Werte tragen eine Standardabweichung von der parametrisierten Karplusbeziehung von 0,73 mit sich (Vuister and Bax 1993).

Wie Abbildung 35 deutlich macht, kann eine gemessene Kopplungskonstante zu vier verschiedenen Winkeln passen, allerdings sind nur wenige sterisch und energetisch sinnvoll.

Schnelle konformationelle Umwandlungen in Proteinen resultieren in gemittelten Kopplungskonstanten im Bereich von etwa 7 Hz; die Möglichkeit der schnellen Umwandlung ist also immer zu berücksichtigen und solche Kopplungskonstanten

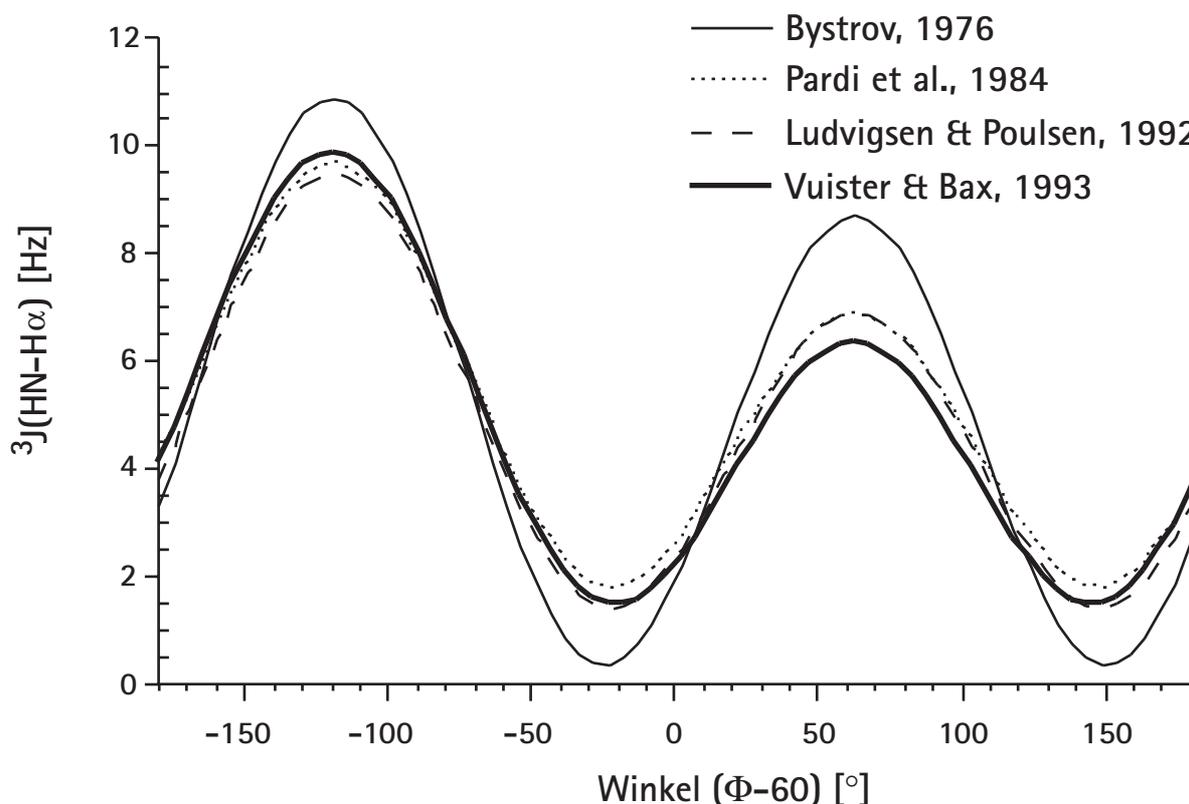


Abbildung 35: Karplusbeziehung für den Backbone-Winkel Φ in Proteinen.

sind immer mit Vorsicht in die Strukturrechnung einzubeziehen.

Die Bestimmung der skalaren Kopplungskonstanten gestaltete sich im Rahmen der Untersuchungen an der zweiten Domäne des TFPI als eines der Hauptprobleme: Die Spektren waren vorhanden, die Qualität der Spektren auch stets gut, aber die Signalbreite verunmöglichte eine einfache Bestimmung aus den DQF-COSY-Spektren. Im Rahmen der Arbeit kamen – neben dem einfachen Auslesen der Werte aus dem Multipllett des DQF-COSY – verschiedene Methoden zur Anwendung, von denen nur die letzte (siehe “TACSX Experimente zur Bestimmung von Kopplungskonstanten” auf Seite 77) zum gewünschten Erfolg führte: Die bestimmten Kopplungskonstanten wurden in die Strukturrechnungen integriert, was zu einer deutlichen „Straffung“ der Strukturen führte – bei gleichzeitiger Erniedrigung der Gesamtenergie des Moleküls. Alle bestimmten $^3J(\text{HN-H}\alpha)$ -Werte waren zudem konsistent mit den erwarteten Sekundärstrukturen.

4.1.1 Die Lorenz-Fit-Methode.

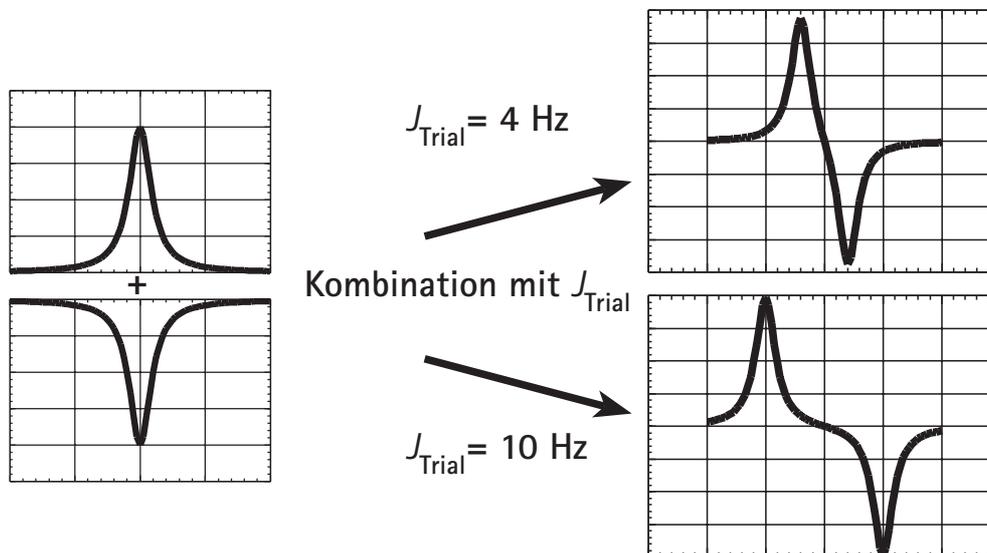


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Lorenz-Fit-Methode: Aus zwei idealen Lorenz-Linien wird versucht, durch Variation der Versuchskopplung J_{Trial} ein Antiphase-Signal nachzuahmen. Die sich ergebenden Peak-to-Peak-Distanzen werden mit den experimentellen Werten verglichen.

Herr Dr. Till Maurer, München, stellte ein Programm zur Bestimmung der Kopplungskonstanten aus einem DQF-COSY Verfügung. Dieses versucht mit der Vorgabe von Halbwertsbreite, abgelesener Kopplungskonstante (*Peak-to-Peak*) und Genauigkeit durch reines Durchprobieren aller Werte eine Lösung zu finden

Dabei wird davon ausgegangen, daß das Antiphase-Signal im DQF-COSY aus zwei idealen Lorenz-Linien besteht, die bei gegebener Halbwertsbreite und variabler Verschiebung, also Kopplungskonstante, kombiniert werden (Abbildung 36). Mit dem Abstand *Peak-to-Peak* kann dann ein Wert für die Kopplungskonstante bestimmt werden. Diese Methode geht davon aus, daß ein Antiphase-Signal aus zwei gleichartigen Lorenz-Linien aufgebaut ist. Trotz der theoretischen Richtigkeit bereitet diese Methode genau dann Probleme, wenn die beiden Linien des Antiphasesignals unterschiedliche Intensität aufweisen.

Die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse waren zu einem großen Teil a) nicht mit den Strukturen in Übereinstimmung zu bringen, b) lieferten unsinnige Werte, oder aber c) die Iteration versagte bei den geforderten Genauigkeiten und das Programm konnte gar keinen Wert liefern.

4.1.2 Die Methode nach Kim und Prestegard

Kim und Prestegard entwickelten 1989 eine Methode (Kim und Prestegard 1989), mit der aus einem DQF-COSY-Spektrum die Kopplungskonstanten bestimmt werden können.

Dabei wird davon ausgegangen, daß sich das Antiphase-Signal in Absorption ($g_a(v)$) und Dispersion ($g_d(v)$) beschreiben lassen über:

$$g_a(v) = \frac{2T_2}{1 + 4\pi^2 T_2^2 (v_0 - v - J/2)^2} - \frac{2T_2}{1 + 4\pi^2 T_2^2 (v_0 - v + J/2)^2} \quad (36)$$

$$g_d(v) = \frac{4\pi T_2^2 (v_0 - v - J/2)}{1 + 4\pi^2 T_2^2 (v_0 - v - J/2)^2} - \frac{4\pi T_2^2 (v_0 - v + J/2)}{1 + 4\pi^2 T_2^2 (v_0 - v + J/2)^2}$$

Zur Auflösung wird die Hilfsvariable $\omega = (\pi T_2)^{-1}$ eingeführt und die Gleichungen in Form der *Peak-to-Peak*-Separationen v_a und v_d beschrieben. Für die Maxima und Minima muß die erste Ableitung Null werden. Es resultiert:

$$1 - \frac{3}{\omega^4} v_a^4 - \frac{2}{\omega^2} v_a^2 - \frac{2}{\omega^4} v_a^2 J^2 + \frac{2J^2}{\omega^2} + \frac{J^4}{\omega^4} = 0 \quad (37)$$

$$3 - \frac{1}{\omega^4} v_d^4 + \frac{2}{\omega^2} v_d^2 - \frac{2}{\omega^4} v_d^2 J^2 + \frac{2J^2}{\omega^2} - \frac{J^4}{\omega^4} = 0$$

Die Hilfsvariable kann eliminiert und die Gleichung nach J aufgelöst werden:

$$J^6 - v_d^2 J^4 + \left(-\frac{9}{4} v_a^4 + \frac{3}{2} v_a^2 v_d^2 + \frac{3}{4} v_d^4 \right) J^2 + \frac{81}{16} v_a^6 - \frac{9}{16} v_a^4 v_d^2 - \frac{21}{32} v_a^2 v_d^4 - \frac{1}{16} v_d^6 + \frac{v_d^8}{64 v_a^2} = 0 \quad (38)$$

Diese Gleichung kann als allgemeine kubische Gleichung für J^2 angesehen werden, in der Form $x^3 + ax^2 + bx + c = 0$, deren einzige reale allgemeine Lösung lautet:

$$\frac{-a}{3} - \frac{\sqrt[3]{2(-a^2 + 3b)}}{3\sqrt[3]{-2a^3 + 9ab + \sqrt{(4(-a^2 + 3b)^3 + (-2a^3 + 9ab - 27c)^2)} - 27c}} + \frac{\sqrt[3]{-2a^3 + 9ab + \sqrt{(4(-a^2 + 3b)^3 + (-2a^3 + 9ab - 27c)^2)} - 27c}}{3\sqrt[3]{2}} \quad (39)$$

Diese Lösung wurde in ein C-Programm ("Kim+Prestegaard.c" auf Seite 187) überführt. Die abgelesenen Werte für die *Peak-to-Peak*-Separationen (v_a und v_d) werden übergeben.

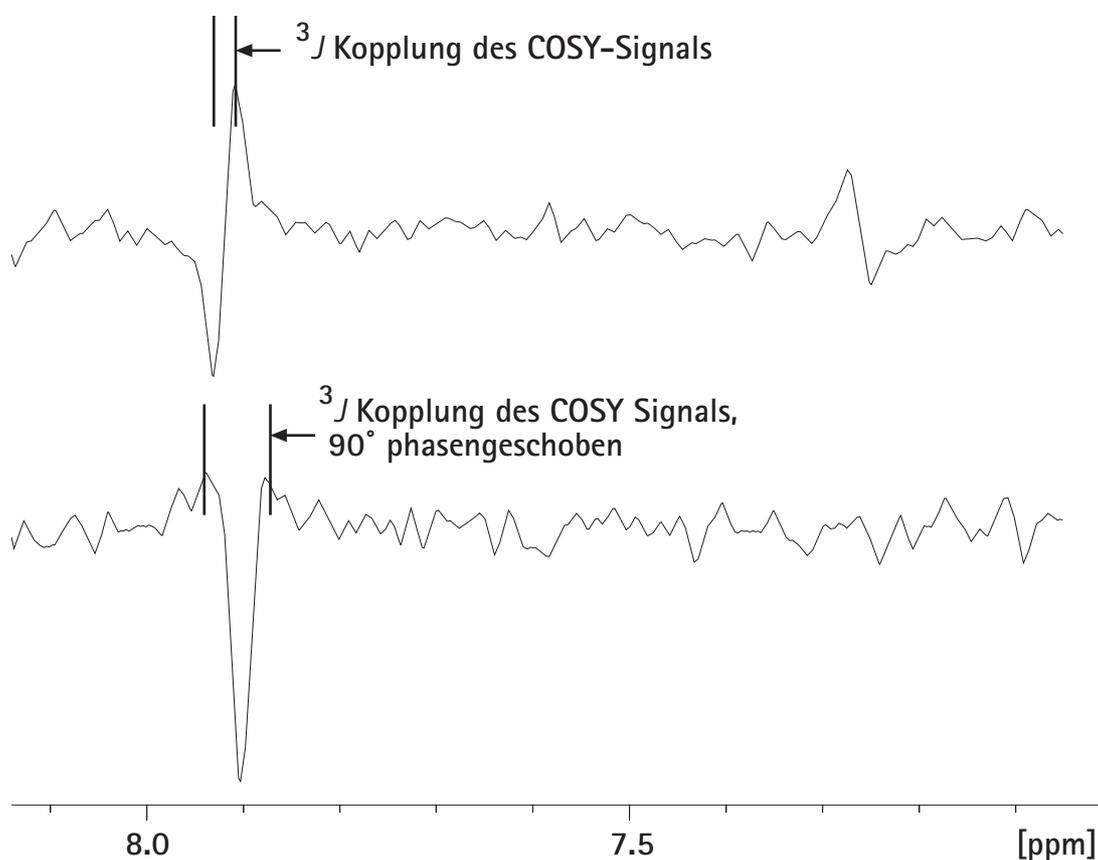


Abbildung 37: Kim & Prestegard: Ablesen der *Peak-to-Peak*-Separation im absorptiv gephasten 1D-Spektrum; Schieben der Phase um 90°, Ablesen der *Peak-to-Peak*-Separation.

Um zu den *Peak-to-Peak*-Separationen zu gelangen, wurden aus einem DQF-COSY (mit 4096 aufgenommenen Punkten in t_2) in den Programmen XWINNMR oder UXNMR (beide BRUKER) Spuren entlang ω_2 ausgelesen, ein Imaginäranteil erzeugt

(Befehl: hft) und eine inverse Fourier-Transformation durchgeführt. Der entstandene FID mit dem interessierenden Kreuzsignal wurde auf 64 Kbyte aufgefüllt (*zero-filling*), wieder einer Fourier-Transformation unterworfen und sorgfältig gephasst.

Dieser Schritt wurde pro Signal zweimal durchgeführt, mit jedem Teilsignal des Quadrupletts.

Es zeigte sich, daß sich die Signale ob ihrer Breite nur schwer phasen ließen: War absorptiv gut gephasst, so sah das dispersive Signal nicht symmetrisch aus und umgekehrt. Die errechneten Werte für ${}^3J(\text{HN-H}\alpha)$ waren bei sehr breiten Signalen oft unbrauchbar und mehr als einmal widersprachen sich die Werte der Teilsignale eines Multipletts.

Aus diesen Problemen ergab sich ein Mißtrauen in die Werte; zu oft waren die erhaltenen Daten nicht konsistent mit den erwarteten Sekundärstrukturelementen.

4.2 TACSY Experimente zur Bestimmung von Kopplungskonstanten

In Zusammenarbeit mit Dr. Harald Schwalbe wurde eine Methode entwickelt, die aus einem Satz Experimenten die Kopplungskonstanten des HN-N-C α -H α -Dihedralwinkels φ bestimmen.

Daß eine neue, eine andere Methode benötigt wurde, lag an den Problemen mit den Spektren des TFPI: durch die sehr schnelle Relaxation, die zu hohen Linienbreiten führte, durch die Überlagerungen, die bei der genauen Auswertung der Maxima von Signalen zu Problemen führten und durch die geringe Sensitivität konnten, wie gezeigt, die etablierten Methoden zur Bestimmung von Kopplungskonstanten in unmarkierten Proben keine guten und nachvollziehbaren Ergebnisse liefern.

Das Problem in den bisherigen Messungen war die Linienbreite der Signale, die durch die ungewöhnlich schnelle Relaxation sehr groß war. Eine Aufreinigung der Probe veränderte die Eigenschaften nicht.

Daher mußte eine Methode angewandt werden, bei der die Genauigkeit der Ableitung nicht von der Linienbreite der Signale abhängig ist, sondern von anderen Faktoren.

Bei TOCSY wird der Magnetisierungstransfer über die skalare Kopplung ermöglicht. Die Intensität, also das ablesbare Integral im Spektrum, ist dann abhängig von der Transferfunktion (Gleichung 28, Seite 53) des Transfers von I_{1z} nach I_{2z} . Da beim TOCSY-Experiment aber ein Transfer über *alle* Protonen des Spinsystems erfolgt,

was die Auswertung unmöglich machen würde, wurde ein Experiment benötigt, das den Magnetisierungstransfer auf ein Zweispinsystem limitiert, also nur in einem begrenzten spektralen Bereich als TOCSY arbeitet, außerhalb dieses eingestellten Bereiches aber keinen Transfer zuläßt.

Die Grundlage der Experimente bildete das in dieser Arbeitsgruppe entwickelte TACSY (*Tailored Correlation Spectroscopy*) (Quant, Prasch et al. 1995).

4.2.1 Tailored Correlation Spectroscopy

Das *Tailored Correlation Spectroscopy*-Experiment (Quant, Prasch et al. 1995) ist eine Methode, um selektiven Hartmann-Hahn-Transfer zwischen bestimmten Protonen zu erreichen. Im speziellen Fall geht es um den Transfer der Magnetisierung von HN- auf H α -Protonen in Proteinen.

Durch die Einschränkungen der Bereiche eines Spektrums, in dem Magnetisierungen übertragen werden, wird eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit erreicht.

Über die Verschiebungsdifferenzen der H α -Protonen von den H β -Protonen wurde mit dem Programmpaket SimOne (Glaser und Drobny 1990) rechnerisch eine Mischsequenz, CBBY-1 (*Coherence Accumulation by Blocking of Bypasses*), gewonnen, die folgende Voraussetzungen erfüllt:

- Die Sequenz ist symmetrisch
- Die einzelnen Pulse haben gleiche Amplitude
- Der *offset* der HN-Protonen ist $1 \text{ kHz} > \nu_{\text{HN}} > 0 \text{ kHz}$
- Der *offset* der H α -Protonen ist $0 \text{ kHz} > \nu_{\text{H}\alpha} > -1 \text{ kHz}$
- Der *offset* der H β -Protonen ist $-1 \text{ kHz} > \nu_{\text{H}\beta} > -1.5 \text{ kHz}$

Die Kopplungen zwischen H α und H β -Protonen wurden mit mindestens 7 Hz angenommen. Um einen effektiven Transfer zu gewährleisten, muß dann gegeben sein:

$$\frac{\gamma}{2\pi} \left| |B_{\text{eff}}(\nu_{\text{HN}})| - |B_{\text{eff}}(\nu_{\text{H}\alpha})| \right| \ll \left| J_{\text{HN-H}\alpha}^{\text{min}} \right| \quad (40)$$

Damit nach dem Transfer vom HN nach H α das Spinsystem „abgeschnitten“ wird, darf kein Transfer zu den H β -Protonen stattfinden, also:

$$\frac{\gamma}{2\pi} \left| |B_{\text{eff}}(\nu_{\text{H}\alpha})| - |B_{\text{eff}}(\nu_{\text{H}\beta})| \right| \gg \left| J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}^{\text{max}} \right| \quad (41)$$

Zusätzlich stehen die effektiven Felder B_{eff} für $H\alpha$ - und $H\beta$ -Protonen orthogonal zueinander, wohingegen die effektiven Felder der $H\alpha$ - und HN -Protonen parallel ausgerichtet sind.

Der aus diesen Rechnungen (und weiteren Verfeinerungen) resultierende *composite pulse* ist im Pulsschema in der Abbildung 38 dargestellt.

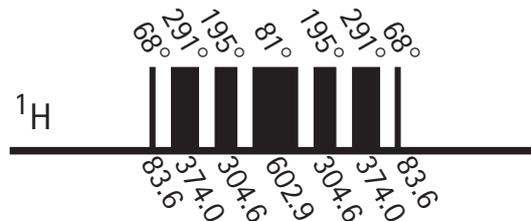


Abbildung 38: CABBY-1 Sequenz. Unten: Flip-Winkel, oben: Phase. Bei 400 MHz ist $\gamma B_1/2\pi = 2.661$ kHz, $\tau_{\text{cyc}} = 2.22$ ms.

Diese Sequenz, zunächst auf einem 400 MHz-Spektrometer entwickelt, kann durch Skalieren des RF-Feldes auf 600 MHz-Spektrometer portiert werden.

Einen Überblick über die Güte der Sequenz gewährt der Vergleich experimenteller Daten mit Simulationen; wie ersichtlich, wird bei etwa 80 ms Mischzeit ein maximaler Transfer vom Diagonalsignal (T_{NN}) zum Kreuzsignal ($T_{\text{N}\alpha}$) erreicht (Abbildung 39 und Abbildung 40). Es findet kein nennenswerter Magnetisierungstransfer von Amidprotonen auf β -Protonen statt.

Diese Sequenz ist gut geeignet für Aminosäuren, bei denen die Verschiebung der β -Protonen ausreichend unterschiedlich ist zu der der α -Protonen. Es sind dies zunächst die Aminosäuren Ala, Arg, Glx, Ile, Leu, Lys, Met und Val. Während der Mischzeit, so die Ergebnisse, ist der Transfer dem in einem Zweispinsystem aus lediglich einem HN und einem $H\alpha$ sehr ähnlich.

Wird die Relaxation nicht berücksichtigt, dann liegt die ideale Mischzeit bei $1/(2J(\text{HN}-H\alpha))$; bei Berücksichtigung ist die Mischzeit natürlich kürzer. Der größte Vorteil ist die Erhöhung des S/N schon bei kurzen Mischzeiten, da die Magnetisierung vom Amidproton aus nicht über das gesamte Spinsystem „verteilt“ wird.

Trotz der Tatsache, daß bei den Aminosäuren Asx, Cys, Gly, His, Phe, Ser, Thr und Tyr die Verschiebung der β -Protonen so ist, daß keine vollständige Entkopplung von den α -Protonen erreicht werden kann, ist trotzdem eine signifikante Verbesserung des S/N möglich.

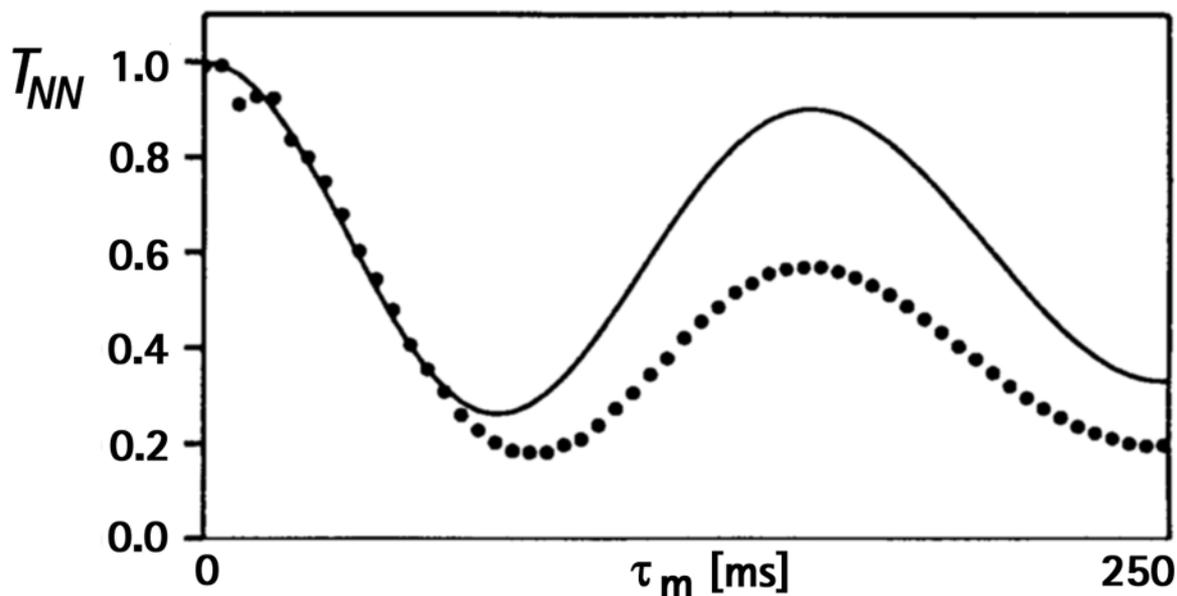


Abbildung 39: Transferfunktion des Diagonalsignals eines Amidprotons der CBBY-1-Sequenz (durchgezogene Linie) im Vergleich mit experimentellen Daten (gepunktete Linie). Aus (Quant, Prasch et al. 1995).

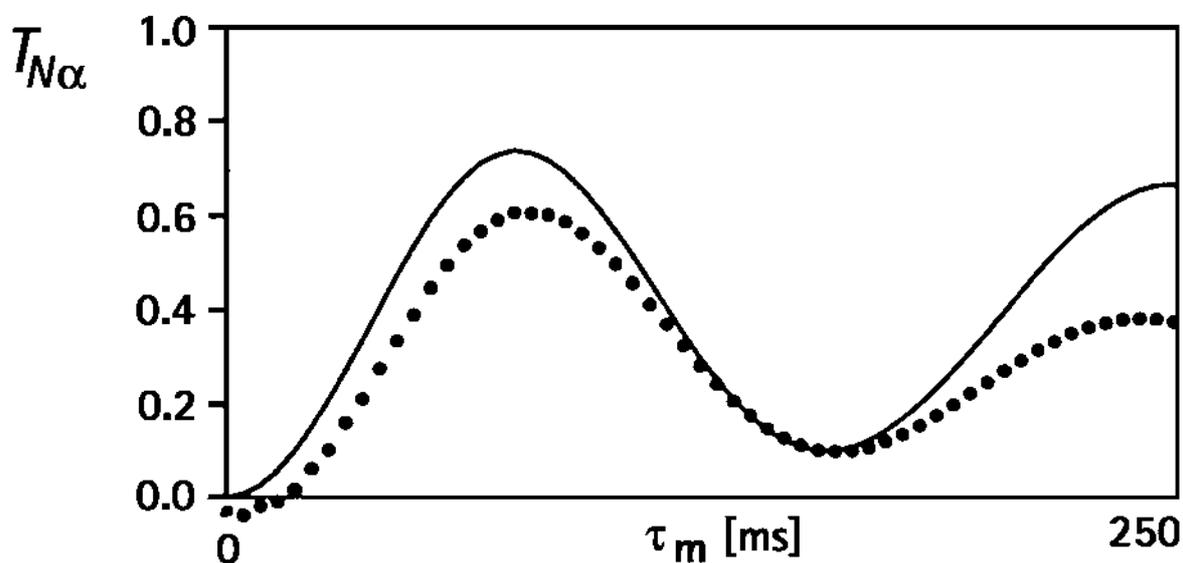


Abbildung 40: Transferfunktion von einem Amidproton auf ein $H\alpha$ -Proton eines Proteins der CBBY-1-Sequenz (durchgezogene Linie) im Vergleich mit experimentellen Daten (gepunktete Linie). Aus (Quant, Prasch et al. 1995).

4.2.2 Das TACSU f#r die Ermittlung der Kopplungskonstanten

Wie in Gleichung 28 ersichtlich, gelingt der Transfer in einem Zweispinsystem von Kern 1 auf Kern 2 mit der Transferfunktion:

$$I_{1z} \xrightarrow{\pi J_{12} \tau_m (2I_{1x,y} I_{2x,y})} I_{2z} \sin^2(\pi J_{12} \tau_m) \quad (42)$$

Wendet man hier ein normales TOCSU an, so mu#B ber#cksichtigt werden, da# die Spinsysteme in Proteinen nicht Zweispinsysteme sind! Das TACSU-Experiment bietet hier den Ausweg: Durch die Mischsequenz CABB-1 wird nach dem Magnetisierungstransfer vom Amidproton zum H α das weitere „Ausbleichen“ auf weitere Kerne des Spinsystems unterdr#ckt, die Gleichung 42 ist dann wieder g#ltig.

Die Transferfunktion bietet nun die M#glichkeit, die Kopplungskonstante zu ermitteln: Dazu mu#B die Intensit#t des Kreuzsignals, die von der Transferfunktion abh#ngt, durch die Aufnahme des Signals bei mehreren Mischzeiten aufgetragen werden. Die Funktion, die dann den Verlauf der Intensit#t beschreibt, hat dann – analog zu Gleichung 42 – die Form:

$$\text{Intensit#t}(\tau_m) = \text{Amplitude} \cdot \sin^2(\pi J_{12} \cdot \tau_m) \quad (43)$$

Ber#cksichtigt werden mu#B zus#tzlich die Relaxation, die die Signalintensit#t bei l#ngeren Mischzeiten signifikant verringert und hier als einfacher exponentieller Zerfall in die Gleichung eingeht:

$$\text{Intensit#t}(\tau_m) = \text{Amplitude} \cdot \sin^2(\pi J_{12} \cdot \tau_m) \cdot \exp\left(-\frac{\tau_m}{T_2}\right) \quad (44)$$

Es zeigte sich, da# *eine* angenommene Relaxationszeit in erster N#herung ausgereicht h#tte; sp#ter wurde dann auch T_2 mit in die Fitting-Prozeduren mit einbezogen und pro Aminos#ure gesucht.

In den Versuchen mit KALEIDAGRAPH als Auswertungsprogramm zeigte sich, da# bei drei anzupassenden Parametern die Fitting-Routine bei der geringen Anzahl von experimentellen Werten versagte. In den Auswertungen wurde die T_2 -Zeit auf 50 ms gesetzt.

Mit Gleichung 44 ist es nun m#glich, #ber eine Fitting-Prozedur die Intensit#ten bei verschiedenen Mischzeiten an die Funktion anzupassen; angepa#te Parameter sind dann Amplitude, J_{12} und T_2 . Die Amplitude ist f#r die Auswertung uninteres-

sant.

Die theoretischen Überlegungen wurden durch Simulationen bestätigt, die von Jens Quant durchgeführt wurden. Dabei wurde der Transfer I_1 nach I_2 unter TACSY bei 600 MHz mit der CBBY-1-Sequenz (Abbildung 38) simuliert.

Die untersuchten Bereiche waren dabei:

- Ω_{HN} : -2,5 bis 2,5 kHz
- $\Omega_{\text{H}\alpha}$: -2,5 bis 2,5 kHz
- t : 6,12 ms bis 195,84 ms
- 3J : 4 – 11 Hz

Simuliert wurden dabei keine Randbedingungen, sondern der exakte Transfer unter Berücksichtigung von Inhomogenität des B_1 -Feldes (10% Halbwertsbreite einer Gauss-Verteilung).

In allen relevanten Bereichen lag der Transfer bei über 90%, selbst im Fall von Tyr-21, bei dem die chemische Verschiebung des H α bei 5.76 ppm liegt, lag die Transfereffizienz bei >80%.

4.2.3 Experimente und Auswertung

Es wurden insgesamt zwei Spektrensätze aufgenommen. Ein erster Satz sollte zunächst als Test dienen, die Ergebnisse waren allerdings bereits so gut, daß mit den gleichen Basisparametern (Sequenz, Temperatur, Delays, etc.) weitere, ergänzende Experimente aufgenommen wurden. Die in den konkreten Experimenten verwendeten Mischzeiten lagen zwischen 6 und 110 ms.

In einem ersten Schritt wurden nur relativ kurze TACSY-Mischzeiten benutzt, da zu diesem Zeitpunkt es zuerst wünschenswert war, sich ein generelles Bild über die Möglichkeiten zu machen. Die Mischzeiten dieses ersten Datensatzes lagen zwischen 6,12 und 40,8 ms. Es stellte sich heraus, daß diese Experimente gelungen waren und daß auf den Ergebnissen aufgebaut werden konnte.

Wie in Abbildung 41 ersichtlich, reichen die kurzen Mischzeiten nicht aus, um präzise Ergebnisse zu erzielen, verständlich dadurch, daß bei dem ersten Satz von Experimenten nur ein Teil des ansteigenden Astes der Sinusfunktion ausreichend abgedeckt wurde; der abfallende Ast und damit der Teil, der die genaue Auswertung auch der T_2 -Zeiten erlaubt hätte, fehlte in diesen ersten Experimenten.

Im zweiten Satz wurde nochmals ein Spektrum mit 40,8 ms Mischzeit aufgenommen und die entsprechenden Intensitäten der Spektren aus dem ersten und dem zweiten Satz verglichen. Es erfolgte ein Skalieren der Werte mit Hilfe eines PERL-

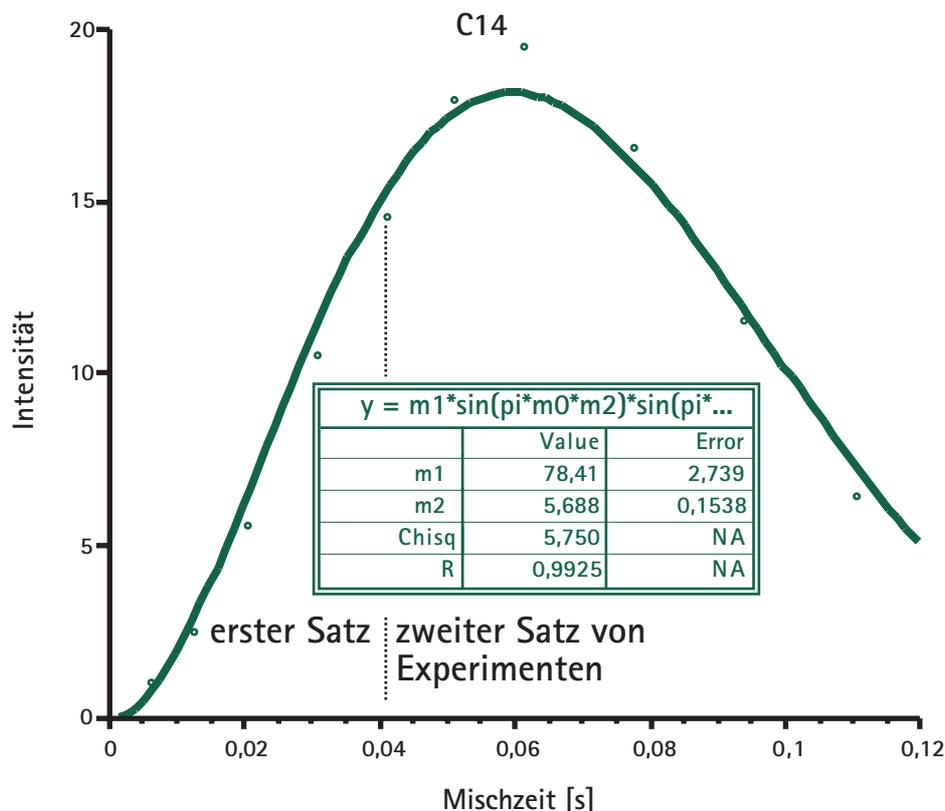


Abbildung 41: Plot für Cys-14 mit Fitting an die Gleichung 44. Die Variable $m2$ beschreibt die Kopplungskonstante; T_2 ist hier 50 ms.

Skripts.

Die kombinierten Werte überstreichen einen Mischzeitenbereich von 6 bis 110 ms, was in allen Fällen ausreichend war für eine gute Abdeckung des Anstiegs und des Abfalls der Intensitäten der Signale.

Die Experimente wurden mit dem Pulsprogramm thotacsy (siehe "TACSY-Pulsprogramm" auf Seite 169) auf dem AMX 600 und dem DMX 600 (beide: BRUKER, Rheinstetten) des Instituts aufgenommen. Im ersten Anlauf wurden Spektren mit 0.00612 s, 0.01224 s, 0.02040 s, 0.03060 s, und 0.04080 s Mischzeit aufgenommen. Die Zeiten ergeben sich aus der Tatsache, daß ein einfacher Durchlauf aller Pulse des Pulszuges zusammen mit rahmenden Trimpulsen ein Vielfaches von 6,12 ms bedingt, wenn man 10 kHz Einstrahlung ($90^\circ = 25 \mu\text{s}$) voraussetzt.

In einem zweiten Satz wurden – aus den angegebenen Gründen – längere Mischzeiten für die Spektren benutzt: 0.05100 s, 0.06120 s, 0.07752 s, 0.09384 s und 0.11016 s.

Es wurden nun mit Hilfe des Programme UXNMR (erster Satz) und XWINNMR (zweiter Satz) die Spektren integriert. Die *Region of Interest* (ROI), die Datei, in der die

Integrationsbereiche angeben sind, wurde pro Spektrensatz lediglich einmal definiert und konnte dann auf die weiteren Spektren des jeweiligen Spektrensatzes angewandt werden.

Aus den Integrationstabellen, die mit den Programmen von den Spektren erstellt wurden, wurden zunächst die zu einem identifizierten Signal gehörenden Intensitäten mit einem einfachen grep-Kommando unter UNIX aus den int2d-Dateien ausgelesen und in neuen Dateien abgelegt. In diesen Dateien stehen neben den Dateinamen die Integrationsgrenzen und das gefundene Integral des Signals.

Aus diesen Dateien wurden nun mit einem PERL-Skript ("Tacsyintegrale.perl" auf Seite 183) aus den Dateien für die TACSY-Integrale die Dateien generiert, in denen lediglich die Mischzeiten und die in den entsprechenden Integrale des betrachteten Signals stehen.

Diese Dateien konnten dann in das Programm KALEIDAGRAPH übernommen werden. Dort wurden die Werte, wie in Abbildung 41, aufgetragen und dann mit einer *Fitting*-Routine an die Funktion in Gleichung 44 angepaßt.

Die beiden Werte m_1 und m_2 in der Tabelle in Abbildung 41 beschreiben die Amplitude der Kurve und die Kopplung.

Um diese Spektren, die jeweils in etwa 4 h aufgenommen wurden konnten, zu kombinieren, wurde das Programm tacsymerge ("tacsymerge" auf Seite 184) benutzt. Dieses skalierte Zusammenführen der Werte war notwendig, da die Integrationswerte am AMX 600 (UXNMR auf einem X32-Rechner) und am DMX 600 (XWINNMR auf einer INDY von SGI) in sich jeweils konsistent waren, die Wertebereiche sich aber erheblich unterschieden.

Die Intensitäten wurden skaliert, indem die Spektren mit den Mischzeiten von 0.04080 s in beiden Spektrensätzen aufgenommen wurden. Aus dem Quotienten der Intensitäten in den Spektren wird ein Faktor gewonnen, mit dem die Werte der folgenden Signalintensitäten skaliert werden. Die Ergebnisse wurden in einer ASCII-Tabelle in neue Dateien geschrieben, die zunächst mit dem Programm KALEIDAGRAPH (Albeck Software), dann mit eigenen Programmen und Macros ausgewertet wurden.

4.3 SIAM-TACSY

Das beschriebene TACSY-Experiment bot im Rahmen dieser Arbeit ein Hebel, um die $^3J(\text{H}\alpha\text{-HN})$ Kopplungskonstanten zu gewinnen. Die entwickelten Methoden, die im Kapitel "TACSY Experimente zur Bestimmung von Kopplungskonstanten" auf Seite 77 ausführlich dargelegt werden, hatten allerdings den Nachteil, daß sie

lange Meßreihen erfordern – je Meßpunkt ein Spektrum.

Aufbauend aus den guten Erfahrungen mit dem TACSY wurde von Prof. Steffen Glaser, Dr. Thomas Prasch und mit meiner Mithilfe das SIAM-TACSY (*Simultaneous acquisition of In-phase- and Anti-phase Multiplets*) (Prasch, Gröschke et al. 1998) entwickelt, bei dem aus einem einzelnen TACSY-Spektrum sowohl die Anti-phase-Multipletts als auch die Inphase-Multipletts gewonnen werden können. Dies bedeutet, daß mit nur einer Messung die zur Bestimmung der Kopplungskonstanten benötigten Daten vorliegen, die für die bereits erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe genutzte Methode (Markert 1994) zur Bestimmung der Kopplungskonstanten benötigt werden.

In der Praxis stellt die gleichartige Aufnahme der ansonsten benötigten zwei Experimente für die Aufnahme von Inphase- und Antiphasen-Signalen ein Problem dar:

- COSY-Spektren sind nur schlecht auswertbar, wenn Kopplungskonstante und Signalbreite ähnlich sind, da es zu teilweisen Auslöschungen der Multiplettkomponenten sowohl entlang ω_1 als auch ω_2 kommen kann. Auch wenn nur eine Antiphasenaufspaltung benötigt wird, so können die inherenten Probleme eine *genaue* Messung der Kopplungskonstanten verhindern.

Neben den COSY-Spektren für die Antiphasen-Signale wird ein Spektrum mit Inphase-Signalen benötigt, das kann ein NOESY, ein TOCSY oder auch ein ROESY sein. Nachteile ergeben sich bei allen aufgeführten Spektren:

- Bei TOCSY oder ROESY wird während der Mischzeit eingestrahlt, was zu einer Erwärmung der Probe führen kann und damit zu leichten Verschiebungen von temperaturempfindlichen Resonanzen z. B. der HN-Protonen.
- Bei instabilen Proben kann es zudem sein, daß sich die Probe mit der Zeit zersetzt, die zwangsläufig sequentiell aufgenommenen Spektren sich mit der Zeit ändern.
- Bei einem NOESY kann es vorkommen, daß die Vielzahl der Signale eine Auswertung erschwert.

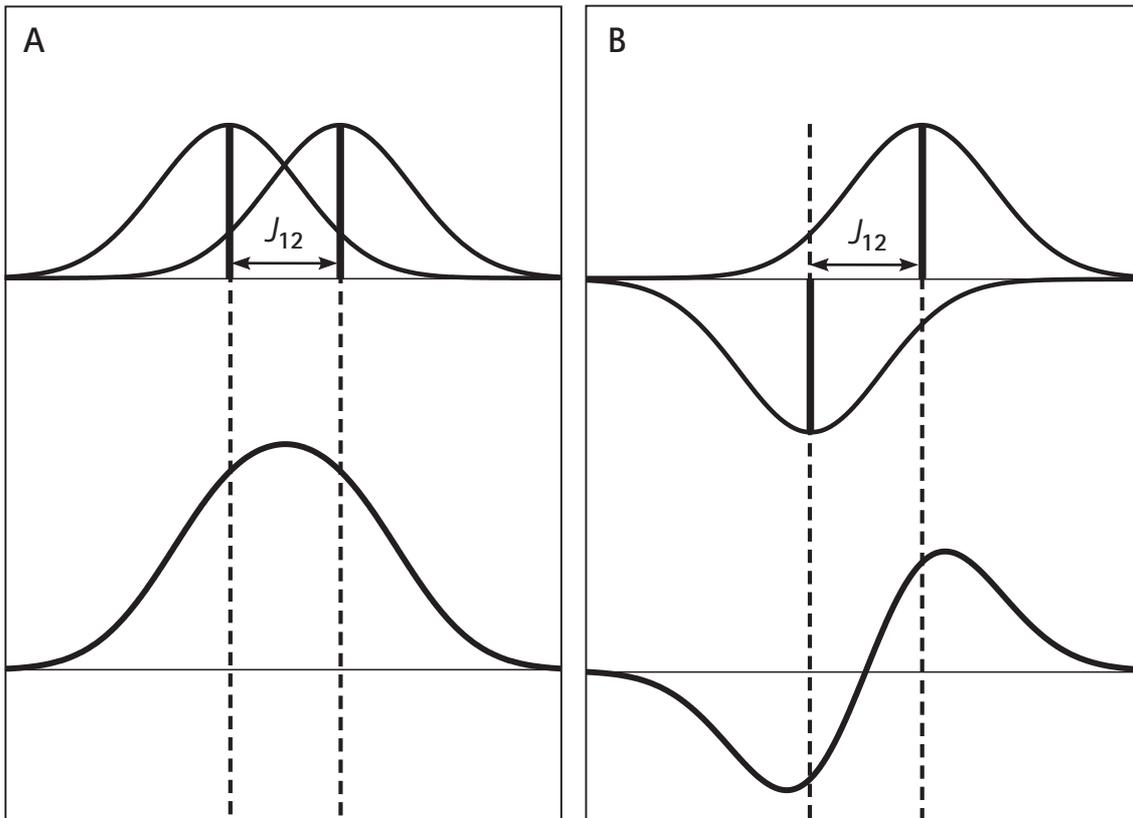


Abbildung 42: Probleme bei der Bestimmung von Kopplungskonstanten, wenn J_{12} der Halbwertsbreite des Signals ähnlich ist. Links: Inphase-, rechts: Anti-phase-Signale. Bei letzteren erscheint die J_{12} größer als sie in Wirklichkeit ist.

4.3.1 Theoretische Grundlagen des SIAM-TACSY

Ziel war es, ein Experiment zu entwickeln, das in einer Aufnahme und mit einer Mischzeit in der Lage ist, in guter Auflösung sowohl Inphase-Signale als auch – nach einem Editierschritt – Antiphase-Signale zu liefern. Die Kopplungskonstanten sollten dann nach der von Keeler und Titman (Titman, Neuhaus et al. 1989) entwickelten Methode aus den beiden Spektren, die aus einem Datensatz heraus prozessiert worden sind, extrahiert werden.

Ausgehend von den guten Erfahrungen mit den TACSY-Experimenten zur Kopplungskonstantenbestimmung sollte das zentrale Element zum Transfer der Kohärenzen ein Hartmann-Hahn-Experiment sein.

In einem Zweispinsystem gilt für den isotropen Hartmann-Hahn-Transfer:

$$\rho(t) = \frac{1}{2} \{1 + \cos(2\pi J_{12}t)\} I_{1z} + \frac{1}{2} \{1 - \cos(2\pi J_{12}t)\} I_{2z} - \sin(2\pi J_{12}t) (I_{1y} I_{2x} - I_{1x} I_{2y}) \quad (45)$$

Dieser Transfer kann in drei Terme zerlegt werden: der erste Term beschreibt dabei die residuale Magnetisierung, die auf dem ersten Spin verbleibt, der zweite Term beschreibt den erwünschten Kohärenztransfer von Kern 1 auf Kern 2. Der letzte Term des Transfers führt im TOCSY zu unerwünschten Antiphase-Signalen in ω_2 . Diese Transformation wurde bislang entweder schlicht ignoriert oder aber unterdrückt. Das Maximum dieser Anregung ist nach einer Mischzeit von $1/(4J_{12})$ erreicht.

Eine Trennung der Inphase- und Antiphase-Transfers stellt ein Problem dar, da die Kohärenzordnung dieselbe ist. Daher sind weder Phasenzyklen noch gepulste Feldgradienten ein Mittel zur Auflösung des Problems.

Ein Lösungsansatz bieten selektive Pulse, die dann eingesetzt werden können, wenn die Kerne deutlich unterschiedliche chemische Verschiebungen haben. Da die ursprünglich – die Entwicklung geschah mit Blick auf eine universelle Anwendung – interessierenden HN- und H α -Protonen sich von den chemischen Verschiebungen her genügend unterscheiden, ist dieser Ansatz hier anwendbar. Dann kann eine Wandlung

$$2(ZQ)_y \xrightarrow{\text{selektiver Puls}} 2(DQ)_y = 2(I_{2x}I_{1y} + I_{1x}I_{2y}) \quad (46)$$

erfolgen. Ein solcher Doppelquantenoperator läßt sich von einem Nullquantenoperator I_{2z} trennen. Ein selektiver 180° -Puls auf den zweiten Spin erzeugt den Doppelquantenoperator, ändert aber bei I_{2z} lediglich das Vorzeichen.

Der selektive Puls als Filterelement ist bei HN- und H α -Protonen über ein Puls-Sandwich (*composite pulse*) implementierbar. Dabei besteht der selektive 180°_x -Puls für die HN-Protonen aus einem nicht selektiven 180°_x -Puls, der von zwei selektiven 90°_x -Pulsen auf H α eingerahmt ist. Dabei kamen Q3-Pulse (Emsley und Bodenhausen 1992) zum Einsatz.

Ein erster Ansatz, mit einer beliebigen TOCSY-Mischsequenz (mithin also ein SIAM-TOCSY), wurde entworfen (Abbildung 43). Nach der Evolution in t_1 liegt I_{1z} vor, aus der in der Mischzeit I_{2z} und $(ZQ)_y$ entstehen.



Abbildung 43: SIAM-TOCSY. ϕ_1 : TPPI, $\phi_2=x,-x,y,-y$ und $\phi_{rec}=x,-x,y,-y$ für (ZQ)-Selektion, $\phi_{rec}=x,-x,-y,y$ für (DQ)-Selektion.

Die Phasenzyklen während der Acquisition unterscheiden sich nur durch einen Faktor -1 in der zweiten Hälfte des Zyklus', es ist daher bei separater Speicherung der FIDs möglich, beide Spektren aus einem Datensatz zu generieren. Aufgenommen wird ein FID mit $x,-x$ der Receiverphase und ein FID mit $y,-y$ in der Receiverphase. Aus den beiden Telexperimenten mit den erhält man das Nullquantengefilterte Experiment, wenn die beiden FIDs addiert werden; das Doppelquantengefilterte Experiment, wenn die beiden FIDs voneinander subtrahiert werden. Die Phasendifferenz der beiden Teilspektren beträgt 90° und kann daher ohne Probleme aus einer „korrekten“ Phasierung der Teilspektren bestimmt werden.

Die gängigen TOCSY-Sequenzen, die hier zum Einsatz kamen, sind immer auf Breitbandigkeit optimiert, so daß es z. B. bei den selektiven Pulsen auch noch eine Beachtung der $H\beta$ -Protonen erfolgen mußte.

Um nun ein optimiertes Experiment für Bestimmung von Kopplungskonstanten zwischen H_N und H_α zu entwickeln, wurde auf das bereits beschriebene TACSY mit der CABB-1-Sequenz zurückgegriffen. Das ermöglicht in dem Experiment

- die Reduzierung der spektralen Weite in ω_1 ,
- die Verbesserung von Auflösung und des S/N durch Entkopplung der H_α von H_N und $H\beta$ in t_1 und
- die Empfindlichkeitssteigerung durch einen maßgeschneiderten Transfer.

Die vollständige optimierte Pulssequenz SIAM-TACSY mit Gradienten zur Messung von $^3J(HN-H\alpha)$ -Kopplungskonstanten ist in Abbildung 44 dargestellt.

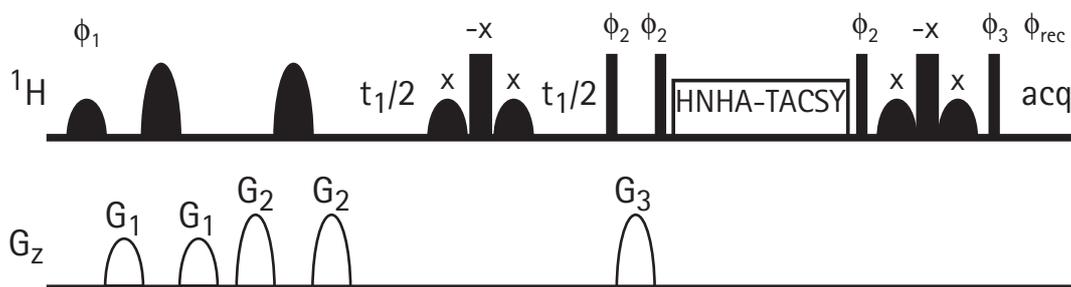


Abbildung 44: Sequenz des optimierten SIAM-TACSY-Experiments. Die Sequenz innerhalb der Mischzeit war CABB-1 (Abbildung 38).

Die verwendete Pulssequenz befindet sich im Anhang, siehe "SIAM-TACSY (auf AMX)" auf Seite 170.

4.3.2 Experimentelle Daten

Zunächst wurde versucht, die Messungen am TFPI durchzuführen, da dort die ersten Kopplungskonstanten aus TACSY-Experimenten gewonnen worden waren. In den Test stellte sich allerdings bald heraus, daß die Probe zu schnell relaxierte, die Spektren mit TFPI nicht aufgenommen werden konnten.

Es wurde dann auf die ebenfalls im Arbeitskreis vorhandene BPTI-Probe zurückgegriffen (ca. 10 mM, H₂O:D₂O 9:1).

Für die entgültigen Messungen an einem 600 Mhz-Spektrometer wird als Mischsequenz CBBY-1 verwendet. Die RF-Amplitude liegt bei 4.4 kHz. Die Mischzeit liegt bei den Experimenten bei 43 ms. Die Trägerfrequenz wird auf 6.2 ppm kalibriert. Der damit überstrichene Bereich deckt chemische Verschiebungen zwischen 3.4 und 9.0 ppm ab.

Nach einer Presaturation von 1.5 s zur Solvenssignalunterdrückung (in Abbildung 44 nicht gezeigt) werden die H α -Protonen angeregt. Bei dem selektiven Anregungspuls auf H α handelt es sich um einen SNOB (Emsley and Bodenhausen 1992), gefolgt von zwei selektiven 180°(H α)-SNOB-Pulsen von 3.7 ms Länge und -1 kHz *off-resonance*. Die folgenden selektiven 90°-Pulse des *composite*-180°-Pulses auf H α werden als Q3-*Shaped Pulses* (Emsley and Bodenhausen 1992) realisiert. Der erste Puls in der Mitte der Präparation dient zur Entkopplung von H α von HN und H β . Der zweite *composite*-Puls nach der Mischzeit konvertiert die Nullquanten-Kohärenz in Doppelquanten-Kohärenz um.

$$(I_{1x}I_{2y} + I_{1y}I_{2x}) \xrightarrow{\text{composite-Puls}} (I_{1y}I_{2x} - I_{1x}I_{2y}) \quad (47)$$

Die Pulsdauer der Q3-Pulse beträgt 3 ms, mit einem *offset* von -1 kHz. Die Gradienten haben eine Dauer von je 1 ms; die Stärken betragen 15, 25 und 35 G/cm für G₁, G₂ und G₃.

Die Spektren wurden auf einem 600 MHz-Spektrometer der Firma BRUKER bei 310 K aufgenommen. Die spektrale Weite betrug entlang ω_2 4194 Hz bei 2048 Inkrementen und 1000 Hz bei 200 Inkrementen entlang ω_1 . Pro t₁-Inkrement wurden 64 Scans aufgenommen, also je 32 Scans pro FID.

Die Spektren wurden alle gleichartig prozessiert und skaliert, für das Doppelquanten-gefilterte Spektrum wurde der FID für die zweite Hälfte des Phasenzyklus um 90° phasenverschoben (0. Ordnung). Eine Apodisierung entlang ω_2 fand nicht statt, eine Basislinienkorrektur (Polynom 5. Ordnung) wurde durchgeführt.

4.3.3 Beispielspektren

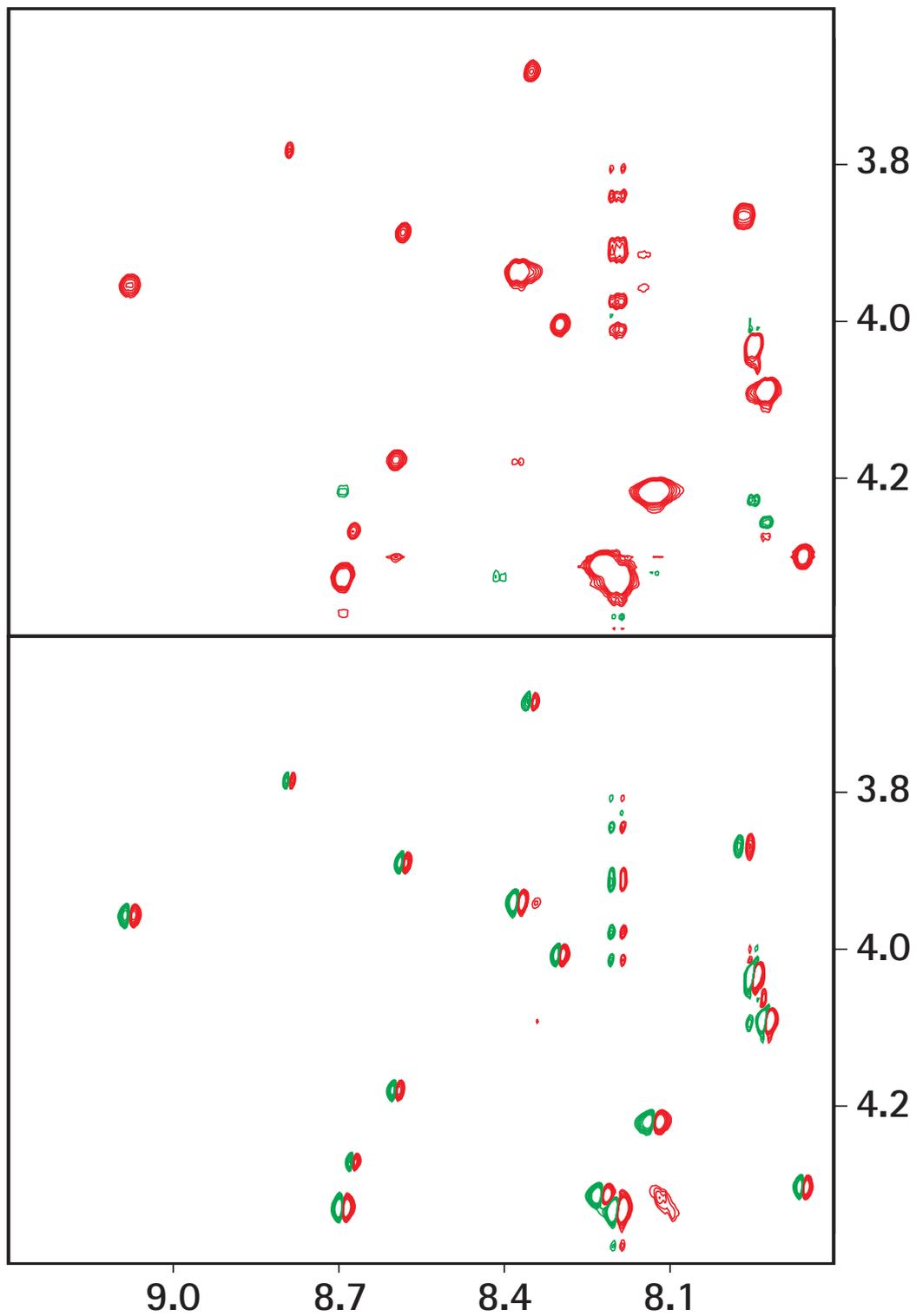


Abbildung 45: SIAM-TACSY von BPTI; oben: ZQ-gesfiltertes Spektrum (Addition der FIDS); unten: DQ-gesfiltertes Spektrum.

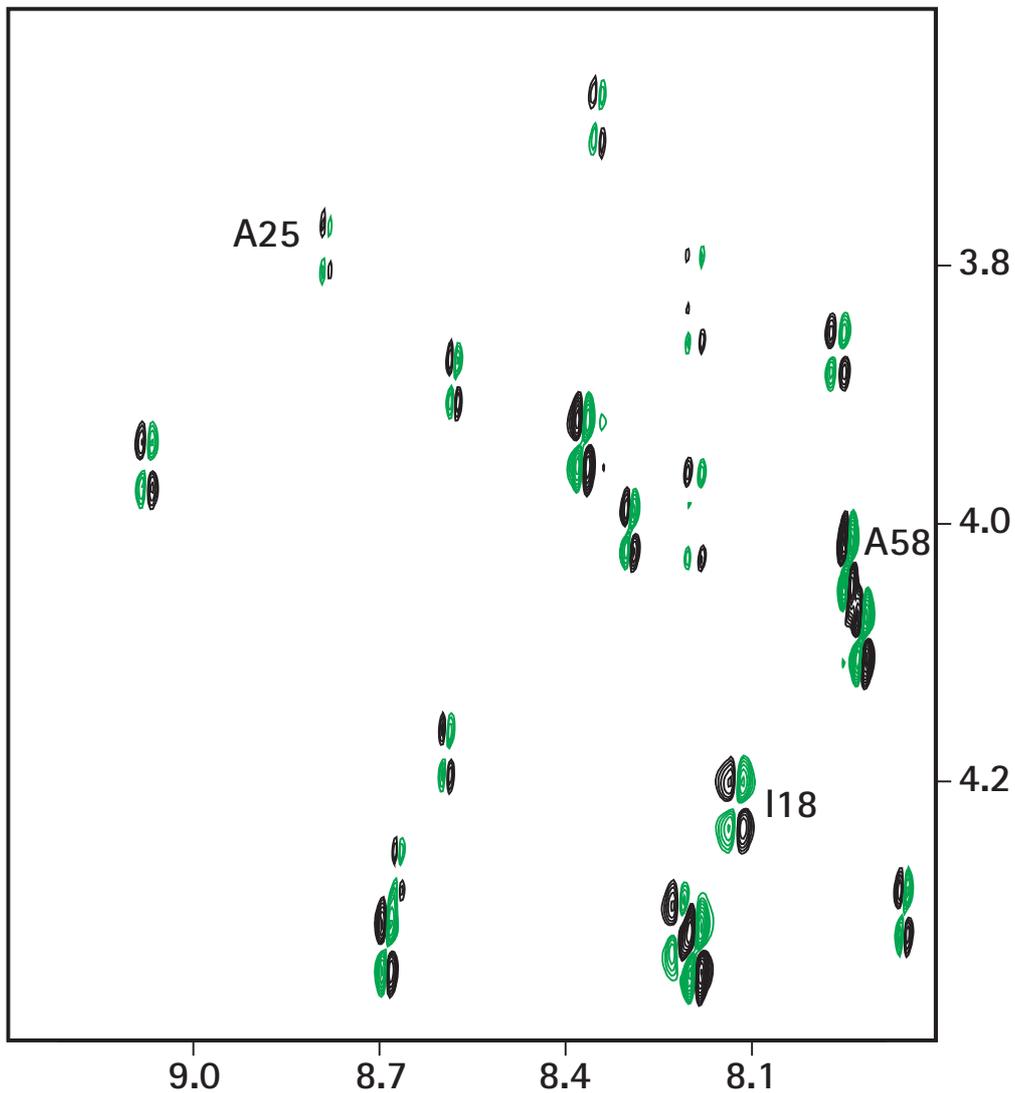


Abbildung 46: Fingerprintregion des DQF-COSY von BPTI, ebenfalls aufgenommen auf einem 600 MHz-Spektrometer bei 310 K. Die Dauer des Experiments war identisch mit dem SIAM-TACSY-Experiment. Die Prozessierung erfolgte wie bei dem SIAM-TACSY.

