

**Untersuchungen der internen Dynamik des Ileal
Lipid Binding Proteins (ILBP) und des Einflusses
der CSA-Werte auf die mikrodynamischen
Parameter**

Dissertation

Zur Erlangen des Doktorgrades
der Naturwissenschaft

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Pharmazie und
Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Raed Aljazzar
Aus Palästina

Frankfurt am Main 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Dynamik von Proteinen	6
1.2	Fett- and Gallensäurebindungsproteine	8
1.3	RNaseT1	11
1.4	Mikrodynamische Bewegungsparameter	13
1.5	Das Ziel dieser Arbeit	16
2	Relaxationsphänomene in der NMR-Spektroskopie	17
2.1	Theorie	17
2.2	Operatorarstellung des Relaxationssuperoperators	20
2.3	Relaxationswege eines skalar gekoppelten IS-Spinsystems	23
2.4	Die Dipol- Dipol-Wechselwirkung	24
2.5	Die Wechselwirkung des chemischen Verschiebungstensor mit Dem äußeren Magnetfeld	27
2.6	Relaxation durch Kreuzkorrelation der DD- und CSA-Wechselwirkung Chemischer Austausch	29 30
2.7	Berechnung der Relaxationsraten	32
2.8	Bestimmung der spektralen Dichtefunktion nach Lipari und Szabo: „der Modell freie Ansatz“	34

3	Methoden	37
3.1	Das longitudinale Relaxationsexperiment	37
3.2	Das transversale Relaxationsexperiment	38
3.3	Messung des heteronuklearen NOE	39
3.4	Pulssequenz zur Messung der ^{15}N -CSA/DD-Kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsrate	39
3.5	Messung des chemischen Austausches mit dem Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Experiment	42
4	Experimente	44
4.1	^{15}N -Relaxationszeiten des humanen intestinalen Lipidbindungsproteins (ILBP)	44
4.2	NMR-Experimente zur Ermittlung der transversalen CSA/DD-Kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsrate (Apo/Holo ILBP und RNase T ₁)	47
4.3	NMR-Experimente zur Bestimmung des chemischen Austausches	47
5	Ergebnisse und Diskussion	50
5.1	^{15}N -Relaxationsraten von Human-ILBP (apo- und holo-Form)	51
5.2	(CSA/DD)-kreuzkorrelierte Kreuzrelaxationsraten von Human-ILBP (holo-Form)	61
5.3	Einfluss der individuellen CSA-Konstanten $\Delta\sigma_{\text{N}}$ auf den Ordnungsparameter S^2 beim „Model-Free-Approach“	76
5.4	Austauschparameter	80
6	Zusammenfassung	82
7	Anhang	84

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Heinz Rüterjans in der Zeit von April 2000 bis Dezember 2002 angefertigt.

Meinen verehrten Prof. Dr. Heinz Rüterjans möchte ich an dieser Stelle besonders für die interessante Themenstellung und für die hervorragende Arbeitsbedingungen, sowie seine uneingeschränkte Unterstützung in allen Bereichen danken.

Mein weiterer Dank gilt:

- Herrn Dr. C. Ludwig für die gute Einarbeitung und die fruchtbare Zusammenarbeit, sowie seine Diskussionsbereitschaft bei allen NMR-Fragen.

- Herrn PD Dr. C. Lücke für die ausgezeichnete, zahlreiche Diskussionen und die angenehme Atmosphäre.

- Herrn PD Dr. U. Günther und Dipl. Physiker Filician Dancia bei der Unterstützung und Hilfe bei der Lösung zahlreiche Computerprobleme.

- Herrn Dr. H. Hanssum für die angenehme Diskussionen über Gerätetechnik.

- Der Sekretärinnen Frau S. Fachinger für ihre professionelle Arbeit.

- allen Kollegen, Freunden für die unbeschreiblich tolle Zeit während meiner Arbeit.

- insbesondere aber meinen Eltern und meiner Frau Rasha für die vorbehaltlose Unterstützung während einer nicht immer einfachen und oftmals sehr kraftraubenden Zeit.

1 Einleitung

Proteine stellen neben den Nukleinsäuren die zentralen Moleküle des Lebens dar. Während Nukleinsäuren überwiegend als Träger genetischer Informationen zur Kodierung von Proteinen fungieren, sind die Proteine die ausführenden Moleküle und spielen bei allen biochemischen Vorgängen eine entscheidende Rolle. Die Katalyse chemischer Reaktionen in biologischen Systemen, der Transport und Speicherung kleiner Moleküle und Ionen, die koordinierte Bewegung im Muskelgewebe, sowie die Kontrolle von Wachstum sind nur einige Beispiele für die vielfältigen Aufgaben von Proteinen. Dass die Proteine so viele Aufgaben ausführen können, liegt in erster Linie in ihrer dreidimensionalen Struktur begründet. Proteine setzen sich aus 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren zusammen, die durch Peptidbindungen als Kette miteinander verbunden sind. Die Abfolge der Aminosäurereste wird als Primärstruktur des Proteins bezeichnet^{1,2}.

Um die Funktion eines Proteins vollständig erklären zu können, benötigt man neben der dreidimensionalen Anordnung der funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum auch Informationen über die internen Bewegungsvorgänge. Die Struktur allein kann nur einen Teil der Funktion eines Proteins aufdecken. Wie am Beispiel der Fettsäure bindenden Proteinfamilie gezeigt werden konnte, ist trotz relativ hoher Sequenzhomologien (30 – 95%) und einer großen strukturellen Ähnlichkeit die Spezifität dieser Proteine hinsichtlich der Bindung von Liganden recht unterschiedlich.

Die hochauflösende NMR-Spektroskopie in Lösung hat sich in den letzten Jahren zu einer der wichtigsten Methoden zur Bestimmung von dreidimensionalen Strukturen biochemisch relevanter Makromoleküle entwickelt³. Ein entscheidender Vorteil der NMR-Spektroskopie gegenüber der Röntgenstrukturuntersuchung liegt darin, dass das Protein in Lösung untersucht wird- ein Medium, das den physiologischen Bedingungen recht nahe kommt. Ein weiterer grundlegender Vorteil der NMR-Spektroskopie ist die Möglichkeit, neben der Struktur auch

dynamische Vorgänge zu verfolgen. Die NMR-Spektroskopie gestattet die zuverlässige Detektion derartiger dynamischer Effekte in verschiedenen Zeitfenstern.

Die methodische und technische Entwicklung der NMR-Spektroskopie ist noch lange nicht abgeschlossen. Seit der Entdeckung des physikalischen Phänomens der kernmagnetischen Resonanz^{4,5} im Jahr 1946, wurde die Methode zunächst innerhalb der Physik und der chemischen Analytik verfolgt. Erst nach der Entwicklung der Fourier-Transformations-NMR-Spektroskopie im Jahr 1966⁶ und der Einführung mehrdimensionaler Techniken wurde die Möglichkeit der Strukturbestimmung biologischer Makromoleküle eröffnet. Durch das Zusammenwirken der weiteren Entwicklungen im methodischen, technischen und molekularbiologischen Bereich lassen sich inzwischen immer größere Biomoleküle untersuchen. Standardmäßig werden heute Proteine in der Größenordnung bis etwa 30 – 40 kDa mittels NMR-Spektroskopie strukturell charakterisiert.

1.1 Dynamik von Proteinen

Proteine in Lösung zeigen interne Bewegungen auf sehr unterschiedlichen Zeitskalen, die sich verschieden auf die Kernresonanzspektroskopie auswirken. Schnelle Bewegungen führen zu gemittelten molekularen Parametern (z.B. Bindungslängen und Bindungswinkel), die sich jedoch auch auf Relaxationsraten auswirken. Man kann die verschiedenen Prozesse in fünf Zeitbereiche einteilen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass eine vollständige Charakterisierung aller dynamischen Prozesse in einem Molekül kaum erreichbar ist. Die Anzahl der unabhängigen Parameter, die zu einer vollständigen Beschreibung der Dynamik notwendig sind, wird immer viel größer sein als die Zahl der mit Hilfe der NMR-Spektroskopie meßbaren bewegungsempfindlichen Größen. Aus diesem Grund sind die Modelle, die zu Beschreibung der internen Bewegungen benutzt werden, sehr einfach. Die Form, in der die NMR-Parameter von den dynamischen Prozessen beeinflusst werden, ist von der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten abhängig:

- Sehr langsame Prozesse ($\tau > 1\text{s}$). In diese Zeitskala fallen langsamer Austausch von Amidprotonen des Proteinrückgrats sowie Faltungsprozesse im Protein. Langsamen Protonenaustausch kann man beispielsweise messen, indem man nach einem

Lösungsmittelwechsel von H₂O nach D₂O die zeitabhängigen Änderungen der Signalintensitäten in einer Serie von schnell hintereinander aufgenommenen Spektren beobachtet^{7,8}.

- Langsame Prozesse mit einer Zeitkonstante zwischen (10ms und 1s). Die in diesem Zeitbereich ablaufenden Prozesse lassen sich mittels homonuklearer⁹ bzw. heteronuklearer^{10,11} Austauschspektroskopie sowie durch Titrationsanalysen ermittelter Zugänglichkeiten für das Lösungsmittel aufspüren.
- Prozesse im mittleren Zeitbereich ($10\mu < \tau < 10\text{ms}$) entsprechen schnellen Konformationsänderungen oder schnellem chemischen Austausch. Mit einer Carr – Purcell – Meiboom – Gill (CPMG) Pulssequenz oder der Messung von $R_{1\rho}$ können Prozesse in diesem Zeitfenster untersucht werden. Eine Reihe biologischer Prozesse finden in diesem Zeitbereich statt. Als Beispiel variieren Proteinfaltungsraten^{12,13} von 0,2 bis 10^5 s^{-1} . Phänomene dieser Art werden durch T₂-Messungen mit variablen CPMG-Delay-Zeiten (Spin-Echo-Zeit) untersucht^{14,15}.
- Prozesse im schnellen Zeitbereich ($10\text{ps} < \tau < 10\text{ns}$). Prozesse auf dieser Zeitskala wie die Umorientierung eines Proteins oder Bewegungen der Proteinhauptkette beeinflussen homo- bzw. heteronuklearer Relaxationsraten. Schnelle Bewegungsvorgänge werden durch direkte Messungen von homo- oder heteronuklearen Auto- und Kreuzrelaxationsraten charakterisiert.
- Lokale Schwingungen einzelner Atome oder Atomgruppen sind so schnell, dass sie mittels NMR spektroskopischer Methoden nicht mehr zeitlich aufgelöst werden können.

1.2 Fett- and Gallensäurebindungsproteine

Bei den in Dün- und Dickdarm ablaufenden Verdauungsprozessen spielt die Leber eine wichtige Rolle, da in ihr die Galle gebildet wird, die dann in der Gallenblase konzentriert und gespeichert wird. Die Funktion der Galle basiert auf ihrer Fähigkeit, die wasserlöslichen Triacylglyceride im Zwölffingerdarm zu emulgieren, damit diese im Dünndarm absorbiert werden können. Der Transport der Gallensäuren ist daher von speziellem medizinischen und pharmakologischen Interesse. Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin gebildet. Die Primärgallensäuren, Chol- und Chenodesoxycholsäure werden normalerweise zur Steigerung der Detergenzwirkung durch kovalente Bindung von Glycin oder Taurin in der Leber modifiziert. Als Teil des enterohepatischen Kreislaufs werden ungefähr 90 bis 95% der Gallensalze, im Dünndarm resorbiert¹⁶⁻²⁰.

Die wichtigsten Gallensäuren sind Cholsäure und Chenodesoxycholsäure, deren Strukturen in Abb. 1.1 dargestellt sind²¹. Mittels Photoaffinitätsmarkierungen zeigten Kramer und Mitarbeiter, dass das Na⁺/ Gallensäure-Kotransportsystem im Kaninchendarm eine aktive Einheit von 451 ± 35 kDa bildet, die wahrscheinlich aus 4 Untereinheiten des membranständigen Teils von je 93 kDa und 4 zytoplasmatisch anhaftenden Einheiten von 14 kDa^{22, 23,24} zusammengesetzt ist. Das 14 kDa Protein, das Ileale Lipidbindungsprotein (ILBP), wurde ursprünglich als gallensäurenbindendes Protein an der zytosolischen Membranseite von Ileozyten identifiziert. Die Photoaffinitätsmarkierungen von intaktem Darmgewebe aus Kaninchen zeigten, dass ILBP das einzige physiologisch wichtige Protein zu sein scheint, das Gallensäuren innerhalb des Proteinraums binden kann²⁵. Die Aufklärung der Wechselwirkung von Gallensäuren mit ILBP, bzw. das Verständnis der molekularen Ligandenbindungseigenschaften dieses Proteins ist sehr wichtig, um den Mechanismus der Resorption der Gallensäuren zu verstehen. Dieser Mechanismus ist bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt^{26,27}.

ILBP gehört zu einer Familie von intrazellulären Lipidbindungsproteinen (LBP). Diese Proteine LBP treten in unterschiedlichen Körpergeweben auf und können amphiphile Liganden wie Fettsäuren oder Gallensäuren binden. Die besondere Bedeutung dieser Proteine wird auch durch die große Menge an LBP's, die innerhalb der Zelle gefunden wird, und durch

ihr allgegenwärtiges Auftreten in allen Arten von Organismen, einschließlich der Säugetiere, der Vögel, der Fische und der Insekten, deutlich. Diese Klasse zytoplasmatischer Proteine wurde erstmalig Anfang der siebziger Jahren beschrieben. Sie besitzen hohe Bindungsaffinitäten für langkettige Fettsäuren (16-22 Kohlenstoffatome)²⁸⁻³⁰. In der Familie der LBP haben nur zwei Proteine (ILBP und L-FABP) die Fähigkeit³¹⁻³³ neben Fettsäuren auch Gallensäuren zu binden. Beide Proteine zeigen eine höhere Sequenzhomologie zueinander als zu anderen LBP's

ILBP hat ein Molekulargewicht von 14.1 kDa und wurde zum ersten Mal aus Dickdarmgewebe von Kaninchen und Schwein isoliert^{34, 35}. Die Struktur des ILBP stellt im wesentlichen ein β -Fass dar (Abb. 1.2). Das Polypeptidgerüst besteht aus 10 antiparallelen β -Faltblattsträngen, wobei aus den β -Strängen zwei senkrecht zueinander angeordnete β -Faltblätter gebildet werden. Das erste β -Faltblatt besteht aus den β -Strängen β_A - β_E und der ersten Hälfte von β_F , während das zweite β -Faltblatt aus der zweiten Hälfte von β_F und den Strängen β_G - β_J gebildet wird. Zwischen den Abschnitten β_A und β_B sind zwei durch eine kleine Schleifenregion getrennte α -Helices angeordnet. Zwischen den beiden Strängen β_D und β_E befindet sich ein größerer Zwischenraum. Der Ein- und Austritt der Fettsäuren erfolgt wahrscheinlich durch die Öffnung, die durch die α_{II} -Helix und den Strängen β_C , β_D und β_E begrenzt wird. Der Hohlraum im Inneren des Proteins nimmt etwa 5% des Molekülvolumen ein. Innerhalb dieses Raumes bindet der Ligand in der Nähe der beiden α -Helices (Abb. 1.3)³⁶. Weil das Volumen der Kavität in allen LBPs nahezu vergleichbar ist, ist die Fähigkeit, Gallensäuren und Fettsäuren zu binden, entweder durch einen spezifischen Unterschied in der Struktur oder in der Proteindynamik begründet.

Im Bezug auf die Struktur sind die zwei Stränge β_G , β_H im ILBP verkürzt, was die Existenz eines eventuell vorhandenen zweiten Portals ermöglicht³⁷. Diese Eigenschaft wurde bei Untersuchungen an der apo-Form von ILBP bestätigt³⁸.

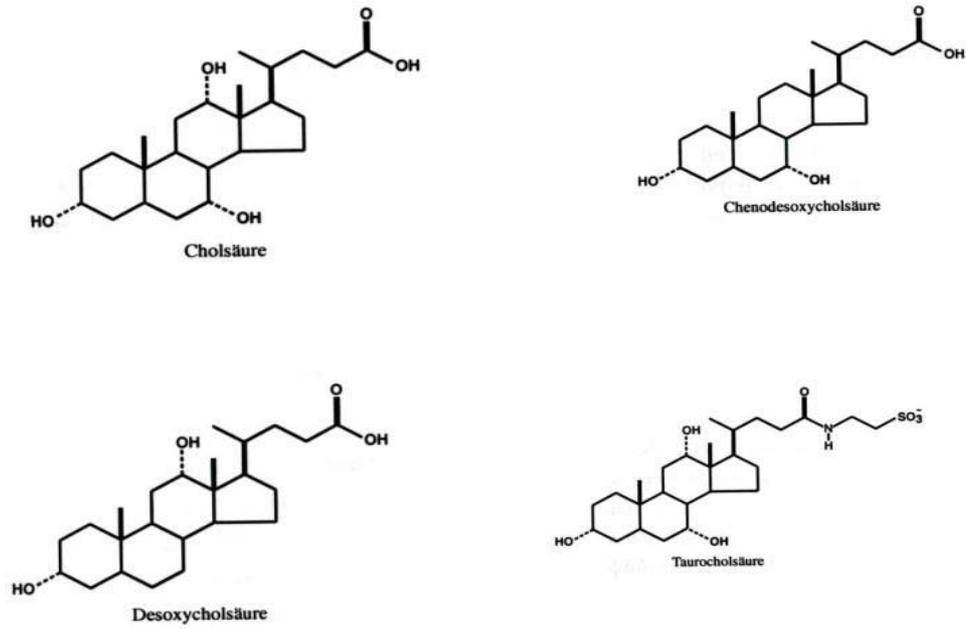


Abb. 1.1: Chemische Strukturen der wichtigsten Gallensäurederivate, die von ILBP gebunden werden²¹.

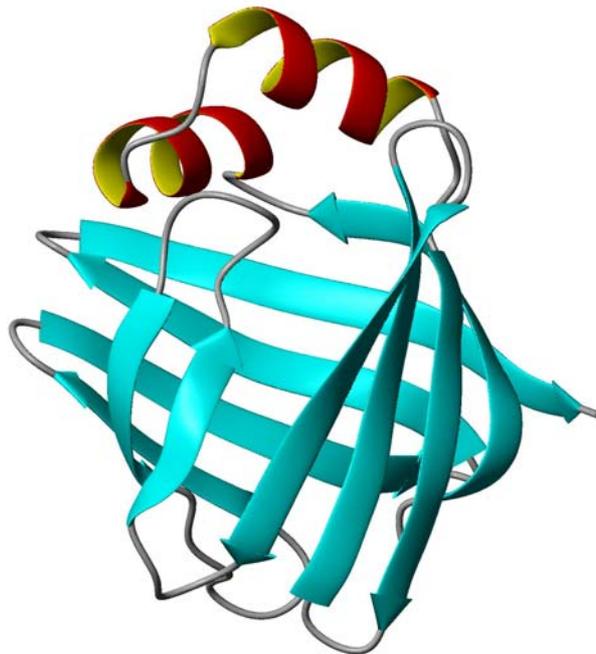


Abb. 1.2: Das ILBP (Apo-Fprm) besteht aus 10 antiparallelen β -Faltblattsträngen, die eine Fassform bilden, und zwei α -Helices. In der Kavität des Innenraums wird der Ligand gebunden.

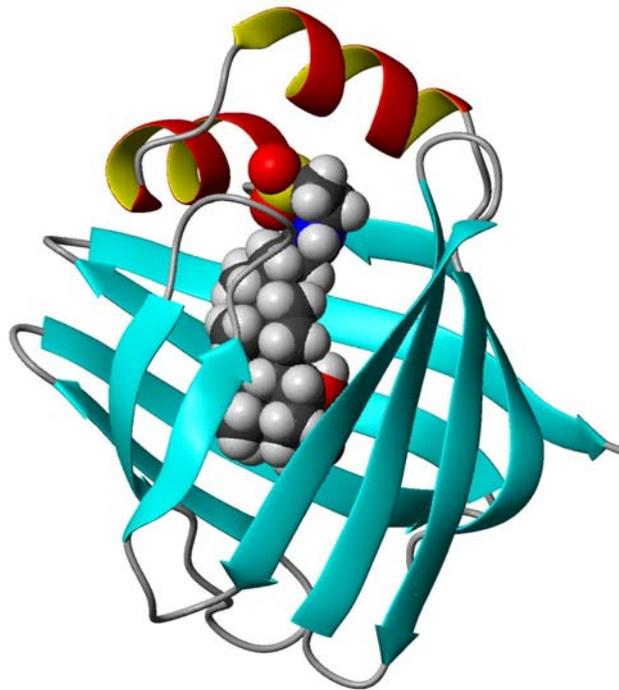


Abb. 1.3: Ein einziges Gallensäuremolekül wird in der Kavität des Proteins gebunden.

1.3 RNaseT1

Das Enzym Ribonuklease T₁ (RNaseT₁) ist ein häufig verwendetes Modellsystem für Untersuchungen der Struktur und Funktion von Enzymen, da es über einen weiten pH-Bereich eine außerordentliche Stabilität aufweist. Das Molekül gehört zu der Gruppe der mikrobiellen, endolytisch spaltenden Hydrolasen. Es spaltet spezifisch einzelsträngige RNA am 3'-Ende

von Guaninnukleotiden, jedoch nicht DNA, doppelsträngige RNA oder organische Phosphorsäurediester³⁹⁻⁴¹.

RNaseT₁ wurde erstmals 1957 aus Takadiastase, einer industriell produzierten Fraktion aus dem Kulturmedium des Schimmelpilzes *Aspergillus oryzae*, in zwei isomeren Formen isoliert⁴², die entweder Glutamin oder Lysin an Position 25 enthalten⁴³⁻⁴⁴. Die beiden Isoenzyme unterscheiden sich in ihren isoelektrischen Punkten⁴³. In der vorliegenden Arbeit wurde die Isoform mit Lysin an Position 25 verwendet. RNaseT₁ zeichnet sich durch gute Löslichkeit aus. Aufgrund der Verfügbarkeit größerer Proteinmengen durch Überexpression von RNaseT₁ mit Hilfe der Rekombinantentechnik aus *E. Coli*-Bakterien⁴⁵ konnten dreidimensionale Strukturen mittels Röntgenstrukturanalysen sowohl von unkomplexierter RNaseT₁⁴⁶ als auch von RNaseT₁ in Komplex mit verschiedenen Inhibitormolekülen erhalten werden⁴⁷⁻⁴⁹.

RNaseT₁ (Abb. 1.4) ist ein monomeres, globuläres Protein und besteht aus einer Polypeptidkette von 104 Aminosäuren mit einer Molekülmasse⁵⁰ von 11.1 kDa. Es enthält zwei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuren Cys 2 und Cys 10 sowie Cys 6 und Cys 103. Die Disulfidbrücke zwischen Cys 6 und Cys 103 verbindet das N-terminale mit dem C-terminalen Ende der Polypeptidkette. Die Spaltung der Disulfidbrücken durch Reduktion führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität und der räumlichen Struktur⁵¹. Die räumliche Struktur der freien und komplexierten Ribonuklease T₁ wurde sowohl durch Röntgenstrukturanalyse^{49, 52, 53} als auch mit NMR-Messungen bestimmt⁵⁴⁻⁵⁶. Die Tertiärstruktur der RNaseT₁ besteht aus einer 4.5 Windungen umfassenden α -Helix, einem zentralen fünfsträngigen, antiparallelen β -Faltblatt, das linksgängig verdrillt ist, sowie einem kurzen zweisträngigen β -Faltblatt im N-terminalen Sequenzabschnitt. Im aktiven Zentrum wird die Hydrolyse von Phosphorbindungen in einzelsträngiger RNA in einem zweistufigen Prozess selektiv am 3'-Ende von Guaninnukleotiden katalysiert. Im ersten Schritt wird die Bindung zwischen dem 3'-Phosphoratom des Guaninnukleotids und dem 5'-Sauerstoffatom des folgenden Nucleotids unter Bildung einer freien 5'-Hydroxylgruppe und eines intermediären Guanosin-2', 3'-cyclophosphats gespalten. An diese reversible Transesterifizierung schließt sich die Hydrolyse des Intermediates zum 3'-Phosphat an⁵⁷. Die erhaltenen Guanosin-3'-monophosphat-Derivate sind kompetitive Inhibitoren der Katalyse⁵⁸. Die interne Dynamik der RNaseT₁ wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmt^{59,60}.

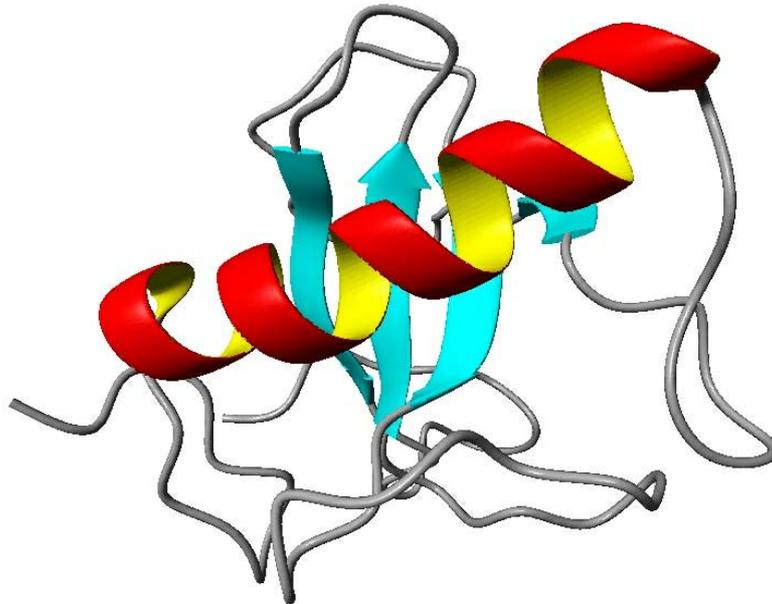


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Tertiärstruktur der RNaseT₁. Die blauen Pfeile stellen die Stränge des β -Faltblatts dar. Die Rot-Gelb dargestellte, schraubenförmige Anordnung der Aminosäuren ist die einzige α -Helix in diesem Enzym.

1.4 Mikrodynamische Bewegungsparameter

Allgemein ist die Bewegung eines Moleküls beliebiger Form in Lösung prinzipiell anisotrop, besteht aus einer Kombination von translatorischen und rotatorischen Bewegungsformen. Die Rotationsbewegung kann dabei aus drei unabhängigen Bewegungen um die Hauptachsen des Rotationsträgheitstensors des Moleküls zusammengesetzt sein. Für nahezu kugelförmige Moleküle kann die Rotationsdiffusion des Moleküls als isotrop angenommen werden. Mit dieser Voraussetzung ist weder von bevorzugten Bewegungsrichtungen oder –geschwindigkeiten, noch von bevorzugten Orientierungen im Raum auszugehen. Durch Messungen von Relaxationsraten bestimmter Spinzustände können geeignete Daten zu

Beschreibung der internen Dynamik von Proteinen erhalten werden. Man unterscheidet zwei Typen von Relaxationsraten, die Auto- und die Kreuzrelaxationsraten. Die bekanntesten Autorelaxationsraten sind die longitudinale Relaxation mit der charakteristischen T_1 -Zeit, während der das System nach einer Störung zurück zum Boltzmann-Gleichgewicht strebt, und die transversale Relaxation mit der charakteristischen T_2 -Zeit, während der das System ohne Energieänderung eine maximale Entropie anstrebt. Die transversale Relaxation bestimmt die Lebensdauer beobachtbarer Kohärenzen und spielt bei jeder Art von NMR-Experimenten eine entscheidende Rolle. Wird Energie von einem Kern auf einen anderen aufgrund eines Relaxationsmechanismus übertragen, so spricht man von Kreuzrelaxation. Dieser Effekt bildet die Basis der homo- oder heteronuklearen NOE bzw. ROE-Werte.

Werden verschiedene Relaxationsmechanismen durch eine Kopplung miteinander beeinflusst, so entsteht eine neue Relaxation. Liegt z. B. eine zeitliche Korrelation der verschiedenen Korrelationsfunktionen der Relaxationsmechanismen vor, so können diese miteinander kommunizieren und es kommt zu einem Relaxationseffekt, bei dem sich das Kohärenzniveau ändern kann (was ansonsten quantenmechanisch verboten ist). Diese Art der Relaxation wird kreuzkorrelierte Kreuzrelaxation genannt. Zwei Typen dieser Art der Relaxation sind von Interesse und zwar die DD/DD-kreuzkorrelierte Relaxation zwischen der Korrelationsfunktion der C_α - H_α - und N - H_N -Bindungen, mittels der sich Diederwinkel im Proteinrückgrat bestimmen lassen, und die CSA/DD-kreuzkorrelierte Kreuzrelaxationsrate der Amidstickstoffresonanzen im Proteinrückgrat, mit der sich aminosäurespezifische Werte für die Anisotropie des ^{15}N chemischen Verschiebungstensors bestimmen lassen⁶¹⁻⁶⁴.

Aus der Relaxationstheorie⁶⁵⁻⁶⁷ lassen sich die Zusammenhänge zwischen den für ein gewähltes molekulares Modell berechneten Werten der spektralen Dichtefunktion und den experimentell bestimmten Relaxationsraten ableiten⁶⁸⁻⁷¹. Die spektrale Dichtefunktion ergibt sich aus der Bewegungskorrelationsfunktion des betrachteten Systems. Die Fourier-Transformierte dieser Funktion bestimmt dann die entsprechenden Relaxationsraten. Die Wahl des Modells für die spektrale Dichtefunktion ist abhängig von dem betrachteten Molekül und der Komplexität der internen Bewegungsvorgänge⁷²⁻⁸⁰.

Anfang der siebziger Jahre wurden die ersten Messungen von heteronuklearen Relaxationsraten an Makromolekülen⁸¹⁻⁸² durchgeführt. Longitudinale Relaxationszeiten der Carbonylkohlenstoffresonanzen und der ^{13}C -Resonanzen aliphatischer Kohlenstoffatome von Ribonuklease A wurden bei natürlicher Häufigkeit bestimmt. Seit Mitte der siebziger Jahre wurden zahlreiche Studien zur Untersuchung der Dynamik von Makromolekülen mittels ^{15}N - und ^{13}C -Relaxationszeiten, die mit eindimensionalen, direkt detektierten Spektren

aufgenommen wurden, bei natürlicher Häufigkeit durchgeführt⁸³⁻⁸⁶. Allerdings mussten wegen der sehr geringen Empfindlichkeit der Experimente sowie der Signalüberlappung in den Spektren die Proteinkonzentrationen hoch sein und es konnten meist nur für einzelne Resonanzen die Relaxationszeiten bestimmt werden. Durch die Entwicklung gentechnischer Methoden ist es mittlerweile möglich, vollständig mit NMR-aktiven Isotopen angereicherte Proteine einzusetzen, sodaß man nur geringe Proteinkonzentrationen benötigt. Ferner werden die Methoden des Magnetisierungstransfers von ^1H auf die $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Resonanzen und zurück genutzt. Hierdurch wird die Steigerung der Empfindlichkeit durch das gyromagnetische Verhältnis der Protonen ausgenutzt.

Neuere Untersuchungen nutzen die Möglichkeit, neben der Bewegung des N-H-Bindungsvektors im Peptidgerüst, auch die Dynamik verschiedener anderer in Proteinen auftretender Gruppen zu untersuchen. Ansätze zur Beschreibung der dynamischen Effekte in diesen Gruppen des Proteins⁸⁷⁻⁹⁵ erlauben die routinemäßige Messung der ^{15}N -Relaxationsraten im Proteinerückgrat^{60, 96-107}. In derartigen Analysen ist es üblich, die anisotrope Rotationsdiffusion des Proteins zu ermitteln und die lokale Dynamik zu ermitteln^{100, 101, 108, 109}.

Mit Hilfe von ^{13}C -bezogenen Relaxationsraten können ebenfalls Untersuchungen durchgeführt werden, um Informationen über die interne Dynamik zu erhalten^{83, 110-114}. Diese Untersuchungen wurden an Modellsystemen durchgeführt^{115, 116}. Problematisch bei gleichmäßig mit ^{13}C -angereicherten Molekülen sind jedoch ^{13}C - ^{13}C homonukleare Kopplungen, die zum einen die Resonanzzuordnung und zum anderen die Interpretation der erhaltenen Relaxationsraten erschweren.

Ausgehend von den ersten Berechnungen von Woessner⁶⁸ wurden immer komplexere physikalische Modelle für interne Bewegungen entwickelt.

Ein in letzter Zeit zur Beschreibung der internen Dynamik häufig verwendetes Modell wurde von Lipari und Szabo^{117, 118} vorgeschlagen. Die Beschreibung der internen Dynamik, die unter dem Namen "Model-Free Approach" bekannt wurde, geht von einer allgemeinen Beschreibung der internen Bewegung durch eine Korrelationszeit und einen Ordnungsparameter aus. Dieses Modell ermöglicht es, NMR-Relaxationsparameter zu interpretieren, ohne auf spezifische Bewegungsmodelle zurückgreifen zu müssen. Dieser Ansatz ist besonders geeignet, viele ähnliche Bewegungen miteinander zu vergleichen und die Bewegungsamplitude abzuschätzen. Das Modell von Lipari und Szabo findet daher, mit verschiedenen Modifikationen und Erweiterungen hauptsächlich Verwendung für die Beschreibung der Bewegung in dem Peptidrückgrat von Proteinen. In der vorliegenden

Arbeit werden die dynamischen Eigenschaften von ILBP und RNaseT₁ mit Hilfe des Modells von Lipari und Szabo untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit

- Im Rahmen dieser Arbeit sollen Messungen sämtlicher ¹⁵N-bezogener Relaxationsraten an einem vollständig mit ¹⁵N-Isotopen angereicherten Lipidbindungsprotein (ILBP) bei Magnetfeldstärken (500, 600, 800 MHz ¹H Larmorfrequenz) erfolgen. Durch Messungen bei verschiedenen Feldstärken lassen sich Feldstärke-abhängige (z. B. chemischer Austausch und CSA-Relaxation) von den Feldstärke-unabhängigen Relaxationseffekten (z. B. Dipol-Dipol Relaxation) separieren. Zur Auswertung dieser experimentellen Daten soll der „Model-Free Approach“ von Lipari & Szabo verwendet werden.
- Mittels Messungen der CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten für ¹⁵N-Resonanzen im Proteinrückgrat sollte die aminosäurespezifische Anisotropie des chemischen Verschiebungstensors ($\Delta\sigma_N$) in ILBP mit und ohne Ligand bestimmt werden.
- Es sollten Untersuchungen der Abhängigkeit der CSA-Werte von der Struktur des Proteins sowohl im freien als auch im mit Taurocholat komplexierten ILBP durchgeführt werden. Ebenso sollten CSA-Werte von RNaseT₁ bestimmt werden.
- Der Einfluß der individuellen aminosäurespezifischen Anisotropie des chemischen Verschiebungstensor auf die Dynamik sollte ermittelt werden.
- Langsame dynamische Vorgänge mit einer charakteristischen Zeitkonstanten zwischen 10µs und 10ms (schneller „chemischer Austausch“ sowie Konformationsänderungen) sollten mit einer modifizierten CPMG-Pulssequenz verfolgt werden.

2. Relaxationsphänomene in der NMR-Spektroskopie

Im allgemeinen ist die NMR-Relaxation der Prozess, der das System von nuklearen Spins nach einer Störung in das Gleichgewicht zurückbringt. NMR-Relaxation ist bedingt durch die Kopplung der Spinsysteme mit dem umgebenden Medium. Die beim Übergang vom höheren ins tiefere Energieniveau freiwerdende Energie wird in Form von Wärme an die Umgebung (Spin-Gitter-Relaxation) abgegeben. Dieser Prozess vollzieht sich mit einer Geschwindigkeitskonstante $1/T_1$, wobei T_1 longitudinale Relaxationszeit genannt wird. Durch die Wechselwirkung der Kernspins untereinander unterliegt die transversale Magnetisierung einer zeitlichen Änderung (Spin-Spin-Relaxation). Dementsprechend definiert man eine transversale Relaxationszeit T_2 .

Eine erste phänomenologische Theorie der Relaxation wurde bereits kurz nach der Entdeckung der NMR-Spektroskopie entwickelt^{119,120}. Eine halbklassische Relaxationstheorie war ausreichend für die Erklärung des NMR-Phänomens^{121,122}.

2.1 Theorie

Die Zeitevolution eines abgeschlossenen quantenmechanischen Systems wird im allgemeinen durch die Liouville-von Neumann Gleichung beschrieben¹²³:

$$\frac{d\sigma}{dt} = -i[H_{\text{tot}}, \sigma(t)] \quad (2.1)$$

$\sigma(t)$ kennzeichnet den Zustand des Spinensembles und $H_{\text{tot}}(t)$ ist der Hamiltonoperator, der die Wechselwirkung dieses Ensembles mit der Umgebung beschreibt. Die eckigen Klammern deuten an, daß die Glieder Kommutatoren sind. Kernspinsysteme sind nicht völlig von ihrer Umgebung isoliert. Man zerlegt daher den Hamiltonoperator in zwei Anteile¹²⁴:

$$H_{\text{tot}}(t) = H_0 + H_1(t) \quad (2.2)$$

wobei H_0 ist der zeitunabhängige Anteil der Spinsysteme (z. B. chemische Verschiebung, skalare Kopplung etc.) während $H_1(t)$ der zeitabhängige Teil für die stochastischen Vorgänge ist, die für die Relaxation verantwortlich sind. Der Hamiltonoperator in Gleichung (2.2) wird in Einheiten der Plank schen Konstanten beschrieben. Setzt man diese Zerlegung des Hamiltonoperators in Gleichung (2.1) ein, so nimmt die Gleichung in Kommutatorschreibweise folgende Form an:

$$\frac{d\sigma}{dt} = -i[H_0 + H_1(t), \sigma(t)] \quad (2.3)$$

Da der stochastische Anteil des Hamiltonoperators für die Relaxation von Bedeutung ist, transformiert man Gleichung (2.3) in eine Wechselwirkungsdarstellung bezüglich H_0 ¹²⁵:

$$\frac{d}{dt}\sigma^T(t) = -i[H_1^T(t), \sigma^T(t)] \quad (2.4)$$

wobei $H_1^T(t) = e^{iH_0t} H_1(t) e^{-iH_0t}$ und $\sigma^T(t) = e^{iH_0t} \sigma(t) e^{-iH_0t}$

Da $H_1(t)$ als eine kleine Störung angenommen werden kann, ist eine Integration möglich:

$$\sigma^T(t) \approx \sigma^T(0) - i \int_0^t [H_1^T(t'), \sigma^T(t')] dt' \quad (2.5)$$

Nach einer zweiten Integration¹²⁶:

$$\sigma^T(t) \approx \sigma^T(0) - i \int_0^t [H_1^T(t'), \sigma^T(t')] dt' - \int_0^t \int_0^{t'} [H_1^T(t'), [H_1^T(t''), \sigma^T(0)]] dt' dt'' \quad (2.6)$$

Mit der ersten Ableitung bildet man den Mittelwert über die gesamten Systeme des Ensembles und mit $\tau = t - t'$:

$$\frac{d}{dt} \overline{\sigma^T}(t) = -i \overline{[H_1^t(t), \sigma^T(o)]} - \int_0^t d\tau \overline{[H_1^T(t), [H_1^T(t-\tau), \sigma^T(0)]]} \quad (2.7)$$

Es wird angenommen, dass $H_1(t)$ stationäre stochastische Prozesse beschreibt. Die für $H_1(t)$ verantwortlichen stochastischen Prozesse sollten mit einer Korrelationszeit τ verknüpft sein, die sehr viel kürzer als die Zeitskala für die Entwicklung von $\sigma^T(t)$ ist. Die Zeitskala ist durch die Spin-Spin- und Spin-Gitter-Relaxation gegeben. In der Lösung ist diese Bedingung erfüllt, solange die Rotationskorrelationszeit signifikant kleiner als die Relaxationszeit ist. Diese Bedingung führt dazu, dass der erste Kommutator der Gleichung (2.7) verschwindet und $H_1(t)$ und $\sigma^T(t)$ getrennt gemittelt werden können. Der Wert des Integrals ist ungefähr gegeben durch $\overline{[H_1]^2} \tau t$, und wenn dieser Ausdruck kleiner 1, ändert sich σ^T kaum mit t . $\sigma^T(0)$ kann durch $\sigma^T(t)$ ersetzt werden. Alle diese Bedingungen führen zu dem folgenden Integral¹²⁶:

$$\frac{d}{d\tau} \overline{\sigma^T}(t) = - \int_0^\infty d\tau \overline{[H_1^T(t), [H_1^T(t-\tau), \sigma^T(t)]]} \quad (2.8)$$

Für $t \rightarrow \infty$ verschwindet $\sigma^T(t)$ in Gleichung (2.8). Dieser Befund wird durch die Symmetrie der stationären stochastischen Prozesse verursacht, die für Emission und Absorption gleiche Wahrscheinlichkeiten aufweisen und so für lange Zeiten zur Sättigung führen. Man muss deswegen in der Gleichung (2.8) $\sigma^T(t)$ durch $\sigma^T(t) - \sigma_0^T$ ersetzen, wobei σ_0^T der Gleichgewichtsdichteoperator in der Wechselwirkungsdarstellung ist. Transformiert man Gleichung (2.8) zurück in das Laborkoordinatensystem, so erhält man^{127,128}:

$$\frac{d}{dt} \overline{\sigma(t)} = -i [H_0, \overline{\sigma(t)}] - \hat{\Gamma} \{ \overline{\sigma(t)} - \sigma_0 \} \quad (2.9)$$

Diese Gleichung (2.8) steht im Mittelpunkt der Relaxationstheorie und dient als Ausgangspunkt für alle folgenden Rechnungen in dieser Arbeit. für den Relaxationssuperoperator $\hat{\Gamma}$ gilt:

$$\hat{\Gamma} B = \int_0^{\infty} \overline{[H_1(t), [e^{-iH_0\tau} H_1(t-\tau) e^{iH_0\tau}, B]]} d\tau \quad (2.10)$$

B steht für den Produktoperator, dessen Relaxationsrate bestimmt werden soll, z. B. I_Z-Operator im Fall der longitudinalen Relaxationsrate.

