# **INAUGURAL - DISSERTATION**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen

Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Physiker Markus Schott

aus Mannheim-Neckarau

Tag der mündl. Prüfung:

Strukturbestimmung biologisch relevanter Proteinfragmente mittels hochauflösender, multidimensionaler Kernspinresonanz-Spektroskopie:

Die Porenregion des Kaliumkanals IRK1, das *Shaker*-Ballpeptid und die Dimerisierungshelix P11 der Glutathionreduktase

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prof. Dr. Josef Bille

Strukturbestimmung biologisch relevanter Proteinfragmente mittels hochauflösender, multidimensionaler Kernspinresonanz-Spektroskopie: Die Porenregion des Kaliumkanals IRK1, das *Shaker*-Ballpeptid und die Dimerisierungshelix P11 der Glutathionreduktase

Der Hauptteil der Dissertation beschäftigt sich mit der NMR-Strukturanalyse von drei biologisch relevanten Polypeptiden: Dem Kaliumkanal Ballpeptid *Shaker*-P22, dem Kaliumkanalporenpeptid von IRK1 und dem Glutathionreduktase - Faltungshemmer P11. Es konnte gezeigt werden, dass das Fragments des *Shaker* K<sup>+</sup>-Kanals keine wohldefinierte Tertiärstruktur einnimmt. Das 95 Aminosäuren lange Porenpeptid des IRK1 Kaliumkanals verhinderte aufgrund seiner stark hydrophoben Eigenschaft eine vollständige, dreidimensionale NMR-Strukturanalyse mit atomarer Auflösung. Jedoch war es durch den Einsatz eines speziellen Präparationsverfahrens erstmals gelungen, signifikante Mengen des Kanalpeptids in SDS-Micellen zu lösen und den Sekundärstrukturgehalt des Peptides mittels NMR-Spektroskopie und CD-Spektroskopie zu bestimmen Die komplette <sup>1</sup>H-NMR-Strukturanalyse des Glutathionreduktase - Faltungsinhibitors P11 ergab eine für kurze Peptide seltene, wohldefinierte, α-helikale Faltung des Peptids.

Weiterhin wird ein neues Verfahren zur Minimierung von  $t_1$ -Rauschstreifen vorgestellt. Unter dem Begriff  $t_1$ -Rauschstreifen sind spektrale Artefakte bekannt, die von diskontinuierlichen Übergängen im Zeitsignal hervorgerufen werden (z.B. Hardwareinstabilitäten oder Temperaturschwankungen). Der neue Ansatz zur Reduktion dieser gravierenden Artefakte bestand in der Entwicklung eines Verfahrens in der Zeitdomäne, welches mit großem Erfolg an simulierten Spektren getestet wurde.

Structure of biological relevant protein fragments analysed by multidimensional, high-resolution NMR spectroscopy: The pore region of the IRK1 K<sup>+</sup>- channel, the *Shaker* ball-peptide and the dimerisation helix P11 of glutathione reductase.

The main part of the thesis is about the NMR structural analysis of three biologically relevant polypeptides: The potassium channel ball peptide *Shaker*-P22, the potassium channel pore region of IRK1 and the glutathione reductase folding inhibitor P11. It could be shown that the *Shaker* fragment forms no well-defined structure. The long peptide of the IRK1 potassium channel prevented a complete three-dimensional structural analysis due to its strong hydrophobicity. However it was possible for the first time by the application of a special preparation procedure to solve significant quantities of the channel peptide into SDS micelles and to specify the secondary structure content of the peptide by NMR and CD spectroscopy. The complete <sup>1</sup>H-NMR structural analysis of the glutathione reductase folding inhibitor P11 resulted in a well-defined  $\alpha$ -helical folding which is rare for short peptides.

A new procedure for the minimization of  $t_1$ -noise is presented also. The term  $t_1$ -noise describes spectral artefacts which are caused by intermittent transitions in the time signal (e.g. hardware instabilities or variations in temperature). The new method for the reduction of these serious artefacts resulted in the development of a procedure in the time domain which was tested with success at simulated spectra.

### Teile dieser Arbeit sind bereits publiziert worden:

Markus K. Schott, Christof Antz, Rainer Frank., Johann Peter Ruppersberg und Hans Robert Kalbitzer (1998) Structure of the inactivating gate from the *Shaker* voltage gated K<sup>+</sup> Channel analysed by NMR spectroscopy. *European Biophysics Journal* **27**, 99-104

Christof Antz, Matthias Geyer, Bernd Fakler, Markus K. Schott, H. Robert Guy, Rainer Frank, Johann Peter Ruppersberg und Hans Robert Kalbitzer (1997) NMR structure of inactivation gates of mammalian voltage-dependent potassium channels. *Nature* **385**, 272-275

Axel Nordhoff, Christos Tziatzios, Jacomina A. van den Broek, Markus K. Schott, Hans Robert Kalbitzer, Katja Becker, Dieter Schubert und R. Heiner Schirmer (1997) Denaturation and reactivation of dimeric human glutathione reductase. An assay for folding inhibitors. *European Journal of Biochemistry* **245**, 273-282

## Inhaltsverzeichnis

1	EINL	EITUNG	7
1.1	NN	IR Stukturanalyse biologischer Makromoleküle	7
1.2	All	gemeine Vorgehensweise	
1	.2.1	Grundlagen	
1	.2.2	Erste eindimensionale NMR-Messungen	
1	.2.3	Messungen multidimensionaler Spektren und Spektrenzuordnung	8
1	.2.4	Analyse der Torsionswinkel	
1	.2.5	Messung der intramolekularen Kernabstände	10
1	.2.6	Bestimmung der Austauschraten	11
1	.2.7	Molekulardynamik Rechnungen zur Bestimmung der Tertiärstruktu	r 15
2 P11	STR I DER	JKTURUNTERSUCHUNGEN AN DER DIMERISIERUNGSHEI GLUTATHIONREDUKTASE	_IX 20
21	Ц	ntorgrund	20
2.1 2	<b>ח</b> וו 1 1	Ovidativar Strass als chamatherapoutisaher Apsatz	
2	1.1	Dia mangabligha Clutathian Paduktaga	22 24
2	.1.2	Die menschnene Glutatmon-Reduktase	
2.2	Pr	obenpräparation und Messbedingungen	25
2.3	Er	gebnisse	26
2	.3.1	Sequenzspezifische Zuordnung der <sup>1</sup> H-Resonanzen in H <sub>2</sub> O	26
2	.3.2	Sequentielle Zuordnung und intramolekulare Abstände	28
2	.3.3	Bestimmung des Torsionswinkels $\varphi$	29
2	.3.4	Chemische Verschiebungen	30
2	.3.5	H/D - Austauschraten	31
2	.3.6	Molekulardynamik - Rechnungen	33
2.4	Dis	kussion	37
2.5	Au	sblick	38
3	IONE	NKANÄLE	40
2 1	¥7-		10
<b>J.I</b>	<b>VO</b>	Figenschaften von enennungsgesteverten Jonenkenälen	40 40
3 2	.1.1 1つ	Eigenschaften von spannungsgesteuerten $V^+$ Jorenkenälen	404
3	.1.2	Altivianung den anannungsgesteuenten K -Ionenkanalen	
3 2	.1.3	Die Kanalpore	42
3 2	.1.4	Inalitiviarung anannungagaatauartar V <sup>+</sup> Varäla	
3	.1.3	makuvierung spannungsgesteuenter K -Kanate	44

3.1	1.6	"Ball and Chain" Model:	44
4	STRI	JKTURUNTERSUCHUNGEN AM SHAKER-BALLPEPTID	46
4.1	Hiı	ntergrund	46
4.2	Pro	benpräparation und Messbedingungen	47
4.3	Erg	gebnisse	48
4.3	3.1	Sequenzspezifische Zuordnung der <sup>1</sup> H-Resonanzen in H <sub>2</sub> O	
4.3	3.2	Sequentielle Zuordnung und intramolekulare Abstände	50
4.3	3.3	Bestimmung der Torsionswinkel	51
4.3	3.4	Chemische Verschiebungen	52
4.3	3.5	H/D - Austauschraten	52
4.3	3.6	Molekulardynamik - Rechnungen	55
4.4	Dis	kussion	58
4.5	Au	shlick	60
KAL 5.1	IUMP Hir	(ANALS	61
5.2	Ers	ste Lösungsansätze	63
5.2	2.1	Eigenschaften von Membranproteinen	63
5.2	2.2	Sequenzanalyse	63
5.2	2.3	Probenpräparation und Messbedingungen	65
5.2	2.4	Erste Versuche mit SDS - Micellen	69
5.2	2.5	TFE / TFA als Lösungsreagenz	71
5.3	1D	-NMR Sekundärstrukturbestimmung	
5.3	3.1	Hintergrund	73
5.3	3.2	Probenpräparation und Messbedingungen	75
5.3	3.3	Ergebnisse	76
5.4	Seł	undärstrukturbestimmung mittels CD-Spektroskopie	
5.4	4.1	Hintergrund	
5.4	4.2	Probenpräparation und Messbedingungen	83
5.4	4.3	Ergebnisse	83
5.5	Ne	ue Sequenzvorschläge	85
5.6	Dis	kussion	87

II

5.7 Au	sblick	88
6 t <sub>1</sub> -RA	USCHBEFREIUNG	90
6.1 Hi	ntergrund	
6.1.1	Symmetrie in zweidimensionalen NMR - Spektren	
6.1.2	Äquivalenz von Zeit- und Frequenzdomäne	
6.1.3	Die hyperkomplexe Fouriertransformation	
6.2 Lö	sungsansatz	
6.2.1	Material und Methode	
6.3 Er	gebnisse	
6.3.1	Simulierte Daten	
6.3.2	Erste Experimentelle Daten	100
6.4 Dis	skussion	
6.5 Au	sblick	102
7 LITE	RATUR	104
8 ANH	ANG	109
8.1 Str	uktur der 20 Aminosäuren	109
8.2 Ch	emische Verschiebungen des Shaker-Peptids	110
8.3 Ch	emische Verschiebungen des P11-Peptids	111
8.4 XF	LOR Parameter	112
8.4.1	NOE-Abstandseinschränkungen von P11	112
8.4.2	NOE-Abstandseinschränkungen von Shaker	118
8.4.3	Winkeleinschränkungen von P11	120
8.4.4	Winkeleinschränkungen von Shaker	122
8.5 So	ftware	124
8.5.1	C-Programm "ZNOISE"	124
8.5.2	C-Programm "ZNORM"	127
8.5.3	C-Programm "PNORM"	

### ABKÜRZUNGEN

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
Сα	α-ständiges Kohlenstoffatom
CD	Zirkulardichroismus
CMC	kritische Micellen Konzentration (Critical Micelle Concentration)
COSY	Korrelationsspektroskopie (Correlated Spectroscopy)
C-Terminus	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
δ	chemische Verschiebung (in ppm)
d-	deuteriert
$D_2O$	Deuteriumoxid
Da	Dalton
DG	Abstands-Geometrie (Distance Geometry)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithiothreithol
DQF	Doppelquanten Filter (Double Quantum Filter)
DSS	4,4-Dimethyl-4-silapentansulfonsäure
FD	Frequenz Domäne
FID	Freier Induktionszerfall (Free Induction Decay)
G	Gauß
GSH	reduziertes Glutathion (γ-Glutamylcysteinylglycin)
GSSG	oxidiertes Glutathion
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hz	Hertz
hGR	menschliche Glutathionreduktase
J	Skalare Kopplung
К	Kelvin
М	Molarität [mol/l]
MD	Moleküldynamik (Molecular Dynamics)
MLEV	Malcom Levitt breitbandige Entkopplungssequenz
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)

NOE	Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect)					
NOESY	Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie (Nuclear Overhause Effect Spectroscopy)					
N-Terminus	Aminoterminales Ende einer Polypeptidkette					
PDB	Protein Data Bank (Brookhaven, USA)					
PPM	Millionstel Teil (Parts Per Million; 10 <sup>-6</sup> )					
RMSD	Standardabweichung (Root Mean Square Deviation)					
ROESY	Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie im rotierenden Koordina- tensystem (Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)					
SA	Simuliertes Ausheizen (Simulated Annealing)					
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)					
TD	Zeitdomäne (Time Domain)					
TOCSY	Totale Korrelationsspektroskopie (Total Correlation Spectros- copy)					
TPPI	Zeitproportionale Phaseninkrementierung (Time Proportional Phase Increment)					

# ABKÜRZUNGEN DER AMINOSÄUREN (EIN- UND DREIBUCHSTABENCODE)

А	Ala	Alanin	М	Met	Methionin
С	Cys	Cystein	Ν	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	Р	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
Н	His	Histidin	Т	Thr	Threonin
Ι	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
Κ	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

### PHYSIKALISCHE GRÖßEN UND KONSTANTEN

γ	gyromagnetisches Verhältnis
D	Diffusionskoeffizient
Н	Hamiltonoperator
$H^{s}$	Spin-Hamiltonoperator
k	Boltzmann Konstante (1,380662 $\cdot$ 10 <sup>-23</sup> J K <sup>-1</sup> )
h	Planksche Konstante $(6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J s})$
η	Diffusionskonstante
$\mu_0$	Induktionskonstante (4 $\pi \cdot 10^{-7}$ V s A <sup>-1</sup> m <sup>-1</sup> )
Μ	longitudinaler Magnetisierungsvektor
q	dipolare Wechselwirkungskonstante (7,1584 $\cdot$ 10 <sup>-69</sup> m <sup>6</sup> s <sup>-2</sup> )
R	universelle Gaskonstante (8,31541 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
V <sub>mol</sub>	Molvolumen bei Normalbedingungen $(0,02241 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1})$
t <sub>1</sub>	Evolutionszeit
t <sub>2</sub>	Detektionszeit
$T_1$	longitudinale Relaxationszeit
T <sub>2</sub>	transversale Relaxationszeit

# 1 Einleitung

### 1.1 NMR Stukturanalyse biologischer Makromoleküle

Dreidimensionale Proteinstrukturen spielen eine Schlüsselrolle in der biologischen und biomedizinischen Forschung. Sie sind einerseits wichtig zur Erforschung und zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen der molekularen Struktur und der physiologischen Funktion von Proteinen; andererseits liefern sie wichtige Basisdaten zur Durchführung von strukturbasierten Wirkstoffentwicklung (Drug-Design) und Protein-Engeneering-Projekten.

Vor rund 17 Jahren wurde die Flüssigkeits-Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) als neue Protein-Strukturbestimmungsmethode neben der Röntgenkristallstrukturanalyse eingeführt (Williamson et al. 1984). Im Gegensatz zu dieser benötigt die NMR-Strukturbestimmung keine Proteine in kristalliner Form, sondern nur in gelöstem Zustand. Dies entbindet den Wissenschaftler von der zeitraubenden Suche nach einer guten Kristallisationsbedingung und erlaubt die Untersuchung eines Proteins oder Peptids unter nahezu physiologischen Bedingungen. Mittlerweile wurden mehrere hundert Proteinstrukturen mit NMR bestimmt. Dies ergänzt, insbesondere durch die Charakterisierung von dynamischen Moleküleigenschaften, die strukturellen Informationen, die man von der Kristallographie erhält. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können derzeit allerdings nur Proteine von ca. 150 Aminosäuren im homonuklearen Fall bzw. von rund 300 Aminosäuren bei vollständiger Isotopenmarkierung mit hinreichender Auflösung strukturell analysiert werden. Allerdings sind vor kurzem neue NMR-Experimente vorgestellt worden, die diese Grenze deutlich nach oben verschieben werden (Tjandra und Bax 1997). Auch wird die ständige technische Weiterentwicklung der NMR-Spektrometer der Aufklärung größerer Proteine dienen (Boyd et al. 1994). Mittlerweile sind Spektrometer mit 900 MHz Resonanzfrequenz und entsprechend gestiegener Auflösung verfügbar.

Ist ein Protein für die NMR-Strukturbestimmung geeignet, so erhält man in der Regel wesentlich mehr unabhängige Informationen über das Molekül als mit der klassischen Röntgenstrukturanalyse: Im NOESY-Spektrum (Nuclear Overhausen Effect Spectroscopy, Jeener et al., 1979) zeigen Kreuzsignale die räumliche Nachbarschaft zweier Protonen an, im COSY-Spektrum (Correlated Spectroscopy, Rance et al., 1983) erhält man aus den Multiplettaufspaltungen die Torsionswinkel der Atombindungen. Beispielsweise kann man aus den Austauschraten von NH-Protonen mit dem Lösungsmittel D<sub>2</sub>O auf eine intramolekulare Wasserstoffbrücke schließen. Änderungen der chemischen Verschiebungen der NH-Protonen mit der Temperatur zeigen ebenfalls an, ob eine Wasserstoffbrücke zum Wasser vorliegt. Aus der T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Relaxation der Signale kann man Informationen über die Flexibilität des Moleküls erhalten und mittels Diffusionsmes-

sungen kann man Aggregationen erkennen. Die Abweichung der chemischen Verschiebungen zu den Statistischen-Knäuel-Werten (random coil) der NH- und H $\alpha$ -Protonen liefern Informationen über die Sekundärstruktur.

## 1.2 Allgemeine Vorgehensweise

### 1.2.1 Grundlagen

Die in der NMR-Spektroskopie detektierten Signale werden durch eine sehr große Anzahl gleichartiger Kernspins (typischerweise  $>10^{17}$ ) hervorgerufen. Das klassische Bild sich bewegender Magnetisierungsvektoren (Blochsche Gleichungen) ist aber unzureichend zur Beschreibung der Dynamik gekoppelter Spins, wie sie in mehrdimensionalen NMR-Experimenten beobachtet werden kann. Die adäquate Beschreibung erfordert deshalb eine quantenmechanische Behandlung mit dem Dichteoperatorformalismus.

Die Theorie der NMR-Spektroskopie ist in den Monographien von Abragam (1961), Slichter (1978), Ernst et. al. (1987) und Goldman (1988) ausführlich dargestellt.

Die Strukturaufklärung eines Proteins mit Hilfe der NMR-Spektroskopie erfolgt in mehreren Schritten:

### 1.2.2 Erste eindimensionale NMR-Messungen

In den 1D-Experimenten optimiert man die verschiedenen Mess- und Lösungsparameter (z.B. Temperatur, pH, Lösungsmittel, Puffer, Ionenstärke, Probenkonzentration). Man erhält erste Informationen über das Faltungsverhalten und die Reinheit der Probe.

### 1.2.3 Messungen multidimensionaler Spektren und Spektrenzuordnung

Durch die Analyse der Spinsystemmuster (Wüthrich 1986) werden mit TOCSY- (Total Correlation Spectroscopy, Braunschweiler und Ernst 1982) und COSY-Spektren die Spinsysteme aufgrund ihrer skalaren Kopplung analysiert. Jede Aminosäure besitzt ein eindeutiges Spinsystemmuster, wie ein Fingerabdruck. Aus der Lage und Anordnung der Signale im Spektrum lässt sich daher die entsprechende Aminosäure bestimmen. Nach vollständiger Zuordnung der Spinsysteme wird die sequentielle Zuordnung der Aminosäuren mit einem NOESY-Spektrum durchgeführt. Dazu wertet man die dipolare Kopplung zwischen dem C $\alpha$ -Proton einer Aminosäure und dem Hauptketten-N-Proton der nachfolgenden Aminosäure aus. Auf diese Weise ordnet man — bei bekannter Aminosäurensequenz — sequentiell das ganze Protein zu.

### 1.2.4 Analyse der Torsionswinkel

Aus den COSY-Spektren erhält man direkt die Stärke der J-Kopplung, einer Wechselwirkung zwischen zwei Protonen, die über Elektronenspins der kovalenten Bindungen vermittelt wird. Sie zeigt sich im Spektrum als Multiplettaufspaltung. Die Stärke dieser Spin-Spin-Wechselwirkung ist abhängig von dem Torsionswinkel der beteiligten Atome. Man erhält deshalb als wichtige Strukturinformation aus der Analyse der Multiplettaufspaltung die Größe der intramolekularen dihedralen Torsionswinkel.

Ein dihedraler Winkel ist durch vier Atome (i,j,k,l) definiert und bezeichnet den Winkel zwischen den beiden Ebenen *i,j,k* und *j,k,l* (typischerweise: H-C-C-H). Damit beinhaltet die *J*-Kopplung wichtige Information über die lokale Molekülkonformation (Bild 1.1). Der formale Zusammenhang zwischen den dihedralen Winkeln  $\varphi$  einer Peptidkette und der vicinalen <sup>3</sup>*J*-Kopplung wird durch die allgemeine Karplusgleichung beschrieben (Karplus, 1959):

$${}^{3}J(\varphi) = A\cos^{2}(\varphi) + B\cos(\varphi) + C$$
(1.1)

Die Parameter A, B und C sind unterschiedlich für die verschiedenen dihedralen Winkel und wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen empirisch ermittelt (z.B.: Bystrov, 1976; de Marco, 1978; Pardi, 1984). In Bild 1.1 ist die Bezeichnung der dihedralen Winkel einer Peptidkette nach der Standardkonvention (IUPAC-IUB, 1970) dargestellt.



Bild 1.1: Standardnomenklatur für die Atome und Torsionswinkel  $\varphi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  und  $\chi^1$ ,  $\chi^2$  entlang einer Polypeptidkette (Wüthrich, 1986).

Der  $\omega$ -Winkel in der Peptidbindung ist durch den partiellen Doppelbindungscharakter der CN-Bindung auf etwa 180° fixiert. Die vier dargestellten Atome O'<sub>i-1</sub>,C'<sub>i-1</sub>, N<sub>i</sub> und NH<sub>i</sub> liegen damit in einer Ebene. Der  $\psi$ -Winkel kann nur durch heteronukleare <sup>15</sup>Noder <sup>13</sup>C-/<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestimmt werden. In einem Protein mit fester Sekundärstruktur sind aber nur bestimmte Kombinationen von  $\varphi/\psi$ -Winkelpaaren möglich. Die dihedralen  $\varphi$ - und  $\chi^1$ -Winkel können durch die Bestimmung der vicinalen Kopplungskonstante <sup>3</sup>J<sub>NH $\alpha}$ </sub> und <sup>3</sup>J<sub> $\alpha\beta$ </sub> mit der Karpluskurve berechnet werden. Für den  $\varphi$ -Winkel gelten beispielsweise die Parameter: A = 6,4; B = -1,4; C = 1,9 (Pardi, 1984); und für den  $\chi^1$ -Winkel: A = 9,5; B = -1,6; C = 1,8 (de Marco et al., 1978). Die lokale Molekülkonformation einer Peptidkette, wie z.B. die rechts- oder linksgängige  $\alpha$ -Helix und das  $\beta$ -Faltblatt, wird als Sekundärstrukturelement einer Proteinstruktur bezeichnet. Daraus resultieren entsprechende Kombinationen der Torsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  der Hauptkette, die für die jeweilige Sekundärstruktur charakteristisch sind. Zu einer  $\alpha$ -Helix gehören kleine  ${}^{3}J_{NH\alpha}$ -Kopplungskonstanten (< 6 Hz), während bei einem  $\beta$ -Faltblatt große Kopplungskonstanten um 8 Hz vorherrschen.



Bild 1.2: Abhängigkeit des dihedralern Winkels von der vicinalen Kopplungskonstante  ${}^{3}J_{NH\alpha}$  (Antz, 1994).

#### 1.2.5 Messung der intramolekularen Kernabstände.

Neben der J-Kopplung dient ein zweiter physikalischer Effekt der Strukturbestimmung: Die dipolare Wechselwirkung. Sie hängt nur von der räumlichen Entfernung zweier Protonen ab und wird durch den Nuclear Overhauser Effekt (NOE; Overhauser 1953) im NOESY-Spektrum gemessen. Die Kreuzsignale im NOESY weisen auf die räumliche Nachbarschaft der beiden beteiligten Protonen hin. Sie treten aufgrund der Proteinfaltung auch zwischen unterschiedlichen, nicht benachbarten Aminosäuren auf. Die Intensität des NOE-Signals zwischen Proton i und j ist gemäß

$$NOE \approx r_{ij}^{-6} \cdot \tau_m \tag{1.2}$$

abhängig vom räumlichen Abstand  $r_{ij}$  und der Mischzeit  $\tau_m$  des Moleküls. Unter praktischen Bedingungen erreicht man die Nachweisgrenze aufgrund des sehr schnellen Abfalls des NOE-Signals bei einem Abstand  $r_{ij}$  von mehr als 0,5 nm. Es ist notwendig, die NOE-Signalvolumina jeweils auf ein oder mehrere Referenzsignale mit bekannten Abstand zu eichen. Für bestimmte Sekundärstrukturelemente kann man aus den räumlichen Faltungsbedingungen typische NOE-Muster ableiten. So sind beispielsweise  $\alpha$ -Helices durch starke H $\alpha_i$  / N<sub>i+3</sub> und H $\alpha_i$  / H $\beta_{i+3}$  NOE Kreuzsignale gekennzeichnet (Bild 1.3).

Eine prinzipielle Schwierigkeit bei der Auswertung der NOE-Signale liegt darin, dass sie zwischen beliebig benachbarten Protonen auftreten. Dies führt dazu, dass in einem iterativen Prozess die wahrscheinlichste, d.h. die widerspruchsfreiste Zuordnung gefunden werden muss. Weitere Strukturhinweise lassen sich aus dem Vergleich der NH- und H $\alpha$ -chemischen Verschiebungen mit den statistischen Mittelwerten erhalten.



Bild 1.3: Links: NOE-Schema typischer Sekundärstrukturelemente. Die Dicke der Linien ist proportional zur Intensität der NOE-Signale. Rechts: Übliche Protonenabstände (in Å) und J-Kopplungskonstanten (in Hz) für typische Sekundärstrukturelemente. (Wagner, 1990; Wüthrich, 1986)

#### 1.2.6 Bestimmung der Austauschraten

Die Messung von Wasserstoffaustauschraten stellt eine weitere Möglichkeit dar, mittels NMR-Spektroskopie eine ortsaufgelöste Information makromolekularer Eigenschaften von Proteinen zu bestimmen. Die Wasserstoffprotonen der Haupt- und Seitenkettengruppen aller Proteine und Peptide stehen in einem kontinuierlichen Gleichgewicht mit Wasserstoffatomen des Lösungsmittels. Die ersten den Protein-Austauschratenmessungen wurden schon Mitte der 50er Jahre von Linderstrøm-Lang (1958) gemacht. Mittlerweile ist diese Methode aufgrund verbesserter Experimente wiederaufgelebt (Hvidt et al., 1966). Speziell durch die NMR und die Massenspektroskopie sind neue Anwendungen, wie z.B. das Markieren von Austauschprotonen, zur Untersuchung komplizierter biologischer Systeme möglich geworden (Woodward et al., 1982). Parallel zu diesen Fortschritten wuchs das Verständnis der chemischen und physikalischen Grundlagen des Austauschprozesses selbst (Englander et al., 1984).

Die austauschbaren Protonen der Proteine umfassen die NH-Protonen der Hauptkettengruppen und die an N, O oder S polarer Gruppen gebundenen Seitenkettenprotonen. Obwohl die Protonen polarer Gruppen labil sind, sind sie kovalent gebunden und tauschen mit den Lösungsmittelprotonen nur als Ergebnis einer chemischen Reaktion aus.

Der zugrundeliegenden Protonen-Transfer hängt direkt von den Eigenschaften der Donor- oder Akzeptorgruppen ab. Da die NH-Gruppen der Peptide sehr extreme pK-Werte haben, findet der basenkatalytische Austausch in Wasser nur durch  $OH^{-}$ -Ionen und der säurekatalytische Austausch nur durch  $H^{+}$ -Ionen statt (Bild 1.1).

Wasserstoffaustauschraten können auf einer nicht ortsaufgelösten Ebene durch Tritiumdetektion und verschiedene spektroskopische Methoden, wie z.B. Infrarotspektroskopie (Zhang et al., 1995, De Jongh et al., 1995), Ramanspektroskopie (Hildebrandt et al., 1993) oder UV-Absorption (Englander et al., 1979) bestimmt werden. Für die atomare Auflösung einzelner Protonen kann man die NMR-Spektroskopie und die Neutronen-Kristallographie (Kossalioff, 1982) verwenden.



Bild 1.1: Säure- und Basenkatalysierter Austausch der Amidprotonen der Peptidbindung. Oben: Mechanismus des säurekatalysierten Austauschs. Unten: Basenkatalysierter Austausch. (Kalbitzer, 1989)

Die Austauschraten der Protein-Amidprotonen mit den Protonen des Lösungsmittels ist stark von der räumlichen Struktur des Proteins abhängig. Die dominierenden Faktoren sind hierbei elektrostatische Effekte benachbarter Gruppen (z.B. Wasserstoffbrücken) und die Wasserzugänglichkeit (diese ist bei kurzen Peptiden nicht zu berücksichtigen).

Zur Bestimmung der Austauschraten löst man das protonierte Protein in 100% D<sub>2</sub>O auf und verfolgt die Intensitätsabnahme der Signale der Amidprotonen in einer Reihe von 1D- oder 2D-NMR-Experimenten. Aus einer Anpassung erster Ordnung an die Gleichung

$$I_{i}(t) = I_{i}(t=0) \cdot \exp(-k_{i}t)$$
(1.3)

erhält man schließlich die experimentelle Austauschrate  $k_{exp}$ . Man findet Austauschraten, die sich über einen weiten Zeitbereich erstrecken. Für unstrukturierte Peptide erhält man Austauschraten in der Größenordnung von  $1s^{-1}$ , in unzugänglichen Bereichen von globulären Proteinen findet man die kleinsten Raten in der Größenordnung von  $10^{-5}$  s<sup>-1</sup>.

Aus einer deutlichen Verringerung der experimentellen Austauschrate  $(k_{exp})$  zur theoretisch erwarteten Austauschrate  $(k_{theo})$  kann man deshalb Wasserstoffbrücken ableiten.

#### 1.2.6.1 Abhängigkeit der Austauschraten

Zusammengefasst hängen die Austauschraten vom pH, der Temperatur, den benachbarten Aminosäuren (Bai et al., 1993), den beteiligten Isotopen (Connelly et al., 1993), der Salzkonzentration (Englander et al., 1984) und dem beteiligten Lösungsmittel (Englander et al., 1985, Zhang et al., 1995) ab. Für die NH-Protonen sind diese Faktoren mit kleinen Peptiden genau geeicht und an ungefalteten Proteinen überprüft worden (Buck et al., 1994, Robertson et al., 1991). Es ist also möglich, die theoretisch zu erwartenden Austauschraten für ein ungefaltetes Peptid genau zu bestimmen.



Bild 1.2: Austauschverhalten von Poly-D-Alanin mit verschiedenen Isotopkombinationen in Abhängigkeit des pH-Wertes (Conelly et al., 1993).

Trägt man den Logarithmus der Austauschrate gegen den pH-Wert auf, erhält man eine typische V-förmige Kurve (Bild 1.2) mit einem Minimum zwischen pH 2 und pH 3. Die Nachbarschaftseffekte der Seitenketten verschieben diese Kurven entlang der pH-Achse.

#### 1.2.6.2 Korrektur der Austauschraten der Amidprotonen in D<sub>2</sub>O

Die Hauptketten-Amidprotonen einer Polypeptidkette tauschen mit den Protonen oder Deuteronen des Lösungsmittels H<sub>2</sub>O bzw. D<sub>2</sub>O mit einer Austauschrate  $k_{exp}$  aus. Im Folgenden wird angenommen, dass es sich beim Lösungsmittel um H<sub>2</sub>O handelt. An diesem Austauschprozess sind Hydroxydionen, Hydroniumionen und Wassermoleküle beteiligt, so dass  $k_{exp}$  von der Konzentration dieser Moleküle und damit dem pH-Wert abhängt. Es kann durch Gleichung (1.4) beschrieben werden:

$$k_{\exp}(pH) = k_A \cdot 10^{-pH} + k_B \cdot 10^{(pH-pK_H)} + k_W$$
(1.4)

Hierbei sind  $k_A$ ,  $k_B$  und  $k_W$  Ratenkonstanten zweiter Ordnung, welche die Beiträge von  $H_3O^+$ ,  $OH^-$  und  $H_2O$  zur Gesamtaustauschrate beschreiben. pK<sub>H</sub> ist die Dissoziati-

onskonstante von Wasser. In einer Polypeptidkette wird der pK<sub>a</sub>-Wert einer Peptidgruppe durch die Abschirmungs- und Induktionseffekte von den Seitenketten der sequentiell benachbarten Aminosäuren beeinflusst, so dass selbst in einer ungefalteten Polypeptidkette nicht alle Hauptketten-Amidprotonen mit der gleichen Austauschrate  $k_{exp}$  mit den Protonen des Lösungsmittels austauschen (Molday et al., 1972). Bai und Englander (1993) konnten zeigen, dass die Seitenketten der Aminosäuren *i-1* und *i+1*, die zu einer Peptidgruppe an Stelle *i* der Aminosäurensequenz links und rechts benachbart sind, die Ratenkonstanten  $k_A(i)$ ,  $k_B(i)$  und  $k_W(i)$  dieser Peptidgruppe voneinander unabhängig multiplikativ modifizieren. Um den Einfluss zu quantifizieren, bestimmten sie für alle Aminosäuren linke und rechte empirische Korrekturfaktoren  $A_I(i-1)$ ,  $B_I(i-1)$  bzw.  $A_r(i+1)$ ,  $B_r(i+1)$ , mit denen die Ratenkonstanten  $k_{A,Ala}$ ,  $k_{B,Ala}$  und  $k_{W,Ala}$ , die man bei einer reinen Poly-Alanin-Kette für die Aminosäure *i* finden würde, zu multiplizieren sind, um die Ratenkonstanten in der heterogenen Polypeptidkette zu erhalten. Mit Hilfe dieser Korrekturfaktoren lässt sich die auf Sequenzabhängigkeit korrigierte Austauschrate  $k_{exp,seq}(i)$ durch

$$k_{\exp,seq}(i) = k_{A,Ala} \cdot A_{l}(i-1) \cdot A_{r}(i+1) \cdot 10^{-pH} + k_{B,Ala} \cdot B_{l}(i-1) \cdot B_{r}(i+1) \cdot 10^{(pH-pK_{H})} + k_{W,Ala} \cdot B_{l}(i-1) \cdot B_{r}(i+1)$$
(1.5)

ausdrücken.

Die von Bai und Englander angegebenen Referenzwerte für die Ratenkonstanten  $k_{A,Ala}$ ,  $k_{B,Ala}$  und  $k_{W,Ala}$ , beziehen sich auf eine Temperatur von 293 K. Mit der Gleichung

$$k_{\exp,seq}(T) = k_{\exp,seq}(293K) \cdot \exp\left(-\frac{E_a(1/T - 1/293K)}{R}\right)$$
(1.6)

in der *R* die universelle Gaskonstante und  $E_a$  die Aktivierungsenergie der Austauschreaktion sind, ist es möglich die Austauschraten einer ungefalteten Polypeptidkette bei beliebigen Temperaturen T zu berechnen. Die Aktivierungsenergie  $E_a$  beträgt für  $k_A$ 14 kcal/mol, für  $k_B$  17 kcal/mol und für  $k_W$  19 kcal/mol.

Berechnete Austauschraten können benutzt werden, um einen sogenannten Verlangsamungsfaktor  $f_s$  zu bestimmen, welcher der Quotient aus berechneter und gemessener Austauschrate ist. Der Verlangsamungsfaktor ist ein von der Aminosäurensequenz unabhängiges Maß dafür, wie stark der Austausch der Amidprotonen mit den Protonen des Lösungsmittels durch die Faltung der Polypeptidkette in die Tertiärstruktur verlangsamt wird (Englander et al., 1984), d.h. ob eine Wasserstoffbrücke vorliegt, oder nicht. Von Prof. Englander wurde mir dankenswerterweise eine Excel-Arbeitsmappe zur Verfügung gestellt. Ausgehend von Austauschraten der Amidprotonen in D<sub>2</sub>O, die im Rahmen dieser Arbeit bei dem *Shaker*-Ballpeptid und bei dem Kontaktpeptid P11 bestimmt worden sind, konnten damit Verlangsamungsfaktoren  $f_s$  inklusive aller Korrekturen auf pH, Temperatur Isotope und Seitenketteneffekte berechnet werden.

#### 1.2.7 Molekulardynamik Rechnungen zur Bestimmung der Tertiärstruktur

Aus den gemessenen Strukturdaten (NOEs, dihedrale Winkel, etc.) erhält man zuletzt durch Molekulardynamiksimulationen mit dem Programm X-PLOR 3.1 (Brünger, 1993) dreidimensionale Proteinstrukturdaten, die mit den experimentellen Parametern übereinstimmen. Aufgrund der kurzen Distanz der messbaren Kernabstände und der Mehrdeutigkeiten der NOE-Kreuzsignale erhält man aber normalerweise eine große Anzahl von Lösungsmöglichkeiten für die Proteinstruktur. Sinnvolle Strukturhypothesen lassen sich deshalb nur durch eine große Anzahl von gemessenen Strukturinformationen erhalten. Aus eindeutigen Widersprüchen in den berechneten Strukturen lassen sich nun iterativ Fehler in der Spektrenauswertung korrigieren und genauere Strukturen berechnen. Auch dient die Rückrechnung von NOESY-Spektren aus den berechneten Proteinstrukturen mit dem Relaxationsmatrix-Formalismus zur Fehleranalyse und Verfeinerung der experimentellen Daten (Görler, 1998). Leider ist es oft aufgrund mangelnder Spektrenqualität (z.B. Auflösung, t<sub>1</sub>-Rauschartefakte, etc.) nicht möglich alle Informationen aus einem NMR-Spektrum zu erhalten. Durch neuere Hardware und durch intelligente Software wird die Qualität der Messungen und der Daten in Zukunft immer besser werden. Am Ende dieses Prozesses erhält man eine wahrscheinlichste Proteinstruktur, die allen gemessenen geometrischen Einschränkungen, z.B. NOE-Abständen und dihedrale Winkel, entspricht. Der Prozess der Strukturberechnung kann dabei in zwei Stufen untergliedert werden:

- 1. Erzeugung von Startstrukturen durch "Distanz-Geometrie"-Algorithmen (DG).
- 2. Strukturbestimmung durch Moleküldynamik-Simulationen (MD) mit experimentellen Einschränkungen (Berechnung der Struktur im Vakuum und ggf. im Lösungsmittel.

Ziel von Molekulardynamik-Simulationen (MD) zur Strukturbestimmung ist es, Molekülkonformationen ausfindig zu machen, die möglichst keine experimentell bestimmten geometrischen Einschränkungen verletzen. Für eine eindeutige Lösung reicht die Anzahl der gemessenen Strukturparameter bei weitem nicht aus. Deshalb ist mit den experimentell gewonnene Winkel- und Abstandsinformationen vielfach eine ganze Schar von Proteinstrukturen vereinbar. Das Bündel der energieärmsten Strukturen dient dann als "Momentaufnahme" des dynamischen, gefalteten Proteins.

#### 1.2.7.1 Theoretische Aspekte der MD-Simulationen

Zu Beginn werden die Koordinaten zufälliger Startstrukturen numerisch verfeinert, bis es zu einer Konvergenz der Strukturen kommt. Dabei wird die Phasenraumtrajektorie eines Moleküls aus N-Teilchen nach den klassischen Bewegungsgesetzen berechnet. Es gilt die Newtonsche Bewegungsgleichung, nachdem auf das *i*-te Teilchen der Masse  $m_i$ und der Beschleunigung  $\vec{a}_i$  zur Zeit t die Kraft  $\vec{F}_i$  wirkt:

$$\vec{\mathbf{F}}_{i}(t) = m_{i}\vec{\mathbf{a}}_{i}(t) = m_{i}\frac{\mathrm{d}^{2}\vec{\mathbf{r}}_{i}(t)}{\mathrm{d}t^{2}} = -\vec{\nabla}_{i}E_{\mathrm{pot}}$$
(1.7)

Die gesamte potentielle Energie  $E_{pot}$  des Systems stellt man als Überlagerung unterschiedlicher individueller Beiträge dar:

$$E_{\text{pot}} = E_{\text{vdw}} + E_{\text{elec}} + E_{\text{noe}} + E_{\text{dihe}} + E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{tor}}$$
(1.8)

Dabei sind die einzelnen Energieterme wie folgt charakterisiert:

#### $E_{vdw}$ : Energie der Van der Waals-Wechselwirkung

Die Energie der Van der Waals-Wechselwirkung zwischen zwei Atomen i und j im Abstand  $r_{ij}$  wird durch das Lennard-Jones Potential beschrieben

$$E_{\rm vdw}\left(r_{ij}\right) = \frac{1}{2} \sum_{\rm pairs(ij)} k_{\rm vdw} \, 4\varepsilon \left(\left(\frac{\sigma}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}}\right)^{6}\right) H\left(r_{ij} - r_{cut}\right) \tag{1.9}$$

wobei  $\varepsilon$  und  $\sigma$  durch die Energie  $E_{\min}$  und den van der Waals-Radius  $r_{\min}$  bestimmt sind zu  $r_{\min} = \sigma \sqrt[6]{2}$  und  $E_{\min} = -\varepsilon$ . Um den Rechenaufwand zu begrenzen, wird eine obere Abstandsgrenze  $r_{cut}$  gesetzt (entspricht dem maximaler Wechselwirkungsradius), die über die Heavyside-Sprungfunktion H mit dem Abstand  $r_{ij}$  verknüpft ist. Die Werte von  $\sigma$  und  $\varepsilon$  sind durch Anpassen der errechneten Daten an experimentelle Ergebnisse aus Röntgenbeugungs- und Infrarotexperimenten bestimmt worden (Jorgensen et al., 1981).  $k_{vdw}$  ist ein benutzerdefinierter Wichtungsfaktor.