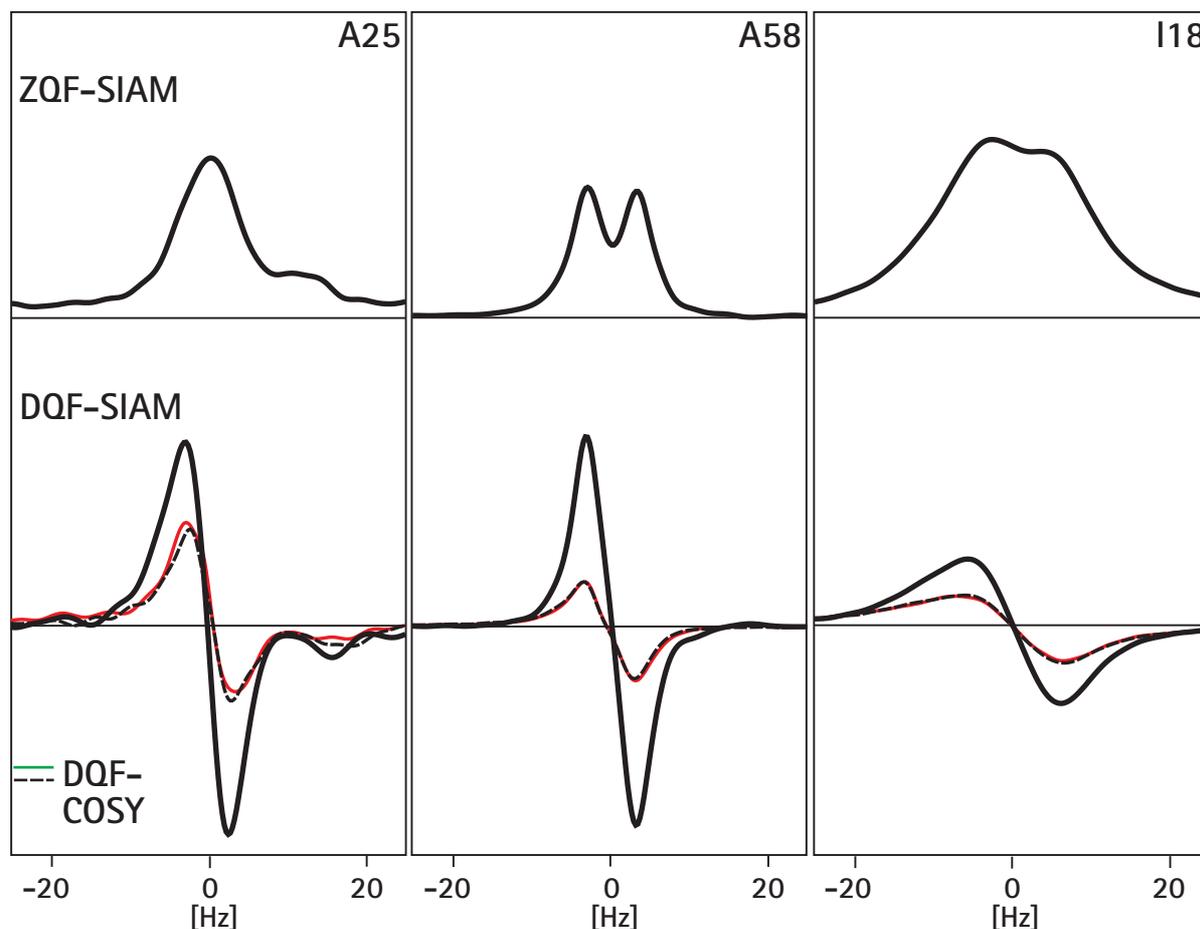


Abbildung 47: Spuren des SIAM-TACSY von BPTI. Oben: Nullquanten-gefiltertes, unten Doppelquanten-gefiltertes Spektrum. Gestrichelt: die beiden Spuren des DQF-COSY.

4.3.4 Die Bestimmung mittels TACSY

Die Bestimmung mit Hilfe der Integrale gelang wie beschrieben. Zunächst wurde auf die einfache Funktion (Gleichung 43) mit Hilfe des Programms KALEIDAGRAPH gefittet. Diese Ergebnisse waren bereits ermutigend, allerdings waren die RMSD-Werte für die gefundenen Parameter für Amplitude und Kopplung nicht gut, da die Zielfunktion (Gleichung 43) keine T_2 -Relaxationszeiten in den Rechnungen berücksichtigte. Die Näherungen wurden erweitert, so daß in dem Programm KALEIDAGRAPH auf die in Gleichung 44 beschriebene Funktion gefittet wurde. Diese Ergebnisse waren bereits sehr gut und verbesserten die Struktur (RMSD-Werte, Gesamtenergie).

Da die Routinen, mit denen das Fitten innerhalb des Programmpaketes KALEIDAGRAPH stattfindet, nur unzureichend dokumentiert sind und es bei diesen Messun-

gen essentiell ist, nachvollziehbare und überprüfbare Werte für die Kopplungskonstanten zu errechnen, wurde eine eigene Auswertung vorgezogen. Basierend auf einem bereits vorhandenen Programm von Dr. Harald Schwalbe, mit dem Daten zu einer von dem Programm FELIX (MSI) lesbaren Matrix zusammengefaßt werden können, wurde ein Programm entwickelt, mit dem die besten Lösungen in einem *Brute Force*-Verfahren gefunden werden können (siehe "Kopplungsextraktion (brute_force)" auf Seite 185). Dabei wird der Lösungsraum systematisch abgetastet, die Werte berechnet und mit den experimentellen Werten verglichen. Das Ergebnis ist eine Matrix der Differenzen, aufgetragen gegen J -Kopplung und T_2 -Zeit. An der Stelle, an der der Trial-Wert den experimentellen Werten am ehesten entspricht, ist das Minimum und damit der am besten passende Wert für die Kopplung.

Das Auslesen der besten Werte für die J -Kopplung und für die T_2 -Relaxation geschah dann mit Hilfe des Programms FELIX (MSI).

Im Rahmen der späteren Strukturrechnungen wurden nur die Werte benutzt, zu denen man über die Integration *isolierter* Signale kam; Überlagerungen von Signalen führten zu deutlichen Störungen, da die Aufbauraten recht unterschiedlich sein konnten. Es ist bei den zur Verfügung stehenden Programmen nur möglich, Integrale über *rechteckige* Bereiche zu bilden. Bis auf die neuesten Versionen des Programms AURELIA (Autor: Peter Neidig, BRUKER) benutzt kaum ein anderes Programm elliptische Regionen für die Bestimmung der Integrale von NMR-Signalen. Da die meisten interessanten Signale genügend isoliert vorlagen, wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, AURELIA zu installieren.

Die extrahierten Kopplungen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Aminosäure	$^3J(\text{HN-H}\alpha)$ KALEIDAGRAPH	$^3J(\text{HN-H}\alpha)$ FELIX
Phe-6	7.0	5.8
Leu-7	7.1	7.6
Gln-8	6.3	6.3
Asp-10	10.5	9.9
Cys-14	5.7	6.6
Arg-15	8.2	7.9

Tabelle 5: Übersicht über die erhaltenen Kopplungskonstanten TFPI-2: Black Box-Fitting mit Kaleidagraph und Brute Force-Methode mit Felix.

Aminosäure	$^3J(\text{HN-H}\alpha)$ KALEIDAGRAPH	$^3J(\text{HN-H}\alpha)$ FELIX
Thr-19	5.3	6.2
Tyr-21	10.3	7.3
Asn-24	6.7	5.0
Gln-26	6.3	6.9
Thr-27	9.5	9.7
Lys-28	7.6	7.8
Lys-34	8.6	6.9
Met-42	5.7	4.9
Thr-47	11.5	11.4
Gln-49	3.5	3.5
Asn-53	5	–
Ile-54	6.5	7.3

Tabelle 5: Übersicht über die erhaltenen Kopplungskonstanten TFPI-2: Black Box-Fitting mit Kaleidagraph und Brute Force-Methode mit Felix.

Größere Unterschiede zwischen den Kopplungskonstanten sind selten, können aber im Einzelfall auf die Einbeziehung der T_2 -Zeit bei der Methode mit Felix zurückgeführt werden. Ein Test mit unterschiedlichen Dihedralwinkeln ϕ für Tyr-21 (-120° und -140°) zeigte keine Effekte; der entsprechende Winkel in BPTI liegt bei 100° .

4.4 Alternative Experimente: das HNHA

G. Vuister und Ad Bax beschrieben 1993 das HNHA-Experiment (Vuister and Bax 1993; Vuister und Bax 1994), mit dem sie über einen neuen Ansatz sehr genau die Kopplungskonstanten einer ^{15}N -gelabelten Probe von Staphylokokken-Nuklease bestimmen konnten.

Die J -Kopplung wird bei diesem Experiment über das Verhältnis von Diagonal- zu Kreuzpeakintensität bestimmt. Dabei ist das Experiment – in erster Näherung, wie die Autoren betonen – unabhängig von der transversalen Relaxation der beteiligten Protonen, hier HN und H α .

Mit dem HNHA wurden die bislang besten Parameter für die Karplus-Kurve erstellt, es ist also erstrebenswert, wenn mit diesem etablierten Experiment die mit dem

TACSU-Verfahren erhaltenen Kopplungskonstanten überprüft werden könnten. Da das HNHA-Experiment als 3D-Experiment entwickelt wurde, muß die Dimension des Experimentes reduziert werden, da die TFPI-2-Probe nicht ^{15}N -markiert vorliegt.

Ausgehend von dem 3D-Experiment (Vuister and Bax 1993) wurde ein 2D-Experiment entworfen, das ebenfalls das Ablesen der Kopplungskonstanten aus den Intensitätsverhältnissen ermöglichen sollte. Dazu wurden alle Pulse auf ^{15}N herausgenommen und der Delay Δ_1 so angepaßt, daß die gewünschte Kopplung sich entwickeln konnte.

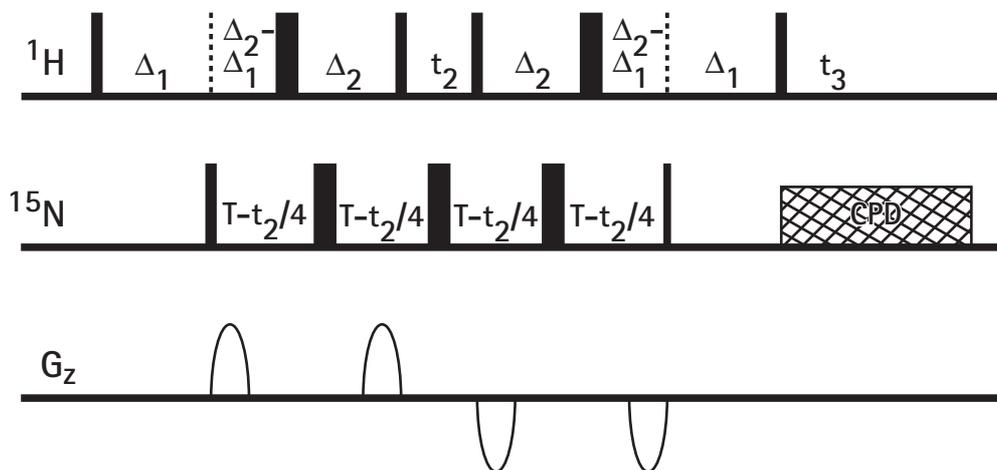


Abbildung 48: HNHA-Sequenz nach (Vuister and Bax 1993).

Dieses neue Experiment sollte, wie auch das Originalexperiment, zu Kreuz-Signalen führen, bei denen die Transferfunktion für die Kopplung mit $\sin^2(\pi J\Delta)$, für die Diagonal-Signale mit $\cos^2(\pi J\Delta)$ moduliert ist. Das Verhältnis der beiden Intensitäten ist dann proportional zu $\tan^2(\pi J\Delta)$.

Es wurden mehrere Experimente durchgeführt, in denen die Delays und die Gradienten variiert wurden; auch eine Variation der Phasenzyklen, ausgehend von dem in (Vuister and Bax 1993) verwendeten. Leider hatten alle Versuche, die im 1D-Testspektrum beobachteten vielversprechenden Signale in ein auswertbares 2D-Spektrum zu überführen, keinen Erfolg.

Es wird davon ausgegangen, daß auch in diesem Spektrum, in dem der Delay Δ_1 auf 15 bis 20 ms gesetzt war, um eine gute Transfereffizienz zu erreichen, die Gesamtdauer ($4 \cdot \Delta_1 + t_1$) dazu führte, daß die schnell relaxierende Probe von TFPI keine ausreichenden Signale lieferte.

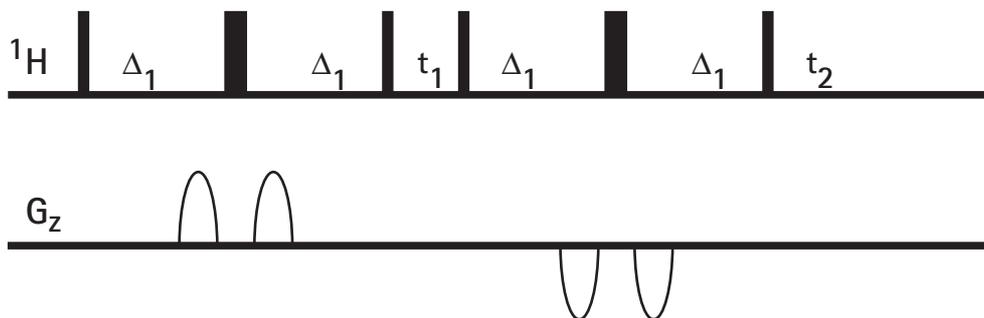


Abbildung 49: Modifizierte HNHA-Sequenz für 2D-Spektrum einer ungelabelten Probe.

Da die gleichzeitig stattgefundenen Strukturrechnungen mit den durch die TACSY-Spektren erhaltenen Dihedralwinkel außerordentlich erfolgreich verliefen, wurde dieser Ansatz nicht mehr weiterverfolgt.

5 Gewinnung strukturelevanter NMR-Daten

Zur Zuordnung der Signale zu den Protonen, bedient sich heute – wenn das Protein nicht isotonenmarkiert vorliegt – dreier Methoden: Über die Bindungen mit Hilfe der skalaren Kopplung, über räumliche Nähe mit Hilfe der dipolaren Kopplung und mit Hilfe der chemischen Umgebung der Protonen mit Hilfe der Korrelation von chemischer Verschiebung mit strukturellen Elementen. Erst seit wenigen Jahren findet die Einbeziehung von CSA-Tensoren (*Chemical Shift Anisotropy*) (Reif, Hennig et al. 1997) ihren Weg in die Strukturrechnungen, wenn isotonenmarkierte Verbindungen vorliegen.

Die alleinige Zuordnung der Spinsysteme ist allerdings nicht ausreichend, gewinnt man daraus nur wenig an Information über das Funktionieren des Proteins und auch nur wenig über die Sekundärstruktur; die Zuordnung ist mithin eine Notwendigkeit auf dem Weg hin zur dreidimensionalen Struktur des Proteins.

Chemische Verschiebungen, skalare Kopplungskonstanten und dipolare Relaxation sind Parameter, die in hohem Maße von der Konformation des Moleküls abhängig sind. Die skalaren Kopplungen und die dipolaren Wechselwirkungen bilden die Grundlage der Berechnung der dreidimensionalen Struktur.

5.1 Bestimmung der Abstände aus NOEs

Die wichtigsten Informationen, die heute aus NMR-Spektren zur Bestimmung von

Strukturen verwandt werden, sind die Abstandswerte, die aus NOESY-Spektren (siehe "Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy" auf Seite 47) durch Integration gewonnen werden. Die Intensität eines Kreuzsignals ist dabei von der Kreuzrelaxation der beiden Kerne anhängig.

Die Kreuzrelaxationskonstante ist proportional zu der reziproken sechsten Potenz des Abstandes der beiden Protonen und der Korrelationszeit τ_c . Benutzt man die Näherung der *initial rate approximation*, so ist die Intensität des Kreuzsignals direkt proportional zur Kreuzrelaxationsrate. Nach der *initial rate approximation* gilt (Croasmun and Carlson 1994):

$$\left. \frac{dI}{dt} \right|_{t=0} = \sigma_{ij} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10r_{ij}^6} \left(\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2\tau_c^2} - \tau_c \right) \quad (48)$$

mit der Signalintensität I , der Kreuzrelaxationsrate σ_{ij} , dem gyromagnetischen Verhältnis γ , dem interatomaren Abstand r_{ij} , der Korrelationszeit τ_c und der Larmorfrequenz ω .

Gleichung 48 muß nicht nach r_{ij} aufgelöst werden, um die Distanz zwischen den Kernen i und j zu erhalten: der Abstand der interessierenden Kerne kann über den Vergleich mit zugeordneten Signalen – Methylenprotonen haben z. B. einen Abstand von 178 pm und werden daher oftmals als solche Referenzsignale genutzt – und deren Intensitäten.

Jeder weitere Abstand kann über das Verhältnis der Intensität des interessierenden Signals zu der Intensität des Referenzsignals berechnet werden. Dann gilt:

$$\frac{I_{\text{gesucht}}}{I_{\text{referenz}}} = \frac{r_{\text{referenz}}^6}{r_{\text{gesucht}}^6} \quad (49)$$

Ein Problem, das sich stellt, ist die Diskrepanz zwischen der Länge der Mischzeit, bei der die *initial rate approximation* gültig ist und der Intensität der Signale aus diesen Spektren. Bei den geforderten kurzen Mischzeiten kann oftmals nur wenig Magnetisierung übertragen werden und die Intensität der Signale ist sehr schwach. Benutzt man dagegen längere Mischzeiten und mißachtet damit die in der *initial rate approximation* gemachte Annahme des linearen Aufbaus der Kreuzrelaxation, so kann es zu Fehlbestimmungen kommen. Ein Grund ist die *spin diffusion*, die bei längeren Mischzeiten signifikant wird. Es ist dies der Effekt, der dann auftritt, wenn es außer den beiden wechselwirkenden Kernen noch weitere gibt, die nahe

bei den beobachteten Kernen sind, in Abbildung 50 also H_3 bei Beobachtung des

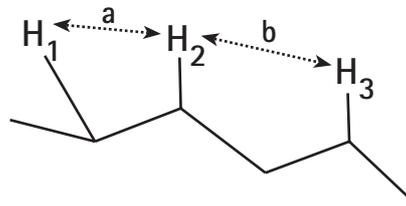


Abbildung 50: Spindiffusion durch den Magnetisierungstransfer b bei Beobachtung der Kerne H_1 und H_2 (Transfer a).

NOEs zwischen H_1 und H_2 . Durch den Transfer der Magnetisierung auf einen zweiten Kern wird

- der Abstand zwischen H_1 und H_2 zu groß angenommen, da die Magnetisierung und damit das Integral des Signals im NOESY abnimmt und
- der Abstand zwischen H_1 und H_3 zu klein angenommen, da die Intensität der Wechselwirkung zwischen den beiden Kernen zum Teil über den *Relay*-Transfer H_1 - H_2 - H_3 zustande kommt.

Der Spindiffusion kann auf zwei Arten begegnet werden: Entweder werden nur Spektren mit sehr kurzen Mischzeiten (≤ 50 ms) aufgenommen, so daß die *Relay*-Magnetisierung nicht propagieren kann oder es werden mehrere Spektren mit gleichen experimentellen Bedingungen, aber unterschiedlicher Mischzeit aufgenommen, so daß die Entwicklung des interessierenden NOEs als Verhältnis von Intensität zur Zeit aufgetragen werden kann. Aus den Punkten kann dann die *Initial Rate Approximation* bestimmt werden (Ernst, Bodenhausen et al. 1991).

Wie oben beschrieben, können aus den Intensitäten der Kreuzsignale in NOE-Spektren die Abstände zwischen den korrelierenden Kernen bestimmt werden. Es ergibt sich aus Gleichung 49, daß:

$$r_{\text{gesucht}} = r_{\text{referenz}} \cdot \sqrt[6]{\frac{I_{\text{referenz}}}{I_{\text{gesucht}}}} \quad (50)$$

Diese Gleichung ist nur dann gültig, wenn die Spindiffusion nicht berücksichtigt wird.

Die NOEs wurden in drei Kategorien eingeordnet: stark, mittel und schwach. Die Verwendung solcher *Distance Bounds* (Williamson, Havel et al. 1985) bietet bei den Berechnungen der Strukturen einen Spielraum an möglichen Distanzen, die durch einen NOEs repräsentiert werden: Die Intensität spiegelt nun keinen konkreten Abstandswert nach Gleichung 50 wieder, sondern einen Bereich zwischen dem Mindestabstand (Van-der-Waals-Radii) und einem maximalen Abstand, normalerweise 2,5 Å bei starken Signalen, 3,5 Å bei mittelstarken Signalen und 5,0 Å bei schwachen Signalen.

Bei den ersten Rechnungen zeigte sich, daß bei TFPI-2 die Grenzen etwas weiter gezogen werden mußten; die besten Ergebnisse, in Bezug auf Konsistenz der berechneten Strukturen und berechnete Energien der Moleküle, wurden erreicht mit: stark: 2,9 Å, mittel: 4 Å und schwach: 5,5 bis 6 Å.

Zu diesen automatischen Korrekturen kamen noch

- die Pseudoatomkorrekturen für Methylgruppen und nicht stereospezifisch zugeordnete Methylen-Protonen, sowie
- eine Korrektur für die schnell rotierenden und damit magnetisch äquivalenten aromatischen δ - und ϵ -Protonen in Phe- und Tyr-Resten.

Gerade die letzte Korrektur hätte bei Verwendung von XPLOR automatisch erfolgen sollen (M. Nilges, pers. Kommun.), mußte bei den Rechnungen allerdings von Hand erfolgen.

Diese vereinfachende Nutzung von *upper* und *lower bounds* ermöglicht es, die Unsicherheiten bei der Bestimmung der Integrale der Signale in NOESY-Spektren durch schlechtes S/N oder überlappende Kreuzsignale mit einzubeziehen und es können damit lokale Dynamiken (verschiedene lokale τ_c , Bewegung von einzelnen Gruppen oder Segmenten) berücksichtigt werden.

5.2 Sekundärstrukturelemente

Die Details der lokalen Konformation lassen sich aus den relativen Intensitäten der HN–HN, der H α –HN und auch der HN–H β Signale herleiten. Starke Wechselwirkungen zwischen sequentiellen *Backbone*-Amidprotonen bei gleichzeitig geringer $^3J(\text{H}\alpha\text{--HN})$ -Kopplungskonstante lassen den Schluß zu, daß eine helikale Konformation vorliegt; sind große $^3J(\text{H}\alpha\text{--HN})$ -Kopplungskonstanten zu beobachten, sind die Intensitäten der HN–HN Signale gering und die der H α –HN-Signale groß, so

liegt mit großer Wahrscheinlichkeit ein β -Faltblatt vor.

In den verschiedenen Sekundärstrukturelementen finden sich spezifische Protonenabstände, die typische Signalmuster in den NOE-Spektren hervorrufen. α -helicale Bereiche weisen Abstände von ca. 3 Å der Amidprotonen benachbarter Aminosäuren auf, die zu mittelstarken Signalen in NOESYs führen. Gleichzeitig ist das α -Proton der Aminosäure i relativ nah (ca. 3 Å) den β -Protonen der Aminosäure $i+3$. Die Signale der α -Protonen der Aminosäure i sind aufgrund des großen Abstandes, der durch die Drehung der Helix bedingt wird, weit entfernt von den $\text{HN}(i+1)$ -Protonen, so daß diese Kreuzsignale in den Spektren nur schwach sind.

In β -Faltblättern sind gerade die Signale zwischen $\text{H}\alpha(i)$ - und $\text{HN}(i+1)$ -Protonen sehr stark, da die Abstände hier zwischen 2 und 2,5 Å liegen. Diese Ausrichtung der Aminosäuren bedingt einen großen Abstand zwischen $\text{HN}(i)$ und $\text{HN}(i+1)$, so daß diese Signale recht schwach in den Spektren sind.

Wüthrich et al. (Pardi, Billeter et al. 1984) faßten die relevanten Abstände in einer Tabelle zusammen:

Abstand	α -Helix	3_{10} -Helix	β -sheet, antiparallel	β -sheet, parallel	Turn Typ I	Turn Typ II
$d\alpha\text{N}(i,i+1)$	3,5	3,4	2,2	2,2	3,4 3,2	2,2 3,2
$d\alpha\text{N}(i,i+2)$	4,4	3,8			3,6	3,3
$d\alpha\text{N}(i,i+3)$	3,4	3,3			3,1-4,2	3,8-4,7
$d\alpha\text{N}(i,i+4)$	4,2					
$d\text{NN}(i,i+1)$	2,8	2,6	4,3	4,2	2,6 2,4	4,5 2,4
$d\text{NN}(i,i+2)$	4,2	4,1	4		3,8	4,3
$d\beta\text{N}(i,i+1)$	2,5-4,1	2,9-4,4	3,2-4,5	3,7-4,7	2,9-4,4 3,6-4,6	3,6-4,6 3,6-4,6
$d\alpha\beta(i,i+1)$	2,5-4,4	3,1-5,1				

Tabelle 6: Sequentielle und mittelreichweitige Abstände kleiner als 4,5 Å in Proteinsekundärstrukturelementen. $d\text{XY}(i,i+1)$: Abstand zwischen HX und HY in den Aminosäuren i und $i+1$.

6 Strukturrechnungen

An die Extraktion der strukturrelevanten Daten aus den beschriebenen NMR-Experimenten schließen sich Strukturrechnungen an. Zur Verfügung stehen zu Beginn neben den aus den Spektren erhaltenen Abstandsinformationen die Primärstruktur und die einige physikalische Eigenschaften wie Atomradii.

In vielen Fällen ist es aufgrund der Anzahl der Freiheitsgrade und der zum Teil gegensätzlichen *Constraints*¹ eines Systems nicht leicht möglich, aus den Informationen eine Strukturlösung zu finden, da die Zielfunktion über eine Vielzahl an lokalen Minima verfügt. Ein allgemeiner Lösungsansatz sollte ein Algorithmus sein, der den Lösungsraum mit zwei Grundbedingungen absucht:

- Die Wahrscheinlichkeit, daß das globale Minimum gefunden wird, muß groß sein und
- der Algorithmus muß den Lösungsraum in einer vertretbaren Zeit durchsucht haben.

Die verwendete Methode zur Berechnung ist das *Simulated Annealing* (Carlson 1997), bei der die thermodynamischen Prozesse bei dem Ausfrieren und der Kristallisation von Flüssigkeiten und dem Auskühlen und Aushärten von Metallen – daher auch der Name – nachbildet werden.

Die andere Methode, die Verwendung findet, ist *Distance Geometry* (Kuntz, Tho-

¹. Der Begriff *Constraint* wird als „geometrische Bedingung“ benutzt, ein *Restraint* ist im Gegensatz dazu ein in den Rechnungen benutztes Pseudo-Potential.

mason et al. 1989): Die Atome werden als masselose Punkte betrachtet und es wird eine rein mathematische Lösung der Struktur gesucht, in der alle Abstandsparameter so gut als möglich erfüllt sind.

Dieses Kapitel geht kurz auf beide Methoden ein, da beide bei der Strukturbestimmung des TFPI eine Rolle spielten. Die ersten Strukturen, die in dieser Arbeit nicht weiter gezeigt werden sollen, wurden mit *Distance Geometry* gerechnet, die aus dem Programm INSIGHT II aus zur Verfügung steht und die endgültigen Strukturen wurden alle mit dem Programmpaket XPLOR (Brünger 1992) gerechnet, welches das *Simulated Annealing* benutzt.

6.1 Simulated Annealing

Bei hohen Temperaturen bewegen sich die Moleküle einer Schmelze völlig frei und unvorhersagbar. Wird die Schmelze langsam gekühlt, dann wird die thermische Beweglichkeit deutlich geringer, die Moleküle ordnen sich und es bildet sich ein reguläres Gitter aus. Dieser sich bildende Kristall hat eine minimale strukturelle Energie, was mathematisch der optimalen Lösung des Organisationsproblems entspricht (Press, Teukolsky et al. 1992; Diener 1995; Diener 1996).

Werden flüssige Substanzen, z. B. geschmolzene Metalle, schnell auf eine Temperatur unterhalb ihres Fließpunktes gekühlt, haben die Teilchen keine Zeit, um sich optimal auszurichten; die Anordnung ist energetisch nicht minimal, mathematisch gesehen also nicht die beste Lösung des Organisationsproblems. Bei Metallen werden die geformten Stücke daher noch einmal bei einer hohen Temperatur gehärtet; knapp unterhalb des Fließpunktes haben so die Moleküle die Möglichkeit, sich optimal auszurichten.

Um die thermodynamischen Prozesse beim Abkühlen in ein mathematisches Abbild zu überführen, müssen folgende Elemente (Blumenthal 1970; Carlson 1997) vorausgesetzt werden:

1. Eine Beschreibung möglicher Ausgangssituationen, also im Falle von Molekülen eine Struktur, die eine mögliche Lösung des Problems darstellen könnte und in der alle Verbindungen geknüpft sind; dies ist dann eine Molekülkonfiguration in der Form $X=(x_1, x_2, x_3 \dots)$.
2. Eine Möglichkeit, um zufällige Konfigurationsänderungen zu generieren; diese Änderungen stellen meist Lösungen des Problems dar, die nahe bei der Ausgangslösung, also der vorhergehenden Konfiguration, liegen, also zum Beispiel durch die Änderung eines einzelnen Parameters x_i repräsentiert werden.

3. Eine die Kosten, also im diesem Fall die Energie darstellende Funktion $E(X)$, deren Minimierung das Ziel der Rechnungen ist.
4. Ein Kontrollparameter T , der in Analogie zur Temperatur nach einem bestimmten Plan immer weiter gesenkt wird. Im Falle von Strukturrechnungen wird damit beschrieben, nach wievielen Änderungen in der Konfiguration die Temperatur um wieviel Grad gesenkt wird.

Die ersten, die diese Gedanken in Minimierungssimulationen einfließen ließen, waren Metropolis, Rosenbluth, Teller und Teller (Blumenthal 1970). Demnach ändert sich die Energie eines Systems innerhalb einer Anzahl von Änderungen von einer Energie E_{alt} in eine Energie E_{neu} mit der Wahrscheinlichkeit

$$\exp\left(\frac{-(-E_{\text{neu}}-E_{\text{alt}})}{kT}\right) \quad (51)$$

mit k : Boltzmann-Konstante und – im ersten Ansatz – bei festgelegter Temperatur. Ist die Energie E_{neu} kleiner als E_{alt} , dann wird die neue Konfiguration automatisch, also mit einer Wahrscheinlichkeit 1 die neue Ausgangskonfiguration. Ist E_{neu} jedoch höher als die Energie der Ausgangskonfiguration, so kann die neue Konfiguration mit einer geringen Wahrscheinlichkeit trotzdem akzeptiert und damit als neue Ausgangskonfiguration benutzt werden. Damit wird dem System geholfen, sich aus lokalen Minima zu befreien, aus denen nicht heraus kommen könnte, wenn es die Strategie verfolgte, wonach die neue Energie *immer* geringer sein müßte als die der Ausgangskonfiguration. Der generelle Ansatz, wonach stets (energetisch) bergab gegangen wird und manchmal aber doch bergan, wird auch als Metropolis-Algorithmus bezeichnet. Kirkpatrick, Gelatt und Vecchi (Kirkpatrick, Gelatt et al. 1983) variierten die Temperatur und senkten sie im Verlauf des *Simulated Annealing* von einem hohen auf einen niedrigen Wert. Die vollständige Prozedur des *Simulated Annealing* kann in einem Flußdiagramm (Abbildung 51) dargestellt werden.

Der Energieparameter muß aus den Teilenergien berechnet werden, die das System beschreiben:

$$E_{\text{gesamt}} = E_{\text{Bindung}} + E_{\text{Winkel}} + E_{\text{Dihedral}} + E_{\text{VdW}} + E_{\text{NOE}} \quad (52)$$

Dabei wird die Gesamtenergie durch die Summe der Bindungs-, Winkel-, Dihedral-, van der Waals- und NOE-Energien dargestellt.

Die Funktion, die das Verhalten der Bindungsenergie in Abhängigkeit des Abstan-

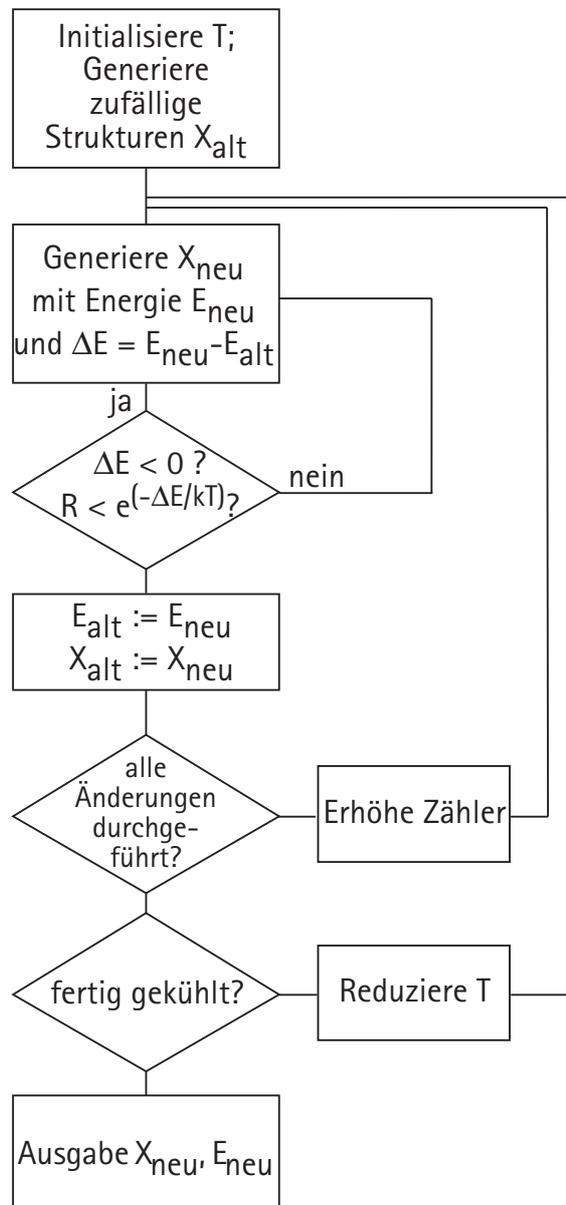


Abbildung 51: Prinzip des Simulated Annealing Algorithmus'. X steht für einen Satz Konfigurationen, R für eine Zufallszahl zwischen 0 und 1.

des zweier Atome beschreibt, lautet:

$$E_{\text{Bindung}} = \sum K_{\text{Bindung}}(r - r_0)^2 \quad (53)$$

Ebenfalls eine einfache quadratische Funktion beschreibt die Winkelenergie:

$$E_{\text{Winkel}} = \sum K_{\theta}(\theta - \theta_0)^2 \quad (54)$$

Die Funktion, die die Dihedralwinkel beschreibt, ist mit einem Wichtungsfaktor S und einer Konstante C ($\text{kcal mol}^{-1}\text{rad}^{-2}$) behaftet:

$$E_{Dihedral} = S \sum C \begin{cases} (\text{mod}_{2\pi}(\phi - \phi_0) - \Delta\phi)^2 & \text{wenn } \text{mod}_{2\pi}(\phi - \phi_0) > -\Delta\phi \\ 0 & \text{wenn } -\Delta\phi < \text{mod}_{2\pi}(\phi - \phi_0) < \Delta\phi \\ (\text{mod}_{2\pi}(\phi - \phi_0) + \Delta\phi)^2 & \text{wenn } \text{mod}_{2\pi}(\phi - \phi_0) < -\Delta\phi \end{cases} \quad (55)$$

Diese Funktion ist in drei Bereiche aufgeteilt: In einem erlaubten Bereich um den Dihedralwinkel herum ($\pm\Delta\Phi$) ist der Energieterm gleich 0. Außerhalb dieses Bereiches steigt er quadratisch an.

Die nichtbindenden Energieterme sind zunächst durch die Funktion gegeben, die die van-der-Waals-Energien beschreibt:

$$E_{vdW} = C_{rep} (\max(0, (k^{rep} r_{min})^2 - r^2))^2 \quad (56)$$

Dabei sind C_{rep} eine Konstante mit der Dimensionalität $\text{kcal mol}^{-1}\text{rad}^{-2}$, die die Abstoßung (*Repulsion*) beschreibt, k^{rep} ein den Anstieg der Abstoßung beschreibender Wert und r_{min} der Abstand zweier Atome, ab dem die van-der-Waals-Energie keinen Einfluß mehr hat.

Die zusammengesetzte Funktion zur Beschreibung der Potentiale, die die Energiezunahme durch eine Verletzung der durch die NOEs gegebenen Entfernungen widerspiegelt, gilt für die verschiedenen Klassen von Abständen und lautet für eine Klasse:

$$E_{NOE}^{Klasse} = SC \begin{cases} (r - (d - d_{minus}))^2 & \text{wenn } r < d - d_{minus} \\ 0 & \text{wenn } d - d_{minus} < r < d + d_{plus} \\ (r - (d + d_{plus}))^2 & \text{wenn } d + d_{plus} < r < d + d_{plus} + r_{SW} \\ a + \frac{b}{r - (d + d_{plus})} + 2(r - (d + d_{plus})) & \text{wenn } r > d + d_{plus} + r_{SW} \end{cases} \quad (57)$$

und besteht aus 4 Bereichen: Sind die Entfernungen in der Struktur kleiner als der minimale Abstand (erste Zeile in Gleichung 57), dann wird die Energie durch eine quadratische Funktion beschrieben. Im erlaubten Bereich (zweite Zeile) ist der Energieterm gleich 0. Unter Nutzung der *Soft-Square* Funktion, die XPLOR (Brünger 1992) zur Verfügung stellt, wird in einem kleinen Bereich oberhalb des erlaubten

Bereiches eine quadratische Funktion benutzt, um den Anstieg des Potentials zu beschreiben. Danach ($d+d_{\text{plus}}+r_{\text{sw}}$) wird ein linearer Anstieg des Potentials angenommen.

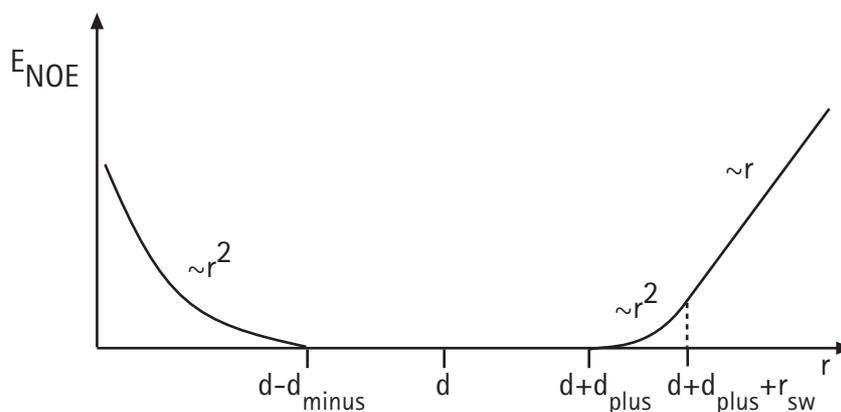


Abbildung 52: Graphische Beschreibung der Soft-Square Funktion aus XPLOR.

S ist eine Wichtung, C eine Konstante der Dimension $\text{kcal mol}^{-1} \text{rad}^{-2}$ und die beiden Parameter a und b der letzten Zeile sind so gewählt, daß die Funktion stetig ist.

6.2 Distance Geometry

Von L. M. Blumenthal (Blumenthal 1970) entwickelt, beschäftigt sich *Distance Geometry* mit dem allgemeinen Problem, Strukturen lediglich aus bekannten internen Distanzen aufzubauen (Kuntz, Thomason et al. 1989). Bereits 1977 wurde dieser Zweig der Mathematik auf chemische Strukturen angewandt.

6.2.1 Der Ansatz

Das Ziel der *Distance Geometry* (DG) ist aus der Sicht der Biochemie die Gewinnung einer Molekülstruktur aus *Constraints*, aus strukturellen Bedingungen, die durch beliebige Experimente gewonnen werden können.

Aus der Sicht der NMR sind dies die aus NOE-Spektren gewonnenen Daten über interatomare Abstände und die aus J -Kopplungen gewonnenen Dihedralwinkel.

Die Verknüpfungen der Atome im Molekül sind vorgegeben und damit die Bindungslängen und die Bindungswinkel. Diese als holonomisch bezeichneten Daten sind neben den *Constraints* die Eingabewerte für eine DG-Rechnung. Aufgebaut werden die für die Rechnung notwendigen Startstrukturen in einem als *Embedding* bezeichneten Schritt, in dem die Punkt-zu-Punkt-Distanzen in Koordinaten übersetzt werden.

Die Strukturrechnungen können auch über vorgegebene Strukturen beginnen: Im Falle des TFPI wurden erste Rechnungen an einer Struktur des BPTI durchgeführt, dessen Aminosäuren, die es vom TFPI unterscheiden, ausgetauscht worden waren.

6.2.2 Distanzgeometrie in der Anwendung

Als erster Schritt wird die Sequenz des untersuchten Proteins erstellt, aus der sich die holonomischen Daten, also die in der Rechnung nicht veränderlichen Abstandsdaten der kovalent gebundenen Atome und die van-der-Waals-Radii, ergeben.

Aus den Daten wird die Distanzmatrix mit allen $(N \cdot (N-1)/2)$ Ober- und Untergrenzen der Abstände – und damit auch gleichzeitig Eingrenzung des zu untersuchenden Konformationsraumes – erstellt.

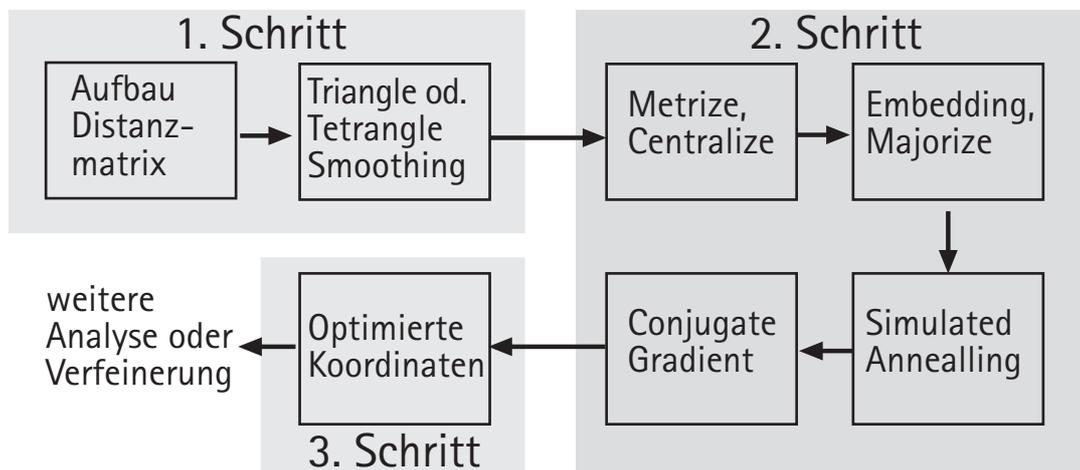


Abbildung 53: Prinzip der Distance Geometry, wie von dem Programmpaket Insight II verwandt. Metrize und Centralize sind für die Erstellung der kartesischen Koordinaten notwendigen Programmbausteine. Die Eingabe wird bei INSIGHT II nicht mit berücksichtigt. (Technologies 1994).

Nach der Eingabe der *Constraints* werden die Werte in die Distanzmatrix eingesetzt. Dabei sind die Obergrenzen oberhalb, die Untergrenzen der Entfernungen unterhalb der Hauptdiagonalen der Matrix zu finden. Obergrenzen, die nicht vorgegeben werden können, werden programmtechnisch auf einen unsinnigen Wert, z. B. 999 Å gesetzt; die minimalen Werte für die Untergrenzen werden durch die van-der-Waals-Radien beschrieben.

Um bessere Startbedingungen zu schaffen, wird ein Verfahren benutzt, das als *Triangle Smoothing* bezeichnet wird: Es muß dabei gegeben sein, daß bei drei Atomen i , j und k der Abstand zwischen i und j kleiner ist als die Summe der Abstände i

nach k und k nach j (Dreiecksungleichung). In dem Fall, daß solche Werte in der Matrix auftauchen, werden die zu großen Werte durch den größtmöglichen (also die Summe der Abstände) ersetzt. Nicht immer führt diese Methode zu guten Ergebnissen und so wird heute meist die deutlich aufwendigere Methode des *Tetrahedron Smoothing* eingesetzt, bei der statt drei vier Atome gleichzeitig betrachtet werden.

Die Abstände der Atome liegen in den Startstrukturen zwischen den Ober- und Untergrenzen. Die Auswahl der Abstände kann zufällig (*random metrization*) erfolgen; es hat sich gezeigt, daß dies der Auswahl der Abstände durch eine Verteilungsfunktion überlegen ist (Scheek, Torda et al. 1991).

Für die Umsetzung der Distanzmatrix in einen Koordinatensatz im *Embedding*-Schritt stehen eine Vielzahl von Algorithmen zur Verfügung. In einem ersten Schritt wird ein Referenzpunkt definiert, anschließend werden die Diagonalelemente der Matrix den Entfernungen der Atome zu diesem Ursprung gleichgesetzt. Im folgenden werden die Nichtdiagonalelemente in Bezug zum Ursprung gebracht. Die Quadratwurzel der Eigenwerte der metrischen Matrix sind die Hauptachsen des Koordinatensystems. Die einzelnen Koordinaten lassen sich dann durch Anwendung der Gleichung

$$\bar{c}_m = \sqrt{\lambda_m \bar{w}_m} \quad (58)$$

beschrieben, dabei ist \bar{c}_m der Koordinatenvektor in der Dimension m , λ_m und \bar{w}_m der dazugehörige Eigenwert und -vektor.

Nach dem *Embedding* sind die Strukturen noch nicht optimal, da die gewählten Abstandswerte zwischen der Ober- und Untergrenze zu „*unusual conformations*“ (Kuntz, Thomason et al. 1989) führen kann.

Die Optimierung versucht die Verletzungen der Vorgaben zu berichtigen. Dazu wird eine Zielfunktion benutzt, die die Energie des Moleküls in Abhängigkeit der Koordinaten beschreibt. Nun wird eine Änderung der Koordinaten (entweder Weite oder Richtung) entlang eines Gradienten durchgeführt und in die Koordinatenliste eingetragen. Die Zielfunktion wird dann mit den neuen Koordinaten überprüft – ist der Wert besser, die Energie geringer, dann wird er übernommen. Dieses iterative Verfahren wird so lange durchgeführt, bis keine Verbesserung mehr erreicht wird. Die verletzten Ober- und Untergrenzen werden in der Funktion

$$E_{Distanz} = \sum_{ij} k'(B_{ij}^2 - D_{ij}^2)^2 \quad (59)$$

beschrieben. Dabei ist $k' 1 \text{ \AA}^{-4}$, B_{ij} entweder Ober- und Untergrenze und D_{ij} die Entfernung in der Struktur. Solange D_{ij} innerhalb des durch B_{ij} gesetzten Bereiches liegt, ist der Funktionswert 0.

Im Falle der Chiralitäten hat die Funktion folgende Funktion:

$$E_{chiral} = \sum_{\substack{\text{chirale} \\ \text{Zentren}}} k'' (f_{ch} - f_{ch}^*)^2 + \sum_{\substack{\text{Abstände} \\ \text{chiraler} \\ \text{Zentren}}} k' (B_{ij}^2 - D_{ij}^2)^2 \quad (60)$$

wobei im ersten Term die Funktionen f_{ch} und f_{ch}^* die vorzeichenbehafteten chiralen Volumina in idealen und durch *Constraints* bedingten Chiralitätszentren darstellen. k'' ist dann 1 \AA^{-6} .

Die Gesamtenergie des Systems wird aus den beiden Summen berechnet. INSIGHT II (MSI) verwendet mehrere Verfahren zur Erhöhung der Strukturgüte über den Energieparameter. Neben einem *Simulated Annealing* ist dies *Conjugate Gradient*, eine Methode, die darauf beruht, daß die Richtungen, in denen die Minimierung entlang der Zielfunktion erfolgt, sich nicht gegenseitig behindern.

Die von der *Distance Geometry* ausgegebenen Strukturen sind zunächst mathematische Lösungen des Problems, N masselose Punkte so zu positionieren, daß die geometrischen Bedingungen möglichst gut erfüllt sind. Was fehlt, sind Energieminimierungsschritte, die chemischen Gegebenheiten berücksichtigen und bei minimalen Koordinatenauslenkungen eine weitere Verbesserung der Struktur ermöglichen. Scheek et al. (Scheek, Gunsteren et al. 1989) schlagen – ausgehend von Moleküldynamik-Rechnungen – vor, bei DG-Rechnungen eine *Restrained MD* anzuschließen, um so die internen Energien mit möglichst geringen Verschiebungen der Koordinaten zu minimieren.

6.2.3 IRMA

Der *iterative relaxation matrix approach* ist eine Methode zur Generierung einer Liste von erwarteten NOE-Entfernungsdaten basierend auf Relaxationstheorie des *Nuclear-Overhauser-Effektes* (Malliavin, Delsuc et al. 1992). Einbezogen werden in diese Berechnungen eine Modellstruktur und die – unvollständigen – Distanzen aus den aufgenommenen NOESY Spektren.

Danach sind die in NOESY Spektren beobachteten Intensitäten der Signale das Resultat einer Kombination von *spin diffusion*, molekularer Flexibilität und des NOE. Ausgehend von bestehenden Strukturen werden die Kreuzrelaxationsraten der Protonen berechnet. Dieser Ansatz wird dazu benutzt, neue *restraints* zu generieren,

die als Protonenabstände wieder in die Strukturrechnung zurückfließen.

Die für den Einsatz von IRMA benötigte Startstruktur muß bereits eine der Zielstruktur ähnliche Faltung aufweisen. Diese erste Struktur kann aus den zugeordneten NOEs generiert worden sein oder durch ein *Mapping* der Aminosäuresequenz auf eine bestehende, als ähnlich angenommene Struktur, gewonnen werden.

Basis des Verfahrens ist die Relaxationsmatrix \mathbf{R} , auf deren Diagonale die Eigenrelaxation ρ und auf deren Nichtdiagonalelementen r_{ij} die Kreuzrelaxation σ_{ij} der Protonen i und j zu finden sind (Croasmun and Carlson 1994). Die Kreuzsignalintensitäten \mathbf{a}_{ij} sind zeitlich abhängig und lassen sich wie folgt mit der Kreuzrelaxation verknüpfen:

$$\frac{da_{ij}}{dt} = -\sigma_{ij} \cdot a_{ij} \quad (61)$$

Für eine konstante Mischzeit τ_m , in der sich der sich der Magnetisierungstransfer $I_{iz} \rightarrow I_{jz}$ entwickeln konnte, lautet dann die formale Lösung:

$$a_{ij} = \exp(-\sigma_{ij}\tau_m) \quad (62)$$

und für das gesamte Molekül, repräsentiert durch die Relaxationsmatrix \mathbf{R} und den normalisierten Intensitäten \mathbf{A} zu

$$\mathbf{A} = \exp(-\mathbf{R}\tau_m) \quad (63)$$

Die Exponentialmatrix kann als Reihe entwickelt werden:

$$\exp(-\mathbf{R}\tau_m) = 1 - \mathbf{R}\tau_m + \frac{1}{2}\mathbf{R}^2\tau_m^2 + \dots \quad (64)$$

Wählt man für die experimentellen Mischzeiten hinreichend kurze Zeiten, so reduziert sich die Reihe im wesentlichen auf die ersten beiden Terme, die Intensität der Kreuzsignale kann als linear abhängig von der Mischzeit und der Relaxationsrate angesehen werden.

Unter diesen Voraussetzungen, der kurzen Mischzeit und der Annahme, daß keine Spindiffusion in der Zeit τ_m auftritt, kann aus einer Struktur die komplette NOE-Matrix berechnet, können also die Intensitäten aus der Struktur bestimmt werden.

In der IRMA-Rechnung wird aus der Startstruktur eine theoretische NOE-Matrix generiert, diese wird mit den aus den NOESY-(oder auch ROESY-)Spektren gewonnenen Intensitäten kombiniert, wobei die experimentellen Werte die theoretischen überschreiben. Aus dieser kombinierten Relaxationsmatrix kann nun ein Satz von Proton-Proton-Abständen gewonnen werden, die in eine *restrained* MD-Rechnung einfließen.

Diese neuen Strukturen werden dann wieder als Startstrukturen für den nächsten Zyklus gewählt.

6.3 Die Strukturrechnungen

Die ersten Strukturrechnungen wurden mit dem Programmpaket INSIGHT II von MSI durchgeführt. Diese Strukturen gaben einen ersten Eindruck der Struktur, blieben aber im Endeffekt nur ein Schritt auf dem Weg. Die endgültigen Rechnungen wurden mit XPLOR, Version 3.1 (Brünger 1992), durchgeführt. Die Strukturrechnungen benötigen die im Kapitel 5 auf Seite 97 beschriebenen, aus den verschiedenen Spektren gewonnenen Daten in Form von *Distance Restraints* und *Angle Restraints*.

Die ersten Berechnungen wurden mit INSIGHT II mit der Hilfe von Sandor Szalma (jetzt MSI, San Diego) durchgeführt. Es kamen bei diesen Berechnungen nur eine geringe Anzahl von *Restraints* zum Einsatz; die Güte der erhaltenen Strukturen war sehr schlecht, sie konnten aber als Ausgangspunkt für die weiteren Verfeinerungen mit Hilfe von XPLOR genutzt werden.

6.3.1 Ablauf der Strukturrechnung

In den ersten Berechnungen mit XPLOR, die zusammen mit Herrn Alexander Diener durchgeführt wurden, wurden ausschließlich Distanz-NOEs genutzt.

6.3.1.1 Distanz-NOEs und Intervalle

Die Distanz-NOEs wurden in den ersten Rechnungen aus dem von FELIX gelieferten Format in eines umgewandelt, das der XPLOR Notation entspricht. Das größte Problem dieses Vorgehens ist die fehlende Pseudoatomkorrektur, die nur dann von XPLOR durchgeführt wird, wenn Integrale als Input zur Verfügung stehen, nicht aber, wenn es sich bereits um Distanzen handelt – ein Faktum, das selbst Herrn Dr. Nilges (EMBL Heidelberg) erstaunte (pers. Komm.). Als Konsequenz wurden alle Pseudoatome per Hand nachkorrigiert.

In den neuesten Versionen von FELIX können die resultierenden Entfernungen als

XPLOR-Dateien exportiert werden.

Verwendet wurden die NOEs der folgenden Typen: 424 intraresidual, 180 sequentiell, 158 nichtsequentielle interresiduale NOEs.

Die Struktur der zweiten Kunitz-Domäne, die von Burgering et al. publiziert wurde (Burgering, Orbons et al. 1997), beruht bei einer Länge von 65 AS auf 906 Distanz-NOEs.

6.3.1.2 Pseudoatomkorrektur

Bei den Methylengruppen der Aminosäuren kam die *floating chirality* zum Einsatz; dabei wird die Stereochemie der CH₂-Gruppe erst dann festgelegt, wenn sich eine eindeutige Zuordnung aus den NOEs im Laufe der Rechnung ergibt. Somit ist die in den *Distance Restraints* bestehende Zuordnung von H β 1 und H β 2 nicht fest, sondern kann von XPLOR aus korrigiert werden.

Die Protonen von Methylgruppen sowie die aromatischen Protonen der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin (δ - und ϵ -Protonen) sind bei rascher Rotation der C-C-Bindung bzw. der aromatischen Gruppe magnetisch äquivalent und besitzen eine einzige Resonanzfrequenz. Ein NOE zwischen diesen ununterscheidbaren Protonen und einem benachbarten Proton stellt daher eine Überlagerung mehrerer NOEs dar, im Falle der Methylgruppe eben eine Überlagerung von drei NOEs. Um dennoch diesen NOE in die Strukturrechnungen mit einbeziehen zu können, wird aus einer Methylgruppe ein Pseudoatom generiert, dessen Lage im geometrischen Zentrum der magnetisch äquivalenten Protonen liegt. Die Distanz muß nun dahingehend korrigiert werden, daß die Distanz zwischen Pseudoatom und dem wechselwirkenden Proton vernünftig ist und daß das Integral des Signals aus mehreren Wechselwirkungen herrührt.

Die Distanzwerte der NOEs zwischen „normalen“ und Pseudoatomen wurde manuell um 0,5 Å, beim Kontakt zwischen zwei Pseudoatomen um 1 Å erhöht (Bayer 1994). Bei den aromatischen Pseudoatomen wurden nach Kontrolle in der Struktur die Distanzwerte schrittweise erweitert, da aufgrund der fehlenden ³J-Kopplungen zu den β -Methylen-Protonen nicht immer sicher zwischen δ - und ϵ -Protonen unterschieden werden konnte.

6.3.1.3 Wasserstoffbrückenbindungen

Nachdem die Rechnungen bereits auf eine BPTI-ähnliche Struktur hindeuteten, wurde nach möglichen Wasserstoffbrücken in den Strukturen gesucht. Mit Hilfe eines Moduls (`back_calc_db`) des Programmes NDEE konnten diese Bindungen identifiziert werden. Zur Identifizierung der Wasserstoffbrückenbindungen wurden

die Strukturen genutzt, die lediglich die Distanz-NOEs als Strukturparameter nutzten. Eine Wasserstoffbrückenbindung wurde dann angenommen, wenn:

- der Abstand eines Amidprotons zu einem räumlich benachbarten Carbonyl-Sauerstoff kleiner als 2,3 Å in mehr als 50% der Strukturen war und
- die Ausrichtung der 4 Atome N–H–O–C annähernd linear war.

In die weiteren Rechnungen wurden diese Brücken über Abstandsbeschränkungen $d(\text{HN-O})$ und $d(\text{N-O})$ mit einbezogen und in einer zusätzlichen Datei zur Laufzeit mit berücksichtigt.

Die Dihedralwinkel wurden über die ausführlich beschriebenen Methoden bestimmt. In den letzten Strukturrechnungen wurden 762 Distanz-NOEs genutzt, zusammen mit 15 Wasserstoffbrücken-Bindungen und 24 Dihedralwinkeln um die H–N–C α –H α -Bindung der Aminosäure.

Eingabedateien sind im Anhang C auf Seite 217 aufgeführt.

6.4 Die Strukturen und die Bewertung

Es wurden jeweils Sätze von 100 Strukturen mit XPLOR (Brünger 1992) gerechnet. Die ersten Sätze wurden ohne Wasserstoffbrücken berechnet, erst in den letzten Sätzen wurden diese Parameter mit einbezogen. Von den erhaltenen Strukturen wurden die jeweils 10 besten weiter untersucht, um darüber Zuordnungsfehler oder falsche Integrale zu identifizieren und diese zu korrigieren. Dieses iterative Verfahren wurde solange durchgeführt, bis keine Verbesserungen mehr erreicht werden konnten.

Es wurden für die folgenden Ausführungen die 10 besten von 100 Strukturen verwendet.

Die Definition der Qualität einer gewonnenen Struktur wird an der Standardabweichung (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) der einzelnen Strukturen eines Satzes untereinander (*pairwise comparison*) oder als Standardabweichung von der mittleren Struktur eines Ensembles.

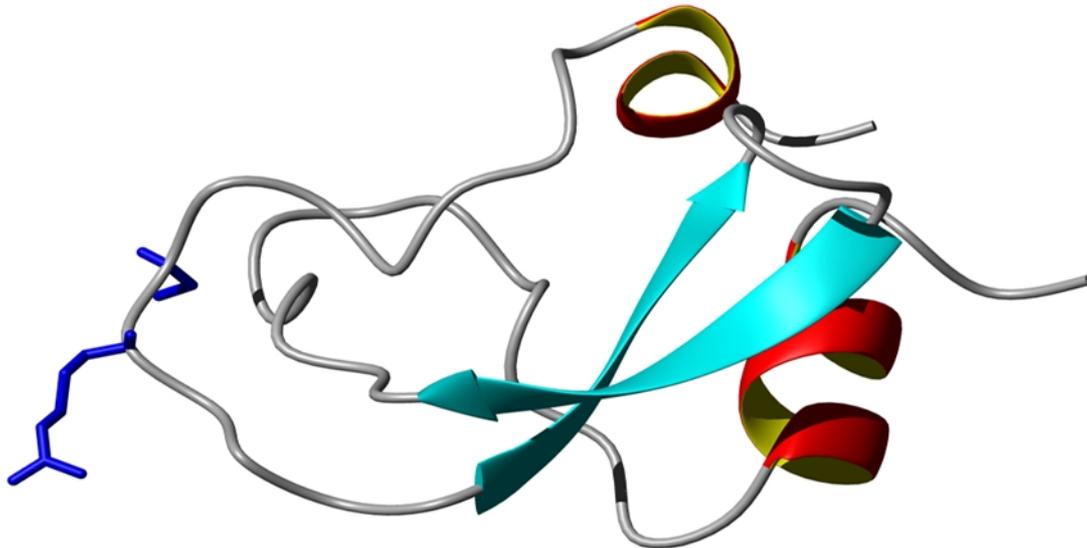


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Struktur der zweiten Domäne des TFPI. Zu erkennen ist die N-terminale Helix (hinten, oben) und die C-terminale Helix (hinten, unten). Links: die Reste Cys-14 und Arg-15, die reactive Site.

