

NMR-spektroskopische Untersuchungen an Fettsäurebindungsproteinen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich 14 Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

von
Martin Rademacher
aus Bielefeld

Frankfurt am Main, 2001

Vom Fachbereich 14 Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation
angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Rüterjans

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Tag der Disputation: 05.03. 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1996 bis Oktober 2001 am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich meinem akademischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans, für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und großzügige Förderung herzlich danken.

Herrn Dr. Christian Lücke gilt mein besonderer Dank für die Einführung in das Themengebiet, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung sowie die für den Fortgang der Arbeit sehr zuträgliche freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Veerkamp und Frau Aukje Zimmerman am Institut für Biochemie der Universität Nijmegen danke ich für die Bereitstellung des humanen H-FABP sowie mehrerer Mutanten und für die äußerst fruchtbare Zusammenarbeit.

Allen während meiner Zeit tätigen Administratoren sei pauschal für die Unterstützung in „Computerfragen“ herzlichst gedankt.

Herrn Dr. H. Hanssum und Herrn Dipl. Ing. R. Esche danke ich für die technische Unterstützung an den NMR-Spektrometern sowie manche weiterführende Diskussion.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schubert-Zsilavec und Mitarbeitern am Institut für Pharmazie für die Durchführung der GC-Analysen.

Allen unerwähnt gebliebenen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das freundliche Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die Ein- und Dreibuchstaben-Abkürzungen für Aminosäuren wurden gemäß den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur (IUPAC-IUB, 1970) verwendet.

1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
Abb.	Abbildung
A-FABP	Adipocyte-type Fatty Acid-Binding Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B-FABP	Brain-type Fatty Acid-Binding Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
COSY	Correlated Spectroscopy
CRABP	Cellular Retinoic Acid-Binding Protein
CRBP	Cellular Retinol-Binding Protein
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DHA	Docosahexaenoic Acid
DYANA	Dynamics Algorithm for NMR Application
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
E-FABP	Epidermal Fatty Acid-Binding Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
FABP	Fatty Acid-Binding Protein
FAST-Q	Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose Fast Flow
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FID	Free Induction Decay
GC	Gaschromatographie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HTQC	Heteronuclear Triple Quantum Correlation

H-FABP	Heart-type Fatty Acid-Binding Protein
I-FABP	Intestinal-type Fatty Acid-Binding Protein
iLBP	Intracellular Lipid-Binding Protein
ILBP	Ileal Lipid-Binding Protein
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
L-FABP	Liver-type Fatty Acid-Binding Protein
M-FABP	Myelin-type Fatty Acid-Binding Protein
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei Wellenlänge 600 nm
PBS	Phosphate Buffered Saline
pI	Isoelektrischer Punkt
RMSD	Root Mean-Square Deviation
rpm	Rotations per minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SL	Spinlock
Tab.	Tabelle
TAD	Torsion Angle Dynamics
TB-Medium	Terrific-Broth-Medium
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TPPI	Time Proportional Phase Incrementation
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Methylamin
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent

INHALT

1	EINLEITUNG	
1.1	Fettsäurebindungsproteine	1
1.2	Natürliches Vorkommen	1
1.3	Primärstruktur	3
1.4	Tertiärstruktur und Ligandenbindung	6
1.5	Das Herz-Typ Fettsäurebindungsprotein	8
1.6	Das Hirn-Typ Fettsäurebindungsprotein	11
2	THEORIE	
2.1	NMR-Spektroskopie	13
2.1.1	1D-NMR-Spektroskopie	14
2.1.2	2D-NMR-Spektroskopie	15
2.1.3	3D-NMR-Spektroskopie	18
2.1.4	NMR-Experimente	19
2.2	Torsionswinkeldynamikrechnungen mit DYANA	24
2.3	Energieminimierung	25
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	Molekularbiologische Methoden	26
3.1.1	Kultivierung des E. coli Stamms BL21(DE3)	26
3.1.2	Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	27
3.2	Proteinchemische Methoden	27
3.2.1	Fermentierung von Rinderherz FABP	27
3.2.2	Isolierung von Rinderherz FABP	27
3.2.3	Delipidierung von H-FABP	29
3.2.4	Relipidierung von H-FABP	29
3.2.5	Analytik von H-FABP	30
3.2.6	NMR-Probenvorbereitung	30
3.3	Aufnahme der NMR-Experimente	31
3.3.1	Spektren der H-FABP Mutanten	31
3.3.2	Spektren mit delipidiertem und relipidiertem H-FABP	32
3.3.3	B-FABP Spektren	32

3.4	Strukturbestimmung	33
3.4.1	Automatisierte Generierung der NOE-Abstandsbeschränkungen mit NMR2ST	34
3.4.2	Stereospezifische Analyse prochiraler Gruppen mit GLOMSA	34
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	
4.1	Teil I: Das H-FABP	36
4.1.1	Präparation	36
4.1.1.1	Expression und Isolierung von Rinderherz FABP	36
4.1.1.2	Delipidierung und Relipidierung von Rinderherz FABP	37
4.1.1.3	GC-Analyse von Rinderherz FABP	37
4.1.2	Spinsystem-Heterogenitäten beim H-FABP aus Mensch und Rind	38
4.1.2.1	Spinsystem-Heterogenitäten	38
4.1.2.2	Humanes H-FABP	40
4.1.2.3	Fettsäureliganden	41
4.1.3	NMR-spektroskopische Untersuchungen von humanen H-FABP Mutanten	43
4.1.3.1	Zuordnung und Strukturanalyse	43
4.2	Teil II: Das B-FABP	48
4.2.1	Strukturbestimmung des humanen B-FABP	48
4.2.1.1	Zuordnung der ¹ H-Resonanzen	48
4.2.1.2	Zuordnung der ¹⁵ N-Resonanzen	51
4.2.2	Torsionswinkeldynamikrechnungen	58
4.2.2.1	Sekundärstruktur	58
4.2.2.2	Tertiärstruktur	60
4.2.2.3	Vergleich mit der Kristallstruktur des humanen B-FABP	64
4.2.2.4	Vergleich mit den Lösungsstrukturen des H-FABP aus Mensch und Rind	65
5	ZUSAMMENFASSUNG	69
6	LITERATUR	71
7	ANHANG	84
7.1	Materialien	84
7.2	Geräte	84
7.3	Puffer und Medien	85
7.4	¹ H-Zuordnung von Wildtyp und Mutanten des humanen H-FABP	87

1 EINLEITUNG

1.1 Fettsäurebindungsproteine

Die Fettsäurebindungsproteine (Fatty Acid-Binding Protein, FABP) sind Mitglieder der Familie der intrazellulären Lipidbindungsproteine (intracellular Lipid Binding Protein, iLBP). Diese Klasse umfaßt cytosolische Proteine mit Molekulargewichten zwischen 14-16 kDa. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie zeigen eine hohe Affinität zu amphiphilen Substanzen, wie Fettsäuren, Gallensäuren und Retinoiden. FABPs bestehen aus 126 bis 137 Aminosäuren und wurden erstmals von Ockner und Mitarbeitern beschrieben (Ockner *et al.*, 1972). Obwohl sie große Unterschiede in den Sequenzhomologien auf Aminosäureebene zeigen (z.B. humanes B-FABP zeigt 67% Sequenzhomologie zu humanem H-FABP, aber nur 28% zu humanem L-FABP), ist die dreidimensionale Struktur hochkonserviert. Sie besteht aus zehn antiparallelen β -Faltblättern, die eine muschelähnliche Struktur bilden, deren Öffnung von zwei kurzen, nahezu parallelen α -Helices geschlossen wird. Fettsäurebindungsproteine dienen vermutlich als Reservoir für unlösliche Fettsäuren, dirigieren deren zelluläre Aufnahme und ermöglichen einen zielgerichteten Transport der Fettsäuren zu dem entsprechenden Ort der metabolischen Umsetzung. Möglicherweise beeinflussen sie die Genexpression, das Zellwachstum, sowie die Funktion von Enzymen, Membranen, Ionenkanälen und Rezeptoren.

1.2 Natürliches Vorkommen

FABPs findet man nicht nur im fettsäuremetabolisierenden Gewebe von Säugern, sondern auch in dem von Vögeln, Fischen und Insekten (Veerkamp & Maatman, 1995; Hohoff & Spener; 1998). Sie erhielten ihren Namen nach dem Gewebe, aus dem sie erstmals isoliert oder identifiziert wurden. Man kennt z. B. aus menschlichem Muskelgewebe, fötaler Lunge und Plazenta den Herz-Typ (H-FABP) (Peeters *et al.*, 1989; Sa *et al.*, 1989; Das *et al.*, 1988), den Leber-Typ aus Huhn (L-FABP) (Sewell *et al.*, 1989; Scapin *et al.*, 1988), den Darm-Typ aus Ratte (I-FABP) (Kanda *et al.*, 1989), den Adipozyten-Typ aus Schwein, Mensch und Maus (A-FABP) (Armstrong *et al.*, 1990; Baxa *et al.*, 1989; Matarese & Bernlohr, 1988), den Myelin-Typ aus Rind (My-FABP) (Jones, *et al.*, 1988a), den Hirn-Typ aus Mensch und Rind

(B-FABP) (Shimizu *et al.*, 1997; Schoentgen *et al.*, 1989), den Haut-Typ aus Mensch und Ratte (E-FABP) (Siegenthaler *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1994) und ein Lipidbindungsprotein aus dem Ileum vom Schwein (ILBP) (Sacchettini *et al.*, 1990; Lücke *et al.*, 1996). FABPs wurden auch in Rindermilchdrüsen (Jones *et al.*, 1988b), in Rattennieren (Lam *et al.*, 1988), einer Schellfischart (Stewart & Driedzic, 1988), im Darm von Schmetterlingslarven (Smith *et al.*, 1992) und im Flugmuskel von Heuschrecken (Hauerland & Chisholm, 1990) gefunden. Sogar im Cytosol der Hefe *Yarrowia lipolytica* wurde ein 15 kDa FABP entdeckt (Dell'Angelica *et al.*, 1996). Diese Hefe ist darauf spezialisiert, langkettige Fettsäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle für den Stoffwechsel zu nutzen. Eine zum Teil erfolgte Aminosäuresequenzierung zeigte jedoch keine signifikante Homologie zu den FABPs höherer Organismen. Zur gleichen Familie von Proteinen gehören zelluläre Retinolbindungsproteine (CRBP I-III) (Sundelin *et al.*, 1985a; Schaefer *et al.*, 1989; Vogel *et al.*, 2001), zelluläre Retinolsäurebindungsproteine (CRABP I und II) (Sundelin *et al.*, 1985b; Giguere *et al.*, 1990) und ein Lipidbindungsprotein aus Testis (T-FABP) (Schmitt *et al.*, 1994).

Tab. 1: Gewebespezifisches Vorkommen der iLBP-Familie nach Glatz & van der Vusse (1996); Hohoff & Spener (1998), Veerkamp & Zimmerman (2001) und Vogel *et al.* (2001). Zusätzlich angegeben ist der natürliche Ligand.

iLBP-Typ	Ligand	Gewebe
H-FABP	Fettsäuren	Herz, Skelettmuskel, Hirn, Milchdrüse, Hoden, Eierstöcke, Niere, Magen, Aorta, Lunge
B-FABP	Fettsäuren	Hirn
My-FABP	Fettsäuren	Myelinscheiden des peripheren Nervensystems
A-FABP	Fettsäuren, Retinoesäure	Fettgewebe, Harnblase
E-FABP	Fettsäuren	Fettgewebe, Hirn, Epidermis, Augenlinsen, Netzhaut, Hoden, Niere, Lunge
I-FABP	Fettsäuren	Dünndarm
L-FABP	Fettsäuren, Häm, Bilirubin, Eicosanoide	Leber, Dünndarm, Niere
ILBP	Gallensäuren, Fettsäuren	Dünndarm, Magen
CRBPI	all- <i>trans</i> -Retinol	Leber, Lunge, Niere, Darm, Hoden
CRBP II	all- <i>trans</i> -Retinol/-al	Dünndarm
CRBP III	all- <i>trans</i> -Retinol	Fettgewebe, Herz, Muskelgewebe
CRABPI	all- <i>trans</i> -Retinoesäure	Hoden, Hirn, Niere, Haut
CRABPII	all- <i>trans</i> -Retinoesäure	Haut
T-FABP	?	Hoden

T-FABP und My-FABP sind lediglich in einem bestimmten Gewebetyp anzutreffen, nämlich im Hoden bzw. dem peripheren Nervensystem; im Dünndarm hingegen wurden vier FABP-Typen gefunden (CRBP II, I-FABP, ILBP und L-FABP). Am weitesten verbreitet sind H-FABP und E-FABP, welche in einer Vielzahl von Geweben identifiziert wurden. Generell werden FABPs als intrazelluläre, cytosolische Proteine beschrieben (Veerkamp & Maatman, 1995; Glatz & van der Vusse, 1996, Hohoff & Spener, 1998). Mit Hilfe der Immunoelektronenmikroskopie wurden mittlerweile mehrere FABP-Typen auch im Zellkern verschiedener Spezies identifiziert, z.B. L-FABP in Hepatozyten (Bordewick *et al.*, 1989), H-FABP in Rinderherzzellen (Börchers *et al.*, 1989) und B-FABP in sich entwickelnden Mäusegehirnzellen (Feng *et al.*, 1994). Mittels ELISA wurde in Darm und Fettgewebe die jeweilige FABP-Konzentration mit 2-5% des Gesamtgehalts an cytosolischen Proteinen bestimmt; bis zu 7% des Proteingehalts im Cytosol von Ratten- und Rinderleber ist L-FABP. Die FABP-Konzentration in den Zellkernen ist um zwei Größenordnungen kleiner (Börchers *et al.*, 1989; Bordewick *et al.*, 1989).

1.3 Primärstruktur

Die Primärstrukturen der iLBP-Familie lassen sich auf ein gemeinsames Ursprungsgen zurückführen. Abbildung 1 zeigt den phylogenetischen Stammbaum der Mausproteine. A-, B-, E-, H-, M- und T-FABP lassen sich durch Vergleich der Aminosäuresequenzen auf das

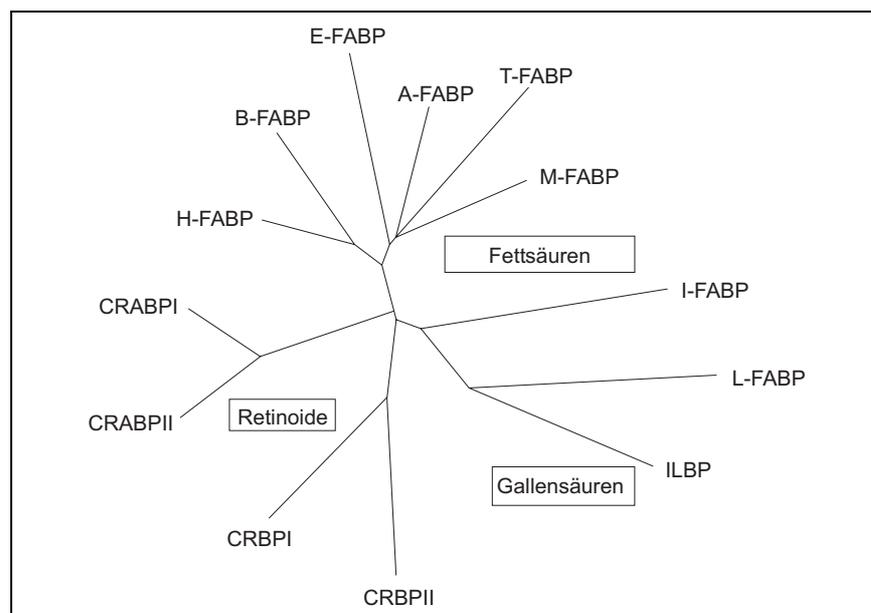


Abb. 1: Wurzelloser phylogenetischer Baum der iLBP Genfamilie. Die Strichlänge repräsentiert die evolutionäre Distanz zwischen den Proteinen. Zur Kalkulation der Verwandtschaft wurden die Sequenzen der Mausproteine verwendet (Hohoff & Spener, 1998).

	1	10	20	30	40	
H-FABP	...VDAFLGT	WKLVD SKNFD	DYMKSLGVGF	ATRQVA SMT.	.KPTTIEKN	100%
B-FABP	...VEAFCAT	WKL TNSQNFD	EYMKALGVGF	ATRQVGNVT.	.KPTVVISQE	67%
A-FABP	...CDAFVGT	WKLVSSENFD	DYMKEVGVGF	ATRKVAGMA.	.KPNMISVN	63%
My-FABP	...SNKFLGT	WKLVSSENFD	DYMKALGVGL	ATRKLGNLA.	.KPTVVISKK	61%
E-FABP	MATVQOLEGR	WRLVDSKGF	EYMKELGVGI	ALRKMGA.	.KPCDIITCD	49%
I-FABPAFDST	WVDRSENYD	KFMEKMGVNI	VKRKL AHD.	.NLKLTITQE	33%
L-FABP	...MSFSGK	YQLSQENFE	AFMKAIGLPE	ELIQKGKDI.	.KGVSEIVON	27%
ILBPAFTGK	YEIESEKNYD	EFMKRLALPS	DAIDKARNL.	.KIISEVKQD	26%
CRBPI	...PVDFTGY	WMLVNEFE	EYLRALDINV	ALRKIANLL.	.KPKDEIVQD	31%
CRBPII	...TKDQNGT	WEMESNENFE	GYMKALDIDF	ATRKIAVRL.	.TQTKIIVQD	40%
CRBPIII	..MPPNLTGY	YRFVSKNME	DYLQALNISL	AVRKIALLL.	.KPKDEIEHQ	34%
CRABPI	...PN.FAGT	WMRSSNENFD	ELLKALGVNA	MLRKKVAVAA	SKPHVEIROD	40%
CRABPII	...PN.FSGN	WKIIRSENEFE	ELLKVLGVNV	MLRKKIIVAAA	SKPAVEIKQE	40%
	50	60	70	80	90	
H-FABP	GLIL LKTHS	.TFKNT EISE	KLGV EFD ETT	..ADDRK VKS	IVTLDG .GKL	
B-FABP	GLKVVIRTLS	.TFKNT EISE	QLGEEFDETT	..ADDNCKS	VVSLDG .DKL	
A-FABP	GLVITIKSES	.TFKNT EISE	ILGQEFDETV	..ADDRK VKS	TITLDG .GVL	
My-FABP	GLIITIRTES	.TFKNT EISE	KLGV EFEETT	..ADNRKTKS	IVTLQR .GSL	
E-FABP	GKNLTIKTES	.TLKTTQFSC	TLGEDFEETT	..ADGRDTQT	VCNFTD .GAL	
I-FABP	GNKFTVKES	.AFRNIEVVF	ELGVTFENYL	..ADGTELRG	TWSLEG .NKL	
L-FABP	GKHFKFTITA	.GSKVIQNEF	TVGEECHLET	..MTGEVVT	VVQLEGDNKL	
ILBP	GQNF TWSQOY	PGH S ITNTF	TIGKECDIET	..IGGKFKFA	TVQMEG .GKV	
CRBPI	GDHMIIRTLS	.TFRN YIMDF	QVGKEFEEDL	TGIDDRKMT	TVSWDG .DKL	
CRBPII	GDNFKTKTNS	.TFRN YK LDF	TVGV EFD EHT	KGLDGRNVT	LVTWEG .NTL	
CRBPIII	GNHMIVRTLS	.TFRN YTVQF	DVGVEFEEDL	RSVDGRKQT	IVTWEE .EHL	
CRABPI	GLQFYIKTST	.TVRTTEINF	KVGE GFEET	..VDGRKCRS	LATWENENKI	
CRABPII	GLTFYIKTST	.TVRTTEINF	KVGE EFERQT	..VDGRPKS	LVKWSENK M	
	100	110	120	130		
H-FABP	VHLQK...W.	.DGQETT LVR	ELI.DGKLI L	TLTHGTA VCT	RTVEKEA 132	
B-FABP	VHIQK...W.	.DGKETNFVR	EIK.DGKM M	TLTFGDV VAV	RHYEKA. 131	
A-FABP	VHVQK...W.	.DGDKTTIKR	KRE.DDKLVV	ECVMKGV TST	RVYERA. 131	
My-FABP	NQVQR...W.	.NKETT IKR	KL.V.DGKM A	ECKMKG VCT	RIYEKV. 131	
E-FABP	VQHGE...W.	.DGKEST ITR	KLK.DGKLVV	ECVMNNTCT	RIYEKVE 135	
I-FABP	IGKFK...RT	DNENELN TVR	EII.GDELVQ	TYVYEGWEAK	RIFKED. 131	
L-FABP	VTTFK.....	.NIK...SVT	ELN.GDIITN	IMTLGDI VFK	RISKRI. 127	
ILBP	VVNSP.....	.NYH...HTA	EIV.DGKLV E	VSTVGVSYE	RVSKLA 127	
CRBPI	QCVQK...G.	.EKEGRGWTQ	WIE.GDEHL	EMRVEGVCK	QVFKVQ 134	
CRBPII	VCVQK...G.	.EKENRGWKQ	WVE.GDKLYL	ELTCGDQVCR	QVFKK. 133	
CRBPIII	VCVQK...G.	.EVPNRGWRH	WLE.GEMLYL	ELTARDAVCE	QVFRVH 134	
CRABPI	HCTTLLEG.	.DGPKTYWTR	ELAND.EIIL	TFGADDVCT	RIIVRE. 136	
CRABPII	VCEQLLKG.	.EGPKTSWTR	ELTNDGEIIL	IMTADDVCT	RVYVRE. 137	

Abb. 2: Aminosäuresequenzvergleich einiger Mitglieder der iLBP-Familie. Alle Sequenzen sind von humanem Protein, außer ILBP und CRBP II, welche aus Schwein und Ratte stammen. Die Positionen konservierter Aminosäuren (mindestens fünfmal vorhanden) sind grün eingefärbt. Teilweise wurden Leerzeichen in die Sequenzen eingefügt, um Insertionen und Deletionen von Aminosäureresten zu berücksichtigen. Die Aminosäuresequenzen wurden folgenden Referenzen entnommen: H-FABP (Peeters *et al.*, 1991), B-FABP (Shimizu *et al.*, 1997), My-FABP (Hayasaka *et al.*, 1991), A-FABP (Baxa *et al.*, 1989), E-FABP (Madsen *et al.*, 1992), I-FABP (Sweetser *et al.*, 1987), L-FABP (Lowe *et al.*, 1985), ILBP (Walz *et al.*, 1988), CRBPI (Nilsson *et al.*, 1988), CRBPII (Schaefer *et al.*, 1989), CRBPIII (Folli *et al.*, 2001), CRABPI und CRABPII (Åstrom *et al.*, 1991).

	1	10	20	30	40	50					
H-FABP (Mensch)	VDAFL	GTWKLVD	SKNFDDY	MKSLGV	GFATRQV	ASMTKPTT	II EKNGDIL	100%			
H-FABP (Ratte)	ADAFV	GTWKLVD	SKNFDDY	MKSLGV	GFATRQV	ASMTKPTT	II EKNGDTII	91%			
H-FABP (Rind)	VDAFV	GTWKLVD	SKNFDDY	MKSLGV	GFATRQV	GNMTKPTT	II EVNGDITVI	90%			
H-FABP (Maus)	ADAFV	GRWKLVD	SKNFDDY	MKSLGV	GFATRQV	GSMTKPTT	II EKNGDTII	87%			
		60	70	80	90	100					
H-FABP (Mensch)	LKTHS	TFKNT	EISEK	LGVEF	DETT	TADDRK	VKSIV	VTLDGG	KLVHL	QKWDGQ	
H-FABP (Ratte)	IKTHS	TFKNT	EISEK	QLGVE	FDEVT	TADDRK	VKSIV	VTLDGG	KLVHV	QKWDGQ	
H-FABP (Rind)	IKTQS	TFKNT	EISEK	LGVEF	DETT	TADDRK	VKSIV	VTLDGG	KLVHV	QKWDGQ	
H-FABP (Maus)	IKTQS	TFKNT	EIN	QLGIE	FDEVT	TADDRK	VKSIV	VTLDGG	KLI	HVQKWE	EGQ
		110	120	132							
H-FABP (Mensch)	ETTLV	RELID	GKLIL	TLTHG	TAV	CTR	TYE	KEA			
H-FABP (Ratte)	ETTLT	RELSD	GKLIL	TLTHG	NV	S	TR	TYE	KEA		
H-FABP (Rind)	ETSLV	REMV	DGKLIL	TLTHG	TAV	CTR	TYE	KQA			
H-FABP (Maus)	ETTLT	RELVD	GKLIL	TLTHG	SV	S	TR	TYE	KEA		

Abb. 3: Aminosäuresequenzvergleich der pI=4,9 Isoform des H-FABP aus Rind (Billich *et al.*, 1998; Unterberg *et al.* 1990), mit H-FABP aus Mensch (Börchers *et al.*, 1990), Ratte (Kimura *et al.*, 1989) und Maus (Tweedie *et al.*, 1989). Die Positionen konservierter Aminosäuren (mindestens dreimal vorhanden) sind grün eingefärbt.

	1	10	20	30	40	50								
B-FABP (Mensch)	VEAFC	ATWKL	TNSQ	NFDEY	MKALG	VGFATR	QVGNV	TKPTVI	IISQ	E	GDKVV	100%		
B-FABP (Ratte)	VDAFC	ATWKL	TD	SQNF	DEYMK	ALGV	GFQTR	QVGNV	TKPTVI	IISQ	E	GDKVV	90%	
B-FABP (Maus)	VDAFC	ATWKL	TD	SQNF	DEYMK	ALGV	GFATR	QVGNV	TKPTVI	IISQ	E	GDKVV	88%	
B-FABP (Rind)	VDAFV	GTWKL	TESQ	NFDEY	MKSL	GVGFATR	QVGNM	TDPTL	IISV	NGD	TEI	80%		
		60	70	80	90	100								
B-FABP (Mensch)	IRTL	S	TFKNT	EISF	QLGEE	FDETT	TADDR	NCKSV	VS	LDGD	KLVH	I	QKWDGK	
B-FABP (Ratte)	IRTQ	CT	TFKNT	EISF	QLGEE	FEE	TSI	DDRN	CKSV	IR	LDGD	KLI	HV	QKWDGK
B-FABP (Maus)	IRTQ	CT	TFKNT	EIN	FQLGEE	FEE	TSI	DDRN	CKSV	I	VTLD	GGKLV	HL	QKWDGK
B-FABP (Rind)	IKTQS	TFKNT	EISE	H	LGEE	FDD	TADD	QKVS	I	VTLD	GGKLV	HV	QKWDGQ	
		110	120	132										
B-FABP (Mensch)	ETNFV	REIKD	GKMV	M	TLTF	GDV	VAVR	H	YEKA					
B-FABP (Ratte)	ETNCV	REIKD	GKMV	V	TLTF	GDV	VAVR	C	YEKA					
B-FABP (Maus)	ETNCT	REIKD	GKMV	V	TLTF	GD	I	VAVR	C	YEKA	V			
B-FABP (Rind)	ESSLV	REMV	AGKL	LIL	TLTHG	DV	VAVR	H	YEK	Q				

Abb. 4: Aminosäuresequenzvergleich des B-FABP aus Mensch (Shimizu *et al.*, 1997), mit B-FABP aus Rind (Schoentgen *et al.*, 1989), Ratte (Bennet *et al.*, 1994) und Maus (Feng *et al.*, 1994). Die Positionen konservierter Aminosäuren (mindestens dreimal vorhanden) sind grün eingefärbt.

I-FABP zurückführen, welches sich wiederum aus L-FABP/iLBP entwickelt hat. Abbildung 2 zeigt paraloge humane iLBPs mit einer Sequenzhomologie von 26-67%, bei orthologen Proteinen liegt die Sequenzhomologie mit 80-91% wesentlich höher. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen einen orthologen Aminosäuresequenzvergleich der in dieser Arbeit NMR spektroskopisch untersuchten Proteine H-FABP und B-FABP.

Die konservierten Reste R106, R126 und Y128 sind in der Unterfamilie A-FABP, B-FABP, E-FABP, H-FABP und My-FABP an der Fettsäurebindung beteiligt (Xu *et al.*, 1993; Balendiran *et al.*, 2000; Hohoff *et al.*, 1999; Young *et al.*, 1994; Cowan *et al.*, 1993). Beide Argininreste sind auch beim CRABP I an der Retinolsäurebindung beteiligt (Cheng *et al.*, 1991), während beim CRABP II nur Arginin 126 essentiell ist (Chen *et al.*, 1995).

1.4 Tertiärstruktur und Ligandenbindung

Obwohl die Primärstrukturen der iLBPs teilweise eine nur schwache Sequenzhomologie untereinander aufweisen, ist die Tertiärstruktur in der Proteinfamilie stark konserviert. Die allgemeine räumliche Struktur der iLBPs besteht aus zehn antiparallelen β -Faltblattsträngen, die so angeordnet sind, daß die innenliegende Bindungstasche von zwei nahezu orthogonalen Faltblättern umschlossen wird. Diese Tertiärstruktur läßt sich anschaulich als eine Faßstruktur oder Muschelform beschreiben (Sacchettini *et al.*, 1988). Das erste Faltblatt besteht aus den Strängen β A bis β E und der ersten Hälfte des Stranges β F. Das zweite Faltblatt umfaßt die zweite Hälfte von Strang β F und die Stränge β G bis β J. Zwischen den Strängen β A und β B befindet sich eine Helix-Turn-Helix Domäne. Helix α -I ist die Fortsetzung von Strang β A und Helix α -II mündet in Strang β B. Im Innern der Faßstruktur befindet sich ein Hohlraum, der dem Lösungsmittel weitgehend unzugänglich ist. In diesem Hohlraum befindet sich der hydrophobe Ligand (Banaszak *et al.*, 1994). Im Prinzip stehen kleineren Molekülen zwei Öffnungen zur Verfügung, um in das Innere des iLBPs zu gelangen. Die Portalregion wird gebildet durch die Schleifenregionen zwischen den Faltblattsträngen β C und β D, β E und β F, sowie durch die Helix α -II. Außerdem befindet sich zwischen den Strängen β D und β E ein breiter Spalt („gap“). Der Ein- und Austritt des Liganden erfolgt wahrscheinlich durch die Portalregion. Gleichzeitig verlassen Wassermoleküle die Bindungstasche durch den Spalt zwischen den Faltblattsträngen β D und β E. Mittlerweile sind von allen iLBPs außer T-FABP Kristall- und/oder Lösungsstrukturen bekannt (Tabelle 2 und 3).

Die iLBPs können nach ihrer Sequenzhomologie und Bindungseigenschaften in vier Gruppen eingeteilt werden (Hohoff & Spener, 1998). Die erste Unterfamilie (*I*) enthält CRBP I-III und CRABP I/II (Ligand: Retinoide). Unterfamilie zwei (*II*) beinhaltet ILBP (Ligand: Gallensäuren) und L-FABP (bindet zwei Fettsäuren). In der dritten Unterfamilie (*III*) befindet sich I-FABP (bindet Fettsäuren in linearer Konformation). Zuletzt umfaßt Unterfamilie vier

(IV) alle FABPs, die die Fettsäure in stark gebogener (U-förmiger) Konformation binden. Zu dieser letzten Gruppe gehören A-FABP, B-FABP, E-FABP, H-FABP, My-FABP und vermutlich T-FABP.

Tab. 2: Mitglieder der iLBP-Familie deren Kristallstrukturen bestimmt wurden. Zusätzlich sind angegeben Ligand, Auflösung der Struktur und die Referenz.

iLBP	Organismus	Ligand	Auflösung	Referenz
H-FABP	Mensch	heterogen	2,1 Å	Zanotti <i>et al.</i> , 1992
		Stearinsäure	1,4 Å	Young <i>et al.</i> , 1994
		Ölsäure	1,4 Å	Young <i>et al.</i> , 1994
		Elaidinsäure	1,4 Å	Young <i>et al.</i> , 1994
B-FABP	Rind	heterogen	3,5 Å	Müller-Fahrnow <i>et al.</i> , 1991
	Mensch	Ölsäure	2,8 Å	Balendiran <i>et al.</i> , 2000
My-FABP	Rind	DHA	2,1 Å	Balendiran <i>et al.</i> , 2000
		heterogen	2,7 Å	Jones, <i>et al.</i> , 1988a
A-FABP	Maus	Ölsäure	2,7 Å	Cowan <i>et al.</i> , 1993
		Apo	1,6 Å	Xu <i>et al.</i> , 1993
E-FABP	Mensch	Ölsäure, Stearinsäure	1,6 Å	Xu <i>et al.</i> , 1993
		Arachidonsäure	1,6 Å	La Londe <i>et al.</i> , 1994 (a&b)
		Ölsäure, Stearinsäure	1,6 Å	La Londe <i>et al.</i> , 1994 (a&b)
		Hexadecansulfonsäure	1,6 Å	La Londe <i>et al.</i> , 1994 (a&b)
I-FABP	Ratte	heterogen	2,05 Å	Hohoff, <i>et al.</i> 1999
I-FABP (R106Q)	Ratte	Palmitinsäure	2,0 Å	Sacchettini <i>et al.</i> , 1989
		Ölsäure	1,75 Å	Sacchettini <i>et al.</i> , 1992
		Apo	1,2 Å	Scapin, <i>et al.</i> , 1992
		Myristinsäure	1,5 Å	Eads <i>et al.</i> , 1993
		Ölsäure	1,7 Å	Eads <i>et al.</i> , 1993
L-FABP	Ratte	Apo	1,2 Å	Eads <i>et al.</i> , 1993
		Ölsäure	1,7 Å	Eads <i>et al.</i> , 1993
CRBPI	Huhn	heterogen	2,7 Å	Scapin <i>et al.</i> , 1990
CRBPII	Ratte	Ölsäure	2,3 Å	Thompson <i>et al.</i> , 1997
CRBPIII	Ratte	all- <i>trans</i> -Retinol	2,1 Å	Cowan <i>et al.</i> , 1993
		Apo	2,1 Å	Winter <i>et al.</i> , 1993
CRABPI	Mensch	all- <i>trans</i> -Retinol	1,9 Å	Winter <i>et al.</i> , 1993
CRABPII	Ratte	all- <i>trans</i> -Retinol	2,3 Å	Folli <i>et al.</i> , 2001
		Apo	2,1 Å	Newcomer <i>et al.</i> , 1993
CRABPII	Mensch	all- <i>trans</i> -Retinoesäure	2,2 Å	Kleywegt <i>et al.</i> , 1994
		all- <i>trans</i> -Retinoesäure	2,9 Å	Kleywegt <i>et al.</i> , 1994
		all- <i>trans</i> -Retinoesäure	1,8 Å	Kleywegt <i>et al.</i> , 1994
FABP	Falter	synthetisches Retinoid	2,2 Å	Kleywegt <i>et al.</i> , 1994
FABP	Heuschrecke	heterogen	1,75 Å	Benning <i>et al.</i> , 1992
		heterogen	2,2 Å	Hauerland <i>et al.</i> , 1994

Tab. 3: Mitglieder der iLBP-Familie deren Lösungsstrukturen bestimmt wurden. Zusätzlich sind angegeben sind die Art des Liganden und die Referenz.

iLBP	Organismus	Ligand	Referenz
H-FABP	Mensch	heterogen	Lücke <i>et al.</i> , 2001
	Rind	Palmitinsäure Palmitinsäure	Lassen <i>et al.</i> , 1995 Brandau, 2000
B-FABP	Mensch	heterogen	diese Arbeit
E-FABP	Mensch	Stearinsäure	Gutiérrez-González <i>et al.</i> , 2002
I-FABP	Mensch	heterogen	Zhang <i>et al.</i> , 1997
	Ratte	Apo Palmitinsäure	Hodsdon <i>et al.</i> , 1997 Hodsdon <i>et al.</i> , 1996
I-FABP Δ 17-SG		heterogen	Keehyuk <i>et al.</i> , 1996
ILBP	Schwein	apo	Lücke <i>et al.</i> , 1996
		Glycocholsäure	Lücke <i>et al.</i> , 1999
CRBPI	Ratte	Apo, Retinol	Franzoni <i>et al.</i> , 2002
CRBPII	Ratte	Apo	Lu <i>et al.</i> , 1999
CRABPII	Mensch	Apo	Wang <i>et al.</i> , 1998

Die Fettsäureliganden in der vierten Gruppe ragen mit dem Carboxylatende in die Bindungstasche hinein und bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu konservierten Tyrosin- und Arginin-Resten. Dies geschieht entweder direkt oder über geordnete Wassermoleküle. Das hydrophobe Ende der Fettsäure formt van der Waals-Wechselwirkungen mit hydrophoben Resten innerhalb der Bindungstasche und mit unpolaren Wassermolekülen, die in Kontakt mit hydrophilen Resten stehen.

1.5 Das Herz-Typ Fettsäurebindungsprotein

H-FABP findet man in den meisten Geweben, im Gegensatz zu einigen iLBPs, die nur in einem oder einer kleinen Anzahl von Geweben exprimiert werden (siehe Tab. 1). Es wurde aus so unterschiedlichen Geweben wie Herz- und Skelettmuskulatur (Börchers *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 1989; Claffey *et al.*, 1987), Niere, Gehirn, Hoden, Eierstöcke, Bauchspeicheldrüse, Thymus und Nebennierengewebe (Sweetser *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1988; Paulussen *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1991) isoliert. Auch in Milchdrüsen von säugenden Rindern wird H-FABP exprimiert (Spener *et al.*, 1990; Jones, *et al.* 1988b). Wie Untersuchungen zeigen, ist der in Säugetierzellen gefundene und ursprünglich als MDGI (Mammary-Derived Growth Inhibitor) bezeichnete Wachstumsinhibitor eine Mischung aus H-FABP und A-FABP (Böhmer *et al.*, 1987; Specht *et al.*, 1996).

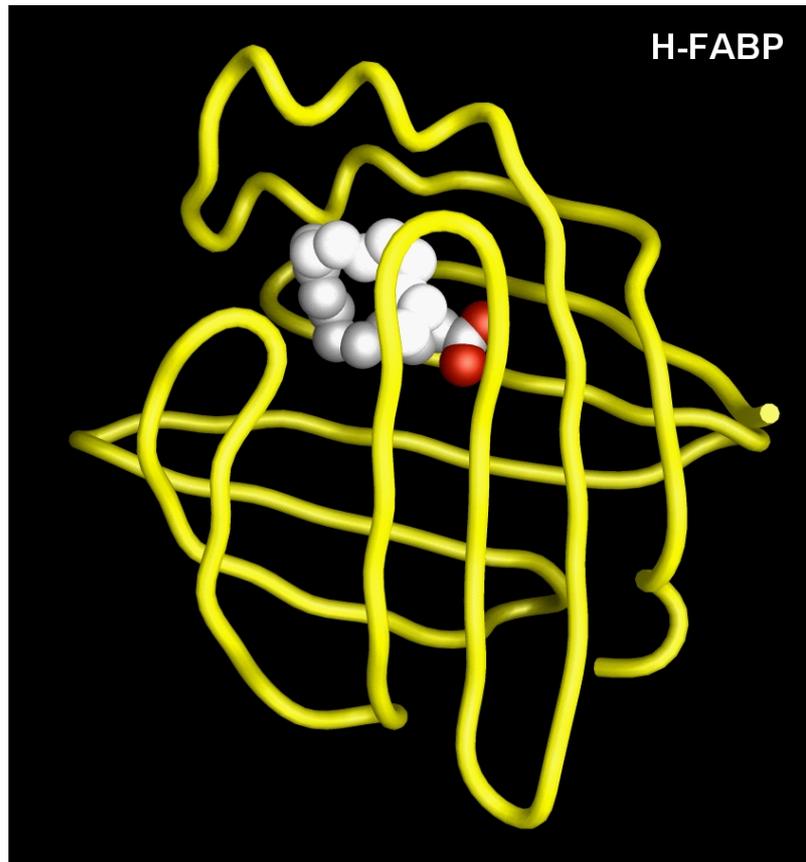


Abb. 5: Kristallstruktur des humanen H-FABP mit eingelagerter Ölsäure in U-förmiger Konformation (Young *et al.*, 1994).

Die dreidimensionale Struktur von humanem H-FABP mit einer Mischung von endogenen Liganden wurde als Röntgenstruktur in einer Auflösung von 2,1 Å bestimmt (Zanotti *et al.*, 1992); höher aufgelöste Holo-Strukturen (1,4 Å) wurden von Young *et al.* (1994) mit Stearin-, Öl- und Elaidinsäure beschrieben. Eine Lösungsstruktur von Rinderherz FABP mit Palmitinsäure als Liganden wurde von Lassen *et al.* (1995) veröffentlicht und von Brandau (2000) verfeinert. Lücke *et al.* (2001) veröffentlichte vor kurzem die Lösungsstruktur von humanem H-FABP.

Allen Strukturen ist gemein, daß die Fettsäure in U-förmiger Konformation gebunden wird. Abbildung 5 zeigt das Carboxylatende der Fettsäure im Innern des Proteins. Es bildet Wasserstoffbrücken zu den Seitenketten von Y128 und R126 sowie einigen geordneten Wassermolekülen aus. In diesem Wasserstoffbrückennetzwerk sind R106 und T40 indirekt über ein Wassermolekül an der Ligandbindung beteiligt. Die Fettsäure nimmt dabei ein

Volumen von ca. 250 \AA^3 ein (Young *et al.*, 1994). Dies sind 23 % des Volumens der Bindungstasche (ca. 1100 \AA^3). Dreizehn intern gebundene Kristallwassermoleküle wurden im Innern der Bindungstasche gefunden, die auch bei unterschiedlichen Liganden nahezu identische Positionen einnehmen (Young *et al.*, 1994). Sie befinden sich alle unterhalb der pseudo-re Seite der Fettsäure und zeigen Wechselwirkungen untereinander. Zehn dieser Wassermoleküle stehen in Kontakt mit Aminosäureseitenketten, die den Hohlraum für die Bindungsstelle säumen. Zwei weitere Wassermoleküle zeigen Wechselwirkungen mit der Carboxylatgruppe der Fettsäure, lediglich ein Wassermolekül zeigt keine Kontakte mit internen Partnern, sondern nur mit der Seitenkette von T60 und dem Sauerstoffatom der Hauptkette von L51.

Mutationen der an der Fettsäurebindung beteiligten Aminosäuren R106 und R126 verringerten beim humanen H-FABP dramatisch die Fettsäurebindungsaffinität und Proteinstabilität, wohingegen T40V und T40Q Mutanten keine signifikanten Veränderungen zum Wildtyp zeigten (Prinsen *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur weiterer Mutanten des humanen H-FABP NMR-spektroskopisch untersucht. In Verbindung mit Bindungsstudien, Fluoreszenz- und Denaturierungsexperimenten konnten weitere essentielle Reste für Stabilität und Ligandenbindung identifiziert werden (Zimmerman *et al.*, 1999).

In den NMR-Spektren des Rinderherz FABP wurden vor allem im Bereich der Portalregion Spinsystemheterogenitäten beobachtet (Lücke *et al.*, 1992; Lassen *et al.*, 1995). Die Ursache hierfür war bisher unklar: Zum einen könnten, hervorgerufen durch verschiedene Ligandenpopulationen, unterschiedliche Orientierungen des F57-Seitenkettenrings wie beispielsweise in den Kristallstrukturen von H-FABP (Scapin *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1994), I-FABP (Eads *et al.*, 1993) und A-FABP (Xu *et al.*, 1993) eine mögliche Ursache sein, zum anderen könnten unterschiedliche Konformationen des Proteinrückgrats, wie im Fall des E-FABP aufgrund geringer Elektronendichte in den Schleifenregionen zwischen den β -Faltblattsträngen C und D vorgeschlagen (Hohoff *et al.*, 1999), eine alternative Erklärung bieten. In dieser Arbeit wurde für das H-FABP mittels NMR-spektroskopischen Methoden ein „Selected-Fit“ Mechanismus als Ursache für die Spinsystemheterogenitäten postuliert (Lücke *et al.*, 2001).