2.2 Operatordarstellung des Relaxationssuperoperators

Der totale Hamiltonoperator H(t) ergibt sich aus der Summe von H₀ und des stochistischen Teils H₁(t). In der allgemeinen Form lautet der Hamiltonoperator¹²⁶:

$$H_1(t) = \sum_{\mu} \xi^{(\mu)}(t) \sum_{m=-l_{\mu}}^l (-1)^m Y_{l_{\mu},-m}(\Omega_{\mu}(t)) T_{l_{\mu},m}^{(\mu)} \quad (2.11)$$

Mit dieser Gleichung ergibt sich H₁(t) als gewichtete Summe mit dem Index für die verschiedenen Wechselwirkungen μ mit dem Rang l_{μ} . $\xi^{(\mu)}$ bezeichnet die Stärke der Wechselwirkung, m ist die magnetische Quantenzahl. $Y_{l_{\mu},m}^{(\mu)}$ sind die sphärischen Kugelflächenfunktionen¹⁰, die den räumlichen Anteil des Hamiltonoperators der Wechselwirkung μ beschreiben. Der Spinanteil wird durch die Spintensoroperatoren $T_{l,m}^{(\mu)}$ beschrieben. Wenn folgende Symmetrieeigenschaften

$$Y_{l,-m} = (-1)^m Y_{l,m}^* \quad (2.12)$$

$$T_{l,-m} = (-1)^m T_{l,m}^{\dagger}$$

berücksichtigt werden, so ergibt sich folgender Relaxationssuperoperator:

$$\begin{aligned} \hat{\Gamma}(B) = & \sum_{\mu, \mu'} \xi_{\mu} \xi_{\mu'} \sum_{m, m'} (-1)^{m+m'} \int_0^{\infty} d\tau \overline{[Y_{l_{\mu}, -m}^{\mu}(\Omega(t)) Y_{l_{\mu'}, -m'}^{\mu'}(\Omega_{\mu'}(t-\tau))]} \\ & \times [T_{l_{\mu}, m}^{(\mu)}, [e^{-iH_0\tau} T_{l_{\mu'}, m'}^{(\mu')} e^{iH_0\tau}, B]] \end{aligned} \quad (2.13)$$

Eine Vereinfachung der Abhängigkeit von τ in diesem Integral kann dadurch erreicht werden, dass man die Spintensoroperatoren $T_{l_{\mu}, m}^{(\mu)}$ in der Basis $\{A_p\}$ der Eigenoperatoren des Hamiltonsuperoperators \hat{H}_0 einsetzt:

$$T_{l_{\mu}, m}^{(\mu)} = \sum_p a_{l_{\mu}, m, p}^{(\mu)} A_p^{(\mu)}, \quad (2.13)$$

die folgende Beziehung erfüllen:

$$\hat{H}_0 A_p = [H_0, A_p] = \omega_p A_p \quad (2.14)$$

Jetzt können durch diese Transformation die Tensoroperatoren in Gleichung (2.13) durch folgenden Ausdruck ersetzt werden:

$$e^{-iH_0\tau} T_{l_{\mu'}, m'}^{(\mu')} e^{iH_0\tau} = \sum_p a_{l_{\mu'}, m', p'}^{(\mu')*} A_{p'}^{(\mu')} e^{-i\omega_{p'}\tau} \quad (2.15)$$

Hier soll nur die Relaxation im Laborkoordinatensystem betrachtet werden. Die endgültige Form des Relaxationssuperoperators im Laborkoordinatensystem erhält man, wenn die letzte Beziehung in Gleichung (2.13) eingesetzt wird:

$$\hat{\Gamma}(\sigma) = \sum_{\mu, \mu'} \xi_{\mu} \xi_{\mu'} \sum_{m, m'} (-1)^{m+m'} \sum_{p, p'} a_{l_{\mu}, m, p}^{(\mu)} a_{l_{\mu'}, m', p'}^{(\mu')*} \quad (2.16)$$

$$\times \int_0^{\infty} d\tau \overline{\left(Y_{l_{\mu'}, -m'}(\Omega_{\mu'}(t)) Y_{l_{\mu}, -m}^*(\Omega_{\mu}(t-\tau)) \right)} e^{-i\omega_p^{(\mu)} \tau} [A_p^{(\mu)}, [A_p^{(\mu')}, B]]$$

Dieses Integral hat den Charakter einer Fouriertransformation einer Korrelierten sphärischen Kugelflächenfunktion. Dadurch wird Gleichung (2.16) vereinfacht, in dem man das Integral durch die spektrale Leistungsdichtefunktion $J(\omega)$ ersetzt. Die spektrale Leistungsdichtefunktion $J(\omega)$ ist definiert als die Fouriertransformierte der Korrelationsfunktion gemäss:

$$J_{-m, -m', l_{\mu}, l_{\mu'}}^{(\mu, \mu')}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} d\tau C_{-m, -m', l_{\mu}, l_{\mu'}}^{(\mu, \mu')}(\tau) e^{-i\omega\tau} \quad (2.17)$$

wobei $C_{-m, -m', l_{\mu}, l_{\mu'}}^{(\mu, \mu')}(\tau)$ die Korrelationsfunktion ist.

$$C_{-m, -m', l_{\mu}, l_{\mu'}}^{(\mu, \mu')}(\tau) = \overline{Y_{l_{\mu}, -m}^{(\mu)}(\Omega_{\mu}(0)) Y_{l_{\mu'}, -m'}^{(\mu')*}(\Omega_{\mu'}(\tau))}$$

In der Gleichung (2.16) kann der Imaginärteil vernachlässigt werden, sodass die spektrale Leistungsdichtefunktion in der folgenden Form ausgedrückt werden kann¹²⁶:

$$\frac{1}{2} J_{l, l', m, m'}^{(\mu, \mu')}(\omega_p) = \int_0^{\infty} d\tau \overline{Y_{l_{\mu}, -m}(\Omega_{\mu}(t)) Y_{l_{\mu'}, -m'}^*(\Omega_{\mu'}(t-\tau))} e^{i\omega_p^{(\mu')} \tau} \quad (2.18)$$

Diese Gleichung führt zu der Berechnung der spektralen Leistungsdichtefunktionen $J(\omega)$, die sämtliche dynamische Informationen des betrachteten Spinsystems beinhaltet und somit als ein zentrales Problem der Auswertung von NMR-Relaxationsdaten gilt. Wenn die

Parameter μ , μ' gleich sind, spricht man von einer Autokorrelationsfunktion, sind die beiden verschieden, von einer Kreuzkorrelationsfunktion.

2.3 Relaxationswege eines skalar gekoppelten IS-Spinsystems

Für Moleküle in der Größenordnung von einigen tausend Dalton – d.h. in der Größe von Proteinen- sind für die Relaxation vor allem zwei Mechanismen von Bedeutung. Die Wechselwirkung zweier benachbarter Dipolvektoren (DD) durch den Raum ist für Protonen der wichtigste Relaxationsweg. Für ^{15}N -Resonanzen ist noch die Wechselwirkung zwischen dem Magnetfeld und dem Tensor der chemischen Verschiebung, dem sogenannten CSA-Beitrag wichtig, so dass der Hamiltonoperator aus Gleichung (2.1) folgende Form annimmt:

$$H_1(t) = H^{\text{DD}}(t) + H^{\text{CSA}}(t) \quad (2.19)$$

Für viele Spinsystem sind beide DD- und CSA-Relaxationswege effektiv. In diesem Fall können beide Mechanismen miteinander wechselwirken. Gleichung (2.19) wird zu:

$$H_1(t) = H^{\text{DD}}(t) + H^{\text{CSA}}(t) + H^{\text{CSA/DD}}(t) \quad (2.20)$$

Die Feldfluktuationen des CSA-Mechanismus und des DD-Mechanismus können sich jetzt entweder addieren, so dass die Amplitude der Fluktuation größer wird oder bei destruktiver Wechselwirkung die Amplitude der Fluktuation kleiner werden lassen. Dies hängt von dem Spinzustand des angesprochenen Spins ab (Abb. 2.1). Aufgrund der Bedeutung werden beide Relaxationswege in den folgenden Abschnitten eingehend erläutert.

2.4 Die Dipol- Dipol-Wechselwirkung

Durch die homo- oder heteronukleare Kopplung der Spins besteht eine weitere, wesentliche Wechselwirkung. Diese Dipol-Dipol-Wechselwirkung ist stark richtungs- und entfernungsabhängig, aber unabhängig vom angelegten B_0 -Feld. Aufgrund ihrer r^{-3} -Abhängigkeit tragen zu ihr fast ausschließlich direkt benachbarte Kerne bei, da die Beiträge weiter entfernter Kerne entsprechend abfallen¹²⁹.

Das klassische Bild bei der Wechselwirkung von zwei magnetischen Momenten μ_1 und μ_2 ist wie folgt gegeben:

$$E_{1,2} = \{\mu_1 \cdot \mu_2 - 3 (\mu_1 \cdot \mathbf{n}_{1,2})(\mu_2 \cdot \mathbf{n}_{1,2})\} / r_{1,2}^3 \quad (2.21)$$

Wobei $r_{1,2}$ der Abstand zwischen μ_1 und μ_2 , $\mathbf{n}_{1,2}$ ist der Einheitsvektor entlang der Linie, die beide verbindet, $\mathbf{n}_{1,2} = \mathbf{r}_{1,2} / |\mathbf{r}_{1,2}|$.

Im quantenmechanischen Formalismus¹³⁰:

$$H^{DD} = -I \cdot \underline{D} \cdot S \quad (2.22)$$

hat im Hauptachsensystem des Tensors, in dem die z-Achse in Richtung des Kernverbindungsvektor \vec{r}_{IS} zeigt, der dipolare Kopplungstensor \underline{D} die Form:

$$\underline{D} = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{h}{2\pi} \frac{\gamma_I \gamma_S}{r_{IS}^3} \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \quad (2.23)$$

For die ^1H - ^1H -Relaxation ("NOESY-Effekt") spielt dieser Effekt eine große Rolle. Der Abstand sowie die Winkeländerung der dipolaren Wechselwirkung müssen allerdings beachtet werden, so dass der Vorfaktor in der Gleichung (2.11) ξ_{DD} zeitabhängig wird.

Bei heteronuklearer Relaxation, in der die Wechselwirkung zwischen direkt benachbarten Atomen stattfindet, ist die Fluktuation der Verbindungskraft so schnell, dass die Zeitabhängigkeit bei der Relaxation vernachlässigt werden und der gemittelte Abstand angenommen werden kann. Aus diesem Grund werden nur gemittelte Abstände $\langle r_{IS}^{-3} \rangle$ betrachtet.

Für eine zufällige relative Orientierung des statischen magnetischen Feldes \mathbf{B}_0 kann der Wechselwirkungsvektor \mathbf{H}^{DD} in Termen von irreduziblen Tensoroperatoren und sphärischen Kugelflächenfunktion ausgedrückt werden^{131,132}:

$$\begin{aligned}
 Y_{2,0}(\Omega(t)) &= \sqrt{\frac{5}{16\pi}} (3 \cos^2 \varphi - 1) \\
 Y_{2,\pm 1}(\Omega(t)) &= \sqrt{\frac{15}{18\pi}} \sin \varphi \cos \varphi e^{\pm i\varphi} \\
 Y_{2,\pm 2}(\Omega(t)) &= \sqrt{\frac{15}{32\pi}} \sin^2 \varphi e^{\pm 2i\varphi} \\
 T_{2,0}(t) &= \frac{1}{\sqrt{6}} [3I_z S_z - \vec{I} \vec{S}] \\
 T_{2,\pm 1}(t) &= \frac{1}{2} [I^\pm S_z + I_z S^\pm] \\
 T_{2,\pm 2}(t) &= \frac{1}{2} [I^\pm S^\pm]
 \end{aligned} \tag{2.24}$$

mit dem Vorfaktor

$$\xi_{DD} = \sqrt{\frac{24\pi}{5}} \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{h}{2\pi} \gamma_I \gamma_S \langle r_{IS}^{-3} \rangle \quad (2.25)$$

Für ^{15}N -Resonanzen sind die Relaxationszeiten und heteronuklearen Overhauser Effekte (NOE) gegeben durch folgende Formeln¹⁶:

$$\begin{aligned} T_1^{-1} &= d^2 [J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_S) + 6J(\omega_I + \omega_S)] + c^2 J(\omega_S) \\ T_2^{-1} &= 0,5d^2 [4J(0) + J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_S) + 6J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S)] \\ &\quad + \left(\frac{1}{6}\right) c^2 [3J(\omega_S) + 4J(0)] \\ NOE &= 1 + \left(\frac{\gamma_I}{\gamma_S}\right) d^2 [6J(\omega_I + \omega_S) - J(\omega_I - \omega_S)] T_1 \end{aligned} \quad (2.26)$$

d^2 , c^2 bezeichnen:

$$\begin{aligned} d^2 &= 0.1 \gamma_I^2 \gamma_S^2 h^2 * \frac{1}{(4\pi^2) \langle r_{NH}^3 \rangle^2} \\ c^2 &= \left(\frac{2}{15}\right) \gamma_S^2 I_0^2 (\sigma_{||} - \sigma_{\perp}) \end{aligned} \quad (2.27)$$

γ_I , γ_S geben das gyromagnetische Verhältnis der Kerne I und S wieder. ω_I , ω_S sind ihre Larmor-Frequenzen. Der Abstand zwischen den beiden Kernen ist r_{IS} und beträgt etwa (1 Å). Die parallelen und orthogonalen Komponenten des axial symmetrischen chemischen Verschiebungstensors der ^{15}N - ^1H Peptidbindung¹⁷ sind $\sigma_{||}$ und σ_{\perp} .

2.5 Die Wechselwirkung des chemischen Verschiebungstensors mit dem äußeren Magnetfeld

Die lokale elektronische Umgebung erzeugt ein zusätzliches Magnetfeld am Ort des Kerns im Magnetfeld B_0 . Dieser Effekt wird als Abschirmung des Kerns bezeichnet. Die elektronische Umgebung des Kerns ist im allgemeinen nicht isotrop sondern anisotrop. Durch die Anisotropie der chemischen Verschiebung wird die Resonanzfrequenz richtungsabhängig. In der hochauflösenden Flüssigkeits-NMR ist diese Richtungsabhängigkeit durch die schnelle Umorientierung der Moleküle gemittelt.

Die Wechselwirkungsenergie des magnetischen Dipols eines Kerns, I , mit dem äußeren Magnetfeld, B_0 , wird moduliert durch den chemischen Verschiebungstensor σ , und kann mit dem Hamiltonien der chemischen Verschiebung ausgedrückt werden:

$$H^{CS} = \gamma \sum_{ij} B_i \sigma_{ij} I_j \quad (2.28)$$

i, j sind die Komponenten eines am Molekül angelegten Koordinatensystems. σ hat einen realen Eigenwert und einen orthogonalen Eigenvektor.

Ein beliebiger Tensor kann als Summe von zwei axial symmetrischen Tensoren geschrieben werden. Es kann angenommen werden, dass $\sigma_{XX} = \sigma_{YY} = \sigma_{\perp}$ und $\sigma_{ZZ} = \sigma_{||}$ ist. Diese Annahme vereinfacht die Rechnung. Die Hamiltonien der chemischen Verschiebung kann jetzt folgendermaßen formuliert werden:

$$\begin{aligned} H^{CS} &= \gamma \{ \sigma_{||} B_Z I_Z + \sigma_{\perp} (B_X I_X + B_Y I_Y) \} \\ &= \gamma \{ (1/3)(\sigma_{||} + \sigma_{\perp}) B I + (1/3)(\sigma_{||} - \sigma_{\perp}) (2B_Z I_Z - B_X I_X - B_Y I_Y) \} \quad (2.29) \end{aligned}$$

Der erste Term ist unveränderlich unter der Rotationsbewegung und leistet somit keinen Beitrag zum Relaxationsparameter. Dieser Term bildet die Isotropie der chemischen Verschiebung und kann durch Gleichung 2.30 beschrieben werden:

$$\sigma_{\text{iso}} = (1/3)(\sigma_{\parallel} + \sigma_{\perp}) \quad (2.30)$$

Der zweite Term betrifft die Anisotropie der chemischen Verschiebungswechselwirkung, H^{CSA} , welche wie folgt ausgedrückt werden kann:

$$H^{\text{CSA}} = -(1/3)(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})(B_I I - 3B_Z I_Z) \quad (2.31)$$

Allgemein kann die Anisotropie der chemischen Verschiebung in folgender Form beschrieben werden:

$$H^{\text{CSA}} = -I \cdot \underline{\sigma} \cdot \vec{B} \quad (2.32)$$

Die Wechselwirkung eines Kerns I mit dem äußeren Magnetfeld hat die gleiche Form wie bei der Dipol-Dipol-Wechselwirkung mit der Ausnahme, dass in dem Fall von Anisotropie der chemischen Verschiebung nur ein einziger Kern zu berücksichtigen ist.

Der chemische Verschiebungstensor $\underline{\sigma}$ ist nicht symmetrisch und kann in eine Summe zweier symmetrischer Teile zerlegt werden¹²⁶:

$$\underline{\sigma} = \xi_{\text{CSA}} \begin{bmatrix} \sigma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz} \end{bmatrix} + \xi_{\text{CSA},x} \begin{bmatrix} 2 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} + \xi_{\text{CSA},y} \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \quad (2.33)$$

wobei

$$\xi_{\text{CSA}} = \sqrt{\frac{8\pi}{15}} \gamma_I$$

$$\xi_{\text{CSA},x} = \sqrt{\frac{8\pi}{135}} \gamma_I (\sigma_{xx} - \sigma_{zz}) \quad \text{und} \quad \xi_{\text{CSA},y} = \sqrt{\frac{8\pi}{135}} \gamma_I (\sigma_{yy} - \sigma_{zz})$$

Die Wechselwirkung kann in Form von Termen eines Operators mit dem Rang 2 geschrieben werden, bei der Benutzung von Gleichung (2.11) aber für zwei Wechselwirkungen mit $\xi_{CSA,x}$, $\xi_{CSA,y}$. Der Kern S in Gleichung 2.24 muss nur durch \mathbf{B}_0 ersetzt werden entsprechend durch $\mathbf{B}_0 = [0 \ 0 \ B_0]$ ausgedrückt.

2.6 Relaxation durch Kreuzkorrelation der DD- und CSA-Wechselwirkung

Für viele Spinsysteme sind die oben genannten Relaxationsmechanismen effektiv, so dass die Relaxation eines Kerns z.B. A sowohl durch die dipolare als auch durch die CSA Wechselwirkung verursacht wird. Es entsteht dadurch eine durch Zeitkorrelation hervorgerufene Relaxationsinterferenz, die sogenannte Kreuzkorrelation. Die Feldfluktuationen der CSA und DD Mechanismen können sich addieren, so dass die Amplitude der Feldfluktuation größer wird oder bei der Aufhebung der Interferenz wird die Amplitude entsprechend kleiner (Abb. 2.1), abhängig von der Orientierung des Spins von Kern B¹³³⁻¹³⁵. Die Dubletlinien im ¹⁵N-Spektrum beschreiben die Wechselwirkung mit einem Signal vom Spin im $|\alpha\rangle$ -Zustand und dem zweiten vom Spin im $|\beta\rangle$ -Zustand (Abb. 2.1). Die zwei Komponenten haben verschiedene Linienbreiten und longitudinale Relaxationsraten.

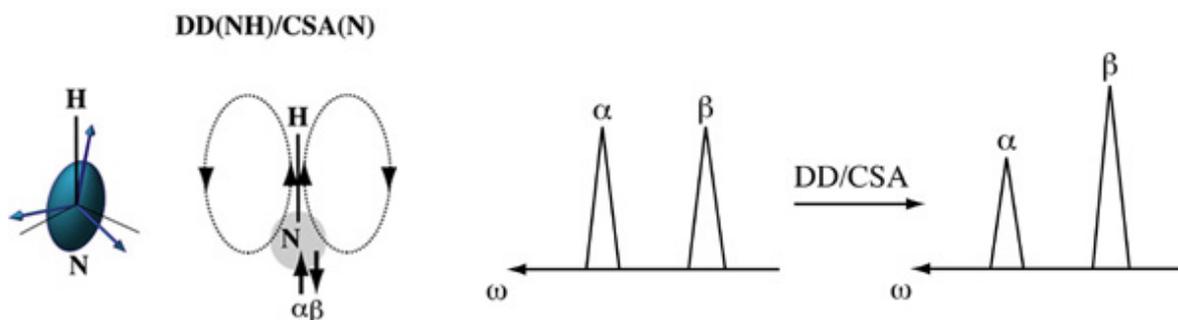


Abb. 2.1: Der Einfluss der Dipol- CSA Wechselwirkung auf die Populationsänderungen in den Zuständen.

2.7 Chemischer Austausch

Mit NMR-Messungen können auch Austauschprozesse beobachtet werden. Es führen hauptsächlich zwei Ursachen zu Austauschphänomenen, die in der letzten Zeit in der Literatur diskutiert wurden¹³⁶⁻¹⁴⁰.

- ❖ Konformationeller Austausch. Ein Molekül existiert in 2 verschiedenen Konformationen (A und B). Diese beiden Konformationen führen bei schnellem Austausch zu mittleren Signalen. Ein klassisches Beispiel dafür ist Dimethylformamid. Die beiden Methylgruppen im DMF sind magnetisch nicht äquivalent. Durch Rotation um die N-C Bindung werden die Resonanzen der beiden Methylgruppen gemittelt (Abb. 2.2).
- ❖ Chemischer Austausch. In diesem Fall kann sich ein Kern (Proton) zwischen zwei Orten (A und B) bewegen. Ein Beispiel dafür ist der Austausch von Hydroxylprotonen oder Amidprotonen mit Lösungsmittelprotonen bzw. Protonen des Lösungsmittels Wasser.

Zunächst soll ein einzelner Spin betrachtet werden, der zwischen zwei Positionen mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung hin- und herwechseln kann. Wenn die Aufenthaltszeit an einem bestimmten Ort lang ist, verglichen mit der transversalen Relaxationszeit, wird sich während jeder Messung ein Teil der Spins an der einen Position befinden, ein Teil an der anderen, und mit ihrer jeweiligen Resonanzfrequenz zum Signal beitragen. Im Spektrum werden zwei Resonanzen beobachtet (Abb. 2.3).

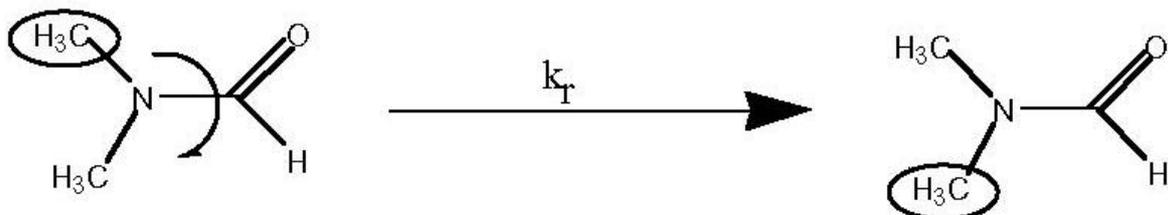
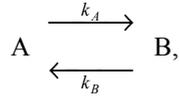


Abb. 2.2: Die beiden Methylgruppen sind magnetisch nicht äquivalent

Wenn die Aufenthaltszeit klein im Vergleich zum Frequenzabstand der beiden Resonanzlinien ist, ist das Spektrum unabhängig von der Austauschfrequenz (Abb. 2.3).



Mit K_A , K_B als Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ergibt sich für die Aufenthaltsdauer $\tau_{A,B} \approx 1/k_{A,B}$ im Zustand A bzw. B folgender Zusammenhang:

$$\tau_A \gg (\Delta\omega)^{-1} \quad \text{bzw.} \quad \tau_B \gg (\Delta\omega) \quad (2.34)$$

$\Delta\omega$ ist gleich der Differenz der beiden Resonanzfrequenzen in den Zuständen A und B.

Ein Austausch, bei dem $p_A = p_B$, tritt normalerweise nur dann auf, wenn der Austauschprozess eine Symmetrie miteinbezieht, wie bei gleicher Population von Zuständen A und B. Der allgemeine Fall der Asymmetrie der Zustandspopulation $p_A > p_B$ ist durchaus im Makromolekülen möglich.

Ein Unterschied in der Stabilität von nur $2k_B T$ zwischen den zwei Populationszuständen führt dazu, dass $p_A = 0.88$ und $p_B = 0.12$. Der Austauscheffekt beeinflusst die NMR-Experimente¹⁴¹. Für longitudinale oder transversale Operatoren unter freier Präzision oder für transversale Operatoren unter (pseudo) „spin-Locking“, müssen viele Bedingungen beachtet werden.

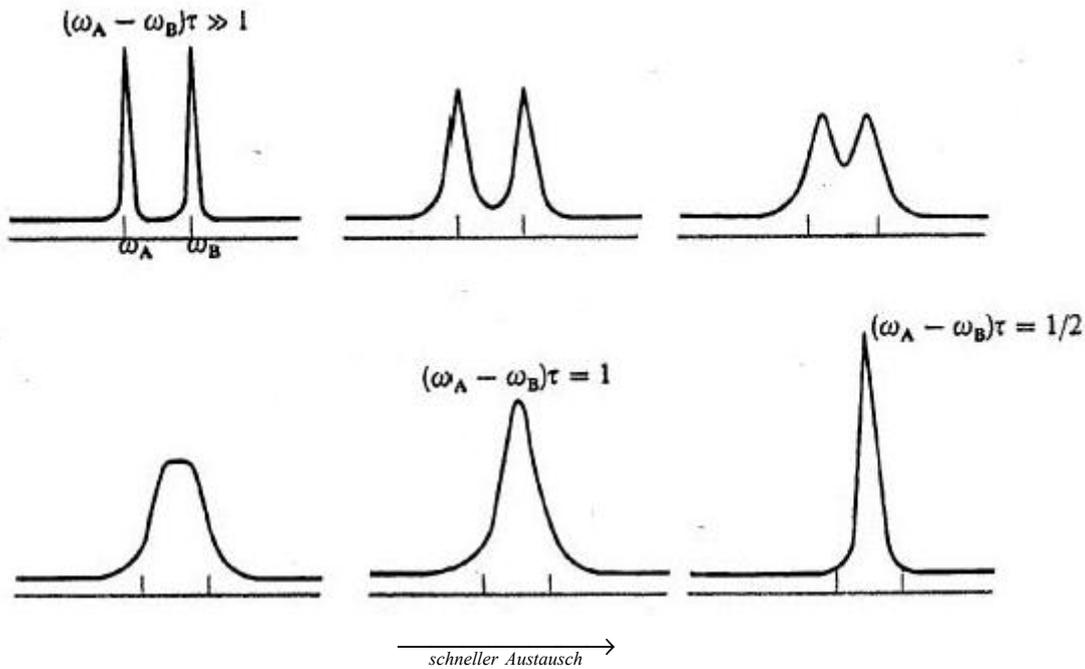


Abb. 2.3: Die Auswirkung des chemischen Austauschs auf die NMR-Spektren. Der Austausch eines Kerns zwischen den Orten A und B mit den Resonanzfrequenzen ω_A und ω_B wird dargestellt. Gleiche Population und gleiche Aufenthaltsdauern sind für beide Zustände angenommen.

2.8 Berechnung der Relaxationsraten

Um die Relaxationsrate zu berechnen, erweitert man die Abweichung des spektralen Dichteoperators von dem Gleichgewicht zum rotierenden Koordinatensystem $\sigma^T(t) - \sigma_0^T$ mit einem Satz von orthogonalen Basisoperatoren $\{B_i\}$ ¹⁴².

$$|\sigma^T(t) - \sigma_0^T\rangle = \sum_{i=1}^N \frac{\langle B_i | \sigma^T(t) - \sigma_0^T \rangle}{\langle B_i | B_i \rangle} |B_i\rangle = \sum_{i=1}^N b_i |B_i\rangle \quad (2.35)$$

Diese Erweiterung wird in das rotierende Koordinatensystem transformiert und in die Master-Gleichung eingesetzt, so dass sich folgende Gleichung ergibt:

$$\frac{d}{dt} \sigma^T(t) = -\hat{\Gamma}^T \{ \sigma^T(t) - \sigma_0^T \} \quad (2.36)$$

Der Relaxationssuperoperator im rotierenden Koordinatensystem $\hat{\Gamma}^T$ kann wie im Abschnitt 2.2 berechnet werden:

$$\begin{aligned} \hat{\Gamma}^T B &= \frac{1}{2} \sum_{\mu, \mu'} \xi_{\mu} \xi_{\mu'} \sum_{mm'} (-1)^{m+m'} \sum_{p, p'} a_{l_{\mu} m p}^{(\mu)} a_{l_{\mu'} m' p'}^{(\mu')} * e^{i(\omega_p^{(\mu)} - \omega_{p'}^{(\mu')})t} \\ &\quad \times J_{-m, -m', l_{\mu}, l_{\mu'}}^{(\mu, \mu')}(\omega_{p'}^{(\mu')}) [A_p^{(\mu)}, [A_{p'}^{(\mu')}]^+, B] \end{aligned} \quad (2.37)$$

Jetzt wird diese Erweiterung nach der Zeit abgeleitet und in die Master-Gleichung eingesetzt:

$$\frac{d}{dt} \sigma^T(t) = \sum_{i=1}^N \frac{db_i}{dt} |B_i\rangle = -\hat{\Gamma}^T \left\{ \sum_{i=1}^N b_i |B_i\rangle \right\} = -\sum_{i=1}^N b_i \hat{\Gamma}^T |B_i\rangle \quad (2.38)$$

Durch Multiplikation dieser Gleichung links mit dem Operator $\langle B_k |$ und durch den Normierungsfaktor $\langle B_k | B_k \rangle$ geteilt, erhält man:

$$\frac{db_k}{dt} = -\sum_{i=1}^N b_i \frac{\langle B_k | \hat{\Gamma}^T | B_i \rangle}{\langle B_k | B_k \rangle} = -\sum_{i=1}^N \Gamma_{ki}^T b_i \quad (2.39)$$

Die Matrix Γ_{ki}^T beschreibt die Relaxation in einer Basis der Form $\{B_i\}$. Die Matrixdiagonalen beschreiben die Autorelaxation, wobei die außerhalb der Diagonalen angeordneten Elementeder Matrix die Kreuzrelaxation- und kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsprozesse

darstellen. Jetzt können alle Relaxationsraten mit Hilfe der Doppelkommutatoren aus Gleichung (2.16) für die entsprechenden Kernspinoperatoren berechnet werden.

2.9 Bestimmung der spektralen Dichtefunktion nach Lipari und Szabo " der Modell freie" Ansatz

Mit ^{15}N -Relaxationsstudien lassen sich für jede Aminosäure (außer Prolin) die Beweglichkeiten des Rückgrats innerhalb des Proteins bestimmen. Man erhält sowohl Informationen über die Amplitude als auch über die Zeitskala der internen Bewegungen, da jeder Molekülteil in der Lösung internen Bewegungen auf unterschiedlichen Zeitskalen unterliegt, die sich verschieden auf die NMR-Parameter auswirken. Schnelle Bewegungen führen zu gemittelten molekularen Parametern (z. B. Bindungslängen und Bindungswinkel), während langsame Bewegungen eine Mittelung der Relaxationsraten zur Folge haben. Nur für den Fall ,dass die Größenordnung der Korrelationszeit der internen Bewegung mit der Korrelationszeit der Rotationsbewegung des gesamten Moleküls übereinstimmt, erhält man eine direkte Beeinflussung der Relaxationsraten durch die interne Bewegung. Um die Bewegung des Proteinrückgrats beschreiben zu können, wurde hier der sogenannte "Model Free Approach" entwickelt^{117,118}. Dieses Modell, das in den letzten Jahren häufig verwendet wurde, ermöglicht es, NMR-Relaxationsparameter zu interpretieren, ohne auf spezifische Bewegungsmodelle zurückgreifen zu müssen.

Für ein Makromolekül, dessen Gesamtbewegung durch eine einzige Korrelationsfunktion beschrieben wird, kann in einer Unterteilung eine anisotrope Gesamtbewegung angenommen werden. Für diesen Anisotropiefall kann die gesamte Korrelationsfunktion unter der Annahme, dass die Bewegungen voneinander abhängig sind, in eine makroskopische und eine interne Korrelationsfunktion unterteilt werden:

$$C(t) = C_0(t) \cdot C_1(t) \quad (2.40)$$

Die Korrelationsfunktion für die makroskopische Bewegung kann ausgedrückt werden durch:

$$C_0(t) = \frac{1}{15} e^{-6D_M t} = \frac{1}{15} e^{-t/\tau_M} \quad (2.41)$$

wobei D_M und τ_M die rationale Diffusionskonstante und die Korrelationszeit des Makromoleküls beschreiben.

Zur Beschreibung der internen Bewegung in einem Protein wird von Lipari und Szabo folgende Korrelationsfunktion verwendet:

$$C_I^A(t) = S^2 + (1 - S^2) e^{-t/\tau_e} \quad \text{mit } 0 \leq S^2 \leq 1 \quad (2.42)$$

τ_e ist die effektive Korrelationszeit.

Für die Ausbreitung in einen Kegelmodell ist $C_1(t)$ durch eine unendliche Summe exponentieller Ausdrücke gegeben. Solange S^2 nicht zu klein ist, kann eine Näherung für τ_e durch die begrenzte Fläche von $C_I^A(t)$ bestimmt werden. Für diese Näherung ergibt sich:

$$\int_0^{\infty} (C_I^A(t) - S^2) dt = \int_0^{\infty} (C_I(t) - S^2) dt \quad \text{oder} \quad (2.43)$$

$$\tau_e (1 - S^2) = \int_0^{\infty} (C_I - S^2) dt$$

Im Spezialfall, dass $C_1(t) = e^{-t/\tau_e}$ ($S = 0$), folgt aus Gleichung (2.43), dass $\tau = \tau_e$.

Gleichung (2.43) kann als Definition für die effektive Korrelationszeit einer beliebigen Korrelationsfunktion aufgefasst werden¹⁴⁴.

Der Ansatz in der Gleichung 2.44 basiert auf der Annahme, dass die Abnahme der Korrelation einer Bewegung innerhalb des Proteins durch einen zweistufigen Prozess beschrieben werden kann:

In einem ersten Schritt führt eine Bewegung, die schnell ist im Vergleich zur Korrelationszeit der Gesamtrationsbewegung zu einer Abnahme der Korrelationsfunktion auf das Niveau S^2 , bevor es durch die Diffusion des gesamten Moleküls zu einem vollständigen Verlust der

Korrelation kommt. Somit stellt S^2 ein Maß für die räumliche Beschränkung der internen Flexibilität dar. Eine vollständig beschränkte interne Bewegung ist durch den Wert $S^2 = 1$ gekennzeichnet, da die Korrelationsfunktion in diesem Fall in die eines starren Rotators übergeht. Dagegen führt eine in der Amplitude unbeschränkte interne Bewegung bereits während der Zeit τ_i zu einem vollständigen Verlust der Korrelation, so dass der Ordnungsparameter in diesem Fall den Wert Null annimmt. S^2 stellt somit eine modellunabhängige Größe zur Charakterisierung der Amplitude der internen Bewegung dar.

Da S^2 unabhängig von der Geschwindigkeit der internen Bewegung ist, kann es direkt mit dem räumlichen Fluktuationen eines auf NMR-Daten basierenden Strukturenensembles eines Proteins verglichen werden. Dagegen, so haben Lipari und Szabo gezeigt, ist die interne Korrelationszeit τ_i sowohl von der Art der Bewegung als auch von der Geschwindigkeit abhängig, so dass eine Interpretation dieser Größe nur im Rahmen von konkreten Bewegungsmodellen erfolgen sollte.

3 Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Experimente verlaufen nach einem gleichen Prinzip und zwar mittels einer INEPT, bzw. refokussierten-INEPT Sequenz wird die Polarisation vom Amidprotonen auf den Stickstoff übertragen. Die Polarisation wird dann nach Mischungs- und Evolutionsperioden zur Detektion wieder aus das Amidproton übertragen

3.1 Das longitudinale Relaxationsexperiment

Das experimentelle Schema zur Messung von ^{15}N T_1 -Relaxationszeiten ist in (Abb. 3.1)¹⁴¹ gezeigt. Die Pulssequenz ist ein Inversion-Recovery-Experiment für den S-Spin, das in ein 2D heteronukleares Korrelationspektrum eingebunden ist. Die S-Spin Magnetisierung wird nach einem refokussierten INEPT-Schritt invertiert und kann während des variablen Delays T_1 in Richtung z-Achse relaxieren. Nach diesem Delay wird die Magnetisierung zur Frequenzmarkierung wieder in die transversale Ebene geklappt und in einem reversen INEPT-Schritt wieder auf Protonenmagnetisierung übertragen und detektiert.

Die Relaxationen infolge der Kreuzkorrelation zwischen CSA- und DD-Relaxation wird mit 180° applizierten Protonenpulsen aufgehoben.

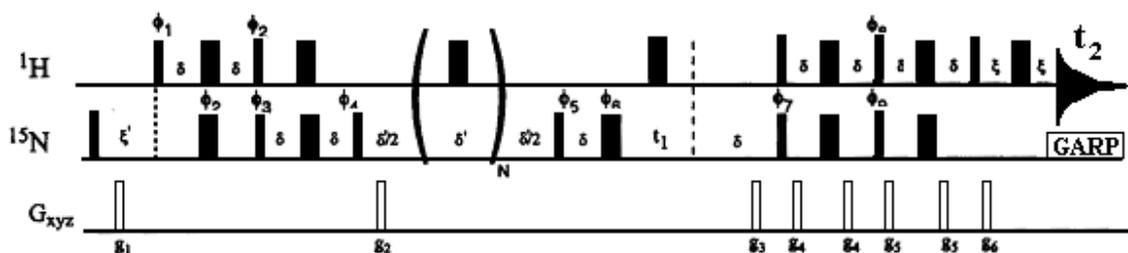


Abb. 3.1: Pulssequenz zur Messung der longitudinalen Relaxationsraten (T_1) für ^{15}N Kerne des Proteinrückgrats in einem vollständig im ^{15}N Isotop angereicherten Protein. Breite und schmale Pulse entsprechen Pulsen mit einem Flipwinkel von 180° und 90° .

3.2 Das transversale Relaxationsexperiment

Für die Bestimmung der T_2 -Relaxationszeiten wurde die in Abbildung 3.2 gezeigte Pulssequenz verwendet¹⁴¹.

Bei der Frequenz wird die transversale Magnetisierung des N-Spins durch einen refokussierten INEPT-Schritt erzeugt. Diese transversale Magnetisierung evolviert während der folgenden Relaxationsperiode T_2 unter der Wirkung skalarer Kopplungen und unter der Wirkung transversaler Relaxation. Aus diesem Experiment soll nur ein einfacher experimenteller Abfall gewonnen werden, der allein durch die transversale Relaxation bestimmt ist. Es ist deshalb notwendig, skalare Kopplungsterme und Kreuzrelaxationseffekte zu unterdrücken. Die Verwendung der sogenannten Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz (CPMG) führt zur Eliminierung der skalaren Kopplungsterme und der 180°-Protonenpuls in der CPMG-Sequenz führt zur Unterdrückung von Kreuzrelaxationseffekte (CSA und Dipol-Dipol-Wechselwirkung)

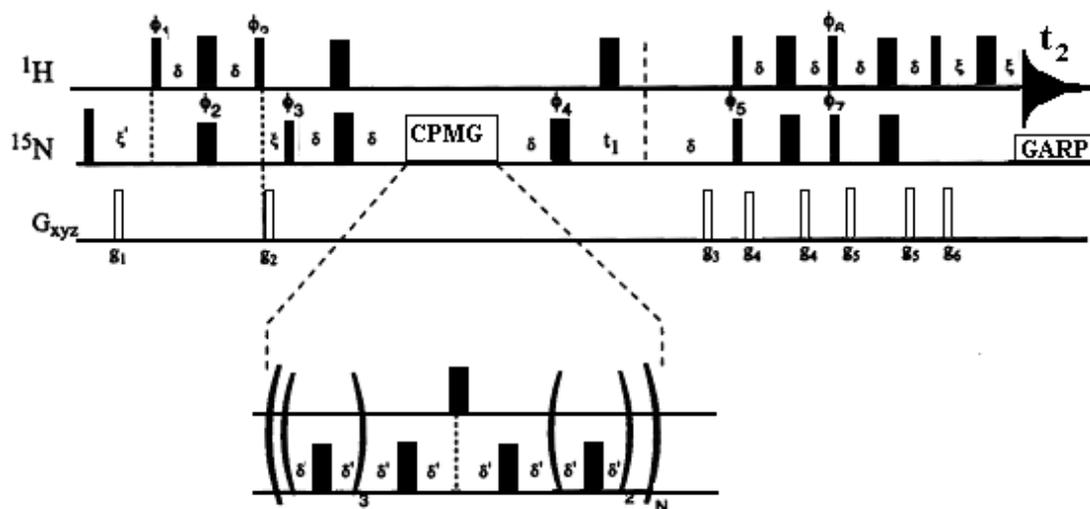


Abb. 3.2: Pulssequenz zur Messung der transversalen Relaxationsraten (T_2) für ^{15}N Kerne des Proteinerückgrats in einem vollständig mit ^{15}N Isotopen angereichertem Protein. Breite und schmale Pulse entsprechen Pulsen mit einem Flipwinkel von 180° und 90° .

3.3 Messung des heteronuklearen NOE

Wenn die Gleichgewichtsmagnetisierung eines Kerns I gestört wird, wird die Intensität eines NMR-Signals für den Kern S geändert. Dieser Effekt wird „Nuclear Overhauser Enhancement“ genannt. Für die Bestimmung der heteronuklearen NOEs wurde die in Abbildung 3.3 gezeigte Pulssequenz verwendet^{141,142}.