Struktur	Gesamtenergie (kcal/Mol)
tfpi01.pdb	363.937
tfpi02.pdb	372.419
tfpi03.pdb	397.160
tfpi04.pdb	410.994
tfpi05.pdb	414.114
tfpi06.pdb	414.949
tfpi07.pdb	423.117
tfpi08.pdb	447.241
tfpi09.pdb	459.058
tfpi10.pdb	460.102

Tabelle 7: Energiewerte der 10 Strukturen mit Abweichungen, alle Werte in kcal/Mol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		1.18	1.23	1.27	1.00	1.31	1.06	1.32	1.75	1.35
2	1.82		1.59	1.85	0.66	1.08	1.30	1.52	1.71	1.43
3	2.16	2.34		1.69	1.54	1.69	1.32	1.48	1.82	1.55
4	1.91	2.54	2.57		1.73	1.71	1.32	1.44	1.75	1.78
5	1.78	1.40	2.32	2.47		1.16	1.17	1.47	1.84	1.37
6	2.10	1.73	2.56	2.48	2.04		1.19	1.46	1.75	1.52
7	1.77	1.66	2.14	2.12	1.74	1.85		1.29	1.87	1.48
8	2.02	2.40	2.67	2.26	2.44	2.37	2.15		1.47	1.45
9	2.58	2.58	2.97	2.30	2.73	2.68	2.73	2.51		1.64
10	2.40	2.28	2.70	2.97	2.33	2.38	2.53	2.72	2.82	

Tabelle 8: RMSD-Werte der 10 besten Strukturen gegeneinander (pairwise comparison). Oberhalb der Diagonale: alle backbone-Atome, unterhalb: heavy-Atome. Alle Werte in Å.

Damit wird allerdings lediglich eine Bewertung der Präzision möglich, nicht erhalten ist, wie sich die neue Struktur in das Bild der bereits bekannten Strukturen einfügt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bb	1.18	0.78	2.25	0.88	1.05	1.04	1.62	1.49	1.00	1.10
heavy	1.85	1.41	2.67	1.74	1.95	1.75	2.35	2.19	1.78	1.96

Tabelle 9: RMSD-Werte der besten Strukturen gegen die mittlere Struktur (Reste 4-55). bb: nur backbone-Atome; heavy: alle Schweratome. Alle Werte in Å.

Die RMSD-Werte wurden für das Rückgrat des Moleküls (*backbone*, bb) bestimmt und für alle Schweratome (*heavy atoms*). Der RMSD-Wert für das proteinrückgrat liegt bei 1,46 Å, für alle Atome liegt er bei 2,31 Å (berechnet mit MOLMOL).

Die RMSD-Werte sind unbedingt auf lokaler Ebene weiter zu untersuchen. Wird das getan, so wird die lokale Beweglichkeit der Gruppen klar. In Abbildung 55 ist gut zu sehen, daß das dem Betrachter zugewandte β -Faltblatt sehr gut definiert ist, wohingegen der *Loop*-Bereich, der linker Hand in der Abbildung zu finden ist, eine sehr hohe Variabilität aufweist. Diese Variabilität überträgt sich auch auf den über

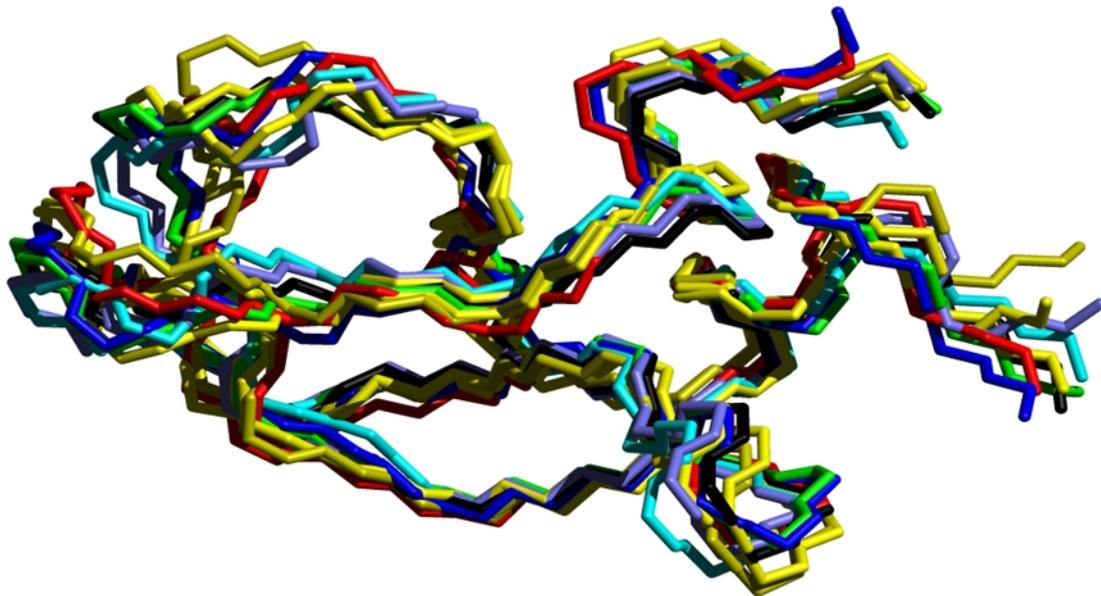


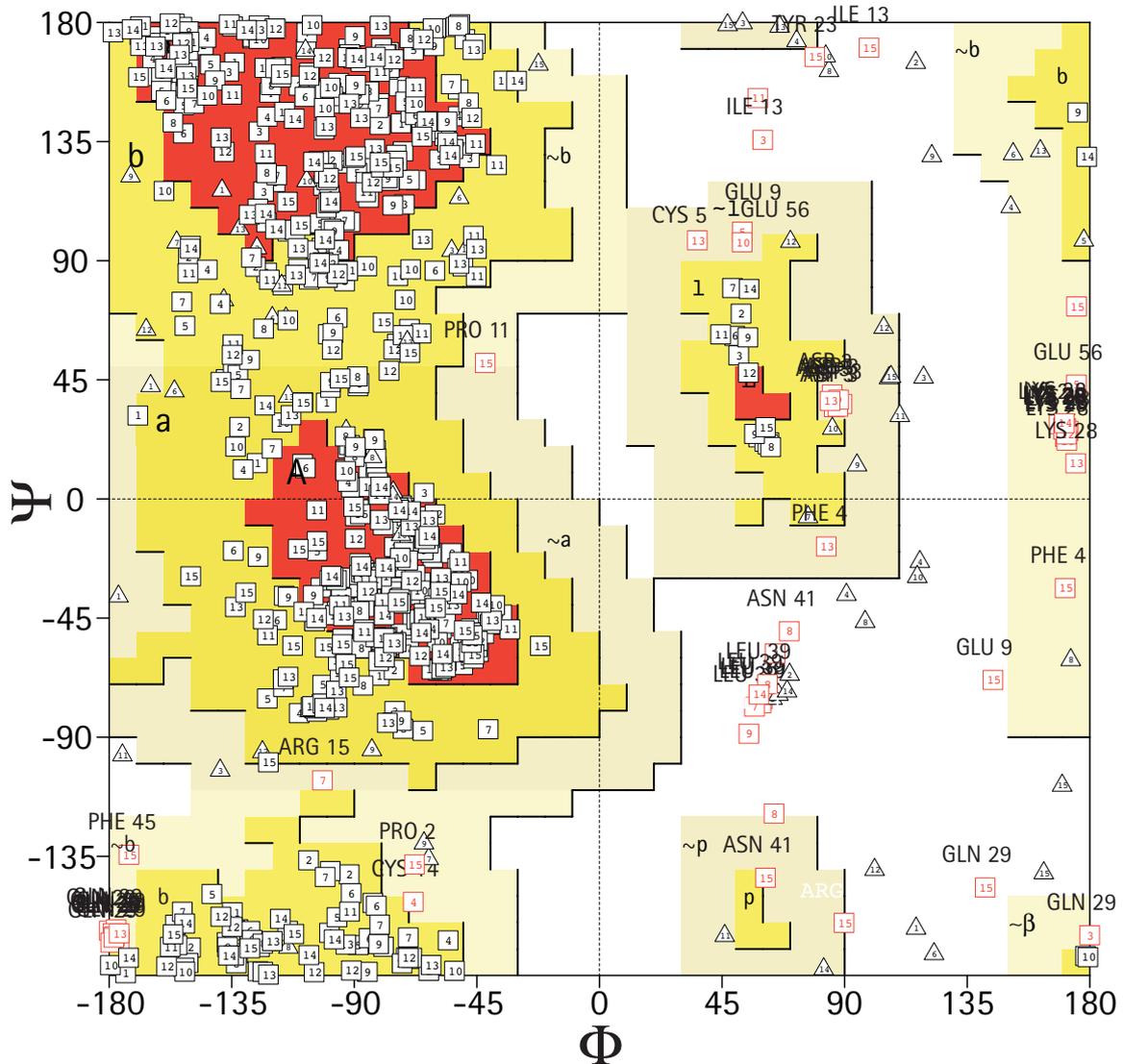
Abbildung 55: Overlay der 10 besten Strukturen der zweiten Domäne des TFPI.

die Disulfidbindung zwischen Cys-14 und Cys-38 verbundenen Bereich zwischen dem Ende des Faltblatts bei etwa Gly-36 und Met-42.

Die Anzahl der *long range* NOEs für die Aminosäuren des *N*- und *C*-Terminus war nicht groß genug, um die Struktur zu stabilisieren, hinzu kommt, daß im *C*-Terminus einige Aminosäuren nur wenige Signale gaben.

Der Ramachandran-Plot korreliert die Backbone-Winkel ϕ und ψ . Die Sekundärstrukturelemente und elektronische Gegebenheiten bedingen, daß die Winkelkombinationen sich auf einige wenige Bereiche beschränken. Idealerweise sind alle Winkelpaare ϕ, ψ in einem der gefärbten Bereiche des Plots (Abbildung 56) zu finden. Die Analyse ergibt einen Anteil von über 90 % der Winkel in den favorisierten Bereichen (*most favoured* & *additional allowed*) für die 15 besten Strukturen von 100.

Um das Molekül als Einheit bewerten zu können, sind die Ramachandran-Plots der einzelnen Aminosäuren getrennt aufgeführt (Abbildung 57 ff.). Dabei ist sehr gut zu erkennen, daß der Bereich um die *reactive site* (Gly-12 bis Gly-16) sehr beweglich ist, das folgende β -Faltblatt dagegen nur wenig Dynamik aufzeigt.



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	429	58.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	247	33.6%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	44	6.0%
Residues in disallowed regions	15	2.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	735	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	15	
Number of glycine residues (shown as triangles)	90	
Number of proline residues	30	

Total number of residues	870	

Abbildung 56: Ramachandran-Plot für die 15 besten Strukturen aus 100. Generiert mit PROCHECK.

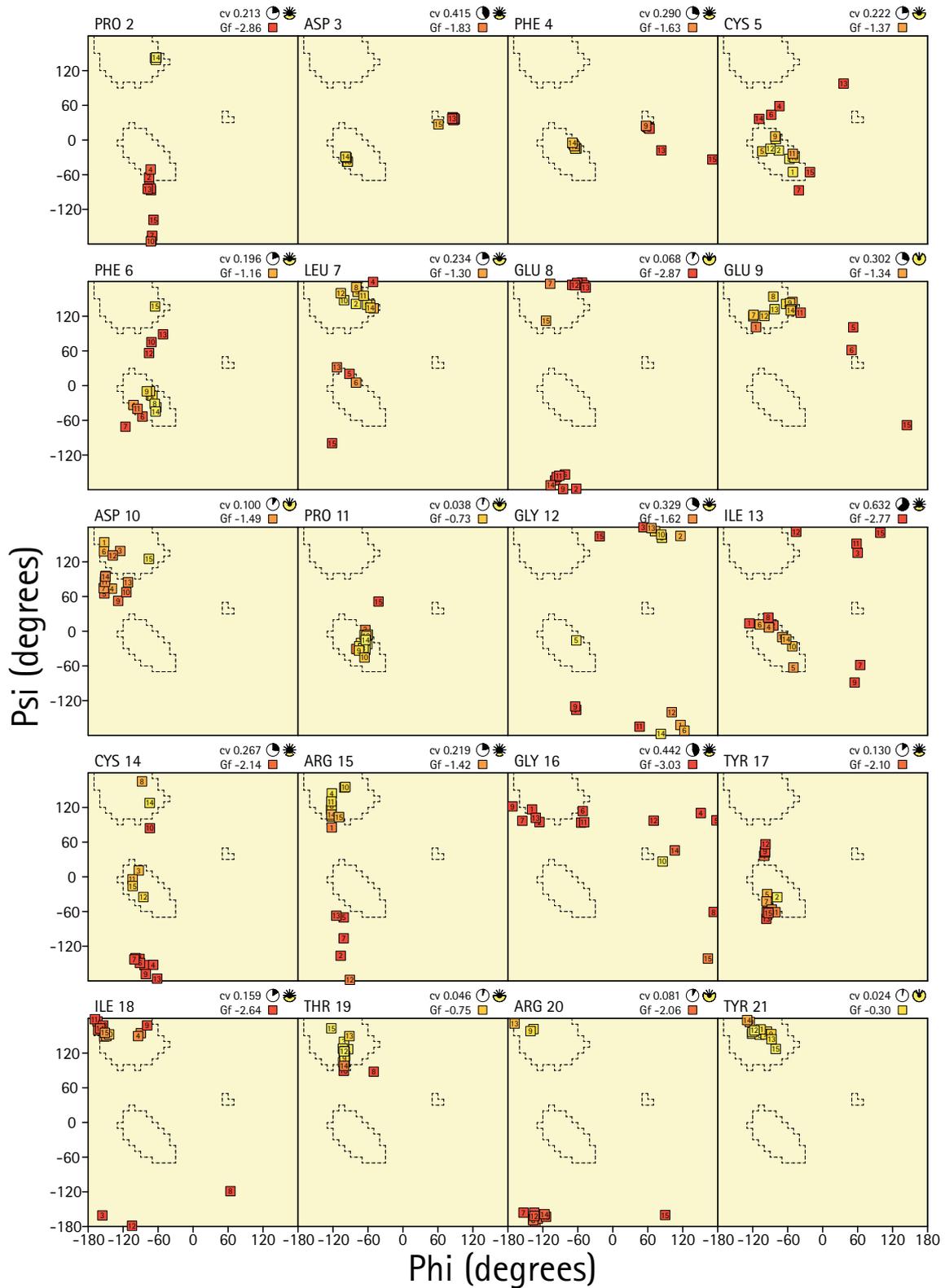


Abbildung 57: Ramachandran-Plots der individuellen Aminosäuren (I).

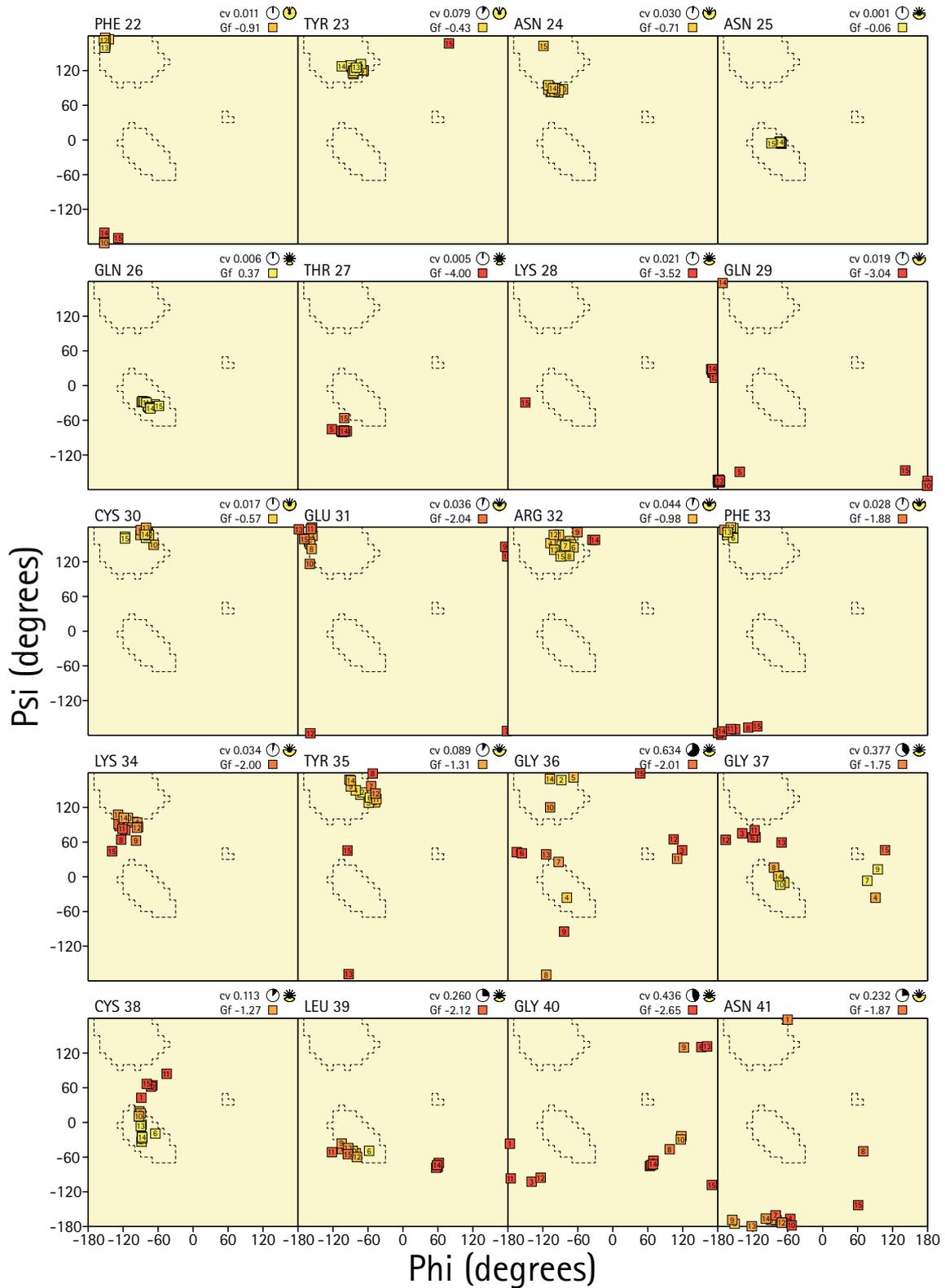


Abbildung 58: Ramachandran-Plots der individuellen Aminosäuren (II).

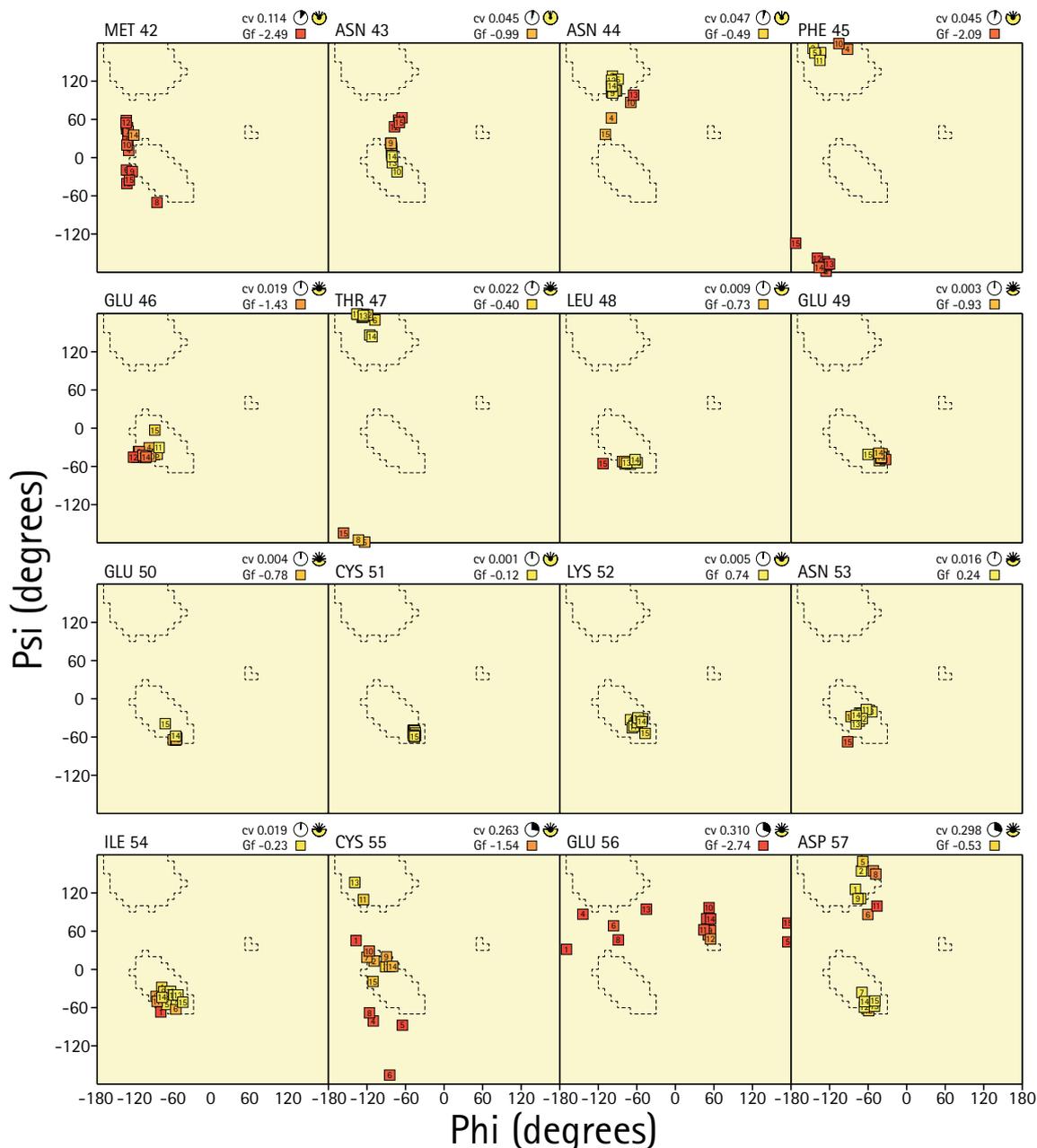


Abbildung 59: Ramachandran-Plots der individuellen Aminosäuren für die besten 15 Strukturen. Generiert mit PROCHECK-NMR.

6.4.1 Elemente der Struktur des TFPI-2

Die zweite Domäne des TFPI weist eine hohe Homologie zu anderen Inhibitoren vom Kunitz-Typ auf, namentlich BPTI. Die Struktur kann eingeteilt werden in einen α -helicalen *N*-Terminus, der etwa von Asp-3 bis Glu-8 läuft. Die Schleife mit der *reactive site* bei Cys-14 und Arg-15 schließt sich an. Es handelt sich dabei um

ein durch die S-S-Bindung zwischen Cys-14 und Cys-38 stabilisiertes *random-coil*-Strukturelement. Von Ile-18 bis Tyr-35 bildet TFPI-2 ein antiparalleles β -Faltblatt aus, der *turn* liegt zwischen 25 und 29. Die Sektion zwischen den Aminosäuren 41 und 46 kann als dritter Strang des β -Faltblatts gesehen werden, der nicht wirklich parallel läuft. Ab Cys-51 bildet der C-Terminus eine weitere α -Helix aus, die etwa bis Cys-55 verfolgt werden kann.

6.4.2 Die Güte der erhaltenen Strukturen – Procheck-NMR

Laskowski et al. (Laskowski, Rullmann et al. 1996) entwickelten 1996 einen Satz von Programmen, mit denen die strukturellen Parameter nicht nur auf innere Konsistenz, also durch Vergleich mit sich selbst, sondern auch auf Konsistenz bezüglich regulären Sekundärstrukturelementen wie *backbone*-Winkeln geprüft werden können. PROCHECK-NMR, das auf dem Programmpaket PROCHECK (Laskowski, MacArthur et al. 1993) beruht, berechnet also die „stereochemische Qualität“ und versucht gleichzeitig ein Maß für die Zuverlässigkeit (*reliability*) der Struktur zu geben. Ein Beispiel für einen Test der *reliability* ist die Auswertung eines Ramachandran-Plots, bei dem die Rückrat-Winkel ϕ und ψ eines Proteins gegeneinander aufgetragen werden. Für jedes Sekundärstrukturelement gibt es Richtwerte, die die beiden Winkel in dem Diagramm annehmen können.

Das Programmpaket benutzt eine Reihe von Parametern für die Analyse der stereochemischen Qualität (Morris, MacArthur et al. 1993), die nicht explizit in die Strukturrechnungen einfließen, damit also ein unabhängiges Maß darstellen. Neben dem Test gegen bereits bekannte Strukturen bietet das Programmpaket eine Wertung bezüglich der Geschlossenheit des Datensatzes. Einbezogen werden ideale Bindungslängen und -winkel, die aus einer großen Zahl² von Röntgenstrukturen kleiner Proteine, die in der *Cambridge Structural Database* gespeichert sind, gewonnen wurden. Neben der Geometrie werden Chiralität, Planarität, die Präzision (Standardabweichung der Koordinaten und Bereiche, in denen die Winkel variieren) und die Verteilung der *Restraints* und deren Streuung und die Verteilung der Verletzungen der *Restraints*. Die Module von AQUA (*Analysis of Quality*) und PROCHECK-NMR bewerten die Sekundärstrukturen (SECSTR.F), die Bindungslängen und -winkel des Rückrates (ANGLEN.F) und die nichtbindenden Wechselwirkungen (NB.C).

². Eine genaue Liste findet sich in Procheck Operation Manual, Appendix A.

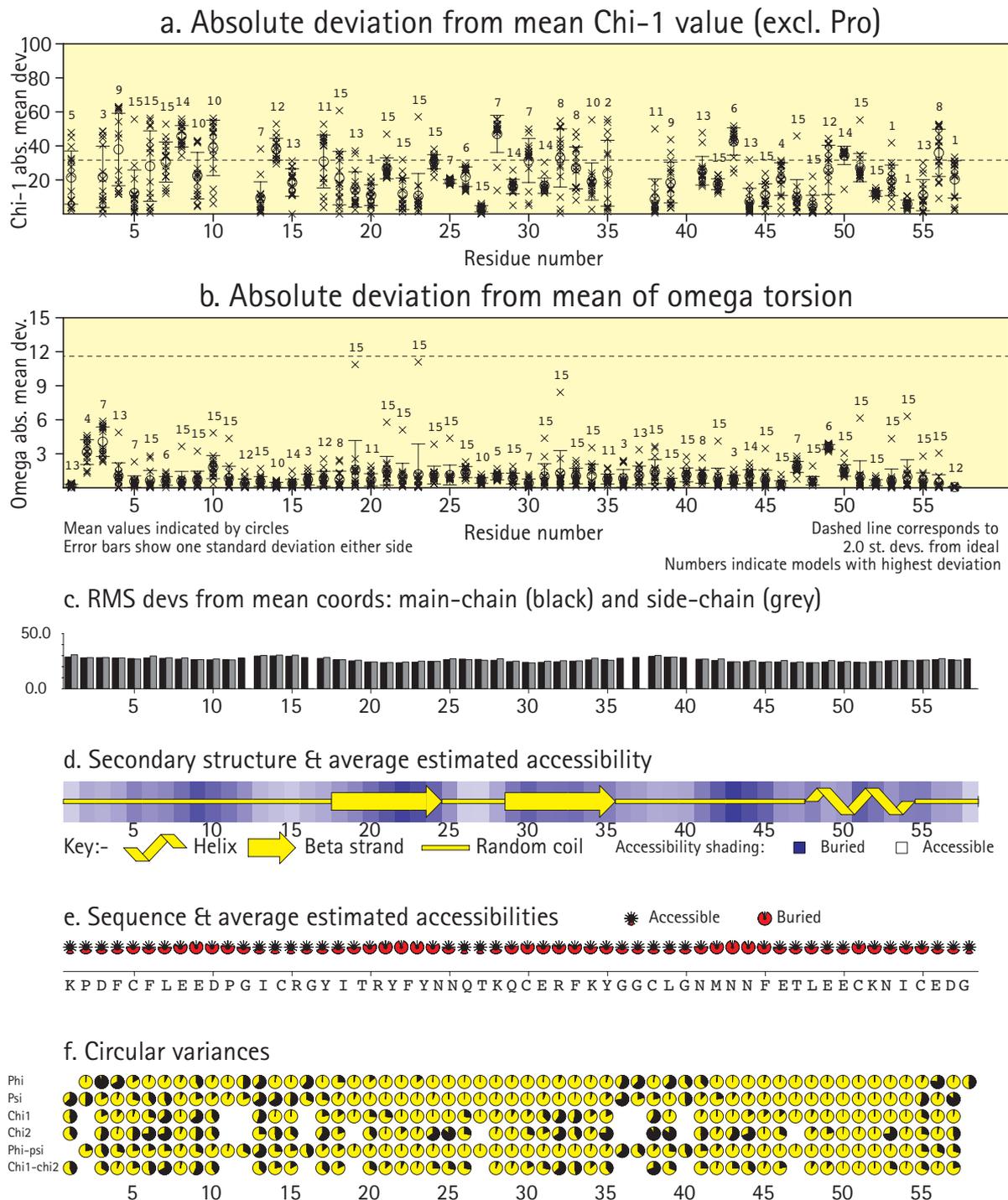


Abbildung 60: Übersicht über wichtige Strukturparameter von TFPI-2. Ausgabe von PROCHECK-NMR.

6.4.3 Vergleich mit der publizierten Struktur

In einer Zusammenarbeit von Max-Planck-Institut Martinsried (Bode, Huber und Stubbs) und der Firma Scientific Development Group N. V. Organon aus den Niederlanden wurde nicht nur die Struktur von TFPI-2 mit Hilfe von NMR gelöst, es wurden zusätzlich mittels Röntgenstrukturanalyse die Struktur des Komplexes von TFPI-2 mit Trypsin bestimmt und der Komplex TFPI-2 mit Faktor Xa modelliert.

6.4.3.1 Die NMR-Struktur

Wie in der vorliegenden Arbeit, so wurde auch die von M. J. M. Burgering et al. (Burgering, Orbons et al. 1997) publizierte (und Anfang 1998 freigegebene) Struktur der zweiten Domäne des TFPI über NMR-Methoden generiert. Dabei wurde nicht dieselbe Sequenz wie in dieser Arbeit untersucht, sondern eine um 9 Reste *N*-terminal und 4 Reste *C*-terminal verlängerte. Die überzähligen Reste stammen von dem Peptid des *Kloning*-Vektors. Dadurch wurden die in dieser Arbeit nicht zugeordneten Reste *N*- und *C*-terminal in der Struktur stabilisiert und konnten zugeordnet werden. Die Reste -9 bis -1 der Struktur (Abbildung 61) konnten nicht

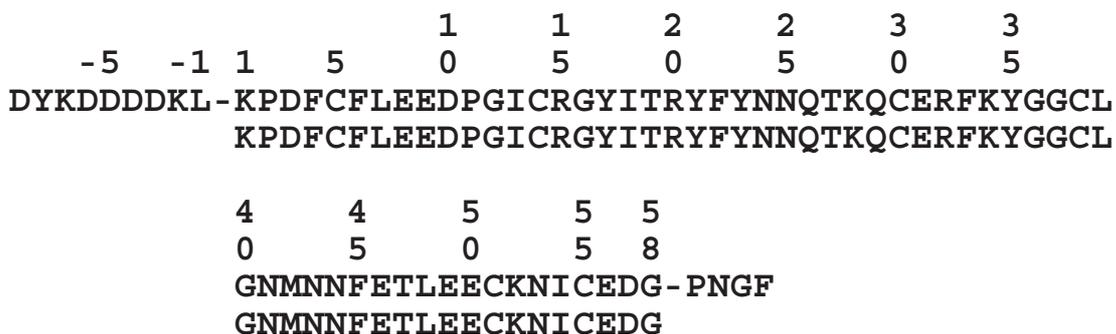


Abbildung 61: Die beiden TFPI-2-Sequenzen, oben die in (Burgering, Orbons et al. 1997) beschriebene, unten die in dieser Arbeit verwendete.

zugeordnet werden. Diese sind, so die Autoren, flexibel und zeigten daher keine strukturellen NOEs in den Spektren.

Wie auch bei der in dieser Arbeit beschriebenen Struktur, so konnten auch Burgering et al. für einige Abschnitte des Proteins keine NOEs finden. Es handelt sich um die Bereiche um die Disulfidbindung Cys-14–Cys-38. Wahrscheinlich handelt es sich um dieselben Isomerisierungen, die bereits bei BPTI beobachtet wurden (Oting, Liepinsh et al. 1993).

Die Proben entsprachen den in dieser Arbeit verwendeten; wobei die Konzentrationen etwas höher lagen (7 mM). Der pH-Wert lag bei 4.5. Die Spektren wurden bei

37°C aufgenommen, bei dieser Temperatur waren die Signale der in dieser Arbeit verwendeten Probe verbreitert. Neben den DQF-COSY-, Clean-TOCSY- ($\tau_m=80$ ms) und NOESY-Spektren mit $\tau_m=50$ ms gelang es, ein ^1H , ^{13}C -Spektrum bei natürlicher Häufigkeit aufzunehmen.

Für die Strukturrechnungen konnten 906 NOE-Constraints und 23 Dihedralwinkel genutzt werden. Kalkuliert wurden 300 Strukturen. Von diesen wurden 30 Strukturen mit den geringsten Energien ausgewertet, die resultierenden RMSD-Werte für den Backbone und für alle Schweratome liegen bei 0,73 Å, respektive 1,38 Å.

Auch in der Arbeit von Burgering et al. wurde das Programm PROCHECK (Laskowski, MacArthur et al. 1993; Laskowski, Rullmann et al. 1996) zur Beurteilung der stereochemischen Güte eingesetzt. Insgesamt 93,5% der Reste lagen in den Core- und erlaubten Regionen des Ramachandran-Plots. Die Autoren weisen darauf hin, daß in allen Regionen des Proteins Winkel zu finden sind, die im „ungünstigen Bereich“ des Ramachandran-Plots liegen.

Der RMSD-Wert für alle Backbone-Atome der Reste 2 bis 57 (nach Abbildung 61) liegt bei 2,08 Å. Die größte lokale Abweichung liegt in der leicht unterschiedlichen Lage der C-terminalen Helix zum zentralen β -Faltblatt hin begründet. Eine nochmalige Überprüfung der zugeordneten interresidualen NOEs zeigte in diesem Bereich zeigte keine Auffälligkeiten; alle *Constraints* können in der Struktur gut erfüllt werden.

Der *reactive loop* des Inhibitors ist in beiden Strukturen beweglich und daher unterschiedlich geformt.

6.4.3.2 Die Komplexe von TFPI-2 mit Trypsin und Faktor Xa

Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte die Struktur eines Kristall des Komplexes von TFPI-2 mit Trypsin mit einer Auflösung von 2,6 Å gewonnen werden. In diesem Komplex ähnelt TFPI-2 stark dem BPTI, die einzige konformationelle Ausnahme wurde bei Gly-40 des TFPI-2 beobachtet – im BPTI ein Alanin. Der RMSD-Wert des paarweisen Vergleichs der Struktur des TFPI-2 im Kristall mit den NMR-Strukturen liegt im Durchschnitt bei 1,17 Å. Dabei sind die Abweichungen in den verschiedenen Regionen des Moleküls unterschiedlich: die Bereiche um die terminalen Helices und das zentrale β -Faltblatt weisen kleinere, die Bereiche um die *reactive site* (Pro-11 bis Ile-18) und die Region um das an Cys-14 über Disulfidbrücke gebundene Cys-38 (Gly-36 bis Thr-47) größere RMSD-Werte auf. Die Autoren führen dies auf die bereits erwähnte Isomerisierung um diese Disulfidbindung zurück. Besonders augenfällig sind die konformationellen Änderungen der Seitenkettenorientierung bei Tyr-17 im Vergleich zu der NMR-Struktur. Beim BPTI wird

an derselben Stelle (Arg-17) derselbe Effekt beobachtet (Berndt, Güntert et al. 1992), es scheint sich um einen Packungseffekt im Kristall zu handeln, da Tyr-151 des Trypsins dort besser zu liegen kommt (*favourable stacking interaction*).

Im Komplex liegt das TFPI-2 genauso in der *active site* wie das homologe BPTI. Der Bereich mit Kontakten liegt, wie erwartet (Bode and Huber 1992), zwischen Pro-11 und Thr-19 des TFPI-2. Die relative Orientierung der Moleküle BPTI und TFPI-2 zum Trypsin ist fast identisch, der RMSD der C α -Atome der Komplexe liegt bei 0,50 Å.

Die Wechselwirkungen mit Trypsin sind entsprechend dem BPTI/Trypsin-Komplex Arg-15 (N) des TFPI-2 zu Ser-214 (O) des Trypsin, Ile-13 (O) zu Gly-216 (N). Die Carbonyl-Gruppe des Arg-15 liegt dabei im Oxyanion-Loch und weist die typischen Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amidgruppen von Gly-193 und Ser-195 auf. Die Seitenkette des Arginin weist in die Spezifitätstasche des Trypsin hinein. Die Guanidgruppe bildet eine Salzbrücke zu dem gegenüberliegenden Asp-189 aus und ist zusätzlich durch Wasserstoffbrücken (Ser-190 und Gly-219) stabilisiert.

Die Modellierung des Komplexes TFPI-2 mit Faktor Xa konnte nicht *straight forward* erfolgen. Die Reste Tyr-99 und Gln-61 des Enzyms kollidieren mit dem Inhibitor. Erst durch ein Auslenken des aromatischen Systems (*swing out*), wie es bereits für den Komplex zwischen BPTI und Kallikrein beobachtet worden war (Chen und Bode 1983), passen die beiden Moleküle in der Simulation zusammen. Die Kontaktfläche zwischen TFPI-2 und Faktor Xa ist in dem Modell deutlich größer als in dem Trypsin/BPTI-Komplex, da drei Schleifen an der Oberfläche des Enzyms in Wechselwirkung treten. Es sind drei Regionen des TFPI-2, die in Kontakt mit der Protease stehen: Gly-12 bis Arg-20, Arg-32 bis Cys-38 und Glu-46. Die letzteren sind elektrostatische Wechselwirkungen, bei denen im Modell die positiv geladenen Seitenketten von Lys-28, Arg-32 und Arg-20 mit den Seitenketten Glu-39, Glu-37 und Glu-36 im Enzym wechselwirken. Glu-46 und Glu-50 des Inhibitors zeigen im Modell eine Tendenz hin zu Lys-62 des Enzyms.

Auf der Oberfläche des TFPI-2 existiert in dem Modell des Komplexes ein Bereich erhöhter Ladungsdichte, der aus den Resten Glu-8, Glu-9, Asp-10 und Glu-31 gebildet wird. Diese stehen den Resten Arg-143, His-145, Glu-147, Lys-148 und Arg-150 gegenüber. Diese Schleife ist wahrscheinlich beweglich in Lösung und so in der Lage, sich dem Substrat anzupassen.

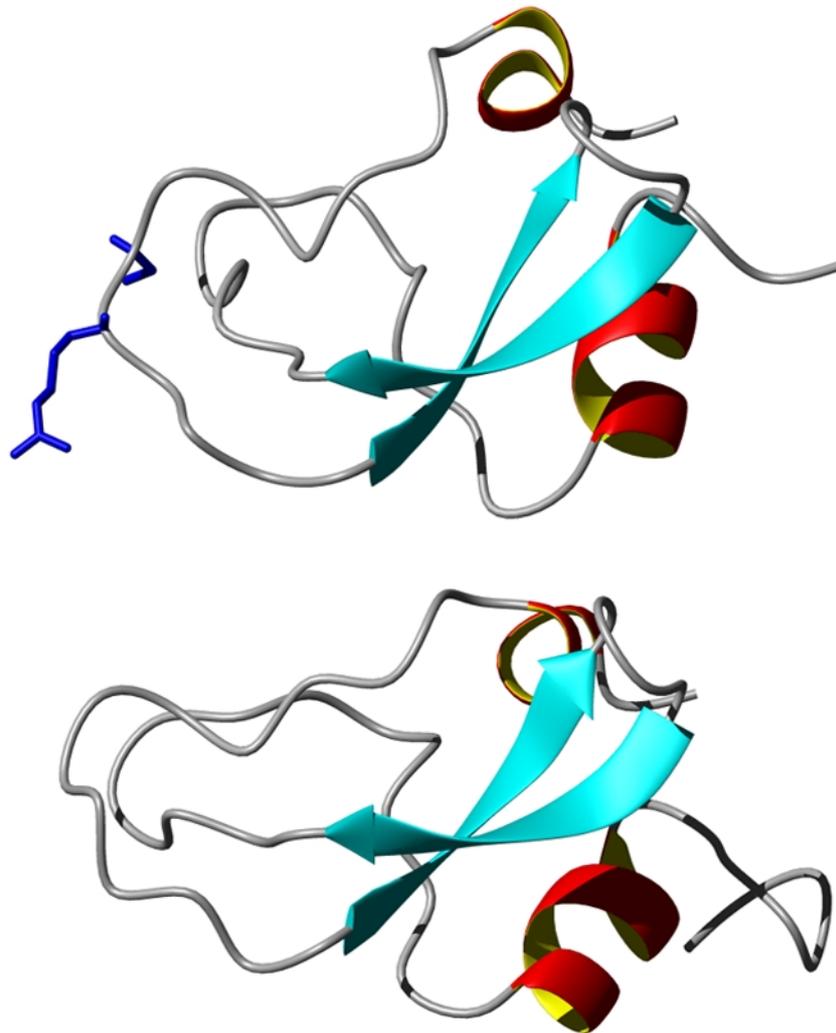


Abbildung 62: Vergleich der beiden Strukturen der zweiten Domäne des TFPI; oben: eigene, unten: Struktur von (Burgering, Orbons et al. 1997).

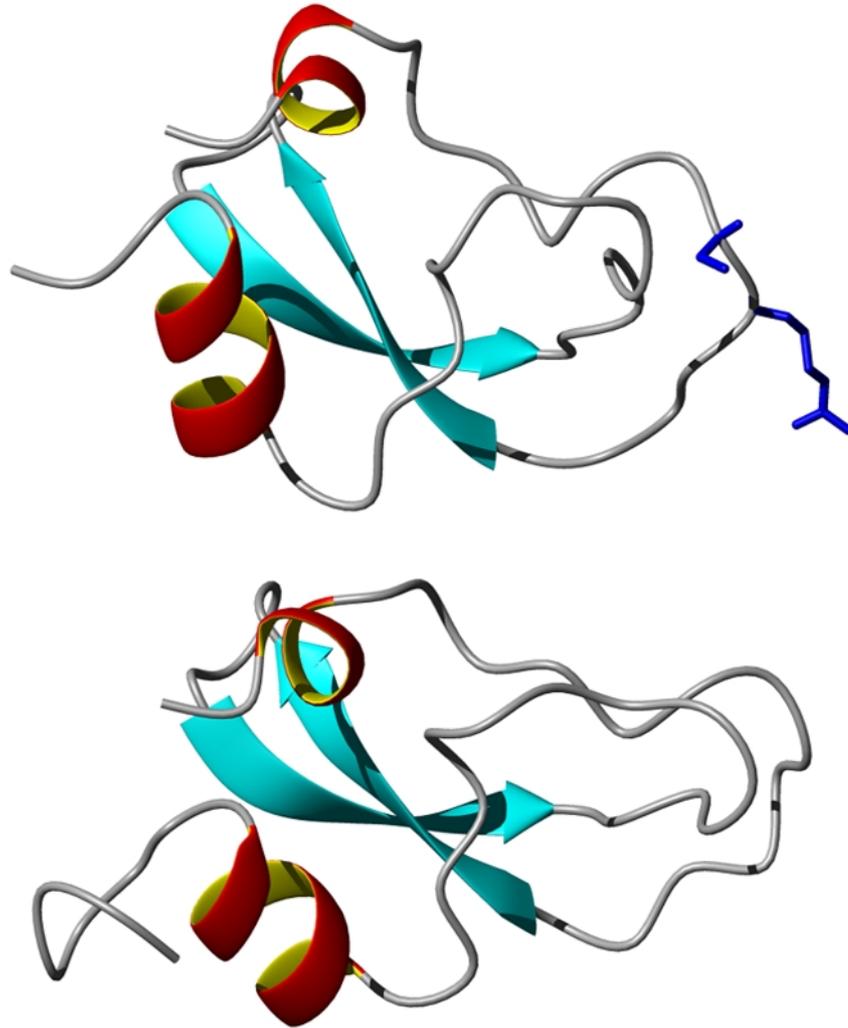


Abbildung 63: Vergleich der beiden Strukturen der zweiten Domäne des TFPI; oben: eigene, unten: Struktur von (Burgering, Orbons et al. 1997). Wie Abbildung 62, um 180° gedreht.

6.4.4 Vergleich mit anderen Kunitz-Inhibitoren

TFPI-2 ist ein typischer Vertreter der Kunitz-Inhibitoren. Im Vergleich zu den Strukturen von:

- Kunitz-Inhibitor aus der Seeanemone *Stichodactyla helianthus*
- und BPTI

zeigen sich von Seiten der Sekundärstrukturelemente kaum Unterschiede.

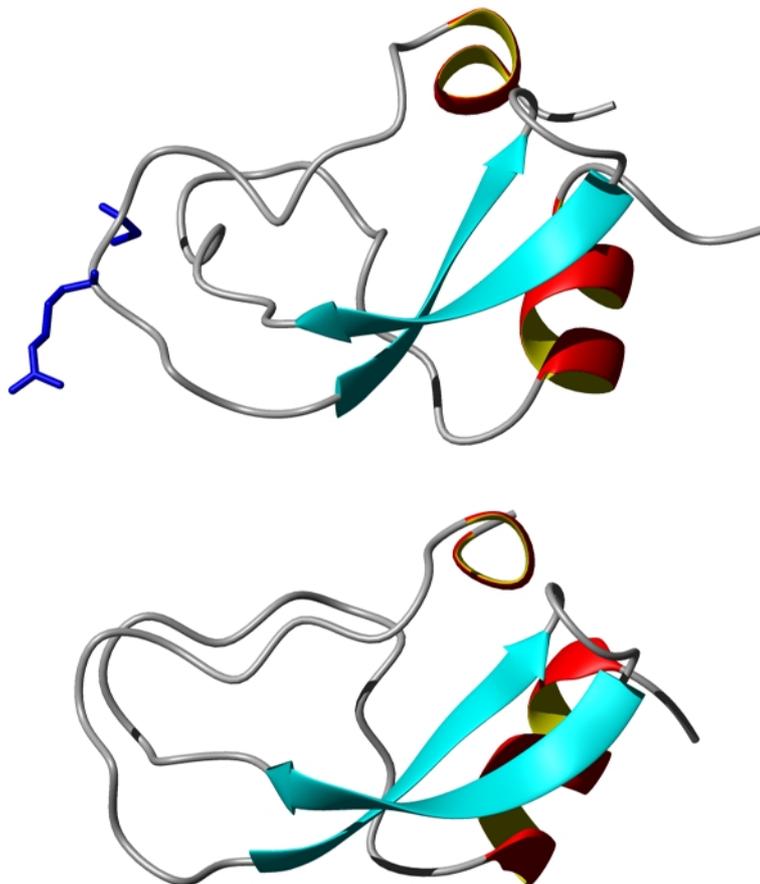


Abbildung 64: Vergleich der Strukturen von TFPI-2 (oben) und dem Inhibitor aus der Seeanemone Stichodactyla helianthus.

Von dem Inhibitor der Seeanemone wurde eine hervorragende NMR-Struktur von W. Antuch aus der Arbeitsgruppe Prof. Wüthrich (ETH Zürich) publiziert. Das Protein besitzt 55 Aminosäuren und die Struktur (1shp) weist die typischen Merkmale von Kunitz-Inhibitoren auf. Wie auch in dieser Arbeit ist der Bereich um die Reste

10-14 (*reactive site*), 33-39 (über die Disulfidbrücke mit der *reactive site* verbunden) und der C-terminale Bereich schlechter definiert, d. h. die Anzahl an strukturrelevanten NOEs war klein. Der wichtigste strukturelle Unterschied ist die ausgeprägtere C-terminale Helix.

BPTI ist der Prototyp der Kunitz-Inhibitoren und eines der mit NMR bestuntersuch-

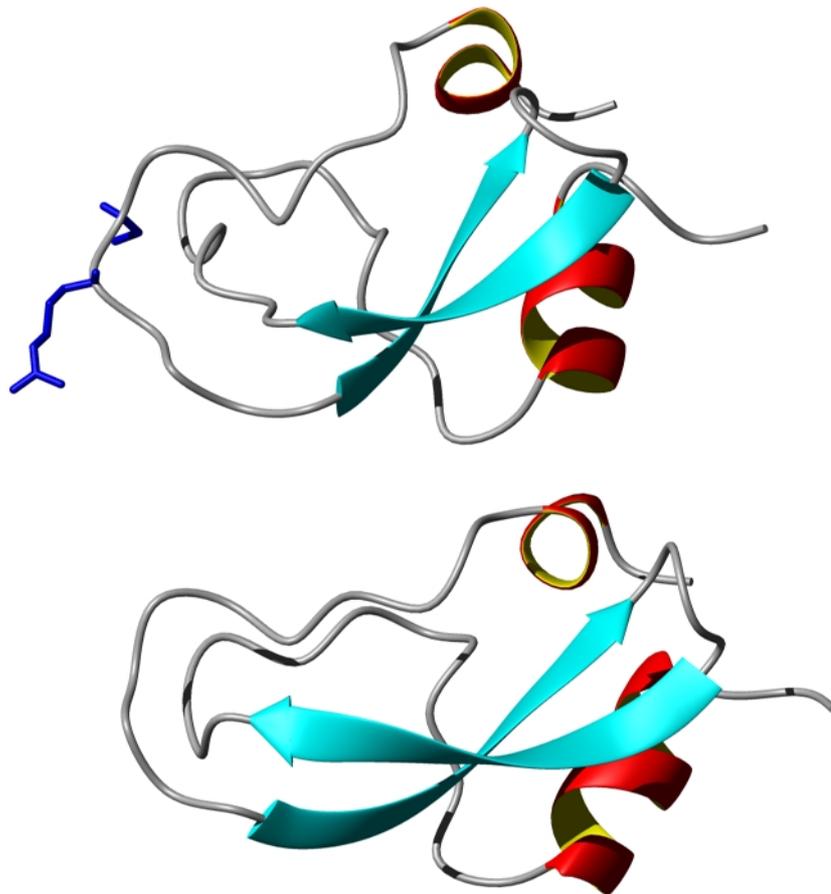


Abbildung 65: Vergleich der Strukturen von TFPI-2 (oben) und BPTI (5pti).

testen Proteine. Im Vergleich mit der zweiten Domäne des TFPI zeigten sich kaum Unterschiede. Das Faltblatt ist im BPTI ausgeprägter als bei TFPI-2 und der Winkel, in dem die N-terminale Helix zu dem Rest des Moleküls steht, ist unterschiedlich. Es kann darauf zurückzuführen sein, daß die sich an die Helix anschließenden Aminosäuren 8 und 9 im BPTI Proline sind, im TFPI dagegen Glutaminsäuren.

Als Prototyp der Klasse bietet BPTI sich für einen einfachen Vergleich an, mit dem eine strukturelle Ähnlichkeit zu TFPI-2 festgestellt werden kann. Dabei wird ein

Kontakt-Plot angefertigt, bei dem aufgetragen wird, welche Aminosäure sich in Nachbarschaft zu welcher anderen befindet.

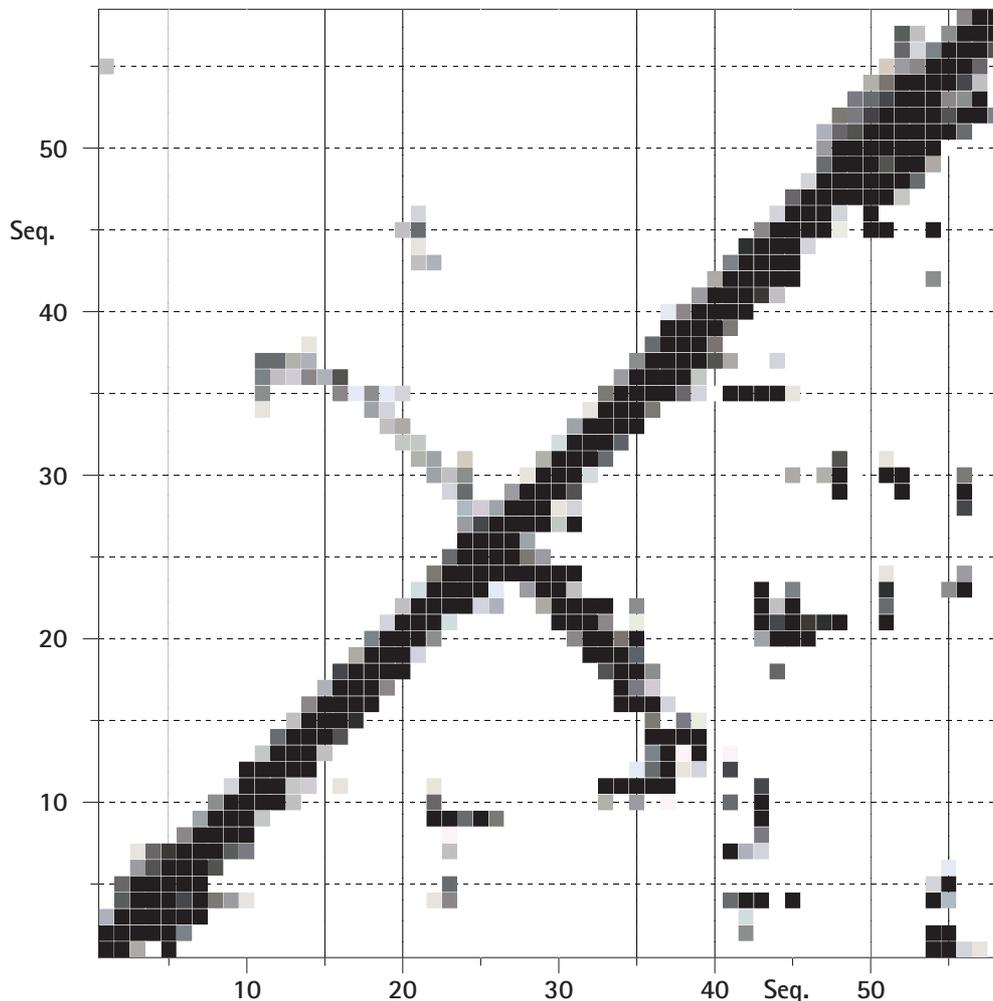


Abbildung 66: Kontakt-Plot von TFPI-2. Oberhalb der Diagonale: Backbone-Atome, unterhalb: alle Atome; schwarz: 3 Å, hellgrau: 5 Å Abstand.

Anhand der Kontakt-Plots läßt sich gut erkennen, wo ein α -helikaler Bereich auftritt, da an diesen Stellen im Molekül die Diagonale eine deutliche Verbreiterung aufweist. Dies ist in den beiden Inhibitoren zu Beginn am Ende der Sequenz zu beobachten. Wie erwähnt, stehen die beiden Helices in den beiden Proteinen nicht im gleichen Winkel zueinander, so daß die Kontakte zwischen den ersten und den letzten Aminosäuren leicht unterschiedlich sind. Wie erwähnt, ergab eine Überprüfung der zugeordneten NOEs in diesem Bereich keine Unstimmigkeiten.

Die β -Faltblattstrukturen stimmen in beiden Strukturen qualitativ überein, sie sind in den Plots gut als rechtwinklig zu den Diagonalen laufende Kontakte zu erken-

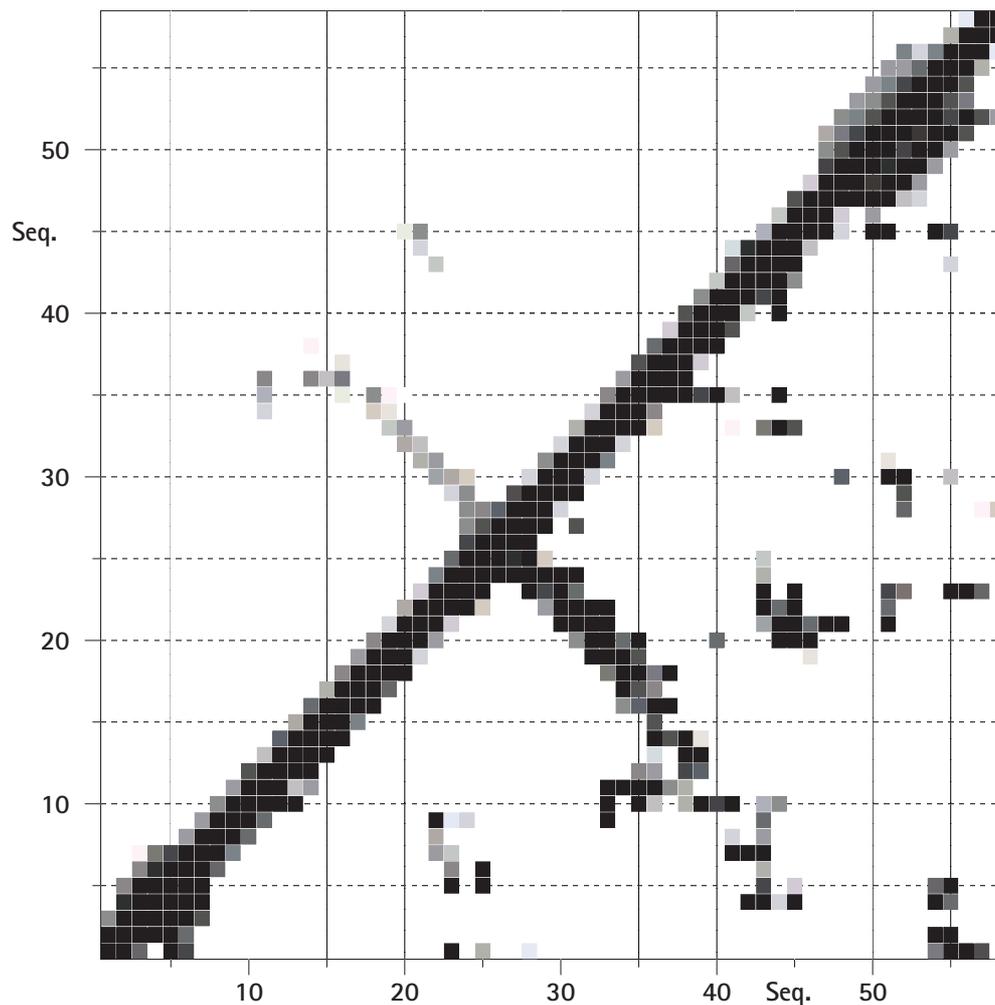


Abbildung 67: Kontakt-Plot von BPTI. Oberhalb der Diagonale: Backbone-Atome, unterhalb: alle Atome; schwarz: 3 Å, hellgrau: 5 Å Abstand.

nen. In beiden Inhibitoren sind die Kontakte ähnlich weitgehend, sie beginnen ca. bei Aminosäure 15 und enden erst bei Aminosäure 36.

In beiden Fällen ist auch das in einigen Publikationen als dritter Strang des zentralen Faltblatts bezeichnete Region zwischen etwa Aminosäuren 43 und 46 zu erkennen, daß antiparallel zum ersten Strang des Faltblatts in Höhe der Aminosäuren 21 bis 23 zu liegen kommt.

Die Kontakte zwischen den Aminosäuren 12 bis 14 mit den Aminosäuren 36 bis etwa 40 rühren von der Disulfidbrücke zwischen Cys-14 und Cys-38 her. Sie sind daher auch unterhalb der Diagonalen im Plot – Kontakte zwischen allen Atomen der Reste – deutlich ausgeprägter als oberhalb. In den Plots sind auch die anderen beiden Disulfidbrücken zwischen Cys-5 und Cys-55 und zwischen Cys-30 und Cys-51 erkennbar.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von kleinen, nicht-isotopenmarkierten Proteinen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Ziel ist die Aufklärung der Struktur und der biologisch relevanten Wechselwirkung mit anderen Molekülen. Konkret wird die strukturelle Aufklärung der zweiten Kunitz-Domäne des *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI), TFPI-2 beschrieben. Dieses Molekül spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung (Kapitel 2.2) in Säugetieren, in dem es bei kleinsten Verletzungen die Gerinnung unterbindet und so die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen des betroffenen Bezirks aufrecht erhält (Kapitel 2.3). Die untersuchte zweite Domäne des TFPI lagert sich direkt und spezifisch an ein zentrales Molekül der Gerinnungskaskade, den Faktor Xa, an. Neben dieser biologischen Funktion trägt die Entdeckung des TFPI dazu bei, die strikte Trennung der Gerinnung in zwei voneinander unabhängige Reaktionswege bis zur Bildung des Fibrinpolymers aufzuheben.