#### *E*<sub>elec</sub>: Energie der elektrostatischen Coulomb-Wechselwirkung

Der negative Energieterm der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen zwei Atomen i, j ergibt sich aus dem Coulomb-Potential zu

$$E_{\text{elec}}(r_{ij}) = -\sum_{\text{pairs}(ij)} k_{\text{elec}} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \mathbf{H}(r_{ij} - r_{cut})$$
(1.10)

Dabei sind  $q_{i,j}$  die Ladungen der Atome und  $\varepsilon_0$  die Dielektrizitätskonstante, sowie k<sub>elec</sub> ein benutzerdefinierter Wichtungsfaktor.

Bei der Simulation mit Lösungsmittelatomen berechnet man die Proteinstrukturen, wie z.B. beim *Shaker*-Peptid (Kapitel 4.3.6.2), in einer Box aus H<sub>2</sub>O-Atomen und berücksichtigt dabei periodische Randbedingungen. D.h. Wassermoleküle die die Box an einer Grenzfläche verlassen, wandern auf der gegenüberliegenden Seite wieder in sie hinein. Zur Berücksichtigung dieser Wechselwirkungen zwischen symmetrischen Paaren von Atomen benötigt man noch zusätzlich die Energiefunktionen  $E_{pvdw}$  und  $E_{pelec}$ . Beide Funktionen sind von der gleichen Form wie (1.9) und (1.10), jedoch werden hier zusätzliche Wechselwirkungen zwischen berücksichtigt, die aus einer vom Anwender definierten Translation hervorgehen.

#### *E<sub>noe:</sub>* Energie der Kernabstände

#### *E*<sub>dihe</sub>: Energie der dihedralen Winkel

Diese beiden Terme berücksichtigen die experimentell bestimmten Strukturparameter. Die dihedralen Winkel (Spin-Spin-Kopplung) und die Kernabstände (NOE) werden in Form von sogenannten experimentellen- oder Pseudo-Potentialen mit in das Kraftfeld einbezogen. Dafür gibt es in dem MD-Programm X-PLOR mehrere Alternativen, die abhängig von der Art der Molekülform und der Verlässlichkeit der Strukturparameter vom Benutzer gewählt werden können. Üblicherweise werden die besten Resultate für ein monomeres Molekül mit einer sogenannten biharmonischen Potentialfunktion erzielt:

$$E_{noe} = \begin{cases} k_{noe} (r_{ij} - r_{max})^2 & r_{ij} > r_{max} \\ 0 & r_{min} < r_{ij} < r_{max} \\ k_{noe} (r_{ij} - r_{min})^2 & r_{ij} < r_{max} \end{cases}$$
(1.11)

Hier bezeichnen  $r_{min}$  und  $r_{max}$  die untere und obere Fehlergrenze des gemessenen NOE-Abstands. Der vom Benutzer definierte Wichtungsfaktor  $k_{noe}$  kann dabei auch von der Temperatur und den Fehlertoleranzen abhängig sein. Die Potentialfunktion für die aus der *J*-Kopplungsanalyse bestimmten dihedralen Winkel wird ebenso wie für die NOEs angesetzt. *E*<sub>bond</sub>: Energie der kovalenten Bindung

- *E<sub>angle</sub>*: Energie der Valenzwinkel
- *E*<sub>tor:</sub> Energie der Torsionswinkel

Die letzten drei Energieterme beschreiben die kovalente Bindungsgeometrie des Moleküls. Sie werden durch harmonische Potentiale definiert mit Ausnahme der periodischen Torsionswinkel  $\varphi$ , die entsprechend ihrer Multiplizität *n* mehrere Potentialminima einnehmen können:

$$E_{\text{bond}} = \frac{1}{2} \sum_{\text{bonds}} k_b (r - r_0)^2$$
(1.12)

$$E_{\text{angle}} = \frac{1}{2} \sum_{\text{angles}} k_{\vartheta} (\vartheta - \vartheta_0)^2$$
(1.13)

$$E_{\text{torsion}} = \frac{1}{2} \sum_{\text{torsions}} k_{\varphi} [1 + \cos(n\varphi - \delta)]$$
(1.14)

Die Gleichgewichtsgrößen für Bindungslänge ( $r_0$ ), Valenzwinkel ( $\vartheta_0$ ) und Torsionswinkel ( $\varphi_0$ ) sind durch Röntgendiffraktionsmessungen experimentell bestimmten worden,  $\delta$  stellt einen Phasenwinkel dar. Die Kraftkonstanten  $k_b$ ,  $k_\vartheta$  und  $k_\varphi$  sind in X-PLOR so aufeinander abgestimmt vorgegeben, dass die lokale Stabilität des Systems gewährleistet ist.

Die Bewegungsgleichung (1.7) kann nur durch numerische Integration gelöst werden. Dazu verwendet XPLOR den Verlet-Algorithmus, der auf der Methode der finiten Differenzen beruht (Verlet, 1967). Die Berechnung der Koordinaten eines Teilchens *i* zum Zeitpunkt  $(t+\Delta t)$ , mit  $\Delta t$  als dem benutzerdefinierten Zeitinkrement der numerischen Integration, erfolgt aus den Koordinaten der vorhergehenden beiden Zeitschritte (*t*) und (*t*- $\Delta t$ ). Dieser Term ergibt sich durch die Addition zweier Taylorreihenentwicklungen für (*t*+ $\Delta t$ ) und (*t*- $\Delta t$ ) bis zur dritten Ordnung.

$$\vec{r}_{i}(t+\Delta t) = 2\vec{r}_{i}(t) - \vec{r}_{i}(t-\Delta t) + \frac{d^{2}\vec{r}_{i}(t)}{dt^{2}}(\Delta t)^{2}$$
(1.15)

Diese Methode führt durch die Taylorreihenentwicklung prinzipiell zu einer Verletzung des Energieerhaltungssatzes und damit zu einer geometrische Invarianz von Position und Geschwindigkeit des Teilchens. Dies ist aber bei den üblichen Zeitschritten von  $\Delta t = 10^{-15}$ s aufgrund der Kopplung an ein Wärmebad aber zu vernachlässigen.

Ziel der MD-Simulationen ist es, Molekülkonformationen zu bestimmen, die möglichst keine der gemessene geometrischen Einschränkungen verletzen und zudem nahe dem Energieminimum aller Energiefunktionen (1.8) kommt. Um zu verhindern, dass Molekülkonformation errechnet werden, die nur lokalen Energieminima entsprechen, werden die MD-Rechnungen mit Steuerungsprotokollen durchgeführt, durch die die Energiewerte und die Wichtungsfaktoren skaliert werden können. Durch ein "Simulated Annealing"-Protokoll (SA) können energetische Barrieren zwischen lokalen Energieminima durchtunnelt werden und mögliche Konformationsräume gleichmäßiger abgetastet werden (Kirkpatrick, 1983). Um andere Minima zu finden erlaubt es Energiebarrieren zu überwinden, indem sich das System nach der Boltzmann-Verteilung mit der Wahrscheinlichkeit P auch zu höheren Energiewerten *E* hin entwickeln kann

$$\mathbf{P}(E) = e^{\frac{-E}{k_B T}} \tag{1.16}$$

Während einer sogenannten "Hochtemperaturphase" werden die Wichtungsfaktoren der anderen Energiefunktionen gegenüber  $k_{noe}$  und  $k_{dihe}$  stark herabgesetzt. Auf diese Weise ist es möglich, dass sich während der Simulation Atome durchdringen können. Das von  $E_{noe}$  und  $E_{dihe}$  gebildete Kraftfeld überwiegt in dieser Phase, wodurch sich Konformationen entwickeln können, die im Wesentlichen von den experimentell gefundenen Einschränkungen bestimmt werden. Anschließend wird das System bei gleichzeitiger Erhöhung aller Kraftkonstanten in diskreten Schritten abgekühlt. Dadurch werden die berechneten Strukturen auf den Konformationsraum eingeengt, der mit den NMR-Daten bestmöglich übereinstimmt. Dieses Vorgehen ermöglicht den Faltungsprozess der Aminosäurenkette bis hin zu einer terminalen dreidimensionalen Proteinstruktur im thermodynamischen Gleichgewicht mit dem umgebenden Wärmebad.

# 2 Strukturuntersuchungen an der Dimerisierungshelix P11 der Glutathionreduktase

# 2.1 Hintergrund

In den letzten 25 Jahren hat die Malaria ihre angestammte Rolle als größte Bedrohung für Gesundheit und wirtschaftlichen Wohlstand der Menschheit zurückgewonnen, und baut diese Position weiter aus (Schirmer et al., 1993; Yamey 2001). Derzeit sind nach den Zahlen der Weltgesundheitsorganisation WHO ca. ein Drittel der Menschheit durch die Malaria gefährdet, 300 bis 500 Millionen Erkrankungen werden pro Jahr registriert, mehr als 2 Millionen Menschen sterben an Malaria (vorwiegend Kinder in Afrika) und bei mindestens ebenso vielen bleiben lebenslang Behinderungen zurück.

Die Erreger der Malaria ist der einzellige Parasit *Plasmodium*, der verkettete Fortpflanzungszyklen im Menschen und in blutsaugenden Anophelesmücken durchläuft (Bild 2.1). Vier Plasmodienarten infizieren den Menschen: *P. falciparum* ist der Erreger der Malaria tropica; *P. vivax* und *P. ovale* verursachen die Malaria tertiana; *P. malariae* ist verantwortlich für die Malaria quartana. Weitaus am gefährlichsten ist die Malaria tropica – fast alle der oben erwähnten Todesfälle gehen auf Ihr Konto.

Zur eigentlichen Erkrankung beim Menschen kommt es, wenn sich die Malariaparasiten in den Erythrozyten, den roten Blutzellen, vermehren. Das klinische Bild ist charakterisiert durch hohes Fieber und ein vernichtendes Krankheitsgefühl. Allgemein bekannt ist die sogenannte *Malaria tertiana*, bei der es an jedem dritten Tag zu einem Fieberschub kommt. Ein solcher Fieberschub kostet den Energiehaushalt des Kranken bis zu 20000 kJ; da meist unterernährte Kinder zwischen zwei und fünf Jahren betroffen sind, ist Entkräftung in der Regel die Todesursache.

Auch das Immunsystem ist Spitzenbelastungen ausgesetzt. Wenn nur 1 % der Erythrozyten bei Malaria befallen sind, werden alle drei Tage beim Platzen der infizierten Zellen 10-20 g Fremdprotein direkt ins Blutplasma entlassen. Die Malaria ist somit die Sepsis (Blutvergiftung) schlechthin. Vieles deutet darauf hin, dass das Immunsystem und vor allem das Netzwerk der Interleukine nicht durch die Auseinandersetzung mit Bakterien und Tumorzellen, sondern mit Malariaparasiten im Laufe der Evolution für Höchstleistungen programmiert worden sind. Wesentliche Prinzipien der körpereigenen Krebsabwehr ließen sich demnach aus dem Studium der Erkrankungen durch intrazelluläre Parasiten — der größeren und älteren Bedrohung für höhere Organismen — erklären.



Bild 2.1: Entwicklungszyklen des Malaria-Erregers. Der Malariaparasit durchläuft während seines komplizierten Lebenszyklus in einer weiblichen Anopheles-Mücke als Überträger und in einem Säugetier als Wirt eine Anzahl verschiedener Stadien. Ein von einer Stechmücke übertragener Sporozoit dringt alsbald in eine Leberzelle ein, wo er sich in einen großen vielkernigen Schizonten verwandelt. Dieser teilt sich in viele Tausend Merozoiten, die von der Leberzelle freigesetzt werden. Jeder Merozoit dringt in ein rotes Blutkörperchen ein und vermehrt sich darin. Das rote Blutkörperchen platzt schließlich und entlässt dabei 10 bis 20 Merozoiten ins Blutplasma, die in weitere rote Blutkörperchen eindringen. Einige Merozoiten differenzieren sich zu männlichen und weiblichen Gametocyten (Vorläufern von Keimzellen), die von der Stechmücke bei der Blutmahlzeit aufgenommen werden. Nach einer Reihe weiterer Veränderungen erscheinen reife Sporozoiten in der Speicheldrüse der Stechmücke – ein neuer Infektionszyklus kann beginnen (Spektrum Dossier, 1997).

Gefährlicher noch als die *Malaria tertiana* ist die *Malaria tropica*, die durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wird und bei der der Fieberverlauf weniger charakteristisch ist. Die gefürchtete Komplikation ist hier die zerebrale Malaria, die sich in Halluzinationen, Kopfschmerzen, Krämpfen und schweren Bewusstseinstrübungen äußert. 5% der Kinder, die die Zerebralmalaria überleben, leiden dauerhaft an neurologischen Schäden wie Halbseitenlähmungen, Blindheit oder Sprachstörungen. Wegen ihrer weiten Verbreitung ist die Malaria somit die schwerwiegendste neurologische Erkrankung der Welt. Die chronische Malaria ist vor allem wegen der resultierenden Anämie, der Blutarmut, eine schwere Krankheit.

Die Entwicklung von Impfstoffen gegen Malaria hat die Erwartungen bisher nicht erfüllt. Malariaerreger sind gegenüber chemischen Veränderungen ihrer Umwelt sehr anpassungsfähig. Bei Einführung eines neuen Medikaments ist damit zu rechnen, dass die Plasmodien, besonders *Plasmodium falciparum*, nach wenigen Jahren resistent werden. Chloroquin, noch vor einem Jahrzehnt das Mittel der Wahl, ist heute in vielen malariaendemischen Gebieten wirkungslos. Erst seit dem weltweiten Auftreten resistenter *P. falciparum*-Stämme beschäftigt sich die Wissenschaft mit dem Wirkungsmechanismus dieser Verbindung. Die Hemmung einer parasitenspezifischen Häm-Polymerase durch Chloroquin ist zur Zeit die attraktivste Hypothese. Der zivile, vor allem aber der militärische Ferntourismus führten maßgeblich zur Verbreitung chloroquinresistenter Erreger.

Zur Zeit gibt es kein Präparat, das in allen Teilen der Welt vor Malaria schützt; der Bedarf an neuartigen Chemotherapeutika ist dementsprechend groß.

#### 2.1.1 Oxidativer Stress als chemotherapeutischer Ansatz

Von 800 L Sauerstoff, die ein Mensch täglich aufnimmt, werden 5%, das entspricht 50 g, in Nebenreaktionen zu reaktiven Sauerstoffspezies wie  $O_2^-$ , HO<sub>2</sub>-Radikal, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH-Radikal oder ONOO<sup>-</sup> (Peroxynitrit) umgesetzt. Ihre zytotoxischen Wirkungen entfalten diese Substanzen durch Modifikation von Nukleinsäuren, thiolhaltigen Proteinen und Membranlipiden. Fast alle Zellen enthalten daher komplexe Stoffwechselsysteme, um die reaktiven Sauerstoffspezies unschädlich zu machen. Werden diese antioxidativen Systeme überfordert, spricht man vom, "oxidativen Stress" für die Zelle.

Oxidativer Stress ist aber nicht nur eine unvermeidbare Begleiterscheinung des aeroben Lebens, sondern auch ein wichtiges Prinzip der körpereigenen Abwehr. Beim "respiratory burst" (toxischen Sauerstoffstoß) produzieren Leukozyten und Makrophagen mit Hilfe einer membranständigen Oxidase (NADPH +  $2O_2 \Rightarrow$  NADP<sup>+</sup> + H<sup>+</sup> +  $2O_2^-$ ) Superoxidradikale als Ausgangssubstanzen chemischer Abwehrstoffe gegen Bakterien, Parasiten und Tumorzellen. In der Haber-Weiss-Reaktion ( $O_2^- + H_2O_2 \Rightarrow O_2 + HO^- + OH-$ Radikal) entstehen anschließend hochgiftige OH-Radikale. Auch zahlreiche pharmakologisch und toxikologisch aktive Substanzen führen als sogenannte Redoxpendler zu oxidativem Stress.

Klinische und experimentelle Befunde sprechen dafür, dass oxidativer Stress ein wichtiger Mechanismus bei der Zerstörung von Parasiten und Tumorzellen ist (Müller et al., 1993). Angeborene wie erworbene Faktoren, die in Erythrozyten einen erhöhten oxidativen Stress bewirken, bieten beispielsweise einen partiellen Schutz gegen *Plasmodium falciparum*, den Erreger der *Malaria tropica* (Hunt et al., 1990). Das bekannteste Beispiel hierfür ist der Mangel an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH). Dieser häufigste angeborene Enzymdefekt betrifft weltweit 400 Millionen Menschen und tritt in mehr als 300 genetischen Varianten auf. Sein Verbreitungsgebiet fällt mit dem der *Malaria tropica* zusammen. Der funktionelle Defekt besteht unter anderem in der eingeschränkten Bereitstellung von NADPH über den Hexosemonophosphatweg. Dies führt in Erythrozyten zu einer Beeinträchtigung des Glutathion-Redoxsystems (Bild 2.2) und so zu stark erhöhtem oxidativem Stress. Diese zusätzliche oxidative Belastung für den Parasiten bewirkt möglicherweise eine vorzeitige Freisetzung unreifer, nicht fortpflanzungsfähiger Erreger (Ruwende und Hill, 1998).



Bild 2.2: Der Glutathion-Redoxzyklus. Im Mittelpunkt steht das Tripeptid Glutathion (GSH). Es ist u.a. an der Entgiftung organischer Hydroperoxyde (ROOH) und an der Produktion von Desoxyribonukleotiden (dNDP) für die DNA Synthese beteiligt. Bei diesen Reaktionen werden zwei GSH Moleküle zum Disulfid GSSG oxidiert. GSH wird durch Reduktion mit NADPH Glutathion-Reduktase-katalysiert regeneriert. (Schirmer et al., 1995)

Da der G6PDH-Phänotyp zu einem Mangel an NADPH, dem Substrat der Glutathion-Reduktase, führt, entspricht er aus klinischer Sicht einer Glutathion-Reduktase-Insuffizienz in den Erythrocyten. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass der seltene, angeborene Glutathionreduktase-Mangel zu einem vergleichbaren Krankheitsbild führt (Becker et al., 1994). Auf dieser Grundlage ist die Hemmung der Glutathionreduktase, als Simulation eines natürlichen G6PDH-Mangels, ein erfolgversprechendes Prinzip für die Chemotherapie der Malaria (Zhang et al., 1988; Böhme et al., 2000).

Glutathion, ein Tripeptid mit einer Sulfhydrylgruppe, ist ein besonderes Aminosäurederivat mit mehreren wichtigen Funktionen. Zum Beispiel schützt Glutathion die Erythrozyten vor Oxidationsschäden. Glutathion, das in tierischen Zellen in hoher Konzentration vorliegt (ca. 5 mM), wirkt dabei als Reduktionsmittel. Es wechselt zwischen einer reduzierten Thiolform (GSH) und einer oxydierten Form (GSSG), in der zwei Tripeptide über eine Disulfidbindung verknüpft sind. Die reduzierte Form des Glutathions dient als Reduktionsmittel, das die Cysteinreste in Hämoglobin und anderen Erythrocytenproteinen im reduzierten Zustand hält. Es spielt eine Rolle bei Entgiftungsreaktionen, indem es mit Wasserstoffperoxyd und organischen Peroxyden reagiert. Das Verhältnis von GSH zu GSSG ist in den meisten Zellen größer als 500. Das reduzierte Glutathion ist notwendig zur Aufrechterhaltung der normalen Erythrozytenstruktur und des zweiwertigen Zustands des Eisens im Hämoglobin. Zellen mit einem verminderten Gehalt an GSH sind hämolyseanfälliger.

#### 2.1.2 Die menschliche Glutathion-Reduktase

Die Regenerierung von reduziertem Glutathion wird von der *Glutathion-Reduktase* katalysiert, einem Dimer aus 50 kDa Untereinheiten. Die Elektronen des NADPH werden nicht direkt auf die Disulfidbindung des oxidierten Glutathions übertragen, sondern zunächst auf ein fest gebundenes Flavinadenindinukleotid (FAD), dann auf eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten in einer Untereinheit und schließlich auf das oxidierte Glutathion. Jede Untereinheit besteht aus drei Domänen: einer FADbindenden Domäne, einer NADP<sup>+</sup>-bindenden Domäne und einer Zwischendomäne (Bild 2.3). Die FAD- und NADP<sup>+</sup>-Domänen gleichen einander und ähneln den nukleotidbindenden Domänen anderer Dehydrogenasen. FAD und NADP<sup>+</sup> werden in gestreckter Form gebunden, wobei der Isoalloxazin- und der Nicotinamidring einander benachbart sind. Interessanterweise wird die Bindungsstelle für das oxidierte Glutathion von der FAD-Domäne der einen Untereinheit und der Zwischendomäne der anderen Untereinheit gebildet.



Bild 2.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Glutathion-Reduktase. Jede Untereinheit des dimeren Enzyms besteht aus einer NADP<sup>+</sup>-Domäne, einer FAD-Domäne und einer Zwischendomäne. Das Glutathion wird an die FAD-Domäne der einen Untereinheit und die Zwischendomäne der anderen Untereinheit gebunden (Schultz et al., 1978).

Die menschliche Glutathionreduktase (hGR) ist ein homodimeres Flavoenzym, dessen Untereinheiten über eine Disulfid-Brücke verbunden sind. Jede Untereinheit enthält vier wohldefinierte Domänen und beide Untereinheiten stellen notwendige Strukturen für die beiden aktiven Zentren. hGR hält in der Zelle ein reduzierendes Milieu aufrecht (NADPH + GSSG + H<sup>+</sup>  $\rightarrow$  NADP<sup>+</sup> + 2 GSH) und es wird für das oxidative Stressmanagement benötigt. Da das monomere hGR nicht funktionsfähig ist, sollte es möglich sein, den oxidativen Stress durch Verhinderung der Dimerisation zu erhöhen. Dimerisations-Inhibitoren für hGR sind vielversprechende Wirkstoffe gegen Malaria und eine Anzahl weiterer Krankheiten. *Ab initio* Faltung und/oder Dimerisation von hGR kann durch Punktmutationen oder durch Peptide verhindert werden, die der Kontaktregion der Untereinheiten entsprechen: z.B. das synthetische Peptid P11, das der Kontakthelix H11 entspricht (436-459).

Dieses Peptid kann als ein Ausgangsprodukt für das Wirkstoffdesign eines Faltungs-Inhibitors dienen. Das Ziel war die Bestimmung der Struktur von P11 durch hochauflösende <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie.

### 2.2 Probenpräparation und Messbedingungen

Das Inhibitor-Peptid P11 (QGLGC DEMLQ GFAVA VKMGA TKAD-NH<sub>2</sub>; Molekulargewicht 2440 Da), welches den Resten 436 bis 459 bzw. 436' bis 459' der dimeren menschlichen GR entspricht, wurde von Dr. Pipcorn (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) synthetisiert und aufgereinigt.

Etwa 1,5 mg des Peptids wurden in 290 ml H<sub>2</sub>O und 10 ml D<sub>2</sub>O, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,8 mM NaN<sub>3</sub> gelöst. Als interne Referenz wurden der Probe 5 µl 0,01 mM DSS (4,4-Dimethyl-4-silapentansulfoxyd) zugesetzt. Der pH wurde mit NaOD oder DCl auf pH 3,1 bzw. pH 6,0 eingestellt und nicht auf Isotopeneffekte korrigiert. Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden an einem Bruker AMX-500 NMR Spektrometer (Feldstärke 11,7 T entsprechend  $v_0 = 500,13$  MHz) bei einer Temperatur von 283 K aufgenommen. Die H<sub>2</sub>O-Linie des Lösungsmittels wurde durch selektive Einstrahlung von 1,5 s Dauer vorgesättigt. Die Spin-System-Identifikation und sequentielle Zuordnung wurden durch zweidimensionale, homonukleare NOESY-, ROESY-, DQF-COSY- und TOCSY-Experimente erreicht. Die NOESY-Spektren (Jeener et al., 1979) wurden mit Mischzeiten von 100 ms und 300 ms aufgenommen, die z-gefilterten ROESY-Spektren (Rance et al., 1987) mit Mischzeiten von 150 ms und 200 ms. Die TOCSY-Spektren (Braunschweiler und Ernst, 1982) wurden mit einer 60 ms MLEV-16-Entkopplungssequenz (Levitt et al., 1982) und die doppelquantengefilterten (DQF-) COSY-Spektren mit der Standard-Pulssequenz von Rance et al. (1983) aufgenommen. Die phasenempfindliche Aufnahme in der  $\omega_1$ -Richtung wurde im TPPI-Modus (time proportional phase increments) nach Marion et al. (1983) durchgeführt. Zur Echounterdrückung wurde ein Paar von Spin-Lock-Pulsen mit 5 ms und 2,5 ms Dauer mit orthogonaler Phase vor dem schwachen Wasserunterdrückungspuls verwendet. Die typische Messdauer variierte zwischen 12 und 48 Stunden.

Auswertung und Prozessierung der oben beschriebenen Messungen erfolgte auf verschiedenen Computern der Firma SGI (Indy, Indigo2, O2) mit Hilfe der Programme XWINNMR (Bruker) und AURELIA (Neidig et al., 1995). Die Zuordnung der Resonanzlinien wurde entsprechend dem Standardverfahren (Wüthrich, 1986) mittels TOCSY- und DQF-COSY-Spektren zur Identifikation der Spin Systeme und NOESY-Spektren zur sequentiellen Zuordnung durchgeführt.

### 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Sequenzspezifische Zuordnung der <sup>1</sup>H-Resonanzen in H<sub>2</sub>O

Zunächst wurden 1D-NMR-Spektren von P11 in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Mit diesen Messungen können bereits sehr früh unerwünschte Peptidaggregationen (verbreiterte Resonanzlinien) oder störende Verunreinigungen erkannt werden. In den 1D-Spektren des Peptids P11 waren keine Verunreinigungen nachweisbar und die durchschnittlichen Linienbreiten von 5-7 Hz der Signale waren so gering, wie man es für nicht aggregierte monomere Peptide der Größe von P11 erwartet. Bild 2.4 zeigt ein 1D-Spektrum von P11 in H<sub>2</sub>O.



*Bild 2.4:* 1D<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum vom Kontakthelix-Peptid P11 (32k Datenpunkte, pH 3,1, Temperatur 283 K, exponentielle Filterung, SW: 16,13 ppm, NS: 16).

Mit den TOCSY- und DQF-COSY-Experimenten ließen sich alle Spinsysteme im Spektrum den entsprechenden Aminosäuren im Molekül zuordnen.

Um möglichst auch die schnellaustauschenden Aminogruppen sichtbar zu machen, wurde für die ersten Experimente eine niedrige Ionenkonzentration von pH 3,1 in Wasser und eine Temperatur von 10°C gewählt. Tabelle 2. enthält eine Auflistung aller beobachteten Resonanzlinien von P11 in  $H_2O$ .

Tabelle 2.1: <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen des hGR-Peptids P11 (436-459) bei 283K und pH 3,1.

Rest	H <sup>N</sup>	Ηα	Η <sup>β</sup>	Ηγ	Ηδ	Andere
Gln-436	а	3,94	2,03	2,33		N <sup>ε2</sup> 6,82/7,51
Gly-437	8,87	4,04				
Leu-438	8,54	4,37	1,60/1,67	1,60	0,88/0,92	
Gly-439	8,66	3,97				
Cys-440	8,31	4,51	2,91/2,96			
Asp-441	8,68	4,69	2,82/2,90			
Glu-442	8,37	4,30	1,96/2,11	2,44		
Met-443	8,36	4,44	2,51/2,59	2,00/2,07		Ηε 2,00
Leu-444	8,24	4,35	1,59/1,66	1,59	0,85/0,90	
Gln-445	8,41	4,28	1,98/2,08	2,36		$N^{\epsilon_2}$ 6,78/7,44
Gly-446	8,43	3,83/3,91				
Phe-447	8,07	4,59	3,02/3,15		$H^{\delta 1/2}$ 7,33	$H^{\epsilon_{1/2}}$ 7,22/ $H^{\zeta}$ 7,48
Ala-448	8,28	4,30	1,34			
Val-449	8,11	4,03	2,04	0,95		
Ala-450	8,42	4,33	1,37			
Val-451	8,24	4,02	2,01	0,93		
Lys-452	8,46	4,32	1,75/1,81	1,43/1,67	1,43/1,68	$H^{\epsilon}$ 2,99/ $H^{\zeta}$ 7,57
Met-453	8,57	4,48	2,56/2,64	2,03/2,11		Ηε 2,00
Gly-454	8,54	3,96				
Ala-455	8,29	4,40	1,40			
Thr-456	8,28	4,33	4,20	1,21		
Lys-457	8,49	4,30	1,78/1,84	1,44/1,69	1,43/1,68	H <sup>ε</sup> 2,99/ H <sup>ζ</sup> 7,57
Ala-458	8,50	4,28	1,38			
Asp-459	8,42	4,64	2,81/2,87			

<sup>*a*</sup> Signal nicht gefunden.

Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu DSS bestimmt.

Die Zuordnung bei pH 6 ist im Anhang 8.3 in Tabelle 8.2 wiedergegeben.

#### 2.3.2 Sequentielle Zuordnung und intramolekulare Abstände

Nach der Bestimmung der Spinsysteme wurde die sequentielle Zuordnung der im TOCSY identifizierten Aminosäuren mit einem NOESY-Spektrum durchgeführt. Dabei werden im NOESY-Spektrum alle Kreuzsignale zugeordnet. Insbesondere in der Fingerabdruckregion eines Proteins kann die Sequenzabfolge der Aminosäuren durch die Auswertung der dipolaren Kopplung zwischen den H $\alpha$ -Proton einer Aminosäure und dem Hauptketten-N-Proton der nachfolgenden Aminosäure eindeutig bestimmt werden (Bild 2.5).



Bild 2.5: Sequentieller NOE-Pfad durch die "fingerprint" Region von P11 (pH 3,1, Temperatur 283 K, 1024x1024 Datenpunkte, quadratische Sinus-Filterung, SW: 11,11 ppm, NS: 64, RG: 32).

Um die intramolekularen Abstände der Protonen von P11 zu bestimmen, wurden NOESY-Spektren in H<sub>2</sub>O bei 283 K und pH 3,1 aufgenommen. Die Mischzeiten betrugen 100 ms, 200 ms und 300 ms. Das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis zeigte das Spektrum mit 100 ms Mischzeit (Bild 2.5). Die Analyse der NOESY-Spektren ergab insgesamt 250 bestimmbare Kernabstände. Für die folgenden Molekulardynamikrech-

Die Eichung der Daten erfolgte auf ein Paar gut aufgelöster Methylenprotonen, die einen bekannten Abstand von 0,176 nm besitzen. Verbesserungen erbrachte die Rückrechnung der NOESY-Spektren mit dem kompletten Relaxations-Matrix-Formalismus mit dem Programm AURELIA. Damit konnten sowohl nicht zugeordnete, schwache Signale erkannt, als auch falsch zugeordnete Kreuzsignale korrigiert werden (Bild 2.9).

#### 2.3.3 Bestimmung des Torsionswinkels φ

Die Amid-H $\alpha$ -Kopplungskonstanten  ${}^{3}J_{NH-H}\alpha}$  sind durch Anpassen der entsprechenden DQF-COSY-Signalen an zwei Lorentzkurven mit dem Programm AURELIA bestimmt worden. Dazu wurde ein stark auflösungsverstärktes DQF-COSY-Spektrum mit hoher digitalen Auflösung verwendet (Spektrale Breite 5555 Hz, 1024\*8192 Datenpunkte in der Zeitdomäne, Sinusfilterung in t<sub>1</sub>-Richtung, Gaußfilterung in der t<sub>2</sub>-Richtung, 2048\*16384 reale Datenpunkte, Basislinienkorrektur nach Saffrich et al., 1993) Die digitale Auflösung der benutzten Daten in der Zeitdomäne in t<sub>2</sub>-Richtung betrug 1,36 Hz/Punkt und 0,68 Hz/Punkt nach der Fouriertransformation.

Viele der aus COSY Spektren bestimmten Kopplungskonstanten zwischen Amid- und  $\alpha$ -Proton, welche den durchschnittlichen Rückgrat- $\phi$ -Winkel entsprechen, haben Werte aus dem  $\alpha$ -helikalen Bereich (Bundi et al., 1979). Für  $\alpha$ -Helizes betragen die Kopplungskonstanten normalerweise weniger als 6 Hz.

Die dihedralen Winkel  $\varphi$  wurden mit der Karplus-Funktion und den Parametern von Pardi et al. (1984) berechnet (Tabelle 2.2). Zur Vermeidung der offensichtigen Mehrdeutigkeiten (Bild 1.2) wurden die  $\varphi$ -Winkel für die folgenden Molekulardynamikrechnungen mit unterschiedlichen Toleranzen nach oben und nach unten versehen: Da bei vielen Aminosäuren von P11 die zugehörigen NOE-Signale charakteristisch für eine  $\alpha$ -Helix waren, wurden bei diesen Aminosäuren die Lösung der Karplusgleichung benutzt, die einem  $\alpha$ -helikalen Winkel am nächsten kam ( $\varphi \sim -57^{\circ}$ ). Für die anderen Aminosäuren wurde der Mittelwert der berechneten Winkel mit einer entsprechend großen Toleranz angegeben. Typische Toleranzwerte waren etwa  $\pm75^{\circ}$ .

	terung prozessiert.					,
Rest	<sup>3</sup> J <sub>NHα</sub> [Hz]	φ [°]				
Gln-436	а					
Gly-437	а					
Leu-438	5,2	-68,1	-171,9	-27,5	+27,5	

Tabelle 2.2: <sup>3</sup>J<sub>HNα</sub>-Kopplungskonstanten von P11 und entsprechende dihedrale Winkel. Die Auflösung des verwendeten Spektrums betrug 0,68 Hz/Punkt. Das Spektrum wurde mit einer Gaußfilterung prozessiert.

Rest	$^{3}J_{NH\alpha}$ [Hz]	φ [°]			
Gly-439	а				
Cys-440	5,9	-73,5	-166,5	-26,5	+26,4
Asp-441	6,1	-75,1			
Glu-442	6,5	-78,2			
Met-443	4,8	-64,9			
Leu-444	5,4	-69,7			
Gln-445	5,2	-68,1			
Gly-446	a				
Phe-447	6,6	-79,0			
Ala-448	5,2	-68,1			
Val-449	5,9	-73,5			
Ala-450	5,6	-71,2			
Val-451	5,6	-71,2			
Lys-452	6,3	-76,6			
Met-453	6,3	-76,6			
Gly-454	a				
Ala-455	4,8	-64,9	-175,1	-14,1	+14,1
Thr-456	6,3	-76,6	-163,4	-27,2	+27,2
Lys-457	5,8	-72,7	-167,2	-26,4	+26,4
Ala-458	5,2	-68,1	-171,9	-27,5	+27,5
Asp-459	6,3	-76,63	-163,37	-27,2	+27,2

<sup>*a*</sup> Dieses Multiplett war entweder nicht beobachtbar oder ein unbestimmbares Glycin. Aus dem absoluten Ablesefehler der Kopplungskonstanten von 0,5 Hz ergeben sich die nicht angegebenen Winkeltoleranzen

### 2.3.4 Chemische Verschiebungen

Weitere Strukturhinweise lassen sich aus der Abweichung  $\Delta \delta H^N$  der chemischen Verschiebung der Amidprotonen von den Random-Coil Werten (Wüthrich, 1993) erhalten (Bild 2.6). Einige der Verschiebungen der Amidprotonen weichen signifikant von den Werten eines Zufalls-Knäuels ab: Die Aminosäuren Glu442 bis Val451 sind signifikant hochfeldverschoben. Das Abweichungsmuster weist auf helikale Sekundärstrukturelemente in diesem Abschnitt hin (Wishard et al., 1995). Aufgrund der geringeren Möglichkeit der endständigen Aminosäuren, Kontakte auszubilden, erwartet man hier keine definierte Sekundärstruktur, sondern eher flexible Enden. Dies zeigt sich ebenfalls im chemischen Verschiebungsdiagramm.



Bild 2.6: Abweichung der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen von den statistischen Knäuel Werten.  $\Delta \delta H^N$  stehen für die Differenz der experimentell bestimmten chemischen Verschiebung der Amidprotonen zu den statistischen Knäuel Werten von Wishart et al., (1995). Die Messungen erfolgten bei 283 K und pH 3,1.

#### 2.3.5 H/D - Austauschraten

Verringerte H/D-Austauschraten der Amid-Protonen sind charakteristische Merkmale für Wasserstoffbrücken. Bei einigen der beobachteten Aminosäuren ist das Verhältnis  $f_s$  (Verlangsamungsfaktor, Kapitel 1.2.6) der theoretisch zu erwartenden Austauschrate  $k_{theo}$  (Bai et al., 1993) zu der experimentell bestimmten Austauschrate  $k_{exp}$  deutlich größer als 1. Dies weist auf eine interne Wasserstoffbrücke hin (Tabelle 2.3).

Die H/D-Austauschraten wurden aus einer Reihe von sehr kurzen TOCSY-Spektren unmittelbar nach dem Lösen des protonierten Peptids in reinem D<sub>2</sub>O (Deuterierungsgrad 99.85%, Merck) bestimmt (256\*4096 Datenpunkte, NS: 1, Messdauer ca. 9 min). Zur Bestimmung der Austauschraten passt man die Linienintensität I<sub>j</sub> der Amid-H $\alpha$ -Kreuzsignale j in einer Reihe von TOCSY-Spektren in Abhängigkeit der Zeit an eine Gleichung pseudoerster Ordnung an

$$I_{i}(t) = I_{i}(t=0) \cdot \exp(-k_{i}t)$$
(2.1)
und korrigiert den erhaltenen Wert auf pH, Temperatur, Ionenstärke, Isotopen und benachbarte Seitenketten.

Eine zusammenfassende Darstellung der aus den NMR-Daten gewonnenen Ergebnisse zeigt die Sekundärstrukturkarte des Interfacepeptids P11 (Bild 2.7).

Tabelle 2.3:Experimentelle  $(k_{exp})$  und theoretische  $(k_{theo})$  H/D-Austauschraten von P11 bei pH 3,2 und<br/>283 K. Die theoretischen Raten sind für pH, Temperatur, Ionenstärke und Seitenkettenef-<br/>fekte korrigiert. Die Fehler in  $k_{exp}$  sind durch den exponentiellen Fit der Daten abgeschätzt;<br/>die Fehler in  $k_{theo}$  wurden durch einen abgeschätzten Fehler von  $\pm 1K$  für die Temperatur<br/>und  $\pm 0,1$  Einheiten für den pH erhalten.

Rest	$k_{exp} (10^{-2}/sec)$	$k_{theo}$ (10 <sup>-2</sup> /sec)	$f_s = k_{theo}/k_{exp}$
Gln-436	а		
Gly-437	а		
Leu-438	8,8 (±0,9)	5,6 (±1,4)	0,6
Gly-439	4,5 (±0,5)	12,5 (±3,1)	2,7
Cys-440	а		
Asp-441	а		
Glu-442	а		
Met-443	3,7 (±0,4)	5,4 (±1,4)	1,5
Leu-444	1,6 (±0,2)	5,6 (±1,4)	3,5
Gln-445	2,8 (±0,3)	12,5 (±3,1)	4,4
Gly-446	3,8 (±0,4)	12,3 (±3,1)	3,2
Phe-447	3,8 (±0,4)	9,9 (±2,5)	2,6
Ala-448	а		
Val-449	0,9 (±0,1)	4,9 (±1,2)	5,4
Ala-450	а		
Val-451	0,7 (±0,1)	4,5 (±1,1)	6,4
Lys-452	3,3 (±0,3)	5,7 (±1,4)	1,7
Met-453	3,6 (±0,4)	5,6 (±1,4)	1,6
Gly-454	11,0 (±1,1)	12,3 (±1,4)	1,1
Ala-455	а		
Thr-456	4,2 (±0,4)	4,4 (±1,1)	1,0
Lys-457	8,2 (±0,8)	5,8 (±1,5)	0,7
Ala-458	8,8 (±0,9)	12,5 (±3,1)	1,4
Asp-459	а		

<sup>*a*</sup> Die Austauschraten für diese Aminosäuren konnten mit dieser Methode nicht ermittelt werden, da die beobachteten Amidprotonen schon im ersten TOCSY-Spektrum der Serie bereits ausgetauscht waren.