1.6 Das Hirn-Typ Fettsäurebindungsprotein

Im Gewebe des Hirns findet man drei Mitglieder der FABP Familie: B-FABP, E-FABP und H-FABP (Veerkamp & Zimmerman, 2001). Sie werden räumlich und zeitlich unterschiedlich im fötalen, postnatalen und adultem Gehirn exprimiert (Owada *et al.*, 1996). B-FABP ist in hohen Konzentrationen in den Epithelzellverbänden des sich entwickelnden Gehirns nachweisbar, zu einem späteren Zeitpunkt ist es nur noch in Radialzellen und unreifen Astrozyten anzutreffen (Feng *et al.*, 1994; Kurtz *et al.*, 1994). In adultem Gehirn findet die B-FABP Expression nur noch in Gliazellen des Bulbus olfactorius statt. Das verstärkte Vorkommen des B-FABP zum Zeitpunkt der Neuronenentwicklung deutet auf eine möglicherweise entscheidende Rolle dieses Proteins während der Entstehung des zentralen Nervensystems hin (Kurtz *et al.*, 1994). In humaner fötaler Netzhaut und Gehirn sowie in bösartigem Glioma wurde ebenfalls B-FABP Expression nachgewiesen (Godbout *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der FABP-Familie zeigt, B-FABP aus Maus eine höhere Affinität zu langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure und DHA als zu Ölsäure (Xu *et al.*, 1996). Richieri *et al.* (2000) auf der anderen Seite fanden für humanes B-FABP eine schwächere Bindungsaffinität für mehrfach ungesättigte Fettsäuren als für gesättigte und einfach ungesättigte. Zusammen mit H-FABP und My-FABP zeigt B-FABP die höchste Bindungsaffinität für verschiedene Fettsäuren innerhalb der FABP-Familie (Richieri *et al.* 2000; Zimmerman *et al.*, 2001). Eine mögliche Funktion des B-FABP ist die Speicherung und/oder Abgabe von Fettsäuren, die essentielle Komponenten der Phospho- und Glykolipide in Membranen sind (Green *et al.*, 1999). Alternativ könnte das Protein involviert sein im Transport von Fettsäuren zu spezifischen Regulationspunkten oder um mehrfach ungesättigte Fettsäuren vor radikalischer Oxidation schützen.

Die Kristallstruktur von humanem B-FABP wurde im Komplex mit Ölsäure (2,8 Å) bzw. DHA (2,1 Å) als Ligand veröffentlicht (Balendiran *et al.*, 2000). Der Ölsäurekomplex zeigt eine U-förmig gebundene Fettsäure. Das eine Sauerstoffmolekül der Carboxylatgruppe bindet direkt über Wasserstoffbrückenbindungen an R126 und Y128. Indirekt über ein Kristallwassermolekül bildet der zweite Carboxylatsauerstoff Wasserstoffbrücken zu den Seitenketten von T53 und R106 aus. Zwölf Seitenketten zeigen van der Waals Wechselwirkungen mit der Fettsäure. Der DHA-Komplex hingegen enthält eine helikal gebundene Fettsäure, deren Carboxylatgruppe analog zum Ölsäurekomplex Wasserstoffbrücken aufweist. Außerdem werden 22 van der Waals Kontakte zwischen der Fettsäurekette und verschiedenen Aminosäureseitenketten in der Bindungstasche gefunden.

Die Autoren nehmen an, daß die besondere helikale Konformation des DHA Liganden durch π - π Wechselwirkungen unter anderem zwischen F104 und der C4=C5 Doppelbindung der Fettsäure stabilisiert wird.

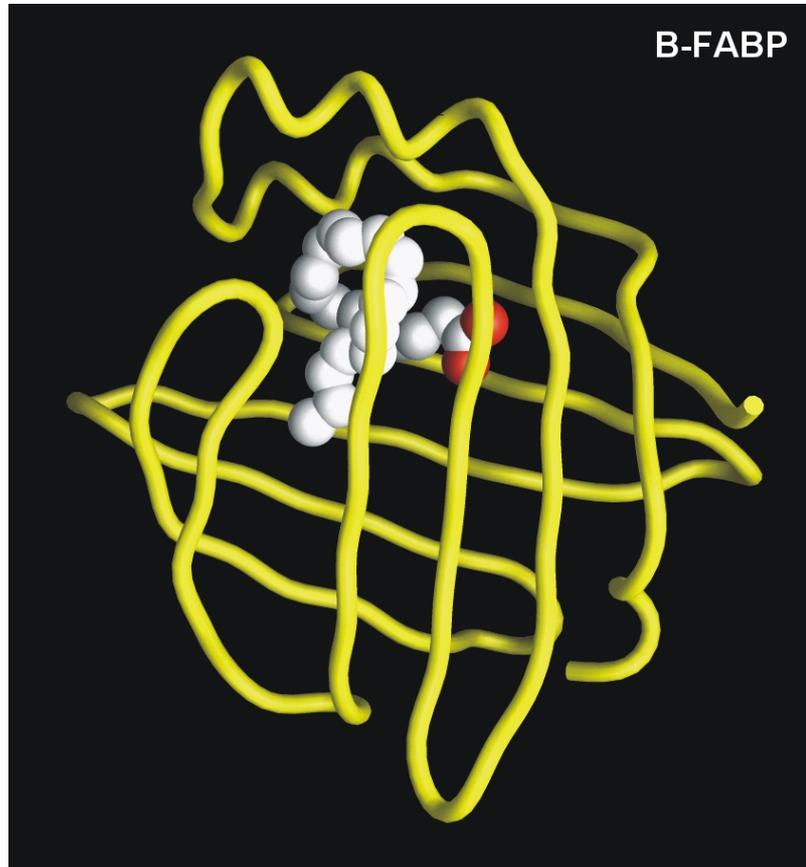


Abb. 6: Kristallstruktur des humanen B-FABP mit helikal gebundenem Ligand (DHA) im Innern der Bindungstasche (Balendiran *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die NMR-Spektroskopie als Methode eingesetzt, um die dreidimensionale Struktur des humanen B-FABP in Lösung aufzuklären.

2 THEORIE

2.1 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments eines Atomkerns mit einem äußeren Magnetfeld, der magnetischen Resonanz. Ein magnetisches Moment ist für Atome mit einem Kernspin $S \neq 0$ gegeben. In der hochauflösenden NMR-Spektroskopie untersucht man überwiegend Kerne mit $S = 1/2$, die kein Quadrupolmoment haben und daher scharfe Linien ergeben. Die Empfindlichkeit der zu untersuchenden Kernsorte wird durch das gyromagnetische Verhältnis (γ) bestimmt. Der Wert γ für den Kern ^1H ist im Vergleich zu den anderen sogenannten Heterokernen, z. B. ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P , der Größte. Daraus resultiert die im Gegensatz zu den Heterokernen einfachere Detektion der Protonen.

In einem statischen Magnetfeld B_0 gibt es für $S = 1/2$ Kerne genau zwei Orientierungen, die als α - und β -Zustand bezeichnet werden. Diese sogenannten Kern-Zeeman-Niveaus werden gemäß der Boltzmann-Verteilung populiert, wobei die Wahrscheinlichkeit, den energetisch günstigeren α -Zustand zu besetzen, größer ist. Für ein Ensemble gleichartiger Kernspins ergibt sich daraus eine makroskopische Magnetisierung in z-Richtung (M_z), die zum statischen Magnetfeld parallel orientiert ist (longitudinale Magnetisierung). Die einzelnen Spins präzedieren mit der Larmor-Frequenz, jedoch ohne Phasenbeziehung (willkürliche Lage auf dem Kegelmantel). Daher mitteln sich alle Komponenten zu B_0 heraus und es tritt keine Magnetisierung M_x in x- oder M_y in y-Richtung auf. Das Verhalten der makroskopischen Magnetisierung läßt sich mit den Bloch-Gleichungen beschreiben (Bloch, 1946). Für die Lösung dieser Bewegungsgleichungen unter Berücksichtigung von gleichzeitig angelegten Hochfrequenzpulsen ist eine Transformation in ein rotierendes Koordinatensystem von Vorteil. Dieses Koordinatensystem dreht sich mit der Trägerfrequenz ω_0 der Radiofrequenzpulse um die zum B_0 -Feld parallele z-Achse. Pulse lassen sich durch Rotation der Magnetisierung um einen bestimmten Winkel (Flipwinkel) und um eine bestimmte Achse beschreiben (Abb.7). Wird in x-Richtung ein kurzer Radiofrequenzpuls (z.B. 90°_x) einge-

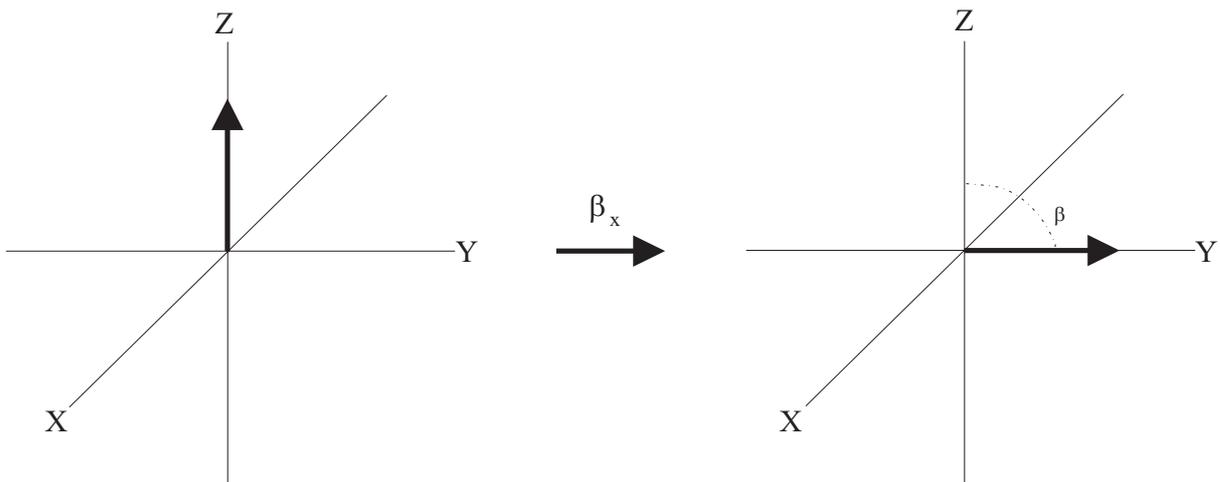


Abb. 7: Wirkung eines On-Resonance-Radiofrequenzpulses aus der x-Richtung mit dem Flipwinkel β (hier 90°) auf die longitudinale Magnetisierung im rotierenden Koordinatensystem.

strahlt, so wird die z-Magnetisierung um die x-Achse (90°) auf die y-Achse gedreht. Nach dem Puls beginnt die transversale Magnetisierung M_y um die z-Achse zu präzedieren. Die Präzessionsfrequenz beträgt $\omega = \gamma B_{\text{eff}}$, wobei B_{eff} die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der Kerne berücksichtigt. Im rotierenden Koordinatensystem dreht sich auch der Beobachter (Detektor) mit der Frequenz ω_0 um die z-Achse. Dadurch registriert der Detektor nur Differenzfrequenzen ($\omega - \omega_0$). Diese Differenzfrequenz nennt man Präzessionsfrequenz oder chemische Verschiebung Ω . Die Präzessionsfrequenz Ω ist die von der Trägerfrequenz abweichende Oszillatorfrequenz jenes Signals, das ein Detektor registriert, der z.B. längs der y-Achse im rotierenden Koordinatensystem angeordnet ist. Man erhält ein mit Ω oszillierendes Signal $S(t)$, den Free Induction Decay (FID), der durch eine Fourier-Transformation in ein Spektrum mit einem Signal bei der Frequenz Ω umgewandelt wird. Da die Fourier-Transformation je eine Linie bei $\pm\Omega$ ergibt, setzt man Quadraturdetektion ein und ermöglicht so die Selektion von nur einer Frequenz, z.B. von $+\Omega$.

2.1.1 1D-NMR-Spektroskopie

Das 1D-NMR-Experiment besteht aus den zwei Blöcken Präparation und Detektion. Während der Präparation wird das Spinsystem mittels Hochfrequenzpulsen in einen definierten Zustand gebracht. Die Antwort des Spinsystems hierauf wird während der Detektionszeit registriert. In der Präparationsphase erzeugt man z.B. mit einem 90° -Puls aus der im Boltzmann-Gleichgewicht vorliegenden Magnetisierung M_z transversale Magnetisierung M_x . Dieser Zustand, die sogenannte Kohärenz entwickelt sich während der Detektionszeit t . Obwohl

unter der Einwirkung von Pulsen im allgemeinen viele der möglichen Kohärenzen auftreten, enthalten nur einige von ihnen eine observierbare Magnetisierung, und zwar ausschließlich solche mit $\Delta m_z = \pm 1$ (Auswahlregel der NMR-Spektroskopie). Die verschiedenen Kerne mit unterschiedlichen Larmorfrequenzen präzedieren um die z-Achse und induzieren in einer Empfängerspule eine Spannung, die registriert und gespeichert wird. Das Experiment kann nach einer Wartezeit, in der die Magnetisierung wieder in ihren Gleichgewichtszustand zurückkehrt (Relaxationszeit), beliebig oft wiederholt werden. Das Signal eines 1D-NMR-Experiments wird nicht kontinuierlich, sondern diskontinuierlich registriert. Das ankommende Signal wird während fester Zeitintervalle Δt integriert und dann in einem Analog-Digital-Wandler digitalisiert. Man erhält einen FID aus N Punkten, wobei $N\Delta t$ die Akquisitionszeit ist.

2.1.2 2D-NMR-Spektroskopie

Die Pulsfolge eines 2D-NMR-Experiments läßt sich im allgemeinen in vier Blöcke unterteilen: Präparation – Evolution (t_1) – Mischung – Detektion (t_2). Dabei entspricht die Detektionsphase vollständig derjenigen im 1D-NMR-Experiment. Die t_2 -Zeit ergibt nach der Fourier-Transformation die mit ω_2 bezeichnete Frequenzachse eines 2D-NMR-Spektrums. Die 2D-NMR-Spektroskopie enthält darüber hinaus aber eine zweite variable Zeit, die Evolutionszeit t_1 . Sie wird schrittweise verlängert. Diese inkrementierte Aufnahme entspricht den Zeitinkrementen im digitalisierten FID der t_2 -Zeit. Für jedes t_1 Inkrement wird separat ein FID in t_2 detektiert. Man erhält schließlich ein Signal, das von zwei Zeitparametern, t_1 und t_2 , abhängt: $S(t_1, t_2)$. Die Fourier-Transformation jedes FIDs nach t_2 liefert dann eine Serie von ω_2 -Spektren, die sich für die jeweiligen t_1 Inkremente in der Intensität und/oder Phase der Signale unterscheiden. Eine zweite Fourier-Transformation nach t_1 , senkrecht zur ω_2 -Dimension, ergibt ein Spektrum als Funktion zweier Frequenzen (ω_2 horizontal, ω_1 vertikal).

In der hochauflösenden NMR-Spektroskopie gibt es zwei wesentliche Spin-Spin Wechselwirkungen, die für die Übertragung von Kohärenzen in den Mischperioden genutzt werden können: Die skalare Kopplung, die zur Aufklärung von Bindungs-Konnektivitäten verwendet wird, und die dipolare Kopplung, die eine Bestimmung von intra-/intermolekularen Atomabständen ermöglicht.

Skalare Kopplung

Die skalare Kopplung ist eine durch die Bindung wirkende Spin-Spin-Kopplung (J-Kopplung), die zu Multiplettaufspaltungen führt. Sie besteht nur zwischen Spins, die durch wenige Bindungen im Molekül voneinander getrennt sind. Daher ist sie für die Aufklärung von Verknüpfungen von Atomen geeignet und dient zum Beweis der Konstitution chemischer Verbindungen oder zur Zuordnung von Spektren. Die Größe der skalaren Kopplung ist zudem ein empfindlicher Parameter für Torsionswinkel um Einfach- oder Doppelbindungen, deren Abhängigkeit durch die semiempirische Karplus-Beziehung beschrieben wird:

$$J(\theta) = A \cos^2(\theta) - B \cos(\theta) + C$$

A, B, und C stellen empirisch bestimmte Konstanten dar, die für jeden Typ von Torsionswinkel (z.B. Φ - und Ψ -Winkel) verschieden sind.

Dipolare Kopplung

Die dipolare Kopplung ist die Wechselwirkung der magnetischen Momente zweier Spins (I und S) durch den Raum. Die Anzahl der verbrückenden chemischen Bindungen ist dabei unerheblich. Befindet sich ein Zweispinsystem nicht mehr im Gleichgewichtszustand, weil z.B. die Resonanz des Kerns S durch ein schwaches Hochfrequenz-Feld gesättigt wurde, so relaxiert es durch den Austausch von Spinpolarisierung wieder in einen der Boltzmann-Verteilung entsprechenden Grundzustand. Wegen der dipolaren Kopplung relaxieren die beiden Spins nicht unabhängig voneinander, sondern beeinflussen sich gegenseitig, d. h. jede Abweichung des einen Spins vom Gleichgewicht überträgt sich auf den anderen Spin und führt dort ebenfalls zu einer Abweichung vom Gleichgewicht. Diesen Effekt nennt man Nuclear-Overhauser-Enhancement NOE Effekt. Es gilt allgemein:

$$\eta_i(s) = \frac{I - I_0}{I_0}$$

- I_0 = Ausgangsintensität im Gleichgewicht
 I = Intensität während der Sättigung einer anderen Resonanz
 $\eta_i(s)$ = NOE am Kern i wenn der Kerns s gesättigt ist

Die Entstehung eines NOEs durch Kreuzrelaxation ist in Abbildung 8 anhand eines 2-Spin- $\frac{1}{2}$ -Systems ohne J-Kopplung erläutert. Der NOE-Effekt kann dabei nicht nur mit Ein-

Quanten-Übergängen erklärt werden (Relaxation nach W_1), sondern es müssen auch die Übergangswahrscheinlichkeiten W_0 und W_2 berücksichtigt werden.

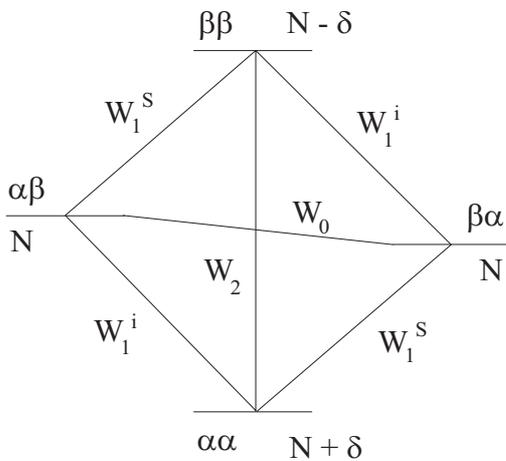


Abb. 8: Energieniveauschema für ein 2-Spin- $\frac{1}{2}$ -System. Die Wahrscheinlichkeiten einer Inversion der Spins i und s werden mit W_1^i und W_1^s bezeichnet. Nach Sättigung des Überganges s und dem damit verbundenen Ausgleich der Populationen der Zustände $\alpha\alpha$ und $\beta\alpha$ sowie $\alpha\beta$ und $\beta\beta$ kann das thermische Gleichgewicht nur über Null- (W_0) und Doppelquantenübergänge (W_2) wiederhergestellt werden.

Die Summe aller Kerne im System sei $4N$. Im thermischen Gleichgewicht sind alle Energieniveaus nach der Boltzmann-Verteilung besetzt. Der Energieunterschied zwischen den Niveaus $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ sei vernachlässigbar und beide Niveaus somit gleich besetzt. Das energetisch niedrigste Niveau $\alpha\alpha$ ist um einen Betrag δ stärker populiert, während das Niveau $\beta\beta$ entsprechend weniger besetzt ist. Der Besetzungsunterschied für die Übergänge i und s ($\Delta m=1$) mit der Übergangswahrscheinlichkeit W_1 ist jeweils δ . Der Nullquantenübergang ($\Delta m=0$) mit der Übergangswahrscheinlichkeit W_0 hat den Besetzungsunterschied 0. Und für den Doppelquantenübergang ($\Delta m=2$) mit der Übergangswahrscheinlichkeit W_2 beträgt der Besetzungsunterschied 2δ .

Im NOE-Experiment werden beide s -Übergänge gesättigt und die Veränderung der Resonanzintensität des i -Übergangs nach Einstellung des neuen Gleichgewichts beobachtet. Um sich dem thermischen Gleichgewicht wieder zu nähern sind die Relaxationswege über die s -Übergänge durch die Sättigungsbedingung nicht gangbar, die i -Übergänge sind ebenfalls nicht geeignet, da die Populationsdifferenzen entlang dieser Übergänge mit jeweils δ schon dem Gleichgewicht entsprechen. Die Populationsdifferenz zwischen $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ ist nun aber nicht mehr 0 sondern δ und kann durch Nullquantenrelaxation ausgeglichen werden. Über Doppelquantenrelaxation ist ein Populationsausgleich von $\beta\beta$ nach $\alpha\alpha$ möglich. Im dynamischen Gleichgewicht gilt:

$$\eta_i(s) = \frac{W_2 - W_0}{2W_1^i + W_2 + W_0}$$

Je nachdem, ob W_0 oder W_2 dominiert, ist die Kreuzrelaxationsrate ($W_2 - W_0$) negativ oder positiv. Für $W_2 = W_0$ verschwindet die Kreuzrelaxationsrate. Bei kleinen Molekülen in nicht viskosen Lösungen, die sich schnell umorientieren, wird die Relaxation durch W_2 dominiert (positiver NOE-Effekt) und die molekulare Korrelationszeit τ_c ist kurz. Für Makromoleküle oder organische Moleküle in sehr viskosen Lösungen ist τ_c länger und die Relaxation wird durch W_0 bestimmt (negativer NOE-Effekt). Für die Relaxations-Geschwindigkeiten über dipolare Kopplungen in einem System aus 2 Spins mit Abstand r gilt:

$$W_1^i = \frac{3}{20} \frac{\gamma_i^2 \gamma_s^2 \hbar^2}{r^6} \frac{\tau_c}{1 + \omega_i^2 \tau_c^2}$$

$$W_0 = \frac{1}{10} \frac{\gamma_i^2 \gamma_s^2 \hbar^2}{r^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_i - \omega_s)^2 \tau_c^2}$$

$$W_2 = \frac{3}{5} \frac{\gamma_i^2 \gamma_s^2 \hbar^2}{r^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_i + \omega_s)^2 \tau_c^2}$$

ω_i, ω_s = Resonanzfrequenzen (Larmor-Frequenzen) der Kerne i und s
 τ_c = molekulare Korrelationszeit

Die Intensität des NOE-Effekts ist in erster Näherung proportional zu $1/r^6$, wobei ein Magnetisierungsaustausch zwischen zwei Kernen in der Regel nur dann beobachtet wird, wenn diese weniger als 5 Å voneinander entfernt sind.

2.1.3 3D-NMR-Spektroskopie

Bei den in dieser Arbeit verwendeten dreidimensionalen NMR-Experimenten handelt es sich nicht um „echte“ Tripelresonanzexperimente (^1H , ^{13}C , ^{15}N), sondern um die Verknüpfung von zwei 2D-Experimenten. Die dritte Dimension wird konstruiert, indem nach der ersten Mischperiode statt der Akquisition eine weitere indirekte Evolutionszeit, gefolgt von einer zweiten Mischperiode, eingefügt wird. Die Pulsfolge der verwendeten 3D-NMR-Experimente läßt sich in sechs Blöcke unterteilen: Präparation – Evolution (t_1) – Mischung – Evolution (t_2) – Mischung – Detektion (t_3). Für jedes Zeitinkrement t_2 wird ein kompletter Datensatz (t_1, t_3) aufgenommen. Anschließende Fourier-Transformation in drei Dimensionen ergibt ein dreidimensionales NMR-Spektrum.

2.1.4 NMR-Experimente

Für die homonukleare NMR-Spektroskopie an Proteinen haben sich hauptsächlich drei 2D-Experimente als wesentlich herauskristallisiert: COSY, TOCSY und NOESY. Diese Spektren enthalten die Informationen, die notwendig sind, um die einzelnen Resonanzfrequenzen im Spektrum den entsprechenden Protonen im Protein zuordnen zu können (Wüthrich, 1986).

Das COSY Experiment

Im COSY-Experiment (Correlation Spectroscopy; Aue *et al.*, 1976) erfolgt der Magnetisierungstransfer durch skalare Kopplung. Für aliphatische Verbindungen sind die 4J -Kopplungskonstanten nahezu null, so daß in einem COSY-Spektrum nur Signale von Protonen sichtbar sind, die über zwei bzw. drei Bindungen (2J - und 3J -Kopplungen) miteinander verknüpft sind (Abb. 9).

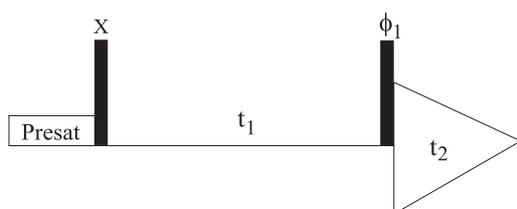


Abb. 9: Pulssequenz für das COSY-Experiment. Der Phasenzyklus ist $\phi_1 = x, -x, y, -y$; Akquisition = $x, -x, y, -y$.

Das TOCSY-Experiment

Im TOCSY-Experiment (Total Correlation Spectroscopy; Braunschweiler & Ernst, 1983) wird über skalare 3J -Kopplung die Magnetisierung sukzessive durch das gesamte Spinsystem eines Moleküls oder einer Molekülkomponente (beispielsweise einer Aminosäure) verteilt. Die Mischung wird während einer Periode erreicht, in der ein Spinlock-Feld angelegt und der Einfluß der chemischen Verschiebung idealerweise vollständig aufgehoben ist (Abb.10). Alle Spins werden dadurch vorübergehend magnetisch äquivalent. Über die Länge des angelegten Spinlock-Feldes läßt sich die Reichweite des Magnetisierungsaustausches steuern. Nach dem Abschalten des Spinlock-Feldes steht die Gleichgewichts-Magnetisierung wieder unter dem Einfluß des Hauptmagnetfeldes.

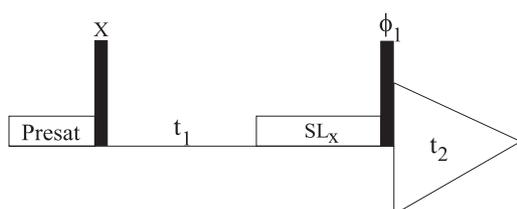


Abb. 10: Pulssequenz für das TOCSY-Experiment. Der Phasenzyklus ist abhängig vom verwendeten Spinlock-Feld (SL).

Das NOESY-Experiment

Für die Strukturbestimmung entscheidend ist das NOESY-Experiment (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy; Jeener *et al.*, 1979). Die Magnetisierung wird durch dipolare Kopplung während der Mischzeit τ_{mix} zwischen den Kernen ausgetauscht (Abb.11). Die Korrelation zweier Protonen durch den Raum ist in der Regel nur bis zu einem Abstand $<5 \text{ \AA}$ beobachtbar. Bei zunehmender Proteingröße und/oder bei starken Signalüberlappungen wird es erforderlich zwecks verbesserter Auflösung und erhöhter Empfindlichkeit ^{13}C oder ^{15}N markierte Proteine für die NMR-Experimente einzusetzen. Im folgenden sollen die beiden wesentlichen 1D-NMR-Techniken zum Kohärenztransfer in heteronuklearen Spinsystemen genauer vorgestellt werden: Die INEPT- und DEPT-Pulssequenz.

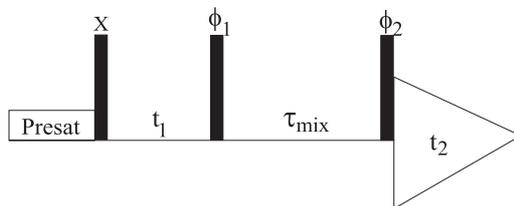


Abb. 11: Pulssequenz für das NOESY-Experiment. Der Phasenzklus ist $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 2(x), 2(-x); 2(y), 2(-y)$; Akquisition = $x, -x, -x, x, y, -y, -y, y$.

Die INEPT-Sequenz

Die INEPT-Pulsfolge (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer; Morris & Freeman, 1979) bietet die Möglichkeit beim Kohärenztransfer von I (hohes γ) nach S (niedriges γ) die Sensitivität um den Faktor γ_I/γ_S zu erhöhen. Der 90° -Anregungspuls auf I erzeugt transversale Magnetisierung, während nach der Zeit Δ je ein 90° -Puls auf beide Kernsorten den Kohärenztransfer bewirkt (Abb.12). Die 180° -Pulse dienen lediglich zur Refokussierung, in der Zeit Δ findet somit nur Kohärenztransfer unabhängig von der chemischen Verschiebung beider Kerne statt. Das Auftreten von Multipletts in Antiphase macht die Interpretation von INEPT-Spektren manchmal schwierig, so daß häufig eine refokussierte INEPT-Pulsfolge (Sørensen & Ernst, 1982) verwendet wird, bei der eine zusätzliche Wartezeit Δ angehängt wird, während der nochmals refokussiert wird.

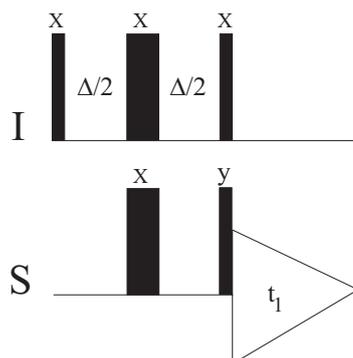


Abb. 12: Pulssequenz für das INEPT-Experiment. Die Wartezeit $\Delta/2$ hat die Länge von $1/4J_{IS}$, so daß sich die skalare Kopplung zwischen den beiden Spins optimal entwickeln bzw. refokussieren kann.

Die DEPT-Sequenz

Der Vorteil der DEPT-Sequenz (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer; Dodrell *et al.*, 1982) gegenüber der INEPT-Sequenz ist, daß sie nicht so stark von Schwankungen der Kopplungskonstanten der I_nS -Spinsysteme abhängt. Die Unterscheidung zwischen verschiedenen I_nS -Spinsystemen erfolgt hier durch einen variablen Flipwinkel β anstatt eines Refokussierungsdelays (Abb.13). Der Kohärenztransfer erfolgt hier ebenfalls unabhängig von der chemischen Verschiebung beider Kerne. Die 180° -Pulse refokussieren die chemischen Verschiebung, sie entwickelt sich erst nach dem variablen Puls β_x für die I-Spins.

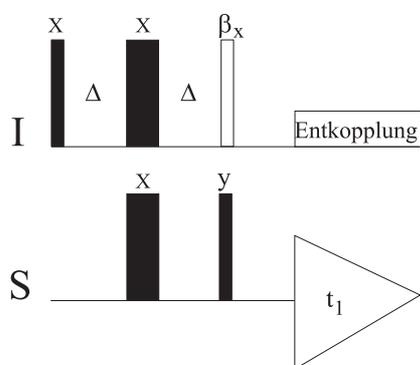


Abb. 13: Pulssequenz für das DEPT-Experiment. Der nicht gefüllte Protonenpuls hat einen Flipwinkel von β° und dient zur optimalen Anpassung der Pulssequenz an IS , I_2S - oder I_3S -Spinsysteme ($\beta = 90^\circ$, $\beta = 45^\circ$, $\beta = 35^\circ$). Die Wartezeit Δ hat eine Länge von $1/2J_{IS}$, so daß sich die skalare Kopplung zwischen den beiden Spins optimal entwickeln bzw. refokussieren kann.

Das ^{15}N HSQC-Experiment

Das ^{15}N HSQC-Experiment (Heteronuclear Single-Quantum Correlation; Bodenhausen & Ruben, 1980) beinhaltet zwei INEPT-Schritte um Magnetisierung von Protonen auf Heterokerne und wieder zurück zu übertragen (Abb.14). Durch die erste INEPT-Sequenz wird ^1H Magnetisierung auf den ^{15}N Heterokern übertragen und befindet sich dort bezüglich des Heterokerns in Antiphase. Protonen werden während der Evolutionszeit t_1 vom Heterokern entkoppelt, indem in der Mitte von t_1 ein 180° Puls angelegt wird. Ein anschließender zweiter INEPT-Schritt überführt die transversale Magnetisierung des ^{15}N Heterokerns wieder in detektierbare Protonenmagnetisierung. Es werden rein absorptive Linienformen erhalten. Man erhält ein zweidimensionales Spektrum von korrelierten Einzelsignalen für jede ^{15}NH -Gruppe im Molekül. Durch Einsatz von Gradienten läßt sich die Sensitivität des Experiments weiter steigern (Kay *et al.*, 1992).

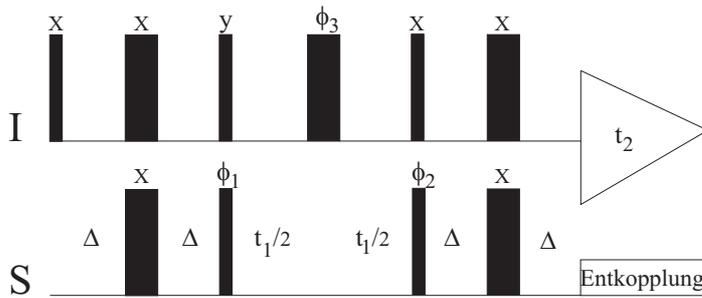


Abb. 14: Pulssequenz für das ^{15}N HSQC-Experiment. Der Phasenzyklus ist $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_3 = 4(y), 4(-y)$; Akquisition = $2(x, -x, -x, x)$. Δ entspricht einer Wartezeit von $1/4J_{\text{IS}}$.

Das ^{15}N HTQC-Experiment

Im ^{15}N HTQC-Experiment (Heteronuclear Triple-Quantum Correlation; Schmidt & Rüterjans, 1990) nutzt man eine modifizierte DEPT-Sequenz um Tripelquantenkohärenzen zu erzeugen. Eine zeitlich umgekehrte DEPT-Sequenz konvertiert die Tripelquantenkohärenzen anschließend wieder in detektierbare Einquantenkohärenzen (Abb.15). Ein 180° -Puls auf den Protonenkanal in der Mitte der t_1 -Zeit vertauscht Tripelquanten- und Einquantenkohärenzen und refokussiert gleichzeitig die chemische Verschiebung der Protonen. Zur Vermeidung phasenmodulierter Signale in der ω_1 -Dimension wird ein Refokussierungspuls auf den Heterokanal eingestrahlt, der gleichzeitig mit dem ersten Protonenmischpuls erfolgt. Dieser Puls bewirkt, daß die ursprüngliche Phasenbeziehung der Heterokern-Magnetisierungskomponenten wieder hergestellt wird und die Signale als reine Absorptionslinien erhalten werden. Es ergibt sich ein zweidimensionales Spektrum von korrelierten Signalen für jede $^{15}\text{NH}_2$ -Gruppe im Molekül.

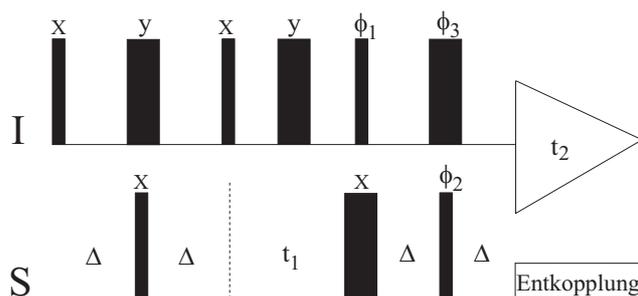


Abb. 15: Pulssequenz des ^{15}N HTQC-Experiments. Der Phasenzyklus ist $\phi_1 = x, x, -x, -x, y, y, -y, -y$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = y, y, -y, -y, -x, -x, x, x$; Akquisition = $x, -x, -x, x, -y, y, y, -y$; $\Delta = 1/2J_{\text{IS}}$.

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

Beim 3D TOCSY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC-Experiment werden die TOCSY- und die HSQC-Pulssequenz kombiniert (Cavanagh *et al.*, 1996). Die Pulssequenz startet mit einer TOCSY-Sequenz auf dem Protonenkanal (Abb.16), während die Heterokerne durch einen 180° -Puls in der Mitte der Evolutionszeit t_1 von den Protonen entkoppelt werden. Dem ersten $90^\circ(^1\text{H})$ -Puls

folgt ein zweiter $90^\circ(^1\text{H})$ -Puls, der die transversale Magnetisierung wieder in z-Magnetisierung für die Mischperiode zurückführt. Die isotrope Spinlock-Feld transferiert ^1H -Magnetisierung u.a. auf die Amidprotonen eines gegebenen Spinsystems. Der $90^\circ(^1\text{H})$ -Puls erzeugt erneut transversale Magnetisierung und leitet die HSQC-Sequenz ein. Nach der Fourier-Transformation ergeben sich ^{15}N -editierte homonukleare TOCSY-Spektren.

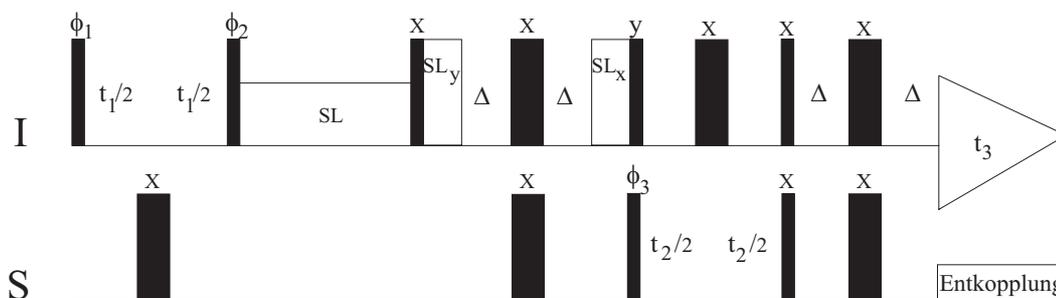


Abb. 16: Pulssequenz für das 3D TOCSY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment. Der Phasenzyklus ist $\phi_1 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_2 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_3 = x, -x$; Akquisition = $x, -x, x, -x, x, x, -x$. Die Spinlock „Reinigungspulse“ (SL) haben eine Länge von 1-2 ms.

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

Das 3D NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment kombiniert die NOESY- und die HSQC-Pulssequenz (Cavanagh *et al.*, 1996). Am Anfang steht die Pulssequenz des homonuklearen NOESY (Abb.17). Während der Evolutionszeit t_1 werden die Heterokerne durch einen 180° -Puls auf dem Heterokanal von den Protonen entkoppelt. Nach der Mischzeit τ_m leitet der $90^\circ(^1\text{H})$ -Puls die HSQC-Pulssequenz ein. Nach der Fourier-Transformation ergeben sich ^{15}N -editierte homonukleare NOESY-Spektren.

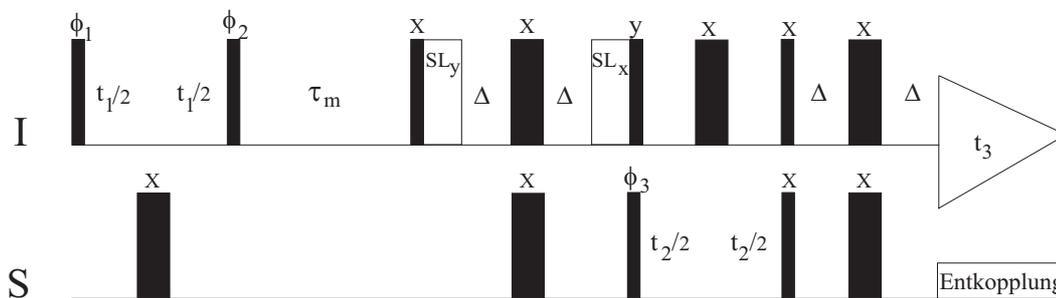


Abb. 17: Pulssequenz für das 3D NOESY-(^{15}N , ^1H)-HSQC-Experiment. Der Phasenzyklus ist $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = x, -x, -x, -x$; $\phi_3 = 4(x), 4(-x)$; Akquisition = $x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$.

2.2 Torsionswinkeldynamikrechnungen mit DYANA

Zur Bestimmung der Lösungsstruktur eines Peptides oder Proteins müssen alle aus den NMR-Daten gewonnenen strukturelevanten Parameter, z. B. interatomare Abstandsbeschränkungen und Winkelinformationen unter Berücksichtigung sterischer Randbedingungen kombiniert werden. Bei der Verwendung von interatomaren Abstandsbeschränkungen, wie sie ein NOESY-Spektrum liefert, kann die Lösungsstruktur mit Hilfe des Programms DYANA (Güntert *et al.*, 1997) berechnet werden. Das Programm arbeitet nach der TAD-Methode (Torsion Angle Dynamics; Stein *et al.*, 1987). Im Diederwinkelraum werden die Standardgeometrien der Aminosäurereste wie Bindungslängen, –winkel und Chiralitäten während der Strukturrechnung konstant gehalten. Die zur Verfügung stehenden Freiheitsgrade sind ausschließlich Diederwinkel. Das Protein wird als Baumstruktur mit einem starren Basiskörper, der im Raum fixiert ist, und n starren Körpern, die durch n rotierbare Bindungen verbunden sind, beschrieben (Abe *et al.*, 1983). Die Baumstruktur startet am N-Terminus des Proteinrückgrates und schreitet über die Seitenketten zum C-Terminus vor. Die Zielfunktion V , gleichzusetzen mit der potentiellen Energie, zeigt, inwieweit die ermittelten Konformationen die experimentellen Daten erfüllen. Es gilt:

$$E_{\text{pot}} = \omega_0 V \quad \text{mit einem Gewichtungsfaktor } \omega_0 = 10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$$

Die Zielfunktion enthält alle Verletzungen der vorgegebenen Abstandsbeschränkungen sowie die van-der-Waals-Abstandsverletzungen für eine bestimmte gerechnete Struktur. Ziel der Strukturrechnung ist die Minimierung dieser Zielfunktion durch Variation der Diederwinkel. Die Zielfunktion V lautet:

$$V = \sum_{c=o,u,v} w_c \sum_{(\alpha,\beta) \in I_c} \left(\frac{d^2 - b^2}{2b} \right)^2 + w_d \sum_{k \in I_d} \left(1 - \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta_k}{\Gamma_k} \right) \right) \Delta_k^2$$

V ist immer positiv, wobei 0 nur erreicht wird, wenn alle experimentellen Abstands- und Winkelbeschränkungen erfüllt sind, sowie keine sterische Überlappung zwischen nicht miteinander verbundenen Atompaares existieren. Die Parameter w_c und w_d sind Wichtungsfaktoren für Bindungs- und Winkelbeschränkungen. In der zweiten Summe werden die oberen und unteren Abstandsverletzungen zwischen zwei Atomen α und β beschrieben, wobei b die Abstandsbeschränkung und d den tatsächlichen Abstand beschreibt. Die letzte Summe faßt die Verletzungen der zulässigen Diederwinkelintervalle zusammen. Dabei ist Δ_k

die vorzeichenbehaftete Größe der Verletzungen eines der Diederwinkelintervalle und Γ_k die Halbwertsbreite des verbotenen Diederwinkelintervalls ($\Gamma_k = \pi - (\theta_k^{\max} - \theta_k^{\min})/2$).

Grundsätzlich besteht hierbei die Gefahr, während der Rechnung in ein lokales Minimum zu gelangen, dessen Zielfunktion größer ist als die des globalen Minimums. Diesem Problem begegnet das Simulated-Annealing-Verfahren: Ein fünftel der TAD-Schritte wird bei einer hohen Temperatur von mehreren tausend Kelvin durchgeführt. Dadurch wird die freie Beweglichkeit des Proteins über der Energiehyperfläche gewährleistet und das Erreichen des globalen Minimums ermöglicht. Für die restlichen Rechenschritte wird die Temperatur sukzessive auf null Kelvin gesenkt.