Zur Beobachtung dieses Effekts werden zwei ^1H -Spektren aufgenommen, eins mit und das andere ohne Sättigung. Die indirekte Evolutionsperiode beginnt nach dem ersten 90° -Puls auf dem ^{15}N -Kanal. Nach der Entwicklung der chemischen Verschiebung und der Antiphase-Magnetisierung wird die Magnetisierung wieder auf das direkt gebundene Proton übertragen, refokussiert und detektiert.

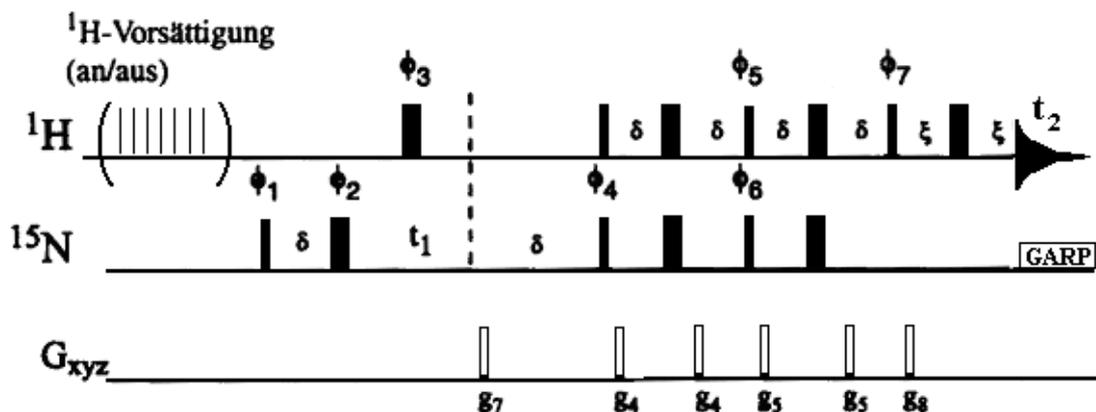


Abb. 3.3: Pulssequenz zur Messung der heteronuklearen NOEs für ^{15}N Kerne des Proteinrückgrats in einem vollständig mit ^{15}N Isotopen angereicherten Protein. Breite und schmale Pulse entsprechen Pulsen mit einem Flipwinkel von 180° und 90° .

3.4 Pulssequenz zur Messung der ^{15}N -CSA/DD-Kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsrate

Das in dieser Arbeit verwendete Experiment zur Messung der ^{15}N -CSA/DD Kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsrate ist in der (Abb. 3.4) dargestellt. Diese Messung erfordert zwei verschiedene Experimente¹⁴³. In dem ersten wird die Magnetisierung selektiert und die zweite gilt als Referenzexperiment.

Am Punkt a in der Pulssequenz wird eine Antiphase-Magnetisierung ($2I_zS_y$) erzeugt. In Gegenwart von ^{15}N CSA/DD Kreuzkorrelation wird die Antiphase- ^{15}N -Magnetisierung in Inphase- ^{15}N -Magnetisierung umgewandelt, sodass sich am Punkt b die Magnetisierung wie folgt ergibt¹⁴⁶:

$$\begin{aligned}
 2I_zS_y &\xrightarrow{4T} 2I_zS_y \exp[-4\lambda(T - \Delta)] \\
 &\times \{E(+, 4\Delta) + E(-, 4\Delta)\} / 2 \\
 &+ S_y \exp[-4\lambda(T - \Delta)] \\
 &\times \{E(+, 4\Delta) - E(-, 4\Delta)\} / 2
 \end{aligned} \tag{3.1}$$

Der Ausdruck in Gleichung 3.1 $E(\pm, \tau)$ ist definiert als $\exp\{-(\lambda \pm \eta_N)\tau\}$ und λ , η_N sind die Auto- and Kreuzrelaxationsraten^{144,145}.

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen ($\sin(2\pi J_{IS}\delta) = 1$) erhält man nach zweidimensionaler Fouriertransformation als Intensität infolge des ^{15}N CSA/DD Mechanismus für Kreuzsignale I_{kreuz} :

$$\begin{aligned}
 I_{\text{kreuz}} &= C \cdot \exp[-4\lambda(T - \Delta)] \\
 &\times \{E(+, 4\Delta) - E(-, 4\Delta)\}
 \end{aligned} \tag{3.2}$$

C ist eine Proportionalitätskonstante, die sich aus der experimentellen Einstellung und Prozessierungsfaktoren ergibt.

Im Referenzexperiment ist die Wartezeit Δ zu Null gesetzt und der Protonen- 180° -Puls ist um δ verschoben. Jetzt entwickelt sich die Antiphase-Magnetisierung folgendermaßen¹⁴⁵:

$$\begin{aligned}
2I_z S_y \xrightarrow{4T} & -2S_x \exp[-\lambda(4T - 2\delta)] \\
& \times \{E(+, 2\delta) + E(-, 2\delta)\} / 2 \sin(2\pi J_{IS} \delta) \\
& - 2I_z S_x \exp[-\lambda(4T - 2\delta)] \\
& \times \{E(+, 2\delta) - E(-, 2\delta)\} / 2 \sin(2\pi J_{IS} \delta)
\end{aligned} \tag{3.3}$$

Die 90°-Pulse ($I \phi_7$ und $^{15}\text{N} \phi_8$) verändern den S_x Operator nicht, während der $I_z S_y$ Operator zur Multiquantenmagnetisierung konvertiert wird. Durch die Wahl der Stärke und Richtung der Gradienten G_3 , G_4 und G_4 wird der unerwünschte Multiquantenterm dephasiert. Am Punkt d (Beginn der Detektion) ergibt sich als Signal:

$$\begin{aligned}
S_{ref}(t_1, t_2) & = \langle I_+ \rangle \exp[-\lambda(4T - 2\delta)] \\
& \times \{E(+, 2\delta) + E(-, 2\delta)\} / 2 \\
& \times \sin^2(2\pi J_{IS} \delta) \exp(\pm i\omega_N t_1) \\
& \times \exp(-i\pi/2) \exp(-i\omega_H t_2)
\end{aligned} \tag{3.4}$$

Unter der Berücksichtigung, dass $\sin^2(2\pi J_{IS} \delta) = 1$ ist (wegen $\delta = (4J_{IS})^{-1}$) erhält man als Intensität für die Kreuzsignale nach zweidimensionaler Fouriertransformation:

$$\begin{aligned}
I_{ref} & = C \cdot \exp(-\lambda[4T - 2\delta]) \\
& \{E(+, 2\delta) + E(-, 2\delta)\}
\end{aligned} \tag{3.5}$$

Man bildet das Verhältnis der beiden Intensitäten des ^{15}N CSA/DD Kreuzsignals zum Referenzsignal unter der Berücksichtigung, dass $4\Delta\eta_{\text{N}} \ll 1$:

$$\frac{I_{\text{kreuz}}}{I_{\text{ref}}} \approx 4\Delta\eta_{\text{N}} \quad (3.6)$$

Diese Gleichung zeigt die Abhängigkeit des Verhältnisses der Intensitäten von Δ und der Kreuzkorrelation η_{N} .

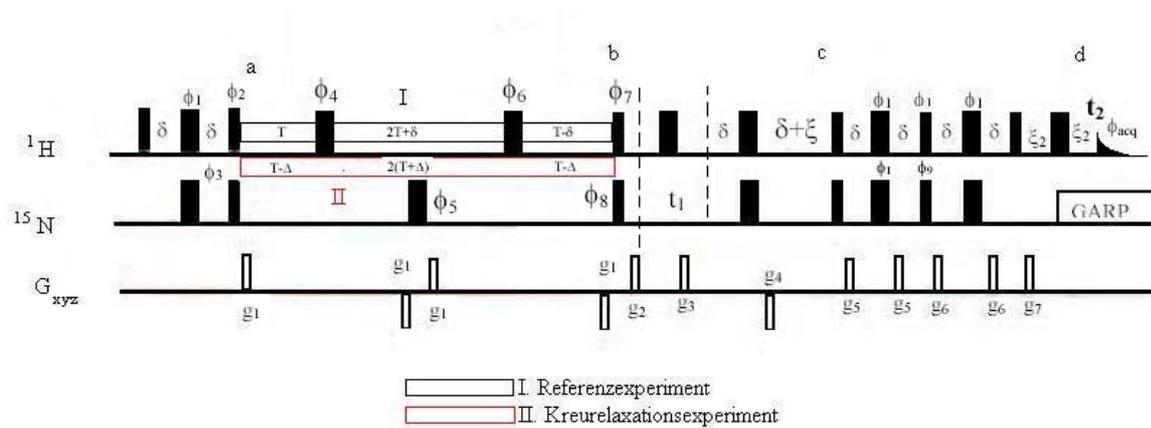


Abb. 3.4: Pulssequenz zur Messung der kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten η_{N} für ^{15}N Kerne des Proteinrückgrats in einem vollständig mit ^{15}N Isotopen angereicherten Protein. Zur Bestimmung der Raten ist die Aufnahme eines Referenzexperimentes (untere Beschriftung zwischen den Punkten a und b) und eines Kreuzrelaxationsexperimentes (obere Beschriftung zwischen a und b) erforderlich.

3.3 Messung des chemischen Austausches mit dem Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Experiment

Mit diesem Experiment kann der chemische oder konformationelle Austausch in einer Zeitskala von 0.5 zu 5 ms gemessen werden^{146,147}. Und somit dynamische Effekte im

Proteinrückgrat in μs – ms -Zeitbereich charakterisiert werden. Der chemische oder konformationelle Austausch, der nukleare Spins zwischen Seiten mit unterschiedlichen Umgebungen transferiert, trägt zum adiabatischen Zerfall der transversalen Magnetisierung bei. Die Ratenkonstante der transversalen Relaxation gemessen mit dem CPMG-Experiment - $R_2(\tau_{cp})$ - ist gegeben durch:

$$R_2\left(\frac{1}{\tau_{cp}}\right) = \frac{1}{2} \left(R_{2A}^0 + R_{2B}^0 + K_{ex} \frac{1}{\tau_{cp}} \cosh^{-1} \left(D_p \cosh(\eta_p) - D_m \cos(\eta_m) \right) \right) \quad (3.7)$$

Wobei τ_{cp} die Wartezeit zwischen den 180° -Pulsen in der CPMG-Pulsfolge ist.

$$D_x = \frac{1}{2} \left[\pm 1 + \frac{(\psi + 2\Delta\omega^2)}{(\psi^2 + \zeta^2)^{(1/2)}} \right]$$

$$\eta_x = \frac{\tau_{cp}}{\sqrt{2}} \left(\left(\pm \psi + (\psi^2 + \zeta^2)^{(1/2)} \right) \right)^{(1/2)}$$

$$\psi = \left(-R_{2B}^0 - P_A K_{ex} + P_B K_{ex} \right)^2 - \Delta\omega + 4P_A P_B K_{ex}^2$$

$$\zeta = 2\Delta\omega \left(R_{2A}^0 - P_{2B}^0 - P_A K_{ex} + P_B K_{ex} \right)$$

Die Variation von $R_2(1/\tau_{cp})$ als Funktion von $1/\tau_{cp}$ wird Relaxationsdispersion genannt. Die Kurven der Relaxationsdispersion gewonnen aus dem CPMG-Experiment können mit einer Anpassung von Gleichung 3.7 analysiert werden

Die Messung von ^{15}N $R_2(1/\tau_{cp})$ wurde bei zwei Magnetfeldstärken (500 und 600 MHz ^1H Larmorfrequenz) und eine Temperatur von 305 K durchgeführt. Da in der vorliegenden Arbeit der chemischen Austausch nicht vollständig ausgewertet wurde, wurde von der Beschreibung der Pulssequenzen¹⁴⁸ abgesehen.

4 Experimente

Im Institut für Biophysikalische Chemie standen folgende Spektrometer der Firma BRUKER für die NMR-Untersuchungen zur Verfügung:

Magnet	magn. Flussdichte [T]	Lamorfrequenzen		Gradienten- System
		^1H [MHz]	^{15}N [MHz]	
500/51	11.7	499.87	50.66	x,y,z
600/52	14.1	600.13	60.81	x,y,z
800/54	18.8	800.13	81.07	x,y,z

Alle Experimente zur Bestimmung der Relaxationszeiten wurden an vollständig mit ^{15}N -Isotopen angereicherten Proteinen von Human-ILBP (apo- und holo-Form) und RNase T_1 durchgeführt. Die Messungen an ILBP wurde bei einer Temperatur von 305K, die an RNase T_1 bei 314 K durchgeführt.

4.1 ^{15}N -Relaxationszeiten des humanen intestinalen Lipidbindungsproteins (ILBP)

^{15}N Relaxationsraten (longitudinale- T_1 und transversale- T_2 - ^{15}N Relaxationsraten) und die $\{^1\text{H}\}$ -NOE)-Werte vom humanen ILBP in der Apo- und Holo-Form wurden mit den in Abbildung 3.1 gezeigten Pulssequenzen bestimmt.

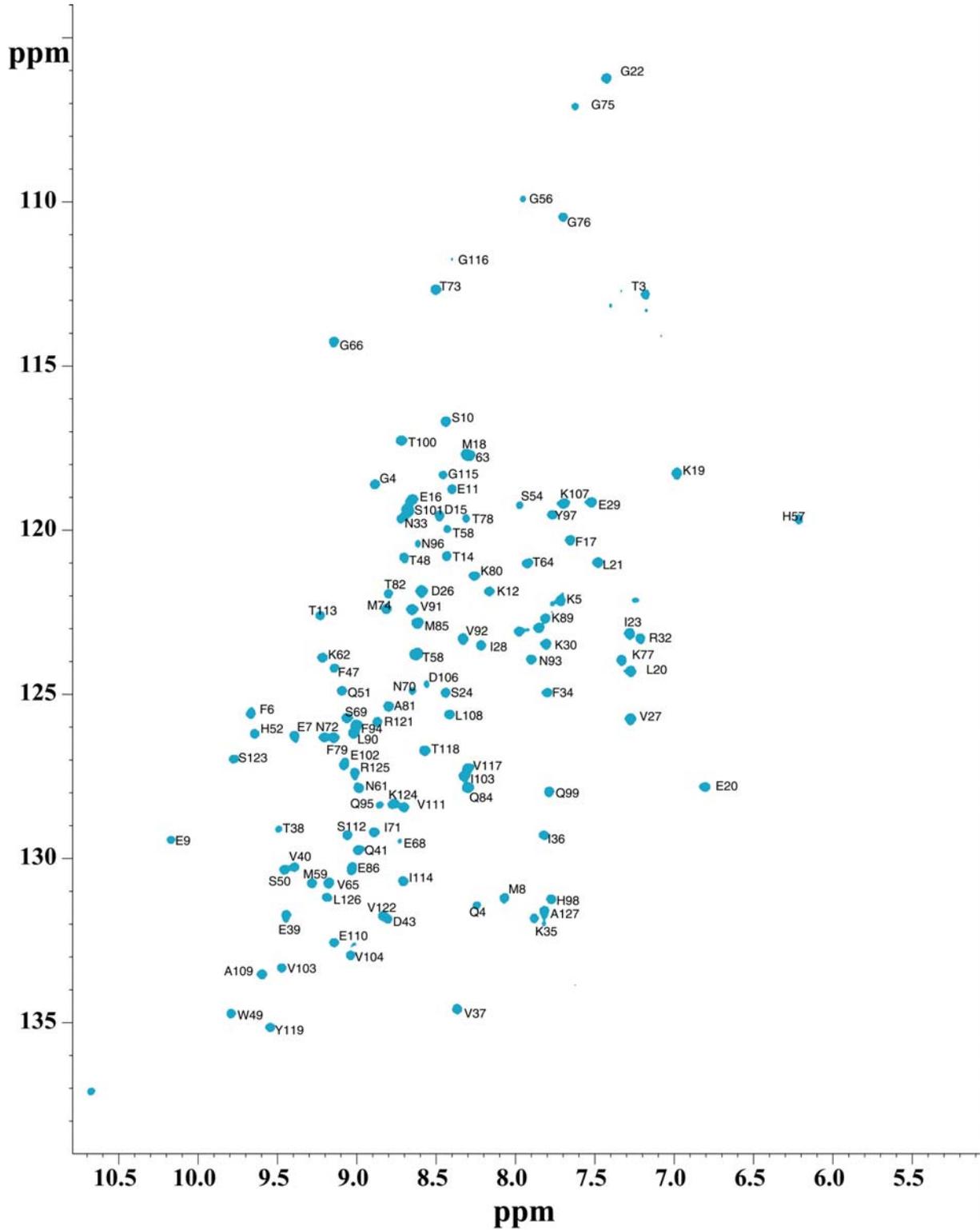


Abb. 4.1: Ein $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des ILBP (Holo-Form). Die Temperatur betrug 305 K mit Signalzuordnung¹⁵⁴. Das Spektrum wurde mit dem DMX 500 NMR Spektrometer aufgenommen.



Abb. 4.2: Ein $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des humanen ILBP (Apo-Form) bei einer Temperatur von 305 K. Das Spektrum wurde mit dem DMX 600 NMR Spektrometer aufgenommen.

4.2 NMR-Experimente zur Ermittlung der transversalen CSA/DD-Kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsrate (Apo/Holo ILBP und RNase T₁)

Die CSA/DD-Kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten der Proteine ILBP (mit und ohne Ligand) und RNase T₁ wurden mit der in der Abbildung 3.4 beschriebenen Pulssequenz gemessen. (Abb.4.3) zeigt das Verhältnis der Intensitäten zwischen Kreuz- und Referenzsignal in Abhängigkeit von der Wartezeit Δ für drei Aminosäuren (LYS_5, GLU_39 und HIS_98).

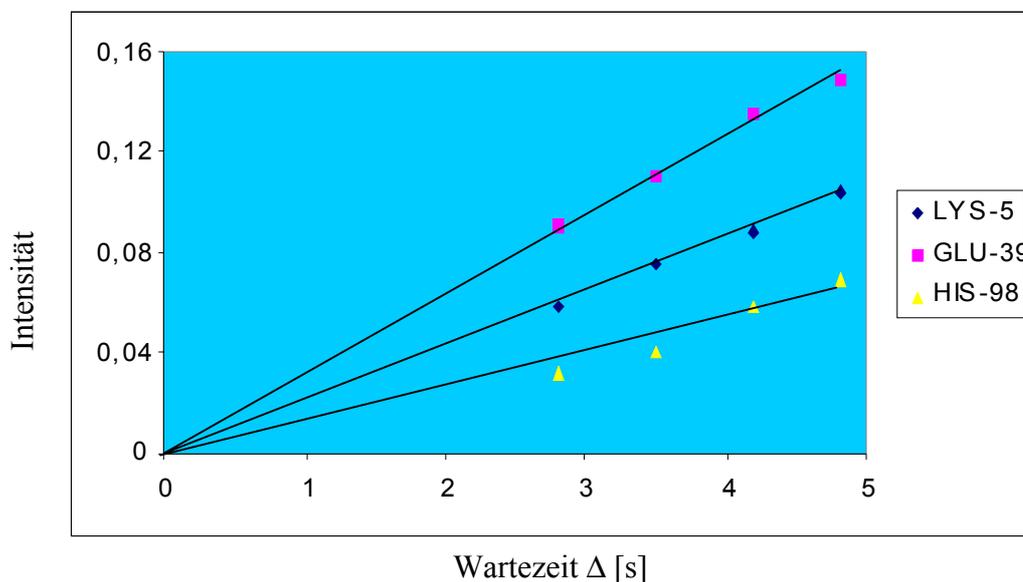


Abb. 4.3: CSA/DD-kreuzkorrelierte Kreuzrelaxation für drei Aminosäurereste des ILBP (holo-Form) [LYS_5, GLU_39 und HIS_98]. Die Messungen wurden bei 305 K am DMX 600 NMR Spektrometer durchgeführt

4.3 NMR-Experimente zur Bestimmung des chemischen Austausches

Der chemische Austausch von ILBP (apo- und holo-Form) wurde mit der in (Abb. 3.5) dargestellten Pulssequenz gemessen. in den Abbildungen 4.4 und 4.5 wurden die Werte für zwei Aminosäuren [LEU_21 und ASP_26] dargestellt. Die Fittkurven deuten an, dass bei dem

Aminosäurerest LEU_21 kein chemischer Austausch stattfindet, während bei ASP_26 ein deutlicher chemischer Austausch zu beobachten war. Die zwei Aminosäurereste des ILBP (apo-Form) wurden bei einer Temperatur von 305 K vermessen.

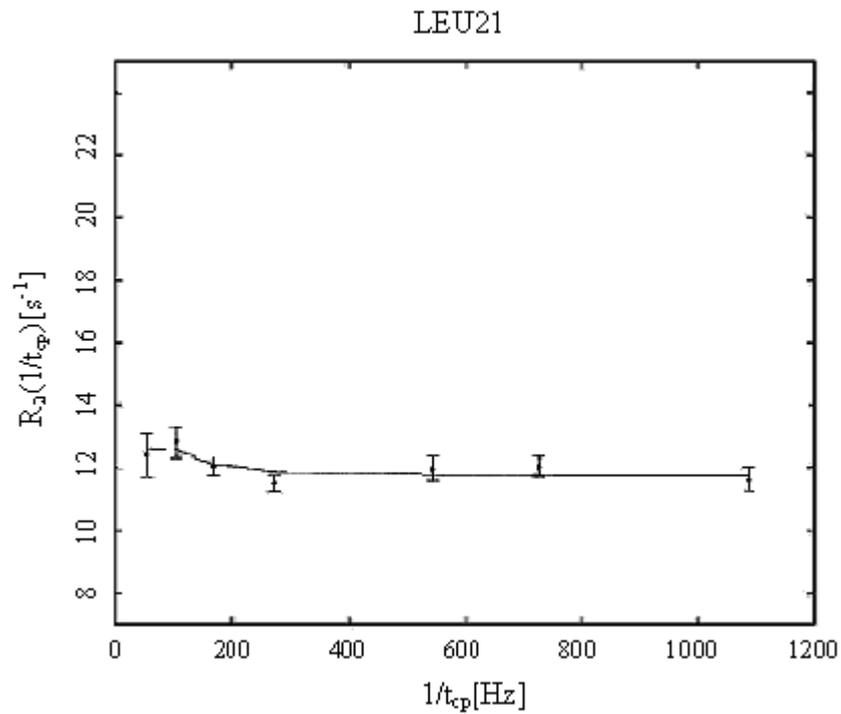


Abb. 4.4: Linienbreite der N-H-Protonen von LEU_21 bei einer Temperatur von 305 K. Bei diesem Aminosäurerest hat kein chemischer Austausch stattgefunden.

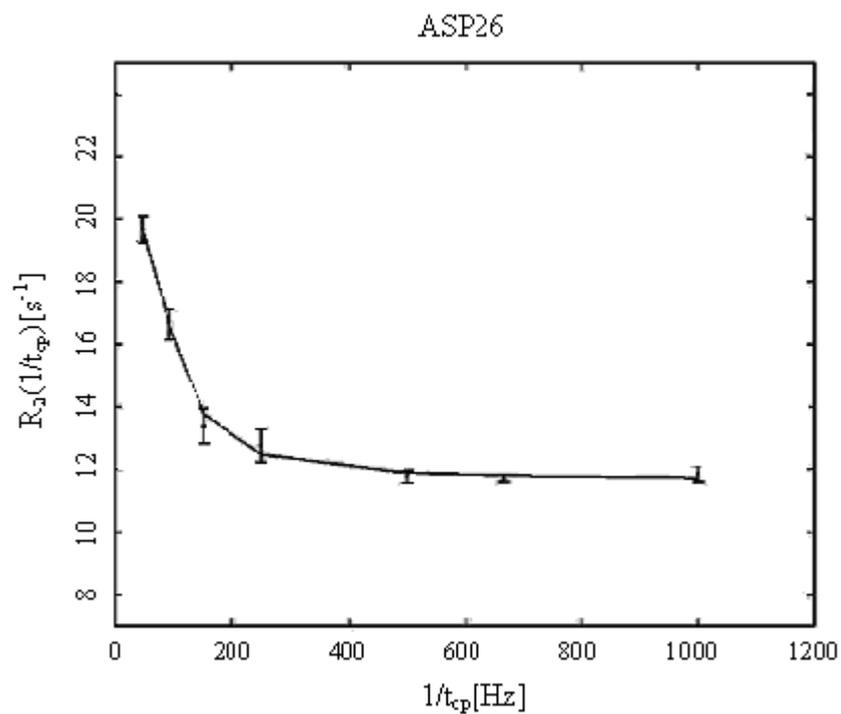


Abb. 4.5: Chemischer Austausch des Rückgrat N-H von ASP_26 gegen H₂O-Protonen bei einer Temperatur von 305 K. Bei diesem Aminosäurerest erfolgt ein deutlicher chemischer Austausch.

5 Ergebnisse und Diskussion

Da die NMR-Parameter eines Proteins von dessen dreidimensionaler Struktur und seinen dynamischen Eigenschaften abhängig sind, ist die NMR-Spektroskopie eine gute Methode, Protein-Ligand- und Protein-Protein-Wechselwirkungen zu studieren.

Mit ^{15}N -Relaxationsstudien kann für jede Aminosäure (außer Prolin) die Beweglichkeit der N-H-Gruppe innerhalb eines Proteins bestimmt werden. Man erhält sowohl Informationen über die Amplitude als auch über die Zeitskala der internen Bewegung. In dieser Arbeit wurden zwei Bewegungen untersucht: schnelle (ps – ns) thermische Bewegungen, die lokal ungeordneten Strukturen entsprechen, und langsame (μs – ms) Konformationsänderungen, die zwischen definierten Zuständen wechseln.

Dynamikuntersuchungen sind besonders im Zusammenhang mit Protein-Ligand-Wechselwirkungen von Interesse, da die Dynamikparameter häufig die Stärke der Wechselwirkung wiedergeben. In vielen Fällen ergeben sich Hinweise, welche Aminosäuren an dieser Wechselwirkung beteiligt sind. Diese Protein-Ligand-Wechselwirkungen können mit Konformationsänderungen sowohl im Protein als auch im Liganden zusammenhängen. Die NMR-Signale ändern dadurch meist ihre Linienbreite und ihre Position im Spektrum. Hinsichtlich des Proteins, können nach erfolgter Zuordnung der Signale jene Abschnitte in diesem Protein identifiziert werden, die Bindungstaschen bilden. Durch Untersuchung der Konformationen des Liganden im Komplex können Rückschlüsse für den Entwurf von verbesserten Liganden gezogen werden.

Für die Holo-Form des Human-ILBP wurden sämtliche ^{15}N Relaxationsraten (R_1 , R_2 und $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE) bei drei verschiedenen Magnetfeldstärken (500, 600 und 800 MHz) gemessen. Mit den Relaxationsraten wurde ein Bild der Dynamik des mit Taurocholat komplexierten Proteins gewonnen und mit der Dynamik des freien Proteins verglichen. Die ^{15}N CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten des ILBP wurden gemessen, um die individuellen CSA-Werte der apo- und holo-Form bei drei verschiedenen Feldstärken zu bestimmen. Auch für RNase T₁ wurden CSA Werte ermittelt.

Die gemittelten CSA Werte wurden für jede Aminosäure individuell in die Relaxationsanalyse mit dem „Model-Free Approach“ eingesetzt, um den Einfluss dieser Werte auf die Dynamik zu ermitteln.

Anschließend wurde die Dynamik in einem Zeitfenster von Mikro- zu Millisekunden untersucht.

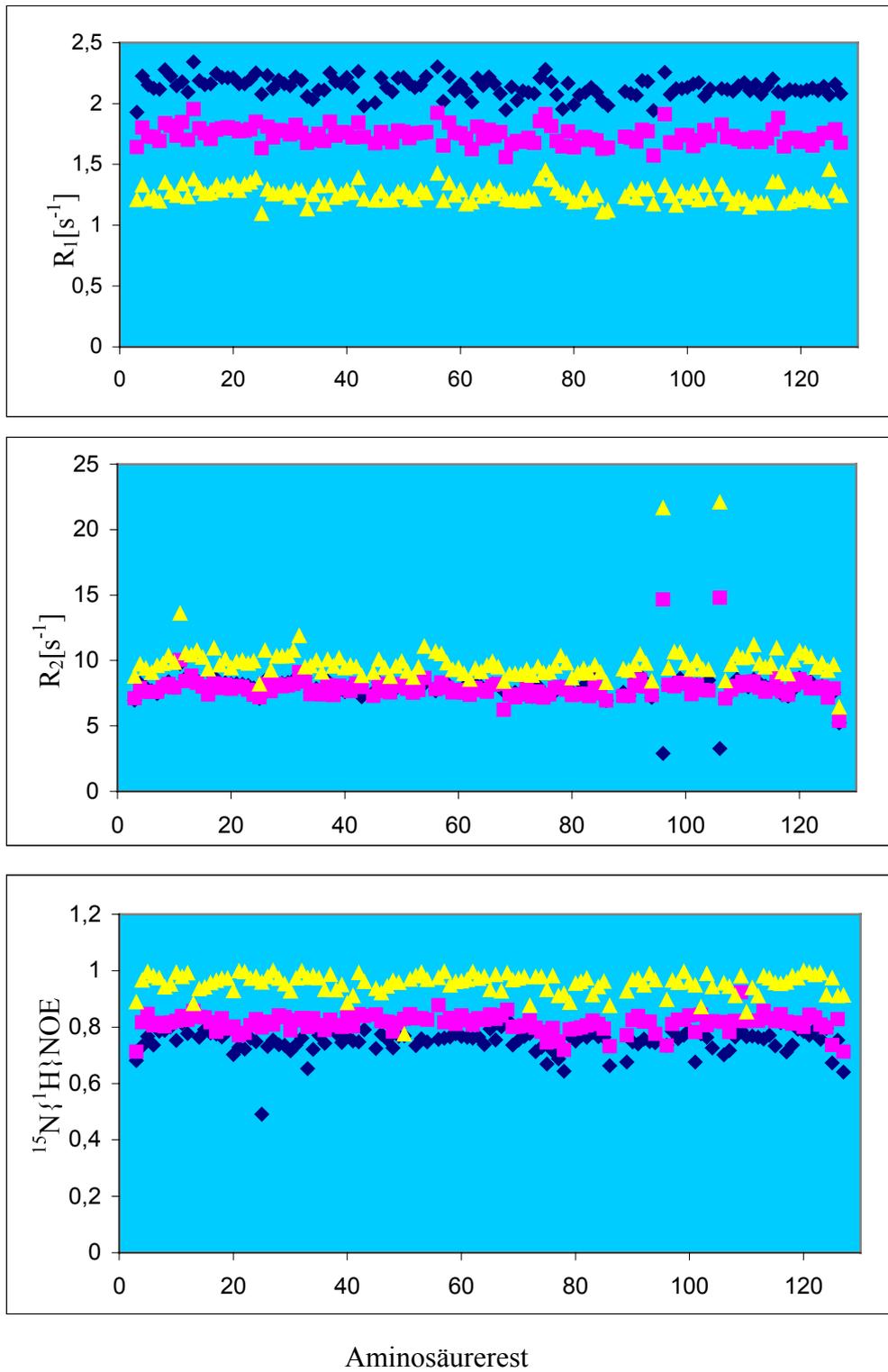
5.1 ¹⁵N-Relaxationsraten von Human-ILBP (apo- und holo-Form)

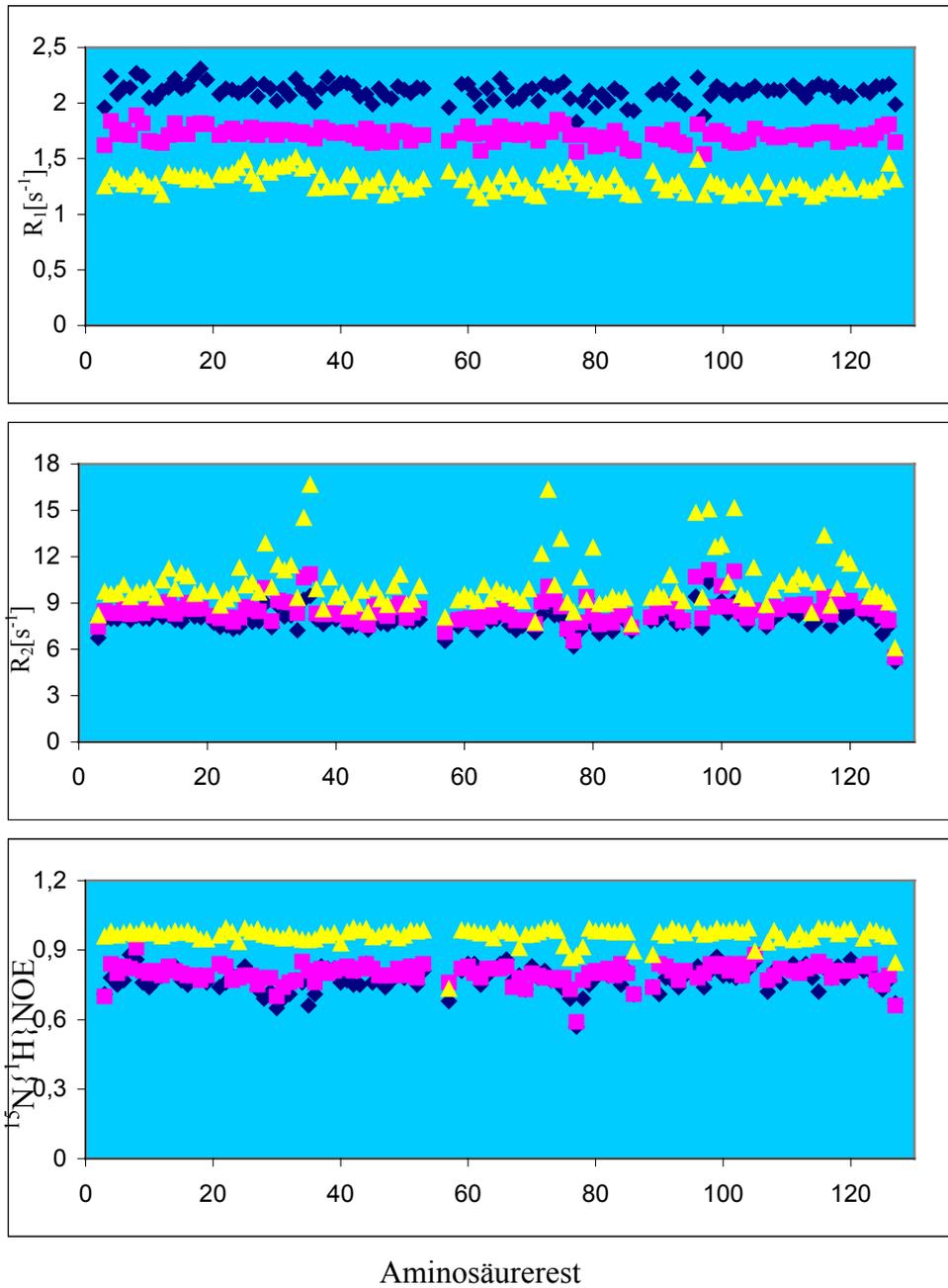
Longitudinale und transversale ¹⁵N Relaxationsraten sowie heteronukleare NOEs des Human-ILBP (holo-Form) wurden bei drei verschiedenen Feldstärken (500, 600 und 800 MHz ¹H-Larmorfrequenz) gemessen.

In Abbildung 5.1.A sind die ermittelten Relaxationsraten der Amidstickstoff-Resonanzen des Proteinrückgrats des ILBP (holo-Form) für die verschiedenen Feldstärken aufgetragen. Nur sehr wenige in der Literatur beschriebene Arbeiten haben bisher Messungen bei drei verschiedenen Feldstärken durchgeführt. Messungen bei drei Feldstärken tragen somit zur statistischen Absicherung und zur Verfeinerung der Ergebnisse bei. In dieser Abbildung sind die unterschiedlichen Abhängigkeiten der einzelnen Relaxationsraten von der Magnetfeldstärke gut zu erkennen. Für R₁ ist diese Abhängigkeit eindeutiger als bei R₂, deren Werte bei 600 und 500 MHz sich nur wenig unterscheiden. An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß die Aminosäurereste ASN 96, ASP 106 nur bei R₂ eine Ausnahme bilden (siehe Abb. 5.1.A). Eine Erklärung für dieses Verhalten ist zur Zeit nicht möglich. Es kann nur vermutet werden, dass diese zwei Reste jeweils in unterschiedlichen Konformationen vorliegen oder dass sie keine Empfindlichkeit gegen die Temperatur zeigen wie der Rest der Aminosäurereste.

Für ILBP in der Apo-Form wurden die Werte bei 500 und 600 MHz aus der Dissertation von Christian Ludwig entnommen, um bei der Verwendung des „Model-Free-Approach“ einen direkten Vergleich mit dem ILBP in der Holo-Form zu erhalten. In Abbildung 5.1.B sind die Relaxationsraten bei drei verschiedenen Feldern dargestellt. Wie bei ILBP (holo-Form) wurde auch hier die Abhängigkeit der Relaxationsraten von der Feldstärke beobachtet. Bei den Relaxationsraten R₂ sind drei Regionen gut zu erkennen, die extrem hohe Werte aufweisen. Diese drei Regionen sind besonders bei der Feldstärke 800 MHz ausgeprägt, obwohl sie bei den anderen Feldstärken 500 und 600 MHz noch angedeutet sind. Diese Regionen sind im human-ILBP (holo-Form) nicht zu erkennen, was auf Unterschiede in der Dynamik zwischen apo- und holo-Form hinweist. Aus diesen Daten lassen sich bereits qualitative Aussagen über

dynamische Phänomene und auch Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur machen. Interessant ist, dass keine extrem kleinen heteronuklearen NOE-Werte beobachtet wurden.





-B-

Abb. 5.1: R_1 , R_2 und heteronukleare NOE Werte der Stickstoffresonanzen des Rückgrats von Human-ILBP (holo-Form) bei 500, 600 und 800 MHz und bei einer Messtemperatur von 305 K. Die blauen Symbole repräsentieren die Relaxationsraten bei 500 MHz, pinkfarbene

Symbole die Werte bei 600 MHz und schließlich die gelben Symbole die Werte bei 800 MHz. A repräsentiert die holo-Form und B die apo-Form.

Rein qualitativ sind große heteronukleare NOE-Werte den Bereichen, in denen Sekundärstrukturelemente festgelegt sind, zuzuordnen. Bei den R_2 -Raten deuten größere Werte chemische Austauschprozesse an, wenn nicht gleichzeitig kleine Werte von R_1 vorliegen. Die Werte deuten an, daß die Dynamik im ILBP (apo- und holo-Form) ein Zeitfenster von Nano- zu Mikrosekunden umfasst. Ausgenommen von dieser Annahme sind die drei Regionen im ILBP (apo-Form), in denen die Aminosäuren größere R_2 -Werte und gleichzeitig keine Veränderung in den R_1 -Werten zeigen. Dieser Befund weist darauf hin, dass ILBP in seiner Apo-Form verstärkt einen chemischen Austausch unterliegt.

Die Daten (Tabelle 5.5) wurden für die Relaxationsanalyse benutzt, um die mikrodynamischen Parameter S^2 , τ_e und R_{ex} zu ermitteln. Diese Parameter vermitteln die Informationen über die Mobilität des Proteinrückgrats, die Korrelationszeiten der lokalen Bewegungen und den chemischen oder konformationellen Austausch.

Ausgehend von den gemessenen Relaxationsdaten wurden mittels des „model-free approach“ von Lipari and Syabo die Dynamik-Parameter bestimmt. Die mikrodynamischen Parameter S^2 , τ_e und R_{ex} sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

Die molekulare Korrelationszeit der ILBP holo-Form beträgt (6.10 ns). Dieser Wert ist vergleichbar mit dem τ_c -Wert der ILBP apo-Form (6.25 ns). In der LBP-Familie wurden Werte für die molekulare Korrelationszeit in einem Bereich von 5.8 bis 9.05 Nanosekunden beobachtet: E-FABP (8.6), A-FABP (8.7), H-FABP (9.05), ILBP aus dem Schwein, H-FABP (5.8), die apo-Form von I-FABP (6.7) und die holo-Form (6.2).

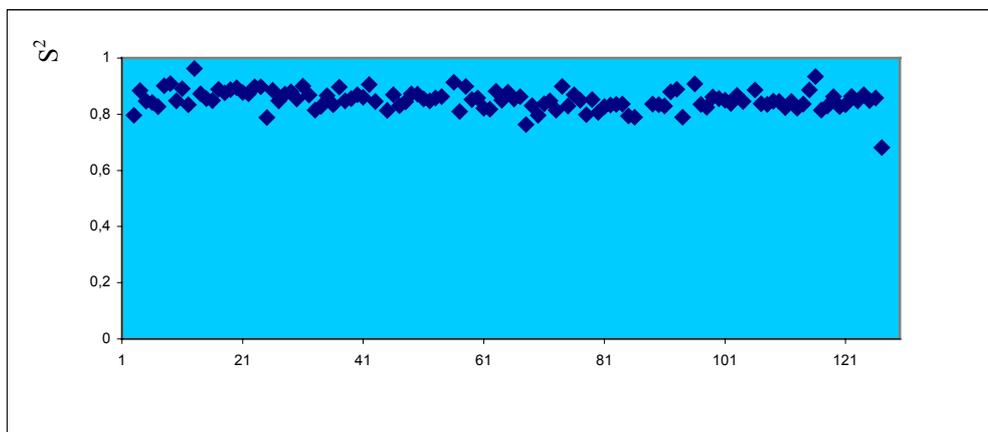
In Abbildung (5.2) sind die mikrodynamischen Parameter S^2 dargestellt. Der Ordnungsparameter S^2 ist ein Maß für die Beweglichkeit oder Unbeweglichkeit eines ^{15}N -H-Vektors. Der maximale Wert für S^2 beträgt 1. Alle Amidgruppen des Proteinrückgrats zeigen S^2 -Werte zwischen 0.8 und 1, was die Stabilität des Proteins in Gegenwart eines Liganden andeutet. Der Abbildung 5.2 ist zu entnehmen, dass in den nicht geordneten Schleifenregionen „N- und C-terminale Sequenzen“ die mikrodynamischen Parameter S^2 etwas niedriger sind als in den Faltblatt- bzw. Helixregionen. Dies deutet darauf hin, daß in diesen Regionen die Beweglichkeit etwas höher ist als in den anderen Regionen. Der C-Terminus ist deutlich flexibler als der N-Terminus. Dieser Befund ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der N-Terminus durch die starren Regionen der Helices beeinflusst

wurde. Aus der Verteilung der S^2 -Werte in den beiden Formen des ILBP ergibt sich kein großer Unterschied. Bei diesem Model werden die Aminosäuren in ihrer Beweglichkeit durch die Bindung mit einem Ligand nicht wesentlich beeinflusst.