Bild 2.7: Sekundärstrukturkarte des hGR Inhibitors P11.

Die ausgefüllten Kreise in der ersten Reihe stehen für die Aminosäuren, deren Amid-H $\alpha$ -Kopplungskonstante <sup>3</sup>J<sub>NH-H $\alpha$ </sub> kleiner als 6 Hz ist. Die Stärke der sequentiellen H $\alpha$ (i)-HN(i+1) NOEs  $d_{\alpha N}$ , des sequentiellen H $\beta$ (i)-HN(i+1) NOEs  $d_{\beta N}$  und des sequentiellen HN(i)-HN(i+1) (oder  $H\delta(i)-HN(i+1)$  für Prolyl-Peptidbindungen) NOEs d<sub>NN</sub> wird durch die Dicke der Balken angezeigt (Dick: 1,8-2,3 Å, mittel: 2,3-3,5 Å, dünn: > 3,5 Å). Die NOE-Kontakte mittlerer Reichweite zwischen den Aminosäuren i und i+2, i+3 und i+4, die typisch für eine helikale Struktur sind, sind durch dünne Linien dargestellt (vgl. Bild 1.3).. Es wurden nur solche NOEs gezeigt, deren Kreuzsignale aus überlagerungsfreien Regionen des Spektrums stammen. Die gefüllten Kreise in der unteren Reihe zeigen die Aminosäuren, deren experimentelle H/D-Austauschraten signifikant kleiner als die theoretisch erwarteten waren. Dies erwartet man insbesondere bei einer helikalen Struktur. Der unterste Graph zeigt die Differenz  $\Delta\delta H^{\alpha}$  der experimentell bestimmten H $\alpha$ chemischen Verschiebungen zu den Referenzwerten eines ungeordneten Peptids an (Wishart et al 1995). Die besonders zwischen Aminosäure 442 und 451 sichtbare Hochfeldverschiebung bestätigt eine helikale Struktur dieses Abschnitts. Alle diese Informationen deuten auf eine weitgehend helikale Struktur des Peptids P11 hin.

#### 2.3.6 Molekulardynamik - Rechnungen

Nachdem es in den vorangegangenen Abschnitten aus den einzelnen NMR-Ergebnissen erste deutliche Hinweise auf eine  $\alpha$ -helikale Struktur des Peptids P11 gab, wurden mit

den gewonnenen Abstands- und Winkelinformationen (Anhang 8.4.1 und 8.4.3) MD-Simulationen durchgeführt. Alle Simulationen wurden mit dem Programm X-PLOR 3.1 (Brünger, 1993) auf einer SGI Origin 2000 mit 16 CPUs (R10k, 195 MHz) und 4 GByte RAM ausgeführt. Zur Visualisierung der Peptide dienten verschiedene Programme auf einer SGI Workstation (Indy, INDIGO2, O2): Mit MOLMOL (Koradi, 1996) wurden die Strukturen dargestellt und einer Sekundärstrukturanalyse nach Kabsch-Sander (Kabsch et al., 1983) unterzogen. Ebenso wurden mit diesem Programm Wasserstoffbrücken bestimmt. Die erhaltenen Strukturen wurden mit dem Programm PROCHECK (Morris et al., 1992) auf korrekte Stereochemie überprüft (Bild 2.8). Die endgültige Visualisierung erfolgte mit InsightII (Molecular Simulations Inc.).



Bild 2.8: Mit PROCHECK erstellter Ramachandran-Plot (Ramachandran et al., 1963) für die energetisch günstigste Struktur von P11. Fast alle Aminosäuren (schwarze Markierungen) liegen in den drei roten Regionen (A,B,L). Dies ist nur bei kompakt gefalteten Proteinen der Fall.

Als Startstrukturen wurden mit X-PLOR 50 Zufallsstrukturen erzeugt. Zunächst wurde, wie in Kapitel 1.2.7 beschrieben, das Simulated-Annealing-Protokoll angewandt (Kirkpatrick, 1983). Nach einer Phase hoher Temperatur zum Ausheizen struktureller Defekte wurden die Strukturen langsam abgekühlt. Dabei wurden nur die Abstandsinformationen berücksichtigt. Die so erhaltenen Strukturen wurden in weiteren

Berechnungszyklen weiter verfeinert. Dabei wurden nun auch die Winkelinformationen eingebunden. Die Strukturen wurden über 2000 Schritte Energie-minimiert, für 20 ps bei Raumtemperatur weiter verfeinert (Restrained MD; Kaptain, 1985) und nochmals über 2000 Schritte Energie-minimiert. Danach waren keine Abstands- oder Winkelverletzungen vorhanden. Die Energie der 10 besten Strukturen wurde abschließend mittels der kompletten empirischen Energie-Funktion weiter bis auf 13,9 kJ/mol im Durchschnitt minimiert. Die Standardabweichung (RMSD) der Zentralkettenatome (N, C $\alpha$ , C) im helikalen Bereich (Cyc440-Gly454) betrug nur 49 pm und über die Gesamtsequenz 189 pm.



Bild 2.9: Ausschnitt der NH-NH-Region aus einem rückgerechneten NOESY-Spektrum von P11. Die aus der dreidimensionalen Struktur berechneten Signale sind als kleine Kreise mit Beschriftung auf dem originalen Spektrum eingeblendet. Die Lage und Zuordnung der Signale ist mit den experimentellen Signalen identisch.



Bild 2.10: Überlagerung der 10 energieärmsten Strukturen (grün) mit der hGR Kristallstruktur(gelb). Deutlich ist die klar definierte α-Helix im mittleren Abschnitt zu erkennen, die mit der Proteinstruktur sehr gut übereinstimmt. Die Enden der Peptid-Strukturen sind erwartungsgemäß flexibel. In Orange sind die stark konservierten Aminosäuren markiert.

Zur Überprüfung der berechneten Strukturen wurden am Ende der Molekulardynamik-Berechnungen aus den gewonnenen Strukturdaten mit dem Programmpaket AURELIA (Fa. Bruker; Goerler, 1996) NMR-Spektren zurückgerechnet. Dabei wird direkt auf dem experimentellen Spektrum die Lage der zur Struktur berechneten NMR-Signale eingeblendet. Wie in dem Bild 2.9 deutlich zu sehen ist, liegen die rückgerechneten Signale (kleine Kreise mit Beschriftung) exakt auf den experimentellen Signalen. Durch dieses Verfahren lassen sich schnell Fehler in der Zuordnungen der Signale erkennen und iterativ beheben. Die experimentellen Signale, denen kein errechnetes Signal zugeordnet ist, sind überwiegend schwache Rauschsignale.

Außerdem wurden die berechneten Strukturen mit dem Programm PROCHECK analysiert. Dabei werden insbesondere die dihedralen Winkel und die Hauptkettenstrukturparameter auf korrekte Stereochemie überprüft. Alle finalen Strukturen erfüllten die Kriterien.

## 2.4 Diskussion

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des Peptides P11 in wässriger Lösung sind durch kleine, aber signifikante Änderungen der chemischen Verschiebungen charakterisiert, wie sie für gefaltete Peptide typisch sind. Eine qualitative Analyse der NOEs, der J-Kopplungskonstanten, der chemischen Verschiebung und der H/D-Austauschraten zeigen, dass das Peptid eine wohldefinierte Struktur ausbildet. Die MD-Rechnungen der dreidimensionalen Struktur bestätigen diese qualitativen Ergebnisse: Die zehn energieärmsten Strukturen ohne Abstands- oder Winkelverletzungen zeigen eine α-Helix von Cys440 bis Met453. Die Standardabweichung der Rückgrat Atome (N, C $\alpha$ , C) ist mit 0,05 nm recht klein und steigt nur um 0,01 nm, wenn anziehende "non-bonded" Kraftfelder in der MD-Rechnung berücksichtigt werden. Ein vergleichbares Ergebnis zeigt die Standardabweichung von allen Atomen im helikalen Teil des Peptides. Sie beträgt 0,19 nm unabhängig von der Anwesenheit eines anziehenden Potentials (durchschnittliche minimale Energie: -70 kJmol<sup>-1</sup>). Für ein Amidproton eines Polypeptides, das eine Wasserstoffbrücke bildet, erwartet man eine kleinere H/D-Austauschrate. Bei einer regelmäßigen α-Helix erwartet man Wasserstoffbrücken zwischen der Carbonyl-Gruppe der Aminosäure i und des Amidprotons von Aminosäure i+4. Aus den berechneten Strukturen konnten langsame Austauschraten für die Amidprotonen von Leu444 bis Met453 vorhergesagt werden. Die experimentell bestimmten H/D-Austauschraten passen sehr gut zu dieser Vorhersage. Mit Ausnahme von Ala448 und Ala450 sind bei allen anderen Aminosäuren in diesem Bereich die experimentellen Raten mehr als dreimal so langsam als die Austauschraten für nicht gebundene Amidprotonen in Wasser. Interessanterweise bilden in den berechneten Strukturen Ala448 und Ala450 keine (starken) Wasserstoffbrücken, während die restlichen Amidprotonen der 10 energieärmsten Strukturen in diesem Bereich alle Wasserstoffbrücken zeigen.

Die Struktur von Peptid P11 in Lösung ist überraschenderweise sehr ähnlich zu seiner Struktur im intakten Protein. Die dreidimensionale Röntgenkristallstruktur (Thieme et al., 1981) ist in sehr guter Übereinstimmung mit der Mehrzahl der experimentellen Abstände und Winkel, die an dem Peptid in Lösung bestimmt wurden. Von den 26 NOE-Verletzungen befinden sich nur drei innerhalb des Rückgrats, alle anderen betreffen nur Seitenkettenatome, deren Position üblicherweise in Lösung nur schlecht definiert ist. Insbesondere ist der helikale Teil des Peptides in Lösung sehr stark konserviert. Nur der N-terminale Teil der Helix (zwischen Aminosäure 442 und 445) zeigt eine signifikant andere Struktur in Lösung. Die Analyse der Kristallstruktur mit dem Programm XPLOR zeigt die Ursache: Als ein isoliertes Peptid ist dieser Teil der Struktur energetisch nicht optimal. Seine Struktur wird wahrscheinlich durch Wechselwirkungen mit dem Rest des Proteins stabilisiert. In Lösung tritt dieser Effekt nicht auf und es bildet sich die beobachtete Struktur aus.

Die 10 energieärmsten Strukturen wurden in der Protein Data Bank hinterlegt (PDB, http://www.rcdb.org/pdb/; PDB ID: 1ALG) und die Ergebnisse der Strukturanalyse veröffentlicht (Nordhoff A, Tziatzios C, van den Broek JA, Schott MK, Kalbitzer HR, Becker K, Schubert D und Schirmer RH (1997) *Eur. J. Biochem* **245**, 273-282).

# 2.5 Ausblick

Oligomere Enzyme können sehr spezifisch gehemmt werden, indem man verhindert, dass sich die Monomere zu einer funktionsfähigen Quartär-Struktur verbinden. Diese Art der Hemmung wurde sehr intensiv an dimeren, viralen Enzymen untersucht (Divita et al., 1994; Liuzzi et al., 1994). Ein Grund für die Untersuchungen an viralen Proteinen ist die Tatsache, dass das Monomer/Dimer-Gleichgewicht die Existenz von Monomeren erlaubt (Darke, 1994). Im Gegensatz dazu ist die Bindung der beiden Untereinheiten der hGR sehr stark. Diese Stabilität von hGR als Dimer kann man durch die große Kontakt-fläche erklären, die 15% der Oberfläche jeder Untereinheit belegt.

Für Dimere, wie z.B. die HIV-1 Protease, kann man Dimerisationshemmer als dissoziative Substanzen ansehen (Zhang et al., 1991), für Dimere vom hGR Typ sind die besten Dimerisations-Inhibitoren solche Substanzen, die die Faltung und/oder Assoziation verhindern.

Ein vielversprechender Inhibitor dieses Typs ist das Peptid P11, das den Aminosäuren 436-459 der nativen, menschlichen Glutathionreduktase entspricht. NMR-spektroskopische Untersuchungen dieses Inhibitor Peptids P11 zeigen, dass es eine he-likale Struktur in Lösung aufweist, die sehr ähnlich zu der Struktur des intakten Proteins ist. Dieser starke Zwang, eine Helix auszubilden, könnte seine herausragende Rolle als Keimzelle der hGR-Faltung erklären.

Mit dem Peptid P11 als Ausgangsprodukt, das der Kontakthelix H11 entspricht, könnte es möglich sein, Peptid-ähnliche Inhibitoren für die GR zu entwickeln. Wie schon für eine Vielzahl von dimeren, viralen Enzymen gezeigt, sind Faltungs- und Assoziationshemmer aufgrund ihrer Spezifizität gut zum Wirkstoff-Design geeignet. Sie wirken schon in sub-stöchiometrischer Menge, weil sie die ungefalteten Monomere *in vivo* blockieren. Da das Ziel die Entwicklung von Substanzen für die Chemotherapie von parasitären Erkrankungen ist, werden in Zukunft zu hGR ähnliche Enzyme, wie z.B. menschliche Thioredoxinreduktase, *Trypanosoma cruzi* Trypanothionreduktase und die GR des Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* in diese Untersuchungen einbezogen werden. Die zu P11 von hGR äquivalenten Sequenzen sind unterschiedlich genug, so dass spezifische Inhibitoren für die individuellen Enzyme möglich sein sollten. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen an dem isolierten Inhibitor Peptid zeigen, dass es in Lösung eine geordnete helikale Struktur aufweist, die ähnlich zu der Struktur der intakten Protein Kontaktstelle ist. Kleine Änderungen seiner Struktur können zur Entwicklung besserer Peptide führen. Dies ist das Ziel für weitere Experimente in der Zukunft.

# 3 Ionenkanäle

# 3.1 Vorkommen und Funktion

Die Verarbeitung von Reizen im Nervensystem kann in zwei Arten unterteilt werden: Die interzelluläre Kommunikation (Reizleitung an Synapsen) und die intrazelluläre Kommunikation (Reizleitung im Nerv). Sie spielen eine wesentliche Rolle in der neuronalen Kommunikation. So gibt es in allen Lebewesen z.B. Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- oder Cl<sup>-</sup>spezifische Ionenkanäle.

Synapsen sind spezielle Kontaktflächen, an denen Nervenzellen mit anderen Zellen kommunizieren. Sie nutzen dazu chemische Botenstoffe (Neurotransmitter). Diese binden an zugeordneten Rezeptoren auf der postsynaptischen Seite, wodurch ein Ionendurchtritt durch die Membran der postsynaptischen Zelle ermöglicht wird (Hille und Seeburg, 1995). Diese Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle. Der Durchtritt der Ionen erzeugt in der postsynaptischen Zelle ein neues elektrisches Signal, das sich an der Zellmembran fortpflanzt.

Bei der elektrischen Kommunikation werden solche Änderungen des Membranpotentials dazu benutzt, um einen Reiz innerhalb einer Nervenzelle weiterzuleiten. Zentrale Komponenten dieser Reizleitung sind spannungsabhängige Ionenkanäle, deren Öffnungszustand über eine Änderung des Membranpotentials reguliert wird.

## 3.1.1 Eigenschaften von spannungsgesteuerten Ionenkanälen

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle (Keynes, 1992) sind verantwortlich für die Erzeugung und Weiterleitung von elektrischen Signalen an Zellmembranen. Die spannungsgesteuerten Ionenkanäle sind Transmembranproteine, die in einem offenen und geschlossenen Zustand vorliegen können. Eine Depolarisation der Membran führt zu einer Öffnung der Ionenkanäle und - je nach Ionenselektivität des Kanals - zu einer Änderung der Permeabilität für Kalium- (K<sup>+</sup>), Natrium- (Na<sup>+</sup>), Chlorid- (Cl<sup>-</sup>) oder Kalzium- (Ca<sup>2+</sup>) Ionen. Der Durchtritt der Ionen erzeugt ein elektrisches Signal, das sich an der Membran der Zelle fortpflanzt.

Es lassen sich zwei Phasen der Permeabilitätsänderung unterscheiden: Die Depolarisation führt zunächst zu einer Erhöhung der Ionenpermeabilität für K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> oder Ca<sup>2+</sup>. Dies erfolgt in einem Zeitbereich von 0,5 bis mehreren hundert Millisekunden. In einem Zeitbereich von 2 ms bis einigen Sekunden fällt die Permeabilität dann wieder auf den Ausgangszustand zurück (Bild 3.1).

Der Funktionszustand der Ionenkanäle wird durch die Prozesse der Aktivierung und Inaktivierung bestimmt:

Der Prozess der *Aktivierung* bestimmt Zeitdauer, Größe und Spannungsabhängigkeit der Permeabilitätserhöhung.

Der Prozess der *Inaktivierung* bestimmt die Geschwindigkeit und die Spannungsabhängigkeit, mit der die Rückkehr zum Ruhezustand erfolgt.



Bild 3.1: Zeitlicher Verlauf eines Aktionspotentials und der Permeabilitätsänderung für K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Kanäle.

Damit lassen sich drei Zustände eines Ionenkanals angeben, nämlich Ruhezustand, aktivierter Zustand und inaktivierter Zustand. Nur der aktivierte Zustand ist leitend, im Ruhezustand und im inaktivierten Zustand ist der Ionenkanal geschlossen. Für eine erneute Öffnung muss der Ionenkanal vom inaktivierten Zustand in den Ruhezustand übergehen.

#### 3.1.2 Struktur von spannungsgesteuerten K<sup>+</sup>-Ionenkanälen

Die bisher bekannten spannungsgesteuerten  $Na^+$ -,  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ - Ionenkanäle besitzen jeweils eine sehr ähnliche Gesamtstruktur (Catterall, 1995). Dies erlaubt die Einteilung der drei Kanäle in drei Gruppen. Jede dieser Kanalgruppen umfasst verschiedene Mitglieder, die sich in strukturellen Details, in den Poreneigenschaften und der Regulierbarkeit unterscheiden.

Generell sind die spannungsgesteuerten K<sup>+</sup>-Ionenkanäle aus mehreren Untereinheiten aufgebaut. Die Ionenpore wird von der großen  $\alpha$ -Untereinheit gebildet, während die anderen Untereinheiten einen modulierenden bzw. verstärkenden Einfluss auf die Porenfunktion der großen Untereinheit haben. In den  $\alpha$ -Untereinheiten finden sich Transmembrandomänen (Bild 3.2), die meist aus  $\alpha$ -Helices bestehen. Diese Transmembranhelices sind ein dominantes Sekundärstrukturelement in allen bekannten Membranproteinen (Kühlbrand et al, 1994; Deisendorfer et al, 1995, Iwata et al, 1995, Henderson et al., 1990). Der extrazellulär lokalisierte Teil der Untereinheiten ist häufig glykosyliert, und die intrazellulär lokalisierten Strukturanteile besitzen regulatorische Phosphorylierungsstellen. In der Regel sind die großen Untereinheiten alleine imstande, eine Ionenpore zu bilden. Die große  $\alpha$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kaliumkanals besitzt eine homologe Domäne, die jeweils sechs potentielle Transmembranhelices aufweist, sowie zwei zytoplasmatische Einheiten, die vom N- und C-Terminus gebildet werden. Durch die Assoziation von je vier dieser Proteine (Tetramer) wird ein funktionsfähiger K<sup>+</sup>-Kanal gebildet.

Die assoziierte  $\beta$ -Untereinheit hat vielfach eine stabilisierende Wirkung auf die von der großen Untereinheit gebildeten Pore. Sie bestimmt in hohem Maße das kinetische Verhalten des Kanals bei Aktivierung und Deaktivierung der Pore. Darüber hinaus weisen die assoziierten Untereinheiten auch Phosphorylierungsstellen auf, und es wird angenommen, dass sie über diese regulierend auf die Porenfunktion einwirken können.

Hochaufgelöste Strukturinformationen zu den spannungsgesteuerten Ionenkanälen liegen erst seit kurzem vor (Doyle et al., 1998), so dass die bisherigen Strukturvorstellungen (Guy et al., 1994) vor allem auf Untersuchungen an gezielt mutierten Ionenkanälen (MacKinnon, 1995) und auf Inhibitorstudien (Aiyar et al., 1995; Stampe et al., 1993) beruhten. Dabei konnte man z.B. durch Bindungsuntersuchungen mit Toxinen die Porendimensionen sehr genau bestimmen und die Kanalstruktur modellieren.

Die Vorstellungen zur Struktur der Ionenpore gehen davon aus, dass die Wandung von den vier Domänen gebildet wird. Die in den vier Domänen enthaltenen Strukturelemente müssen deshalb für die wichtigsten, nur auf Indizien beruhenden Erklärungen der Eigenschaften der Ionenkanäle wie spannungsgesteuerte Öffnung, Ionendurchtritt, Ionenselektivität sowie für die Deaktivierung verantwortlich sein.

#### 3.1.3 Aktivierung der spannungsgesteuerten Kanäle

Nach allgemeiner Überzeugung wird die Aktivierung der Ionenkanäle durch eine spannungsinduzierte Konformationsumwandlung verursacht, die eine Transmembranpore öffnet (Hille, 1992). Es wird angenommen, dass der Ionenkanal ein Strukturelement enthält, das Änderungen des elektrischen Felds registrieren kann. Diesem Strukturelement wird die Funktion eines Spannungssensors zugeschrieben, der aufgrund der Depolarisation eine Kraft erfährt, wodurch seine Konformation und/oder Position relativ zur Membran geändert wird.

Der Spannungssensor enthält geladene Aminosäuren, deren Ladungen sich bei der Depolarisation im elektrischen Feld der Membran bewegen und einen Öffnungsstrom (gating current) verursachen. Ein solcher Öffnungsstrom lässt sich in Form einer auswärts gerichteten Bewegung von positiven Ladungen experimentell nachweisen, die zeitlich vor dem Durchtritt der Ionen erfolgt.

Primärstrukturanalysen sowie gezielter Austausch von Aminosäuren haben zu der Vorhersage geführt, dass die Transmembranhelix S4 den Spannungssensor darstellt (Bild 3.2). Die S4-Helix enthält ein sich wiederholendes Motiv einer positiv geladenen Aminosäure und zweier hydrophober Aminosäuren. Die positiven Ladungen werden als Träger des auswärts gerichteten Öffnungsstroms angesehen. Man nimmt an, dass die positiven Ladungen im geschlossenen und offenen Zustand durch negative Ladungen in unterschiedlicher Weise angeordnet werden.



Bild 3.2: Topologie spannungsgesteuerter Ionenkanäle. Links: Die verschiedenen Untereinheiten der K<sup>+</sup>-Kanäle in schematischer Form. Gezeigt sind auch regulatorische Phosphorylierungsstellen (P) im zytoplasmatischen Teil sowie Glykosylierungsstellen ( $\Psi$ ) im extrazellulären Teil des Ionenkanals. Die gestrichelte Linie deutet die Kanalpore an. Rechts: Die Zylinder repräsentieren die vermutete  $\alpha$ -helikale Struktur der Transmembranelemente Die homologen  $\alpha$ -Domänen der spannungsgesteuerten Ionenkanäle sind aus sechs Transmembranelementen (S1-S6) aufgebaut, welche die Membran in  $\alpha$ -helikaler Form durchqueren. Die S4-Helix ist vermutlich der Spannungssensor, von dem Segment H5 wird angenommen, dass es die Wandung der Ionenpore bilden. (Catterall, 1995)

Der genaue Mechanismus, nach dem die Depolarisation zu einer Bewegung des Spannungssensors führt, ist nicht bekannt. Diskutiert wird zum einen ein einfaches Modell, nach dem sich die S4-Helix bei der Öffnung um eine Helixwindung nach außen dreht und so zum Auswärtstransport von 1-2 Ladungen je Helix führt. Ein komplexeres Modell geht von einer Konformationsumwandlung der S4-Helix aus, bei der der Auswärtstransport der Ladungen mit der Umwandlung einer  $\alpha$ -Helix in eine  $\beta$ -Faltblattstruktur verknüpft ist.

#### 3.1.4 Die Kanalpore

Alle Strukturmodelle der spannungsgesteuerten Ionenkanäle zeigen, dass die Porenwandung von Strukturanteilen der vier homologen Domänen gebildet wird. Informationen über die Sequenzabschnitte der Domänen, welche die Porenwandung auskleiden, sind im Hinblick auf den Mechanismus des Ionendurchtritts und der Ionenselektivität von großem Interesse. Infolge des Mangels direkter Strukturinformationen wurden bisher vor allem Bindungsstudien von Ionenkanal-blockierenden Substanzen dazu benutzt, um die Aminosäuren zu identifizieren, die an der Bildung der Porenwandung beteiligt sind.

Durch Bindungsstudien mit Toxinen von der extrazellulären Seite aus konnte man ein Strukturelement identifizieren, das als H5-Segment bezeichnet wird (Bild 3.2). In diesem Segment wurden Aminosäuren identifiziert, die sowohl für den Ionendurchtritt als auch für die Ionenselektivität eine wichtige Rolle spielen. Bindungsstudien mit Pharmaka, die von der intrazellulären Seite aus an den Ionenkanal binden, haben ebenfalls Bereiche des H5-Segments als Teil der inneren Pore identifiziert. Darüber hinaus sind auch Aminosäurereste der S6-Helix an der Bildung der Porenmündung der zytosolischen Seite beteiligt.

#### 3.1.5 Inaktivierung spannungsgesteuerter K<sup>+</sup>-Kanä1e

Nach der Aktivierung und Öffnung des Ionenkanals geht dieser in einen inaktiven Zustand über. Für die Zeitdauer der Inaktivierung, die einige Millisekunden bis zu mehreren Sekunden betragen kann, ist der Ionenkanal geschlossen und kann nicht erneut geöffnet werden.

Ein Modell, das den schnellen Inaktivierungsprozess bei K<sup>+</sup>-Kanälen beschreibt, ist derzeit allgemein akzeptiert und experimentell gut abgesichert. Das Modell postuliert Konformationsänderungen, bei denen sich flexible Strukturelemente der  $\beta$ -Untereinheit von der intrazellulären Seite aus in die Mündung der Pore einlagern und diese kurzzeitig blockieren (Bild 3.3).



Bild 3.3: Modell der Inaktivierung von spannungsgesteuerten K<sup>+</sup>-Kanälen.. Das Modell geht davon aus, dass sich ein kompakter Strukturanteil des C-Terminus der β-Untereinheit in die Pore einlagert und sie transient verschließt. Der inaktivierende Strukturanteil (ball) ist über ein flexibles Strukturelement (chain) mit der Pore verbunden und enthält funktionell wichtige Reste mit einer Häufung positiver Ladungen. I-IV symbolisiert die vier Unterinheiten des Ionenkanals (Catterall, 1995).

#### 3.1.6 "Ball and Chain" Model:

Der molekulare Mechanismus der schnellen Inaktivierung der sogenannten "A-Typ"-Kanäle wurde zuerst am *Shaker*-Kanal von *Drosophila melanogaster* untersucht (Timpe et al., 1988; Pongs et al., 1988). Die verschiedenen *Shaker* K<sup>+</sup>-Kanal Subtypen stammen von dem selben Gen, dass unterschiedlich gespliced wurde, um verschiedene N- und Cterminale Varianten mit funktionellen Unterschieden zu erzeugen. Diese *Shaker*-Fliegenmutanten schütteln sich aufgrund eines defekten Kaliumkanals. Dieser bewirkt, dass die Neuronen nach dem feuern schlecht repolarisieren. Schnell inaktivierende Shaker-Kanäle haben eine spezielle N-terminale Domäne, die bei den langsam inaktivierenden Varianten fehlt (Timpe et al., 1988; Iverson et al., 1988). Diesem N-terminaler Sequenzabschnitt wird eine autoinhibitorische Funktion zugesprochen. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung von Inside-Out-Patches mit Trypsin und Löschung einzelner Aminosäuren bzw. Punkt-Mutationen in dieser Domäne die schnelle Inaktivierung zerstören können (Hoshi et al., 1990). Es ist auch möglich, dass die schnelle Inaktivierung auf einen nicht-inaktivierenden Kalium-Kanal eines Säugetiers übertragen werden kann, indem man dessen N-Terminus mit dem eines schnell inaktivierenden Shaker-Kanals austauscht (Stocker et al., 1991). In einer genaueren Struktur-Funktion-Untersuchung war es möglich, zwei funktionelle Domänen im N-Terminus von Shaker-Kanälen zu bestimmen. Die erste ist eine N-terminale Domäne von 21 Aminosäuren Länge, von der man annimmt, dass sie sich an die offene Mündung der Pore anlagert und diese verschließt (inaktivierende Ball-Domäne). Nach der Entfernung der N-terminalen Aminosäuren zeigen die Kanäle zwar eine normale Aktivierungsphase, jedoch können diese Kanäle nicht mehr inaktivieren. Gibt man im Gegensatz dazu zu diesen beschnittenen Kanälen Peptide, die den N-terminalen Aminosäuren des abgetrennten Balls entsprechen, so sind die Kanäle wieder fähig zu inaktivieren (Hoshi et al., 1990). Die zweite Domäne hat eine längere Sequenz von ca. 70 Aminosäuren, welche den Inaktivierungsball an das erste Transmembransegment der Pore bindet und "Chain-Domäne" genannt wird. Dem anschaulichen "Ball-and-Chain-Modell" entsprechend erhöht sich die Dauer der Kanalöffnung bei Mutanten mit verlängerter Kettensequenz und sie erniedrigt sich bei verkürzten Mutanten (Thompson et al., 1980, Hoshi et al., 1990). Auch wenn die Shaker-Inaktivierungs-Domäne als synthetisches Peptid in mikromolarer Lösung zu der zytoplasmatischen Seite nicht-inaktivierender Shaker-K<sup>+</sup>-Kanäle zugeführt wird, wird die Inaktivierung wieder hergestellt (Zagota et al., 1990).

Dies zeigt, dass die Ball-Domäne eine eigenständige Proteinstruktur aufweist, welche unabhängig von der Chain-Domäne mit den Kanalporen von spannungsgesteuerten  $K^+$ -Kanälen interagiert. Die Sequenz der Inaktivierungsdomäne umfasst einen hydrophilen Teil, der verschiedene positive Ladungen trägt und einen hydrophoben Teil. Durch Mutationsexperimente konnte gezeigt werden, dass die positiven Ladungen sehr wichtig für die elektrostatische Anziehung des Inaktivierungsballs sind und der hydrophobe Bereich die Bindungsaffinität zur Porenöffnung des Kanals vermittelt (Murrell-Lagnado und Aldrich, 1993a; Murrell-Lagnado und Aldrich, 1993b).

# 4 Strukturuntersuchungen am Shaker-Ballpeptid

# 4.1 Hintergrund

Bisher wurden die Gene von drei verschiedenen Typen von schnell inaktivierenden K<sup>+</sup>-Kanälen in Säugetieren entdeckt (Stühmer et al., 1989; Schröter et al., 1991; Pak et al., 1991): RCK4, Raw3 und mSha1. Zusätzlich fand man, dass die  $\beta$ -Untereinheit der K<sup>+</sup>-Kanäle eine schnelle Inaktivierung verursacht, sobald sie mit der  $\alpha$ -Untereinheit von nicht-inaktivierenden K<sup>+</sup>-Kanälen koexprimiert wird (Rettig et al., 1994). Analog zu den *Shaker* K<sup>+</sup>-Kanälen nimmt man ebenso einen Inaktivationsmechanismus mit einer Ball- und einer Chain-Domäne für die schnell inaktivierenden A-Typ K<sup>+</sup>-Kanäle an.

Für Raw3 wurde der Effekt einer Deletion der N-terminalen 28 Aminosäuren getestet. Dies führte zu einem vom nicht-inaktivierenden Raw2-Kanal nicht zu unterscheidenden Phänotyp (Rettig et al., 1992). Weiterhin untersuchte man das Inaktivierungspotential von Peptiden aus den N-terminalen 28 Aminosäure der Raw3-Sequenz und 37 Aminosäure der RCK4-Sequenz und verglich es mit den entsprechenden Peptiden von *Shaker* (Ruppersberg et al., 1991b). Das Ergebnis dieser Experimente war, dass die Peptide der Säugetier-K<sup>+</sup>-Kanäle viel potenter waren als das Peptid des *Shaker*-Kanals. Obwohl diese Peptide funktionell sehr ähnlich und an dem gleichen Rezeptor aktiv sind, zeigen sie dennoch keine Sequenzhomologie außer einem Sequenzmotiv zur Wechselwirkung mit Glutathion in RCK4 und Raw3 (Rupperberg et al., 1991a).

Die dreidimensionale Strukturbestimmung der Ballpeptide von RCK4 und Raw3 (Antz et al., 1997) zeigte, dass der Inaktivierungsball von Raw3 eine kompakt gefaltete Struktur aufweist und dass der Inaktivierungsball von RCK4 ein wohldefiniertes Helix-Turn-Motiv zusätzlich zu einer unstrukturierten N-terminalen Region aufweist.

Die Untersuchungen zum *Shaker*-Ballpeptid in dieser Arbeit hatten zum Ziel, herauszufinden, ob auch das funktionale Ballpeptid des *Shaker*-K<sup>+</sup>-Kanals eine wohldefinierte, eindeutige Struktur in wässriger Lösung zeigt.

Messungen des Zirkulardichroismus des *Shaker*-Ballpeptides deuteten darauf hin, dass es in wässriger Lösung ungefaltet vorliegt und in Anwesenheit von Detergentien einige  $\beta$ -Faltblatt Strukturelemente aufweist (Fernandez-Ballester et al., 1995). Im Gegensatz dazu berichteten Aldrich et al. (1990) über NMR-spektroskopische Untersuchungen, die zeigten, dass das Peptid ungefaltet ist und eine Tendenz zu  $\alpha$ -helikaler Struktur aufweist. Dieser Effekt wurde in der Anwesenheit von Trifluorethanol verstärkt. Das Ziel dieser Arbeit war es, aus den mit NMR-Spektroskopie gewonnenen Daten ein präziseres Bild der Struktur des *Shaker*-Ballpeptides zu erhalten.

### 4.2 **Probenpräparation und Messbedingungen**

Das *Shaker*-P22 Peptid wurde mittels Festphasensynthese von Dr. R. Frank (DKFZ Heidelberg) synthetisiert und aufgereinigt (Frank et al. 1988). Die Aminosäurensequenz lautet: MAAVA GLYGL GEDRQ HRKKQ QQ–CONH<sub>2</sub>; das Molekulargewicht beträgt 2485 Da.

Etwa 2,5 mg des Peptids wurden entweder in Puffer A oder in Puffer B aufgelöst und der pH Wert - wenn notwendig - durch Zugabe von NaOD oder DCl korrigiert. Puffer A enthielt 1 mM DTE, 0,5 mM EDTA, 0,8 mM NaN<sub>3</sub>, 450 ml H<sub>2</sub>O und 50 ml D<sub>2</sub>O (pH 3,9). Puffer B ist so zusammengesetzt, dass er soweit wie möglich der physiologischen intrazellulären Ionenkonzentration nahekommt (Freund et al., 1995). Er besteht aus 47,0 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 9,0 mM KHCO<sub>3</sub>, 2,4 mM MgHPO<sub>4</sub>, 0,3 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,2 mM KCl, 4,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>, 67,2 mM CD<sub>3</sub>COOD, 450 ml H<sub>2</sub>O und 50 ml D<sub>2</sub>O (pH 7,2). Als interne Referenz wurden der Probe 5 µl 0,01 mM DSS (4,4-Dimethyl-4-silapentan-sulfoxyd) zugesetzt. Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren wurden an einem Bruker AMX-500 NMR-Spektrometer aufgenommen (Feldstärke 11,7 T entsprechend  $v_0 = 500,13$  MHz). Die Temperatur betrug üblicherweise 282 K. Die H<sub>2</sub>O-Linie des Lösungsmittels wurde durch eine selektive Einstrahlung von 1,5 s Dauer vorgesättigt. Die Spinsystem-Identifikation und sequentielle Zuordnung wurden durch zweidimensionale homonukleare NOESY-, ROESY-, DQF-COSY- und TOCSY-Experimente erreicht. Die NOESY-Spektren (Jeener et al., 1979) wurden mit Mischzeiten von 100 ms und 300 ms aufgenommen, die z-gefilterten ROESY-Spektren (Rance et al., 1987) mit Mischzeiten von 150 ms und 200 ms. Die TOCSY-Spektren (Braunschweiler und Ernst, 1982) wurden mit einer 60 ms MLEV-16 Entkopplungssequenz (Levitt et al., 1982) und die doppelquantengefilterten (DQF-) COSY-Spektren mit der Standardpulssequenz von Rance et al. (1983) aufgenommen. Die phasenempfindliche Aufnahme in der w1-Richtung wurde im TPPI-Modus (Marion et al., 1983) durchgeführt. Zur Echo-Unterdrückung wurde ein Paar von Spin-Lock-Pulsen mit 5 ms und 2,5 ms Dauer mit orthogonaler Phase vor dem schwachen Wasserunterdrückungspuls verwendet. Die typische Messdauer variierte zwischen 12 und 48 Stunden.

Die H/D-Austauschraten wurden aus einer Reihe von sehr kurzen TOCSY-Spektren unmittelbar nach dem Lösen des protonierten Peptids in reinem  $D_2O$  (Deuterierungsgrad 99.85%, Merck) bestimmt (256 x 4096 Datenpunkte, NS: 1, Messdauer ca. 9 min).

Zur Bestimmung der Austauschraten passt man die Linienintensität  $I_j$  der Amid-H $\alpha$ -Kreuzsignale j in einer Reihe von TOCSY Spektren in Abhängigkeit der Zeit an eine Gleichung pseudoerster Ordnung an

$$I_{j}(t) = I_{j}(t=0) \cdot \exp(-k_{j}t)$$
 (4.1)

und korrigiert den erhaltenen Wert wie in Kapitel 1.2.6 beschrieben auf pH, Temperatur, Ionenstärke, Isotope und benachbarte Seitenketten.



Bild 4.1: 1D<sup>1</sup>H--NMR-Spektrum von Shaker-P22 (NS: 25, SW: 10,1 ppm, 32k Datenpunkte, pH 7,2, Temperatur 282 K, exponentielle Filterung, v<sub>0</sub>=500,13 MHz).

Auswertung und Prozessierung der oben beschriebenen Messungen erfolgte auf verschiedenen Computern der Firma SGI (Indy, Indigo2, O2) mit Hilfe der Programme XWINNMR (Bruker) und AURELIA (Neidig et al., 1995). Die Zuordnung der Resonanzlinien wurde entsprechend dem Standardverfahren (Wüthrich, 1986) mittels TOCSY- und DQF-COSY-Spektren zur Identifikation der Spinsysteme und NOESY-Spektren zur sequentiellen Zuordnung durchgeführt.

## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 Sequenzspezifische Zuordnung der <sup>1</sup>H-Resonanzen in H<sub>2</sub>O

Die NMR-Messungen am *Shaker*-P22 Ballpeptid wurden unter verschiedenen experimentellen Bedingungen aufgenommen (Bild 4.1). Ein niedriger pH ist geeigneter um austauschbare NH-Protonen zu beobachten, ein neutraler pH und eine entsprechende Salzkonzentration ist für die biologische Relevanz der möglichen Strukturen wichtig. Die Spinsysteme wurden unter beiden Bedingungen komplett durch ein- und zweidimensionale NMR-Messungen bestimmt. Die erhaltenen chemischen Verschiebungen im physiologischen Puffer B sind im wesentlichen auch bei niedrigen pH erhalten. Die fehlende Konzentrationsabhängigkeit der Linienbreiten mit einem Durchschnittswert von 5,8 Hz bei 282 K zeigt, dass das gelöste Peptid im millimolaren Bereich monomer vorliegt und Aggregation vernachlässigt werden kann. Die <sup>1</sup>H-chemischen Verschiebungen des *Shaker*-Peptides im physiologischen Puffer zeigt Tabelle 4.1 (<sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen bei pH 3,1: Anhang 8.2, Tabelle 8.1).