2.3 Energieminimierung

Die Strukturen der Torsionswinkeldynamikrechnungen entsprechen in der Regel nicht dem energieärmsten Ensemble, so daß eine anschließende Energieminimierung durchgeführt werden sollte. Zur Energieminimierung von Proteinen verwendet das Modul hauptsächlich zwei Algorithmen, die „Steepest Descent“- und „Conjugate Gradient“-Methoden. Der „Steepest Descent“-Algorithmus sucht in gerader Linie entlang des Gradienten $g_i = -\nabla E(r)$ auf der Energiehyperfläche nach einem Energieminimum. Bei jedem Iterationsschritt erfolgt die Richtungssuche dabei orthogonal zum vorherigen Gradienten. Da die Suchrichtung ständig oszilliert und frühere ungünstige Richtungsentscheidungen stets überkorrigiert werden, arbeitet dieser Algorithmus mitunter sehr ineffizient. Der Conjugate Gradient Algorithmus hingegen berücksichtigt das vorangegangene Suchergebnis mit. Dabei wird der Richtungsvektor aus dem vorherigen Schritt, h_i , mit einem Skalierungsfaktor γ_i gewichtet:

$$h_{i+1} = g_{i+1} + \gamma_i h_i \quad \text{mit} \quad \gamma_i = \frac{(g_{i+1} - g_i) \cdot g_{i+1}}{g_i \cdot g_i} \quad (\text{nach Fletcher-Reeves})$$

Dieser Algorithmus ist insbesondere bei flachen Energiehyperflächen sehr effektiv. In der Praxis werden beide Algorithmen kombiniert. Der „Steepest Descent“-Algorithmus wird für die ersten Iterationsschritte eingesetzt, danach wird die Energieminimierung mit dem „Conjugate Gradient“-Algorithmus fortgeführt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach Maniatis *et al.* (1982) durchgeführt.

3.1.1 Kultivierung des *E. coli* Stamms BL21(DE3)

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) wurde auf LB-Platten kultiviert. Bei Verwendung von mit Expressionsplasmid transformierten BL21(DE3) Zellen enthielten die Platten zur Selektion noch zusätzlich die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden die Bakterien auf Agarmedien ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Herstellung von Übernachtskulturen wurde LB-Medium mit den benötigten Antibiotika mit einer Einzelkolonie angeimpft und im Luftbadschüttler bei 37°C angezogen. Die Übernachtskulturen dienten entweder der Isolierung von DNA oder dem Animpfen großvolumiger Flüssigkulturen.

3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte analog der Methode nach Hanahan (1985). 100 ml LB-Medium wurde mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die heranwachsenden Zellen wurden bei Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,3-0,5 für 10 min bei 4°C mit 3000 rpm abzentrifugiert und in 15 ml TF-B₁-Puffer resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml TF-B₂-Puffer resuspendiert. Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden in 200 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen mit DNA-Lösung (10-500 ng) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach abschließender Hitzeschockbehandlung (42°C

für 1 min) wurde der Transformationsansatz mit 400 µl SOC-Medium gemischt, 60 min unter Schütteln bei 37°C vorinkubiert und auf LB-Platten (mit Antibiotika) ausplattiert.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Fermentierung von Rinderherz FABP

9 Liter TB-Medium wurden im Fermenter mit Übernachtskultur im Verhältnis 1 : 100 angeimpft. Als Fermentationsbedingungen wurden 37°C, eine Rührgeschwindigkeit von 330 rpm und ein Luftdruck von 1,3 bar gewählt. Der pH-Wert wurde kontinuierlich gemessen und konstant auf pH 7,2 gehalten. Das Wachstum wurde durch Messungen der OD₆₀₀ verfolgt. Bei einer OD₆₀₀ von 1,2 erfolgte die Induktion mit IPTG (Endkonzentration 0,4 mM). Nach 4 Stunden wurde die Fermentation beendet und die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 x g, 4°C, 15 min).

3.2.2 Isolierung von Rinderherz FABP

Die Aufreinigung des Rinderherz FABP erfolgte leicht abgewandelt nach Lassen (1994).

Aufschluß

Das Zellpellet wurde mit Aufschlußpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 40 mM NaCl; 0,05% NaN₃; Pefablock 0,5 mg/ml) resuspendiert und auf 90 ml Volumen eingestellt. Die Suspension wurde mittels Ultraschallhomogenisator (6 x 20 Pulse bei 200 Watt) im Eisbad aufgeschlossen und die Zelltrümmer anschließend bei 4°C mit 80000 x g für 45 min abzentrifugiert.

DNA-Fällung

Der Überstand wurde bei 4°C langsam unter Rühren mit Protaminsulfat bis zu einer Konzentration von 1,44% (w/v) versetzt. Nach 30 min Rühren wurde der Niederschlag bei 4°C mit 30000 x g für 45 min abzentrifugiert.

Entsalzung

Eine Gelfiltrationschromatographie wurde bei 4°C mit einer Schwerkraftsäule durchgeführt.

Säulenmaterial: Sephadex G25 (Pharmacia)

Säulenparameter: Größe 20 x 3 cm; Füllmenge 140 ml

Flußrate:	2 ml/min
Puffer:	10 mM Tris pH 7,4; 40 mM NaCl; 0,05% NaN ₃

Die Sephadex G25 Säule wurde mit fünf Säulenvolumina Puffer äquilibriert. Der Überstand der DNA-Fällung wurde portionsweise (je 25 ml) aufgetragen und der Durchbruch durch UV-Detektion bei 280 nm verfolgt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe 2.5.6) analysiert.

Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde am FPLC-System (Pharmacia, Schweden) durchgeführt.

Säulenmaterial:	Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Schweden)
Säulenparameter:	Größe 19 x 6 cm; Füllmenge 540 ml
Flußrate:	5 ml/min (Auftragen und Spülen)
Puffer A:	20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 0,05% NaN ₃
Puffer B:	1 M NaCl

Das Eluat der Entsalzungssäule wurde auf die mit fünf Säulenvolumina Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen und der Durchbruch aufgefangen. Die gesammelten Fraktionen wurden durch UV-Detektion bei 280 nm verfolgt. Die gebundenen *E. coli* Proteine wurden mit Puffer B eluiert und verworfen. Die proteinhaltigen Fraktionen des Durchbruchs wurden gesammelt und für die anschließende Gelfiltration in einer Druckfiltrationszelle (Membran YM 10) eingeeengt.

Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie wurde am FPLC-System (Pharmacia, Schweden) durchgeführt.

Säulenmaterial:	Superdex G75 (Pharmacia, Schweden)
Säulenparameter:	Größe 60 x 2,5 cm; Füllmenge 300 ml
Flußrate:	0,8 ml/min
Puffer:	100 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,4; 0,05% NaN ₃

Die Superdex G75 Säule wurde mit fünf Säulenvolumina Puffer bei gegebener Flußrate äquilibriert. Das eingengte Eluat der Anionenaustauschchromatographie wurde in Volumina von je 10 ml aufgetragen und die gesammelten Fraktionen durch UV-Detektion bei 280 nm verfolgt. Die Reinheit des so erhaltenen FABP wurde mit SDS-PAGE analysiert (siehe 3.4.5).

3.2.3 Delipidierung von H-FABP

Die Affinitätschromatographie wurde bei Raumtemperatur mit einer Schwerkraftsäule durchgeführt.

Säulenmaterial:	Lipidex 5000 (Canberra-Packard)
Säulenparameter:	5 x 11 cm, Füllmenge 220 ml
Flußrate:	0,5 ml/min
Puffer:	20 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,4; 0,05% NaN ₃

Die Delipidierung basiert auf einer Methode von Glatz und Veerkamp (1983). 40 mg aufgereinigtes FABP wurden auf die mit zehn Säulenvolumina Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen und die gesammelten Fraktionen durch UV-Detektion bei 280 nm verfolgt. Das Lipidexmaterial wurde anschließend mit Methanol regeneriert und erneut mit Puffer äquilibriert. Die eluierten Proteinfractionen wurden gesammelt, aufkonzentriert und nochmals delipidiert. Ein Teil des delipidierten H-FABP wurde direkt NMR-spektroskopisch (siehe 3.2.6) untersucht, der andere Teil wurde relipidiert.

3.2.4 Relipidierung von H-FABP

Wenn kein Fettsäuresalz käuflich erhältlich war, wurde die Fettsäure in einer ethanolischen KOH-Lösung gelöst. Die ethanolische Phase wurde anschließend an einem Rotationsverdampfer abdestilliert und das erhaltene Fettsäuresalz in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) aufgenommen. Delipidiertes H-FABP wurde im Unterschuß (je nach Löslichkeit der Fettsäure) zugesetzt und das Volumen auf 20 ml eingestellt. Die Lösung wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ungebundene Fettsäuren wurden durch Umpuffern entfernt (siehe 3.2.6) und die relipidierten FABP Proben NMR-spektroskopisch untersucht.

3.2.5 Analytik von H-FABP

GC-Analyse

Der Delipidierungs- bzw. Relipidierungsgrad des H-FABP wurde durch gaschromatographische Analyse bestimmt. Dazu wurde 1 mg H-FABP mit 3 µg C17-Fettsäure als internem Standard versetzt, 30 min bei -80°C eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Die Aufarbeitung der Proben nach Müller *et al.* (1990) und die anschließende Analyse durch GC erfolgte freundlicherweise durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schubert-Zsilavec am Institut für Pharmazeutische Chemie.

Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach Lämmli (1970) erfolgte die SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen.

Die Gele wurden etwa 15 min bei 50°C gefärbt (0,1% PhastGel Blue R, 40% Methanol, 10% Essigsäure) und anschließend bis zur gewünschten Aufhellung des Hintergrundes entfärbt (40% Methanol, 10% Essigsäure, 5% Glycerin).

Konzentrationsbestimmung von H-FABP

Alle Konzentrationsbestimmungen von H-FABP erfolgten UV-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ ($E_{280}^{1\%} = 0,81$; Jagschies *et al.*, 1985).

3.2.6 NMR-Probenvorbereitung

Für NMR-Messungen wurde die Proteinlösung in einem Vivaspin-Konzentrator bei 4°C mit $3000 \times g$ auf NMR-Puffer (20 mM K_2HPO_4 , pH variabel; 0,05% NaN_3) umgepuffert, auf 0,5 ml eingengt und mit 10% D_2O versetzt.

Beim H-FABP aus Rind wurde der NMR-Puffer auf pH 5,5 eingestellt; für die B-FABP-Proben betrug der pH 7,0. Das H-FABP aus Mensch wurde beim Mutantenvergleich auf pH 7,0 eingestellt, bei der Analyse der Signaltheterogenitäten mit pH 5,5. Bei einigen Mutanten war es erforderlich, dem NMR-Puffer 1 M Harnstoff (F4E, L66G, E72S) oder sogar 2 M Harnstoff (F4S/W8E, W8E) hinzuzufügen.

3.3 Aufnahme der NMR-Experimente

Die NMR-Experimente wurden mit einem Bruker DMX 600 Spektrometer bei den Resonanzfrequenzen von 600,13 MHz (^1H) und 60,82 MHz (^{15}N) bei 298 K durchgeführt. Es wurde ein Tripelresonanz-Probenkopf ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) mit XYZ-Gradientenkapazität verwendet. Für das Spinlockfeld aller TOCSY-Experimente wurde die MLEV-17 Pulssequenz verwendet (Bax & Davis, 1985). Für das HSQC und die 3D-Experimente wurden Gradienten zur Kohärenzselektion sowie zur Wasser- und Artefaktunterdrückung eingesetzt (Kay *et al.*, 1992; Schleucher *et al.*, 1993). Die homonuklearen 2D-NMR-Experimente wurden mit Quadraturdetektion nach dem TPPI-Verfahren (Time Proportional Phase Incrementation; Marion & Wüthrich, 1983) phasensensitiv aufgenommen, das HSQC und 3D-Experimente nach der Echo/Antiecho-Methode. Die Prozessierung und Darstellung der Spektren erfolgte auf Silicon Graphics Rechnern mit der Bruker-Software XWIN-NMR 1.3 und AURELIA 2.5.9 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland).

3.3.1 Spektren der H-FABP Mutanten

Die NMR-Proben lagen in einer Konzentration von 1-4 mM in 20 mM Phosphatpuffer ($\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O} = 90:10$ v/v) bei pH 7,0 mit 0,05 % NaN_3 vor. Aus Stabilitätsgründen mußten die Mutanten F4E, L66G und E72S zusätzlich mit 1M Harnstoff, die Mutanten W8E und F4S/W8E mit 2M Harnstoff vermessen werden. Die Experimente wurden bei 298 K durchgeführt. Die Spektren wurden mit 3-Trimethylsilyl[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$]propionat als externe Referenz kalibriert (Wishart *et al.*, 1995).

1D ^1H -NMR: Die 1D ^1H -NMR-Experimente wurden unter Sättigung der H_2O -Lösungsmittelresonanz mit einer spektralen Weite von 8389 Hz aufgenommen. Der FID von 16 K Größe wurde vor der Fourier-Transformation mit einer Sinus-Funktion multipliziert und mit Nullen aufgefüllt.

$^1\text{H}/^1\text{H}$ -TOCSY und $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY: Die $^1\text{H}/^1\text{H}$ -TOCSY- und $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-Experimente wurden bei einer spektralen Weite von jeweils 8389 Hz mit 512 Datenpunkten in der t_1 -Dimension und 2048 Datenpunkten in der t_2 -Dimension aufgenommen. Die Mischzeit des NOESY-Experiments betrug 200 ms, das Spinlock-Feld der TOCSY-Experimente betrug 3 ms (um nur ^3J -Kopplung wie im COSY zu ermöglichen) bzw. 80 ms. Die Sättigung der H_2O -Lösungsmittelresonanz erfolgte bei TOCSY und NOESY während des Relaxationsdelays, beim NOESY auch noch teilweise während der Mischzeit. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID zum Erhalt einer 2048 x 2048 Datenmatrix mit Nullen aufgefüllt, in der t_1 -

Dimension mit einer Sinus-Funktion und in der t_2 -Dimension mit einer Sinusquadrat-Funktion multipliziert. Eine anschließende Basislinienkorrektur erfolgte in der ω_2 -Dimension mit einem Polynom fünfter Ordnung.

3.3.2 Spektren mit delipidiertem und relipidiertem H-FABP

Die NMR-Proben lagen in einer Konzentration von 1-3 mM in 20 mM Phosphatpuffer ($H_2O:D_2O = 90:10$ v/v) bei pH 5,5 mit 0,05 % NaN_3 vor. Die Experimente wurden bei 310 K durchgeführt. Für die Kalibrierung wurde 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat als externe Referenz verwendet (Wishart *et al.*, 1995).

$^1H/^1H$ -TOCSY und $^1H/^1H$ -NOESY: Die $^1H/^1H$ -TOCSY- und $^1H/^1H$ -NOESY-Experimente wurden wie unter 3.1.1 beschrieben durchgeführt.

3.3.3 B-FABP Spektren

Die homonuklearen und ^{15}N -markierten NMR-Proben lagen in einer Konzentration von 2-4 mM in 20 mM Phosphatpuffer ($H_2O:D_2O = 90:10$ v/v) bei pH 7,0 mit 0,05 % NaN_3 vor. Die Experimente wurden bei 298 K durchgeführt. Die Entkopplung der Heterokerne wurde bei allen ^{15}N -NMR-Experimenten während der Datenaufnahme wurde mit einer GARP Sequenz durchgeführt. Die Spektren wurden mit 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat als externe Referenz kalibriert (Wishart *et al.*, 1995).

$^1H/^1H$ -TOCSY und $^1H/^1H$ -NOESY: Die $^1H/^1H$ -TOCSY- und $^1H/^1H$ -NOESY-Experimente wurden mit einer spektralen Weite von jeweils 9615 Hz für beide Dimensionen wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt.

HSQC: Das HSQC-Experiment wurde ungefalt (gefaltet) mit einer spektralen Weite von 9615 Hz (9615 Hz) für die 1H -Dimension (t_2) und 6446 Hz (1946 Hz) für die ^{15}N -Dimension (t_1) aufgenommen. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID zum Erhalt einer 2048 x 1024 Datenmatrix mit Nullen aufgefüllt und in beiden Dimensionen mit einer um $\pi/2$ verschobenen Sinusquadrat-Funktion multipliziert.

HTQC: Das HTQC-Experiment wurde mit einer spektralen Weite von 2097 Hz für die 1H -Dimension (t_2) und 425 Hz für die ^{15}N -Dimension (t_1) aufgenommen. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID zum Erhalt einer 1024 x 512 Datenmatrix mit Nullen aufgefüllt und in beiden Dimensionen mit einer um $\pi/3$ verschobenen Sinusquadrat-Funktion multipliziert.

3D TOCSY- $(^{15}\text{N},^1\text{H})$ -HSQC: Das 3D TOCSY- $(^{15}\text{N},^1\text{H})$ -HSQC-Experiment wurde mit einer spektralen Weite von 9615 Hz für beide ^1H -Dimensionen (t_1 und t_2) und 1946 Hz für die ^{15}N -Dimension (t_3) aufgenommen. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID zum Erhalt einer $1024 \times 256 \times 128$ Datenmatrix mit Nullen aufgefüllt und in allen Dimensionen mit einer um $\pi/2$ verschobenen Sinusquadrat-Funktion multipliziert.

3D NOESY- $(^{15}\text{N},^1\text{H})$ -HSQC: Das 3D NOESY- $(^{15}\text{N},^1\text{H})$ -HSQC-Experiment wurde mit einer spektralen Weite von 9615 Hz für beide ^1H -Dimensionen (t_1 und t_3) und 1946 Hz für die ^{15}N -Dimension (t_2) aufgenommen. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID zum Erhalt einer $2048 \times 256 \times 128$ Datenmatrix mit Nullen aufgefüllt und in allen Dimensionen mit einer um $\pi/2$ verschobenen Sinusquadrat-Funktion multipliziert.

3.4 Strukturbestimmung

Für die Bestimmung der Struktur des humanen B-FABP wurde die in Abbildung 18 schematisch gezeigte Vorgehensweise gewählt:

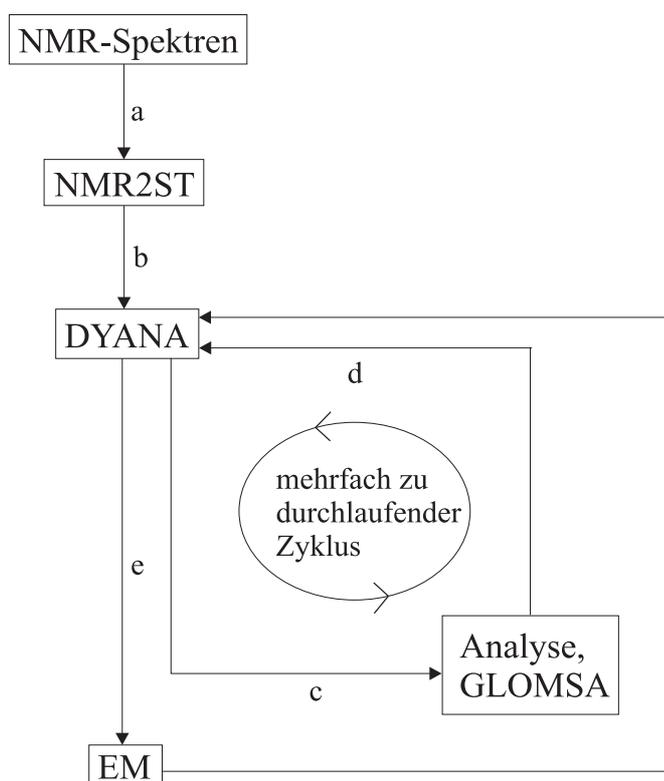


Abb. 18: Schema der Strukturbestimmung:

- Kalibrierung der aus den NOESY-Spektren gewonnenen NOE-Abstandsbeschränkungen
- Automatisierte Generierung der NOE-Abstandsbeschränkungen mit NMR2ST
- Torsionswinkeldynamikrechnung mit DYANA
- Analyse der Konformere, stereospezifische Analyse prochiraler Gruppen mit GLOMSA
- Energieminimierung der Konformere

3.4.1 Automatisierte Generierung der NOE-Abstandsbeschränkungen mit NMR2ST

Die aus homo- und heteronuklearen NOESY-Spektren gewonnenen NOE-Abstandsbeschränkungen wurden intern kalibriert und in Kategorien von 2,5, 3,0, 3,5, 4,5 und 6,0 Å eingeteilt. Als Orientierung dienten gut aufgelöste intramolekulare NOE-Kreuzsignale (z.B. Glycin H α) sowie Signale, die für α -Helix oder β -Faltblatt charakteristisch sind. Unter Zuhilfenahme einer sehr ähnlichen Ausgangsstruktur (Balendiran *et al.*, 2000) wurde eine Zuordnung der NOE-Signale mit dem Programm NMR2ST (Pristovšek *et al.*, 2000) erhalten.

3.4.2 Stereospezifische Analyse prochiraler Gruppen mit GLOMSA

Das Programm GLOMSA (Güntert *et al.*, 1991) ist ein Hilfsmittel zur stereospezifischen Analyse prochiraler Gruppen. Es invertiert die Protonen prochiraler Methylen- und Isopropylgruppen und vergleicht von beiden Alternativen die Summe aller Abstandsverletzungen. Die neu gewonnen stereospezifischen Informationen werden in anschließenden DYANA-Läufen verwendet. Chemisch äquivalente Protonen und nicht zugeordnete Stereopartner werden von DYANA nach Wüthrich *et al.* (1983) als Pseudoatome behandelt (Tab. 4).

Tab. 4: Pseudoatomkorrekturen in (Å) für chemisch äquivalente Protonen zur verbesserten Angabe von NOE-Abstandsbeschränkungen in Proteinen. Die Großbuchstaben A, B, G, D, E und H wurden in Übereinstimmung mit den Positionen der Seitenkettenprotonen in den jeweiligen Aminosäuren verwendet (Wüthrich *et al.*, 1983).

Chemisch äquivalente Protonen	Pseudoatome	Korrekturfaktor (Å)
Methylen-Gruppe	QA, QB, QG, QD, QE, QH	0,9
Methyl-Gruppe	QG, QD	1,1
Isopropyl-Gruppe	QQG, QQD	2,3
Phenylring (H δ oder H ϵ)	QD, QE	2,2
Phenylring (alle Protonen)	QR	2,5

Zur Verfeinerung der Lösungsstruktur des humanen B-FABP wurde ein strukturgefilterter Iterationsprozeß durchlaufen (siehe Abb. 18). Es wurden jeweils 100 Strukturen gerechnet, die Abstandsverletzungen der 20 besten Konformere anhand der NMR-Spektren analysiert und die Abstandsbeschränkungen falls erforderlich korrigiert. Mit den verbesserten NOE-Abstandsbeschränkungen wurden so oft neue DYANA-Läufe gestartet, bis die Zielfunktion einen Wert $< 1 \text{ \AA}^2$ erreichte. Ab diesem Zeitpunkt wurde zusätzlich das Programm GLOMSA (Güntert *et al.*, 1991) eingesetzt. Mit insgesamt 106 stereospezifischen Zuordnungen wurden

schließlich 300 Strukturen in 8000 Annealing-Schritten gerechnet. Die 20 besten Strukturen mit einer Zielfunktion $< 0,1 \text{ \AA}^2$ wurden energieminiert. Hierfür wurde das Modul DISCOVER 2.9.5 des Programmpakets INSIGHT II (Molecular Simulations Inc., San Diego, USA) verwendet. Das Programm rechnet mit dem CVFF-Kraftfeld. Neu aufgetretene Abstandsverletzungen wurden überprüft, korrigiert und in weitere DYANA-Rechnungen eingespeist.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Teil I: Das H-FABP

4.1.1 Präparation

4.1.1.1 Expression und Isolierung von Rinderherz FABP

Die Expression der pI 5,1 Isoform (Billich *et al.*, 1988) von rekombinantem Rinderherz FABP erfolgte nach frischer Transformation (siehe 3.1.2) des Expressionskonstruktes (Oudenhampsen, 1992) mit dem zusätzlichen Plasmid pLysS in den *E. coli* Stamm BL21(DE3). Die Isolierung des H-FABP aus Rind wurde, wie unter 3.2.1/3.2.2 beschrieben, durchgeführt. Nach Aufschluß der Expressionszellen durch Ultraschall und anschließender DNA-Fällung wurde die Proteinlösung durch Umpuffern auf 20 mM Tris/HCl (pH 7,4; 0,05% NaN₃) für die Anionenaustauschchromatographie vorbereitet. Das FABP bindet nicht an das Säulenmaterial und erscheint im Durchbruch. Bei der darauffolgenden Gelfiltration wurde das H-FABP mit 100 mM K₂HPO₄ (pH 7,4; 0,05% NaN₃) abschließend gereinigt. Die Elutionsprofile des H-FABP bei der Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration sind in Abb. 19 dargestellt. Die Ausbeute an Rinderherz FABP betrug im Durchschnitt 60 mg pro Liter Medium.

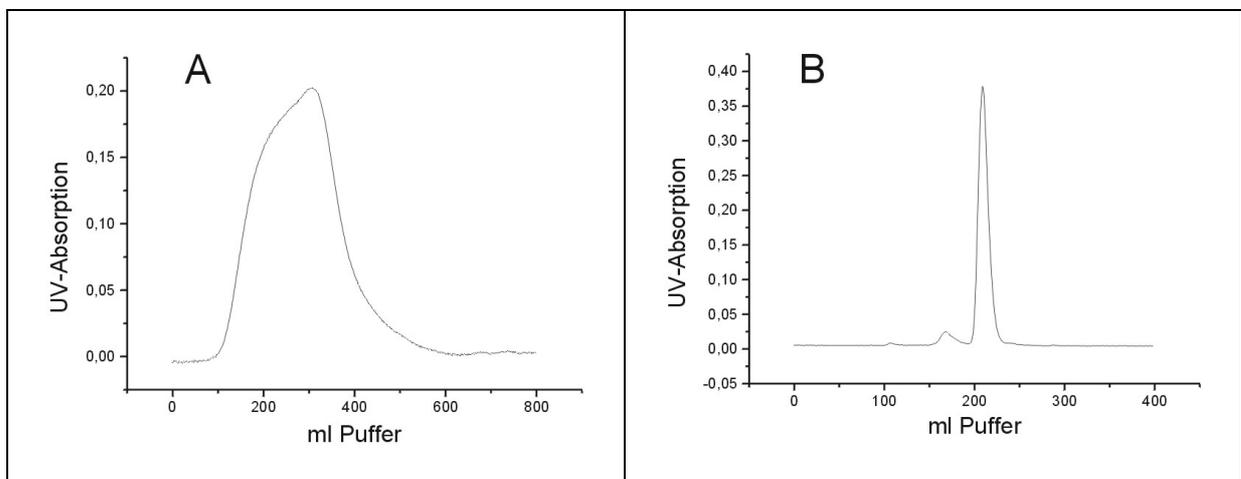


Abb. 19: Elutionsprofile der (A) FAST-Q Anionenaustauschchromatographie und (B) Superdex G75 Gelfiltration. Der Hauptpeak der Gelfiltration enthält reines H-FABP, welches mittels SDS-PAGE analysiert wurde.

Die gelelektrophoretische Analyse (siehe 3.2.5) der vereinigten Gelfiltrationsfraktionen des Hauptpeaks zeigt die hohe Reinheit des H-FABP. In Spur 1 des SDS-Gels (Abb. 20) ist nur noch die H-FABP-Bande zu erkennen.

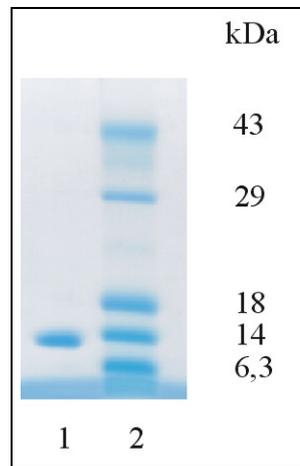


Abb. 20: Nachweis der Reinheit des präparierten H-FABP mit SDS-PAGE. Bahn 1 zeigt H-FABP nach der Gelfiltration, Bahn 2 den Molekulargewichtsmarker (Low Range).

4.1.1.2 Delipidierung und Relipidierung von Rinderherz FABP

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Protonenspinsystem-Heterogenitäten war es erforderlich, die endogen an H-FABP gebundenen Fettsäuren zu entfernen (siehe 2.4.3). Für jede NMR-Probe wurden 40 mg Protein eingesetzt und zweimal delipidiert, um zwischen 15 - 18 mg delipidiertes H-FABP zu erhalten (37-45 % Ausbeute).

Das so delipidierte H-FABP wurde mit Palmitinsäure (C16:0; 1:5), Palmitoleinsäure (C16:1; 1:5), Stearinsäure (C18:0; 1:1) oder Ölsäure (C18:1; 1:3) relipidiert, wie unter 3.2.4. beschrieben, wobei die jeweilige Fettsäure im Überschuß vorlag.

4.1.1.3 GC-Analyse von Rinderherz FABP

Zur Untersuchung der endogen am H-FABP gebundenen Fettsäuren wurde eine gaschromatographische Analyse durchgeführt (siehe 2.4.5). Da *E. coli* Bakterien, in denen das H-FABP exprimiert wurde, nur geradzahlige Fettsäuren synthetisieren können, wurde zur GC-Analyse eine definierte Menge Margarinsäure (C17:0) als interner Standard zugesetzt. Die Peakfläche der Margarinsäure wurde ins Verhältnis zu den anderen Fettsäurepeaks gesetzt und auf diese Weise der Lipidierungsgrad bestimmt. Vor und nach zweimaliger Delipidierung wurde für das H-FABP ein Beladungsgrad von 82% bzw. 21% ermittelt. Nach der Relipidierung war keine quantitative Analyse möglich. Die jeweils zugesetzten Fettsäuren waren aber in sehr großer Menge im Verhältnis zum Standard nachweisbar, so daß eine vollständige Relipidierung angenommen werden konnte.

4.1.2 Spinsystem-Heterogenitäten beim H-FABP aus Mensch und Rind

4.1.2.1 Spinsystem-Heterogenitäten

Für das native H-FABP aus Rind wurden 23 Spinsystem-Heterogenitäten gefunden (Lücke *et al.*, 1992). Diese mehrfach vorkommenden Spinsysteme repräsentieren verschiedene stabile konformationelle Zustände, die innerhalb der NOESY-Zeitskala von 100-200 ms nicht untereinander austauschen. Abb. 21 zeigt die Aminosäurereste mit mehrfachen Spinsystemen im nativen Rinderherz FABP.

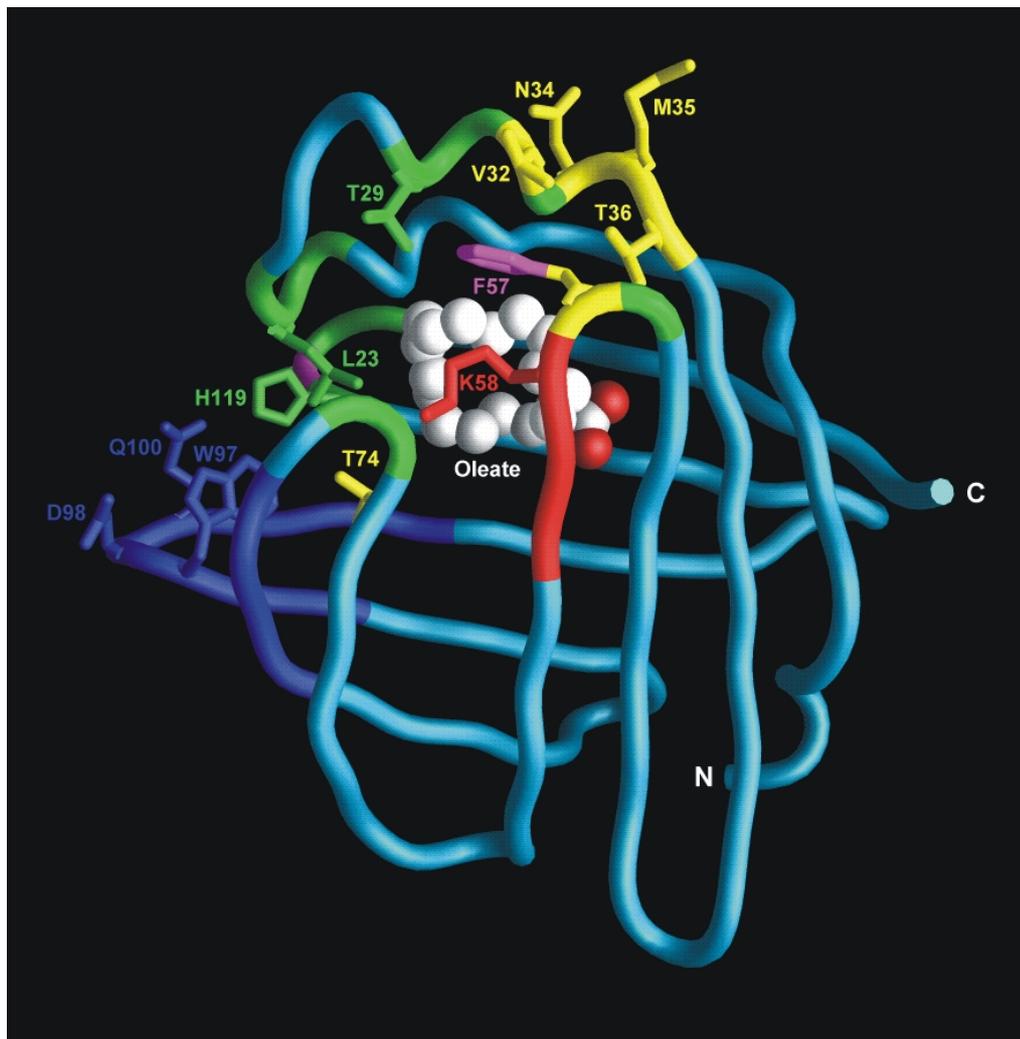


Abb. 21: Graphische Darstellung der Aminosäurereste mit mehrfachen Spinsystemen im nativen Rinderherz FABP. Das Auftreten von Spinsystem-Heterogenitäten im Proteinrückgrat und den Aminosäureseitenketten sind getrennt, aber in der gleichen Farbkodierung dargestellt. Grün, gelb und rot stehen für zweifach, dreifach und vierfach auftretende Protonenspinsysteme. Bereiche in Magenta zeigen verschmierte (G120 Proteinrückgrat) oder fehlende (F57 Ring) Protonenresonanzen. Unterschiede zwischen Protonenresonanzen der pI 5,1 und pI 4,9 Isoformen sind dunkelblau gekennzeichnet. Grundlage der hier dargestellten Struktur ist die Röntgenstruktur des humanen H-FABP mit Ölsäure als Ligand (Young *et al.*, 1994).

Die Spinsystem-Heterogenitäten treten hauptsächlich um die sogenannte Portalregion herum auf, d. h. in Helix α -II und in den Schleifenregionen zwischen den Strängen β C und β D sowie β E und β F. Man vermutet, daß durch diese Portalregion auch der Ein- und Austritt des Fettsäureliganden erfolgt (Scapin *et al.*, 1993). Deutlich beobachtbar sind die vierfachen Protonenspinsysteme von K58, N59 und T60. Vier separate Kreuzsignale sind in den TOCSY-Spektren für die HN-C α H Konnektivität zwischen N59 und T60 beobachtbar (Abb.22; oberes linkes Spektrum). Das dazugehörige NOESY-Spektrum zeigt jeweils genau ein sequentielles $d_{\alpha N(i,i+1)}$ Signal zwischen den entsprechenden Spinsystemen von N59 und T60 (Abb.22; unteres linkes Spektrum).

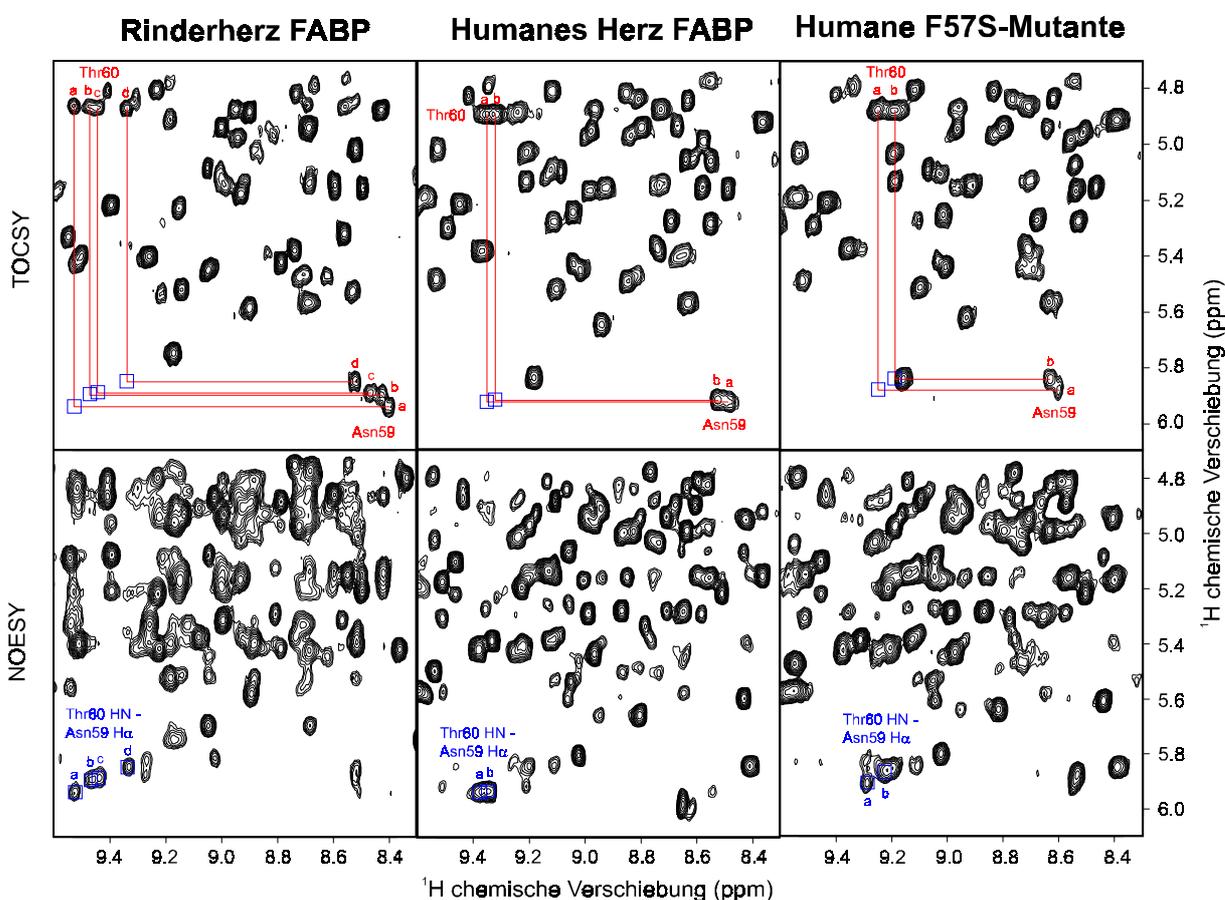


Abb. 22: Die TOCSY-Spektren (obere Reihe) zeigen die Spinsystem-Heterogenitäten im Proteinerückgrat (HN-C α H Kreuzsignale) für N59 und T60. In den NOESY-Spektren (untere Reihe) finden sich NOE-Kreuzsignale für jeden einzelnen konformationellen Zustand der beiden Aminosäuren. Im Falle des nativen H-FABP aus Rind wurden vier separate Protonenspinsysteme (a-d) beobachtet, während für rekombinantes humanes H-FABP und die humane F57S Mutante lediglich zwei Spinsysteme (a und b) für N59 und T60 sichtbar waren. Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen den beiden humanen Proteinen werden durch die Mutation des F57 Rings hervorgerufen.

In einer anderen Region des nativen Rinderherz FABP um den Rest 98 herum (Abb. 21; dunkelblau eingefärbt) treten ebenfalls Protonenspinsystem-Heterogenitäten auf. Die Ursache hierfür ist ein zweite Proteinisoform (pI 4,9). Im rekombinanten H-FABP aus Rind sind diese Heterogenitäten nicht vorhanden, da nur die pI 5,1 Isoform kloniert wurde (Billich *et al.*, 1988).

Die Ursache der Heterogenitäten war lange Zeit unklar. Lu *et al.* (2000) postulierten als mögliche Erklärung für das CRBP II unterschiedliche Konformationen des Proteins. In mehreren Röntgenstrukturen verschiedener FABPs, inklusive H-FABP, wurde je nach Ligand eine unterschiedliche Position des F57-Rings gefunden (Scapin *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1994; Eads *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1993). Demnach könnte die F57-Seitenkette sich abhängig von der Kettenlänge der Fettsäure orientieren. Da F57 ein hochkonservierter Rest in der FABP-Familie ist, nahm man an, daß er möglicherweise als beweglicher Deckel für die Portalregion fungiert. In NMR-Spektren führen unterschiedlich orientierte aromatische Ringsysteme oft zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenzen benachbarter Kerne durch den sogenannten „Ringstromeffekt“. Die Heterogenitäten könnten also durch unterschiedliche Stellungen des F57-Rings hervorgerufen werden. Wie weiter unten diskutiert, ist dies jedoch nicht die Begründung für das Auftreten der Spinsystemheterogenitäten.

4.1.2.1 Humanes H-FABP

Analog zum Rinderherz FABP zeigt das humane H-FABP (89% Sequenzhomologie) ebenfalls Heterogenitäten für die Reste N59 und T60. Obwohl die Spinsysteme nicht mehr vierfach auftraten (Abb. 22; mittleres Spektrenpaar), sind immer noch zwei Konformationen für beide Aminosäuren erkennbar. Um den Ringstromeffekt des F57-Rings als Ursache für die Heterogenitäten auszuschließen, wurden TOCSY und NOESY-Spektren einer F57S-Mutante des humanen H-FABP (Prinsen *et al.*, 1996) aufgenommen (Abb. 22, rechtes Spektrenpaar). Diese Mutante zeigt im Gegensatz zu analogen Mutanten des A-FABP und I-FABP keine verringerte Bindungsaffinität relativ zum Wildtyp (Prinsen *et al.*, 1996). Da auch für diese F57S Mutante des humanen H-FABP zweifach auftretende Spinsysteme in der Portalregion erkennbar sind, kann somit der Ringstromeffekt eines beweglichen F57-Rings nicht die Ursache für die beobachteten Spinsystem-Heterogenitäten sein. Vielmehr scheinen die Spinsystem-Heterogenitäten unterschiedliche Konformationen des Proteinrückgrates zu repräsentieren, wie weiter unten angedeutet.

4.1.2.3 Fettsäureliganden

Um die Verteilung der Spinsystem-Heterogenitäten in den NMR-Spektren abhängig von der gebundenen Fettsäure zu untersuchen, wurden die Rinderherz FABP-Proben zuerst delipidiert und anschließend mit unterschiedlichen Fettsäuren relipidiert (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Eine GC-Analyse (siehe 3.2.5) zeigte, daß bestenfalls 80% der endogenen Fettsäuren nach zweimaliger Delipidierung mit der Lipidex-Methode (Glatz & Veerkamp, 1983) entfernt werden konnten. Wahrscheinlich ist die starke Bindungsaffinität des H-FABP im Vergleich zu anderen FABPs der Grund für die unvollständige Delipidierung. Abhängig von der jeweiligen Proteinpräparation waren in den TOCSY-Spektren unterschiedliche Verhältnisse der HN-C α H Kreuzsignale für N59 beobachtbar (Abb. 23). Die Summe der Peakvolumina aller vier Kreuzsignale entspricht dem mittleren Peakvolumen des HN-C α H Signals von

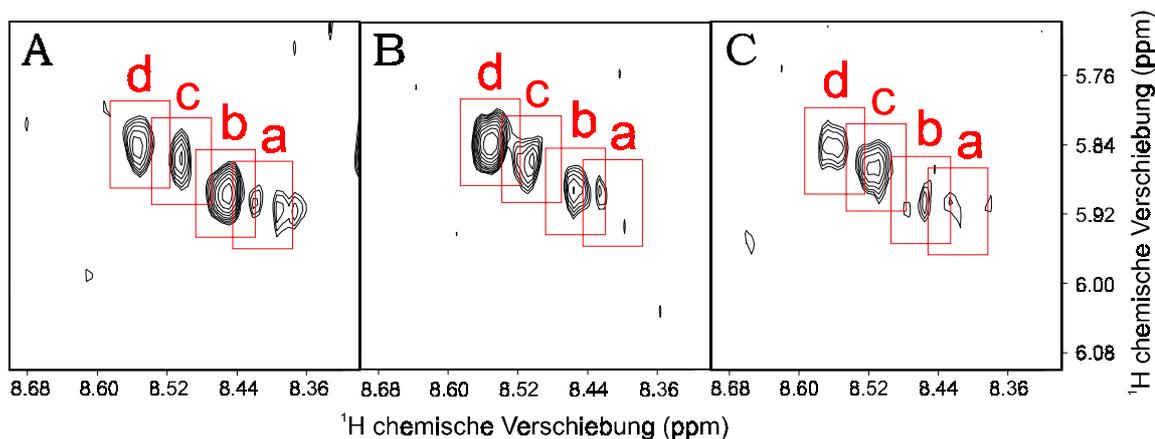


Abb. 23: Ausschnitt aus den TOCSY-Spektren drei verschiedener delipidierter Proben von rekombinanten H-FABP aus Rind (A, B, C). Die Fluktuationen der Spinsystem-Heterogenitäten von N59 zeigen keine Bevorzugung eines bestimmten Konformationszustandes im apo-Protein.