Beim Vergleich der Daten des Human-ILBP (apo- und holo-Form) mit Daten anderer Mitglieder der FABP-Familie wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet. Die S^2 -Werte des ILBP aus dem Schwein (Luecke 1999) waren bei einigen Aminosäuren niedriger. Diese Aminosäuren waren ein Teil der Portalregion.

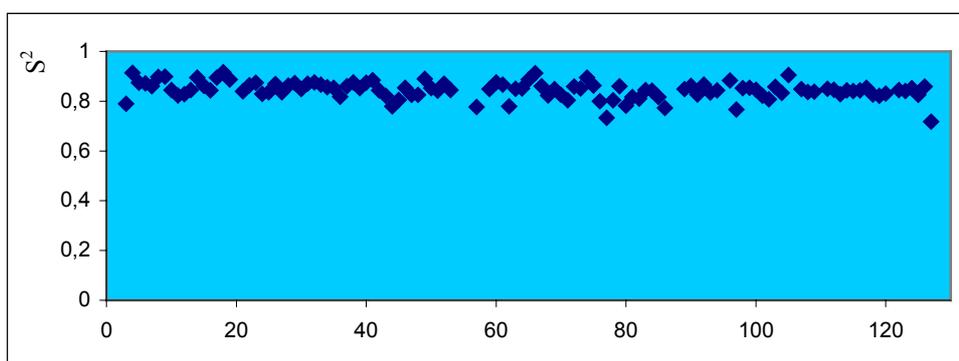
Die meisten Proteine der LBP-Familie zeigen S^2 -Werte > 0.7 . Ein direkter Vergleich der Ordnungsparameter S^2 von Human ILBP (apo- und holo-Form), H-FABP, E-FABP und dem ILBP aus Schwein ergibt, dass nur das Schweine ILBP Aminosäurereste mit höherer Mobilität im ganzen Protein inklusive der Helix-II aufweist.

In der vorliegenden Arbeit und in anderen Studien der LBP-Familie war zu beobachten, dass das ILBP eine höhere Dynamik zeigt als der Rest dieser Familie, unabhängig davon, ob das Protein aus dem Schwein oder dem Menschen stammt. Dieser deutliche Unterschied in der Flexibilität in bestimmten Regionen des ILBP kann mit dessen bevorzugter Bindung von voluminösen Gallensäuren begründet sein.



Aminosäurerest

Abb. 5.2: Ordnungsparameter (S^2) in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz des Human-ILBP (holo-Form). Der maximale Wert beträgt 0.99 in der Helix I. Allgemein wurden Werte zwischen 0.8 und 0.9 beobachtet. Die N- und C-terminalen Schleifen zeigen niedrigere Werte



Aminosäurerest

Abb. 5.3: Ordnungsparameter (S^2) in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz des Human-ILBP (apo-Form). Die Werte betragen zwischen 0.8 und 0.9. Die N- und C-terminalen Schleifen zeigen niedrigere Werte.

Im Vergleich zu Fettsäuren benötigen Gallensäuren ein größeres Volumen in der Bindungstasche, was wiederum bedeutet, dass der Ein- und Ausgang des Liganden möglicherweise durch die Dynamik des Proteinrückgrats bedingt ist. Die Positionen der Aminosäurereste, bei denen der Unterschied in S^2 deutlich wird, sind zum größten Teil den β -Faltblattsträngen E, F, G und H zuzuordnen, die zu den angenommenen Bindungspositionen für den Gallensäurenliganden gehören, was darauf hindeutet, dass die konformationelle Flexibilität ein wichtiger Faktor bei der Ligandenbindung ist.

Konformative Austauschprozesse (R_{ex}) wurden in dem ILBP (holo-Form) verteilt beobachtet. In der Apo-Form des ILBP wurden R_{ex} -Werte in drei oder vier großen Bereichen ermittelt. Diese Bereiche stimmen mit den drei Regionen überein, die in den Relaxationsraten als abweichend gefunden wurden (siehe Abb. 5.1.B). Die R_{ex} -Werte für die konformativen Austauschprozesse sind in Abbildung 5.4.A,B dargestellt.

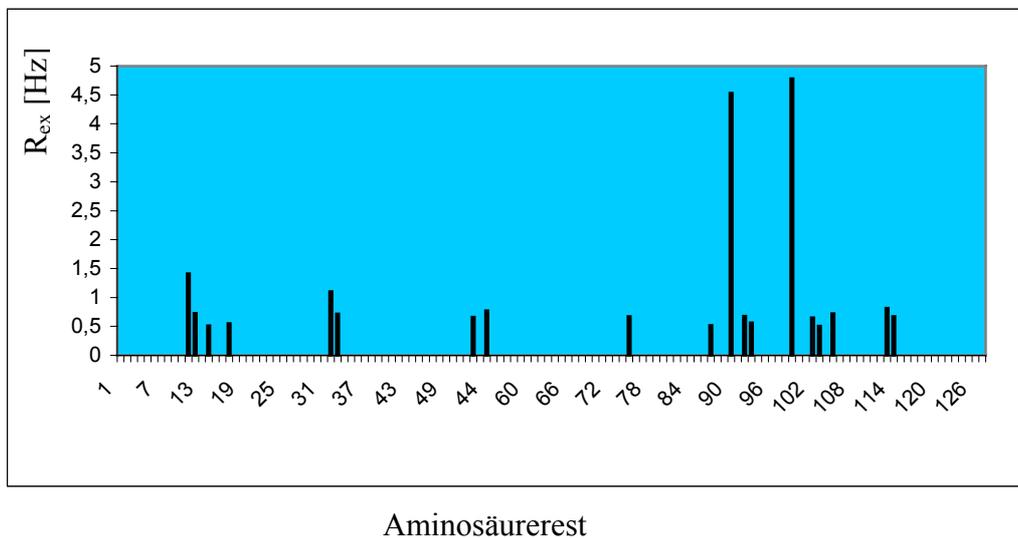


Abb. 5.4: Bereiche des konformativen Austausches des ILBP in seiner (holo-Form) einer Zeitskala oberhalb der isotropen molekularen Korrelationszeit. Aminosäuren, die einen geringen R_{ex} -Wert aufweisen, sind statistisch verteilt.

Die Verteilung der Austauschparameter für ILBP (holo-Form) ist in Abbildung 5.5 dargestellt. Aminosäuren, die in der Analyse einen Austauschparameter > 0.5 Hz aufweisen, sind in der Abbildung rotmarkiert.

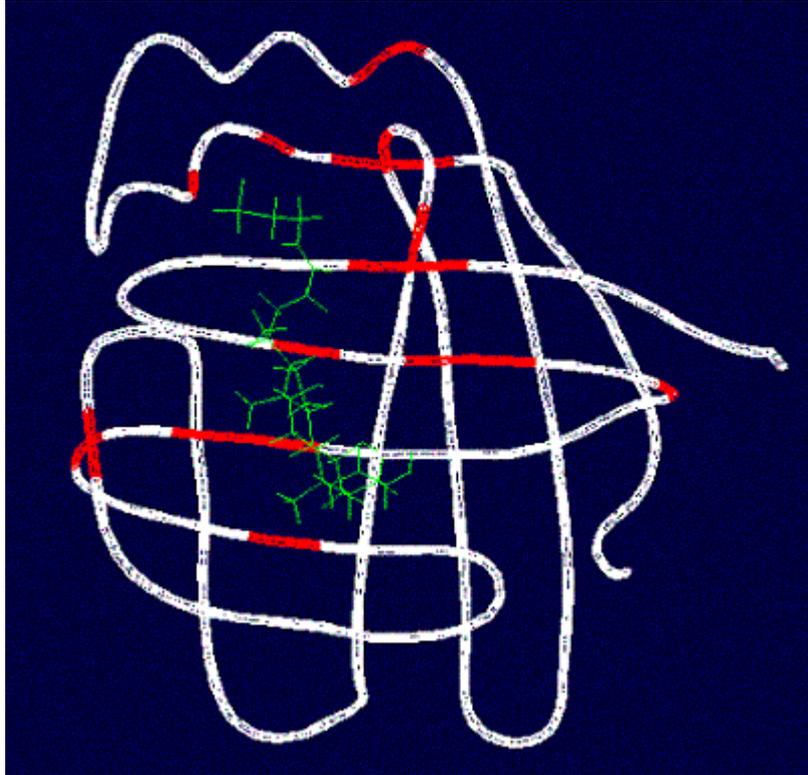


Abb. 5.5: Bereiche langsamer Konformationsänderungen des Human-ILBP (Holo-Form). Aminosäuren mit einem $R_{ex} > 0,5$ Hz sind rot dargestellt. Der Ligand Taurocholate ist grün markiert

Bei der Apoform des ILBP wurden im Vergleich zur Holoform etwa doppelt so viele Aminosäurereste, die $R_{ex} > 0.5$ Hz aufweisen, beobachtet. Interessanterweise liegen die meisten Aminosäuren, welche chemischen Austausch (R_{ex}) zeigen, zwischen den Aminosäureresten 66 und 109. Genauer gesagt: etwa 60% der 43 Aminosäuren in dieser Region zeigen einen messbaren chemischen Austausch. Der deutliche Unterschied in der Dynamik zwischen der ILBP (apo- und holo-Form) lässt sich an den konformationellen Austauschparametern R_{ex} in den Abbildungen 5.3 und 5.6 ablesen.

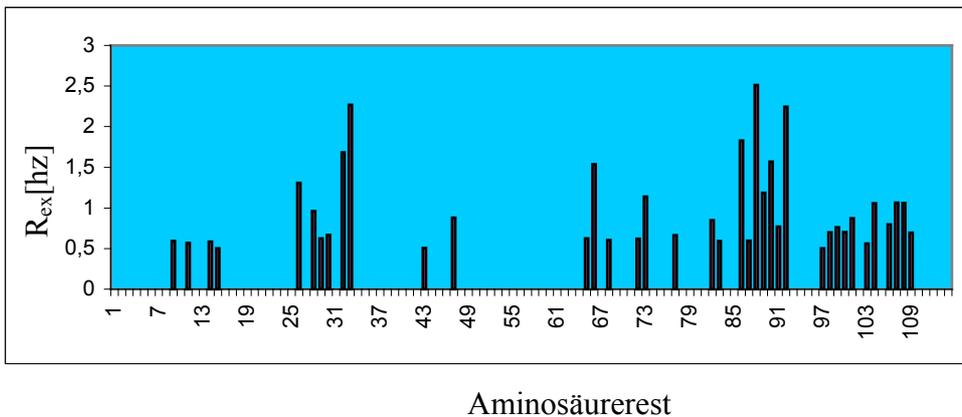


Abb. 5.6: Bereiche des konformativen Austausches einer Zeitskala oberhalb der isotropen molekularen Korrelationszeit der Apoform.

Die Verteilung der Austauschparameter für ILBP (apo-Form) ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Aminosäuren, die in der Analyse einen Austauschparameter > 0.5 Hz aufweisen, sind in der Abbildung rot markiert.

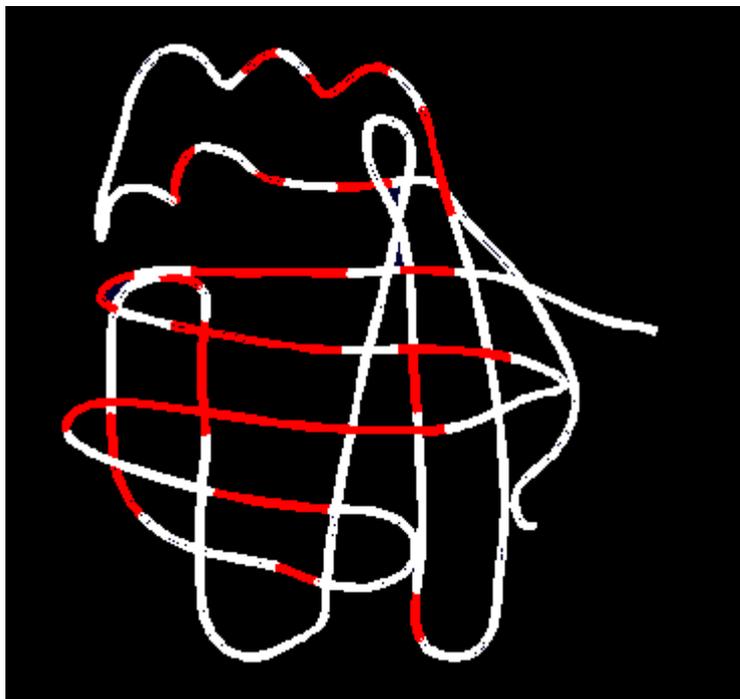


Abb.5.7: Dreidimensionale Struktur von Human-ILBP (apo-Form). Aminosäuren, die einen Austauschparameter > 0.5 Hz aufweisen, sind rot markiert.

Bei der Betrachtung der bis jetzt gewonnenen Abbildungen (S^2 und R_{ex}) ist anzumerken, daß keine auffallend niedrigen S^2 -Werte (mit der Ausnahme der C- und N-Terminalen Sequenzen) in Bereichen, die auf konformativen Austausch hinweisen, beobachtet wurden. Dies deutet darauf hin, daß das Protein ILBP entweder in seiner freien Form oder mit einem Liganden relativ starr im Zeitbereich $< \tau_m$, jedoch flexibler in einem Zeitbereich $\mu s - ms$ ist.

Tabelle 5.1 Ordnungsparameter und lokale Korrelationszeiten für Human-ILBP (holo-Form).

Die Nummer 1 und 2 deuten auf das benutzte Modell der Rechnung.

	AS	S^2	R_{ex}	τ_c	Modell
THR	3	0,796		4,722	1
GLY	4	0,884		10,781	1
LYS	5	0,846		7,775	1
PHE	6	0,842		7,305	1
GLU	7	0,827		7,854	1
MET	8	0,901		12,998	1
GLU	9	0,909		17,484	2
SER	10	0,847		8,622	1
GLU	11	0,891	1,411	0	1
LYS	12	0,834	0,728	11,802	1
ASN	13	0,962		0	2
TYR	14	0,873	0,51	15,85	1
ASP	15	0,855		17,15	1
GLU	16	0,849		7,537	1
PHE	17	0,889	0,55	18,732	1
MET	18	0,876		9,263	1
LYS	19	0,887		12,08	1
LEU	20	0,894		10,775	2
LEU	21	0,877		11,007	2
GLY	22	0,873		12,581	1
ILE	23	0,898		13,38	2
SER	24	0,898		12,975	1
SER	25	0,788		4,852	1
ASP	26	0,885		14,666	1
VAL	27	0,847		7,891	1
ILE	28	0,872		13,156	1
GLU	29	0,879		9,233	2
LYS	30	0,854		9,25	1
ALA	31	0,9		14,292	2
ARG	32	0,868	1,101	99,939	1
ASN	33	0,814	0,718	7,828	1
PHE	34	0,828		8,908	1
LYS	35	0,866		13,757	1
ILE	36	0,834		6,957	2
VAL	37	0,897		17,083	1
THR	38	0,848		7,271	1
GLU	39	0,855		10,011	1
VAL	40	0,869		9,05	1

GLN	41	0,86		8,697	2
GLN	42	0,906		17,317	1
ASP	43	0,845		8,078	2
GLN	45	0,813		5,619	1
ASP	46	0,869		15,119	1
PHE	47	0,831		8,971	1
THR	48	0,844		7,088	2
TRP	49	0,873		10,321	1
SER	50	0,871		10,928	1
GLN	51	0,854		9,097	2
HIS	52	0,847		8,016	1
TYR	53	0,858		8,091	1
SER	54	0,862	0,664	26,555	1
GLY	56	0,913		67,633	1
HIS	57	0,81	0,77	8,018	1
THR	58	0,899		13,714	2
MET	59	0,852		8,573	1
THR	60	0,858		7,42	1
ASN	61	0,821		7,09	2
LYS	62	0,818		6,424	2
PHE	63	0,882		9,341	2
THR	64	0,85		7,602	2
VAL	65	0,878		11,645	1
GLY	66	0,854		12,105	1
LYS	67	0,862		10,728	2
GLU	68	0,763		6,405	2
SER	69	0,831		6,792	2
ASN	70	0,796		4,66	1
ILE	71	0,837		6,709	2
GLN	72	0,848		8,213	2
THR	73	0,815		5,52	1
MET	74	0,899		11,895	1
GLY	75	0,829		5,772	1
GLY	76	0,869		9,041	1
LYS	77	0,85		7,479	1
THR	78	0,799	0,675	7,452	1
PHE	79	0,852		8,572	1
LYS	80	0,807		5,943	2
ALA	81	0,827		6,914	1
THR	82	0,833		6,051	1
VAL	83	0,835		6,982	1
GLN	84	0,836		8,461	1
MET	85	0,794		6,082	1
GLU	86	0,79		4,713	1
LYS	89	0,836		6,324	1
LEU	90	0,834		6,748	1
VAL	91	0,829		9,316	1
VAL	92	0,879	0,519	17,302	1
ASN	93	0,889		10,797	2
PHE	94	0,79		5,001	2
ASN	96	0,908	4,53	5,001	1
TYR	97	0,835		7,995	2
HIS	98	0,825	0,676	8,682	1
GLN	99	0,861	0,565	15,333	1
THR	100	0,856		10,538	2
SER	101	0,85		6,866	1

GLU	102	0,839		12,118	1
ILE	103	0,867		11,733	2
VAL	104	0,845		8,282	2
ASP	106	0,886	4,787	8,282	1
LYS	107	0,837		6,173	1
LEU	108	0,835		8,2	1
VAL	109	0,846	0,653	19,384	1
GLU	110	0,845	0,506	8,76	1
VAL	111	0,824		8,435	1
SER	112	0,845	0,72	10,748	1
THR	113	0,821		8,364	1
ILE	114	0,836		6,043	1
GLY	115	0,886		11,719	1
GLY	116	0,934		0	2
VAL	117	0,814		6,404	2
THR	118	0,829		6,051	1
TYR	119	0,862		9,86	2
GLU	120	0,827	0,816	11,594	1
ARG	121	0,834	0,673	11,761	1
VAL	122	0,863		12,641	2
SER	123	0,847		8,55	2
LYS	124	0,869		9,517	2
ARG	125	0,849		7,077	1
LEU	126	0,858		9,108	1
ALA	127	0,681		2,642	1

5.2 (CSA/DD)-kreuzkorrelierte Kreuzrelaxationsraten von Human-ILBP (holo-Form)

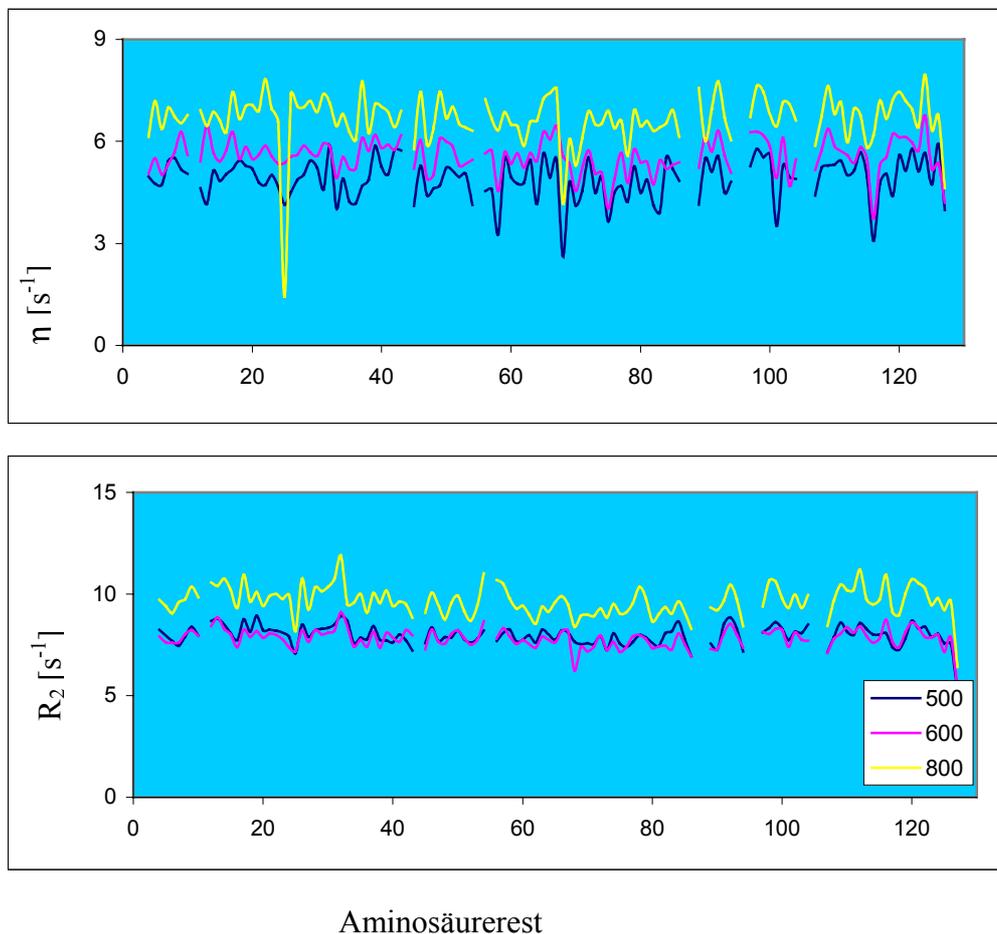
Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Messung transversaler ^{15}N CSA/DD-kreuzkorrelierter Kreuzrelaxationsraten die aminosäurespezifischen Werte für die Anisotropie des chemischen Verschiebungstensors für die beiden Proteine ILBP (apo- und holo-Form) und RNase T₁ ermittelt.

Obwohl zahlreiche Arbeitsgruppen¹⁴⁹⁻¹⁵² in der letzten Zeit versucht haben, die Anisotropie des chemischen Verschiebungstensors zu bestimmen, wurde nur für ein Beispiel eine Korrelation zwischen den CSA-Werten und der Sekundärstruktur beschrieben. Diese Studie zeigte, dass die CSA/DD-Interferenz in den Aminosäuren der α -Helix sehr viel kleiner ist als bei den Aminosäuren des β -Faltblatts. Diese zwei Sekundärstrukturelemente zeigen eine perfekte, diskrete Form der Anisotropie des chemischen Verschiebungstensors, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die Anisotropiewerte der α -Kohlenstoffatome zuverlässige Informationen bezüglich der Sekundärstruktur der einzelnen Aminosäuren liefern. In einer

anderen Studie wurde die Korrelation der ^{15}N CSA-Werte mit der Stärke der Wasserstoffbrückenbindung aufgezeigt⁴.

In der vorliegenden Arbeit wurden die transversalen ^{15}N CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten bestimmt. Für die einzelnen Aminosäurereste wurde die Anisotropie des chemischen Verschiebungstensors dem Verhältnis zwischen den Auto- und Kreuzrelaxationsraten in Abhängigkeit der magnetischen Feldstärke ermittelt, wobei es möglich war, die Orientierung und Größe des CSA-Tensors zu bestimmen. Bei dieser Methode (wie auch in vielen anderen Studien gezeigt) wurde keine Korrelation zwischen der Sekundärstruktur und den ^{15}N CSA-Werten beobachtet.

Die CSA-Werte wurden für ILBP (holo-Form) in (Abb. 5.8) dargestellt.



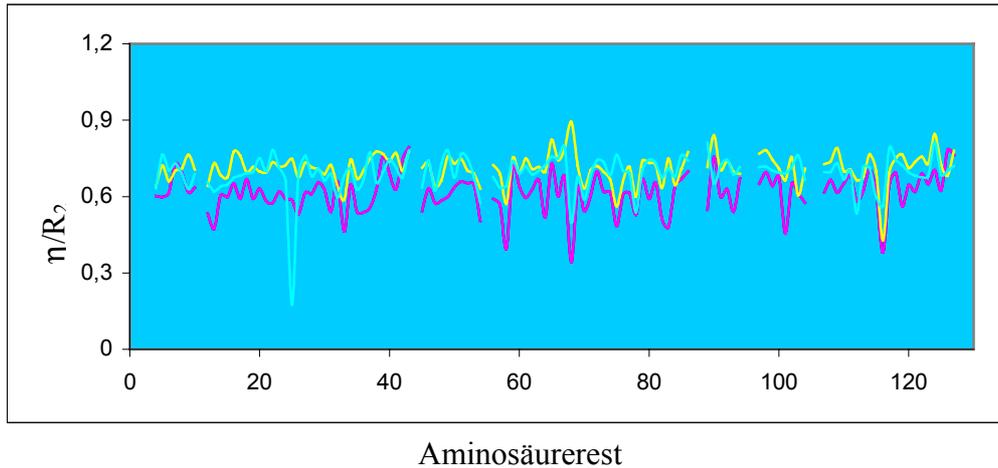
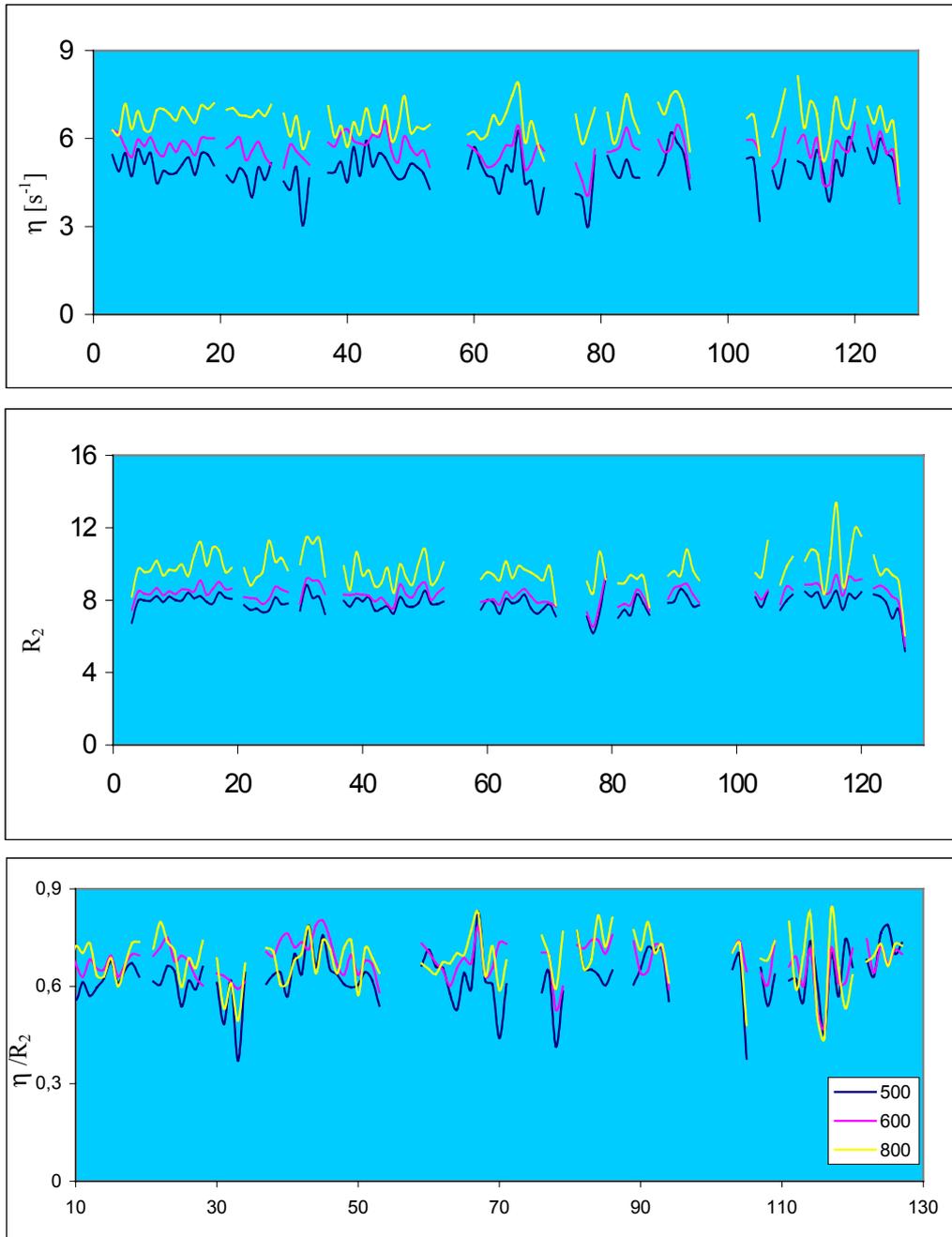


Abb. 5.8: Die für 3 verschiedene Magnetfeldstärken gemessenen CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten (η) und die transversalen Relaxationsraten R_2 aufgetragen in Abhängigkeit der Sequenz des ILBP (holo-Form). Auch das Verhältnis der beiden Relaxationsraten (η/R_2) wurde in Abhängigkeit der Sequenz erfasst. Von der Analyse wurden alle Aminosäurereste mit sehr hohen R_2 und η -Werte ausgeschlossen, da dies zu physikalisch nicht sinnvollen Werten führt. Aus diesem Grund sind in der Abbildung für einzelne Aminosäuren Lücken gelassen.

In Abbildung 5.8 werden die ermittelten CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten (η) mit den Werten der transversalen Relaxationsraten R_2 und mit dem Verhältnis zwischen den beiden Werten dargestellt. Aminosäurereste mit sehr hohem R_2 und η wurden von der Analyse ausgeschlossen, da dies zu physikalisch nicht sinnvollen Werten führt. Bei den meisten Aminosäureresten, die von der Analyse ausgeschlossen wurden, sind die Signale sehr schwach, was für die Bestimmung der CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten sehr störend ist. Die aminosäurespezifischen CSA-Werte wurden aus dem Verhältnis zwischen den CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten η und den transversalen Relaxationsraten R_2 ermittelt (Tabelle 9.1 in Anhang).

Die CSA-Werte wurden für die ILBP Apoform wie auch für die ILBP Holoform ebenfalls aus der transversalen CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxation bestimmt. In Abbildung 5.9 sind die ermittelten Werte für die CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten η zusammen mit den transversalen Relaxationsraten R_2 dargestellt. Auch hier bei dem Human-ILBP (apo-form) wurden alle Aminosäuren mit sehr hohen R_2 -Werten und gleichzeitig hohen η -Werten von der Analyse ausgeschlossen (Siehe Abschnitt 5.2)



Aminosäurerest

Abb. 5.9: Die gemessenen CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten η und die Werte der transversalen Relaxationsraten R_2 von ILBP (apo-Form). Das Verhältnis zwischen den beiden Relaxationsraten η/R_2 ist ebenfalls aufgetragen. Leere Stellen in den Kurven zeigen Positionen der Aminosäurereste, die von der Analyse ausgeschlossen wurden.

Wie aus den Abbildungen zu entnehmen ist, waren beim ILBP (apo-Form) mehr Aminosäuren aus der Analyse auszuschließen, da in dieser ILBP Spezies mehr Reste mit hohem R_2 vorkommen.

Hier ist ein Vergleich mit einem Protein, das nicht der LBP- Familie zu zuordnen ist, möglich, um das Verhalten der CSA-Werte besser zu verstehen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, eignet sich in besonderer Weise die Ribonuklease T₁ für den Vergleich.

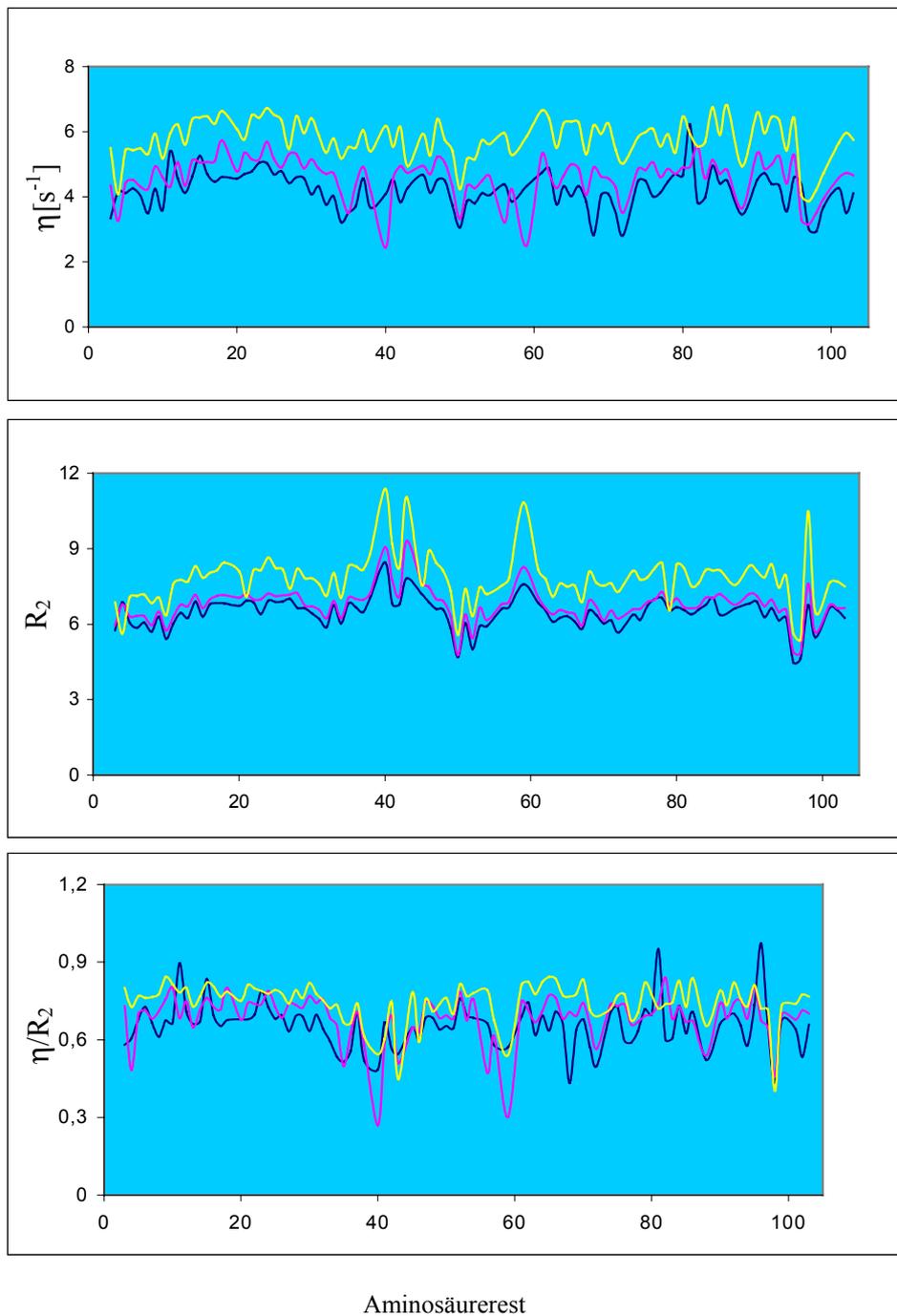
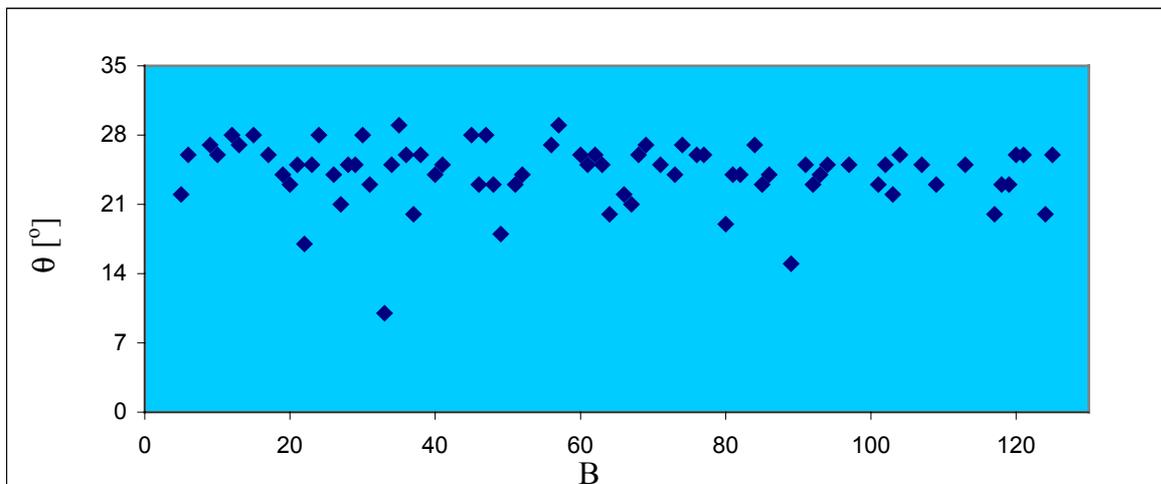
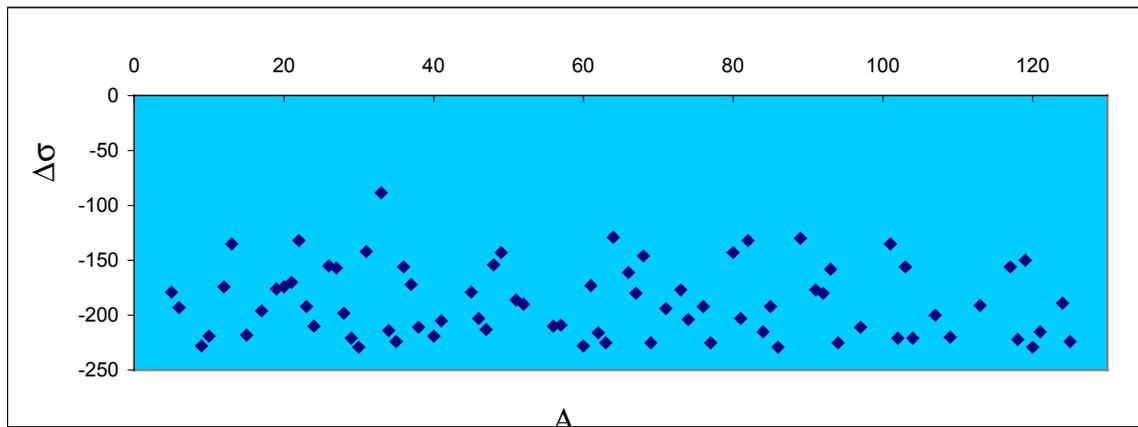


Abb. 5.10: Die gemessenen CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten η und die transversale Relaxationsraten R_2 der Aminosäurerückgratresonanzen der RNase T₁. Das Verhältnis zwischen den beiden Relaxationsraten ist ebenfalls dargestellt.

Abbildung 5.11. A und B, 5.12.A und B sowie 5.13. A und B zeigen die errechneten CSA- und θ -Werte in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz des Human-ILBP (holo-Form), des ILBP (apo-Form) und der RNase T₁. Für ILBP (holo-Form) schwanken die CSA-Werte in einem ziemlich breiten Bereich (-130 bis -224 ppm). Eine Ausnahme ergibt sich für den Rest ASN 33 mit einem Wert von -89 ppm. Die Winkel streuen ebenfalls über einen Bereich von (18 bis 28°). Für drei Aminosäurereste – GLY 22, ASN 33 und LYS 89 ergeben sich kleinere Werte.



Aminosäurerest

Abbildung 5.11. A und B: Die ermittelten CSA- (A) und θ -Werte (B) von Human-ILBP im Komplex mit Taurochololat in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz.

Die CSA-Werte schwanken für ILBP (apo-Form) ebenfalls in einem ziemlich breiten Bereich (-150 bis -229 ppm). Drei Aminosäurereste zeigen Werte außerhalb dieses Bereichs. Es handelt sich um die Reste GLY 22, THR 78 und PHE 79. Die Winkel streuen über einen Bereich von 18° bis 28° . Auch hier bilden die Aminosäurereste GLY 22 und THR 78 Ausnahmen.