Rest	$\mathrm{H}^{\mathrm{N}}$	$H^{\alpha}$	$H^{\beta}$	Hγ	${\rm H}^{\delta}$	Andere
Met-1	a	4,04	2,14	2,63		H <sup>ε3</sup> 2,11
Ala-2	8,54	4,36	1,42			
Ala-3	8,56	4,36	1,39			
Val-4	8,27	4,10	2,08	0,97		
Ala-5	8,55	4,35	1,41			
Gly-6	8,43	3,92				
Leu-7	8,10	4,27	1,36	1,46	0,80/0,87	
Tyr-8	8,33	4,61	2,93/3,15		$H^{\delta 1,2}$ 7,15	$H^{\epsilon 1,2}$ 6,85
Gly-9	8,44	3,93				
Leu-10	8,28	4,37	1,35	1,46	0,89/0,96	
Gly-11	8,63	3,95/3,99				
Glu-12	8,41	4,23	1,95/2,05	2,26		
Asp-13	8,60	4,57	2,75/2,69			
Arg-14	8,37	4,22	1,78/1,86	1,60/1,75	3,19	H <sup>ε</sup> 7,39
Gln-15	8,40	4,28	1,99/2,08	2,31		$H^{\epsilon 2}$ 6,99/7,67
His-16	8,32	4,60	3,22/3,12		H <sup>δ2</sup> 7,11	H <sup>ε1</sup> 8,06
Ala-17	8,41	4,29	1,83/1,87	1,63/1,76	3,19	H <sup>ε</sup> 7,39
Lys-18	8,47	4,27	1,70/1,76	1,42	1,78/1,84	$H^{\epsilon}$ 2,99/ $H^{\zeta_3}$ 7,69
Lys-19	8,50	4,30	1,71/1,79	1,45	1,81	$H^{\epsilon}$ 2,99/ $H^{\zeta_3}$ 7,69
Gln-20	8,56	4,30	2,00/2,11	2,39		H <sup>ε2</sup> 6,98/7,65
Gln-21	8,58	4,34	2,03/2,15	2,41		$H^{\epsilon 2}$ 6,98/7,65
Gln-22	8,57	4,32	2,02/2,14	2,40		$H^{\epsilon 2}$ 6,98/7,65

Tabelle 4.1: <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen von Shaker-P22 Peptid bei pH 7.2 und 282 K.

<sup>a</sup> Signal nicht sichtbar.

Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu DSS bestimmt.

#### 4.3.2 Sequentielle Zuordnung und intramolekulare Abstände

Nach der Bestimmung der Spinsysteme wurde die sequentielle Zuordnung der im TOCSY identifizierten Aminosäuren mit einem NOESY-Spektrum durchgeführt. Dabei werden im NOESY-Spektrum alle Kreuzsignale zugeordnet. Insbesondere in der Fingerabdrucksregion eines Proteins kann die Sequenzabfolge der Aminosäuren durch die Auswertung der dipolaren Kopplung zwischen den H $\alpha$ -Proton einer Aminosäure und dem Hauptketten N-Proton der nachfolgenden Aminosäure bestimmt werden (Bild 4.2).



Bild 4.2: Sequentieller NOE-Pfad durch die "fingerprint" Region von Shaker-P22 (pH 7,1, Temperatur 283 K, 1024x1024 Datenpunkte, quadratische Sinus-Filterung in t<sub>1</sub> und t<sub>2</sub> Richtung, SW: 11,018 ppm). Die Zahlen verweisen auf die entsprechende Aminosäureposition im Peptid.

Um die intramolekularen Abstände der Protonen des *Shaker*-Peptides zu bestimmen, wurden NOESY-Spektren in H<sub>2</sub>O bei 282 K und pH 7,2 aufgenommen. Die Mischzeiten betrugen 100 ms, 200 ms und 300 ms. Das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis zeigte das Spektrum mit hoher Mischzeit. Die Analyse der NOESY-Spektren ergab insgesamt 82 quantitativ auswertbare Kernabstände. Für die folgenden Molekulardynamikrechnungen wurden nur solche Signale berücksichtigt, die aus überlagerungsfreien Signalen stammen und für die automatische Signalintegration im Programm AURELIA geeignet waren (Anhang 8.4.2). Nach Eichung der

Integrationsdaten auf ein Kreuzsignal eindeutig bestimmter Methylenprotonen mit einem bekannten Abstand von 0,176 nm erhält man die Liste der bestimmten Abstände. Diese wurde durch Rückrechnung mit dem Programm RELAX (Görler et al., 1997) überprüft und weiter verfeinert.



Bild 4.3: Die sequentiellen NOEs und die lokale Struktur von Shaker-P22. Die Stärke der NOEs wird durch die Dicke der Balken symbolisiert (Dick: 1,8-2,3Å, mittel: 2,3-3,5Å, dünn: >3,5Å). NOEs aus überlagerungsfreien Regionen zeigen ausgefüllte Kontakte, die gestrichelten stellen vorhandene NOEs dar, die nicht quantitativ ausgewertet werden konnten. (Erklärung der Abkürzungen d<sub>xx</sub>: siehe Text)

Bild 4.3 gibt einen Überblick über die wichtigsten NOEs, die aus der sequentiellen Zuordnung erhalten wurden (vgl. Bild 1.3). Dies charakterisiert gleichzeitig die lokale Sekundärstruktur des Peptids. Die sequentiellen NOEs werden durch  $d_{\alpha N}$  dominiert, dem NOE zwischen dem  $\alpha$ -Proton der Aminosäure i und dem Amidproton der nächsten Aminosäure i+1. Zwischen Leu7 und Gly11 gibt es einen Bereich zusätzlicher Amid-Amid-NOEs ( $d_{NN}$ ). Dies weist auf eine helikale Struktur dieser Region hin. Es wurden weder im NOESY- noch im ROESY-Spektrum mittel- oder langreichweitige NOEs gemessen, die auf eine gefaltete, kompakte Struktur hinweisen würden.

#### 4.3.3 Bestimmung der Torsionswinkel

Die Amid-H $\alpha$  Kopplungskonstanten <sup>3</sup>J<sub>NH-H $\alpha$ </sub> wurde aus einem DQF-COSY-Spektrum mit großer digitaler Auflösung bestimmt (spektrale Breite 5050,50 Hz, 1024\*8192 Datenpunkte in der Zeitdomäne, Sinusfilterung in t<sub>1</sub>-Richtung, Gaußfilterung in der t<sub>2</sub>-Richtung, 2048\*16384 reale Datenpunkte, Basislinienkorrektur nach Saffrich et al., 1993). Die Multiplettaufspaltung wurde mit dem Programm AURELIA bestimmt. Man erhält die J-Kopplungswerte durch das Anpassen zweier Lorentzfunktionen an die entsprechenden DQF-COSY-Signale. Die digitale Auflösung der verwendeten Zeitdomänendaten in t<sub>2</sub>-Richtung betrug 0,62 Hz/Punkt und 0,31 Hz/Punkt nach der Fouriertransformation.

Auch die meisten der aus COSY-Spektren bestimmten Kopplungskonstanten zwischen Amidund  $\alpha$ -Proton, welche den durchschnittlichen Rückgrat- $\phi$ -Winkel entsprechen, haben Werte aus dem statistischen-Knäuel Bereich (Bundi et al., 1979; Bild 4.4). Allerdings gibt es ein paar Ausnahmen, die signifikant von diesen Werten abweichen. Dies betrifft die Aminosäuren Tyr8, Asp13, Gln15 und Ala17 und deutet darauf hin, das das Peptid-Rückgrat im Zeitmittel eine zumindest teilweise geordnete Struktur annimmt.



Bild 4.4: Kopplungskonstanten der Amid-H $\alpha$  Protonen  ${}^{3}J_{NH-H\alpha}$  des Shaker-Ballpeptids. Die experimentell bestimmten Kopplungskonstanten (dunkle Säulen) im Vergleich zu den statistischen-Knäuel Werten (helle Säulen) von Bundi und Wüthrich (1979). Die Messungen erfolgten bei 282 K und pH 7,2.

#### 4.3.4 Chemische Verschiebungen

Weitere Strukturhinweise lassen sich aus der Abweichung  $\Delta \delta H^N$  der chemischen Verschiebung der Amidprotonen und der Abweichung  $\Delta \delta H^{\alpha}$  der H $\alpha$ -chemischen Verschiebung von den statistischen-Knäuel Werten (Wüthrich 1993) erhalten (Bild 4.5). Einige der Verschiebungen der Amidprotonen und noch stärker einige der H $\alpha$ -Verschiebungen weichen signifikant von den statistischen-Knäuel Werten ab. Allerdings gibt es kein Abweichungsmuster, das auf typische kanonische Sekundärstrukturelemente hinweist (Wishard et al. 1995).

#### 4.3.5 H/D - Austauschraten

Die H/D-Austauschrate der Amidprotonen ist üblicherweise klein, wenn das entsprechende Proton an einer internen Wasserstoffbrücke beteiligt ist. Bei wenigen Aminosäuren ist das Verhältnis  $f_s$  (Verlangsamungsfaktor) der theoretisch zu erwartenden Austauschrate  $k_{theo}$  (Bai et al. 1993) zu der experimentell bestimmten Austauschrate  $k_{exp}$  deutlich größer als 1. Dies weist auf eine interne Wasserstoffbrücke hin. Dies trifft für die Aminosäure Gly6, Gly9 und Glu12 zu (Tabelle 4.2). Deutlich erhöhte  $k_{exp}$  Werte findet man für Leu10, Gly11 und Lys19. Eine Erhöhung der Austauschrate kann z.B. durch eine eng benachbarte negative Ladung herrühren. Die Stärke dieses Effekts kann man aus den statistischen-Knäuel Werten von Bai et al. (1993) abschätzen: Tauscht man z.B. Lys18 mit Asp aus, führt dies zu einem Anstieg von  $k_{theo}$  von 1,4 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> zu 2,5 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>. Dieser Effekt liegt genau in der Größenordnung, die wir in unserem Peptid beobachten. Da es nur zwei negativ geladene Gruppen in unserem Peptid gibt (die Carboxyl-Gruppe von Glu12 und die C-terminale Carboxyl-Gruppe), ist eine mögliche Interpretation der Daten, dass eine (oder beide) dieser Gruppen im Zeitmittel in die Nähe von Leu10, Gly11 und Lys19 gelangt. Dies unterstreicht nochmals die Annahme, dass das Peptid nicht völlig strukturlos ist.



Bild 4.5: Abweichung der chemischen Verschiebungen der  $\alpha$ - und der Amidprotonen von den statistischen-Knäuel Werten.  $\Delta \delta H^{\alpha}$  und  $\Delta \delta H^{N}$  stehen für die Differenz der experimentell bestimmten chemischen Verschiebungen der H $\alpha$ - und Amidprotonen zu den statistischen-Knäuel Werten von Wüthrich (1986). Die Messungen erfolgten bei 282 K und pH 7,2 (dunkle Säulen) bzw. pH 3,9 (helle Säulen).

Rest	$k_{exp} [10^{-3}/sec]$	k <sub>theo</sub> [10 <sup>-3</sup> /sec] <sup>a</sup>	fs=ktheo/kexp
Met-1	b	1320,00 (±330,00)	-
Ala-2	b	41,60 (±10,82)	-
Ala-3	0,75 (±0,08)	0,93 (±0,24)	1,2
Val-4	0,25 (±0,02)	0,18 (±0,05)	0,7
Ala-5	0,75 (±0,08)	0,64 (±0,18)	0,9
Gly-6	0,86 (±0,09)	1,53 (±0,43)	1,8
Leu-7	0,52 (±0,05)	0,37 (±0,09)	0,7
Tyr-8	0,40 (±0,04)	0,30 (±0,08)	0,8
Gly-9	1,07 (±0,11)	1,65 (±0,46)	1,5
Leu-10	0,67 (±0,07)	0,37 (±0,09)	0,6
Gly-11	1,55 (±0,16)	0,95 (±0,28)	0,6
Glu-12	1,34 (±0,13)	1,96 (±0,51)	1,5
Asp-13	b	7,88 (±2,13)	-
Arg-14	2,62 (±0,79)	3,28 (±0,89)	1,3
Gln-15	2,70 (±0,81)	1,50 (±0,46)	0,6
His-16	b	7,75 (±2,52)	-
Arg-17	b	6,26 (±1,82)	-
Lys-18	1,72 (±0,52)	1,19 (±0,34)	0,7
Lys-19	2,25 (±0,67)	0,95 (±0,28)	0,4
Gln-20	2,26 (±0,68)	1,20 (±0,34)	0,5
Gln-21	2,26 (±0,68)	1,44 (±0,42)	0,6
Gln-22	2,26 (±0,68)	1,44 (±0,42)	0,6

Tabelle 4.2: H/D-Austauschraten des Shaker-P22 Peptids bei pH 3.7 und 283 K.

<sup>a</sup> Die theoretischen Austauschraten  $k_{theo}$  wurden nach dem Verfahren von Bai et al. (1993) bestimmt. Sie sind auf Temperatur, pH, Ionenstärke und Seitenketteneffekte korrigiert. Die Fehler in  $k_{exp}$  wurden aus dem exponentiellen Fit der Daten bestimmt, die Fehler in  $k_{theo}$  durch Annahme eines Fehlers von ±1 K für die Temperatur und ±0,1 Einheiten für den pH.

<sup>b</sup> Die Austauschraten konnten mit dieser Methode nicht bestimmt werden, da die Amidprotonen bereits während der ersten TOCSY Messung ausgetauscht waren.

#### 4.3.6 Molekulardynamik - Rechnungen

#### 4.3.6.1 Strukturrechnungen im Vakuum

Um zu überprüfen, ob aus den gemessenen NMR-Daten sich bekannte Strukturelemente ergeben, wurden mit den Abstands- und Winkelinformationen Molekulardynamiksimulationen durchgeführt. Insgesamt wurden 82 NOE-Abstände und 13 Torsionswinkel in die Berechnungen einbezogen (Anhang 8.4.2 und 8.4.4).

Trotz einer langen Simulationsdauer und iterativen Verfeinerung der Strukturdaten konvergierten die erhaltenen Strukturen nicht. Das *Shaker*-Peptid ordnet sich hierbei relativ zufällig an., d.h. die Überlagerung der energieärmsten Strukturen zeigte kein gemeinsam erhaltenes Strukturmotiv auf. Möglicherweise benötigt das Peptid zur Stabilisierung externe Kontakte, wie sie durch das Lösungsmedium oder den Bindungspartner erst gegeben sind.

#### 4.3.6.2 Strukturrechnungen in der Wasserbox

Da vielleicht das umgebende Lösungsmittel das Vorhandensein einer Sekundärstruktur erst ermöglicht, wurden weitere MD-Simulationsrechnungen mit einem in einem Wasserquader (Wasserbox) eingebetteten *Shaker*-Peptid unternommen. Obwohl es allgemein bekannt ist, dass die Berücksichtigung von Lösungsmitteleffekten für eine möglichst realistische Simulationsrechnung notwendig ist, existiert kein gemeinsamer Standard, wie es in die Rechnungen zu implementieren ist. Der Grund dafür liegt in dem Widerspruch zwischen Rechenzeitbedarf und Genauigkeit. Die Berechnung der Dynamik kleiner Moleküle in Wechselwirkung mit Lösungsmittelmolekülen ist selbst heute noch mit der schnellsten Computerhardware mit einem großem Zeitaufwand verbunden. Aus diesem Grund werden die meisten Proteinstrukturen ohne Lösungsmittel oder ähnliche Randbedingungen im Vakuum berechnet.

Periodische Grenzbedingungen (z.B. Wasserbox, Bild 4.6), wie man sie häufig bei Lösungsmittelrechnungen benutzt, werden bei großen Proteinen, die sehr viele Wassermoleküle zur guten Lösung benötigen, nicht mehr berechenbar. Dabei wandern die Wassermoleküle, die während der Berechnung die Grenzen des Würfels durchdringen, auf der gegenüberliegenden Seite wieder in die Box hinein. Eine Alternative stellt der Gebrauch einer Lösungsmittelhülle dar. Um das Protein legt man eine sphärische Grenzbedingung, die verhindert, dass Lösungsmittelmoleküle entkommen (Brunger et al., 1984; Brooks et al., 1985). Die Anzahl der Lösungsmittelmoleküle innerhalb einer solchen Hülle ist wesentlich kleiner als die in einer Box.

Im Falle des *Shaker*-Peptids wurden die zehn energieärmsten Strukturen der Vakuumsimulation in je einen Wasserquader von je 2000 H<sub>2</sub>O-Molekülen mit periodischen Randbedingungen eingebettet. Die Kantenlänge der Quader betrug 1,5 nm x 1,5 nm x 3,1 nm. Die Wasserwürfel stammen aus Simulationen äquilibrierter H<sub>2</sub>O-Moleküle bei einer Temperatur von 300 K gemäß dem TIPS-Modell für die verwendeten Potentiale (Jorgensen et al., 1981). Alle Molekulardynamikrechnungen unter Berücksichtigung der H<sub>2</sub>O-Lösungsmittelatome wurden entsprechend den Vakuumsimulationen durchgeführt. Zusätzlich berücksichtigen die Potentiale  $E_{pvdw}$  (periodische Van-der-Waals Energie) und  $E_{pelec}$  (periodische elektrostatische Energie), die während der Berechnung durch die Quadergeometrie auftretenden, periodischen Randbedingungen. Die beiden Energiefunktionen sind von der gleichen Form wie  $E_{elec}$  und  $E_{vdw}$  (Seite 16). Weiterhin wurden die als besonderst robust bekannten Charm22-Potentiale (Brooks et al., 1983) sowie ein großer "cutoff"-Wert von 15 Å benutzt. Zur Glättung des elektrostatischen Potentials vor dem Cutoff-Wert muss auch der "Force-Switch" in dem Simulationsprotokoll aktiviert werden. Die Simulationsdauer betrug 125 ps bei Zeitschritten von 1 fs, was einer CPU-Zeit von insgesamt 4 Wochen entsprach (SGI Origin 2000, R10k 195 MHz).



Bild 4.6: Das Shaker-Peptid in der Wasserbox aus 2000 H<sub>2</sub>O-Molekülen. Grün: Röhrendarstellung des Peptid-Rückrats. Gelb: Shaker-Peptid. Blau/Rot: Wassermoleküle.

Da sich die Gesamtenergie der berechneten Strukturen im Laufe der Simulation trotz starker Schwankungen etwas erniedrigte, ist zu vermuten, dass sich die Moleküle in Wasser besser anordnen als im Vakuum. Trotzdem lassen sich keine gemeinsamen Strukturelemente nach der Simulation feststellen.

Um die strukturellen Ähnlichkeiten innerhalb der berechneten Strukturen zu analysieren, wurden sie alle untereinander mit der in X-PLOR implementierten Methode der kleinsten Quadrate verglichen. Als ein objektives Maß für strukturelle Ähnlichkeit berechnet dieses Verfahren sogenannte RMSD-Werte für Paare von Strukturen (Root Mean Square Deviation, Standardabweichung) gemäß

$$RMSD = \sqrt{\left(\sum_{i=1}^{n} (x_i - \langle x \rangle)^2\right)}$$
(4.2)

mit n der Anzahl der betrachteten Atome.

Wie in Bild 4.7 zu sehen ist, nimmt die Standardabweichung des Rückgrates der berechneten Strukturen zur jeweiligen Startstruktur im Laufe der Simulation stetig zu, ohne je ein Plateau zu erreichen. Das gleiche gilt für den RMSD-Wert aller Atome. Dies bedeutet, dass sich keine stabile Struktur ausbildet, oder dass die Simulationsdauer noch zu kurz ist.



Bild 4.7: MD-Rechnungen in der Wasserbox. A: RMSD-Wert aller Atome zur Startstruktur. B: RMSD-Wert der Rückgratatome zur Startstruktur. Simulationsdauer 125 ps, Daten aus einer von zehn Rechnungen.

Auch Vergleiche ausgewählter Strukturen aus verschiedenen Simulationsläufen zu den jeweils energieärmsten Zeitpunkten am Ende der MD-Simulation zeigten keine strukturelle Ähnlichkeit auf. Ebenfalls wurden die berechneten Strukturen mit dem Programm PROCHECK analysiert. Dabei werden insbesondere die dihedralen Winkel und die Hauptkettenstrukturparameter auf korrekte Stereochemie überprüft. In allen untersuchten Strukturen lagen die Mehrzahl der  $\varphi$ - und  $\psi$ -Winkel im Ramachandran-Plot in den energetisch ungünstigeren gelben Bereichen (Bild 4.8). Bei gut gefalteten Peptiden findet man die Aminosäuren vor allem in den roten Zonen.



Bild 4.8: Mit PROCHECK erstellter Ramachandran-Plot (Ramachandran et al., 1963) für die energetisch günstigste, in der Wasser-Box berechneten Struktur von Shaker-P22. Die meisten Aminosäuren (schwarze Markierungen) liegen in den noch erlaubten gelben Winkelbereichen. Im Idealfall einer kompakt gefalteten Struktur sollten 90% der Aminosäuren in den drei roten Regionen (A,B,L) liegen.

#### 4.4 Diskussion

Die in Bild 4.3 aufgelisteten NOEs sind bei pH 7,2 bestimmt worden. Allerdings unterscheiden sie sich nicht wesentlich von den bei pH 3,9 beobachteten. Das gleiche gilt für die gemessenen HN- und H $\alpha$ -chemischen Verschiebungen, die J-Kopplungskonstanten <sup>3</sup>J<sub>HNH $\alpha}$  und die H/D-Austauschraten. All diese Daten weisen darauf hin, dass das Konformationsgleichgewicht ("Die Struktur") unabhängig vom pH-Wert ist, abgesehen von den trivialen pH-abhängigen chemischen Verschiebungsänderungen, die durch die Protonierung bzw. Deprotonierung der funktionellen Gruppen der Seitenketten herrührt.</sub>

Auch erste Messungen an einem deutlich längeren *Shaker*-Peptid (1-55) zeigten keine Anzeichen einer kompakten Faltung im Bereich 1-22 (Bild 4.9). Alle TOCSY-Signale des *Shaker*-P22 Peptids konnten an der selben Stelle im TOCSY-Spektrum des *Shaker*-P55 Peptids gefunden werden.



Bild 4.9: 1D<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Shaker-P55 (NS: 128, SW: 10,2 ppm, 16k Datenpunkte, pH 3,9, Temperatur 282 K, keine Filterung, v<sub>0</sub>=800,13 MHz).

Zusammenfassend zeigen die NMR Ergebnisse, dass das *Shaker*-Ball-Peptid erwartungsgemäß in wässriger Lösung keine wohldefinierte Struktur mit klar herausgebildeten Sekundärstrukturelementen annimmt. Allerdings nimmt es auch keine reine Zufallsstruktur an. Am besten beschreibt man es als dynamisches Gleichgewicht von lokalen, nichtzufälligen Strukturen. Dies ist im Einklang zu den schon bekannten NMR- und CD-Daten (Fernandez-Ballester et al, 1995) und mit den von Murrell-Lagnado und Aldrich (1993a; 1993b) durchgeführten Mutationsexperimenten.

Viele dieser Mutationen veränderten die Bindungscharakteristik des Ballpeptids nicht signifikant. Man kann sich schwer vorstellen, wie eine wohlgeordnete, dreidimensionale Struktur so unempfindlich auf diese Mutationen sein kann. Im Gegensatz dazu ist der Inaktivierungsball von Raw3 kompakt gefaltet und der von RCK4 enthält ein wohldefiniertes Helix-Loop-Motiv (Antz et al., 1997). Offensichtlich hat die Natur das allgemeine Problem der Verschließung der Poren spannungsgesteuerter Kanäle von innen auf verschiedene Weise gelöst. Diese reicht von der ungeordneten Struktur des *Shaker*-Peptids bis zur gut gefalteten Tertiärstruktur des Raw3-Peptids.

Die Ergebnisse der *Shaker*-Strukturuntersuchung wurden veröffentlicht (Schott MK, Antz, C, Frank R, Ruppersberg JP und Kalbitzer HR (1998) *Eur. Biophys. J.* **22**, 99-104).

## 4.5 Ausblick

Aus den Ergebnissen zeigt sich, dass eine wohldefinierte, dreidimensionale Struktur für eine effektive Kanalblockierung nicht notwendig ist. Allerdings hat das Vorhandensein von lokalen Strukturelementen beim *Shaker*-Ballpeptid den Vorteil, dass sie dem Peptid den Eingang zur inneren Porenregion besser ermöglicht, als einem Random-Coil Peptid (statistisches-Knäuel). Es ist schließlich denkbar, dass sich erst durch die Wechselwirkung mit dem Rezeptor in der K<sup>+</sup>-Kanalpore eine wohldefinierte kompakte Struktur ausbildet. Die An- oder Abwesenheit einer vorgefalteten, dreidimensionalen Struktur beeinflusst wahrscheinlich die Kinetik des Inaktivierungsprozesses. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass das kompakt gefaltete Raw3-Ballpeptid der effektivste Inaktivator ist, selbst bei Kanälen wie *Shaker*, für die es nicht das natürliche Verschlußpeptid ist.

# 5 Strukturuntersuchungen an dem Porenpeptid des IRK1-Kaliumkanals

# 5.1 Hintergrund

Neben den spannungsgesteuerten K<sup>+</sup>-Kanälen wie *Shaker*, die durch eine Membrandepolarisation aktiviert werden und Kalium-Ionen nach außen abgeben, gibt es auch K<sup>+</sup>-Kanäle, die nicht durch Spannung gesteuert werden. Ein Beispiel dafür sind die "Inward Rectifier" K<sup>+</sup>-Kanäle (IRK), die nur ein Einströmen von K<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle ermöglichen (Aldrich, 1993; Kubo et al., 1993). Auch diesen Kanaltyp findet man in einer Vielzahl von Zellen (z.B. Neuronen, Herzmuskel, etc.). Diese Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und in der Kontrolle der Erregbarkeit einer Zelle.

Der komplette IRK1-Kanal besteht aus einem Tetramer von je 428 Aminosäuren, die jeweils nur zwei transmembrane Helices bilden. Damit ist diese Kanalklasse deutlich kleiner, als die der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle mit sechs Transmembranelementen. IRK1 entspricht dadurch anschaulich der inneren Porenstruktur von *Shaker* mit den beiden Membranhelices S5 und S6 und der dazwischenliegenden Porenregion H5 (Bild 5.1).

Da insbesondere in der vermuteten Porenregion die Sequenzhomologie zu den *Shaker*-K<sup>+</sup>-Kanälen sehr hoch ist, bietet sich der IRK1-Kanal zur genaueren Untersuchung der Poreneigenschaften an. Der Bauplan dieses Kanals besteht vermutlich aus der Kaliumsensitiven Pore (H5), die von zwei membranständigen  $\alpha$ -Helices (M1, M2) in der Zellmembran verankert und gestützt wird. Daran schließen sich N- und C-terminal zwei große zytoplasmatische Domänen an.

Da die besonderen Eigenschaften von Ionenkanälen, wie z.B. die Ionenselektivität, bis zum Abschluss dieser Arbeit noch ungeklärt waren, würde die genaue Aufklärung der Struktur einer Porenregion höchstwahrscheinlich neue Erkenntnisse über die Funktionsweise von Ionenkanälen erbringen (Kubo, 1994). Die einzigen Anhaltspunkte über die strukturellen Eigenschaften und der Funktionsweise der Porenregion wurden bislang durch gezielte Punktmutationen (Thomas et al., 1993; Kürz et al., 1995) erhalten oder aus geometrischen Betrachtungen durch gezielte Inhibition der Kanäle mit kleinen Peptiden (Aiyar et al., 1995) oder anderen Substanzen (Stampe et al., 1993).

Da bisher die massiven Schwierigkeiten bei der Kristallisation von Membranproteinen nicht überwunden werden konnten, bestand mein neuer Ansatz darin, nur die isolierte, innere Porenregion als synthetisches Peptid einer Strukturanalyse zu unterziehen.



Bild 5.1: Die Membrantopologie der IRK-Kaliumkanäle. Oben: Analog zu den Membranelementen der spannungsgesteuerten Kaliumkanälen bilden die Segmente M1 und M2 die transmembranen Helices und der dazwischen sitzende Bereich H5 die in der Membran sitzende Pore. Unten: Im Vergleich zu einem spannungsgesteuerten K<sup>+</sup>-Kanal, der noch eine weitere äußere Hülle von Transmembransegmenten aufweist (S1, S2, S3 und S4), stellt der IRK-Kanal eine dem inneren Kern entsprechende verkleinerte tetramere Struktur dar (Kubo et al., 1993).

Die Schwierigkeit dieses Ansatzes liegt darin, dass man bei erfolgreicher Strukturbestimmung nicht ausschließen kann, dass sich die Struktur des Peptids von der nativen Struktur des gesamten Kanals unterscheiden wird. Aus diesem Grund ist es am besten, ein möglichst großes Peptid zu benutzen, da diese sich eher wie das ganze Protein falten. Größere Proteine bestehen meist aus einzelnen stabilen Domänen. Es ist deshalb sinnvoll, solch einen Abschnitt in der Gesamtsequenz des Proteins zu bestimmen und zu synthetisieren. Bei IRK-Kanälen ist die Porenregion direkt von zwei transmembranen Segmenten M1 und M2 umgeben. Deren Wechselwirkung mit der Pore wird vermutlich deren Struktur beeinflussen. Aus diesem Grund sollte man bei der Synthese der Pore auf jeden Fall auch diese Segmente berücksichtigen. Aufgrund der hydrophoben Natur der Transmembranelemente lassen sich allerdings Probleme mit ihrer Löslichkeit erwarten.

Das ausgewählte IRK1-Ausschnitt (87-178) entspricht der Sequenz der vermuteten Porenregion H5 mit den beiden Transmembranelementen M1 und M2.

Auch dieses Peptid wurde mittels Festphasensynthese von Dr. R. Frank (DKFZ Heidelberg) hergestellt und aufgereinigt. Die Aminosäure Sequenz lautet: IFCLAFVLSW LFFGCVFWLI ALLHGDLDTS SKVKVSKACV SEVNSFTAAF LFLIETQTTI GYGFRCVTDE CPIAVFMVVF QSIVGCIIDA FIIGA–CONH<sub>2</sub>; das Molekulargewicht beträgt 10431 Da. Während der Sequenzierung wurden an zwei Stellen Mutatio-

nen in die Aminosäurekette eingeschleust: An Position 134 wurde statt des Leucins ein Serin synthetisiert und an Position 116 wurden zusätzlich die Aminosäuren Serin, Lysin und Valin eingefügt. Diese Sequenzfehler sind bei einem synthetischen Peptid dieser Länge nahezu unvermeidlich.

# 5.2 Erste Lösungsansätze

## 5.2.1 Eigenschaften von Membranproteinen

Eukariontische Zellen besitzen sowohl eine äußere Zellmembran, als auch Membranen im Inneren (Zellkern, Organellen, etc.). Diese Membranen sind sowohl für den Zellaufbau als auch den Zellstoffwechsel lebensnotwendig. Zellmembranen sind außerdem an der Wechselwirkung zwischen Zellen mit ihren Nachbarzellen und extrazellulären Stoffen beteiligt. Viele der Strukturen und Organellen innerhalb von Zellen, die bei den Stoffwechselprozessen der Energieerzeugung und Biosynthese mitwirken, werden ebenfalls aus Membranen gebildet, z.B. Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat.

Biologische Membranen bestehen aus amphiphilen Molekülen mit einem als "Kopf" bezeichneten hydrophilen (wasserlöslichen) Teil sowie einem als "Schwanz" bezeichneten hydrophoben (wasserabstoßenden) Teil. Werden amphiphile Moleküle in eine wässrige Umgebung gebracht werden, so lagern sie sich zu einer Membran zusammen, einer aus zwei Molekülschichten (Doppelschicht) bestehenden zweidimensionalen Struktur (Bild 5.2).



Bild 5.2: Lipiddoppelschicht

In dieser Struktur zeigen die hydrophilen Köpfe nach außen und die hydrophoben Schwänze nach innen. Die hydrophoben Bereiche der Moleküle vermeiden auf diese Weise den Kontakt mit den Wassermolekülen der umgebenden Lösung. Die Moleküle sind in der Membran nicht an ihrer Position fixiert und können sich innerhalb der Doppelschichtebene bewegen. Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Cholesterin dienen als Bausteine der biologischen Membranen. Der Transport durch diese Membranschichten wird durch verschiedene Transportproteine, wie z.B. den Ionenkanälen gewährleistet.

### 5.2.2 Sequenzanalyse

Die Aminosäuren des IRK1-Porenpeptids gehören zu dem Bereich des IRK1 Kanals, der die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen durchspannt (Bild 5.1). Um eine genau-

ere Vorstellung darüber zu bekommen wurde die Peptidsequenz einer Sequenzanalyse unterzogen (PredictProtein; Rost 1996). Dabei können verschiedenste Eigenschaften der Aminosäuresequenz, wie z.B. erwartete Sekundärstruktur, Membranständigkeit oder Hydrophobizität, bestimmt werden. Die Strukturvorhersagen für das IRK1-Peptid ergaben folgenden erwarteten Anteil an Sekundärstrukturelementen:

53% α-Helices, 25% β-Faltblatt, 21% Rest

Ebenfalls konnten die Transmembranelemente vorhergesagt werden. Dies ist in tabellarischer Form in Tabelle 5.1 gezeig.

Aminosäure	Segment	Beschreibung
1- 20	Ml	membrane helix 1
21- 41	01	outside region 1
42- 59	M2	membrane helix 2
60- 73	i1	inside region 1
74- 92	МЗ	membrane helix 3
93- 95	02	outside region 2

Tabelle 5.1: Ergebnis der Strukturvorhersage (PredictProtein, EMBL)

Dabei wurde die in der Tabelle verwedeten Segmentbezeichnung durch die Software erzeugt. Die vorhergesagte Membranhelix M2 entspricht dem Porensegment H5 in der Kanalbeschreibung. Ebenfalls ist mit dem vorhergesagten Element M3 die Membranhelix M2 gemeint.

Das Ergebnis der Membranelementvorhersage in graphischer Form zeigt Bild 5.3. Die vom Programm PredictProtein getroffenen Vorhersagen entsprachen genau den Vorstellungen, die man über Kanalproteine bislang hatte.

Die Ergebnisse wurden von dem Resultat einer Aminosäureanalyse ergänzt, die aufzeigt, dass die Sequenzabschnitte der Transmembranelemente M1 und M2 fast vollständig aus hydrophoben, also lipophilen Aminosäuren zusammengesetzt sind. Nur außerhalb dieser Bereiche überwiegen hydrophile Aminosäuren (Bild 5.4).

Aufgrund dieser Tatsachen, die für die meisten Membranproteine typisch sind, ist es sehr problematisch, Membranproteine in wässrigem Medium zu lösen, wie sie zur NMR-Strukturbestimmung verwendet werden. Darin bestand auch das Hauptproblem bei diesem Projekt. Um geeignete Lösungsbedingungen zu finden, wird im allgemeinen bei solchen Proteinen ein Lösungsmittelscreening durchgeführt. D.h. man versucht, kleine Mengen an Protein in unterschiedlichsten Lösungsmitteln bei unterschiedlichen pH- und Temperaturwerten zu lösen. Nur die vielversprechendsten Ansätze werden weiterverfolgt und weiter variiert. Leider führt diese "Versuch und Fehler"-Methode nicht immer zum gewünschten Erfolg.



"DAS" TM-segment prediction

Bild 5.3: Grafische Darstellung der Membransegmentvorhersage (PredictProtein, EMBL): Große "DAS"-Werte weisen auf transmembrane Strukturen hin.

#### 5.2.3 Probenpräparation und Messbedingungen

Für die Lösungsversuche wurden je etwa 2,5 mg des Peptids zu den verschiedenen Lösungsmitteln aus Tabelle 5.2 hinzugefügt und auf einem Vortexer ca. 1 Minute gemischt. Der pH-Wert wurde - wenn notwendig - durch Zugabe von NaOD oder DCl eingestellt. Falls sich das Peptid optisch nicht klar auflöst, wurde die Probe für 5 Minuten bei Raumtemperatur in einem Ultraschallbad beschallt. Von allen ca. 100 Lösungen wurden eindimensionale <sup>1</sup>H-NMR Spektren gemessen.



Bild 5.4: Das modellierte IRK1-Peptid (Rückgrat-Tube-Ansicht). Links: Frontalansicht von innen. Rechts: Seitenansicht, das Porensegment steht nach innen vor. Rot markiert sind die hydrophoben Aminosäuren in den Transmembranhelices M1 und M2.

Lösungsmittel	Konzentration, Mischungsve hältnis, etc.	er- Getesteter pH-Bereich
H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O		3-11
Physiologischer Puffer		3,4; 6,2; 6,4; 7,5
Triphosphat- Puffer	10, 15, 35, 55 mM	3,1; 3,3; 5,1; 6,0; 6,5; 6,6; 6,9
d-Acetonitril	5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 %	2,5; 4,8; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,5; 6,3
d-Trifluorethanol	100, 95, 90, 80, 70 %	2,0; 2,3; 2,5; 3,1; 4,0; 4,3; 4,8; 5,0; 6,0; 6,3; 6,8

*Tabelle 5.2: Lösungstests des IRK1-Peptids. Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die Verdünnungen auf H<sub>2</sub>O.* 

Lösungsmittel	Konzentration, Mischungsver- hältnis, etc.	Getesteter pH-Bereich
d-Propionsäure	3, 7, 6, 50 %	2,3; 4,8; 5,3; 7,7
d-Pentansäure	1%	4,9; 6,0
d-Heptansäure	1%	4,6
d-Methanol	90, 80, 70, 60, 50, 10%	3,4; 3,5; 6,2; 6,4; 7,3; 8,0
d-Chloroform/ Methanol	100, 90, 80, 75, 70, 60 %	
d-DMSO	100, 90, 80, 70, 60, 50, 25,10 %	4,5; 4,0; 3,8
d-SDS	16-, 56-, 110-, 320-, 530-, 716-, 1026-facher Überschuss	4,6; 6,4; 6,1; 7,0
Tetrahydrofuran		
Isopropanol	100 %	
Ethylenglykol	100 %	
Benzin	100 %	
Aceton	100, 50 %	
Cyclohexan	100 %	
Triton X-100		
Butanol	100 %	
Glycerin		
Ethylacetat		
Methanol	100,50 %	
Ethanol	100 %	
Detergent Screen- ing Kit	Set aus 22 fertigen Lösungen	
Guanidin Hydro- chlorid		
Harnstoff	8M	
Taurin		
Betain		
Hexandiol		

\_\_\_\_
Lösungsmittel	Konzentration, hältnis, etc.	Mischungsver- Getesteter pH-Bereich
Ameisensäure	100 %	
Tetrahydrofuran		
Chapso		
TBAB		
DMPC		

Als interne Referenz wurden den Proben 5 µl 0,01 mM DSS (4,4-Dimethyl-4silapentan-sulfoxyd) sowie 10 mM DTE zugesetzt. Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren wurden an einem Bruker AMX-500 NMR-Spektrometer aufgenommen (Feldstärke 11,7 T entsprechend  $v_0 = 500,13$  MHz). Die Temperatur betrug üblicherweise 308 K. Die H<sub>2</sub>O-Linie des Lösungsmittels wurde durch eine selektive Einstrahlung von 1,5 s Dauer vorgesättigt.



*Bild 5.5:* Ausschnitt aus einem IRK1 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum. Peptid gelöst in TFE +10% D<sub>2</sub>O +10 mM DTE bei pH 2 (NS: 1024, SW: 20,1 ppm, 32k Datenpunkte, pH 2,0, Temperatur 308 K, exponentielle Filterung, v<sub>0</sub>=500,13 MHz).

Auswertung und Prozessierung der NMR-Messungen erfolgte auf verschiedenen Computern der Firma SGI (Indy, Indigo2, O2) mit Hilfe der Programme XWINNMR (Bruker) und AURELIA (Neidig et al., 1995).

Das IRK1-Peptid ließ sich nur in reinem DMSO, in Trifluorethanol (TFE), sowie in 8M-Harnstoff optisch klar auflösen. In allen anderen Lösungsmitteln war das IRK1-Peptid unter allen untersuchten Bedingungen praktisch unlöslich! In 8M-Harnstoff war das Peptid erwartungsgemäß vollständig denaturiert. Erste Messungen in DMSO zeigten leider, dass die Signaldispersion der NMR-Spektren sehr gering war und das Peptid ebenfalls nicht gefaltet vorliegt. Bessere Spektren ergaben sich mit TFE als Lösungsmittel (Bild 5.5). Das Peptid sieht gefaltet aus, aber es war zunächst nicht möglich, mehr als max. 0,1 mM Peptid zu lösen. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis war deshalb zu gering und verhinderte damit weitere zur Strukturaufklärung notwendige zweidimensionale Experimente (TOCSY, NOESY, COSY).