Aminosäureresten, die nur ein einziges Protonenspinsystem aufweisen. Da nur noch 20% der Proteinprobe lipidiert sind (GC-Analyse, siehe 3.2.5), repräsentieren 80% der aufaddierten Peakvolumina die apo-Form. Keines der vier Signale ist eindeutig dominant in allen delipidierten Proben, so daß ein langsamer Austausch zwischen den Konformationen für das apo H-FABP angenommen werden kann.

Die delipidierten Proben wurden mit Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Ölsäure oder Stearinsäure relipidiert (siehe 3.2.4). Die TOCSY-Spektren (Abb. 24) zeigen eindeutig, daß durch die jeweilige Fettsäure ein einzelnes HN-C α H Signal betont wird, welches auf einen bevorzugten Konformationszustand des Proteinrückgrates hindeutet. Für N59 konnten somit die vier HN-C α H Kreuzsignale mit (A) Palmitoleinsäure (C_{16:1}), (B) Palmitinsäure (C_{16:0}), (C)

Ölsäure ($C_{18:1}$) bzw. (D) Stearinsäure ($C_{18:0}$) gleichgesetzt werden. Eine direkte Abhängigkeit zwischen der Konformation des Proteinrückgrates und der Kettenlänge des gebundenen Fettsäureliganden ist daher naheliegend. Die teilweise noch lipidierten Proteinproben in Abb. 23 wurden mit einem Überschuß Fettsäure relipidiert (siehe 3.2.4). Z.B. wurde die H-FABP Probe aus Abb. 23 A mit einem Überschuß Stearinsäure ($C_{18:0}$) versetzt. Das Spektrum der erhaltenen Probe in Abb. 24 D zeigt, daß Konformationszustand a (Stearinsäure ($C_{18:0}$)) nun dominierend ist. Die Signale für Palmitoleinsäure ($C_{16:1}$), Palmitinsäure ($C_{16:0}$) und Ölsäure ($C_{18:1}$), welche die Konformationszustände b-d repräsentieren, sind nahezu verschwunden. Für Wildtyp und F57S Mutante des humanen H-FABP wurden nur die Ölsäurekomplexe hergestellt. Analog zum H-FABP aus Rind, wurde nur ein bevorzugtes HN-C α H Kreuzsignal in den TOCSY-Spektren beobachtet (Abb. 25). Auch für das humane H-FABP gibt es offensichtlich abhängig von Liganden eine Hauptkonformation des Proteinrückgrates. Daher erscheint es naheliegend, daß durch die Anwesenheit von nur zwei Protonenspinsystemen in der Proteinprobe des nicht delipidierten humanen H-FABP hauptsächlich nur zwei unterschiedliche Fettsäuren (Ölsäure und vermutlich Palmitinsäure) vorhanden sind.

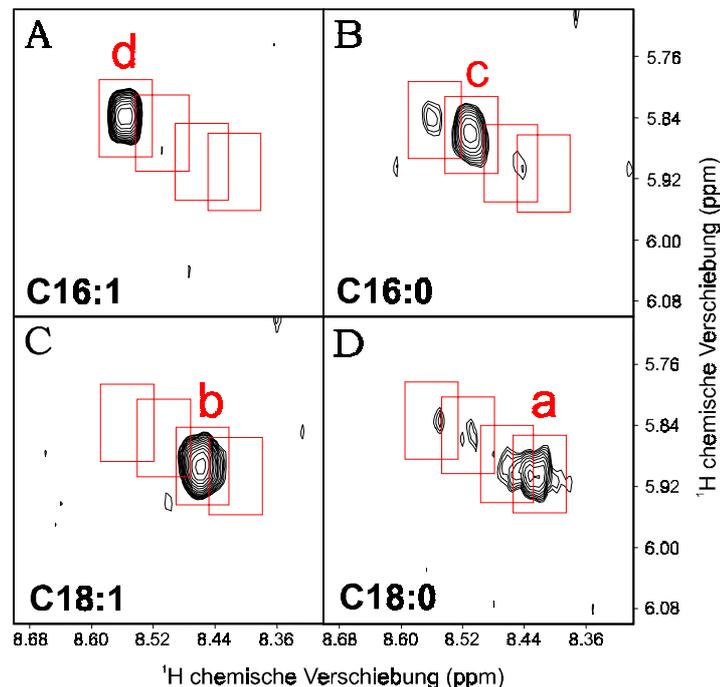


Abb. 24: Ausschnitt aus den TOCSY-Spektren des rekombinanten relipidierten H-FABP aus Rind. Zu sehen sind die HN-C α H Signale von N59 nach Relipidierung mit (A) Palmitoleinsäure ($C_{16:1}$), (B) Palmitinsäure ($C_{16:0}$), (C) Ölsäure ($C_{18:1}$) bzw. (D) Stearinsäure ($C_{18:0}$). Die Spektren zeigen eindeutig, daß eine bestimmte Fettsäure für einen Konformationszustand steht, wie a für Stearinsäure, b für Ölsäure, c für Palmitinsäure und d für Palmitoleinsäure. Aufgrund unterschiedliche Delipidierungsergebnisse sind darüberhinaus noch einige Peaks mit geringeren Intensitäten sichtbar.

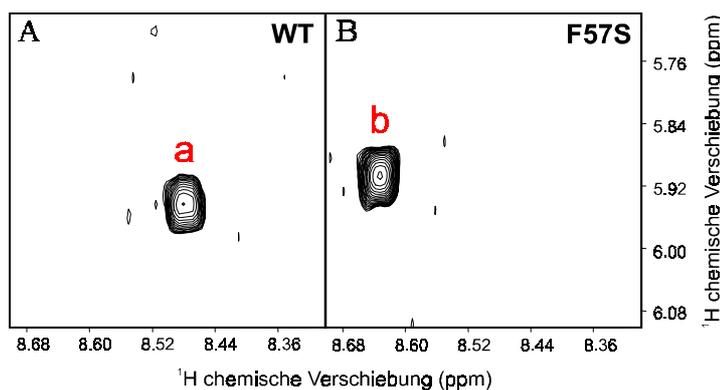


Abb. 25: Ausschnitt aus den TOCSY-Spektren von humanem H-FABP mit Ölsäure: (A) Wildtyp und (B) F57S Mutante. Im Vergleich mit Abb. 22 (mittleres und rechtes oberes Spektrum) zeigen die HN-C α H Signale von N59 im Ölsäurekomplex ganz deutlich nur einen einzigen bevorzugten Konformationszustand.

4.1.3 NMR-spektroskopische Untersuchung von humanen H-FABP Mutanten

4.1.3.1 Zuordnung und Strukturanalyse

Um die intakte Faltung und Sekundärstrukturelemente der H-FABP Mutanten (Zimmerman *et al.*, 1999) zu untersuchen, wurden 1D und 2D (TOCSY, NOESY) ^1H -NMR Spektren aufgenommen. Die Proben wurden freundlicherweise von Aukje Zimmerman (Universität Nijmegen) zur Verfügung gestellt. Ausgehend von der Resonanzzuordnung des humanen H-FABP bei pH 5,5 und 310 K (Lücke *et al.*, 2001) wurden aus Stabilitätsgründen Wildtyp und Mutanten bei pH 7,0 und 298 K so weit wie möglich nach der Methode von Wüthrich (1986) zugeordnet.

Im Folgenden sollen die Motive für die Herstellung der einzelnen Mutanten kurz vorgestellt werden:

- 1) F4E, F4S, F4S/W8E, W8E, F64S: Ein konservierter hydrophober Bereich, der die Aminosäuren F4, W8 und F64 umfaßt, befindet sich am Boden der Öffnung zwischen den Faltblattsträngen βD und βE . Möglicherweise trägt er zur Proteinstabilität bei. Beim A-FABP führten die W8F und W8Y Mutanten zu unlöslichem Protein (Banaszak *et al.*, 1994).
- 2) F16E, F16S, F57S: F16 und F57 liegen am Rand der Portalregion und gehen van der Waals Wechselwirkungen mit dem gebundenen Liganden ein. Der Phenylring von F57 agiert eventuell als eine Art beweglicher Deckel, der je nach Ligand unterschiedlich orientiert ist (Young *et al.*, 1994). Mutationen des F57 zeigten allerdings keinen Effekt auf die Ligandenbindung (Prinsen *et al.*, 1996). Mehrere Kontaktstellen der Seitenkette von F16 zur

gebundenen Fettsäure (Zanotti *et al.*, 1992) legen eine Schlüsselrolle des Restes für Ligandenspezifität und –affinität nahe. Mutationen dieses Restes haben tatsächlich starke Auswirkungen auf Bindung und Stabilität (Prinsen *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 1999).

3) K21I: K21 liegt in α -Helix I an der Proteinoberfläche und scheint eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit negativ geladenen Membranen zu spielen. Eine Acetylierung bzw. Mutation dieser Aminosäure zu Isoleucin reduzierten den Transfer von markierten Fettsäuren durch H-FABP zu Phospholipidvesikeln (Herr *et al.*, 1996). Die geladene Seite der α -Helix I scheint bei Membranwechselwirkungen beteiligt zu sein, wie Versuche mit der "helixlosen" Variante des I-FABP zeigten (Cistola *et al.*, 1996; Corsico *et al.*, 1998).

4) L66G: Bindungsstudien und MD-Simulationen am CRBP zeigten, daß die Mutation von G67 einen Verlust der Retinolbindung hervorrief (Van Aalten *et al.*, 1997). Beim I-FABP trägt eine flexible Schleifenregion bestehend aus Aminosäuren 63-66 ("hinge" Region) möglicherweise zur Ligandenbindung bei (Kim *et al.*, 1997). Beim H-FABP ist eine ähnliche Region, bestehend aus L66, G67 und V68, vorhanden.

5) E72S: Der Aminosäurerest E72 liegt zwischen den Faltblattsträngen β D und β E am Rande der „gap“ Region. Die Seitenkette zeigt in die Bindungstasche hinein und bildet mit H93, R106 und drei Kristallwassermolekülen ein elektrostatisches Netzwerk (Young *et al.*, 1994). Beim I-FABP wurde lediglich eine kleinere Öffnung zur Bindungstasche beobachtet, die NMR-Daten sind jedoch nicht eindeutig (Hodsdon *et al.*, 1997).

Ein Vergleich der 1D 1 H-NMR Spektren der Mutanten mit dem Wildtyp zeigt (Abb. 26), daß fast alle Mutanten eine Signalaufspaltung von 10,2 bis –0,4 ppm wie der Wildtyp aufweisen und somit die β -Faßstruktur der FABPs in den meisten Fällen noch intakt ist. Eine Ausnahme sind die W8-Mutanten W8E und F4S/W8E, welche den Verlust der FABP-Struktur aufweisen. Die 2 M Harnstoffkonzentration ist jedoch nicht die Ursache für diese Strukturveränderung, da die Wildtyp-Spektren in dem gleichen Puffer eine korrekte Faltung zeigen. Bei allen anderen Mutanten ist die β -Faltblattstruktur noch konserviert, worauf die große Anzahl der Amidprotonen im Bereich von 9 bis 10 ppm sowie die Methylresonanzen unterhalb 0,5 ppm hindeuten.

Für eine detailliertere Analyse der Strukturveränderungen wurden 2D NMR-Spektren aufgenommen. Aufgrund des hohen pH-Wertes, konnten nicht alle NH-Resonanzen identifiziert werden, allerdings war eine partielle Zuordnung möglich. Fast alle Mutationen konnten durch die Spektren bestätigt werden. Nur für E72S war dies aufgrund der schlechten Spektrenqualität nicht möglich. Tab. 5 zeigt die Prozentzahl der zugeordneten Aminosäuren

sowie die Zahl jener identifizierten NOE-Kreuzsignale, die für die Sekundärstrukturelemente β -Faltblatt und α -Helix charakteristisch sind.

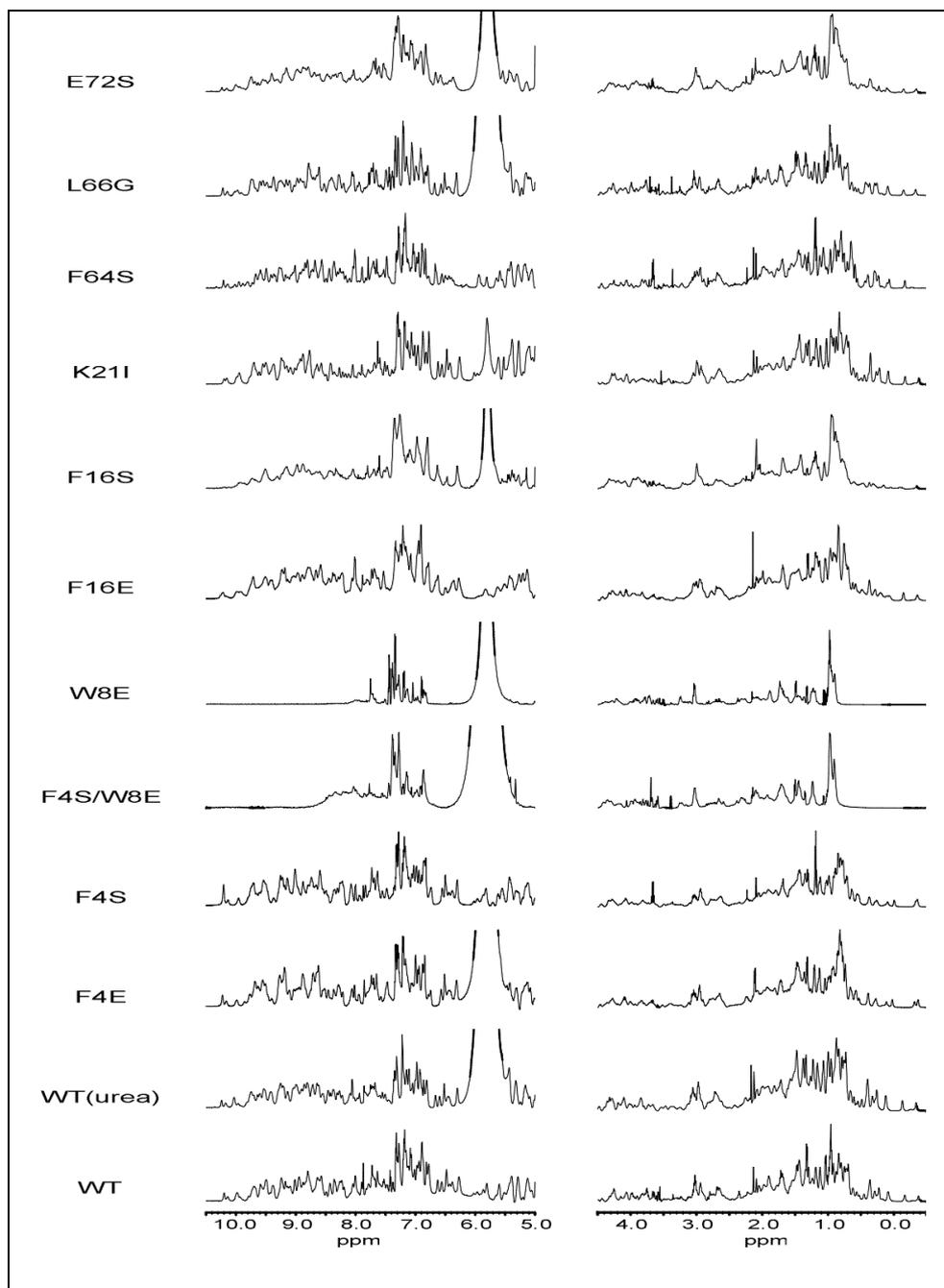


Abb. 26: Alle Spektren wurden bei 600 MHz, pH 7,0 und 298 K aufgenommen. Die Wasserresonanz bei 4,8 ppm wurde ausgeblendet. Die große Dispersion von 10,2 bis $-0,4$ ppm zeigt sich für alle Spektren, außer bei den Mutanten W8E und F4S/W8E. Dies deutet auf eine konservierte β -Faltblattstruktur mit Ausnahme der W8-Mutanten hin. Das breite Signal bei 5,8 ppm in einigen Spektren rührt vom Harnstoff (urea) her.

Einige Mutanten zeigten geringe Stabilität während der ein- bis zweitägigen Messungen unter den oben genannten Bedingungen, was sich in einer schlechten Spektrenqualität äußerte. Den

stärksten Proteinverlust (Präzipitation) während der Messungen zeigten die Mutanten F16S und E72S. Da die große Dispersion der Signale immer noch vorhanden war, und die Hoch- und Tieffeld verschobenen Spinsysteme mit denen des Wildtyps übereinstimmten, lag der Schluß nahe, daß die globale Faltung beider Mutanten noch der des Wildtyps entsprach. Eine Zuordnung war jedoch nur noch teilweise möglich, weil die Anzahl der beobachteten Protonenresonanzen gegenüber dem Wildtyp deutlich verringert war. Ein Großteil des Proteins schien offenbar denaturiert vorzuliegen, da die relativen Signalintensitäten der Methylprotonen unterhalb von 0,5 ppm sehr niedrig war bezogen auf die Methylresonanzen zwischen 1,0 – 0,9 ppm.

Tab. 5: Überblick über den Grad der Zuordnung für Wildtyp und Mutanten des humanen H-FABP. Für den Wildtyp bei pH 5,5 und pH 7,0, sowie für die Mutanten bei pH 7,0 ist die Prozentzahl der zugeordneten Aminosäuren und die Zahl der identifizierten NOE-Kreuzsignale in den Sekundärstrukturelementen β -Faltblatt und α -Helix angegeben.

H-FABP	zugeordnete Aminosäuren	NOE-Kreuzsignale in den β -Faltblättern	NOE-Kreuzsignale in den α -Helices	Harnstoffkonzentration
WT (pH 5,5)	99%	130	40	-
WT (pH 7,0)	90%	91	23	-
F4E	77%	59	25	1M
F4S	72%	58	25	-
F4S/W8E	-	-	-	2M
W8E	-	-	-	2M
F16E	80%	68	2	-
F16S	30%	9	-	-
K21I	89%	96	20	-
F64S	71%	69	14	-
L66G	78%	74	12	1M
E72S	67%	33	6	1M

Die 2D Spektren der W8-Mutanten W8E und F4S/W8E lassen vollständige Denaturierung vermuten. Trotz einiger Unterschiede in den Spektren der beiden Mutanten, war eine weitergehende Analyse der Daten aufgrund die geringe Dispersion der Protonenresonanzen unmöglich.

Die Mutanten F4E und F16E zeigten deutliche bzw. schwache Präzipitation während der Messungen. Die Spektrenqualität war jedoch ausreichend, um eine Analyse der Sekundärstrukturelemente wie für die stabilen Mutanten durchzuführen: NOE-Kreuzsignale in den β -Faltblättern deutete auf eine intakte β -Faßstruktur der Mutanten hin. Starke $d_{NN}(i,i+1)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, $d_{\alpha N}(i,i+3)$ und $d_{NN}(i,i+2)$ NOE Konnektivitäten zeigten das

Vorhandensein der Helix-Turn-Helix Domäne. Darüberhinaus waren Informationen über die globale Faltung durch den Vergleich der chemischen Verschiebungen von Mutanten und Wildtyp erhältlich. Diese waren in der Regel vergleichbar, außer in der unmittelbaren Umgebung des mutierten Aminosäurerestes. Im Falle der F16-Mutanten wurde die Region der α -Helix I allerdings nur unzureichend charakterisiert, weil die Protonenresonanzen der Aminosäuren um die Mutationstelle herum nicht zugeordnet werden konnten.

Die Mutanten, die sich während der NMR-Messungen als instabil erwiesen (F4E, F16S, F16E, E72S), entfalteten auch in den Denaturierungsexperimenten mit Harnstoff schneller als der Wildtyp (Zimmerman *et al.*, 1999). Die 1D und 2D NMR-Experimente zeigten insgesamt, daß alle Mutanten außer den beiden W8-Mutanten prinzipiell noch die für FABPs typische β -Faßstruktur besitzen.

4.2 Teil II: Das B-FABP

4.2.1 Strukturbestimmung des humanen B-FABP

4.2.1.1 Zuordnung der ^1H -Resonanzen

Die Zuordnung der ^1H -Resonanzen des humanen B-FABP wurde nach der Methode von Wüthrich (1986) vorgenommen. In wässrigem Phosphatpuffer (20 mM K_2HPO_4 , pH 7,0; 0,05% NaN_3 ; 10% D_2O) wurden mit dem B-FABP homonukleare TOCSY- und NOESY-Spektren aufgenommen.

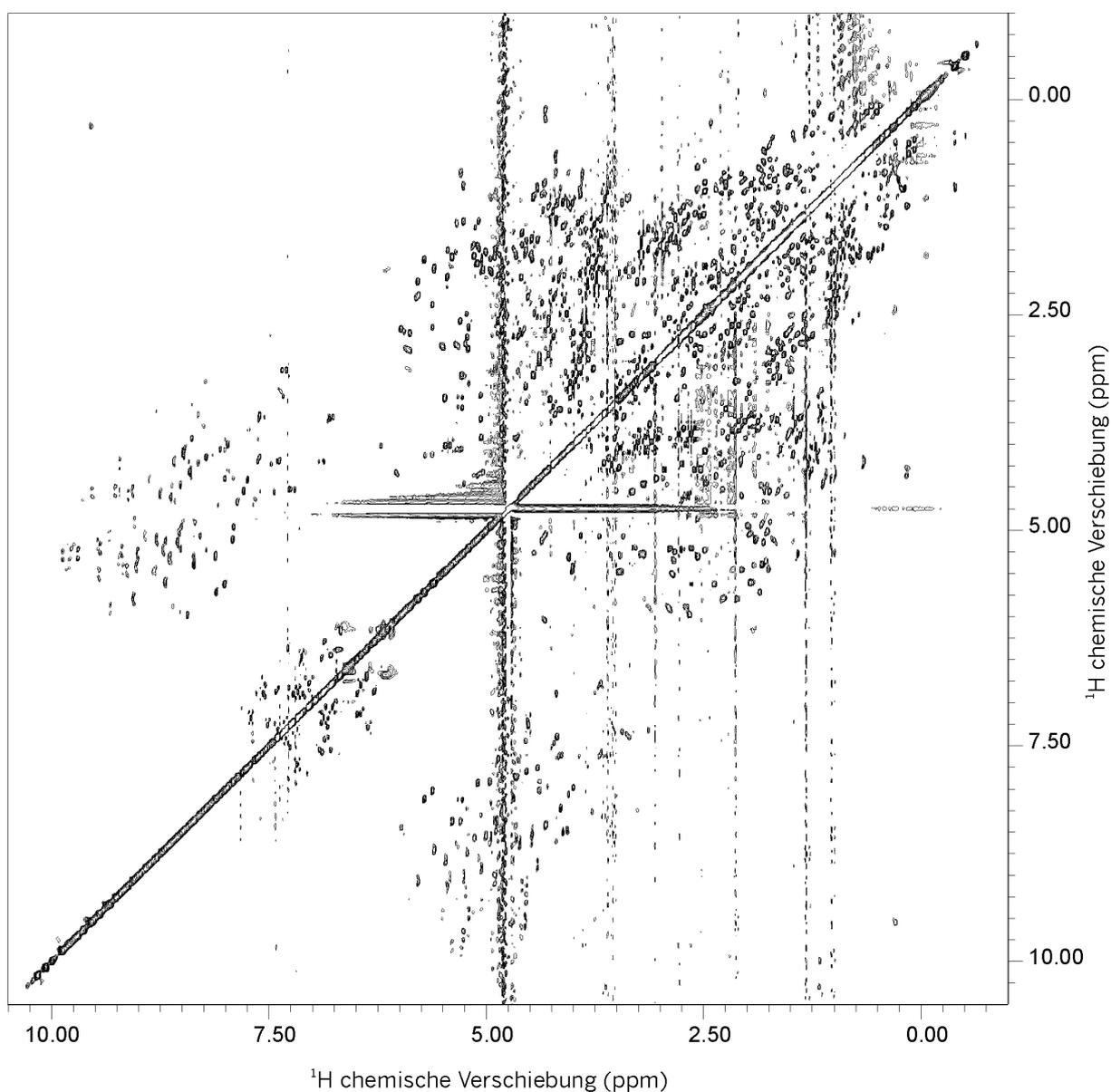


Abb. 27: TOCSY-Spektrum mit sehr kurzer Spinlock-Zeit (aufgenommen bei 600 MHz und 298 K mit humanem B-FABP in 20 mM K_2HPO_4 , pH 7,0; 0,05% NaN_3 ; 10% D_2O).

Das TOCSY-Spektrum mit sehr kurzer Spinlock-Zeit (Abb. 27) zeigte im wesentlichen nur direkt korrelierte $^2J_{\text{HH}}$ - und $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungen. Für die vollständige Zuordnung der Resonanzen der Seitenkettenprotonen wurde ein TOCSY-Experiment mit langer Spinlock-Zeit (Abb. 28) durchgeführt. Dabei liefert der im TOCSY-Experiment angewendete mehrfache Kohärenztransfer auch Kreuzsignale zwischen Protonen, die über mehr als drei Bindungen miteinander wechselwirken. Die an C^α -, C^β - und $\text{C}^{\gamma/\delta/\epsilon}$ - gebundenen Protonen sind aufgrund dieses Effektes mit den H^{N} -Resonanzen des jeweiligen Aminosäurespinsystems korreliert und zugeordnet worden.

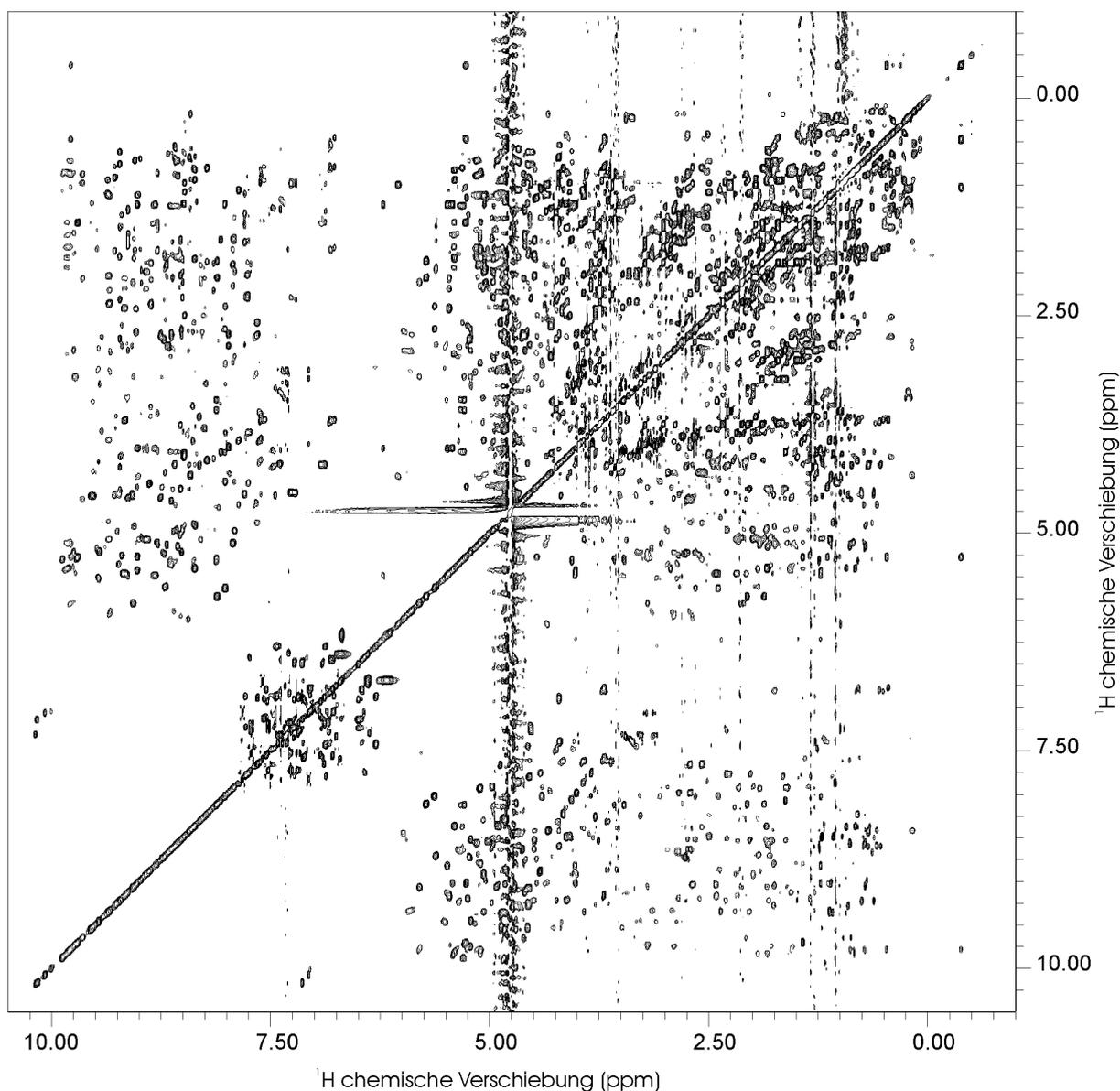


Abb. 28: TOCSY-Spektrum mit langer Spinlock-Zeit (aufgenommen bei 600 MHz und 298 K mit humanem B-FABP in 20 mM K_2HPO_4 , pH 7,0; 0,05% NaN_3 ; 10% D_2O).

Das NOESY-Spektrum (Abb. 29) zeigt Kreuzsignale zwischen allen Resonanzen, deren Protonen räumlich nicht weiter als 5 Å voneinander entfernt sind. Somit sieht man

sequentielle $d_{\alpha N(i,i+1)}$ Kreuzsignale zwischen dem C^α -Proton der i -ten und dem Rückgratamidproton der $(i+1)$ -ten Aminosäure (2,2 Å im β -Faltblattstrang bzw. 3,5 Å in der α -Helix). Auch für die $d_{NN(i,i+1)}$ Korrelation zwischen den Rückgratamidprotonen zweier aufeinander folgender Aminosäuren findet man mittelstarke bis schwache Kreuzsignale (2,8 Å in der α -Helix bzw. 4,3 Å im β -Faltblattstrang). Mit dem NOESY-Spektrum wurde bestimmt, welcher Platz in der Aminosäuresequenz den zuvor identifizierten Spinsystemen zukommt.

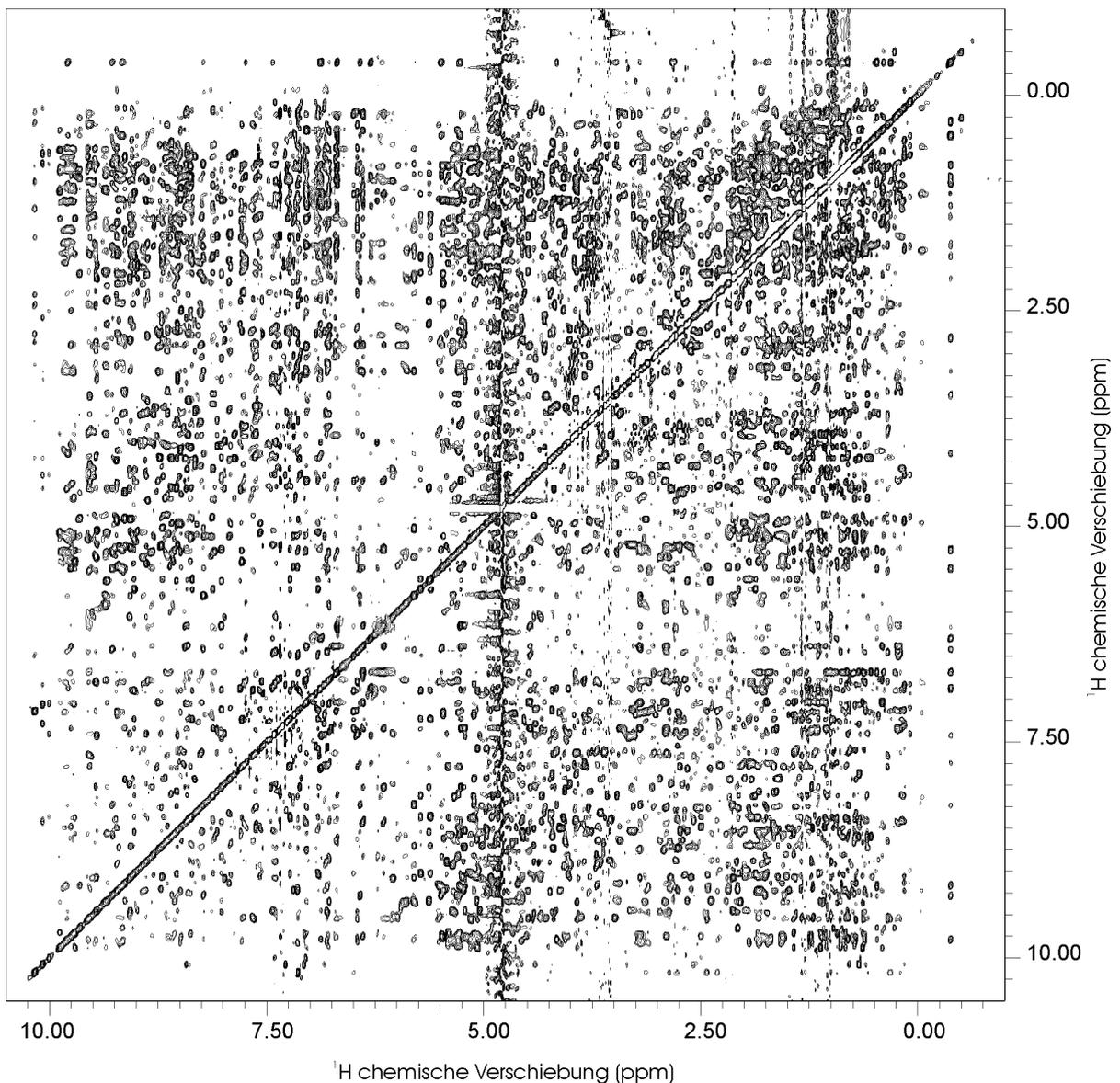


Abb. 29: NOESY-Spektrum (aufgenommen bei 600 MHz und 298 K mit humanem B-FABP in 20 mM K_2HPO_4 , pH 7,0; 0,05% NaN_3 ; 10% D_2O).

4.2.1.2 Zuordnung der ^{15}N -Resonanzen

Für ein Protein mit einem Molekulargewicht von fast 15 kDa, wie das humane B-FABP, ist eine vollständige Zuordnung nur mit homonuklearen Spektren nur schwer möglich. Deswegen wurde das B-FABP mit ^{15}N -Kernen angereichert (Zimmerman & Veerkamp, 1998) und mit dieser Probe eine Serie von ^{15}N -editierten NMR Spektren aufgenommen ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HTQC-, 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ TOCSY-HSQC- und 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC). Das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC-Spektrum (Abb. 30) zeigt die direkte Korrelation zwischen ^{15}N -Kernen und kovalent gebundenen Amidprotonen auf. Es konnten, abgesehen von S13, K37 und T56, alle Amidresonanzen gefunden werden.

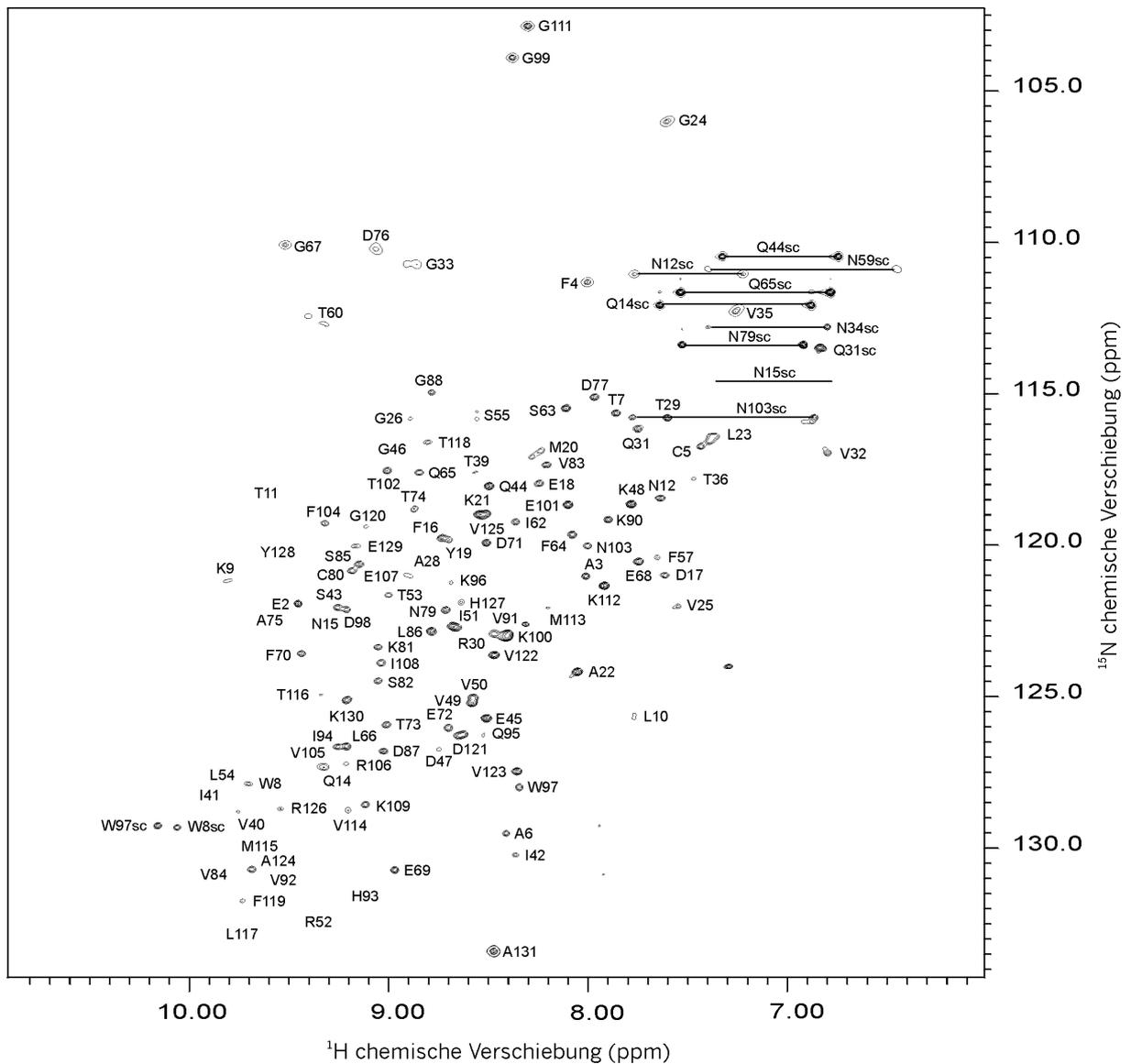


Abb. 30: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC Spektrum (aufgenommen bei 600 MHz und 298 K mit humanem B-FABP in 20 mM K_2HPO_4 , pH 7,0; 0,05% NaN_3 ; 10% D_2O).

Das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HTQC Spektrum (Abb. 31) korreliert in einer NH_2 -Gruppe den ^{15}N -Kern mit beiden kovalent gebundenen Protonen. Somit sind nur Amidprotonensignale der Seitenketten von Glutamin, Asparagin und gegebenenfalls Arginin zu erkennen. Mit diesem Experiment konnte zuverlässig zwischen NH - und NH_2 -Gruppen unterschieden werden.

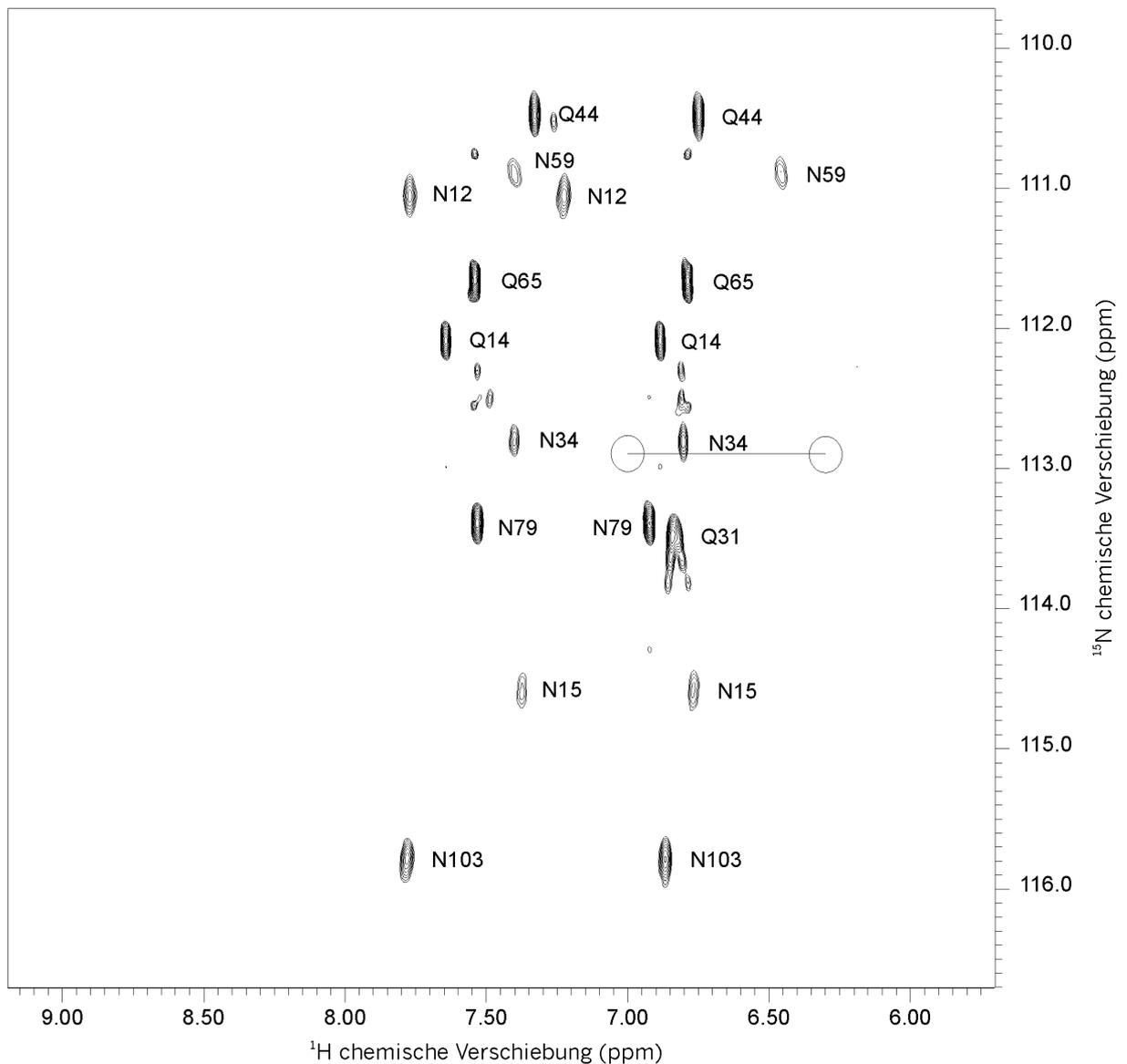


Abb. 31: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HTQC Spektrum (aufgenommen bei 600 MHz und 298 K mit humanem B-FABP in 20 mM K_2HPO_4 pH 7,0; 0,05% NaN_3 ; 10% D_2O). Die Signale für Q95 sind durch Kreise angedeutet, da sie in diesem Spektrum sehr schwach und stark verschmiert auftraten.

Das dreidimensionale $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ TOCSY-HSQC Experiment liefert Spektren, die man als eine Reihe von homonuklearen TOCSY-Experimenten ansehen kann, die in Bezug auf die ^{15}N chemische Verschiebung in eine dritte Dimension aufgefächert wurden. Die Signalfülle gegenüber nicht ^{15}N editierten Spektren ist deutlich reduziert, da lediglich Protonenspinsysteme überlappen können, wenn die zugehörigen ^{15}N -Kerne, mit denen sie

über $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplung korreliert sind, die gleiche chemische Verschiebung haben. Mit Ausnahme von K37 konnten alle Aminosäuren sequentiell eindeutig identifiziert werden.