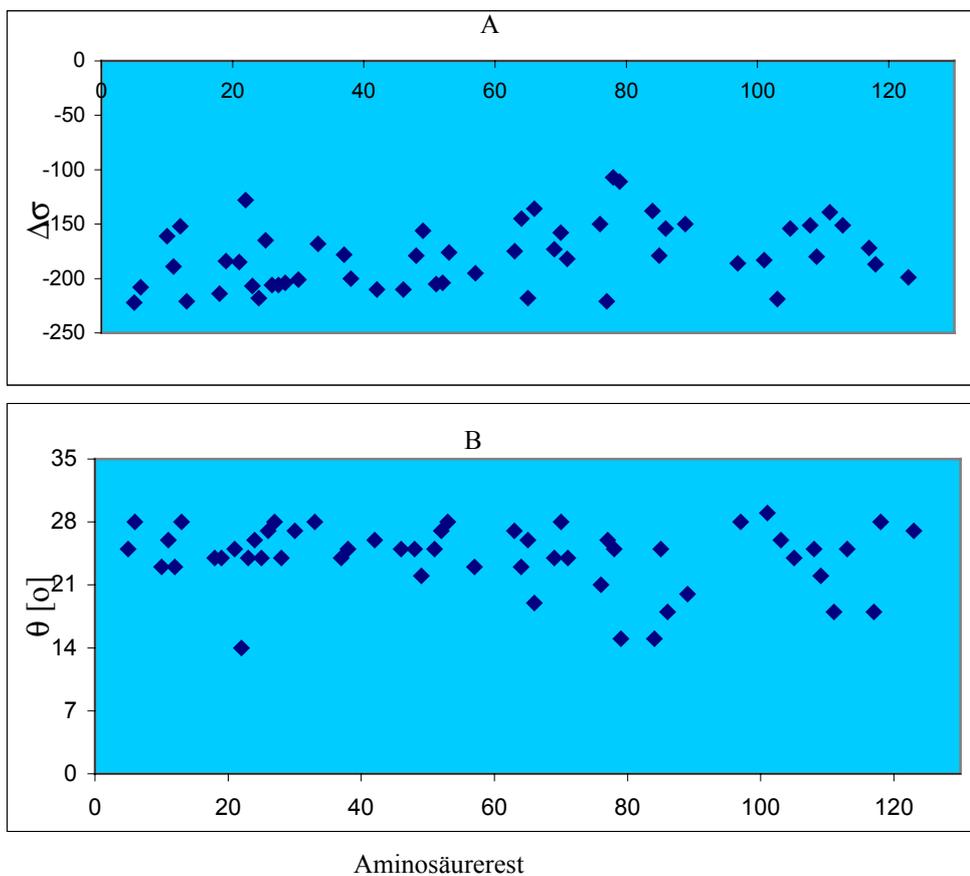


Abb. 5.12: Die ermittelten CSA- und θ -Werte von ILBP (apo-Form) in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz Die CSA-Werte streuen über einen breiten Bereich (-150 bis -229 ppm).

Da in der RNase T₁ nicht so viele Extremwerte der Daten ausgeschlossen werden mussten, führt dies dazu, dass mehr Aminosäurereste zur Bestimmung der CSA-Werte zur Verfügung

stehen. Die Anzahl der Aminosäurereste, denen ein CSA- und θ -Wert zugeordnet werden kann, ist somit groß. Die CSA-Werte und Winkel θ der RNase T₁ sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Auch hier streuen die CSA-Werte über einen breiten Bereich (-150 bis 220 ppm).

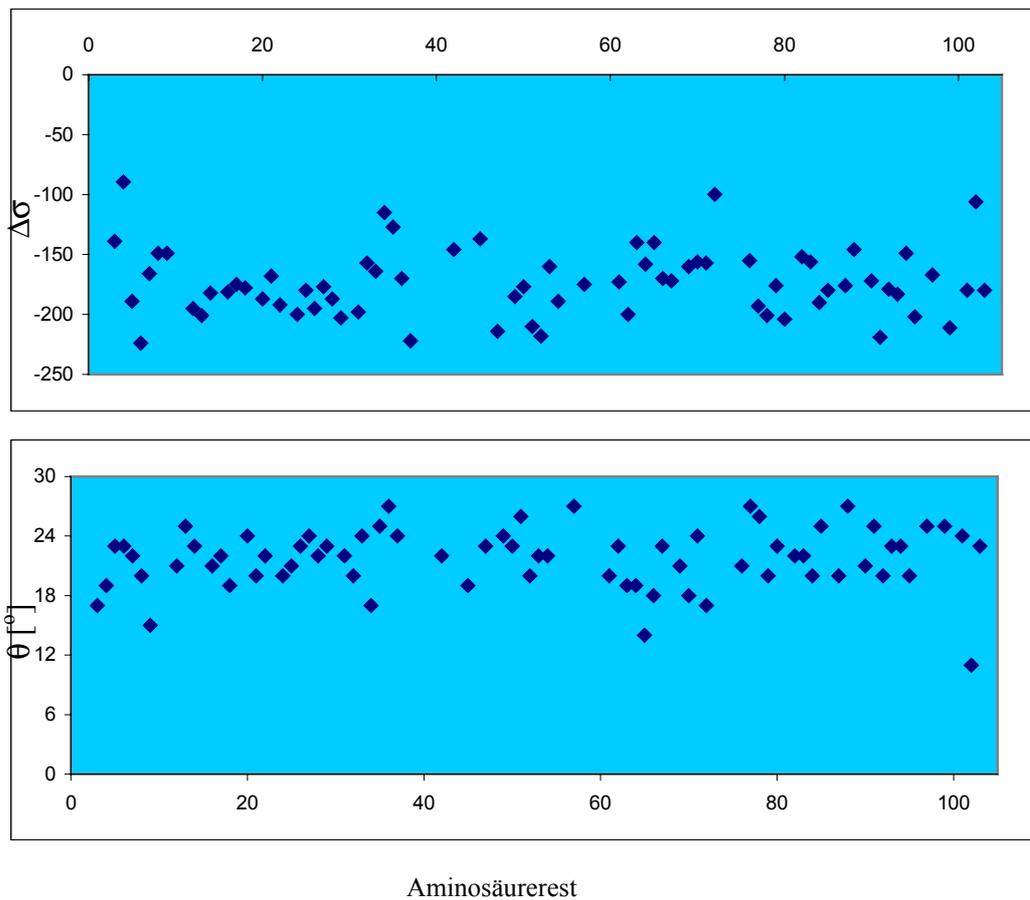


Abb. 5.13: Die ermittelten CSA- und θ -Werte der RNaseT₁ in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz. Die $\Delta\sigma$ -Werte streuen über einen Bereich von -150 bis -220 ppm.

Die ermittelten $\Delta\sigma$ -Werte wurden auf ihre Verteilung im ganzen Protein untersucht, um festzustellen, ob eine Abhängigkeit von der Sekundärstruktur zu erkennen ist. Hierzu wurden die CSA-Werte in vier Gruppen unterteilt (Abbildung 5.7.)

CSA-Wert	Anzahl der Aminosäurereste			Farbe
	ILBP (holo)	ILBP (apo)	RNaseT ₁	
Unter -160 ppm	20	16	23	Grün
-160 – 200 ppm	24	21	37	Rot
-200 – 220 ppm	19	14	10	Rosa
Über -220 ppm	14	3	2	Gelb

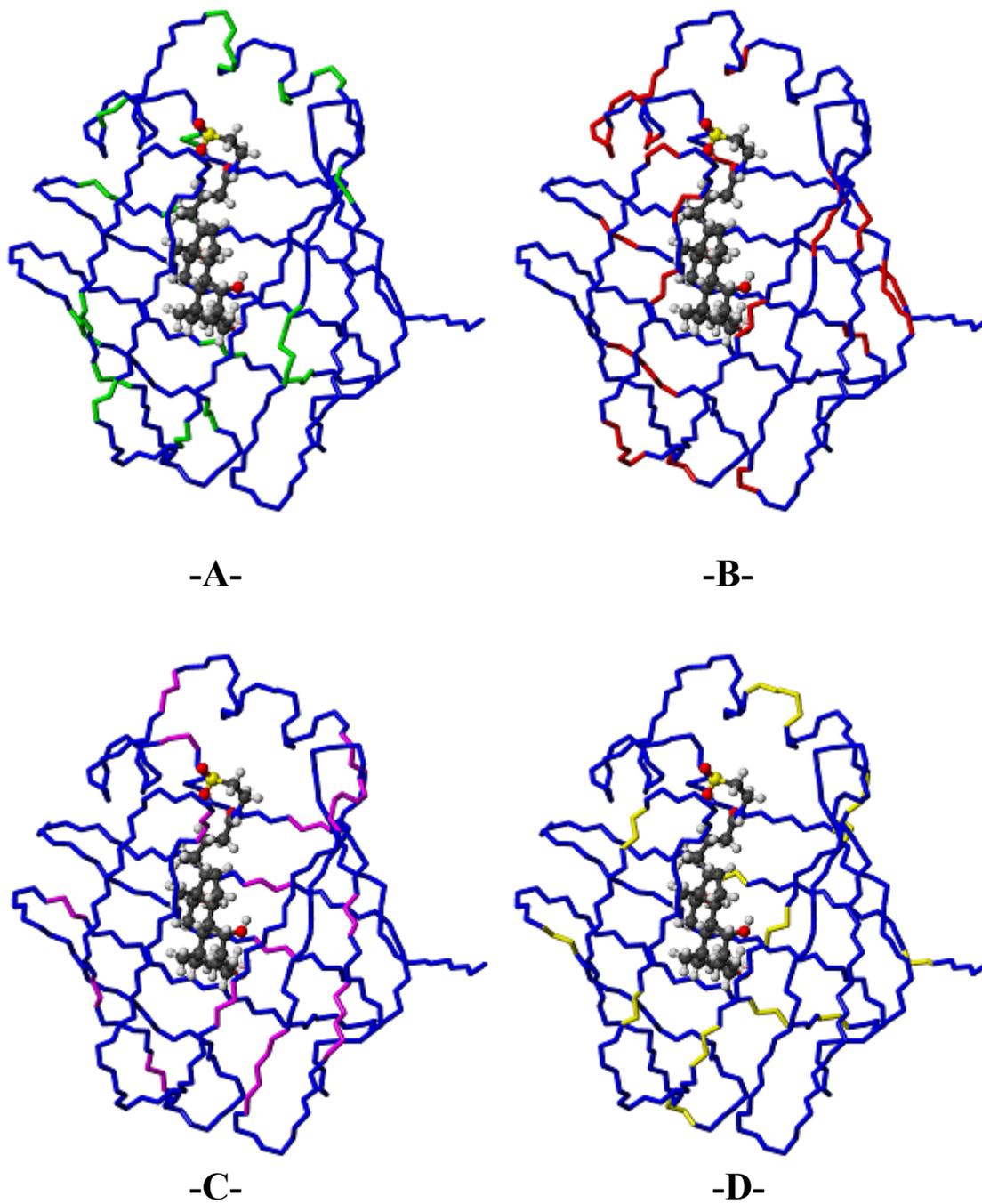


Abb.5.14: Die CSA-Werte sind in Human-ILBP (holo-Form) statistisch verteilt. Das Bild -A- zeigt $\Delta\sigma$ -Werte unter (-160ppm), -B- zwischen -160 bis -200 ppm, -C- $\Delta\sigma$ -Werte -200 bis -220 ppm und -D- $\Delta\sigma$ -Werte von über -220 ppm.

Für ILBP (apo-Form) wurden folgende Verteilung gefunden (Abb. 5.15)

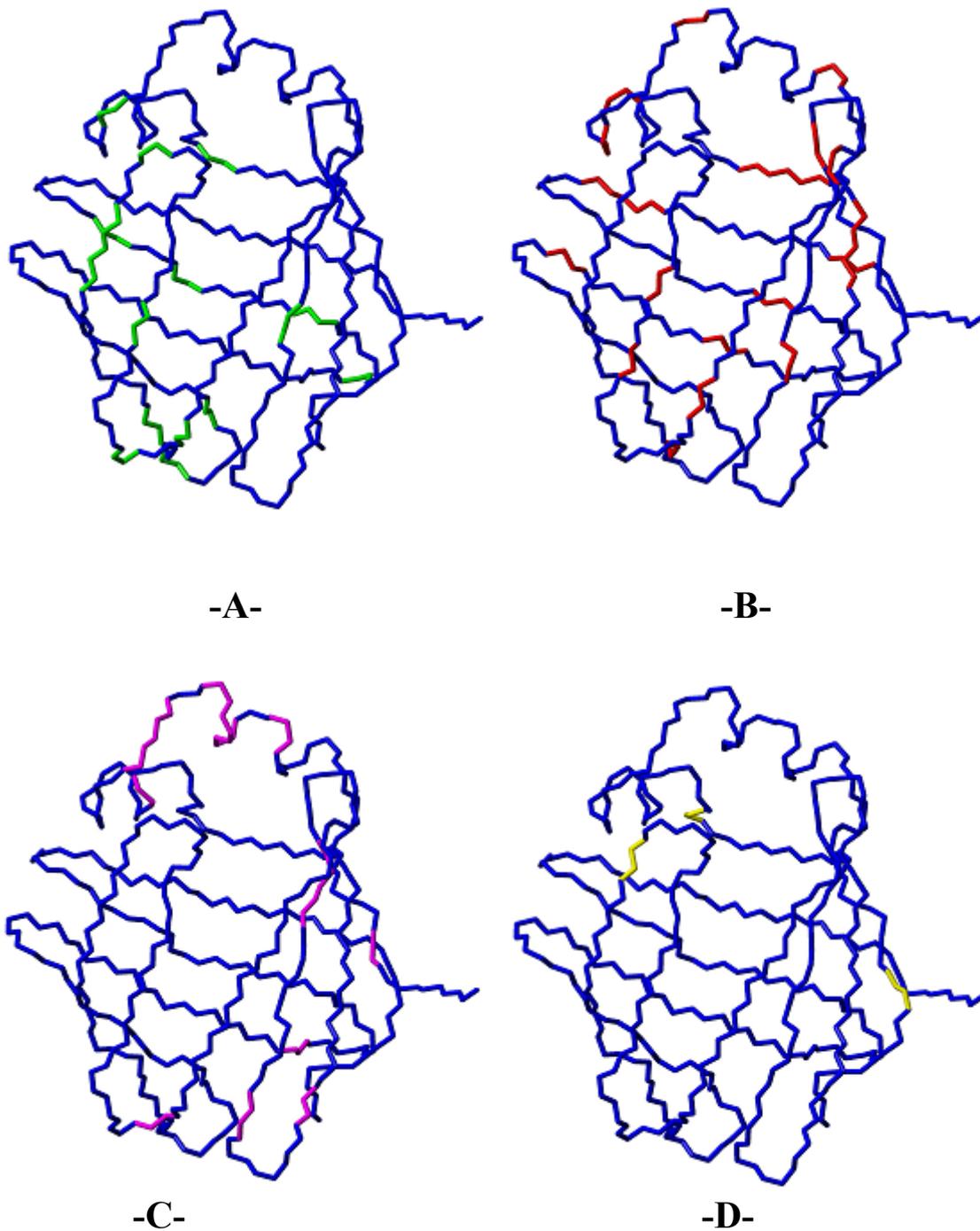


Abb. 5.15: Die Verteilung der $\Delta\sigma$ -Werte im ganzen Protein ILBP (apo-Form). Das Bild -A- zeigt $\Delta\sigma$ -Werte unter -160ppm , -B- $\Delta\sigma$ -Werte zwischen -160 bis -200 ppm , -C- $\Delta\sigma$ -Werte zwischen -200 bis -220 ppm und -D- die $\Delta\sigma$ -Werte von über -220 ppm .

Für RNase T₁ ergibt sich folgendes Bild (Abb. 5.16):

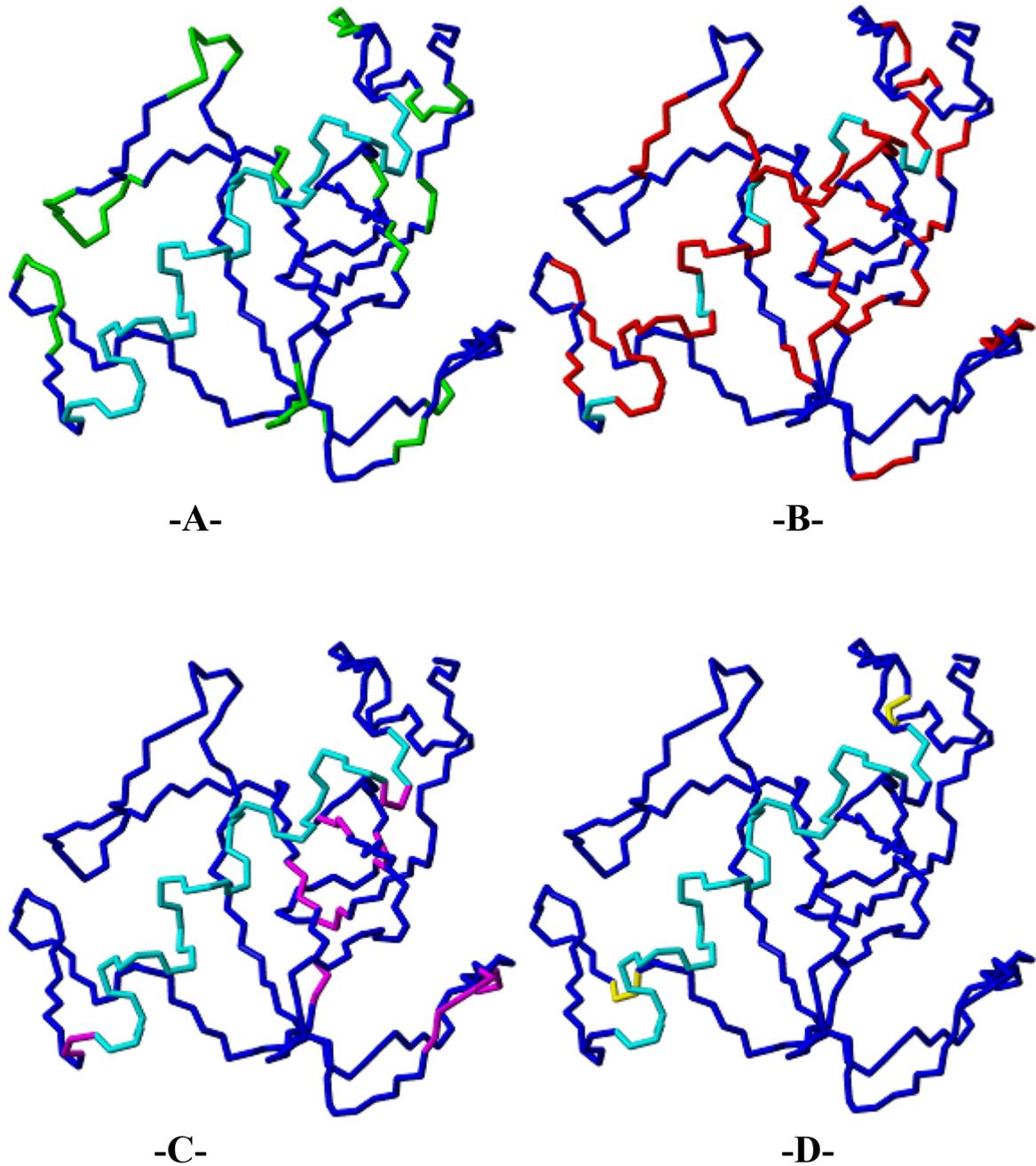


Abb. 5.16: Die Verteilung der CSA-Werte in der RNase T₁. Die einzige Helix in diesem Protein ist pink gefärbt. Aminosäuren mit CSA-Werten größer als -160 ppm sind in A gezeigt, $\Delta\sigma$ -Werte von -160 - -200 ppm in B und $\Delta\sigma$ -Werte kleiner als -200 ppm in C, wobei D Aminosäurereste mit einem $\Delta\sigma$ -Wert < -220 ppm zeigt, jeweils farblich markiert.

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der CSA-Werte von der Geometrie des Proteins ist beobachtet worden, dass tatsächlich eine gewisse Signifikanz der Werte für α -Helixregionen zu beobachten ist, die in den β -Faltblättern nicht vorhanden ist. Die CSA-Werte der α -Helixregionen im ILBP (holo-Form) sind denen des H-FABP (holo-Form) sehr ähnlich (Abb. 5.17 und 5.18). Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die CSA-Werte der beiden Helices in einen kleinen Zwischenbereich unterschiedlich sind. Die $\Delta\sigma$ -Werte der ersten Aminosäuren der Helix-II sind relativ größer als die der Helix-I, was auf eine nicht ganz vollständige Faltung der Helix-II zurückzuführen sein könnte. Der Unterschied beträgt etwa -50 ppm. Diese Untersuchung zeigt aber auch, dass die berechneten CSA-Werte über einen großen Bereich streuen. Der Streubereich umfasst Werte zwischen -89 ppm bis -220 ppm. Bei der Untersuchung der Korrelationen zwischen den Änderungen der $\Delta\sigma_N$ -Werte für jede einzelne Aminosäure konnte keine signifikante Abhängigkeit von Sekundärstrukturelementen ermittelt werden. Dieses Befund stimmt mit anderen Studien überein²¹.

Bei der Ermittlung der CSA-Werte war es nicht möglich, für alle Aminosäuren einen individuellen CSA-Wert ($\Delta\sigma_N$) zu bestimmen. Wahrscheinlich ist die Berechnung der CSA-Werte bei diesem Verfahren durch viele Vereinfachungen und Annahmen, die oft bei Proteinen in Lösung nicht erfüllt sind, zu wenig genau ist. Zu diesen Rechnungen war unter anderem vorausgesetzt:

- Der chemische Austausch darf nur sehr langsam erfolgen, da die Auswertung auf dem $\frac{\eta}{R_2}$ -Verhältnis bei verschiedenen Feldstärken beruht.
- Von der Analyse müssen Aminosäuren mit sehr hohem R_2 - und gleichzeitig sehr hohen η -Werten ausgeschlossen werden, da diese zu physikalisch nicht sinnvollen Werten führen.
- Das Protein muss sich ideal isotrop bewegen. Das heißt, lokale Anisotropieeffekte dürfen nicht auftreten.
- Die erhaltene Streuung von $\Delta\sigma_N$ für Proteine in Lösung ist bedingt auch durch die Ungenauigkeit der experimentellen Daten.

Diese vier Voraussetzungen sind bei den beiden Proteine, ILBP (apo –und holo-Form) und bei der RNase T₁, nicht erfüllt.

Die Art und Weise, wie die transversalen ¹⁵N-Relaxationsraten bestimmt wurden, trägt ebenfalls zum Fehler bei.

Der Mittelwert $\langle \Delta\sigma_N \rangle$ beträgt -183 ppm für ILBP (holo-Form), -173 ppm für ILBP (apo-Form) und -170 ppm für die RNase T₁. Diese Werte sind somit um -23 ppm (ILBP holo-Form), -13 ppm (ILBP apo-Form) und -10 ppm (RNase T₁) niedriger als der normalerweise verwendete Wert von -160 ppm, der mit Festkörper-NMR –Methoden für einfache Peptide bestimmt wurde.

Bei dem Vergleich der CSA-Werte für ILBP (apo- und holo-Form) mit den entsprechenden Werten für ein Protein aus der LBP-Familie, das H-FABP (holo-Form), ist die Verteilung dieser Werte ähnlich.

Bei dem Enzym RNaseT₁ ist der Streubereich der $\Delta\sigma_N$ -Werte ähnlich groß.

In der vorliegenden Analyse wurde für den Abstand des NH-Vektors ein Wert von 102 pm verwendet, wobei eine Analyse mit einem Abstand von 103 pm dazu führt, dass wegen der Grenzbedingungen mehreren Aminosäureresten weitere CSA-Wert zugeordnet werden⁶. Die Zahl der Möglichkeiten zur Berechnung der $\Delta\sigma_N$ -Werte scheint von dem verwendeten Wert für den NH-Abstand abhängig zu sein.

Bei der Unterteilung der CSA-Werte für das ILBP (apo- und holo-Form) in vier Gruppen (siehe Abb. 5.14 und 5.15) ist bemerkenswert, dass in der holo-Form für etwa 60% der Aminosäurereste ein Wert errechnet werden konnte, während dies in der apo-Form für nur etwa 50% der Aminosäurereste möglich war. Bei dem Enzym RNase T₁ wurden 70% der Aminosäureresten ein CSA-Wert zugeordnet. Der größte Unterschied zwischen den Proteinspezies ist bei Werten zu beobachten, die kleiner als -220 ppm sind. (bei der ILBP (holo-Form) 14, bei der apo-Form nur 3, bei der RNaseT₁ ebenfalls nur 2).

Dieses Ergebnis könnte auf die erste nicht richtige Annahme zurückzuführen sein, dass kein chemischer Austausch stattfindet. Das freie Protein (ILBP apo-Form) hat etwa doppelt so viele Aminosäurereste mit einem R_{ex} -Wert ≥ 0.5 Hz (siehe Abb 5.4 und 5.6) im Vergleich zur holo-Form. Das Ausschließen mehrerer Aminosäuren mit hohen R_2 -Werten führte auch zu einer Reduzierung der errechneten CSA-Werten ($\Delta\sigma_N$ -Werte).

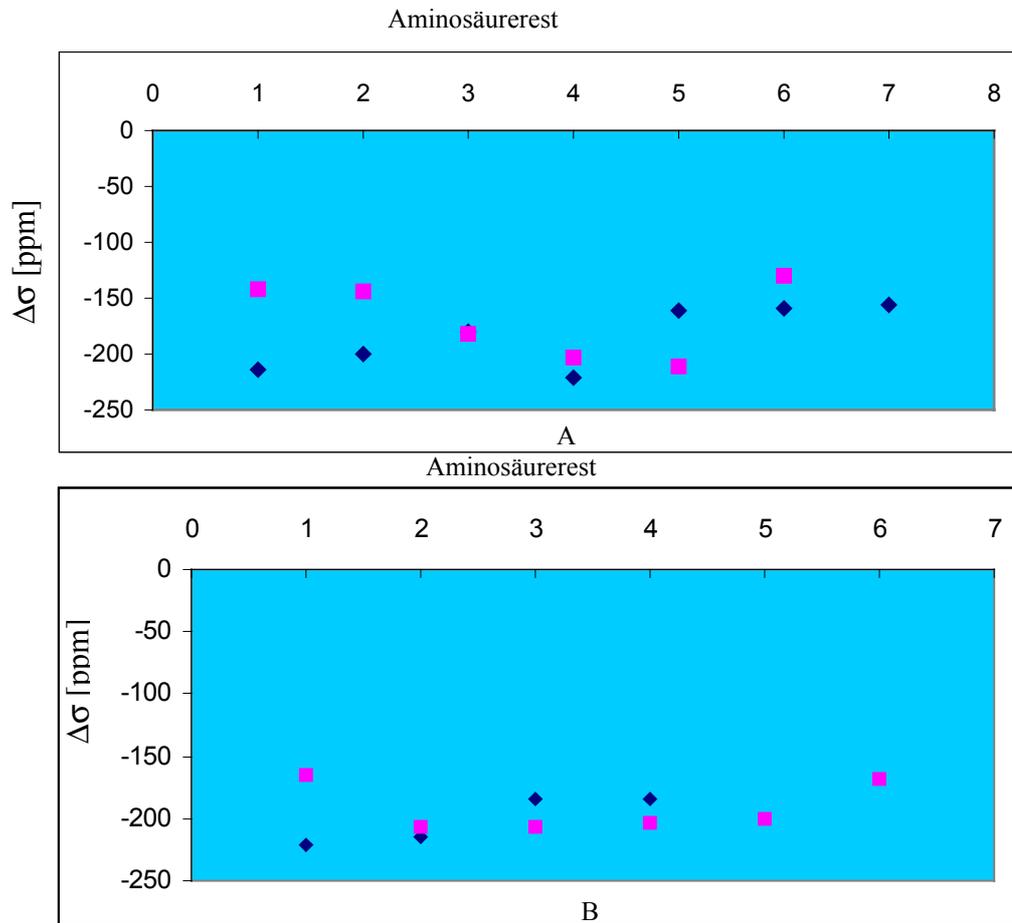


Abb. 5.17 A, B: $\Delta\sigma_N$ -Werte für ILBP (apo- und holo-Form). Helix-II ist durch pinkfarbene Symbole, Helix-I durch blaue Symbole dargestellt. Der Unterschied von etwa 80 ppm am Anfang der beiden Helices ist wahrscheinlich durch die nicht vollständige Faltung von Helix-II bedingt

Aus den Abbildungen 5.9 und 5.10 ist zu entnehmen, dass die Feldstärkeabhängigkeit des CSA-Anteils nicht präzise bestimmt werden konnte. Messungen bei größeren Feldstärken ($> 1\text{GHz}$ ^1H -Larmorfrequenz) würden eine wesentlich genauere Bestimmung der aminosäurenspezifischen CSA-Werte ermöglichen.

Wegen der zahlreichen möglichen Fehlerquellen wurden die errechneten aminosäurenspezifischen $\Delta\sigma_N$ -Werte nur bei der Untersuchung des Einflusses der individuellen CSA-Werte auf das „Model-Free Approach-Model“ verwendet.

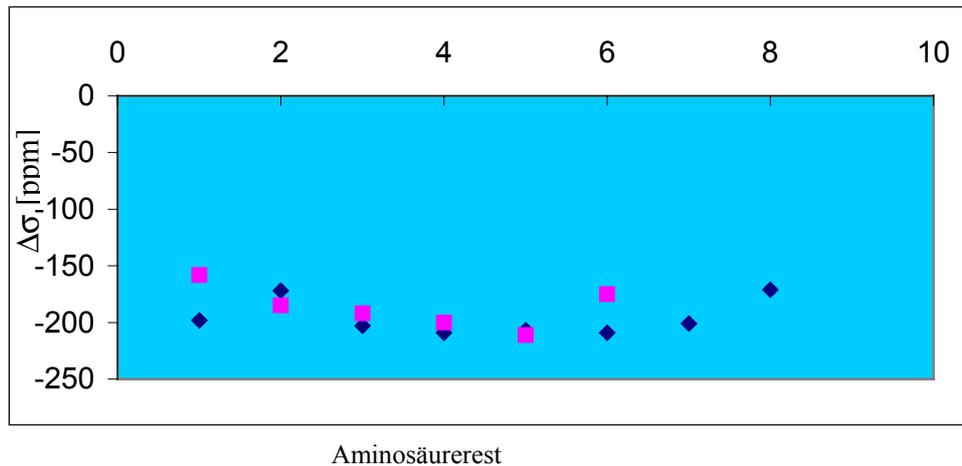


Abb. 5.18: $\Delta\sigma_N$ -Werte für H-FABP (holo-Form) für die Sequenz 1-10. Symbole sind wie Abb. 5.17.

5.3 Einfluss der individuellen CSA-Konstanten $\Delta\sigma_N$ auf den Ordnungsparameter S^2 beim „Model-Free-Approach“

In dem Model-Free-Approach wurde davon ausgegangen, dass alle Aminosäuren die gleiche CSA-Konstante aufweisen. Dieser Wert (-160 ppm) wurde mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie von Peptiden und Polypeptiden ermittelt. Da die chemische Verschiebung im allgemeinen von der Orientierung der Moleküle zu dem angewandten Magnetfeld abhängt, kann mit Hilfe der Festkörper-NMR die Orientierungsabhängigkeit durch Messung der chemischen Verschiebung in einem einzigen Kristall untersucht werden, der in verschiedenen Richtungen zum angelegten Magnetfeld gehalten wird. In der Lösung bewegen sich die Moleküle sehr schnell, so dass $(\tau_c)^{-1} \gg \Delta\nu$ gilt, wobei τ_c die Rotationskorrelationszeit und $\Delta\nu$ der Unterschied in der Resonanzfrequenz zwischen den beiden extremen Orientierungen ist.

Die ermittelten mikrodynamischen Ordnungsparameter S^2 sind für jede Aminosäure des ILBP (apo- und holo-Form) ohne große Ausnahme nahezu identisch (s. Abb.19), was zu der Annahme führt, dass alle Aminosäuren sich gleich bewegen und beide Formen den gleichen durchschnittlichen S^2 -Wert aufweisen. Dieser Befund ist unrealistisch, da viele Studien zeigten, dass die Wechselwirkung zwischen dem Protein und dem Liganden dazu führt, dass

das Protein starrer wird. Aus der Analyse der S^2 -Werte kann deswegen nicht abgeleitet werden, welche Aminosäurereste an der Wechselwirkung beteiligt sind.

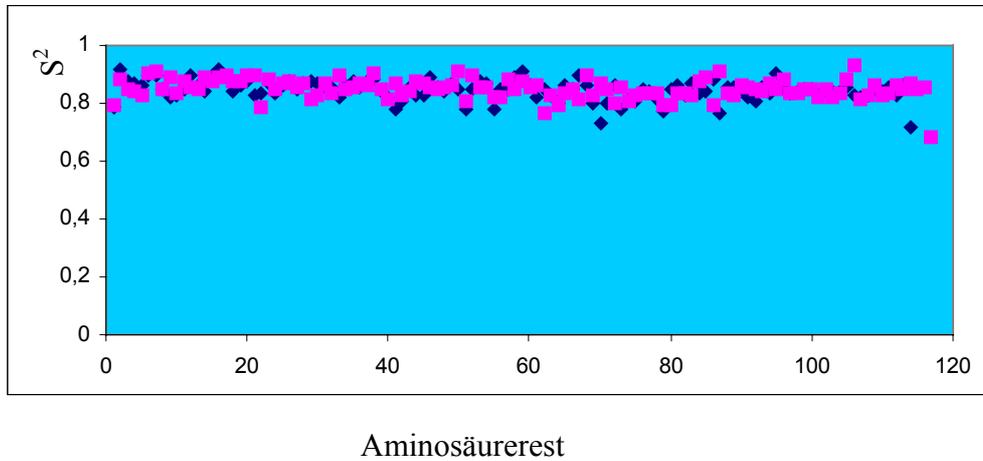


Abb. 6.2: Die mikrodynamischen Parameter S^2 in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz der beiden Human-ILBP (apo- und holo-Form). Ein größerer Unterschied zwischen den Werten wird nicht beobachtet (Apo- und Holo-Form sind pink und blau dargestellt).

Eine mögliche Fehlerquelle wäre die Benutzung einer einzigen CSA-Konstante für alle Aminosäurereste, was allen derzeit bekannten Ergebnissen über die Verteilung von den CSA-Konstanten widerspricht, da die $\Delta\sigma_N$ -Werte aminosäurespezifisch sind. Bei der Bestimmung der mikrodynamischen Ordnungsparameter S^2 wurde in dem Model-Free-Approach von Lipari und Szabo eine $\Delta\sigma_N$ -Konstante von -160 ppm verwendet. Dieser Wert wurde von Proteinen aus der Festkörper-NMR-Spektroskopie einfacher System ermittelt, was der NMR-Spektroskopie in Lösung nicht entspricht. Aus diesem Grund wurden die experimentell ermittelten CSA-Konstanten für jede Aminosäure individuell eingesetzt und die mikrodynamischen Ordnungsparameter neu berechnet.

Unter diesen Bedingungen wurden die individuellen CSA-Werte von ILBP (Holo-Form) im Model-Free-Approach eingesetzt und die mikrodynamischen Parameter S^2 neu berechnet. Die S^2 -Werte, die mit einem CSA-Wert (-160 ppm) oder mit der für jede Aminosäure individuellen CSA-Konstante berechnet wurde, sind in Abbildung 5.20, 21 dargestellt. In der Abbildung 5.20 kann die höhere Dynamik der Helix II (AS 23-33) relativ gut erkannt werden. Dieser Bereich scheint offensichtlich eine Rolle bei der Komplexbindung mit Gallensäuren zu spielen.

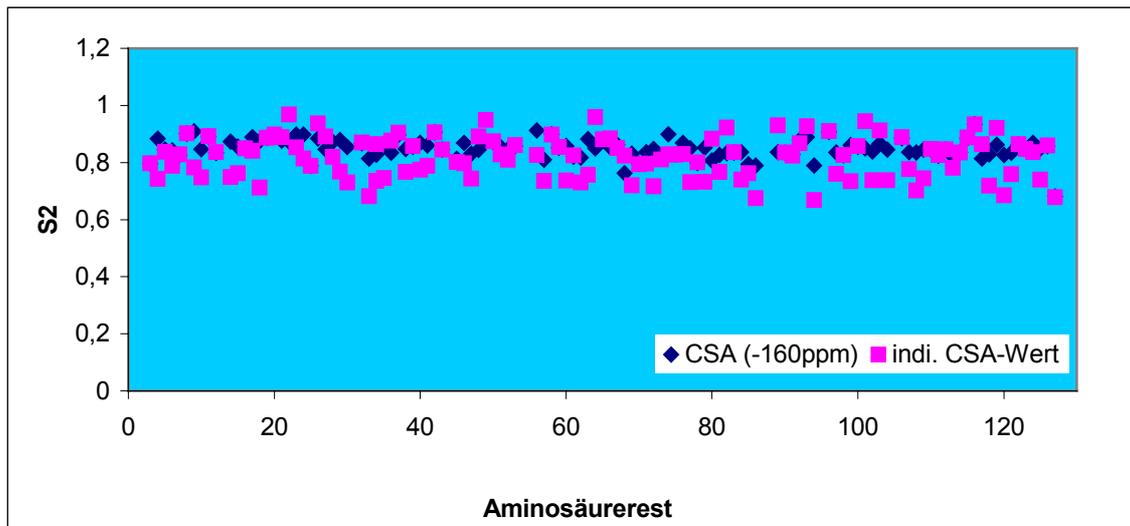


Abb. 5.20: Unterschiede der mikrodynamischen Parameter S^2 im ILBP (holo-Form), wenn S^2 mit einer CSA-Konstante (-160 ppm) - blaue Symbole- oder mit der für jede Aminosäure individuellen CSA-Konstante –pinkfarbene Symbole- berechnet wird.

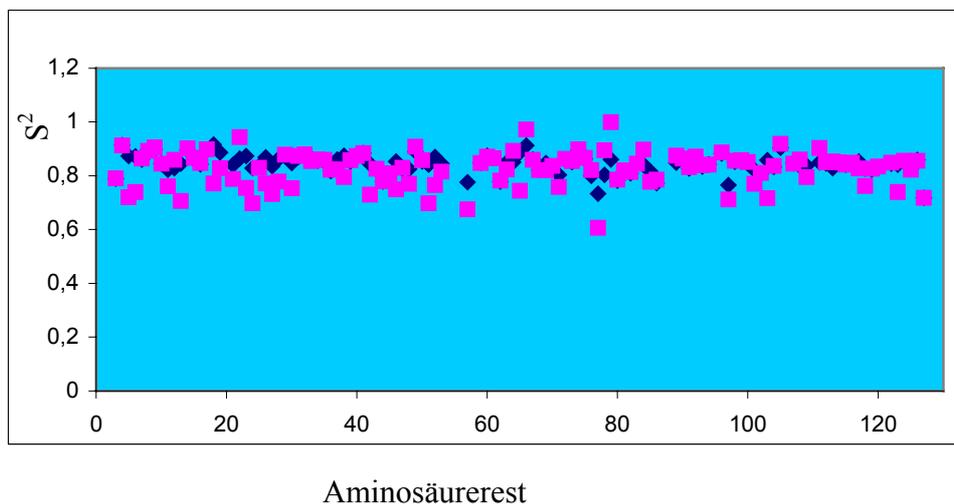


Abb. 5.21: Die mikrodynamischen Parameter S^2 für ILBP (apo-Form) mit einer CSA-Konstante (-160 ppm) – blaue Symbole- und mit der für jede Aminosäure eigenen CSA-Konstante –pinkfarbene Symbole-.

In Abbildung 5.22 sind die mikrodynamischen Parameter S^2 für ILBP (apo- und holo-Form) nach dem Einsatz der für jeden Aminosäurerest individuellen CSA-Konstante gut unterscheidbar.

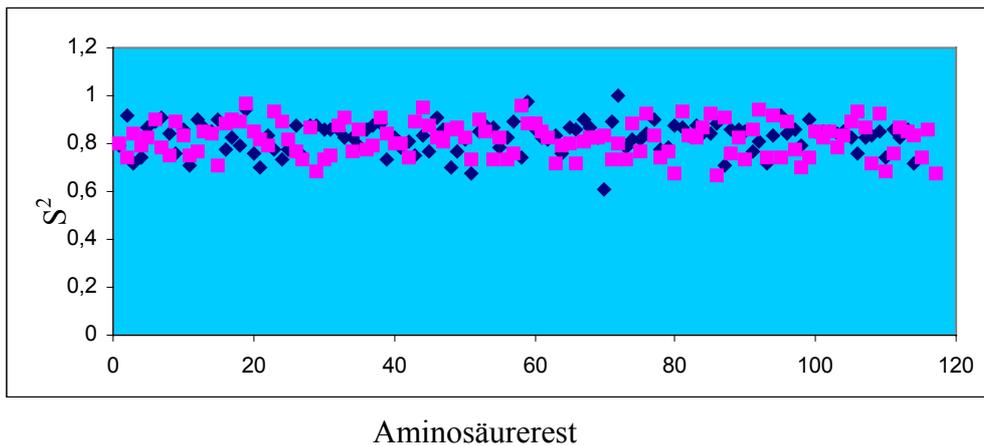


Abb. 5.22: Die mikrodynamischen Parameter S^2 in Abhängigkeit der Sequenz der beiden Human-ILBP (apo- und holo-Form) berechnet mit individuellen $\Delta\sigma_N$ -Werten. Der Unterschied zwischen den beiden Datenserien ist offensichtlich auf Unterschiede in der Dynamik der Struktur zurückzuführen. Pinkfarbige Symbole: ILBP (apo-Form), blaue Symbole: ILBP (holo-Form).

Für die RNase T₁ ergibt sich, dass S^2 -Werte, die mit den individuellen $\Delta\sigma_N$ -Werten berechnet wurden, eine interessante Dynamik der Struktur wiedergeben (Abb. 5.23). Für eine längere Schleifenregion wurde so eine hohe Dynamik der Struktur ermittelt in Übereinstimmung mit einer MD-Simulation¹⁵³. Dieses Verhalten war bei der Verwendung von einem CSA-Wert von -160 ppm in dem Model-Free- Approach nicht zu erkennen.