## 5.2.4 Erste Versuche mit SDS - Micellen

Um Membran-ähnliche Bedingung zu schaffen, wurde versucht das Peptid in verschiedenen d-SDS /  $H_2O$  Gemischen (perdeuteriertes Natriumdodecylsulfat in Wasser) zu lösen. Das ionische Tensid SDS besteht wie die Membranlipide aus einem hydrophilen und hydrophoben Teil. Der hydrophile Teil besteht aus der anionischen Sulfatgruppe (Kopf). Die lange Alkylkette (Schwanz) ist der hydrophobe Teil des Tensids (Bild 5.6).

Durch den hydrophilen Kopf läßt sich SDS in Wasser lösen. Die amphiphilen SDS-Moleküle sind zunächst als Monomere gelöst. Jedoch bereits bei niedrigen Tensidkonzentrationen kommt es zu einer abrupten Änderung der physikochemischen Eigenschaften der Lösung. Oberhalb dieser kritischen Konzentration (Critical-Micelle-Concentration, CMC; Armstrong, 1985) lagern sich die Tensidmoleküle zu Micellen zusammen (Bild 5.7). Für SDS liegt diese Konzentration in Wasser bei ca. 8 mmol/L, bei wässrigen Elektrolytlösungen wird sie auf 3 mmol/L herabgesetzt (Muijselaar et al., 1997). Die Bildungsgeschwindigkeit der Micellen (Terabe et al., 1993) liegt im Bereich von Millisekunden (Moroi, 1992).



Bild 5.6: Struktur von SDS. Deutlich ist der hydrophobe Schwanz und der polare Kopf zu erkennen.

Oberhalb der CMC stehen die micellaren Tensidmoleküle im dynamischen Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht mit den gelösten, monomeren Molekülen. Die Gleichgewichtskonstante liegt dabei im Bereich von 10<sup>-5</sup> s und ist stark temperaturabhängig. Bei ionischen Tensiden wie SDS steigt beispielsweise die CMC bei höheren Temperaturen.



Bild 5.7: Bildung einer Micelle (Terabe et al., 1993).

Die Tensidmonomer-Konzentration in der wässrigen Phase bleibt konstant bei der CMC, unabhängig von der Gesamtkonzentration des Tensids. Form und Größe der entstehenden Micellen werden durch die Struktur der Monomere und die Gesamtkonzentration des Tensids beeinflusst.

Die Micellen bilden zweidimensionale Strukturen wie lamellenartige oder sphärische Körper und dreidimensionale Strukturen wie Diskus und Kugel die alle aus zwei Molekülschichten (ähnlich einer Lipiddoppelschicht, Bild 5.2) bestehen. Je höher die Tensidkonzentration ist, desto höher sind auch die Aggregationszahlen der Micellen. Dreidimensionale Strukturen bilden sich bevorzugt bei hohen Konzentrationen. Wie bei Lipiden in Zellmembranen zeigen die hydrophilen Köpfe dabei nach außen, während die hydrophoben Schwänze nach innen gerichtet sind. Dies minimiert die Wechselwirkung der hydrophoben Bereiche mit den Wassermolekülen der Umgebung. Die Position der Moleküle in der Membran ist nicht fixiert, sondern sie können sich innerhalb der Doppelschicht weitgehend frei bewegen.

Die Aggregationszahlen der Micellen folgen der statistischen Normalverteilung um die thermodynamisch stabilste Micelle (Israelachvili, 1992). Die Größenverteilung der Micellen ist in wässriger Lösung jedoch sehr schmal. Für SDS-Micellen beträgt die Anzahl der Monomere, die eine Micelle bilden, ungefähr 70.

Aufgrund dieser gleichzeitig hydrophilen und lipophilen Eigenschaften der SDS-Micellen sind sie ein geeignetes Hilfsmittel, um Membranproteine zu lösen. Für die Lösungsversuche des IRK1-Peptids wurde deshalb versucht, etwa 2,5 mg des Peptids mit unterschiedlichen d-SDS-Mengen in H<sub>2</sub>O zu lösen. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOD oder DCl eingestellt. Um eine bessere Einlagerung des IRK1-Peptides in die SDS-Micellen zu ermöglichen, wurden die Proben zwischen 5 und 60 Minuten in einem Ultraschallbad bei 25°C beschallt. Von allen Lösungen wurden eindimensionale <sup>1</sup>H-NMR Spektren bei v<sub>0</sub> = 500,13 MHz ermessen. Es wurden unterschiedliche SDS-Konzentrationen zwischen 10- und 1000-fachem Überschuss (0,3-30 mM) verwendet, um eine optimale Tensidkonzentration zu erhalten. Die eindimensionalen <sup>1</sup>H-NMR Experimente wurden mit den gleichen Parametern wie bei den ersten Lösungsansätzen (Seite 68) durchgeführt.



Bild 5.8: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von 2,5 mg IRK1-Peptid in 90% H<sub>2</sub>O / 10% D<sub>2</sub>O mit 1,7mg d-SDS bei pH 2,8 und 308K. NS: 1024, SW: 16,12 ppm, exponentiell gefiltert. Es sind nur sehr schwache Peptidsignale zu erkennen.

Es war leider trotz Ultraschallbehandlung nicht möglich, signifikante Peptidmengen in die Micellen einzuschleusen, die aussagekräftige, mehrdimensionale NMR-Messungen erlauben (Bild 5.8). In allen Fällen löste sich das deuterierte SDS klar in Wasser auf, das vor- oder nachgelegte IRK-Peptid schwamm optisch ungelöst in der Probe. Auch Experimente mit stark erhöhter Temperatur oder stark sauren bzw. basischen pH-Werten brachten keine Verbesserung der Löslichkeit.

## 5.2.5 TFE / TFA als Lösungsreagenz

Da die beste Löslichkeit und Spektrenqualität in TFE erreicht wurde, adaptierte ich verschiedene Ansätze von Killian et al. (1994) und Jao et al. (1997), die Löslichkeiten von hydrophoben Peptiden in TFE (Trifluorethanol) und TFA (Trifluoressigsäure) ausnutzten, um diese dann in Micellen einzuschleusen.



Bild 5.9: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von 2,5 mg IRK1-Peptid in 90% H<sub>2</sub>O / 10% D<sub>2</sub>O (in d-SDS Micellen) nach der TFE-Präparation. pH 5,0 und 308K. NS: 1024, SW: 16,12 ppm, exponentiell gefiltert.

Dazu wurden die Proben wie folgt vorbereitet: Das Peptid wurde zunächst in einer großen Menge TFE vollständig gelöst (2,5-10,4 mg Peptid auf 50-100 mL TFE). Nach Zentrifugation der Probe bei 13000 U/min (Eppendorf Tischzentrifuge) für 15 min konnte kein ungelöstes Pellet festgestellt werden. Auch durch optische Kontrolle unter dem Mikroskop fand sich kein Anhaltspunkt auf ungelöste Bestandteile. Danach wurden 10 mL einer H<sub>2</sub>O / d-SDS Lösung hergestellt. Typischerweise wurden dafür 10 mg d-SDS verwendet. Beide Lösungen wurden jeweils gut durchmischt und ca. 5 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach wurden die SDS-Lösung zu dem TFE-Ansatz vorsichtig hinzutitriert. Nach dem Zusammenfügen läßt sich in der Mischung eine turbulente Schlierenbildung beobachten. Nach wenigen Minuten ist dann die Mixtur vollkommen klar. Diese Lösung blieb nun über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Am nächsten Tag wurde die komplette Lösung an einem Lyophyllisator gefriergetrocknet (mind. 12h). Nach vollständiger Trocknung konnte nun das entstandene Pulver in reinem H<sub>2</sub>O aufgelöst werden. Sowohl die eingesetzte Menge an SDS, als auch die Konzentration der Endlösung wurden variiert. In den meisten Fällen zeigten sich nach dieser Behandlung immer noch gewisse Anteile an ungelöstem Protein (in Form von feinem Niederschlag oder als lösungstrübende Schwebeteilchen). Trotzdem konnte mit diesem aufwendigen Verfahren erstmals signifikante Mengen an IRK1-Peptid in Wasser gelöst und vermessen werden (Bild 5.9).

Für die NMR-Messungen wurden je nach Ansatz eine ca. 0,1-1 mM Lösung verwendet und der pH Wert - wenn notwendig - durch Zugabe von NaOD oder DCl auf pH 5 korrigiert. Als interne Referenz wurden den Proben 5  $\mu$ l 0,01 mM DSS (4,4-Dimethyl-4-silapentan-sulfoxyd) sowie 10% D<sub>2</sub>O zugesetzt. Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren wurden an einem Bruker AMX-500 NMR-Spektrometer aufgenommen (Feldstärke 11,7 T entsprechend  $v_0 = 500,13$  MHz). Die Temperatur betrug typischerweise 308 K. Die H<sub>2</sub>O-Linie des Lösungsmittels wurde durch eine selektive Einstrahlung von 1,5 s Dauer vorgesättigt.

Auswertung und Prozessierung der SDS-Messungen erfolgte auf verschiedenen Computern der Firma SGI (Indy, Indigo2, O2) mit Hilfe der Programme XWINNMR (Bruker) und AURELIA (Neidig et al., 1995).

# 5.3 1D-NMR Sekundärstrukturbestimmung

Nachdem es durch die oben beschriebene Probenpräparation erfolgreich gelungen war erstmals eine ausreichende Menge des Peptids im NMR-Spektrometer zu detektieren, schien besonders die Methode von Wishard et al. (1991) geeignet zu sein, um Aussagen zu der Sekundärstruktur des IRK1-Peptides zu erhalten.

## 5.3.1 Hintergrund

Diese Methode ist im Gegensatz zur konventionellen NMR-Strukturbestimmung auch für schlecht lösliche Proben geeignet. Es genügen einfache eindimensionale NMR-Spektren, um den Sekundärstrukturgehalt der Aminosäuresequenz zu bestimmen. Allerdings ist es dabei nicht möglich, eine gut aufgelöste dreidimensionale Struktur zu erhalten.

Das Verfahren beruht auf der Signalintegration in speziellen Bereichen des NMR-Spektrums und ist eng verwandt mit der Auswertung der NH- und H $\alpha$ -chemischen Verschiebungen. Die Vorraussetzungen für die Durchführung einer Sekundärstrukturbestimmung sind Löslichkeit des Peptids, Stabilität bei pH < 6,0 sowie die Kenntnis der Aminosäuresequenz. Zunächst benötigt man je ein identisches eindimensionales <sup>1</sup>H-NMR Spektrum des Peptides gelöst in H<sub>2</sub>O sowie in D<sub>2</sub>O. Dazu bereitet man 2 gleiche Ansätze vor, trocknet sie und löst den einen in 90% H<sub>2</sub>O / 10% D<sub>2</sub>O und den anderen in 99,9% D<sub>2</sub>O auf. Es muss darauf geachtet werden, dass beide NMR-Spektren unter den gleichen Bedingungen aufgezeichnet werden (Temperatur, pH, Anzahl der Scans NS, Auflösung, Spektrale Breite, etc.). Mit dieser Methode lassen sich besonders gut für Peptide mit mehr als 40 Aminosäureresten verlässliche Aussagen über deren Sekundärstrukturgehalt treffen.

Im H<sub>2</sub>O-Spektrum werden Teile des Amidbereiches integriert, während im D<sub>2</sub>O-Spektrum die Integration über Teile des H $\alpha$ -Bereichs läuft. Um sicherzustellen, dass die Signale der Amid-protonen nicht abgeschwächt werden, ist es notwendig, bei niedrigen pH-Werten zu arbeiten und darauf zu achten, dass nur ein schwacher H<sub>2</sub>O-Sättigungspuls verwendet wird. Ebenso sollten die Messungen bei einer Temperatur zwischen 25°C und 35°C durchgeführt werden. Damit ist gewährleistet, dass das HDO-Signal im D<sub>2</sub>O-Spektrum weit genug von den H $\alpha$ -Protonen entfernt liegt.

Statistische Analysen an Referenzproteinen zeigten, dass dem Integral über die Amidprotonen im Bereich zwischen 8,20-9,00 ppm ungefähr 90% der Aminosäurenreste entspricht, die weder in einer  $\alpha$ -Helix noch in einem  $\beta$ -Faltblatt angeordnet sind. Dieser Wert wird mit <C> bezeichnet. Die Integration über den Bereich zwischen 4,85 ppm und 5,90 ppm zeigt die Hälfte der Aminosäuren, die sich in einem  $\beta$ -Faltblatt anordnen. Diesen Wert bezeichnet man mit <B>. Sofern man diese beiden Integrationen korrekt durchführt und skaliert, ist es dadurch möglich, den Anteil der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekundärstrukturelemente zu bestimmen.

Die korrekte Integration und Skalierung ist ausschlaggebend für die Qualität des Endergebnisses. Man muss deshalb die Spektren sehr sorgfältig prozessieren und insbesondere die Basislinie gut korrigieren. Ebenso ist eine angemessene Messdauer zu wählen um ein für die Integration ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten (mind. 50:1). Für die Skalierung der Integrale kann bei kleinen Peptiden ein gut aufgelöstes Einzelsignal ausgewählt werden (z.B. ein isoliertes  $\alpha$ -Proton, ein einzelnes Histidinsignal oder Amidsignal). Bei größeren Peptiden mit schlecht aufgelösten Einzelsignalen wie IRK1 kann man die Skalierung sehr genau durchführen, indem man den gesamten Spektralbereich zwischen 6,0 ppm und 11,0 ppm integriert und diesen Wert mit der Anzahl N<sub>prot</sub> der aromatischen und Amidprotonen des Peptides dividiert. N<sub>prot</sub> berechnet sich wie folgt:

$$N_{prot} = \#R + (2 \cdot \#N) + (2 \cdot \#Q) + (2 \cdot \#H) + (4 \cdot \#Y) + (5 \cdot \#F) + (6 \cdot \#W)$$
(5.1)

mit #R der Anzahl der Aminosäuren des Peptids (außer Prolinen) und #N, #Q, #H, #Y, #F und #W der Anzahl der entsprechenden Aminosäuren in der Peptidsequenz. Für das IRK1-Peptid ergibt sich daraus  $N_{prot} = 179$ .

Die weitere Auswertung der Integrale ist sehr einfach: Nach erfolgter Integration der Spektren erhält man wie beschrieben die Werte <C> und <B> der Integrale. Die Anzahl der Reste #coil ohne klar definierte Struktur (statistisches Knäuel) ist

$$\#coil = \frac{\langle C \rangle}{0.9} \tag{5.2}$$

Der Faktor 0,9 resultiert aus der Messung in 90%  $H_2O / 10\% D_2O$ . Dies bedeutet, dass 10% der Amidprotonen mit dem Lösungsmittel  $D_2O$  austauschen und deshalb nicht im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum beobachtbar sind. Bei anderen  $H_2O/D_2O$ -Verhältnissen muss der

Faktor entsprechend angepasst werden. Die Anzahl der Aminosäuren  $\#\beta$  im  $\beta$ -Faltblattbereich ergibt sich, wie oben beschrieben, aus

$$\#\beta = 2, 0 < B > \tag{5.3}$$

Mit der Gesamtzahl aller Aminosäuren #R im Peptid erhält man die Anzahl der Reste in  $\alpha$ -helikalen Bereichen durch:

$$#\alpha = #R - \#\beta - \#coil \tag{5.4}$$

Mit Gleichung (5.2)-(5.4) errechnet sich dann der relative Sekundärstrukturgehalt des Peptids aus

$$\%\alpha = \frac{\#\alpha}{\#R}, \quad \%\beta = \frac{\#\beta}{\#R}, \quad \%coil = \frac{\#coil}{\#R}$$
(5.5)

### 5.3.2 Probenpräparation und Messbedingungen

Dieses Verfahren wurde an insgesamt 3 unterschiedlichen Proben durchgeführt. Probe 1 und 2 enthielten je 2,6 mg IRK1-Peptid und 17 mg d-SDS. Nach der TFE-Präparation wurde das gefriergetrocknete Pulver mit 0,5 ml 95% H<sub>2</sub>O / 5% D<sub>2</sub>O aufgenommen. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOD oder DCl auf pH 5,5 korrigiert. Als interne Referenz wurden den Proben 5  $\mu$ l 0,01 mM DSS (4,4-Dimethyl-4-silapentan-sulfoxyd) zugesetzt. Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren von Proben 1 und 2 wurden an einem Bruker AMX-500 NMR-Spektrometer aufgenommen (Feldstärke 11,7 T entsprechend v<sub>0</sub> = 500,13 MHz). Die Temperatur betrug 308 K. Die H<sub>2</sub>O-Linie des Lösungsmittels wurde durch eine selektive Einstrahlung vorgesättigt. Um die Probe vollständig ausrelaxieren zu lassen, wurde eine Pause d1 von 5 s zwischen den einzelnen Scans gewählt.

Die Anzahl der Scans NS betrug je 10240 und die Spektrale Breite SW 16,125 ppm. Probe 1 wurde mit 32k Auflösung und exponentieller Filterung fouriertransformiert und danach integriert. Bei Probe 2 wurde vor der Integration eine Streifen-Transformation des Bereichs von 4,0-11,5 ppm mit 64k Auflösung und Gauß-Filterung durchgeführt.

Für Probe 3 wurde ca. 5 mg Peptid mit 10 mg d-SDS in TFE gelöst und getrocknet. Nach dem Lösen in 0,5 ml 90%  $H_2O$  / 10%  $D_2O$  wurden der Probe ebenfalls 5  $\mu$ l 0,01 mM DSS als internen Standard zugesetzt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOD oder DCl auf pH 5,5 eingestellt. Die <sup>1</sup>H NMR Spektren von Probe 3 wurden an

einem Bruker DRX-800 NMR-Spektrometer aufgenommen (Feldstärke 18,7 T entsprechend  $v_0 = 800,13$  MHz). Das stärkere B<sub>0</sub>-Feld des Magneten führt zu einer höheren Auflösung der NMR-Spektren. Die Temperatur betrug 308 K. Die H<sub>2</sub>O-Linie des Lösungsmittels wurde durch eine selektive Einstrahlung vorgesättigt. Um die Probe vollständig auszurelaxieren wurde eine Pause d1 von 5 s zwischen den einzelnen Scans gewählt. Die Anzahl der Scans NS betrug je 1024 und die Spektrale Breite SW 13,019 ppm. Probe 3 wurde mit 32k Auflösung und exponentieller Filterung fouriertransformiert und danach wie beschrieben integriert.



*Bild* 5.10: <sup>1</sup>*H-NMR* Spektren zur 1D-Strukturbestimmung: H<sub>2</sub>O-Spektrum (pH 5,0 T:308K, NS: 2048, SW: 13,02ppm, v<sub>0</sub>=800,13MHz, exponentiell gefiltert).

Auswertung und Prozessierung der Messungen erfolgte auf verschiedenen Computern der Firma SGI (Indy, Indigo2, O2) mit Hilfe der Programme XWINNMR (Firma BRUKER) und AURELIA (Neidig et al., 1995).

### 5.3.3 Ergebnisse

Die ausgewerteten Sekundärstrukturanteile der drei Messungen sind in Tabelle 5.3 wiedergegeben. Es ist zu erkennen, dass die einzelnen Strukturparameter bei allen Experimenten ungefähr die gleiche Größenordnung haben. Im Mittel enthält das IRK1-Peptid folgende Strukturanteile:

27% α-Helices, 50%	β-Faltblatt und 23%	Rest
--------------------	---------------------	------

	Integral H <sub>2</sub> O	Integral D <sub>2</sub> O	%α	%β	%coil
Probe 1	21,2 ±8	23,8 ±7	27 ±13	$50 \pm 15$	23 ±9
Probe 2	19,3 ±7	22,8 ±7	31 ±15	48 ±14	21 ±8
Probe 3	21,5 ±8	24,5 ±6	$23 \pm 10$	52 ±12	25 ±9

Tabelle 5.3: Ergebnisse der 1D-<sup>1</sup>H-NMR Sekundärstrukturbestimmung

Der relativ große Fehler von 20-30% bei der Bestimmung der Integrale zeigt sich entsprechend in einer großen Toleranz der drei Strukturanteile. Die Integration der Spektralbereiche ist sehr sensitiv auf kleine Änderungen der Basislinie des Spektrums. Da die Basislinie manuell korrigiert wurde und die zu integrierenden Signale bei dem IRK1-Peptid nicht sehr intensiv sind, resultiert daraus die große Fehlerbreite. Die automatische Basislinienkorrektur mit dem Programm AURELIA glättet die Basislinie zu stark, so dass die linienverbreiterten Peptidsignale geringer Intensität unterdrückt wurden. Sie konnte deshalb bei dieser quantitativen Analyse nicht verwendet werden.



Bild 5.11: <sup>1</sup>H-NMR Spektren zur 1D-Strukturbestimmung: D<sub>2</sub>O-Spektrum (pH 5,0 T:308K, NS: 2048, SW: 13,02ppm, v<sub>0</sub>=800,13MHz, exponentiell gefiltert).

Die prozentuale Verteilung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt Strukturelementen entspricht überraschenderweise nicht den aus der Sekundärstrukturvorhersage erwarteten Anteilen von 53%  $\alpha$ -Helices, 25%  $\beta$ -Faltblatt und 21% Rest. Das gemessene Verhältnis der beiden Hauptstrukturelemente ist gerade umgekehrt als erwartet. Dies bedeutet, dass sich das IRK1-Porenpeptid in SDS-Micellen nicht wie im IRK1-K<sup>+</sup>-Ionenkanal *in vivo* faltet. Möglicherweise betrifft diese Diskrepanz aber insbesondere die N- und C-terminalen Abschnitte, die aus den 2 großen Transmembranhelices gebildet werden. Strukturelle Änderungen speziell in diesen Membransegmenten sind aufgrund der nicht nativen Lösungsbedingungen in einem H<sub>2</sub>O/SDS-Gemisch leicht vorstellbar und könnten die Sekundärstrukturverhältnisse stark beeinflussen. Die zentrale Porenregion selbst kann dabei dennoch korrekt gefaltet vorliegen.

## 5.4 Sekundärstrukturbestimmung mittels CD-Spektroskopie

Um weitere Strukturinformationen über das Porenpeptid von IRK1 zu erhalten und um die unerwarteten Ergebnisse der 1D-NMR Sekundärstrukturbestimmung zu überprüfen, wurden mit dem Kanalfragment in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Reed am DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) Zirkulardichroismus-Spektren (CD) mit unterschiedlichen Lösungsbedingungen (Peptid- und Micellenkonzentration) aufgenommen.

## 5.4.1 Hintergrund

Der Zirkulardichroismus resultiert aus der Wechselwirkung eines Mediums mit linear polarisiertem Licht. Zum einfacheren Verständnis betrachtet man nach Fresnel das linear polarisierte Licht als Überlagerung zweier gleicher Anteile links- und rechts-zirkular polarisierten Lichts. Optisch aktive Medien besitzen für diese beiden Komponenten verschiedene Brechungsindizes,  $n_l \neq n_r$ , sowie verschiedene Ausbreitungsgeschwindigkeiten  $v_l \neq v_r$ , da n = c/v, und damit verschiedene Winkelgeschwindigkeiten der Projektionen der elektrischen Feldstärkevektoren (Bild 5.12).



Bild 5.12: Überlagerung eines links und rechts zirkular polarisierten Lichtstrahls mit verschiedener Fortpflanzungsgeschwindigkeit. Dargestellt sind Momentaufnahmen zur selben Zeit, aber in größer werdenden Abständen zur Quelle (Mayer, 2000).

Weiterhin besitzt die links- bzw. rechtszirkular polarisierte Komponente einen unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_1 \neq \varepsilon_r$ , d.h. es zeigt Zirkulardichroismus. Die Projektionen der elektrischen Vektoren haben also nicht allein eine unterschiedliche Winkelgeschwindigkeit, sondern auch eine unterschiedliche Länge. Das Licht verlässt das Medium mit elliptischer Polarisation (Bild 5.13).



Bild 5.13: Elliptische Polarisation bei Austritt des Lichts aus einem Medium imAbsorptionsbereich eines optisch aktiven Elektronenüberganges: Die beiden Teilstrahlen sind unterschiedlich geschwächt, der Summenvektor beschreibt eine Ellipse (=Zirkulardichroismus) (Mayer, 2000).

Die Elliptizität  $\Theta$  ist definiert als der Arcustangens des Verhältnisses von kleiner zu großer Halbachse.

$$\Theta = \arctan \frac{b}{a}$$
(5.6)

Da die Transmission T proportional dem Quadrat der Länge des elektrischen Vektors ist, gilt

$$\vec{E} = k \cdot \sqrt{T} \tag{5.7}$$

$$\tan \Theta = \frac{b}{a} = \frac{\sqrt{T_r} - \sqrt{T_l}}{\sqrt{T_r} + \sqrt{T_l}} = \frac{T_r - T_l}{T_r + 2\sqrt{T_r T_l} + T_l}$$
(5.8)

Da der Unterschied zwischen  $T_r$  und  $T_l$  und dementsprechend auch der Winkel  $\Theta$  äußerst klein sind, gilt näherungsweise:

$$\Theta \approx \frac{1}{4} \cdot \frac{\Delta T}{T} [rad]$$
(5.9)

Nach Lambert entspricht dem Logarithmus der Transmission T die Extinktion E und dem Logarithmus der minimal höheren Transmission (T+ $\Delta$ T) die kleinere Extinktion (E- $\Delta$ E). Für kleine  $\Delta$ T erhält man mit einer Taylor-Reihenentwicklung:

$$\Delta E = E_l - E_r = \frac{\Delta T}{T} \cdot \frac{1}{\ln 10}$$
(5.10)

Aus Gleichung (5.9) und Gleichung (5.10) ergibt sich folgende Beziehung zwischen Elliptizität und dem Zirkulardichroismus:

$$\Theta = \frac{2,303 \cdot \Delta E}{4} [rad] \text{ bzw. } \Theta = \frac{360 \cdot 2,303 \cdot \Delta E}{2\pi \cdot 4} = 33,0 \cdot \Delta E[grad]$$
(5.11)

Die Elliptizität ist also proportional zum Zirkulardichroismus.

In der Praxis wird üblicherweise die molare Elliptizität  $[\Theta]_{\lambda}$  angegeben. Es gilt:

$$\left[\Theta\right]_{\lambda}^{T} = \frac{M}{100} \cdot \frac{\Theta}{c \cdot d}$$
(5.12)

Hierbei ist d die Schichtdicke in cm, c die Konzentration in  $g/cm^3$  und M die mittlere Molmasse in g/mol. Aus der  $\lambda$ - bzw. T-Indizierung ist bereits ersichtlich, dass die Elliptizität von der Wellenlänge und der Temperatur abhängt. Die Auftragung des optischen Drehwinkels gegen die Wellenlänge bei konstanter Temperatur wird als CD-Spektrum bezeichnet. Je nachdem ob Brechzahl oder Extinktionskoeffizient der linkszirkular polarisierten Komponente größer oder kleiner sind als die der rechts-zirkular polarisierten Komponente, hat die Elliptizität ein positives oder negatives Vorzeichen (Cotton-Effekt).

Die wichtigste Anwendung der CD Spektroskopie findet sich bei der Strukturbestimmung von Proteinen oder Biopolymeren. Dabei verwendet man UV-Wellenlängen im Bereich von 160-250 nm. Im Vergleich zur NMR oder Röntgenkristallographie genügen hierbei schon minimale Proteinmengen. Proteine sind optisch aktiv, da der  $n \rightarrow \pi^-$  Übergang der Peptidbindung verboten ist. Sein Extinktionskoeffizient wird im wesentlichen über die Symmetrieverzerrung durch die ungleiche Substitution durch N und C bewirkt. Er impliziert eine Ladungsdrehung um die C-O Bindung und damit ein magnetisches Übergangsmoment. Das für das Auftreten optischer Aktivität erforderliche elektrische Moment wird durch die Umgebung induziert. Ebenso wird sein chiroptischer Extinktionskoeffizient durch die Chiralität dieser Symmetrieverzerrung erzeugt. Daher ist die Größe des CD-Effektes eine Funktion der Konformation der Peptidkette. In einfacher Näherung kann man den Zirkulardichroismus eines Proteins bei einer Wellenlänge  $\lambda$  als Summe der CD-Effekte der einzelnen Aminosäuren in ihrer jeweiligen Konformation auffassen:

$$\Theta(\lambda) = \chi_{\alpha} \cdot \Theta_{\alpha}(\lambda) + \chi_{\beta} \cdot \Theta_{\beta}(\lambda) + \chi_{r} \cdot \Theta_{r(\lambda)}$$
(5.13)

 $\chi_{\alpha} \Rightarrow$  Anteil der  $\alpha$ -Helix Konformation  $\chi_{\beta} \Rightarrow$  Anteil der  $\beta$ -Faltblatt-Konformation  $\chi_{r} \Rightarrow$  Anteil restlicher Konformationen (Zufallsknäuel, Schleifen, etc.) mit  $\chi_{\alpha} + \chi_{\beta} + \chi_{r} = 1$ .

Da die Sekundärstrukturelemente in Proteinen charakteristische Elliptizitäten aufweisen, kann man aus dem CD-Spektrum Rückschlüsse über die Verhältnisse der einzelnen Strukturelemente ziehen und daraus den Anteil einzelner Strukturelemente berechnen. Vereinfacht kann man sich die gesamte Elliptizität eines Proteins als Summe der Elliptizitäten der einzelnen Strukturelemente vorstellen. Jede Komponente wird dabei nach ihrer Häufigkeit gewichtet. Im einfachsten Fall sind die drei einzigen möglichen Konformationen die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt und das statistische Knäuel. Selbst bei Einbeziehung weiterer Sekundärstrukturelemente, wie zum Beispiel Schleifen, 3<sub>10</sub>-Helices oder Poly-Prolin-TypIII-Helices, liefert die Strukturvorhersage nur Näherungswerte. Daher sind die Ergebnisse einer solchen Strukturanalysen nicht mit hochaufgelösten 3D-Strukturbestimmungsmethoden wie NMR oder Röntgenkristallographie zu vergleichen. Zur Analyse der CD-Spektren passt man Standartspektren (Bild 5.14) bekannter Sekundärstrukturelemente an die Messkurve an.

Sichere Aussagen lassen sich mit der CD-Spektroskopie über die Existenz einer definierten Struktur, sowie über deren Stabilität gegenüber thermischer oder chemischer Denaturierung machen oder über andere Vorgänge, die mit größeren Konfirmationsänderungen verbunden sind. Problematisch bei diesem Verfahren ist die Bestimmung der Referenzspektren (Bild 5.14) besonders für das Spektrum der "restlichen" Strukturen. In den meisten Betrachtungen zu diesem Thema wird für "restlich" die Struktur eines statistischen Knäuels ("random coil") angenommen. Dies ist natürlich nur als Näherung brauchbar.



Bild 5.14: Referenzspektren für  $\alpha$  - Helix ( $\blacklozenge$ ),  $\beta$  -Faltblatt ( $\Box$ ) und Coil-Bereiche ( $\bullet$ ) (Reed, 1997).

Für die Standardspektren der einzelnen Strukturelemente benutzt man Homopolypeptide, die unter bestimmten Bedingungen eine definierte Struktur einnehmen. Poly-L-Alanin bildet z.B. eine  $\alpha$ -Helix, während Poly-L-Lysin bei saurem pH Wert ein  $\beta$ -Faltblatt und im alkalischen Milieu ein statistisches Knäuel ausbildet. Die Forderung, dass diese nur in einer bestimmten Formation vorliegen, ist aber meist nicht erfüllt. Bei den Standards haben die Sekundärstrukturen quasi unendliche Ausdehnung, während in globulären Proteinen Helices nur wenige Windungen, Faltblätter nur wenige Kettenabschnitte umfassen, so dass End- und Randeffekte zu erwarten sind. Neuerdings sind polymerisierte und cyclisierte Di- und Tetrapeptide als Modelle für den  $\beta$ -Turn eingeführt worden, eine weitverbreitete Hauptkettenkonformation die sich über 4 Aminosäuren erstreckt. Relativ unsicher sind die Daten für statistische Knäuel. Abgesehen davon, dass es experimentell schwer zu verwirklichen ist, repräsentiert es Bereiche in Proteinen, die zwar nicht hoch geordnet, aber auch nicht vollkommen zufällig angeordnet sind. Weitere Referenzparameter extrahiert man aus den bekannten CD-Spektren von Proteinen mit bekannter dreidimensionaler Struktur.

## 5.4.2 Probenpräparation und Messbedingungen

Alle CD-Messungen wurden an einem Jasco Spektropolarimeter mit einer Empfindlichkeit von 10 mdeg/cm bei einer Zeitkonstante von 2,0 s und einer Abtastgeschwindigkeit von 5 nm/min gemessen. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich zwischen 190 bis 240 nm mit einer Spaltbreite von 1,0 mm aufgenommen. Die Proben wurden in verschiedenen Konzentrationen (zwischen 10 und 200 µg Peptid/mL) bei pH 5,5 in 1 ml Wasser gelöst und in einer 1,0 mm dicken dichroitisch neutralen Quarz-Messzellen bei Raumtemperatur gemessen. Die Peptidmenge wurde jeweils durch Aminosäureanalyse bestimmt. Vor jeder Messung wurde das Gerät kalibriert. Die ausgewerteten CD-Spektren wurden mit mindestens vier gleichen Spektren addiert und gemittelt, sowie die Basislinie korrigiert.

Die erhaltenen CD-Spektren wurden mit dem Programm PEPFIT (Reed 1997) an Referenzspektren von Modellpeptiden angepasst. Die Referenzdaten sind auf Peptide und kleine Proteine mit wenigen Strukturelementen optimiert, so dass keine Strukturparameter von großen globulären Proteinen das Ergebnis verfälschen. Da die mit CD-Spektroskopie bestimmten Sekundärstrukturverhältnisse den Mittelwert über alle Konformationen in der Probe wiedergeben, sind quantitative Aussagen bei Peptiden und kleinen Proteinen mit ggf. mehreren Konformationen nur eine Abschätzung und nicht absolute Werte.

## 5.4.3 Ergebnisse

Da die CD-Proben nur relativ geringe Konzentrationen an Protein verlangen (ca. 100  $\mu$ M), wurden erste CD-Messungen vom IRK1-Porenpeptid in SDS/H<sub>2</sub>O-Lösungen durchgeführt. Es wurden drei unterschiedliche Proben hergestellt, um möglichst den geforderten Konzentrationsbereich zu treffen.

Nach ersten Kontrollmessungen an unterschiedlichen SDS/H<sub>2</sub>O-Lösungen ohne Peptid war klar, dass die SDS-Micellen kein Problem für die CD-Messungen darstellten. Die UV-Absorption der Micellen war vernachlässigbar gering und erwartete Streuungsartefakte blieben aus.

Schon nach den ersten Messungen an den Peptidproben stellte sich heraus, dass selbst für CD-Messungen die Peptidkonzentrationen in den SDS/H<sub>2</sub>O-Proben viel zu gering war. Die Spektrenqualität genügte jedoch, um schon folgende wichtige Aussage zu treffen: Das Proteinfragment in den Micellen besitzt einen großen Anteil an Sekundärstrukturelementen!

Um eine höhere Proteinkonzentration zu erhalten, wurde wie für die NMR-Messungen zunächst 4,5 mg Peptid in 90 mL TFE gelöst und später mit einem SDS-H<sub>2</sub>O-Gemisch

versetzt. Nach dem Gefriertrocknen wurde dieses Pulver wieder mit reinem Wasser aufgenommen und in verschiedenen Konzentrationen aliquotiert (50, 100 und 150  $\mu$ g/ml). Eine zweite Charge wurde zuerst in TFA aufgelöst und dann ebenso weiterbehandelt.

Beide Probensets wurden im CD-Spektrometer vermessen (Bild 5.15) und die Kurven mit dem Programm PEPFIT ausgewertet. Da sich alle Kurven unterschiedlicher Peptidkonzentration algebraisch ineinander überführen lassen, konnte eine Aggregation des Peptides ausgeschlossen werden.

Die Spektrenauswertung ergab, dass in den aus TFE präparierten Proben etwas weniger IRK1-Peptid gelöst war als in den TFA-Ansätzen. Die Proteinmenge war in allen Proben für CD-Messungen vollkommen ausreichend. Der Sekundärstrukturanteil in beiden Chargen errechnete sich zu

25% α-Helices, 55% β-Faltblatt, 20% Rest



Bild 5.15: CD-Spektren vom IRK1-Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen. A: 150 µg/ml B: 100 µg/ml C: 50 µg/ml.

Dieses Ergebnis deckt sich innerhalb der Fehlergrenzen mit dem Resultat der NMR-Sekundärstrukturbestimmung (Seite 77). Es bestätigt also den unerwartet geringen Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturelementen und untermauert die Annahme, dass das IRK1-Porenpeptid in SDS-Micellen nicht die in Kaliumkanälen erwartete Konformation einnimmt.

# 5.5 Neue Sequenzvorschläge

Da es trotz aller Bemühungen nicht möglich war, das gefaltete Peptid in ausreichender Konzentration für mehrdimensionale NMR-Experimente in Lösung zu bringen, konnte eine gut aufgelöste Struktur dieser Peptidsequenz mittels NMR-Spektroskopie nicht ermittelt werden.

Am NIH (National Institutes of Health Bethesda, USA) arbeitet Herr Dr. Robert Guy an der Computermodellierung von Ionenkanälen. Von Ihm stammen Modellstrukturen verschiedener Ionenkanäle und anderer Membranproteine (Guy, 1992). Viele Aspekte dieser Simulationen von spannungsgesteuerten Ionenkanälen konnten experimentell bestätigt werden (Durell, 1992). Nach Gesprächen mit Dr. Guy kam die Idee auf, die Struktur der IRK1-Porenregion zu modellieren und gezielt hydrophobe Aminosäuren in den Transmembranhelices M1 und M2 durch hydrophile zu ersetzen, ohne dass die den Kaliumkanalmodellen entnommene Struktur des Peptides in der MD-Simulation verloren geht (Bild 5.4). Die so erhaltene mutierte Sequenz sollte sich wesentlich besser in wässrigem Lösungsmedium lösen und dennoch aussagekräftige NMR-Strukturdaten der möglichst unveränderten Porenregion liefern.

Org. soll sol2	IFCLAFVLSW <b>k</b> FCL <b>e</b> FV <b>ks</b> W <b>e</b> SW	LFFGCVFWLI L <b>e</b> FG <b>k</b> VFW <b>e</b> I L <b>e</b> FG <b>k</b> VFW <b>e</b> I	ALLHGDLDTS A <b>ker</b> GDLDTS A <b>ker</b> GDLDTS	SKVKVSKACV SKVKVSKACV SKVKVSKACV	SEVNSFTAAF SEVNSFTAAF SEVNSFTAAF
sol3	dFeekW	<b>kek</b> GeeFWke	A <b>kk</b> HGDLDTS	SKVKVSKACV	SEVNSFTAAF
sol4	dFeekW	kekGeeFWke	AkkHGDLDTS	SKVKVSKACV	SEVNSFTAAF
	× 116	IIA MI	/		X
Org.	LFLIETQTTI	GYGFRCVTDE	CPIAVFMVVF	QSIVGCIIDA	FIIGA
sol1	LFLIETQTTI	GYGFR <b>s</b> VTDE	CP <b>e</b> AVF <b>k</b> VVe	QSIkGC <b>e</b> ID <b>s</b>	FIKGA <b>e</b> MAK <b>ks</b> KP
sol2	LFLIETQTTI	GYGFR <b>s</b> VTDE	CP <b>e</b> AVF <b>k</b> VV <b>e</b>	QSI <b>k</b> GC <b>e</b> ID <b>s</b>	k
sol3	LFLIETQTTI	GYGFRCVTDE	CP <b>e</b> AV <b>ekVkk</b>	QS <b>ek</b> G <b>skk</b> Dk	
sol4	LF <b>s</b> IETQTTI	GYGFR <b>s</b> VTDE	CP <b>e</b> AV <b>ekVkk</b>	QS <b>ek</b> GC <b>kkDk</b>	
	Pore HS	$5 \rightarrow \rightarrow$	$\leftarrow$	– Helix M2	$\rightarrow$

Bild 5.16: Sequenzvorschläge des IRK1-Membranbereiches mit hydrophilen Aminosäuren. Die Mutationen sind mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet. Die Originalsequenz ist mit "Org." gekennzeichnet.