Zur Bestimmung der Struktur des unmarkierten Proteins wurden NMR-Spektren aufgenommen. Neben den im Kapitel 3 beschriebenen Standardexperimenten wurden im Rahmen der Untersuchungen das TACS-Experiment in neuer Art und Weise genutzt (Kapitel 4.2), da die Probe eine ungünstige Relaxationseigenschaft aufwies. Mit den entwickelten Experimenten ist ein neuer Ansatz zur Bestimmung von Kopplungskonstanten in nicht-markierten Molekülen nun auch in solchen Proben möglich, da die Güte der abgelesenen Konstanten nicht mehr von der Signalbreite beeinflusst wird.

Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde ein neues Experiment zur Bestimmung von $^3J(\text{HN-H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten entwickelt. Das SIAM-TACSY (Kapitel 4.3), ermöglicht die Bestimmung der Kopplungskonstanten nach der DISCO-Methode, für die bislang die Aufnahme von wenigstens zwei Spektren mit unterschiedlichen Methoden nötig war, mit nur einem einzigen Spektrum.

Beide Methoden, SIAM-TACSY als auch die in dieser Arbeit näher beschriebene Methode, umgehen die Notwendigkeit der Aufnahme verschiedener Spektren mit unterschiedlichen Pulssequenzen und Aufnahmebedingungen. Während SIAM-TACSY mit nur einem Experiment auskommt, dessen Daten durch unterschiedliches *Post-Processing* alle Kopplungskonstanten liefern, müssen mit der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Methode mehrere Spektren desselben Typs aufgenommen werden.

Im Verlauf der Arbeit wurden die Resonanzen von 52 von 58 Aminosäuren eindeutig und vollständig zugeordnet (Kapitel 3.4). Die Spektren liefern die für die Strukturrechnungen notwendigen Parameter (Kapitel 5). Die berechnete Struktur basiert auf 762 Distanz-*Restraints*, 20 Dihedral-Winkel des Protein-Rückgrats und 15 Wasserstoffbrückenbindungen.

Diese Parameter wurden zunächst in *Distance-Geometry*-Berechnungen (Kapitel 6.2) eingesetzt. Zur Verfeinerung der Struktur wurde in den späteren Rechnungen das *Simulated-Annealing*-Verfahren (Kapitel 6.1) genutzt. In einem iterativen Verfahren werden die gewonnenen Strukturen – es wurden immer 100 Strukturen gleichzeitig aus einem Parametersatz berechnet – analysiert und die korrigierten und überprüften Parameter wieder in die Berechnungen eingesetzt (Kapitel 6.3). Die Struktur der zweiten Domäne des *Tissue Factor Pathway Inhibitor* ist durch dieses Verfahren sehr gut definiert, was sich in den Werten der Standardabweichung für die 10 besten Strukturen für den Backbone (1,4 Å) niederschlägt (Kapitel 6.4).

Die so bestimmte Struktur beweist die Annahme, daß es sich bei der zweiten Domäne des TFPI auch *strukturell* um einen typischen Kunitz-Inhibitor (Kapitel 2.1) handelt, was durch punktuelle Mutationen im Bereich der *reactive site* bereits *funktionell* bewiesen war. Die Stabilität der Protease-Inhibitoren gegenüber Verdau und Entfaltung begründet sich in der kompakten Struktur, die durch 3 Disulfidbrücken stabilisiert wird. Die sechs stets¹ gleichweit voneinander in der Sequenz entfernten Cysteine verbinden N- und C-Terminus (Cys-5 – Cys-55 in der BPTI-Numerierung), stabilisieren die *reactive site* (Cys-14 – Cys-38) und binden das

¹. Es sei auf das Beispiel des rTAP hingewiesen, dessen Funktionsweise noch nicht geklärt werden konnte.

zentrale Faltblatt an den Rest des Moleküls. Die für Kunitz-Inhibitoren typische Struktur ist im untersuchten Protein bewahrt; weniger gut definiert ist die in einigen Inhibitoren dieses Typs zu findenden *N*-terminale α -Helix, sie ist in den Strukturen des TFPI-2 lediglich angedeutet.

Ein Vergleich der Struktur des TFPI-2, so wie es in dieser Arbeit untersucht wurde, und der Struktur eines Homologen findet in Kapitel 6.4.3 statt.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die strukturelle Untersuchung des kleinen, unmarkierten Proteins erfolgreich durchgeführt werden kann. Die Struktur des pharmakologisch interessanten Moleküls sollte ein Hilfsmittel bei der Auffindung von neuen, den körpereigenen ähnlichen und damit besser verträglichen Gerinnungsinhibitoren sein. Die neuen NMR-Methoden bieten ein innovatives Werkzeug zur Gewinnung von skalaren Kopplungskonstanten mit hoher Effizienz und unter Umgehung der Probleme, die in COSY-Spektren mit hohen Linienbreiten auftreten.

8 Experimentelles

In diesem Kapitel werden die Wege zu den in den vorangehenden Kapiteln gezeigten Ergebnisse beschrieben.

8.1 Die Probe der zweiten Domäne des TFPI

Die Substanz wurde von der Arbeitsgruppe von Ole Sørensen, damals Novo Nordisk, heute Carlsberg Institutes, zur Verfügung gestellt.

8.1.1 Gentechnische Expression

Die Arbeiten zur Gewinnung eines Klonierungsvektors für TFPI-2 wurden in den Laboratorien von Novo Nordisk durchgeführt.

Das Gen der zweiten Domäne des TFPI wurde durch PCR vervielfältigt (Pedersen, Nordfang et al. 1990). Das TFPI-2 Gen wurde *in-frame* mit Hilfe von *overlay extension* PCR (Horton, Hunt et al. 1989) an eine hybride Leader-Sequenz angebracht (Thim, Norris et al. 1993).

Der Expressionsvektor pKFN-1605 beinhaltet das *leader-TFPI-2* Gen zwischen dem Promotor und Terminator der *Triosephosphat-Isomerase* der Hefe *S. cerevisiae*. Zusätzlich befindet sich im Vektor noch modifiziertes Pombe-TPI-Gen (POT) aus *Schizosaccharomyces*, durch das auf Wachstum auf Glucose selektiert wurde.

Für die Aufreinigung wurde der Überstand der Hefekultur (Linie KFN-1593) auf einer S-Sepharose *Fast Flow*-Säule aufkonzentriert und dann auf einer Mono-S-Säule eluiert. Eine *reverse phase*-HPLC zur endgültigen Aufreinigung schloß sich

an.

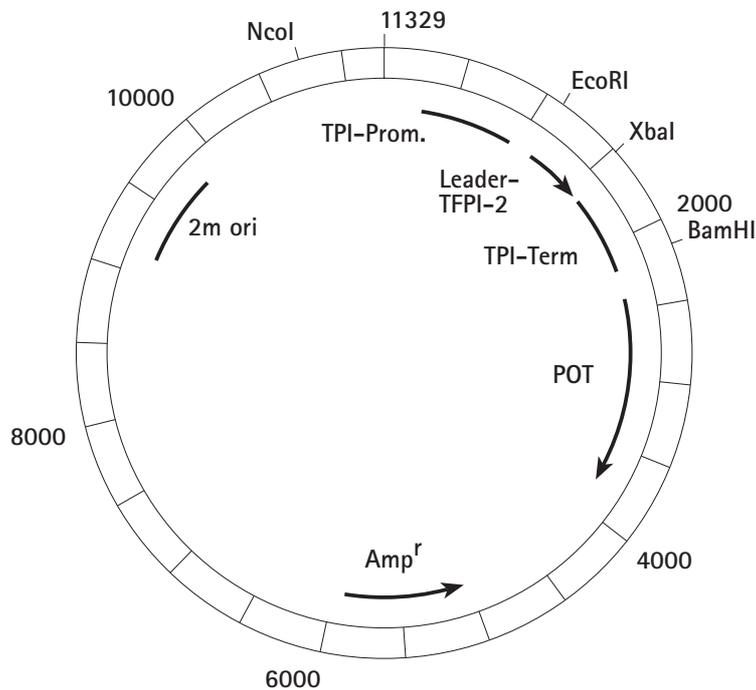


Abbildung 68: Expressionsvektor *pKFN-1605*.

Die beiden gegenüber Trypsin aktiven Komponenten, die durch diese Aufreinigung gewonnen wurde, waren TFPI-2 und das an Asn-25 glykosylierte TFPI-2. In dieser Arbeit wurde nur die unglykosylierte Version verwendet.

8.1.2 NMR-Proben

Die erste Probe, die Verwendung fand, wurde bereits während der Diplomarbeit (Gröschke 1992) verwendet. Bei einem eingestellten pH-Wert von 3,5 lag die Konzentration anfänglich bei etwa 5 mM, die Güte der Probe sank mit der Zeit kontinuierlich ab und sie war zu Beginn der Dissertation nicht mehr uneingeschränkt brauchbar.

Im Verlauf der Arbeiten wurde der Arbeitsgruppe dankenswerterweise weiteres lyophilisiertes Material von Novo Nordisk zur Verfügung gestellt.

Aus diesem Material wurden zwei Proben angesetzt, eine in H₂O, eine in D₂O. Rein rechnerisch lag die Konzentration bei etwa 6 mM; jedoch zeigte sich bei einem Vergleich mit einer 5 mM Probe des Proteins Rhodniin im 1D-Experiment, das die Rhodniin-Probe deutlich stärkere Signale (etwa Faktor 1,3) zeigte. Es muß also von einem recht hohen Salzgehalt ausgegangen werden, was eine *genaue* Konzentrationsangabe schwierig macht.

Probe	Lösungsmittel	Konzentration	pH-Wert
1	H ₂ O/D ₂ O (9:1)	~5 mM	3,3
2	H ₂ O/D ₂ O (9:1)	~6 mM	3,5
3	D ₂ O	~6 mM	pD: ~3.5

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Proben.

Für die D₂O-Probe wurden etwa 25 mg lyophilisiertes TFPI-2 vier Mal in D₂O aufgenommen. Um die Substanz in Lösung zu bringen, wurde mit DCl auf einen pH-Wert von etwa 3,5 bis 4 eingestellt. Die Proben wurden entweder übernacht oder während eines Tages bei Raumtemperatur liegengelassen. Während des letzten Zyklus wurde die Probe bei etwa 40°C im Wasserbad für etwa 5 Stunden gelagert. Es wurde vorsichtig einrotiert und der pD-Wert jeweils gemessen. Bevor die Probe lyophilisiert worden ist, wurde mit NaOD ein pD-Wert von etwa 6,5 eingestellt.

Für die H₂O-Probe wurden etwa 27 mg Substanz in H₂O (bidest) gebracht. Um die Substanz in Lösung zu bringen, wurde mit 0,5 M HCl ein pH-Wert von etwa 3 bis 4 eingestellt.

Die neue H₂O-Probe wurde durch die Zugabe von kleinsten Mengen 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH, die D₂O-Probe durch Zugabe von DCl und NaOD, auf die angegebenen pH- beziehungsweise pD-Werte eingestellt.

Diese Proben waren stabil und wurden stets bei etwa 8°C (Kühlraum) gelagert. Die Untersuchungen zum SIAM-TACSY zeigten, daß die H₂O-Probe eine für die Messungen unzureichende Konzentration hatte. Zu dem abzuhelpen, wurden die D₂O und H₂O-Proben vereinigt und auf etwa das halbe Volumen eingengt. Leider war diese vereinigte Probe nicht mehr stabil und zeigte Ausfällungen. Das Präzipitat ließ sich nicht wieder in Lösung bringen. Eine Abtrennung des Überstandes und das Überführen in ein neues NMR-Röhrchen brachte keinen positiven Effekt, ebensowenig wie eine Variation des pH-Wertes auf bis zu pH 5.

Neben normalen NMR-Röhrchen (5 mm Durchmesser) fanden auch Probenröhrchen der Firma SHIGEMI Verwendung, die eine Messung mit geringen Volumina, typischerweise 200 bis 250 µl, ermöglichen.

8.2 NMR Spektren

8.2.1 Aufnahme: Geräte und Programme

Alle Spektren wurden auf Spektrometern der Firma BRUKER, Rheinstetten, aufgenommen. Dabei wurden sowohl die Geräte der Chemischen Institute, als auch – so verfügbar – 400 und 600 MHz-Spektrometer sowie das damals erste 750 MHz-Spektrometer bei der Firma BRUKER genutzt. Wurden die ersten Spektren auf AMX Geräten aufgenommen, so standen ab Herbst 1994 Geräte mit DMX-Ausstattung zur Verfügung.

Im Rahmen der *Large Scale Facility* der Europäischen Gemeinschaft wurde ein 800 MHz-Spektrometer installiert und stand dann ebenfalls zur Verfügung.

Die Prozessierung wurde mit den Programmen UXNMR (BRUKER) auf den AMX-Geräten und XWINNMR (BRUKER) auf den DMX-Spektrometern und als *stand alone*-Programme auf den Rechnern der Arbeitsgruppe verwendet.

8.2.2 Programme zur Auswertung

Die Auswertung der Spektren und die Zuordnung wurde auf den SILICON GRAPHICS Computern des Arbeitskreises vorgenommen.

Es fanden folgende Programme im Laufe der Arbeit Verwendung:

1. PRONTO von Dr. Mogens Kjær (Carlsberg Institutes). Dieses Programm lag zu Beginn der Dissertation als Betaversion vor, einige Updates folgten. Das Programm war instabil und der Aufruf einer Vielzahl von versprochenen Optionen funktionierte nicht. Ab einer gewissen Tiefe der Menüs wurden Fehler- und selbst die Warnhinweise dänisch.
2. NDEE von Dr. Franz Herrmann aus der Arbeitsgruppe Prof. Rösch in Bayreuth. Dieses Programm wies eine sehr gute Leistung bei Darstellung und Aufbereitung auf. Einige Probleme, die den Einstieg erschwerten – das Programm war kurz vor der Fertigstellung, die Arbeitsgruppe hat inzwischen Lizenzen gekauft – sind jetzt behoben.
3. AURELIA von Dr. Peter Neidig (BRUKER). Dieses Programm bietet exzellente Optionen zur Nachbereitung der Daten, ist aber nicht für die gesamte Auswertung von Proteinspektren ausgelegt.

Im Endeffekt wurde auf das bereits seit Jahren in der Gruppe verwendete Programm FELIX (Versionen 2.1, 2.3 (HARE RESEARCH & BIOSYM) und 95 und 97.2, jetzt bei MOLECULAR SIMULATIONS INC.) zurückgegriffen. Inzwischen ist in das Programmpaket eine Datenbank eingearbeitet, die die Auswertung von Spektren von Biomakromolekülen in Hinblick auf eine Strukturaufklärung deutlich erleichtert.

8.2.3 Programme für die Strukturrechnungen

Für die ersten Strukturen wurde INSIGHTII (BIOSYM) in der Version 2.3 benutzt. Eingebettet in INSIGHTII ist ein *Distance Geometry*-Modul.

Durch die enge Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Michael Nilges am *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) wurde das Programm XPLOR die Plattform der Wahl für Strukturrechnungen. XPLOR verwendet im Kern *Simulated Annealing*.

Der Vergleich der Strukturen, eine Beurteilung der verletzten *Restraints* und eine Möglichkeit zur Darstellung boten die Programme INSIGHTII und MOLMOL von Reto Konradi (ehemals Arbeitsgruppe Prof. Wüthrich, ETH Zürich, jetzt TRIPOS).

Gerade die Darstellung verletzter *Restraints* in mehreren Strukturen und die durch eine – manchmal etwas umständliche – Makrosprache mögliche Vielzahl an Gestaltungsmöglichkeiten zeichnen letzteres Programm aus.

8.2.4 Meßbedingungen

Alle relevanten Spektren wurden bei 310 oder 313 K aufgenommen. Der wiederholt durchgeführte Versuch, die Temperaturen deutlich nach unten zu ändern, etwa 298 K, brachten – wie bereits während der Diplomarbeit beobachtet (Gröschke 1992) – keinen Erfolg.

Ein Satz Experimente wurde bei 323 K aufgenommen, nachdem in 1D-Experimenten bei steigenden Temperaturen gezeigt werden konnte, daß die Probe diese Temperaturen ohne Beeinträchtigungen aushält. Die Inhibitoren vom Kunitz-Typ sind thermisch außerordentlich stabil, die Experimente an BPTI fanden bei 68°C (341 K) statt (Dubs, Wagner et al. 1979; Wüthrich and Wagner 1979).

Die Kalibrierung der Spektren fand nach der Substitutionsmethode wie in (Markert 1994) beschrieben statt. Danach ist bei einer Eichung auf Natrium-3-(trimethylsilyl)-propionat in wässriger Lösung die Verschiebung in *parts per million* (ppm) gegeben durch:

$$\delta_{(H_2O)} = -0,01102 \cdot \text{Temperatur [K]} + 8,092 \quad (65)$$

Die verwendete Experimente und Wasserunterdrückungssequenzen sind in “Grundbausteine der Experimente” auf Seite 45 beschrieben. Bei Nutzung der Vorsättigung lag die Stärke des Sättigungspulses zwischen 55 und 58 dB am AMX 600 und konnte bis in Bereiche von etwa 70 dB am DMX 600 gesenkt werden, was der Intensität der Signale nahe dem Wassersignal zugute kam.

Alle Experimente wurden phasensensitiv aufgenommen und prozessiert. Verwendung fanden dabei die Methoden TPPI (Marion and Wüthrich 1983), RSH (States, Haberkorn et al. 1982) und States-TPPI (Marion, Ikura et al. 1989).

In allen Experimenten wurde eine Axialpeak-Unterdrückung durch die Verwendung eines Phasenzklus 0° , 180° auf einen 90° -Puls innerhalb der Pulssequenz vorgenommen. Zu den Phasenzyklen und der Axialpeak-Unterdrückung siehe (Croasmun and Carlson 1994).

Fast ausnahmslos wurden die 2D-Spektren mit 1024×2048 Datenpunkten aufgenommen, die für die quantitative Auswertung des Signalvolumens verwendeten Spektren wurden mit 1024×4096 Punkten aufgenommen.

Die Spektrenbreite (*Sweep Width*) betrug stets etwa 12 ppm, also etwa 7200 Hz auf einem 600 MHz-Spektrometer und etwa 9600 kHz auf dem 800 MHz-Spektrometer. Diese Breite war bei den beobachteten Signalen im Bereich von $-0,25$ bis 10.4 ppm erforderlich.

8.2.5 Prozessierung

Zur Prozessierung wurden stets alle Punkte verwendet, ein *Zerofilling* fand nicht statt.

Apodisiert wurde mit einer um $\pi/2$ verschobenen quadratischen Sinusfunktion (Parameter $q_{\sin 2}$ in den Programmen UXNMR und XWINNMR). Der Versuch, mit anderen Apodisierungsfunktionen (Lorentz-Gauß und Gauß (Croasmun and Carlson 1994)) zu arbeiten, führte bei den aufgenommenen Spektren nicht zu signifikanten Verbesserungen: Die Erhöhung der Signalschärfe wurde mit einem Verlust an Intensität erkaufte und umgekehrt.

Zur Basislinienkorrektur wurde in Ω_1 jeweils rechts und links des Wassersignals und in Ω_2 über die gesamte spektrale Breite die Basislinie auf ein Polynom 5. Grades gefittet.

8.2.6 Bedingungen der TACSY-Spektren

Für die HNHA-TACSY-Spektren war es erforderlich, die Trägerfrequenz auf die Mitte zwischen den $H\alpha$ und den HN-Protonenverschiebungen zu setzen. Dieser Punkt liegt beim TPPI etwa 1,5 ppm hochfeld vom Wassersignal, also bei etwa 6,2 ppm. Jeder Durchlauf der Sequenz erforderte eine Zeit von 23,637 mal die Dauer eines harten 90° -Pulses ($8,5 \mu\text{s}$). Daraus ergaben sich die Zeiten von 6 ms (Loop = 3) bis 110 ms (Loop = 54) als Mischzeit.

Die Temperatur lag bei 310 K in allen Fällen. Wie bei den anderen Spektren wurden 1024 Inkremente in ω_1 und 2048 Punkte in ω_2 gewählt.

8.2.7 Die Ergebnisse der TACSY-Spektrenreihe

Die Spektren wurden wie beschrieben auf der X32-Workstation prozessiert. Dabei wurden alle Spektren mit denselben Parametern prozessiert, eine Optimierung einzelner Spektren fand nicht statt.

Im Spektrum, das mit 76 ms Mischzeit aufgenommen wurde, wurde nun eine *region of interest* (ROI) erstellt. Es wurden alle eindeutig zuordbaren HN-H α -Kreuzsignale markiert. Die Datei mit den Integrationsgrenzen wurde gesichert und danach auf alle Spektren angewendet. So wurde gewährleistet, daß bei der Integration keine Fehler aufgrund wechselnder Integrationsgrenzen auftreten konnten. Die Integrale wurden pro Spektrum in eine Datei (`int2d` im Spektrenverzeichnis) geschrieben. Aus diesen Dateien wurden die entsprechenden Zeilen mit den integrierten Werten mit einem einfachen `grep` (*get regular expression*) ausgelesen.

Die entstandenen Dateien hatten folgendes Aussehen:

```
10/pdata/1/int2d: 7 512 446 455 1.49777 1.27285 4.9373 a
4/pdata/1/int2d: 7 512 446 455 1.49777 1.27285 6.3574 a
5/pdata/1/int2d: 7 512 446 455 1.49777 1.27285 11.217 a
6/pdata/1/int2d: 7 512 446 455 1.49777 1.27285 13.016 a
7/pdata/1/int2d: 7 512 446 455 1.49777 1.27285 13.781 a
8/pdata/1/int2d: 7 512 446 455 1.49777 1.27285 11.098 a
9/pdata/1/int2d: 7 512 446 455 1.49777 1.27285 7.5924 a
```

Abbildung 69: Mit `grep` ausgelesene Integralwerte; nach dem Dateinamen: Signalnummer, vorletzte Spalte: Integralwert.

Wie beschrieben, wurden zwei Sätze von Spektren aufgenommen, einer mit kurzen und einer mit längeren Mischzeiten. Dabei wurde darauf geachtet, daß es eine Überlappung von Mischzeiten gibt, die ein Anpassen der Daten ermöglicht. Dabei wurde angenommen, daß

- die Probe in der Zwischenzeit (~1 Woche) sich nicht verändert hat,
- die Experimente identische Signale liefern und
- es lediglich aufgrund der unterschiedlichen (zum Teil automatischen) Parametrisierung während der Aufnahme zu absoluten, jedoch nicht relativen Intensitätsänderungen der Signale kommt.

Die Annahmen haben sich schließlich bestätigt, alternativ hätte eine komplette Reihe aufgenommen werden müssen, was etwa bei der gewünschten Genauigkeit eine reine Meßzeit von etwa 2 Tagen erfordert hätte.

Mit dem PERL-Skript `tacsyintegrale.perl` wurden dann aus den Auszügen der der Integrationstabellen pro Signal eine Tabelle mit Mischzeit (in ms) und dazugehörigem Integralwert generiert:

6,12	1,0891	110,16	10,563
12,24	2,4996	30,6	17,42
20,40	5,6438	40,8	23,68
30,60	10,58	51,0	29,293
40,80	14,578	61,2	31,728
		77,52	27,014
		93,84	18,811

Abbildung 70: Beispiele für die beiden Integrallisten; erste Spalte: Mischzeiten in Millisekunden, zweite Spalte: Integralwerte.

Die beiden Dateien zu einem Signal wurden mit dem PERL-Skript `tacsymerge` kombiniert. Dazu wurde das Integral bei der längsten Mischzeit des ersten Spektrensatzes (40,8 ms) als Referenzwert genommen und durch den Integralwert der entsprechenden Mischzeit der zweiten Spektrenreihe geteilt. Der entstehende Faktor wurde dann genutzt, um alle folgenden Werte zu skalieren.

Die entstandenen Tabellen hatten nun folgendes Aussehen (für Cys-14):

0,00612	1,0891
0,01224	2,4996
0,02040	5,6438
0,03060	10,58
0,04080	14,578
0,05100	18,033503125
0,06120	19,53255
0,07752	16,63049375
0,09384	11,580521875
0,11016	6,502846875

Abbildung 71: Kombinierte Liste, die Werte der höheren Mischzeiten sind skaliert. Mischzeit in Sekunden.

Die entstandenen Tabellen mit Mischzeit und Integral wurden nun in das Programm KALEIDAGRAPH eingeladen, das eine *Fitting*-Routine bereitstellt.

8.2.7.1 Graphen der gefitteten Funktionen

Es wurden für diesen Ansatz alle eindeutig zuordbaren und ausreichend isolierten Signale verwendet. Bei der Auswahl wurde auf eine ausreichende Isolierung geachtet; es sollte eine Verfälschung durch benachbarte Signale vermieden werden.

Die zunächst verwendete Funktion lautete:

$$\text{Intensität}(\tau_m) = \text{Amplitude} \cdot \sin^2(2\pi J_{12} \cdot \tau_m) \quad (66)$$

Die Werte, die das Maß der Güte beschreiben sollen, waren nicht ausreichend; die Übereinstimmung unzureichend. Als Resultat wurde eine Relaxationszeit eingeführt:

$$\text{Intensität}(\tau_m) = \text{Amplitude} \cdot \sin^2(2\pi J_{12} \cdot \tau_m) \cdot \exp\left(\frac{\tau_m}{T_2}\right) \quad (67)$$

Es wurde in einem ersten Ansatz mit einer variablen T_2 -Zeit experimentiert, allerdings führte das nicht in allen Fällen zum Erfolg, es gab einige Ausreißer, die an den gesamten Ergebnissen zweifeln ließen.

Die Probleme bei der Kalkulation der Kopplung mit variabler T_2 -Zeit sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die geringe Anzahl von Datenpunkten zurückzuführen. Bei 10 Wertepaaren drei Parameter korrekt zu berechnen, ist bei einigen Datensätzen offensichtlich nicht sauber möglich.

Mit einer fest definierten T_2 -Zeit von 50 ms ergab sich ein besseres Bild; offensichtlich hat die *Fitting*-Routine des Programmes ihre Probleme bei diesem Verhältnis von offenen Parametern zu Datenpunkten.

Die Eingabe der anzupassenden Funktion im Syntax von KALEIDAGRAPH gestaltet sich wie folgt:

$$m1*\sin(\pi*m0*m2)*\sin(\pi*m0*m2)*\exp(m0/-0.05);m1=20;m2=15 \quad (68)$$

Der berechnete Faktor $m1$ beschreibt die Amplitude, die für die Kopplung unwichtig ist, $m0$ ist die Laufvariable, also die Mischzeit in Sekunden und $m2$ die Kopplung in Hertz. Der letzte Teil beschreibt den exponentiellen Verfall mit einer angenommenen T_2 -Relaxation von 50 ms. Die durch Semikolon abgetrennten Werte in Gleichung 68 sind beliebige Startwerte.

Die Graphen sind im Anhang zu finden (siehe "Auswertungen mit Kaleidagraph" auf Seite 189).

8.2.7.2 Zweidimensionale Darstellung der Minimumsbestimmung

Die von KALEIDAGRAPH verwendete Routine zur Bestimmung der *Fitting*-Parameter war leider nicht in den Unterlagen zum Programm beschrieben. Um nicht eine „Black Box“ zu nutzen, um die Kopplungsparameter besser zu bestimmen und eine

Aussage über die Präzision zu erlangen, wurde jetzt versucht, ein *Fitting* mit Hilfe eines „*brute force*“-Ansatzes zu erreichen.

Dazu wurde das Programm BRUTE_FORCE entwickelt, dessen Quelltext sich im Anhang (siehe “Kopplungsextraktion (brute_force)” auf Seite 185).

Dabei werden die experimentellen Daten mit theoretischen Werten verglichen. Die theoretischen Parameterbereiche laufen dabei von 1 bis 64 für die angenommene Amplitude der Funktion, die zwar für die Kopplung nicht wichtig ist, jedoch berücksichtigt werden muß, von 3 bis 15,8 Hz für die Kopplung in 0,1 Hz-Schritten und von 5 bis 320 ms für die T_2 -Zeiten.

Alle Parameter werden in geschachtelten Schleifen abgelaufen, die Differenzen zwischen experimentellen und theoretischen Werten werden kalkuliert und die besten Werte werden gespeichert.

Parallel wird die FELIX-Datei geschrieben, die später eingelesen werden und ausgewertet werden kann.

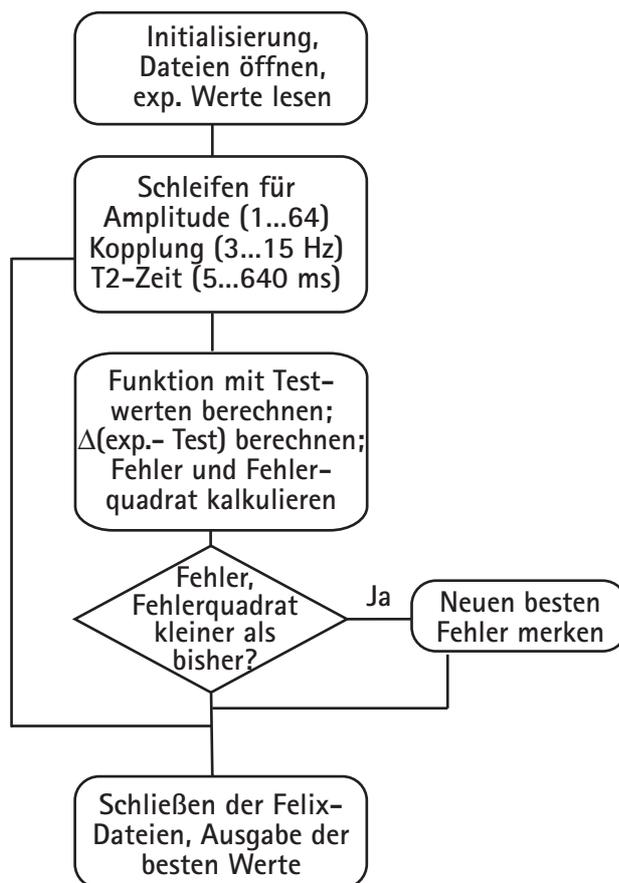


Abbildung 72: Flußdiagramm zum Programm *brute_force*.

Im Flußdiagramm wird die einfache Vorgehensweise transparent: Es werden alle

möglichen Werte berechnet, es erfolgt keine Näherung und keine weitere Optimierung.

Die Graphen sind – immer mit allen Mischzeiten – im Anhang zu finden (siehe “Auswertung mit Felix” auf Seite 189).

Die Werte für die Kopplungen, die mit der zweidimensionalen Methode gewonnen wurden, sind natürlich etwas geringer als die mit KALEIDAGRAPH errechneten – die Festlegung auf eine fixe T_2 -Zeit zeigt immer nur das Minimum bei eben dieser T_2 -Zeit; die KALEIDAGRAPH-Daten entsprechen mithin einer Spur durch die zweidimensionalen Abbildungen.

9 Literatur

Abraham, A. (1961). Principles of Nuclear Magnetism. Oxford, Oxford University Press.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson (1994). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Publishing.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-10.

Alwine, J. C., D. J. Kemp und G. R. Stark (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Procs. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350-54.

Antuch, W., K. D. Berndt, M. A. Chaves, J. Delfin und K. Wüthrich (1993). The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* 212: 675-84.

Antuch, W., P. Güntert, M. Billeter, T. Hawthorne, H. Grossenbacher und K. Wüthrich (1994). NMR solution structure of the recombinant tick anticoagulant protein (rTAP), a factor Xa Inhibitor from the tick *ornithodoros moubata*. *FEBS Lett.* 352: 251-257.

Aue, W. P., E. Bartholdi und R. R. Ernst (1976). *J. Chem. Phys.* 64: 2229.

Bauer, K. A. und R. D. Rosenberg (1987). The Pathophysiology of the Prethrombotic State in Humans: Insights Gained From Studies Using Markers of Hemostatic System Activation. *Blood* 70: 343-50.

Baugh, R. J., G. J. Broze Jr. und S. Krishnaswamy (1998). Regulation of Extrinsic Pathway Factor Xa Formation by Tissue Factor Pathway Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **273**: 4378-86.

Bax, A. und D. G. Davis (1985). MLEV-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**: 355-60.

Bayer, P. (1994). Die Struktur des Transaktivator-Proteins aus dem menschlichen Immunschwäche-Virus in Lösung, Universität Bayreuth.

Berndt, K. D., J. Beunink, W. Schröder und K. Wüthrich (1993). Designed Replacement of an Internal Hydration Water Molecule in BPTI: Structural and Functional Implications of a Glycine-to-Serine Mutation. *Biochemistry* **32**: 4564.

Berndt, K. D., P. Güntert, L. P. M. Orbons und K. Wüthrich (1992). Determination of a High-Quality Nuclear Magnetic Resonance Solution Structure of the Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor and Comparison with Three Crystal Structures. *J. Mol. Biol.* **227**: 757-775.

Bloch, F., W. W. Hansen und M. Packard (1946). *Phys. Rev.* **70**: 474.

Blumenthal, L. M. (1970). Theory and Application of Distance Geometry. Chelsea, New York.

Bode, W. und R. Huber (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**: 433-451.

Bode, W., I. Mayr, U. Baumann, R. Huber, S. R. Stone und J. Hofsteenge (1989). *EMBO J.* **8**: 3467-75.

Bode, W., E. Papamokos und D. Musil (1987). The high-resolution X-ray crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and eglin c, an elastase inhibitor from the leech *Hirudo medicinalis*. Structural analysis, subtilisin structure and interface geometry. *Eur. J. Biochem.* **166**: 673-92.

Bothner-By, A. A., R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren und R. W. Jeanloz (1984). Structure Determination of a Tetrasaccharide Transient Nuclear Overhauser Effects in a Rotating Frame. *J. Am. Chem. Soc.* **106**: 811-13.

Brandstetter, H., A. Kühne, W. Bode, R. Huber, W. von der Saal, K. Wirthensohn und R. A. Engh (1996). X-ray Structure of Active Site-inhibited Clotting Factor Xa. *J. Biol. Chem.* **271**: 29988-29992.

Braunschweiler, L. und R. R. Ernst (1983). Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy. *J. Mag. Reson.* **53**: 521-

528.

Broze Jr., G. B. (1992). The Role of Tissue Factor Pathway Inhibitor in a Revised Coagulation Cascade. *Sem. Hematol.* 29(3): 159-169.

Broze Jr., G. J. (1995). Tissue Factor Pathway Inhibitor and the Revised Theory of Coagulation. *Annu. Rev. Med.* 46: 103-12.

Broze Jr., G. J., T. J. Girard und W. F. Novotny (1991). The Lipoprotein-Associated Coagulation Inhibitor. *Prog. Thromb. Haemost.*: 243-268.

Broze Jr., G. J. und P. W. Majerus (1982). Human Factor VII. *Meth. Enzymol.* 80: 228-237.

Broze Jr., G. J. und J. P. Miletich (1987). Characterization of the Inhibition of Tissue Factor in Serum. *Blood* 69: 150-5.

Broze Jr., G. J. und J. P. Miletich (1987). Isolation of the Tissue Factor Inhibitor Produced by HepG2 Hepatoma Cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 1886.

Broze Jr., G. J., L. A. Warren, W. F. Novotny, D. A. Higuchi, J. J. Girard und J. P. Miletich (1988). The Lipoprotein-Associated Coagulation Inhibitor That Inhibits the Factor VII-Tissue Factor Complex Also Inhibits Factor Xa: Insight Into Its Possible Mechanism of Action. *Blood* 71: 335-43.

Brünger, A. T. (1992). X-PLOR Version 3.1. New Haven/London, Yale University Press.

Burgering, M. J. M., L. P. M. Orbons, A. van der Doelen, J. Mulders, H. J. M. Theunissen, P. D. J. Grootenhuis, W. Bode, R. Huber und M. T. Stubbs (1997). The Second Kunitz Domain of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor: Cloning, Structure Determination and Interaction with Factor Xa. *J. Mol. Biol.* 269: 395-407.

Bystrov, V. F. (1976). *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 10: 41-81.

Camerer, E., A.-B. Kolstø und H. Prydz (1996). Cell Biology of Tissue Factor, the Principal Initiator of Blood Coagulation. *Thromb. Res.* 81: 1-41.

Carlson, S. (1997). Algorithm of the Gods. *Sci. Am.* 276(März): 121-3.

Carson, S. D. (1981). Plasma High Density Lipoproteins Inhibit the Activation of Coagulation Factors X by Factor VII_a and Tissue Factor. *FEBS Lett.* 132: 37-40.

Cavanagh, J., W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III und N. J. Skelton (1996). Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice. San Diego, Academic Press.

Chen, Z. G. und W. Bode (1983). Refined 2.5 Å X-ray crystal structure of the

- complex formed by porcine kallikrein A and the bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **164**: 283-311.
- Clore, G. M. und A. M. Gronenborn (1991). *Science* **252**: 1390.
- Colman, R. W., G. Marder, E. W. Salzman und J. Hirsh (1987). Overview of haemostasis. Philadelphia, J.B. Lippincott Co.
- Colman, R. W., C. F. Scott, M. Schapira, H. L. James und A. B. Cohen (1982). Inactivation of factor XIa by plasma protease inhibitors; predominant role of α 1-protease inhibitor and protective effect of high molecular weight kiniogen. *J. Clin. Invest.* **69**: 844-852.
- Corey, D. R. und C. S. Craik (1992). An Investigation into the Minimum Requirements for Peptide Hydrolysis by Mutation of the Catalytic Triad of Trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 1784-90.
- Crippen, G. M. und T. F. Havel (1988). Distance Geometry and Molecular Conformation. Taunton, Research Studies Press.
- Croasmun, W. R. und R. M. K. Carlson (1994). Two-dimensional NMR spectroscopy: applications for chemists and biochemists. Denton, Texas, VCH Publishers.
- Daggett, V., S. Schröder und P. Kollman (1991). Catalytic Pathway of Serine Proteases: Classical and Quantum Mechanical Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 8926-34.
- Davie, E. A. und O. D. Ratnoff (1964). Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* **145**: 1310-11.
- Derome, A. E. (1992). Modern NMR Techniques for Chemistry Research. Oxford, Pergamon Press.
- Diener, A. (1995). Structure Determination of Proteins with/in Spite of X-Plor, Seminar des Arbeitskreises.
- Diener, A. (1996). Proteinstrukturbestimmung mit XPLOR – TFPI und Rhodniin, Graduiertenkolleg.
- Dubs, A., G. Wagner und K. Wüthrich (1979). Individual Assignments of Amide Proton Resonances in the Proton NMR Spectrum of the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* **577**: 177-194.
- Edgington, T. S., W. Ruf, A. Rehemtulla und N. Mackman (1991). The Molecular Biology of Initiation of Coagulation by Tissue Factor. *Current Studies in Hematology and Blood Transfusion* **58** (Biotechnology of Plasma Proteins): 15-21.

- Emsley, L. und G. Bodenhausen (1992). *J. Magn. Reson.* **97**: 135-48.
- Enjoji, K., T. Miyata, Y. Kamikubo und H. Kato (1995). Effect of Heparin on the Inhibition of Factor Xa by Tissue Factor Pathway Inhibitor: A Segment, Gly212-Phe243, of the Third Kunitz Domain Is a Heparin-Binding Site. *Biochemistry* **34**: 5725-35.
- Ernst, R. R. (1992). Kernresonanz-Fourier-Transformations-Spektroskopie (Nobel-Vortrag). *Angew. Chemie* **104**: 817.
- Ernst, R. R. und W. A. Anderson (1966). *Rev. Sci. Instr.* **37**: 93.
- Ernst, R. R., G. Bodenhausen und A. Wokaun (1991). Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. Oxford, Oxford University Press.
- Fersht, A. R. (1985). Enzyme Structure and Mechanism. New York, W. H. Freeman and Co.
- Forth, W. (1987). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Mannheim Wien Zürich, Bibliographische Institut.
- Girard, T. J., L. A. Warren, W. F. Novotny, K. M. Likert, S. G. Brown, J. P. Miletich und J. G. J. Broze (1989). Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* **338**: 518-20.
- Glaser, S. J. (1993). Coupling Topology Dependence of Polarization-Transfer Efficiency in TOCSY and TACSU Experiments. *J. Magn. Reson. A* **104**: 283.
- Glaser, S. J. und G. P. Drobny (1990). Assessment and Optimization of Pulse Sequences for Homonuclear Isotropic Mixing. *Adv. Magn. Reson.* **14**: 35-58.
- Glaser, S. J. und J. J. Quant (1996). Homonuclear and Heteronuclear Hartmann-Hahn Transfer in Isotropic Liquids. *Adv. Magn. Optic. Reson.* **19**: 59-252.
- Griesinger, C. (1991). Skript zur Vorlesung OC IV. Institut für Organische Chemie. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Griesinger, C., G. Otting, K. Wüthrich und R. R. Ernst (1988). Clean TOCSY for ¹H Spin System Identification in Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 7870-72.
- Griesinger, C., O. W. Sørensen und R. R. Ernst (1987). Novel Three-Dimensional NMR Techniques for Studies of Peptides and Biological Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 7227-8.
- Gröschke, P. (1992). NMR Spektroskopische Untersuchungen an Inhibitoren vom Kunitz Typ. Institut für Organische Chemie. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-

the-Universität.

Grzesiak, A., R. Helland, A. O. Smalås, D. Krowarsch, M. Dadlez und J. Otlewski (2000). Substitutions at the P₁' Position in BPTI Strongly Affect the Association Energy with Serine Proteinases. *J. Mol. Biol.* **301**: 205-217.

Guéron, M. und P. Plateau (1982). Exchangeable Proton NMR without Base-Line Distortion, Using New Strong-Pulse Sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 7310-1.

Guéron, M., P. Plateau, A. Kettani und M. Decorps (1992). Improvements in Solvent-Signal Suppression. *J. Mag. Reson.* **96**: 541-50.

Hansen, J.-B., K. R. Huseby, N.-E. Huseby, M. Ezban und A. Nordøy (1997). Tissue Factor Pathway Inhibitor in Complex with Low Density Lipoprotein Isolated from Human Plasma Does not Possess Anticoagulant Function in Tissue Factor-Induced Coagulation in Vitro. *Thromb. Res.* **5**: 413-425.

Hansen, J.-B., N.-E. Huseby, P. M. Sandset, B. Svensson, V. Lyngmo und A. Nordøy (1994). Tissue factor pathway inhibitor and lipoproteins: evidence for association with and regulation by LDL in human plasma. *Atheroscler. Thromb.* **14**: 223-229.

Hjort, P. F. (1957). Intermediate Reactions in the Coagulation of Blood with Tissue Thromboplastin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **9**(Suppl. 27): 1-182.

Ho, G., J. R. Toomey, G. J. Broze Jr. und A. L. Schwartz (1996). Receptor-mediated Endocytosis of Coagulation Factor Xa Requires Cell Surface-bound Tissue Factor Pathway Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **271**: 9497-502.

Hollister, R. D., W. Kisiel und B. T. Hyman (1996). Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-1 (TFPI-1), a Kunitz proteinase inhibitor, in Alzheimer's Disease. *Brain Res.* **728**: 13-19.

Hore, P. J. (1989). Solvent Suppression. *Meth. Enzymol.* **176**: 64-77.

Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen und L. R. Pease (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61-8.

Husten, E. J., C. T. Esmon und A. E. Johnson (1987). The Active Site of Blood Coagulation Factor Xa. *J. Biol. Chem.* **262**: 12953-61.

Ikeo, K., K. Takahashi und T. Gojobori (1992). Evolutionary Origin of a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor Domain Inserted in the Amyloid b Precursor Protein of Alzheimer's Disease. *J. Mol. Evolution* **34**: 536-543.

IUPAC (1972). IUPAC-UIB-Kommision für biochemische Nomenklatur. *J. Biol.* **156**

Chem. 247: 977-83.

Jackson, C. M. und Y. Nemerson (1980). Blood Coagulation. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 765-811.

James, Sielecki, Brayer, Delbaere und Bauer (1980). *J. Mol. Biol.* 144: 43-88.

Janin, J. und C. Chothia (1990). The structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* 265: 16027-30.

Jeener, J. (1971). . Ampère International Summer School, Basko Polji, Jugoslawien.

Jesty, J. und S. A. Silverberg (1979). Kinetics of the tissue factor-dependent activation of coagulation Factors IX and X in a bovine plasma system. *J. Biol. Chem.* 254: 12337-45.

Jesty, J., T. C. Wun und A. Lorenz (1994). *Biochemistry* 33: 12686-694.

Kadkhodaie, M., O. Rivas, M. Tan, A. Mohebbi und A. J. Shaka (1991). Broadband Homonuclear Cross Polarization Using Flip-Flop Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 91: 437-43.

Karplus, M. (1959). *J. Phys. Lett.* 30: 11-15.

Kay, L. E., G. M. Clore, A. Bax und A. M. Gronenborn (1990). *Science* 249: 249.

Keidel, W.-D. (1985). Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart, New York, Thieme Verlag.

Kerssebaum, R., R. Markert, J. Quant, W. Bermel, S. J. Glaser und C. Griesinger (1992). Power Reduction in Clean TOCSY Experiments with Shaped Pulses. *J. Magn. Reson.* 99: 184-92.

Kessler, H., M. Gehrke und C. Griesinger (1988). Zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Grundlagen und Übersicht über die Experimente. *Angew. Chemie* 100: 507.

Kim, Y. und J. H. Prestegard (1989). Measurement of Vincinal Couplings from Cross Peaks in COSY Spectra. *J. Magn. Reson.* 84: 9-13.

Kirkpatrick, S., C. D. Gelatt und M. P. Vecchi (1983). *Science* 220: 4598.

Kitaguchi, N., Y. Takahashi, Y. Tokushima, S. Shiojiri und H. Ito (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331: 530-532.

Kojima, T., A. Katsumi, T. Yamazaki, T. Muramatsu, T. Nagasaka, K. Oshumi und H. Saito (1996). Human Ryudocan from Endothelium-like Cells Binds Basic Fi-

- broblast Growth Factor, Midkine, and Tissue Factor Pathway Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **271**: 5914–20.
- Kuntz, I. D., J. F. Thomason und C. M. Oshiro (1989). Distance Geometry. *Meth. Enzymol.* **177**: 159–204.
- Kurachi, K., K. Fujikawa, G. Schmer und E. W. Davie (1976). Inhibition of bovine factor IXa and factor Xa β by antithrombin III. *Biochemistry* **15**: 373–377.
- Laskowski, M. und I. Kato (1980). Protein Inhibitors of Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* **49**: 593–626.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss und J. M. Thornton (1993). PROCHECK. *J. Appl. Crystallogr.* **26**: 283–291.
- Laskowski, R. A., J. A. C. Rullmann, M. W. MacArthur, R. Kaptein und J. M. Thornton (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**: 477–486.
- Lawson, J. H. und K. G. Mann (1991). Cooperative Activation of Human Factor IX by the Human Extrinsic Pathway of Blood Coagulation. *J. Biol. Chem.* **217**: 11317–27.
- Leytus, S. P., D. C. Foster, K. Kurachi und E. W. Davie (1986). Gene for human factor X: A blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IXa and protein C. *Biochemistry* **25**: 5098–5102.
- Li, Q., M. C. Berndt, A. I. Bush, B. Rumble, I. Mackenzie, A. Friedhuber, K. Beyreuther und C. L. Masters (1994). Membrane-Associated Forms of the bA4 Amyloid Protein Precursor of Alzheimer's Disease in Human Platelet and Brain: Surface Expression on the Activated Human Platelet. *Blood* **84**(1): 133–142.
- Lim, T. K., V. A. Bloomfield und G. L. Nelsetuen (1977). Structure of the Prothrombin- and Blood Clotting Factor X-Membrane Complexes. *Biochemistry* **16**: 4177–81.
- Loeb, L., M. S. Fleischer und L. Tuttle (1922). The interaction between blood serum and tissue extract in the coagulation of blood: I. The combined action of serum and tissue extract on flouride, hirudin, and peprone plasma; the effect of heating on the serum. *J. Biol. Chem.* **51**: 461–483.
- Loeb, L., M. S. Fleischer und L. Tuttle (1922). The interaction between blood serum and tissue extract in the coagulation of blood: II. A comparison between the effects of the stroma of erythrocytes and of tissue extracts, unheated and heated, on the coagulation of the blood, and on the mechanism of the interaction of the-

- se substances with blood serum. *J. Biol. Chem.* 51: 485-506.
- Ludvigsen, S. und F. M. Poulsen (1992). *J. Biomol. NMR* 2: 227.
- MacBride, A. (1997). Rational Drug Design – Modelling a better fit. *Wired* 5: 80.
- MacFarlane, R. G. (1964). An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* 202: 498-99.
- Malliavin, T. E., M. A. Delsuc und J. Y. Lallemand (1992). Computation of relaxation matrix elements from incomplete NOESY data sets. *J. Biomol. NMR* 2: 349-60.
- Marciniak, E. und S. Tsukamura (1972). Two Progressive Inhibitors of Factor X_a in Human Blood. *Brit. J. Haematol.* 22: 341-351.
- Marion, D., M. Ikura, R. Tschudin und A. Bax (1989). Rapid Recording of 2D NMR Spectra without Phase Cycling. Application to the Study of Hydrogen Exchange in Proteins. *J. Magn. Reson.* 85: 393-399.
- Marion, D. und K. Wüthrich (1983). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 113: 967.
- Markert, R. L. M. (1994). Synthese und Konformationsuntersuchung der immunodominanten Region von HIV-1 und HIV-2. Fachbereich Chemie. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität: 300.
- Markert, R. L. M. (1994). Synthese und Konformationsuntersuchungen der immunodominanten Region von HIV-1 und HIV-2. Fachbereich Chemie. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität: 290.
- McPhalen, C. A. und M. N. G. James (1988). *Biochemistry* 27: 6582-98.
- McVey, J. H. (1999). Tissue Factor pathway. *Baillière's Clinical Haematology* 12(3): 361-371.
- Morris, A. L., M. W. MacArthur, E. G. Hutchinson und J. M. Thornton (1993). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12: 345-364.
- Morrison, J. F. (1982). The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *FEBS Lett.*: 102-5.
- Morrison, S. A. und J. Jesty (1984). Tissue factor-dependent activation of tritium-labeled factor IX and factor X in human plasma. *Blood* 63: 133-1347.
- Moses, E. und H.-J. Hinz (1983). Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor Has Unusual Thermodynamic Stability Parameters. *J. Mol. Biol.* 170: 765-776.
- Mutschler und Vaupel (1989). Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Narita, M., G. Bu, G. M. Olins, D. A. Higuchi, J. Herz, G. J. Broze Jr. und A. L. Schwartz (1995). Two Receptor Systems Are Involved in the Plasma Clearance of Tissue Factor Pathway Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **270**: 24800–4.

Nolte, H. J. und E. Neumann (1978). Kinetics and mechanism for the conformational transition in p-guanidinobenzoate bovine trypsinogen induced by the isoleucine-valine dipeptid. *Biophys. Chem.* **10**: 253.

Novotny, W. F., S. G. Brown, J. P. Miletich und G. J. Broze Jr. (1986). Plasma LACI antigen in patient samples. *Blood* **74**: 209a.

Novotny, W. F., S. G. Brown, J. P. Miletich, D. J. Rader und G. J. Broze Jr. (1991). Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood* **78**: 387–393.

Novotny, W. F., T. J. Girard, J. P. Miletich und G. J. Broze Jr. (1988). Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Blood* **72**: 2020–25.

Østerud, B. und S. Rapaport (1977). Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII. Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**: 5260–5264.

Otting, G., E. Liepinsh und K. Wüthrich (1993). Disulfide Bond Isomerisation in BPTI and BPTI(G36S): An NMR Study of Correlated Mobility in Proteins. *Biochemistry* **32**: 3571–3582.

Padmanabhan, K., K. P. Padmanabhan, A. Tulinsky, C. H. Park, W. Bode, R. Huber, D. T. Blankenship, A. D. Cardin und W. Kisiel (1993). Structure of Human Des(1–45) Factor Xa at 2.2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **232**: 947–66.

Pardi, A., M. Billeter und K. Wüthrich (1984). Calibration of the Angular Dependence of the Amide Proton–Ca Proton Couplings Constants, $^3J_{\text{HNa}}$, in a Globular Protein. *J. Mol. Biol.* **180**: 741–751.

Pathy, L. (1993). Modular Design of Proteases of Coagulation, Fibrinolysis, and Complement Activation: Implications for Protein Engineering and Structure–Function Studies. *Meth. Enzymology* **222**: 10–21.

Pedersen, A. H., O. Nordfang, F. Norris, F. C. Wiberg, P. M. Christensen, K. B. Møller, J. Meidahl-Pedersen, T. C. Beck, K. Norris, U. Hedner und W. Kisiel (1990). Recombinant Human Extrinsic Pathway

Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **265**(28): 16786–93.

Petersen, L. C., S. E. Bjørn, O. H. Olsen, O. Nordfang, F. Norris und K. Norris

- (1996). Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **235**: 310-6.
- Piotto, M., V. Saudek und V. Sklenár (1992). Gradient-tailored excitation of single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**: 661-665.
- Prasch, T., P. Gröschke und S. J. Glaser (1998). SIAM TACSY, a New Experiment for the Determination of Homonuclear Coupling Constants. *Angew. Chemie* **37(6)**: 802-806.
- Press, W. H., S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling und B. P. Flannery (1992). Numerical Recipes in C. Cambridge, GB, Cambridge University Press.
- Pritchard, L. und M. J. Dufton (1999). Evolutionary Trace Analysis of the Kunitz/BPTI Family of Proteins: Functional Divergence May Have Been Based on Conformational Adjustment. *J. Mol. Biol.* **285**: 1589-1607.
- Pschyrembel, W. (1986). Klinisches Wörterbuch. Berlin, de Gruyter.
- Purcell, E. M., H. C. Torrey und R. V. Pound (1946). *Phys. Rev.* **69**: 37.
- Quant, J., T. Prasch, S. Ihringer und S. J. Glaser (1995). Tailored Correlation Spectroscopy for the Enhancement of Fingerprint Cross Peaks in Peptides and Proteins. *J. Magn. Reson. B* **106**: 116-121.
- Reif, B., M. Hennig und C. Griesinger (1997). Direct Measurement of Angles Between Bond Vectors in High-Resolution NMR. *Science* **276**: 1230-33.
- Sanders, N. L., S. P. Bajaj, A. Zivelin und S. I. Rapaport (1985). Inhibition Of Tissue Factor/Factor VIIa Activity in Plasma Requires Factor X and an Additional Plasma Component. *Blood* **66(1)**: 204-12.
- Sandset, P. M., U. Abildgaard und M. L. Larsen (1988). Heparin induces the release of extrinsic pathway coagulation inhibitor (EPI). *Thromb. Res.* **50**: 803-13.
- Schechter, I. und A. Berger (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**(157-62).
- Scheek, R. M., W. F. v. Gunsteren und R. Kaptein (1989). Molecular Dynamics Simulation Techniques for Determination of Molecular Structures from Nuclear Magnetic Resonance Data. *Meth. Enzymol.* **177**: 204-218.
- Scheek, R. M., A. E. Torda, J. Kemmink und W. F. van Gunsteren (1991). Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by Nuclear Magnetic Resonance. New York, Plenum Press.

Schleucher, J., J. Quant, S. J. Glaser und C. Griesinger TOCSY in ROESY & ROESY in TOCSY. .

Schneider, C. L. (1947). The active Principle of Placental toxin: Thromboplastin; Its Inactivator: Antithromboplastin. *Am. J. Physiol.* **149**: 123.

Shafqat, J., Z. H. Zaidi und H. Joernvall (1990). Purification and characterization of a chymotrypsin Kunitz inhibitor type of polypeptide from the venom of cobra (*Naja naja naja*). *FEBS Lett.* **275**: 6-8.

Silbernagel, S. und A. Despopoulos (1991). Taschenatlas der Physiologie. Stuttgart, Thieme Verlag.

Sklenár, V. und A. Bax (1987). Spin-Echo Water Suppression for the Generation of Pure-Phase Two-Dimensional NMR Spectra. *J. Magn. Reson.* **74**: 469-479.

Sklenár, V., M. Piotto, R. Leppik und V. Saudek (1993). Gradient-Tailored Water Suppression for ¹H-¹⁵N HSQC Experiments Optimized to Retain full Sensitivity. *J. Magn. Reson.:* 241-245.

Sørensen, O. W., G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen und R. R. Ernst (1983). Product Operator Formalism for the Description of NMR Pulse Experiments. *Prog. NMR Spectros.* **16**: 163-192.

States, D. J., R. A. Haberkorn und D. J. Ruben (1982). A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants. *J. Magn. Reson.* **48**: 286-292.

Stryer, L. (1988). Biochemistry. New York, W. H. Freeman and Co.

Tanzi, R. E., A. I. McClatchey, E. D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, J. F. Gusella und R. L. Neve (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer disease. *Nature* **331**: 528-530.

Technologies, B. (1994). NMRchitect User Guide Beta, Version 95.0. San Diego, Biosym Technologies.

Thim, L., K. Norris, F. Norris, P. F. Nielsen, S. E. Bjorn, M. Christensen und J. Petersen (1993). Purification and characterization of the trefoil peptide human spasmodic polypeptide (hSP) produced in yeast. *FEBS Lett.* **18**: 345-52.

Thomas, L. (1947). Studies on the Intravascular Thromboplastin Effect of Tissue Suspensions in Mice: II. A Factor in Normal Rabbit Serum Which Inhibits The Thromboplastin Effect of the Sedimentable Tissue Component. *Bull. Johns Hopkins Hospital* **81**: 26.

Titman, J. J., D. Neuhaus und J. Keeler (1989). Measurement of Long-Range He-

- teronuclear Coupling Constants. *J. Magn. Reson.* **85**: 111-131.
- Tschesche, H., J. Beckmann, A. Mehlic, E. Schnabel und H. R. Wenzel (1987). Semisynthetic engineering of protease inhibitor homologous. *Biochim. Biophys. Acta* **913**: 97-101.
- van der Logt, C. P. E., P. H. Reitsma und R. M. Bertina (1991). Intron-Exon Organization of the Human Gene Coding for the Lipoprotein-Associated Coagulation Inhibitor: The Factor Xa Dependent Inhibitor of the Extrinsic Pathway of Coagulation. *Biochemistry* **30**(43): 1571-7.
- Vuister, G. und A. Bax (1993). Quantitative J Correlation: A New Approach for Measuring Homonuclear Three-Bond $J(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha})$ Coupling Constants in ^{15}N -Enriched Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 7772.
- Vuister, G. W. und A. Bax (1994). Measurement of four-bond HN-H α J-couplings in staphylococcal nuclease. *J. Biomol. NMR* **4**: 193-200.
- Wagner, G., W. Braun, T. F. Havel, T. Schaumann, N. Go und K. Wüthrich (1987). Protein Structures in Solution by Nuclear Magnetic Resonance and Distance Geometry. *J. Mol. Biol.* **196**: 611-639.
- Wagner, G. und K. Wüthrich (1982). Sequential Resonance Assignments in Protein ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *J. Mol. Biol.* **155**: 347-366.
- Wang, C. und A. Pardi (1987). *J. Magn. Reson.* **71**: 154.
- Warn-Cramer, B. J., L. V. M. Rao, S. L. Maki und S. I. Rapaport (1988). Modifications of Extrinsic Pathway Inhibitor (EPI) and Factor Xa that Affect their Ability to Interact and to Inhibit Factor VIIa/Tissue Factor: Evidence for a Two-Step Model of Inhibition. *Thromb. Haemost.* **60**(3): 453-6.
- Warshawsky, I., G. Bu, A. Mast, J. E. Saffitz, J. G. J. Broze und A. L. Schwartz (1995). The Carboxy Terminus of Tissue Factor Pathway Inhibitor Is Required for Interacting with Hepatoma Cells and In Vivo. *J. Clin. Invest.* **95**: 1773-81.
- Wenzel, H. R. und H. Tschesche (1981). „Chemische Mutation“ durch Aminosäureaustausch im reaktiven Zentrum eines Proteinase-Inhibitors und Änderung seiner Hemmspezifität. *Angewandte Chemie* **93**(3): 292.
- Wesselschmidt, R., K. Likert, T. Girard, T. C. Wun und G. J. Broze Jr. (1993). Structural requirements for tissue factor pathway inhibitor interactions with factor Xa and heparin. *Blood Coagulation Fibrinolysis* **4**: 661-669.
- Williamson, M. P., T. F. Havel und K. Wüthrich (1985). *J. Mol. Biol.* **182**: 295.

Wlodawer, A., J. Deisenhofer und R. Huber (1987). Comparison of two highly refined structures of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **193**: 145-56.

Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. New York, Wiley & Sons.

Wüthrich, K. und G. Wagner (1979). Nuclear Magnetic Resonance of Labile Protons in the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor. *J. Mol. Biol.* **130**: 1-18.

Wüthrich, K., G. Wagner und A. Kumar (1981). Systematic Application of Two-Dimensional ¹H Nuclear-Magnetic-Resonance Techniques for Studies of Proteins (Teil 2); *Eur. J. Biochem.* **114**: 375.