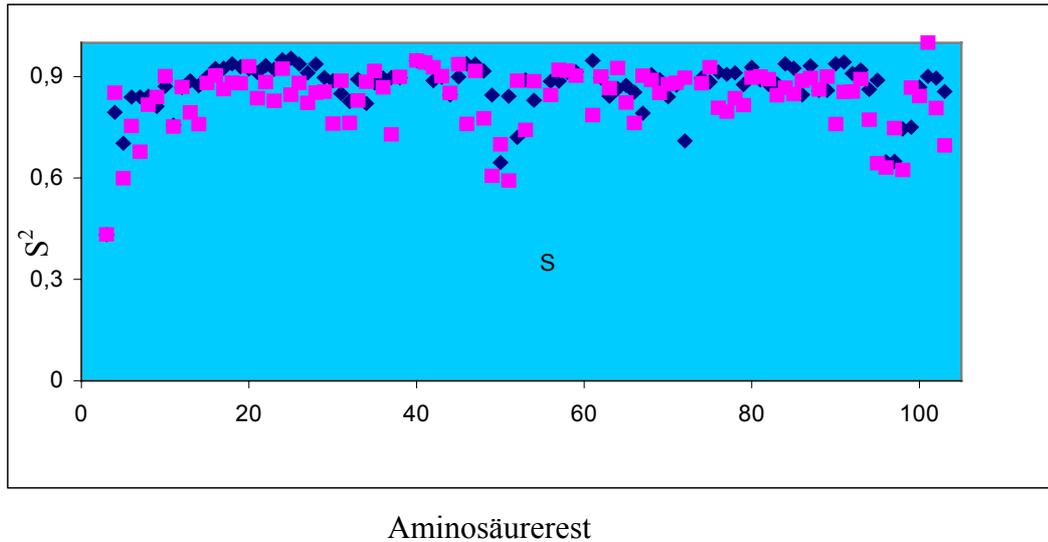


Abb. 5.23: Ordnungsparameter S^2 der RnaseT₁, die mit einer einheitlichen CSA-Konstanten (–160 ppm) (blau) und mit der für jede Aminosäure eigenen CSA-Konstante (pink) berechnet wurde.

5.4 Austauschparameter

Um einen Gesamteindruck von der Dynamik des ILBP (apo- und holo-Form) zu erhalten, sollen an dieser Stelle die dynamischen Effekte der Mikro- und Millisekunden Zeitskala nur kurz diskutiert werden, da die mittels der CPMG-Pulssequenz erhaltenen Relaxationsraten noch nicht vollständig ausgewertet wurden. Es ist aus vielen Studien bekannt, daß die Bindung zwischen Ligand und Protein zu einer Reduzierung der Flexibilität der Struktur führen kann.

Es stellt sich die Frage, ob dieses Ergebnis für alle beobachtbaren dynamischen Zeitskalen zutrifft oder nicht. Bei den sehr schnellen dynamischen Vorgängen – ps bis ns-Bereich - trifft dies zu (siehe Abschnitt 5.3), wo gezeigt wurde, dass Unterschiede in den mikrodynamischen Parametern S^2 beobachtet wurden. In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, dass die Aminosäuren, welche eine wichtige Rolle bei der Bindung des Liganden spielen, einem ausgeprägt langsamen chemischen Austausch der N-H-Protonen unterworfen sind. Es wurde festgestellt, daß etwa die Hälfte der Aminosäuren der Helix-II des ILBP (apo-Form) als Teil

des Eingangsportals nach der Bindung mit einer Gallensäure aufgrund dynamischer Effekte langsameren Austauschprozessen unterliegt. Alle Aminosäurereste, die nach dem CPMG-Experiment chemischen Austausch erfahren, sind den Regionen, in denen chemischen Austausch an Hand der Relaxationsraten vorhergesagt wurden, zu zuordnen. Alle markierten Aminosäuren sind in der Bindungstasche lokalisiert. Die Ordnungsparameter sind in der Portalregion (Helix-II) relativ niedrig und zeigen eine wesentlich größere Beweglichkeit in diesem Bereich als im Rest des Proteins.

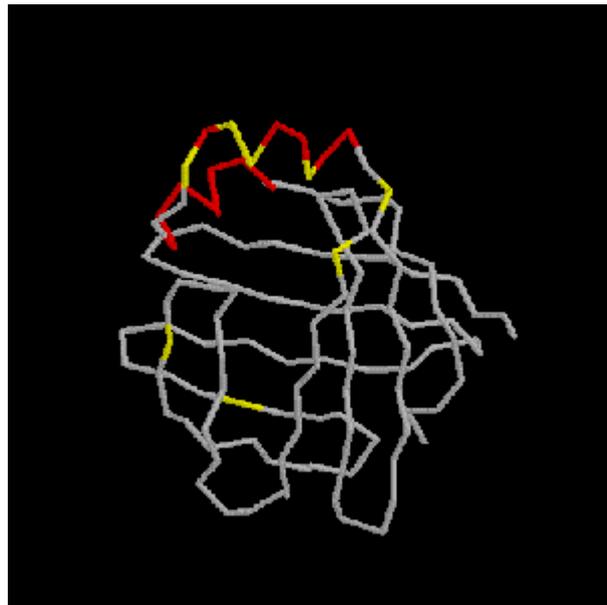


Abb. 5.24: Graphische Darstellung des ILBP (Apo-Form) mit solchen Aminosäuren, deren N-H-Protonen mit H₂O-Protonen austauschen. Alle markierten Aminosäuren, die diesem Effekt unterliegen sind, liegen entweder in Helix II oder sind in der Nähe der Bindungstasche lokalisiert.

7 Zusammenfassung

Die Messung von heteronuklearen ^{15}N -Relaxationszeiten (Longitudinale, transversale sowie heteronukleare NOE) bei verschiedenen Magnetfeldstärken (500, 600 und 800 MHz ^1H Larmorfrequenz) ergeben Informationen über interne dynamische Prozesse in Biomolekülen. Diese verschiedenen Relaxationsraten sind voneinander abhängig und über die spektrale Leistungsdichtefunktion miteinander gekoppelt. Die mikrodynamischen Parameter des NH-Peptidrückgratvektors (der Ordnungsparameter S^2 und die effektive interne Korrelationszeit τ_c) sowie der Beitrag des konformationellen Austausches zur transversalen Relaxationsrate der Austauschparameter R_{ex} wurden für einige Proteine errechnet und angepaßt.

Das Human ILBP gehört zur Familie der intrazellulären Lipidbindungsproteine (LBP), die in der Lage sind, Fett- und Gallensäuren spezifisch zu binden und in Cytosol zu transportieren. Viele verschiedene Typen von LBPs sind bis heute identifiziert worden. Diese Proteine enthalten 127 – 135 Aminosäurereste und werden nach dem Gewebe benannt, aus dem sie isoliert wurden.

Human-ILBP enthält 127 Aminosäurereste und besteht hauptsächlich aus 10 antiparallelen β -Faltblattsträngen, die eine β -Fasstruktur mit einer großen Bindungstasche bilden, und zwei α -Helices. ILBP hat die Tendenz, Gallensäuren oder Fettsäuren zu binden. Diese geringe Tendenz zur liganden Spezifität ist entweder in der Struktur oder in seiner Dynamik begründet. Aus diesem Grund kann die Untersuchung der Dynamik des Human ILBP (apo- und holo-Form) in zwei Zeitfenstern zum besseren Verständnis der Funktion führen.

Für die nicht-terminalen Peptidrückgratgruppen wurde ein S^2 -Parameter $> 0,8$ mit einen Durchschnitt von 0,88 beobachtet, was auf eine niedrige Mobilität im ganzen Protein in einem Nano- zu Picosekunden-Zeitfenster deutet, wobei eine Korrelationszeit von $\tau_c = 6.25$ ns für ILBP (apo-form) und $\tau_c = 6.10$ ns für ILBP (holo-Form) beobachtet wurde. Apo- und holo-Form (mit Taurocholat als Ligand) zeigen eine ähnliche Dynamik in diesem Zeitfenster.

Überdurchschnittliche S^2 -Werte der α -Helix I deuten eine geringe Flexibilität des Peptidrückgrats an, während α -Helix II als Teil der Portalregion eine höhere Beweglichkeit zeigt. Austauschparameter R_{ex} wurden hauptsächlich in den Regionen der Ligandenbindung nachgewiesen.

Die hier beschriebenen Eigenschaften unterscheiden sich von denen des H-FABP und des E-FABP. Offensichtlich unterscheiden sich verschiedene Mitglieder der LBP-Familie wie ILBP (Human oder Schwein), H-FABP und E-FABP in der Funktion und Dynamik des Peptidrückgrats.

In der vorliegenden Arbeit wurden die transversalen ^{15}N CSA/DD-kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten bestimmt. Für die Bestimmung der Anisotropie des chemischen Verschiebungstensors wurde das Verhältnis zwischen den Auto- und Kreuzrelaxationsraten in Abhängigkeit von der magnetischen Feldstärke genutzt, wobei es möglich war, die Orientierung und Größe des CSA-Tensors einzelner Aminosäurereste zu bestimmen. Bei dieser Methode (wie auch in vielen anderen Studien gezeigt) wurde keine Korrelation zwischen der Sekundärstruktur des Proteins und den ^{15}N CSA-Werten festgestellt.

Zum Vergleich der CSA-Konstanten der ILBP-Spezies wurden die entsprechenden Parameter der R_{NaseT_1} gemessen. Alle Daten wurden im Hinblick auf strukturelle Details kritisch diskutiert.

9 Anhang

Tab. 9.1: Relaxationsraten von Human-ILBP (holo-Form) bei drei verschiedenen Magnetfeldstärken (500, 600 und 800 MHz). Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 305 K durchgeführt.

AS		$R_1 \pm \sigma$ [s ⁻¹]						$R_2 \pm \sigma$ [s ⁻¹]					
		500		600		800		500		600		800	
		[MHz]											
THR	3	1,929	0,025	1,642	0,011	1,207	0,017	6,959	0,081	7,102	0,123	8,787	0,538
GLY	4	2,225	0,019	1,802	0,009	1,327	0,029	8,243	0,143	7,904	0,084	9,709	0,293
LYS	5	2,152	0,034	1,729	0,015	1,214	0,017	7,949	0,138	7,622	0,075	9,398	0,196
PHE	6	2,124	0,028	1,724	0,026	1,233	0,026	7,693	0,173	7,599	0,117	9,056	0,357
GLU	7	2,118	0,018	1,692	0,019	1,196	0,012	7,453	0,144	7,615	0,139	9,583	0,151
MET	8	2,277	0,031	1,839	0,02	1,349	0,026	7,914	0,174	8,017	0,131	9,743	0,128
GLU	9	2,225	0,004	1,816	0,038	1,268	0,046	8,377	0,156	8,215	0,272	10,36	0,286
SER	10	2,145	0,024	1,735	0,015	1,243	0,014	7,959	0,114	7,939	0,056	9,843	0,117
GLU	11	2,178	0,033	1,848	0,022	1,338	0,031	9,743	0,338	10,04	0,132	13,58	0,402
LYS	12	2,093	0,021	1,702	0,013	1,231	0,019	8,679	0,177	8,427	0,151	10,56	0,196
ASN	13	2,341	0,098	1,955	0,064	1,378	0,081	8,792	0,394	8,854	0,518	10,41	0,411
TYR	14	2,187	0,024	1,797	0,019	1,303	0,029	8,499	0,123	8,288	0,115	10,75	0,163
ASP	15	2,155	0,024	1,756	0,017	1,256	0,021	8,088	0,106	8,012	0,132	10,22	0,067
GLU	16	2,163	0,026	1,708	0,011	1,263	0,011	7,728	0,127	7,395	0,106	9,319	0,214
PHE	17	2,248	0,018	1,785	0,02	1,327	0,016	8,758	0,091	8,255	0,171	10,93	0,224
MET	18	2,215	0,021	1,797	0,018	1,285	0,013	8,146	0,141	7,896	0,064	9,631	0,116
LYS	19	2,211	0,015	1,805	0,018	1,325	0,009	8,291	0,209	8,171	0,094	10,09	0,244
LEU	20	2,211	0,023	1,793	0,015	1,341	0,017	8,221	0,073	7,843	0,139	9,411	0,522
LEU	21	2,163	0,024	1,773	0,014	1,283	0,013	8,231	0,144	8,053	0,133	9,879	0,236
GLY	22	2,161	0,029	1,778	0,011	1,332	0,031	8,183	0,095	7,991	0,091	9,992	0,237
ILE	23	2,201	0,037	1,789	0,014	1,351	0,014	8,091	0,096	7,765	0,296	9,767	0,193
SER	24	2,251	0,033	1,851	0,029	1,388	0,038	7,894	0,146	7,385	0,211	9,941	0,235
SER	25	2,078	0,189	1,633	0,114	1,095	0,097	7,088	1,305	7,179	0,481	8,181	1,237
ASP	26	2,231	0,037	1,811	0,017	1,292	0,019	8,483	0,186	8,212	0,102	10,75	0,249
VAL	27	2,123	0,016	1,721	0,022	1,254	0,011	7,898	0,176	7,651	0,111	9,238	0,483
ILE	28	2,192	0,028	1,781	0,012	1,261	0,033	8,225	0,113	8,218	0,121	10,32	0,253
GLU	29	2,163	0,018	1,775	0,017	1,277	0,013	8,285	0,082	8,024	0,058	10,31	0,237
LYS	30	2,145	0,021	1,746	0,008	1,229	0,017	8,329	0,164	8,094	0,091	10,35	0,195
ALA	31	2,219	0,029	1,824	0,019	1,292	0,019	8,501	0,197	8,199	0,097	10,75	0,249
ARG	32	2,188	0,044	1,761	0,014	1,282	0,021	8,905	0,127	9,102	0,274	11,88	0,192
ASN	33	2,058	0,051	1,676	0,022	1,132	0,021	8,683	0,183	8,378	0,486	9,488	0,313
PHE	34	2,031	0,021	1,701	0,026	1,251	0,012	7,588	0,208	7,426	0,233	9,575	0,067
LYS	35	2,111	0,049	1,752	0,036	1,321	0,027	7,848	0,651	7,737	0,525	9,993	0,225
ILE	36	2,109	0,042	1,691	0,018	1,173	0,031	7,775	0,171	7,403	0,201	9,088	0,316
VAL	37	2,251	0,025	1,851	0,022	1,325	0,033	8,421	0,351	8,132	0,137	10,04	0,431
THR	38	2,181	0,034	1,734	0,017	1,227	0,025	7,755	0,108	7,363	0,106	9,549	0,337
GLU	39	2,167	0,003	1,765	0,029	1,254	0,026	7,721	0,181	8,086	0,171	10,17	0,228
VAL	40	2,213	0,021	1,761	0,022	1,288	0,031	7,627	0,111	7,857	0,272	9,421	0,354
GLN	41	2,133	0,029	1,721	0,021	1,267	0,021	8,002	0,138	7,651	0,335	9,622	0,289
GLN	42	2,263	0,051	1,844	0,037	1,389	0,036	7,715	0,291	8,225	0,215	9,498	0,245
ASP	43	1,981	0,141	1,726	0,039	1,213	0,021	7,211	0,436	7,963	0,161	8,833	0,218
GLN	45	2,006	0,093	1,674	0,066	1,202	0,068	7,571	0,318	7,282	0,196	9,075	0,695
ASP	46	2,212	0,039	1,764	0,024	1,276	0,014	8,351	0,166	8,234	0,086	10,05	0,063
PHE	47	2,131	0,052	1,713	0,019	1,203	0,022	7,684	0,177	7,661	0,097	9,446	0,038
THR	48	2,095	0,053	1,679	0,024	1,207	0,019	7,882	0,102	7,558	0,145	8,763	0,242
TRP	49	2,209	0,032	1,777	0,011	1,271	0,024	7,856	0,245	8,026	0,089	9,551	0,441
SER	50	2,214	0,032	1,767	0,029	1,288	0,031	8,207	0,348	8,205	0,262	9,911	0,139
GLN	51	2,163	0,019	1,716	0,022	1,227	0,041	7,781	0,143	7,826	0,125	9,158	0,171
HIS	52	2,132	0,039	1,754	0,018	1,207	0,031	7,601	0,226	7,522	0,131	8,695	0,438
TYR	53	2,151	0,031	1,759	0,016	1,288	0,023	7,793	0,118	7,744	0,068	9,453	0,117
SER	54	2,222	0,092	1,766	0,049	1,265	0,041	8,204	0,371	8,663	0,171	11,07	0,268

GLY	56	2,301	0,099	1,924	0,066	1,425	0,076	7,693	0,478	7,808	0,307	10,67	0,772
HIS	57	2,019	0,041	1,655	0,022	1,201	0,031	8,081	0,278	8,318	0,351	10,49	0,462
THR	58	2,221	0,113	1,844	0,073	1,345	0,087	8,256	0,416	7,927	0,273	9,795	0,429
MET	59	2,106	0,033	1,761	0,021	1,246	0,022	7,665	0,141	7,551	0,205	9,288	0,316
THR	60	2,157	0,022	1,753	0,014	1,288	0,023	7,744	0,082	7,743	0,057	9,421	0,171
ASN	61	2,095	0,015	1,712	0,017	1,173	0,021	7,968	0,352	7,524	0,22	8,973	0,298
LYS	62	2,014	0,037	1,625	0,011	1,188	0,026	7,609	0,065	7,365	0,288	8,541	0,218
PHE	63	2,209	0,021	1,81	0,019	1,285	0,011	8,231	0,078	7,896	0,064	9,371	0,361
THR	64	2,148	0,037	1,711	0,017	1,237	0,015	8,021	0,169	7,752	0,08	9,137	0,216
VAL	65	2,218	0,029	1,785	0,023	1,312	0,022	7,749	0,191	7,618	0,239	9,595	0,168
GLY	66	2,161	0,034	1,731	0,02	1,256	0,024	8,213	0,155	8,154	0,154	9,889	0,147
LYS	67	2,081	0,027	1,766	0,013	1,287	0,018	8,111	0,289	8,198	0,419	9,479	0,492
GLU	68	1,948	0,141	1,559	0,086	1,213	0,137	7,661	0,848	6,244	0,454	8,388	0,621
SER	69	2,136	0,038	1,665	0,017	1,205	0,021	7,529	0,091	7,397	0,247	8,935	0,439
ASN	70	2,024	0,135	1,692	0,061	1,211	0,073	7,581	0,391	7,179	0,083	8,975	0,277
ILE	71	2,102	0,034	1,685	0,016	1,195	0,029	7,525	0,061	7,404	0,186	8,911	0,511
GLN	72	2,091	0,066	1,718	0,013	1,231	0,024	7,929	0,186	7,953	0,291	9,278	0,491
THR	73	2,082	0,019	1,676	0,016	1,213	0,017	7,252	0,127	7,242	0,074	8,842	0,306
MET	74	2,212	0,017	1,855	0,01	1,379	0,021	8,065	0,134	7,638	0,143	9,509	0,123
GLY	75	2,281	0,072	1,911	0,067	1,449	0,058	7,561	0,268	7,161	0,113	9,033	0,577
GLY	76	2,178	0,022	1,814	0,016	1,371	0,029	7,391	0,455	7,394	0,121	9,107	0,221
LYS	77	2,072	0,026	1,692	0,034	1,299	0,014	7,631	0,101	7,902	0,188	9,545	0,175
THR	78	1,953	0,031	1,646	0,016	1,264	0,029	7,994	0,139	7,977	0,085	10,34	0,116
PHE	79	2,166	0,059	1,771	0,02	1,243	0,028	7,862	0,136	7,776	0,077	9,789	0,096
LYS	80	1,989	0,026	1,639	0,01	1,189	0,011	7,591	0,186	7,343	0,161	8,658	0,358
ALA	81	2,069	0,018	1,702	0,012	1,202	0,015	7,439	0,121	7,421	0,195	9,011	0,173
THR	82	2,091	0,084	1,726	0,043	1,301	0,052	8,069	0,356	7,457	0,086	9,358	0,247
VAL	83	2,131	0,013	1,703	0,023	1,207	0,024	8,153	0,341	7,267	0,116	9,031	0,199
GLN	84	2,091	0,025	1,696	0,022	1,244	0,016	8,641	0,478	8,045	0,331	9,639	0,228
MET	85	2,019	0,014	1,629	0,013	1,105	0,021	7,761	0,135	7,494	0,092	9,082	0,073
GLU	86	1,982	0,024	1,638	0,017	1,121	0,029	6,935	0,135	6,942	0,221	8,286	0,166
LYS	89	2,098	0,032	1,727	0,021	1,233	0,031	7,566	0,134	7,291	0,113	9,331	0,247
LEU	90	2,081	0,055	1,718	0,024	1,289	0,035	7,286	0,16	7,298	0,147	9,211	0,291
VAL	91	2,067	0,028	1,688	0,022	1,222	0,021	8,515	0,195	8,072	0,213	9,664	0,163
VAL	92	2,187	0,026	1,784	0,013	1,299	0,014	8,856	0,148	8,529	0,136	10,45	0,182
ASN	93	2,182	0,038	1,773	0,032	1,295	0,031	8,316	0,125	8,001	0,095	9,764	0,211
PHE	94	1,942	0,034	1,572	0,018	1,172	0,013	7,172	0,138	7,353	0,162	8,417	0,176
ASN	96	2,256	0,084	1,911	0,081	1,325	0,067	2,902	0,64	14,67	0,461	21,64	1,701
TYR	97	2,074	0,021	1,679	0,023	1,241	0,024	8,107	0,166	8,151	0,326	9,384	0,358
HIS	98	2,123	0,028	1,676	0,017	1,162	0,026	8,324	0,182	8,039	0,221	10,65	0,428
GLN	99	2,121	0,026	1,739	0,018	1,277	0,025	8,617	0,167	8,287	0,161	10,61	0,223
THR	100	2,131	0,034	1,738	0,022	1,226	0,021	8,294	0,339	8,232	0,168	9,798	0,639
SER	101	2,159	0,023	1,649	0,026	1,275	0,013	7,729	0,13	7,409	0,099	9,313	0,155
GLU	102	2,171	0,027	1,698	0,011	1,204	0,021	8,141	0,234	8,111	0,105	9,975	0,068
ILE	103	2,061	0,028	1,782	0,012	1,328	0,023	8,077	0,285	7,755	0,426	9,318	0,571
VAL	104	2,119	0,029	1,733	0,019	1,218	0,023	8,501	1,103	7,705	0,211	9,294	0,522
ASP	106	2,123	0,092	1,826	0,046	1,332	0,064	3,274	0,625	14,79	0,352	22,07	1,141
LYS	107	2,114	0,021	1,723	0,011	1,251	0,011	7,138	0,08	7,091	0,142	8,431	0,285
LEU	108	2,101	0,028	1,732	0,018	1,176	0,021	7,874	0,139	7,777	0,183	9,671	0,174
VAL	109	2,146	0,037	1,706	0,027	1,229	0,024	8,586	0,146	8,051	0,223	10,45	0,229
GLU	110	2,172	0,023	1,685	0,028	1,212	0,039	8,148	0,36	8,371	0,208	10,19	0,275
VAL	111	2,106	0,047	1,708	0,021	1,146	0,023	7,988	0,223	8,095	0,095	10,24	0,296
SER	112	2,158	0,034	1,722	0,023	1,186	0,031	8,563	0,149	8,402	0,167	11,18	0,611
THR	113	2,076	0,035	1,683	0,025	1,183	0,019	8,282	0,198	7,934	0,099	9,752	0,295
ILE	114	2,141	0,026	1,714	0,019	1,179	0,028	8,023	0,17	7,611	0,093	9,491	0,193
GLY	115	2,203	0,056	1,786	0,054	1,355	0,038	8,001	0,275	7,836	0,237	9,732	0,342
GLY	116	2,095	0,168	1,882	0,079	1,354	0,098	8,064	0,642	8,724	0,502	10,94	0,646
VAL	117	2,077	0,084	1,647	0,02	1,178	0,016	7,377	0,38	7,645	0,157	9,113	0,583
THR	118	2,115	0,021	1,711	0,01	1,191	0,016	7,272	0,121	7,377	0,071	8,959	0,076
TYR	119	2,111	0,019	1,717	0,023	1,251	0,048	7,818	0,181	8,126	0,173	10,01	0,475
GLU	120	2,098	0,025	1,684	0,019	1,204	0,009	8,674	0,301	8,591	0,204	10,72	0,251
ARG	121	2,111	0,016	1,699	0,017	1,222	0,053	8,294	0,081	8,324	0,102	10,53	0,234
VAL	122	2,127	0,097	1,655	0,052	1,254	0,022	8,389	0,328	7,885	0,244	10,27	0,529
SER	123	2,106	0,032	1,707	0,013	1,199	0,021	7,892	0,119	7,857	0,129	9,458	0,231
LYS	124	2,141	0,035	1,759	0,017	1,192	0,068	8,036	0,205	7,987	0,143	9,792	0,226
ARG	125	2,071	0,045	1,758	0,023	1,456	0,044	7,579	0,144	7,155	0,156	9,216	0,295

LEU 126	2,159	0,019	1,789	0,028	1,281	0,038	7,563	0,181	7,861	0,321	9,648	0,253
ALA 127	2,082	0,031	1,678	0,058	1,243	0,026	5,224	0,135	5,388	0,151	6,413	0,088

AS	$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{-NOE} \pm \sigma$						AS	$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{-NOE} \pm \sigma$					
	500	600	800	500	600	800		500	600	800	500	600	800
	[MHz]							[MHz]					
THR 3	0,681	0,03	0,713	0,03	0,888	0,03	ASN 61	0,764	0,03	0,824	0,06	0,968	0,03
GLY 4	0,732	0,03	0,817	0,06	0,966	0,03	LYS 62	0,761	0,03	0,808	0,06	0,995	0,03
LYS 5	0,767	0,03	0,847	0,06	0,995	0,03	PHE 63	0,765	0,03	0,831	0,06	0,972	0,03
PHE 6	0,737	0,03	0,806	0,06	0,981	0,03	THR 64	0,739	0,03	0,825	0,06	0,979	0,03
GLU 7	0,785	0,03	0,815	0,06	0,974	0,03	VAL 65	0,794	0,03	0,844	0,06	0,932	0,03
MET 8	0,788	0,03	0,803	0,06	0,941	0,03	GLY 66	0,755	0,03	0,829	0,06	0,985	0,03
GLU 9	0,801	0,03	0,816	0,06	0,951	0,03	LYS 67	0,802	0,03	0,841	0,06	0,927	0,03
SER 10	0,753	0,03	0,822	0,06	0,993	0,03	GLU 68	0,826	0,03	0,862	0,06	0,991	0,03
GLU 11	0,813	0,03	0,839	0,03	0,978	0,03	SER 69	0,737	0,03	0,801	0,06	0,967	0,03
LYS 12	0,777	0,03	0,825	0,06	0,991	0,03	ASN 70	0,754	0,03	0,802	0,06	0,973	0,03
ASN 13	0,854	0,03	0,858	0,06	0,882	0,03	ILE 71	0,767	0,03	0,806	0,06	0,978	0,03
TYR 14	0,764	0,03	0,836	0,06	0,935	0,03	GLN 72	0,777	0,03	0,823	0,06	0,876	0,03
ASP 15	0,792	0,03	0,834	0,06	0,941	0,03	THR 73	0,713	0,03	0,798	0,06	0,978	0,03
GLU 16	0,779	0,03	0,817	0,06	0,957	0,03	MET 74	0,728	0,03	0,783	0,06	0,978	0,03
PHE 17	0,775	0,03	0,783	0,06	0,965	0,03	GLY 75	0,669	0,03	0,746	0,06	0,932	0,03
MET 18	0,765	0,03	0,831	0,06	0,972	0,03	GLY 76	0,716	0,03	0,797	0,06	0,981	0,03
LYS 19	0,785	0,03	0,795	0,06	0,973	0,03	LYS 77	0,688	0,03	0,749	0,06	0,911	0,03
LEU 20	0,703	0,03	0,802	0,06	0,928	0,03	THR 78	0,644	0,03	0,719	0,06	0,918	0,03
LEU 21	0,728	0,03	0,771	0,06	0,998	0,03	PHE 79	0,768	0,03	0,792	0,06	0,886	0,03
GLY 22	0,722	0,03	0,779	0,06	0,995	0,03	LYS 80	0,751	0,03	0,795	0,06	0,955	0,03
ILE 23	0,761	0,03	0,807	0,06	0,972	0,03	ALA 81	0,769	0,03	0,799	0,06	0,961	0,03
SER 24	0,749	0,03	0,828	0,06	0,978	0,03	THR 82	0,764	0,03	0,806	0,06	0,973	0,03
SER 25	0,491	0,03	0,799	0,06	0,959	0,03	VAL 83	0,781	0,03	0,823	0,06	0,914	0,03
ASP 26	0,731	0,03	0,819	0,06	0,978	0,03	GLN 84	0,766	0,03	0,811	0,06	0,942	0,03
VAL 27	0,754	0,03	0,809	0,06	0,999	0,03	MET 85	0,764	0,03	0,795	0,06	0,962	0,03
ILE 28	0,738	0,03	0,841	0,06	0,972	0,03	GLU 86	0,663	0,03	0,732	0,06	0,875	0,03
GLU 29	0,735	0,03	0,835	0,06	0,952	0,03	LYS 89	0,676	0,03	0,771	0,06	0,927	0,03
LYS 30	0,716	0,03	0,788	0,06	0,927	0,03	LEU 90	0,748	0,03	0,825	0,06	0,967	0,03
ALA 31	0,736	0,03	0,824	0,06	0,973	0,03	VAL 91	0,741	0,03	0,839	0,06	0,972	0,03
ARG 32	0,761	0,03	0,832	0,06	0,998	0,03	VAL 92	0,758	0,03	0,819	0,06	0,948	0,03
ASN 33	0,653	0,03	0,801	0,06	0,975	0,03	ASN 93	0,749	0,03	0,819	0,06	0,989	0,03
PHE 34	0,721	0,03	0,831	0,06	0,982	0,03	PHE 94	0,745	0,03	0,776	0,06	0,967	0,03
LYS 35	0,771	0,03	0,807	0,06	0,974	0,03	ASN 96	0,737	0,03	0,734	0,03	0,896	0,03
ILE 36	0,743	0,03	0,789	0,06	0,932	0,03	TYR 97	0,785	0,03	0,811	0,06	0,966	0,03
VAL 37	0,793	0,03	0,826	0,06	0,986	0,03	HIS 98	0,759	0,03	0,826	0,06	0,958	0,03
THR 38	0,779	0,03	0,807	0,06	0,931	0,03	GLN 99	0,771	0,03	0,826	0,06	0,996	0,03
GLU 39	0,746	0,03	0,801	0,06	0,949	0,03	THR 100	0,788	0,03	0,841	0,06	0,959	0,03
VAL 40	0,766	0,03	0,837	0,06	0,885	0,03	SER 101	0,676	0,03	0,782	0,06	0,948	0,03
GLN 41	0,751	0,03	0,803	0,06	0,911	0,03	GLU 102	0,776	0,03	0,844	0,06	0,871	0,03
GLN 42	0,748	0,03	0,845	0,06	0,992	0,03	ILE 103	0,764	0,03	0,807	0,06	0,989	0,03
ASP 43	0,791	0,03	0,839	0,06	0,961	0,03	VAL 104	0,726	0,03	0,821	0,06	0,942	0,03
GLN 45	0,724	0,03	0,844	0,06	0,936	0,03	ASP 106	0,702	0,03	0,818	0,03	0,956	0,03
ASP 46	0,775	0,03	0,821	0,06	0,921	0,03	LYS 107	0,717	0,03	0,782	0,06	0,943	0,03
PHE 47	0,757	0,03	0,819	0,06	0,944	0,03	LEU 108	0,765	0,03	0,822	0,06	0,911	0,03
THR 48	0,726	0,03	0,784	0,06	0,965	0,03	VAL 109	0,788	0,03	0,924	0,06	0,981	0,03
TRP 49	0,768	0,03	0,815	0,06	0,958	0,03	GLU 110	0,766	0,03	0,821	0,06	0,853	0,03
SER 50	0,769	0,03	0,829	0,06	0,774	0,03	VAL 111	0,768	0,03	0,823	0,06	0,939	0,03
GLN 51	0,836	0,03	0,845	0,06	0,969	0,03	SER 112	0,764	0,03	0,822	0,06	0,911	0,03
HIS 52	0,734	0,03	0,831	0,06	0,981	0,03	THR 113	0,758	0,03	0,858	0,06	0,981	0,03
TYR 53	0,759	0,03	0,831	0,06	0,993	0,03	ILE 114	0,771	0,03	0,831	0,06	0,973	0,03
SER 54	0,748	0,03	0,826	0,06	0,968	0,03	GLY 115	0,733	0,03	0,821	0,06	0,957	0,03
GLY 56	0,757	0,03	0,878	0,06	0,975	0,03	GLY 116	0,816	0,03	0,846	0,06	0,953	0,03
HIS 57	0,761	0,03	0,817	0,06	0,996	0,03	VAL 117	0,712	0,03	0,819	0,06	0,959	0,03

THR 58	0,765	0,03	0,832	0,06	0,948	0,03	THR 118	0,737	0,03	0,812	0,06	0,981	0,03
MET 59	0,776	0,03	0,811	0,06	0,961	0,03	TYR 119	0,793	0,03	0,816	0,06	0,974	0,03
THR 60	0,767	0,03	0,841	0,06	0,963	0,03	GLU 120	0,784	0,03	0,801	0,06	0,999	0,03

ARG 121	0,771	0,03	0,843	0,06	0,993	0,03
SER 123	0,757	0,03	0,809	0,06	0,991	0,03
LYS 124	0,796	0,03	0,799	0,06	0,914	0,03
ARG 125	0,673	0,03	0,737	0,06	0,974	0,03
LEU 126	0,754	0,03	0,828	0,06	0,911	0,03
ALA 127	0,641	0,03	0,713	0,06	0,913	0,03

Tabelle9.2: Transversale ^{15}N CSA/DD –kreuzkorrelierte Kreuzkorrelationsraten, gemessen bei drei Feldern (500, 600 und 800 MHz) holo-Form.

AS		$\eta[\text{s}^{-1}] \pm \sigma$						AS		$\eta[\text{s}^{-1}] \pm \sigma$					
		[500		600		800]				[500		600		800]	
GLY 4	4,957	0,199	5,042	0,123	9,709	0,293	THR 64	4,165	0,11	5,419	0,135	9,137	0,216		
LYS 5	4,757	0,326	5,492	0,085	9,398	0,196	VAL 65	5,646	0,117	6,271	0,253	9,595	0,168		
PHE 6	4,729	0,174	5,022	0,11	9,056	0,357	GLY 66	4,928	0,178	6,063	0,374	9,889	0,147		
GLU 7	5,417	0,134	5,335	0,344	9,583	0,151	LYS 67	5,478	0,242	6,457	1,298	9,479	0,492		
MET 8	5,509	0,146	5,685	0,451	9,743	0,128	GLU 68	2,628	0,693	5,575	0,596	8,388	0,621		
GLU 9	5,172	0,131	6,271	0,242	10,36	0,286	SER 69	4,779	0,147	5,334	1,04	8,935	0,439		
SER 10	5,048	0,145	5,602	0,347	9,843	0,117	ASN 70	4,114	0,702	4,541	0,298	8,975	0,277		
LYS 12	4,625	0,228	5,41	0,247	10,56	0,196	ILE 71	4,541	0,232	5,207	0,194	8,91	0,511		
ASN 13	4,165	0,47	6,476	4,683	10,41	0,411	GLN 72	5,525	0,111	5,729	0,083	9,278	0,491		
TYR 14	5,133	0,154	5,672	0,418	10,75	0,163	THR 73	4,489	0,171	5,053	0,442	8,842	0,306		
ASP 15	4,836	0,134	5,411	0,34	10,21	0,067	MET 74	4,967	0,063	5,083	0,219	9,509	0,123		
GLU 16	5,033	0,292	5,737	0,375	9,319	0,214	GLY 75	3,655	0,741	4,026	0,554	9,033	0,577		
PHE 17	5,188	0,22	6,273	0,282	10,93	0,224	GLY 76	4,497	0,356	4,898	0,155	9,107	0,22		
MET 18	5,439	0,107	5,488	0,152	9,63	0,116	LYS 77	4,678	0,282	5,654	0,133	9,545	0,175		
LYS 19	5,282	0,128	5,848	0,154	10,09	0,244	THR 78	4,228	0,148	4,786	0,155	10,34	0,116		
LEU 20	5,187	0,09	5,473	0,23	9,411	0,522	PHE 79	5,258	0,057	5,756	0,188	9,789	0,096		
LEU 21	4,792	0,097	5,607	0,216	9,879	0,236	LYS 80	4,491	0,08	5,38	0,116	8,658	0,358		
GLY 22	4,713	0,517	5,868	0,293	9,992	0,237	ALA 81	4,866	0,138	5,392	0,469	9	0,173		
ILE 23	5,01	0,127	5,565	0,324	9,767	0,193	THR 82	4,123	0,209	4,732	0,718	9,358	0,247		
SER 24	4,666	0,388	5,343	0,809	9,94	0,235	VAL 83	3,916	0,153	5,444	0,096	9,03	0,199		
SER 25	4,147	1,238	5,363	2,002	8,181	1,237	GLN 84	5,524	0,31	5,198	0,098	9,639	0,228		
ASP 26	4,513	0,193	5,551	0,209	10,75	0,249	MET 85	5,189	0,181	5,311	0,193	9,082	0,073		
VAL 27	4,867	0,102	5,606	0,308	9,238	0,483	GLU 86	4,84	0,058	5,379	0,386	8,286	0,166		
ILE 28	5,023	0,182	5,872	0,147	10,32	0,253	LYS 89	4,143	0,737	5,224	0,329	9,33	0,247		
GLU 29	5,428	0,218	5,673	0,218	10,13	0,237	LEU 90	5,499	0,414	6,131	0,521	9,21	0,291		
LYS 30	5,22	0,058	5,569	0,529	10,35	0,195	VAL 91	5,11	0,145	5,701	0,239	9,664	0,163		
ALA 31	4,589	0,111	5,936	0,329	10,75	0,249	VAL 92	5,56	0,065	6,311	0,216	10,45	0,182		
ARG 32	5,869	0,254	5,845	0,262	11,88	0,192	ASN 93	4,492	0,103	5,581	0,112	9,764	0,21		
ASN 33	4,026	0,418	4,925	0,561	9,488	0,313	PHE 94	4,808	0,148	5,071	0,775	8,417	0,176		
PHE 34	4,901	0,074	5,532	0,377	9,575	0,067	TYR 97	5,271	0,075	6,267	1,259	9,384	0,358		
LYS 35	4,228	0,545	5,185	0,377	9,993	0,225	HIS 98	5,779	0,277	6,285	0,592	10,65	0,428		
ILE 36	4,183	0,111	5,202	0,535	9,088	0,316	GLN 99	5,529	0,257	6,171	0,169	10,6	0,223		
VAL 37	4,685	0,365	6,095	0,064	10,04	0,431	THR 100	5,625	0,29	5,841	0,257	9,798	0,639		
THR 38	4,864	0,092	5,719	0,344	9,549	0,354	SER 101	3,522	0,73	4,925	0,561	9,313	0,155		
GLU 39	5,866	0,242	6,191	0,184	10,17	0,228	GLU 102	5,288	0,415	6,109	0,592	9,975	0,068		
VAL 40	5,254	0,099	5,81	0,792	9,421	0,354	ILE 103	4,955	0,14	4,692	0,26	9,318	0,57		

GLN	41	5,03	0,285	5,904	0,387	9,622	0,289	VAL	104	4,89	0,389	5,47	0,373	9,942	0,522
GLN	42	5,747	0,592	5,762	0,257	9,498	0,245	LYS	107	4,402	0,196	5,153	0,17	8,431	0,285
ASP	43	5,728	0,051	6,182	0,399	8,833	0,218	LEU	108	5,228	0,114	5,742	0,39	9,67	0,174
GLN	45	4,11	0,113	5,197	0,613	9,075	0,695	VAL	109	5,286	0,335	6,365	0,091	10,45	0,229
ASP	46	5,278	0,251	6,032	0,101	10,05	0,063	GLU	110	5,315	0,178	5,86	0,165	10,19	0,275
PHE	47	4,413	0,31	4,903	0,173	9,446	0,038	VAL	111	5,434	0,282	5,714	0,546	10,2	0,296
THR	48	4,61	0,076	5,014	0,803	8,763	0,242	SER	112	5,006	0,118	5,586	0,201	11,18	0,61
TRP	49	4,708	0,257	6,082	0,435	9,551	0,441	THR	113	5,151	0,234	5,368	0,356	9,752	0,295
SER	50	5,222	0,246	5,99	0,175	9,91	0,139	ILE	114	5,677	0,241	5,827	0,684	9,491	0,193
GLN	51	5,126	0,149	5,848	0,497	9,158	0,171	GLY	115	4,959	0,272	5,481	1,012	9,732	0,342
HIS	52	4,955	0,243	5,286	0,563	8,695	0,438	GLY	116	3,077	1,972	3,74	1,366	10,94	0,646
TYR	53	5,048	0,294	5,34	0,158	9,453	0,117	VAL	117	4,76	0,252	5,31	0,088	9,113	0,583
SER	54	4,138	0,375	5,462	0,724	11,01	0,268	THR	118	5,041	0,072	5,536	0,107	8,959	0,076
GLY	56	4,54	0,521	5,648	0,672	10,69	0,772	TYR	119	4,393	0,384	6,212	1,099	10,01	0,475
HIS	57	4,581	0,217	5,723	0,36	10,49	0,462	GLU	120	5,593	0,252	6,118	0,303	10,72	0,251
THR	58	3,271	0,481	4,538	1,38	9,795	0,429	ARG	121	5,14	0,149	6,127	0,188	10,53	0,234
MET	59	5,486	0,117	5,679	0,417	9,288	0,316	VAL	122	5,774	0,013	5,962	0,306	10,26	0,529
THR	60	4,95	0,247	5,348	0,148	9,42	0,17	SER	123	5,124	0,296	5,733	0,325	9,458	0,23
ASN	61	4,749	0,269	5,645	1,075	8,973	0,298	LYS	124	5,651	0,12	6,755	0,884	9,792	0,226
LYS	62	4,781	0,154	5,221	0,263	8,541	0,218	ARG	125	4,731	0,308	5,178	0,374	9,216	0,295
PHE	63	5,461	0,128	5,657	0,129	9,371	0,36	LEU	126	5,918	0,431	5,357	0,363	9,648	0,252
								ALA	127	3,985	0,162	4,202	0,864	6,413	0,088

Tabelle 9.3: Die ermittelten CSA- und θ -Werte für ILBP (Holo-Form)

AS	$\Delta\sigma$ [ppm]	θ [°]	AS	$\Delta\sigma$ [ppm]	θ [°]		
LYS	5	-179	22	LYS	62	-216	26
PHE	6	-193	26	PHE	63	-225	25
GLU	9	-228	27	THR	64	-129	20
SER	10	-219	26	GLY	66	-161	22
LYS	12	-174	28	LYS	67	-180	21
ASN	13	-135	27	GLU	68	-146	26
ASP	15	-218	28	SER	69	-225	27
PHE	17	-196	26	ILE	71	-194	25
LYS	19	-176	24	THR	73	-177	24
LEU	20	-174	23	MET	74	-204	27
LEU	21	-170	25	GLY	76	-192	26
GLY	22	-132	17	LYS	77	-225	26
ILE	23	-192	25	LYS	80	-143	19
SER	24	-210	28	ALA	81	-203	24
ASP	26	-155	24	THR	82	-132	24
VAL	27	-157	21	GLN	84	-215	27
ILE	28	-198	25	MET	85	-192	23
GLU	29	-221	25	GLU	86	-229	24
LYS	30	-229	28	LYS	89	-130	15
ALA	31	-142	23	VAL	91	-177	25
ASN	33	-89	10	VAL	92	-180	23
PHE	34	-214	25	ASN	93	-158	24
LYS	35	-224	29	PHE	94	-225	25
ILE	36	-156	26	TYR	97	-211	25
VAL	37	-172	20	SER	101	-135	23
THR	38	-211	26	GLU	102	-221	25

VAL	40	-219	24	ILE	103	-156	22
GLN	41	-205	25	VAL	104	-221	26
GLN	45	-179	28	LYS	107	-200	25
ASP	46	-203	23	VAL	109	-220	23
PHE	47	-213	28	THR	113	-191	25
THR	48	-154	23	VAL	117	-156	20
TRP	49	-143	18	THR	118	-222	23
GLN	51	-186	23	TYR	119	-150	23
HIS	52	-190	24	GLU	120	-229	26
GLY	56	-210	27	ARG	121	-215	26
HIS	57	-209	29	LYS	124	-189	20
THR	60	-228	26	ARG	125	-224	26
ASN	61	-173	25				

Tabelle 9.4: Die Parameter S^2 für Human ILBP (holo-Form) berechnet mit einem CSA-Wert (-160ppm) und mit dem für jede Aminosäure individuellen CSA-Wert.