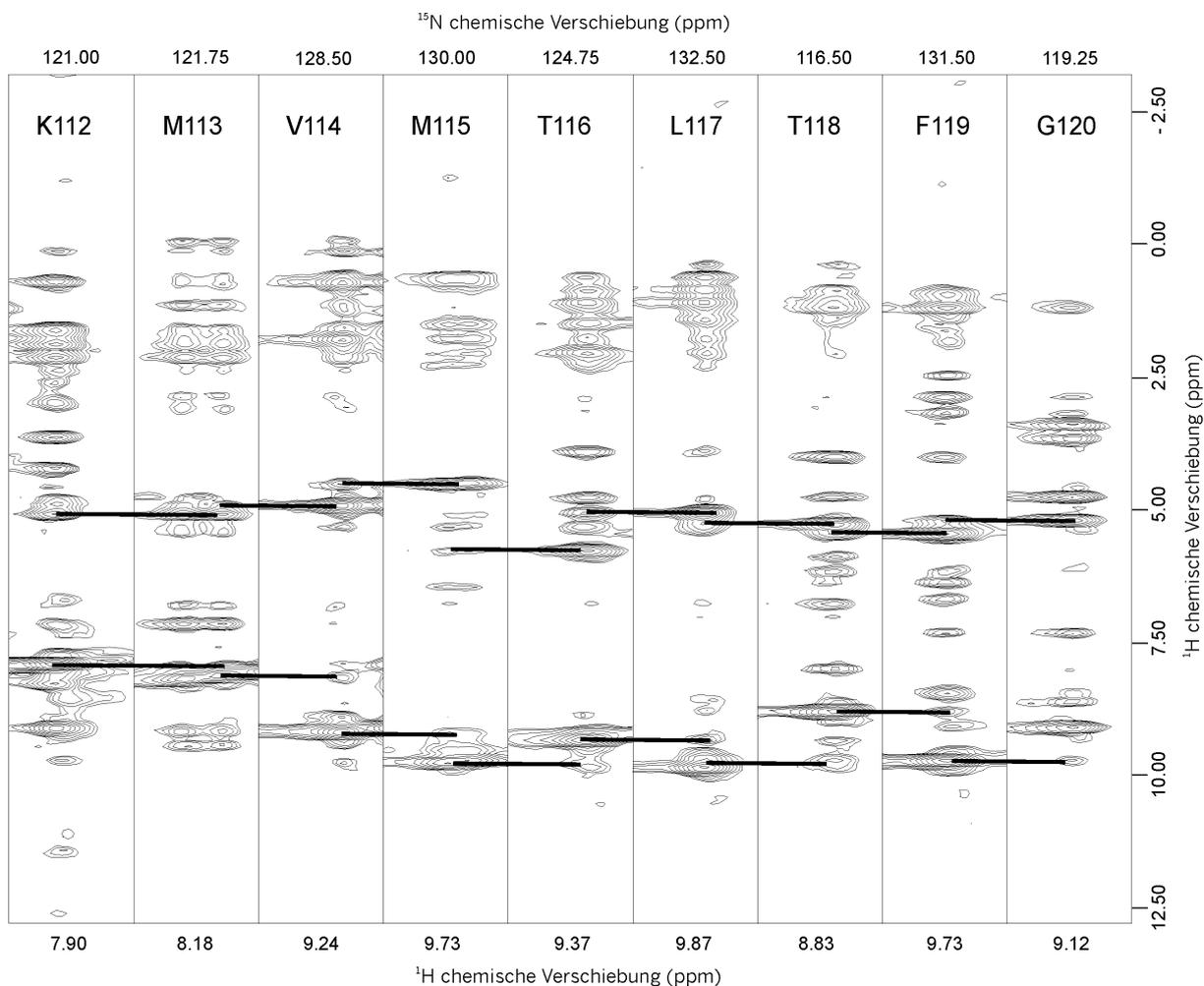


Abb. 32: Streifendarstellung aus einem dreidimensionalen $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC Spektrum (aufgenommen bei 600 MHz und 298 K mit humanem B-FABP in 20 mM K_2HPO_4 , pH 7,0; 0,05% NaN_3 ; 10% D_2O). Repräsentativ für die Vorgehensweise bei der sequentiellen Zuordnung wurde der Falblattstrang βI , der die Aminosäurereste K112 bis G120 umfaßt, ausgewählt. Die roten Linien deuten die sequentiellen Verknüpfungen der NOE-Kreuzsignale an.

Analog zum 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ TOCSY-HSQC Experiment ergibt das 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC Experiment eine Serie von protonenkorrelierten NOESY-Spektren, die in der dritten Dimension nach der ^{15}N chemischen Verschiebung aufgespalten sind. Dipolare Kopplungen zeigen nur diejenigen Protonen, die direkt über $^1J_{\text{NH}}$ -Kopplung mit einem ^{15}N -Kern korreliert sind. Abb. 32 zeigt am Beispiel des Falblattstrangs βI , der die Aminosäuren K112 bis G120 umfaßt, die sequentiellen $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ und $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ Kreuzsignale zwischen dem C^α - bzw. Amidproton der i -ten und dem Amidproton der $(i+1)$ -ten Aminosäure im Proteinrückgrat. Die aus den obengenannten Spektren erhaltene Zuordnung der ^1H und ^{15}N Resonanzen des humanen B-FABP sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 6: ^1H - und ^{15}N -Zuordnung von humanem B-FABP bei pH 7,0 und 298 K. Stereospezifisch zugeordnete Protonenresonanzen sind kursiv dargestellt.

Amino- säurerest	HN	H α	H β	andere H	N	andere N
V1		4,21	2,28	<i>0,87/0,97 (H$\gamma^{1/2}$)</i>		
E2	9,46	4,18	2,07	2,43 (H γ)	121,9	
A3	8,02	4,07	1,22		121,0	
F4	8,02	4,40	<i>3,05/3,29</i>	7,12 (H δ) 6,90 (H ϵ) 7,57 (H ζ)	111,3	
C5	7,44	4,56	<i>3,32/2,76</i>		116,7	
A6	8,42	4,21	0,67		129,5	
T7	7,85	4,67	3,93	1,05 (H γ^2)	115,5	
W8	9,71	5,30	3,20	10,07 (H ϵ^1) 7,06 (H δ^1) 7,15 (H ϵ^3) 7,19 (H ζ^3) 6,84 (H η^2) 7,29 (H ζ^2)	127,8	129,3 ϵ^1
K9	9,81	5,40	<i>1,82/1,94</i>	<i>1,56/1,42 (Hγ)</i> 1,70 (H δ) 2,93 (H ϵ)	121,1	
L10	7,77	3,89	1,54	1,34 (H γ) <i>0,83/0,35 (H$\delta^{1/2}$)</i>	125,7	
T11	9,54	4,58	4,18	1,20 (H γ^2)	118,2	
N12	7,65	4,87	<i>2,72/2,58</i>	<i>7,77/7,23 (Hδ^2)</i>	118,4	111,1 δ^2
S13		5,08	<i>3,44/3,72</i>			
Q14	9,34	4,84	<i>2,03/2,20</i>	2,35 (H γ) <i>7,64/6,89 (Hϵ^2)</i>	127,3	112,1 ϵ^2
N15	9,42	4,83	<i>2,75/3,83</i>	<i>7,38/6,77 (Hδ^2)</i>	122,6	114,6 δ^2
F16	8,74	4,47	<i>2,93/3,20</i>	7,04(H δ) 7,04 (H ϵ) 6,94 (H ζ)	119,8	
D17	8,70	4,29	<i>2,54/2,91</i>		119,8	
E18	8,25	3,79	<i>2,06/1,94</i>	<i>2,49/2,41 (Hγ)</i>	117,9	
Y19	7,61	3,95	<i>3,04/2,93</i>	6,70 (H δ) 6,39 (H ϵ)	121,0	
M20	8,24	3,26	2,13	<i>1,26/1,40 (Hγ)</i> 2,12 (H ϵ)	116,9	
K21	8,52	3,75	1,83	<i>1,43/1,21 (Hγ)</i> 1,63 (H δ) 2,88 (H ϵ)	119,0	
A22	8,07	4,08	1,63		124,0	
L23	7,34	3,45	1,19			
L23	7,38	3,39	1,17	1,04 (H γ) <i>0,20/0,24 (H$\delta^{1/2}$)</i>	116,3	
L23'	7,40	3,37	1,16			
L23''	7,34	3,45	1,19			
G24	7,61	<i>3,61/4,17</i>			106,0	
V25	7,55	3,69	1,40	<i>0,79/0,95 (H$\gamma^{1/2}$)</i>	122,0	
G26	8,94	<i>4,04/4,00</i>			115,8	
G26'	8,90	<i>4,07/4,02</i>				
F27	8,69	3,85	<i>3,26/3,03</i>	7,18 (H δ) 7,30 (H ϵ) 7,30 (H ζ)	121,0	
A28	8,83	3,96	1,45		120,8	
T29	7,61	3,70	3,91	0,88 (H γ^2)	115,8	
R30	8,44	3,87	1,67		122,9	
Q31	7,73	3,84	1,89	1,99 (H γ) <i>6,84/6,82 (Hϵ^2)</i>	116,2	113,5 ϵ^2
Q31'	7,76	3,84	1,88			
V32	6,80	3,70	1,74	<i>0,53/0,80 (H$\gamma^{1/2}$)</i>	116,9	
V32'	6,77	3,70	1,71			

Fortsetzung Tab. 6: ^1H - und ^{15}N -Zuordnung von humanem B-FABP bei pH 7,0 und 298 K. Stereospezifisch zugeordnete Protonenresonanzen sind kursiv dargestellt.

Aminosäurerest	HN	H α	H β	andere H	N	andere N
G33	8,87	<i>3,54/3,65</i>			110,7	
G33'	8,92	<i>3,54/3,65</i>				
N34	8,29	4,83	2,76/2,68	7,41/6,80 (H δ^2)	116,8	112,8 δ^2
V35	7,27	4,52	2,29	0,95/1,00 (H $\gamma^{1/2}$)	112,3	
V35'	7,21	4,52	2,32	0,95/1,00 (H $\gamma^{1/2}$)		
V35''	7,24	4,52	2,29	0,97/0,99 (H $\gamma^{1/2}$)		
T36	7,45	4,23	4,07	1,27 (H γ^2)		
T36'	7,48	4,23	4,04	1,26 (H γ^2)	117,8	
T36''	7,51	4,25	4,06	1,26 (H γ^2)		
P38	-	4,11	2,05/2,33	1,99 (H γ) 3,40/3,32 (H δ)		
T39	8,56	5,33	4,05	1,23 (H γ^2)	117,6	
V40	9,78	5,15	1,71	0,72/0,88 (H $\gamma^{1/2}$)	128,7	
I41	9,82	5,11	1,70	1,27/1,57 (H γ^1) 0,86 (H δ) 0,85 (H γ^2)	128,2	
I42	8,37	5,31	2,59	1,07 (H γ^1) 1,07(H δ) 0,80 (H γ^2)	130,2	
S43	9,26	4,79	3,79/3,65		121,9	
Q44	8,50	4,96	1,99/1,84	2,11/2,28 (H γ) 6,75/7,33 (H ϵ^2)	118,0	110,5 ϵ^2
E45	8,52	4,48	1,62/1,79	2,03 (H γ)	125,7	
G46	8,97	<i>3,62/3,97</i>			117,2	
D47	8,75	4,59	2,72		126,7	
K48	7,79	4,54	1,65	1,45/1,09 (H γ) 1,39/1,33 (H δ) 2,83 (H ϵ)	118,6	
V49	8,59	4,21	0,86	0,55/0,67 (H $\gamma^{1/2}$)	125,2	
V50	8,59	4,67	1,82	0,72/0,58 (H $\gamma^{1/2}$)	125,0	
I51	8,64	4,87	1,81	1,05 (H γ^1) 0,82 (H δ) 0,63 (H γ^2)	122,5	
R52	9,48	5,16	1,84/1,72	1,74/1,51 (H γ) 3,13 (H δ) 7,29 (H ϵ)	132,4	85,1 ϵ
T53	9,01	5,08	4,34	1,11 (H γ^2)	121,6	
L54	9,74	5,33	1,79	1,54 (H γ) 0,84 (H $\delta^{1/2}$)	127,5	
S55	8,56	4,95	3,93/4,13		115,6	
T56		4,08	4,30	1,26 (H γ^2)		
F57	7,66	4,65	2,76/3,15	7,18 (H δ) 7,18 (H ϵ) 6,88 (H ζ)	120,4	
F57'	7,68	4,69	2,75/3,20	7,18 (H δ) 7,18 (H ϵ) 6,88 (H ζ)		
K58	6,88	4,21	1,30/1,42	0,98/0,79 (H γ) 1,52 (H δ) 2,69 (H ϵ)	115,6	
K58'	6,91	4,21	1,37/1,44	1,04/0,90 (H γ) 1,52 (H δ) 2,69 (H ϵ)		
K58''	6,93	4,21	1,34/1,34	1,02/0,87 (H γ) 1,52 (H δ) 2,69 (H ϵ)		
N59	8,61	5,88	2,67/2,89	7,40/6,46 (H δ^2)	123,3	110,9 δ^2
N59'	8,43	5,98	2,67/2,90	7,40/6,46 (H δ^2)		
N59''	8,52	5,95	2,72/2,89	7,40/6,46 (H δ^2)		
N59'''	8,58	5,91	2,70/2,87	7,40/6,46 (H δ^2)		
T60	9,40	4,89	4,36	1,06 (H γ^2)	112,3	
T60'	9,33	4,89	4,36	1,06 (H γ^2)		

Fortsetzung Tab. 6: ^1H - und ^{15}N -Zuordnung von humanem B-FABP bei pH 7,0 und 298 K. Stereospezifisch zugeordnete Protonenresonanzen sind kursiv dargestellt.

Amino-säurerest	HN	H α	H β	andere H	N	andere N
T60''	9,48	4,89	4,36	1,06 (H γ^2)		
E61	8,68	5,13	1,91	2,05 (H γ)	122,7	
I62	8,38	4,89	1,88	1,70 (H γ^1) 0,94 (H δ) 1,28 (H γ^2)	119,0	
S63	8,11	5,29	<i>3,46/3,57</i>		115,4	
F64	8,07	4,70	<i>2,76/1,70</i>	6,18 (H δ) 6,69 (H ϵ) 6,69 (H ζ)	119,6	
Q65	8,86	4,84	<i>1,89/2,08</i>	2,39/2,35 (H γ) 7,54/6,79 (H ϵ^2)	117,6	111,7 ϵ^2
L66	9,21	4,50	<i>1,64/1,85</i>	1,84 (H γ) <i>0,97/0,81</i> (H $\delta^{1/2}$)	126,5	
G67	9,52	<i>3,49/4,28</i>			110,1	
E68	7,76	4,76	2,01	2,26 (H γ)	120,3	
E69	8,97	5,04	1,97	2,12 (H γ)	130,7	
F70	9,45	5,21	<i>3,27/3,31</i>	7,42 (H δ) 6,87(H ϵ) 6,30 (H ζ)	123,6	
D71	8,51	5,21	<i>2,64/2,74</i>		119,9	
E72	8,71	4,78	1,82	2,32 (H γ)	125,8	
T73	9,02	5,43	4,02	1,22 (H γ^2)	125,8	
T74	8,87	4,42	4,34	0,99 (H γ^2) 6,04 (H γ^1)	118,8	
A75	9,49	3,92	1,43		122,5	
A75'	9,55	3,89	1,43			
E76	9,07	4,55	<i>2,84/2,13</i>		110,2	
E77	7,98	4,00	<i>2,71/2,84</i>		115,1	
R78	7,39	4,20	<i>1,27/0,58</i>	<i>1,03/0,81</i> (H γ) <i>2,42/0,31</i> (H δ) 9,53 (H ϵ) 6,15 (H η^2)	116,5	89,4 ϵ 72,8 η^2
N79	8,71	5,22	2,77	7,53/6,92 (H δ^2)	122,1	113,4 δ^2
C80	9,19	5,25	<i>2,84/2,61</i>		120,8	
K81	9,05	4,92	1,84	1,50/1,41(H γ) 1,61(H δ) 2,93 (H ϵ)	123,3	
S82	9,05	5,80	<i>2,13/3,20</i>	5,89 (H γ)	124,5	
V83	8,22	4,15	1,88	0,80 (H $\gamma^{1/2}$)	117,3	
V84	9,77	5,26	1,02	<i>0,46/-0,38</i> (H $\gamma^{1/2}$)	130,8	
S85	9,16	4,79	3,70		120,6	
L86	8,79	5,11	<i>1,41/1,74</i>	1,53 (H γ) 0,85 (H $\delta^{1/2}$)	122,5	
D87	9,03	4,82	<i>2,42/2,65</i>		126,8	
G88	8,79	<i>3,62/4,05</i>			114,9	
D89	8,66	4,79	2,84		126,0	
K90	7,91	4,97	1,99	1,37 (H γ) 1,61 (H δ) 2,98 (H ϵ)	119,1	
L91	8,49	4,90	<i>1,09/0,65</i>	0,93 (H γ) <i>0,39/0,27</i> (H $\delta^{1/2}$)	122,9	
V92	9,64	4,61	2,08	<i>0,88/0,97</i> (H $\gamma^{1/2}$)	131,0	
H93	9,14	5,49	<i>2,82/3,46</i>	11,93 (H ϵ^2) 6,42 (H δ^2) 7,74 (H ϵ^1)	131,1	163,2 ϵ^2
I94	9,27	4,55	1,75	<i>1,54/1,02</i> (H γ^1) 0,78 (H δ) 0,91 (H γ^2)	126,6	
Q95	8,53	5,01	<i>1,76/1,85</i>	2,17 (H γ) 6,98/6,28 (H ϵ^2)	126,2	112,9 ϵ^2
K96	8,70	5,61	<i>1,98/1,94</i>	<i>1,39/1,47</i> (H γ) 1,64 (H δ) 2,83 (H ϵ)	121,2	

Fortsetzung Tab. 6: ^1H - und ^{15}N -Zuordnung von humanem B-FABP bei pH 7,0 und 298 K. Stereospezifisch zugeordnete Protonenresonanzen sind kursiv dargestellt.

Aminosäurerest	HN	H α	H β	andere H	N	andere N
W97	8,36	4,90	<i>3,14/3,79</i>	10,16 (H ϵ^1) 7,14 (H δ^1) 7,23 (H ϵ^3) 6,90 (H ζ^3) 6,49 (H η^2) 7,14 (H ζ^2)	128,0	129,2 ϵ^1
D98	9,21	4,23	<i>2,31/2,76</i>		122,1	
G99	8,39	<i>3,54/3,93</i>			103,9	
K100	8,41	4,33	<i>0,18/0,99</i>	1,25 (H γ) 1,62 (H δ) 2,86/2,78 (H ϵ)	122,9	
E101	8,10	5,72	1,87	2,06 (H γ)	110,7	
T102	9,01	5,26	4,47	1,14 (H γ^2)	117,5	
N103	8,01	5,62	<i>2,38/2,64</i>	7,78/6,87 (H δ^2)	120,0	115,8 δ^2
F104	9,33	5,91	<i>3,14/2,92</i>	6,78 (H δ) 7,05 (H ϵ) 6,86 (H ζ)	119,3	
F104'	9,36	5,94	<i>3,14/2,91</i>	6,78 (H δ) 7,05 (H ϵ) 6,86 (H ζ)		
V105	9,36	4,86	2,04	<i>0,94/1,09</i> (H $\gamma^{1/2}$)	127,3	
V105'	9,38	4,86	2,04	<i>0,94/1,09</i> (H $\gamma^{1/2}$)		
R106	9,23	5,35	<i>1,55/1,45</i>	<i>1,23/1,79</i> (H $\gamma^{1/2}$)	127,1	
E107	8,93	5,07	1,99	2,19 (H γ)	121,0	
I108	9,05	4,91	1,74	<i>0,53/0,64</i> (H γ^1) 0,16 (H δ) 0,71 (H γ^2)	123,9	
K109	9,12	4,59	<i>1,56/1,69</i>	1,27 (H γ) 1,62 (H δ) 2,89 (H ϵ)	128,5	
D110	9,49	4,29	<i>2,96/2,62</i>			
G111	8,31	<i>3,67/4,22</i>			102,9	
K112	7,92	5,11	<i>1,91/2,15</i>	1,62 (H γ) 1,74 (H δ) 3,03 (H ϵ)	121,3	
M113	8,21	4,95	<i>1,82/1,15</i>	-0,04 (H γ)	122,1	
V114	9,21	4,51	1,81	<i>0,61/0,75</i> (H $\gamma^{1/2}$)	128,7	
M115	9,73	5,78	<i>1,55/2,29</i>	2,09 (H γ) 2,06 (H ϵ)	130,3	
T116	9,35	5,06	3,92	1,10 (H γ^2)	124,9	
L117	9,87	5,29	<i>0,89/1,06</i>	1,25 (H γ) <i>0,63/0,40</i> (H $\delta^{1/2}$)	132,7	
T118	8,82	5,47	4,02	1,22 (H γ^2) 6,21 (H γ^1)	116,6	
F119	9,75	5,22	<i>3,20/2,89</i>	7,36 (H δ) 7,32 (H ϵ) 7,42 (H ζ)	131,7	
G120	9,12	<i>3,45/3,70</i>			119,0	
D121	8,63	4,62	2,72		126,2	
V122	8,48	4,10	2,49	<i>0,96/1,07</i> (H $\gamma^{1/2}$)	123,6	
V123	8,36	5,40	1,84	<i>0,82/0,93</i> (H $\gamma^{1/2}$)	127,4	
A124	9,70	5,27	1,43		130,7	
V125	8,56	5,15	1,82	<i>0,72/0,89</i> (H $\gamma^{1/2}$)	119,4	
R126	9,54	4,89	1,45	<i>1,16/1,76</i> (H γ)	128,5	
H127	8,64	5,35	<i>2,85/2,95</i>	7,06 (H δ^2) 7,82 (H ϵ^1)	121,9	
Y128	9,46	5,51	<i>2,87/3,10</i>	6,80 (H δ) 6,46 (H ϵ)	120,5	
E129	9,16	5,46	<i>2,06/2,18</i>	2,41 (H γ)	120,0	
K130	9,21	4,14	1,49	<i>0,42/0,85</i> (H γ) <i>1,26/1,35</i> (H δ) <i>2,51/2,74</i> (H ϵ)	125,1	
A131	8,48	4,14	1,20		133,4	

4.2.2 Torsionswinkeldynamikrechnungen

4.2.2.1 Sekundärstruktur

Durch eine qualitative Abschätzung der sequentiellen und Nahbereichs-NOEs konnte auf die Sekundärstruktur vom humanen B-FABP geschlossen werden (Abb. 33). Starke sequentielle $H\alpha$ -HN Kreuzsignale, die auf ausgedehnte β -Faltblattstrukturen hindeuten, wurden für die Sequenzabschnitte 6-14, 39-44, 49-54, 59-64, 69-74, 78-86, 91-96, 101-108, 113-118 und 123-130 gefunden. Helikale Strukturen, die durch starke HN-HN wie auch mittelstarke oder schwache $HN-HN(i,i+2)$, $H\alpha-HN(i,i+2)$, $H\alpha-HN(i,i+3)$, $H\alpha-H\beta(i,i+3)$ und eventuell schwache $H\alpha-HN(i,i+4)$ NOE-Signale definiert sind, wurden für die Reste 1-4, 16-23 und 27-35 gefunden. NOE-Kreuzsignale, die typisch für antiparalleles β -Faltblatt sind, wurden zwischen den Rückgratprotonen der Faltblattstränge βA bis βD , βE bis βJ sowie zwischen βA und βJ beobachtet. Nur zwischen den Faltblattsträngen βD und βE wurden keine Kreuzsignale gefunden (Abb. 34).

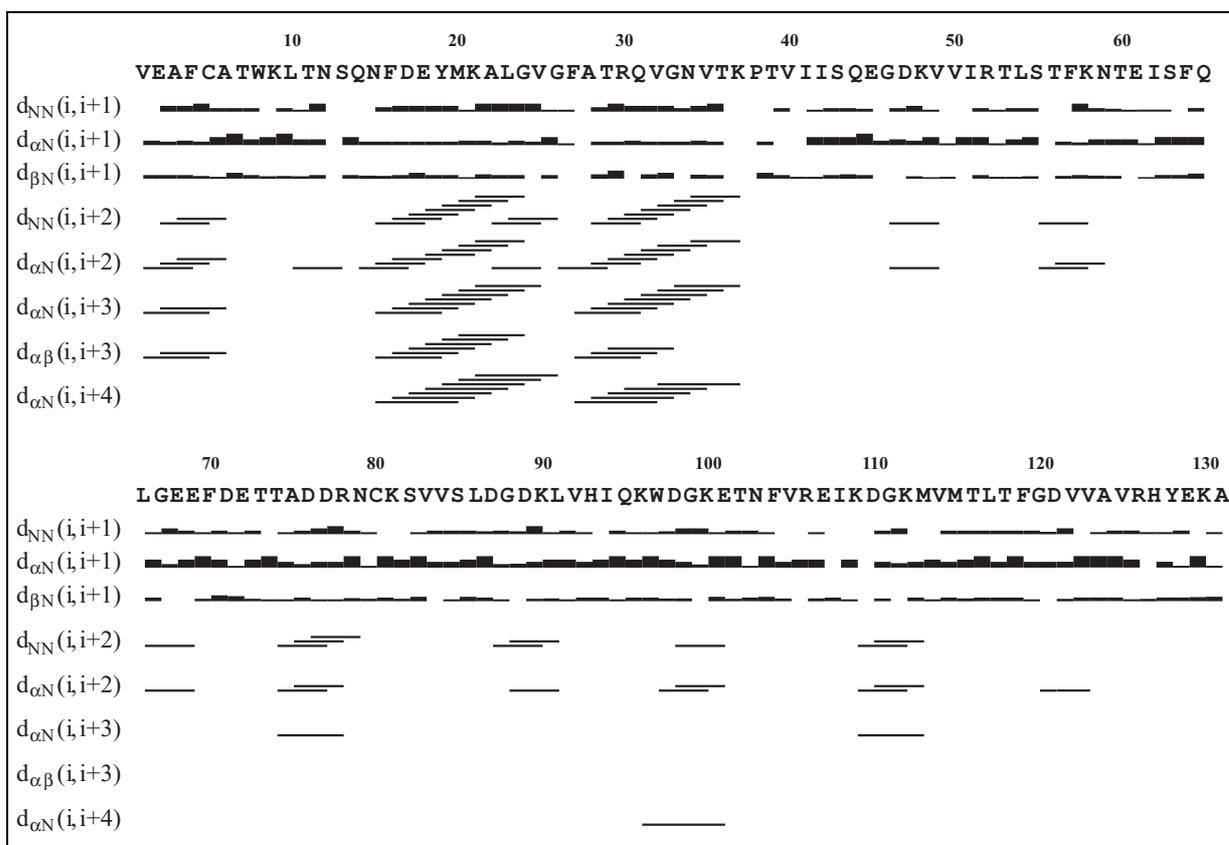


Abb. 33: Schematische Darstellung der sequentiellen und Nahbereichs-NOEs zwischen HN, $H\alpha$ und $H\beta$ Protonen im humanen B-FABP. Die Dicke der Linien symbolisiert die Intensitäten der NOE-Kreuzsignale.

4.2.2.2 Tertiärstruktur

Aus den 2D NOESY und 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC Spektren wurden mit dem Programm *nmr2st* (Pristovšek *et al.*, 2000; siehe 2.2.1) 2490 effektiv abstandsbeschränkende NOE-Signale eindeutig zugeordnet. Mit den Abstandsrandbedingungen und zusätzlich 106 stereospezifischen Zuordnungen aus GLOMSA (Güntert *et al.*, 1991) wurden 300 Strukturen wie unter 3.2.2 beschrieben berechnet. Die 20 besten Strukturen mit der niedrigsten Zielfunktion (unter $0,1 \text{ \AA}^2$) wurden anschließend einer Energieminimierung mit dem DISCOVER Modul des Programmpakets INSIGHT II (Molecular Simulations Inc. San Diego, USA) unterworfen (Tab. 7). Die Abbildung 35 zeigt das Strukturenssemble der 20 besten Strukturen nach der Energieminimierung.

Tab. 7: Statistik der 20 besten Strukturen des humanen B-FABP nach der Energieminimierung

Abstandsbeschränkungen

Anzahl aller Abstandsbeschränkungen	2490
Intraresiduelle Abstände ($i = j$)	265
Sequentielle Abstände ($ i - j = 1$)	627
Nahbereichs-Abstände ($1 < i - j \leq 4$)	420
Weitbereichs-Abstände ($ i - j > 4$)	1178

Abstandsverletzungen nach Energieminimierung

Anzahl der Abstandsverletzungen $> 0,2 \text{ \AA}$	5
Anzahl der Abstandsverletzungen $> 0,3 \text{ \AA}$	0
Maximale Abstandsverletzung	$0,25 \text{ \AA}$

Strukturbündel, RMSD (\AA)

Rückgrat (Reste 2-130)	$0,85 \pm 0,12$
Schweratome (Reste 2-130)	$1,41 \pm 0,10$
Rückgrat (Reste 2-23, 39-54, 59-73, 79-130)	$0,72 \pm 0,10$
Schweratome (Reste 2-23, 39-54, 59-73, 79-130)	$1,30 \pm 0,08$

Die resultierende Lösungsstruktur des humanen B-FABP ist gut aufgelöst und enthält keine signifikanten Verletzungen einzelner Abstandsbeschränkungen, was auf eine gute Übereinstimmung der NOE-Daten mit den berechneten Konformeren hindeutet. Deutlich sichtbar sind Bereiche mit höherer Dispersion des Proteinrückgrates, besonders im Bereich der sogenannten Portalregion, welche die Helix α -II und die Schleifenregionen der Faltbattstränge β C und β D sowie β E und β F umfaßt. Die Ursache der erhöhten Dispersion liegt vermutlich in der Dynamik dieser Region begründet, welche zum Vorhandensein vergleichsweise weniger Abstandsbeschränkungen der entsprechenden Reste führt. Der

RMSD-Wert des Proteinrückgrates für die Reste 2-130 fällt von $0,85 \pm 0,12 \text{ \AA}$ auf $0,72 \pm 0,10 \text{ \AA}$ ab, wenn man die Portalregion (Reste 24-38, 55-58 und 74-78) nicht berücksichtigt. Dies zeigt deutlich die gute Definition der Lösungsstruktur außerhalb des Fettsäureportals

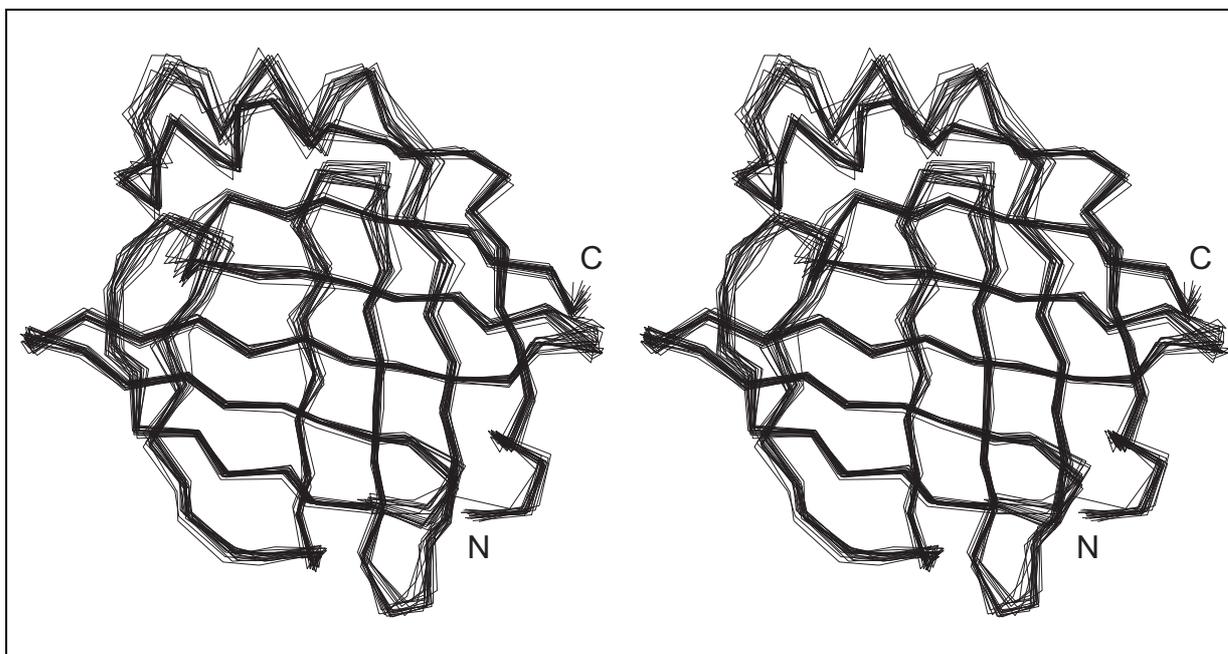
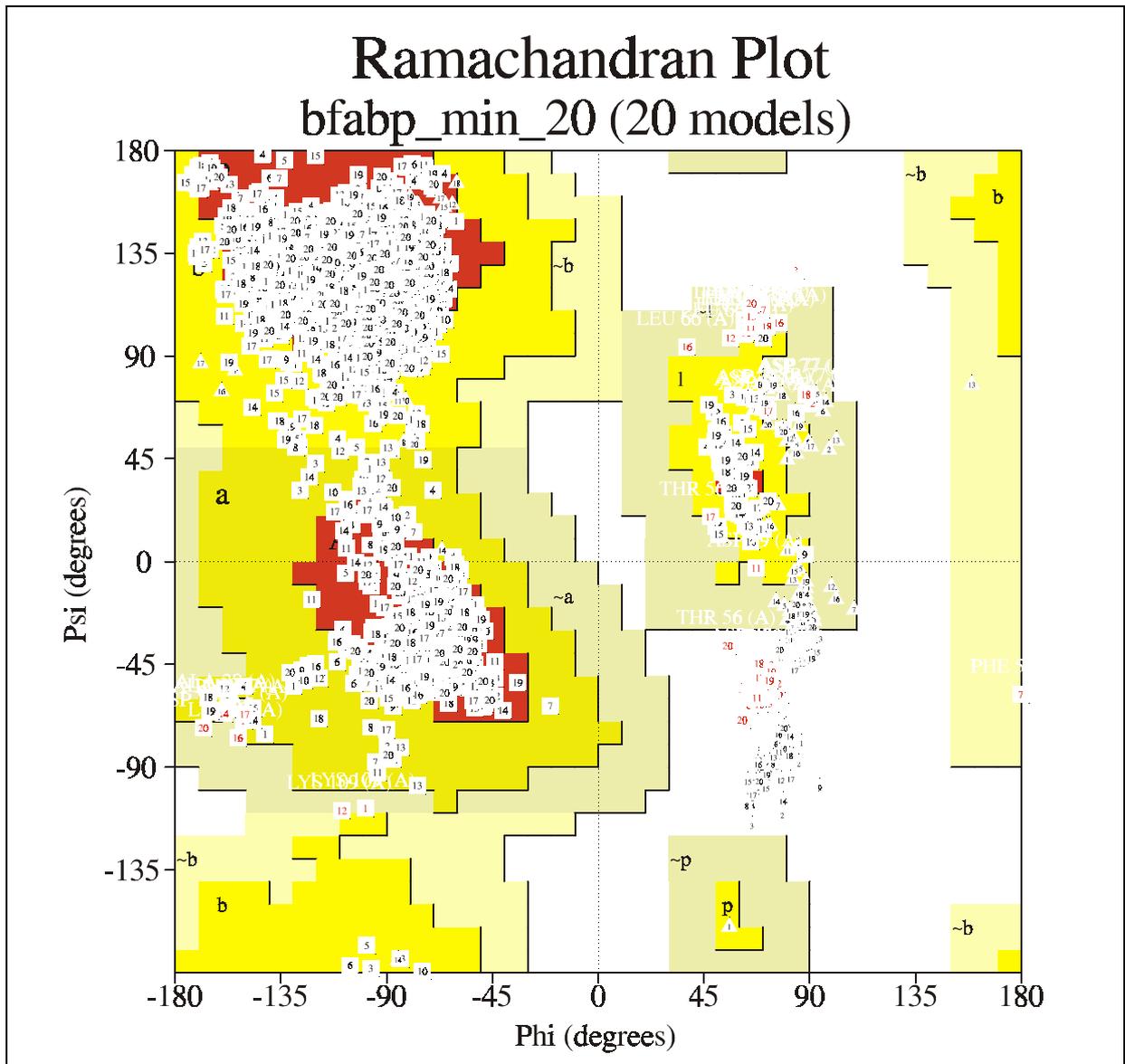


Abb. 35: Stereodiagramm des Strukturensambles der 20 besten Strukturen aus der Torsionswinkeldynamikrechnung nach Energieminimierung. Im Bereich der Portalregion, die Helix α -II sowie die Schleifenregionen β C- β D und β E- β F umfaßt, ist eine größere Dispersion erkennbar.

Die Qualität der energieminimierten Strukturen wurde mit PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1993) analysiert. Das erhaltene Ramachandran-Diagramm in Abbildung 36 zeigt durch Farbabstufungen im Hintergrund verschieden intensiv populierte Bereiche, die einer Hyperfläche der potentiellen Energie entsprechen. Rote, gelbe und hellgelbe Regionen markieren energetisch günstige ϕ - ψ Winkelkombinationen, die als erlaubte Bereiche bezeichnet werden. In den sogenannten unerlaubten weißen Regionen befinden sich Konformationen mit erhöhtem Energiegehalt, bei denen die Diederwinkelleinstellungen zu ungünstigen van-der-Waals-Kontakten führen. Im Falle des humanen B-FABP befinden sich 83,2% der Aminosäurereste in besonders günstigen (rot), 14,8% in zusätzlich erlaubten (gelb), 1,0% in großzügig erlaubten (hellgelb) und 1,0% in verbotenen Bereichen (weiß).

Die Lösungsstruktur des humanen B-FABP besteht aus 10 antiparallelen β -Faltblattsträngen (A bis J) und zwei kurzen α -Helices, die eine Helix-Turn-Helix Domäne bilden (Abbildung 37). Die β -Faltblattstränge A bis D und E bis J bilden ein kontinuierliches Faltblatt, welches



Reste in besonder günstigen Bereichen	83,2%
Reste in zusätzlich erlaubten Bereichen	14,8%
Reste in großzügig erlaubten Bereichen	1,0%
Reste in verbotenen Bereichen	1,0%

Abb. 36: Ramachandran-Diagramm für das Ensemble der 20 besten Strukturen nach der Energieminimierung (siehe Tabelle 7). Die roten, gelben und hellgelben Regionen markieren energetisch günstige ϕ - ψ Winkelkombinationen. Die sogenannten verbotenen Regionen (weiße Flächen) hingegen sind energetisch ungünstig. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1993).

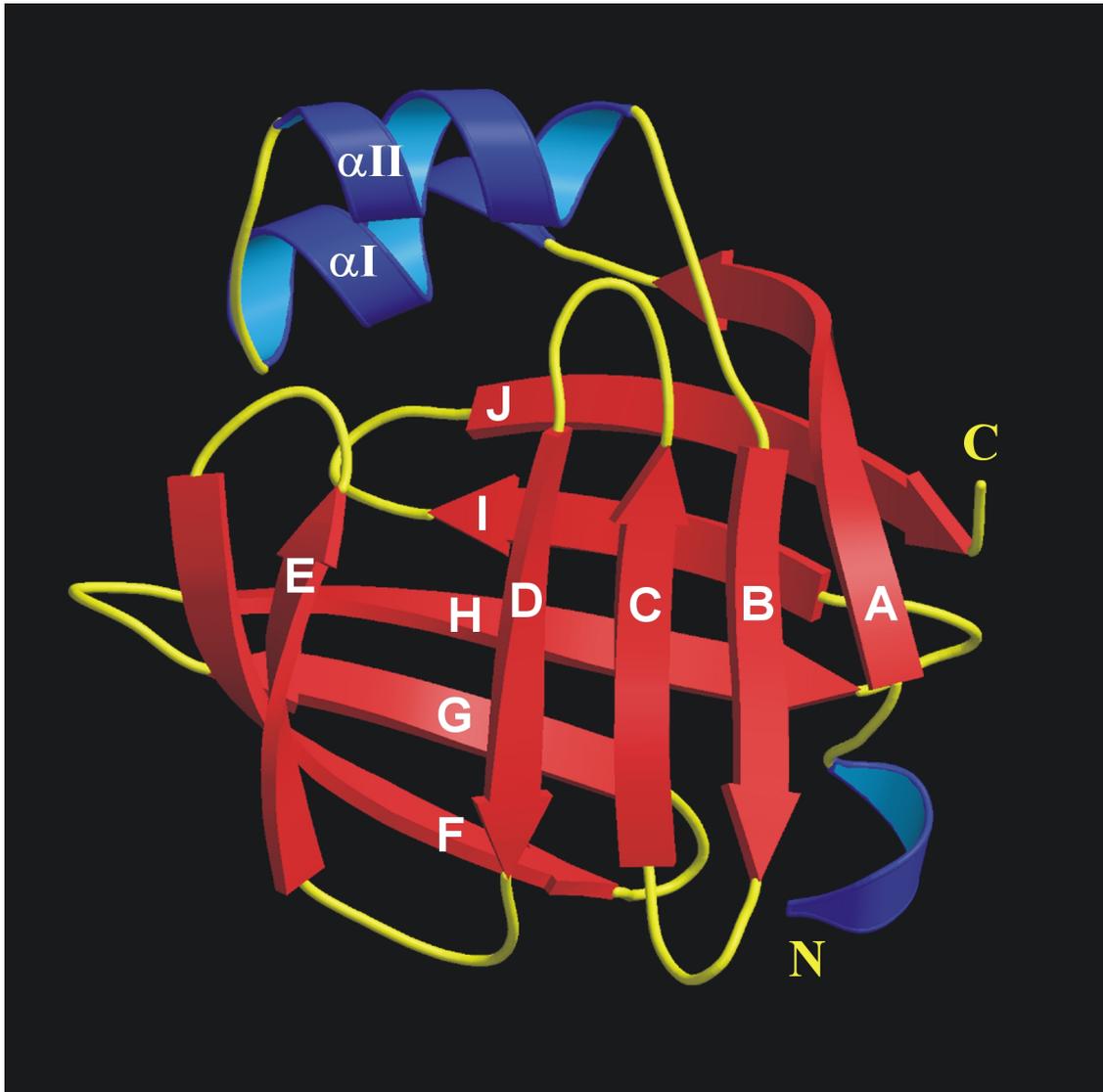


Abb. 37: Skizze des Proteinrückgratverlaufs der energetisch günstigsten Konformation des humanen B-FABP in Lösung. Die β -Faltblattstränge (A bis J) und die α -Helices (α I und α II) sind mit weißen Buchstaben beschriftet. Eine helikaler Schleife wurde am N-Terminus gefunden. Die Ligandenbindungsstelle befindet sich innerhalb des Hohlraums der Bindungstasche, die durch die β -Faßstruktur definiert ist. Die Darstellung erfolgte mit den Programmen MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und Raster3D (Merrit & Bacon, 1997).

zwischen den β -Faltblattsträngen D und E unterbrochen ist, aber die β -Faltblattstränge A und J miteinander verbindet. Die N-terminalen Reste V1-F4 formen eine helikalen Schleife (3_{10} -Helix), die in den Faltblattstrang β A (A6-Q14) mit einem Knick (“bulge”) bei den Resten T11-N12 übergeht. Die beiden kurzen α -Helices, Helix α I (F16-L23) and α -II (F27-V35), verbinden den ersten und zweiten β -Faltblattstrang. Der Rest der Struktur ist durch eine Serie von antiparallelen β -Faltblattsträngen definiert, die meistens durch β -Schleifenregionen verbunden sind: β B (T39-Q44), β C (V49-L54), β D (N59-F64), β E (E69-T74), β F (R78-L86), β G (L91-K96), β H (E101-I108), β I (M113-T118) und β J (V123-K130).