Robert Guy berechnete daraufhin mehrere neue Sequenzvorschläge (Bild 5.16) für das IRK1-Peptid. Dabei wurden gezielt die hydrophoben Aminosäuren auf den nach außen

gerichteten Transmembranhelixseiten gegen ähnliche hydrophile Aminosäuren ausgetauscht. Jede dieser Mutanten zeigte in den MD-Simulationen nur sehr geringe Abweichungen zu der berechneten Struktur aus der Originalsequenz (Bild 5.4). Peptide mit diesen neuen Sequenzen könnten vermutlich problemlos und ohne Zusatz von SDS-Micellen in H<sub>2</sub>O gelöst werden. Es wäre dann zu erwarten, dass keine Strukturveränderungen durch die Micellen auftreten und dass die Dateninterpretation nicht durch mögliche Störsignale von Micellen erschwert wird.

In den Sequenzvorschlägen bezeichnen die kleinen Buchstaben Positionen, in denen hydrophobe durch polare Aminosäuren ersetzt wurden. Die Sequenz sol2 ist kürzer als sol1, enthält aber dennoch alle Wechselwirkungen mit der Porenregion (H5). Da unklar ist, wie lange die Transmembranelemente wirklich  $\alpha$ -helikal sind (insbesondere bei der verwendeten IRK1-Peptidsequenz), ist der Vorschlag sol2 besser geeignet als sol1. Sol3 sollte noch besser löslich sein, da insbesondere im Bereich der ersten Transmembranhelix (M1) weitere Mutationen eingebaut wurden (91-109). Sol4 zeigt in den Simulationen weniger Wechselwirkungen zu den anderen Untereinheiten des tetrameren Ionenkanals. Dies könnte störende Aggregationen in Lösung verhindern und scheint deshalb der beste Kandidat für ein neues, mutiertes Kanalpeptid zu sein.

р3	GDLDTSSKVK	VSKACVSEVN	SFTAA <b>k</b> lfli	ETQTTIGYGF	R <b>s</b> VTDECP
p2		-S <b>p</b> ACVSE <b>e</b> N	S <b>kdsek</b> LF <b>se</b>	ETQTTIGYGF	R <b>ke</b> TDEC <b>k</b>
p1		-S <b>p</b> ACVSEVN	SF <b>de</b> AkLFsI	ETQTTIGYGF	R <b>s</b> VTDECP
Org.	GDLDTSSKVK	VSKACVSEVN	SFTAAFLFLI	ETQTTIGYGF	RCVTDECP

Bild 5.17: Verkürzte Sequenzvorschläge der IRK1-Porenregion. Die Mutationen sind mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet. Die Originalsequenz ist mit "Org." gekennzeichnet.

Weitere Vorschläge gab es für verkürzte Peptide, die nur dem Porenabschnitt entsprechen (Bild 5.17). Diese sind im Vergleich zur Originalsequenz an zwei Abschnitten mutiert worden: Teile der extrazellulären Schleife bleiben Teil der neuen Sequenz (122-133) und einige hydrophobe Reste sind gegen hydrophile ausgetauscht worden. Um zu vermeiden, dass die in den Simulationsläufen vorhandene Cysteinbrücke in der Pore sich falsch ausbildet, wurde Cystein152 zu einem Serin bzw. Lysin mutiert. P1 und p2 sind die kürzesten Sequenzen, die die erwünschte Disulfidbrücke ausbilden und die Porenstruktur wiedergeben.

Direkt zu Beginn der p1- und p2-Sequenz wird eine α-Helix erwartet. Deshalb wurde in p1 und p2 Lysin123 zu einem Prolin mutiert, das die Helixbildung stabilisiert. Die Mutationen am Anfang des Porenbereichs zu negativ geladenen Aminosäuren sollen die Helixbildung und den Kontakt zu Arginin151 am Ende der Porensequenz verstärken. Ebenfalls wurden in p1 zwei Aminosäuren mutiert, die im kompletten Kanal nicht zugänglich sind, aber in einem kurzen Peptid dem Lösungsmittel ausgesetzt sind. P2 ist ein nach den gleichen Kriterien stärker mutierter Vorschlag als p1, der sich noch besser

in Wasser lösen sollte. P2 besitzt deshalb weitere Mutationen mit hydrophilen Aminosäuren. P3 hat im Unterschied zu p1 und p2 am Anfang einen längeren Abschnitt der extrazellulären Schleife (111-133). Der Beginn des Porenbereiches wurde bei p3 nicht so stark verändert, da dieser Vorschlag am Anfang ein Aspartat (112) enthält, welches mit dem N-Terminus und mit dem konservierten Arginin wechselwirkt. Dieser längere Vorschlag sollte das Peptid ebenfalls löslicher machen und führt zusätzlich aufgrund der Länge zu einer stabileren Faltung als bei p1 und p2.

Leider konnte bis zum Ende dieser Arbeit keine der vorgeschlagenen Sequenzen erfolgreich synthetisiert werden. Insbesondere die favorisierten kurzen Vorschläge p1 und p3 (Bild 5.17) machten große Probleme während der Peptidsynthese. Dieser sehr interessante neue Ansatz, der auch eine neue Methode für andere Membranproteine sein könnte, konnte somit nicht weiter verfolgt werden.

## 5.6 Diskussion

Das 95 Aminosäuren lange Porenfragment des IRK1-Kaliumkanals verhinderte aufgrund seiner stark hydrophoben Eigenschaft eine vollständige dreidimensionale Strukturanalyse durch mehrdimensionale NMR-Spektroskopie in wässriger Lösung. Es gelang nicht, Lösungen mit ausreichender Proteinkonzentration für solche Experimente zu erzeugen.

Jedoch war es durch den Einsatz eines speziellen Präparationsverfahrens erstmals gelungen, signifikante Mengen des Kanalpeptids in SDS-Micellen einzuschleusen und den Sekundärstrukturgehalt des Peptides mittels NMR- und CD-Spektroskopie zu bestimmen.

Dabei wurden mit beiden Methoden ein geringer  $\alpha$ -helikaler Anteil der Peptidsequenz von nur ca. 26% und ein hoher  $\beta$ -Faltblattanteil von ca. 52% beobachtet. Dieses Verhältnis der beiden Strukturparameter deckt sich überraschenderweise nicht mit dem aus Sequenzanalysen und von anderen Membranproteinen erwarteten (und durch die Kristallstruktur eines Kaliumkanals mittlerweile bestätigten) Vorkommen der beiden Sekundärstrukturen. Das Kaliumkanalpeptid hat zumindest in SDS-Micellen in wässriger Lösung eine signifikant andere Struktur als *in vivo*. Ob sich dieser Unterschied auf die gesamte Sequenz erstreckt, oder nur die beiden C- und N-terminalen Membranhelices betrifft, konnte mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht geklärt werden. Möglicherweise besitzt die zentrale Porenregion des IRK1-Peptides ihre natürliche Faltung und steht dadurch weiteren Untersuchungen offen.

Es ist nicht auszuschließen, dass dieses ungewöhnliche Sekundärstrukturverhältnis des Porenpeptides auf die fehlerhafte Peptidsynthese zurückzuführen ist. Schon Punktmutationen in Proteinen können sowohl deren Struktur als auch die Funktion stark beeinflussen. Erst eine neue Untersuchung der korrekten Aminosäuresequenz wird klären können, ob die Peptidfaltung die Modellannahmen bestätigt. Da bekannt ist, dass die Struktur von Membranproteinen stark von der Lipidzusammensetzung der Membran selbst abhängt (Doak et al., 1996), ist es gut möglich, das nur teilweise oder falsch in Micellen eingebettete Peptide für die Existenz mehrerer Peptidpopulationen mit unterschiedlichen Konformationen verantwortlich sind. Die beobachteten Sekundärstrukturen wären dann sowohl in der NMR, als auch in der CD-Spektroskopie nur Mittelwerte aus diesen Überlagerungen.

Möglicherweise bilden sich auch die transmembranen  $\alpha$ -Helices nicht ohne weiteres alleine, sondern erst zusammen mit dem Rest des Proteins (Popot und Engelmann, 1990; Bormann und Engelmann, 1992). Dies würde bedeuten, das das Peptid ohne seine natürliche Membranumgebung *in vivo* und ohne komplette Proteinsequenz keine native Struktur annimmt.

## 5.7 Ausblick

Nur durch eine zukünftige vollständige 3D-NMR Strukturanalyse des Peptids in Micellen ließen sich diese Fragen endgültig klären. Sobald Spektrometer mit stärkeren Feldern oder Kryo-Probenköpfe mit wesentlich verbesserter Signalempfindlichkeit zur Verfügung stehen, ist es sicherlich möglich, eine zumindest teilweise Zuordnung der Aminosäuresequenz zu erhalten und eine detaillierte Strukturanalyse vorzunehmen.

Alternativ zu den benutzten SDS-Micellen könnte man auch einen Ansatz mit DMPC (Dimyristolphosphatcholine) und CHAPSO (ein zwitterionisches Salz-Derivat) versuchen (Sanders et al., 1995). DMPC bildet in Wasser über einen weiten Konzentrationsbereich besonders viele Bilayer-Fragmente aus, welche durch CHAPSO stabilisiert werden.

Da aber in der Zwischenzeit die 3D-Struktur eines K<sup>+</sup>-Ionenkanals (KcsA, Fragment 23-119) komplett durch Röntgenkristallstrukturanalyse in atomarer Auflösung bestimmt wurde, sind weitergehende Experimente am IRK1-Peptid z.Zt. nicht mehr von Interesse.

Diese Kristallstruktur weist eine sehr hohe Übereinstimmung mit den Daten der IRK1-Proteinanalyse und dem berechneten Kaliumkanalmodell von Dr. Guy auf. Der große  $\alpha$ helikale Sekundärstrukturgehalt, der so typisch für Membranproteine ist, wurde dabei bestätigt. Jede Untereinheit besitzt die beiden vorrausgesagten Transmembranhelices, sowie eine Porenregion, die aus einer kurzen Porenhelix und einer Schlaufe besteht. Das Porenelement ist nahe der extrazellulären Membranseite mittig um die Kanalöffnung angeordnet. Die Porenhelix hat viele Kontakte zu den drei anderen Tetrameren und stabilisiert so den Kanal. Die Pore selbst hat einen Durchmesser von nur 1,3 Å und lässt nur die in der Größe passenden K<sup>+</sup>-Ionen passieren. Kleinere Ionen werden elektrostatisch abgeblockt (Doyle et al., 1998).

Auch von weiteren Untereinheiten von Ionenkanälen sind mittlerweile Strukturen aufgeklärt worden. So konnte am Salk Institut (Kreusch, 1998) die Kristallstruktur der Tetramerisierungsdomäne des *Shaker*-K<sup>+</sup>-Kanals durch Röntgenbeugungsuntersuchungen mit einer Auflösung von 1,55 Å bestimmt werden. Diese Domäne ist zwischen dem flexiblen Ballpeptid und den Transmembranhelices angeordnet (Aminosäuren 56-196) und die Sequenz ist hoch konserviert. Nach diesen Ergebnissen bildet schon dieser Sequenzabschnitt alleine eine 4-fache Symmetrie aus, die eine ca. 20 Å lange Pore erzeugt. Dieser enge Kanal ist eindeutig Teil des Membrandurchgangs. Durch weitere Untersuchungen an spezifischen Mutanten wird man in Zukunft mehr über die genaue Funktionsweise aussagen können.

# 6 t<sub>1</sub>-Rauschbefreiung

# 6.1 Hintergrund

Unter dem Begriff t<sub>1</sub>-Rauschen versteht man spektrale Artefakte, die durch Diskontinuitäten im Zeitsignal, d.h. den Rohdaten, erzeugt werden (Bild 6.1). Solche Störungen werden durch Instabilitäten in der Spektrometerhardware oder aber auch aufgrund externer Unstetigkeiten wie z.B. Temperaturschwankungen oder Magnetfeldstörungen während der Messung verursacht.



Bild 6.1: Beispiel eines NOESY-Spektrums mit starkem t<sub>1</sub>-Rauschen.

Aufgrund der oft langen Messzeiten bei mehrdimensionalen NMR-Experimenten lassen sich solche Störungen nur schwer vermeiden. Dadurch werden häufig wichtige Signale im NMR-Spektrum verdeckt. Die bisherigen Möglichkeiten zur Artefaktreduktion beschränken sich auf geeignete Filterung der Daten vor der Fouriertransformation oder Nachbearbeitung der transformierten Spektren und sind nicht in der Lage, diese Störungen wirkungsvoll zu unterdrücken (Brissac et al., 1995).

In dieser Arbeit wurde ein neuer Ansatz zur Reduktion dieser störenden Artefakte in der Zeitdomäne entwickelt (d.h. vor der Fouriertransformation der NMR-Daten). Dieses sogenannte  $t_1$ -Rauschen lässt sich in der Zeitdomäne als Modulation der Basisebene entlang der Zeit-Achse veranschaulichen. Diese Modulation verläuft periodisch, so dass nach der Fouriertransformation immer an der gleiche Frequenz  $\omega_2$  Artefakte auftreten.

Ein zweidimensionales NMR-Experiment basiert auf einer Abfolge von vier Zeitintervallen: Präparation, Evolution, Mischzeit und Detektion (Bild 6.2). In der Präparationszeit werden die vorhandenen Kernspins für das Experiment vorbereitet, sei es z.B. durch Anwendung eines Entkopplungspulses oder einfach durch einen 90° Anregungspulses. In der Evolutionszeit t<sub>1</sub> entwickelt sich das Spinsystem unter der Wechselwirkung der Kernspins untereinander. Während der Mischphase t<sub>M</sub> kann der Kohärenztransfer oder Polarisierungstransfer stattfinden und die Magnetisierung wird in detektierbare Transversalmagnetisierung umgewandelt. In der anschließenden Detektionszeit t<sub>2</sub> wird diese transversale Magnetisierung als FID, wie im eindimensionalen Fall, in äquidistanten Abständen  $\Delta t_2$  digital detektiert und abgespeichert.



Bild 6.2: Zeitablauf eines 2D-NMR Experimentes (Günther, 1992)

Der geschilderte Ablauf wird erst dann zu einem zweidimensionalen NMR-Experiment, wenn man in einer Serie von Einzelexperimenten die Evolutionszeit  $t_1$  systematisch um einen festen Betrag  $\Delta t_1$  erhöht. Das zu jedem  $t_1$  Wert gehörige Spektrum wird getrennt abgespeichert. Nach einer ersten Fouriertransformation bezüglich  $t_2$  erhält man in der Frequenzdomäne  $F_2$  eine Folge von eindimensionalen Spektren mit einer periodischen Modulation der Signalamplitude oder Signalphase. Die Daten in den einzelnen Spalten werden wieder als ein FID betrachtet und man erhält nach einer weiteren Fouriertransformation in  $t_1$ -Richtung ein zweidimensionales Spektrum mit den gewünschten Informationen aus der Evolutionszeit.

Ein zweidimensionales NMR-Experiment ist experimentell also nichts anderes als eine Abfolge von meist einigen hundert eindimensionalen Experimenten (Scans) und dauert gewöhnlich mehrere Stunden (meist 512-1024 Scans in t<sub>2</sub>). Ein einzelner Scan dauert dabei nur einige Sekunden bis wenige Minuten. Da die Signalmodulation durch die Störungen in der Größenordnung der Messzeit liegt, also im Bereich von Stunden, kann ein einzelner Scan als praktisch rauschfrei angesehen werden.

### 6.1.1 Symmetrie in zweidimensionalen NMR - Spektren

Eine Haupteigenschaft der am häufigsten benutzten zweidimensionalen NMR-Spektren wie TOCSY, COSY und NOESY ist die globale Symmetrie in bezug auf die Hauptdiagonale,  $|\omega_1| = |\omega_2|$ . 2D-NMR-Spektren sind genau dann spiegelsymmetrisch zur Hauptdiagonalen, wenn die Mischsequenz invariant gegenüber der Umkehr der Operationen, also der Vertauschung der Pulsreihenfolge, mit gleichzeitigem Vorzeichenwechsel aller Pulsphasen ist (Boentges et al., 1989). Man spricht von TPR-Invarianz ("Time and Phase Reversal"). Griesinger (1987) konnte zeigen, dass die TPR-Invarianz für die oben genannten zweidimensionalen Pulssequenzen gilt. 2D-HSQC-Experimente, wie sie bei <sup>15</sup>N bzw. <sup>13</sup>C markierten Proteinen eingesetzt werden, erfüllen die TPR Bedingung nicht. Diese augenscheinliche Symmetrie der Spektren in der Frequenzdomäne wurde schon in anderen Ansätzen zur computergestützten Verbesserung der Spektrenqualität ausgenutzt (Baumann et al., 1981; Glaser et al., 1986). Aufgrund der Korrekturrechnungen in der Frequenzdomäne leiden diese Ansätze jedoch unter erhebliche Problemen, wie z.B. die mangelnde Erkennung von Signalen unter dem Rauschen oder die Zerstörung der Linienformen. Dadurch werden häufig weitere Artefakte erzeugt oder wichtige Signale nicht erkannt.

Ein neuer Ansatz zur Signalverbesserung ist es, die Symmetrie der Rohdaten in der Zeitdomäne, also vor der Fouriertransformation zu nutzen. Denn auch dort wird die Symmetrie der Rohdaten durch Artefakte wie dem t<sub>1</sub>-Rauschen gebrochen.

### 6.1.2 Äquivalenz von Zeit- und Frequenzdomäne

Die Äquivalenz zwischen der Zeit- und der Frequenzdomäne ist ein wesentlicher Bestandteil des Prinzips der Fourier-NMR-Spektroskopie. Beide Domänen können für Manipulation und Darstellung der Daten dienen und mehrere Dimensionen umfassen.

Sie enthalten jeweils die gleiche physikalische Information, nur eben in einer anderer Darstellungsform. So kann man je nach Bedarf die eine oder die andere Ansicht wählen. Die NMR-Daten werden vom Spektrometer als FID in der Zeitdomäne aufgenommen. Da das menschliche Auge und Gehirn sehr viel besser in der Lage sind, ein Spektrum in der Frequenzdomäne zu verstehen, als die Informationen der Zeitdomäne, benutzt man ausschließlich die Frequenzdarstellung zur Visualisierung der Daten (Bild 6.3).



Bild 6.3: Beispiel eines simulierten Spektrums bestehend aus zwei Signalen in der Frequenzdomäne (links) und in der Zeitdomäne (rechts). Beide Darstellungsformen sind symmetrisch zur Hauptdiagonalen und haben den gleichen Informationsgehalt.

### 6.1.3 Die hyperkomplexe Fouriertransformation

Die Verbindung zwischen der Zeit- und der Frequenzdomäne wird durch die Fouriertransformation hergestellt. Durch ein Paar Fouriertransformationen wird eine Funktion s(t) in der Zeitdomäne eindeutig mit der Funktion S(f) in der Frequenzdomäne verknüpft:

$$S(\omega) = \int s(t)e^{-i\omega t} dt$$
(6.1)

$$s(t) = \int S(\omega) e^{+i\omega t} \,\mathrm{d}\omega \tag{6.2}$$

Die vorwärtsgerichtete Transformation aus der Zeit- in die Frequenzdomäne wird in jeder NMR-Software zur Erzeugung der Spektren genutzt.

Die gebräuchlichste NMR-Aufnahmetechnik ist die sequentielle, phasenempfindliche Signaldetektion. Für zweidimensionale Spektren ist dieses Verfahren unter dem Begriff TPPI (time proportional phase increments) von Marion et al. (1993) weiterentwickelt worden. Es erlaubt eine phasenempfindliche Aufnahme sowohl in  $t_2$ - als auch in  $t_1$ -Richtung. Für die Prozessierung des Zeitsignals wird anstelle der einfachen reellen Fouriertransformation nun eine komplexe Fouriertransformation benötigt. Für die 2D-NMR hat man die zweidimensionale, hyperkomplexe Fouriertransformation eingeführt (Ernst et al., 1987). Dadurch ist es möglich die Phasenkorrektur, die Mischung von reellen und imaginären Anteilen, für beide Richtungen unabhängig voneinander durchzuführen. Die hyperkomplexe 2D-Fouriertransformation unterscheidet sich von der komplexen durch die Verwendung zweier unabhängiger imaginärer Einheiten *i* und *j*. Für das vierkomponentige Zeitsignal <sup>4</sup>s(t\_1,t\_2) gilt bei phasenempfindlicher Aufnahme in t<sub>1</sub> und t<sub>2</sub>:

$${}^{4}\mathbf{s}(t_{1},t_{2}) = \mathbf{s}^{\text{rr}}(t_{1},t_{2}) + i \, \mathbf{s}^{\text{ri}}(t_{1},t_{2}) + j \, \mathbf{s}^{\text{jr}}(t_{1},t_{2}) + i j \, \mathbf{s}^{\text{ji}}(t_{1},t_{2})$$
(6.3)

mit  $i^2 = j^2 = -1$ 

Die hyperkomplexe Fouriertransformation

$$S(\omega_1, \omega_2) = \int dt_1 \ e^{-i\omega_1 t_1} \int dt_2 \ e^{-j\omega_2 t_1}$$
(6.4)

überführt dieses Signal in eine vierkomponentige Resonanzlinienfunktion

$${}^{4}\mathbf{S}(\boldsymbol{\omega}_{1},\boldsymbol{\omega}_{2}) = \mathbf{S}^{\mathrm{rr}}(\boldsymbol{\omega}_{1},\boldsymbol{\omega}_{2}) + i\,\mathbf{S}^{\mathrm{ri}}(\boldsymbol{\omega}_{1},\boldsymbol{\omega}_{2}) + j\,\mathbf{S}^{\mathrm{jr}}(\boldsymbol{\omega}_{1},\boldsymbol{\omega}_{2}) + ij\,\mathbf{S}^{\mathrm{ji}}(\boldsymbol{\omega}_{1},\boldsymbol{\omega}_{2})$$
(6.5)

Unter der Vorraussetzung, dass der Realteil des Spektrums symmetrisch bezüglich der Hauptdiagonalen ist, d.h.

$$\mathbf{S}^{\mathrm{rr}}(\boldsymbol{\omega}_1, \boldsymbol{\omega}_2) = \mathbf{S}^{\mathrm{rr}}(\boldsymbol{\omega}_2, \boldsymbol{\omega}_1) \tag{6.6}$$

gilt für die anderen Komponenten des Spektrums  $S^{ri}(\omega_1, \omega_2)$ ,  $S^{jr}(\omega_1, \omega_2)$  und  $S^{ji}(\omega_1, \omega_2)$ , die mit dem Realteil  $S^{rr}(\omega_1, \omega_2)$  über die Kramers-Kronig-Relation verknüpft sind (Abragam, 1961), folgende Symmetrie:

$$\mathbf{S}^{\mathrm{ri}}(\omega_{1},\omega_{2}) = \mathbf{S}^{\mathrm{jr}}(\omega_{2},\omega_{1})$$
  

$$\mathbf{S}^{\mathrm{jr}}(\omega_{1},\omega_{2}) = \mathbf{S}^{\mathrm{ri}}(\omega_{2},\omega_{1})$$
  

$$\mathbf{S}^{\mathrm{ji}}(\omega_{1},\omega_{2}) = \mathbf{S}^{\mathrm{ji}}(\omega_{2},\omega_{1})$$
  
(6.7)

Aufgrund der Linearität der Fouriertransformation gelten auch für die Komponenten des Zeitsignals die Beziehungen

$$\mathbf{s}^{rr}(t_{1},t_{2}) = \mathbf{s}^{rr}(t_{2},t_{1})$$

$$\mathbf{s}^{ri}(t_{1},t_{2}) = \mathbf{s}^{jr}(t_{2},t_{1})$$

$$\mathbf{s}^{jr}(t_{1},t_{2}) = \mathbf{s}^{ri}(t_{2},t_{1})$$

$$\mathbf{s}^{ji}(t_{1},t_{2}) = \mathbf{s}^{ji}(t_{2},t_{1})$$
(6.8)

Die globale Symmetrie in der Frequenzdomäne eines 2D-NMR-Spektrums spiegelt sich somit durch die Fouriertransformation auch in der Zeitdomäne wieder. D.h. der aufgenommene Zeitdatensatz ist ebenfalls symmetrisch bezüglich der Hauptdiagonalen. Diese Symmetrie der Zeitdomäne kann also dafür benutzt werden, Symmetriestörungen durch  $t_1$ -Rauschartefakte zu korrigieren.

## 6.2 Lösungsansatz

Der Lösungsansatz für eine Rauschbefreiung durch Symmetrisierung in der Zeitdomäne stellt sich wie folgt dar: Aufgrund der Symmetrie der Zeitdaten im ungestörten Fall sollte man zu jedem Wert des Scans *i* entsprechende Werte in der Spalte *i* finden (Bild 6.4).

Für den normalen Fall mit  $t_1$ -Instabilitäten bedeutet dies, dass die Werte jeder Spalte *i* mit einem  $t_1$ -abhängigen Rauschen überlagert sind, d.h.

Spalte (*i*) = Scan (*i*) \* Rauschen(
$$t_1$$
)



Bild 6.4: Symboldarstellung eines idealen symmetrischen Zeitdatensatzes. Die einzelnen Scans in t<sub>2</sub> werden durch horizontale Linien repräsentiert. Die Werte jedes Scans i findet man in der Reihe i wieder.

Das zeitliche Rauschprofil während einer Messung ist also:

$$Rauschen (t_1) = Spalte(i) / Scan(i)$$
(6.10)

Wenn man diesen Rauschverlauf in  $t_1$  nach Gleichung (6.10) bestimmt, sollte man einen rauschfreien Datensatz erhalten, indem man alle Spalten *i* mit diesem Profil normiert.

$$Spalte(t_1)_{NEU} = Spalte(i) / Rauschen (i)$$
 (6.11)

Die Rauschmodulation der FIDs wird somit vollständig unterdrückt.

Dies macht genau die neuentwickelte Software PNORM (Anhang 8.5.3). Es benötigt als Eingabefile einen symmetrischen, phasenkorrigierten Datensatz, bestimmt daraus das t1-Rauschprofil, korrigiert damit alle Scans und speichert das Ergebnis als neuen Datensatz ab.

(6.9)

### 6.2.1 Material und Methode

Das hier beschriebene Zeitdomänenverfahren zur t<sub>1</sub>-Rauschunterdrückung wurde in der Programmiersprache C (Kernighan et al., 1978) unter UNIX auf einem X32-Computer (Fa. Bruker) entwickelt. Die experimentellen Daten, die in diesem Kapitel verwendet werden, wurden auf Bruker NMR-Spektrometern aufgenommen. Die Spektrometer arbeiten bei einer Feldstärke des statischen Magnetfeldes B<sub>0</sub> von 11,7 T bzw. 18,7 T, entsprechend 500,13 MHz bzw. 800,13 MHz <sup>1</sup>H-Lamorfrequenz. Die herkömmliche Spektrenverarbeitung, wie Fouriertransformation, Phasenkorrektur und Darstellung, wurde mit dem Programmpaket UXNMR (Fa. Bruker) durchgeführt. Die Vorbereitung der experimentellen Daten in der Frequenzdomäne wurde ebenfalls mit UXNMR durchgeführt. Die selbstentwickelten Programme sind mit den Dateiformaten für Zeitdaten, Spektren und Parameter hierzu voll kompatibel.

Um die Wirkung des Zeitdomänenverfahrens objektiv beurteilen zu können, wurde es zuerst an simulierten Datensätzen getestet. Dafür stand das Simulationsprogramm ZSIM zur Verfügung (Beneike, 1994). Damit ist es möglich, einen zweidimensionalen Zeitdatensatz mit lorentzförmigen Resonanzsignalen zu erzeugen. Sämtliche spektralen Parameter, die bei der Verarbeitung experimenteller Spektren eine Rolle spielen, können eingestellt werden. Dazu gehören die Spektrometerfrequenz SF, die spektralen Breiten SW<sub>1</sub> und SW<sub>2</sub>, die Datensatzdimensionen TD<sub>1</sub> und TD<sub>2</sub>, die Nullpunkte der chemischen Verschiebung, sowie die Fouriertransformationsparameter in t<sub>1</sub>- und t<sub>2</sub>-Richtung. Die zu erzeugenden Resonanzsignale werden vom Benutzer in einer Liste mit Amplitude und chemischen Verschiebungen vorgegeben. Dieser simulierte Zeitdatensatz kann dann wie ein experimenteller Datensatz mit dem Programmpaket UXNMR weiterverarbeitet werden. Nach einer zweidimensionalen, hyperkomplexen Fouriertransformation erhält man ein gewohntes 2D-Spektrum.

Für eine möglichst einfache Handhabung der Zeitdaten, ist es für die Symmetrie in der Zeitdomäne erforderlich, dass in beiden Akquisitionsrichtungen t<sub>1</sub> und t<sub>2</sub> simultan aufgenommene Daten vorliegen. Dies bedeutet, dass Real- und Imaginärteil eines komplexen Datenpunktes bei der Aufnahme zur gleichen Zeit abgetastet werden. Bei der gebräuchlicheren Alternative, der sequentiellen Quadraturdetektion, wird der Imaginärteil um einen halben Zeitschritt versetzt detektiert. Die Spektren für beide Aufnahmeverfahren sind natürlich identisch, d.h. die sequentiellen und simultanen Zeitdaten stellen nur zwei verschiedene Aufzeichnungsmethoden der aus dem NMR-Spektrometer gewonnenen physikalischen Informationen dar. Im Verlauf dieser Arbeit wurde folgender, einfacher Weg gefunden, die auf dem Spektrometer meist sequentiell gemessenen und vom Simulationsprogramm sequentiell erzeugten Datensätze mittels UXNMR in die gewünschten Simultandaten zu transformieren (die UXNMR Befehle sind *kursiv* dargestellt, erforderliche FT\_mod Parameter in Klammern):

- I. Transformation der sequentiellen Zeitdaten in die Frequenzdomäne: xfb (fqr/fsr)
- II. Rücktransformation der prozessierten Daten in die simultane Zeitdomäne: *xtrfp* (iqc/iqc)
- III. Erzeugung eines neuen (simultanen) Datensatzes: genser
- IV. Transformation der simultanen Zeitdaten in die Frequenzdomäne: xtrf (fqc/fqc)

Danach kann mit dem neuen Datensatz wie gewohnt weitergearbeitet werden.

Unabhängig von den Eingangs erwähnten Instabilitäten, die die t<sub>1</sub>-Rauschsteifen erzeugen, treten in der Regel weitere experimentell verursachte Symmetriestörungen auf. Durch die apparativ bedingte Wartezeit zwischen dem Detektionsimpuls und dem Beginn der Abtastung des Zeitsignals (FID), sowie durch interne Laufzeitunterschiede in der Aufnahmeelektronik und möglichen Gleichlaufschwankungen am phasenempfindlichen Gleichrichter werden Phasenfehler erzeugt. Das bedeutet, dass die Nutzsignale nicht in reiner Absorption, sondern in Mischphase vorliegen. Durch die standardmäßige Verwendung der hyperkomplexen Fouriertransformation, bei der Real- und Imaginärteile der Transformierten für beide Aufnahmerichtungen getrennt gebildet werden, können die Spektren in beiden Frequenzdimensionen mit UXNMR phasenkorrigiert werden.

Ein weiteres häufiges Artefakt, welches die Symmetrie eines Spektrums stören kann, ist die Modulation der Basisebene in der Frequenzdomäne (Marion et al., 1988). Auch dies kann heute automatisch oder interaktiv mit der Basislinienkorrektur von UXNMR gut korrigiert werden.

Um das neue Rauschbefreiungsverfahren an simulierten Datensätzen testen zu können, ist es notwendig diese synthetischen Daten definiert mit  $t_1$ -Rauschen zu versehen. Dafür wurde das Programm ZNOISE (Anhang 8.5.1) entwickelt. Mit der Software wird  $t_1$ -Rauschen auf einen beliebigen zweidimensionalen Datensatzes appliziert. Dabei wird jeder Scan mit einem bestimmten Rauschwert multipliziert. Da Temperatur- und Magnetfeldschwankungen proportional zu

$$e^{-\frac{\omega B_0}{kT}} \tag{6.12}$$

sind, müssen die verwendeten Rauschwerte gaußverteilt sein. Ihre Stärke ist mit dem Parameter durch einen Skalierungsfaktor f (0 < f < 1) einstellbar. Der Wert für die f wurde normalerweise auf 0,1 gesetzt. Dies erzeugt deutliche t<sub>1</sub>-Rauschstreifen in den simulierten Spektren.

Zur Rauschbefreiung der simulierten und experimentellen Datensätze wurde das selbstentwickelte Programm ZNORM (Anhang 8.5.2) eingesetzt. Als Eingabedatei benötigt es einen phasenkorrigierten, simultanen Datensatz mit gleicher Zahl von Datenpunkten in beiden Dimensionen ( $TD_2=TD_1$ ). Die Korrekturwerte werden aus dem ersten Scan und der ersten Spalte berechnet und das Datenfile anschließend zeilenweise korrigiert. Es ist geeignet Daten in unlimitierter Größe zu behandeln. Die Ausgabe erfolgt in einen neuen Datensatz.

Beide Programme wurden schließlich zusammengefasst. Das Programm PNORM ist in der Lage, sowohl Spektren mit gaußverteiltem Rauschen zu versehen, als auch die Symmetrisierung in der Zeitdomäne durchzuführen.

# 6.3 Ergebnisse

## 6.3.1 Simulierte Daten

Bild 6.5 zeigt die Funktion der Rauschbefreiung auf einen simulierten Datensatz mit NOESY-Signalen. Das Spektrum oben links mit 512\*512 Datenpunkten besteht aus 1000 Signalen, deren Position und Intensität aus einem gemessenen Spektrum (Histidine-containing Protein, Goerler, 1998) entnommen wurden. Die Symmetrie zur Hauptdiagonalen ist offensichtlich. Die Dimensionierung der Datenmatrizen und der experimentellen Parameter entspricht der einer realen 2D-Messung, wie sie für die Strukturaufklärung von Proteinen in Lösung durchgeführt werden. Auf eine Filterung vor der Fouriertransformation wurde verzichtet.

Rechts oben die Darstellung des gleichen Spektrums als Konturdiagramm der Zeitdomäne. Auch hier kann man die globale Symmetrie des Zeitdatensatzes zur Hauptdiagonalen gut erkennen.

Das Bild in der Mitte links zeigt das Spektrum, nachdem mit PNORM gleichmäßig starkes, gaußverteiltes t<sub>1</sub>-Rauschen zugefügt wurde. Sehr starke vertikale Rauschstreifen verdecken fast alle Signale Dies ist deutlich mehr, als im experimentellen Fall an Störungen zu erwarten ist. Auch in der Zeitdomäne (Mitte rechts) ist die Störung der Symmetrie klar zu erkennen.

Nach der Anwendung von PNORM gleicht das korrigierte Spektrum (untere Reihe) in der Frequenz- wie in der Zeitdomäne wieder dem Ausgangsspektrum. Auch bei genauer Analyse zeigen sich keinerlei neue Artefakte oder Phasenfehler. Alle Signale sind zu erkennen und die Linienform bleibt vollständig intakt.



Bild 6.5: Rauschbefreiung an simulierten Daten. A: Simulierter symmetrischer Datensatz aus 1000 Signalen (TD: 512x512). B: Darstellung der Zeitdomäne, die Symmetrie ist deutlich zu erkennen.
C: Simulierter Datensatz mit starkem t<sub>1</sub>-Rauschen. D: Zeitdomäne, die Symmetrie ist nicht mehr vollständig erhalten. E und F: Mit PNORM rauschbefreiter Datensatz und seine Zeitdomäne.

### 6.3.2 Erste Experimentelle Daten

In Bild 6.6 ist die Anwendung von PNORM zur Rauschbefreiung an einem gemessenen Datensatz dargestellt. Es handelt sich um ein NOESY-Spektrum des *Shaker*-Peptids in H<sub>2</sub>O (NS: 32, DS: 8, 4096\*1024 Scans,  $v_0$ :500,13 MHz, qsim). Das linke Spektrum wurde mit UXNMR in einen symmetrischen Datensatz mit TD=512\*512 Datenpunkten umgewandelt.



Bild 6.6: Rauschbefreiung an experimentellen Daten. Links sieht man ein stark verrauschtes symmetrisches Spektrum (TD: 512x512). Rechts: Nach der Rauschbefreiung.

Das Spektrum wurde vor der Fouriertransformation mit einer quadratischen Sinusfunktion gefiltert und phasenkorrigiert. Hier ist der deutliche Symmetriebruch durch die t<sub>1</sub>-Rauschstreifen und der starken Wasserlinie in der Mitte zu erkennen.

Nach der Anwendung von PNORM sieht das korrigierte Spektrum nicht besser aus. Die Linienform bleibt zwar intakt und es treten keine Phasenfehler auf, aber die starken Rauschstreifen sind immer noch vorhanden. Man erkennt insbesondere starke neue Störungen in der Wasserlinie und nur kleine Veränderungen an den Rauschstreifen.

Durch die starke unsymmetrische Wasserbande wird die Symmetrie des Spektrums massiv gestört. Dadurch werden vom Rauschbefreiungsalgorithmus falschen Korrekturwerte berechnet. Dies hat zur Folge, dass in H<sub>2</sub>O-Spektren keine Qualitätsverbesserung erzielt wird.

Ein weiterer Versuch mit PNORM  $t_1$ -Rauschen zu beseitigen wurde deshalb mit einem in D<sub>2</sub>O gemessenen NMR-Spektrum gemacht. Es wurde ein NOESY-Spektrum des HPr-Proteins (Histidine-containing Protein, Goerler, 1998) in D<sub>2</sub>O verwendet (NS: 16, SW: 11,0 ppm, 1024\*1024 Scans, v<sub>0</sub>: 800,13 MHz). Das Spektrum links in Bild 6.7 wurde mit UXNMR wie beschrieben in einen simultanen, symmetrischen Datensatz mit TD=512\*512 Datenpunkten umgewandelt. Das Spektrum wurde vor der Fouriertransformation mit einer quadratischen Sinusfunktion gefiltert und phasenkorrigiert. Hier sind neben den vertikalen auch zusätzliche horizontale Rauschstreifen zu erkennen.



Bild 6.7: Rauschbefreiung an experimentellen Daten eines in D<sub>2</sub>O gelösten Proteins. Links sieht man ein stark verrauschtes symmetrisches Spektrum (TD: 512x512). Rechts: Nach der Rauschbefreiung mit PNORM.

Auch hier wurde mit PNORM kein optimales Ergebnis erzielt. Nach der Rauschbefreiung sind durch die stärksten Diagonalsignale Antidiagonalen zu erkennen. Die horizontalen Streifen sind stark unterdrückt worden, aber die Reste der vertikalen Rauschstreifen stören das Spektrum immer noch sehr.

Diese horizontalen und vertikalen Artefakte gehen fast ausschließlich von starken Diagonalsignale aus und haben nicht nur das t<sub>1</sub>-Rauschen als Ursache. Auch durch Unstetigkeiten im FID treten in horizontaler und vertikaler Richtung Störungen auf. Aufgrund der starken Überlagerung vieler Signale auf der Hauptdiagonale haben die Diagonalsignale immer eine hohe Intensität. Entsprechend sind auch ihre Störausläufer besonders stark. Durch die optimale Unterdrückung des Wassersignals in einem D<sub>2</sub>O-Spektrum, werden diese Rauschstreifen sogar noch stärker hervorgehoben.

Aber diese Störausläufer sind nur auf den ersten Blick symmetrisch zu einander. In Wirklichkeit besteht keine Symmetrie zwischen den einzelnen Störsignalen in horizontaler und in vertikaler Richtung. PNORM normiert dadurch die  $t_1$ -Korrekturwerte auf das gegenüberliegende horizontale Rauschen. Dadurch werden falsche Korrekturwerte berechnet. Es ist deshalb in diesem Fall nicht möglich gewesen, die überlagerten  $t_1$ -Rauschstreifen erfolgreich zu entfernen. Leider stand kein experimenteller D<sub>2</sub>O-Datensatz ohne solche horizontalen Rauschstreifen zur Verfügung, um diesen Effekt zu unterdrücken.

# 6.4 Diskussion

Bislang wird die Symmetrie in zweidimensionalen Spektren normalerweise nur in der Frequenzdomäne ausgenutzt. Hier ist die Symmetrieeigenschaft offensichtlich. Darauf beruhen z.B. Symmetrisierungsverfahren wie die adaptive Symmetrisierung (Neidig et al., 1991) oder die trianguläre Multiplikation (Baumann et al., 1981). Sie alle leiden an der Schwierigkeit, Nutz- von Störsignalen zu unterscheiden und beeinträchtigen oft die reguläre Linienform der Nutzsignale. Neu an dem vorliegenden Zeitdomänenverfahren ist das Konzept, Rauschstreifen durch die Verwendung der Symmetrieeigenschaften der Zeitdomäne zu entfernen.