AS	S^2	S^2 [CSA-Wert] -160ppm	AS	S^2	S^2	[CSA-Wert] -160ppm	[CSA-Wert] individuell
THR	3	0,796	0,797	LYS	62	0,818	0,73
GLY	4	0,884	0,743	PHE	63	0,882	0,757
LYS	5	0,846	0,838	THR	64	0,85	0,96
PHE	6	0,842	0,789	VAL	65	0,878	0,881
GLU	7	0,827	0,829	GLY	66	0,854	0,885
MET	8	0,901	0,903	LYS	67	0,862	0,851
GLU	9	0,909	0,783	GLU	68	0,763	0,824
SER	10	0,847	0,748	SER	69	0,831	0,72
GLU	11	0,891	0,893	ASN	70	0,796	0,794
LYS	12	0,834	0,837	ILE	71	0,837	0,796
ASN	13	0,835	0,831	GLN	72	0,848	0,717
TYR	14	0,873	0,749	THR	73	0,815	0,811
ASP	15	0,855	0,763	MET	74	0,899	0,829
GLU	16	0,849	0,85	GLY	75	0,829	0,828
PHE	17	0,889	0,841	GLY	76	0,869	0,83
MET	18	0,876	0,712	LYS	77	0,85	0,731
LYS	19	0,887	0,887	THR	78	0,799	0,801
LEU	20	0,894	0,898	PHE	79	0,852	0,733
LEU	21	0,877	0,889	LYS	80	0,807	0,883
GLY	22	0,873	0,968	ALA	81	0,827	0,767
ILE	23	0,898	0,853	THR	82	0,833	0,923
SER	24	0,898	0,814	VAL	83	0,835	0,836
SER	25	0,788	0,788	GLN	84	0,836	0,74
ASP	26	0,885	0,937	MET	85	0,794	0,763
VAL	27	0,847	0,891	GLU	86	0,79	0,675
ILE	28	0,872	0,82	LYS	89	0,836	0,931
GLU	29	0,879	0,768	LEU	90	0,834	0,835
LYS	30	0,854	0,73	VAL	91	0,829	0,824
ALA	31	0,981	0,979	VAL	92	0,879	0,868
ARG	32	0,868	0,87	ASN	93	0,889	0,927
ASN	33	0,814	0,682	PHE	94	0,79	0,669
PHE	34	0,828	0,736	ASN	96	0,908	0,91
LYS	35	0,866	0,746	TYR	97	0,835	0,761

ILE	36	0,834	0,877	HIS	98	0,825	0,827
VAL	37	0,897	0,905	GLN	99	0,861	0,735
THR	38	0,848	0,767	THR	100	0,856	0,858
GLU	39	0,855	0,858	SER	101	0,85	0,945
VAL	40	0,869	0,775	GLU	102	0,839	0,738
GLN	41	0,86	0,789	ILE	103	0,867	0,913
GLN	42	0,906	0,906	VAL	104	0,845	0,738
ASP	43	0,845	0,845	ASP	106	0,886	0,889
GLN	45	0,813	0,802	LYS	107	0,837	0,777
ASP	46	0,869	0,797	LEU	108	0,835	0,702
PHE	47	0,831	0,744	VAL	109	0,846	0,745
THR	48	0,844	0,891	GLU	110	0,845	0,848
TRP	49	0,873	0,949	VAL	111	0,824	0,826
SER	50	0,871	0,874	SER	112	0,845	0,847
GLN	51	0,854	0,829	THR	113	0,821	0,782
HIS	52	0,847	0,81	ILE	114	0,836	0,835
TYR	53	0,858	0,861	GLY	115	0,886	0,888
SER	34	0,862	0,865	GLY	116	0,934	0,934
GLY	56	0,913	0,827	VAL	117	0,814	0,864
HIS	57	0,81	0,736	THR	118	0,829	0,719
THR	58	0,899	0,898	TYR	119	0,862	0,921
MET	59	0,852	0,854	GLU	120	0,827	0,686
THR	60	0,858	0,737	ARG	121	0,834	0,759
ASN	61	0,821	0,825	VAL	122	0,863	0,864
				SER	123	0,847	0,848
				LYS	124	0,869	0,837
				ARG	125	0,849	0,741
				LEU	126	0,858	0,861
				ALA	127	0,681	0,679

Tabelle 9.5: Relaxationsraten von Human-ILBP (apo-Form) bei drei verschiedenen Feldern (500, 600 und 800 MHz). Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 305 K durchgeführt .

AS		$R_1 \pm \sigma$ [s ⁻¹]			$R_2 \pm \sigma$ [s ⁻¹]								
		500MHz	600MHz	800MHz	500MHz	600MHz	800MHz						
THR	3	1,96	0,03	1,62	0,02	1,25	0,02	6,75	0,07	7,46	0,39	8,2	0,29
GLY	4	2,24	0,05	1,84	0,05	1,35	0,01	7,96	0,08	8,47	0,14	9,73	0,19
LYS	5	2,08	0,02	1,72	0,02	1,32	0,03	7,98	0,06	8,35	0,15	9,55	0,12
PHE	6	2,14	0,05	1,76	0,04	1,27	0,02	7,96	0,07	8,34	0,15	9,63	0,16
GLU	7	2,14	0,06	1,71	0,03	1,27	0,02	8,21	0,09	8,66	0,09	10,2	0,13
MET	8	2,27	0,07	1,89	0,05	1,35	0,03	7,91	0,08	8,27	0,31	9,37	0,08
GLU	9	2,24	0,08	1,82	0,07	1,31	0,02	8,18	0,23	8,49	0,24	9,68	0,43
SER	10	2,05	0,03	1,66	0,01	1,25	0,02	8,01	0,08	8,34	0,12	9,64	0,24
GLU	11	2,04	0,02	1,65	0,01	1,27	0,02	7,98	0,08	8,59	0,05	9,97	0,07
LYS	12	2,11	0,05	1,64	0,02	1,17	0,01	8,39	0,22	8,57	0,17	9,34	0,13
ASN	13	2,14	0,05	1,71	0,01	1,37	0,03	8,11	0,06	8,49	0,08	10,5	0,13
TYR	14	2,22	0,02	1,82	0,01	1,35	0,03	8,21	0,05	9,08	0,16	11,2	0,26
ASP	15	2,13	0,02	1,72	0,01	1,34	0,01	7,91	0,05	8,29	0,13	9,91	0,14
GLU	16	2,16	0,02	1,72	0,01	1,31	0,03	7,81	0,05	8,62	0,03	10,9	0,1
PHE	17	2,25	0,04	1,81	0,02	1,35	0,03	8,43	0,07	9,01	0,1	10,7	0,18
MET	18	2,31	0,03	1,82	0,02	1,33	0,01	8,14	0,15	8,61	0,17	9,58	0,09
LYS	19	2,21	0,03	1,81	0,02	1,31	0,02	8,07	0,08	8,64	0,09	9,77	0,3
LEU	21	2,08	0,02	1,71	0,01	1,36	0,03	7,72	0,09	8,17	0,06	9,76	0,11
GLY	22	2,13	0,04	1,74	0,02	1,35	0,02	7,46	0,11	8,01	0,11	8,82	0,41
ILE	23	2,12	0,02	1,77	0,02	1,37	0,01	7,53	0,04	8,07	0,12	9,24	0,26
SER	24	2,09	0,02	1,72	0,01	1,42	0,04	7,34	0,05	7,78	0,12	9,57	0,6
SER	25	2,12	0,06	1,74	0,07	1,49	0,28	7,44	0,12	8,05	0,21	11,3	1,36
ASP	26	2,17	0,02	1,78	0,02	1,34	0,01	8,14	0,08	8,74	0,17	10,1	0,32
VAL	27	2,06	0,03	1,71	0,01	1,27	0,02	7,78	0,05	8,59	0,16	10,3	0,13
ILE	28	2,17	0,02	1,76	0,01	1,42	0,04	7,82	0,05	8,46	0,18	9,67	0,32
GLY	29	2,13	0,03	1,76	0,01	1,37	0,02	8,98	0,05	9,97	0,08	12,9	0,16
LYS	30	2,02	0,03	1,71	0,01	1,43	0,02	7,43	0,07	7,82	0,18	9,99	0,07
ALA	31	2,13	0,02	1,76	0,02	1,43	0,03	8,82	0,05	9,17	0,1	11,5	0,17
ARG	32	2,07	0,03	1,75	0,02	1,45	0,02	8,13	0,07	9,08	0,1	11,1	0,14
ASN	33	2,22	0,03	1,72	0,04	1,51	0,16	8,19	0,11	9,03	0,08	11,4	1,12
PHE	34	2,13	0,03	1,74	0,01	1,41	0,05	7,23	0,09	8,34	0,11	9,32	0,24
LYS	35	2,09	0,04	1,71	0,02	1,44	0,03	9,21	0,08	10,7	0,37	14,5	0,68
ILE	36	2,01	0,03	1,68	0,03	1,23	0,02	9,45	0,14	10,9	0,21	16,6	1,27
VAL	37	2,13	0,02	1,78	0,05	1,35	0,02	7,96	0,13	8,31	0,1	9,89	0,21
THR	38	2,23	0,01	1,75	0,02	1,24	0,04	7,65	0,08	8,27	0,42	8,57	1,08
GLU	39	2,13	0,03	1,73	0,02	1,24	0,01	8,01	0,06	8,33	0,35	10,6	0,59
VAL	40	2,18	0,05	1,73	0,02	1,25	0,05	7,95	0,11	8,29	0,17	9,37	0,21
GLN	41	2,18	0,02	1,74	0,01	1,35	0,04	8,17	0,09	8,24	0,37	9,64	0,37
GLN	42	2,15	0,03	1,71	0,01	1,35	0,03	7,43	0,05	7,93	0,49	8,77	0,23
ASP	43	2,06	0,02	1,68	0,02	1,21	0,04	7,53	0,07	8,13	0,42	8,95	0,19
GLY	44	2,08	0,06	1,77	0,04	1,26	0,17	7,66	0,17	7,77	0,12	9,78	0,18
GLU	45	1,99	0,02	1,64	0,01	1,26	0,03	7,27	0,09	7,57	0,16	8,41	0,61
ASP	46	2,13	0,02	1,74	0,02	1,32	0,04	8,17	0,11	8,85	0,14	9,97	0,19
PHE	47	2,07	0,04	1,66	0,03	1,17	0,03	7,71	0,11	8,31	0,11	9,24	0,17
THR	48	2,04	0,03	1,65	0,02	1,19	0,01	7,63	0,08	8,16	0,16	8,86	0,19
TRP	49	2,15	0,03	1,75	0,04	1,33	0,01	7,85	0,12	8,72	0,17	10,1	0,18

SER	50	2,12	0,02	1,74	0,02	1,27	0,02	8,51	0,07	8,96	0,2	10,8	0,52
GLN	51	2,09	0,03	1,66	0,02	1,22	0,04	7,81	0,13	8,02	0,1	8,91	0,25
HIS	52	2,14	0,03	1,71	0,03	1,24	0,03	7,78	0,05	8,38	0,13	9,19	0,18
TYR	53	2,13	0,03	1,71	0,02	1,31	0,04	7,92	0,06	8,66	0,13	10,1	0,13
HIS	57	1,96	0,03	1,66	0,03	1,39	0,02	6,53	0,13	7,11	0,09	8,05	0,07
MET	59	2,17	0,04	1,73	0,02	1,31	0,05	7,49	0,06	7,91	0,37	9,17	0,49
THR	60	2,17	0,07	1,79	0,05	1,35	0,14	8,01	0,13	7,97	0,09	9,55	0,46
ASN	61	2,08	0,03	1,72	0,03	1,21	0,03	7,84	0,05	8,03	0,15	9,39	0,23
LYS	62	1,97	0,02	1,57	0,02	1,14	0,02	7,25	0,07	7,76	0,12	9,11	0,14
PHE	63	2,13	0,02	1,73	0,02	1,27	0,03	8,06	0,05	8,46	0,11	10,1	0,08
THR	64	2,03	0,03	1,65	0,02	1,2	0,02	7,83	0,09	8,11	0,17	9,23	0,08
VAL	65	2,22	0,02	1,79	0,01	1,34	0,01	7,96	0,06	8,39	0,41	9,88	0,11
GLY	66	2,13	0,03	1,72	0,01	1,25	0,04	8,29	0,08	8,61	0,24	9,69	0,24
LYS	67	2,02	0,03	1,76	0,01	1,36	0,02	7,55	0,04	8,21	0,23	9,53	0,17
GLU	68	2,04	0,04	1,71	0,02	1,24	0,07	7,25	0,06	7,86	0,29	9,29	0,65
SER	69	2,11	0,02	1,73	0,01	1,26	0,03	7,52	0,06	7,91	0,07	9,11	0,14
ASN	70	2,13	0,11	1,76	0,06	1,18	0,01	7,79	0,14	7,86	0,18	9,89	0,51
ILE	71	2,02	0,03	1,66	0,03	1,16	0,04	7,11	0,09	7,65	0,46	7,72	1,07
GLN	72	2,17	0,01	1,74	0,02	1,35	0,03	8,22	0,08	9,08	0,35	12,2	1,05
THR	73	2,14	0,02	1,74	0,02	1,31	0,03	8,88	0,09	10,1	0,14	16,3	0,57
MET	74	2,15	0,06	1,85	0,03	1,38	0,2	8,21	0,03	9,24	0,14	10,1	0,32
GLY	75	2,19	0,11	1,81	0,06	1,29	0,19	8,12	0,17	8,77	0,24	13,2	0,93
GLY	76	2,04	0,03	1,71	0,01	1,42	0,03	7,09	0,07	7,32	0,11	9,02	0,27
LYS	77	1,83	0,02	1,56	0,01	1,35	0,02	6,19	0,06	6,54	0,09	8,39	0,38
THR	78	2,02	0,03	1,71	0,05	1,28	0,06	7,26	0,06	7,74	0,12	10,7	0,65
PHE	79	2,11	0,02	1,71	0,02	1,32	0,02	9,28	0,13	9,4	0,19	9,18	0,21
LYS	80	1,96	0,02	1,61	0,01	1,22	0,02	7,61	0,06	8,17	0,14	12,6	0,14
ALA	81	2,08	0,03	1,69	0,01	1,28	0,03	7,02	0,04	7,62	0,19	8,93	0,05
THR	82	2,02	0,03	1,63	0,01	1,25	0,03	7,45	0,05	7,81	0,13	8,95	0,07
VAL	83	2,13	0,02	1,75	0,02	1,35	0,04	7,18	0,08	7,73	0,17	9,38	0,16
GLN	84	2,09	0,02	1,68	0,01	1,25	0,02	8,32	0,07	8,58	0,09	9,18	0,68
MET	85	1,94	0,03	1,59	0,01	1,18	0,01	7,83	0,07	8,22	0,19	9,35	0,13
GLU	86	1,93	0,01	1,57	0,02	1,17	0,03	7,19	0,07	7,41	0,37	7,63	0,31
LYS	89	2,08	0,02	1,72	0,01	1,39	0,03	7,85	0,06	8,07	0,13	9,35	0,12
LEU	90	2,12	0,03	1,71	0,01	1,28	0,03	7,94	0,06	8,66	0,16	9,6	0,23
VAL	91	2,08	0,02	1,67	0,02	1,21	0,03	8,61	0,14	8,78	0,11	9,36	0,66
VAL	92	2,17	0,02	1,76	0,01	1,26	0,02	8,27	0,04	8,9	0,08	10,8	0,4
ASN	93	2,03	0,02	1,65	0,01	1,29	0,01	7,66	0,07	8,31	0,18	9,65	0,16
PHE	94	1,99	0,03	1,62	0,02	1,19	0,02	7,72	0,05	7,87	0,14	9,11	0,22
ASN	96	2,23	0,06	1,81	0,04	1,49	0,06	9,41	0,11	10,7	0,24	14,8	0,3
TYR	97	1,88	0,03	1,54	0,02	1,17	0,02	7,39	0,06	8,01	0,11	9,34	0,63
HIS	98	2,07	0,04	1,72	0,03	1,29	0,04	10,4	0,11	11,1	0,18	15,1	0,37
GLN	99	2,15	0,03	1,75	0,03	1,27	0,07	8,75	0,07	8,75	0,07	12,6	0,52
THR	100	2,11	0,02	1,72	0,02	1,25	0,01	9,12	0,07	10,1	0,23	12,8	0,32
SER	101	2,07	0,02	1,66	0,01	1,17	0,01	8,36	0,08	8,76	0,17	10,3	0,11
GLU	102	2,12	0,04	1,64	0,03	1,21	0,04	9,05	0,11	11,1	0,28	15,1	0,28
ILE	103	2,08	0,02	1,65	0,02	1,18	0,02	8,15	0,08	8,44	0,12	9,5	0,19
VAL	104	2,11	0,02	1,67	0,02	1,29	0,03	7,62	0,06	8,03	0,12	9,28	0,13
GLY	105	2,15	0,09	1,77	0,09	1,18	0,03	8,44	0,12	8,55	0,17	11,3	1,36
LYS	107	2,11	0,03	1,72	0,02	1,29	0,02	7,46	0,06	7,78	0,12	8,86	0,06
LEU	108	2,12	0,03	1,69	0,02	1,15	0,03	7,97	0,07	8,75	0,2	9,82	0,21
VAL	109	2,11	0,02	1,69	0,02	1,23	0,02	8,31	0,08	8,58	0,15	10,4	0,21
VAL	111	2,16	0,03	1,71	0,02	1,26	0,03	8,47	0,11	8,86	0,24	10,2	0,43
SER	112	2,11	0,03	1,71	0,02	1,26	0,02	8,21	0,07	8,85	0,24	10,8	0,28
THR	113	2,05	0,04	1,67	0,02	1,22	0,03	8,43	0,16	8,92	0,11	10,5	0,32
ILE	114	2,14	0,02	1,72	0,02	1,16	0,04	7,59	0,14	8,4	0,38	8,33	1,11

GLY	115	2,17	0,06	1,74	0,05	1,18	0,07	7,95	0,11	8,45	0,17	10,3	0,09
GLY	116	2,14	0,07	1,73	0,06	1,24	0,06	8,51	0,12	9,39	0,34	13,4	1,07
VAL	117	2,15	0,02	1,74	0,02	1,29	0,02	7,49	0,06	8,24	0,19	8,82	0,27
THR	118	2,06	0,03	1,65	0,01	1,23	0,01	8,33	0,08	9,29	0,11	9,92	0,15
TYR	119	2,09	0,04	1,69	0,02	1,31	0,03	8,11	0,11	9,09	0,17	11,9	0,21
GLU	120	2,06	0,04	1,68	0,02	1,23	0,02	8,44	0,05	9,15	0,29	11,6	0,89
VAL	122	2,12	0,02	1,71	0,02	1,24	0,03	8,32	0,06	8,65	0,13	10,5	0,17
SER	123	2,09	0,04	1,67	0,02	1,21	0,01	8,21	0,09	8,79	0,14	9,41	0,12
LYS	124	2,15	0,04	1,73	0,03	1,24	0,04	7,85	0,08	8,61	0,14	9,72	0,26
ARG	125	2,15	0,04	1,79	0,03	1,29	0,04	6,99	0,07	8,19	0,23	9,4	0,35
LEU	126	2,17	0,04	1,81	0,02	1,46	0,07	7,49	0,09	7,88	0,11	9,03	0,18
ALA	127	1,99	0,03	1,65	0,01	1,31	0,02	5,19	0,08	5,47	0,36	6,07	0,11

	AS	$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{-NOE} \pm \sigma$						AS	$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{-NOE} \pm \sigma$						
		500	600		800		500		600		800				
			[MHz]					[MHz]							
THR	3	0,71	0,06	0,7	0,06	0,96	0,06	TYR	53	0,81	0,06	0,84	0,07	0,99	0,06
GLY	4	0,78	0,06	0,84	0,07	0,98	0,06	HIS	57	0,68	0,05	0,76	0,06	0,73	0,05
LYS	5	0,75	0,06	0,8	0,06	0,96	0,06	MET	59	0,81	0,06	0,82	0,06	0,99	0,06
PHE	6	0,77	0,06	0,83	0,07	0,97	0,06	THR	60	0,84	0,07	0,83	0,07	0,98	0,07
GLU	7	0,88	0,07	0,82	0,06	0,98	0,07	ASN	61	0,84	0,07	0,8	0,06	0,98	0,07
MET	8	0,86	0,07	0,91	0,07	0,97	0,07	LYS	62	0,75	0,06	0,78	0,06	0,97	0,06
GLU	9	0,76	0,06	0,81	0,06	0,99	0,06	PHE	63	0,79	0,06	0,82	0,07	0,97	0,06
SER	10	0,74	0,06	0,8	0,06	0,97	0,06	THR	64	0,82	0,06	0,82	0,07	0,95	0,06
GLU	11	0,77	0,06	0,81	0,06	0,98	0,06	VAL	65	0,84	0,07	0,82	0,06	0,99	0,07
LYS	12	0,79	0,06	0,79	0,06	0,96	0,06	GLY	66	0,86	0,07	0,83	0,07	0,98	0,07
ASN	13	0,81	0,06	0,83	0,07	0,97	0,06	LYS	67	0,77	0,06	0,74	0,06	0,97	0,06
TYR	14	0,83	0,07	0,81	0,06	0,98	0,07	GLU	68	0,79	0,06	0,78	0,06	0,91	0,06
ASP	15	0,77	0,06	0,8	0,06	0,97	0,06	SER	69	0,73	0,06	0,73	0,06	0,96	0,06
GLU	16	0,75	0,06	0,79	0,06	0,98	0,06	ASN	70	0,83	0,07	0,8	0,06	0,97	0,07
PHE	17	0,78	0,06	0,79	0,06	0,97	0,06	ILE	71	0,78	0,06	0,79	0,06	0,98	0,06
MET	18	0,79	0,06	0,77	0,06	0,95	0,06	GLN	72	0,81	0,06	0,78	0,06	0,99	0,06
LYS	19	0,76	0,06	0,79	0,06	0,95	0,06	THR	73	0,77	0,06	0,78	0,06	0,99	0,06
LEU	21	0,74	0,06	0,84	0,07	0,96	0,06	MET	74	0,76	0,06	0,77	0,06	0,98	0,06
GLY	22	0,76	0,06	0,83	0,07	0,99	0,06	GLY	75	0,73	0,06	0,78	0,06	0,92	0,06
ILE	23	0,79	0,06	0,77	0,06	0,98	0,06	GLY	76	0,69	0,05	0,73	0,06	0,87	0,05
SER	24	0,79	0,06	0,78	0,06	0,93	0,06	LYS	77	0,57	0,05	0,59	0,06	0,88	0,05
SER	25	0,83	0,07	0,79	0,07	0,99	0,07	THR	78	0,69	0,05	0,77	0,06	0,91	0,05
ASP	26	0,79	0,06	0,79	0,06	0,98	0,06	PHE	79	0,75	0,06	0,8	0,06	0,99	0,06
VAL	27	0,73	0,06	0,75	0,06	0,99	0,06	LYS	80	0,78	0,06	0,81	0,06	0,98	0,06
ILE	28	0,69	0,05	0,78	0,06	0,97	0,05	ALA	81	0,81	0,06	0,8	0,06	0,98	0,06
GLY	29	0,72	0,06	0,78	0,06	0,96	0,06	THR	82	0,79	0,06	0,82	0,06	0,98	0,06
LYS	30	0,65	0,05	0,7	0,06	0,96	0,05	VAL	83	0,81	0,06	0,79	0,07	0,98	0,06
ALA	31	0,69	0,05	0,74	0,06	0,95	0,05	GLN	84	0,75	0,06	0,84	0,06	0,98	0,06
ARG	32	0,71	0,06	0,76	0,06	0,97	0,06	MET	85	0,81	0,06	0,8	0,06	0,98	0,06
ASN	33	0,77	0,06	0,77	0,06	0,95	0,06	GLU	86	0,71	0,06	0,71	0,06	0,89	0,06
PHE	34	0,76	0,06	0,85	0,07	0,94	0,06	LYS	89	0,74	0,06	0,74	0,07	0,88	0,06
LYS	35	0,66	0,05	0,81	0,06	0,94	0,05	LEU	90	0,71	0,06	0,84	0,07	0,98	0,06
ILE	36	0,71	0,06	0,76	0,06	0,95	0,06	VAL	91	0,78	0,06	0,83	0,06	0,96	0,06
VAL	37	0,83	0,11	0,82	0,06	0,97	0,11	VAL	92	0,77	0,06	0,81	0,06	0,99	0,06

THR	38	0,82	0,07	0,8	0,06	0,96	0,07	ASN	93	0,74	0,06	0,77	0,06	0,98	0,06
GLU	39	0,82	0,06	0,81	0,06	0,97	0,06	PHE	94	0,79	0,06	0,81	0,06	0,97	0,06
VAL	40	0,76	0,06	0,82	0,06	0,93	0,06	ASN	96	0,83	0,07	0,78	0,06	0,99	0,07
GLN	41	0,77	0,06	0,83	0,07	0,98	0,06	TYR	97	0,74	0,06	0,8	0,06	0,97	0,06
GLN	42	0,75	0,06	0,81	0,06	0,99	0,06	HIS	98	0,81	0,06	0,84	0,07	0,97	0,06
ASP	43	0,75	0,06	0,82	0,06	0,98	0,06	GLN	99	0,87	0,07	0,83	0,07	0,99	0,07
GLY	44	0,84	0,07	0,84	0,07	0,99	0,07	THR	100	0,79	0,06	0,84	0,06	0,98	0,06
GLU	45	0,76	0,06	0,82	0,07	0,96	0,06	SER	101	0,79	0,06	0,81	0,06	0,98	0,06
ASP	46	0,77	0,06	0,79	0,06	0,96	0,06	GLU	102	0,78	0,06	0,84	0,06	0,99	0,06
PHE	47	0,74	0,06	0,79	0,06	0,98	0,06	ILE	103	0,79	0,06	0,79	0,06	0,98	0,06
THR	48	0,77	0,06	0,79	0,06	0,98	0,06	VAL	104	0,82	0,06	0,84	0,07	0,99	0,06
TRP	49	0,81	0,06	0,82	0,06	0,95	0,06	GLY	105	0,85	0,07	0,88	0,06	0,89	0,07
SER	50	0,78	0,06	0,79	0,06	0,96	0,06	LYS	107	0,72	0,06	0,77	0,06	0,93	0,06
GLN	51	0,83	0,07	0,83	0,07	0,98	0,07	LEU	108	0,81	0,06	0,79	0,06	0,98	0,06
HIS	52	0,75	0,06	0,78	0,06	0,98	0,06	VAL	109	0,76	0,06	0,82	0,06	0,95	0,06

ARG	121	0,771	0,03	0,843	0,06	0,993	0,03
SER	123	0,757	0,03	0,809	0,06	0,991	0,03
LYS	124	0,796	0,03	0,799	0,06	0,914	0,03
ARG	125	0,673	0,03	0,737	0,06	0,974	0,03
LEU	126	0,754	0,03	0,828	0,06	0,911	0,03
ALA	127	0,641	0,03	0,713	0,06	0,913	0,03

Tabelle 9.6: Die transversalen ^{15}N CSA/DD kreuzkorrelierten Kreuzrelaxationsraten, gemessen bei 500, 600 und 800 MHz für ILBP (apo-Form)

	AS	$\eta[\text{s}^{-1}] \pm \sigma$						AS	$\eta[\text{s}^{-1}] \pm \sigma$						
		500			600				500			600			
		[MHz]							[MHz]						
THR	3	5,44	0,144	6,289	0,281	6,284	0,251	LYS	62	4,757	0,178	5,042	0,088	6,13	0,376
GLY	4	4,9	0,268	6,166	0,898	6,141	0,22	PHE	63	4,652	0,143	5,088	0,095	6,797	0,104
LYS	5	5,494	0,14	5,705	0,112	7,181	0,304	THR	64	4,14	0,17	5,312	0,059	6,481	0,231
PHE	6	4,728	0,185	5,372	0,348	6,332	0,251	VAL	65	5,097	0,267	5,763	0,211	6,879	0,145
GLU	7	5,638	0,13	5,966	0,408	6,934	0,625	GLY	66	4,904	0,19	5,781	0,412	7,475	0,329
MET	8	5,149	0,203	5,744	0,498	6,32	0,223	LYS	67	6,257	0,137	6,438	0,286	7,867	0,25
GLU	9	5,507	0,235	6,039	0,306	6,284	0,268	GLU	68	4,467	0,142	4,964	0,684	5,875	0,123
SER	10	4,487	0,292	5,58	0,101	6,971	0,253	SER	69	4,559	0,238	5,18	0,323	6,593	0,273
GLU	11	4,888	0,121	5,401	0,203	7,003	0,169	ASN	70	3,429	0,278	5,775	0,367	5,815	0,325
LYS	12	4,786	0,215	5,84	0,314	6,843	0,067	ILE	71	4,314	0,245	5,589	0,313	5,248	0,198
ASN	13	4,831	0,125	5,556	0,048	6,627	0,267	MET	74	4,715	0,3	5,03	0,631	2,471	3,237
TYR	14	5,12	0,106	5,922	0,621	7,062	0,063	GLY	76	4,121	0,379	5,158	0,415	6,821	0,163
ASP	15	5,352	0,14	5,751	0,268	6,803	0,099	LYS	77	3,988	0,144	4,558	0,212	5,824	0,155
GLU	16	4,768	0,148	5,435	0,713	6,545	0,297	THR	78	3,013	0,469	4,084	0,62	6,318	0,668
PHE	17	5,484	0,167	6,008	0,69	7,135	0,307	PHE	79	5,426	0,186	5,63	0,109	7,044	0,133
MET	18	5,454	0,146	6,012	0,602	7,011	0,187	ALA	81	5,403	0,23	5,535	0,352	6,885	0,6
LYS	19	5,082	0,195	6,009	0,28	7,203	0,176	THR	82	4,87	0,171	5,587	0,67	5,839	0,233

LEU	21	4,747	0,113	5,668	0,814	6,985	0,173	VAL	83	4,68	0,286	5,734	0,178	6,379	0,394
GLY	22	4,52	0,125	5,838	0,333	7,029	0,336	GLN	84	5,277	0,227	6,366	0,353	7,508	0,156
ILE	23	4,985	0,199	6,044	0,505	6,812	0,16	MET	85	4,725	0,248	5,762	0,379	6,753	0,093
SER	24	4,741	0,124	5,266	0,099	6,778	0,12	GLU	86	4,665	0,201	5,62	0,252	6,19	0,248
SER	25	4,004	0,234	5,587	0,108	6,741	0,219	LYS	89	4,752	0,204	5,956	0,451	7,222	0,141
ASP	26	5,022	0,149	5,896	0,486	6,957	0,169	LEU	90	5,201	0,051	5,546	0,048	6,833	0,433
VAL	27	4,595	0,154	5,396	0,207	6,776	0,061	VAL	91	6,193	0,038	5,68	0,446	7,468	0,092
ILE	28	5,161	0,03	5,098	0,883	7,154	0,164	VAL	92	5,864	0,188	6,473	0,551	7,59	0,148
LYS	30	4,534	0,045	4,998	0,323	6,854	0,103	ASN	93	5,491	0,086	5,982	0,699	7,031	0,316
ALA	31	4,269	0,323	5,796	1,329	6,09	0,249	PHE	94	4,278	0,126	4,65	0,125	5,571	0,145
ARG	32	5,02	0,201	5,563	0,259	6,765	0,158	TYR	97	4,009	0,281	4,919	0,219	5,948	0,141
ASN	33	3,04	0,455	5,345	0,072	5,655	0,758	SER	101	4,367	0,053	5,566	0,043	6,392	0,066
PHE	34	4,64	0,158	5,109	0,45	6,244	0,152	ILE	103	5,322	0,122	5,953	0,363	6,692	0,326
VAL	37	4,831	0,162	5,866	0,34	7,103	0,298	VAL	104	5,315	0,106	5,93	0,263	6,802	0,289
THR	38	4,86	0,14	5,737	0,372	6,05	0,255	GLY	105	3,187	0,442	5,524	0,044	5,423	0,793
GLU	39	5,207	0,14	6,188	0,461	6,431	0,265	LYS	107	4,903	0,05	4,996	0,375	6,07	0,3
VAL	40	4,525	0,437	6,319	0,662	5,725	0,291	LEU	108	4,301	0,343	5,289	0,207	6,693	0,199
GLN	41	5,712	0,189	5,932	0,108	6,558	0,396	VAL	109	5,286	0,125	6,364	0,146	7,686	0,305
GLN	42	4,735	0,167	5,834	0,641	6,136	0,37	VAL	111	5,231	0,198	5,855	0,319	8,127	0,308
ASP	43	5,929	0,283	5,804	0,127	7,027	0,333	SER	112	5,104	0,105	6,109	0,157	6,384	0,091
GLY	44	5,056	0,262	6,118	0,822	6,261	0,197	THR	113	4,643	0,152	5,348	0,126	7,276	0,242
GLU	45	5,502	0,24	6,071	0,201	6,231	0,567	ILE	114	5,604	0,166	6,016	0,186	6,851	0,431
ASP	46	5,337	0,09	6,605	0,332	7,121	0,275	GLY	115	4,843	0,094	4,465	0,457	5,259	0,677
PHE	47	4,909	0,226	5,548	0,761	5,914	0,438	GLY	116	3,864	0,897	4,448	0,777	5,901	0,687
THR	48	4,626	0,067	5,184	0,16	6,358	0,13	VAL	117	5,258	0,151	5,896	0,58	7,409	0,175
TRP	49	4,688	0,072	6,073	0,555	7,442	0,339	THR	118	4,74	0,235	5,668	0,468	6,526	0,055
SER	50	5,143	0,22	5,691	0,113	6,203	0,508	TYR	119	6,036	0,231	5,564	0,206	6,37	0,253
GLN	51	5,029	0,153	5,442	0,267	6,392	0,222	GLU	120	5,567	0,274	6,556	0,288	7,333	0,228
HIS	52	4,806	0,067	5,591	0,436	6,321	0,471	VAL	122	5,67	0,352	6,449	0,199	7,084	0,585
TYR	53	4,28	0,125	5,034	0,253	6,469	0,123	SER	123	5,169	0,244	5,647	0,101	6,525	0,237
HIS	57	4,357	0,196	5,273	0,284	6,107	0,414	LYS	124	5,992	0,336	6,234	0,104	7,095	0,813
MET	59	4,969	0,254	5,784	0,524	6,142	0,296	ARG	125	5,506	0,078	5,491	0,584	6,234	0,313
THR	60	5,708	0,197	5,628	0,576	6,234	0,313	LEU	126	5,249	0,098	5,615	0,402	6,589	0,525
ASN	61	5,174	0,102	5,393	0,095	5,989	0,223	ALA	127	3,808	0,054	3,824	0,362	4,401	0,115

Tabelle 9.7: Die ermittelten CSA- und θ -Werte für ILBP (apo-Form)

	As	$\Delta\sigma$ [ppm]	θ [$^\circ$]		As	$\Delta\sigma$ [pp]	θ [$^\circ$]	
	LYS	5	-222	25	HIS	57	-195	23
	PHE	6	-208	28	PHE	63	-175	27
	SER	10	-161	23	THR	64	-145	23
	GLU	11	-189	26	VAL	65	-218	26
	LYS	12	-152	23	GLY	66	-136	19
	ASN	13	-221	28	SER	69	-173	24
	MET	18	-214	24	ASN	70	-158	28
	LYS	19	-184	24	ILE	71	-182	24
	LEU	21	-185	25	GLY	76	-150	21
	GLY	22	-128	14	LYS	77	-221	26
	ILE	23	-207	24	THR	78	-107	25
	SER	24	-218	26	PHE	79	-111	15
	SER	25	-165	24	GLN	84	-138	15
	ASP	26	-206	27	MET	85	-179	25
	VAL	27	-206	28	GLU	86	-154	18

ILE	28	-204	24	LYS	89	-150	20
LYS	30	-201	27	TYR	97	-186	28
ASN	33	-168	28	SER	101	-183	29
VAL	37	-178	24	ILE	103	-219	26
THR	38	-200	25	GLY	105	-154	24
GLN	42	-210	26	LEU	108	-151	25
ASP	46	-210	25	VAL	109	-180	22
THR	48	-179	25	VAL	111	-139	18
TRP	49	-156	22	THR	113	-151	25
GLN	51	-205	25	VAL	117	-172	18
HIS	52	-204	27	THR	118	-187	28
TYR	53	-176	28	SER	123	-199	27

Tabelle 9.8: Transversale ^{15}N CSA/DD –kruzkorrelierte Kreuzrelaxationraten und transversale Relaxation R_2 gemessen bei drei Feldern (500, 600 und 800 MHz) sind aufgetragen für RNase T1.