A Puls-, C- und PERL-Programme

A.1 Verwendete Pulsprogramme

A.1.1 FLOPSY

;homonuclear Hartman-Hahn transfer using flopsy sequence
;Shaka JMR 91 (1991), 437-ff. (TPPI, 2 homospoilgrads)

d21=d16/100-2u
d16=400u

```
1 ze
  lm do dbo
2 d11
3 50u t1o t12
  p18 ph29
  3u
  20u t11
  p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  3u
7 2u:ngrad
  d21
  lo to 7 times 100
  d16:ngrad
  20u t13
4 p5*0.511 ph11 ;R
  p5*1.066 ph12
  p5*1.822 ph13
  p5*1.767 ph14
  p5*1.444 ph15
  p5*1.767 ph14
  p5*1.822 ph13
  p5*1.066 ph12
  p5*0.511 ph11
  p5*0.511 ph21 ;-R
  p5*1.066 ph22
  p5*1.822 ph23
  p5*1.767 ph24
  p5*1.444 ph25
  p5*1.767 ph24
  p5*1.822 ph23
  p5*1.066 ph22
  p5*0.511 ph21
  p5*0.511 ph21 ;-R
  p5*1.066 ph22
  p5*1.822 ph23
  p5*1.767 ph24
  p5*1.444 ph25
  p5*1.767 ph24
  p5*1.822 ph23
  p5*1.066 ph22
  p5*0.511 ph21
  p5*0.511 ph11 ;R
  p5*1.066 ph12
  p5*1.822 ph13
  p5*1.767 ph14
  p5*1.444 ph15
  p5*1.767 ph14
  p5*1.822 ph13
  p5*1.066 ph12
  p5*0.511 ph11
  p5*0.511 ph11 ;R
  p5*1.066 ph12
  p5*1.822 ph13
  p5*1.767 ph14
  p5*1.444 ph15
  p5*1.767 ph14
  p5*1.822 ph13
  p5*1.066 ph12
  p5*0.511 ph11
```

```

p5*0.511 ph11 ;R
p5*1.066 ph12
p5*1.822 ph13
p5*1.767 ph14
p5*1.444 ph15
p5*1.767 ph14
p5*1.822 ph13
p5*1.066 ph12
p5*0.511 ph11
p5*0.511 ph21 ;-R
p5*1.066 ph22
p5*1.822 ph23
p5*1.767 ph24
p5*1.444 ph25
p5*1.767 ph24
p5*1.822 ph23
p5*1.066 ph22
p5*0.511 ph21
p5*0.511 ph21 ;-R
p5*1.066 ph22
p5*1.822 ph23
p5*1.767 ph24
p5*1.444 ph25
p5*1.767 ph24
p5*1.822 ph23
p5*1.066 ph22
p5*0.511 ph21
lo to 4 times l1
3u
8 2u:ngrad
d21
lo to 8 times 100
d16:ngrad
20u t11
p1 ph2
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
lo to 3 times tdl
exit

ph1=0 0 2 2 1 1 3 3
ph2=0 2 2 0 1 3 3 1

ph11=(720) 0 360 360 0 180 540 540 180
ph12=(720) 90 450 450 90 270 630 630 270
ph13=(720) 135 495 495 135 315 675 675 315
ph14=(360) 315 135 135 315 45 225 225 45
ph15=(720) 45 405 405 45 225 585 585 225

ph21=(720) 360 0 0 360 540 180 180 540
ph22=(720) 450 90 90 450 630 270 270 630
ph23=(720) 495 135 135 495 675 315 315 675
ph24=(360) 135 315 315 135 225 45 45 225
ph25=(720) 405 45 45 405 585 225 225 585

ph29= 0
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3

;mixing time p5*94.22*11

```

A.1.2 DQF-sCOSY (TPPI)

```

;grodqfcosy
;2D homonuclear shift correlation
;phase sensitive using TPPI
;with double quantum filter
;ndo=2!

1 ze
2 d1 do tlo t12

```

Verwendete Pulsprogramme

```

3 p18 ph29
  30m t1o t11
4 p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  d13
  p1 ph3
  go=2 ph31
  d1 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
  lo to 2 times td1
exit

ph1=0 0 0 0 2 2 2 2 1 1 1 1 3 3 3 3
      2 2 2 2 0 0 0 0 3 3 3 3 1 1 1 1
ph2=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
      2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph3=0 1 2 3 0 1 2 3 1 2 3 0 1 2 3 0
      2 3 0 1 2 3 0 1 3 0 1 2 3 0 1 2
ph29=0
ph31=0 3 2 1 2 1 0 3 1 0 3 2 3 2 1 0
      2 1 0 3 0 3 2 1 3 2 1 0 1 0 3 2

```

A.1.3 DQF-COSY (NS=64)

```

;cosydfpt
;dqfcosy von Urs Eggenberger

1 ze
2 d1 t1o
3 d12 t12
  p18 ph19      ;ca 1.5s
  ;d13
  ;p8:h         ;ca 4ms
  ;d8
  ;p19 ph19    ;ca 0.2s
  ;d13
  d12 t11
  p1 ph1
4 d0
5 p1 ph2
  d2
7 p1 ph3
  go=2 ph4
  d1 wr #0 if #0 id0 zd ip1
  lo to 3 times td1
exit

ph1=0 2 1 3 2 0 3 1
      1 3 2 0 3 1 0 2
      2 0 3 1 0 2 1 3
      3 1 0 2 1 3 2 0
ph2=0 0 1 1 2 2 3 3
      1 1 2 2 3 3 0 0
      2 2 3 3 0 0 1 1
      3 3 0 0 1 1 2 2
ph3=0 0 0 0 0 0 0 0
      1 1 1 1 1 1 1 1
      2 2 2 2 2 2 2 2
      3 3 3 3 3 3 3 3
ph4=0 2 2 0 0 2 2 0
      1 3 3 1 1 3 3 1
      2 0 0 2 2 0 0 2
      3 1 1 3 3 1 1 3

ph18=0
ph19=0

;ns=64
;mc2=tppi

```

A.1.4 TACSY-Pulsprogramm

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

1 ze
2 93m p11:f1
3 50u p19:f1
  50u UNBLKGRAD
  3m fq1:f1
  (p18 ph29):f1
  3m fq1:f1
  d12 p11:f1
  4u
  p1:sp1:f1 ph1
  GRADIENT(cnst21)
  500u
  4u
  p2:sp4:f1 ph2
  4u
  GRADIENT(cnst22)
  500u
  4u
  GRADIENT(cnst23)
  500u
  4u
  p2:sp4:f1 ph2
  4u
  GRADIENT(cnst24)
500u
d0
p13:sp3:f1 ph13
4u
20u p11:f1
4u
(p14 ph14):f1
4u
20u
p13:sp3:f1 ph17
4u
d0
(p20 ph25):f1
4u
GRADIENT(cnst25)
500u
4u
3m fq1:f1
(p20 ph20):f1
20u p12:f1
4 (p5*0.929 ph11):f1
(p5*4.156 ph12):f1
(p5*3.384 ph22):f1
(p5*6.699 ph23):f1
(p5*3.384 ph22):f1
(p5*4.156 ph12):f1
(p5*0.929 ph11):f1
lo to 4 times ll
20u p11:f1
(p20 ph20):f1
3m ; compensation for fq1switching
4u
p13:sp5:f1 ph13
4u
20u p11:f1
4u
(p14 ph14):f1
4u
20u
p13:sp5:f1 ph17
4u
20u p11:f1
3m fq1:f1
```

Verwendete Pulsprogramme

```
(p21 ph19):f1
GRADIENT(cnst26)
  500u
  4u
  p9:sp6:f1 ph3
  4u
  GRADIENT(cnst27)
  500u ;watergate ende
  20u p11:f1
  3m
  (p14 ph15):f1
  20u
  GRADIENT(cnst28)
  500u
  4u
  p9:sp6:f1 ph3
  4u
  GRADIENT(cnst29)
  500u ;watergate ende
  3m fq1:f1
  4u BLKGRAD
go=2 ph31
3m ip19
3m ip31
3m ip3
3m ip15
d11 wr #0 if #0 zd
lo to 3 times 2
3m id0
3m ip19
3m ip3
3m ip15
3m ip31
3m ip19
3m ip3
3m ip15
3m ip31
3m ip19
3m ip3
3m ip15
3m ip31
3m ip1
3m ip2
lo to 3 times 10;td1/2
exit

ph1=0 2 0 2; 3 1 3 1 1 3;0 2 2 0;1 3 3 1; 0 2 2 0
ph2=0; 3
ph3=1; 1 3 3 3 3 1 1
ph11=(360) 68 68 68 68; 158 158 158 158
ph12=(360) 291 291 291 291; 21 21 21 21
ph13=(360) 180
ph14=(360) 0
ph15=(360) 0; 180 360 360 360 360 180 180
ph17=(360) 180
ph19=1 1 1 1 3 3 3 3; 1 1;0 0 2 2
ph20=1 1 3 3;1;3 3; 3 3 1 1; 2 2 0 0
ph22=(360) 195; 195 195 195 ;285 285 285 285
ph23=(360) 81 81 81 81; 171 171 171 171
ph25=(360) 165 165 345 345
ph29=0
ph31=1 3 3 1 3 1 1 3;2 0 0 2
```

A.1.5 SIAM-TACSY (auf AMX)

```
1 ze
2 93m tlo t11
3 50u t12
  3m ol ;auf den Alphas
  2s
; p18 ph29
```

```

3m o1
d12 t11
(p1 ph1):tp1           ;selektive Anregung
6 2u:ngrad
8u
lo to 6 times 100
500u:ngrad
4u
(p2 ph2):tp4
4u
7 2u:ngrad
8u
lo to 7 times 100
500u:ngrad
4u
8 2u:ngrad
8u
lo to 8 times 100
500u:ngrad
4u
(p2 ph2):tp4
4u
9 2u:ngrad
8u
lo to 9 times 100
500u:ngrad           ;selektive Anregung fertig,
d0                   ;t1 Zeit beginnt.
(p13 ph13):tp3
4u
20u t11
4u
p14 ph14
4u
20u
(p13 ph17):tp3
d0
p20 ph20
5 2u:ngrad
8u
lo to 5 times 100
500u:ngrad
3m o1
; 20u t11
p20 ph20           ;Beginn TACS Y
20u t12
4 p5*0.929 ph11
p5*4.156 ph12
p5*3.384 ph22
p5*6.699 ph23
p5*3.384 ph22
p5*4.156 ph12
p5*0.929 ph11
lo to 4 times 20
20u t11
p20 ph20
4u
(p13 ph13):tp5
4u
20u t11
4u
p14 ph14
4u
20u
(p13 ph17):tp5
4u
20u t11
p20 ph19
10 2u:ngrad         ;watergate beginn
8u
lo to 10 times 100
500u:ngrad
(p13 ph13):tp5
4u

```

Verwendete Pulsprogramme

```
20u t11
4u
p14 ph14
4u
20u
(p13 ph17):tp5
11 2u:ngrad
8u
lo to 11 times 100
500u:ngrad ;watergate ende
go=2 ph31
d11 st zd
3m ip19
3m ip31
lo to 3 times nbl
d11 wr #0 st0 zd
3m if #0
3m id0
3m ip19
3m ip31
3m ip19
3m ip31
3m ip19
3m ip31
3m ip1
lo to 3 times 10;td1/2
exit

ph1=0 2 2 0; 1 3 3 1; 0 2 2 0
ph2=1
ph11=(360) 68 68 68 68; 158 158 158 158
ph12=(360) 291 291 291 291; 21 21 21 21
ph13=(360) 280
ph14=(360) 180
ph17=(360) 280
ph19=1 1 3 3 3 3 1 1 ;0 0 2 2
ph20=1 1 3 3; 2 2 0 0
ph21=3 3 1 1; 0 0 2 2
ph22=(360) 195 195 195 195 ;285 285 285 285
ph23=(360) 81 81 81 81; 171 171 171 171
ph29=0
ph31=1 3 3 1 3 1 1 3 ;2 0 0 2

;p1: 90 Grad softer Puls (SNOB)
;p2: 180 Grad softer Puls (Q3)
;p14: 180 Grad harter Puls
;p13: 90 Grad softer Puls (SNOB)
;p20: 90 Grad harter Puls
```

A.1.6 TOCSY: Mit DIPSI-Sequenz

```
;mirkowgnoesy
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive using TPPI
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)
```

```
d21=1m/100-2u ; C gradient
dl6=400u
```

```
1 ze
2 d1 do dbo
3 20u tlo t11 ;dblo dbl1 dbo do
p1 ph1
;d0
;(p6 ph1):f3
d0
```

```

p1 ph2
4 2u:ngrad
  d21
  lo to 4 times 100
  200u:ngrad t12
  20u t12
6 p5*3.556 ph23
  p5*4.556 ph25
  p5*3.222 ph23
  p5*3.167 ph25
  p5*0.333 ph23
  p5*2.722 ph25
  p5*4.167 ph23
  p5*2.944 ph25
  p5*4.111 ph23
  p5*3.556 ph25
  p5*4.556 ph23
  p5*3.222 ph25
  p5*3.167 ph23
  p5*0.333 ph25
  p5*2.722 ph23
  p5*4.167 ph25
  p5*2.944 ph23
  p5*4.111 ph25
  p5*3.556 ph25
  p5*4.556 ph23
  p5*3.222 ph25
  p5*3.167 ph23
  p5*0.333 ph25
  p5*2.722 ph23
  p5*4.167 ph25
  p5*2.944 ph23
  p5*4.111 ph25
  p5*3.556 ph23
  p5*4.556 ph25
  p5*3.222 ph23
  p5*3.167 ph25
  p5*0.333 ph23
  p5*2.722 ph25
  p5*4.167 ph23
  p5*2.944 ph25
  p5*4.111 ph23
  lo to 6 times 11;115.112*p5*11 dipsi mixing time
5 2u:ngrad
  d21
  lo to 5 times 100
  200u:ngrad t11
  20u t11
  p1 ph3
  30u
  20u t13
8 2u:ngrad
  d21
  lo to 8 times 100
  d16:ngrad ;d11
  p28*0.231 ph4
  d19*2
  p28*0.692 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph5
  d19*2
  p28*0.692 ph5
  d19*2
  p0*0.231 ph5
  30u
9 2u:ngrad
  d21
  lo to 9 times 100
  d16:ngrad
  20u ;db10
  go=2 ph31 ;cpdb

```

Verwendete Pulsprogramme

```
d1 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
lo to 3 times td1
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
;ph3=0 0 2 2
ph3=0 0 2 2 3 3 1 1
ph4=0
ph5=2
ph23=0
ph25=2
;ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;      use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;      d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null
```

A.1.7 NOESY mit Watergate (DMX-Version)

```
;mirkowgnoesy
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive using TPPI
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)

p2=p1*2

d0=3u

d9=d8-d16-1m
d20=d0*2+p6
d21=1m/100-2u ; C gradient
d16=400u

1 ze
2 d1
3 20u tlo t11 dlo d11
  p1 ph1
  d0
  (p6 ph0):f2
  d0
  p2 ph0
  d20
  p1 ph2
  d8
  (p6 ph0):f2
  d9
7 2u:ngrad
  d21
  lo to 7 times 100
  d16:ngrad
  p1 ph3
  30u
  20u t12
```

```

8 2u:ngrad
  d21
  lo to 8 times 100
  d16:ngrad
  p28*0.231 ph4
  d19*2
  p28*0.692 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph5
  d19*2
  p28*0.692 ph5
  d19*2
  p0*0.231 ph5
  30u
9 2u:ngrad
  d21
  lo to 9 times 100
  d16:ngrad
  20u d10
  go=2 ph31 cpd
  d1 do wr #0 if #0 id0 ipl zd
  lo to 3 times td1
exit

ph0=0
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
;ph3=0 0 2 2
ph3=0 0 2 2 3 3 1 1
ph4=0
ph5=2
;ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI

;use gradient program (GRDPROG) : 2sine

;use gradient ratio: cnst21 : cnst22
; 1 : 1

```

A.1.8 Jump-Return NOESY

```

;gronoejrecho
;noesy mit tppi und echo und jumpreturn und schnickes halt
;JMR 74 (1987), 469

```

Verwendete Pulsprogramme

```
;calculations

d19=120u
;d29=200m
d20=d19*2

d21=1m/100-2u
;d16=500u
d16=1m

1 ze
2 d11
3 d1 tlo t11
  p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  3u
;4 2u:ngrad
; d21
; lo to 4 times 100
; d16:ngrad
  d29 ; NOESY
  p1 ph11
  d19 ;~1/(4*offsetmax)
  p1 ph12
5 2u:ngrad
  d21
  lo to 5 times 100
  d16:ngrad
  p1 ph13
  d20
  p1 ph14
6 2u:ngrad
  d21
  lo to 6 times 100
  d16:ngrad
  go=2 ph31
  d11 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
  lo to 3 times td1
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 0
    2 2 2 2 2 2 2 2
ph11=0
ph12=2
ph13=0 0 1 1 2 2 3 3
ph14=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0
    2 0 0 2 2 0 0 2
```

A.1.9 TOCSY mit DIPSI Sequenz und Watergate

```
;aus mirkowgdipsi

p2=p1*2

d0=3u

d9=d8-d16-1m
d13=4u
d20=d0*2+p6
d21=1m/100-2u ; C gradient
d22=2m/100-2u ; C gradient
d16=400u

1 ze
2 d1
3 20u tlo t11 dlo d11
  p1 ph1
  d0
```

```
(p6 ph0):f2
d0
p2 ph0
d20
p1 ph2
d13
d13

6 2u:nggrad
d21
lo to 6 times 100
d16:nggrad t13

5 p30*3.556 ph23
p30*4.556 ph25
p30*3.222 ph23
p30*3.167 ph25

p30*0.333 ph23
p30*2.722 ph25
p30*4.167 ph23
p30*2.944 ph25

p30*4.111 ph23
p30*3.556 ph25
p30*4.556 ph23
p30*3.222 ph25

p30*3.167 ph23
p30*0.333 ph25
p30*2.722 ph23
p30*4.167 ph25

p30*2.944 ph23
p30*4.111 ph25
p30*3.556 ph23
p30*4.556 ph25

p30*3.222 ph23
p30*3.167 ph25
p30*0.333 ph23
p30*2.722 ph25

p30*4.167 ph23
p30*2.944 ph25
p30*4.111 ph23
p30*3.556 ph25

p30*4.556 ph23
p30*3.222 ph25
p30*3.167 ph23
p30*0.333 ph25

p30*2.722 ph23
p30*4.167 ph25
p30*2.944 ph23
p30*4.111 ph25
lo to 5 times l1
d13
d13

7 2u:nggrad
d22
lo to 7 times 100
d16:nggrad t11

p1 ph3
30u
20u t12

8 2u:nggrad
d21
lo to 8 times 100
d16:nggrad
```

Verwendete Pulsprogramme

```
p28*0.231 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*1.462 ph5
d19*2
p28*0.692 ph5
d19*2
p0*0.231 ph5
30u
9 2u:ngrad
d21
lo to 9 times 100
d16:ngrad
20u d10
go=2 ph31 cpd
d1 do wr #0 if #0 id0 ipl zd
lo to 3 times td1
exit

ph0=0
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
;ph3=0 0 2 2
ph3=0 0 2 2 3 3 1 1
ph4=0
ph5=2
ph23=2
ph25=0
;ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
```

A.1.10 NOESY mit Watergate (AMX)

```
;gronoewgneu (aus brnoewg)
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive using TPPI
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)
```

```
d21=1m/100-2u          ; C gradient
d16=400u
```

```
1 ze
2 d1
3 20u tlo t11
p1 ph1
d0
p1 ph2
d8
p1 ph3
20u t12
8 2u:ngrad
d21
lo to 8 times 100
d16:ngrad d11
p28*0.231 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*1.462 ph5
d19*2
```

```

p28*0.692 ph5
d19*2
p0*0.231 ph5
46u
9 2u:nggrad
d21
lo to 9 times 100
d16:nggrad
4u
go=2 ph31
d1 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
lo to 3 times td1
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
;ph3=0 0 2 2
ph3=0 0 2 2 3 3 1 1
ph4=0
ph5=2
;ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3

;t11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;t12 : f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p18
;
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p18
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI

;use gradient program (GRDPROG) : 2sine

;use gradient ratio: cnst21 : cnst22
; 1 : 1

```

A.1.11 NOESY mit Presat und RSH

```

;noesyprsh
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive using States et al. method
;with presaturation during relaxation delay and mixing time

```

```

1 ze tlo
2 d11
3 d11
d11
4 d12 t12
p18 ph29
d13
d12 t11
p1 ph1
d0

```

Verwendete Pulsprogramme

```
p1 ph2
d13
100m
;d12 t12
;p19 ph29
d13
;d12 t11
p1 ph3
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 ipl zd
lo to 3 times 2
d11 ipl id0
d11 ipl
lo to 4 times 13
exit
```

```
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0
    2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 1 1 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
      2 0 0 2 3 1 1 3
```

```
;hl1: ecoupler high power level
;hl2: ecoupler power level for presaturation
;p1 : 90 degree transmitter high power pulse
;p18: presaturation during relaxation delay
;p19: presaturation during mixing time
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay (e.g. to compensate delay line) [3 usec]
;L3: loop for phase sensitive 2D using States et al. method: 13 = td1/2
;in0:  $1/(1 * SW) = 2 * DW$ 
;nd0: 1
;NS: 8 * n
;DS: 2 or 4
;td1: number of experiments
;MC2: RSH
```

A.1.12 NOESY mit Jump-Return

```
;jsflopsy
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using flopsy sequence
;Shaka JMR 91 (1991), 437-ff.
;mit der weithin geruehmten JumpReturnEcho Sequenz
d21=1m/100-2u
d16=1m
d19=120u
d20=d19*2

1 ze
  1m do dbo
2 d11
3 50u t1o t12 ;gueltig bei Presat
  p18 ph29
;3 1.2s
  3u
  20u t11
  p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  3u
7 2u:ngrad
  d21
  lo to 7 times 100
  d16:ngrad
  20u t13
```

```

4 p5*0.511 ph11 ;R
p5*1.066 ph12
p5*1.822 ph13
p5*1.767 ph14
p5*1.444 ph15
p5*1.767 ph14
p5*1.822 ph13
p5*1.066 ph12
p5*0.511 ph11
p5*0.511 ph21 ;-R
p5*1.066 ph22
p5*1.822 ph23
p5*1.767 ph24
p5*1.444 ph25
p5*1.767 ph24
p5*1.822 ph23
p5*1.066 ph22
p5*0.511 ph21 ;-R
p5*1.066 ph22
p5*1.822 ph23
p5*1.767 ph24
p5*1.444 ph25
p5*1.767 ph24
p5*1.822 ph23
p5*1.066 ph22
p5*0.511 ph21
p5*0.511 ph11 ;R
p5*1.066 ph12
p5*1.822 ph13
p5*1.767 ph14
p5*1.444 ph15
p5*1.767 ph14
p5*1.822 ph13
p5*1.066 ph12
p5*0.511 ph11
p5*0.511 ph11 ;R
p5*1.066 ph12
p5*1.822 ph13
p5*1.767 ph14
p5*1.444 ph15
p5*1.767 ph14
p5*1.822 ph13
p5*1.066 ph12
p5*0.511 ph11
p5*0.511 ph11 ;R
p5*1.066 ph12
p5*1.822 ph13
p5*1.767 ph14
p5*1.444 ph15
p5*1.767 ph14
p5*1.822 ph13
p5*1.066 ph12
p5*0.511 ph11
p5*0.511 ph21 ;-R
p5*1.066 ph22
p5*1.822 ph23
p5*1.767 ph24
p5*1.444 ph25
p5*1.767 ph24
p5*1.822 ph23
p5*1.066 ph22
p5*0.511 ph21
p5*0.511 ph21 ;-R
p5*1.066 ph22
p5*1.822 ph23
p5*1.767 ph24
p5*1.444 ph25
p5*1.767 ph24
p5*1.822 ph23
p5*1.066 ph22
p5*0.511 ph21
lo to 4 times 11

```

Verwendete Pulsprogramme

```
3u
8 2u:ngrad
  d21
  lo to 8 times 100
  d16:ngrad
  20u t11
  p1 ph2
  ;d19
  ;p1 ph5
;9 2u:ngrad
  ;d21
  ;lo to 9 times 100
  ;d16:ngrad
  ;p1 ph6
  ;d20
  ;p1 ph7
;10 2u:ngrad
  ;d21
  ;lo to 10 times 100
  ;d16:ngrad
  go=2 ph31
  d11 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
  lo to 3 times td1
exit

ph1=0 0 2 2 1 1 3 3
ph2=0 2 2 0 1 3 3 1 ;entspricht der ph4

ph11=(720) 0 360 360 0 180 540 540 180
ph12=(720) 90 450 450 90 270 630 630 270
ph13=(720) 135 495 495 135 315 675 675 315
ph14=(360) 315 135 135 315 45 225 225 45
ph15=(720) 45 405 405 45 225 585 585 225

ph21=(720) 360 0 0 360 540 180 180 540
ph22=(720) 450 90 90 450 630 270 270 630
ph23=(720) 495 135 135 495 675 315 315 675
ph24=(360) 135 315 315 135 225 45 45 225
ph25=(720) 405 45 45 405 585 225 225 585

ph29= 0
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3

;Phasen fuer jr echo

ph5=2 0 0 2 3 1 1 3    ; = ph2 +180
ph6=0 2 2 0 1 3 3 1    ; = ph2
ph7=2 0 0 2 3 1 1 3    ; = ph2 +180

;mixing time p5*94.22*11
```

A.1.13 COSY mit Gradienten

```
;cosydftp mit Gradienten
dl6=200u; Recoverydelay nach einem Gradienten
d21=1m/100-2u; wird waehrend eines Gradienten 100 mal durchlaufen
dl7=1.2m;kompensiert Gradient und Recoverydelay, so dass keine
; chemische Verschiebung evolviert

1 ze
2 d11
3 d12 tlo t12
  p18 ph29
  d12 t11
  p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  d17
  p2 ph2
7 2u:ngrad ;grdprog=servcosy(1.Grad: 40, 2. 80)
  d21
```

```

lo to 7 times 100
d16:ngrad
p1 ph3
d17
p2 ph2
8 2u:ngrad ;Staerke 2. Gradient 80
d21
lo to 8 times 100
d16:ngrad
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
lo to 3 times td1
exit

ph1=0 2
ph2=0
ph3=0
ph29=0
ph31=0 2

;p1 : 90 degree transmitter high power pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d13: short delay (e.g. to compensate delay line) [3 usec]
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI

```

A.1.14 NOESY mit $1\bar{1}$ -Sequenz

```
;noesytp, phcycle +1 -1 for solvent suppression
```

```

1 ze thi
2 d1
3 p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  d7
  p7:h
  d8
  p1 ph3
  d18
  p0 ph0:r
  go=2 ph31
  d1 wr #0 if #0 id0 ip1 zd h12
  lo to 3 times td1
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 1 1 3 3 ;+1
ph0=2 2 0 0 3 3 1 1 ;-1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
       2 0 0 2 3 1 1 3

```

A.2 PERL-Programme

A.2.1 Tacsyintegrale.perl

```
#!/usr/local/bin/perl
```

PERL-Programme

```
@b=split(/,/, '110.16,30.6,40.8,51.0,61.2,77.52,93.84');
$i=1;
print @b;

while ($i < 57)
{
    $Dateiname=join(' ', 'tacint', $i);
    $Dateiout=join(' ', 'Tacout', $i);
    print "Dateiname: $Dateiname \n";
    open(FILE, "$Dateiname");
    open(FILEOUT, ">$Dateiout");
    $j=0;
    while (<FILE>)
    {
        @a=split(/\s+/, $_);
        #print "@a";
        print FILEOUT "$b[$j] \t $a[7] \n";
        $j++;
    }
    close (FILEOUT);
    close (FILE);

    $i++;
}
}
```

entsprechend für die kurzen Mischzeiten:

```
#!/usr/local/bin/perl

@b=split(/,/, '0.00612,0.01224,0.02040,0.03060,0.04080');
$i=85;
print @b;

while ($i <= 85)
{
    $Dateiname=join(' ', 'tac2_', $i);
    $Dateiout=join(' ', 'Tac2out', $i);
    print "Dateiname: $Dateiname \n";
    open(FILE, "$Dateiname");
    open(FILEOUT, ">$Dateiout");
    $j=0;
    while (<FILE>)
    {
        @a=split(/\s+/, $_);
        #print "@a";
        print FILEOUT "$b[$j] \t $a[7] \n";
        $j++;
    }
    close (FILEOUT);
    close (FILE);

    $i++;
}
}
```

A.2.2 tacsymerge

```
#!/usr/local/bin/perl
# Tacsy_Merge: Dieses kleine Programm nimmt die aus den verschiedenen
# Spektren gewonnenen Integrale und verbindet sie unter Beruecksichtigung
# eines Skalierungsparameters, der aus dem Integral zweier Spektren bei
# gleicher Messzeit gewonnen wird.
# Bedienung: tacsy_merge kurze_Zeiten lange_Zeiten neue_Datei

@b=split(/,/,
, '0.00612,0.01224,0.02040,0.03060,0.04080,,,,0.05100,0.06120,0.07752,0.09384,0.11016');

$i=1;

($AS_1 = $ARGV[0]);
```

```

($AS_2 = $ARGV[1]);
($Dateiout = $ARGV[2]);

    open(FILE1,"$AS_1");
    open(FILE2,"$AS_2");
    open(FILEOUT,">$Dateiout");

    $j=0;
    while (<FILE1>)
        {
        @a=split(/\s+/,$_);
        #print "@a";
        print FILEOUT "$b[$j] \t $a[1] \n";
        $j++;
        if ($j == 5) {$Divisor=$a[1]};
        }
    close (FILE1);
    print "\n $Divisor \n ";
print "Jott gleich $j \n";
    while (<FILE2>)
        {
        @a=split(/\s+/,$_);

        if ($j==5) {$e=$a[1]};

        if ($j==7) {$c=$Divisor/$a[1]};
        };
    print "$j \n";
        if ($j>7){
        $d=$a[1]*$c;
        print FILEOUT "$b[$j] \t $d \n";
        }
        $j++;
        }

    close (FILE2);
    $d=$e*$c;
    print FILEOUT "$b[$j] \t $d \n";
    close (FILE2);

close (FILEOUT);

```

A.3 C-Programme

A.3.1 Kopplungsextraktion (brute_force)

Zur besseren Lesbarkeit wurden einige Zeilenumbrüche eingefügt, die im ursprünglichen Code so nicht vorhanden sind.

```

/* ***** */
/* Auswertung von Kopplungen; Schreiben in FELIX File. */
/* Eingabe: Experimentelle Werte, Anzahl Werte und Name der .dat Datei */
/* fuer Felix, Name der Mathematica-Datei. */
/* Ausgabe: Felixdatei, Ergebnisse und Mathematica-Datei */
/* gro, 1996 */
/* ***** */

#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <string.h>
#define PI 3.14159265358979323846

int SI[2],i,j,k,l,m,n,zahl,a;
double ver_kopp,ver_T2,ver_amp,q_fehler,fehler,ges_fehler=1000000.0;

```

C-Programme

```

double sum_qfehler,sum_gesfehler=1000000.0,sum_best_kopp;
double sum_best_T2,sum_best_amp;
double ver_wert,t_mix[100],exp_wert[100],best_amp,best_kopp,best_T2;
float fehler_out[256];
FILE *felixfile,*mathfile, *fin,*fout,*fout2;
char s1[80],s2[80];
char tmp_s1[30],tmp_s2[30];

main()
{
    printf("\nName der Datei:");
    scanf("%s",s1);
    printf("\nAnzahl der Daten:");
    scanf("%d",&zahl);
    printf("felix file to write: ");
    scanf("%s",s2);
    felixfile = fopen(s2,"w");

    printf("Mathematica file to write: ");
    scanf("%s",s2);
    mathfile = fopen(s2,"w");
    fprintf(mathfile, "matest =\n{");

    n =64;
    SI[0] = 8*n+4;
    SI[1] = n;

    printf("%s ist die eingelesene Datei\n",s1);
    fin=fopen(s1,"r");
    if( fin == NULL )
    {
        printf( "File not found\n");
        exit( -2 );
    }

    fout2=fopen("testwerte","w");
    fout=fopen((strcat(s1,".out")),"w");

    for (l=0;l<zahl;l++) /* Einlesen der exp. Werte und der Mischzeiten */
    {
        fscanf(fin,"%lf %lf",&t_mix[l],&exp_wert[l]);
    }

    for(i=1;i<200;i=i+8)
    {
        for(k=1;k<=64;k++)
        {
            fprintf(mathfile,"\n{");
            for(j=0;j<128;j++)
            {
                a = j+30;
                /* Erlaubt Startwert fuer Testkopplung zu aendern */
                fehler = 0.0;
                sum_qfehler = 0.0;
                ver_amp = ((double)i)/2;
                /* Amplitude in Schrittweite 0.5 */
                ver_kopp = ((double)a)/10.0;
                /* Kopplung in Schrittweite 0.1 Hz von 3 bis 15.8 */
                ver_T2 = ((double)k)/200.0;
                /* T2 Zeiten zwischen 5 ms und 0.32 s*/

                for(l=0;l<zahl;l++)
                    /* Vergleichsschleife: Testwerten gegen Exp.-Werte */
                {
                    ver_wert = ver_amp * sin(PI*ver_kopp*t_mix[l]) *
                        sin(PI*ver_kopp*t_mix[l]) *
                        exp(t_mix[l]/((-1.0)*ver_T2));
                    q_fehler = (ver_wert-exp_wert[l]) * (ver_wert-exp_wert[l]);
                    fehler = fehler + sqrt(q_fehler);
                    sum_qfehler = sum_qfehler + q_fehler;
                }
            }
        }
    }
}

```

```

    if (fehler < ges_fehler) /* Besten Wert finden fuer Fehler */
    {
        ges_fehler = fehler;
        best_amp   = ver_amp;
        best_kopp  = ver_kopp;
        best_T2    = ver_T2;
    }
    if (sum_qfehler < sum_gesfehler)
        /* Besten Wert finden fuer Fehlerquadrat */
    {
        sum_gesfehler = sum_qfehler;
        sum_best_amp  = ver_amp;
        sum_best_kopp = ver_kopp;
        sum_best_T2   = ver_T2;
    }

    fehler_out[j] = (float)(fehler)
}          /* j-Schleife (Kopplung) */

}          /* k-Schleife (T2-Zeiten) */
}          /* i-Schleife (Amplitude) */

for(l=1;l<=zahl;l++)
{
    ver_wert = best_amp * sin(PI*best_kopp*t_mix[l]) *
               sin(PI*best_kopp*t_mix[l]) *
               exp((-1.0)*t_mix[l]/best_T2);

    fprintf(fout2,"%f      %f\n",t_mix[l], ver_wert);
}

fprintf(fout,"Amplitude(Sum(sqrts)): %6.3f
\t Kopplung: %6.3f \t T2-Zeit: \
%6.3f \n Amplitude(SQRT(Sum)) :%6.3f \
\t Kopplung: %6.3f \t T2-Zeit: %6.3f", \
best_amp, best_kopp, best_T2, sum_best_amp, \
sum_best_kopp, sum_best_T2);
close(fin);
close(fout);
close(fout2);
close(felixfile);
fprintf(mathfile, "};\n");
close(mathfile);
}

```

A.3.2 Kim+Prestegaard.c

```

/*****
/* Kim und Prestegaard, JMR 84, 9-13 Der Ansatz setzt auf der reelen */
/* Loesung fuer Nullstellen einer Glg dritter Ordnung auf.          */
/* Die reele Nullstelle wurde aus der allgemeinen Loesung der Glg:  */
/* yyy+ayy+by+c=0 mit Mathematika bestimmt.                        */
/*****

#include "stdio.h"
#include "math.h"
#include "stdlib.h"

float  va, vd, y,a,b,c, Hilfe1, Hilfe2;

FILE   *fin, *fout;

main(argc,argv)
int  argc;
char *argv[];

```

C-Programme

```
{
  if (argc != 3)
  { printf("\n\нкundp: wrong number of arguments\n");
    printf("USAGE: kundp <absorp> <disper>\n\n");
    printf("<absorp> <disper> werden in Hz abgegeben\n");
    exit(1);
  }

  va=atof(argv[1]);
  vd=atof(argv[2]);

  a=-vd*vd;

  b=(-2.25*va*va*va*va+1.5*va*va*vd*vd+0.75*vd*vd*vd*vd);

  c=(1.265625*va*va*va*va*va*va-          \
    0.5625*va*va*va*va*vd*vd-          \
    0.65625*va*va*vd*vd*vd*vd-          \
    0.0625*vd*vd*vd*vd*vd*vd+          \
    vd*vd*vd*vd*vd*vd*vd/(64*va*va));

  Hilfe1=pow(-2.0*a*a+9*a*b+              \
    sqrt(4.0*pow(-a*a+3.0*b,3.0)+        \
    pow((-2.0*a*a*a+9.0*a*b-27.0*c),2.0))- \
    27.0*c,0.3333333) ;

  Hilfe2=pow(2.0,0.3333333333) ;

  y= (-a/3)- (Hilfe2 *(-a*a+3*b))/(3*Hilfe1)+ Hilfe1/(3*Hilfe2);