Ein Charakteristikum von Zeitdomänenverfahren im allgemeinen ist, dass sie die Frequenzdomäne nicht lokal verändern, sondern global jedes einzelne Signal bzw. seine Komponenten beeinflussen. Diese neue Rauschbefreiungsmethode arbeitet global auf allen spektralen Daten in der Zeitdomäne und hat deshalb keines der oben genannte Problem.

Das Rauschreduktionsprogramm liefert auf simulierten, stark verrauschten Daten perfekte Ergebnisse, ohne selbst Artefakte zu erzeugen. Hier ist es uneingeschränkt verwendbar. Die Linienform und Intensität, sowie die Symmetrie des Spektrums und alle Signalpositionen bleiben unverändert und es werden keine neuen Signale erzeugt.

Das Programm bringt jedoch im jetzigen Entwicklungsstadium auf realen Datensätzen kaum Verbesserungen. Dieses Verhalten ist auch zu verstehen, da die Voraussetzung globaler Symmetrie für das Verfahren bei den verwendeten Datensätzen nicht gegeben war. Besonders die starken, unvermeidlichen Signale der Wasserlinie in der Mitte von H<sub>2</sub>O-Spektren und die unsymmetrischen vertikalen und horizontalen Rauschstreifen im D<sub>2</sub>O-Spekrum stören die Gesamtsymmetrie sehr und verhindern dadurch die Berechnung der richtigen Korrekturwerte.

# 6.5 Ausblick

Eine Lösung für die weitere Entwicklung des Verfahrens wäre es, nur Korrekturwerte aus einem kleinen, wasserfreien Bereich zu berechnen. Dies macht es allerdings notwendig, das Spektrum erst normal zu prozessieren, den gewünschten Bereich auszuwählen und ihn alleine neu zu prozessieren (Streifen-Transformation). Aus dem daraus gewonnenen kleineren Zeitdatensatz werden dann die Korrekturwerte bestimmt. Dies macht die Methode unhandlicher und aufgrund der zusätzlichen Fouriertransformationen zeitaufwendiger. Außerdem ist ein intelligenter Algorithmus notwendig, der einen geeigneten ungestörten Bereich erkennt. Da das vorgestellte Rauschreduktionsverfahren vorhandenen Programmpakete verhältnismäßig einfach in die zur NMR-Spektrenverarbeitung zu integrieren ist, wäre ein solcher Automatismus durchaus denkbar.

Weiterhin ist es bei realen Datensätzen sehr wichtig, die Phasenlage möglichst gut zu korrigieren. Schon geringe Phasenfehler führen zu Abweichungen zwischen den Spalten- und Zeilenwerten. Die Folge sind falsche Korrekturwerte.

Eine weiter Verbesserung der Methode könnte man durch Bestimmung der Korrekturwerte aus mehreren Zeilen-/Spaltenpaaren erreichen. Ein Mittelwert aus den gewonnenen Korrekturen sollte kleinere Störeffekte (z.B. Rundungsfehler) in den Daten wirkungsvoll unterdrücken.

Abschließend ist es auch notwendig, die aktuelle Einschränkung auf gleiche Datensatzdimensionen ( $TD_1=TD_2$ ) aufzuheben. In der Regel sind die experimentellen Datensätze in t1- und t2-Richtung unterschiedlich dimensioniert (z.B. 4096\*512 Punkte). Aufgrund der kurzen Datenakquisitionszeit t<sub>2</sub> von wenigen Sekunden ist es problemlos möglich, mehr als 512 Datenpunkte in dieser Dimension aufzunehmen, ohne das die Gesamtmessdauer merklich beeinflusst wird. Man erhält dadurch eine verbesserte Auflösung in F1-Richtung. Die beste Lösung in diesem Fall wäre die Kombination der Rauschreduktion mit der sogenannten "Zeitdatenextrapolation" (Beneicke, 1994). Diese Methode erzeugt zuerst durch mehrfaches Zerofilling (Bartholdi et al., 1973) einen quadratischen Datensatz, und füllt die freien Bereiche sowohl mit Originaldaten, als auch mit extrapolierten Daten auf. Diese neue Datenmatrix ist dem Zeitdatenbild eines vollkommen symmetrischen Spektrums sehr ähnlich.

Es ist klar, dass die bisherigen Ergebnisse mit dem Programm PNORM nur vorläufigen Charakter haben. Auf simulierten Spektren angewandt, werden vielversprechende Ergebnisse erzielt, die die Effektivität des neuen Ansatzes bestätigen. Für eine routinemäßige Verwendung auf experimentellen Datensätzen müssen allerdings noch einige der oben angesprochene Modifikationen eingebaut werden.
## 7 Literatur

Abragam A (1961): The Principles of Nuclear Magnetism. Clarendon, Oxford

Aiyar J, Withka JM, Rizzi JP, Singleton DH, Andrews GC, Lin W, Boyd J, Hanson D, Simon M, Dethlefs B, Lee C, Hall JE, Gutman GA und Chandy KG (1995) *Neuron* **15**, 1169-1181

Aldrich R (1993) Nature 362, 107

Antz C (1994) Dissertation Universität Heidelberg

Antz C, Geyer M, Fakler B, Schott MK, Guy HR, Frank R, Ruppersberg JP und Kalbitzer HR (1997) *Nature* **385**, 272-275

Armstrong C (1998) Science 280, 56-57

Armstrong DW (1985) Sep. Purif. Methods 14, 213-304

Bai Y, Milne JS, Mayne L, Englander (1993) Proteins 17, 75-86

Bartholdi E und Ernst E (1973) J. Magn. Reson. 11, 9-19

Baumann R, Kumar A, Ernst RR und Wüthrich K (1981) J. Magn. Reson. 44, 76

Baumann R, Wider G, Ernst RR und Wüthrich K (1981) J. Magn. Reson. 44, 402

Becker K, Gui M, Traxler A, Kirsten C und Schirmer RH (1994) Histochem. 102, 389-396

Becker K und Schirmer RH (1995) Methods Enzymol. 251, 173-188

Beneike W (1994) Dissertation Universität Heidelberg

Boentges S, Meier BU, Griesinger C und Ernst RR (1989) J. Mag. Res. 85, 337-358

Bormann BJ und Engelmann DM (1992) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc. 21, 223-242

Boyd J, Soffe N, Campbell I (1994) Structure 2, 253-255

Böhme CC, Arscott LD, Becker K, Schirmer RH und Williams CH Jr. (2000) J. Biol. Chem. 275, 37317-37323

Brissac C, Malliavin TE and Delsuc M (1995) J. Biomol. NMR 6, 361-365

Brooks BR, Karplus M (1983) J. Chem. Phys. 79, 6312

Brooks CL III, Brunger AT and Karplus M (1984) Biopolymers 24, 843-865

Brunger AT (1993): X-PLOR Manual (Version 3.01), Yale University, New Havwn, CT

Brunger AT, Brooks CL III and Karplus M (1984) Chem. Phys. Lett. 105, 495-500

Buck M, Radford SE, Dobson CM (1994) J. Mol. Biol. 237, 247-254

Catteral ,WA (1995) Annu. Rev. Biochem. 64, 493-531

Connelly GP, Bai Y, Jeng MF, Englander SW (1993) Proteins 17, 87-92

De Jongh HH, Goomaghtigh E, Ruysschaert JM (1993) Biochemistry 34, 172-179

De Marco A, Llinas M, Wüthrich K (1978) Biopolymers 17, 617-636

Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, und Michel H (1985) Nature 318, 618-623

Doak DG, Mulvey D, Kawaguchi K, Villalain J und Campbell ID (1996) J. Mol. Biol. 258, 672-687

Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT und MacKinnon R (1998) *Science* **280**, 69-77

Durell SR und Guy HR (1992) Biophy. J. 62, 238-250

Durell SR, Raghunathan G und Guy HR (1992) Biophys. J. 63, 1623-2631

Englander JJ, Calhoun DB, Englander SW (1979) Anal. Biochem. 92, 517-524

Englander JJ, Rogero JR, Englander SW (1985) Anal. Biochem. 147, 234-244

Englander SW, Kallenbach NR (1984) Q. Rev. Biophys. 16, 521-655

Ernst RR, Bodenhausen G und Wokaun A (1987): Principles of Nuclear Magnetic Resonances in One and Two Dimensions. Oxford University Press, Oxford

Glaser S und Kalbitzer HR (1986) J. Magn. Reson. 68, 350

Goodford PJ (1985) J. Med. Chem. 28, 849-857

Goerler A (1998): Dissertation Universität Heidelberg

Goerler A und Kalbitzer HR (1996) J. Mag. Res. 124, 177-188

Griesinger C, Gemperle C, Sorensen OW und Ernst RR (1987) Mol. Phys. 62, 295-332

Guy HR und Conti F (1990) Trends in Neurosci. 13, 201-206

Guy HR und Seetharamulu P (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 508-512

Guy HR (1990): Models of voltage- and transmitter-activated channels based on their amino acid sequences; Monovalent Cations in Biological Systems. Pasternak CA, editor. CRC Press, Boca Raton, Florida, 31-38

Hausser KH und Kalbitzer HR (1989): NMR in medicine and Biology. Structure Determination, Tomography, in vivo Spectroscopy. Springer Verlag, Heidelberg

Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckman E und Downing KH (1990) J. Mol. Biol. 213, 899-929

Hildebrandt P, Vanhecke F, Heibel G, Mauk AG (1993) Biochemistry 32, 14158-14164

Hille B (1992) Ionic Channels of Exitable Membranes, Sinauer, Sunderland, MA

Hille B und Deeburg PH (1995) Curr. Opin. in Neurobiol. 5, 265-267

Hunt NH und Stocker R (1990) Blood Cells 16, 499-530

Hvidt A, Nielsen SO (1966) Adv. Protein. Chem. 21, 287-386

Israelachvili JN (1992) Intermolecular and Surface Forces, Second Edition. Academic Press, London San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto

- IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nemenclature (1970) J. Mol. Biol. 52, 1-17
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B und Michel H (1995) Nature 376, 660-669

Jorgensen WL, Ibrahim M (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3976

Kabsch W und Sander C (1983) Biopolymers 22, 2577

Kalbitzer HR und Hausser KH (1989) NMR für Mediziner und Biologen, Springer Verlag, Heidelberg

Kaptein R, Zuiderweg ERP, Scheek RM, Boelens R und van Gunsteren WF (1985) J. Mol. Biol. 182, 179-182

Karplus M (1959) J. Chem. Phys. 30, 11-15

Kernighan BW und Ritchie DM (1978) The C Programming Language. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey

Keynes RD (1992) Proc. R. Soc. Lond. B 249, 107-112

Kossiakoff AA (1982) Nature 298, 713-721

Kreusch A, Pfaffinger P, Stevens C & Choe S (1998) Nature 392, 945-948

Kubo Y, Baldwin T, Jan YN und Jan LY (1993) Nature 362, 127-133

Kubo Y (1994) Neurosc. Res. 21, 109-117

Kühlbrand W, Wang DN und Fujiyoshi Y (1994) Nature 367, 614-621

Kürz LL, Zühlke RD, Zhang HJ und Joho RH (1995) Biophys. J. 68, 900-905

Koradi R, Billeter M und Wüthrich K (1997) J. Mol. Graphics 14

Lindstrøm-Lang KU (1958) Deuterium exchange and protein structure. Symposium on Protein Structure, London: Methuen 23-34

MacKinnon R (1995) Neuron 14, 889-892

Marion D und Bax A (1988) J. Magn. Reson. 79, 352-356

Marion D und Wüthrich K (1988) BBRC 113, 967-974

Mayer S (2000) Dissertation Universität Wuppertal

Molday RS, Englander SW und Kallen RG (1972) Biochemistry 11, 150

Moroi Y (1992) Micelles - Theoretical and Applied Aspects. Plenum Press, New York, London

Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG und Thornton JM (1992) Proteins 12, 345

Müller JG, Bücheler US, Kayser K, Schirmer RH, Werner D, Krauth-Siegel RL (1993) *Cell. Mol. Biol.* **39**, 389-396

Muijselaar PG, Otsuka K, Terabe S (1997) J. Chromatogr. A 780, 41-61

Nordhoff A, Bücheler US, Werner D und Schirmer RH (1993) Biochemistry 32, 4060-4066

Nordhoff A, Tziatzios C, van den Broek JA, Schott MK, Kalbitzer HR, Becker K, Schubert D und Schirmer RH (1997) *Eur. J. Biochem* **245**, 273-282

Perham RN, Leistler B, Solomon RG und Guptasarma P (1996) *Biochem. Soc*. *Trans.* **24**, 61-66

Popot JL und Engelmann DM (1990) Biochemistry 29, 4031-4037

Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V (1963) J. Mol. Biol. 7, 95

Robertson AD, Baldwin RL (1991) Biochemistry 30, 9907-9914

Rost B (1996) Meth. in Enzym. 266, 525-539

Ruwende C und Hill A (1998) J. Mol. Med. 76, 581-588

Sanders CR und Landis GC (1995) Biochemistry 34, 4030-4040

Schirmer RH und Becker K (1993) Futura 4, 15-21

Schirmer RH, Müller JG und Krauth-Siegel RL (1995) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 34, 141-154 und Angew. Chem. 107, 153-166

Schott MK, Antz, C, Frank R, Ruppersberg JP und Kalbitzer HR (1998) *Eur. Biophys. J.* 27, 99-104

Shin YK (1998) Nature Struc. Biol. 5, 418-420

Spektrum Dossier (1997) Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg

Stampe P, Kolmakova-Partensky L und Miller C (1993) Biochemistry 33, 443-450

Terabe S, Katsura T, Okada Y, Ishimaha Y, Otsuka K (1993) J. Microcol. Sep. 5, 23-33

Thomas L, Blachly-Dyson E, Colombini M und Forte M (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5446-5449

Urbanke C (2000) Vorlesungsskript Universität Hannover

Verlet L (1967) Phys. Rev. 159, 98

Wagner, G: Prog. (1990) NMR Spektrosc. 22, 101-139

Williamson MP, Havel TF, Wüthrich K (1985) J. Mol. Biol. 182, 295-315

Woodward CK, Simon I, Tuchsen E (1982) Mol. Cell. Biochem. 47, 135-160

Wüthrich, K (1986) NMR of Proteins and Nucleid Acids, John Wiley & Sons, New York

Yamey G (2001) British Med. J. 322, 1191-1192

Yellen G (1998) Nature Struct. Biol. 5, 421

Zhang Y, Hempelmann E und Schirmer RH (1988) Biochem. Pharmacol. 37, 855-860

Zhang Y, Paterson Y, Roder H (1995) Protein. Sci. 4, 804-814

Zhang YP, Lewis RN, Henry GD, Sykes BD, Hodges RS, McElhansy RN (1995) *Biochemistry* **34**, 2348-2361

# 8 Anhang

## 8.1 Struktur der 20 Aminosäuren



Bild 8.1: Seitenketten und Abkürzung der 20 Aminosäuren (Hausser et al., 1989)

# 8.2 Chemische Verschiebungen des *Shaker*-Peptids

Rest	$\mathrm{H}^{\mathrm{N}}$	$H\alpha$	$_{ m H}\beta$	Нγ	$_{\rm H}\delta$	Andere
Met-1	a •	4,12	2,12	2,65		H <sup>ε3</sup> 2,10
Ala-2	8,79	4,35	1,40			
Ala-3	8,56	4,33	1,45			
Val-4	8,29	4,08	2,09	0,98		
Ala-5	8,56	4,33	1,44			
Gly-6	8,41	3,91				
Leu-7	8,09	4,24	1,35/	1,44	0,85/0,89	
Tyr-8	8,31	4,59	2,91/3,20			$H^{C2,6}$ 7,15/ $H^{C3,5}$ 6,86
Gly-9	8,37	3,90				
Leu-10	8,24	4,34	1,64/	1,70	0,92/0,95	
Gly-11	8,61	3,94				
Glu-12	8,29	4,31	1,95/	2,32/	Ηδ1/2 7,30	$H^{\epsilon 1/2}$ 7,20/ $H^{\zeta}$ 7,50
Asp-13	8,56	4,56	2,75/2,70			
Arg-14	8,42	4,13	1,75/1,72	1,60/1,65	3,20	H <sup>ε</sup> 7,35
Gln-15	8,28	4,21	2,00/2,15	2,43		N <sup>ε2</sup> 7,00/7,65
His-16	8,30	4,64	3,22/3,13		C4 7,12,C2 8,00	
Ala-17	8,36	4,31	1,43			
Lys-18	8,55	4,26	1,69/1,80	1,43	1,70/1,85	$H^{\epsilon}$ 3,00/ $N^{\zeta 3}$ 7,70
Lys-19	8,51	4,25	1,71/1,83	1,50	1,85	$H^{\epsilon}$ 3,00/ $N^{\zeta_3}$ 7,70
Gln-20	8,59	4,30	2,01/2,12	2,42		N <sup>ε2</sup> 7,00/ 7,70
Gln-21	8,61	4,32				
Gln-22	8,60	4,30				H <sup>ε</sup> 2,99/7,60
Gln-23	8,58	4,34				
Gln-24	8,58	4,34				
a <b>c</b> · · · ·		1				

Tabelle 8.1: <sup>1</sup>H-chemische Verschiebungen des Shaker-Peptids (1-22) bei 282K und pH 3,1

<sup>a</sup> Signal nicht sichtbar.

Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu DSS bestimmt.

# 8.3 Chemische Verschiebungen des P11-Peptids

*Tabelle* 8.2: <sup>1</sup>*H*-chemische Verschiebungen des P11-Peptids (436-459) bei 283K und ca. pH 6 relativ zu DSS.

Rest	$\mathrm{H}^{\mathrm{N}}$	$\mathrm{H} \alpha$	$_{ m H}\beta$	Нγ	${\rm H}^{\delta}$	Andere
Gln-436	a					
Gly-437	8,72	3,87				
Leu-438	8,39	4,21	1,50	1,50		
Gly-439	8,52	3,81				
Cys-440	8,17	4,34	2,77/2,78			
Asp-441	8,54	4,53	1,67/2,77			
Glu-442	a	4,14	1,81/1,95	2,29		
Met-443	8,22	4,29	2,35/2,44	1,83/1,93		
Leu-444	8,09	4,20	1,52	1,44	0,78/0,70	
Gln-445	8,28	4,12	1,82/1,91	2,20		N <sup>E2</sup> 6,78/7,44
Gly-446	8,29	3,71				
Phe-447	7,92	4,43	2,85/2,99		${ m H}^{{\delta}1/2}$ 7,36	$H^{\epsilon 1/27,10;H^{\zeta 7,19}}$
Ala-448	8,14	4,16	1,18			
Val-449	7,97	3,87	1,89	0,80		
Ala-450	8,27	4,17	1,21			
Val-451	8,10	3,86	1,86	0,78		
Lys-452	8,33	4,15	1,58/1,67	1,49		
Met-453	8,43	4,32	2,41/2,48	1,88/1,93		
Gly-454	8,40	3,79				
Ala-455	8,15	4,23	1,25			
Thr-456	8,14	4,19	4,05	1,06		
Lys-457	8,8,35	4,13	1,61/1,69	1,52		
Ala-458	8,36	4,13	1,24			
Asp-459	8,28	4,48	2,67/2,84			
a Signal nicht	gefunden o	der überlag	gert.			

## 8.4 XPLOR Parameter

## 8.4.1 NOE-Abstandseinschränkungen von P11

!1 GLN													
assign	(resid	1	and	name	HA)	(resid	1	and	name	HB#)	3.73	1.12	1.12
assign	(resid	1	and	name	HA)	(resid	1	and	name	HG#)	3.94	1.18	1.18
assign	(resid	1	and	name	HA)	(resid	2	and	name	HN)	3.22	0.97	0.97
assign	(resid	1	and	name	HA)	(resid	3	and	name	HN)	4.44	2.00	2.00
assign	(resid	1	and	name	HG#)	(resid	1	and	name	HB#)	3.36	1.01	1.01
assign	(resid	1	and	name	HG#)	(resid	2	and	name	HN)	4.00	1.20	1.20
assign	(resid	1	and	name	HE21)	(resid	1	and	name	HE22)	2.74	0.82	0.82
!2 GLY													
assign	(resid	2	and	name	HN)	(resid	3	and	name	HN)	4.01	1.20	1.20
assign	(resid	2	and	name	HA#)	(resid	2	and	name	HN)	3.34	1.00	1.00
assign	(resid	2	and	name	HA#)	(resid	3	and	name	HN)	2.98	0.89	0.89
assign	(resid	2	and	name	HA#)	(resid	4	and	name	HN)	4.87	1.46	1.46
!3 LEU													
assign	(resid	3	and	name	HA)	(resid	3	and	name	HN)	3.53	1.06	1.06
assign	(resid	3	and	name	HA)	(resid	4	and	name	HN)	3.31	0.99	0.99
assign	(resid	3	and	name	HA)	(resid	7	and	name	HN)	3.44	1.03	1.03
assign	(resid	3	and	name	HN)	(resid	4	and	name	HN)	4.07	1.22	1.22
assign	(resid	3	and	name	HB#)	(resid	3	and	name	HN)	3.00	0.90	0.90
!4 GLY													
assign	(resid	4	and	name	HA#)	(resid	4	and	name	HN)	2.93	0.88	0.88
assign	(resid	4	and	name	HA#)	(resid	5	and	name	HB#)	3.71	1.11	1.11
assign	(resid	4	and	name	HA#)	(resid	8	and	name	HN)	3.53	1.06	1.06
!5 CYS													
assign	(resid	5	and	name	HA)	(resid	5	and	name	HN)	3.57	1.07	1.07
assign	(resid	5	and	name	HA)	(resid	5	and	name	HB#)	3.40	1.02	1.02
assign	(resid	5	and	name	HA)	(resid	б	and	name	HN)	3.50	1.05	1.05
assign	(resid	5	and	name	HA)	(resid	7	and	name	HN)	4.50	1.35	1.35
assign	(resid	5	and	name	HA)	(resid	8	and	name	HN)	3.44	1.03	1.03
assign	(resid	5	and	name	HA)	(resid	8	and	name	HB#)	4.80	1.44	1.44
assign	(resid	5	and	name	HN)	(resid	4	and	name	HA#)	2.64	0.79	0.79
assign	(resid	5	and	name	HN)	(resid	6	and	name	HN)	3.22	0.97	0.97
assign	(resid	5	and	name	HB#)	(resid	5	and	name	HN)	3.29	0.99	0.99
assign	(resid	5	and	name	HN)	(resid	4	and	name	HN)	3.29	0.99	0.99
!6 ASP													
assign	(resid	6	and	name	HA)	(resid	6	and	name	HN)	4.13	1.24	1.24
assign	(resid	6	and	name	HA)	(resid	6	and	name	HB#)	3.76	1.13	1.13
assign	(resid	6	and	name	HA)	(resid	7	and	name	HN)	3.76	1.13	1.13
assign	(resid	6	and	name	HB#)	(resid	6	and	name	HN)	3.48	1.04	1.04
assign	(resid	6	and	name	HB#)	(resid	7	and	name	HN)	3.71	1.11	1.11
assign	(resid	6	and	name	HB#)	(resid	6	and	name	HN)	3.16	0.95	0.95

!7 GLU													
assign	(resid	7	and	name	HA)	(resid	б	and	name	HN)	4.02	1.21	1.21
assign	(resid	7	and	name	HA)	(resid	7	and	name	HB#)	2.74	0.82	0.82
assign	(resid	7	and	name	HA)	(resid	7	and	name	HG#)	3.26	0.98	0.98
assign	(resid	7	and	name	HA)	(resid	8	and	name	HN)	2.95	0.89	0.89
assign	(resid	7	and	name	HA)	(resid	10	and	name	HB#)	3.55	1.07	1.07
assign	(resid	7	and	name	HA)	(resid	10	and	name	HE21)	3.92	1.18	1.18
assign	(resid	7	and	name	HN)	(resid	6	and	name	HN)	2.88	0.86	0.86
assign	(resid	7	and	name	HN)	(resid	8	and	name	HN)	3.95	1.19	1.19
assign	(resid	7	and	name	HB#)	(resid	7	and	name	HG#)	2.90	0.89	0.89
assign	(resid	7	and	name	HB#)	(resid	4	and	name	HN)	2.80	0.89	0.89
assign	(resid	7	and	name	HG#)	(resid	7	and	name	HN)	3.11	0.93	0.93
!8 MET													
assign	(resid	8	and	name	HA)	(resid	8	and	name	HN)	3.34	1.00	1.00
assign	(resid	8	and	name	HA)	(resid	8	and	name	HB#)	3.25	1.07	1.07
assign	(resid	8	and	name	HA)	(resid	8	and	name	HG#)	2.99	0.90	0.90
assign	(resid	8	and	name	HA)	(resid	9	and	name	HN)	3.36	1.01	1.01
assign	(resid	8	and	name	HA)	(resid	10	and	name	HN)	4.05	1.21	1.21
assign	(resid	8	and	name	HN)	(resid	б	and	name	HN)	3.31	0.99	0.99
assign	(resid	8	and	name	HB#)	(resid	8	and	name	HN)	3.61	1.08	1.08
assign	(resid	8	and	name	HB#)	(resid	9	and	name	HB#)	4.33	1.30	1.30
assign	(resid	8	and	name	HG#)	(resid	8	and	name	HN)	2.87	0.87	0.87
assign	(resid	8	and	name	HG#)	(resid	8	and	name	HB#)	2.72	0.82	0.82
assign	(resid	8	and	name	HG#)	(resid	9	and	name	HG)	4.54	1.36	1.36
assign	(resid	8	and	name	HN)	(resid	6	and	name	HN)	3.37	1.01	1.01
assign	(resid	8	and	name	HG#)	(resid	12	and	name	HE#)	4.55	1.37	1.37
assign	(resid	8	and	name	HG#)	(resid	12	and	name	HD#)	4.55	1.37	1.37
assign	(resid	8	and	name	HG#)	(resid	9	and	name	HG)	4.75	1.43	1.43
!9 LEU													
assign	(resid	9	and	name	HA)	(resid	9	and	name	HG)	2.94	0.88	0.88
assign	(resid	9	and	name	HA)	(resid	9	and	name	HN)	2.77	0.83	0.83
assign	(resid	9	and	name	HA)	(resid	9	and	name	HB#)	2.57	0.37	0.33
assign	(resid	9	and	name	HA)	(resid	10	and	name	HN)	3.55	1.07	1.07
assign	(resid	9	and	name	HA)	(resid	12	and	name	HN)	3.44	1.03	1.03
assign	(resid	9	and	name	HA)	(resid	12	and	name	HB#)	4.24	1.27	1.27
assign	(resid	9	and	name	HA)	(resid	12	and	name	HE#)	3.63	3.00	3.00
assign	(resid	9	and	name	HG)	(resid	12	and	name	HE#)	4.55	3.00	3.00
assign	(resid	9	and	name	HG)	(resid	12	and	name	HD#)	4.55	3.00	3.00
assign	(resid	9	and	name	HG)	(resid	9	and	name	HN)	3.11	0.93	0.93
assign	(resid	9	and	name	HG)	(resid	9	and	name	HD1#)	3.60	1.08	1.08
assign	(resid	9	and	name	HG)	(resid	9	and	name	HD2#)	2.80	0.84	0.84
assign	(resid	9	and	name	HG)	(resid	10	and	name	HN)	3.72	1.12	1.12
assign	(resid	9	and	name	HG)	(resid	12	and	name	HN)	4.92	1.48	1.48
assign	(resid	9	and	name	HN)	(resid	8	and	name	HN)	3.67	1.10	1.10

assign	(resid	9	and	name	HN)	(resid	8	and	name	HB#)	4.22	1.27	1.27
assign	(resid	9	and	name	HN)	(resid	8	and	name	HB#)	4.06	1.22	1.22
assign	(resid	9	and	name	HB#)	(resid	9	and	name	HN)	2.88	0.88	0.52
assign	(resid	9	and	name	HB#)	(resid	9	and	name	HD1#)	2.66	0.80	0.80
assign	(resid	9	and	name	HB#)	(resid	9	and	name	HD2#)	4.00	1.20	1.20
assign	(resid	9	and	name	HD1#)	(resid	9	and	name	HA)	4.00	1.20	1.20
assign	(resid	9	and	name	HD1#)	(resid	12	and	name	HD#)	3.50	3.00	3.00
assign	(resid	9	and	name	HD2#)	(resid	9	and	name	HN)	3.77	1.13	1.13
!10 GLN	1												
assign	(resid	10	and	name	HA)	(resid	10	and	name	HN)	2.50	0.75	0.75
assign	(resid	10	and	name	HA)	(resid	10	and	name	HB#)	2.86	0.86	0.86
assign	(resid	10	and	name	HA)	(resid	10	and	name	HG#)	3.14	0.94	0.94
assign	(resid	10	and	name	HA)	(resid	12	and	name	HN)	3.62	1.09	1.09
assign	(resid	10	and	name	HA)	(resid	13	and	name	HN)	3.44	1.03	1.03
assign	(resid	10	and	name	HN)	(resid	9	and	name	HN)	3.15	0.94	0.94
assign	(resid	10	and	name	HN)	(resid	12	and	name	HE#)	4.15	3.00	3.00
assign	(resid	10	and	name	HB#)	(resid	10	and	name	HN)	2.87	0.86	0.86
assign	(resid	10	and	name	HB#)	(resid	10	and	name	HG#)	3.02	0.91	0.91
assign	(resid	10	and	name	HB#)	(resid	10	and	name	HE21)	4.09	1.23	1.23
assign	(resid	10	and	name	HB#)	(resid	10	and	name	HE22)	4.65	1.40	1.40
assign	(resid	10	and	name	HB#)	(resid	12	and	name	HN)	4.46	1.34	1.34
assign	(resid	10	and	name	HB2)	(resid	9	and	name	HB1)	3.86	1.16	1.16
assign	(resid	10	and	name	HB#)	(resid	10	and	name	HN)	2.78	0.83	0.83
assign	(resid	10	and	name	HB#)	(resid	10	and	name	HG#)	2.88	0.86	0.86
assign	(resid	10	and	name	HB#)	(resid	10	and	name	HE21)	4.09	1.23	1.23
assign	(resid	10	and	name	HB#)	(resid	10	and	name	HE22)	4.39	1.32	1.32
assign	(resid	10	and	name	HG2)	(resid	10	and	name	HN)	3.05	0.91	0.91
assign	(resid	10	and	name	HG#)	(resid	10	and	name	HE21)	3.86	1.16	1.16
assign	(resid	10	and	name	HG#)	(resid	10	and	name	HE22)	3.82	1.15	1.15
assign	(resid	10	and	name	HG2)	(resid	12	and	name	HN)	4.63	1.39	1.39
assign	(resid	10	and	name	HE22)	(resid	10	and	name	HE21)	2.60	0.78	0.78
assign	(resid	10	and	name	HE21)	(resid	9	and	name	HD1#)	3.33	1.00	1.00
assign	(resid	10	and	name	HE22)	(resid	9	and	name	HD1#)	4.55	1.37	1.37
assign	(resid	10	and	name	HE21)	(resid	9	and	name	HB#)	5.00	1.50	1.50
assign	(resid	10	and	name	HN)	(resid	9	and	name	HN)	3.07	0.92	0.92
!11 GLY	2												
assign	(resid	11	and	name	HN)	(resid	8	and	name	HA)	4.44	1.33	1.33
assign	(resid	11	and	name	HN)	(resid	12	and	name	HN)	3.32	1.00	1.00
assign	(resid	11	and	name	HN)	(resid	13	and	name	HN)	3.00	1.00	1.00
assign	(resid	11	and	name	HA#)	(resid	10	and	name	HB#)	3.79	1.14	1.14
assign	(resid	11	and	name	HA#)	(resid	11	and	name	HN)	2.80	0.84	0.84
assign	(resid	11	and	name	HA#)	(resid	12	and	name	HN)	3.07	0.92	0.92
assign	(resid	11	and	name	HA#)	(resid	12	and	name	HD#)	5.57	3.00	3.00
assign	(resid	11	and	name	HA#)	(resid	12	and	name	HE2)	4.10	1.40	1.40

assign	(resid	11	and	name	HA2)	(resid	13	and	name	HB2)	4.04	1.21	1.21
assign	(resid	11	and	name	HA#)	(resid	14	and	name	HN)	3.44	1.03	1.03
assign	(resid	11	and	name	HA#)	(resid	14	and	name	HG#)	3.52	1.06	1.06
!12 PHE	2												
assign	(resid	12	and	name	HA)	(resid	12	and	name	HN)	3.67	1.10	1.10
assign	(resid	12	and	name	HA)	(resid	12	and	name	HD#)	4.49	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HA)	(resid	12	and	name	HB#)	3.61	1.08	1.08
assign	(resid	12	and	name	HA)	(resid	12	and	name	HE#)	3.60	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HA)	(resid	13	and	name	HN)	3.27	0.98	0.98
assign	(resid	12	and	name	HA)	(resid	15	and	name	HN)	3.44	1.03	1.03
assign	(resid	12	and	name	HA)	(resid	15	and	name	HB#)	4.05	1.21	1.21
assign	(resid	12	and	name	HN)	(resid	12	and	name	HE#)	3.82	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HD#)	(resid	11	and	name	HN)	4.00	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HD#)	(resid	12	and	name	HN)	4.14	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HD#)	(resid	13	and	name	HN)	5.00	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HB#)	(resid	12	and	name	HN)	3.33	1.00	1.00
assign	(resid	12	and	name	HB#)	(resid	12	and	name	HD#)	3.94	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HB#)	(resid	13	and	name	HN)	3.66	1.10	1.10
assign	(resid	12	and	name	HB2)	(resid	10	and	name	HN)	4.42	1.33	1.33
assign	(resid	12	and	name	HB#)	(resid	12	and	name	HD#)	4.15	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HE#)	(resid	8	and	name	HG#)	3.84	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HE#)	(resid	9	and	name	HD1#)	4.44	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HE#)	(resid	11	and	name	HN)	3.79	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HE#)	(resid	12	and	name	HD#)	2.60	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HE#)	(resid	12	and	name	HB#)	3.30	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HE#)	(resid	12	and	name	HZ)	2.55	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HE#)	(resid	13	and	name	HN)	3.92	3.00	3.00
assign	(resid	12	and	name	HZ)	(resid	11	and	name	HN)	4.22	1.27	1.27
assign	(resid	12	and	name	HD1)	(resid	9	and	name	HD1#)	3.22	1.10	1.10
!13 ALA	4												
assign	(resid	13	and	name	HA)	(resid	12	and	name	HB#)	3.72	1.12	1.12
assign	(resid	13	and	name	HA)	(resid	13	and	name	HN)	2.88	0.86	0.86
assign	(resid	13	and	name	HA)	(resid	13	and	name	HN)	2.94	0.88	0.88
assign	(resid	13	and	name	HA)	(resid	13	and	name	HB#)	2.91	0.87	0.87
assign	(resid	13	and	name	HA)	(resid	14	and	name	HN)	2.89	0.87	0.87
assign	(resid	13	and	name	HA)	(resid	16	and	name	HN)	3.44	1.03	1.03
assign	(resid	13	and	name	HN)	(resid	11	and	name	HA#)	4.44	1.22	1.22
assign	(resid	13	and	name	HN)	(resid	12	and	name	HN)	2.77	0.83	0.83
assign	(resid	13	and	name	HN)	(resid	14	and	name	HN)	3.71	1.11	1.11
assign	(resid	13	and	name	HB#)	(resid	10	and	name	HA)	4.00	1.20	1.20
assign	(resid	13	and	name	HB#)	(resid	12	and	name	HN)	3.71	1.11	1.11
assign	(resid	13	and	name	HB#)	(resid	14	and	name	HN)	3.11	0.93	0.93
assign	(resid	13	and	name	HB#)	(resid	12	and	name	HD#)	4.55	3.00	3.00
!14 VAI	L												

assign	(resid	14	and	name	HA)	(resid	14	and	name	HN)	3.39	1.02	1.02
assign	(resid	14	and	name	HA)	(resid	14	and	name	HG#)	2.53	0.76	0.76
assign	(resid	14	and	name	HA)	(resid	15	and	name	HN)	2.78	0.83	0.83
assign	(resid	14	and	name	HA)	(resid	17	and	name	HB#)	3.50	1.00	0.90
assign	(resid	14	and	name	HB)	(resid	11	and	name	HA#)	3.96	1.19	1.19
assign	(resid	14	and	name	HB)	(resid	14	and	name	HN)	3.12	0.94	0.94
assign	(resid	14	and	name	HB)	(resid	14	and	name	HG#)	2.27	0.68	0.68
assign	(resid	14	and	name	HN)	(resid	13	and	name	HN)	3.89	1.17	1.17
assign	(resid	14	and	name	HG#)	(resid	14	and	name	HN)	2.94	0.88	0.88
assign	(resid	14	and	name	HG#)	(resid	15	and	name	HN)	2.83	0.85	0.85
!15 ALA	1												
assign	(resid	15	and	name	HA)	(resid	15	and	name	HN)	2.77	0.83	0.83
assign	(resid	15	and	name	HA)	(resid	15	and	name	HB#)	2.61	0.78	0.78
assign	(resid	15	and	name	HA)	(resid	16	and	name	HN)	2.66	0.80	0.80
assign	(resid	15	and	name	HA)	(resid	18	and	name	HN)	2.81	0.84	0.84
assign	(resid	15	and	name	HN)	(resid	14	and	name	HN)	3.45	1.03	1.03
assign	(resid	15	and	name	HB#)	(resid	15	and	name	HN)	2.74	0.82	0.82
assign	(resid	15	and	name	HB1)	(resid	14	and	name	HG#)	3.57	1.07	1.07
assign	(resid	15	and	name	HB#)	(resid	12	and	name	HE2)	3.56	4.00	4.00
!16 VAI	L												
assign	(resid	16	and	name	HA)	(resid	15	and	name	HB#)	3.20	1.05	1.05
assign	(resid	16	and	name	HA)	(resid	16	and	name	HB)	2.88	0.86	0.86
assign	(resid	16	and	name	HA)	(resid	16	and	name	HN)	3.32	1.00	1.00
assign	(resid	16	and	name	HA)	(resid	16	and	name	HG#)	4.00	1.20	1.20
assign	(resid	16	and	name	HA)	(resid	17	and	name	HN)	2.71	0.81	0.81
assign	(resid	16	and	name	HA)	(resid	17	and	name	HB#)	4.30	1.29	1.29
assign	(resid	16	and	name	HA)	(resid	20	and	name	HN)	5.00	1.00	2.00
assign	(resid	16	and	name	HA)	(resid	20	and	name	HB2)	5.00	1.00	2.00
assign	(resid	16	and	name	HB)	(resid	13	and	name	HA)	3.25	0.75	1.15
assign	(resid	16	and	name	HB)	(resid	16	and	name	HN)	2.89	0.87	0.87
assign	(resid	16	and	name	HN)	(resid	15	and	name	HN)	3.15	0.94	0.94
assign	(resid	16	and	name	HG#)	(resid	16	and	name	HN)	2.78	0.83	0.83
assign	(resid	16	and	name	HG#)	(resid	17	and	name	HN)	3.02	0.91	0.91
!17 LYS	3												
assign	(resid	17	and	name	HA)	(resid	16	and	name	HG#)	3.65	1.21	1.21
assign	(resid	17	and	name	HA)	(resid	17	and	name	HN)	2.70	0.83	0.83
assign	(resid	17	and	name	HA)	(resid	17	and	name	HB#)	2.95	0.89	0.89
assign	(resid	17	and	name	HA)	(resid	17	and	name	HG#)	3.34	1.00	1.00
assign	(resid	17	and	name	HA)	(resid	18	and	name	HN)	2.78	0.83	0.83
assign	(resid	17	and	name	HA)	(resid	18	and	name	HB#)	4.84	1.45	1.45
assign	(resid	17	and	name	HN)	(resid	14	and	name	HA)	3.44	1.03	1.03
assign	(resid	17	and	name	HN)	(resid	16	and	name	HN)	2.88	0.86	0.86
assign	(resid	17	and	name	HN)	(resid	18	and	name	HN)	3.66	1.10	1.10
assign	(resid	17	and	name	HB#)	(resid	17	and	name	HN)	3.14	0.94	0.94

assign	(resid	17	and	name	HG#)	(resid	17	and	name	HN)	3.53	1.06	1.06
!18 MET	1												
assign	(resid	18	and	name	HA)	(resid	18	and	name	HB#)	3.67	1.10	1.10
assign	(resid	18	and	name	HA)	(resid	18	and	name	HG#)	3.21	0.96	0.96
assign	(resid	18	and	name	HA)	(resid	19	and	name	HN)	2.82	0.85	0.85
assign	(resid	18	and	name	HB#)	(resid	18	and	name	HN)	3.47	1.04	1.04
assign	(resid	18	and	name	HG#)	(resid	18	and	name	HB#)	3.15	0.97	0.97
assign	(resid	18	and	name	HG#)	(resid	18	and	name	HN)	3.06	0.92	0.92
!19 GLY													
assign	(resid	19	and	name	HA#)	(resid	20	and	name	HN)	2.64	0.79	0.79
assign	(resid	19	and	name	HN)	(resid	16	and	name	HA)	3.44	1.03	1.03
assign	(resid	19	and	name	HA#)	(resid	19	and	name	HN)	2.75	0.82	0.82
!20 ALA	L												
assign	(resid	20	and	name	HA)	(resid	20	and	name	HB#)	3.04	0.91	0.91
assign	(resid	20	and	name	HA)	(resid	21	and	name	HN)	2.77	0.83	0.83
assign	(resid	20	and	name	HN)	(resid	18	and	name	HN)	4.49	1.25	1.25
assign	(resid	20	and	name	HN)	(resid	19	and	name	HN)	3.35	1.00	1.00
assign	(resid	20	and	name	HB#)	(resid	15	and	name	HA)	5.00	1.00	2.00
assign	(resid	20	and	name	HB#)	(resid	20	and	name	HN)	2.72	0.82	0.82
!21 THR	1												
assign	(resid	21	and	name	HA)	(resid	21	and	name	HN)	2.77	1.03	1.03
assign	(resid	21	and	name	HA)	(resid	21	and	name	HG1#)	3.33	2.00	2.00
assign	(resid	21	and	name	HA)	(resid	22	and	name	HN)	3.55	1.07	1.07
assign	(resid	21	and	name	HB)	(resid	21	and	name	HN)	3.58	1.07	1.07
assign	(resid	21	and	name	HB)	(resid	21	and	name	HG1#)	3.15	0.94	0.94
assign	(resid	21	and	name	HB)	(resid	22	and	name	HN)	3.88	1.16	1.16
assign	(resid	21	and	name	HG1#)	(resid	21	and	name	HN)	3.65	1.09	1.09
assign	(resid	21	and	name	HG1#)	(resid	22	and	name	HN)	4.03	1.21	1.21
assign	(resid	21	and	name	HA)	(resid	23	and	name	HN)	4.44	1.33	1.33
!22 LYS	;												
assign	(resid	22	and	name	HA)	(resid	23	and	name	HN)	2.47	0.74	0.74
assign	(resid	22	and	name	HN)	(resid	21	and	name	HN)	3.42	1.03	1.03
assign	(resid	22	and	name	HB#)	(resid	22	and	name	HN)	2.82	0.85	0.85
!23 ALA													
assign	(resid	23	and	name	HA)	(resid	23	and	name	HN)	2.77	0.83	0.83
assign	(resid	23	and	name	HA)	(resid	23	and	name	HB#)	2.55	0.35	0.35
assign	(resid	23	and	name	HB#)	(resid	23	and	name	HN)	3.32	1.00	1.00
!24 ASP	)												
assign	(resid	24	and	name	HA)	(resid	24	and	name	HN)	3.79	1.14	1.14
assign	(resid	24	and	name	HA)	(resid	24	and	name	HB#)	3.79	1.14	1.14
assign	(resid	24	and	name	HN)	(resid	23	and	name	HN)	4.91	1.47	1.47
assign	(resid	24	and	name	HB#)	(resid	24	and	name	HN)	3.54	1.06	1.06
assign	(resid	24	and	name	HB#)	(resid	20	and	name	HB#)	3.27	0.98	0.98