AS		η [s^{-1}]						R_2 [s^{-1}]						
		500		600		800		500		600		800		
														[MHz]
ASP	3	3,341	0,12	4,349	0,102	5,496	0,096	5,757	0,244	5,961	0,075	6,858	0,061	
TYR	4	4,156	0,129	3,266	0,112	4,085	0,035	6,866	0,112	6,765	0,134	5,619	0,026	
THR	5	4,118	0,095	4,425	0,172	5,432	0,043	6,055	0,035	6,311	0,102	7,062	0,05	
CYS	6	4,257	0,101	4,516	0,168	5,427	0,219	5,856	0,188	6,323	0,178	7,117	0,086	
GLY	7	4,033	0,142	4,31	0,082	5,485	0,071	6,055	0,033	6,322	0,043	7,173	0,025	
SER	8	3,491	0,065	4,245	0,068	5,318	0,045	5,705	0,075	5,96	0,058	6,84	0,103	
ASN	9	4,244	0,082	4,925	0,021	5,944	0,183	6,287	0,063	6,501	0,082	7,052	0,153	
CYS	10	3,599	0,021	4,603	0,062	5,178	0,205	5,419	0,027	5,74	0,074	6,35	0,212	
TYR	11	5,4	0,169	4,312	0,255	5,944	0,107	6,022	0,079	6,305	0,215	7,596	0,11	
SER	12	4,575	0,034	5,067	0,062	6,218	0,127	6,445	0,036	6,765	0,119	7,76	0,108	
SER	13	4,123	0,061	4,346	0,103	5,604	0,08	6,242	0,038	6,709	0,057	7,697	0,064	
SER	14	4,625	0,159	5,123	0,071	6,378	0,082	6,891	0,064	7,158	0,042	8,302	0,066	
ASP	15	5,258	0,19	5,058	0,086	6,44	0,187	6,295	0,099	6,644	0,157	7,85	0,187	
VAL	16	4,702	0,038	5,071	0,062	6,472	0,054	6,782	0,035	6,972	0,084	8,036	0,09	
SER	17	4,462	0,017	5,099	0,085	6,243	0,152	6,83	0,031	7,114	0,038	8,15	0,079	
THR	18	4,61	0,069	5,727	0,032	6,631	0,154	6,821	0,078	7,153	0,066	8,437	0,111	
GLN	20	4,569	0,086	4,781	0,076	6,086	0,039	6,731	0,055	7,049	0,058	8,101	0,056	
ALA	21	4,697	0,021	5,351	0,224	5,763	0,057	6,919	0,035	7,211	0,032	7,098	0,04	
ALA	22	4,784	0,029	5,155	0,057	6,503	0,133	6,855	0,037	6,976	0,055	8,147	0,079	
GLY	23	5,043	0,192	5,16	0,102	6,427	0,282	6,401	0,129	6,992	0,244	8,148	0,075	
TYR	24	5,036	0,052	5,686	0,05	6,727	0,245	6,939	0,051	7,214	0,075	8,645	0,236	
LYS	25	4,693	0,008	5,166	0,059	6,527	0,052	6,883	0,051	7,106	0,129	8,233	0,04	
LEU	26	4,789	0,111	4,901	0,135	6,352	0,186	6,896	0,029	7,145	0,033	8,165	0,04	
HIS	27	4,425	0,096	5,306	0,411	5,48	0,2	6,995	0,036	7,17	0,041	7,401	0,034	
GLU	28	4,599	0,068	5,305	0,089	6,483	0,156	6,655	0,07	7,223	0,047	8,195	0,08	
ASP	29	4,578	0,07	4,875	0,094	5,958	0,047	6,628	0,032	6,739	0,042	7,826	0,101	
GLY	30	4,078	0,031	5,159	0,103	6,411	0,25	6,425	0,062	6,709	0,058	7,819	0,254	
GLU	31	4,318	0,079	4,866	0,176	5,91	0,113	6,202	0,018	6,557	0,044	7,593	0,077	
THR	32	3,767	0,076	4,713	0,169	5,362	0,33	5,87	0,039	6,231	0,033	7,126	0,223	
VAL	33	4,013	0,062	4,729	0,068	5,791	0,077	6,757	0,055	6,916	0,09	8,024	0,085	
GLY	34	3,225	0,081	4,086	0,115	5,185	0,07	6,03	0,036	6,233	0,048	7,059	0,166	
SER	35	3,518	0,096	3,51	0,081	5,526	0,157	6,825	0,179	7,048	0,436	8,293	0,173	
ASN	36	3,711	0,144	4,363	0,272	5,513	0,11	6,673	0,228	7,002	0,142	8,295	0,376	
SER	37	4,567	0,104	4,921	0,119	6,044	0,096	6,476	0,031	6,961	0,03	8,162	0,072	

TYR	38	3,663	0,042	4,179	0,062	5,402	0,122	7,062	0,106	7,244	0,074	8,818	0,091
HIS	40	4,096	0,055	2,44	0,136	6,181	0,101	8,447	0,083	9,049	0,068	11,38	0,107
LYS	41	4,542	0,233	4,545	0,471	5,546	0,182	6,805	0,123	7,743	0,208	9,173	0,302
TYR	42	3,837	0,105	4,945	0,16	6,156	0,092	6,793	0,26	7,122	0,108	8,271	0,064
ASN	43	4,276	0,291	4,743	0,585	4,944	1,495	7,819	0,303	9,301	0,447	11,05	1,234
TYR	45	4,673	0,162	4,953	0,085	5,935	0,045	7,212	0,123	7,654	0,196	7,578	0,03
GLU	46	4,128	0,076	4,699	0,087	5,276	0,124	6,884	0,036	7,475	0,051	8,906	0,083
GLY	47	4,524	0,156	5,23	0,051	6,39	0,111	6,603	0,061	6,995	0,061	8,449	0,05
PHE	48	4,497	0,053	5,046	0,139	5,75	0,145	6,568	0,065	6,91	0,092	8,111	0,057
ASP	49	3,747	0,054	4,321	0,066	5,415	0,111	5,852	0,066	6,32	0,074	7,338	0,153
PHE	50	3,058	0,04	3,313	0,057	4,243	0,026	4,679	0,048	4,77	0,042	5,575	0,05
SER	51	3,885	0,12	4,347	0,122	5,174	0,05	6,035	0,026	6,38	0,039	7,391	0,043
VAL	52	3,804	0,087	4,267	0,201	5,154	0,187	5,012	0,045	5,436	0,041	6,323	0,166
SER	53	4,107	0,097	4,488	0,032	5,737	0,071	5,92	0,111	6,646	0,048	7,459	0,081
SER	54	4,051	0,084	4,639	0,125	5,624	0,119	5,917	0,039	6,154	0,033	7,197	0,034
TYR	56	4,378	0,1	3,213	0,082	5,956	0,046	6,605	0,033	6,789	0,079	7,529	0,064
TYR	57	3,859	0,128	4,239	0,098	5,282	0,103	6,668	0,07	6,895	0,121	7,827	0,084
TRP	59	4,332	0,152	2,495	0,076	5,855	0,168	7,587	0,078	8,269	0,127	10,84	0,164
ILE	61	4,737	0,111	5,283	0,119	6,65	0,043	6,849	0,058	7,064	0,045	8,166	0,04
LEU	62	4,869	0,087	4,728	0,041	6,416	0,126	6,548	0,087	6,643	0,046	7,791	0,167
SER	63	3,771	0,099	4,27	0,086	5,509	0,016	6,094	0,055	6,392	0,076	7,092	0,032
SER	64	4,332	0,072	4,656	0,055	6,26	0,055	6,241	0,031	6,557	0,047	7,609	0,049
GLY	65	4,014	0,073	4,993	0,047	6,315	0,059	6,313	0,049	6,468	0,057	7,492	0,064
ASP	66	4,329	0,069	4,868	0,025	6,291	0,05	6,101	0,03	6,395	0,046	7,536	0,053
VAL	67	3,845	0,09	4,059	0,038	5,309	0,104	5,808	0,07	5,955	0,058	6,878	0,151
TYR	68	2,831	0,146	4,902	0,132	6,194	0,125	6,542	0,041	6,934	0,054	8,081	0,159
SER	69	4,05	0,062	4,625	0,122	5,938	0,119	6,352	0,058	6,681	0,058	7,642	0,05
GLY	70	4,093	0,287	4,566	0,413	6,261	0,272	6,03	0,44	6,148	0,099	7,528	0,256
GLY	71	3,5	0,14	4,284	0,091	5,442	0,134	6,147	0,079	6,539	0,045	7,618	0,051
SER	72	2,828	0,553	3,522	0,183	5,032	0,145	5,669	0,791	6,225	0,367	7,289	0,145
GLY	74	4,49	0,118	4,858	0,195	5,843	0,538	6,368	0,077	6,585	0,189	8,116	0,064
ALA	75	4,497	0,095	4,818	0,114	5,983	0,113	6,173	0,06	6,605	0,038	7,769	0,192
ASP	76	4,016	0,106	5,063	0,087	6,097	0,054	6,726	0,043	6,876	0,048	7,864	0,071
ARG	77	4,123	0,086	4,6	0,039	5,552	0,114	6,998	0,072	6,978	0,055	8,235	0,093
VAL	78	4,46	0,101	4,863	0,158	5,923	0,209	7,035	0,044	7,277	0,101	8,406	0,078
VAL	79	4,699	0,126	4,706	0,149	5,358	0,077	6,537	0,083	6,797	0,118	6,527	0,135
PHE	80	4,661	0,137	4,906	0,18	6,463	0,056	6,675	0,109	7,021	0,081	8,359	0,405
ASN	81	6,229	0,412	4,921	0,113	5,935	0,045	6,558	0,147	6,667	0,145	8,235	0,581
GLU	82	3,832	0,092	5,564	0,429	5,549	0,266	6,39	0,055	6,624	0,056	7,515	0,037
ASN	83	3,977	0,095	4,564	0,069	5,682	0,191	6,576	0,055	6,693	0,041	7,632	0,086
ASN	84	4,951	0,111	5,133	0,271	6,752	0,144	6,773	0,05	7,05	0,065	8,161	0,061
GLN	85	4,406	0,066	4,709	0,177	5,911	0,136	7,047	0,059	7,048	0,034	8,124	0,073
LEU	86	4,495	0,054	4,827	0,307	6,809	0,293	6,352	0,192	7,182	0,11	8,129	0,229
GLY	88	3,46	0,114	3,648	0,284	4,943	0,141	6,628	0,078	6,768	0,052	7,561	0,085
ILE	90	4,506	0,084	5,33	0,05	6,573	0,036	6,82	0,052	7,21	0,12	8,32	0,073
THR	91	4,727	0,085	4,86	0,093	5,955	0,135	6,888	0,025	7,115	0,077	8,113	0,083
HIS	92	4,4	0,117	4,994	0,075	6,455	0,135	6,278	0,082	6,715	0,07	7,865	0,32
THR	93	4,345	0,029	5,245	0,614	6,354	0,061	6,624	0,058	6,969	0,087	8,377	0,089
GLY	94	3,553	0,049	4,417	0,123	5,43	0,047	6,147	0,059	6,478	0,044	7,447	0,033
ALA	95	4,597	0,055	5,276	0,13	6,422	0,105	6,26	0,047	6,56	0,062	7,918	0,134
SER	96	4,352	0,1	3,295	0,142	4,049	0,053	4,477	0,038	4,877	0,024	5,619	0,026
GLY	97	3,013	0,166	3,152	0,041	3,869	0,065	4,638	0,026	4,869	0,03	5,395	0,052
ASN	98	2,937	0,156	3,499	0,14	4,22	0,087	6,763	0,12	7,601	0,045	10,47	0,071
ASN	99	3,702	0,076	3,952	0,108	4,739	0,102	5,474	0,035	5,663	0,029	6,475	0,042
VAL	101	4,269	0,108	4,583	0,091	5,655	0,07	6,658	0,037	6,762	0,053	7,657	0,073
GLU	102	3,508	0,049	4,733	0,086	5,964	0,036	6,561	0,086	6,64	0,065	7,702	0,035
CYS	103	4,108	0,039	4,656	0,087	5,748	0,095	6,242	0,057	6,637	0,102	7,498	0,091

Tabelle 9.9: Die ermittelten CSA- und θ -Werte für RNase T₁

AS	$\Delta\sigma$	θ	AS	$\Delta\sigma$	θ		
	[ppm]	[°]		[pp]	[°]		
ASP	3	-139	17	VAL	52	-218	20
TYR	4	-89	19	SER	53	-160	22
THR	5	-189	23	SER	54	-189	22
CYS	6	-224	23	TYR	57	-175	27
GLY	7	-166	22	ILE	61	-173	20
SER	8	-149	20	LEU	62	-200	23
ASN	9	-149	15	SER	63	-140	19
SER	12	-195	21	SER	64	-158	19
SER	13	-201	25	GLY	65	-140	14
SER	14	-182	23	ASP	66	-170	18
VAL	16	-181	21	VAL	67	-172	23
SER	17	-175	22	SER	69	-160	21
THR	18	-178	19	GLY	70	-156	18
GLN	20	-187	24	GLY	71	-157	24
ALA	21	-168	20	SER	72	-100	17
ALA	22	-192	22	ASP	76	-155	21
TYR	24	-200	20	ARG	77	-193	27
LYS	25	-180	21	VAL	78	-201	26
LEU	26	-195	23	VAL	79	-176	20
HIS	27	-177	24	PHE	80	-204	23
GLU	28	-187	22	GLU	82	-152	22
ASP	29	-203	23	ASN	83	-156	22
GLU	31	-198	22	ASN	84	-190	20
THR	32	-157	20	GLN	85	-180	25
VAL	33	-164	24	ALA	87	-176	20
GLY	34	-115	17	GLY	88	-146	27
SER	35	-127	25	ILE	90	-172	21
ASN	36	-170	27	THR	91	-219	25
SER	37	-222	24	HIS	92	-179	20
TYR	42	-146	22	THR	93	-183	23
TYR	45	-137	19	GLY	94	-149	23
GLY	47	-214	23	ALA	95	-202	20
ASP	49	-185	24	GLY	97	-167	25
PHE	50	-177	23	ASN	99	-211	25
SER	51	-210	26	VAL	101	-180	24
				GLU	102	-106	11
				GYS	103	-180	23

Literaturverzeichnis

1. **Atkins, P.W.**, Biophysikalischen Chemie, (Verlag Harri Deutsch-Thun, Frankfurt a.M., Dritte Auflage 2001)
2. **Engelke, J.**, NMR-spektroskopische Untersuchung zur Dynamik der Ribonuklease T1 und ihrem Komplex mit 2`GMP, PhD. Thesis, JWG Universität Frankfurt 1996
3. **Wüthrich, K.**, NMR of proteins and nuclei Acids, 1986, John Wiley & Sons, New York.
4. **Bloch, F., Hansen, W.W.**, Phys. Rev. 1946, **69**, 127
5. **Purcell, E. M., Torrey, H.C., Pound, R.V.**, Phys. Rev. 1946, **69**, 37 – 38
6. **Ernst, R. R., Anderson, W. A.**, Rev. Sci. Instr. 1966, **37**, 93–102
7. **Davis, J.**, Refocusing Revisited: An Optimized, Gradient-Enhanced Refocused HSQC and ist Applications in 2D and 3D NMR and in Deuterium Exchange Experiments, J. Biomol. NMR, 1995, **5**, 433–437
8. **Grzesiek, S., Bax, A.**, Measurement of Amide Proton Exchange Rates and NOEs with water in ¹³C/¹⁵N-Enriched Calcineurin, J. Biomol. NMR, 1993, **3**, 627–638
9. **Fejzo, J., Westler, W., Macura, S., Markley, J.**, Elimination of Cross-Relaxation Effects from Two-Dimensional Chemical-Exchange Spectra of Macromolecules, J. Am. Chem. Soc., 1990, **112**, 2574-2577
10. **Wider, G., Neri, D., Wüthrich, K.**, Studies of Slow Conformational Equilibria in Macromolecules by Exchange of Heteronuclear Longitudinal 2-Spin-Order in a 2D Difference Correlation Experiment, J. Biomol. NMR, 1991, **1**, 93–98
11. **Farrow, N., Zhang, O., Forman-Kay, J., Kay, L.**, A Heteronuclear Correlation Experiment for Simultaneous Determination of N Longitudinal Decay and Chemical Exchange Rates of Systems in Slow Equilibrium, J. Biomol. NMR, 1994, **4**, 727–734
12. **Voet D., Voet J. G.**, Biochemistry; John Wily and Sons, New York, 1990
13. **Jackson, S. E.**, Folding and Design, 1998, **3**, R81–R91
14. **Loria, J. P., Rance, M., Palmer , A. G.**, A Relaxation Compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequence for Characterizing Chemical Exchange by NMR Sptroscopy, J. Am. Chem. Soc., 1999, **121**, 2331–2332
15. **Millet,O., Loria, J. P., Kroenke, C.D., Pons, M., Palmer, A. G.**, The static Magnetic Field Dependence of Chemical Exchange Linebroadening Defines the NMR Chemical Shift Time Scale, J., Am., Chem., Soc., 2000, **122**, 2867–2877

16. **Wilson, F.A.**, Handbook of Physiology (schulz, S.G., Field, M., Frizzell, R.A., and Rauner, B.B, eds), **Vol. 4**, pp. 389–404, American Physiology Society, Bethesda, MD, 1991
17. **Garey, M., Cahalane, M.J**, in the Liver. Biology and Pathobiology (Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schacher, D., and Schafritz, D.A, eds), 2nd Ed., pp. 573–616, Raven Press, Ltd., New York, 1988
18. **Anwer, M.S, Kroker, R., Hegner, D.**, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1986, **375**, 1477–1486
19. **Burckhardt, G., Kramer, W., Kurz, G., Wilson, F.A.**, J. Biol. Chem., 1983, **258**, 3618–3622
20. **Weinberg, S.L., Burckhardt, G., Wilson, F.A.**, J. Clin. Invest., 1986, **78**, 44–50
21. **Ludwig, C.**, Untersuchung der internen Dynamik in lipid-bindenden Proteine durch Analyse heteronuklearer ¹⁵N- und ¹³C-NMR-Relaxationsraten, PhD. Thesis, JWG Universität Frankfurt 2000
22. **Kramer, W., Girbig, F., Gutjahr, U., Kowalewski, S., Jouvenal, K., Müller, G., Tripiier, D., Wess, G.**, Intestinal bile acid absorption. J. Biol. Chem., 1993, **268**, 18035–18046
23. **Kramer, W., Wess, G., Bewersdorf, U., Corsiero, D., Girbig, F., Weyland, C., Stengelin, S., Enhsen, A., Bock, K., Kleine, H., Le Dreau, M.A., Schäfer, H.L.**, Eur. J. Biochem., 1997, **249**, 456–464
24. **Kramer, W., Girbig, F., Gutjahr, U., Kowalewski, S.**, Biochem. J., 1995, **306**, 241–246
25. **Hofmann, A.F.**, in Advances in Internal Medicine (Stollerman, G.H., ed), 1976, pp. 501–503, Year Book Medical Publishers, Chicago.
26. **Kanda, T., Iseki, S., Hitomi, M., Kimura, H., Odani, S., Kondo, H., Matsubara, Y., Muto, T., Ono, T.**, Purification and Characterisation of a Fatty-Acid-Binding Protein from the Gastric Mucosa of Rats, Eur. J. Biochem., 1989, **185**, 27–33.
27. **Makishima, M., Okamoto, A., Repa, J., Tu, H., Learned, R., Luk, A., Hull, M., Lustig, K., Mangelsdorf, D., Shan, B.**, Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids, Science, 1999, **284**, 1362–1365
28. **Bass, N.**, The Cellular Fatty Acid Binding Proteins: Aspects of structure, Regulation, and Function, Int. Rev. Cytol., 1988, **111**, 143–185

29. **Veerkamp, J., Peeters, R., Maatman, R.,** Structural and Functional Features of Different Types of Cytoplasmic Fatty Acid-binding Proteins, *Biochem. Biophys. Acta*, 1991, **108**, 1–24
30. **Ockner, R., Manning, J., poppenhausen, R., Ho, W.,** A Binding Protein for Fatty Acids in Cytosol of Intestinal Mucosa, Liver, Myocardium and Other Tissues, *Science*, 1972, **177**, 56–58
31. **Saccettini, J.C., Hauff, S.M., Van Camp, S.L., Cistola, D.P., Gordon, J.I.,** Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in the ileal epithelium. *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 19199–19207
32. **Takikawa, H., Kaplowitz, N.,** Binding of bile acids, oleic acid, and organic anions by rat and human hepatic Z protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, **251**, 385–392
33. **Dietrich, A., Kurz, G.,** Functional significance of interaction of H-FABP with sulfated and nonsulfated taurine-conjugated bile salts in rat liver. *J. Lipid Res.*, 1995, **36**, 1745–1755
34. **Walz, D.A., Wider, M.D., Snow, J.W., Dass, C., Desiderio, D.M.,** The complete amino acid sequence of porcine gastrtrophin, an ileal protein which stimulates gastric acid and pepsinogen secretion. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 14189–14195
35. **Defize, J., Wider, M.D., walz, D., Hunt, R.H.,** Isolation and partial characterization of gastrotropin from canine ileum: Further studies of the parietal and chief cell response. *Endocrinology*, 1988, **123**, 2578–2584
36. **Banaszak, L., Winter, N., XU, Z., Bernlohr, D., Cowan, S., Jones, T.,** Lipid-Binding Proteins: A Family of Fatty Acid and Retinoid Transport Proteins, *Adv. Prot. Chem.*, 1994, **45**, 89-151.
37. **Gantz, I., Nothwehr, S.F, Lucey, M., Sacchettini, J.C, Delvalle, J., Banaszak, L.J, Naud, M., Gordon, J.I., Yamada, T.,** Gastrotropin: not an enterooxyntin but a member of a family of cytoplasmic hydrophobic ligand binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 20248–20254
38. **Lücke, C., Zhang, F., Rüterjans, H., Hamilton, J.A., Sacchettini, J.C.,** Flexibility is a likely determined of binding in the case of ileal lipid binding protein. *Structure*, 1996, **4**, 785–800
39. **Egami, F., Takahashi, K., Uchida, T.,** Ribonucleases in taka-diastrase: Properties, Chemical nature, and applications. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*, 1964, **3**, 59–

40. **Kuriyama, Y., Egami, F.**, reparation and Properties of water-insoluble ribonuclease t-
1. Seikagaku, 1966, **38**, 735-740
41. **Takahashi, K., Uchida, T., Egami, F.**, Ribonuclease T1, Structure and Function.
Adv. Biophys., 1970, **1**, 53–98
42. **Sato, K., Egami, F.**, J. Biochem.(Tokyo), 1957, **44**, 735
43. **Egami, F., Takahashi, K., Uchida, T.**, Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol., 1964, **3**,
59
44. **Iida, S., Ooi, T.**, Biochemistry, 1969, **8**, 3897
45. **Ikehara, M., Ohtsuka, E., Tokunaga, T., Nishikawa, S., Uesugi, S., Tanaka, T.,
Aoyama, Y., Kikyodani, S., Fujimoto, K., Yanase, K., Fushimura, K., Morioka,
H.**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, **83**, 4695
46. **Martinez-Oyanedel, J., Choe, H.-W., Heinemann, U., Saenger, W.**, J. Mol. Biol.,
1991, **222**, 335
47. **Arni, R., Pal, G.P., Ravichandran, K.G., Tulinsky, A., Walz, F.G., Metcalf, P.**,
Biochemistry, 1992, **31**, 3126
48. **Heydenreich, A., Koeller, G., Choe, H.-W., Cordes, F., Kisker, C., Schindelin, H.,
Adamiak, R., Hahn, U. & Saenger, W.**, Eur. J. Biochem., 1993, **218**, 1005
49. **Zegers, I., Haikal, A.F., Palmers, R., Wyns, L.**, J. Biol. Chem., 1994, **269**, 127
50. **Takahashi, K.**, J. Biochem. (Tokyo), 1985, **98**, 815
51. **Pace, C.N., Grimsley, G.R., Thomson, J.A., Barnett, B.J.**, J. Biol. Chem., 1988,
263, 11820
52. **Lenz, A., Choe, H.-W., Granzin, J., Heinemann, U., Saenger, W.**, Eur. J. Biochem.,
1993, **211**, 311
53. **Ding, J., Choe, H.-W., Granzin, J., Saenger, W.**, Acta. Cryst., 1992, **B48**, 185
54. **Pfeiffer, S., Karim-Nejad, Y., Rüterjans, H.**, J. Mol.Biol., 1997, **266**, 400
55. **Schmidt, J.M., Thüring, H., Werner, A., Quaas, R., Hahn, U., Rüterjans, H.**, Eur.
J., Biochem., 1991, **197**, 643
56. **Engelke, J., Rüterjans, H.**, Backbone dynamics of proteins Derived from Carbonyl
Carbon Relaxation Times at 500, 600 and 800 MHz: Application to Ribonuclease T1,
J. Biomol. NMR, 1997, **9**, 63-78.
57. **Sato-Asano, K.**, J. Biochem., 1959, **46**, 31
58. **Egami, F., Sato, S.**, Biochem. Zeitschrift, 1965, **342**, 437

59. **Fushman, D., Weisemann, R., Thüring, H., Rüterjans, H.**, Backbone dynamics of ribonuclease T1 and its complex with 2'GMP studied by two-dimensional heteronuclear nmr spectroscopy., *J. Bio. NMR.*, 1993, **4**, 61–78
60. **Fushman, D., Ohlenschläger, O., Rüterjans, H.**, Determination of the backbone mobility of ribonuclease t1 and its 2'gmp complex using molecular dynamics simulations and NMR Relaxation data., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1994, **11**, 1377–402
61. **Tjandra, N., Bax, A.**, Solution NMR Measurement of Amid Proton Chemical Shift Anisotropy in ¹⁵N-Enriched Proteins. Correlation with Hydrogen Bond Length, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 8076–8082
62. **Tjandra, N., Szabo, A., Bax, A.**, Protein Backbone Dynamics and ¹⁵N Chemical Shift Anisotropy from Quantitative Measurement of Relaxation Interference Effects., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 6086–6091
63. **Tessari, M., Mulder, F.A.A., Boelens, R., Vuister, G.W.**, Determination of Amid Proton CSA in ¹⁵N-labeled proteins Using ¹H CSA/¹⁵N-¹H Dipolar and ¹⁵N CSA/¹⁵N-¹H Dipolar Cross-Correlation Rates, *J. Magn. Res.*, 1997, **127**, 128–133
64. **Fushman, D., Tjandra, N. and Cowburn, D.**, Direct Measurement of ¹⁵N Chemical Shift Anisotropy in Solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 10947–10952
65. **Bloch, F.**, Dynamical Theory of Nuclear Induction 2, *Physical Review*, 1956, **102**, 104–135
66. **Bloch, F.**, Generalized Theory of Relaxation, *Physical Review*, 1957, **105**, 1206–1222
67. **Redfield, A.**, The Theory of Relaxation Processes, *Adv. Magn. Reson.*, 1965, **1**, 1–32
68. **Woessner D.**, spin Relaxation Processes in a Two-Proton System Undergoing Anisotropic Reorientation, *J. Chem. Phys.*, 1962, **36**, 1–4
69. **Woessner, D.**, Nuclear Spin Relaxation in Ellipsoids Undergoing Rotational Brownian Motion, *J. Chem. Phys.*, 1962, **37**, 647–654
70. **Perrin, F.**, Brownian Movement of an Ellipsoid 1: Dielectric Dispersion of an Ellipsoidal Molecules, *J. Phys. Radium.*, 1934, **5**, 497–511
71. **Perrin, F.**, Brownian Movement of an Ellipsoid 2: Free Rotation and Depolarization of Fluorescence-Translation and Diffusion of Ellipsoidal Molecules, *J. Phys. Radium*, 1936, **7**, 1–11
72. **Farrow, N., Zhang, O., Szabo, A., Torchia, D., Kay, L.**, Spectral Density Function Mapping Using ¹⁵N Relaxation Data Exclusively, *J. Biomol. NMR*, 1995, **6**, 153–162

73. **Gupta, R.**, A Novel Nuclear Relaxation Approach for Estimating Distance Between Enzyme- and Nucleotide-Bound Metal Ions at the Catalytic Site of Pyruvate Kinase, *J. Biol. Chem.*, 1977, **252**, 5183–5185
74. **Kumar, P., Kumar, A.**, Effect of Remote Cross Correlations on Transverse Relaxation, *J. Magn. Reson., Series A*, 1996, **119**, 29–37
75. **Jaccar, G., Wimperis, S., Bodenhausen, G.**, Observation of $2I_Z S_Z$ Order in NMR Relaxation Studies for Measuring Cross-Correlation of Chemical Shift Anisotropy and Dipolar Interactions, *Chem. Phys. Let.*, 1987, **138**, 601–606
76. **Kowalewski, J., Werbelow, L.**, Evaluation of Spin Relaxation Induced by Chemical Shift Anisotropy: A Comment on the Importance of the Antisymmetric Component, *J. Magn., Reson.*, 1997, **128**, 144–148
77. **Sengstschmidt, H., Freeman, R.**, A Window on the Motion of the nuclear Spin, *J. Magn. Reson., Series A*, 1996, **121**, 211–216
78. **Zhu, L.**, The Spin Dynamics of Heteronuclear Multiple-Spin Systems Formulated in the Extended Strong-Narrowing Limit, *J. Magn. Reson. Series B*, 1996, **111**, 262–271
79. **Tropp, J.**, Dipolar Relaxation and nuclear Overhauser Effects in Nonrigid Molecules: The Effect of Fluctuating Internuclear Distances, *J. Chem. Phys.*, 1980, **72**, 6035–6043
80. **Boulat, B., Bodenhausen, G.**, Cross Relaxation in Magnetic Resonance: An Extension of the Solomon Equations for a Consistent Description of Saturation, *J. Chem. Phys.*, 1992, **97**, 6040–6043
81. **Allerhand, A., Dodrill, D., Glushko, V., Cochran, D., Wenkert, E., Lawson, P., Gurs, F.**, Conformation and segmental motion of native and denatured ribonuclease A in solution. Application of natural-abundance carbon-13 partially relaxed fourier transform nuclear magnetic resonance., *J. Am.Chem. Soc.*, 1971, **93**, 544–546
82. **Glushko, V., Lawson, P., Gurd, F.**, Conformational States of Bovine Pancreatic Ribonuclease A Observed by Normal and Partially Relaxed Carbon 13 nuclear Magnetic Resonance, *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 3176–3185
83. **Hanssum, H., Rüterjans, H.**, Anisotropic rotational diffusion of an α Helix and analysis of the internal motion of side chains, *J. Chem. Phys.*, 1983, **78**, 4687–4697
84. **Fuson, M., Prestegard, J.H.**, Dynamics of an Interfacial Methylene in Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicles Using Carbon-13 Spin Relaxation, *Biochemistry*, 1983, **22**, 1311–1316

85. **Schiksniš, R.A., Bogusky, M.J., Tsang, P., Opella, S.J.**, Structure and Dynamics of the Pfl Filamentous Bacteriophage Coat Protein in Micella, *Biochemistry*, 1987, **26**, 1373–1381
86. **McCain, D.C., Markley, J.L.**, Rotational Spectral Density functions for Aqueous Sucrose: Experimental Determination Using ^{13}C NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 4259–4264
87. **Allard, P., Härd, T.**, NMR Relaxation Mechanisms for Backbone Carbonyl Carbons in a ^{13}C , ^{15}N -Labeled Protein, *J. Magn. Reson.*, 1997, **126**, 48–57
88. **Allard, P., Helgstrand, M., Härd, T.**, The Complete Homogeneous Master Equation for a Heteronuclear Two-Spin System in the Basis of Cartesian Product Operations, *J. Magn. Reson.*, 1998, **134**, 7–16
89. **Daragan, V., Mayo, K.**, A Simple Approach to Analyzing Protein Side-Chain Dynamics from ^{13}C NMR Relaxation Data, *J. Magn. Reson.*, 1998, **130**, 329–334
90. **Daragan, V., Mayo, K.**, A Novel Model-Free analysis of ^{13}C NMR Relaxation of Alanine-Methyl Side-Chain Motions in Peptides, *J. Magn. Reson.*, 1996, Series B, **110**, 164–175
91. **Daragan, V., Khazanovich, T., Stepanyants, A.**, Cross-Correlation Effects in Multiplett Spectra of ^{13}C , *Chem. Phys. Lett.*, 1974, **26**, 89–92
92. **Korzhnev, D., Orekhov, V., Arseniev, A.**, Model-Free Approach Beyond the Borders of Its Applicability, *J. Magn. Reson.*, 1997, **127**, 184–191
93. **Brutscher, B., Skrynnikov, N., Bremi, T., Brüschweiler, R., Ernst, R.**, Quantitative Investigation of Dipole-CSA Cross-Correlated Relaxation by ZQ/DQ Spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 1998, **130**, 346–351
94. **Bremi, T., Brüschweiler, R., Ernst, R.**, A Protocol for Interpretation of Side-Chain Dynamics Based on NMR Relaxation: Application to Phenylalanines in Antamanida, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 4272–4284
95. **Dellwo, M. and Wand, A.**, Systematic Bias in the Model-Free Analysis of heteronuclear Relaxation, *J. Magn. Reson.*, 1991, **91**, 505–516
96. **Fushman, D., Weisemann, R., Thüring, H., Ohlenschläger, O., Rüterjans, H.**, Backbone Dynamics of Proteins Studied by Two-Dimensional Heteronuclear NMR Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations, *Int. J. Of Quant. Chem.*, 1996, **59**, 291–300

97. **Fushman, D., Cowburn, D.**, Model-Independent Analysis of ^{15}N Chemical Shift Anisotropy from NMR Relaxation Data. Ubiquitin as a Test Example, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 7109–7110
98. **Fushman, D., Cahill, S., Cowburn, D.**, The Main-Chain dynamics of the dynamitin Pleckstrin Homology (PH) Domain in Solution: Analysis of ^{15}N Relaxation with Monomer/Dimer Equilibration, *J. Mol. Biol.*, 1997, **266**, 173–194
99. **Brüschweiler, R., Liao, X., Wright, P.**, Long-Range Motional Restrictions in a Multidomain Zinc-Finger Protein from Anisotropic Tumbling, *Science*, 1995, **268**, 886–888.
100. **Phan, I., Boyd, J., Campbell, I.**, Dynamics Studies of a Fibronectin Type I module Pait at Three Frequencies: anisotropic Modelling and Direct Determination of Conformational Exchange, *J. Biomol. NMR*, 1996, **8**, 369–378
101. **Schurr, J., Babcock, H., Fujimoto, B.**, A Test of the Model-Free Formulas. Effects of Anisotropic Rotational Diffusion and Dimerization, *J. Magn. Reson.*, 1994, Series B, **105**, 211–224
102. **Tjandra, N., Wingfield, p., Stahl, S., Bax, A.**, anisotropic Rotational Diffusion of Perdeuterated HIV Protease from ^{15}N NMR Relaxation Measurements at Two magnetic Fields, *J. Biomol. NMR*, 1996, **8**, 273–284
103. **Habazettl, J., Wagner, G.**, A New Siplified Method for Analyzing Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Relaxation Data of Proteins, *J. Magn. Reson.*, 1995, Series B, **109**, 100–104
104. **Peng, J. Wagner, G.**, Mapping of Spectral Density Functions Using Heteronuclear NMR Relaxation Measurement, *J. Magn. Reson.*, 1992, **98**, 308–332
105. **Kay, L., Nicholson, L., Delaglio, F., Bax, A., Torchia, D.**, Pulse Sequences for Removal of the Effects of Cross Correlation Between Dipolar and Chemical-Shift Anisotropy Relaxation Mechanisms on the Measurement of Heteronuclear T_1 and T_2 Values in Proteins, *J. Magn. Reson.*, 1992, **97**, 359–375
106. **Skelton, N., Palmer 3, A., Akke, M., Kördel, H., Rance, M., Chazin, W.**, Practical Aspects of Two-Dimensional Proton-Detected ^{15}N spin Relaxation Measurements, *J. Magn. Reson.*, 1993, **102**, 253–264
107. **Szyperski, T., Luginbühl, P., Otting, G., Güntert, P., Wüthrich, K.**, Protein Dynamics Studied by Rotating Fram ^{15}N Spin Relaxation Times, *J. Biomol. NMR*, 1993, **3**, 151–164

108. **Birchall, A., Lane, A.**, Anisotropic Rotation in nucleic Acid Fragments: Significance for Determination of Structures From NMR data, *Eur. Biophys. J.*, 1991, **19**, 73–78
109. **Lee, L., Rance, M., Chazin, W., Palmer III, A.**, Rotational Diffusion anisotropy of Proteins from Simultaneous Analysis of ^{15}N and $^{13}\text{C}^\alpha$ Nuclear Spin Relaxation, *J. Biomol. NMR.*, 1997, 287–298
110. **Engelke, J., Rüterjans, H.**, Determination of $^{13}\text{C}^\alpha$ Relaxation Times in Uniformly ^{13}C - ^{15}N -Enriched Proteins, *J. Biomol. NMR*, 1995, **5**, 173–182
111. **Engelke, J., Rüterjans, H.**, Backbone Dynamics of Proteins Derived from Carbonyl Carbon Relaxation Times at 500, 600 and 800 Mhz: Application to Ribonuclease T1, *J. Biomol. NMR.*, 1997, **9**, 63–78
112. **Chatfield, D., Szabo, A., Brooks, B.**, Molecular Dynamics of Staphylococcal Nuclease: Comparison of Simulation with ^{15}N and ^{13}C NMR Relaxation Data, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 5301–5311
113. **Majumdar, A.**, Analytical Expression for Isotropic Mixing in Three- and Four-Spin Topologies in ^{13}C Systems, *J. Magn. Reson.*, 1996, **121**, 121–126
114. **Matson, G.**, Methyl NMR Relaxation: The Effects of Spin Rotation and Chemical Shift Anisotropy Mechanisms, *J. Chem. Phys.*, 1977, **67**, 5152–5161
115. **Nicholson, L.K., Kay, L.E., Baldisseri, D.M., Arango, J., Young, P.E, Bax, A., Torchia, D.A.**, Dynamics of Methyl Groups in Proteins As Studied by Proton-Detected ^{13}C NMR Spectroscopy. Application to the Leucine Residues of Staphylococcal Nuclease, *Biochemistry*, 1992, **31**, 5253–5263
116. **Jamazaki, T., Muhandiram, R., Kay, L.E**, NMR Experiments for the Measurement of Carbon Relaxation Properties in Highly Enriched, Uniformly ^{13}C , ^{15}N -Labeled Proteins: Application to $^{13}\text{C}^\alpha$ Carbons, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 8266–8278
117. **Lipari, G., Szabo, A.**, Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Times in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982a, **104**, 4546–4559
118. **Lipari, G., Szabo, A.**, Model-Free Approach to the Interpretation of nuclear Magnetic Resonance Relaxation Times in Macromolecules. 2. Analysis of Experimental Results, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982b, **104**, 4559–4570
119. **Bloch, F.**, *Phys. Rev*, 1946, **70**, 460-
120. **Blombergen, N., Purcell, E.M., Pound, R.V.**, *Phys. Rev.*, 1948, **73**, 679-
121. **Redfield, A.G.**, *IBM J. Res. Dev.*, 1957, **1**, 19-
122. **Redfield, A.G.**, *Adv. Magn. Reson.* 1965, **1**, 1-

123. **Ernst, R.R., Bodenhausen, G., Wokaum, A.**, Principles of nuclear Magnetic Resonance in One and two Dimensions, Clarendon Press, Oxford 1987.
124. **Abragam, A.**, Principles of Nuclear Magnetism (Clarendon Press, Oxford 1987)
125. **Fick, E., Sauermann, G.**, Quantenstatistik Dynamischer Prozesse, Band I, Generelle Aspekte (Verlag Harri Deutsch/Thun, Frankfurt a. M., 1983)
126. **Bremi, T., Brueschweiler, R., Ernst, R.**, A protocol for the Interpretation of side-chain Dynamics Based on NMR Relaxation, Application to Phenylalanines in Antamanide, J. Am. Chem. Soc., 1997, **19**, 4272-4284
127. **Kuba, R.**, J. Phys. Soc., Japan, 1962, **17**, 1100-
128. **Brueschweiler, R.**, Chem. Phys. Lett. 1997, submitted
129. **Goldman, M.**, Quantum Description of High/Resolution NMR in Liquids, New York 1988.
130. **Ernst, R.R., Bodenhausen, G., Wokaum, A.**, Principles of nuclear Magnetic Resonance in one and two Dimensions (Clarendon Press Oxford, 1987)
131. **Henry, E.R., Syabo, A.**, J. Chem. Phys. 1985, **82**, 4753-
132. **Zare, R.**, **Angular Momentum**, Wiley Interscience, New York 1988
133. **Boyd, J., Hommel, U., Campell, I.D.**, Influence of cross-correlation between dipolar and anisotropic chemical shift relaxation mechanisms upon longitudinal relaxation rates of ^{15}N in macromolecules, Chem. Phys. Lett, 1990, **175**, 477-482
134. **Boyd, J., Hommel, U., Krishnan, V.V.**, Influence of cross-correlation between dipolar and anisotropic chemical shift relaxation mechanisms upon transverse relaxation rates of ^{15}N in macromolecules, Chem. Phys. Lett, 1991, **187**, 317-324
135. **Boyd, J.**, Measurement of ^{15}N Relaxation Data from the side Chains of Asparagine and Glutamine Residues in Protein, J. Magn. Reson. B., 1995, **107**, 279-285
136. **Sandstrom, J.**, Dynamics NMR Spectroscopy, Academic Press, London, 1982
137. **Johnson, C.S.**, Adv. Magn. Reson. 1965, **1**, 33-102
138. **Kaplan, J.I., Fraenkel, G.**, NMR of Chemically Exchanging Systems, Academic Press, New York, 1980.
139. **Woessner, D.E.**, Concepts Magn. Reson., 1996, **8**, 397-421
140. **Johnston, E.R.**, Concepts Magn. Reson., 1995, **7**, 219-242
141. **Farrow, N.A., Muhandiram, R., Singer, A.U., Pascal, S.M., Kay, C.M., Gish, G., Shoelson, S.E., Pawson, T., Forman-Kay, J.D., Kay, L.E.**, Biochemistry 33, 1994, 5984.

142. **Grzesiek, S., Bax, A.**, The Importance of Not Saturating H₂O in Protein NMR. Application to Sensitivity Enhancement and NOE Measurements, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 12593 – 12594.
143. **Tessari, M., Mulder, F.A.A., Boelens, R., Vuister, G.W.**, Determination of amide Proton CSA in ¹⁵N-Labeled Proteins Using ¹H CSA/¹⁵N-¹H Dipolar and ¹⁵N CSA/¹⁵N-¹H Dipolar Cross-Correlation Rates, *J. Magn. Res.*, 1997, **127**, 128 – 133.
144. **Goldman, M.**, *J. Magn. Reson.*, 1984, **60**, 437.
145. **Tjandra, N., Szabo, A., Bax, A.**, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 6986.
146. **Loria, J.P., Rance, M., Palmer, A.G.**, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999a, **121**, 2331 – 2332.
147. **Loria, J.P., Rance, M., Palmer, A.G.**, *J. Biomol. NMR*, 1999b, **15**, 151 – 155.
148. **Millet, O., Loria, J.P., Kroenke, C.D., Pons, M., Palmer, A.G.**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 2867-2877.
149. **Ando, I., Saito, H., Tabeta, R., Shoji, A., Ozaki, T.**, *Macromolecules*, 1984, **17**, 457-461.
150. **Saito, H.**, *Magn. Reson. Chem.*, 1986, **24**, 835-852.
151. **Spera, S., Bax, A.**, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 5490-5492.
152. **De Dios, A.C., Pearson, J.G., Oldfield, E.**, *Science*, 1993, **260**, 1491-1496.
153. **Schieborr, U.**, Neue Verfahren zur Beschreibung der dynamischen Struktur von Biomolekülen am Beispiel Ribonuklease *T*₇ PhD. Thesis, JWG Universität Frankfurt 2001.

Curriculum Vitae

PERSONAL:

Name: Raed Aljazzar
 Date of Birth: 16.01.1971
 Place of Birth: Gaza-Strip
 Marital Status: married, 2 children

EDUCATION & WORK EXPERIENCE:

Apr.2000 – Dez. 2002	PhD in NMR-spectroscopy at the department of biochemistry in Frankfurt
March. 2000	exam as a physicist
Sep. 1998 – Sep. 1999	Diploma thesis with the title: Optimization of the acquisition-parameter of the dual-head-gamma-camera at the department of nuclear medicine
April. 1997	Pre Diploma Exam
March.1995 – Sep. 1997	physics department in Frankfurt Basic study period
Feb. 1990- Sep. 1992	German-courses and studienkolleg for foreign student
1985 – 1988	College of Higher Education, in Gaza,

submitted Publications:

1. A detailed description of the backbone dynamics of the bile acid binding protein ILBP and its complex taurocholate studied at three magnetic field strengths.
2. Comparative study of CSA-values of the ileal lipid binding protein (ILBP) and the RNase T₁ independent with their structures at three different fields