4.2.2.3 Vergleich mit der Kristallstruktur des humanen B-FABP

Zum Vergleich mit der bis auf 2,1 Å aufgelösten Röntgenstruktur des humanen B-FABP im Komplex mit DHA (Balendiran *et al.*, 2000; abgelegt unter 1FDQ in der RCSB Protein Data Bank) wurden alle 20 Konformere, welche die Lösungsstruktur repräsentieren, von Aminosäure 2-130 mit der Kristallstruktur übereinandergelegt (Abb. 38). Der RMSD-Wert beträgt $0,81 \pm 0,08$ Å bzw. $0,82 \pm 0,09$ Å für die Proteinrückgrat-atome relativ zu den Röntgenstrukturketten A und B, wobei die Ketten zueinander einen Proteinrückgrat-RMSD-Wert von $0,43$ Å aufweisen. Dies zeigt insgesamt eine gute Übereinstimmung zwischen Kristall- und Lösungsstruktur. Die Sekundärstrukturelemente stimmen ebenfalls gut in Position und Länge überein. Die kurze N-terminale Schleife scheint ein Charakteristikum für A-, B-, E-, H- und My-FABP zu sein, die zur FABP-Unterfamilie IV gehören und Fettsäuren in einer U-förmigen Konformation bindet. Auf der anderen Seite zeigen alle CRBPs und CRABPs, die ebenfalls einen verlängerten N-Terminus besitzen, nur einen kleinen Knick

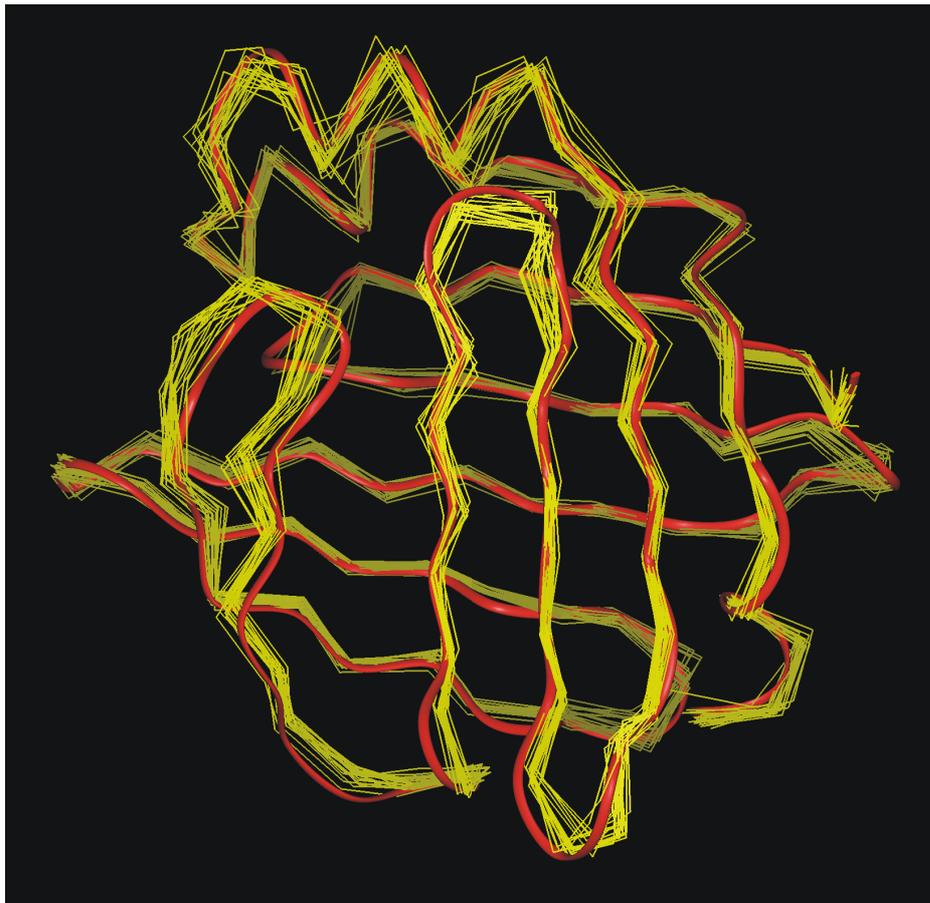


Abb. 38: Superposition der Kristallstruktur des humanen B-FABP (Balendiran *et al.*, 2000) mit dem Ensemble der 20 besten Lösungsstrukturen nach der Energieminimierung. Erkennbar ist die gute Übereinstimmung zwischen den Strukturen und die erhöhte Dispersion des NMR-Strukturensembles in einzelnen Schleifen sowie besonders im Bereich der Portalregion.

(Noy, 2000; Folli *et al.*, 2001; Franzoni *et al.*, 2002), während die restlichen FABPs (I-FABP, L-FABP und ILBP) einen kürzeren N-Terminus haben und somit auch keine helikale Schleife ausbilden können. Die helikale Konformation am N-Terminus (V1-F4) könnte neben dem hydrophoben Cluster einen zusätzlichen Beitrag zur Stabilisierung des unteren Teils der β -Faßstruktur spielen. V1 und F4 zeigen beide NOE-Kontakte zu Resten in der β G- β H-Schleifenregion: Die Seitenkette von F4 (L7 in E-FABP) ist ein zentraler Teil des hydrophoben Clusters, V1 interagiert mit den Seitenketten von L66 und L86 und bildet quasi eine Barriere für das externe Solvens. Dies könnte möglicherweise die erhöhte Proteinstabilität der meisten Mitglieder der FABP Unterfamilie IV erklären (Zimmerman *et al.*, 2001).

4.2.2.4 Vergleich mit den Lösungsstrukturen des H-FABP aus Mensch und Rind

Mehrere Punkte in den NMR-Spektren des humanen B-FABP deuten auf eine starke strukturelle und funktionelle Verwandtschaft zum H-FABP hin. Vergleichsweise starke Ähnlichkeiten wurden bei NMR-Studien an E-FABP, I-FABP, ILPB, CRBP I, CRBP II und CRABP II (Gutiérrez-González *et al.*, 2002; Hodsdon & Cistola, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Lücke *et al.*, 1996; Franzoni *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998) nicht gefunden; für My-FABP liegen bisher keine NMR-Daten vor. Zusätzliche NMR-Untersuchungen an A-FABP (Constantine *et al.*, 1998) könnten vergleichbare Ergebnisse liefern.

Während der Zuordnung zeigte sich bedingt durch die starke Sequenzhomologie (67% im Vergleich zu H-FABP aus Mensch wie auch aus Rind), daß die Protonenresonanzen einiger Aminosäure-Spinsysteme des B-FABP nahezu identisch zum H-FABP sind (Lassen *et al.*, 1995; Lücke *et al.*, 2001) bzw. eine starke Ähnlichkeit aufweisen. Mehr als 53% aller Aminosäurereste bzw. mehr als 80% der konservierten Aminosäurereste zeigen eine maximale Abweichung der chemischen Verschiebung von $< 0,30$ ppm für die Proteinerückgrat- und Seitenkettenprotonen, was die starke strukturelle Verwandtschaft dieser beiden Proteine unterstreicht (Wishart *et al.*, 1991). Abbildung 39 zeigt im Detail die Abweichung der chemischen Verschiebungen (Δ ppm) zwischen B-FABP und den beiden H-FABPs für jede Aminosäure in Graustufen kodiert. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen von A-FABP (Constantine *et al.*, 1998) und E-FABP (Gutiérrez-González *et al.*, 2002) mit H-FABP (Abb.40), welche 63% bzw. 49% Sequenzhomologie aufweisen, zeigt nur noch für 45% bzw. 23% aller Aminosäurereste Abweichungen von $< 0,30$ ppm (Tab. 8).

	1	10	20	30	40	50	
hB-FABP	VEAF	CATWKL	TNSQNFDEYMKALGVGFATRQVGNVTKPTVI	IISQEGDKVV			100%
hH-FABP	VDAFL	GTWKL	VDSKNFDDYMKSLGVGFATRQVASMTKPTTIIIEKNGDILT				67%
bH-FABP	VDAFV	GTWKL	VDSKNFDDYMKSLGVGFATRQVGNMTKPTTIIIEVNGDTVI				67%
		60	70	80	90	100	
hB-FABP		IRTL	STFKNTEISFQLGEEFDETTADDRNCKSVVSLDGD	KL	VHIQKWDGK		
hH-FABP		LKTH	STFKNTEISFKLGVEFDETTADDRKVKSI	VTLDGGKLVHLQKWDGQ			
bH-FABP		IKTQ	STFKNTEISFKLGVEFDETTADDRKVKSI	VTLDGGKLVHVQKWDGQ			
		110	120				
hB-FABP		ETNFVREIKDGKMVMTLTF	GDVVAVRHYEKA	131			
hH-FABP		ETTLVRELIDGKLILTLTHGTAVCTR	TYEKEA	132			
bH-FABP		ETSLVREMVDGKLILTLTHGTAVCTR	TYEQA	132			

Abb. 39: Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem B-FABP mit H-FABP aus Mensch und Rind in Korrelation mit der Abweichung der chemischen Verschiebungen (Δ ppm) in den einzelnen Resten. Die Graustufung gibt die Größe der maximalen Differenz einer Protonenresonanz in der jeweiligen Aminosäure an: dunkelgrau: $< 0,10$ ppm, hellgrau: $0,10 - 0,30$ ppm, fett: $0,31 - 0,50$ ppm, kursiv: $> 0,50$ ppm.

	1	10	20	30	40	50	
hH-FABP	...	VDAFL	GTWKL	VDSKNFDDYMKSLGVGFATRQVASMTKPTTIIIEKNGDILT			100%
hA-FABP	...	CDAFV	GTWKL	VSSNFDDYMKSLGVGFATRQVASMTKPTTIIIEKNGDILT			63%
hE-FABP		MATVQ	QLEGRWRLVDSKGFDEYMKELGVGIALRKM	GAMAKPDCIITCDGKNLT			49%
		60	70	80	90	100	
hH-FABP		LKTH	STFKNTEISFQLGEEFDETTADDRKVKSI	VTLDGGKLVHLQKWDGQ			
hA-FABP		IKSE	STFKNTEISFILGQEFDETTADDRKVKSI	TITLDGGVLVHVQKWDGQ			
hE-FABP		IKTES	TLKTTQFSC	TLGEDFEETTADGRDTQVCNFTDGALVQHQEW	DK		
		110	120				
hH-FABP		ETTLVRELIDGKLILTLTHGTAVCTR	TYEKEA	132			
hA-FABP		STTIK	KRKREDDKLVVECVMKGVSTRVYERA	131			
hE-FABP		ESTI	TRKLDGKLVVECVMNVTCTRIYEKVE	135			

Abb. 40: Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem B-FABP mit humanen A-FABP und E-FABP in Korrelation mit der Abweichung der chemischen Verschiebungen (Δ ppm) in den einzelnen Resten. Die Graustufung gibt die Größe der maximalen Differenz einer Protonenresonanz in der jeweiligen Aminosäure an: dunkelgrau: $< 0,10$ ppm, hellgrau: $0,10 - 0,30$ ppm, fett: $0,31 - 0,50$ ppm, kursiv: $> 0,50$ ppm.

Tab. 8: Maximale Abweichung der chemischen Verschiebung (Δ ppm) einer Protonenresonanz in den Aminosäureresten des humanen B-FABP mit H-FABP aus Mensch und Rind sowie des humanen H-FABP im Vergleich mit humanen A- und E-FABP.

Max. Abweichung einer ^1H Resonanz in den einzelnen Aminosäureresten	Zahl der Aminosäurereste			
	hB-FABP relativ zu bH-FABP	hB-FABP relativ zu hH-FABP	hA-FABP relativ zu hH-FABP	hE-FABP relativ zum hH-FABP
Δ ppm $< 0,10$ ppm	35	28	8	7
Δ ppm = $0,10 - 0,30$ ppm	40	42	51	24
Δ ppm = $0,31 - 0,50$ ppm	13	14	12	15
Δ ppm $> 0,50$ ppm	44	48	60	88

Die Seitenketten des A-FABP sind allerdings nur bis zum H δ zugeordnet, so daß für eine genauere Einstufung zusätzliche Experimente erforderlich wären. Beim E-FABP ist die deutlich niedrigere Sequenzhomologie die Ursache für die geringe Ähnlichkeit. My-FABP wurde bisher NMR-spektroskopisch nicht untersucht.

Analog zum H-FABP (Lücke *et al.*, 2001) aus Mensch und Rind zeigen mehrere Aminosäurereste des humanen B-FABP vornehmlich um die Portalregion herum Spinsystem-Heterogenitäten. 12 der 14 Reste, die mehrfache Protonenspinsysteme aufweisen, sind im Bereich der Portalregion zu finden: G26, Q31, V32, G33, F57, A75 mit zwei, die Reste L23, V35, T36, K58 und T60 mit drei und Asparagin N59 sogar vier mit separaten Spinsystemen. Wie vor kurzem von Lücke *et al.* (2001) veröffentlicht, deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß auch beim humanen B-FABP bis zu vier verschiedene stabile Konformationszustände im Bereich der Portalregion durch eine Mischung endogener Fettsäuren in der Probe hervorgerufen werden. Als einzige Reste außerhalb der Portalregion zeigen F104 und V105 Spinsystem-Heterogenitäten. Die mögliche Ursache könnten in diesem Fall auch Kontakte zwischen der gebundenen Fettsäure und dem F104-Phenylring sein, der im H-FABP nicht konserviert ist. Eine Bindung der Fettsäuren nach einem „Selected-Fit“ Mechanismus wie beim H-FABP scheint somit auch für das B-FABP wahrscheinlich.

Abschließend wird diese Annahme zusätzlich durch das Auftreten von einigen ^1H -Resonanzen im B-FABP unterstützt, die in NMR-Spektren normalerweise nicht beobachtet werden. Analog zum H-FABP konnten die im Innern der Bindungstasche befindlichen Protonenresonanzen für S82 O γ H und H93 N ϵ 2H bei 5.89 ppm bzw. 11.93 ppm zugeordnet werden. Dies ist nur möglich, wenn diese Protonen vom Lösungsmittel abgeschirmt sind und sehr langsam austauschen. Die gleichen Resonanzen wurden auch für H-FABP gefunden (Lücke, persönliche Mitteilung), wo sie Teil eines sehr komplizierten Wasserstoffbrückennetzwerkes innerhalb der Bindungstasche darstellen, welches 13 Wassermoleküle sowie mehrere hydrophile Seitenketten, insbesondere E72, S82, H93 und R106, umfaßt (Young *et al.*, 1994). Dieses elektrostatische Netzwerk im zentralen Bereich der Bindungstasche scheint ein integraler Bestandteil der Proteinstruktur zu sein, da der Imidazolring des H93 sowohl bei der apo- als auch bei der holo-Form des Rinderherz FABP nicht titrierbar ist (Huang, 1999). Die Seitenketten von H93 und S82 scheinen daher selbst in der apo-Form dem externen Solvens unzugänglich zu sein. Da die Aminosäuren E72, S82, H93 und R106 im humanen B-FABP konserviert sind, läßt sich ein vergleichbares

Wasserstoffbrückennetzwerk auch für B-FABP postulieren. Unterstützt wird diese Vermutung durch fünf Kristallwassermoleküle im Ölsäurekomplex des B-FABP (Balendiran *et al.*, 2000), in dem die Fettsäure auch in U-Form gebundet ist. Diese Schicht von hochgeordneten Wassermolekülen im Proteininnern trägt höchstwahrscheinlich zu der hohen Strukturstabilität und Fettsäurebindungsaffinität von H-FABP und B-FABP bei.

Der Hauptunterschied zwischen humanem B-FABP und H-FABP ist wahrscheinlich der nicht konservierte Phenylring in Position 104 im Innern der Bindungstasche. Im B-FABP:DHA-Komplex bildet der F104-Ring π - π Wechselwirkungen mit der C4-C5 Doppelbindung des Liganden aus (Balendiran *et al.*, 2000). Diese π - π Wechselwirkungen sind eventuell auch möglich für die homologen B-FABP aus Maus und Ratte, bei denen das F104 durch ein Cystein substituiert ist. Das L104 des B-FABP aus Rind hingegen ist sicherlich nicht in der Lage solche Wechselwirkungen einzugehen. Ein hydrophober Rest in Position 104 ist aber allen B-FABPs gemein und scheint die Ligandbindung zu stabilisieren.

Während der B-FABP:Ölsäure-Komplex den Liganden in einer U-förmigen Konformation wie im H-FABP bindet, nimmt die gebundene DHA eine helikale Konformation ein (Balendiran *et al.*, 2000). Diese in FABPs ungewöhnliche Ligandenanordnung wird durch die π - π Wechselwirkungen der sechs *cis* Doppelbindungen in DHA mit diversen Proteinseitenketten ermöglicht. Der ω -Terminus des DHA Liganden ragt in das Zentrum des hochgeordneten Wasserstoffbrückennetzwerks hinein. Deshalb werden im Innern des B-FABP:DHA-Komplexes nur sechs, nicht miteinander verknüpfte Kristallwassermoleküle gefunden, von denen lediglich drei bis auf 0,1 Å deckungsgleich sind mit den 13 Kristallwassermolekülen in der H-FABP Bindungstasche. Diese Störung des internen Wasserstoffbrückennetzwerks könnte die Ursache für die verringerte Bindungsaffinität des B-FABP und H-FABP für langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren sein, wie von Richieri *et al.* (2000) und Zimmerman *et al.* (2001) beschrieben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, mit der Methode der NMR-Spektroskopie strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Fettsäurebindungsproteinen zu untersuchen.

NMR-Spektren von Proteinen mit hohem β -Faltblattanteil, wie H-FABP, zeigen häufig eine große Dispersion mit einer typischen Verteilung tief- und hochfeldverschobener Signale. Es wurden 1D/2D ^1H -NMR Spektren für den Wildtyp und mehrere Mutanten (F4E, F4S, F4S/W8E, W8E, F16E, F16S, K21I, F64S, L66G und E72S) des humanen H-FABP aufgenommen und so weit wie möglich zugeordnet. Auf diese Weise ließ sich bestimmen, ob die typische β -Faßstruktur des Wildtyp bei den Mutanten noch intakt ist. Fast alle Mutanten wiesen eine Signalaufspaltung von 10,2 bis $-0,4$ ppm wie der Wildtyp auf, nur die W8-Mutanten W8E und F4S/W8E zeigen keine Struktur mehr.

H-FABP zeigt in NMR-Spektren sogenannte Spinsystem-Heterogenitäten, die auf mehrere parallel existierende konformationelle Zustände zurückzuführen sind und im NMR-Zeitfenster ($\tau < 200$ ms) nicht untereinander austauschen. Diese Spinsystem-Heterogenitäten werden nicht direkt durch Liganden verursacht, da sie auch in delipidierten H-FABP-Spektren vorhanden sind. Noch sind sie abhängig von der Position der in räumlicher Nachbarschaft befindlichen Seitenkette des F57, da sie auch in den Spektren einer F57S-Mutante anwesend sind. Eine Relipidierung der H-FABP Proben mit unterschiedlichen Fettsäuren führte zu einer selektiven Bevorzugung einzelner Spinsysteme. So konnte gezeigt werden, daß die Ligandenbindung beim H-FABP nach einem „selected-fit“ Mechanismus abläuft, bei dem je nach gebundenem Liganden (Palmitin-, Palmitolein-, Stearin- oder Ölsäure) unterschiedliche, schon vorher vorliegende Konformationen des Proteinrückgrates bevorzugt werden.

Ein weiterer Teil der hier vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Lösungsstruktur des humanen B-FABP. Es wurde zur Strukturaufklärung die holo-Form des Proteins verwendet, die ein Fettsäuregemisch endogener Fettsäuren enthielt. Durch den Einsatz mehrdimensionaler homonuklearer und ^{15}N -editierter NMR-Experimente gelang es, nahezu

alle ^1H und ^{15}N Resonanzen der Aminosäuren zuzuordnen. Lediglich für K37 konnten in den Spektren keine Signale gefunden werden.

Nach einer automatisierten Zuordnung der aus den NOESY-Spektren gewonnenen Abstandsbeschränkungen wurde zur Verfeinerung der Lösungsstruktur des humanen B-FABP ein strukturgefilterter Iterationsprozeß durchlaufen. Mit 2490 Abstandsrandbedingungen zwischen Protonenpaaren sowie 106 stereospezifischen Zuordnungen wurden Torsionswinkeldynamikrechnungen mit abschließender Energieminimierung durchgeführt. Ein mittlerer globaler RMSD-Wert der Proteinrückgratotope von $0,85 \pm 0,12 \text{ \AA}$ erfüllt die Ansprüche einer hochaufgelösten Struktur.

Die Tertiärstruktur entspricht einem β -Faß bzw. einer β -Muschel. Sie besteht aus zehn antiparallelen β -Faltblattsträngen und einer kurzen Helix-Turn-Helix Domäne. Die β -Faltblattstränge bilden zwei nahezu orthogonale β -Faltblätter von jeweils fünf Strängen. Die Lösungsstruktur ähnelt trotz teilweise niedriger Sequenzhomologie den bereits bekannten Strukturen der FABPs aus unterschiedlichsten Organismen. Eine sehr gute Übereinstimmung wurde im Vergleich mit der Lösungsstruktur des H-FABP beobachtet. Die enge Verwandtschaft beider zur Unterfamilie IV gehörenden Proteine äußert sich durch die hohe Sequenzhomologie (67%), die Ähnlichkeit der Konformation und Bindungsaffinität der Liganden, die helikale Konformation am N-Terminus (V1-F4) und ein vergleichbares Wasserstoffbrückennetzwerk innerhalb der Bindungstasche.

6 LITERATUR

Abe, H., Braun, W., Nogutti, T. & Go, N. (1983) Rapid Calculation of First and Second Derivatives of Conformational Energy with Respect to Dihedral Angles in Proteins. General Recurrent Equations. *Comput. Chem.* **8**, 239-247

Armstrong, M.K., Bernlohr, D.A., Storch, J. & Clarke, S.D. (1990) The Purification and Characterization of Fatty Acid Binding Protein Specific to Pig Adipose Tissue. *Biochem. J.* **267**, 373-378

Åstrom, A., Tavakkol, A., Petterson, U., Cromie, M., Elder, J.T. & Voorhees, J.J. (1991) Molecular Cloning of Two Human Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins (CRABP). *J. Biol. Chem.* **266**, 17662-17666

Aue, W.P., Bartholdi, E., Ernst, R.R. (1976) Two-Dimensional Spectroscopy. Application to Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chem. Phys.* **64**, 2229-2246

Balendiran, G.K., Schnütgen, F., Scapin, G., Borchers, T., Xhong, N., Lim, K., Godbout, R., Spener, F. & Sacchettini, J.C. (2000) Crystal Structure and Thermodynamic Analysis of Human Brain Fatty Acid Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 27045-27054

Banaszak, L., Winter, N., Xu, Z., Bernlohr, D.A., Cowan, S. & Jones, T.A. (1994) Lipid-Binding Proteins: A Family of Fatty Acid and Retinoic Transport Proteins. *Adv. Prot. Chem.* **45**, 89-151

Baretzko, N., Lezius, A. & Spener, F. (1993) Isoforms of Fatty Acid-Binding Protein in Bovine Heart are Coded by Distinct mRNA. *Eur. J. Biochem.* **215**, 555-559

Bass, N.M. (1988) The Cellular Fatty Acid Binding Proteins: Aspects of Structure, Regulation, and Function. *Internat. Rev. Cytol.* **111**, 143-184

Bax, Al. & Davis, D.G. (1985) MLEV-17 Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360

Baxa, C.A., Sha, R.S., Buelt, M.K., Smith, A.J., Matarese, V., Chinander, L.L., Boundy, K.L. & Bernlohr, D A. (1989) Human Adipocyte Lipid-Binding Protein: Purification of the Protein and Cloning of its Complementary DNA. *Biochem.* **28**, 8683-8690

Bennet, E., Stenvers, K.L., Lund, P.K. & Popko, B. (1994) Cloning and Characterization of a cDNA Encoding a Novel Fatty Acid Binding Protein from Rat Brain. *J. Neurochem.* **63**, 1616-1624

- Benning, M.M., Smith, A.F., Wells, M.A. & Holden, H.M.** (1992) Crystallization, Structure Determination and Least-Squares Refinement to 1.75 Å Resolution of the Fatty-Acid-Binding Protein Isolated from *Manduca Sexta* L. *J. Mol. Biol.* **228**, 208-219
- Billich, S., Wissel, T., Kratzin, H., Hahn, U., Hagenhoff, B., Lezius, A. G. & Spener, F.** (1988) Cloning of a Full Length Complementary DNA for Fatty-Acid-Binding Protein from Bovine Heart. *Eur. J. Biochem.* **175**, 549-556
- Bloch, F.** (1946) Nuclear Induction. *Phys. Rev.* **70**, 460-474
- Bodenhausen, G. & Ruben, D.J.** (1980) Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185-189
- Böhmer, F.D., Kraft, R., Otto, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Kurtz, A., Müller, T., Rohde, K., Etzold, G., Lehman, W., Langen, F., Heldin, C.H. & Grosse, R.** (1987) Identification of a Polypeptide Growth Inhibitor from Bovine Mammary Gland. *J. Biol. Chem.* **262**, 15137-15143
- Börchers, T., Unterberg, C., Rudel, H., Robenek, H. & Spener, F.** (1989) Subcellular Distribution of Cardiac Fatty Acid-Binding Protein in Bovine Heart Muscle and Quantitation with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Biochim. Biophys. Acta* **1002**, 54-61
- Börchers, T., Hojrup, P., Nielsen, S.U., Roepstorff, P., Spener, F. & Knudsen, J.** (1990) Revision of the Amino Acid Sequence of Human Heart Fatty Acid-Binding Protein. *Mol. Cell. Biochem.* **98**, 127-133
- Bordewick, U., Heese, M., Börchers, T., Robenek, H. & Spener, F.** (1989) Compartmentation of Hepatic Fatty-Acid-Binding Protein in Liver Cells and Its Effect on Microsomal Phosphatidic Acid Biosyntheses. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **370**, 229-238
- Brandau, T.** (2000) **Dissertation**, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
- Braunschweiler, L. & Ernst, R.R.** (1983) Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **53**, 521-528
- Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer III, A.G. & Skelton, N.J.** (1996) *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice*, Academic Press, New York
- Chen, L.X., Zhang, Z., Scafonas, A., Cavalli, R.C., Gabriel, J.L., Soprano, K.J. & Soprano, D.R.** (1995) Arginine 132 of Cellular Retinoic Acid-Binding Protein (Type II) is Important for Binding of Retinoic Acid. *J. Biol. Chem.* **270**, 4518-4525
- Cheng, L., Qian, S., Rothschild, C., d 'Avignon, A., Lefkowitz, J.B., Gordon, J.I. & Li, E.** (1991) Alteration of the Binding Specificity of Cellular Retinol-Binding Protein II by Site-directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **266**, 24404-24412
- Cistola, D.P., Kim, K., Rogl, H. & Frieden, C.** (1996) Fatty Acid Interactions with a Helix-less Variant of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein. *Biochem.* **35**, 7559-7565

- Claffey, K., Herrera, B., Brecher, P. & Ruiz-Opazo, N.** (1987) Cloning and Tissue Distribution of Rat Heart Fatty Acid-Binding Protein mRNA: Identical Forms in Heart and Skeletal Muscle. *Biochem.* **26**, 7900-7904
- Constantine, K.L., Friedrichs, M.S., Wittekind, M., Jamil, H., Chu, C.-H., Parker, R.A., Goldfarb, V., Mueller, L. & Farmer, B.T.** (1998) Backbone and Side Chain Dynamics of Uncomplexed Human Adipocyte and Muscle Fatty Acid-Binding Proteins. *Biochem.* **37**, 7965-7980
- Corsico, B., Cistola, D.P., Frieden, C. & Storch, J.** (1998) The Helical Domain of Intestinal Fatty Acid Binding Protein is Critical for Collisional Transfer of Fatty Acids to Phospholipid Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12174-12178
- Cowan, S.W., Newcomer, M.E. & Jones, T.A.** (1993) Crystallographic Studies on a Family of Cellular Lipophilic Transport Proteins. Refinement of P2 Myelin Protein and the Structure Determination and Refinement of Cellular Retinol-Binding Protein in Complex with all-*trans*-Retinol. *J. Mol. Biol.* **230**, 1225-1246
- Das, T., Sa, G. & Mukherjea, M.** (1988) Purification and Characterization of Fatty Acid-Binding Protein from Human Placenta. *Lipids* **23**, 528-533
- Dell'Angelica, E.C., Ermacora, M.R. & Santome, J.A.** (1996) Purification and Partial Characterisation of a Fatty Acid-Binding Protein from the Yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **39**, 439-445
- Dodrell, D.M., Pegg, D.T. & Bendall, M.R.** (1982) Distortionless Enhancement of NMR Signals by Polarization Transfer. *J. Magn. Reson.* **48**, 323-327
- Eads, J., Sacchettini, J.C., Kromminga, A. & Gordon, J.I.** (1993) *Escherichia coli*-derived Rat Intestinal Fatty Acid Binding Protein with Bound Myristate at 1.5 Å Resolution and I-FABP (R106Q) with Bound Oleate at 1.74 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **268**, 26375-26385
- Feng, L., Hatten, M.E. & Heintz, N.** (1994) Brain Lipid-Binding Protein (BLBP): A Novel Signaling System in the Developing Mammalian CNS. *Neuron* **12**, 895-908
- Feng, L. & Heintz, N.** (1995) Differentiating Neurons Activate Transcription of the Brain Lipid-Binding Protein Gene in Radial Glia through a Novel Regulatory Element. *Development* **121**, 1719-1730
- Folli, C., Calderone, V., Ottonello, S., Bolchi, A., Zanotti, G., Stoppini, M. & Rudolfo, B.** (2001) Identification, Retinoid Binding, and X-Ray Analysis of a Human Retinol-Binding Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3710-3715
- Franzoni, L., Lücke, C., Pérez, C., Cavazzini, D., Rademacher, M., Ludwig, C., Spisni, G.L. & Rüterjans H.** (2002) Structure and Backbone Dynamics of Apo- and Holo-Cellular Retinol-Binding Protein in Solution. *J. Biol. Chem.*, *submitted*
- Giguere, V., Lyn, S., Yip, P., Siu, C. & Amin, S.** (1990) Molecular Cloning of cDNA Encoding a Second Cellular Retinoic Acid-Binding Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 6233-6237

- Glatz, J.F. & Veerkamp, J.H.** (1983) Removal of Fatty Acids from Serum Albumin by Lipidex 1000 Chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* **8**, 57-61
- Glatz, J.F. & van der Vusse, G.J.** (1996) Cellular Fatty Acid-Binding Proteins: Their Function and Physiological Significance. *Prog. Lipid Res.* **35**, 243-282
- Godbout, R., Bisgrove, D.A., Shkolny, D. & Day, R.S.** (1998) Correlation of B-FABP and GFABP Expression in Malignant Glioma. *Oncogene* **16**, 1955-1963
- Green, P., Glozman, S., Kamensky, B. & Yavin, E.** (1999) Developmental Changes in Rat Brain Membrane Lipids and Fatty Acids: The Preferential Prenatal Accumulation of Docosahexaenoic Acid. *J. Lipid Res.* **40**, 960-966
- Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K. & Ernst, R.R.** (1988) Clean TOCSY for ¹H Spin System Identification in Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7870-7872
- Güntert, P., Braun, W. & Wüthrich, K.** (1991) Efficient Computation of Three-Dimensional Protein Structures in Solution from Nuclear Magnetic Resonance Data Using the Programm DIANA and the Supporting Programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.* **217**, 517-530
- Güntert, P., Mumenthaler, C. & Wüthrich, K.** (1997) Torsion Angle Dynamics for NMR Structure Calculation with the new Program DYANA. *J. Mol. Biol.* **273**, 283-298
- Gutiérrez-González, L.H., Ludwig, C., Hohoff, C., Rademacher, M., Hanhoff, T., Rüterjans, H., Spener, F. & Lücke, C.** (2002) Solution Structure and Backbone Dynamics of Human Epidermal-Type Fatty Acid Binding Protein (E-FABP). *Biochem. J.*, *in press*
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for Transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning Vol. I: A Practical Approach*, ed. Glover, D.M., IRL Press, Oxford, United Kingdom, 109-135
- Hauerland, N.H. & Chisholm, J.M.** (1990) Fatty Acid Binding Protein in Flight Muscle of the Locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochim. Biophys. Acta* **1047**, 233-238
- Hauerland, N.H., Jacobson, B.L., Wesenberg, G., Reymont, I. & Holden, H.M.** (1994) Three-Dimensional Structure of the Muscle Fatty-Acid-Binding Protein Isolated from the Desert Locust *Schistocerca gregaria*. *Biochem.* **33**, 12378-12385
- Hayasaka, K., Nanao, K., Tahara, M., Sato, W., Takada, G., Miura, M. & Uyemura, K.** (1991) Isolation and Sequence Determination of cDNA encoding P2 Protein of Human Peripheral Myelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 204-207
- Herr, F.M., Aronson, J. & Storch, J.** (1996) Role of Portal Region Lysine Residues in Electrostatic Interactions between Heart Fatty Acid Binding Protein and Phospholipid Membranes. *Biochem.* **35**, 1296-1303
- Hodsdon, M.E., Ponder, J.W. & Cistola, D.P.** (1996) The NMR Solution Structure of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Complexed with Palmitate: Application of a Novel Distance Geometry Algorithm. *J. Mol. Biol.* **264**, 585-602

- Hodsdon, M.E. & Cistola, D.P.** (1997) Discrete Backbone Disorder in the Nuclear Magnetic Resonance Structure of Apo Intestinal Fatty Acid-Binding Protein: Implications for the Mechanism of Ligand Entry. *Biochem.* **36**, 1450-1460
- Hohoff, C. & Spener, F.** (1998) Fatty Acid Binding Proteins and Mammary-Derived Growth Inhibitor. *Fett.-Lipid.* **100**, 252-263
- Hohoff, C., Börchers, T., Rüstow, B., Spener, F. & van Tilbeurgh, H.** (1999) Expression, Purification, and Crystal Structure Determination of Recombinant Human Epidermal-Type Fatty Acid Binding Protein, *Biochem.* **38**, 12229-12239
- Huang, S.** (1999) **Diplomarbeit**, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN)** (1970) Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents, Recommendations 1970. *Biochem. J.* **120**, 449-454
- Jagschies, G., Reers, M., Unterberg, C. & Spener, F.** (1985) Bovine Fatty Acid Proteins: Isolation and Characterisation of Two Cardiac Fatty Acid Binding Proteins that are Distinct from Corresponding Hepatic Proteins. *Eur. J. Biochem.* **152**, 537-545
- Jeener, J., Meier, B.H., Bachmann, P. & Ernst, R.R.** (1979) Investigation of Exchange Progress by Two-Dimensional NMR Spectroscopy *J. Chem. Phys.* **71**, 4546-4553
- Jones, T.A., Bergfors, T., Sedzik, J. & Unge, T.** (1988a) The Three-Dimensional Structure of P2 Myelin Protein. *EMBO J.* **7**, 1597-1604
- Jones, P.D., Carne, A., Bass, N.M. & Grigor, M.R.** (1988b) Isolation and Characterization of Fatty Acid Binding Proteins from Mammary Tissue of Lactating Rats. *Biochem. J.* **251**, 919-925
- Kanda, T., Foucand, L., Nakamura, Y., Niot, I., Besnard, P., Fujita, M., Sakai, Y., Hatakeyama, K., Ono, T. & Fujii, H.** (1998) Regulation of Expression of Human Intestinal Bile Acid-Binding Protein in Caco-2 Cells. *Biochem. J.* **330**, 261-265
- Kanda, T., Iseki, S., Hitomi, M., Kimura, H., Odani, S., Kondo, H., Matsubara, Y., Muto, T. & Ono, T.** (1989) Purification and Characterization of a Fatty-Acid-Binding Protein from the Gastric Mucosa of Rats. *Eur. J. Biochem.* **185**, 27-33
- Kay, L.E., Keifer, P. & Saarinen, T.** (1992) Pure Absorption Gradient Enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy with Improved Sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10663-10665
- Keehyuk, K., Cistola, D.P. & Frieden, C.** (1996) Intestinal Fatty Acid-Binding Protein: The Structure and Stability of a Helix-less Variant. *Biochem.* **35**, 7553-7558
- Kim, K., Ramanathan, R. & Frieden, C.** (1997) Intestinal Fatty Acid Binding-Protein: A Specific Residue in one Turn Appears to Stabilize the Native Structure and be Responsible for Slow Refolding. *Protein Sci.* **6**, 364-372

- Kimura, H., Hitomi, M., Odani, S., Koide, T., Arakawa, M. & Ono, T.** (1989) Rat Heart Fatty Acid-Binding Protein. Evidence that Supports the Amino Acid Sequence Predicted from the cDNA. *Biochem. J.* **260**, 303-306
- Kleywegt, G.J., Bergfors, T., Senn, H., Motte, P.L., Gsell, B., Shudo, K. & Jones, T.A.** (1994) Crystal Structures of Cellular Retinoic Acid Binding Proteins I and II in Complex with all-*trans*-Retinoic Acid and a Synthetic Retinoid. *Structure* **12**, 1241-1258
- Kraulis, P.J.** (1991) MOLSCRIPT: A Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950
- Kurtz, A.** (1994) The Expression Pattern of a Novel Gene Encoding Brain Fatty Acid-Binding Protein Correlates with Neuronal and Glial Cell Development. *Development* **120**, 2637-2649
- Lämmli, U.K.** (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- LaLonde, J.M., Bernlohr, D.A., Banaszak, L.J.** (1994a) X-Ray Crystallographic Structures of Adipocyte Lipid-Binding Protein Complexed with Palmitate and Hexadecanesulfonic Acid. Properties of Cavity Binding Sites. *Biochem.* **33**, 4885-4895
- LaLonde, J.M., Levenson, M.A., Roe J.J., Bernlohr, D.A., Banaszak, L.J.** (1994b) Adipocyte Lipid-Binding Protein Complexed with Arachidonic Acid. *J. Biol. Chem.* **269**, 25339-25347
- Lam, K.T., Borkan, S., Claffey, K.P., Schwartz, J.H., Chobanian, A.V. & Brecher, P.** (1988) Properties and Differential Regulation of Two Fatty Acid Binding Proteins in the Rat Kidney. *J. Biol. Chem.* **263**, 15726-15728
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M.** (1993) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for Checking the Quality of Protein Structures Solved by NMR. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283-291
- Lassen, D., Lücke, C., Kveder, M., Mesgarzadeh, A., Schmidt, J.-M., Specht, B., Lezius, A., Spener, F. & Rüterjans, H.** (1995) Three-Dimensional Structure of Bovine Heart Fatty-Acid-Binding Protein with Bound Palmitic Acid, Determined by Multidimensional NMR Spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **230**, 266-280
- Lassen, D.** (1994) **Dissertation**, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
- Lowe, J.B., Boguski, M.S., Sweetser, D.A., Elshourbagy, N.A., Taylor, J.M. & Gordon, J.I.** (1985) Human Liver Fatty Acid Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **260**, 3413-3417
- Lowe, J.B., Sacchettini, J.C., Laposata, M., McQuillan, J.J. & Gordon, J.I.** (1987) Expression of Rat Intestinal Fatty Acid-Binding Protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 5931-5937
- Lücke, C., Lassen, D., Kreienkamp, H.-J., Spener, F. & Rüterjans, H.** (1992) Sequence-specific ¹H-NMR Assignment and Determination of the Secondary Structure of Bovine Heart Fatty-Acid-Binding Protein. *Eur. J. Biochem.* **210**, 901-910

- Lücke, C., Zhang, F., Rüterjans, H., Hamilton, J.H. & Sacchettini, J.C.** (1996) Flexibility is a Likely Determinant of Binding Specificity in the Case of Ileal Lipid Binding Protein. *Structure* **4**, 785-800
- Lücke, C., Fushman, D., Ludwig, C., Hamilton, J.A., Sacchettini, J.C. & Rüterjans, H.** (1999) A Comparative Study of the Backbone Dynamics of Two Closely Related Lipid Binding Proteins: Bovine Heart Fatty Acid Binding Protein and Porcine Ileal Lipid Binding Protein. *Mol. Cell. Biochem.* **192**, 109-121
- Lücke, C., Zhang, F., Hamilton, J.A., Sacchettini, J.C. & Rüterjans, H.** (1999) Solution Structure of Ileal Lipid Binding Protein in Complex with Glycocholate. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2929-2938.
- Lücke, C., Rademacher, M., Zimmerman, A.W., van Moerkerk, H.T.B., Veerkamp, J.H. & Rüterjans, H.** (2001) Spin-System Heterogeneities Indicate a Selected-Fit Mechanism in Fatty Acid Binding to Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein (H-FABP). *Biochem. J.* **354**, 259-266
- Lu, J., Lin, C.-L., Tang, C., Ponder, J.W., Kao, J.L.F., Cistola, D.P. & Li, E.** (1999) The Structure and Dynamics of Rat Apo-Cellular Retinol-Binding Protein II in Solution: Comparison with the X-Ray. *J. Mol. Biol.* **286**, 1179-1195
- Lu, J., Lin, C.-L., Tang, C., Ponder, J.W., Kao, J.L.F., Cistola, D.P. & Li, E.** (2000) Binding of Retinol Induces Changes in Rat Cellular Retinol-Binding Protein II Conformation and Backbone Dynamics. *J. Mol. Biol.* **300**, 619-632
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J.** (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Madsen, P., Rasmussen, H.H., Leffers, H., Honore, B. & Celis, J.E.** (1992) Molecular Cloning and Expression of a Novel Keratinocyte Protein (Psoriasis-Associated Fatty Acid-Binding Protein [PA-FABP]) that is Highly Upregulated in Psoriatic Skin and that Shares Similarity to Fatty Acid-Binding Protein. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 299-305
- Marion, D. & Wüthrich, K.** (1983) Application of Phase Sensitive Two-Dimensional Correlated Spectroscopy (COSY) for Measurements of ^1H - ^1H Spin-Spin Coupling Constants in Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **113**, 967
- Matarese, V. & Bernlohr, D.A.** (1988) Purification of Murine Adipocyte Lipid-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 14544-14551
- Merrit, E.A. & Bacon, D.J.** (1997) Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics. *Methods Enzymol.* **277**, 505-524
- Mesgarzadeh, A., Pfeiffer, S., Engelke, J., Lassen, D. & Rüterjans, H.** (1998) Bound Water in Apo and Holo Bovine Heart Fatty-Acid-Binding Protein Determined by Heteronuclear NMR Spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **251**, 781-786

- Miller, W., Hickson, R. & Bass, N.** (1988) Fatty Acid Binding Proteins in the three Types of Rat Skeletal Muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **189**, 183-188
- Morris, G.A. & Freeman, R.** (1979) Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarisation Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 760-762
- Müller K.-D., Hausmann H. & Nalik H.-P.** (1990) A New and Rapid Method for the Assay of Bacterial Fatty Acids using High Resolution Capillary Gas Chromatography and Trimethylsulfonium Hydroxide. *Zbl. Bakt.* **274**, 174-182
- Müller-Fahrnow, A., Egner, U., Jones, T.A., Rüdell, H., Spener, F. & Saenger, W.** (1991) Three-Dimensional Structure of Fatty Acid-Binding Protein from Bovine Heart. *Eur. J. Biochem.* **199**, 271-276
- Muhandiram, D.R. & Kay, L.E.** (1994) Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. *J. Magn. Reson. Ser. B* **103**, 203-216
- Newcomer, M.E.** (1993) Structure of the Epididymal Retinoic Acid-Binding Protein at 2.1 Å Resolution. *Structure* **1**, 7-18
- Nilsson M.H., Spurr, N.K., Lundvall, J., Rask, L. & Peterson, P.A.** (1988) Human Cellular Retinol-Binding Protein Gene Organization and Chromosomal Location. *Eur. J. Biochem.* **173**, 35-44
- Noy, N.** (2000) Retinoid-Binding Proteins: Mediators of Retinoid Action. *Biochem. J.* **348**, 481-495
- Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B. & Ho, W.K.L.** (1972) A Binding Protein for Fatty Acids in Cytosol of Intestinal Mucosa, Liver, Myocardium and Other Tissues. *Science* **177**, 56-58
- Oudenampsen, E.** (1992) **Dissertation**, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- Owada, Y., Yoshimoto, T., Kondo, H.** (1996) Spatio-Temporally Differential Expression of Genes for three Members of Fatty Acid Binding Proteins in Developing and Mature Rat Brains. *J Chem Neuroanat* **12**, 113-122
- Paulussen, R.J., van der Logt, C.P.E. & Veerkamp, J.H.** (1988) Characterization and Binding Properties of Fatty Acid-Binding Proteins from Human, Pig, and Rat Heart. *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 533-545
- Paulussen, R.J., van Moerkerk, H.T.B. & Veerkamp, J.H.** (1990) Immunochemical Quantitation of Fatty Acid-Binding Proteins. Tissue Distribution of Liver and Heart FABP Types in Human and Porcine Tissues. *Int. J. Biochem.* **22**, 393-398
- Peeters, R.A., in 't Groen, M.A. & Veerkamp, J.H.** (1989) The Fatty Acid-Binding Protein from Human Skeletal Muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 556-563