  printf("Corriger la fortune: \n");
  printf("Eingelesen absorptiv: %5.2f   dispersiv: %5.2f\n", va, vd);
  printf("Korrigiert: J= %5.2f\n",sqrt(y));
} /*end of main*/
```

B Kopplungskonstanten mit TACSY – Die Graphen

B.1 Auswertungen mit Kaleidagraph

Wie beschrieben wurden die ersten Experimente mit dem Programm KALEIDAGRAPH ausgewertet. Für die einzelnen Aminosäuren ergaben sich die folgenden Graphen. Im Kästchen in den Abbildungen ist unter dem Variablennamen `m2` die errechnete Kopplung ablesbar.

Aufgetragen ist in den Graphen jeweils das Integral des Signals gegen die Mischzeit. Die Mischzeit ist in Sekunden angegeben, die Intensität in willkürlichen Einheiten. Die Werte der Integrale sind als „°“ im Graphen notiert, die durchgezogene Linie ist die durch die Fitting-Routine in KALEIDAGRAPH errechnete *best fit* für die Gleichung 44 auf Seite 81 mit einer festen T_2 -Zeit von 50 ms.

B.2 Auswertung mit Felix

Mit Felix wurden die mit `brute_force.c` (Siehe “Kopplungsextraktion (`brute_force`)” auf Seite 185.) errechneten Matrizen ausgewertet. Das Programm erzeugt Dateien, die von Felix als 2D-Spektren interpretiert werden.

Felix ist an dieser Stelle nicht mehr ein NMR-Programm, sondern ein Hilfsmittel zum anzeigen von beliebigen Wertefeldern (Arrays).

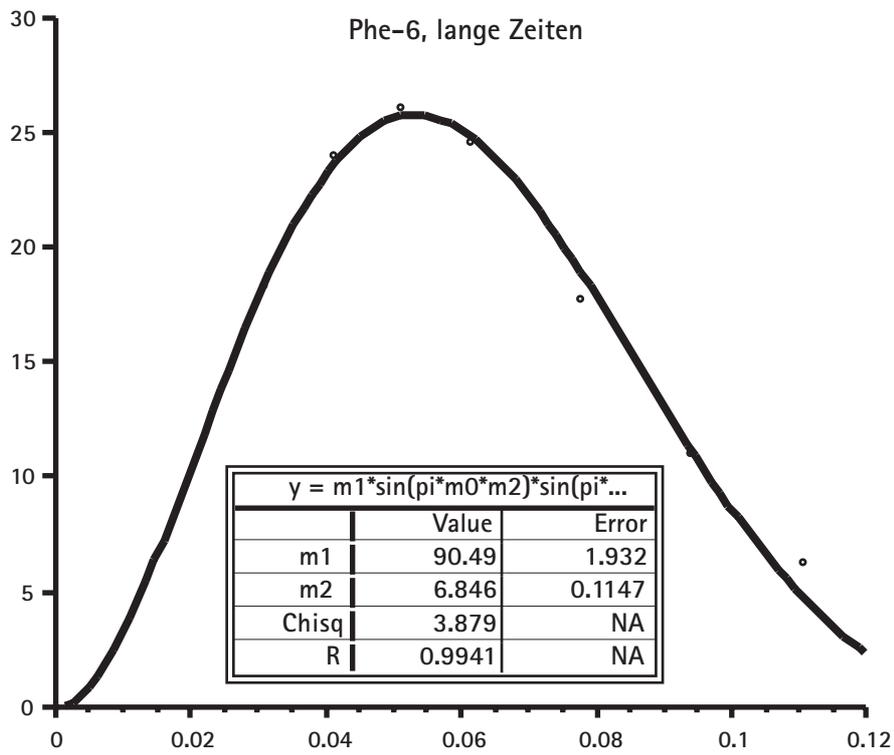


Abbildung 73: Phe-6, Mischzeiten > 40 ms.

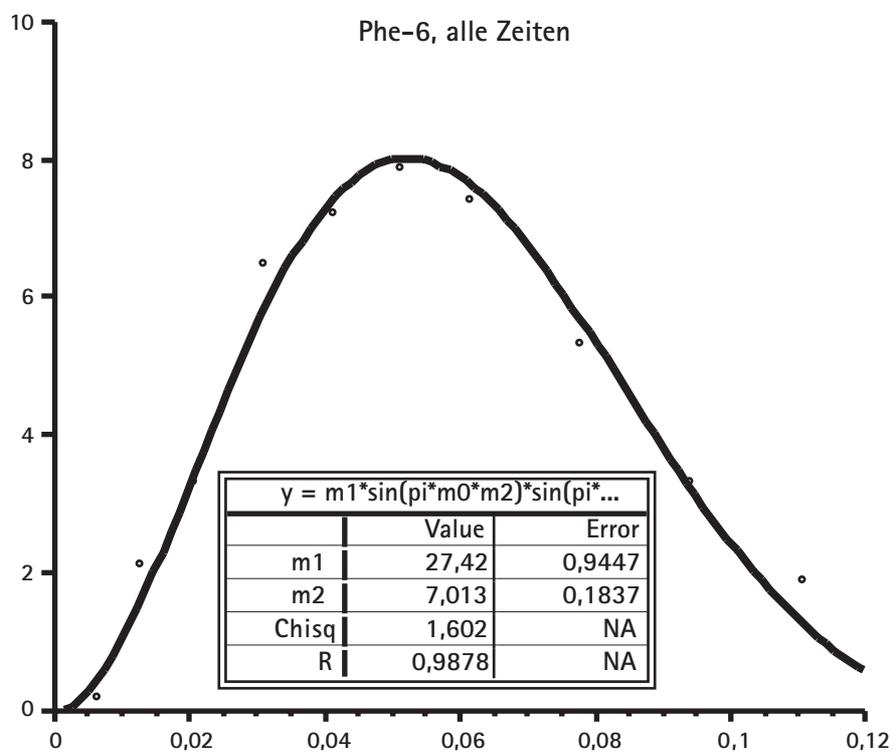


Abbildung 74: Phe-6, alle Mischzeiten.

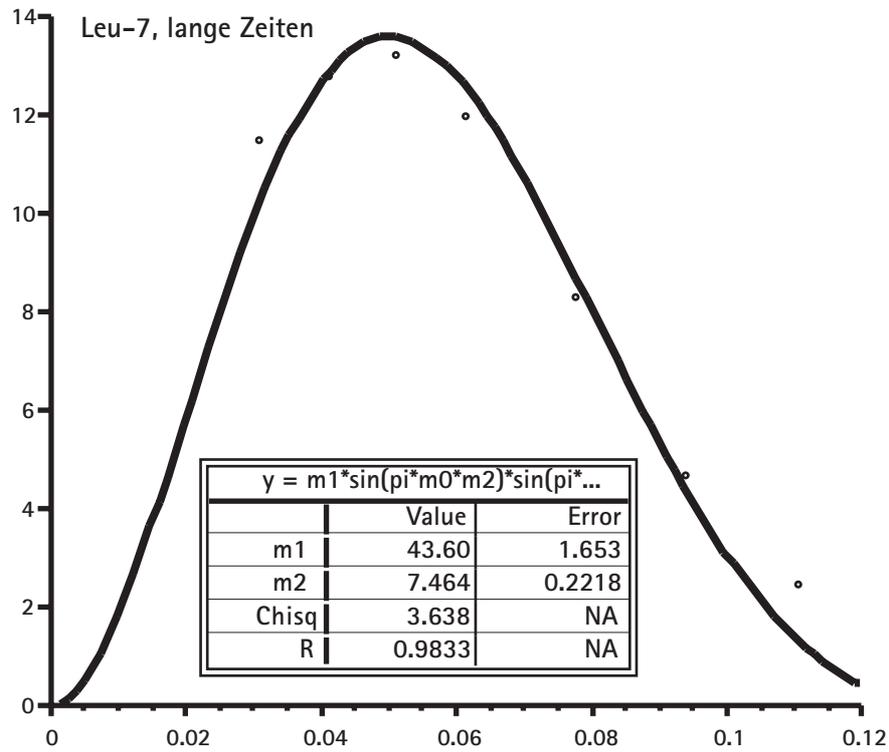


Abbildung 75: Leu-6, Mischzeiten > 40 ms.

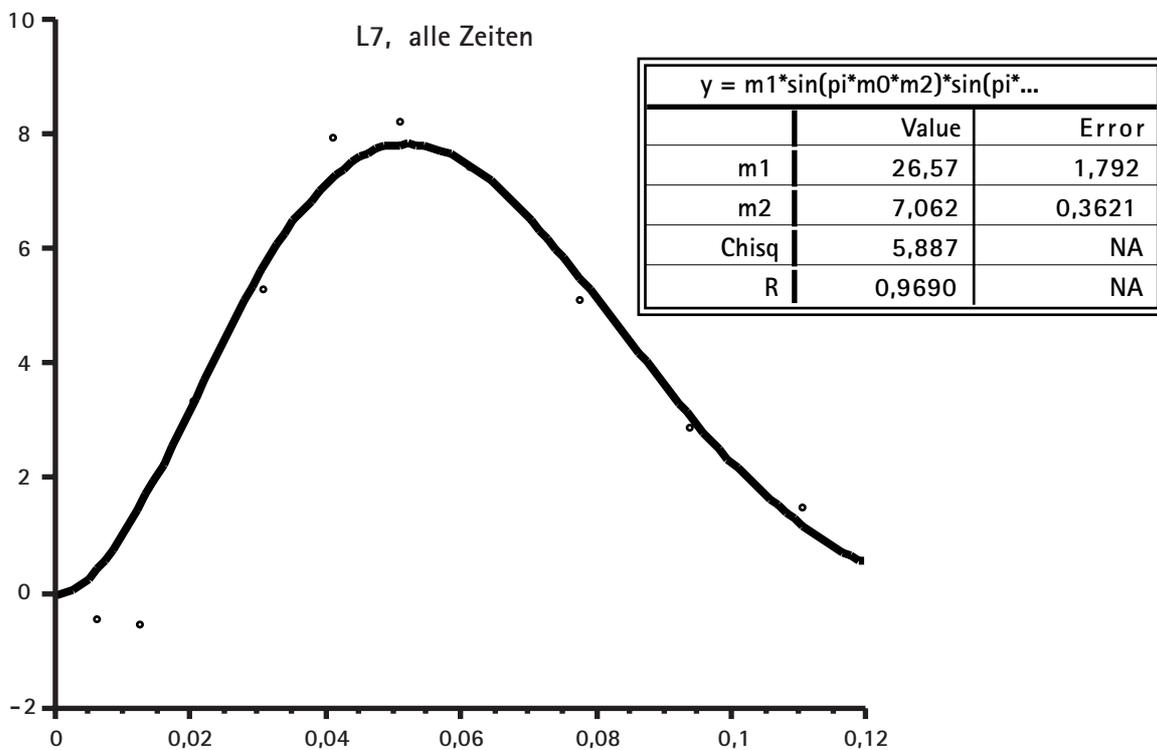


Abbildung 76: Leu-6, alle Mischzeiten.

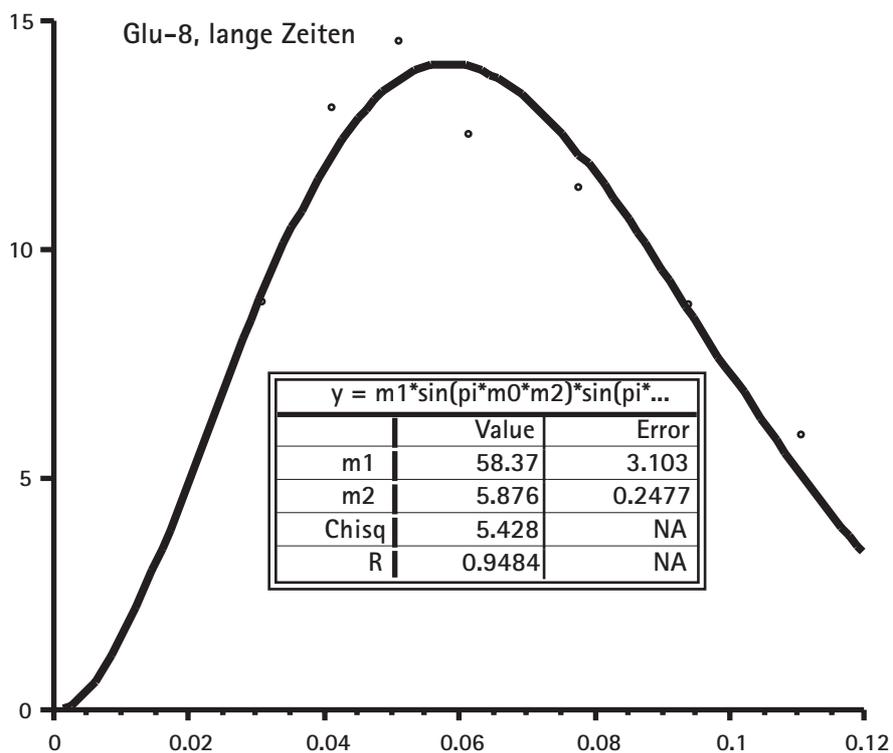


Abbildung 77: Glu-8, Mischzeiten > 40 ms.

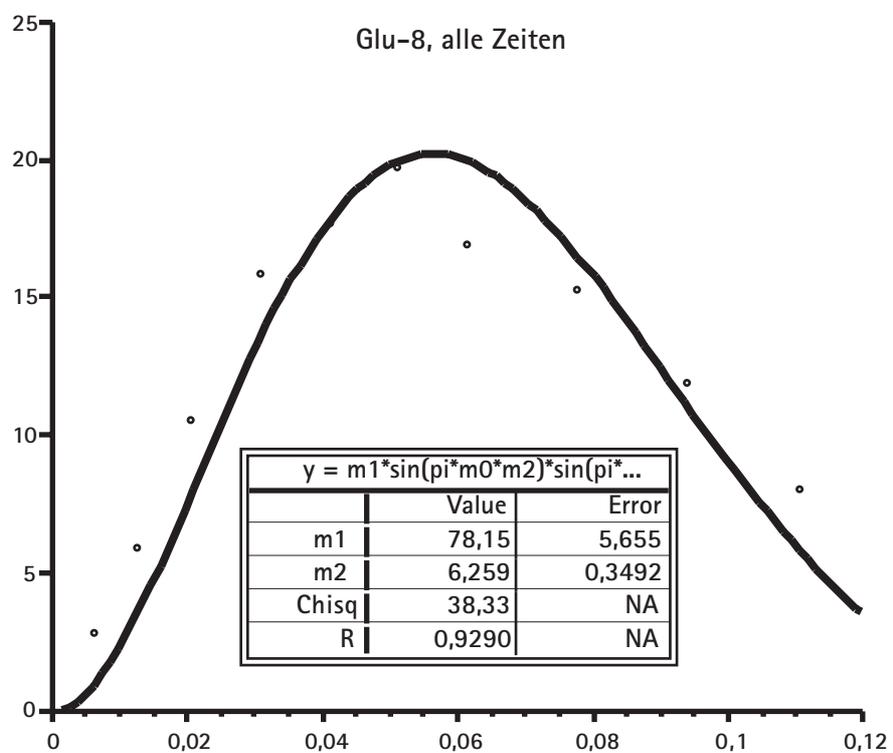


Abbildung 78: Glu-8, alle Mischzeiten.

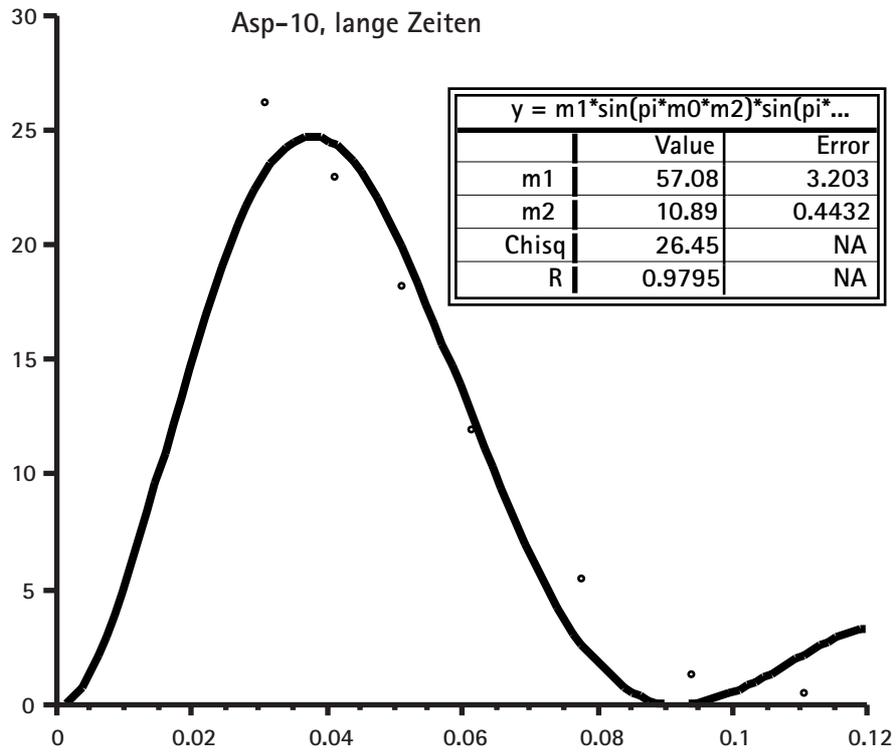


Abbildung 79: Asp-10, Mischzeiten > 40 ms.

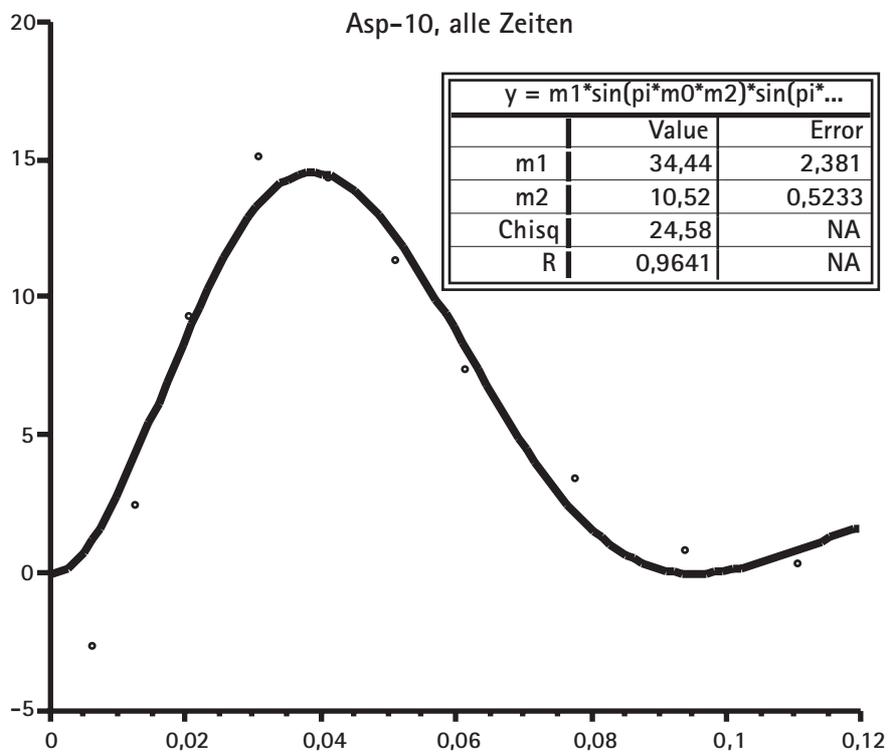


Abbildung 80: Asp-10, alle Mischzeiten.

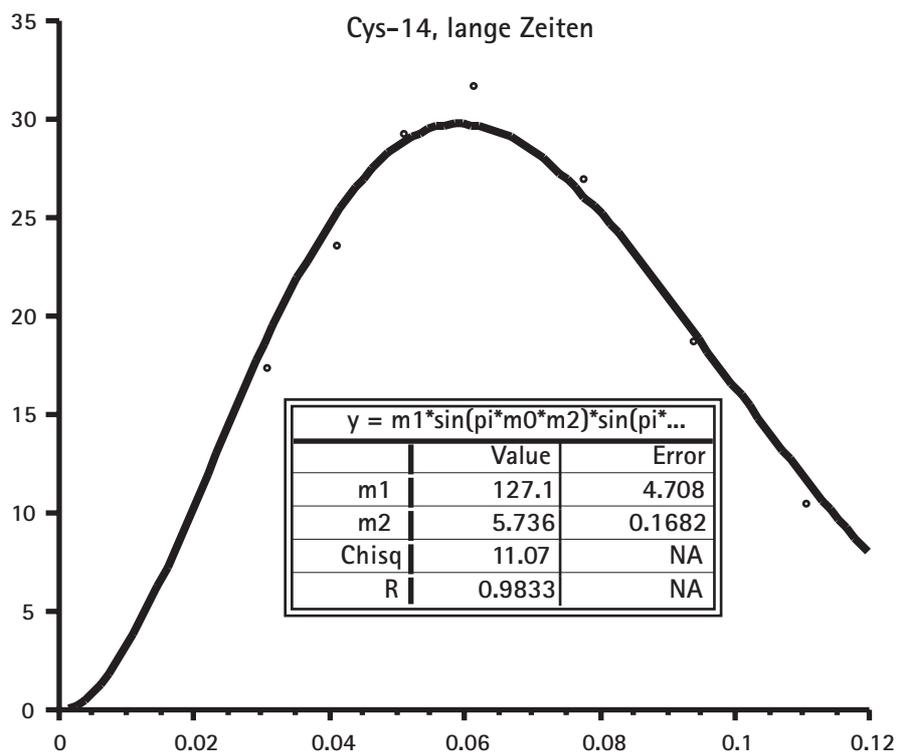


Abbildung 81: Cys-14, Mischzeiten > 40 ms.

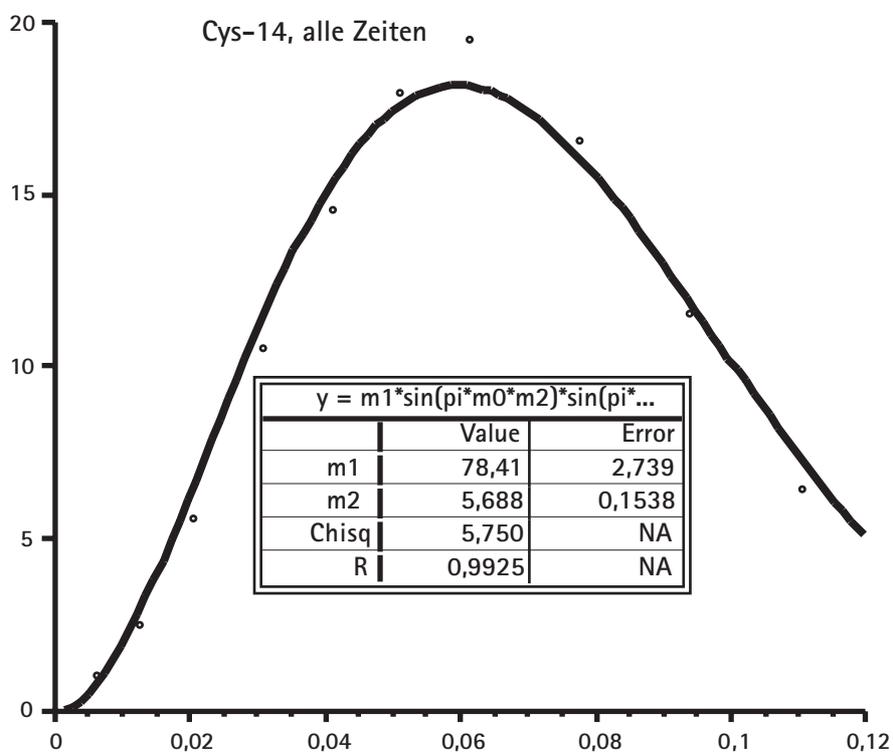


Abbildung 82: Cys-14, alle Mischzeiten.

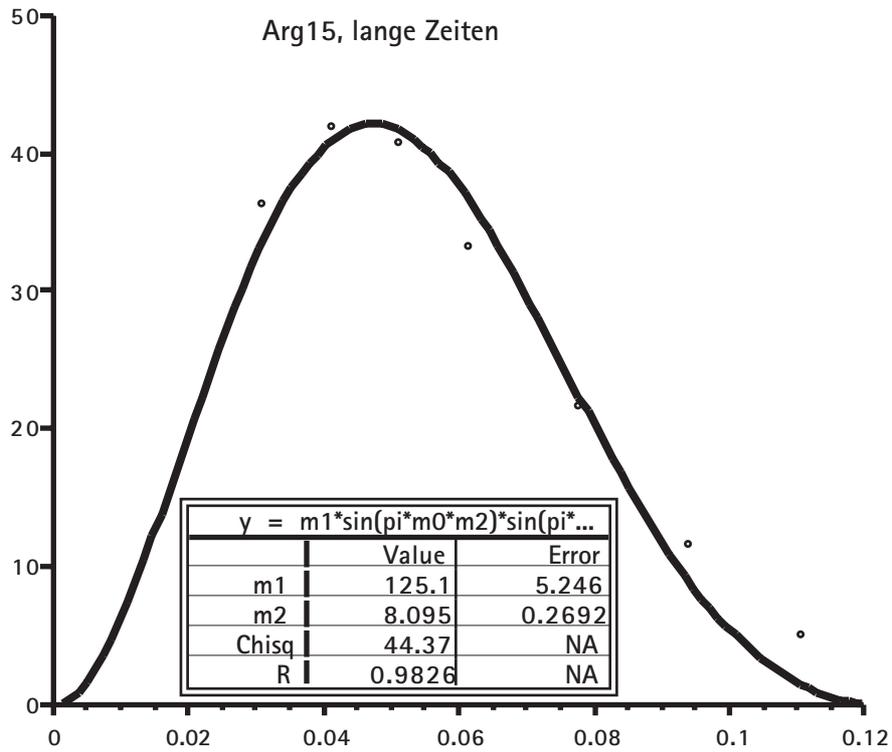


Abbildung 83: Arg-15, Mischzeiten > 40 ms.

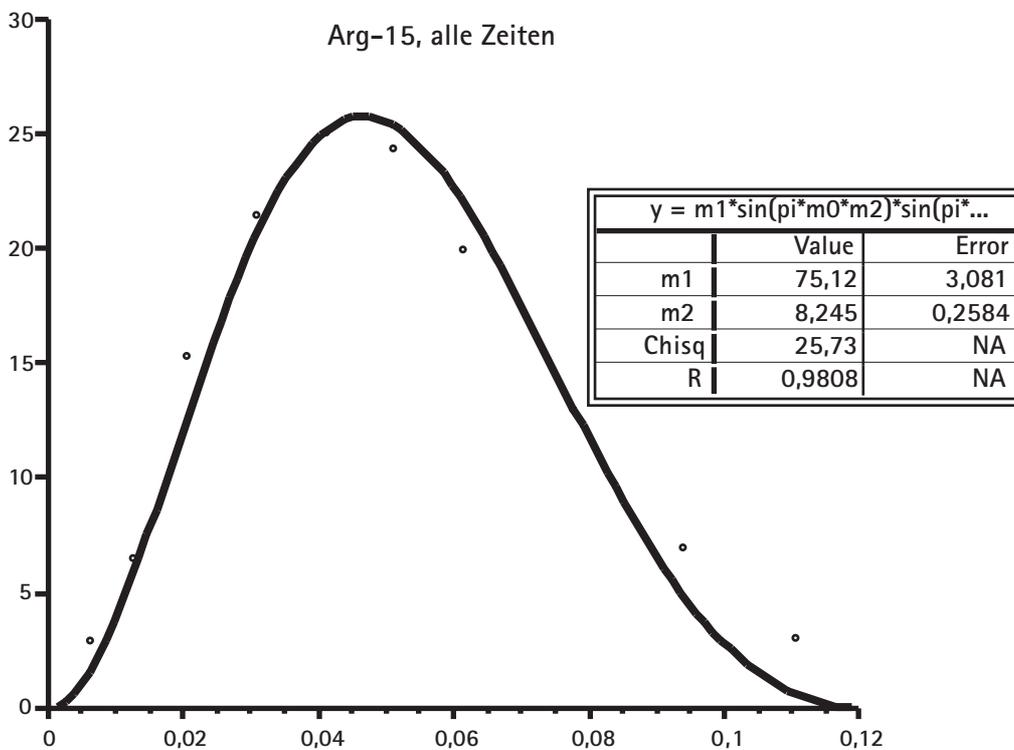


Abbildung 84: Arg-15, alle Mischzeiten.

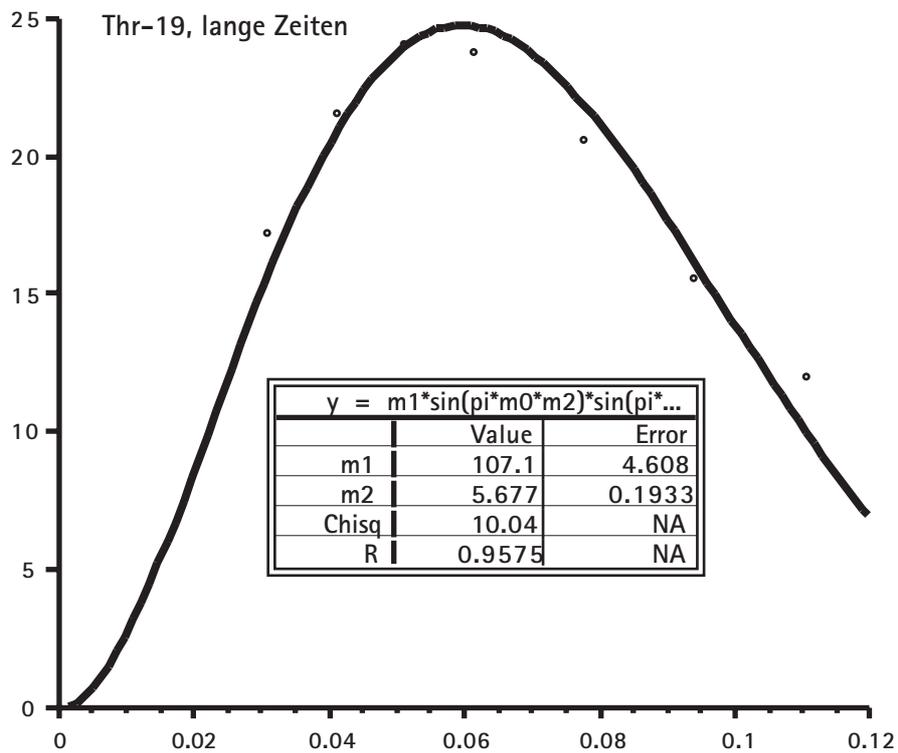


Abbildung 85: Thr-19, Mischzeiten > 40 ms.

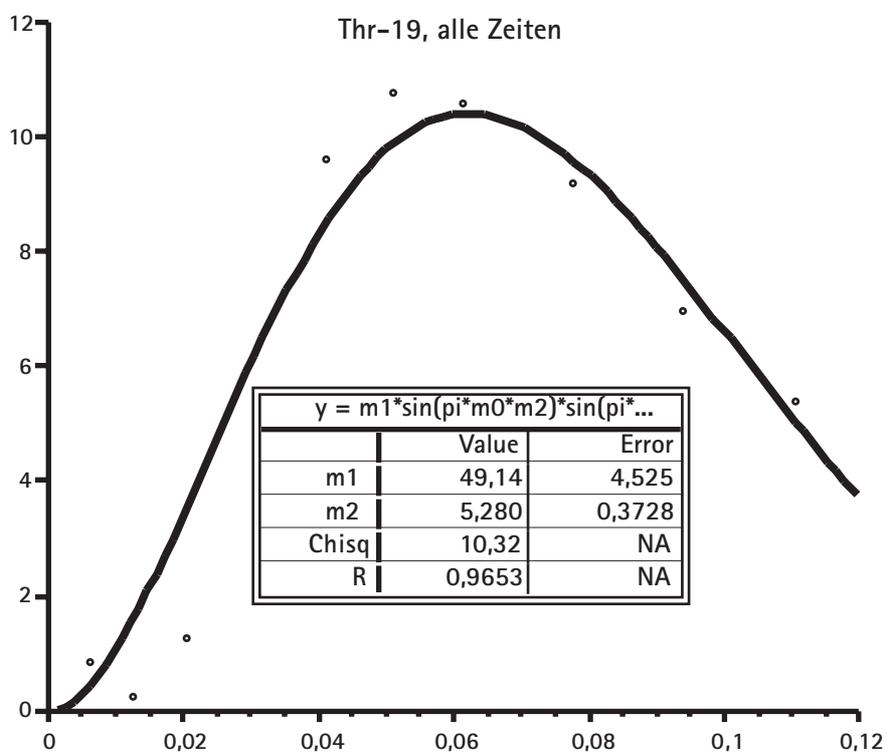


Abbildung 86: Thr-19, alle Mischzeiten.

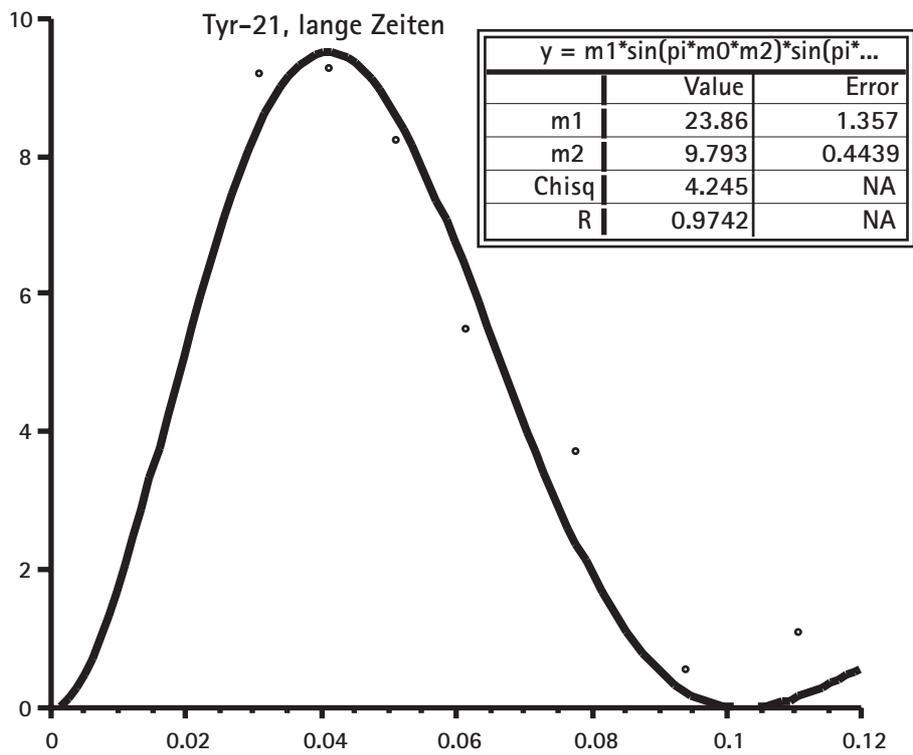


Abbildung 87: Tyr-21, Mischzeiten > 40 ms.

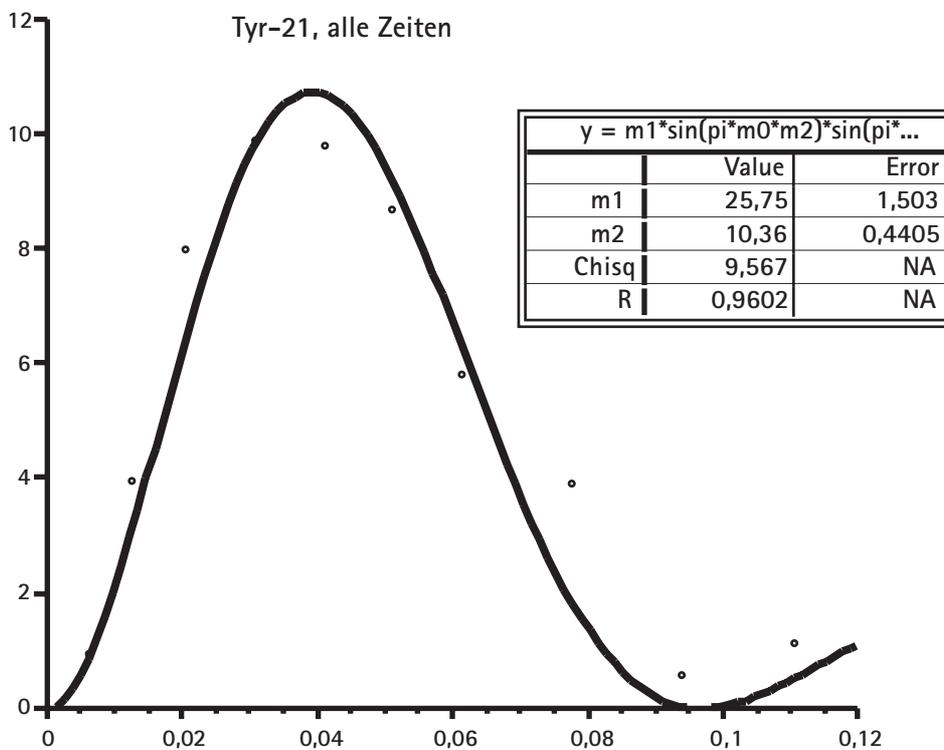


Abbildung 88: Tyr-21, alle Mischzeiten.

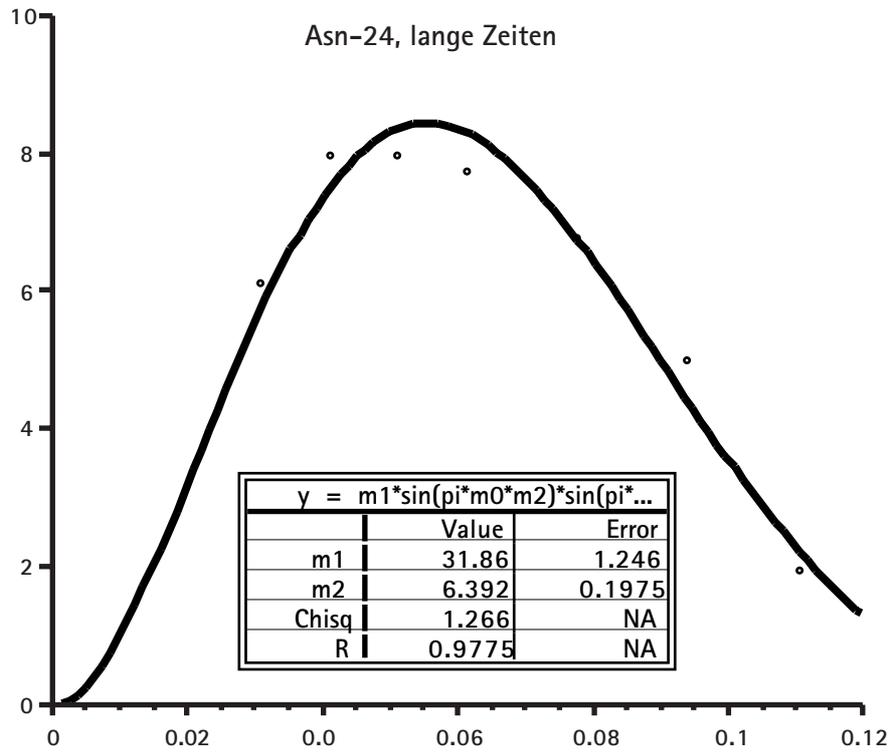


Abbildung 89: Asn-24, Mischzeiten > 40 ms.

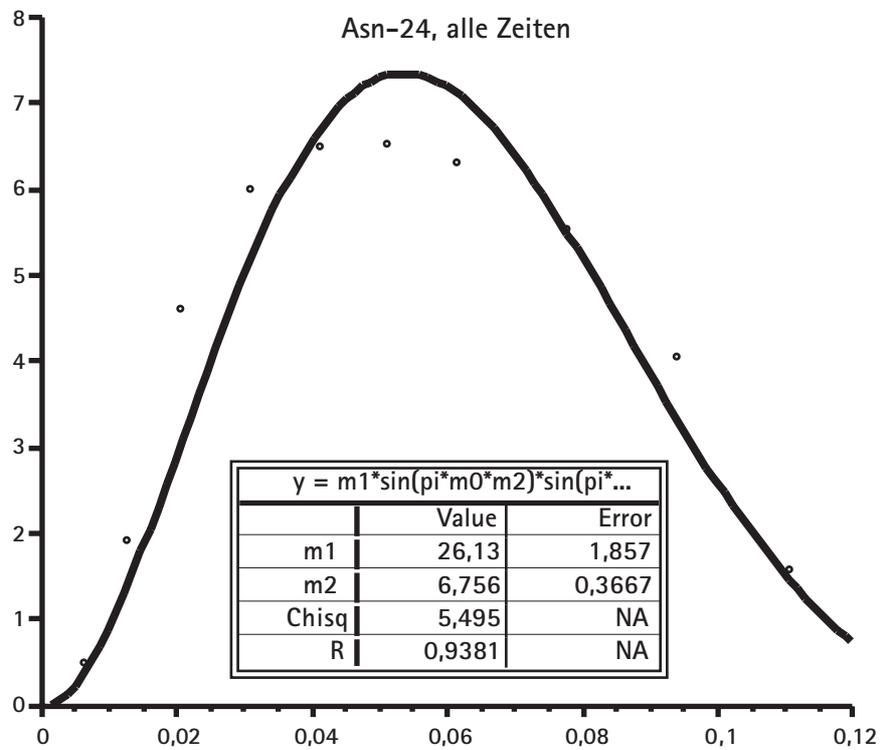


Abbildung 90: Asn-24, alle Mischzeiten.

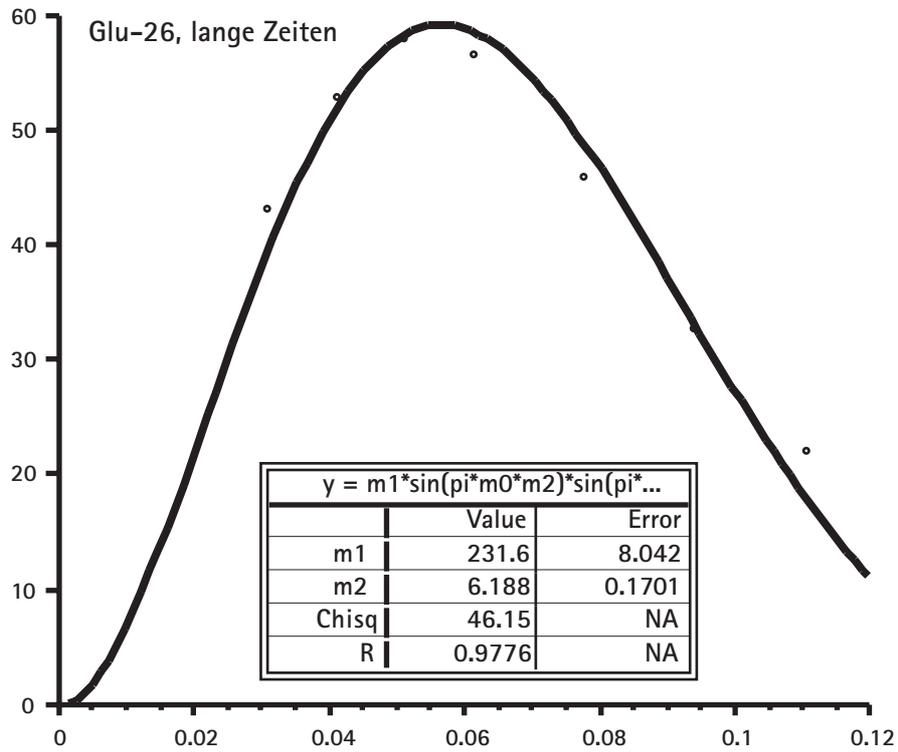


Abbildung 91: Glu-26, Mischzeiten > 40 ms.

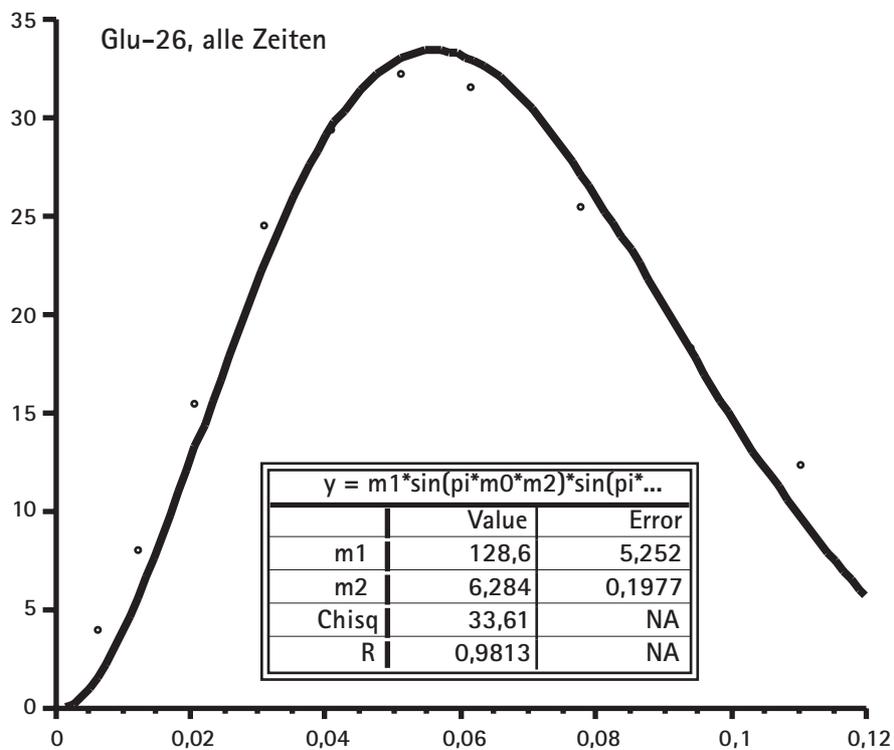


Abbildung 92: Glu-26, alle Mischzeiten.

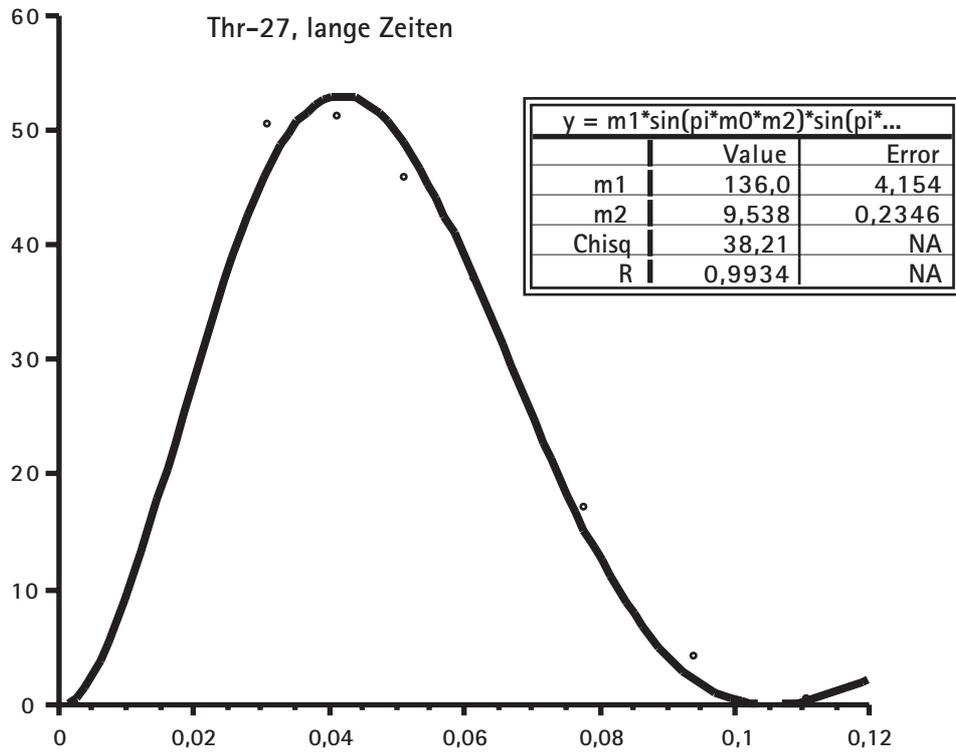


Abbildung 93: Thr-27, Mischzeiten > 40 ms.

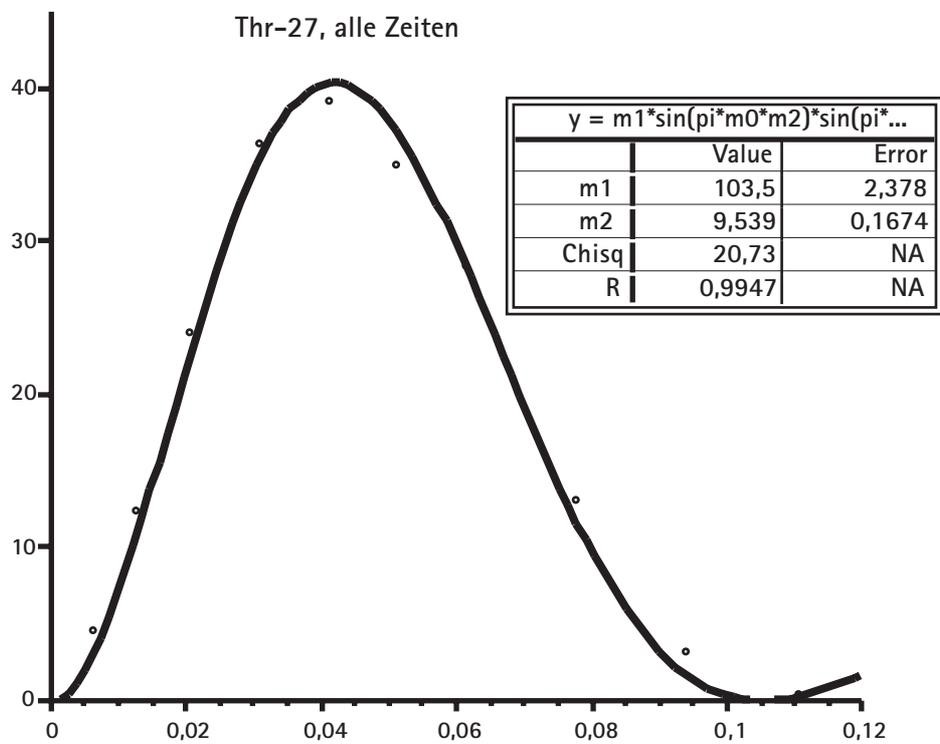


Abbildung 94: Thr-27, alle Mischzeiten.

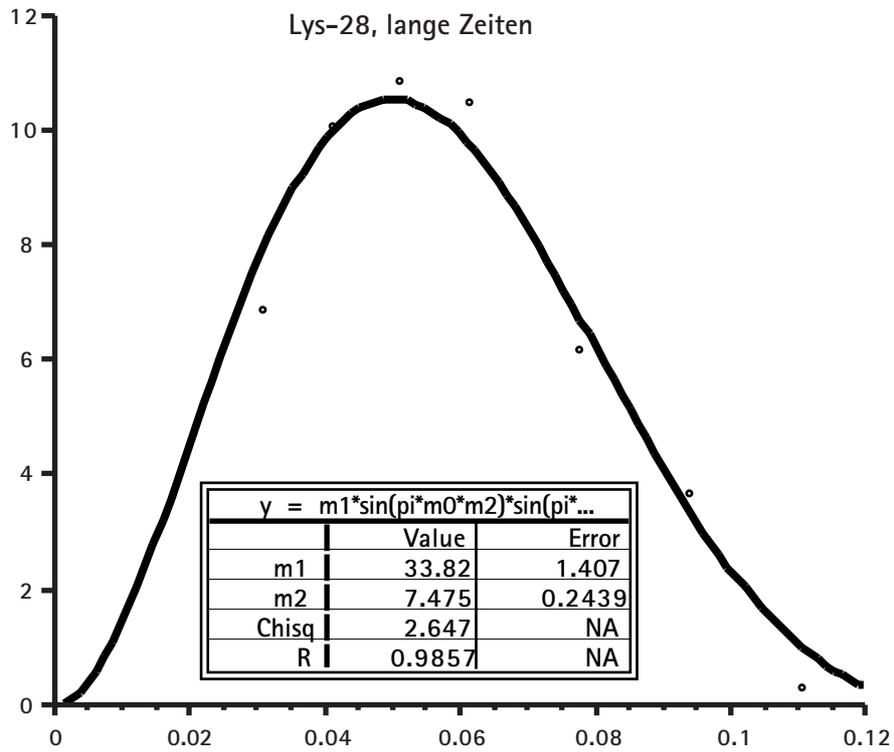


Abbildung 95: Lys-28, Mischzeiten > 40 ms.

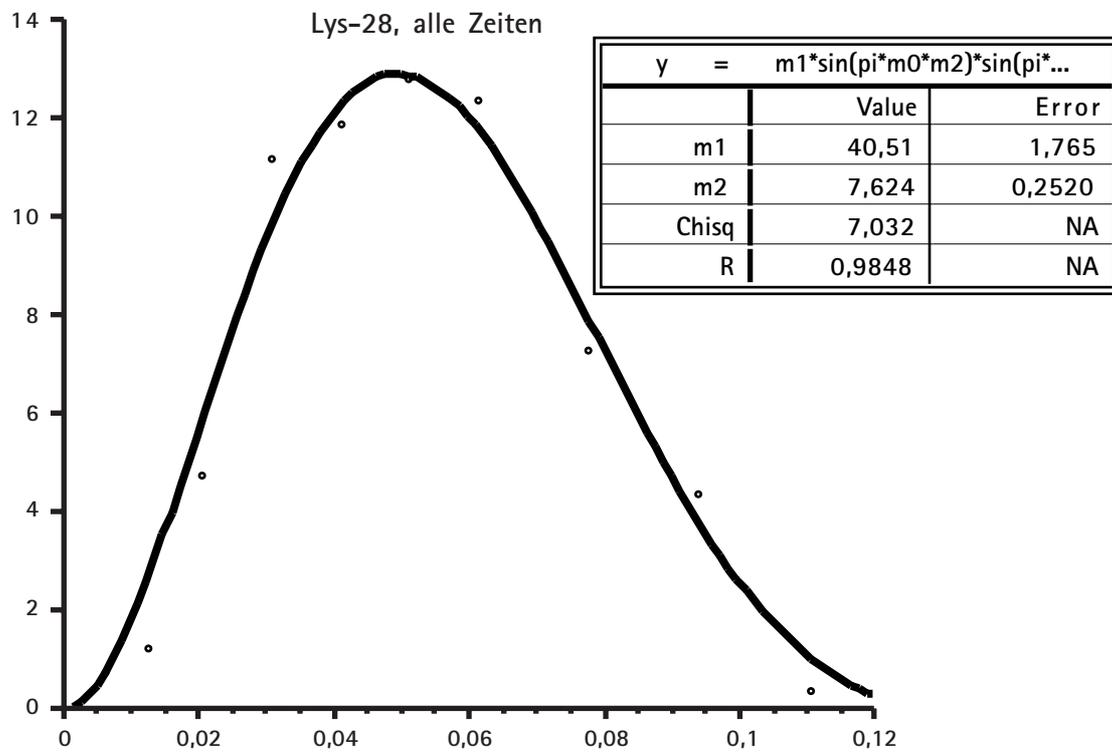


Abbildung 96: Lys-28, alle Mischzeiten.

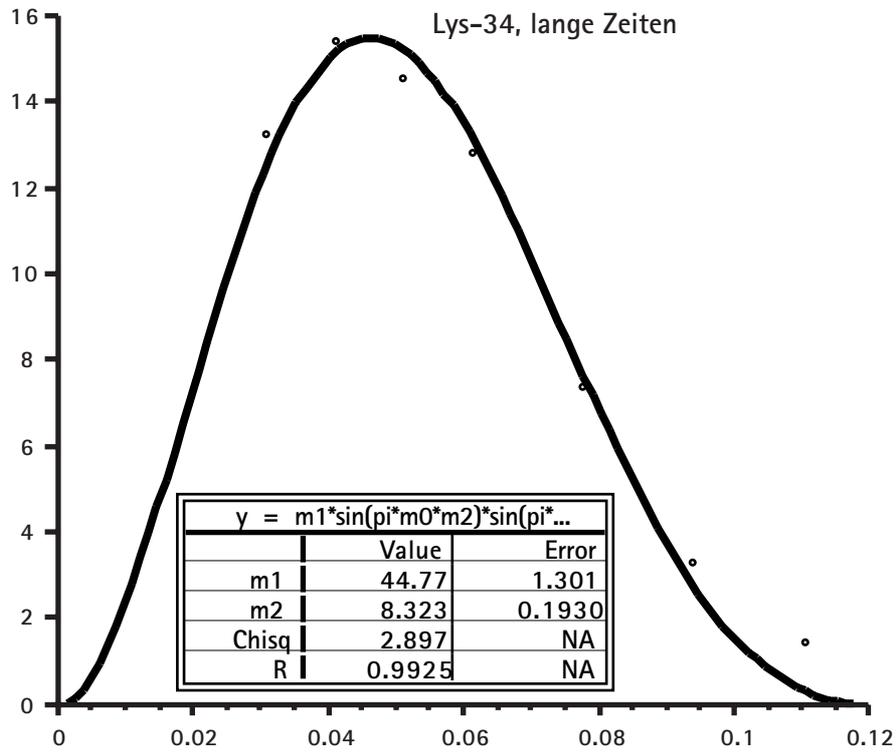


Abbildung 97: Lys-34, Mischzeiten > 40 ms.

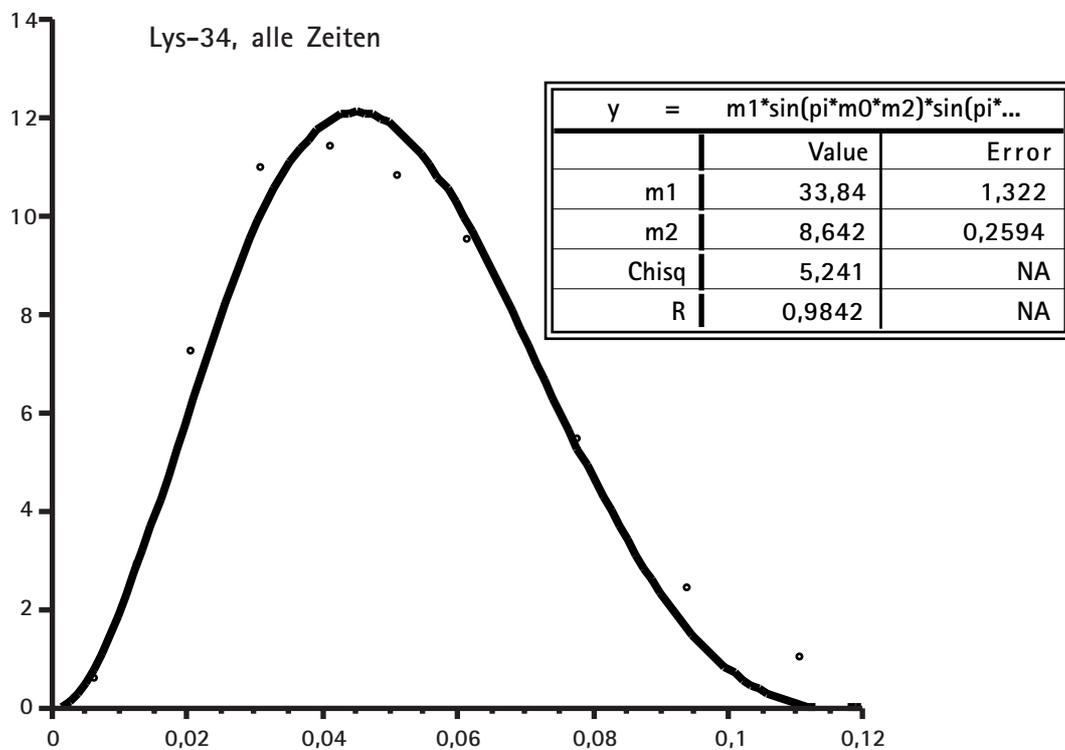


Abbildung 98: Lys-34, alle Mischzeiten.

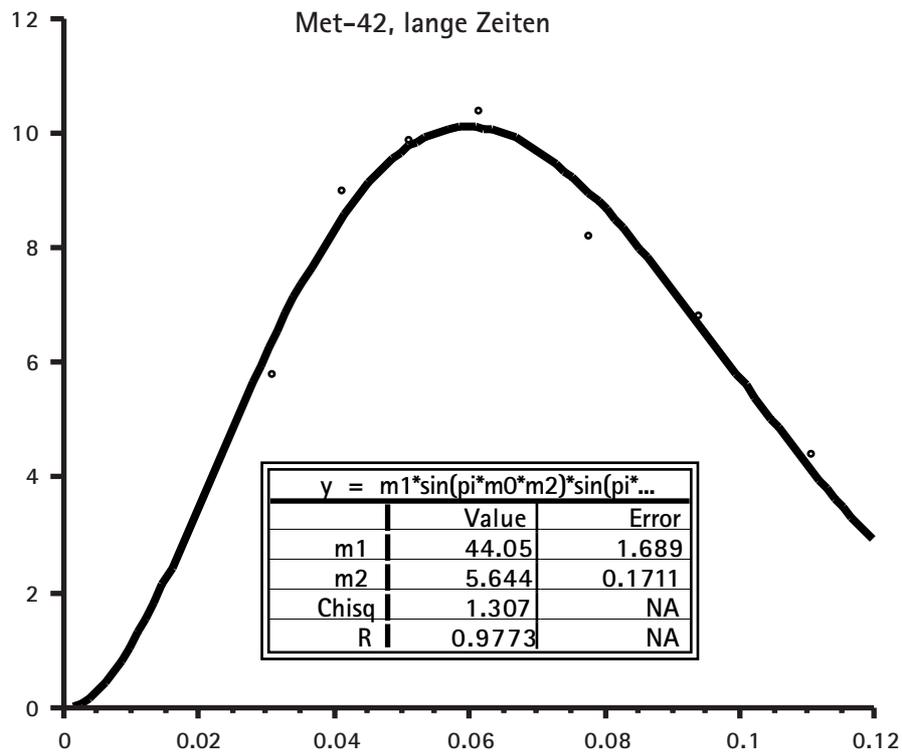


Abbildung 99: Met-42, Mischzeiten > 40 ms.

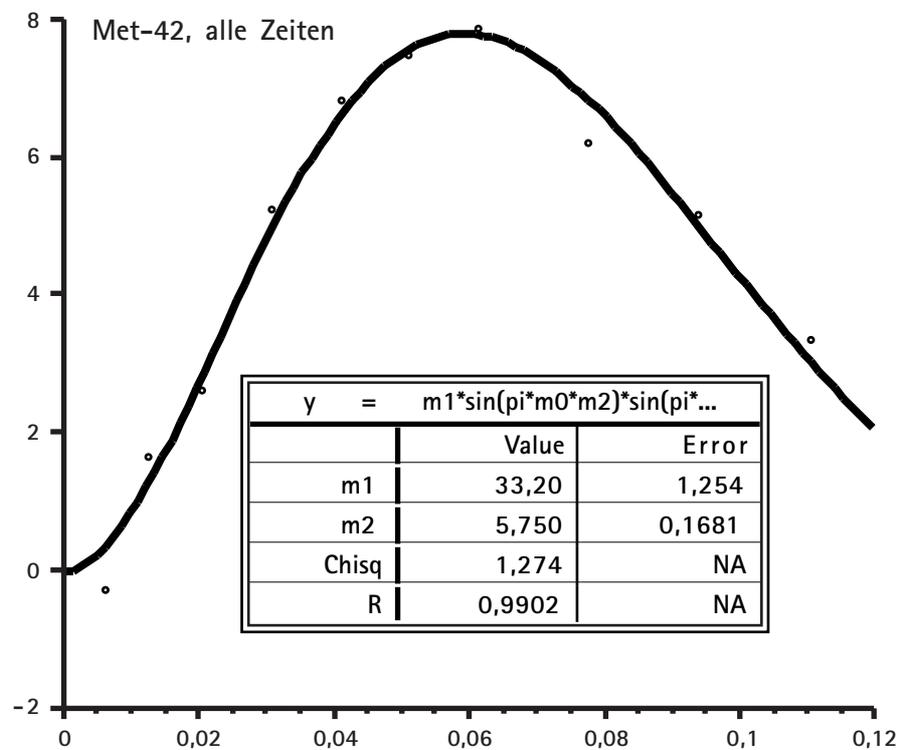


Abbildung 100: Met-42, alle Mischzeiten.

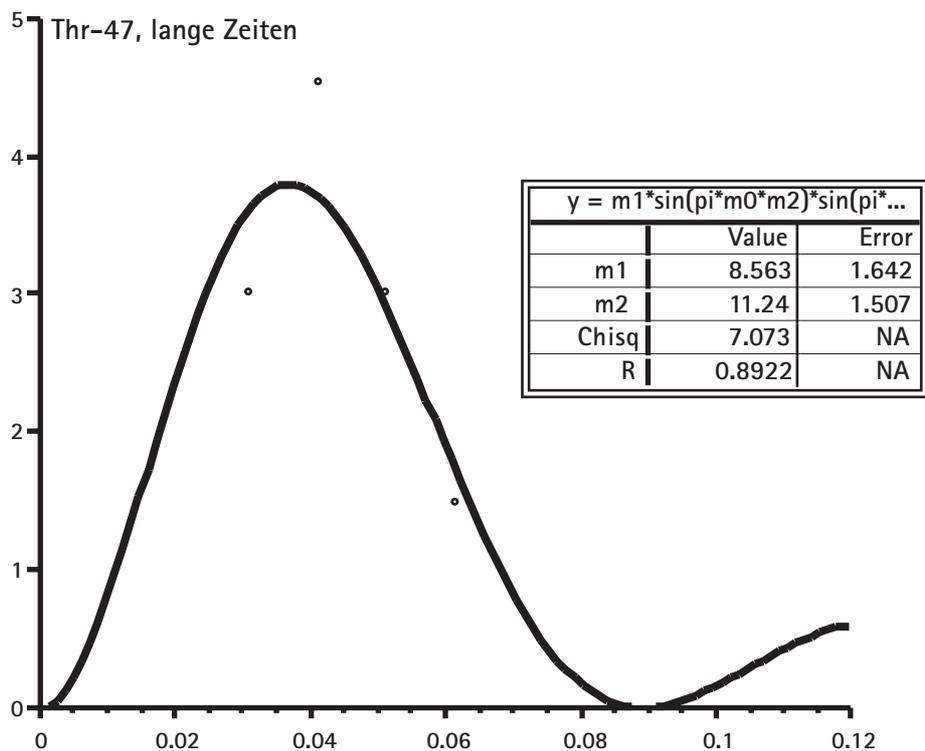


Abbildung 101: Thr-47, Mischzeiten > 40 ms.

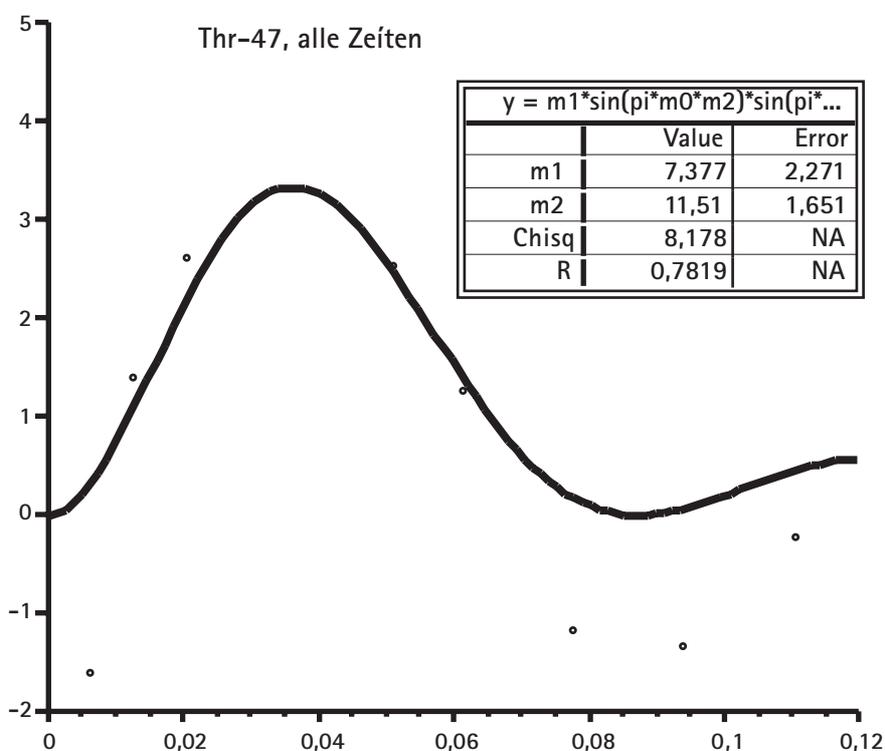


Abbildung 102: Thr-47, alle Mischzeiten.

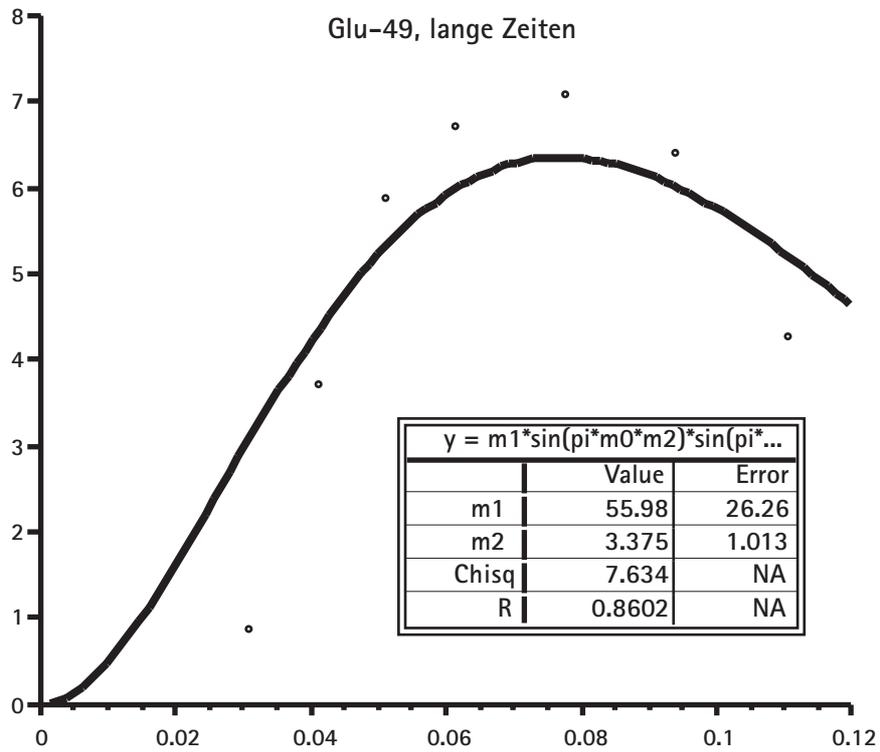


Abbildung 103: Glu-49, Mischzeiten > 40 ms.

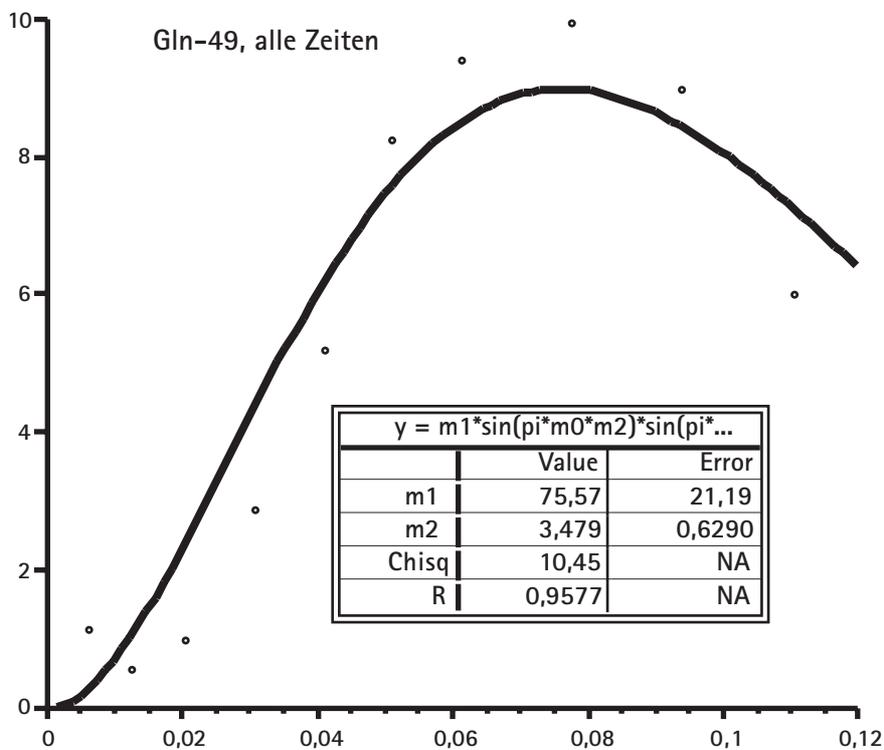


Abbildung 104: Glu-49, alle Mischzeiten.

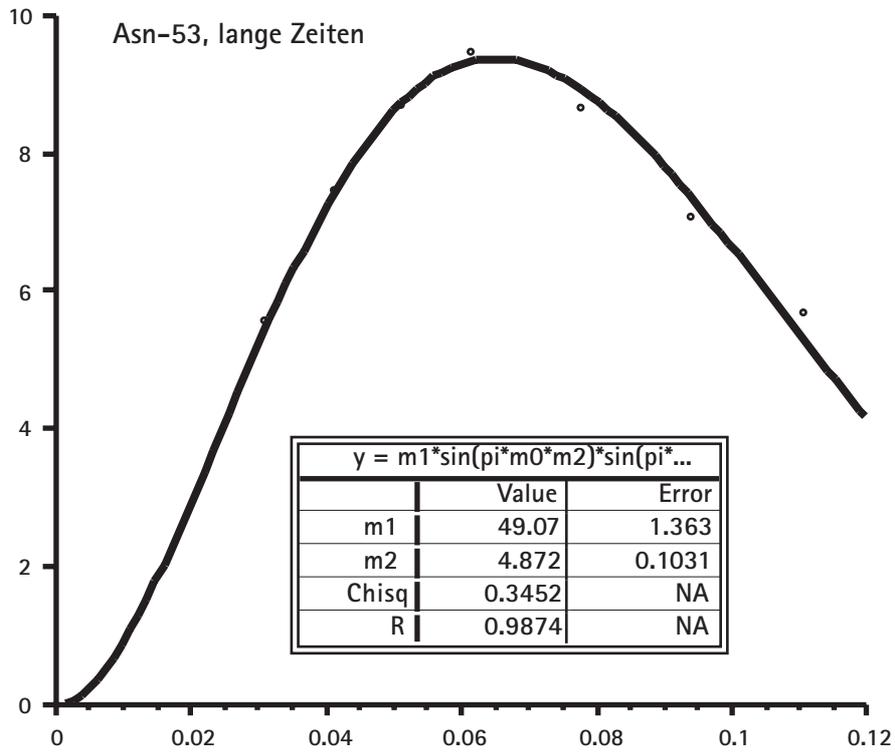


Abbildung 105: Asn-53, Mischzeiten > 40 ms.

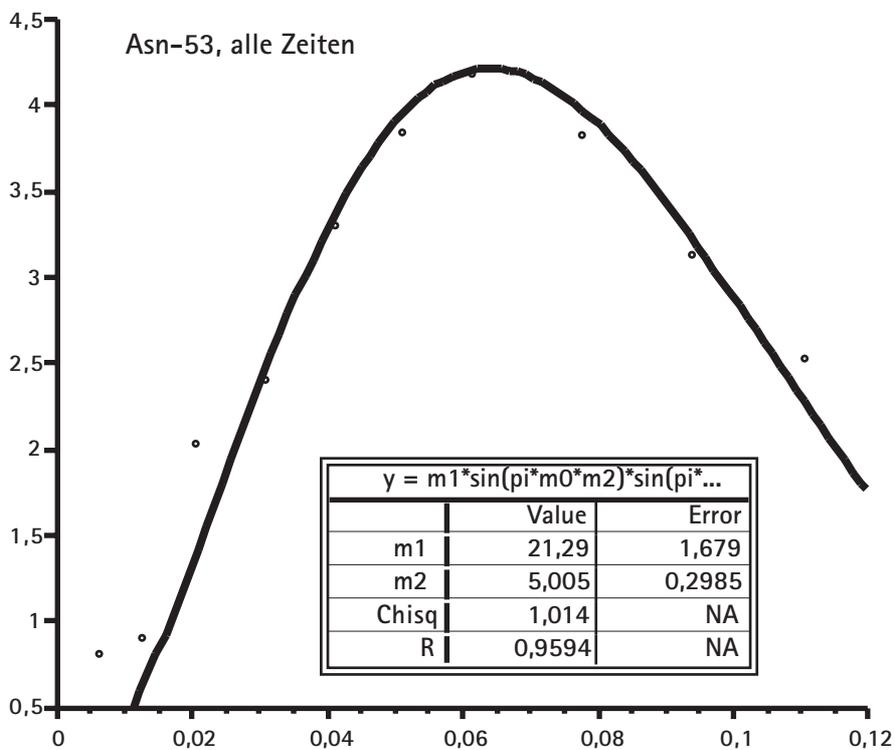


Abbildung 106: Asn-53, alle Mischzeiten.

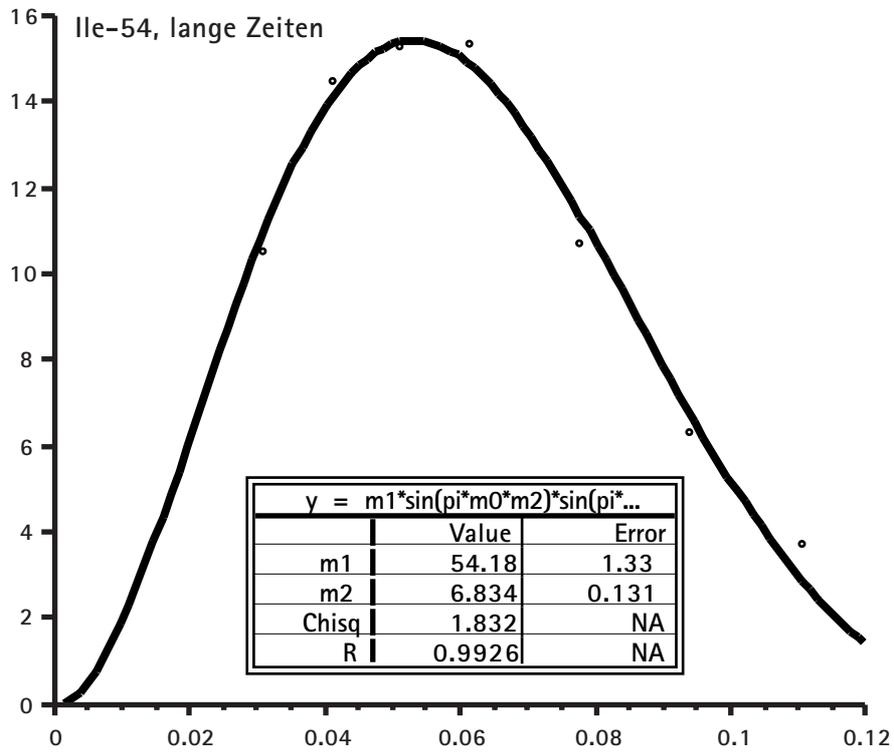


Abbildung 107: Ile-54,

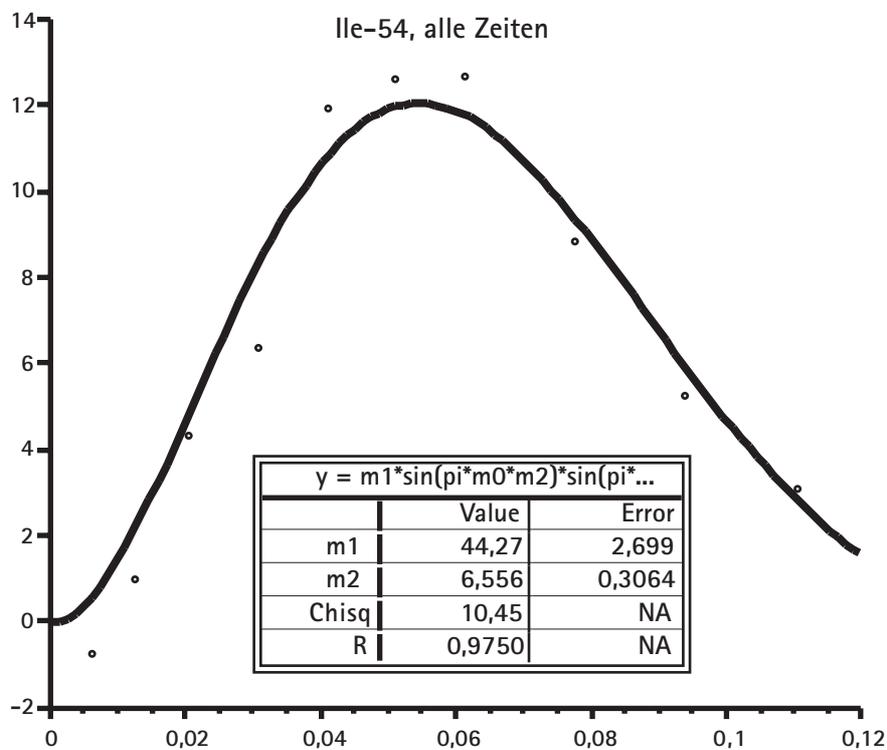


Abbildung 108: Ile-54, alle Mischzeiten.

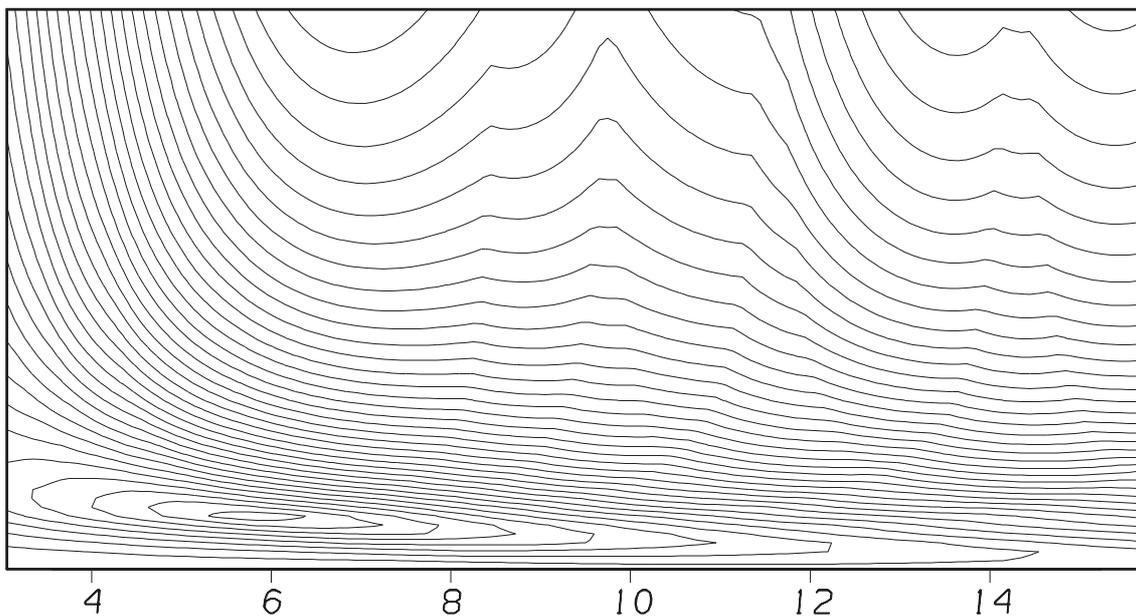


Abbildung 109: Phe-6, alle Werte, abgelesene Kopplung: 5.8 Hz.

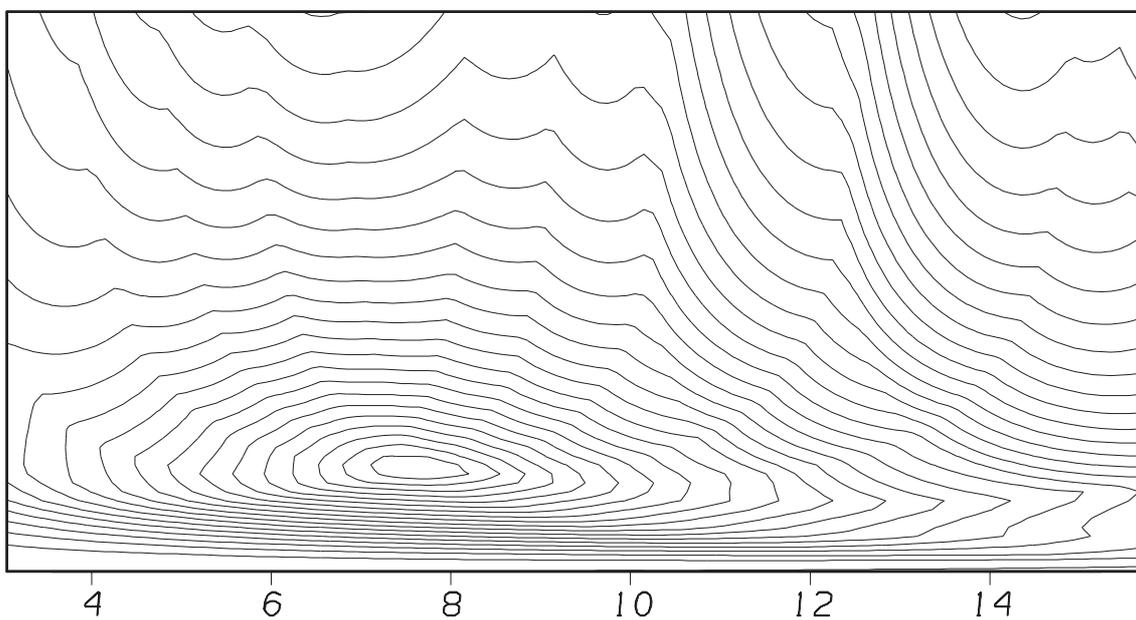


Abbildung 110: Leu-7, alle Zeiten, abgelesene Kopplung: 7.6 Hz.

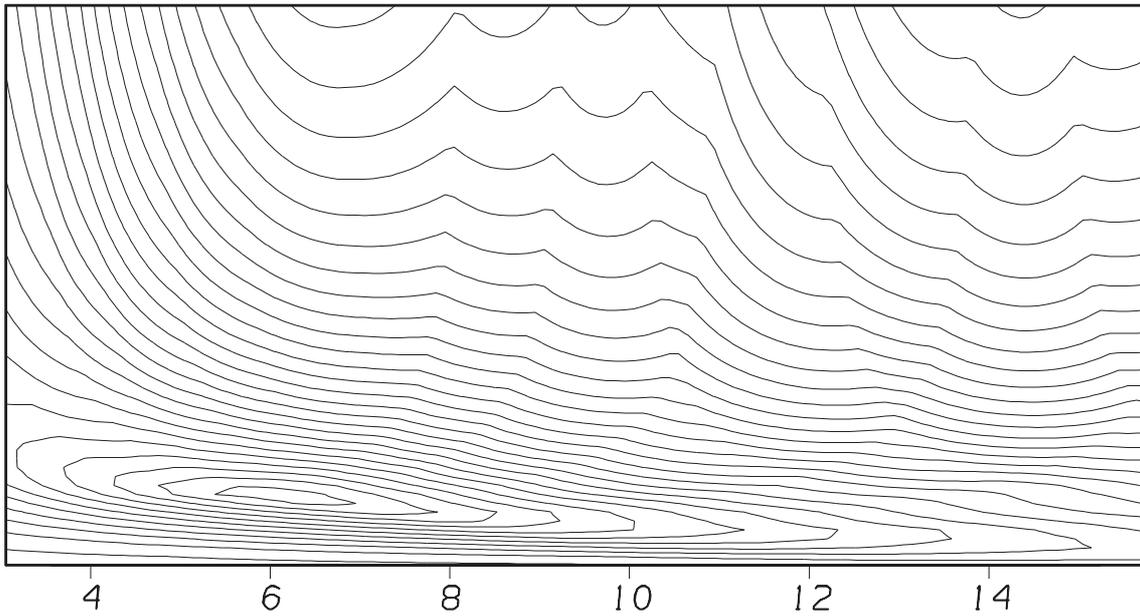


Abbildung 111: Glu-8, alle Zeiten, abgelesene Kopplung: 6.3 Hz.

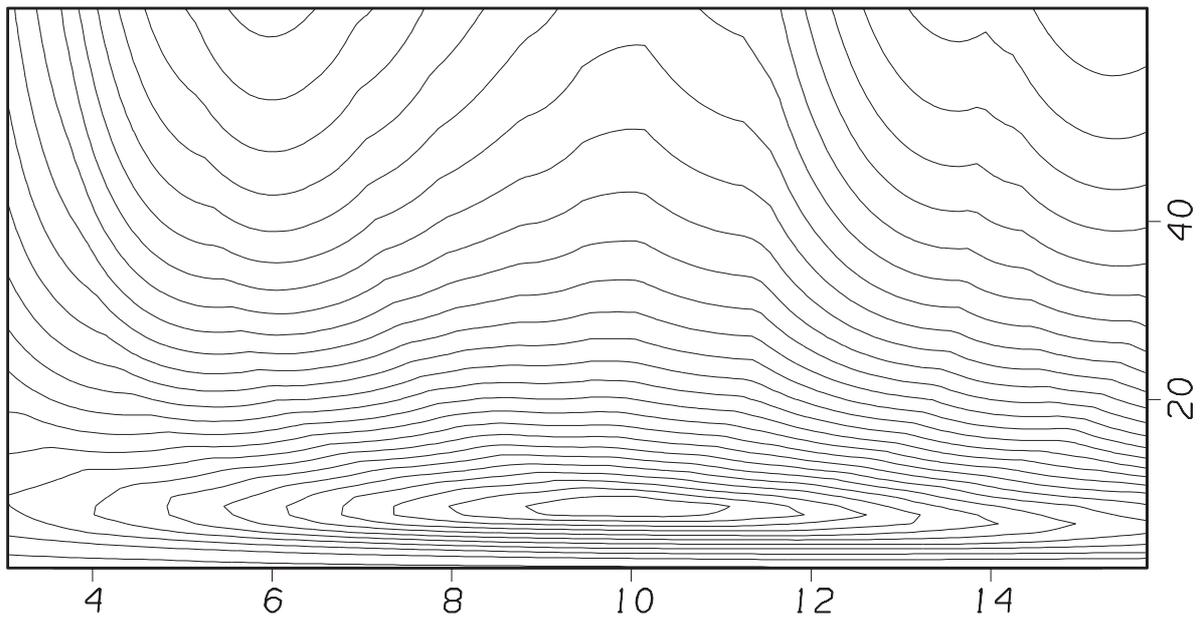


Abbildung 112: Asp-10, alle Werte, abgelesene Kopplung: 9.9 Hz.

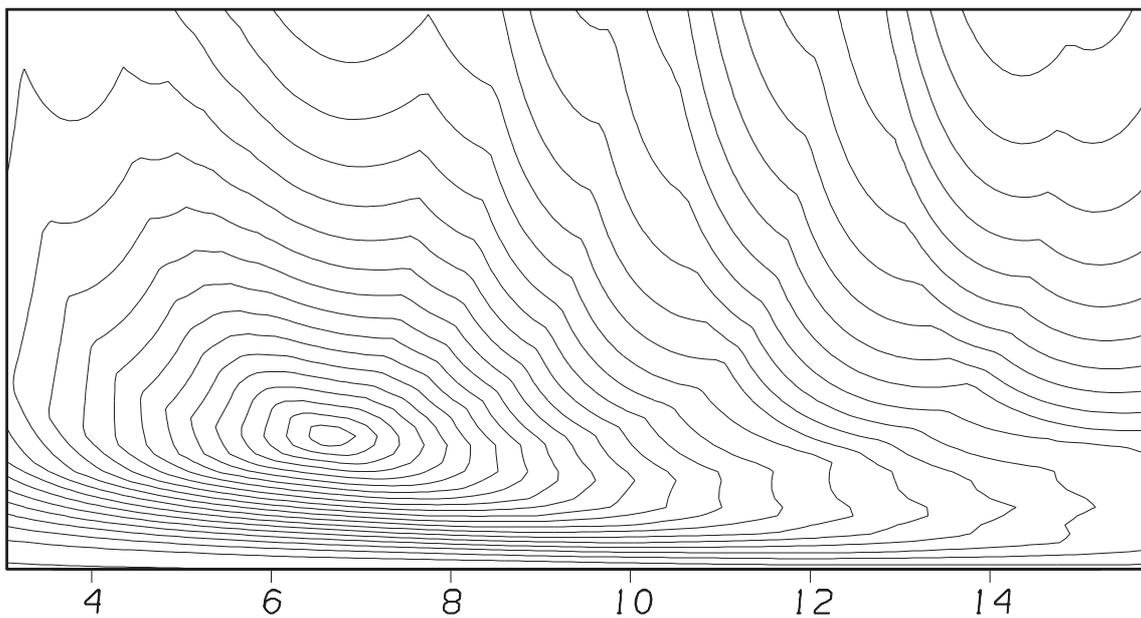


Abbildung 113: Cys-14, alle Werte, abgelesene Kopplung: 6.6 Hz.

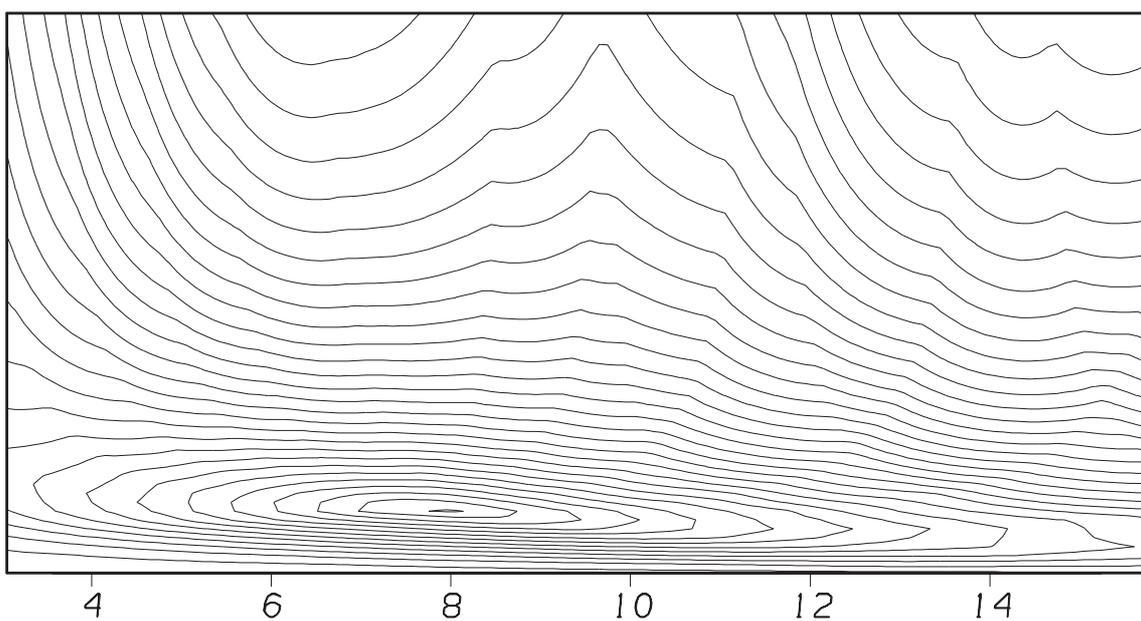


Abbildung 114: Arg-15, alle Werte, abgelesene Kopplung: 7.9 Hz.

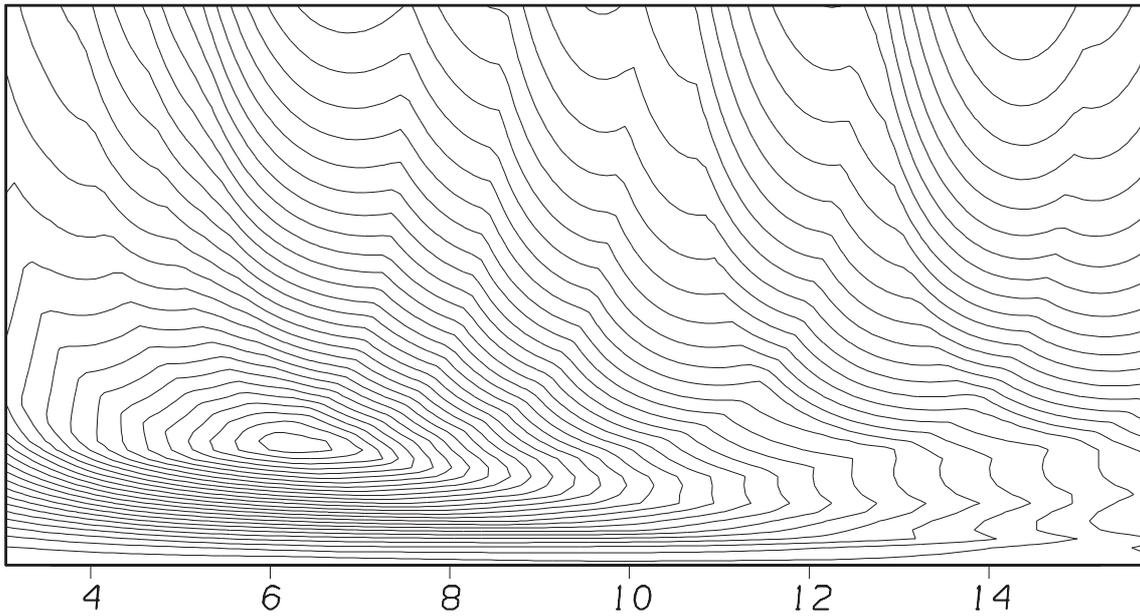


Abbildung 115: Thr-19, alle Werte, abgelesene Kopplung: 6.2 Hz.

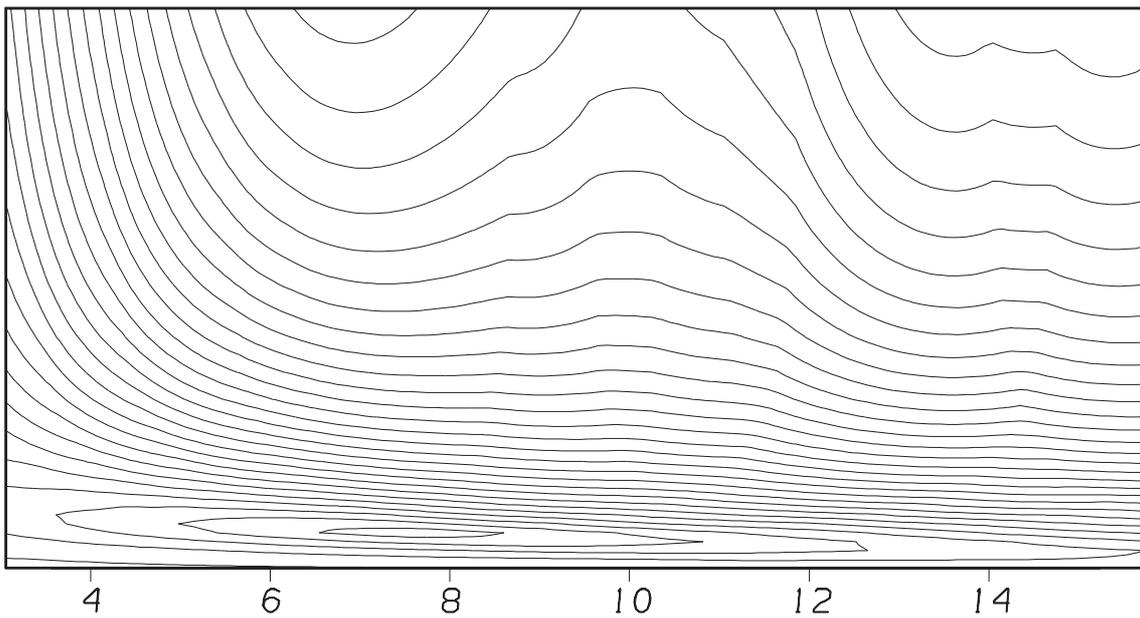


Abbildung 116: Tyr-21, alle Werte, abgelesene Kopplung: 7.3 Hz.

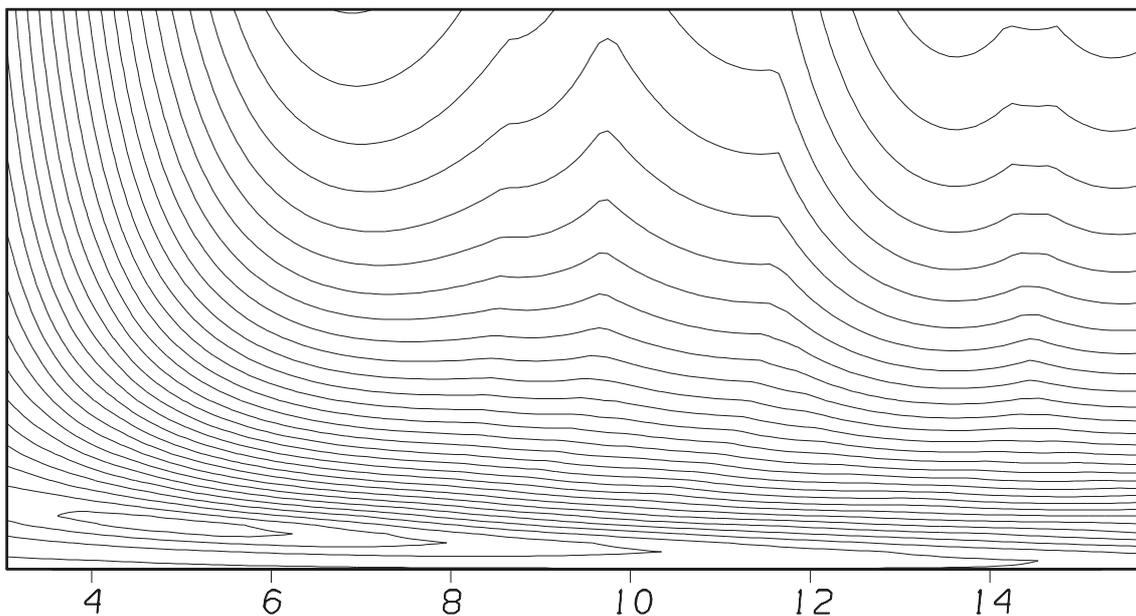


Abbildung 117: Asn-24, alle Werte, abgelesene Kopplung: 5.0 Hz.

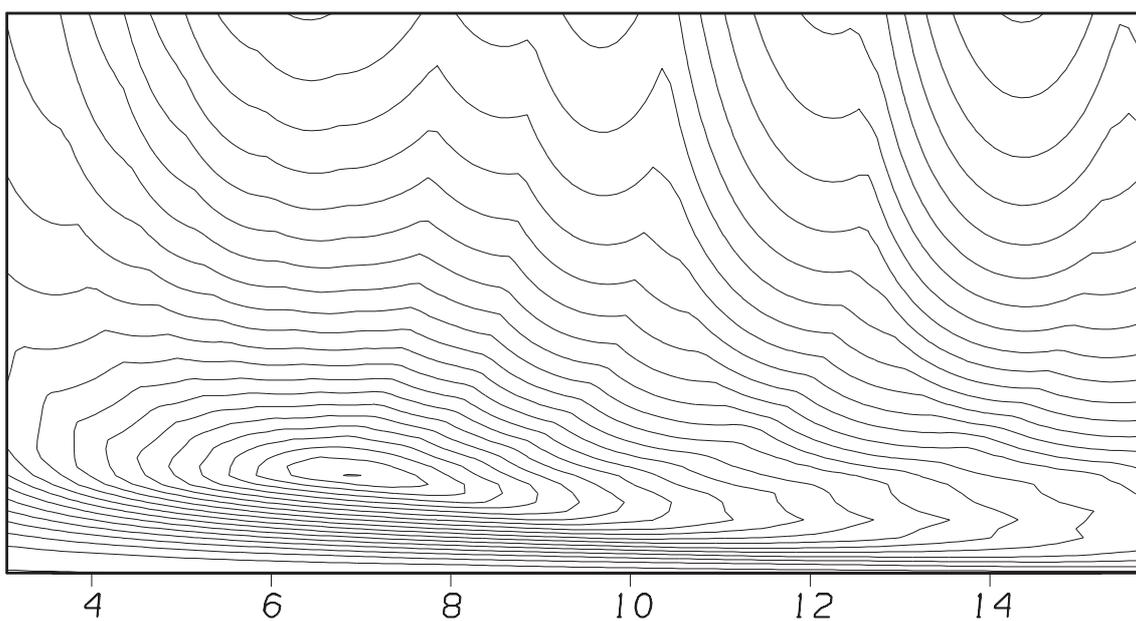


Abbildung 118: Glu-26, alle Werte, abgelesene Kopplung: 6.9 Hz.

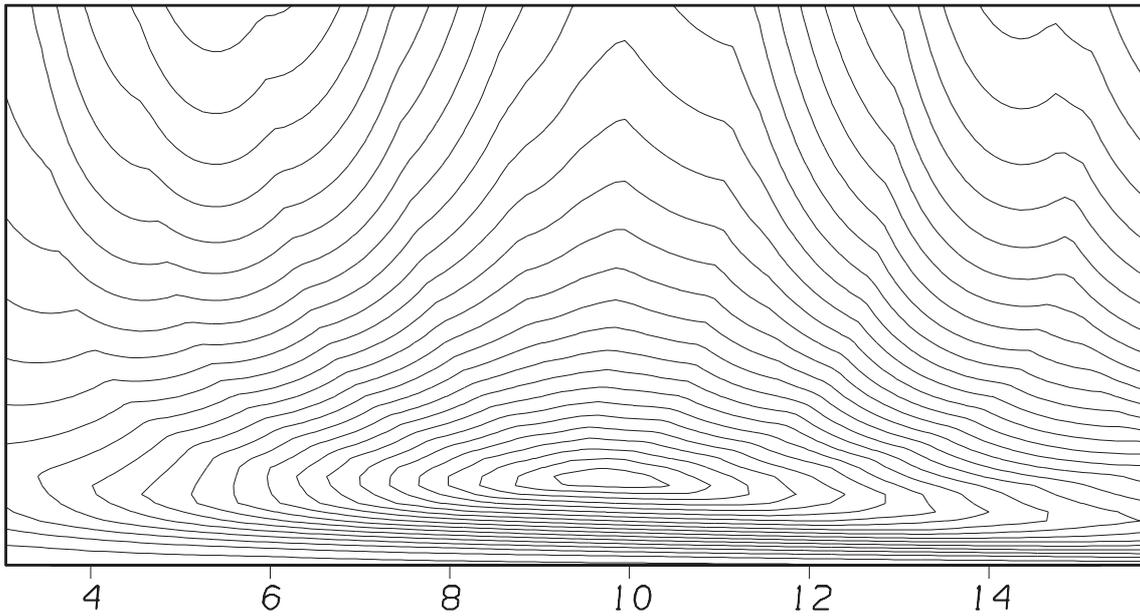


Abbildung 119: Thr-27, alle Werte, abgelesene Kopplung: 9.7 Hz.

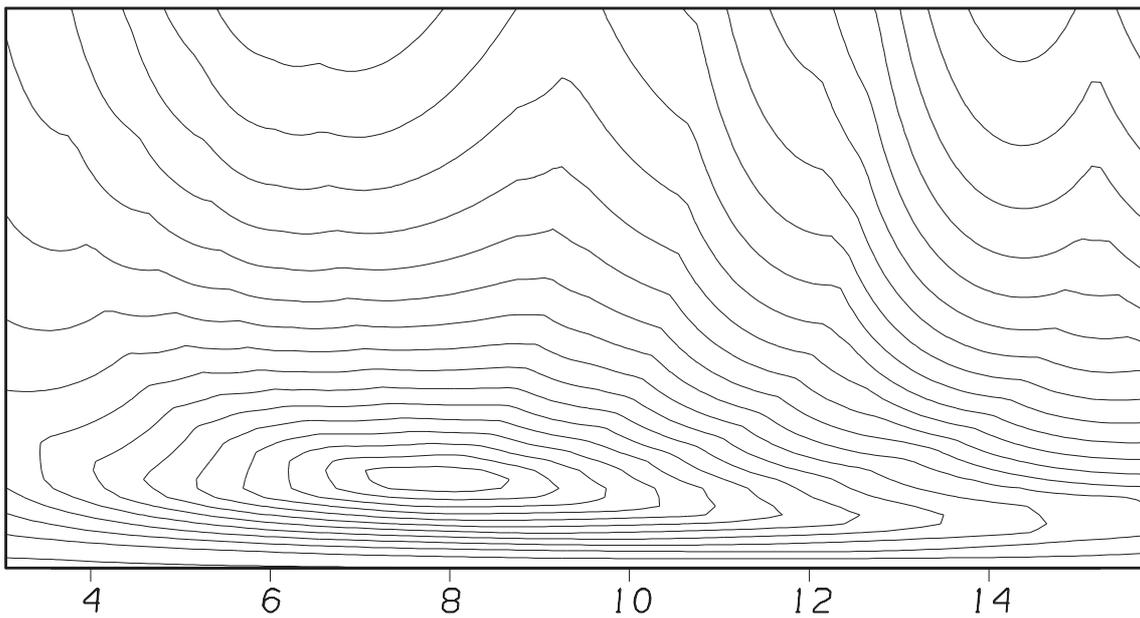


Abbildung 120: Lys-28, alle Werte, abgelesene Kopplung: 7.8 Hz.

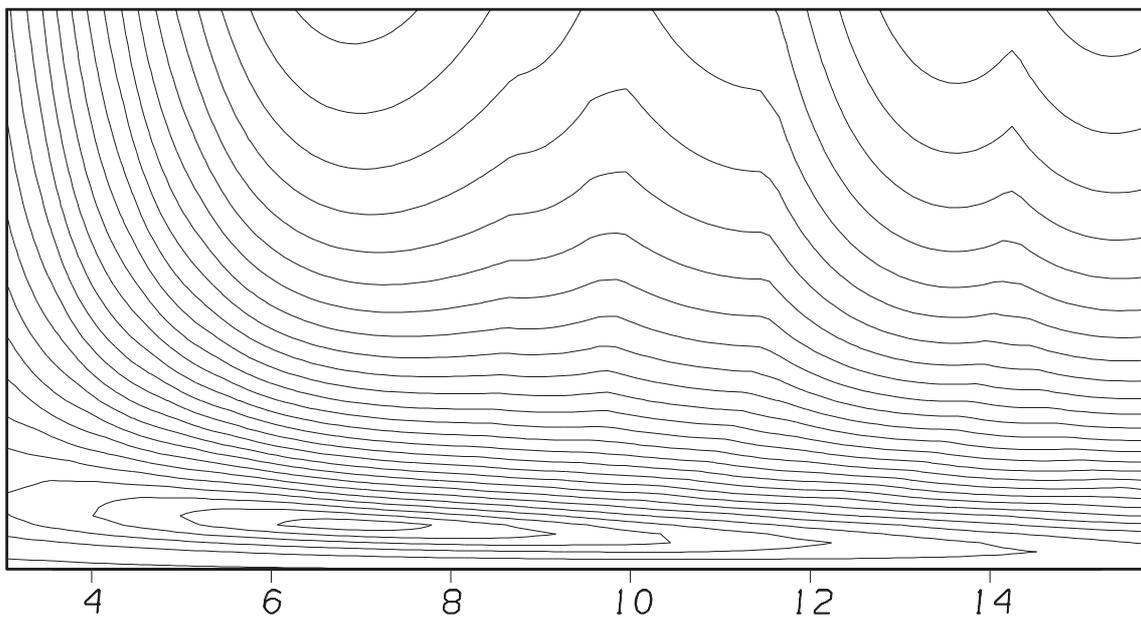


Abbildung 121: Lys-34, alle Werte, abgelesene Kopplung: 6.9 Hz.

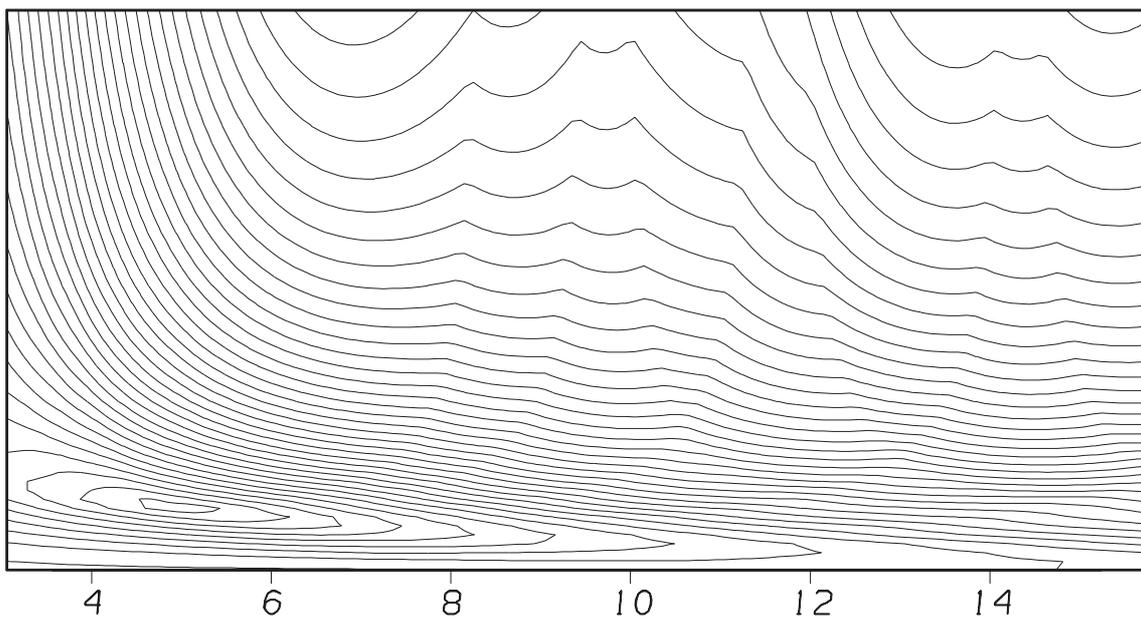


Abbildung 122: Met-42, alle Werte, abgelesene Kopplung: 4.9 Hz.

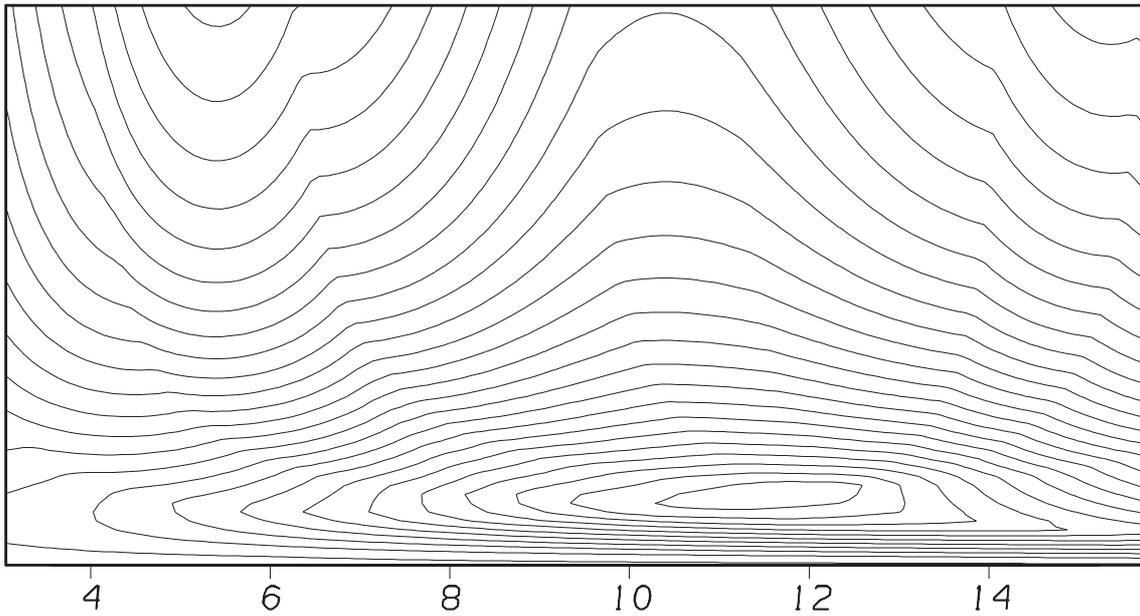


Abbildung 123: Thr-47, alle Werte, abgelesene Kopplung: 11.4 Hz.

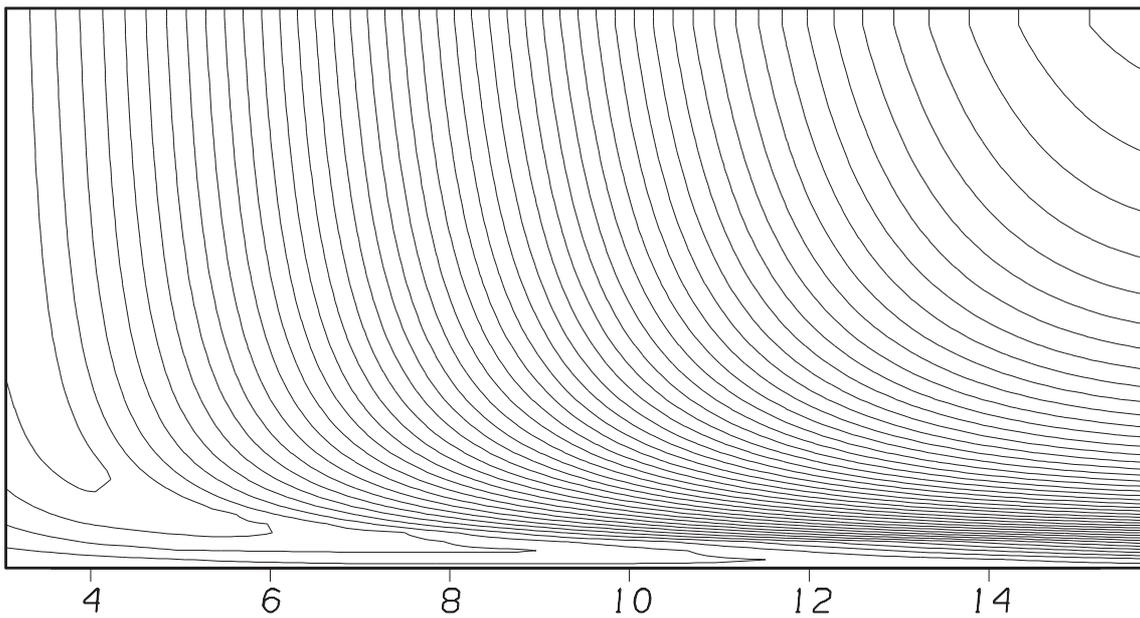


Abbildung 124: Glu-49, alle Werte, abgelesene Kopplung: 3.5 Hz.

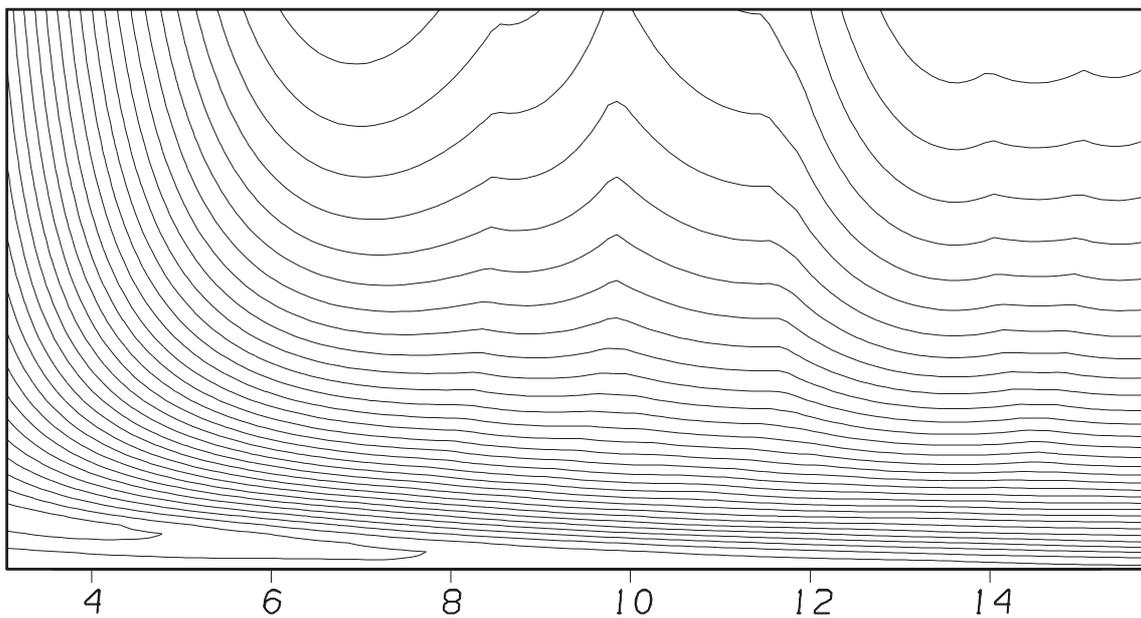


Abbildung 125: Asn-53, alle Werte, abgelesene Kopplung: 4.0 Hz.

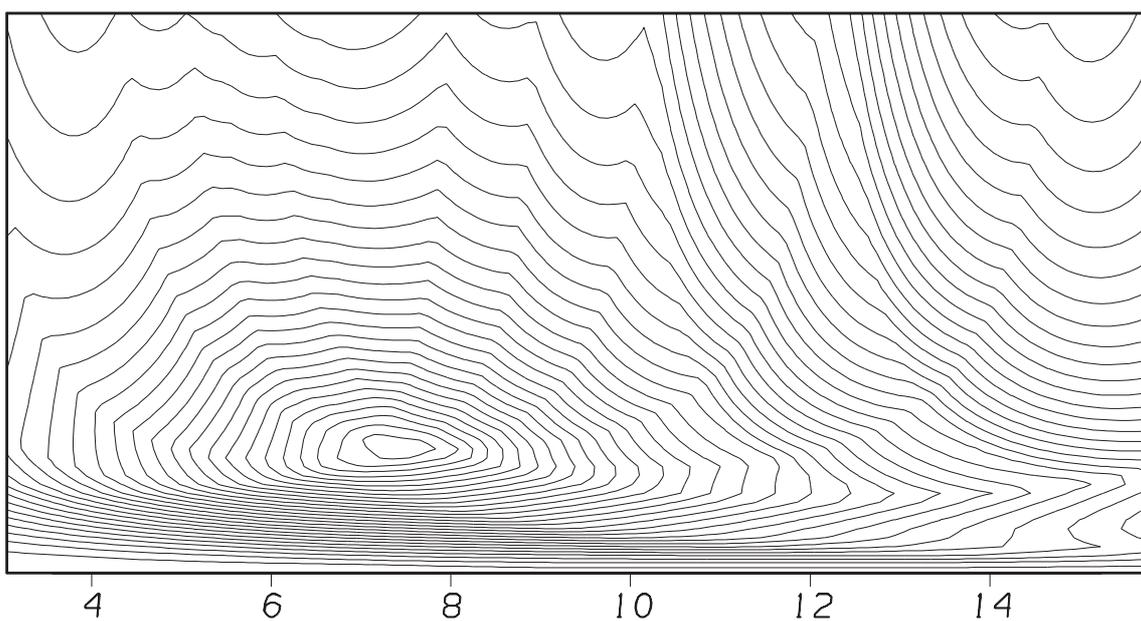


Abbildung 126: Ile-54, alle Werte, abgelesene Kopplung: 7.3 Hz.

C Die XPLOR-Dateien

C.1 Distanz NOEs

C.1.1 Interresiduale NOEs