## 8.4.2 NOE-Abstandseinschränkungen von Shaker

!1 MET													
assign	(resid	1	and	name	HA)	(resid	2	and	name	HN)	2.58	0.80	0.50
assign	(resid	1	and	name	HB#)	(resid	1	and	name	HG#)	2.56	0.80	0.50
!2 ALA													
!3 ALA													
!4 VAL													
assign	(resid	4	and	name	HA)	(resid	5	and	name	HN)	2.20	0.80	0.50
assign	(resid	4	and	name	HG#)	(resid	5	and	name	HN)	3.05	0.80	0.50
assign	(resid	4	and	name	HN)	(resid	4	and	name	HG#)	2.81	0.80	0.50
assign	(resid	4	and	name	HN)	(resid	4	and	name	HA)	2.87	0.80	0.50
assign	(resid	4	and	name	HN)	(resid	3	and	name	HA)	2.12	0.80	0.50
!5 ALA													
assign	(resid	5	and	name	HN)	(resid	5	and	name	HB#)	2.40	0.80	0.50
!6 GLY													
assign	(resid	6	and	name	HN)	(resid	5	and	name	HA)	2.23	0.80	0.50
assign	(resid	6	and	name	HN)	(resid	6	and	name	HA)	2.17	0.80	0.50
assign	(resid	6	and	name	HN)	(resid	5	and	name	HB#)	3.04	0.80	0.50
!7 LEU													
assign	(resid	7	and	name	HN)	(resid	7	and	name	HB#)	2.94	0.80	0.50
assign	(resid	7	and	name	HN)	(resid	7	and	name	HB2)	2.28	0.80	0.50
assign	(resid	7	and	name	HN)	(resid	6	and	name	HA)	2.31	0.80	0.50
assign	(resid	7	and	name	HN)	(resid	б	and	name	HN)	3.00	0.80	0.50
assign	(resid	7	and	name	HN)	(resid	7	and	name	HA)	2.68	0.80	0.50
!8 TYR													
assign	(resid	8	and	name	HA)	(resid	9	and	name	HN)	2.28	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HA)	(resid	8	and	name	HB#)	2.71	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HA)	(resid	8	and	name	HD#)	2.43	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HN)	(resid	8	and	name	HB#)	2.72	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HN)	(resid	7	and	name	HA)	2.03	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HN)	(resid	8	and	name	HA)	2.83	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HN)	(resid	7	and	name	HN)	2.87	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HB1)	(resid	8	and	name	HN)	2.51	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HB1)	(resid	8	and	name	HB2)	1.76	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HD#)	(resid	8	and	name	HB#)	2.29	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HD#)	(resid	8	and	name	HB2)	2.30	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HD#)	(resid	8	and	name	HE#)	1.96	0.80	0.50
assign	(resid	8	and	name	HD#)	(resid	8	and	name	HN)	2.91	0.80	0.50
!9 GLY													
assign	(resid	9	and	name	HN)	(resid	9	and	name	HA)	2.04	0.80	0.50
assign	(resid	9	and	name	HN)	(resid	10	and	name	HN)	2.75	0.80	0.50
assign	(resid	9	and	name	HN)	(resid	8	and	name	HN)	2.82	0.80	0.50
!10 LEU	l												
assign	(resid	10	and	name	HA)	(resid	10	and	name	HN)	2.72	0.80	0.50

assign	(resid	10	and	name	HN)	(resid	10	and	name	HB#)	2.22	0.80	0.50
assign	(resid	10	and	name	HN)	(resid	10	and	name	HG)	2.43	0.80	0.50
assign	(resid	10	and	name	HN)	(resid	9	and	name	HA)	2.24	0.80	0.50
assign	(resid	10	and	name	HN)	(resid	9	and	name	HN)	3.12	0.80	0.50
!11 GLY	7												
assign	(resid	11	and	name	HN)	(resid	11	and	name	HA)	2.15	0.80	0.50
assign	(resid	11	and	name	HN)	(resid	10	and	name	HN)	2.76	0.80	0.50
assign	(resid	11	and	name	HN)	(resid	12	and	name	HN)	2.76	0.80	0.50
!12 GLU	J												
assign	(resid	12	and	name	HN)	(resid	11	and	name	HA)	2.24	0.80	0.50
assign	(resid	12	and	name	HN)	(resid	12	and	name	HG#)	2.50	0.80	0.50
assign	(resid	12	and	name	HN)	(resid	12	and	name	HB#)	2.39	0.80	0.50
assign	(resid	12	and	name	HN)	(resid	12	and	name	HB1)	2.10	0.80	0.50
!13 ASF	>												
assign	(resid	13	and	name	HA)	(resid	13	and	name	HN)	2.47	0.80	0.50
assign	(resid	13	and	name	HA)	(resid	13	and	name	HB#)	2.46	0.80	0.50
assign	(resid	13	and	name	HN)	(resid	13	and	name	HB#)	2.30	0.80	0.50
assign	(resid	13	and	name	HN)	(resid	13	and	name	HA)	2.64	0.80	0.50
assign	(resid	13	and	name	HN)	(resid	12	and	name	HN)	2.48	0.80	0.50
assign	(resid	13	and	name	HN)	(resid	14	and	name	HN)	2.91	0.80	0.50
!14 ARG	ł												
assign	(resid	14	and	name	HN)	(resid	15	and	name	HN)	2.48	0.80	0.50
assign	(resid	14	and	name	HN)	(resid	14	and	name	HB1)	2.53	0.80	0.50
assign	(resid	14	and	name	HE)	(resid	14	and	name	HD)	2.42	0.80	0.50
assign	(resid	14	and	name	HN)	(resid	14	and	name	HB#)	2.78	0.80	0.50
assign	(resid	14	and	name	HA)	(resid	14	and	name	HN)	2.63	0.80	0.50
assign	(resid	14	and	name	HA)	(resid	14	and	name	HB1)	2.60	0.80	0.50
assign	(resid	14	and	name	HA)	(resid	14	and	name	HG1)	2.53	0.80	0.50
assign	(resid	14	and	name	HA)	(resid	14	and	name	HB2)	2.51	0.80	0.50
!15 GLN	1												
assign	(resid	15	and	name	HN)	(resid	14	and	name	HA)	2.70	0.80	0.50
!16 HIS	3												
assign	(resid	16	and	name	HB1)	(resid	16	and	name	HB2)	1.92	0.80	0.50
assign	(resid	16	and	name	HN)	(resid	16	and	name	HB#)	2.55	0.80	0.50
assign	(resid	16	and	name	HN)	(resid	16	and	name	HA)	2.60	0.80	0.50
!17 ARG	3												
assign	(resid	17	and	name	HA)	(resid	18	and	name	HN)	1.90	0.80	0.50
assign	(resid	17	and	name	HB1)	(resid	17	and	name	HN)	2.46	0.80	0.50
assign	(resid	17	and	name	HG#)	(resid	14	and	name	HN)	2.67	0.80	0.50
assign	(resid	17	and	name	HN)	(resid	17	and	name	HG2)	2.60	0.80	0.50
assign	(resid	17	and	name	HN)	(resid	17	and	name	HB#)	2.60	0.80	0.50
assign	(resid	17	and	name	HN)	(resid	17	and	name	HA)	2.71	0.80	0.50
!18 LYS	3												
assign	(resid	18	and	name	HG#)	(resid	18	and	name	HB#)	2.02	0.80	0.50

```
assign (resid 18 and name
                            HN) (resid 18 and name HB1)
                                                            2.35
                                                                   0.80
                                                                          0.50
assign (resid 18 and name
                            HN) (resid 18 and name HB#)
                                                            2.47
                                                                   0.80
                                                                          0.50
assign (resid 18 and name
                                                                          0.50
                            HN) (resid 17 and name
                                                      HN)
                                                            2.83
                                                                   0.80
!19 LYS
assign (resid 19 and name
                            HA) (resid 20 and name
                                                      HN)
                                                            2.07
                                                                   0.80
                                                                          0.50
assign (resid 19 and name
                            HA) (resid 18 and name
                                                     HB#)
                                                            3.24
                                                                   0.80
                                                                          0.50
assign (resid 19 and name
                            HN) (resid 19 and name
                                                     HB1)
                                                            2.28
                                                                   0.80
                                                                          0.50
assign (resid 19 and name
                            HN) (resid 19 and name
                                                     HB#)
                                                            2.46
                                                                   0.80
                                                                          0.50
assign (resid 19 and name
                            HN) (resid 18 and name
                                                      HA)
                                                            2.03
                                                                   0.80
                                                                          0.50
!20 GLN
assign (resid 20 and name
                            HA) (resid 20 and name
                                                            1.91
                                                                   0.80
                                                                          0.50
                                                      HN)
!21 GLN
assign (resid 21 and name
                            HN) (resid 21 and name HB1)
                                                            2.33
                                                                   0.80
                                                                          0.50
assign (resid 21 and name
                            HN) (resid 21 and name HB#2)
                                                             2.61
                                                                  0.80
                                                                         0.50
!22 GLN
```

#### 8.4.3 Winkeleinschränkungen von P11

```
assign (resid 2 and name C )
         (resid 3 and name N )
         (resid 3 and name CA )
         (resid 3 and name C ) 1.0 -120.0 70.0 2
(resid 5 and name N )
         (resid 5 and name CA )
         (resid 5 and name C ) 1 -73.5\ 11.7\ 2
assign ( resid 5 and name C ) % \left( {\left[ {{\left[ {{\left[ {{C_{c}} \right]}} \right]_{c}}} \right]_{c}} \right)} \right)
        ( resid 6 and name N )
         ( resid 6 and name CA )
         ( resid 6 and name C ) 1 -75.0 11.7 2
assign ( resid 6 and name C )
         ( resid 7 and name N ) % \left( {\left( {{\left( {r_{{\rm{s}}} \right)} \right)} \right)} \right)
         ( resid 7 and name CA )
         ( resid 7 and name C ) 1 -78.2 12.0 2
assign ( resid 7 and name C )
         ( resid 8 and name N )
         ( resid 8 and name CA )
         ( resid 8 and name C ) 1 -64.9 12.0 2
assign ( resid 8 and name C )
```

```
( resid 9 and name N )
        ( resid 9 and name CA )
        ( resid 9 and name C ) 1 -69.6 8.7 2 \,
assign ( resid 9 and name C )
        ( resid 10 and name \rm N )
        ( resid 10 and name CA )
        ( resid 10 and name C ) 1 -68.1 11.7 2
assign ( resid 11 and name C )
        ( resid 12 and name N )
        ( resid 12 and name CA ) % \left( {\left( {\left( {r_{\rm s}} \right)} \right)^2} \right)
        ( resid 12 and name C ) 1 -79.0 12.0 2
assign ( resid 12 and name C ) % \left( {\left( {\left( {r_{\rm c}} \right)} \right)} \right)
        ( resid 13 and name N )
        ( resid 13 and name CA )
        ( resid 13 and name C ) 1 -68.1 11.7 2
( resid 14 and name N )
        ( resid 14 and name CA )
        ( resid 14 and name C ) 1 -73.5 11.7 2
assign ( resid 14 and name C )
        ( resid 15 and name N ) \,
        ( resid 15 and name CA )
        ( resid 15 and name C ) 1 –71.2 11.7 2
assign ( resid 15 and name C )
        ( resid 16 and name N ) % \left( \left( {{\left( {{r_{\rm{s}}} \right)} \right)_{\rm{s}}} \right)
        ( resid 16 and name CA )
        ( resid 16 and name C ) 1 -71.2 11.7 2
assign ( resid 16 and name C )
        ( resid 17 and name N ) \,
        ( resid 17 and name CA )
        ( resid 17 and name C ) 1 -76.6 11.7 2
assign ( resid 17 and name C )
        ( resid 18 and name \rm N )
        ( resid 18 and name CA )
        ( resid 18 and name C ) 1 -76.6 11.7 2
```

```
assign ( resid 19 and name \mbox{C} )
            ( resid 20 and name N )
             ( resid 20 and name CA )
             ( resid 20 and name C ) 1 –120.0 72.0 2 \,
assign ( resid 20 and name C ) % \left( {\left( {{\left( {{\left( {r_{{\rm{c}}}} \right)} \right)}} \right)} \right)
            ( resid 21 and name N ) \,
             ( resid 21 and name CA )
             ( resid 21 and name C ) 1 –120.0 65.0 2 \,
assign ( resid 21 and name C )
             ( resid 22 and name N ) % \left( \left( {\left( {r_{\rm s}} \right)^2 + \left( {r_{\rm s}} \right)^2 \right) \right)
             ( resid 22 and name CA )
             ( resid 22 and name C ) 1 -120.0 68.0 2 \,
assign ( resid 22 and name C )
            ( resid 23 and name N ) % \left( \left( {\left( {r_{\rm s}} \right)^2 + \left( {r_{\rm s}} \right)^2 \right) \right)
             ( resid 23 and name CA )
             ( resid 23 and name C ) 1 -120.0 70.0 2
assign ( resid 23 and name C )
             ( resid 24 and name N ) \,
             ( resid 24 and name CA )
             ( resid 24 and name C ) 1 -120.0 65.0 2
```

#### 8.4.4 Winkeleinschränkungen von Shaker

```
assign (resid 1 and name C )
  (resid 2 and name N )
  (resid 2 and name CA )
  (resid 2 and name C ) 1 -75.8 70.0 2
assign (resid 3 and name C )
  (resid 4 and name C )
  (resid 4 and name CA )
  (resid 4 and name C ) 1 -86.3 70.0 2
assign ( resid 6 and name C )
  ( resid 7 and name C )
  ( resid 7 and name C ) 1 -79.8 70.0 2
assign ( resid 7 and name C )
  ( resid 7 and name C )
  ( resid 8 and name N )
```

```
( resid 8 and name CA )
         ( resid 8 and name C ) 1 -86.3 70.0 2
assign ( resid 9 and name \ensuremath{\texttt{C}} )
        ( resid 10 and name N )
         ( resid 10 and name CA )
         ( resid 10 and name C ) 1 -79.0\ 70.0\ 2
assign ( resid 11 and name \ensuremath{\texttt{C}} )
        ( resid 12 and name N )
         ( resid 12 and name CA )
         ( resid 12 and name C ) 1 –79.0 70.0 2 \,
assign ( resid 12 and name C ) % \left( {\left( {\left( {r_{\rm c}} \right)} \right)} \right)
        ( resid 13 and name N ) \,
         ( resid 13 and name CA )
         ( resid 13 and name C ) 1 -73.5\ 70.0\ 2
assign ( resid 13 and name C )
        ( resid 14 and name N ) \,
         ( resid 14 and name CA )
         ( resid 14 and name C ) 1 -83.0\ 70.0\ 2
assign ( resid 14 and name C )
         ( resid 15 and name N ) \,
         ( resid 15 and name CA )
         ( resid 15 and name C ) 1 -83.8\ 70.0\ 2
assign ( resid 15 and name C )
        ( resid 16 and name N )
         ( resid 16 and name CA ) % \left( {\left( {{\left( {{\left( {r_{i}} \right)} \right)}} \right)} \right)
         ( resid 16 and name C ) 1 -86.3 70.0 2
assign ( resid 16 and name C )
         ( resid 17 and name N ) \,
         ( resid 17 and name CA )
         ( resid 17 and name C ) 1 -74.3\ 70.0\ 2
assign ( resid 17 and name C ) \,
         ( resid 18 and name N )
         ( resid 18 and name CA )
         ( resid 18 and name C ) 1 -79.8\ 70.0\ 2
assign ( resid 19 and name C )
```

```
( resid 19 and name N )
( resid 19 and name CA )
( resid 20 and name C ) 1 -79.8 70.0 2
```

### 8.5 Software

#### 8.5.1 C-Programm "ZNOISE"

```
name:
                     znoise.c
  author:
                    markus schott
                    o.k.
  status:
  purpose: multipl. Gauss-verteiltes Rauschen auf ser-file
          derived from zdiv.c (w.b.), -f ergibt Standardabweichung
  notes:
#define BUFLEN (2*1024L) /* bytes; 2KB */
#define MAXINT 0xFFFFFFF
#define MAXBYTE 0xFF
#define INT_PREC 0.0001
#define MAX_RAND 65536
#include "crtdef.h"
#include "crtlib.h"
#include "filelib.h"
#include "zlib.h"
#include <malloc.h>
#include <stdio.h>
#include <string.h>
#include <math.h>
double sig;
double gauss(int idum) /* erzeugt gauss-verteilte Zufallszahlen */
/* int *idum; */
{
      static int iset=0;
      static double gset;
      double fac,r,v1,v2;
      srand(idum);
      if (iset == 0) {
            do {
                  v1 = 2.0 * (double)drand48() - 1.0;
                  v2 = 2.0 * (double)drand48() - 1.0;
```

```
r = v1*v1 + v2*v2;
               } while (r >= 1.0);
               fac = sqrt(-2.0*log(r)/r);
               gset = (v1*fac*sig)+1; /* *sig Standardabweichung */
               iset = 1;
              return (v2*fac*sig)+1; /* +1 damit Verteilung um 1 */
       } else {
              iset = 0;
              return gset;
       }
} /* gauss */
main(argc,argv)
int argc;
char *argv[];
{
       register int *pi,*endi;
  register char *pc,*qc,*endc;
            int nb,h,fdin1,fdin2,fdout,inid1,inid2,outid,fs1,fs2,res,mam;
           char *buf1,*buf2,*buffer1,*buffer2;
           char mustreaddbl=FALSE,flag = FALSE,intcmp=TRUE,use_DIO = YES;
           char f1_name[80],f2_name[80],desc[80];
           long t;
                       unsigned nbu;
         double delta,gs;
  printf("\n\n\n%s: adds tl-noise to ser-file after inversion\n\n",*argv);
  printf("USAGE: znoise [-f sig] serIN serOUT\n");
  printf("\"-f sig\": Standardabweichung Sigma (default 0.5)\n");
       printf("\n");
  *f1_name = *f2_name = '\0';
       sig = 0.5; /* default sigma Standardabweichung */
  /* scan args */
       mustreaddbl = FALSE;
  while (--argc) {
    argv++;
              if (mustreaddbl) {
                      /* read arg for "-f" option */
                      res=sscanf(*argv,"%lf",&sig);
                      if (res != 1) {
                             printf("invalid arg: %s\n",*argv);
                             return(2);
```

```
}
                   mustreaddbl = FALSE;
            }
 else if (!strcmp(*argv,"-f")) { /* -f option followed by float */
   mustreaddbl = TRUE;
            }
 else if (! *f1_name) strcpy(f1_name,*argv);
 else if (! *f2_name) strcpy(f2_name,*argv);
} /* all args */
     /* open files */
while ((h=open_file(&fdin1,&inid1,f1_name,&fs1,DEFPATH,&use_DIO,desc,NO)) < 0)</pre>
 *f1_name = '\0';
use_DIO = TRUE;
while ((h=open_out(&fdout,&outid,f2_name,DEFPATH,updiv(fs1,1024),
      use_DIO,NO)) < 0) *f2_name = '\0';
if (h) return(-1); /* abort */
/* number of points to work on */
nb = Min(fs1,BUFLEN);
nbu = (unsigned)(nb + BLKSZ);
/* allocate buffers */
if ((buffer1 = (char *)malloc(nbu)) == (char *)NULL)
 { printf("Cannot allocate %d bytes! Aborted.\n",nbu); return(-1); }
/* pointer alignment within I/O buffers */
buf1 = (char *)(((int)buffer1+BLOCKSIZE-1)&~(BLOCKSIZE-1));
/* let's go */
printf("\n Please wait ...\r"); fflush(stdout);
 while (fs1 > 0) {
   nb = Min(fsl, nb);
   READ(fdin1,buf1,nb);
                   pi = (int *)buf1;
                   gs = gauss(fs1 + pi); /* Rauschen */
    endi = pi + (nb / sizeof(int));
    while (pi != endi) {
         *pi = *pi * gs;
      pi++;
    }
    WRITE(fdout,bufl,nb);
```

```
/* EXEC(write(fdout,(char *)bufl,nb)) */
fsl -= nb;
    /* printf(" %5d\r",fsl >> 10); fflush(stdout); */
}
/* if (flag) printf("Division by zero occured!\n"); */
return(0);
} /* m a i n */
```

### 8.5.2 C-Programm "ZNORM"

```
filename:
                     znorm.c
  author:
                     Markus Schott
  prog-type:
                    standalone
  status:
                    final
  purpose:
                program to normalize elements in a ser-file
                  especially written to handle TPPI mode
                  >> t1-Rauschbefreiung <<
                        size of ser-file unlimited
  notes:
                  -->
                                                  <--
*****
/* submatrix dimensions in ints; MUST be multiples of 4! */
#define MAX_MUL_SNP 512 /* for multi blocks !!! only 256...512 !!! */
#define MAX_SNP 1024 /* for single block !!! only 256...1024 !!! */
#include "crtdef.h"
#include "crtlib.h"
#include "filelib.h"
#include "zlib.h"
#include "zaclib.h"
#include <values.h>
                  /* for MAXINT */
#include <string.h>
#include <stdio.h>
int main(argc,argv)
int argc;
char *argv[];
{
     char use_DIO = NO,
         mustreaddbl = FALSE,
          multi,
                      /* file contains several subblocks ? */
          is_tppi = NO, /* perform sign changes for TPPI ? */
          ans[10],infile[80],outfile[80],desc[80];
      int *buffer1,*buf1, /* main data buffer */
```

```
*buffer2,*buf2, /* second data buffer */
                           /* input file */
            fdin,
            fdout,
                           /* output file */
            inid,outid,
                           /* inode IDs input/output */
            cbl,cb2,
                           /* current subblock counters */
                           /* points per subblock side */
            snp,
            snpi,
                           /* bytes per subblock side */
            nsubs,
                           /* subblocks per matrix side */
                           /* TD dimensions of ser-file */
            n1,n2,
           h,
                           /* points per side of matrix; effective TD */
            np,
                            /* length of no[] */
            top,
            mult_bl(),norm_bl(),normalize();
                           /* filesize in bytes */
      long fs;
  unsigned nbu;
                           /* size of buffer in bytes */
   double *no;
                            /* array holding normalization values */
  printf("%s : reducing t1-noise\n\n",*argv);
  printf("USAGE: znorm serIN serOUT\n\n\n");
  *infile = *outfile = '\0';
  /* scan args */
  while (--argc) {
   argv++;
   if (! *infile) strcpy(infile,*argv);
   else if (! *outfile) strcpy(outfile,*argv);
  } /* all args */
#ifdef DEBUG
       printf("vor open_file\n");
#endif
 while ((h=open_file(&fdin,&inid,infile,&fs,DEFPATH,&use_DIO,desc,NO)) < 0)</pre>
                                                                                     *infile =
'\0';
 if (h) return(-1); /* abort */
#ifdef DEBUG
       printf("vor readdims\n");
#endif
if (readdims(infile,&n1,&n2,NO,YES) < 0) return(-1);</pre>
/* no. of blocks to allocate is fs/1024 KB */
 use_DIO = NO;
  if (open_out(&fdout,&outid,outfile,DEFPATH,fs/1024,use_DIO,NO) != 0) return(-1);
```

```
/* is ser-file in TPPI mode? */
 if (argc) {
   argc--; ++argv;
    *ans = toupper(**argv);
   printf("ser-file in TPPI mode: %c\n",*ans);
 }
 else getstr("ser-file in TPPI mode",ans,"N",0,4,CNV_U | DF_STR);
 is_tppi = (*ans == 'Y');
 printf("\n");
/* parameter init */
 /\,{}^{\star} working dimensions may be smaller than data dimensions {}^{\star}/
 np = Min(n1, n2);
 if (n1 != n2)
   printf("truncating dimensions to %d x %d!!\n",np,np);
 multi = (np > MAX_SNP); /* needs 2 buffers */
 if (multi)
   snp = Min(np,MAX_MUL_SNP);
 else
   snp = Min(np,MAX_SNP);
 nsubs = np / snp;
 snpi = snp * sizeof(int);
 /* allocate buffers */
 nbu = (unsigned)(snp*snpi); /* buffer size in bytes */
 if ((buffer1 = (int *)malloc(nbu + BLKSZ)) == (int *)NULL)
   { (void)printf("Cannot allocate %u bytes! Aborted.\n",nbu); EXIT(errno); }
 if ((buffer2 = (int *)malloc(nbu + BLKSZ)) == (int *)NULL)
    { (void)printf("Cannot allocate %u bytes! Aborted.\n",nbu); EXIT(errno); }
       /* pointer alignment within buffer */
 buf1 = (int *)(((int)buffer1+BLOCKSIZE-1)&~(BLOCKSIZE-1));
 buf2 = (int *)(((int)buffer2+BLOCKSIZE-1)&~(BLOCKSIZE-1));
 /* allocate buffer holding normalization values */
 top = np;
 nbu = top * sizeof(double);
 if ((no = (double *)malloc(nbu)) == (double *)NULL)
    { (void)printf("Cannot allocate %u bytes for no[]!\n",nbu); EXIT(errno); }
#ifdef DEBUG
       printf("vor let's go\n");
#endif
```

```
/* let's go */
  /* 1. collect normalization values */
  /* from row 0 and col 0 */
  (void)printf("will collect:\n");
  cb1 = 0;
  for (cb2=0;cb2 < nsubs;cb2++) {
       EXEC(read_bl(buf1,buf1,snp,n2,cb1,cb2,nsubs,fdin))
    if (cb1 != cb2) {
       EXEC(read_bl(buf2,buf2,snp,n2,cb2,cb1,nsubs,fdin))
        EXEC(norm_bl(no,buf1,buf2,snp,cb1,cb2))
       }
    else
        EXEC(norm_bl(no,buf1,buf1,snp,cb1,cb2))
    (void)printf("\n");
}
  /* 2. multiply data with normalization values */
  (void)printf("will multiply:\n");
  for (cbl=0;cbl < nsubs;cbl++) {</pre>
    for (cb2=0;cb2 < nsubs;cb2++) {
       EXEC(read_bl(buf1, buf1, snp, n2, cb1, cb2, nsubs, fdin))
       EXEC(mult_bl(no,buf1,snp,cb1,cb2))
        EXEC(write_bl(buf1,snp,n2,cb1,cb2,fdout))
      (void)printf("\n");
    }
  }
  return(0);
} /* main */
int mult_bl(no,buf1,snp,cb1,cb2)
double *no;
int *buf1,snp,cb1,cb2;
{
  /* process one block at bufl of snp*snp elements */
  /* ASSUMING THAT SNP IS A MULTIPLE OF 4 */
  /* row (abs.) = cbl*snp ... (cbl+1)*snp - 1 */
  /* col (abs.) = cb2*snp ... (cb2+1)*snp - 1 */
     register int *s,*eoln;
  register double *n;
                   /* absolute row + column numbers: */
              int row,abs_row = cb1*snp,abs_col = cb2*snp;
```

```
(void)printf("multiplying,\n"); fflush(stdout);
n = no + abs_col;
  for (row=0;row < snp;row++) {</pre>
    /* (void)printf("n %d *n %d count %d\n",n,*n,count); */
    s = buf1 + row*snp;
    eoln = buf1 + (row + 1)*snp;
    while (s < eoln) {
         /* if (row > 35) {
        (void)printf("NORM s %d row %d n %d *s %d",s-bufl-row*snp,row,*n,*s);
         } */
        *s *= *n;
        /* if (row > 35) {
         (void)printf(" *sn %d\n",*s);
         } */
       s++;
    }
    n++;
     /* (void)printf("NORM s %d row %d *n %d *s %d\n",s-bufl-row*snp,row,*n,*s); */
  } /* all rows */
  return(0);
} /* mult_bl() */
int norm_bl(no,buf1,buf2,snp,cb1,cb2)
double *no;
   int *buf1,*buf2,snp,cb1,cb2;
{
  /* process two blocks at buf1/buf2 of snp*snp elements each */
  /* ASSUMING THAT SNP IS A MULTIPLE OF 4 */
  /* row (abs.) = cbl*snp ... (cbl+1)*snp - 1 */
  /* col (abs.) = cb2*snp ... (cb2+1)*snp - 1 */
    register int *s,*d,*eoln;
  register double *n;
                   /* absolute row + column numbers: */
              int abs_row = cb1*snp,abs_col = cb2*snp;
  (void)printf("norming\n"); fflush(stdout);
  n = no + abs_col;
  s = buf1; d = buf2; eoln = buf1 + snp;
  while (s < eoln) {</pre>
        if ((d) && (*d != 0)) *n = ((double)*s / 1);
```

```
else *n = 1; /* *d */
    /* (void)printf("NORM s %d *n %d n %d\n",s,*n,n); */
    /* next pair */
    /* (void)printf("s %d \n",s-bufl); */
    s++; d += snp; n++;
return(0);
}    /* norm_bl() */
```

### 8.5.3 C-Programm "PNORM"

```
filename:
                    pnorm.c
  author:
                    Markus Schott /AG
                   standalone
  prog-type:
  status:
                  in Entwicklung
               t1-Rauschbefreiung, incl. Rauscherzeugung, etc.
  notes: Vorzeichenumwandlung erzeugt simultane ser files von zsim
#include <stdlib.h>
#include <stdio.h>
#include <string.h>
#include <math.h>
#include "byteorder.h"
#define DIM 1024
#define ORDER motorola
#define HIER fprintf(stderr, "reached line %d in %s\n", __LINE__, __FILE__);
double gauss(int idum, double sig) /* erzeugt gauss-verteilte Zufallszahlen */
/* int *idum; */
{
      static int iset=0;
      static double gset;
      double fac,r,v1,v2;
      srand(idum);
     if (iset == 0) {
            do {
                  v1 = 2.0 * (double)drand48() - 1.0;
                  v2 = 2.0 * (double)drand48() - 1.0;
```

```
r = v1*v1 + v2*v2;
               } while (r >= 1.0);
               fac = sqrt(-2.0*log(r)/r);
               gset = (v1*fac*sig); /* sig Standardabweichung */
               iset = 1;
               return (v2*fac*sig);
       } else {
               iset = 0;
               return gset;
       }
} /* gauss */
int SpectFehler(int data[DIM][DIM]) /* mult. Fehler auf jeden Datenpunkt */
{
   int zeile, spalte;
   for(zeile = 0; zeile < DIM; zeile++)</pre>
     double fehler = 0.1 * exp(-gauss(1, 1)); /* je groesser der Faktor desto weniger Rau-
schen */
      if(zeile == 0) fehler = 1;
      for(spalte = 0; spalte < DIM; spalte++) data[zeile][spalte] *= fehler;</pre>
      printf("Fehler %d: %f\n", zeile, fehler);
   }
   return(0);
} /* SpectFehler */
int SpectFehlerFrei(int data[DIM][DIM]) /* Hauptroutine */
{
   int zeile, spalte;
   double norm[DIM];
   norm[0] = 1;
   for(zeile = 1; zeile < DIM; zeile++)</pre>
   {
      int k = 0;
      while((data[zeile][k] == 0 || data[k][zeile] == 0) && k < zeile) k++;</pre>
      if(k < zeile)
         norm[zeile] = norm[k] * (double)data[k][zeile] / (double)data[zeile][k];
      else norm[zeile] = 1;
/*
      if(zeile %2 == 1)
      {
         double b1 = sqrt((double)data[0][zeile] * (double)data[0][zeile] + (doub-
le)data[0][zeile - 1] * (double)data[0][zeile - 1]);
         double b2 = sqrt((double)data[zeile][0] * (double)data[zeile][0] + (double)data[zeile
- 1][0] * (double)data[zeile - 1][0]);
         norm[zeile - 1] = norm[zeile] = b1 / b2;
```

```
}
*/
      if(norm[zeile] > 1.2) norm[zeile] = 1;
      if(norm[zeile] < 0.9) norm[zeile] = 1;</pre>
      printf("Norm %d: %f\n", zeile, 1 / norm[zeile]);
   }
   for(zeile = 1; zeile < DIM; zeile++)</pre>
   {
      for(spalte = 0; spalte < DIM; spalte++) data[zeile][spalte] *= norm[zeile];</pre>
} /* SpectFehlerFrei */
int SpectDiv(int data[DIM][DIM]) /* um clipping zu verhindern Intensitaet veringern */
{
  int zeile, spalte;
   for(zeile = 0; zeile < DIM; zeile++)</pre>
      for(spalte = 0; spalte < DIM; spalte++) data[zeile][spalte] *= 0.00001;</pre>
   }
   return(0);
} /* SpectDiv */
int SpectVorzeichen(int data[DIM][DIM]) /* macht aus zsim Spekten simultane */
{
   int zeile, spalte;
   for(zeile = 0; zeile < DIM; zeile++)</pre>
   {
      int mod = zeile % 4;
      if(mod == 2 || mod == 3)
         for(spalte = 0; spalte < DIM; spalte++) data[zeile][spalte] *= -1;</pre>
   }
   return(0);
} /* SpectVorzeiche */
int SpectCheck(int data[DIM][DIM])
{
   int zeile, spalte;
   for(zeile = 0; zeile < DIM; zeile++)</pre>
   {
      for(spalte = 0; spalte < zeile; spalte++)</pre>
        if(data[spalte][zeile] != data[zeile][spalte])
            printf("Zeile %d Spalte %d Werte: %d, %d\n", zeile, spalte,
               data[spalte][zeile], data[zeile][spalte]);
```

```
}
} /* SpectCheck */
int SpectPrint(int data[DIM][DIM])
{
   int zeile, spalte;
   for(zeile = 0; zeile < 9; zeile++)</pre>
   {
      for(spalte = 0; spalte < 9; spalte++) printf("%10d", data[zeile][spalte]);</pre>
      printf("\n");
   }
}
int main(int argc, char *argv[])
{
   int data[DIM][DIM];
   FILE *in, *out;
   char name[100];
   tByteOrder order;
   strcpy(name, argv[1]);
   strcat(name, "acqus");
   order = DetermineOrder(name);
   strcpy(name, argv[1]);
   strcat(name, "ser");
   in = fopen(name, "rb");
   ReadOrder(data, sizeof(int), DIM * DIM, in, motorola);
   fclose(in);
/*
   SpectVorzeichen(data);
   SpectCheck(data);
   SpectFehler(data);
   SpectPrint(data);
*/
   SpectDiv(data);
/*
   SpectVorzeichen(data);
*/
   strcpy(name, argv[2]);
   strcat(name, "acqus");
   order = DetermineOrder(name);
   strcpy(name, argv[2]);
   strcat(name, "ser");
```

```
out = fopen(name, "wb");
  WriteOrder(data, sizeof(int), DIM * DIM, in, motorola);
  fclose(out);
/*
  SpectVorzeichen(data);
*/
   SpectFehlerFrei(data);
/*
  SpectCheck(data);
  SpectVorzeichen(data);
*/
   strcpy(name, argv[3]);
  strcat(name, "acqus");
  order = DetermineOrder(name);
   strcpy(name, argv[3]);
  strcat(name, "ser");
  out = fopen(name, "wb");
  WriteOrder(data, sizeof(int), DIM * DIM, in, motorola);
   fclose(out);
  return(0);
}
/* Byteorder: intel bei zsim, motorola bei xwinnmr */
```

Herzlichen Dank an alle, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren. Im besonderen möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die gute wissenschaftliche Betreuung, die stete Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen und die Fülle neuer Ideen und Anregungen,

Herrn Prof. Dr. Josef Bille für die externe Betreuung dieser Arbeit seitens der physikalischen Fakultät und für die Übernahme des zweiten Gutachtens,

Herrn Prof. Dr. Peter Ruppersberg für sein großes Interesse an der NMR-Strukturaufklärung und für die Finanzierung dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Heiner Schirmer für die außergewöhnlich herzliche Aufnahme in die faszinierende Welt der Malaria-Bekämpfung,

Herrn Prof. Dr. Kenneth Holmes für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Biophysik des Max-Planck-Instituts für medizinische Forschung,

Herrn Prof. Dr. Ulrich Haeberlen für die unkomplizierte Integration in seinen Arbeitsbereich und die Möglichkeit der F-Praktikumsbetreuung,

allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für medizinische Forschung für Ihre technische Unterstützung und Hilfe bei allen Fragestellungen, insbesondere Klaus Rohm, Wilfried Barho, Anke Hennemann, Rasmus Schröder und Werner Gebhard.

Ich möchte mich auch bei allen meinen ehemaligen Kollegen in der NMR-Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung für die tolle Zeit und für viele Anregungen, Diskussionen und den gemeinsamen Spaß bedanken. Ein besonderes Dankeschön an Christof Antz für seine Einführung in die Molekulardynamik und die freundschaftliche Unterstützung auch weit über das MPI hinaus, an Adrian Görler für sein gemeinsames Interesse an der Lösung der neusten Computerprobleme, an Harry Kany für seine Bereitschaft als Fahrer bei allen Exkursionen und für sein Geschick am Grill, an Till Maurer für seine außergewöhnliche fachlichen und menschliche Kompetenz, an Jens Freund für seine Hilfsbereitschaft und kompetenten Ratschläge, an Matthias Geyer für seine Unterstützung bei fachlichen Problemen, sowie an Wolfgang Beneicke, Klaus Lienhardt, Marika Hahmann, Anja Schulte, Joerg Bomke, Manfred Müller, Rudi Füchsel, Werner Kremer, Wolfram Gronwald und Jones Wolf für eine unvergessliche Arbeitsatmosphäre.

Danken möchte ich auch Tobias Schwarz für seine tolle Fehlerkorrektur dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber Jacqueline Schorr, ohne die die letzten Jahre nicht möglich gewesen wären.