- Peeters, R.A., Veerkamp, J.H., van Kessel, G.A., Kanda, T. & Ono, T.** (1991) Cloning of the cDNA Encoding Human Skeletal-Muscle Fatty Acid-Binding Protein, its Peptide Sequence and Chromosomal Localisation. *Biochem. J.* **276**, 203-206
- Prinsen, C.F.M. & Veerkamp, J.H.** (1996) Fatty Acid Binding and Conformational Stability of Mutants of Human Muscle Fatty Acid-Binding Protein. *Biochem. J.* **314**, 253-260
- Pristovšek, P., Lücke, C., Reincke, B., Ludwig, B. & Rüterjans, H.** (2000) Solution Structure of the Functional Domain of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c*₅₅₂ in the Reduced State. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4205-4212
- Richieri, G.V., Ogata, R.T. & Kleinfeld, A.M.** (1994) Equilibrium Constants for the Binding of Fatty Acids with Fatty Acid-Binding Proteins from Adipocyte, Intestine, Heart, and Liver Measured with the Fluorescent Probe ADIFAB. *J. Biol. Chem.* **269**, 23918-23930
- Richieri, G.V., Low, P.J., Ogata, R.T. & Kleinfeld, A.M.** (1996) Kinetics of Fatty Acid Interactions with Fatty Acid Binding Proteins from Adipocyte, Heart, and Intestine. *J. Biol. Chem.* **271**, 11291-11300
- Richieri, G.V., Low, P.J., Ogata, R.T. & Kleinfeld, A.M.** (1998) Thermodynamics of Fatty Acid Binding to Engineered Mutants of the Adipocyte and Intestinal Fatty Acid-Binding Proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 7397-7405
- Richieri, G.V., Ronald, T.O., Zimmerman, A.W., Veerkamp, J.H. & Kleinfeld, A.M.** (2000) Fatty Acid Binding Proteins from Different Tissues Show Distinct Patterns of Fatty Acid Interactions. *Biochem.* **39**, 7197-7204
- Sa, G., Das, T. & Mukherjea, M.** (1989) Purification and Characterization of FABPs from Human Fetal Lung. *Exp. Lung Res.* **15**, 619-634
- Sacchettini, J.C., Gordon, J.I. & Banaszak, L.J.** (1988) The Structure of Crystalline *Escherichia coli*-Derived Rat Intestinal Fatty Acid-Binding Protein at 2.5 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **263**, 5815-5819
- Sacchettini, J.C., Gordon, J.I. & Banaszak, L.J.** (1989) Crystal Structure of Rat Intestinal Fatty-Acid-Binding Protein. *J. Mol. Biol.* **208**, 327-339
- Sacchettini, J.C., Hauff, S.M., van Camp, S.L., Cistola, D.P. & Gordon, J.I.** (1990) Developmental and Structural Studies of an Intracellular Lipid Binding Protein Expressed in the Ileal Epithelium. *J. Biol. Chem.* **265**, 19199-19207
- Sacchettini, J.C., Scapin, G., Gopaul, D., Gordon, J.I.** (1992) Refinement of the Structure of *Escherichia coli*-Derived Rat Intestinal Fatty Acid-Binding Protein with Bound Oleate to 1.75 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **267**, 23534-23545
- Scapin, G., Spandon, P., Pengo, L., Mammi, M., Zanotti, G. & Monaco, H.L.** (1988) Chicken Liver Basic Fatty Acid-Binding Protein (pI=9.0). Purification, Crystallization and Preliminary X-Ray Data. *FEBS Lett.* **240**, 196-200

- Scapin, G., Spandon, P., Mammi, M., Zanotti, G. & Monaco, H.L.** (1990) Crystal Structure of Chicken Liver Basic Fatty Acid-Binding Protein at 2.7 Å Resolution. *Mol. Cell. Biochem.* **98**, 95-99
- Scapin, G., Gordon, J.I. & Sacchettini, J.C.** (1992) Refinement of the Structure of Recombinant Rat Intestinal Fatty Acid-Binding Protein at 1.2 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **267**, 4253-4269
- Scapin, G., Young, A.C.M., Kromminga, A., Veerkamp, J.H., Gordon, J.I. & Sacchettini, J.C.** (1993) High Resolution X-Ray studies of Mammalian Intestinal and Muscle Fatty Acid-Binding Proteins Provide an Opportunity for Defining the Chemical Nature of Fatty Acid:Protein Interactions. *Mol. Cell. Biochem.* **123**, 3-13
- Schaefer, W.H., Kakkad, B., Crow, J.A., Blair, I.A. & Ong, D.E.** (1989) Purification, Primary Structure Characterization, and Cellular Distribution of two Forms of Cellular Retinol-Binding Protein Type II from Adult Rat Small Intestine. *J. Biol. Chem.* **264**, 4212-4221
- Schleucher, J., Sattler, M. & Griesinger, C.** (1993). Coherence Selection by Gradients without Signal Attenuation: Application to the Three-Dimensional HNCO Experiment. *Angew. Chem. Int. Ed.* **32**, 1489-1491
- Schmidt, J.M. & Rüterjans, H.** (1990) Proton-Detected 2D Heteronuclear Shift Correlation via Multiple-Quantum Coherence of the Type I₂S. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1279-1280
- Schmitt, C.M., Jamison R.S., Orgebin-Crist M.C., Ong, D.E.** (1994) A Novel, Testis-Specific Member of the Cellular Lipophilic Transport Protein Superfamily, Deduced from a Complimentary Deoxyribonucleic Acid Clone. *Biol. Reprod.* **51**, 239-245
- Schnütgen, F., Borchers, T., Müller, T. & Spener, F.** (1996) Heterologous Expression and Characterisation of Mouse Brain Fatty Acid-Binding Protein. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **377**, 211-215
- Schoentgen, F., Pignède, G., Bonanno, L.M. & Jollès, P.** (1989) Fatty Acid-Binding Protein from Bovine Brain. Amino Acid Sequence and some Properties. *Eur. J. Biochem.* **185**, 35-40
- Sewell, J.E., Young, C.R., Davis, S.K. & Hargis, P.S.** (1989) Isolation, Characterization, and Expression of the Fatty Acid Binding Protein in the Liver of *Gallus Domesticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **92B**, 623-629
- Shimizu, F., Watanabe, T.K., Shinomiya, H., Nakamura, Y. & Fujiwara, T.** (1997) Isolation and Expression of a cDNA for Human Brain Fatty Acid-Binding Protein (B-FABP). *Biochim. Biophys. Acta* **1354**, 24-28
- Simson, M.A. & Bernlohr, D.A.** (1998) Analysis of a Series of Phenylalanine 57 Mutants of the Adipocyte Lipid-Binding Protein. *Biochem.* **37**, 10980-10986
- Siegenthaler, G., Hotz, R., Chatellardgruaz, D., Jaconi, S. & Saurat, J.H.** (1993) Characterization and Expression of a Novel Human Fatty Acid-Binding Protein: The Epidermal Type (E-FABP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 482-487

- Smith, A.F., Tsuchida, K., Hanneman, E., Suzuki, T.C. & Wells, M.A.** (1992) Isolation, Characterization, and cDNA Sequence of Two Fatty Acid-Binding Proteins from the Midgut of *Manduca sexta* Larvae. *J. Biol. Chem.* **267**, 380-384
- Sørensen, O.W. & Ernst, R.R.** (1982) Elimination of Spectral Distortion in Polarisation Transfer Experiments. Improvements and Comparison of Techniques. *J. Magn. Reson.* **51**, 477-489
- Spener, F., Unterberg, C., Borchers, T. & Grosse, R.** (1990) Characteristics of Fatty Acid-Binding Proteins and their Relation to Mammary-Derived Growth Inhibitor. *Mol. Cell. Biochem.* **98**, 52-68
- Specht, B., Oudenampsen-Krüger, E., Ingendoh, A., Hillenkamp, F., Lezius, A.G. & Spener, F.** (1994) N-terminal Variants of Fatty Acid-Binding Protein from Bovine Heart Overexpressed in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **33**, 259-269
- Specht, B., Baretzko, N., Hohoff, C., Kuhl, H. Franke, R., Borchers, T. & Spener, F.** (1996) Mammary Derived Growth Inhibitor is not a Distinct Protein but a Mix of Heart-Type and Adipocyte-Type Fatty-Acid-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 19943-19949
- Stein, E.G., Rice, L.M. & Brünger, A.T.** (1997) Torsion-Angle Molecular Dynamics as a new Efficient Tool for NMR Structure Calculation. *J. Magn. Reson.* **124**, 154-164
- Stewart, J.M. & Driedzic, W.R.** (1988) Fatty Acid-Binding Proteins in Teleost Fish. *Can. J. Zool.* **66**, 1671-1675
- Sundelin, J., Anundi, H., Trägård, L., Erickson, U., Lind, P., Ronne, H., Peterson, P. & Rask, L.** (1985a) The Primary Structure of Rat Liver Cellular Retinol-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **260**, 6488-6493
- Sundelin, J., Das, S.H., Erickson, U., Rask, L. & Peterson, P.** (1985b) The Primary Structure of Bovine Cellular Retinoic Acid-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **260**, 6494-6499
- Sweetser, D.A., Birkenmeier, E.H., Klisak, I.J., Zollman, S., Sparkes, R.S., Mohandas, T., Lusic, A.J. & Gordon, J.I.** (1987) The Human and Rodent Intestinal Fatty Acid Binding Protein Genes. *J. Biol. Chem.* **262**, 16060-16071
- Thompson, J., Winter, N., Terwey, D., Bratt, J. & Banaszak, L.** (1997) The Crystal Structure of the Liver Fatty Acid-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 7140-7150
- Tweedie, S. & Edwards, Y.** (1989) cDNA Sequence for Mouse Heart Fatty Acid-Binding Protein, H-FABP. *Nucleic Acids Res.* **17**, 4374
- Unterberg, C., Borchers, T., Højrup, P., Toepstorff, P., Knudsen, J. & Spener, F.** (1990) Cardiac Fatty Acid-Binding Proteins. Isolation and Characterization of the Mitochondrial Fatty Acid-Binding Protein and its Structural Relationship with the Cytosolic Isoforms. *J. Biol. Chem.* **265**, 16255-16261

- Van Aalten, D.M.F., Jones, P.C., de Sousa, M. & Findlay, J.B.C.** (1997) Engineering Protein Mechanics: Inhibition of Concerted Motions of the Cellular Retinol Binding Protein by Site-Directed Mutagenesis. *Protein Eng.* **10**, 31-37
- Veerkamp, J.H. & Maatmann, R.G.H.J.** (1995) Cytoplasmic Fatty Acid-Binding Protein: Their Structure and Genes. *Prog. Lipid Res.* **34**, 17-52
- Veerkamp, J.H. & Zimmerman, A.W.** (2001) Fatty Acid-Binding Proteins of Nervous Tissue. *J. Mol. Neurosci.* **16**, 133-142
- Vogel, S., Mendelsohn, C.L., Mertz, J.R., Piantedosi, R., Waldburger, C., Gottesman, M.F. & Blaner, W.S.** (2001) Characterisation of a new Member of the Fatty Acid-Binding Protein Family that binds all-*trans*-Retinol. *J. Biol. Chem.* **276**, 1353-1360
- Walz, D.A., Wider, M.D., Snow, J.W., Dass, C. & Desiderio, D.M.** (1988) The Complete Amino Acid Sequence of Porcine Gastrotropin, an Ileal Protein which Stimulates Gastric Acid and Pepsinogen Secretion. *J. Biol. Chem.* **263**, 14189-14195
- Wang, L., Li, Y., Abildgaard, F., Markley, J.L. & Yan, H.** (1998) NMR Solution Structure of Type II Human Cellular Retinoic Acid Binding Protein: Implications for Ligand Binding. *Biochem.* **37**, 12727-12736
- Watanabe, R., Ono, T. & Kondo, H.** (1992) Immunohistochemical Studies on the Localization and Ontogeny of Heart Fatty Acid Binding Protein in the Rat. *J. Anat.* **174**, 81-95
- Watanabe, R., Fuji, H., Odani, S., Sakakibara, J., Yamamoto, A., Ito, M. & Ono, T.** (1994) Molecular Cloning of a cDNA Encoding a novel Fatty Acid Binding Protein from Rat Skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 253-259
- Winter, N.S., Bratt, J.M. & Banaszak, L.J.** (1993) Crystal Structures of Holo and Apocellular Retinol-Binding Protein II. *J. Mol. Biol.* **230**, 1247-1259
- Wishart, D.S., Sykes, B.D. & Richards, F.M.** (1991) Relationship between Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift and Protein Secondary Structure. *J. Mol. Biol.* **222**, 311-333
- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L. & Sykes, B.D.** (1995) ^1H , ^{13}C and ^{15}N Chemical Shift Referencing in Biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **6**, 135-140
- Wüthrich, K., Billeter, M. & Braun, W.** (1983) Pseudo-Structures for the 20 Common Amino Acids for Use in Studies of Protein Conformations by Measurements of Intramolecular Proton-Proton Distance Constraints with Nuclear Magnetic Resonance. *J. Mol. Biol.* **169**, 949-961
- Wüthrich, K.** (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York
- Xu, Z., Bernlohr, D.A. & Banaszak, J.** (1993) The Adipocyte Lipid-Binding Protein at 1.6 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **268**, 7874-7884

- Xu, L.Z., Sánchez, R., Sali, A. & Heintz, N.** (1996) Ligand Specificity of Brain Lipid-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 24711-24719
- Young, A.C.M., Scapin, G., Kromminga, A., Patel, S.B., Veerkamp, J.H. & Sacchettini, J.C.** (1994) Structural Studies on Human Muscle Fatty Acid Binding Protein at 1.4 Å Resolution: Binding Interactions with three C18 Fatty Acids. *Structure* **2**, 523-534
- Young, J.M., Baker, J.H. & Müller, T.** (1996) Immunoreactivity for Brain Fatty Acid-Binding Protein in Gomori-Positive Astrocytes. *Glia* **16**, 218-226
- Zanotti, G., Scapin, G., Spandon, P., Veerkamp, J.H. & Sacchettini, J.C.** (1992) Three-Dimensional Structure of Recombinant Human Muscle Fatty Acid-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 18541-18550
- Zhang, F., Lücke, C., Baier, L.J., Sacchettini, J.C. & Hamilton, J.A.** (1997) Solution Structure of Human Intestinal Fatty Acid-Binding Protein: Implications for Ligand Entry and Exit. *J. Biomol. NMR* **9**, 213-228
- Zimmerman, A.W. & Veerkamp, J.H.** (1998) Members of the Fatty Acid-Binding Protein Family inhibit Cell-Free Protein Synthesis. *FEBS Letters* **437**, 183-186
- Zimmerman, A.W., Rademacher, M., Rüterjans, H., Lücke, C. & Veerkamp, J.H.** (1999) Functional and Conformational Characterization of new Mutants of Heart Fatty Acid-Binding Protein. *Biochem. J.* **344**, 495-501
- Zimmerman, A.W., van Moerkerk, H.T.B. & Veerkamp, J.H.** (2001) Ligand Specificity and Conformational Stability of Human Fatty Acid-Binding Proteins. *Int. J. Biochem. Biol.* **33**, 865-876

7 ANHANG

7.1 Materialien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in „p.a.“ Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Serva (Heidelberg) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Für wässrige Lösungen und Puffer wurde entweder bi-destilliertes oder Millipore-Wasser verwendet. An speziellen Materialien wurden eingesetzt:

Säulenmaterialien

Q-Sepharose Fast Flow	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Sephadex G25	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Lipidex 5000	Canberra-Packard, Groningen, Niederlande

Verbrauchsmaterialien

Low-Range (43-2,3 kDa)	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Membranfilter, 0,2 µm und 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen
NMR-Probenröhrchen	Wilmad Glass, Buena, NY, USA
Vivaspin-Konzentrator	VivaScience, Lincoln, UK
Trimethylsilyl[2,2,3,3- ² H ₄]propionat	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA

7.2 Geräte

Zusätzlich zur üblichen Laborausstattung wurden folgende Geräte benutzt:

Dampfautoklav FVS 1/2	Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
Druckfiltrations-Rührzellen Amicon 8003, 8050, 8200 und 8500	Amicon GmbH, Witten
Durchflußdetektor Uvicord SII mit Interferenzfilter 280 nm	LKB Instrument GmbH, Gräfeling
Fermenter Biostat ED mit 10 l Reaktorgefäß	Braun Biotech GmbH, Melsungen
FPLC GP-250 Plus	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Hochdrucksterilisator Getinge 44 EN	Getinge AG, Getinge, Schweden
Luftbadschüttler HT Infors	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Mini Protein II PAGE-Einheit	Biorad Laboratories GmbH, München
MultiRac	LKB Instrument GmbH, Gräfeling

Spektralphotometer U 1100	Hitachi Ltd., Mulgrave, Australien
Sterilwerkbank Danlaf VFS 1206	Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
SuperFrac	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ultraschallhomogenisator Labsonic U mit Schwingsonde 5T und 40T	B. Braun Biotech GmbH, Melsungen
NMR-Spektrometer DMX 500 und 600 Karlsruhe	Bruker Analytische Meßtechnik GmbH,

7.3 Puffer und Medien

Transformationspuffer TF-B₁

RbCl ₂	100 mM
MnCl ₂	50 mM
CaCl ₂	10 mM
Kaliumacetat	30 mM
Glycerin	15% (v/v)
Mit AcOH auf pH= 5,8 einstellen.	

Transformationspuffer TF-B₂

MOPS	10 mM
RbCl ₂	10 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15% (v/v)
Mit AcOH auf pH= 7,0 einstellen.	

SOC-Medium, pro 100 ml

Trypton	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
1 M NaCl	1 ml
1 M KCl	50 µl

Auf 98 ml auffüllen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen folgende sterile Lösungen zusetzen:

2 M Glucose	1 ml
1 M MgCl ₂ /1 M MgSO ₄	1 ml

LB-Medium, pro Liter

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

Auf pH= 7,4 einstellen und autoklavieren.

TB-Medium, pro Liter

KH ₂ PO ₄	0,17 M
K ₂ HPO ₄	0,72 M

Vorratslösung ansetzen und autoklavieren.

Caseinhydrolysat	1,2 g
Hefeextrakt	2,4 g
Glycerin	4 ml

Auf 900 ml auffüllen und autoklavieren. 100 ml Vorratslösung zusetzen

LB-Agarplatten, pro Liter

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar-Agar	15 g

Auf pH= 7,4 einstellen und autoklavieren. Das Medium wird dann im vorgeheizten Wasserbad auf 50°C abgekühlt, mit 100 µg/ml steril filtrierter Ampicillin-Lösung versetzt und in Platten gegossen.

7.4 ¹H-Zuordnung von Wildtyp und Mutanten des humanen H-FABP

¹H-Zuordnung des humanen H-FABP bei pH=7,0 und 298K

Rest	HN	H α	H β	Sonstige
V1		4,33	2,36	1,09/1,02 (H ^{γ1/2})
E2	8,40	4,27	2,71/2,59	
A3	8,06	4,20	1,27	
F4	8,02	4,32	3,16/3,02	7,12 (H δ) 6,93 (H ϵ) 7,56 (H ζ)
L5	7,31	4,21	2,02	
G6	8,83	4,36/3,82		
T7	8,26		3,92	1,16 (H γ ²)
W8	9,73	5,32	3,37/3,02	9,64 (H ϵ ¹) 7,05 (H δ ¹) 7,14 (H ϵ ³) 7,37 (H ζ ³) 7,23 (H η ³) 7,00 (H ζ ²)
K9	10,02	5,45	2,01/1,96	1,60/1,52 (H γ) 1,77 (H δ) 2,98 (H ϵ)
L10	7,83	3,47	1,51	1,31 (H γ) 0,83 (H δ ^{1/2})
V11	9,30	4,63	2,26	1,00/0,84 (H γ ^{1/2})
E12	7,74	4,90	2,77/2,48	
S13	8,31	4,95	3,75/3,46	
K14	8,97	4,90	1,95	1,56/1,47 (H γ) 1,83/1,74 (H δ) 3,09 (H ϵ)
N15				7,67/7,2 (H δ ²)
F16				7,52 (H δ) 7,07 (H ϵ) 7,10 (H ζ)
D17		4,17	2,74/2,62	
D18	7,85	4,29	2,83/2,69	
Y19	7,62	4,09	3,25/3,01	7,02/6,79 (H δ) 6,52/6,49 (H ϵ)
M20	8,26	3,42	1,97	
K21		3,87	1,90/1,74	1,50/1,31 (H γ) 1,69 (H δ)
S22		4,30	4,16	
L23	7,14	3,72	1,57/1,18	
G24	7,79	4,16/3,71		
V25		3,78	1,45	1,02/0,85 (H γ ^{1/2})
G26				
F27		3,87	3,34/3,08	7,23 (H δ) 7,35 (H ϵ) 7,30 (H ζ)
A28		3,95	1,49	
T29	7,57	4,03	3,84	1,09 (H γ)
R30	8,38	3,67	1,88	1,78/1,27 (H γ)
Q31	7,94	3,80	1,81	2,00/1,92 (H γ)
V32	6,96	3,73	1,68	0,91/0,58 (H γ ^{1/2})
A33	8,62	3,84	1,32	
S34	8,31	4,37	4,09/4,01	
M35	7,24	4,71	2,3/2,14	2,78/2,66 (H γ)
T36	7,24	4,40	4,27	1,47 (H γ ²)
K37				
P38				
T39	8,97	5,50	4,12	1,34 (H γ ²)
T40	9,96	5,64	3,50	0,97 (H γ ²)
I41	9,60	5,22	1,53	1,48/1,29 (H γ ¹) 0,89 (H δ) 0,75 (H γ ²)
I42	9,26	5,17	2,40	0,77 (H γ ²)
E43	9,20		1,85	2,17/2,04 (H γ)
K44	8,68	4,99	1,72	1,35/1,12 (H γ) 1,57 (H δ) 3,05/2,99 (H ϵ)
N45	8,66		2,67/2,61	7,90/6,91 (H δ ²)
G46		3,99/3,67		
D47	8,79	4,62	2,81/2,69	
I48	7,73	4,18	1,95	1,53/1,04 (H γ ¹) 0,61 (H δ) 0,75 (H γ ²)
L49				
T50	8,61	5,10	3,69	1,07 (H γ ²)
L51	9,13	5,27	1,40	1,57 (H γ) 0,75 (H δ ^{1/2})
K52	9,76	5,13	1,69	1,31 (H γ) 2,84/2,71 (H ϵ)
T53	9,13	5,10	4,27	1,14 (H γ ²)
H54	9,77	5,91		
S55	8,66		4,01	
T56				
F57	7,74	4,90	3,25/2,77	7,19 (H δ) 7,31 (H ϵ) 7,19 (H ζ)
K58	6,82	4,34		0,95/0,86 (H γ) 1,52/1,38 (H δ)
N59	8,58	6,00	2,76	
T60				
E61	8,63	5,17	1,98	2,09 (H γ)
I62	8,40	4,95		
S63	8,29	5,64	3,55/3,46	
F64	8,47	4,59	2,70	6,31 (H δ) 6,82 (H ϵ) 6,67 (H ζ)

K65	8,85	4,96		1,63 (Hδ) 2,95 (He)
L66	9,18	4,53	1,85	
G67	9,54	4,3/3,51		
V68	7,66	4,47	2,28	1,17/0,95 (Hγ ^{1/2})
E69	9,20	5,13	2,04	2,25 (Hγ)
F70	9,53	5,25	3,36d	7,54 (Hδ) 7,02 (He) 6,32 (Hζ)
D71	8,59	5,18	2,8/2,69	
E72	8,57		1,85	2,35/1,66 (Hγ)
T73	8,87	5,43	4,10	1,23 (Hγ ²)
T74				
A75		3,98	1,41	
D76	9,27	4,53	2,83/2,21	
D77	8,08	4,09	2,93/2,7	
R78	7,43	4,13	1,45/0,42	
K79	8,31	4,95	1,83	1,5 (Hγ) 1,72 (Hδ) 3,04 (He)
V80	8,99	5,20	2,09	0,65/0,27 (Hγ ^{1/2})
K81	8,90	4,99	1,92	1,58/1,49 (Hγ) 1,73 (Hδ) 2,99 (He)
S82	9,27	5,84	3,05/2,05	
I83	8,45	4,3	1,82	1,47/1,01 (Hγ ¹) 0,91 (Hγ ²)
V84	9,74	5,46	1,36	0,5/-0,33 (Hγ ^{1/2})
T85	8,99	4,70		
L86	8,68	5,32	1,88/1,29	1,52 (Hγ) 0,89/0,79 (Hδ ^{1/2})
D87	9,05	4,98	2,72/2,51	
G88				
G89				
K90	7,81	5,02	1,97	1,52/1,28 (Hγ) 1,59 (Hδ) 2,97 (H ^ε)
L91	8,87		1,31/0,72	0,96 (Hγ) 0,39/0,33 (Hδ ^{1/2})
V92	9,71	4,13	2,30	1,00/0,87 (Hγ ^{1/2})
H93	8,67	5,42	4,01/2,67	6,52 (Hδ ²) 7,93 (He ¹)
L94	9,25	5,07	2,00/1,38	1,47 (Hγ) 0,89 (Hδ ^{1/2})
Q95	8,8	5,17	2,24	
K96	9,12	5,56	2,01/1,86	1,55 (Hγ) 1,73 (Hδ) 2,93 (He)
W97	8,31	4,95	3,75	10,23 (He ¹) 7,24 (Hδ ¹)
D98		4,31	2,84/2,41	
G99	8,37	4,00/3,67		
Q100	8,52	4,48	1,35/0,57	1,82/1,53 (Hγ)
E101	8,21	5,85	2,09/1,95	2,20/2,09 (Hγ)
T102	9,06	5,48		1,38 (Hγ ²)
T103	8,00	5,54	4,04	1,22 (Hγ ²)
L104	9,55	5,02	1,92	0,78 (Hδ ^{1/2})
V105	9,28	4,92	2,05	1,10/0,96 (Hγ ^{1/2})
R106	9,00	5,69	1,47	
E107				
L108	8,78	5,31	1,49/1,24	1,00 (Hγ) 0,41/0,27 (Hδ ^{1/2})
I109	8,92	4,28	1,73	1,34/1,06 (Hγ ¹) 0,88 (Hδ) 0,80 (Hγ ²)
D110	9,46	4,36	3,06/2,66	
G111	8,60	4,31/3,69		
K112	8,09	4,98	2,00/1,95	1,6 (Hγ) 1,71 (Hδ) 3,12 (He)
L113	8,47	4,59	1,08/-0,25	0,92 (Hγ) 0,13/-0,12 (Hδ ^{1/2})
I114	9,41		2,04	0,83 (Hγ ²)
L115	9,59	5,50		1,29 (Hγ)
T116	9,82	5,34	3,90	1,07 (Hγ ²)
L117	9,71	5,31		
T118	8,62	5,63	4,13	1,24 (Hγ ²)
H119	9,60	5,22	3,35	
G120				
T121				
A122				
V123	8,26	5,16	1,97	0,96/0,83 (Hγ ^{1/2})
C124	9,61	5,34	3,35/2,28	2,73 (Hγ)
T125	8,12	5,34	3,86	1,17 (Hγ ²)
R126				
T127	8,72	4,93	3,85	1,16 (Hγ ²)
Y128	10,02	5,45	3,38/3,14	6,91 (Hδ) 6,60 (He)
E129	9,41	5,43	2,12/2,04	2,42/2,38 (Hγ)
K130	9,42	3,83	1,47	0,83 (Hγ) 1,13 (Hδ)
E131	8,83	4,36	1,92/1,78	2,24/2,19 (Hγ)
A132	8,04	4,11	1,34	

¹H-Zuordnung der F4E-Mutante des humanen H-FABP bei pH=7,0 und 298K

Rest	HN	H α	H β	Sonstige
V1				
E2				
A3				
E4				
L5				
G6				
T7				
W8	9,69	5,21	3,39/2,98	9,64 (He ¹) 7,01 (H δ^1) 7,13 (He ³) 7,48 (H ζ^3) 7,27 (H η^2) 7,01 (H ζ^2)
K9	9,99	5,44	1,98/1,95	1,59/1,50 (H γ) 1,75 (H δ) 2,97 (He)
L10	7,80	3,43	1,48/1,19	1,29 (H γ) 0,41 (H $\delta^{1/2}$)
V11	9,24	4,63	2,25	0,99 (H $\gamma^{1/2}$)
E12	7,71	4,90	2,75/2,47	
S13	8,30	4,95	3,74/3,46	
K14	8,93	4,92	1,93	1,56/1,47 (H γ) 1,81/1,75 (H δ) 3,09 (He)
N15		4,88	3,54/3,41	7,66/7,20 (H δ^2)
F16	8,64	5,35	3,18/3,05	7,51 (H δ) 7,08 (He) 7,08 (H ζ)
D17		4,18	2,74/2,63	
D18	7,84	4,28	2,82/2,68	
Y19	7,63	4,08	3,23/3,00	7,01/6,79 (H δ) 6,52/6,48 (He)
M20	8,28	3,44	2,07/1,98	1,60/1,38 (H γ)
K21	8,89	3,85	1,91/1,75	1,50/1,32 (H γ) 2,98 (He)
S22	7,77	4,29	4,13	
L23	7,14	3,69	1,54/1,15	0,34/0,13 (H $\delta^{1/2}$)
G24	7,77	4,29/3,70		
V25		3,78	1,46	1,02/0,86 (H $\gamma^{1/2}$)
G26		4,09/4,02		
F27	8,70	3,84	3,32/3,07	7,22 (H δ) 7,35 (He) 7,29 (H ζ)
A28		3,96	1,50	
T29	7,57	4,02	3,83	1,11 (H γ^2)
R30	8,37	3,66		
Q31	7,92	3,79	1,83	2,02/1,94 (H γ)
V32	6,94	3,69	1,68	0,90/0,55 (H $\gamma^{1/2}$)
A33	8,62	3,83	1,32	
S34	8,30	4,36		
M35	7,24	4,70	2,29/2,13	2,76/2,65 (He)
T36	7,24	4,39	4,26	1,45 (H γ^2)
K37				
P38				
T39	8,98	5,52	4,11	1,33 (H γ^2)
T40	9,86	5,60	3,43	0,91 (H γ^2)
I41	9,58	5,22		
I42				
E43				
K44	8,71	5,09	1,74/1,52	1,37/1,14 (H γ) 3,04 (He)
N45	8,66	4,87	2,67/2,61	7,80/6,87 (H δ^2)
G46		4,02/3,69		
D47	8,76	4,62	2,80/2,76	
I48	7,74	4,22	1,94	1,53/1,04 (H γ^1) 0,61 (H δ) 0,75 (H γ^2)
L49				
T50	8,61	5,10	3,68	1,06 (H γ^2)
L51	9,10	5,31	1,74/1,45	1,59 (H γ) 0,81/0,75 (H $\delta^{1/2}$)
K52	9,66	5,13	1,71	1,30 (H γ) 2,84/2,72 (He)
T53	9,14	5,12	4,25	1,14 (H γ^2)
H54	9,76	5,89		
S55				
T56				
F57	7,75	4,86	3,25/2,79	7,20 (H δ) 7,31 (He) 7,20 (H ζ)
K58	6,81	4,35	1,53/1,38	0,96/0,89 (H $\gamma^{1/2}$) 2,81/2,71 (He)
N59	8,59	6,00	2,76	
T60				
E61	8,66	5,17	1,97	2,08 (H γ)
I62				
S63	8,30	5,63	3,54/3,46	
F64	8,46	4,59	2,74	6,33 (H δ) 6,87 (He) 6,75 (H ζ)
K65	8,77	4,92	1,86	1,54/1,51 (H γ) 1,69 (H δ) 2,95 (He)
L66				
G67	9,54	4,30/3,51		

V68	7,66	4,48	2,28	1,17/0,96 (H $\gamma^{1/2}$)
E69	9,19	5,13	2,04	2,25 (H γ)
F70	9,51	5,25	3,36	7,54 (H δ) 7,02 (He) 6,32 (H ζ)
D71	8,62	5,18	2,79/2,70	
E72	8,55			2,34/1,65 (H γ)
T73	8,93	5,43	4,10	1,23 (H γ^2)
T74				
A75		4,03	1,49	
D76	9,13	4,54	2,86/2,22	
D77	8,08	4,08	2,92/2,70	
R78	7,42	4,13	1,44/0,43	1,10/0,92 (H γ)
K79		4,95	1,85	1,54 (H γ) 1,74 (H δ) 3,07 (He)
V80	8,98	5,52	2,10	0,66/0,28 (H $\gamma^{1/2}$)
K81				
S82	9,28	5,83	3,04/2,04	
I83	8,51	4,30		
V84	9,73	5,49	1,41	0,58/-0,30 (H $\gamma^{1/2}$)
T85	9,00	4,74		
L86				
D87	8,95	4,92	2,70/2,51	
G88				
G89				
K90				
L91				
V92	9,70	4,14	2,23	0,99/0,86 (H $\gamma^{1/2}$)
H93	8,74	5,39		6,53 (H δ^2) 7,96 (He 1)
L94	9,28	5,09	2,04/1,38	1,87 (H γ)
Q95	8,83	5,16	2,24	2,47 (H γ)
K96	9,12	5,56	1,99/1,86	1,54 (H γ) 2,92 (He)
W97	8,30	4,95	3,74/3,25	10,23 (He 1) 7,23 (H δ^1)
D98	9,25	4,30	2,84/2,4	
G99	8,37	4,00		
Q100	8,52	4,47	1,33/0,54	1,82/1,54 (H γ)
E101	8,20	5,86	2,08/1,95	2,20 (H γ)
T102	9,05	5,47	4,56	1,38 (H γ^2)
T103	7,99	5,58	4,02	1,21 (H γ^2)
L104	9,56	5,04	1,93/1,40	1,52 (H γ) 0,81/0,43 (H $\delta^{1/2}$)
V105	9,26	5,03	2,04	1,10 (H $\gamma^{1/2}$)
R106	8,88	5,68		
E107	8,61	4,69	1,87	2,13/2,04 (H γ)
L108				
I109				
D110	9,46	4,37	3,06/2,65	
G111	8,56	4,33/3,73		
K112	8,06	5,02	1,96/1,92	1,59 (H γ) 1,72 (H δ) 3,08 (He)
L113				
I114				
L115	9,50	5,52		
T116	9,78	5,32	3,88	1,03 (H γ^2)
L117	9,69	5,29		
T118	8,62	5,64	4,12	1,23 (H γ^2)
H119				
G120		3,84/3,63		
T121				
A122		4,69	1,65	
V123	8,26	5,14	1,96	0,95/0,82 (H $\gamma^{1/2}$)
C124	9,62	5,34	3,33/2,27	2,72 (H γ)
T125	8,09	5,33	3,84	1,15 (H γ^2)
R126	10,16	4,90	1,86/	
T127				
Y128	9,7	5,41	3,4/3,13	6,90 (H δ) 6,58 (He)
E129	9,41	5,44	2,13/2,02	2,43/2,17 (H γ)
K130		1,44	0,89/0,21	1,22/1,18 (H γ) 2,65/2,62 (He)
E131	8,72	4,33	1,90/1,75	2,20/2,17 (H γ)
A132	8,02	4,10	1,33	

¹H-Zuordnung der F4S-Mutante des humanen H-FABP bei pH=7,0 und 298K

Rest	HN	H α	H β	Sonstige
V1				
E2				
A3				
S4				
L5				
G6	8,78	4,48/3,81		
T7	8,31		3,89	1,15 (H γ^2)
W8	9,72	5,19	3,39/2,97	9,60 (He ¹) 6,99 (H δ^1) 7,12 (He ³) 7,38 (H ζ^3) 7,31 (H η^3) 6,99 (H ζ^2)
K9	9,96	5,43	1,98/1,93	1,57/1,48 (H γ) 1,74 (H δ) 2,95 (He)
L10	7,81	3,45	1,50/1,17	1,30 (H γ) 0,85 (H $\delta^{1/2}$)
V11	9,23	4,63	2,23	0,97/0,80 (H $\gamma^{1/2}$)
E12	7,69	4,88	2,74/2,45	
S13	8,28	4,93	3,73/3,43	
K14	8,93	4,89	1,93	1,53/1,44 (H γ) 1,80/1,72 (H δ) 3,07 (He)
N15		3,53/3,41		7,64/7,17 (H δ^2)
F16			3,13/3,05	7,50 (H δ) 7,05 (He) 7,08 (H ζ)
D17		4,14	2,71/2,60	
D18	7,84	4,27	2,81/2,67	
Y19	7,62	4,06	3,22/2,98	7,00/6,77 (H δ) 6,51/6,45 (He)
M20	8,24	3,42	2,06/1,96	1,60/1,35 (H γ)
K21	8,88	3,84	1,89/1,70	1,49/1,30 (H γ) 2,97 (He)
S22				
L23	7,13	3,69	1,57	0,32/0,14 (H $\delta^{1/2}$)
G24	7,75	4,26/3,69		
V25	7,42	3,77	1,45	1,02/0,85 (H $\gamma^{1/2}$)
G26				
F27	8,68	3,82	3,30/3,06	7,21 (H δ) 7,33 (He) 7,29 (H ζ)
A28	8,85	3,93	1,46	
T29	7,56	3,82	4,00	1,11 (H γ^2)
R30	8,35	3,64		
Q31	7,92	3,78	1,82	2,00/1,93 (H γ)
V32	6,94	3,70	1,67	0,90/0,55 (H $\gamma^{1/2}$)
A33	8,61	3,81	1,30	
S34	8,30	4,35		
M35	7,22	4,68	2,28/2,11	2,74/2,64 (He)
T36	7,23	4,36	4,25	1,44 (H γ^2)
K37				
P38				
T39	8,99	5,52	4,11	1,33 (H γ^2)
T40				
I41				
I42				
E43				
K44	8,70	5,08		1,13 (H γ)
N45	8,62	4,84	2,65/2,58	7,87/6,88 (H δ^2)
G46				
D47	8,73	4,60	2,78/2,69	
I48	7,72	4,13	1,92	1,51/1,0 (H γ^1) 0,58 (H δ) 0,73 (H γ^2)
L49				
T50	8,61	5,12	3,66	1,03 (H γ^2)
L51	9,04	5,27	1,70/1,45	1,57 (H γ) 0,78/0,72 (H $\delta^{1/2}$)
K52	9,66	5,10		1,26 (H γ) 1,64 (H δ)
T53	9,14	5,13	4,24	1,12 (H γ^2)
H54	9,75	5,89		
S55	8,67		3,99	
T56				
F57	7,72		3,26/2,77	7,18 (H δ) 7,29 (He) 7,18 (H ζ)
K58	6,79	4,33	1,51/1,36	0,88 (H γ)
N59	8,54	5,97	2,73	
T60				
E61	8,58	5,16	1,93	2,07 (H γ)
I62	8,40	4,93		
S63	8,25	5,64	3,51/3,43	
F64	8,46	4,57	2,72	6,32 (H δ) 6,85 (He) 6,75 (H ζ)
K65	8,76	4,91		2,94 (He)
L66				
G67	9,53	4,29/3,49		

V68	7,66	4,46	2,26	1,15/0,94 ($H\gamma^{1/2}$)
E69	9,18	5,12	2,07	2,24 ($H\gamma$)
F70	9,51	5,23	3,29	7,51 ($H\delta$) 7,01 (He) 6,31 ($H\zeta$)
D71	8,58	5,16	2,79/2,67	
E72	8,55	4,92	1,86/1,80	2,35/1,67 ($H\gamma$)
T73	8,85	5,40	4,08	1,21 ($H\gamma^2$)
T74				
A75				
D76	9,31	4,53	2,84/2,20	
D77	8,06	4,06	2,91/2,68	
R78	7,39	4,10	1,44	
K79	8,31	4,93	1,80	1,47 ($H\gamma$) 1,71 ($H\delta$) 3,01 (He)
V80	8,97	5,51	2,08	0,64/0,26 ($H\gamma^{1/2}$)
K81	4,98		1,46	1,72 ($H\delta$) 2,97 (He)
S82	9,26	5,82	3,03/2,02	
I83	8,49	4,29		
V84	9,73	5,46	1,40	0,57/-0,32 ($H\gamma^{1/2}$)
T85	9,00	4,73		
L86	8,65	5,29		
D87	9,01	4,93	2,70/2,48	
G88				
G89				
K90				
L91				
V92	9,73	4,13	2,32	1,00/0,86 ($H\gamma^{1/2}$)
H93	8,68	5,40	3,99/2,73	6,52 ($H\delta^2$) 7,95 (He^1)
L94	9,27	5,06	2,01/1,36	0,92 ($H\delta^{1/2}$)
Q95	8,80	5,14	2,23	2,46 ($H\gamma$)
K96	9,09	5,55	1,98/1,83	1,53 ($H\gamma$) 2,90 (He)
W97	8,28	4,93	3,73/3,24	10,21 (He^1) 7,23 ($H\delta^1$) 7,15 (He^3) 6,83 ($H\zeta^3$) 6,40 ($H\eta^2$) ($H\zeta^2$)
D98	9,25	4,29	2,80/2,38	
G99	8,35	3,97		
Q100	8,50	4,45	1,31/0,53	1,80/1,52 ($H\gamma$)
E101	8,19	5,84	2,07/1,93	2,18 ($H\gamma$)
T102	9,02	5,46	4,54	1,36 ($H\gamma^2$)
T103	7,99	5,56	4,01	1,20 ($H\gamma^2$)
L104	9,55	5,00	1,92/1,39	1,49 ($H\gamma$) 0,71/0,38 ($H\delta^{1/2}$)
V105				
R106	8,97	5,71		
E107				
L108				
II09				
D110	9,46	4,36	3,04/2,64	
G111	8,59	4,31/3,72		
K112	8,09	5,02		1,59 ($H\gamma$) 1,72 ($H\delta$) 3,12 (He)
L113				
II14				
L115				
T116	9,79	5,31	3,86	1,03 ($H\gamma^2$)
L117	9,70	5,28		
T118	8,61	5,62	4,11	1,21 ($H\gamma^2$)
H119				
G120				
T121				
A122				
V123	8,23	5,13	1,95	0,93/0,79 ($H\gamma^{1/2}$)
C124	9,61	5,32	3,32/2,25	2,68 ($H\gamma$)
T125	8,08	5,32	3,82	1,13 ($H\gamma^2$)
R126	10,15	4,91	1,83	
T127	8,76	4,91		
Y128				6,87 ($H\delta$) 6,57 (He)
E129	9,38	5,43	2,12/2,01	2,43/2,17 ($H\gamma$)
K130				
E131	8,75	4,32	1,88/1,74	2,20/2,14 ($H\gamma$)
A132	8,01	4,09	1,32	