```
assign (resid 43 and name HD22 )(resid 23 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 44 and name HA )(resid 45 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 22 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 21 and name HD* )(resid 22 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 21 and name HA )(resid 22 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 21 and name HB* )(resid 22 and name HN ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 38 and name HA )(resid 39 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 20 and name HN )(resid 33 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 32 and name HE )(resid 33 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 21 and name HA )(resid 33 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 32 and name HB2 )(resid 33 and name HN ) 4.300 4.300 0.000
assign (resid 19 and name HG2* )(resid 33 and name HN ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 22 and name HD* )(resid 31 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 30 and name HA )(resid 31 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 23 and name HA )(resid 31 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 30 and name HB2 )(resid 31 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 40 and name HA2 )(resid 41 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HN )(resid 21 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 22 and name HD1 )(resid 21 and name HN ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 20 and name HB2 )(resid 21 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 20 and name HB1 )(resid 21 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HA )(resid 46 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 34 and name HA )(resid 35 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 53 and name HN )(resid 52 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 51 and name HN )(resid 52 and name HN ) 4.300 4.300 0.000
assign (resid 49 and name HA )(resid 52 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 51 and name HB1 )(resid 52 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 39 and name HB1 )(resid 40 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 39 and name HB2 )(resid 40 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 39 and name HD1* )(resid 40 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 38 and name HA )(resid 40 and name HN ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 39 and name HA )(resid 40 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 19 and name HA )(resid 20 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
```

```
assign (resid 26 and name HN )(resid 25 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 51 and name HB2 )(resid 52 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 18 and name HB )(resid 19 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 7 and name HD2*)(resid 8 and name HN ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 33 and name HN )(resid 32 and name HN ) 4.600 4.600 0.000
assign (resid 28 and name HN )(resid 26 and name HN ) 4.500 4.500 0.000
assign (resid 27 and name HN )(resid 26 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 25 and name HB1 )(resid 26 and name HN ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 6 and name HN )(resid 5 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 3 and name HB1 )(resid 5 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 3 and name HB2 )(resid 5 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 6 and name HB1 )(resid 5 and name HN ) 4.100 4.100 0.000
assign (resid 48 and name HB2 )(resid 49 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 49 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HN )(resid 53 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 23 and name HB2 )(resid 43 and name HD22 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 52 and name HB1 )(resid 53 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 22 and name HD*)(resid 34 and name HN ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 24 and name HB1 )(resid 26 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 33 and name HA )(resid 34 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 33 and name HB2 )(resid 34 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 29 and name HN )(resid 28 and name HN ) 3.200 3.200 0.000
assign (resid 27 and name HN )(resid 28 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 27 and name HA )(resid 28 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 25 and name HA )(resid 28 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 6 and name HN )(resid 3 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 5 and name HB1 )(resid 3 and name HN ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 5 and name HB2 )(resid 3 and name HN ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 54 and name HB )(resid 3 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 54 and name HG2*)(resid 3 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 41 and name HB1 )(resid 42 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 41 and name HB2 )(resid 42 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 23 and name HN )(resid 43 and name HD21 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 47 and name HG2*)(resid 48 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 54 and name HB )(resid 45 and name HE* ) 4.800 4.800 0.000
assign (resid 39 and name HB2 )(resid 38 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HG12 )(resid 45 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 54 and name HD1*)(resid 45 and name HE* ) 6.000 6.000 0.000
assign (resid 8 and name HA )(resid 9 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 8 and name HG1 )(resid 9 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 8 and name HB1 )(resid 9 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 8 and name HB2 )(resid 9 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 53 and name HB2 )(resid 54 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 49 and name HN )(resid 50 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 29 and name HN )(resid 24 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 30 and name HA )(resid 24 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 23 and name HA )(resid 24 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 9 and name HA )(resid 10 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 45 and name HB1 )(resid 47 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 46 and name HB1 )(resid 47 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 46 and name HB2 )(resid 47 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HE*)(resid 47 and name HN ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 51 and name HN )(resid 45 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 51 and name HB2 )(resid 45 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 33 and name HA )(resid 22 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 33 and name HB1 )(resid 22 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 33 and name HB2 )(resid 22 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 31 and name HB2 )(resid 22 and name HE* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 24 and name HB1 )(resid 29 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 28 and name HA )(resid 29 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 23 and name HN )(resid 22 and name HD* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HA )(resid 22 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 9 and name HA )(resid 22 and name HD* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 33 and name HB2 )(resid 22 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 35 and name HB2 )(resid 33 and name HD2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 20 and name HB2 )(resid 22 and name HD1 ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 9 and name HG1 )(resid 22 and name HD* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 9 and name HB1 )(resid 22 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 33 and name HB1 )(resid 22 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 49 and name HA )(resid 50 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 28 and name HA )(resid 27 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 26 and name HG1 )(resid 27 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HG2 )(resid 27 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
```

```
assign (resid 48 and name HN )(resid 21 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 50 and name HG1 )(resid 51 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 50 and name HG1 )(resid 51 and name HN ) 4.500 4.500 0.000
assign (resid 30 and name HB2 )(resid 21 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 48 and name HA )(resid 21 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 28 and name HA )(resid 23 and name HE* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 25 and name HB1 )(resid 23 and name HE* ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 25 and name HA )(resid 23 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 23 and name HN )(resid 22 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 36 and name HN )(resid 11 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HE* )(resid 43 and name HA ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 45 and name HD1 )(resid 43 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 42 and name HN )(resid 41 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 36 and name HN )(resid 35 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 32 and name HN )(resid 31 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 48 and name HN )(resid 47 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 21 and name HE* )(resid 47 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 21 and name HD* )(resid 47 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 50 and name HA )(resid 53 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 47 and name HA ) 6.000 6.000 0.000
assign (resid 7 and name HD1* )(resid 4 and name HA ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 49 and name HN )(resid 47 and name HB ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 48 and name HN )(resid 47 and name HB ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 8 and name HN )(resid 7 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 41 and name HN )(resid 40 and name HA1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 25 and name HN )(resid 24 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 41 and name HD21 )(resid 40 and name HA1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 25 and name HB1 )(resid 24 and name HA ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 19 and name HB )(resid 34 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HD* )(resid 32 and name HA ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 30 and name HA )(resid 23 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 10 and name HA )(resid 11 and name HD2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 43 and name HN )(resid 42 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 5 and name HN )(resid 6 and name HA ) 4.600 4.600 0.000
assign (resid 14 and name HN )(resid 15 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 41 and name HD21 )(resid 40 and name HA2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 53 and name HB2 )(resid 50 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 53 and name HB1 )(resid 50 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 10 and name HA )(resid 11 and name HD1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 52 and name HG1 )(resid 49 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 25 and name HA )(resid 28 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 43 and name HD22 )(resid 23 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 42 and name HE* )(resid 41 and name HB1 ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 19 and name HG2* )(resid 32 and name HD2 ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 22 and name HB2 )(resid 43 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 42 and name HE* )(resid 41 and name HB2 ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 43 and name HB2 )(resid 44 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 52 and name HB2 )(resid 53 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 51 and name HB1 )(resid 50 and name HB1 ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 23 and name HN )(resid 22 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 21 and name HB* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 47 and name HG2* )(resid 46 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 11 and name HD1 )(resid 10 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 34 and name HG2 )(resid 35 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 47 and name HG2* )(resid 50 and name HG1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 5 and name HN )(resid 6 and name HB2 ) 4.500 4.500 0.000
assign (resid 30 and name HN )(resid 29 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HD* )(resid 51 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 36 and name HA1 )(resid 15 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 52 and name HG1 ) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 22 and name HD* )(resid 9 and name HG2 ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 49 and name HN )(resid 47 and name HG2* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 46 and name HB2 )(resid 47 and name HG2* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 32 and name HD1 )(resid 19 and name HG2* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 52 and name HE1 )(resid 48 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HE* )(resid 48 and name HB1 ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 21 and name HD* )(resid 48 and name HB1 ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 30 and name HB1 )(resid 48 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 22 and name HE* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 32 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 24 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 46 and name HN )(resid 47 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 22 and name HN )(resid 33 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
```

```
assign (resid 41 and name HN )(resid 40 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 18 and name HN )(resid 35 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 33 and name HN )(resid 34 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 41 and name HN )(resid 42 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 46 and name HN )(resid 45 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 21 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 33 and name HN )(resid 21 and name HD* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 21 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HN )(resid 30 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 22 and name HN )(resid 32 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 33 and name HN )(resid 34 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 21 and name HN )(resid 20 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 33 and name HN )(resid 32 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 30 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HN )(resid 45 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 23 and name HN )(resid 22 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HN )(resid 20 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 33 and name HN )(resid 32 and name HG2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 45 and name HN )(resid 20 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 40 and name HN )(resid 39 and name HD2* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 30 and name HN )(resid 48 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HN )(resid 27 and name HG2* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 8 and name HN )(resid 7 and name HD1* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 20 and name HN )(resid 19 and name HG2* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 35 and name HN )(resid 34 and name HG2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 35 and name HN )(resid 34 and name HB2 ) 4.800 4.800 0.000
assign (resid 52 and name HN )(resid 51 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 30 and name HN )(resid 29 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 46 and name HN )(resid 45 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HN )(resid 25 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 19 and name HN )(resid 20 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 12 and name HN )(resid 10 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 35 and name HN )(resid 11 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 49 and name HN )(resid 47 and name HA ) 4.700 4.700 0.000
assign (resid 30 and name HN )(resid 29 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 8 and name HN )(resid 7 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 20 and name HN )(resid 22 and name HD1 ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 52 and name HN )(resid 54 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 8 and name HN )(resid 9 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 50 and name HN )(resid 48 and name HN ) 4.000 4.000 0.000
assign (resid 9 and name HN )(resid 22 and name HE* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 50 and name HN )(resid 51 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 48 and name HN )(resid 21 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 45 and name HZ )(resid 43 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 54 and name HN )(resid 53 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 3 and name HN )(resid 6 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 53 and name HN )(resid 52 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 53 and name HN )(resid 49 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 3 and name HN )(resid 55 and name HB* ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 54 and name HN )(resid 53 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 24 and name HN )(resid 23 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 50 and name HN )(resid 49 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HE* )(resid 51 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HZ )(resid 54 and name HB ) 3.100 3.100 0.000
assign (resid 28 and name HN )(resid 27 and name HG2* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 53 and name HN )(resid 54 and name HG12 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HZ )(resid 54 and name HG12 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 45 and name HE* )(resid 54 and name HG11 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 10 and name HN )(resid 9 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 22 and name HE* )(resid 9 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HE* )(resid 9 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 22 and name HD* )(resid 9 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 4 and name HN )(resid 2 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 22 and name HD* )(resid 31 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 21 and name HD* )(resid 32 and name HB2 ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 21 and name HD* )(resid 32 and name HG2 ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 51 and name HN )(resid 48 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HE* )(resid 9 and name HG2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HE* )(resid 9 and name HG1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 51 and name HN )(resid 50 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HZ )(resid 51 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 6 and name HN )(resid 3 and name HB1 ) 4.000 4.000 0.000
assign (resid 4 and name HN )(resid 2 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
```

```
assign (resid 47 and name HN )(resid 45 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 38 and name HN )(resid 36 and name HA2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 51 and name HN )(resid 50 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 10 and name HN )(resid 8 and name HA ) 6.000 6.000 0.000
assign (resid 45 and name HD* )(resid 44 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 32 and name HE )(resid 22 and name HD* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 21 and name HE* )(resid 32 and name HN ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 21 and name HD* )(resid 32 and name HN ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 51 and name HN )(resid 49 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HD* )(resid 9 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 42 and name HN )(resid 43 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 24 and name HN )(resid 23 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 44 and name HN )(resid 43 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 47 and name HN )(resid 50 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 51 and name HN )(resid 47 and name HB ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 21 and name HD* )(resid 20 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 23 and name HE* )(resid 28 and name HB2 ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 51 and name HB1 )(resid 48 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 49 and name HA )(resid 52 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 49 and name HA )(resid 52 and name HB1 ) 4.300 4.300 0.000
assign (resid 45 and name HB1 )(resid 46 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 40 and name HA2 )(resid 42 and name HG2 ) 6.200 6.200 0.000
assign (resid 44 and name HB1 )(resid 45 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 44 and name HB2 )(resid 45 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 24 and name HB1 )(resid 25 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 55 and name HB* )(resid 3 and name HN ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 43 and name HB2 )(resid 42 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 30 and name HB2 )(resid 21 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HB2 )(resid 21 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 23 and name HB2 )(resid 30 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 23 and name HB2 )(resid 22 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 46 and name HB1 )(resid 45 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 14 and name HB1 )(resid 15 and name HA ) 4.400 4.400 0.000
assign (resid 26 and name HG1 )(resid 27 and name HG2* ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 46 and name HB2 )(resid 45 and name HB2 ) 6.000 6.000 0.000
assign (resid 35 and name HB1 )(resid 34 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 35 and name HB2 )(resid 34 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 46 and name HB2 )(resid 45 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 11 and name HG1 )(resid 10 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 11 and name HG2 )(resid 10 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 6 and name HB2 )(resid 3 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 48 and name HB2 )(resid 21 and name HE* ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 52 and name HG2 )(resid 53 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 34 and name HB1 )(resid 33 and name HA ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 48 and name HB2 )(resid 47 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 24 and name HB2 )(resid 23 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 39 and name HB2 )(resid 40 and name HA2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 54 and name HG12 )(resid 53 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 9 and name HB2 )(resid 22 and name HD* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 51 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 54 and name HD1* )(resid 53 and name HB1 ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 54 and name HD1* )(resid 53 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 54 and name HD1* )(resid 45 and name HD* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 52 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 39 and name HD1* )(resid 38 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 42 and name HE* )(resid 41 and name HA ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 42 and name HG1 )(resid 41 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 7 and name HD1* )(resid 4 and name HA ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 19 and name HG2* )(resid 32 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HN )(resid 23 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HE* )(resid 24 and name HB2 ) 6.500 6.500 0.000
assign (resid 21 and name HN )(resid 20 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 27 and name HN )(resid 25 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 25 and name HB2 )(resid 23 and name HE1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 4 and name HN )(resid 2 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 10 and name HN )(resid 43 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 48 and name HD1* )(resid 52 and name HG1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 47 and name HN )(resid 50 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 4 and name HB1 )(resid 7 and name HD1* ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 30 and name HA )(resid 29 and name HG2 ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 28 and name HB1 )(resid 29 and name HG2 ) 3.200 3.200 0.000
assign (resid 27 and name HG2* )(resid 29 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 53 and name HB2 )(resid 54 and name HG11 ) 5.500 5.500 0.000
```

```
assign (resid 27 and name HN )(resid 29 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HD1* )(resid 45 and name HZ ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 52 and name HE1 )(resid 48 and name HD1* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 48 and name HD1* )(resid 49 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 35 and name HN )(resid 11 and name HD1 ) 6.000 6.000 0.000
assign (resid 10 and name HB2 )(resid 11 and name HD1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 23 and name HE* )(resid 6 and name HA ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 57 and name HN )(resid 56 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 55 and name HN )(resid 54 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HN )(resid 55 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 38 and name HN )(resid 39 and name HA ) 4.500 4.500 0.000
assign (resid 40 and name HN )(resid 41 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 41 and name HN )(resid 42 and name HA ) 7.500 7.500 0.000
assign (resid 42 and name HN )(resid 43 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 44 and name HA )(resid 43 and name HN ) 5.000 5.000 0.000
assign (resid 17 and name HA )(resid 18 and name HN ) 4.000 4.000 0.000
assign (resid 17 and name HN )(resid 18 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 19 and name HN )(resid 18 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
```

C.1.2 Intraresiduale NOEs

```
assign (resid 45 and name HB1 )(resid 45 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HA )(resid 45 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 22 and name HD* )(resid 22 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 22 and name HA )(resid 22 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 39 and name HA )(resid 39 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 31 and name HB2 )(resid 31 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HD* )(resid 21 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HA )(resid 21 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HB* )(resid 21 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 46 and name HB1 )(resid 46 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 46 and name HB2 )(resid 46 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 12 and name HA2 )(resid 12 and name HN ) 2.900 2.900 0.000
assign (resid 35 and name HB1 )(resid 35 and name HN ) 3.200 3.200 0.000
assign (resid 35 and name HB2 )(resid 35 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 52 and name HA )(resid 52 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 52 and name HG2 )(resid 52 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 52 and name HG1 )(resid 52 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 40 and name HA2 )(resid 40 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 36 and name HA1 )(resid 36 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 36 and name HA2 )(resid 36 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 25 and name HB1 )(resid 25 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 25 and name HA )(resid 25 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 19 and name HB )(resid 19 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 19 and name HG2* )(resid 19 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 8 and name HA )(resid 8 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 8 and name HG1 )(resid 8 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 8 and name HB1 )(resid 8 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 8 and name HB2 )(resid 8 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 30 and name HB1 )(resid 30 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 30 and name HB2 )(resid 30 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 32 and name HG2 )(resid 32 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HA )(resid 26 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HB2 )(resid 26 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HG1 )(resid 26 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 43 and name HD21 )(resid 43 and name HN ) 4.500 4.500 0.000
assign (resid 49 and name HA )(resid 49 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 43 and name HB2 )(resid 43 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 49 and name HB2 )(resid 49 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 49 and name HB1 )(resid 49 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 15 and name HB1 )(resid 15 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 53 and name HA )(resid 53 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 53 and name HB1 )(resid 53 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 43 and name HD21 )(resid 43 and name HD22 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 34 and name HB1 )(resid 34 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 34 and name HA )(resid 34 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 34 and name HB2 )(resid 34 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 32 and name HD1 )(resid 32 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 28 and name HA )(resid 28 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 28 and name HB1 )(resid 28 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 28 and name HG2 )(resid 28 and name HN ) 4.500 4.500 0.000
assign (resid 43 and name HB2 )(resid 43 and name HD22 ) 3.800 3.800 0.000
```

```
assign (resid 42 and name HE* )(resid 42 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 42 and name HA )(resid 42 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 42 and name HB2 )(resid 42 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 43 and name HB1 )(resid 43 and name HD21 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 43 and name HB2 )(resid 43 and name HD21 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 48 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HZ )(resid 45 and name HE* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 45 and name HD* )(resid 45 and name HE* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 9 and name HA )(resid 9 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 9 and name HB1 )(resid 9 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 9 and name HB2 )(resid 9 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HA )(resid 54 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HB )(resid 54 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 54 and name HG12 )(resid 54 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HD1* )(resid 54 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 50 and name HB2 )(resid 50 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 50 and name HG1 )(resid 50 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 50 and name HG2 )(resid 50 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 50 and name HA )(resid 50 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 24 and name HB1 )(resid 24 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 24 and name HB2 )(resid 24 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 6 and name HA )(resid 6 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 6 and name HB1 )(resid 6 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 6 and name HB2 )(resid 6 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 33 and name HZ )(resid 33 and name HE* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 33 and name HD* )(resid 33 and name HE* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 7 and name HB2 )(resid 7 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 7 and name HD2* )(resid 7 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 7 and name HB1 )(resid 7 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 7 and name HD1* )(resid 7 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 7 and name HA )(resid 7 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 33 and name HD* )(resid 33 and name HZ ) 4.260 4.260 0.000
assign (resid 47 and name HG2* )(resid 47 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 57 and name HB1 )(resid 57 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 57 and name HB2 )(resid 57 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 4 and name HB1 )(resid 4 and name HN ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 45 and name HZ )(resid 45 and name HD* ) 4.260 4.260 0.000
assign (resid 45 and name HA )(resid 45 and name HD* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HB1 )(resid 45 and name HD* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 45 and name HB2 )(resid 45 and name HD* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 22 and name HD* )(resid 22 and name HE* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 29 and name HB1 )(resid 29 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 29 and name HG2 )(resid 29 and name HN ) 3.500 3.500 0.000
assign (resid 23 and name HE* )(resid 23 and name HD* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 23 and name HA )(resid 23 and name HD* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 23 and name HB1 )(resid 23 and name HD* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 23 and name HB2 )(resid 23 and name HD* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 22 and name HB1 )(resid 22 and name HD* ) 3.600 3.600 0.000
assign (resid 22 and name HB2 )(resid 22 and name HD* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 55 and name HB* )(resid 55 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 27 and name HA )(resid 27 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 27 and name HG2* )(resid 27 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 21 and name HD* )(resid 21 and name HE* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 51 and name HB1 )(resid 51 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 21 and name HB* )(resid 21 and name HE* ) 5.000 5.000 0.000
assign (resid 51 and name HA )(resid 51 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 32 and name HG2 )(resid 32 and name HE ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HA )(resid 21 and name HD* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HB* )(resid 21 and name HD* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 44 and name HB1 )(resid 44 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HB* )(resid 21 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 30 and name HB1 )(resid 30 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 30 and name HB2 )(resid 30 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 22 and name HD* )(resid 22 and name HA ) 4.800 4.800 0.000
assign (resid 22 and name HB2 )(resid 22 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 10 and name HB2 )(resid 10 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 10 and name HB1 )(resid 10 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 45 and name HB1 )(resid 45 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 45 and name HB2 )(resid 45 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 11 and name HB1 )(resid 11 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 11 and name HG1 )(resid 11 and name HA ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 33 and name HN )(resid 33 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 33 and name HB1 )(resid 33 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
```

```
assign (resid 33 and name HB2 )(resid 33 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 43 and name HN )(resid 43 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 43 and name HB1 )(resid 43 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 41 and name HB1 )(resid 41 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 43 and name HB1 )(resid 43 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 41 and name HB2 )(resid 41 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 44 and name HB1 )(resid 44 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 44 and name HB2 )(resid 44 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 47 and name HG2* )(resid 47 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 5 and name HN )(resid 5 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 5 and name HB2 )(resid 5 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 4 and name HN )(resid 4 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 4 and name HB1 )(resid 4 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 47 and name HG2* )(resid 47 and name HB ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 7 and name HB2 )(resid 7 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 7 and name HD1* )(resid 7 and name HA ) 4.800 4.800 0.000
assign (resid 7 and name HD2* )(resid 7 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 24 and name HN )(resid 24 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 40 and name HA2 )(resid 40 and name HA1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 24 and name HB2 )(resid 24 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 34 and name HB1 )(resid 34 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 34 and name HB2 )(resid 34 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 19 and name HG2* )(resid 19 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 46 and name HB1 )(resid 46 and name HA ) 2.900 2.900 0.000
assign (resid 46 and name HB2 )(resid 46 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 57 and name HN )(resid 57 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 53 and name HB2 )(resid 53 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 53 and name HB1 )(resid 53 and name HA ) 2.900 2.900 0.000
assign (resid 57 and name HB1 )(resid 57 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 8 and name HB1 )(resid 8 and name HA ) 2.900 2.900 0.000
assign (resid 8 and name HB2 )(resid 8 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 2 and name HB2 )(resid 2 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 2 and name HB1 )(resid 2 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 12 and name HN )(resid 12 and name HA1 ) 2.900 2.900 0.000
assign (resid 12 and name HA2 )(resid 12 and name HA1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 14 and name HN )(resid 14 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 2 and name HD2 )(resid 2 and name HA ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 2 and name HD1 )(resid 2 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 14 and name HB1 )(resid 14 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 24 and name HB1 )(resid 24 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HB2 )(resid 26 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HB1 )(resid 26 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 26 and name HG2 )(resid 26 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 23 and name HN )(resid 23 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 23 and name HB2 )(resid 23 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 23 and name HB1 )(resid 23 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 11 and name HD1 )(resid 11 and name HD2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 11 and name HB2 )(resid 11 and name HD2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 11 and name HG2 )(resid 11 and name HD2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 25 and name HB1 )(resid 25 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 42 and name HB1 )(resid 42 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 42 and name HB2 )(resid 42 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 42 and name HG2 )(resid 42 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 42 and name HG1 )(resid 42 and name HA ) 3.400 3.400 0.000
assign (resid 4 and name HB1 )(resid 4 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 19 and name HG2* )(resid 19 and name HB ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 54 and name HB )(resid 54 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HG12 )(resid 54 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HG11 )(resid 54 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HG2* )(resid 54 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 54 and name HD1* )(resid 54 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 15 and name HD1 )(resid 15 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 15 and name HB2 )(resid 15 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 15 and name HB1 )(resid 15 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 15 and name HN )(resid 15 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 50 and name HB1 )(resid 50 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 50 and name HB2 )(resid 50 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 50 and name HG1 )(resid 50 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 50 and name HG2 )(resid 50 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 39 and name HB1 )(resid 39 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 39 and name HB2 )(resid 39 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 39 and name HG )(resid 39 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 39 and name HD2* )(resid 39 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
```