¹H-Zuordnung der F16E-Mutante des humanen H-FABP bei pH=7,0 und 298K

Rest	HN	H α	H β	Sonstige
V1		4,32	2,34	1,09/1,02 (H $\gamma^{1/2}$)
E2	8,40	4,28	2,70/2,57	
A3	8,05	4,19	1,26	
F4	8,03	4,32	3,15/3,03	7,11 (H δ) 6,93 (He) 7,56 (H ζ)
L5	7,32	4,20	2,01	0,71 (H $\delta^{1/2}$)
G6	8,82	4,36/3,80		
T7	8,28		3,92	1,15 (H γ^2)
W8	9,76	5,33	3,01	9,68 (He ¹) 7,02 (H δ^1) 7,14 (He ³) 7,30 (H ζ^3) 7,22 (H η^3) 7,00 (H ζ^2)
K9	9,98	5,43	2,02/1,94	1,52 (H γ) 1,76 (H δ) 2,97 (He)
L10				
V11	9,28	4,61	2,25	1,01/0,87 (H $\gamma^{1/2}$)
E12	7,72	4,88	2,78/2,48	
S13	8,32	4,94	3,72	
K14	8,95	4,91		3,08 (He)
N15				7,68/7,18 (H δ^2)
E16				
D17				
D18	7,87	4,34	2,82/2,69	
Y19				
M20				
K21				
S22				
L23		3,76	1,56/1,22	0,36/0,31 (H $\delta^{1/2}$)
G24	7,79	4,19/3,74		
V25				
G26				
F27				
A28		3,95	1,47	
T29	7,57	4,05	3,85	1,11 (H γ^2)
R30	8,37	3,66		
Q31				
V32	7,08	3,69	1,80	0,94/0,61 (H $\gamma^{1/2}$)
A33	8,62		1,32	
S34				
M35	7,22	4,62	2,25/2,11	2,73/2,63 (He)
T36	7,28	4,41	4,20	1,38 (H γ^2)
K37				
P38				
T39	8,86	5,51	4,09	1,32 (H γ^2)
T40	9,97	5,64	3,57	1,00 (H γ^2)
I41	9,61	5,22	1,57	0,89 (H δ) 0,77 (H γ^2)
I42	9,26	5,17	2,40	0,77 (H γ^2)
E43	9,20		1,85	2,16/2,05 (H γ)
K44	8,67	4,99	1,72/1,48	1,35/1,11 (H γ) 1,57 (H δ) 3,05/2,98 (He)
N45	8,65	4,86	2,66/2,62	7,91/6,93 (H δ^2)
G46	8,98	3,98/3,66		
D47	8,78	4,61	2,81/2,69	
I48	7,72	4,18	1,94	1,53/1,04 (H γ^1) 0,61 (H δ) 0,75 (H γ^2)
L49				
T50	8,61	5,09	3,68	1,06 (H γ^2)
L51	9,10	5,31	1,43	0,77 (H $\delta^{1/2}$)
K52	9,74	5,15	1,69	1,32 (H γ) 2,82/2,71 (He)
T53				
H54				
S55	8,67		4,01	
T56				
F57	7,7	4,88	2,78	
K58				
N59	8,55	5,95	2,77	
T60				
E61	8,59	5,17	1,97	2,07 (H γ)
I62	8,45	4,94		
S63	8,25	5,64	3,55/3,45	
F64	8,47	4,58	2,69	6,30 (H δ) 6,81 (He) 6,65 (H ζ)
K65	8,82	4,90		2,94 (He)
L66	9,22	4,55	1,85	
G67	9,53	4,29/3,49		

V68	7,65	4,47	2,27	1,16/0,95 ($H\gamma^{1/2}$)
E69	9,19	5,11	2,05	2,24 ($H\gamma$)
F70	9,50	5,24	3,29	7,51 ($H\delta$) 6,98 (He) 6,28 ($H\zeta$)
D71	8,59	5,17	2,79/2,68	
E72	8,58	4,77	1,85	2,30/1,66 ($H\gamma$)
T73	8,84	5,40	4,09	1,22 ($H\gamma^2$)
T74				
A75		4,05	1,46	
D76	9,26	4,55	2,82	
D77	8,07	4,09	2,94/2,69	
R78	7,39	4,14	1,41	
K79	8,32	4,94	1,82	1,49 ($H\gamma$) 1,72 ($H\delta$) 3,02 (He)
V80	8,99	5,20	2,01	0,62 ($H\gamma^{1/2}$)
K81	8,91	4,99	1,93	1,59/1,48 ($H\gamma$) 1,73 ($H\delta$) 2,99 (He)
S82	9,26	5,86	3,04/2,05	
I83	8,43	4,28	1,81	0,99 ($H\delta$) 0,90 ($H\gamma^2$)
V84	9,73	5,46	1,37	0,51/-0,33 ($H\gamma^{1/2}$)
T85	9,03	4,70		
L86	8,68	5,30	1,88	1,51 ($H\gamma$) 0,88/0,79 ($H\delta^{1/2}$)
D87	9,04	4,97	2,71/2,50	
G88	8,54	4,01		
G89				
K90	7,81	5,02	1,96	1,55/1,30 ($H\gamma$) 1,60 ($H\delta$) 2,99 (He)
L91	8,81		0,72	0,96 ($H\gamma$) 0,41/0,32 ($H\delta^{1/2}$)
V92	9,73	4,16	2,28	0,99/0,86 ($H\gamma^{1/2}$)
H93	8,67		4,01/2,66	6,52 ($H\delta^2$) 7,87 (He^1)
L94	9,24	5,07	1,97	1,47 ($H\gamma$) 0,89 ($H\delta^{1/2}$)
Q95	8,79	5,15	2,22	
K96	9,13	5,54	1,99/1,85	1,53 ($H\gamma$)
W97	8,32	4,94	3,72	10,23 (He^1) 7,24 ($H\delta^1$)
D98		4,30	2,82/2,39	
G99	8,37	3,99/3,66		
Q100	8,51	4,46	1,33/0,55	1,82/1,54 ($H\gamma^{1/2}$)
E101	8,23	5,82	1,93	2,18 ($H\gamma$)
T102	9,06	5,47		1,34 ($H\gamma^2$)
T103	7,98	5,44	4,00	1,20 ($H\gamma^2$)
L104	9,59	5,03	1,91/1,41	1,51 ($H\gamma$) 0,73/0,43 ($H\delta^{1/2}$)
V105	9,30	4,90	2,05	0,95 ($H\gamma^{1/2}$)
R106	8,99	5,67	1,46	
E107	8,92	4,99	2,03/1,92	2,21/2,12 ($H\gamma$)
L108	8,77	5,30	1,24	1,00 ($H\gamma$) 0,40/0,24 ($H\delta^{1/2}$)
I109	8,91		1,73	1,05 ($H\gamma^1$) 0,87 ($H\delta$) 0,80 ($H\gamma^2$)
D110	9,44	4,36	3,06/2,65	
G111	8,60	4,31/3,68		
K112	8,09	5,00		1,73 ($H\delta$) 3,12 (He)
L113	8,47	4,58	1,07/-0,25	0,95 ($H\gamma$) 0,11/-0,11 ($H\delta^{1/2}$)
I114	9,42		2,08	0,85 ($H\gamma^2$)
L115				
T116	9,72	5,30	3,89	1,06 ($H\gamma^2$)
L117	9,72	5,30		
T118	8,63	5,57	4,10	1,22 ($H\gamma^2$)
H119	9,59	5,22		
G120		3,83/3,60		
T121				
A122		4,67	1,61	
V123	8,27	5,22	1,94	0,93/0,79 ($H\gamma^{1/2}$)
C124				
T125	8,10	5,35	3,83	
R126				
T127	8,73	4,89	3,88	1,19 ($H\gamma^2$)
Y128	10,02	5,52		
E129	9,35	5,42	2,13/2,05	
K130	9,40	3,85	1,48	0,91/0,20 ($H\gamma$) 1,20/1,10 ($H\delta$) 2,64/2,58 (He)
E131	8,82	4,36	1,92/1,78	2,23/2,18 ($H\gamma$)
A132	8,03	4,10	1,34	

¹H-Zuordnung der F16S-Mutante des humanen H-FABP bei pH=7,0 und 298K

Rest	HN	H α	H β	Sonstige
V1				
E2	8,42	4,30		
A3		4,17	1,28	
F4				7,07 (H δ) 6,93 (He) 7,53 (H ζ)
L5				
G6		4,35/3,83		
T7	8,31		3,95	1,15 (H γ^2)
W8				9,87 (He ¹) 7,00 (H δ^1) 7,11 (He ³) 7,39 (H ζ^3) 7,21 (H η^3) 6,96 (H ζ^2)
K9	9,97	5,37	1,91	1,55 (H γ) 1,77 (H δ)
L10				
V11	9,29	4,56		0,81 (H $\gamma^{1/2}$)
E12				
S13				
K14				
N15				
S16				
D17				
D18				
Y19	7,64	4,08	3,19/2,99	
M20				
K21				
S22				
L23				
G24				
V25				
G26				
F27				
A28				
T29				
R30				
Q31	7,92	3,84		
V32				
A33				
S34		4,35	4,09/3,99	
M35				
T36				
K37				
P38				
T39		5,51	4,18	1,34 (H γ^2)
T40				
I41	9,51	5,21		0,89 (H γ^2)
I42	9,15	5,15	2,42	0,78 (H γ^2)
E43	9,18		1,84	2,16/2,04 (H γ)
K44	8,70	4,97	1,70	1,55 (H γ)
N45	8,64		2,66/2,60	
G46				
D47				
I48	7,71	4,15	1,94	1,54/1,06 (H γ^1) 0,61 (H δ) 0,74 (H γ^2)
L49				
T50	8,61	5,06	3,67	1,06 (H γ^2)
L51				
K52				
T53				
H54				
S55				
T56				
F57				
K58				
N59				
T60				
E61				
I62				
S63	8,22	5,67	3,56/3,46	
F64			2,70	6,31 (H δ) 6,81 (He) 6,64 (H ζ)
K65				
L66	9,17	4,49	1,84	
G67	9,51	4,28/3,49		
V68	7,64	4,46	2,15	1,15/0,93 (H $\gamma^{1/2}$)

E69				
F70				7,48 (H δ) 6,98 (He) 6,31 (H ζ)
D71				
E72				
T73				
T74				
A75				
D76				
D77				
R78				
K79				
V80	9,00			0,65 (H $\gamma^{1/2}$)
K81	8,99	4,96		
S82	9,13	5,85		
I83	8,46	4,29		0,97 (H γ^2)
V84	8,75	5,45	1,35	0,46/-0,33 (H $\gamma^{1/2}$)
T85				
L86				
D87	9,03	4,97	2,70/2,48	
G88				
G89				
K90	8,01	4,98	1,95	2,95 (He)
L91				
V92	9,65		2,24	0,96/0,84 (H $\gamma^{1/2}$)
H93				
L94	9,24	5,10		1,45 (H γ)
Q95				
K96				
W97				
D98				
G99				
Q100				
E101				
T102				
T103				
L104				
V105				
R106				
E107				
L108	8,78	5,30	1,26	
II09	8,93			0,78 (H γ^2)
D110				
G111				
K112	8,06	5,02		
L113	8,44	4,53		0,11/-0,10 (H $\delta^{1/2}$)
II14	9,43		2,05	
L115				
T116				
L117				
T118				
H119				
G120				
T121				
A122				
V123				
C124				
T125				
R126				
T127				
Y128				7,03 (H δ) 6,61 (He)
E129	9,45	5,43	2,05	
K130			1,44	0,87/0,19 (H γ) 1,18/1,05 (H δ) 2,61/2,54 (He)
E131				
A132	8,03	4,10	1,33	

¹H-Zuordnung der K21I-Mutante des humanen H-FABP bei pH=7,0 und 298K

Rest	HN	H α	H β	Sonstige
V1		4,34	2,34	1,08/1,02 (H $\gamma^{1/2}$)
E2	8,41	4,26	2,70/2,59	
A3		4,19	1,27	
F4	8,00	4,31	3,15/3,06	7,11 (H δ) 6,91 (He) 7,54 (H ζ)
L5	7,32	4,20	2,01	
G6	8,80	4,35/3,81		
T7	8,25		3,91	1,15 (H γ^2)
W8	9,74	5,32	3,36/3,02	9,65 (He ¹) 7,50 (H δ^1) 7,13 (He ³) 7,35 (H ζ^3) 7,20 (H η^3) 6,99 (H ζ^2)
K9	9,99	5,44	2,01/1,95	1,60/1,51 (H γ) 1,76 (H δ) 2,98 (He)
L10	7,82	3,46	1,50/1,19	1,31 (H γ) 0,84/0,43 (H $\delta^{1/2}$)
V11	9,29	4,62	2,26	0,97/0,85 (H $\gamma^{1/2}$)
D12	7,72	4,59	2,75/2,47	
S13	8,31	4,95	3,75/3,46	
K14	8,96	4,90	1,95	1,55/1,46 (H γ) 1,81/1,73 (H δ) 3,09 (He)
N15				7,70/7,20 (H δ^2)
F16				7,51 (H δ) 7,06 (He) 7,09 (H ζ)
D17		4,23	2,72/2,61	
D18	7,84	4,27	2,81/2,68	
Y19	7,60	4,08	3,30/2,99	7,01/6,79 (H δ) 6,51/6,47 (He)
M20	8,15	3,46	2,17/2,05	1,57/1,37 (H γ)
I21	8,92	3,55		
S22	7,69	4,30	4,11	
L23	7,27	3,65		0,30/0,13 (H $\delta^{1/2}$)
G24	7,80	4,21/3,76		
V25		3,76	1,49	1,04/0,87 (H $\gamma^{1/2}$)
G26		4,08/3,99		
F27	8,72	3,85	3,33/3,06	
A28		3,95	1,49	
T29		4,05	3,85	1,06 (H γ^2)
R30	8,35	3,70	1,87	1,22 (H γ)
Q31	7,91	3,80	1,85/1,78	1,99/1,95 (H γ)
V32	6,90	3,80	1,62	0,87/0,55 (H $\gamma^{1/2}$)
A33	8,60	3,87	1,36	
S34		4,36	4,09/4,01	
M35		4,74	2,30/2,15	2,78/2,67 (He)
T36	7,27	4,40	4,26	1,46 (H γ^2)
K37				
P38				
T39	8,95	5,49	4,11	1,33 (H γ^2)
T40	9,97	5,64	3,49	0,97 (H γ^2)
I41	9,62	5,22	1,54	1,48/1,28 (H γ^1) 0,87 (H δ) 0,75 (H γ^2)
I42	9,23	5,16	2,41	0,76 (H γ^2)
E43	9,19		1,85	2,16/2,03 (H γ)
K44	8,66	4,98	1,72	1,10 (H γ)
N45	8,65		2,66/2,61	
G46		4,00/3,64		
D47	8,91	4,66	2,81/2,70	
I48	7,72	4,18	1,94	1,54/1,05 (H γ^1) 0,61 (H δ) 0,75 (H γ^2)
L49				
T50	8,61	5,09	3,67	1,06 (H γ^2)
L51	9,14	5,27	1,39	0,74 (H $\delta^{1/2}$)
K52	9,75	5,13	1,70	1,31 (H γ) 2,82/2,71 (He)
T53	9,11	5,11	4,26	1,13 (H γ^2)
H54	9,76	5,84	3,11/3,04	
S55	8,69	5,08	4,00	
T56		4,18	4,47	1,38 (H γ^2)
F57	7,73	4,90	2,76	7,20 (H δ) 7,32 (He) 7,20 (H ζ)
K58	6,81	4,33		0,93/0,83 (H γ) 1,50/1,33 (H δ) 3,11 (He)
N59		6,01	2,76	
T60				
E61		5,16	1,98	2,09 (H γ)
I62	8,40	4,95		
S63	8,29	5,64	3,54/3,45	
F64	8,46	4,59	2,70	6,30 (H δ) 6,81 (He) 6,66 (H ζ)
K65	8,82	4,91		
L66	9,20	4,54	1,85	

G67	9,53	4,29/3,49		
V68	7,66	4,47	2,27	1,17/0,95 ($H\gamma^{1/2}$)
E69		5,13		2,25 ($H\gamma$)
F70	9,51	5,24	3,31	
D71	8,59	5,18	2,80/2,69	
E72	8,57		1,84	2,34/1,65 ($H\gamma$)
T73	8,89	5,42	4,10	1,23 ($H\gamma^2$)
T74				
A75				
D76	9,27	4,52		
D77	8,08	4,09	2,93/2,68	
R78	7,43	4,13	1,44/0,42	
K79	8,37	4,93	1,82	1,49 ($H\gamma$) 1,72 ($H\delta$) 3,02 (He)
V80	9,00	5,18	2,10	0,65/0,27 ($H\gamma^{1/2}$)
K81	8,91	5,00	1,93	1,58/1,51 ($H\gamma$) 1,75 ($H\delta$) 2,99 (He)
S82	9,26	5,84	3,04	2,05 ($H\gamma$)
I83	8,44	4,29	1,81	1,00 ($H\gamma^1$) 0,88 ($H\gamma^2$)
V84	9,73	5,45	1,34	0,49/-0,35 ($H\gamma^{1/2}$)
T85	8,96	4,70		
L86	8,67	5,32	1,88	1,51 ($H\gamma$) 0,87/0,77 ($H\delta^{1/2}$)
D87	9,04	4,98	2,71/2,50	
G88				
G89				
K90	7,79	5,02	1,97	1,51/1,27 ($H\gamma^{1/2}$) 1,57($H\delta$) 2,97 (He)
L91	8,84		1,30/0,71	0,96 ($H\gamma$) 0,40/0,32 ($H\delta^{1/2}$)
V92	9,71	4,13	2,30	1,00/0,86 ($H\gamma^{1/2}$)
H93	8,69	5,43	4,00/2,70	6,51 ($H\delta^3$) 7,93 (He^1)
L94	9,24	5,07	2,00/1,39	1,47 ($H\gamma$) 0,91 ($H\delta^{1/2}$)
Q95	8,80	5,15	2,21	
K96	9,13	5,56	2,00/1,85	1,55 ($H\gamma$) 2,91 (He)
W97	8,31	4,95	3,75	10,23 (He^1) 7,23 ($H\delta^1$)
D98		4,31	2,83/2,40	
G99		4,00/3,67		
Q100	8,53	4,47	1,34/0,57	1,83/1,53 ($H\gamma$)
E101	8,19	5,84	2,08/1,94	2,19 ($H\gamma$)
T102	9,06	5,47		1,38 ($H\gamma^2$)
T103	7,97	5,52	4,03	1,21 ($H\gamma^2$)
L104	9,55	5,03	1,92/1,39	1,52 ($H\gamma$) 0,77/0,41 ($H\delta^{1/2}$)
V105	9,28	4,91	2,05	1,12/0,97 ($H\gamma^{1/2}$)
R106	9,00	5,68	1,45	
E107	8,85	4,96	2,02/1,92	2,21/2,13 ($H\gamma$)
L108	8,78	5,30	1,25	1,01 ($H\gamma$) 0,40/0,26 ($H\delta^{1/2}$)
I109	8,91	4,28	1,73	1,38/1,04 ($H\gamma^1$) 0,87 ($H\delta$) 0,78 ($H\gamma^2$)
D110		4,37	3,06/2,67	
G111		4,31/3,72		
K112	8,09	4,97		1,71 ($H\delta$) 3,10 (He)
L113	8,44	4,61	-0,29	0,88 ($H\delta^{1/2}$)
I114	9,41		2,04	1,47 ($H\gamma^1$) 0,82 ($H\gamma^2$)
L115	9,58	5,50	2,11	1,29 ($H\gamma$) 0,84/0,67 ($H\delta^{1/2}$)
T116	9,80	5,36	3,90	1,07 ($H\gamma^2$)
L117	9,69	5,32		
T118	8,61	5,66	4,13	1,24 ($H\gamma^2$)
H119	9,62	5,22	3,34	
G120				
T121				
A122				
V123	8,24	5,13	1,97	0,95/0,82 ($H\gamma^{1/2}$)
C124	9,58	5,31	3,34/2,28	2,70 ($H\gamma$)
T125	8,16	5,32	3,86	1,16 ($H\gamma^2$)
R126				
T127	8,72	4,93	3,85	1,16 ($H\gamma^2$)
Y128	10,03	5,43	3,39/3,13	6,91 ($H\delta$) 6,60 (He)
E129	9,39	5,42	2,11/2,03	2,43/2,38 ($H\gamma$)
K130	9,41	3,84	1,48	0,90/0,22 ($H\gamma$) 1,19/1,09 ($H\delta$) 2,63/2,55 (He)
E131	8,80	4,35	1,92/1,77	2,23/2,17 ($H\gamma$)
A132	8,02	4,10	1,39	

¹H-Zuordnung der F64S-Mutante des humanen H-FABP bei pH=7,0 und 298K

Rest	HN	H α	H β	Sonstige
V1				
E2	8,42	4,27	2,71/2,59	
A3	8,09	4,18	1,25	
F4	8,04	4,30	3,14/3,05	7,09 (H δ) 6,93 (He) 7,57 (H ζ)
L5	7,29	4,19		
G6	8,85	4,36/3,85		
T7	8,28		3,93	1,16 (H γ^2)
W8	9,74	5,35		9,64 (He ¹) 7,06 (H δ^1) 7,16 (He ³) 7,35 (H ζ^3) 7,22 (H η^3) 7,01 (H ζ^2)
K9	10,01	5,45	2,01/1,97	1,60/1,53 (H γ) 1,77 (H δ) 2,98 (He)
L10	7,77	3,42		
V11	9,33	4,63	2,27	1,01/0,86 (H $\gamma^{1/2}$)
E12	7,75		2,78/2,49	
S13				
K14	8,98		1,96	1,59/1,48 (H γ) 1,83/1,74 (H δ) 3,10 (He)
N15				7,21/7,69 (H δ^2)
F16				7,52 (H δ) 7,07 (He) 7,12 (H ζ)
D17				
D18	7,87	4,30	2,85/2,71	
Y19	7,63	4,11		7,03/6,83 (H δ) 6,54/6,48 (He)
M20	8,26	3,42	1,98	
K21	8,88	3,88	1,91/1,75	1,50/1,35 (H γ) 1,67 (H δ)
S22				
L23	7,16	3,70	1,57	
G24	7,79	4,15/3,71		
V25				
G26				
F27				7,24 (H δ) 7,35 (He) 7,33 (H ζ)
A28	8,75	3,85	1,48	
T29	7,60	3,86	4,04	1,09 (H γ^2)
R30	8,39	3,70		
Q31	7,94	3,81	1,82	2,02/1,94 (H γ)
V32	6,99	3,73	1,71	0,93/0,60 (H $\gamma^{1/2}$)
A33		3,88	1,33	
S34		4,39	4,13/4,06	
M35	7,26	4,73	2,31/2,15	2,78/2,68 (H γ)
T36	7,27	4,40	4,28	1,46 (H γ^2)
K37				
P38				
T39	8,95	5,49	4,12	1,33 (H γ^2)
T40	9,93	5,64	3,49	0,96 (H γ^2)
I41	9,59			0,89 (H γ^2)
I42	9,29		2,42	0,77 (H γ^2)
E43	9,32		1,88	2,18/2,05 (H γ)
K44	8,72	5,22	1,76/1,46	1,57 (H γ) 1,62 (H δ) 3,04 (He)
N45	8,50		2,70/2,67	7,83/6,88 (H δ^2)
G46				
D47		4,29	2,84/2,70	
I48		3,87	2,09	1,52/1,18 (H γ^1) 0,64 (H δ) 0,81 (H γ^2)
L49	8,48		1,82/1,27	0,79/0,71 (H $\delta^{1/2}$)
T50	9,10	5,32	3,82	1,13 (H γ^2)
L51		5,21	1,42/1,36	1,48 (H γ) 0,65/0,63 (H $\delta^{1/2}$)
K52				
T53	9,09	5,09	4,24	1,15 (H γ^2)
H54	9,77	5,86	3,16	
S55				
T56		4,21	4,50	1,40 (H γ^2)
F57	7,76		3,26/2,78	
K58	6,84	4,34	1,55/1,40	0,93/0,90 (H γ) 1,59/1,44 (H δ) 2,78/2,70 (He)
N59	8,63	5,97	2,79	
T60				
E61		5,18	1,98	2,05 (H γ)
I62				
S63	8,21	5,50	3,54/3,50	
S64	8,72	4,21	2,90/2,76	
K65				
L66				
G67		4,25/3,51		

V68	7,72	4,48	2,07	1,11/0,95 ($H\gamma^{1/2}$)
E69				
F70	9,53	5,24		7,52 (H δ) 7,22 (He) 6,70 (H ζ)
D71	8,60	5,19	2,81/2,70	
E72				
T73	8,86	5,43	4,10	1,24 ($H\gamma^2$)
T74				
A75				
D76	9,29	4,55	2,83	
D77	8,08	4,10	2,93/2,72	
R78	7,48	4,15	1,51	
K79	8,33		1,85	1,51 ($H\gamma$) 1,73 (H δ) 3,03 (He)
V80	8,98	5,22		
K81				
S82	9,32	5,99	3,30/2,27	
I83	8,42	4,48		1,03 ($H\gamma^1$)
V84	9,73	5,63	1,88	0,73/0,70 ($H\gamma^{1/2}$)
T85				
L86	8,60	5,30	1,82/1,30	1,53 ($H\gamma$) 0,87/0,80 (H $\delta^{1/2}$)
D87	9,05		2,72/2,52	
G88				
G89				
K90	7,84	5,02	1,96	1,51/1,28 ($H\gamma$) 1,60 (H δ)
L91	8,80		1,22/0,52	
V92	9,85	4,19	2,32	1,01/0,90 ($H\gamma^{1/2}$)
H93	8,62	5,70	3,97/2,79	6,71 (H δ^2) 8,06 (He 1)
L94				
Q95	8,70	5,22		
K96	9,23	5,59	1,97/1,90	1,58 ($H\gamma$) 1,74 (H δ)
W97				10,25 (He 1) 7,26 (H δ^1)
D98				
G99	8,42	4,00/3,70		
Q100	8,53	4,51	1,36/0,64	1,84/1,53 ($H\gamma$)
E101	8,24	5,86	2,09	2,20/2,09 ($H\gamma$)
T102	9,13	5,51		1,40 ($H\gamma^2$)
T103	7,98			1,26 ($H\gamma^2$)
L104				
V105	9,26			1,12/0,98 ($H\gamma^{1/2}$)
R106	9,08	5,69		
E107				
L108	8,77	5,29	1,46/27	1,01 ($H\gamma$) 0,43/0,28 (H $\delta^{1/2}$)
I109	8,93	4,30	1,74	1,33/1,06 ($H\gamma^1$) 0,88 (H δ) 0,82 ($H\gamma^2$)
D110	9,46	4,37	3,07/2,66	
G111		4,30/3,72		
K112	8,08		1,99/1,97	1,60 ($H\gamma$) 1,71 (H δ)
L113			0,92	0,12/-0,11 (H $\delta^{1/2}$)
I114	9,41		2,04	0,84 ($H\gamma^2$)
L115				
T116	9,84	5,35	3,93	1,08 ($H\gamma^2$)
L117	9,71	5,33		
T118	8,60	5,63	4,13	1,26 ($H\gamma^2$)
H119				
G120				
T121				
A122				
V123	8,26	5,19	1,98	0,97/0,84 ($H\gamma^{1/2}$)
C124	9,61	5,32		
T125	8,15	5,36	3,88	1,18 ($H\gamma^2$)
R126				
T127	8,75		3,85	1,17 ($H\gamma^2$)
Y128	10,05	5,45	3,37	6,92 (H δ) 6,60 (He)
E129	9,41	5,43	2,14/2,04	2,42/2,39 ($H\gamma$)
K130	9,38	3,82	1,45	0,83 ($H\gamma$) 1,10 (H δ)
E131	8,85	4,36	1,93/1,79	2,24/2,18 ($H\gamma$)
A132	8,05	4,11	1,35	

¹H-Zuordnung der L66G-Mutante des humanen H-FABP bei pH=7,0 und 298K

Rest	HN	H α	H β	Sonstige
V1		4,30	2,29	1,02/0,97 (H $\gamma^{1/2}$)
E2	8,42	4,27	2,67/2,58	
A3	8,08	4,18	1,27	
F4	8,05	4,33	3,12/3,08	7,06 (H δ) 6,91 (He) 7,48 (H ζ)
L5	7,28	4,16	2,00	
G6	8,74	4,36/3,80		
T7	8,26		3,89	1,14 (H γ^2)
W8	9,74	5,32	3,35/2,99	9,70 (He ¹) 7,04 (H δ^1) 7,11 (He ³) 7,39 (H ζ^3) 7,21 (H η^3) 6,97 (H ζ^2)
K9	10,00	5,43	1,99/1,94	1,58/1,49 (H γ) 1,75 (H δ) 2,95 (He)
L10	7,78	3,43		
V11	9,28	4,61	2,23	0,95/0,82 (H $\gamma^{1/2}$)
E12	7,72	4,88	2,74/2,46	
S13	8,29	4,93	3,78/3,43	
K14	8,94	4,88	1,94	1,54/1,45 (H γ) 1,80/1,70 (H δ) 3,07 (He)
N15				7,65/7,18 (H δ^2)
F16			3,16/3,07	7,49 (H δ) 7,04 (He) 7,07 (H ζ)
D17		4,15	2,71/2,60	
D18	7,83	4,27	2,80/2,67	
Y19	7,64	4,08	3,20/2,99	6,99/6,77 (H δ) 6,50/6,46 (He)
M20				
K21		3,84	1,87/1,70	1,46/1,30 (H γ) 1,66 (H δ)
S22				
L23	7,14	3,67	1,54	
G24	7,74	3,68		
V25		3,77	1,45	1,05/0,85 (H $\gamma^{1/2}$)
G26				
F27		3,84	3,32/3,05	7,21 (H δ) 7,33 (He) 7,29 (H ζ)
A28		3,92	1,47	
T29	7,56	4,01	3,82	1,10 (H γ^2)
R30	8,36	3,65		
Q31	7,93	3,79		
V32	6,92	3,68	1,66	0,88/0,53 (H $\gamma^{1/2}$)
A33	8,60	3,82	1,30	
S34	8,28	4,35	4,08/3,99	
M35	7,22	4,60	2,28/2,11	2,75/2,63 (H γ)
T36	7,23	4,38	4,25	1,45 (H γ^2)
K37				
P38				
T39	8,96	5,48	4,09	1,31 (H γ^2)
T40	9,91	5,60	3,46	0,94 (H γ^2)
I41	9,59	5,19	1,52	1,45(H γ^1) 0,86 (H γ^2)
I42	9,20	5,14	2,39	0,76 (H γ^2)
E43	9,14		1,82	2,14/2,03 (H γ)
K44	8,65	4,98	1,70	1,13 (H γ) 3,01/2,98 (He)
N45	8,61		2,65/2,59	7,81/6,86 (H δ^2)
G46				
D47	8,80	4,60	2,79/2,66	
I48	7,74	4,17	1,95	1,55/1,06 (H γ^1) 0,59 (H δ) 0,72 (H γ^2)
L49				
T50	8,62	5,08	3,66	1,04 (H γ^2)
L51	9,09	5,23	1,72/1,39	1,55 (H γ) 0,73/0,70 (H $\delta^{1/2}$)
K52	9,71	5,11	1,67	1,28 (H γ) 2,80/2,67 (He)
T53	9,12	5,11	4,27	1,12 (H γ^2)
H54	9,74	5,87		
S55				
T56				
F57	7,75	4,85	3,25/2,78	7,18 (H δ) 7,29 (He) 7,18 (H ζ)
K58	6,79	4,83	1,50/1,36	0,93/0,88 (H γ) 2,75/2,67 (He)
N59	8,56	5,98	2,77	
T60				
E61	8,64	5,15	1,95	2,06 (H γ)
I62	8,38	4,93		
S63	8,26	5,59	3,52/3,43	
F64	8,41	4,57	2,73	6,31 (H δ) 6,79 (He) 6,65 (H ζ)
K65	8,79	4,95		1,67 (H δ) 2,95 (He)
G66	9,36	4,25/3,79		

G67	9,42	4,27/3,53		
V68	7,65	4,45	2,26	1,15/0,95 ($H\gamma^{1/2}$)
E69	9,14	5,10	2,03	2,22 ($H\gamma$)
F70	9,58	5,31	3,29	7,49 ($H\delta$) 7,00 (He) 6,33 ($H\zeta$)
D71	8,59	5,15	2,78/2,68	
E72	8,54		1,84	2,33/1,64 ($H\gamma$)
T73	8,92	5,41	4,08	1,21 ($H\gamma^2$)
T74				
A75		3,98	1,46	
D76	9,23	4,53	2,82	
D77	8,05	4,06	2,90/2,67	
R78	7,39	4,10	1,43	
K79	8,29	4,93	1,83	1,46 ($H\gamma$) 1,71 ($H\delta$) 3,01 (He)
V80	8,97	5,17		0,64/0,26 ($H\gamma^{1/2}$)
K81	8,89	4,98		1,46 ($H\gamma$) 1,72 ($H\delta$) 2,96 (He)
S82	9,23	5,81	3,02/2,04	
I83	8,44	4,24	1,81	0,96 ($H\gamma^2$)
V84	9,74	5,32	1,27	0,43/-0,33 ($H\gamma^{1/2}$)
T85	8,99	4,67	4,23	1,18 ($H\gamma^2$)
L86	8,66	5,15		
D87	8,73	4,90	2,69/2,48	
G88				
G89				
K90	7,73	5,06	1,91	1,54/1,27 ($H\gamma$) 1,56 ($H\delta$) 2,98 (He)
L91	8,76			0,95 ($H\gamma$) 0,37/0,26 ($H\delta^{1/2}$)
V92	9,48	4,15	2,31	0,98/0,85 ($H\gamma^{1/2}$)
H93	8,68	5,41		6,52 ($H\delta^2$) 7,93 (He^1)
L94	9,22	5,07	1,96/1,39	0,88 ($H\delta^{1/2}$)
Q95	8,79	5,14	2,20	
K96	9,11	5,54	1,98/1,84	1,54 ($H\gamma$) 1,70 ($H\delta$) 2,90 (He)
W97	8,29	4,93		10,21 (He^1) 7,21 ($H\delta^1$)
D98		4,29	2,82/2,40	
G99	8,35	3,98/3,65		
Q100	8,50	4,45	1,31/0,53	1,80/1,51 ($H\gamma$)
E101	8,18	5,83	1,93	2,18 ($H\gamma$)
T102	9,02	5,45		1,36 ($H\gamma^2$)
T103	7,97	5,53	3,99	1,19 ($H\gamma^2$)
L104	9,55	5,04	1,90	
V105	9,27	4,89	2,04	0,95 ($H\gamma^{1/2}$)
R106	8,89	5,66	1,45	
E107				
L108	8,75	5,29	1,22	0,95 ($H\gamma$) 0,43/0,29 ($H\delta^{1/2}$)
I109	8,92		1,70	1,03 ($H\gamma^1$) 0,85 ($H\delta$) 0,77 ($H\gamma^2$)
D110	9,42	4,34	3,04/2,63	
G111	8,58	4,29/3,68		
K112	8,05	4,95		1,70 ($H\delta$) 3,12 (He)
L113				
I114	9,35		2,07	0,81 ($H\gamma^2$)
L115	9,53	5,48		1,27 (H^1)
T116	9,74	5,32	3,88	1,05 ($H\gamma^2$)
L117	9,65	5,27		
T118	8,61	5,62	4,12	1,22 ($H\gamma^2$)
H119		5,23	3,30	
G120		3,81/3,59		
T121				
A122		4,66	1,62	
V123	8,24	5,12		0,93/0,80 ($H\gamma^{1/2}$)
C124	9,59	5,31	3,33/2,27	2,71 ($H\gamma$)
T125	8,09	5,33	3,83	1,15 ($H\gamma^2$)
R126				
T127	8,69	4,92	3,83	1,13 ($H\gamma^2$)
Y128	10,00	5,43	3,35/3,11	6,88 ($H\delta$) 6,57 (He)
E129	9,38	5,41	2,12/2,02	
K130	9,36	3,73	1,43	0,85/0,19 ($H\gamma$) 1,16/1,05 ($H\delta$) 2,61/2,55 (He)
E131	8,78	4,33	1,90/1,75	2,21/2,15 ($H\gamma$)
A132	8,02	4,08	1,32	

¹H-Zuordnung der E72S-Mutante des humanen H-FABP bei pH=7,0 und 298K

Rest	HN	H α	H β	Sonstige
V1		4,31		1,08/1,01 (H $\gamma^{1/2}$)
E2	8,39	4,23	2,68/2,58	
A3	8,06	4,17	1,27	
F4	8,01	4,32	3,15/3,05	7,07 (H δ) 6,91 (He) 7,54 (H ζ)
L5	7,29	4,19	2,01	
G6	8,79	4,34/3,80		
T7	8,25		3,91	1,14 (H γ^2)
W8	9,72	5,31	3,35/3,01	9,63 (He ¹) 7,03 (H δ^1) 7,12 (He ³) 7,35 (H ζ^3) 7,19 (H η^3) 6,98 (H ζ^2)
K9	10,01	5,43	2,00/ 1,95	1,60/1,51 (H γ) 1,76 (H δ) 2,96 (He)
L10				
V11	9,29	4,62	2,25	0,99/0,83 (H $\gamma^{1/2}$)
E12	7,71	4,89	2,76/2,48	
S13	8,29	4,94		
K14	8,96		1,94	1,55 (H γ) 1,71 (H δ) 3,08 (He)
N15				
F16				
D17		4,15	2,72/2,62	
D18	7,85	4,26	2,81/2,68	
Y19	7,63	4,10	3,20/3,00	6,99/6,77 (H δ) 6,49/6,47 (He)
M20				
K21		3,85	1,89	1,33 (H γ) 1,70 (H δ)
S22				
L23	7,14	3,65	1,52	0,31/0,11 (H $\delta^{1/2}$)
G24	7,75	4,18/3,69		
V25				
G26				
F27		3,85	3,33/3,06	7,19 (H δ) 7,32 (He) 7,30 (H ζ)
A28		3,93	1,47	
T29	7,56		3,83	1,10 (H γ^2)
R30	8,35	3,68		
Q31		3,79	1,80	1,98/1,91 (H γ)
V32	6,93	3,68	1,65	0,88/0,50 (H $\gamma^{1/2}$)
A33		3,86	1,33	
S34		4,36	4,09/4,00	
M35	7,23		2,29/2,11	2,76/2,64 (H γ)
T36	7,25	4,40	4,26	1,46 (H γ^2)
K37				
P38				
T39	9,00	5,45	4,08	1,32 (H γ^2)
T40	9,93	5,61	3,48	0,96 (H γ^2)
I41				
I42	9,21	5,17	2,42	0,77 (H γ^2)
E43	9,17		1,84	2,16/2,01 (H γ)
K44	8,68	4,96	1,71	1,14 (H γ)
N45	8,64		2,66/2,60	
G46				
D47		4,61	2,79/2,67	
I48	7,70	4,18	1,94	1,50/1,05 (H γ^1) 0,60 (H δ) 0,72 (H γ^2)
L49				
T50	8,61	5,09	3,68	1,06 (H γ^2)
L51	9,13	5,26	1,44	
K52			1,69	1,29 (H γ) 2,81/2,69 (He)
T53	9,13	5,13	4,20	1,14 (H γ^2)
H54	9,75	5,83		
S55	8,65		4,05	
T56				
F57	7,72	4,98	2,76	7,19 (H δ) 7,30 (He) 7,19 (H ζ)
K58	6,83	4,35		0,93 (H γ) 1,53 (H δ)
N59		5,97	2,75	
T60				
E61		5,16	1,97	2,10 (H γ)
I62	8,40	4,95		
S63	8,33	5,66	3,54/3,47	
F64				6,34 (H δ) 6,83 (He) 6,66 (H ζ)
K65	8,86	4,95		1,62 (H δ)
L66	9,15	4,52	1,84	
G67	9,50	4,27/3,47		

V68	7,61	4,46	2,25	1,15/0,94 ($H\gamma^{1/2}$)
E69		5,10	2,06	2,24 ($H\gamma$)
F70	9,54		3,33	7,54 ($H\delta$) 7,06 (He) 6,38 ($H\zeta$)
D71				
S72				
T73				
T74				
A75				
D76				
D77	7,97	4,08	2,91/2,71	
R78	7,46	4,15	0,41	
K79	8,29	4,94		
V80				
K81				
S82				
I83				
V84	9,73	5,55	1,36	0,45/-0,33 ($H\gamma^{1/2}$)
T85	8,98	4,70		
L86	8,69	5,33	1,87	1,50 ($H\gamma$) 0,85/0,77 ($H\delta^{1/2}$)
D87	9,00	4,96	2,69/2,51	
G88				
G89				
K90	7,78	5,00	1,95	1,50 ($H\gamma$) 2,99 (He)
L91				
V92	9,75	4,20	2,29	0,98/0,85 ($H\gamma^{1/2}$)
H93		5,40	3,99/2,69	
L94				
Q95				
K96	9,14	5,54		
W97	8,29	4,94		10,23 (He^1) 7,21 ($H\delta^1$)
D98		4,29	2,82/2,40	
G99	8,34	3,96/3,68		
Q100	8,50	4,45	1,32/0,50	1,82/1,55 ($H\gamma$)
E101	8,21	5,83	1,95	2,18 ($H\gamma$)
T102				
T103		5,54	4,03	1,24 ($H\gamma^2$)
L104				
V105				
R106	8,98	5,67		
E107				
L108	8,78	5,29	1,47/1,23	0,99 ($H\gamma$) 0,39/0,23 ($H\delta^{1/2}$)
II09		4,27	1,71	1,07 ($H\gamma^1$) 0,86 ($H\delta$) 0,78 ($H\gamma^2$)
D110		4,35	3,05/2,65	
G111	8,61	3,68		
K112	8,07	4,96		1,70 ($H\delta$) 3,11 (He)
L113			-0,24	0,91 ($H\gamma$) 0,12/-0,13 ($H\delta^{1/2}$)
II14	9,39		2,03	0,82 ($H\gamma^2$)
L115	9,58	5,49		
T116	9,78	5,36	3,89	1,07 ($H\gamma^2$)
L117	9,69	5,30		
T118	8,57	5,63	4,11	1,23 ($H\gamma^2$)
H119				
G120				
T121				
A122				
V123	8,25	5,15	1,96	0,95/0,82 ($H\gamma^{1/2}$)
C124	9,56	5,31		
T125	8,11	5,34	3,84	1,15 ($H\gamma^2$)
R126				
T127	8,69	4,96	3,84	1,15 ($H\gamma^2$)
Y128	10,01	5,43		6,89 ($H\delta$) 6,58 (He)
E129	9,39	5,41	2,13/2,03	
K130	9,39	3,81	1,45	0,88/0,21 ($H\gamma$) 1,18/1,08 ($H\delta$) 2,62/2,55 (He)
E131	8,79	4,34	1,91/1,76	2,21/2,17 ($H\gamma$)
A132	8,02	4,10	1,33	

LEBENS LAUF

Martin Rademacher geboren am 11.10.1970 in Bielefeld.

Schulbildung

1977 – 1981 Wellensiekschule Bielefeld
1981 – 1990 Ratsgymnasium Bielefeld
Abschluß Abitur

Grundwehrdienst

1990 – 1991 Fernschreiber bei der Marinefernmeldegruppe II in Nieby

Hochschulbildung

1991 – 1993 Chemiestudium an der Universität Bielefeld
Abschluß Vordiplom
1993 – 1996 Chemiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen
Diplomarbeit über die Expression des löslichen humanen
MPR300 im Baculovirus-System
seit 1996 Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M.
Promotion über NMR-spektroskopische Untersuchungen an
Fettsäurebindungsproteinen am Institut für Biophysikalische Chemie

Berufspraxis

1995 – 1996 Studentische Hilfskraft am Institut für
Zell- und Molekularbiologie der Georg-August-Universität Göttingen
(Betreuung des Biochemischen Praktikums für Mediziner)
seit 1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biophysikalische
Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M.
(Betreuung von Studenten im Praktikum Biophysikalische Chemie I für
Biochemiker)

Hochschullehrer

Dr. Belzner, Prof. Dr. P. Botschwina, Prof. Dr. R. Brückner, Dr. E. Diemann, Prof. Dr. T. Dorfmueller, Prof. Dr. K. v. Figura, Prof. Dr. H.-F. Grützmacher, Prof. Dr. H.W. Heldt, Prof. Dr. J. Hinze, Prof. Dr. R. Hippler, Prof. Dr. P. Jutzi, Prof. Dr. G.F. Kahl, Prof. Dr. W. Knoche, Prof. Laatsch, PD Dr. K. Luther, Prof. Dr. A. Müller, Prof. Dr. E. Neumann, Prof. Dr. H. Rüterjans, PD Dr. J. Schroeder, Prof. Dr. H. Steidl, Prof. Dr. L.F. Tietze, Prof. Dr. J. Troe, Prof. Dr. B. Voigt, Prof. Dr. H.G. Wagner