```
assign (resid 11 and name HB1 )(resid 11 and name HD1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 11 and name HG1 )(resid 11 and name HD1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 11 and name HG2 )(resid 11 and name HD1 ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 49 and name HG2 )(resid 49 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 49 and name HG1 )(resid 49 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 49 and name HB2 )(resid 49 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 49 and name HB1 )(resid 49 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 2 and name HG2 )(resid 2 and name HD2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 2 and name HD1 )(resid 2 and name HD2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 52 and name HG1 )(resid 52 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 52 and name HB2 )(resid 52 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 9 and name HB1 )(resid 9 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 9 and name HB2 )(resid 9 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 28 and name HB1 )(resid 28 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 28 and name HB2 )(resid 28 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 28 and name HG2 )(resid 28 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 2 and name HG1 )(resid 2 and name HD1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 2 and name HG2 )(resid 2 and name HD1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 2 and name HB1 )(resid 2 and name HD1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 23 and name HN )(resid 23 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 23 and name HB2 )(resid 23 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 36 and name HA2 )(resid 36 and name HA1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 45 and name HB2 )(resid 45 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 43 and name HN )(resid 43 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 43 and name HD22 )(resid 43 and name HB1 ) 4.000 4.000 0.000
assign (resid 22 and name HA )(resid 22 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 43 and name HB2 )(resid 43 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 30 and name HB2 )(resid 30 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 24 and name HB2 )(resid 24 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 41 and name HB2 )(resid 41 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 14 and name HN )(resid 14 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 33 and name HB2 )(resid 33 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 32 and name HB2 )(resid 32 and name HD1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 15 and name HB2 )(resid 15 and name HD1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 15 and name HB1 )(resid 15 and name HD1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 51 and name HB2 )(resid 51 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 51 and name HA )(resid 51 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 48 and name HB2 )(resid 48 and name HA ) 3.100 3.100 0.000
assign (resid 48 and name HG )(resid 48 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 48 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 5 and name HN )(resid 5 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 5 and name HB2 )(resid 5 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 11 and name HG1 )(resid 11 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 11 and name HG2 )(resid 11 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 52 and name HB1 )(resid 52 and name HE1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 53 and name HN )(resid 53 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 5 and name HN )(resid 5 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 10 and name HB1 )(resid 10 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 51 and name HN )(resid 51 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 51 and name HA )(resid 51 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 23 and name HN )(resid 23 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 46 and name HB2 )(resid 46 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 8 and name HB1 )(resid 8 and name HG2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 8 and name HB2 )(resid 8 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 49 and name HB2 )(resid 49 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 42 and name HN )(resid 42 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 42 and name HB2 )(resid 42 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 42 and name HG2 )(resid 42 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 3 and name HN )(resid 3 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 11 and name HD1 )(resid 11 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 49 and name HB2 )(resid 49 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 29 and name HG2 )(resid 29 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 31 and name HB2 )(resid 31 and name HG1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 56 and name HB1 )(resid 56 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 56 and name HG2 )(resid 56 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 56 and name HG1 )(resid 56 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 31 and name HB2 )(resid 31 and name HG2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 28 and name HB2 )(resid 28 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 28 and name HG2 )(resid 28 and name HB1 ) 3.100 3.100 0.000
assign (resid 8 and name HG1 )(resid 8 and name HB1 ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 18 and name HD1* )(resid 18 and name HB ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 18 and name HG11 )(resid 18 and name HB ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 31 and name HB2 )(resid 31 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
```

```
assign (resid 3 and name HB1 )(resid 3 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 29 and name HG2 )(resid 29 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 3 and name HN )(resid 3 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 28 and name HN )(resid 28 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 15 and name HB1 )(resid 15 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 7 and name HD1* )(resid 7 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 7 and name HD2* )(resid 7 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 2 and name HB1 )(resid 2 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 28 and name HG2 )(resid 28 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 39 and name HG )(resid 39 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 39 and name HD1* )(resid 39 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 39 and name HD2* )(resid 39 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 2 and name HG2 )(resid 2 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 2 and name HB1 )(resid 2 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 54 and name HG2* )(resid 54 and name HB ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 54 and name HD1* )(resid 54 and name HB ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 39 and name HG )(resid 39 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 39 and name HD1* )(resid 39 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 39 and name HD2* )(resid 39 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 20 and name HB1 )(resid 20 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 52 and name HA )(resid 52 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 7 and name HD1* )(resid 7 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 7 and name HD2* )(resid 7 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 32 and name HN )(resid 32 and name HB1 ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 52 and name HE1 )(resid 52 and name HG1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 18 and name HB )(resid 18 and name HG12 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 39 and name HD1* )(resid 39 and name HG ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 42 and name HB1 )(resid 42 and name HG1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 9 and name HB1 )(resid 9 and name HG2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 56 and name HG2 )(resid 56 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 48 and name HN )(resid 48 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 56 and name HB1 )(resid 56 and name HG2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 56 and name HB2 )(resid 56 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 48 and name HD1* )(resid 48 and name HB2 ) 4.500 4.500 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 48 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 52 and name HE1 )(resid 52 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 48 and name HD1* )(resid 48 and name HG ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 48 and name HB1 )(resid 48 and name HG ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 48 and name HN )(resid 48 and name HG ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HG12 )(resid 54 and name HG2* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HD1* )(resid 54 and name HG2* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 34 and name HA )(resid 34 and name HG2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 27 and name HB )(resid 27 and name HG2* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 27 and name HA )(resid 27 and name HG2* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 56 and name HA )(resid 56 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 56 and name HG2 )(resid 56 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 18 and name HG11 )(resid 18 and name HD1* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 39 and name HD2* )(resid 39 and name HD1* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 39 and name HA )(resid 39 and name HD1* ) 4.800 4.800 0.000
assign (resid 54 and name HG12 )(resid 54 and name HD1* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 48 and name HN )(resid 48 and name HD1* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 9 and name HB2 )(resid 9 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 21 and name HN )(resid 21 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 41 and name HN )(resid 41 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 31 and name HA ) 4.800 4.800 0.000
assign (resid 33 and name HN )(resid 33 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 33 and name HN )(resid 33 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 41 and name HN )(resid 41 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 41 and name HN )(resid 41 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 41 and name HN )(resid 41 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 41 and name HN )(resid 41 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 22 and name HN )(resid 22 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 31 and name HG1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 31 and name HG2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 31 and name HN )(resid 31 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 39 and name HN )(resid 39 and name HD2* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 18 and name HN )(resid 18 and name HG2* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 18 and name HN )(resid 18 and name HD1* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 20 and name HN )(resid 20 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 52 and name HN )(resid 52 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 20 and name HN )(resid 20 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HN )(resid 26 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 49 and name HN )(resid 49 and name HG1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 49 and name HN )(resid 49 and name HG2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 20 and name HN )(resid 20 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
```

```
assign (resid 19 and name HN )(resid 19 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 46 and name HN )(resid 46 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 35 and name HN )(resid 35 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 32 and name HN )(resid 32 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 30 and name HN )(resid 30 and name HA ) 2.900 2.900 0.000
assign (resid 32 and name HN )(resid 32 and name HE ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 38 and name HN )(resid 38 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 3 and name HN )(resid 3 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 50 and name HN )(resid 50 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 42 and name HN )(resid 42 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 9 and name HN )(resid 9 and name HG2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 15 and name HN )(resid 15 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 28 and name HN )(resid 28 and name HG1 ) 4.800 4.800 0.000
assign (resid 34 and name HN )(resid 34 and name HG2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 54 and name HN )(resid 54 and name HG2* ) 4.800 4.800 0.000
assign (resid 9 and name HN )(resid 9 and name HG1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 54 and name HN )(resid 54 and name HG11 ) 3.100 3.100 0.000
assign (resid 32 and name HE )(resid 32 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 28 and name HZ* )(resid 28 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 29 and name HN )(resid 29 and name HB2 ) 4.000 4.000 0.000
assign (resid 10 and name HN )(resid 10 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 32 and name HE )(resid 32 and name HD1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HE* )(resid 45 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 10 and name HN )(resid 10 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 21 and name HE* )(resid 21 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 44 and name HN )(resid 44 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 22 and name HE* )(resid 22 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 29 and name HN )(resid 29 and name HG1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 2 and name HD2 )(resid 2 and name HB1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 28 and name HE1 )(resid 28 and name HG1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 9 and name HA )(resid 9 and name HG2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 23 and name HB1 )(resid 23 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 28 and name HG1 )(resid 28 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 2 and name HD1 )(resid 2 and name HB2 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 45 and name HB2 )(resid 45 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 10 and name HB1 )(resid 10 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 23 and name HB2 )(resid 23 and name HE* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 5 and name HB1 )(resid 5 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 8 and name HG2 )(resid 8 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 18 and name HB )(resid 18 and name HG2* ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 26 and name HG1 )(resid 26 and name HA ) 4.200 4.200 0.000
assign (resid 7 and name HB1 )(resid 7 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 35 and name HB2 )(resid 35 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 3 and name HB2 )(resid 3 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 3 and name HB1 )(resid 3 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 11 and name HG2 )(resid 11 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 26 and name HG2 )(resid 26 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 52 and name HB1 )(resid 52 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 42 and name HG2 )(resid 42 and name HN ) 3.500 3.500 0.000
assign (resid 32 and name HB2 )(resid 32 and name HA ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 31 and name HB2 )(resid 31 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 20 and name HB2 )(resid 20 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 2 and name HG1 )(resid 2 and name HA ) 4.000 4.000 0.000
assign (resid 2 and name HG2 )(resid 2 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 32 and name HG2 )(resid 32 and name HD1 ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 29 and name HG2 )(resid 29 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 2 and name HG2 )(resid 2 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 52 and name HB2 )(resid 52 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 42 and name HB2 )(resid 42 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 54 and name HG11 )(resid 54 and name HD1* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 2 and name HG2 )(resid 2 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 18 and name HG12 )(resid 18 and name HG2* ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 52 and name HB1 )(resid 52 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 9 and name HG2 )(resid 9 and name HB2 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 9 and name HG1 )(resid 9 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 52 and name HG1 )(resid 52 and name HB1 ) 2.900 2.900 0.000
assign (resid 18 and name HG11 )(resid 18 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 9 and name HB2 )(resid 9 and name HG1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 9 and name HB1 )(resid 9 and name HB1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 20 and name HN )(resid 20 and name HN ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 28 and name HG1 )(resid 28 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 52 and name HB2 )(resid 52 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 11 and name HB1 )(resid 11 and name HD2 ) 4.200 4.200 0.000
```

```
assign (resid 25 and name HB2 )(resid 25 and name HN ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 6 and name HB2 )(resid 6 and name HA ) 3.000 3.000 0.000
assign (resid 18 and name HN )(resid 18 and name HB ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 32 and name HB2 )(resid 32 and name HN ) 2.900 2.900 0.000
assign (resid 28 and name HN )(resid 28 and name HE1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 52 and name HA )(resid 52 and name HE1 ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 52 and name HG2 )(resid 52 and name HE1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 8 and name HA )(resid 8 and name HG1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 28 and name HB1 )(resid 28 and name HG1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 34 and name HG2 )(resid 34 and name HE1 ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 28 and name HG2 )(resid 28 and name HZ* ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 45 and name HE* )(resid 45 and name HN ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 20 and name HB1 )(resid 20 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 48 and name HD1* )(resid 48 and name HA ) 5.500 5.500 0.000
assign (resid 56 and name HB2 )(resid 56 and name HB1 ) 2.800 2.800 0.000
assign (resid 55 and name HB* )(resid 55 and name HA ) 3.800 3.800 0.000
assign (resid 7 and name HB1 )(resid 7 and name HB2 ) 2.800 2.800 0.000
```

C.2 Zusätzlich eingeführte Restraints

C.2.1 Dihedrale Winkelbeschränkungen

```
assign (resid 14 and name C) (resid 15 and name N)
(resid 15 and name CA) (resid 15 and name C) 1 -92 30.0 2
assign (resid 23 and name C) (resid 24 and name N)
(resid 24 and name CA) (resid 24 and name C) 1 -80 30.0 2
assign (resid 27 and name C) (resid 28 and name N)
(resid 28 and name CA) (resid 28 and name C) 1 -155 30.0 2 ! changed from -88
assign (resid 33 and name C) (resid 34 and name N)
(resid 34 and name CA) (resid 34 and name C) 1 -96 30.0 2
assign (resid 7 and name C) (resid 8 and name N)
(resid 8 and name CA) (resid 8 and name C) 1 -76 30.0 2
assign (resid 5 and name C) (resid 6 and name N)
(resid 6 and name CA) (resid 6 and name C) 1 -82 30.0 2
assign (resid 53 and name C) (resid 54 and name N)
(resid 54 and name CA) (resid 54 and name C) 1 -78 30.0 2
assign (resid 9 and name C) (resid 10 and name N)
(resid 10 and name CA) (resid 10 and name C) 1 -120 30.0 2
assign (resid 25 and name C) (resid 26 and name N)
(resid 26 and name CA) (resid 26 and name C) 1 -76 30.0 2
assign (resid 13 and name C) (resid 14 and name N)
(resid 14 and name CA) (resid 14 and name C) 1 -72 30.0 2
assign (resid 29 and name C) (resid 30 and name N)
(resid 30 and name CA) (resid 30 and name C) 1 -92 30.0 2
assign (resid 20 and name C) (resid 21 and name N)
(resid 21 and name CA) (resid 21 and name C) 1 -120 30.0 2
assign (resid 18 and name C) (resid 19 and name N)
(resid 19 and name CA) (resid 19 and name C) 1 -70 30.0 2
assign (resid 21 and name C) (resid 22 and name N)
(resid 22 and name CA) (resid 22 and name C) 1 -120 30.0 2
assign (resid 41 and name C) (resid 42 and name N)
(resid 42 and name CA) (resid 42 and name C) 1 -100 30.0 2
assign (resid 6 and name C) (resid 7 and name N)
(resid 7 and name CA) (resid 7 and name C) 1 -82 30.0 2
assign (resid 16 and name C) (resid 17 and name N)
(resid 17 and name CA) (resid 17 and name C) 1 -65 30.0 2
assign (resid 43 and name C) (resid 44 and name N)
(resid 44 and name CA) (resid 44 and name C) 1 -67 30.0 2
assign (resid 52 and name C) (resid 53 and name N)
(resid 53 and name CA) (resid 53 and name C) 1 -61 30.0 2
assign (resid 34 and name C) (resid 35 and name N)
(resid 35 and name CA) (resid 35 and name C) 1 -57 30.0 2
assign (resid 37 and name C) (resid 38 and name N)
(resid 38 and name CA) (resid 38 and name C) 1 -57 30.0 2
assign (resid 42 and name C) (resid 43 and name N)
(resid 43 and name CA) (resid 43 and name C) 1 -50 30.0 2
assign (resid 48 and name C) (resid 49 and name N)
(resid 49 and name CA) (resid 49 and name C) 1 -50 30.0 2
```

```
assign (resid 56 and name C) (resid 57 and name N)
(resid 57 and name CA) (resid 57 and name C) 1 -52 30.0 2
```

Wie im Text erwähnt, wurde die manuelle Korrektur bei Lys-28 nach Kontrolle der BPTI-Struktur eingeführt.

C.2.2 Wasserstoffbrücken

```
!hydrogen bonds
```

```
! beta-sheet
```

```
assign (resid 35 and name N) (resid 18 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 35 and name HN) (resid 18 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 18 and name N) (resid 35 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 18 and name HN) (resid 35 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 33 and name N) (resid 20 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 33 and name HN) (resid 20 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 20 and name N) (resid 33 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 20 and name HN) (resid 33 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 31 and name N) (resid 22 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 31 and name HN) (resid 22 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 22 and name N) (resid 31 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 22 and name HN) (resid 31 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 29 and name HN) (resid 24 and name O) 2.400 2.400 0.000
assign (resid 28 and name HN) (resid 24 and name O) 2.400 2.400 0.000
assign (resid 24 and name HN) (resid 29 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
! loop to reactive site
```

```
assign (resid 36 and name N) (resid 11 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 36 and name HN) (resid 11 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
! second small beta
```

```
assign (resid 45 and name N) (resid 21 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 45 and name HN) (resid 21 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 21 and name N) (resid 45 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 21 and name HN) (resid 45 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
! from the helices
```

```
assign (resid 54 and name N) (resid 50 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 54 and name HN) (resid 50 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 55 and name N) (resid 51 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 55 and name HN) (resid 51 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 57 and name N) (resid 52 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 57 and name HN) (resid 52 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 51 and name N) (resid 47 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 51 and name HN) (resid 47 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

```
assign (resid 5 and name N) (resid 2 and name O) 3.300 3.300 0.000
assign (resid 5 and name HN) (resid 2 and name O) 2.400 2.400 0.000
```

C.2.3 Disulfidbrücken

```
!patch disn reference=1=(resid 5) reference=2=(resid 55) end
!patch disn reference=1=(resid 14) reference=2=(resid 38) end
!patch disn reference=1=(resid 30) reference=2=(resid 51) end
```

```
assign (resid 5 and name sg) (resid 55 and name sg) 2.02 0.1 0.1
assign (resid 14 and name sg) (resid 38 and name sg) 2.02 0.1 0.1
assign (resid 30 and name sg) (resid 51 and name sg) 2.02 0.1 0.1
```

C.3 XPLOR-Protokolle

Die Inputdatei sa_lal.inp enthält die wichtigsten Daten für die Rechnungen und verweist auf die im weiteren aufgeführten Dateien. Im Beispiel wurden 100 Strukturen mit den Nummern 100 bis 200 (\$ini_count und \$end_count) generiert und in die Dateien tfpi981101_* geschrieben (\$fileroot). In \$template wird auf die Primärsequenz von TFPI (als lineare Kette in INSIGHTII generiert) verwiesen.

C.3.1 Die Inputdatei sa_lal.inp

```
remarks sa_lal.inp
remarks Author: Michael Nilges

evaluate ($ini_count = 100 )
evaluate ($end_count = 200 )

evaluate ($iniseed = 283745)  { * changed from 567313 * }

evaluate ($init_t = 2000 )  { * initial simulated annealing temperature * }
evaluate ($high_steps = 6500)
evaluate ($cool1_steps = 5000) { increased from 2500 }
evaluate ($cool2_steps = 2000) { increased from 1000 }
evaluate ($final1_t = 1000)   { K }
evaluate ($final2_t = 100)    { K }
evaluate ($tempstep = 50)     { K }

evaluate ($fileroot = "ts/tfpi981101 ")
evaluate ($reference = "ti/tfpi_template.pdb")
evaluate ($template = "ti/tfpi_template.pdb")

structure @@ti/tfpi.psf end

parameter @@ti/parallhdg.pro end

parameter
  bond (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
  angle (all) (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
end

@@ti/read_aldata.xplor

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih end

vector do (fbeta=10) (all) { * friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps * }
vector do (mass=100) (all)

evaluate ($kcdih = 5)
restraints dihedral
  scale=$kcdih { * initial weight - will be modified later * }
end

evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main { * main loop * }

  evaluate ($count=$count+1)
  evaluate ($nreassign = 0)
  coor @@$template
  evaluate ($seed = $count*$iniseed)
  set seed $seed end
  @ti/sa_l_randomchain.xplor
```

```

evaluate ($cpu1 = $cpu)

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool1_steps/$ncycle))

@ti/setup_swapnew.xplor
vector ident (store2) (store1)
parameter
  improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
  improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end

  @@ti/sa_l_initial_values.xplor
parameter
  angle (store2) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
  angle (all) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
end

parameter nbonds
  atom cutnb 12 tolerance 3.5 repel=1.2 wmin 0.5
  rexp=2 irexp=2 rcon=1. nbxmod 4
end end

@ti/sa_l_reduced.xplor { defines store1 }

constraints
  interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0 elec 0 end
  interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.1 elec 0 end
end

{* 1 ===== initial minimization *}
restraints dihedral scale=5. end
noe potential * soft scale * 1.0 asymptote * 2.0 end
minimize powell nstep=50 drop=10. nprint=25 end

{* 2 ===== high temperature dynamics *}

@ti/sa_l_hightemp.xplor
{* write coor sele= (name ca) output= high.pdb end *}

{* 3 ===== cooling 1 *}

@ti/sa_l_cool1.xplor

{* 4 ===== cooling 2 *}

@ti/sa_l_cool2.xplor

{* 5 ===== final minimization *}

evaluate ($swap = 1.001)
flags exclude * include noe end
! @ti/swap15v.xplor
flags include bond angl impr vdw noe cdih end

minimize powell nstep=200 drop=10.0 nprint=25 end

{* 6 ===== write out the final structure(s) *}

evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
@@ti/print_coorheader.xplor
write coordinates sele= (all) output =$filename end

end loop main

stop

```

C.3.2 read_aldata.xplor

```
noe
    reset
    nrestraints = 5000          ! allocate space for NOEs
    ceiling 100

    set echo off message off end
    class      dist @@td/TFPI_INTER
                @@td/TFPI_intra
                @@td/tfpissbond.tbl
                @@td/hydrogenbonds
!      class      ambi @@td/tgbamb96_1_15.tbl

    set echo on message on end

!      averaging * sum
    averaging * r-6          ! for pseudoatom
    potential * soft
    scale      * 1.0
    sqconstant * 1.0
    sqexponent * 2
    soexponent * 1
    rswitch    * 1.0
    sqoffset   * 0.0
    asymptote  * 2.0
    avexpo hbond 20
end

restraints dihedral
! set echo off message off end
  @@td/tfpi_dihedrals.tbl
  set echo on message on end
end
```

C.3.3 sa_l_randomchain.xplor

```
REMARK randomchain.inp
REMARK randomize a structure by random rotations around the N-Ca and Ca-C bonds.
REMARK
REMARK input:  a coordinate set obtained with generate_template.inp or any
REMARK          other pdb file with good geometry
REMARK output: the coordinates randomized around phi and psi. chi_i are not
REMARK          affected.
REMARK
REMARK the input file can be used also to generate the randomized coordinates
REMARK "on the fly" as part of the sa.inp protocol. the lines setting the seed,
REMARK reading the structure and the template coordinates at the beginning,
REMARK and writing out the randomized coordinates and the stop command at the end,
REMARK should then be deleted.
REMARK this file should be read after the "coor swap" and "coor copy" statements
REMARK at the beginning of the main loop in sa.inp.
REMARK
REMARK Author: M. Nilges, EMBL, Oct. 1993

set message off echo off end

! The vector store1 is set to 1 for all atoms that have already been
! rotated.
vector do (store1=0) (all)
vector do (store2=0) (all)

! loop through all ca atoms.
```

```

for $id in id (name ca) loop pept
    vector show element (resid) (id $id)
    evaluate ($res = $result)
    vector show element (segid) (id $id)
    evaluate ($seg = $result)
    vector do (store2=1) (byres (id $id))

    evaluate ($phi = random()*360-180)
    evaluate ($psi = random()*360-180)

! all atoms up to the present ca are held fixed for phi rotation
vector do (store1=1)
    ((store2 and (name n or name hn or name ht* or name ca)))

! rotate phi
coor rotate sele= (attribute store1=0)
    center (head (store2 and name ca))
    axis (head (store2 and name ca)
        tail (store2 and name n)) $phi
end

! fix the sidechain of the current residue for psi rotation
vector do (store1=1)
    ((store2 and not (name c or name o or name ot#)))

! rotate psi
coor rotate sele= (attribute store1=0 and segid $seg)
    center (head (store2 and name c) )
    axis (head (store2 and name c)
        tail (store2 and name ca)) $psi
end

! fix all of current residue
vector do (store1=1) (store2)
vector do (store2=0) (byres (id $id))

end loop pept

!!coor translate selection (segid B) vector (head (segid A) tail (segid B)) end

evaluate ($filename="random"+encode($count)+".pdb")

!!write coordinates output =$filename end

set message on echo on end

```

C.3.4 setup_swapnew.xplor

```

vector do (q = 0) (all)
vector do (store1 = 0) (all)
vector do (store1 = store1 + 1)
    ((resn leu and name cd*) or (resn val and name cg*))

set echo off message off end
for $id in id (
    (resn gly and name ha1)
    or (resn ile and name hg11)
    or (resn leu and name hb1)
    or (resn phe and name hb1)
    or (resn pro and (name hb1 or name hg1 or name hd1))
    or (resn met and (name hb1 or name hg1))
    or (resn trp and name hb1)
    or (resn cys and name hb1)
    or (resn ser and name hb1)
    or (resn asn and name hb1)
    or (resn gln and (name hb1 or name hg1))
    or (resn tyr and name hb1)

```

```
or (resn his and name hb1)
or (resn asp and name hb1)
or (resn glu and (name hb1 or name hg1))
or (resn lys and (name hb1 or name hg1 or name hd1 or name hel))
or (resn arg and (name hb1 or name hg1 or name hd1)))

loop meth
vector show element (resid) (id $id)
eval ($resid = $result)
vector show element (name) (id $id)
eval ($name = $result - "1" + "%")
coor sele= (resid $resid and name $name) end
if ($select = 2) then
vector do (store1 = store1 + 1) (resid $resid and name $name)
end if
end loop meth
set echo on message on end
```

C.3.5 sa_l_initial_values.xplor

```
evaluate ($ini_rad = 0.9)          evaluate ($fin_rad = 0.78)
evaluate ($ini_con= 0.003)        evaluate ($fin_con= 4.0)
evaluate ($iniflt = 5)            evaluate ($finflt = 500)
evaluate ($ini_ang = 1.0)        evaluate ($fin_ang = 1.0)
evaluate ($ini_imp = 1.0)        evaluate ($fin_imp = 1.0)
evaluate ($ini_amb = 1.0)        evaluate ($fin_amb = 50.0)

evaluate ($bath = $init_t)
evaluate ($k_vdw = $ini_con)
evaluate ($k_vdwfact = ($fin_con/$ini_con)^(1/$ncycle))
evaluate ($radius= $ini_rad)
evaluate ($radfact = ($fin_rad/$ini_rad)^(1/$ncycle))
evaluate ($kflt = $iniflt)
evaluate ($flt_fac = ($finflt/$iniflt)^(1/$ncycle))
evaluate ($k_ang = $ini_ang)
evaluate ($ang_fac = ($fin_ang/$ini_ang)^(1/$ncycle))
evaluate ($k_imp = $ini_imp)
evaluate ($imp_fac = ($fin_imp/$ini_imp)^(1/$ncycle))
evaluate ($k_amb = $ini_amb)
evaluate ($amb_fac = ($fin_amb/$ini_amb)^(1/$ncycle))
```

C.3.6 sa_l_reduced.xplor

```
vector ident (store1)
((resn Gly and name CA) or
(resn Ala and (name CA or name CB )) or
(resn Val and (name CA or name CG1 )) or
(resn Ile and (name CA or name CG1 )) or
(resn Leu and (name CA or name CD1 )) or
(resn Phe and (name CA or name CD1 )) or
(resn Pro and (name CA or name CG )) or
(resn Met and (name CA or name SD )) or
(resn Trp and (name CA or name CE2 )) or
(resn Cys and (name CA or name SG )) or
(resn Ser and (name CA or name CB )) or
(resn Thr and (name CA or name CG2 )) or
(resn Asn and (name CA or name CG )) or
(resn Gln and (name CA or name CD )) or
(resn Tyr and (name CA or name CD1 )) or
(resn His and (name CA or name CD2 )) or
(resn Asp and (name CA or name CG )) or
(resn Glu and (name CA or name CD )) or
(resn Lys and (name CA or name CD )) or
(resn Arg and (name CA or name CD )))
```

C.3.7 sa_l_hightemp.xplor

```

evaluate ($nstep1=int($high_steps / 5.0 ) )

vector do (vx = maxwell($init_t)) (all)
vector do (vy = maxwell($init_t)) (all)
vector do (vz = maxwell($init_t)) (all)

for $knoe in (3.125 6.25 12.5 25 50) loop anne
  noe scale dist $knoe scale ambi $ini_amb scale hbon $ini_amb end

  flags exclude * include noe end
  evaluate ($swap = 1.001)
  ! @ti/swap15v.xplor
  flags include bond angl impr vdw noe cdih end

  evaluate ($kvdw = $knoe * 0.002)
  constraints
    interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0 elec 0 end
    interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw $kvdw elec 0 end
  end

  dynamics verlet
    nstep=$nstep1 timestep=0.005 iasvel=current firstt=$init_t
    tcoupling=true tbath=$init_t nprint=50 iprfrq=0
    ntrfrq=9999
  end

  evaluate ($critical=$temp/$init_t)
  if ($critical > 1.2) then
    evaluate ($nreassign = $nreassign + 1)
    mini powell nstep 100 end
    vector do (vx=maxwell($init_t)) (all)
    vector do (vy=maxwell($init_t)) (all)
    vector do (vz=maxwell($init_t)) (all)
  end if
end loop anne

```

C.3.8 sa_l_cool1.xplor

```

vector do (vx=maxwell($init_t)) (all)
vector do (vy=maxwell($init_t)) (all)
vector do (vz=maxwell($init_t)) (all)

{* 4 ===== cool the system *}

evaluate ($swap = 0.05)

restraints dihedral scale=200. end

parameter {* parameters for the repulsive energy term *}
nbonds
  repel=1. {* initial value for repel - modified later *}
  rexp=2 irexp=2 rcon=1.
  nbxmod=3
  wmin=0.01
  cutnb=4.5 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
  tolerance=0.5
end
end

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)

```

```

evaluate ($nstep = int($cool1_steps/$ncycle))

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool=$i_cool+1)

  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
  evaluate ($k_vdw=min($fin_con,$k_vdw*$k_vdwfact))
  evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius*$radfact))
  evaluate ($kflt = $kflt*$flt_fac)
  evaluate ($k_ang = $k_ang*$ang_fac)
  evaluate ($k_imp = $k_imp*$imp_fac)
  evaluate ($k_amb = $k_amb*$amb_fac)

  flags exclude * include noe end
!   @ti/swap15v.xplor
  flags include bond angl impr vdw noe cdih end

  parameter
!   bond (name sg) (name sg) $kflt TOKEN
!   angle (all) (name sg) (name sg) $kflt TOKEN
  angle (store2) (all) (store2) $kflt TOKEN
  angle (all) (all) (store2) $kflt TOKEN
  nbonds repel=$radius end
  end

  constraints
  interaction (all) (all) weights * 1 vdw $k_vdw end
  end
  noe scale dist $knoe scale ambi $k_amb scale hbon $k_amb end

  dynamics verlet
  nstep=$nstep time=0.005 iasvel=current firstt=$bath
  tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfrq=0
  ntrfrq=99999
  end

  evaluate ($critical=$temp/$bath)
  if ($critical > 1.2) then
    evaluate ($nreassign = $nreassign + 1)
    mini powell nstep 100 end
    vector do (vx=maxwell($bath)) ( all )
    vector do (vy=maxwell($bath)) ( all )
    vector do (vz=maxwell($bath)) ( all )
  end if
end loop cool

```

C.3.9 sa_l_cool2.xplor

```

constraints interaction (all) (all) weights * 1. vdw 4. end end

evaluate ($ncycle = ($bath-$final2_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool2_steps/$ncycle))

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool=$i_cool+1)
  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)

  flags exclude * include noe end
!   @ti/swap15v.xplor
  flags include bond angl impr vdw noe cdih end

```

```

dynamics verlet
  nstep=$nstep time=0.005 iasvel=current firstt=$bath
  tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfrq=0
  ntrfrq=9999
end

{====>}
evaluate ($critical=$temp/$bath)
if ($critical > 1.2) then
  evaluate ($nreassign = $nreassign + 1)
  mini powell nstep 100 end
  vector do (vx=maxwell($bath)) ( all )
  vector do (vy=maxwell($bath)) ( all )
  vector do (vz=maxwell($bath)) ( all )
end if

end loop cool

```

C.3.10 swap15v.xplor

```

REMARK swaps systematically randomly selected methylene protons
REMARK  accepts the conformation with lower noe energy
REMARK  can be used in conjunction with floating assignment
REMARK  removes atoms from list that do not have any influence on energy
REMARK uses the new "coor flip" and "coor vflip" commands
REMARK
REMARK  Author: Michael Nilges, Yale University.

set echo off message off end

evaluate ($reject = 0)
evaluate ($tries = 0)
evaluate ($newnoe=0)
energy end
evaluate ($oldnoe=$noe)

if ($swap > 0) then
  vector do (q = q * ran()) (attr q > -0.5)
end if

for $id in id (store2 and name h*1 and attr q < $swap and attr q > -0.5) loop meth
  vector show element (resid) (id $id)
  eval ($resid = $result)
  vector show element (name) (id $id)
  eval ($name1 = $result)
  eval ($name2 = $result - "1" + "2")
  coor flip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2)) end

  energy end
  evaluate ($newnoe=$noe)
  evaluate ($tries = $tries + 1)

  if ($newnoe >= $oldnoe) then
    coor flip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2)) end
    evaluate ($reject = $reject+1)
  else
    evaluate ($oldnoe = $newnoe)
    coor vflip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2)) end
  end if
end loop meth

for $id in id (store2 and ((resn val and name cg1) or (resn leu and name cd1))
  and attr q < $swap and attr q > -0.5) loop meth
  coor copy end

  vector show element (resid) (id $id)
  eval ($resid = $result)
  vector show element (name) (id $id)

```

```
eval ($name1 = $result)
eval ($name2 = $name1 - "1" + "2")

coor flip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2)) end

for $hycount in (1 2 3) loop myle
  eval ($hname1 = "H" + $name1 - "C" + encode($hycount))
  eval ($hname2 = "H" + $name2 - "C" + encode($hycount))
  coor flip sele= (resid $resid and (name $hname1 or name $hname2)) end
end loop myle

energy end
evaluate ($newnoe=$noe)
evaluate ($tries = $tries + 1)

if ($newnoe >= $oldnoe) then
  coor swap end
  evaluate ($reject = $reject+1)
else
  evaluate ($oldnoe = $newnoe)
  coor vflip sele= (resid $resid and (name $name1 or name $name2)) end
  for $hycount in (1 2 3) loop myle
    eval ($hname1 = "H" + $name1 - "C" + encode($hycount))
    eval ($hname2 = "H" + $name2 - "C" + encode($hycount))
    coor vflip sele= (resid $resid and (name $hname1 or name $hname2)) end
  end loop myle
end if
end loop meth

if ($tries > 0) then evaluate ($reject = 100 * $reject / $tries) end if

vector do (q=1) (attr q < $swap and attr q > -0.5)

display swaps tried: $tries   swaps rejected: $reject percent
set echo on message on end
```

D Publikationen

ANGEWANDTE

CHEMIE

A Journal of the
Gesellschaft
Deutscher Chemiker

INTERNATIONAL EDITION

1998
37/6

Page 677–852

Titelblatt Angewandte Chemie, Intl. Edition.

COMMUNICATIONS

SIAM, a Novel NMR Experiment for the Determination of Homonuclear Coupling Constants**

Thomas Prasch, Peter Gröschke, and Steffen J. Glaser*

The most important NMR parameters for the determination of molecular conformations in solution are cross-relaxation rates and coupling constants.^[1] With the help of empirical Karplus relations, vicinal coupling constants (3J) yield information about dihedral angles. For example, in peptides and proteins the $^3J(\text{H}^{\alpha}, \text{H}^{\beta})$ coupling is related to the backbone angle ϕ .^[2] However, the quantitative determination of coupling constants is difficult if the line width is not significantly smaller than the coupling constants of interest (Figure 1). In the case of in-phase doublets (e.g. in NOESY^[3]

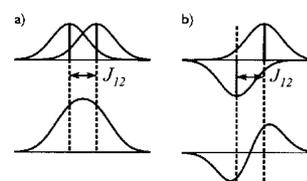


Figure 1. The apparent splittings of in-phase (a) and antiphase (b) doublets deviate markedly from the actual coupling constant J_{12} if the line width is not much smaller than J_{12} .^[6] The individual doublet components are shown at the top and their superposition is shown at bottom. In this case the superimposed in-phase signal does not show any resolved splitting (a), whereas the apparent splitting of the superimposed antiphase signal is significantly larger than the coupling constant J_{12} (b).

[*] Priv.-Doz. Dr. S. J. Glaser, Dipl.-Chem. T. Prasch, Dipl.-Chem. P. Gröschke
Institut für Organische Chemie der Universität
Marie-Curie-Strasse 11, D-60439 Frankfurt (Germany)
Fax: (+ 49) 69-7982-9128
E-mail: sg@org.chemie.uni-frankfurt.de

[**] This work was supported by the Deutsche Forschungsgesellschaft (Gl 203/2-1 and Gl 203/1-5) and by the Fonds der Chemischen Industrie. T. P. thanks the Fonds der Chemischen Industrie for a doctoral fellowship and the Graduiertenkolleg (Gk o111 Eg-52/3-3) for support. All experiments were performed at the Large Scale Facility "Center for Biomolecular NMR at the University of Frankfurt"- (ERBFMGEC1950034).

COMMUNICATIONS

or TOCSY spectra^[4]) the finite line width results in a reduced separation of the maxima of the two doublet lines (Figure 1 a). This is in contrast to the case of antiphase doublets (e.g. in DQF-COSY spectra^[5]), where the finite line width leads to an increased separation of the doublet maxima and hence to an apparent splitting that is larger than the actual coupling constant (Figure 1 b).^[6] However, the precise determination of coupling constants is possible irrespective of the experimental line form if both in-phase and antiphase multiplets are available.^[7,8]

Here we present a new experimental approach for the simultaneous acquisition of in-phase and antiphase multiplets that provides spectra with a minimum of overlap and markedly enhanced sensitivity compared to conventional methods. The experiment is based on the fact that several coherence transfer processes occur simultaneously during the mixing period τ of TOCSY experiments. For example, in a spin system consisting of two spins $1/2$, polarization of the first spin (I_{1z}) is transformed not only into polarization of the second spin (I_{2z}), but also into zero-quantum coherence ($ZQ_y = I_{1y}I_{2x} - I_{1x}I_{2y}$) between the two spins [Eq. (1)].^[4]

$$I_{1z} \rightarrow I_{1z} \cos^2(\pi J_{12}\tau) + I_{2z} \sin^2(\pi J_{12}\tau) - ZQ_y \sin(2\pi J_{12}\tau) \quad (1)$$

In conventional TOCSY experiments only the polarization transfer $I_{1z} \rightarrow I_{2z}$ is exploited, resulting in cross peaks with in-phase splitting in ω_1 and ω_2 (Figure 2 a). The second transfer

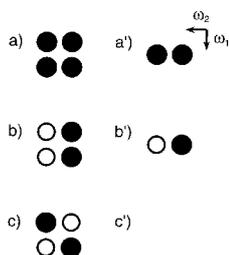


Figure 2. Schematic representation of characteristic multiplets in 2D NMR spectra: a) in-phase splitting in ω_1 and ω_2 (e.g. NOESY, ROESY, TOCSY, and ZQF-SIAM), b) in-phase splitting in ω_1 and antiphase splitting in ω_2 (DQF-SIAM), c) antiphase splitting in ω_1 and ω_2 (e.g. DQF-COSY). Positive signals are white, negative signals are black. a)–c) show the corresponding multiplets when ω_1 decoupling is used. In the first two cases this leads to a signal enhancement and to an improved resolution, whereas in the third case the signals completely cancel.

($I_{1z} \rightarrow ZQ_y$), which results in an in-phase splitting in ω_1 and an antiphase splitting in ω_2 (Figure 2 b), was so far either ignored or suppressed.^[4] The separation of polarization I_{2z} and zero-quantum coherence ZQ_y poses a problem because both terms have the same coherence order $p=0$.^[1] However, if the two mutually coupled spins have well-resolved chemical shifts, selective pulses can be used to convert the zero-quantum coherence ZQ_y selectively into double-quantum coherence ($DQ_y = I_{1y}I_{2x} + I_{1x}I_{2y}$) with coherence order $p=\pm 2$. The two terms I_{2z} and DQ_y can be conveniently selected with the help of a zero-quantum filter (ZQF) and a double-quantum filter (DQF), respectively (Figure 3 a). It is even possible to realize

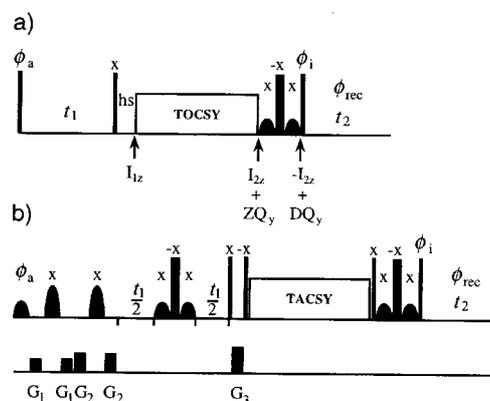


Figure 3. a) Schematic pulse sequence of a SIAM experiment (narrow vertical lines: 90° pulses; broad vertical lines: 180° pulses; bell-shaped symbols: selective 90° pulses acting only on spin I_1 ; hs: homospoil gradient; phase cycles of ϕ_a , ϕ_i , and ϕ_{rec} : see Experimental Section). For a two-spin system, the characteristic operators created during the sequence are indicated. b) Optimized SIAM experiment for the determination of $^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ couplings in peptides and proteins (see Experimental Section).

both filters by processing a single experimental data set in two different ways (see Experimental Section). Since this allows the simultaneous acquisition of *in-phase* and *antiphase* multiplets, we refer to the new method as the SIAM experiment. Because the cross peaks of both ZQF-SIAM and DQF-SIAM spectra have an in-phase splitting in ω_1 , it is possible to further increase the resolution and the sensitivity by ω_1 decoupling^[9] (Figure 2 a', b'). This is not possible in a conventional DQF-COSY experiment with antiphase splittings in ω_1 and ω_2 (Figure 2 c, c'). Figure 3 b shows an optimized SIAM experiment with ω_1 decoupling and band-selective excitation for the quantitative determination of $^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ couplings in peptides and proteins. In addition, a band-selective TACSy mixing sequence (*tailored correlation spectroscopy*)^[10] is used which provides more efficient coherence transfer than a nonselective TOCSY sequence (*total correlation spectroscopy*) (see Experimental Section).

Figures 4 a and b show a section of the fingerprint region of the protein BPTI with $\text{H}^N, \text{H}^\alpha$ cross peaks: the ZQF-SIAM and DQF-SIAM spectra were obtained from the same experimental SIAM data set. For comparison, Figure 4 c shows the corresponding region of a conventional DQF-COSY spectrum (same total measurement time). The resolution of the DQF-SIAM spectrum (Figure 4 b) is markedly better than that of the DQF-COSY spectrum because of ω_1 decoupling. Furthermore, the intensity of the antiphase signals is significantly larger in the DQF-SIAM experiment. For example, the cross sections of the DQF-SIAM cross peaks of Ala25, Ala58, and Ile18 are up to a factor of four more intense than those of the corresponding DQF-COSY cross peaks (see Figure 5). The fact that a ZQF-SIAM spectrum with in-phase splitting and a DQF-SIAM spectrum with antiphase splitting can be obtained from the same data set not only saves measurement time, but also guarantees that the in-phase and antiphase multiplets have identical center frequencies. This is not

COMMUNICATIONS

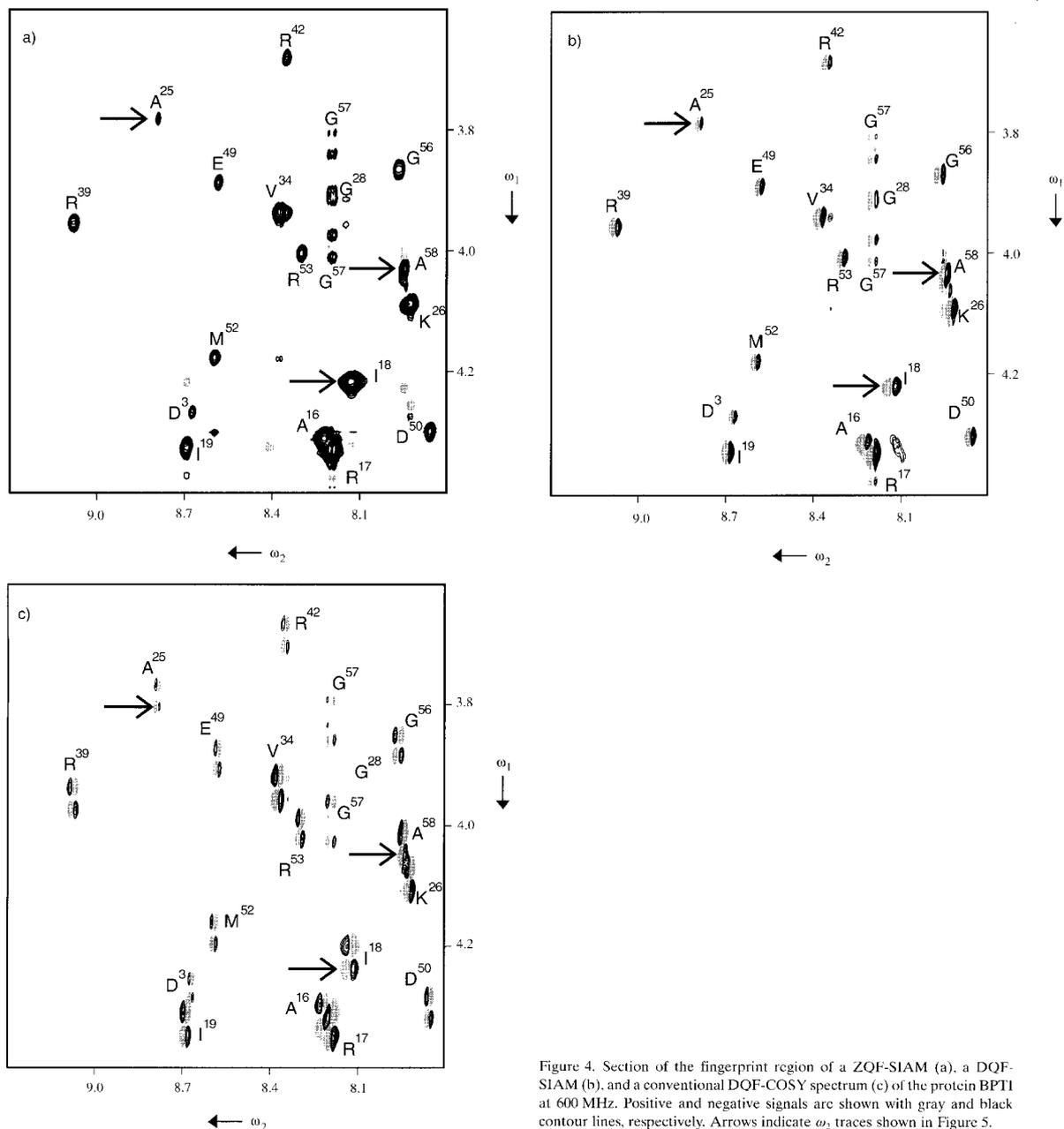


Figure 4. Section of the fingerprint region of a ZQF-SIAM (a), a DQF-SIAM (b), and a conventional DQF-COSY spectrum (c) of the protein BPTI at 600 MHz. Positive and negative signals are shown with gray and black contour lines, respectively. Arrows indicate ω_1 traces shown in Figure 5.

warranted if two different experiments (e.g. DQF-COSY and TOCSY) are acquired because of nonidentical sample heating. Hence, the novel SIAM experiment is almost ideally suited for the determination of $^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ coupling constants in peptides and proteins. Based on the traces of the ZQF-SIAM and DQF-SIAM cross peaks shown in Figure 5,

$^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ coupling constants of (3.6 ± 0.25) Hz for Ala25, (6.1 ± 0.25) Hz for Ala58, and (9.7 ± 0.25) Hz for Ile18 were determined by using the Keeler–Titman extraction procedure.^[6] These coupling constants differ significantly from the apparent in-phase splittings of 0, 6.3, and 6.5 Hz, respectively.

COMMUNICATIONS

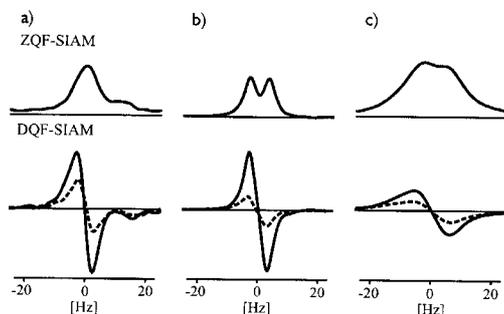


Figure 5. ω_2 traces of the (H^N, H^C) cross peaks of a) Ala 25, b) Ala 58, and c) Ile 18 (see arrows in Figure 4) with representative $^3J(H^N, H^C)$ coupling constants and line widths. The top panels show the in-phase signals of the ZQF-SIAM spectrum and the bottom panels show the antiphase signals of the DQF-SIAM spectrum (solid lines). The dashed lines represent the antiphase signals of the conventional DQF-COSY spectrum for comparison.

The SIAM method is not restricted to the determination of $^3J(H^N, H^C)$ couplings nor to applications to peptides and proteins. A necessary condition is that the two mutually coupled spins of interest (here H^N and H^C) have different chemical shifts. Furthermore it must be ensured that in large spin systems the pure in-phase and antiphase multiplets are not contaminated by other signals. A sufficient (but not necessary) condition for this is that the detected spin (here H^N) has no further coupling partners. Hence, the SIAM method complements the powerful E.COSY technique,^[11] for which a third common coupling partner is mandatory.

Experimental Section

The SIAM technique is based on the conversion of zero-quantum coherence ZQ_0 to double-quantum coherence DQ_2 , which requires a band-selective inversion pulse with a simultaneous suppression of chemical shift evolution. This can be implemented by a composite pulse element consisting of a hard (nonselective) 180°_{inv} pulse sandwiched between two band-selective 90°_{sel} pulses (see Figure 3). A ZQF- and a DQF-SIAM spectrum can be obtained from the same experimental data set if for each t_1 increment two free induction decays $FID1(t_1, t_2)$ and $FID2(t_1, t_2)$ with different phase cycles are acquired and stored separately. The phase cycle ϕ_1 of the last 90° pulse (Figure 3) and the phase ϕ_{rec} of the receiver are $\phi_1 = x, -x$ and $\phi_{\text{rec}} = x, -x$ for $FID1(t_1, t_2)$, whereas for $FID2(t_1, t_2)$ $\phi_1 = y, -y$ and $\phi_{\text{rec}} = y, -y$. Addition and subtraction of $FID1(t_1, t_2)$ and $FID2(t_1, t_2)$ yields, after a two-dimensional Fourier transformation, a ZQF- and a DQF-SIAM spectrum, respectively. Only an additional 90° phase correction in ω_2 is required for the DQF-SIAM spectrum.

The spectra shown in Figures 4 and 5 were acquired with the SIAM experiment shown in Figure 3b, which was optimized for the determination of $^3J(H^N, H^C)$ couplings in peptides and proteins. The RF irradiation frequency was positioned at 6.2 ppm. The water signal was presaturated by CW irradiation for a duration of 2 s (not shown in Figure 3b). For band-selective excitation we used a H^C -selective 90° pulse (Q5)^[12] with a duration of 3.731 ms and an offset of -1.072 kHz in combination with two H^N -selective 180° pulses (Q3)^[12] with a duration of 3 ms and an offset of -1.072 kHz. (Offset frequency, amplitude, and duration of the band-selective pulses are matched for experiments at 600 MHz but can be scaled for applications at other spectrometer frequencies.) The two H^C -selective 180° pulses were bracketed by different B_1 gradients ($G_1 = 15 \text{ G cm}^{-1}$, $G_2 = 25 \text{ G cm}^{-1}$) with a duration of 1 ms each.^[13] This made it possible to reduce the spectral width in ω_1 to 1 kHz and the number of t_1 increments to 200

(spectral width in ω_2 : 4.194 kHz, 2048 complex data points in t_2). The phase ϕ_s was incremented by using the TPPI scheme.^[14] A composite pulse consisting of two H^C -selective 90°_{sel} pulses (Q5) and a nonselective 180°_{inv} pulse was used both for ω_1 decoupling in the center of t_1 and for the conversion of zero-quantum coherence ZQ_0 to double-quantum coherence DQ_2 at the end of the sequence. Prior to the mixing step, x magnetization was selected by two 90°_{sel} pulses and a B_0 gradient ($G_3 = 35 \text{ G cm}^{-1}$). The band-selective HNHA-TACS sequence CABBV-1^[10] was used in the mixing period. The radio frequency amplitude of CABBV-1 was 4.4 kHz, corresponding to a bandwidth of about 3.4 kHz, which allows efficient polarization and coherence transfer between H^C and H^N (in the range between 3.4 and 9.0 ppm). The mixing time used was 43 ms (according to relation (1) the optimal mixing time for the creation of zero-quantum coherence ZQ_0 between H^N and H^C is given by $\tau = 1/(J_{12} - ^3J(H^N, H^C))$). For the clean conversion of ZQ_0 to DQ_2 it is important that the H^N spins can be inverted without affecting the H^C spins. This is usually possible because the H^N and H^C resonances are well separated. Overlap between H^C and H^D resonances (e.g. of Ser or Thr) does not pose a problem. Although this leads to a loss of sensitivity (due to incomplete ω_1 decoupling of the $^3J(H^N, H^D)$ couplings and nonselective TOCSY transfer), the additional coherence terms (involving more than two spins) do not lead to any detectable signals if not all participating spins are coupled to the detected spin (H^N). As $^3J(H^N, H^D)$ couplings can be neglected, the H^C, H^N cross peaks in ZQF-SIAM and DQF-SIAM spectra show even in the presence of overlapping H^C and H^D resonances purely absorptive in-phase and antiphase splittings with respect to the desired $^3J(H^N, H^C)$ coupling. (Only in the case of Gly, where H^N is coupled to H^C and H^D , can the H^C, H^N cross peaks of the ZQF-SIAM spectrum contain in addition to the desired absorptive in-phase signals also dispersive signals in double antiphase with respect to H^C and H^D).

A SIAM experiment and a DQF-COSY experiment were acquired for the protein BPTI at a temperature of 310 K using the same band-selective excitation and the same total measurement time of 9.5 h with a total of 64 scans per t_1 increment (32 scans for $FID1(t_1, t_2)$ and 32 scans for $FID2(t_1, t_2)$ in the SIAM experiment). Except for the addition and subtraction of $FID1(t_1, t_2)$ and $FID2(t_1, t_2)$ for the ZQF-SIAM and DQF-SIAM spectrum, respectively, and an additional 90° phase correction (0th order) in ω_2 for the DQF-SIAM spectrum (as described above), the 2D spectra shown in Figure 4 were processed and scaled identically (no apodization in ω_2 , skewed sinebell with a phase of 90° and a skew parameter of 0.8 in ω_1 , polynomial baseline correction in ω_1 and ω_2). In order to increase the digital resolution of the traces shown in Figure 5, the traces were inversely Fourier transformed and the first 1024 points of the resulting interferograms were extended to 16384 points by using linear prediction with 110 poles. After a final Fourier transformation, the digital resolution of the traces was 0.25 Hz per point.

Received: July 30, 1997 [Z 107521E]

German version: *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 817–821

Keywords: NMR spectroscopy • peptides • proteins • structure elucidation

- [1] a) K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**; b) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536; c) *Two-Dimensional NMR Spectroscopy* (Eds.: W. R. Croasmun, R. M. K. Carlson), VCH Publishers, New York, **1994**.
- [2] A. Pardi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 741–751.
- [3] a) J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546–4553; b) S. Macura, Y. Huang, D. Suter, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1981**, *43*, 259–281.
- [4] a) L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521–528; b) A. Bax, D. G. Davis, *ibid.* **1985**, *65*, 355–360; c) S. J. Glaser, J. J. Quant in *Advances in Magnetic and Optical Resonance*, Vol. 19 (Ed.: W. Warren), Academic Press, San Diego, **1996**, pp. 59–252.
- [5] a) U. Piantini, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6800–6801; b) M. Rance, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *117*, 479–485.

COMMUNICATIONS

- [6] a) D. Neuhäus, G. Wagner, M. Vasak, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *151*, 257–273; b) M. Eberstadt, G. Gemmecker, D. F. Mierke, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1813–1838; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1671–1695.
- [7] a) H. Oschkinat, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1984**, *60*, 164–169; b) H. Kessler, S. Scip in ref.^[15], pp. 619–654.
- [8] a) J. Titman, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 640–646; b) P. Huber, C. Zwahlen, S. J. F. Vincent, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson. A* **1993**, *103*, 118–121.
- [9] R. Brüschweiler, C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1988**, *78*, 178–185.
- [10] J. Quant, T. Prasch, S. Ihringer, S. J. Glaser, *J. Magn. Reson. B* **1995**, *106*, 116–121.
- [11] a) C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6394–6396; b) C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1986**, *85*, 6837–6852; c) C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, *75*, 474–492.
- [12] L. Emsley, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 135–148.
- [13] T. L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson. A* **1995**, *112*, 275–279.
- [14] D. Marion, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *113*, 967–974.

Catalytic Hydrogenolysis at Low Temperature and Pressure of Polyethylene and Polypropylene to Diesels or Lower Alkanes by a Zirconium Hydride Supported on Silica-Alumina: A Step Toward Polyolefin Degradation by the Microscopic Reverse of Ziegler–Natta Polymerization

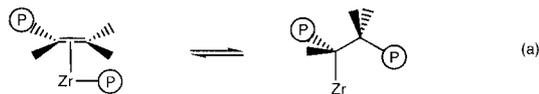
Véronique Dufaud* and Jean-Marie Basset*

Transition metal catalyzed polymerization of ethylene and propylene was discovered in the 1950s by Ziegler and Natta.^[1] Since then, there have been many applications and a large production of these polymers. However, at the end of this century, the presence of such polyolefins in our daily life has reached such a level that its environmental consequences can no longer be underestimated. The solutions to overcome this environmental challenge with catalytic methods at low temperature and pressure are not known at the moment.^[2] The scientific reasons for this deficit may be divided in two categories: the chemical inertness of polyolefins and the thermodynamic limitations to achieving the reverse of the Ziegler–Natta polymerization.

Although they are formed from olefins, polyolefins such as polyethylene or polypropylene are not “olefinic” materials since they become “paraffinic” upon polymerization. These long-chain paraffinic materials are extremely inert, and there is no simple way to transform them selectively, especially at moderate temperature, into valuable products.

* Dr. V. Dufaud, Dr. J.-M. Basset
Laboratoire de Chimie Organométallique de Surface
UMR 9986, CNRS-CPE Lyon
43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69616 Villeurbanne Cédex
(France)
Fax: (+33) 47243-1793
E-Mail: basset@coms1.cpe

It would be very fascinating to transform polyolefins into olefinic oligomers or monomers, which is theoretically possible from a mechanistic point of view according to the principle of microreversibility. The insertion of an olefin into a metal–alkyl bond, the key step in the Ziegler–Natta polymerization,^[3] can be considered as the microscopic reverse of the β -alkyl transfer [Eq. (a)]; the polymer chain is



represented by P .^[4] However, since such transformations are thermodynamically impossible at moderate temperature, it is necessary to find solutions to overcome this limitation.

We report here that it is possible to polymerize ethylene or propylene to the corresponding polyolefins with a zirconium hydride supported on silica-alumina.^[5] We also demonstrate that under hydrogen the same catalyst that can polymerize ethylene or propylene is able to cleave statistically all the C–C bonds of polyethylene or polypropylene to a range of short-chain saturated oligomers, diesels, or eventually methane, ethane, and lower alkanes.

We recently disclosed a new catalyst that is able to carry out the catalytic cleavage of the C–C bonds in several simple alkanes under hydrogen. The catalyst is a well-defined silica-supported zirconium monohydride ($(\text{SiO})_2\text{ZrH}$ (**1**))^[6–8] that is obtained by surface organometallic chemical reactions.^[9] For example, **1**, which is very electrophilic,^[10] is able to cleave the C–C bonds of propane, butanes, and pentanes (but not ethane) under a moderate hydrogen pressure (< 1 atm) and at mild temperatures (typically 25–150 °C).^[11,12] Considering that polyolefins are simply long-chain hydrocarbons, the catalytic cleavage of the C–C bonds in these higher alkanes might be possible with our electrophilic silica-supported zirconium hydride or some more strongly electrophilic supported zirconium hydride.

To render the supported zirconium hydride even more electrophilic than on silica, we treated tetra-n-propylzirconium with the surface silanol groups of a silica-alumina that was partially dehydroxylated at 500 °C (silica-alumina₅₀₀). The reaction led to the formation of a surface species which can be formulated as $(\text{SiO})\text{ZrNp}_3$ (**2**). Treatment of **2** with hydrogen at 150 °C provided the formation of a zirconium hydride supported on silica-alumina with the concomitant generation of silicon dihydride and aluminium hydride. Based on what is known for the structure of **1** on pure silica, we propose two structures for the zirconium hydride supported on silica-alumina (Scheme 1): One can be formulated as $(\text{SiO})_3\text{ZrH}$ (**3a**), in which the zirconium hydride is a monohydride grafted to silica-alumina through three covalent bonds. This was already demonstrated for pure silica by several techniques including EXAFS.^[8] The second structure **3b** is very similar. However, aluminium hydride groups could be in close proximity to the zirconium center, and the zirconium atom would be even more electrophilic than on pure silica.

When **3** was exposed to an ethylene pressure of 200 torr at room temperature, the IR spectrum of the solid showed the

E Akademische Lehrer und Lebenslauf

Akademische Lehrer:

Prof. Dr. F. Becker, Prof. Dr. A. Berkessel, Prof. P. Bienert, Prof. Dr. E. Egert, Prof. Dr. J. W. Engels, Prof. Dr. W. Fenske, Prof. Dr. S. J. Glaser, Prof. Dr. M. Göbel, Prof. Dr. C. Griesinger, Prof. Dr. K. Hensen, Prof. Dr. W. Kaim, Prof. Dr. H. Kessler, Prof. Dr. G. Kohlmaier, Prof. Dr. K. H. König, Prof. Dr. W. Martiensen, Prof. Dr. G. Quintert, Prof. Dr. M. Reggelin, Prof. Dr. P. Rosmus, Prof. Dr. R. Schlögel, Prof. Dr. H.-G. Schmalz, Prof. Dr. H. Schwalbe, Prof. Dr. E. Töpfer, Prof. Dr. M. Trömel.

Lebenslauf:

geb. 24.08.67	in Berlin (Zehlendorf)
1973-1980	Schulbesuch in Berlin
1980	Umzug von Berlin nach Frankfurt/M.
1980-1986	Besuch der Bettinaschule in Frankfurt/M.
1986	Abitur an der Bettinaschule in Frankfurt/M.
Oktober 1986	Aufnahme des Chemiestudiums an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
Mai 1989	Vordiplom im Fach Chemie
Dezember 1991	Mündliche Diplomprüfungen
Januar 1992 bis August 1992	Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Dr. C. Griesinger, Thema: „NMR Spektroskopische Untersuchungen an Inhibitoren vom Kunitz Typ“
September 1992 bis Mai 1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis Prof. Dr. C. Griesinger. Anfertigung der Dissertation mit dem Titel „NMR-spektroskopische und strukturelle Untersuchungen an kleinen Proteinen“
Mai 1995 bis Mai 1997	Lehrbeauftragter an der Fachhochschule Wiesbaden, Fachbereich Medienwirtschaft, Vorlesung: Medientechnik I
ab Juni 1997	Anstellung als Referent und Berater bei der Firma Exper-Teach Gesellschaft für Netzwerkkompetenz mbH, Dietzenbach